

## 倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科及び獣医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえ行った。

## C. 研究結果

### 1. 先天性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

#### 1) 先天異常の発生状況

本コホートの参加者のうち、平成19年10月末までに出産（生産、死産、流産）した妊婦（＝新生児個票が提出された妊婦）10913名のうち、先天異常のあるこどもの総数は231名、形態異常の総数は281（マーカー異常187、その他94）で、先天異常を有する児の出産頻度は2.12%であった。主な先天異常は、先天性心疾患41人、ダウン症候群14人、水腎症14人、口唇口蓋裂11人、停留精巣10人、多指症8人、口蓋裂7人、尿道下裂6人、口唇裂2人などであった。

#### 2) 先天異常のリスク要因の検討

先天異常を有する妊婦と有しない妊婦の属性を比較した結果、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、日常薬を使用している割合が有意に高い結果であった（ $p=0.006$ ）。

また、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、妊娠前における鉄剤摂取を行っている妊婦の割合は、有意に高い結果であった（ $p=0.047$ ）。さらに、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、妊娠中の血清葉酸値が有意に高い値であった（ $p=0.008$ ）。ロジスティック回帰分析の結果、日常薬の使用が有意に先天異常に対するリスクを高めていた（OR = 2.15, 95% CI = 1.01-4.55）。

先天異常を有する妊婦と有しない妊婦との間で、出産時の項目を比較した結果、先天異常を有する妊婦は、有しない妊婦と比較して、有意に在胎週数が短く（ $p < 0.001$ ）、出生体重が低い（ $p < 0.001$ ）結果が得られた。また、先天異常を有する妊婦では、有しない妊婦と比較して、性別判定不能の割合、早産または流産、死産、羊水異常の割合が有意に高かった（それぞれ  $p < 0.001$ ）。

### 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

*ESR1 XbaI* の G アレルならびに G アレルを有する genotype (AG +GG) は、それぞれ尿道下裂と有意な負の関連を示した（それぞれ OR = 0.55,  $P=0.045$ ; OR = 0.52,  $P=0.048$ ）。また、*ESR2 2681-4A>G* について、尿道下裂群における AG genotype ならびに G アレルを有する genotype (AG +GG) の頻度が有意に低い割合であった（それぞれ OR = 0.43,  $P=0.008$ ; OR = 0.50,  $P=0.016$ ）。

C-A haplotype の割合は尿道下裂群で有意に高く（ $P=0.024$ ）、C-G haplotype の割合は対照群で有意に高かった（ $P=0.048$ ）。また、C-A/C-A の組み合わせは他の組み合わせと比較して、有意に尿道下裂と正の関連を示した（OR = 3.07,  $P=0.024$ ）。

*ESR1 PvuII* の CC genotype は軽症型尿道下裂と有意な正の関連を示した（OR = 2.13,  $P=$

0.047)。ESR22681-4A>Gについて、軽症型尿道下裂におけるAG genotypeならびにGアレルを有する genotype (AG +GG)の頻度が有意に低い割合であった（それぞれOR = 0.37,  $P=0.008$ ; OR = 0.41,  $P=0.009$ ）。

C-A haplotype の割合は軽症型尿道下裂で有意に高かったが（ $P=0.002$ ）、重症型ではみられなかった。C-A/C-A の組み合わせの場合、他の組み合わせと比較して、有意に高い軽症型尿道下裂に対するオッズ比を示した（OR = 4.84,  $P=0.002$ ）が重症型ではみられなかった

### 3. 尿道下裂リスクと葉酸代謝遺伝子 MTHFR との関連

#### 1. 基本的属性

症例と対照で、母親の出産時年齢、母親のBMI、教育歴では有意な差は見られなかった。出生時体重は、症例で有意に低く、在胎週数も症例で有意に低かった。

#### 2. 母体要因、児要因のオッズ比

母親の年齢35才以上の割合、母親のBMI25以上の割合、母親の妊娠中の喫煙の有無、母親の教育歴では、では有意な関連は見られなかった。

児の低出生体重で OR=31.3 (95%CI=13.85 - 70.51)、早産で OR=8.0 (95%CI=3.74 - 17.21)と、有意なオッズ比の上昇が見られた。

#### 3. 遺伝子多型オッズ比

母親のMTHFR C677T遺伝子型とA1298C遺伝子型では、有意な関連は見られなかった。児のC677T遺伝子型では677CTの割合が症例で多かったが、有意な関連は見られなかった。A1298C遺伝子型では、母出産時年齢、母親の教育歴、妊娠中の喫煙、出生時体重、在胎週数で調整しても、1298ACで有意なオッズ比の上昇が見られた。

2つの遺伝子の組み合わせでは、児の

677CT/1298ACで症例の割合が高く、有意なオッズ比の上昇が見られた。同様に母親についても解析を行ったが、有意な関連は見られなかった。

### 4. 唇裂口蓋裂リスク要因に関する文献研究

本疾患では、以前は環境要因それぞれの発症リスク評価、染色体異常や奇形症候群の一症状としての検討が研究の中心であった。しかし最近の10年で本疾患の候補遺伝子が次々に明らかにされ、環境要因と遺伝要因の相互作用への研究が進み始めている。また葉酸を含むサプリメントの開発、普及に伴って、これを用いた発症予防の可能性についての研究がさかんになっている。

### 5. 妊婦の血清葉酸値が子宮内発育遅延を含む児の発育に及ぼす影響

#### 1. 基本的属性

初産、経産婦の割合は、ほぼ同じであった。喫煙群は16.0%を占めていた。低出生体重児（出生時体重が2500g未満）128人中34人（7.2%）であり、早産（在胎週数37週未満の出産）の児は、70人（3.9%）、子宮内発育遅延児（mean-1.5SD、厚生労働省ハイリスク母児管理研究班、1983年）であった。

#### 2. 葉酸値と出生時体重との関連

出生児体重を従属変数とし、妊婦の血清葉酸値（四分位）、母親の出産時年齢、妊娠前BMI、教育歴、新生児性別、在胎週数、出産経歴、喫煙を独立変数として、変数固定法で重回帰分析を行った。その結果、喫煙、新生児性別、在胎週数、出産経歴、妊娠前BMIにおいて出生時体重との関連が見られたが、それらの変数を調整しても、葉酸値が5.7ng/ml以下の群と出生時体重との間に負の関連が見られた。

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。

その結果、葉酸値が 5.7ng/ml 以下の群で子宮内発育遅延のオッズ比 2.6（95%CI1.3-5.0）と有意にリスクが上昇した。

## 6. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因について

### 1. 基本的属性

初産、経産婦の割合は、ほぼ同じであった。また喫煙群は、14.8%を占めていた。*MTHFR*C677T多型とA1298C多型はハーディー・ワインバーグ平衡に従っていた。

### 2. 妊婦の血清葉酸値を低下させる要因

妊婦の血清葉酸値は喫煙群と *MTHFR* C677T 多型の変異型 T アリルを持つ群では血清葉酸値と有意な負の関連がみられた。また、出産時年齢及び母親の教育歴と血清葉酸値はそれぞれ有意な正の関連がみられた。

### 3. *MTHFR* 多型の組み合わせが児の出生時体重に及ぼす影響

C677T 多型の野生型ホモ接合非喫煙群と比較して、変異型 T アリルを持つ群では非喫煙群、禁煙群、喫煙群いずれにおいても児の出生時体重に有意な差が見られた。交絡要因と考えられる（児の出生時体重と有意な関連があった）在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI で調整すると、T アリルを持つ群では非喫煙群では正の、喫煙群では負の有意な関連がみられた。A1298C 多型では、多型よりも喫煙が強い影響を及ぼしていた。

