

200736012B

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、
特に尿道下裂、停留精巢のリスク要因と
内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野

水上 尚典

分担研究者

札幌医科大学医学部産科・周産期科／生殖内分泌科

遠藤 俊明

旭川医科大学医学部産婦人科学講座

石川 睦男

千石 一雄

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座生殖内分泌腫瘍学分野

櫻木 範明

北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座腎泌尿器外科学分野

野々村 克也

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学分野

藤田 正一

星薬科大学薬品分析化学講座

中澤 裕之

福岡県保健環境研究所

飯田 隆雄

梶原 淳睦

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

岸 玲子

佐田 文宏

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. はじめに	1
II. 総括研究報告書 前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明（水上尚典ほか）	2
III. 分担研究報告書	
1. 先天奇形の発生状況、および形態異常のリスク要因についての検討 （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	50
2. 尿道下裂とエストロゲンレセプター遺伝子多型との関連 （岸 玲子、野々村克也ほか）	64
3. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子多型 MTHFR との関連 （岸 玲子、野々村克也ほか）	73
4. 唇裂口蓋裂のリスク要因に関する文献的研究 （岸 玲子）	78
5. 妊婦の血清葉酸値が児の子宮内発育遅延などの発育に及ぼす影響 （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	83
6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	89
7. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響 （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	95
8. 妊婦の葉酸摂取と血清葉酸値及び児の出生体重 （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	101
9. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が児の体格に及ぼす影響（新生児を対象に） （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	113
10. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が児の体格に及ぼす影響（乳児を対象に） （水上尚典、岸 玲子、遠藤俊明、石川睦男、千石一雄ほか）	122
11. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究 （岸 玲子）	130
12. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連 （岸 玲子、中澤裕之ほか）	134

13. 母体血中PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の検討 (岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	139
14. 母体血中ダイオキシン類濃度と出生体重およびSGAとの関連 (岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	144
15. 母体血PCB・ダイオキシン類と臍帯血IgEとの関連 (岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	152
16. マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB濃度との関連 (岸 玲子、藤田正一、飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	159
17. 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との関連について (岸 玲子、飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	166
18. オンライン固相抽出ー液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計を利用した ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影響の検討 (中澤裕之ほか)	174
19. 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いた ヒト母乳中有機フッ素化合物の分析 (中澤裕之ほか)	184
20. ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析およびPFCs移行性に関する研究 (中澤裕之ほか)	188
21. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB類濃度(2002-2004年採取検体を 対象として) (飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	191
22. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB類濃度(出産と加齢による影響) (飯田隆雄、梶原淳睦ほか)	202
23. 尿道下裂修復術の長期予後に関する研究ー排尿症状に関する検討ー (野々村克也ほか)	212
24. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究 (野々村克也ほか)	216
25. 尿道下裂形成術後の下部尿路機能 (野々村克也ほか)	221
26. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究(CYP1ファミリー) (藤田正一ほか)	224

27. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究(CYP1ファミリー以外のP450分子種) (藤田正一ほか)	229
28. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究(複合汚染に対するバイオマーカー) (藤田正一ほか)	235
29. 新生児に対するフタル酸エステルの曝露に関する検討 (水上尚典ほか)	240
30. 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子多型と胎児発育遅延 (岸 玲子、佐田文宏)	244
31. 早産, 低出生体重, 子宮内発育遅延と IL-1A, IL-1B 遺伝子多型との関連 (岸 玲子、佐田文宏)	249
32. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型 (佐田文宏)	254
33. ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究 (MEI1について) (石川睦男、千石一雄ほか)	259
34. ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究 (FKBP6について) (石川睦男、千石一雄ほか)	262
35. ヒト無精子症と化学物質に関する研究 (石川睦男、千石一雄ほか)	265
36. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin(TCDD)の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究 (遠藤俊明ほか)	272
37. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究 (遠藤俊明ほか)	275
38. IgG avidity と PCR 法を用いた先天性トキソプラズマ症の管理 (水上尚典ほか)	277
39. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発 (櫻木範明ほか)	283

I はじめに

平成 17 年度より新規研究として開始した厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明」の主任研究者として旧課題研究を引き継ぎ、研究開始から6年目を終了することができました。

尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、最近増加しているとの報告が発表されていますが、日本では、地域の一定集団で発生率やリスク要因を評価することがいまだなされていません。本研究の特徴は、諸外国でもこれまでほとんど実施されていなかった妊娠早期（胎児期）からの前向きコホート研究の形で実施されていることです。

これまで内分泌かく乱物質の次世代への直接的な影響と因果関係は、ほとんど解明されていません。そこで本研究では、北海道各地の産婦人科の皆様方の御協力を得て、妊娠初期に説明と同意を得た妊婦さんから採血し、葉酸と予備的にダイオキシン類および有機フッ素系化合物の測定を行いました。また、母体血中や臍帯血中の PCB 類、農薬、フタル酸エステル類などの環境汚染物質を分析測定し、アウトカムである出産時の児の異常の有無や胎児発育への影響を研究して参りました。今後も、生後数年間、児を追跡することにより更に詳細な研究を進め、アレルギー発症への影響についても検討する予定です。

加えて化学物質の個体への影響の強弱については曝露された個体の異物（薬物）代謝酵素類の遺伝的多型にも影響を受けることが考えられ、この点についてもダイオキシンや喫煙などについて検討してきました。このような研究は、同じ曝露濃度でもハイリスク感受性者には、より予防的な対応を進めるという意味で重要であろうと考えます。

本研究は北海道内広範囲に分布する産婦人科医療機関の御協力が進められています。平成 19 年 10 月末までに全道から約 14,500 名の妊婦さん方が本研究に参加しております。今回の調査により多くの生児人口がカバーされれば、その地域集団での発生率の推移や地理的分布も分かります。日本ではごく一部の地域を除いて、地域ベースの先天異常モニタリングシステムはありませんが、北海道で、今回のように予防医学（公衆衛生学）と臨床医学（産科、泌尿器科、小児科など）が共同で進めるこのような協力体制を続けることができましたならば、将来は、生まれてくる児の早期医療など、予防医学的アプローチと QOL を一層高める方向でも種々の発展が可能になることと思われまます。

最後に、多くの皆様の御協力により実施され、本年度報告書をこのようにまとめることができたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成 20 年 3 月
主任研究者 水上 尚典

前向きコホート研究による先天異常モニタリング、
特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明

主任研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野教授

研究要旨

本研究は、わが国においても、諸外国においてもこれまでほとんど実施されていなかった妊婦を対象にした前向きコホート研究を行い、妊娠中の妊婦への内分泌かく乱物質等の曝露が、胎児へどのような影響を及ぼすかを解明し、予防に役立てることを目的としている。前向き研究の形で、妊娠初期の12週までに、同意を得た妊婦から採血し、PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物など内分泌かく乱物質の濃度を測定し、アウトカムである出産時点での児への影響（先天異常の有無など）を確認することにより、内分泌かく乱物質と尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常との直接的な因果関係を評価することが可能になる。本研究を進めるのに際し、（1）マーカー奇形の選定と手引き書・新生児個票の作成、（2）妊婦への説明・同意書、医療機関に対する趣意書の作成、（3）調査票の作成、（4）採血スピッツの選定と汚染状況の確認、（5）妊婦からの採血・調査票回収、（6）化学物質の新規高感度分析手法の構築、及び（7）遺伝的感受性解析用DNAマイクロアレイの開発等を行った。

平成15年2月から平成20年1月までの本研究への参加妊婦数は、累計12686人であった。このうち、平成15年1月から平成19年10月までにコホートに参加し子どもの出産前後の情報を記載した新生児個票のある10913名を対象として、先天奇形の頻度、内容を調査したところ、先天奇形のある児は231名、先天奇形総数は281、先天奇形児の出産頻度は2.12%であった。これは、日本産婦人科医会先天異常モニタリング（JAOG）に比べると、形態異常を有する子どもの出産頻度が高く、胎児期、新生児期に問題となる重篤な奇形は少なく、病院ベース調査であるJAOGに対して地域ベースの特徴を反映した結果であった。また、平成15年1月より平成18年12月までに本研究に参加し、自記式調査票に記入した妊娠初期の妊婦9746名を対象として、妊婦の基本的属性や妊娠前後の生活習慣などを先天奇形のリスク要因として検討したところ、妊婦の日常薬使用による先天奇形のオッズ比が有意に上昇し（OR = 2.15; 95% CI = 1.01-4.55）、催奇形性薬剤そのものの作用、あるいは薬物治療を要する疾患あるいは疾患重症度が発症に関与している可能性が考えられた。

平成17年9月までに本調査に同意のうえ参加され、出産を終えた妊婦3362人を対象として、血清葉酸値を四分位に分け、中央値を含む7.1-8.7 ng/mlの群と比較すると、2.5-5.7 ng/mlの群において、有意に出生体重の低下と関連していた（ $p = 0.005$ ）。サプリメント非服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について解析を行ったところ、血清葉酸値が低い群（2.5-5.7 ng/ml）において低出生体重と有意な関連が認められた（ $p = 0.017$ ）。また、葉酸サプリメント服用者における血清葉酸値が出生体重に及ぼす影響について解析を行ったところ、有意な関連は見られなかった。このことから、サプリメント服用により低出生体重に与える影響が低くなることが示唆された。

パーフルオロ化合物（PFCs）は難分解性・蓄積性であり、ヒト血液からも高頻度に検出される。

また、最近では PFCs の母乳移行性についても示唆され、子どもに及ぼす影響が危惧されている。本研究では、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いてヒト血液中 PFCs の高感度分析法を構築し、ヒト母体血(n=447)の分析を行った。また、母体血と同一個人から採取した臍帯血、母乳についても分析を行い、母体血から臍帯血および母乳中への PFCs 移行性について評価した。その結果、母体血、臍帯血および母乳すべての検体から PFOS が検出された。臍帯血の分析結果は、PFCs が母体血から胎盤を介して臍帯血に移行すると示唆しており、子どもは胎児期から PFCs に暴露していると考えられた。また、母乳中の PFCs 濃度は臍帯血と比較してごく微量であったが、母乳は授乳期に母体から大量に分泌され、乳児が毎日摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児の PFCs 暴露量の推定を行うことが重要であると考えられた。また、PFOS・PFOA 濃度と出生時体格の関連を調べたところ、PFOS と出生時体重で有意な負の相関が得られた ($p = 0.033$)。

血液及び母乳中のダイオキシン類分析のため最新の技術と機器を導入し、血液 5g、母乳 2g からダイオキシン類及び PCB 類濃度を正確に測定した。母体血（2002 年 99 名、2003 年 100 名、2004 年 70 名、2005 年 100 名）と母乳（2004 年 60 名分）を採取し、血液及び母乳中のダイオキシン類濃度（PCDDs 7 種、PCDFs 10 種、ノンオルソ-PCB 4 種、モノオルソ-PCB 8 種 合計 29 種）および PCB 類（70 種）濃度を異性体別に測定した。その結果、母体血中ダイオキシン類平均濃度は 18.1 pg TEQ/g lipid、総 PCB 類濃度は 438.1 pg/g であり、母乳中ダイオキシン類平均濃度は 13.7 pg TEQ/g lipid、総 PCB 類濃度は 4,084.9 pg/g であった。また、2003 年から 2005 年までに分析した 195 名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度に対する出産と加齢の影響を統計学的に解析し検証した結果、経産婦は初産婦より血中ダイオキシン濃度が 20%低いと推察された。また、年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度も有意に上昇した。さらに、他地域と比較して低濃度のバックグラウンドレベルである本研究の対象者においても、PCDFs 類による出生体重への有意な負の影響 ($p < 0.001$) ならびに PCDDs/PCDFs による SGA への負の影響(OR = 1.72, $P = 0.009$)がみられたことから、ダイオキシン類による次世代影響が懸念された。血中コチニンバイオマーカーとして、その妥当性を検証するとともに、妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類との関連について調べた結果、喫煙者では非喫煙者と比較して、血中 Total non-ortho PCBs、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ が、それぞれ有意に低いことが明らかになった（それぞれ β (SD), P 値 = -12.466 (5.712), $P = 0.030$; -0.952 (0.362), $P = 0.009$; -1.171 (0.517), $P = 0.024$)。その結果、高環境的喫煙群では、低環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/DFs TEQ、Total TEQ が有意に低いこと（それぞれ β (SD) = -9.826 (4.691), $P = 0.049$; β (SD) = -0.460 (0.205), $P = 0.026$; β (SD) = -1.173 (0.560), $P = 0.037$; β (SD) = -1.794 (0.909), $P = 0.050$) が明らかになった。このことから、今後は妊婦の喫煙習慣だけでなく、周囲の環境も考慮する必要があることが示唆された。