## 7. 妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響

全妊婦の血清葉酸値を 4 分位にわけ、全妊婦

の血清葉酸値の平均である 7.3ng/ml を含む群を基準とし、重回帰分析を行ったところ、血清葉酸値 5.6ng/ml 以下の群で児の出生時体重との関連がみられた（ $\beta=-0.062, p=0.004$ ）。在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢、母親の教育歴、母親の妊娠初期喫煙状況を調整してもなお、血清葉酸値 5.7ng/ml 以下の群で児の出生時体重と有意な関連がみられた（ $\beta=-0.042, p=0.02$ ）。

## 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

葉酸を含むサプリメント服用状況と血清葉酸値について、Bonferroni 補正による Mann-Whitney 検定を行った結果、葉酸サプリメント非服用者と比較して葉酸サプリメント服用者及び総合ビタミン服用者、両剤服用者において高値（それぞれ  $p<0.001$ ）であった。また、総合ビタミン服用者は、葉酸サプリメント服用者、両剤服用者と比較して、それぞれ低値（ $p<0.001$ ）であった。

### 2. サプリメント服用状況と児の出生体重について

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。調整後も有意差が見られた。

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、単回帰分析の結果、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。調整後も有意な関連が見られた（ $p=0.017$ ）。

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の単回帰分析結果では、有意な関連は見られなかった。

調整後も有意な関連はみられなかった。

#### 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）

新生児の出生時体重、身長、頭囲、胸囲と血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢との関連を重回帰分析で解析したところ、出生時体重、身長、頭囲、胸囲に関してはいずれも、血清葉酸値最低値群と他のいずれかの群との間に、喫煙群は非喫煙群との間に、飲酒群は非飲酒群との間に有意差がみられた。

低出生体重と血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況との関連をロジスティック回帰分析で解析したところ、禁煙群でのみ有意なリスクの上昇が観察された（オッズ比 1.59, 95%信頼区間 1.02 - 2.48）。

母親の妊娠時喫煙・飲酒状況別の血清葉酸値を Kruskal Wallis 検定で解析したところ、いずれも有意差がみられた。喫煙群、禁煙群の血清葉酸値はいずれも非喫煙群の葉酸値よりも有意に低下し、喫煙群の葉酸値は禁煙群の葉酸値よりも有意に低下していた。一方、飲酒群、禁酒群の血清葉酸値はいずれも非飲酒群の葉酸値よりも有意に上昇していた。

#### 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）

10ヶ月健診受診者を対象に、母親の妊娠初期の血清葉酸値四分位、妊娠時喫煙状況（3群）、妊娠時飲酒状況（3群）における10ヶ月児の体重、体重増加率、身長、身長増加率の群間に差がみられるかを一元配置分散分析で解析したところ、体重は、母親の妊娠初期の血清葉酸値4分位（ $p=0.050$ ）との間に、体重増加率は、血清葉酸値四分位（ $p=0.023$ ）と妊娠時喫煙状況（ $p=0.039$ ）との間に有意差がみられた。特

に、喫煙群の体重増加率は、非喫煙群（ $p<0.01$ ）、禁煙群（ $p<0.05$ ）に比べ有意に増加していた。また、血清葉酸値 7.1～8.6ng/ml 群で、体重、体重増加率、身長増加率が、残りの対象児に比べ有意に増加していた。

10ヶ月児の出生時体重、体重増加率、身長、身長増加率と母親の妊娠初期の血清葉酸値、妊娠時喫煙状況、妊娠時飲酒状況、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢との関連を重回帰分析で解析したところ、体重、体重増加率、身長増加率に関してはいずれも、血清葉酸値 7.1～8.6ng/ml 群と他のいずれかの群との間に有意差がみられた。また、体重増加率に関しては、喫煙群が非喫煙群に比べ増加し、身長に関しては、飲酒群が非飲酒群に減少した。

#### 11. 葉酸の経口摂取状況に関する文献研究

先行研究の対象者の食品による葉酸経口摂取量は  $51.4\mu\text{g/d}\sim 356\mu\text{g/d}$  であった。これら対象者の血清・血漿葉酸濃度は  $2.1\text{ng/ml}\sim 11.9\text{ng/ml}$  であった。血清葉酸値は食事による葉酸経口摂取量が多い方が、血中葉酸値濃度の上昇が見られた。サプリメント投与群の血清・血漿葉酸値は  $7.4\text{ng/ml}\sim 11.24\text{ng/ml}$  であった。葉酸サプリメントを投与した群において、血中葉酸値濃度の上昇が見られた。喫煙群と非喫煙群において、妊娠第1期における血漿葉酸値の平均値は禁煙群で  $12.2\text{nmol/l}$ 、喫煙群  $8.2\text{nmol/l}$ 、妊娠第2期における血漿葉酸値については禁煙群で  $11.1\text{nmol/l}$ 、喫煙群で  $6.4\text{nmol/l}$ 、妊娠第3期における禁煙群の血漿葉酸値は  $12.1\text{nmol/l}$ 、喫煙群では  $4.1\text{nmol/l}$ 、妊娠第4期における血漿葉酸値は禁煙群で  $9.3\text{nmol/l}$ 、喫煙群では  $3.7\text{nmol/l}$  と、全体を通して喫煙群は禁煙群に比べて血漿葉酸値は低下していた。妊婦の年齢や教育歴により、食生活を含む生活習慣の違いがあり、それが葉酸経口摂取量の差として見られた可能性がある。

## 12. 母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連

PFOS・PFOA 濃度と出生時体格の関連を調べるため、母年齢、母学歴、妊娠中喫煙状況、母 BMI、妊娠週数、出産回数（第1子か否か）、児の性にて調整した結果、PFOS と出生時体重で有意な負の相関が得られた ( $p = 0.033$ )。

## 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

毛髪水銀濃度データあるいは母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度データがあった対象者は 456 人であり、解析対象者とした。解析対象者の分娩時年齢は平均で 30.7 歳 ( $SD \pm 4.9$ )、初産婦 220 人 (48.2%)・経産婦 236 人 (51.8%) であった。

本調査対象者の毛髪水銀濃度は、平均 1.5ppm、最小値 0.24ppm、最大値 7.55ppm であった。

母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度と毛髪水銀濃度の関連を重回帰分析にて検討した。Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs、Total において有意な関連がみられた。TEQ においても同様に Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs において有意な関連がみられた。Total PCDDs、Total PCDFs、Total PCDDs/PCDFs においては水銀との関連は見られず、この傾向は TEQ においても同様であった。

また、母体血中 PCB・ダイオキシン類濃度および母親毛髪水銀濃度と魚の推定摂取量との関連を重回帰分析にて検討した。Total Non-ortho PCBs、Total Mono-ortho PCBs、Total Coplanar-PCBs、Total、母親の毛髪水銀濃度において有意な関連がみられた ( $P < 0.01$ )。TEQ においても同様の傾向であった。

## 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

出生体重に与える母体血中ダイオキシン類曝露濃度および毛髪水銀濃度の関連について Table 4 に示した。Total PCDFs ( $\beta = -321.9, p < 0.001$ ) と Total PCDFs TEQ ( $\beta = -269.3, p < 0.05$ ) において、有意に出生体重を減少させる結果であった。毛髪水銀濃度と出生体重との関連は見られなかった。男児と女児に分けてみると、同様の有意な関連は男児においてのみみられた。

SGA に与える母体血中ダイオキシン類濃度の影響について解析したところ、Model I では Total PCDDs (オッズ比: 1.70)、Total PCDFs/PCDDs (オッズ比: 1.72)、Total PCDFs TEQ (オッズ比: 1.70) は、SGA のリスクを上昇させる傾向がうかがえた。一方、母親の毛髪水銀濃度は SGA のリスクを有意に下げる (オッズ: 0.64) 結果であった。毛髪水銀濃度をさらに調整因子として投入した Model II においても、同様の傾向がみられた。