ESR1 の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の遺伝子多型と尿道下裂との関連について調べた。その結果、*ESR1 PvuII*, *XbaI* の C-A haplotype の割合が尿道下裂群で有意に高く ($P = 0.024$)、特に軽症型で高かった ($P = 0.002$)。また、AG genotype ならびに G アレルを有する genotype (AG +GG)の頻度が尿道下裂群で有意に高く（それぞれ OR = 0.55, $P = 0.045$; OR = 0.52, $P = 0.048$)、特に軽症型で高かった（それぞれ OR = 0.37, $P = 0.008$; OR = 0.41,

$P = 0.009$ ）。また、尿道下裂既往のある15歳以上の30症例を対象とし、思春期以降の性腺の状態および内分泌環境を検査することにより、内分泌学的予後を検討した。内分泌学的評価（LH, FSH, テストステロン）および精巣容積の測定を行い、尿道下裂の程度と思春期の内分泌環境、さらに精巣容積との関係を検討した。尿道下裂の程度は遠位型8例、近位型18例、不明4であった。尿道下裂の程度と内分泌の関係では、遠位型尿道下裂8例中2例（低LH 1例、低テストステロン2例、重複あり）、近位型18例中9例（低LH 1例/高LH 6例、低FSH 1例/高FSH 6例、低テストステロン5例、重複あり）に異常を認め、尿道下裂の程度が高度となるほど内分泌異常の頻度が増加していた。また、尿道下裂術後の排尿機能における長期予後は遠位型、近位型に関わらず8割程度の症例で良好であり、下部尿路症状も対照症例と同等であった。

2001～2005年に単胎児を出産した女性412～452名を対象に、COMT Val158Met、IL1A A114S 及び IL1B -511C/T 多型とLBW/IUGR、早産（PTB）との関連を調べたところ、COMTの低活性アリルをホモ接合（Met/Met）に持つ女性のLBWに対するORは2.98（95%CI=1.10-8.11）、IUGRに対するORは2.63/2.57（95%CI=1.14-6.05/0.96-6.88）であった。IL1A A114Sの多型についてはG/T、T/T型のオッズ比がPTBとの関連で2.67、2.49、LBWとの関連で2.23、2.36とそれぞれ上昇した。また、T/T型のみIUGRとの関連で2.88（10パーセントイル）、4.55（-1.5SD）と、オッズ比が上昇した。不育症（習慣流産）症例（ $n=215$ ）、健常経産婦（ $n=420$ ）を対象とし、PAPPA 遺伝子 C3671A 多型と習慣流産との関連を調べた。3671Cアリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられ、特に、少なくとも1回、妊娠9週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した（AA型に対するAC型のOR, 1.54; 95% CI, 0.95-2.49; CC型のOR, 2.83; 95% CI, 1.00-8.05; P trend, 0.02）。

遠藤 俊明

札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内
分泌科 准教授

石川 睦男

旭川医科大学附属病院病院長

千石 一雄

旭川医科大学医学部産婦人科学講座教授

櫻木 範明

北海道大学大学院医学研究科

生殖・発達医学講座

生殖内分泌・腫瘍学分野教授

野々村 克也

北海道大学大学院医学研究科

外科治療学講座泌尿器外科学分野教授

藤田 正一

北海道大学大学院獣医学研究科

毒性学教室教授

中澤 裕之

星薬科大学大学院薬品分析化学教室教授

梶原 淳睦

福岡県保健環境研究所

食品分析化学専門研究員

岸 玲子

北海道大学大学院医学研究科

予防医学講座公衆衛生学分野教授

佐田 文宏

北海道大学大学院医学研究科

予防医学講座公衆衛生学分野助教授

飯田 隆雄

福岡県保健環境研究所保健科学部部長

【研究協力者】

湯浅 資之、吉岡 英治、坂 晋、

金澤 文子、小西 香苗、鷲野 考揚、

渡邊 亜美、イーラ・タマ・アヨ、

西條 泰明、近藤 朋子、森 ゆうこ、
竹田 誠、倉橋 典江、佐々木成子、
加藤 静江、中島そのみ、松澤 重行、
鈴木佳奈、東 倫子、戸屋 真吾

北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学分野

兼元 敏隆

北海道産婦人科医会 会長

山田 秀人

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達
医学講座産科・生殖医学分野

長 和俊、山田 俊、小西 祥平、
太田智佳子

北海道大学病院周産母子センター

馬場 剛、斉藤 豪、林 卓宏

札幌医科大学医学部産婦人科学講座

田熊 直之

旭川医科大学病院周産母子センター

宮本 敏伸

旭川医科大学医学部産婦人科学講座

守屋 仁彦、三井 貴彦

北海道大学大学院医学研究科

外科治療学講座腎泌尿器外科学分野

石塚真由美、

Gihan Game RI Sayed Moustafa

北海道大学大学院獣医学研究科

環境獣医科学講座毒性学教室

斉藤 貢一、伊藤 里恵、岩崎 雄介、
仲田 尚生、勝又 常信、中田 彩子、
手塚 浩子

星薬科大学薬品分析化学教室

平川 博仙、堀 就英、芦塚 由紀、
村田さつき、新谷 依子、小野塚大介、
松枝 隆彦、飛石 和大、安武 大輔

星薬科大学薬品分析化学教室

井上 英

厚生労働省

戸高 尊

九州大学医学部

那須民江、伊藤由起

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛
生学

【研究協力機関】

青葉産婦人科クリニック、秋山記念病院、
旭川医科大学病院、旭川赤十字病院、岩見
沢こども・産婦人科クリニック、遠軽厚生
病院、えんどう桔梗マタニティクリニック、
王子総合病院、帯広協会病院、帯広厚生病
院、北見赤十字病院、北見レディースクリ
ニック、勤医協札幌病院、釧路赤十字病院、
釧路労災病院、慶愛病院、幌南病院、五輪
橋産科婦人科小児科病院、市立札幌病院、
札幌医科大学附属病院、札幌厚生病院、札
幌東豊病院、札幌徳州会病院、市立士別綜
合病院、白石産科婦人科病院、新日鐵室蘭
総合病院、手稲溪仁会病院、天使病院、中
標津町立病院、中村病院、名寄市立総合病
院、日鋼記念病院、市立函館病院、函館五
稜郭病院、函館中央病院、はしもとクリニ
ック、美幌国保病院、朋佑会札幌産科婦人
科、北海道大学病院、公立芽室病院、道立
紋別病院、市立稚内病院（平成20年3月ま
で）

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の多くは、次世代影
響が大きいのが特徴である。今回の研究では、
尿道下裂、停留精巣等の先天異常の疫学研究
を population-based で行い、リスク要因を検
討する。まず発生率そのものが近年、真に増加
しているかどうかを検討する。同時に、前向き
コホート研究で、同意を得られた妊婦を対象
に、妊娠時の母体血、出産時の母体血、臍帯血
を保存し、内分泌かく乱物質（PCB・ダイオキ
シン類、有機フッ素系化合物等）について、濃