## 15. 母体血 PCB・ダイオキシン類と臍帯血 IgE との関連

PCB・ダイオキシン類など環境化学物質のバックグラウンドレベルの汚染による次世代の小児アレルギー疾患への影響を検討する目的で、母体血中におけるダイオキシン濃度と臍帯血 IgE との関連を検討した結果、全血液中濃度では 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,6,7,8-HxCDF、totalPCDF、T PCDDs-TEQ、T PCDFs-TEQ、T PCDDs/PCDFs-TEQ、Total dioxins TEQ と、血液脂質中濃度では 2,3,7,8-TCDD、total Coplanar PCB、Total dioxins、T PCDDs-TEQ、T PCDDs/PCDFs-TEQ、Total dioxins TEQ にて有意な負の関連が認められた。

## 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. マイクロアレイ法による遺伝子多型判定の妥当性評価

試験版ガラスアレイにスポットした10遺伝子、28アレルのうち、CYP2A6 I471T、NAT2 R197Q、NAT2 G286E、CYP2C19 681G>Aについては、安定した発色を得ることができなかった。CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554Kについては、安定した発色を得ることができたため、信頼性の高いTaqMan法ならびにAllelic discrimination法での結果を比較した。その結果、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554Kについて、（一致率、 $\kappa$ 係数）はそれぞれ（0.97、0.94）、（0.95、0.86）、（0.86、0.66）、（0.93、0.89）であった。

### 2. 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との関連を解析した結果、各血中ダイオキシン類TEQ値（Total PCDDs-TEQ値、Total PCDFs-TEQ値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値）は、喫煙群では、非喫煙群と比較して低い傾向がみられたが、有意な相関ではなかった。また、各血中PCB類TEQ値（Total Nonortho PCBs-TEQ値、Total Monoortho PCBs-TEQ値、Total Coplanar PCBs-TEQ値）ならびにTotal-TEQ値は、喫煙群では非喫煙群と比較して、有意に低い値であった。

また、CYP1A1 I462V遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB類濃度との間には、関連はみられなかった。

次に、CYP1B1 L432V遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB類濃度との相関を調べた結

果、Total PCDDs-TEQ値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値、Total-TEQ値は、有意ではなかったが、（L/V + V/V）型では、L/L型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDFs-TEQ値は、（L/V + V/V）型では、L/L型と比較して有意に低い値であった（L/L:  $1.39 \pm 0.40$ , L/V + V/V:  $1.24 \pm 0.39$ ,  $P = 0.03$ ）。CYP1B1 L432V遺伝子多型と各血中PCB類濃度との間には、関連はみられなかった。

GSTP1 I105V遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB類濃度との相関を調べた結果、Total PCDDs-TEQ値、Total PCDFs-TEQ値、Total-TEQ値は有意ではなかったが、（I/V + V/V）型では、I/I型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値は、（I/V + V/V）型では、I/I型と比較して有意に低い値であった（I/I:  $2.43 \pm 0.38$ , I/V + V/V:  $2.28 \pm 0.46$ ,  $P = 0.04$ ）。GSTP1 I105V遺伝子多型と各血中PCB類濃度との間には、関連はみられなかった。

また、AhR R554K遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB類濃度との間には、関連はみられなかった。

いずれの遺伝子多型においても血中ダイオキシン、PCBに対して、多型と喫煙との間に交互作用はみられなかった。

## 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. 血清コチニン値による喫煙状態の妥当性

本研究の対象者において、血清コチニン値15 ng/mLによる喫煙の分類は妥当であると考え、本研究ではこの分類による喫煙状態（非喫煙者200名、喫煙者42名）を使用した。

### 2. 喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

重回帰分析により、喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた結果、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  $\beta$  (SD),  $P$  値 = -12.466 (5.712),  $P = 0.030$ ; -0.952 (0.362),  $P = 0.009$ ; -1.171 (0.517),  $P = 0.024$ ）。

### 3. 環境的喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

非喫煙群を二分位（低環境的喫煙群 100 名、高環境的喫煙群 100 名）し、喫煙群 42 名を加えた 3 群を用いて、環境的喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた結果、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  $\beta$  (SD) = -9.826 (4.691),  $P = 0.049$ ;  $\beta$  (SD) = -0.460 (0.205),  $P = 0.026$ ;  $\beta$  (SD) = -1.173 (0.560),  $P = 0.037$ ;  $\beta$  (SD) = -1.794 (0.909),  $P = 0.050$ ) が明らかになった。その一方で、喫煙群では、低環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDD/DFs TEQ、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ、Total TEQ（それぞれ  $\beta$  (SD) = -17.319 (6.183),  $P = 0.006$ ;  $\beta$  (SD) = -1.472 (0.738),  $P = 0.047$ ;  $\beta$  (SD) = -1.219 (0.392),  $P = 0.002$ ;  $\beta$  (SD) = -1.496 (0.562),  $P = 0.008$ ;  $\beta$  (SD) = -2.968 (1.199),  $P = 0.014$ ) が有意に低いことが明らかになった。

## 18. オンライン固相抽出—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

### 1. 母体血（血漿）の測定結果

本分析法を用いて、北海道在住妊婦ボランティア 447 名の母体血（血漿）を測定した。PFOS は全ての検体から、PFOA 及び PFNA に関し

てはそれぞれ、93.1%、43.9%の検体から検出された。また、検出範囲は、PFOS は 1.3～16.2 ng/ml、PFOA は N.D. (< 0.5 mg/ml) ～5.2 ng/ml、PFNA は N.D. (< 0.5 ng/ml) ～1.6 ng/ml であった。PFOSA 及び PFDA に関しては、ほとんど検出されることがなく、また検出されても定量限界 (0.5 ng/ml) 付近と極微量であった。

### 2. 次世代影響の検討

血中 PFOS 及び PFOA 濃度と妊娠期間及び新生児の発育との関連性について調査したところ、新生児の発育とは関連性は得られなかったものの、妊娠回数の増加に伴って母体血中 PFOS 及び PFOA 濃度が減少していく傾向が見られた。

## 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

本分析法を用いて北海道在住妊婦ボランティア 41 名の母乳を測定した。血液中の結果と同様に、すべての検体から PFOS が検出された。PFOA については、他の測定対象物質と比較しても検出率が低かったが、これは PFOA が測定環境からのコンタミネーションの影響を受けることから、定量限界を 0.1 ng/ml と高く設定したためと思われる。PFOA の最大値としては、PFOS よりも高い濃度で検出された。また、PFHxS、PFNA については、PFOS、PFOA と比較すると微量レベルであった。

同一人物から採取した母乳及び血液中 PFOS 濃度の関連性について調査したところ、 $r=0.74(n=41)$  という相関性が得られ、母体血の濃度依存的に母乳中濃度が高くなるという傾向が見られた。

## 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 法によるヒト血液中 PFCs の高感度分析法の構築および精度管理

本法による定量限界は、全ての測定対象物質において 0.5 ng/mL と高感度な分析が可能であった。血漿試料を用いた添加回収試験(n=6)においても、平均回収率 93.3%と良好な結果が得られた。また、分析法の安定性および精確性を確保するため、内部および外部精度管理を実施し、いずれにおいても良好な結果が得られたことから、本法の高い安定性および正確性が確認された。

### 2. ヒト母体血中 PFCs の測定結果

本研究で構築したオンライン固相抽出-LC/MS/MS 法により、北海道に居住する妊婦ボランティア 447 名の母体血を測定した。その結果、PFOS は全ての検体から検出され、その濃度範囲は 1.3～16.2 ng/mL であった。また、PFOA についても 93.1%の検体から N.D.～5.3 ng/mL の濃度範囲で検出された。また、妊娠回数が増加に伴って、血中 PFOS および PFOA 濃度が減少していく傾向がみられた。このことより、母体は PFCs に暴露されており、臍帯および母乳を介した子どもへの PFCs 暴露が示唆される。