度の直接的な曝露量の測定を行い、内分泌かく乱物質と疾患との直接的な関連を追求する。これらの環境要因の検討と同時に、内分泌かく乱物質の代謝に関係の深い薬物代謝酵素等の遺伝子多型についても検討する。このような遺伝子多型による個体の感受性の検討は予防上重要である。

近年、環境要因やライフスタイルの変化が妊娠女性の健康や胎児の発育に及ぼす影響が懸念されているが、これらについての解明は十分とはいえない。また、日本における先天奇形の有病率はほとんどが病院ベースの調査に基づいており、地域の正確な情報が不足している。そこで、北海道地域の前向きコホート研究において種々の先天奇形の有病率を明らかにし、加えて形態異常に対する妊婦の基本的属性や妊娠前後の要因のリスクを検討した。

葉酸は生体内では DNA 合成の際の補酵素として重要であり、またアミノ酸であるホモシステインをメチオニンに転換する過程で重要である。葉酸が欠乏すると高ホモシステイン血症になる。高ホモシステイン血症は流産や胎児発育遅延、胎児奇形の発生との関連も報告されていることから、周産期疾患予防の観点からも、葉酸は重要であると考えられる。近年、欧米を中心とした疫学調査によって妊娠前から妊娠初期の葉酸の十分な摂取が神経管欠損症（NTD）やその他の先天異常（先天性心疾患）に対する予防効果が報告されたことや、葉酸欠乏状態は早産や出生低体重になるリスクが上昇することが報告されている。一方、日本では欧米諸国と比較して二分脊椎の発症率が低いことなどの理由から、これまで関連する疫学調査は行われていなかったが、ICBDMS（国際先天異常監視機構）によると、わが国の二分脊椎の発症率が増加傾向にあることが報告されたことや、今後、わが国の食生活の多様化により、食物摂取の個人格差が

大きくなり、葉酸摂取量が減少していく可能性があることから、日本においても妊娠可能な女性に対しての葉酸摂取は、検討すべき課題であると考えられる。そこで本研究では、葉酸サプリメントの摂取状況、妊娠初期の葉酸値、喫煙、その他の環境要因を指標とする感受性素因と児への影響（出生時体重）との関連の検討を行った。

また、高感度微量測定法で測定した有機フッ素系化合物、PCB・ダイオキシン類、水銀などの曝露指標と異物代謝酵素遺伝子の発現、児の成長への影響の検討を行うとともに、喫煙がPCB・ダイオキシン類などの曝露に与える影響を調べた。また、喫煙や前向きコホート研究と並行して、尿道下裂、停留精巣、不育症（習慣流産）、不妊症に関する症例対照研究・実験研究を行い、疾患リスクに影響を及ぼす要因を検討した。

B. 研究方法

1. 先天異常の発生状況、およびリスク要因についての検討

1. 対象

1) 先天異常の発生状況

平成15年1月から道内の39産科施設に通院中の妊婦で本調査に同意した者を連続的にサンプリングし、現在もリクルートを継続している。平成15年1月から平成19年10月までに新生児個票（子どもを出産（生産または死産、流産）した場合に病院担当者が子どもの属性などを記載した用紙）のある者（10913名）を対象とした。

2) 先天異常のリスク要因の検討

平成15年1月より平成18年12月までに、本研究に参加し、自記式調査票に記入した妊娠初期の妊婦9746名を対象とした。このうち、

新生児個票を回収できた 8376 名（回収率 85.9%）のうち、双胎児を出産した 81 名を除外した 8295 名を解析対象者とした。

2. 方法

1) 先天異常の発生状況

出産後に医療機関で記載された新生児個票を用いて、各先天異常の発生状況を算出した。

2) 先天異常のリスク要因の検討

妊娠初期に自記式質問紙票を用いて、妊婦の基本的属性と妊娠前後の種々の要因を調べた。また、出産後に医療機関で記載された新生児個票を用いて、子どもの基本的属性（性別、出生時在胎週数、出生時体重）、形態異常の有無について情報を得た。これらの情報をもとに、先天異常のリスク要因の検討を行った。

2. 尿道下裂とエストロゲンレセプター遺伝子多型との関連

1. 対象

症例は、2000-2005 年に北海道、埼玉県、愛知県、徳島県の泌尿器科 4 施設で尿道下裂の手術を行った患児 63 名を対象とした。このうち、Klippel-Trenaunay 症候群（1 名）、VATER 症候群（1 名）および混合型性腺不全症候群（2 名）を除いた 59 名を解析対象者とした。また、専門医により、患児の症状を診断し、本研究においては、軽症型 40 名（penile, coronal, glanular）と重症型 19 名（penoscrotal, scrotal, perineal）として、解析を行った。外来受診時あるいは入院治療時に保護者にインフォームドコンセントのうえ、症例から遺伝子多型のための血液を採取した。

対照は、北海道の産婦人科で出生した先天異常を有しない健常男児 286 名を対象とした。母親にインフォームドコンセントのうえ、対照から遺伝子多型のための臍帯血を採取した。

2. 方法

症例と対照の血液から抽出した DNA を用いて、*ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の遺伝子多型を TaqMan 法により判別し、疾患との関連をロジスティック回帰分析を用いて解析した。また、*ESR1* のハプロタイプについては、expectstion-maximization algorithm に基づいて解析した。

3. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子多型 MTHFR との関連

1. 対象

症例は、2000-2004 年に北海道・埼玉県・愛知県・徳島県の泌尿器科 4 施設（大学病院：2、一般病院：2）で尿道下裂の手術の既往のある児 62 人とその母 39 人とし、対照は、北海道内の産婦人科 19 施設で出生した先天異常を持たない男児 233 人とその母 233 人とした。

2. 方法

- ① 自記式質問紙票を用いて、母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、教育歴、時の出生時体重、合併奇形について調べた。
- ② 手術をした泌尿器科医が、尿道下裂の重症度分類を行った。
- ③ 症例の児は手術時に、母は児の入院中に、2 ml の末梢血を採取し、DNA 抽出を行った。また、対照の児は出産時臍帯血を採取し、母は出産時に 2 ml の末梢血を採取し、DNA 抽出を行った。MTHFR の遺伝子多型 C677T、A1298C は、リアルタイム PCR 法で解析した。
- ④ 母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、妊娠中の飲酒、教育歴、世帯収入を調整因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