### 3. 臍帯血、母乳中の PFCs の測定結果および子どもへの移行性評価

ヒト母体血から高頻度に PFCs が検出されたことから、同一個人から採取した臍帯血(n=41)および母乳(n=41)についても測定を行った。その結果、臍帯血においては全ての検体から PFOS および PFOA が検出され、母体血中の濃度と有意な相関性が見られた(PFOS;  $r=0.83$ 、PFOA;  $r=0.87$ )。また、母体血と同一個人から

採取した母乳試料については、固相抽出法-LC/MS/MS 法を用いて測定を行った。その結果、PFOS および PFOA は全ての検体から検出され、その平均値はそれぞれ 71.0 pg/mL、74.6 ng/mL であった。また、臍帯血と同様に、母乳においても、母体血中の濃度と有意な相関性がみられた。このことから、PFCs は、ヒト母体血から臍帯血および母乳中に移行し、子どもに暴露していることが示唆された。

## 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 年採取検体を対象として)

本年度は 2005 年に収集された妊婦血液 100 名分のダイオキシン類濃度(PCDDs 7 種、PCDFs 10 種、ノンオルソ-PCB 4 種 合計 21 種)及び 2002-2004 年に採取した母体血(269 名分)と母乳(60 名分)の PCB 類(70 異性体)を精密に測定した。この結果、前年度までの測定結果と合わせて 2002-2004 年に採取した母体血(269 名分)と母乳(60 名分)のダイオキシン類(29 種)及び PCB 類(70 種)濃度の詳細な異性体別濃度を明らかにした。

妊婦 269 名の内訳は初産婦 132 名、経産婦 137 名であった。全体平均年齢は 30.9 歳で初産婦の平均年齢は 29.3 歳、経産婦では 32.4 歳であり、血中脂質含量は全体平均 0.37%であった。血中ダイオキシン類濃度を TEQ 値で見ると、PCDDs、PCDFs、ノンオルソ-PCBs、モノオルソ-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、7.4、3.9、4.3、2.4 および 18.1 pg TEQ/g lipid であった。血中総 PCB 類濃度は 438.1 pg/g であった。

母乳を採取した母親 60 名の内訳は初産婦 30 名、経産婦 30 名であり、平均年齢は 30.1 歳と 32.2 歳、全体では 31.2 歳であった。母乳の平均脂質含量は 3.97%であった。母乳中ダイオキシン類濃度を TEQ 値で見ると、PCDDs、

PCDFs、ノンオルソ-PCBs、モノオルソ-PCBs および Total TEQ 平均値は、それぞれ、4.6、2.9、3.8、2.5 および 13.7pg TEQ/g lipid であった。母乳中の総 PCB 類濃度は 4,084.9 pg/g であった。また、血中及び母乳中のダイオキシン類濃度にしめる PCDDs、PCDFs およびノンオルソ-PCBs の割合は初産婦と経産婦でほとんど同じであった。

## 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 年に分析した母体血 56 名分と母乳 65 名分のダイオキシン類(21 種)の分析を行った結果、母体血を採取した 56 名の妊婦の平均年齢は 31.2 歳であり、母乳を採取した母親の平均年齢は 31.6 歳であった。母体血中の Total TEQ 平均値は 15pg TEQ/g lipid であり、母乳中の Total TEQ 平均値は 10 pg TEQ/g lipid であった。母乳中ダイオキシン類(初産婦 39 名および経産婦 26 名)の濃度平均値はそれぞれ 11 及び 9.3 pg TEQ/g lipid であった。母体血中ダイオキシン類(初産婦 26 名および経産婦 30 名)濃度平均値はそれぞれ 17 及び 14 pg TEQ/g lipid であった。母乳および母体血中のダイオキシン類濃度の平均値はいずれも初産婦の方が経産婦より高かった。

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 年までに分析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(初産婦 101 名、経産婦 94 名)平均値はそれぞれ 17 及び 14 pg TEQ/g lipid であった。

## 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—

返却率は尿道下裂症例群 22/33 例(66.7%)、

対照群で 38/50 例(76.0%)であった。質問表を返却した症例群 22 例の尿道下裂の程度は distal type 9 例、proxymal type 11 例、不明 3 例と比較的程度の強い症例が多かった。

### 1. 尿線の方向

尿線が真直ぐであると回答したのは尿道下裂症例群で 77.2%、対照群で 71.1%とほぼ同様であった。その他の尿線の方向は、尿道下裂症例群で右:4.5%・左:9.1%・無回答:9.1%、対照群では右:7.9%・左:10.5%・飛び散る:2.6%であった。

### 2. 尿勢

尿勢に関しては、“非常に良い”“良い”“普通”“悪い”“非常に悪い”の 5 段階で質問したが、尿道下裂症例群・対照群とも全例で普通以上の尿勢であると回答した。

### 3. 頻尿

頻尿については“全く困らない”“困らない”“困っている”“非常に困っている”の 4 段階で質問した。尿道下裂症例群の 95.5%、対照群で 89.5%のが“全く困らない”あるいは“困らない”と回答した。

### 4. 排尿姿勢

“立位で排尿する”“主に立位で排尿するが時々座位で排尿する”との回答が尿道下裂症例群の 90.9%、対照群で 84.2% で得られた。

### 5. 尿の切れ

“良い”あるいは“あまり良くはないが困っていない”と回答したのが、尿道下裂症例群で 68.2%、対照群で 97.4%であり、有意に尿道下裂群で少なかった( $p<0.01$ )。

## 24. 尿道下裂症例の内分泌学的予後に関する研究

遠位型尿道下裂 8 例中、低 LH を 1 例、低テストステロンを 2 例に認めた。近位型 18 例では、低 LH 1 例・高 LH 6 例、低 FSH 1 例・高 FSH 6 例、低テストステロンを 5 例に認め、尿道下裂の程度が不明な 4 例では高 LH 1 例・高 FSH 2 例・低テストステロンを 1 例に認めた。精巣サイズが 10ml 未満であった 9 例中 7 例(78%)で高 LH, 8 例(89%)で高 FSH を呈した反面、精巣サイズが 10ml 以上で高 LH/高 FSH を呈した症例は認めず、精巣サイズと高 gonadotrophin 状態には明らかな相関が認められた。また、低 LH を呈した症例は 10～15ml であった 3 例中 1 例(33%)、15ml 以上の 18 例中 1 例(6%)、低 FSH は 5ml 以上の 18 例中 1 例(6%)で認めるのみであった。

他方、高テストステロン値を示した症例は認められず、精巣サイズが 10ml 未満であった 9 例中 4 例(44%)、10～15ml であった 3 例中 1 例(33%)、15ml 以上の 18 例中 3 例(17%)で低テストステロンを認め、精巣サイズが大きくなるとともに低テストステロンを呈する症例の割合が減少していた。

## 25. 尿道下裂形成術後の下部尿路機能

1. 尿流量測定において、obstruction は 10 例(18%)で認められたが、equivocal 15 例(27%)、normal 30 例(55%)であり、正常と考えられる equivocal+ normal は 45 例(82%)であった。残尿量（正常：20ml 以下または残尿率が 25% 以下）は、46 例(84%)で正常であった。

遠位型、近位型に分けて検討を行ったが、尿流量率は、遠位型で obstruction 3 例(13%)、equivocal 5 例(23%)、normal 15 例(65%)であり、近位型では obstruction 7 例(22%)、equivocal 10 例(31%)、normal 15 例(47%)で