4. 唇裂口蓋裂リスク要因に関する文献研究

唇裂口蓋裂（OFC）のリスク要因に関する疫学研究を1966年にさかのぼってPubMedを利用して検索した。フィールド限定検索を用いてヒトを対象とする文献のみを対象とした。

5. 妊婦の血清葉酸値が児の子宮内発育遅延などの発育に及ぼす影響

6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について

1. 対象

前向きコホート研究を設定し、平成15年1月から平成16年12月までに北海道の39産科施設に通院中で、本調査に同意を得た妊婦1789人を対象とした。

2. 方法

- ① 妊婦の血清葉酸値の測定は、妊娠初期（13週未満）の血清を用いてCLIA法で測定した。
- ② 自記式質問紙票を用いて、母親の属性（母親の出産時年齢、妊娠前身長、体重、教育歴、既往歴、妊娠初期の喫煙、葉酸サプリメントの摂取）を調べた。さらにまた児の属性については、出産後に医療機関で記載された新生児個票から、新生児性別、在胎週数、出生時体重、奇形の有無の情報を得た。
- ③ 出生時体重と血清葉酸値に関連する因子である母親の出産時年齢、妊娠前body mass index（BMI）、出産経歴、新生児性別、在胎週数、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）を独立変数として重回帰分析を行った。さらに子宮内発育遅延を従属変数とし、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、喫煙、教育歴および妊婦の血清葉酸値（四分位）を共変量として、ロジスティック回帰分析を行った。
- ④ 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因を明

らかにするために、血清葉酸値を従属変数とし、出産歴、妊娠前BMI、出産時年齢、母教育歴、MTHFR C677TとA1298Cを独立変数とし、重回帰分析を行った。さらに、喫煙とMTHFRの組み合わせが児の出生時体重に及ぼす影響については、児の出生時体重と関連する、在胎週数、児性別、出産歴、妊娠前BMIで調整し重回帰分析を行った。

7. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響

本研究は、平成15年11月から平成16年12月までに、妊婦3295人を解析対象とした。妊婦の血清葉酸値測定は妊娠初期（13週未満）の血清800 μ lを用いて、化学発光免疫測定法（CLIA法）で測定した。

妊娠初期（13週未満）に自記式質問紙により質問紙調査を行った。質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。児の属性（新生児性別、在胎週数、出生時体重、奇形の有無）については、出生時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。

妊娠初期の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響を検討するために、児の出生時体重を従属変数とし、在胎週数、児性別、出産時年齢、母親の教育歴、出産歴、妊娠前BMI、妊娠初期喫煙状況、血清葉酸値（四分位）を独立変数とし、変数固定法で重回帰分析を行った。

8. 妊婦の葉酸摂取と血清葉酸値及び児の出生時体重

1. サプリメント服用状況と血清葉酸値について

平成15年1月から平成17年9月までの期間、北海道内41施設の産科外来を受診した妊婦のうち3507人について、サプリメント服用状況

と血清葉酸値との関係を調べた。対象妊婦を、葉酸を含むサプリメント服用状況により、葉酸サプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者、総合ビタミン服用者、両剤服用者（葉酸サプリメントと総合ビタミン服用者）の4群に分類し、葉酸サプリメント服用状況と血清葉酸値について、重回帰分析を行ない、解析を行った。

2. サプリメント服用状況と児の出生体重について

サプリメント服用状況と血清葉酸値についての解析対象者 3507 人のうち、児の出生体重に影響を及ぼす既往歴を持たず、単胎出産の確認ができ、出産情報が得られた 3362 人について、葉酸を含むサプリメント服用状況により、葉酸サプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者、総合ビタミン服用者に分類した。葉酸を含むサプリメント服用状況及び児の出生体重について、Kruskal-Wallis 検定を行った。血清葉酸値と出生体重について対象者全体と葉酸を含むサプリメント非服用者、葉酸サプリメント服用者それぞれについて重回帰分析を行った。

9. 妊婦の血清葉酸値、喫煙及び飲酒が児の体格に及ぼす影響（新生児を対象に）

平成 18 年 8 月までに生後 4 ヶ月時調査に回答した 4584 人を対象とし、妊娠初期（13 週未満）及び生後 4 ヶ月時に自記式質問票により質問紙調査を行った。妊娠初期調査の質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。また、4 ヶ月調査では、出生時の身長、体重、頭囲、胸囲、性別、妊娠経過、母親及び父親の妊娠中の喫煙状況を調査した。在胎週数、奇形の有無等については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情

報を得た。妊婦の血清葉酸値は、妊娠初期（13 週未満）の血清 800 μ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した。

統計解析は、新生児体格と血清葉酸値、喫煙・飲酒状況との関連は、一元配置分散分析、Tukey 検定による多重比較、t 検定（2 群の場合）及び重回帰分析により、低出生体重と血清葉酸値、喫煙・飲酒状況との関連は、ロジスティック回帰分析により行った。

10. 妊婦の血清葉酸値及び喫煙、飲酒が児の体格に及ぼす影響（乳児を対象に）

葉酸サプリメントを摂取せず、単胎児を出産し、平成 18 年 10 月までに生後 1 歳時調査に回答した 2537 人を対象とし、妊娠初期（13 週未満）、生後 4 ヶ月時及び 1 年時に自記式質問票により質問紙調査を実施した。妊娠初期調査の質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。生後 4 ヶ月調査では、出生時の身長、体重、頭囲、胸囲、性別、妊娠経過、母親及び父親の妊娠中の喫煙状況を調査した。また、生後 1 年時調査では、乳児検診時の身長、体重、頭囲、胸囲、栄養方法、健康状態、父母の喫煙状況、アレルギー疾患の既往を調査した。在胎週数、奇形の有無等については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。妊婦の血清葉酸値は、妊娠初期（13 週未満）の血清 800 μ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した。

乳児の体格に関しては、10 ヶ月健診受診者 1076 人を解析対象とした。

統計解析は、乳児の体格と胎児期の母親の血清葉酸値、喫煙・飲酒状況との関連は、一元配置分散分析、Tukey 検定による多重比較、t 検定（2 群の場合）及び重回帰分析により行った。

11. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究

食事調査および、サプリメントによる葉酸の経口摂取量、血液中の葉酸値及び喫煙の食生活に対する影響に注目し、1950年にさかのぼり、MEDLINEにて文献検索し、レビューを行なった。

12. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連

札幌市内において調査協力が得られた産婦人科医院で、妊婦と小児を対象に 2002 年～2005 年に前向きコホート研究を実施した。曝露評価は、妊娠中期から後期に採取した母体血とした。貧血で妊娠中採血できなかった場合、出産後の入院中に血液を採取した。母体血清中の PFOS・PFOA 濃度は、LC/MS/MS 法で測定され、これらの測定は全て星薬科大学薬品分析化学教室で実施された。

447名の母体血中 PFOS・PFOA 濃度が測定されたが、そのうち双胎、妊娠中毒症、糖尿病、高血圧、胎児心不全を除外した 387例にて検討した。母体血中 PFOS・PFOA 濃度を対数変換し、交絡要因を調整し、重回帰分析を行った。なお、PFOA 濃度の検出限界以下に関しては、検出限界の半値 0.25 ng/ml で解析を行った。

13. 母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の検討

対象者は、札幌市の一般病院・産科を受診した妊娠 23 週～35 週の妊婦で、母子 514 組を対照とした。妊婦とその配偶者に対して、既往歴、学歴、経済状況、生活環境、食品摂取状況などに関する質問紙調査を行った。

出産後 1 週間以内に母親の毛髪採取を行い、原子吸光法により総水銀濃度を求めた。

解析には、毛髪水銀データ 430 人、前年度測定した母体血中 PCB 類・ダイオキシン類データ 200 人のデータを用いた。

14. 母体血中ダイオキシン類濃度と出生体重および SGA との関連

対象者は、2002 年 7 月から 2005 年 10 月の間に、札幌市の一般病院・産科を受診した妊娠 23 週～35 週の妊婦で、インフォームドコンセントの得られた母子 514 組である。妊婦とその配偶者に対して、既往歴、学歴、経済状況、生活環境、食品摂取状況などに関する質問紙調査を行った。

出産後 1 週間以内に母親の毛髪採取を行い、原子吸光法により総水銀濃度を求めた。また、PCB 類・ダイオキシン類測定のために、リクルート時に妊婦の採血を行い、高感度 GCMS 法による母体血中 PCDDs、PCDFs、Coplanar-PCBs の濃度測定を行い解析に用いた。

魚の推定摂取量は、毛髪採取の際に行った魚摂取状況調査より、1 日あたりの推定摂取量（g）を算出して、解析に用いた。

解析には、毛髪水銀データ 430 人、母体血中ダイオキシン類測定データ 270 人（内 1 人は異常値を示したため除外）のデータを用いた。両データの揃った対象者は 237 人、どちらか一方のデータがある対象者は 461 人であった。この内、妊娠中に重症の妊娠中毒症、高血圧症、糖尿病であった対象者および新生児心不全の対象者 22 名を除く 439 名を解析対象とした。

母体血中 PCB 類・ダイオキシン類濃度、毛髪水銀濃度と出生体重との関連には重回帰分析を、SGA との関連にはロジスティック回帰分析を、SPSS Ver13.0 を用いて行った。

15. 母体血 PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE との関連

札幌市内において調査協力が得られた産婦人科医院を受診した妊婦のうち、PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE のともにそろった 97 例を対象とし、母体血 PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE との関連を検討した。

16. マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙 と血中ダイオキシン、PCB 濃度との関連

1. 対象

対象者は札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠約 200 名である。リクルート時に自記式調査票にて、喫煙の有無を調べた。また、遺伝子多型判定ならびに血中ダイオキシン、PCB 類濃度を測定するために、血液を採取した。

2. 遺伝子多型判定の妥当性評価

我々は、これまで P450 として CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR γ の 10 遺伝子、28 アレルをスポットした試験版ガラスアレイと Multiplex-PCR 法を用いたマイクロアレイ法を開発した。このマイクロアレイ法の妥当性を、約 200 サンプルについて、遺伝子多型の判別としては信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法を用いた結果から κ 統計量を計算し、一致率の検定を行うことにより、検討した。

3. 各遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、 PCB 類との関連

上記の評価で、妥当と判断した遺伝子ならびに喫煙の有無について、遺伝子多型と血中ダイオキシン、PCB との関連を二元配置分散分析に

より検討した。

17. 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との 関連について

1. 対象

対象者は 2002-2004 年に札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠 23 週-35 週の妊婦である。出産前における血中ダイオキシン類の測定を実施した 254 名のうち、異常値を示したもの（1 名）、血清コチニン値不明者 12 名を除外した 242 名を解析対象者とした。

2. 方法

リクルート時に自記式調査票にて、対象者の基本属性を得るとともに、妊娠中期における喫煙状況（妊娠時に非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙）の情報を得た。また、出産前に採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。また、血清コチニン値を Cozart EIA cotinine Kit (Cozart)を用いた ELISA 法により 2 回測定を行い、平均値を解析に用いた。

18. オンライン固相抽出ー液体クロマトグラフ /タンデム質量分析計を利用したヒト母体血 中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影 響の検討

生体暴露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な分析法を開発し、本法を北海道在中妊婦 447 名の血液の分析に応用し、得られた結果をもとに、次世代への影響について検討した。

19. 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いたヒト母乳中有機フッ素化合物の分析

高感度・選択性を有する高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いてヒト母乳中 PFCs を分析し、母乳栄養による乳児の PFCs 暴露評価を行った。

20. ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析および PFCs 移行性に関する研究

1. オンライン固相抽出-LC/MS/MS 法による血液試料の測定概要

測定装置としては、高感度・高選択性を有する LC/MS/MS を採用した。また、オンライン固相抽出法を用いることにより、簡便かつ迅速な試料前処理が可能となった。前処理手順としては、まず-80℃で凍結保存した血液試料を室温で解凍し、ピペッターで100 μLを量り取る。次に内標準物質を含有したアセトニトリルで除タンパクを行い、遠心分離後の上清をフィルターでろ過し、LC/MS/MS による測定に供した。

2. 固相抽出-LC/MS/MS 法によるヒト母乳中 PFCs の測定概要

母乳は血液と比較して PFCs 濃度が極微量であり、脂溶性の夾雑物質を多く含むため、試料前処理に固相抽出法を採用することとし、Oasis WAX カートリッジを検討した。試料量は5 mLとし、ギ酸で除タンパクした後に固相抽出による精製を行い、50 倍に濃縮して LC/MS/MS で測定した。

21. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB 類濃度(2002-2004 年の採取検体を対象として)

先天異常の疫学研究の基礎資料を得ること

を目的に、母体血(2002年99名、2003年100名、2004年70名、2005年100名)と母乳(2004年60名分)を検査対象とし、妊婦血液及び母乳中のダイオキシン類濃度(PCDDs7種、PCDFs10種、ノンオルソ-PCB4種、モノオルソ-PCB8種、合計29種)及びPCB類(70異性体)を精密に測定し、母体に蓄積されているダイオキシン類及びPCB類濃度の把握と母体から母乳への移行について解析した。