両群間に有意差を認めなかった。残尿量についても、遠位型 2 例(9%)、近位型 7 例(22%)で異常を呈したが、両群間に有意差を認めなかった。

2. IPSS は、尿道下裂症例で 1 例(5%)中等度の下部尿路症状を認めたのみで、他の症例は軽度の下部尿路症状のみであった。対照群は、全例軽度の下部尿路症状のみであった。

OABSS では、尿道下裂症例の 1 例(5%)に過活動膀胱を認めるのみで、その他の症例には認めなかった。対照群では、全例過活動膀胱は認めなかった。

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

妊婦 61 人の血液に発現する CYP1A1mRNA 発現レベルと PCDD の TEQ 値との関連は、直線回帰相関係数  $R=0.689$ 、 $P=0.0247$  であった。レベルについては、直線回帰で相関係数  $R=0.802$ 、 $P<0.0001$  であった。PCDD および PCDF の合計 TEQ 値と CYP1A1mRNA レベルとの関係は、直線回帰で  $R=0.746$  であった。また、ノンオルソ及びモノオルソ co-PCB の TEQ 値と CYP1A1mRNA 発現レベルについては直線回帰で、相関係数  $R=0.751$ 、 $P<0.0001$  であった。PCDD、PCDF、co-PCB の総 TEQ 値と CYP1A1mRNA の相関は、直線回帰で、相関係数  $R=0.855$ 、 $P<0.0001$  であった。

## 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)

血液では、他の P450 分子種に比べると CYP2A6 は比較的発現レベルが高かった。CYP2A6 および CYP1B1 は AhR によって発現制御を受けていることが我々の実験も含めて示唆されたが、CYP1A1 以外の P450 分子種では、mRNA の発現と血液に蓄積するダイオキシ

ン類との間に、相関関係は得られなかった。

## 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

人の胎盤では、CYP1A1は検出されたが、その発現は低く、検出できない個体もあった。また、蓄積するダイオキシン類との相関性は得られなかった。マイクロアレイなどについては、現在解析中である。

### 2. 人生活圏の複合汚染下でのバイオマーカー

ヒト生活圏に密着して棲息するドブネズミからは高濃度の残留性有機汚染物質が検出された。特に、ドブネズミの肝臓におけるダイオキシン類は、1300～21,000pg-TEQ/g(lipid)の範囲で蓄積してした。非汚染域の対照用としたラットは16～23pg-TEQ/g(lipid)と低かった。有機塩素系農薬は、その殆どを DDT が占めた。

また、今回の分析により、ドブネズミの肝臓では新規 POPs であるポリ臭素化ジフェニルエーテルの濃度が高いことが分かった。

### 3. 複合汚染下でのバイオマーカー

肝臓に発現する遺伝子群では、CYP 分子種は棲息域によって以下のような発現レベルの違いを示した。多くの CYP 分子種の中でも、汚染亢進域で唯一共通して発現増加を示したのは CYP1A1 および CYP1A2 のみであった。

一方、重金属や活性酸素種などによって発現が上昇するいわゆるストレスタンパク質の遺伝子群は、複合汚染下のラットにおいて、酸化ストレスなどで発現が上昇する熱ショックタンパク質(HSP)やヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)に増加が見られた。抗酸化酵素（スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(Catalase)、グルタチオンパーオキシダーゼ(GPx)) 以外はいずれも発現が上昇しているこ

とが明らかとなった。

## 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

臨床的背景では、妊娠週数、出生体重等で A 群、B 群間に有意差を認めなかったが、唯一母体の分娩既往において、B 群で経産婦が多く有意差を認めた。

MEHP 濃度の比較では、臍帯血および生後 1 か月で、A 群が B 群に比べ高く有意差を認めた。

臍帯血の MEHP 濃度の経年的変化を、縦軸に MEHP 濃度、横軸に生年月日を取り検討した結果、臍帯血および生後 1 か月の MEHP 濃度で、有意な経年的減少を認めた。しかし A 群、B 群に分け、同様に回帰解析を行った結果、有意な減少は認めなかった。

臍帯血と生後 1 か月の MEHP 濃度の関係を検討した結果、臍帯血に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度は高く、有意差を認めた。また、A 群、B 群に分け同様に検定を行い、両群とも有意差を認めたが、明らかに A 群は B 群に比べ生後 1 か月の MEHP 濃度が高く検出された。

最後に A、B 群に関係なく、生後 1 か月の MEHP 濃度と母乳栄養との関係を評価した。結果、人工栄養に比べ母乳を使用していた児では、MEHP 濃度は高く有意差を認めた。

以上の結果をもとに、生後 1 か月の MEHP 濃度に影響する因子を評価するため重回帰解析を行った。結果、塩化ビニル製チューブの使用の有無のみが、MEHP 濃度に影響を与える因子として抽出された。

## 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

低活性アリル (COMT-L) をホモ接合 (Met/Met) に持つ女性の LBW に対するオッズ比 (OR) は、2.98、95%信頼区間 (CI) は 1.10-8.11、IUGR に対する OR は、2.63/2.57、

95%CIは1.14-6.05/0.96-6.88であり、出生体重とも負の関連傾向がみられた。

### 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

早産との関連について、カイ二乗検定を行ったところ、出生体重( $P<0.01$ )、IL1A A114S ( $P=0.02$ )が有意な結果となった。

IL1A A114S、IL1B C-511TとPTB、LBW、IUGRについてロジスティック回帰分析を行った(年齢、出産歴、出産児の性別で調整)。

IL1A A114SはG/T、T/T型において、PTB(2.67, 2.49)、LBW(2.23, 2.36)のオッズ比が上昇した。また、T/T型のみIUGR 2.88(10パーセンタイル)、4.55(-1.5SD)のオッズ比が上昇した。

一方、IL1B -511はPTB、LBW、IUGRともに有意な結果は得られなかった。

### 32. 習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型

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た(AA型に対するAC型のOR, 1.17; 95% CI, 0.82-1.68; CC型のOR, 2.06; 95% CI, 0.87-4.90;  $P$ trend, 0.10)。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)。

### 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)

我々はマウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、ヒト MEI1 cDNA を単離した。ヒト MEI1 遺伝子は16個のエクソンより構成され、染色体 22q13.2 領域に局在している。ヒト

MEI1はヒト精巣組織に優位に発現していた。ヒト MEI1 の mutation 解析にて Open Reading Frame (ORF)内に4つの新たな single-nucleotide polymorphism (SNP1, 2, 3, 4)を検出した。

アメリカ人患者13名と61名のアメリカ人正常コントロール群ではSNP3及びSNP4のアレルの頻度に有意な差を認めた。

### 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)

ヒト FKBP6はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。また mutation 解析を施行したところ、患者19名中4名において Exon3 においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。ヘテロを認めた患者1名のみの精巣からのRNAを得ることができ、解析したところ、RNAレベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール4名でもRNAレベルではシトシンのみが発現していた、さらに、Exon6でヘテロを検出した多型部位での解析でもRNAレベルでは mono allelic な発現を呈した。

### 35. ヒト無精子症と化学物質に関する研究

ヒト FKBP6はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。また mutation 解析を施行したところ、患者19名中4名において Exon3 においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。このシトシンからグアニンへの変換により早期にストップコドンが出現し、コードされるアミノ酸は正常では327個であるが、わずか60個となり不完全な FK506 binding domain が形成される。そこで正常コントロールでも同様にシーケンス解析したところ、40名中4名において同様なヘテロの配列を認めた。しかしながら、このグアニンが

RNA レベルで発現し、不完全なアミノ酸をコードしているとは考えにくい。そこで、ヒト FKBP6 は genomic imprinting を受けているのではないかとの仮説のもとに解析を進めた。ヘテロを認めた患者 1 名のみ精巣からの RNA を得ることができ、解析したところ、RNA レベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール 4 名でも RNA レベルではシトシンのみが発現していた、さらに、Exon6 でヘテロを検出した多型部位での解析でも RNA レベルでは mono allelic な発現を呈した。

### 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

#### 1. 細胞増殖および $\beta$ hCG 分泌量

JAR および JEG-3 細胞株どちらも TCDD 添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。次に、JAR、JEG-3 細胞株細胞株の細胞数  $10^5$  個あたりの  $\beta$  hCG 分泌量を検討したところ、コントロールと比較し変化はなかった。

#### 2. GLUT1、3 および 12 m-RNA の発現

JAR、JEG-3 細胞株ともに、GLUT1 および 3 m-RNA 発現を認め、TCDD 添加による m-RNA 発現変化は認めなかった。

#### 3. GLUT4 m-RNA の発現

JEG-3 細胞株において、TCDD 1 および 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めた。

#### 4. GLUT9 m-RNA の発現

JAR 細胞株では GLUT9 m-RNA 発現は認めなかったが、JEG-3 細胞株ではいずれの条件でも同様に発現を認めた。

#### 5. GLUT4 蛋白発現の検討

次に JEG-3 細胞株は TCDD 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 蛋白発現の減弱を認めた。

### 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

インスリン抵抗性関連遺伝子のうち、IRS-1 に関しては多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 症例で有意に variant allele 陽性例が多いことが判明した (10.6% vs. 4.8%, OR:3.31, 95% CI:1.49-7.35)。RETN に関しては、homozygous variant genotype が PCOS 症例において有意に多いことが判明した (15.4% vs. 8.4%, OR:2.03, 95% CI:1.05-3.92)。一方、ENPP 1、apM1 の genotype 頻度に関しては、PCOS 症例とコントロール症例において、有意差は認められなかった。

PCOS 症例において、IRS-1、RETN genotype と BMI、FPG、IRI、Adiponectin、Total-testosterone、DHEAS、Androstenedione の値について検討したところ、RETN homogeneous variant genotype において有意に BMI 高値、IRI 高値、HOMA-IR 高値、Adiponectin 低値であったが、IRS-1 genotype による差異は認められなかった。

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

現在まで、HA 抗体陽性かつ IgM 陽性の 48 妊婦がエントリーし、うち 36 人で分娩が終了した。トキソプラズマ IgG avidity 値は、3～80%を示した。初感染とされる 25%未満が 12 人 (25%)、判定保留とされる 25～35%が 9 人、慢性感染とされる 35%以上は 27 人であった。

Nested PCR 法では、検体あたり数～10 ゲノムコピーで診断が可能で、30 例の陰性コントロールではすべて陰性であった。母体血 3/48 人、羊水 2/32 人、臍帯血 0/36 人で PCR が陽

性であった。1 症例で、出生前および分娩時羊水中でトキソプラズマ PCR が陽性だった。その新生児は脳内石灰化を認めたが、臍帯血 PCR と IgM は陰性で、髄液 PCR も陰性であった。本症例妊婦の IgG avidity 値は 23% (28 週) であった。IgG avidity 値 25%以上の 36 人中、胎内感染が認められた症例はいなかった。

### 39. 免疫学的生殖不全病態の解明と治療方法の開発

1. 中絶群や染色体異常流産に比し、染色体正常流産では脱落膜中 NK 細胞では、CD158a+細胞や CD94+細胞が減少し、NK 細胞と T 細胞の perforin 発現が有意に増加していた。また NK 細胞における CD158a と CD94 発現には、負の相関関係が認められた。NK 細胞抑制型レセプターの減少と細胞障害性 perforin の増加が、染色体正常流産と関連することが初めて明らかとなった。

2. 免疫グロブリン(Ig)薬理作用機構の解明を目的として、poly(I:C) 誘導の流産マウスモデル (CBA/J×DBA/2J) を作成した。流産マウスモデルへのインタクト型 Ig 投与 (0.8g/kg を 3 日間 i.p) によって、流産率は 55%から 10%に抑制された。しかし、Fab 型 Ig の投与では、この流産抑制効果は認められなかった。流産抑制効果は Ig の Fc 部分を介するものと考えられた。この 0.8g/kg、3 日間の投与方法では、ヒト Ig 治療に用いられる投与量に近似する。また、流産マウスモデルに Ig 負荷非妊娠マウスから得られた脾細胞を養子移入することによってこの流産抑制効果が再現できたことから、Ig により刺激を受けた脾細胞分画が流産抑制効果に介在することが判明した。次に、胎盤の RT-PCR 解析により、poly(I:C) 刺激により上昇した IFN- $\gamma$  ならびに TNF- $\alpha$  mRNA が正常レベルまでに抑制されることが明らかとなっ

た。したがって、流産マウスモデルにおける Ig の流産抑制効果は、局所での炎症性サイトカイン産生の抑制によると考えられる。

### D. 考察

平成 19 年 10 月までに、北海道の産科病院のうち 42 病院の協力が得られ、参加妊婦人数は、累計 14,422 人である。新生児個票の戻った 10,913 人中、先天異常のある児の総数は 231 名、先天奇形の総数は 281 (マーカー奇形 187、その他 94) で、先天奇形を有する児の出産頻度は 2.12%であった。主な先天異常は、先天性心疾患 41 人 (動脈管開存症 5、心房中隔欠損症 6、ファロー四徴症 4、心室中隔欠損症 18、肺動脈閉鎖 3、他)、ダウン症候群 14 人、水腎症 14 人、口唇口蓋裂 11 人、停留精巣 10 人、多指症 8 人、口蓋裂 7 人、尿道下裂 6 人、口唇裂 2 人などであった (延べ人数)。

本研究で示した先天奇形の有病率データは、日本における大規模な地域ベースの点で、これまでにない非常に貴重な情報であると考えられる。先天奇形の有病率は、これまでの報告は調査形態、対象者の選択などが一定ではないため、単純な比較は困難である。日本で唯一の全国規模の調査である「日本産婦人科医会先天異常モニタリング (JAOG)」(日本産婦人科医会 (日母)、横浜市立大学医学部先天異常モニタリングセンター) と比較すると、先天奇形の出産頻度は、本研究では 2.12%であり、JAOG の 1.77%に比べて多い結果であった。また、形態異常の疾患ごとの頻度をみると、本研究では水頭症、脊髄髄膜瘤、消化管閉鎖、複雑心異常など、胎児期に診断され出生直後の集中的な対応が必要とされる重篤な形態異常の頻度が JAOG 調査よりも低い傾向がみられた。JAOG は全国 331 病院が参加し全国の出産児の約 1 割が対象となる大規模な病院ベースの貴重な調査であり、その性格から有病率の低い異常を集

積し解析する上で大きな意義があると考えられる。一方、本研究は参加規模では JAOG に及ばないが、大規模な地域ベース前向きコホート研究であるという特徴を有しており、このことは一般的な地域の有病率を把握する上で非常に重要である。また、JAOG の協力施設が主に大学病院や地域の中核病院など大規模病院であり、胎児期から出生直後の集中的な対応が必要な疾患が集積する傾向があるのに対し、本研究では北海道全域の大規模病院や専門病院から開業産科医院までさまざまな規模の施設が参加しており、地域の一般的傾向をよく反映していると考えられる。本研究と JAOG の出産頻度や各疾患の有病率の違いはこれらの研究デザインの違いに起因していると考えられる。