22. 妊婦の血液及び母乳中のダイオキシン類、PCB 類濃度(出産と加齢による影響)

2007年度は母体血56名分と母乳65名分を分析対象とし、ダイオキシン類及びPCB類を、超高感度精密分析法で測定した。分析方法は血液5gまたは母乳2gを秤取後凍結乾燥し、ダイオキシン類及びPCB類の内標準を添加し、高速溶媒抽出器で脂質を抽出した。これをヘキサンに再溶解後、硫酸処理し、硝酸銀シリカゲルカラムおよび活性炭カラムを直結して精製し、ダイオキシン類とPCB等に分離した。ダイオキシン画分は濃縮して溶媒除去大量試料注入装置を装着した高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能マススペクトロメーター(HRGC/HRMS)でPCDDs7種、PCDFs10種、ノンオルソ-PCB4種の合計21種を測定した。

母体中のダイオキシン類濃度の出産および加齢による影響を解析するため、2003年から2005年までに採取し、血中ダイオキシン類濃度を測定した269名の妊婦のうち出産前に採血された195名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度を統計学的に解析した。解析にはSAS社の統計解析ソフトを用いMann-Whitney's *U* testとSpearmanの順位相関係数を計算した。

23. 尿道下裂修復術の長期予後に関する研究－ 排尿症状に関する検討－

尿道下裂症例は、1983年以降に6歳以下で初回手術を施行し、現在18歳以上となった症例で、現在連絡可能であり、了解が得られた33例を症例群とした。対照群は、尿道下裂既往のない18歳以上の男性50例とした。

方法は症例群と対照群に、自己記入式質問表を記入してもらい、郵送にて返却とした。質問表では、現在の排尿症状(尿線の方向・尿勢・頻尿の有無・尿の切れ・排尿姿勢)に対して、質問した。解析はt検定、カイ自乗検定を行った。

24. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

北海道大学病院泌尿器科にて経過観察中の尿道下裂既往のある症例のうち、15歳以上で二次性徴を迎え、評価可能であった30症例を対象とした。

評価は内分泌学的評価(LH, FSH, テストステロン)およびオルキオメーターを用いての精巣容積の測定を行い、尿道下裂の程度と思春期の内分泌環境、さらに精巣容積との関係を検討した。

25. 尿道下裂形成術後の下部尿路機能

1. 北海道大学病院泌尿器科にて6歳以下で初回手術を施行し、現在10歳以上となった尿道下裂症例で尿流量測定、残尿測定を施行した55例を対象とした。

評価は、尿流量測定において、Toguriらのノモグラムより尿流量率をnormal (N): >25パーセント値、equivocal (E): 5-25パーセント値の間、obstruction (O): <5パーセント値、に分類し、評価した。残尿量は、正常を20ml以下または残尿率が25%以下と定義し、

評価を行った。

2. 下部尿路症状に関するアンケートに回答のあった尿道下裂症例21例と対照症例15例(尿道下裂既往のない男性)に対して、国際前立腺スコア(IPSS)、過活動膀胱症状スコア(OABSS)の下部尿路症状に関するアンケートを郵送し、下部尿路症状の有無について検討した。

26. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究 (CYP1ファミリー)

札幌市内病院より妊婦の母体血を採集し、TotalRNAはTriReagent (Sigma-Aldrich)を用いて抽出した。TaqMan Probe (ABI: Applied Biosystem, Inc)を用いて、real-time RT-PCRによってCYP1A1のmRNA発現レベルを測定した。

27. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究(CYP1ファミリー以外のP50分子種に)

血液に恒常的に発現し、AhRリガンドで発現が変動するP450分子種の探索を行った。さらに、ダイオキシン類の分析を行った母体血サンプルについて、これらP450の発現を測定し、新規バイオマーカーの探索を行った。

28. バイオマーカーcytochrome P450に関する研究(複合汚染に対するバイオマーカー)

1. 人の胎盤に発現するCYP1A1

札幌市内病院より妊婦の母体血を採集した。母体血は液体窒素によって凍結し、分析まで-80℃にて保存した。TotalRNAはTriReagent (Sigma-Aldrich)を用いて抽出した。real-time RT-PCRおよびDNAマイクロアレイ法によって、P450やその発現調節因子のmRNA発現レベルを測定した。

なお、RNA を抽出した血液サンプルに蓄積するポリ塩素化ジベンゾダイオキシン (PCDD: polychlorinated dibenzo-p -dioxins)、ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDF: polychlorinated dibenzofurans)、コプラナーPCB (cp-PCB : coplanar polychlorinated bi- phenyls) のダイオキシン類は、福岡県保健環境研究所によって測定された。

2. 複合汚染下でのバイオマーカー

野生のドブネズミは大阪、東京から採集した。汚染亢進地区としてごみ埋立場、汚染の進んでいない地域として北海道離島より溝鼠を採集した。肝臓の脂肪画分から GC-MS を用いて、PCDD、PCDF、co-PCB、DDT などの有機塩素系農薬、ジフェニルエーテルなどの臭素系難燃剤の蓄積濃度を調べた。

また、肝臓より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて、汚染域で変動する遺伝子について検索した。

29. 新生児に対するフタル酸エステルの曝露を評価するため後方視的検討

1. 対象

2001 年から 2005 年までの 5 年間に当院 NICU に入院した児 1613 名のうち、妊娠 35 週未満で出生した 265 名を対象に、出生時から生後 1 ヶ月まで持続的に経鼻あるいは経口より栄養チューブを必要とした児 62 名で検討した。なお生後 1 ヶ月までに輸血を行った児および消化管手術を行った児は除外した。

2. 研究方法

2003 年 4 月以前に塩化ビニル製の栄養チューブを使用していた児を A 群 (n=39)、それ以降 PVC フリーの栄養チューブを使用していた児を B 群 (n=23) に分け、臍帯血および生後 1 か月の凍結保存血清を用いて、フタル酸ジエチ

ルヘキシル (DEHP) の代謝物であるフタル酸モノ 2 エチルヘキシル (MEHP) 濃度を測定し比較検討した。

検査は名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学のご協力で、GC-MS6890/5973N (Agilent technologies 社製) を用い行った。測定条件は以下の通りであった。