本研究では、日常薬の使用が有意に先天奇形に対するオッズ比を上昇させていたことから、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。しかし、日常薬の中は多種にわたっている。また、今回の解析に用いた先天奇形にも種々の疾患がある。そのため、今後はそれぞれの疾患と薬の使用を個別に検討する必要がある。そのためには、個別の疾患数が現地点では不足しており、今後も参加妊婦を増加させる必要がある。また、本研究においては、喫煙、職業的化学物質曝露などと先天異常との関連がみられなかった。この原因として、用いた調査票が対象者による自記式であることから、実際の曝露状況と対象者本人の曝露感覚との不一致などが考えられる。今後、採血保存している血中の化学物質等の測定をすすめて、疾患との関連を検討する必要がある。

近年、各国の疫学調査において、葉酸の服用により、二分脊椎を始め、様々な奇形のリスクを低減させることが報告されている。日本では、厚生労働省が、妊娠可能な女性における葉酸の十分量の摂取を勧めている。また、栄養補助剤（サプリメント）が、コンビニエンスストアで

販売されるなど、入手のしやすさが最近の特徴である。本研究では栄養補助剤を服用している妊婦が 2 割を占めた。

今回対象となった妊婦の血清葉酸値は、 $7.9 \pm 4.1$  ng/ml であった。また、サプリメント非服用者では  $7.4 \pm 3.0$  ng/ml だったのに対し、葉酸サプリメント服用者では  $11.9 \pm 8.3$  ng/ml であり、葉酸サプリメント服用による血清葉酸値の上昇がみられた。欧米と比較して神経管欠損症の発症率が低い本邦では、今まで葉酸は十分に摂取されていると考えられていたためか、妊婦はもとより、成人女性を対象とした血清葉酸値についての分析報告は少ない。近藤らが、愛知県の妊婦 222 人を対象とした血漿葉酸値を測定したが、平均値は 8.1 ng/ml であり、大きな差はみられなかった。基準値である  $3.6 \sim 12.9$  ng/ml の中にほとんどの妊婦が分布しているが、基準値の幅が広く、またこの下限値未満の葉酸値を示す妊婦は、約 2% ほどであった。出生時体重との関連を検討するために、葉酸値を 4 分位にわけて解析をおこなったところ、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、血清葉酸値が低い群 ( $2.5\text{-}5.7$  ng/ml) において、低出生体重と有意な関連が認められたのに対し、葉酸サプリメント服用者において、有意な関連は見られなかったことから、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と考えられる。しかし、サプリメント服用者の中でも、血清葉酸値が低い ( $2.5\text{-}5.7$  ng/ml) 対象者が約 13% 存在している。また、葉酸については、妊娠がわかってからの服用者が多いことから、厚生労働省が推奨する、葉酸摂取の時期は妊娠前 1 か月から妊娠 3 か月であることについて、未だ、周知されていない可能性が疑われた。

葉酸値が 5.7 ng/ml 以下である場合に、出生時体重との間に負の有意な関連がみられたが、Alayne らは、葉酸値と出生時体重との関連について、有意な関連がなかったことを報告してい

る。異なった結果となった理由は、解析対象者の血清葉酸値の計測時期が異なることにも関連していると考えられる。本研究では、妊娠初期の血清葉酸値を計測しているが、先行研究では、研究対象となる妊婦の妊娠する前の血清葉酸値を計測している。また Scholl らは、妊娠中の葉酸経口摂取量が、 $240 \mu\text{g}/\text{d}$  未満であると低出生体重になるリスクが上昇すると報告している。

また葉酸経口摂取量と血清葉酸値は、有意な相関があることが報告されている。したがって、今回の結果は、妊娠前よりも妊娠中の葉酸値が低値になると、胎児の発育、出生時体重に影響を及ぼす可能性があり、妊娠中における葉酸摂取の必要性が示唆された。

今回測定した血中及び母乳中のダイオキシン類濃度を過去の測定結果と比較した。1993年6月から1994年6月に福岡県内に居住する50名の未婚女性（平均年齢20.2歳）の血中ダイオキシン類濃度は  $24.1 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$  であった。一方、北海道の初産婦（平均年齢31.2才）の血中ダイオキシン類濃度は  $15 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$  であった。母乳中ダイオキシン類濃度では1994-96年に西日本地区で測定された母乳中ダイオキシン類の Total TEQ は  $20\text{-}28 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$ 、1999年に厚生省が報告した国内での母乳中ダイオキシン類の平均濃度は  $24.0 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$  であり、今回の北海道での母乳中ダイオキシン類濃度は  $10 \text{ pg-TEQ}/\text{g lipid}$  であったのをはじめ、これまでに本研究で測定した血中及び母乳中のダイオキシン類濃度（2003-2005年）は過去の測定値と比較すると低下している。食物や嗜好性の違いによる地域的特性による影響も考えられるが、ダイオキシン類の環境への排出はこの間、1/10以下に低減しており、その効果が示唆される。

2003年から2007年までに合計415名の血液と125名の母乳中のダイオキシン類及びPCB類濃度の分析データが蓄積されている。これまでも血液中ダイオキシン類濃度が出産

により低下することや加齢に伴い上昇することが報告されているが、このような大規模な母集団を対象とした解析は稀である。2003年から2005年に採取した195名の妊婦の血中ダイオキシン類濃度の解析により、初産婦、経産婦ともに100名前後の集団の血中ダイオキシン類濃度を解析した結果、PCDD、PCDF、ダイオキシン様 PCB 類および総ダイオキシン類の血中濃度について経産婦は初産婦より血中ダイオキシン濃度が20%低いことが示唆された。また、初産婦、経産婦とも年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度が有意に上昇することを統計学的に明らかにした。

本研究では、生体暴露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な有機フッ素系化合物に対する分析法を構築し、ヒト母体血( $n=447$ )の分析に適用した結果、全ての検体からPFOSが検出されたことから、母体はPFCsに広く暴露していると考えられ、子どものPFCs暴露評価の重要性が示唆された。そこで、PFCsの移行性が示唆されている臍帯血および母乳中についても分析を行ったところ、それらすべての検体からPFOSおよびPFOA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る。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る。

## E. 結論

平成19年10月までに、本研究コホートに参加した計14,422人から出生した新生児10,913人中、先天異常のある児の出産頻度は2.12%であった。これは、病院をベースとした「日本産

婦人科医会先天異常モニタリング（JAOG）」の発生頻度と比べ多く、また重篤な形態異常の頻度がJAOG調査よりも低い傾向にあった。このことは地域ベースで行なわれている本研究が一般的な地域の有病率を把握していることの査証と考えられた。

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、妊娠13週未満の血清を用いて葉酸値の測定を行ったところ、 $7.9 \pm 4.1$  ng/mlであった。また、サプリメント非服用者では $7.4 \pm 3.0$  ng/mlだったのに対し、葉酸サプリメント服用者では $11.9 \pm 8.3$  ng/mlであり、葉酸サプリメント服用による血清葉酸値の上昇がみられた。葉酸値が5.7ng/ml以下であると出生時体重との間に負の関連がみられた。また、サプリメント服用者では、この負の関連はみられなかった。

今回測定した母体血中のTotal TEQ平均値は15pg TEQ/g lipidであり、母乳中のTotal TEQ平均値は10 pg TEQ/g lipidであった。PCDD、PCDF、ダイオキシン様PCB類および総ダイオキシン類の血中濃度については、経産婦は初産婦より血中ダイオキシン濃度が20%低いことが示唆された。また、初産婦、経産婦とも年齢の上昇に伴いダイオキシン類濃度が有意に上昇することが明らかになった。また、妊婦の能動的喫煙ならびに環境的喫煙曝露が母体血中ダイオキシン類の濃度に影響を与えることが明らかになった。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ならびにPCDDs/PCDFsによるSGAへの負の影響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る。

有機フッ素系化合物に関しても、血液、臍帯血および母乳中のすべての検体からPFOSが検出された。このことから、PFOSの胎盤や母乳を解して児に広く暴露している危険性が示

唆された。さらに、母体血中PFOS濃度と児の出生体重との間に負の関連がみられたことから、PFOSによる次世代影響が懸念される。今後、継続的な調査が必要と考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Todaka T., Hirakawa H., Kajiwara J., Hori T., Tobiishi K., Onozuka D., Kato S., Sasaki S., Nakajima S., Saijo Y., Sata., Kishi R., Iida T., Furue M.: Concentration of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 69: 1228-1237, 2007.
2. Todaka T., Hirakawa H., Kajiwara J., Hori T., Tobiishi K., Onozuka D., Kato S., Sasaki S., Nakajima S., Saijo Y., Sata., Kishi R., Iida T., Furue M.: Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Organohalogen Compounds*. 69: 789-792, 2007.
3. Inoue S., Hori T., Todaka T., Hirakawa H., Kajiwara J., Kato S., Sasaki S., Nakajima S., Saijo Y., Sata., Kishi R.: Congener specific determination of PCBs in human breast milk collected from Hokkaido, Japan. *Organohalogen Compounds*. 69: 1997-2000, 2007.

4. Ban S., Kondo T., Sasaki S., Konishi K., Washio N., Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Ishizuka M., Fujita S., Kishi R. : Correlations among serum PCB/dioxin levels, smoking status, and gene polymorphisms in mothers from Hokkaido, Japan. *Organohalogen Compounds*. 69: 2039-2041, 2007.
5. Washino N., Saijo Y., Konishi K., Kato S., Sasaki S., Ban S., Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Inoue S., Kishi R. : The effect of prenatal exposure to dioxins on cord serum Ige. *Organohalogen Compounds*. 69: 2106-2108, 2007.
6. Konishi K., Sasaki S., Kato S., Ban S., Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Inoue S., Kishi R. : Effects of prenatal exposure to dioxins and methyl mercury on birth weight. *Organohalogen Compounds*. 69: 2109-2112, 2007.
7. Moustafa GG, Ibrahim ZS, Hashimoto Y, Alkelch AM, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Testicular toxicity of profenofos in matured male rats. *Arch Toxicol*. 81(12):875-81(2007)
8. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Di-(2-ethylhexyl)phthalate suppresses tamoxifen-induced apoptosis in GH3 pituitary cells. *Arch. Toxicol*. 81:27-33 (2007)
9. Ban S, Kondo T, Ishizuka M, Sasaki S, Konishi K, Washino N, Fujita S, Kishi R. Using Microarray Analysis to Evaluate Genetic Polymorphisms Involved in the Metabolism of Environmental Chemicals. *Fukuoka Acta Medica* 89: 208-214 (2007).
10. Ishizuka M, Nagai S, Sakamoto KQ, Fujita S. Plasma pharmacokinetics and CYP3A12-dependent metabolism of c-kit inhibitor imatinib in dogs. *Xenobiotica*. May;37(5):503-13(2007).
11. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. (2007) *Drug Metab Dispos*. 35(1):62-6.
12. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Mitsui T, Furuno T, Kitta T, Higashiyama H, Sano H, Nonomura K. Long-term patient reported outcome of urinary symptoms after hypospadias surgery: norm related study in adolescents. *J Urol*. 178 : 1659-1662, 2007
13. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res*. 67(15):7095-105. 2007
14. Miyamoto T, Yu YS, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K. Mutational analysis of the human MBX gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. *Turk J Pediatr*.;49(3):334-6. 2007.
15. Inaoka T, Sugimori H, Sasaki Y, Takahashi K, Sengoku K, Takada N, Aburano T. VIBE MRI for evaluating the normal and abnormal gastrointestinal tract in fetuses. *AJR Am J Roentgenol*. 189(6):W303-8. 2007.
16. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. (2007) The association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese

- women. *BMC Infect Dis* 7(1):128
17. Baba T, Endo T, Sata F, Honnma H, Manase K, Kanaya M, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito T. (2007) Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene *IRS-1* but not *ENPP1* in a Japanese population. *Life Sci* 81(10), 850-854.
  18. Takeda M, Yamada H, Iwabuchi K, Shimada S, Sakuragi N, Minakami H, Onoé K.(2007) Administration of high-dose intact immunoglobulin has an anti-miscarriage effect in a mouse model of reproductive failure. *Mol Hum Reprod* 13(11):807-814
  19. Baba T, Endo T, Sata F, Honnma H, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Kanaya M, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito T. *Life Sci*. 2007 Aug 16;81(10):850-4. Epub 2007 Aug 7
  20. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. (2006) *Mol Hum Reprod*. 12(2):77-83.
  21. Nakajima S, Saijo Y, Kato S, Sasaki S, Uno A, Kanagami N, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Todaka T, Nakamura Y, Yanagiya S, Sengoku Y, Iida T, Sata F, Kishi R. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at six months. *Environ Health Perspect*, 115 (5); 773-8.
  22. Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic defect in Fkbp6 a common cause of azoospermia in human? *Cell Mol Biol Lett* 11(4): 557-569. 2006.
  23. Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Iida T., Washino N., Konishi K., Matuzawa S., Ban S., Sata F., Kishi R. and Yoshimura T. Dioxin and related chemicals concentration in human milk. (2006) *Organohalogen Compounds* 68:1608-1610.
  24. Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T and Katsuya Nonomura Long-term cosmetic and sexual outcome of hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent. (2006) *J Urol* 176: 1889-1992.
  25. Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, Shaban Z, El Bohi K, Kazusaka A, Fujita S. Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. (2006) *Toxicol Appl Pharmacol*. 215(3):330-40.
  26. Ishizuka M, Lee JJ, Masuda M, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. CYP2D-related metabolism in animals of the CYP2D superfamily - species differences. (2006) *Vet Res Commun*. 30:505-12.
  27. Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S. Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand. (2006) *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98(1):48-55.
  28. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M,

- Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet.* 51: 533-540.2006.
29. Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic defect in FKBP6 a common cause of azoospermia? (2006) *Cell Mol Biol Lett* 11: 567-569.
30. Sasaki Y, Miyamoto T, Hidaka Y, Satoh H, Takuma N, Sengoku K, Sugimori H, Inaoka T, Aburano T. Three-dimensional magnetic resonance imaging after ultrasonography for assessment of fetal gastroschisis. *Magn Reson Imaging.* 24(2):201-3. 2006
31. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. (2006) *J Hum Genet* 51: 533-540.
32. Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. (2006) Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasma in early pregnancy. *J Clin Microbiol* 44(1), 51-55.
33. Tanaka K, Yamada H, Minami M, Kataoka S, Numazaki K, Minakami H, Tsutsumi H. (2006) Screening for vaginal shedding of cytomegalovirus in healthy pregnant women using real-time PCR: correlation of CMV in vagina and adverse outcome of pregnancy. *J Med Virol* 78, 757-759.
34. Shimada S, Nishida R, Takeda M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H. (2006) Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 56, 193-200.
35. Yamada H, Shimada S, Nishida R, Yakubo K. (2006) Topological factors in placental surface arteries correlate with neonatal birth weight. *Hokkaido J Med Sci* 81(5), 365-370.
36. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishi R. (2006) Maternal functional catechol-*O*-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenetics (Pharmacogenet Genomics)* 16, 775-781.
37. Kurahashi N, Sata F, Kasai S, Shibata T, Moriya K, Yamada H, Kakizaki H, Minakami H, Nonomura K, Kishi R. Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias. *Mol Hum Reprod* 11:93-98, 2005
38. Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, Kakizaki H, Nonomura K, Sata F, Kishi R. Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism. *Med Sci Monit* 11:CR274-283, 2005
39. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato EH, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 11:357-360, 2005