HP-5MS 5%phenyl methyl siloxane キャピラリーカラム (長さ 30m×内径 0.25mm×膜厚 0.25 μ m) キャリアーガス: 高純度ヘリウム、初期流量 1ml/分、注入 1min-split、カラム温度 80°C 2 分→20°C/分→260°C 5 分、注入口 Split ratio 50:1、スプリットレス、SIM mode

検体は血清 60 μ l を用い、酢酸エチルによる抽出およびシリル化誘導を行い GC/MS にて特定のイオンのみを拾う SIM モードで測定した。内部標準液として MEHP を重水素置換体したものをを用いた。

3. 統計学的方法

A,B の 2 群間比較、および母乳と MEHP 濃度の関係の検討には Mann-Whitney の U 検定を用いた。また線形回帰解析を用いて生年月日と MEHP 濃度の関係を検討し、Wilcoxon の符合付順位和検定を用いて臍帯血と生後 1 か月の MEHP 濃度の関係を検討した。生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子は、重回帰解析を行い検討した。

なお、 $p < 0.05$ を有意とした。

30. 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子多型と胎児発育遅延

31. 早産、低出生体重、子宮内発育遅延と IL-1A、IL-1B 遺伝子多型との関連

2001～2005 年に北海道大学病院で単胎児を出産し、本研究に参加することに同意の得られた女性 412 および 452 名を対象とした。対象者

の末梢血白血球より DNA を抽出し、allelic discrimination assay によって *COMT* Val158Met、*IL1A*A114S、及び *IL1B*-511C/T 多型の遺伝子型を判定した。この多型と低出生体重 (LBW, 2,500g 未満) と IUGR (10 パーセントイル未満/−1.5 標準偏差 (SD) 未満) との関連をロジスティック回帰分析により解析し、出生体重との関連を重回帰分析により解析した。

32. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白 A 遺伝子多型

北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性 (n=215) を症例、産後外来を受診した健常経産婦 (n=420) を対象とし、症例対照研究を行った。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球から DNA を抽出し、PAPPA 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連をロジスティック回帰分析で解析した。

33. ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究 (MEI1 について)

ヒト MEI1 遺伝子とヒト無精子症の関係を解析するために、アメリカ人患者 13 名及びイスラエル人患者 13 名、計 26 名の患者 DNA を用いて mutation 解析を施行した。mutation 解析により 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4) を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度の差を Fisher's exact test を用いて有意差検定した。

34. ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究 (FKBP6 について)

近年、Fkbp6 遺伝子のノックアウトマウスが

報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子のヒト無精子症への関与を解析した。

35. ヒト無精子症と化学物質に関する研究

1. ヒト FKBP6 の発現様式を解析するために、我々は Clontech 社のヒト成人 cDNA パネル (15 臓器) を鋳型として PCR 法を施行した。
2. 対象は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者 19 名及び正常コントロール 40 名である。本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。全ての患者は染色体異常がないことまたその Y 染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。

3. ヒト FKBP6 の coding region である Exon1 から Exon8 までの隣接するイントロンにプライマーを各々設定し、PCR 法を施行し、ダイレクトシーケンス解析した。

4. 3 にて検出された single nucleotide polymorphism (SNP) において正常コントロール群でも同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。

5. 検出された 2 つの SNP において genomic imprinting の有無を解析するために患者精巣及び正常精巣組織から各々 RNA を抽出し、RT-PCR 法を施行し、それぞれダイレクトシーケンス解析を施行した。

36. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3 を 10% fetal bovine serum 加 RPMI1640 にて培養。単離浮遊細胞を 2 日間培養後、DMSO に溶解した TCDD を濃度 10nM 添加し培養 0, 24, 48 時間後の上清ならびに細胞を回収した。培養細胞の分化程度を決定するため、上清の β -hCG 濃度を測定した。培養細胞を ISOGEN にて処置し、その溶解液から total RNA を採取し、RT-PCR を施行した。細胞溶解から蛋白質を抽出し、GLUT 各種抗体を作用させた。ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体を作用し、 β アクチンを基準に NIH image にて画像解析した。

37. 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

症例は札幌医科大学附属病院婦人科で診断された多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 症例 123 例、対象は北海道大学医学部附属病院を受診した正常産後症例 380 例とした。EDTA を含んだ採血管に末梢血を採血した全血から DNA を抽出し、TaqMan PCR 法で SNP を検出した。PCOS 症例については、身長と体重計測に加え、月経 3-5 日目に採血して Follicle stimulating hormone (FSH)、Luteinizing hormone (LH)、Estradiol、Prolactin、Total testosterone、Free testosterone、Androstenedione、Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、Fasting plasma glucose (FPG)、Fasting insulin (IRI)、Adiponectin 値を測定した。インスリン抵抗性の診断は、homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を用い、 $HOMA-IR \geq 2.0$ をインスリン抵抗性ありと診断した。なお、HOMA-IR の計算式は以下となる： $HOMA-IR = FPG \text{ (mg/dl)} \times IRI \text{ (}\mu$

IU/ml) $\div 405$ 。

また、ホルモン値など臨床パラメーターの比較のため、出産例以外の健常者を新コントロール群として抽出し、PCOS 群と非出産健常コントロール群とで新たに検討することとした。

38. IgG avidity と PCR 法を用いた先天性トキソプラズマ症の管理

前方視的研究として、妊娠初期にトキソプラズマ抗体 (HA) が陽性で、かつ IgM 抗体が陽性の妊婦に対して、同意を得て母体血トキソプラズマ IgG avidity を測定 (IDL) した。また、母体血、羊水、出生時の臍帯血を採取し、PCR 法 (Nested PCR) でトキソプラズマの有無を検討 (札幌ジェネティックラボ) した。新生児感染の有無を調べた。

39. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発

1. 前方視的コホート研究として、自然流産の脱落膜中 CD3-CD56+NK 細胞の perforin、CD94、CD161、CD158a、CD158b、CD244 発現を、および CD8 陽性 T 細胞の perforin 発現をフローサイトメトリー法で解析し、同時に絨毛染色体核型分析を行った。染色体正常流産、異常流産、人工中絶間で比較検討した。

2. Poly(I:C) 誘導の免疫学的生殖不全マウスモデルを作成した。CBA/J \times DBA/2J 妊娠マウスに Poly(I:C) 60-200 μ g を i.p. (Day7) して胎仔吸収率 (流産率) を Day13 に調べた結果、Poly(I:C) 用量依存性に流産率が上昇し、200 μ g i.p. によってプラトーに達し、コントロールの流産率 20% から 55 ± 5 (M \pm SD) % に上昇した ($p < 0.01$)。

このマウスモデルを用いて、免疫グロブリン投与によって、流産率変化を解析した。