

201133021A (別冊有り)

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基づく先天異常、免疫アレルギー
および小児発達障害のリスク評価と
環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

北海道大学環境健康科学研究教育センター

岸 玲子

研究分担者

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

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

千石 一雄

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

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座小児科学分野

有賀 正

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

梶原 淳睦

いであ株式会社環境創造研究所

松村 徹

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座毒性学分野

石塚真由美

北海道大学環境健康科学研究教育センター

安住 薫

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

佐々木成子

旭川医科大学医学部健康科学講座地域保健疫学分野

吉岡 英治

平成 24 (2012) 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基づく先天異常，免疫アレルギーおよび小児発達障害の リスク評価と環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明（岸 玲子ほか）	2
III. 分担研究報告書	
1. 先天異常の発生状況 （岸 玲子，水上 尚典，遠藤 俊明，千石 一雄，吉岡 英治ほか）	19
2. 妊婦の葉酸値と先天性単発奇形との関連 （岸 玲子，佐々木 成子，吉岡 英治ほか）	30
3. 妊娠初期(第1三半期)の母体血清葉酸濃度と流早産リスク等に関する研究 （水上 尚典ほか）	38
4. 出生時体格に影響を及ぼす妊婦の受動喫煙曝露 （岸 玲子，佐々木 成子，吉岡 英治ほか）	44
5. 母体血液中のPCBs・ダイオキシン類，有機フッ素化合物および毛髪水銀濃度に関連 する要因の基礎的検討 （岸 玲子，梶原 淳睦，佐々木 成子ほか）	56
6. 微量ダイオキシン類，水酸化PCB(OH-PCB)測定法の開発 （梶原 淳睦ほか）	65
7. 有機フッ素化合物(PFCs)の胎児期曝露評価と児への健康影響評価 （岸 玲子，佐々木 成子，松村 徹ほか）	72
8. 血液中のビスフェノールA(BPA)の分析 （松村 徹ほか）	82
9. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる脳内神経伝達物質と養育環境要因の関係 （岸 玲子，佐々木 成子，吉岡 英治ほか）	90
10. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる環境化学物質(生活要因も含む)曝露と その代謝に関与する遺伝子多型と交互作用 （岸 玲子，佐々木 成子，吉岡 英治ほか）	98
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	118

I はじめに

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、わが国では、地域の一定集団を対象に発生率やリスク要因を評価することがなされていませんでした。また、世界的にも環境化学物質の次世代への直接的な影響と因果関係は、未だ十分に解明されるには至っておりません。

そこで先天異常モニタリングに関する前向きコホート研究を立ちあげ、これまで平成14～16年度および平成17～19年度さらに平成20～22厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）による「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環境化学物質に対する感受性の解明」として過去9年間研究を継続してきました。

本研究では2つの前向き研究を行っていますがそのうち札幌市の1産院で説明と同意を得た妊婦さん514人の母体血とお子さんの臍帯血につきましてこれまでダイオキシン・PCB類、有機フッ素化合物（PFOS・PFOA）、農薬、およびビスフェノールAの測定を行いました。今後は北海道全域で進めています大規模コホートで母子のペアの参加が2万人に達する24年度以降有機フッ素化合物のPFOS、PFOAに加えてPFDA・PFNA・PFHxS・PFUnDAの測定分析を行い、アウトカムである出生時の児の異常の有無や胎児発育への影響を研究し、引き続き4歳児と7歳児の追跡により詳細な研究を進めていきます。特にフタル酸エステル類やリン酸トリエステル類などの小児のアレルギー発症やADHDなど神経発達への影響についても検討を開始します。

一方、環境化学物質の個体への影響の強弱は、曝露された個体の異物（薬物）代謝酵素類の遺伝子多型にも修飾されることが考えられますので、ダイオキシンや喫煙の曝露では環境遺伝相互作用の検討を行っています。同じ曝露濃度でも遺伝的ハイリスク群である者には、より予防的な対応を進めるという意味でこうした研究は重要であると思われれます。

本研究は北海道内の広範囲の産婦人科医療機関の御協力で進められております。今年度末にはいよいよ2万人の参加者の登録が達成されると思われれます。本研究のように地域をベースに胎児期から立ち上げ、次世代の子どもへの種々の影響を大きなサンプルサイズで追跡し、先天異常をモニタリングしながら環境測定を行っている研究は世界的にも初めてです。北海道で、環境疫学（公衆衛生学、環境医学など）と臨床医学（産科、泌尿器科、小児科など）が共同で環境リスク評価を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、将来的には、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を一層高めるために有益になろうと思います。

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24年3月

研究代表者 岸 玲子

前向きコーホート研究に基づく先天異常、免疫アレルギーおよび
小児発達障害のリスク評価と環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター センター長・特任教授

研究要旨

本研究は妊娠初期の12週までに同意を得た妊婦からの採血とPCB・ダイオキシン類や有機フッ素化合物(PFCs)、ビスフェノールA(BPA)などの環境化学物質濃度測定から、先天異常の有無やSmall for Gestational Age(SGA)など出生時点での児への影響と出生後のアレルギー・感染症や発達への影響について、環境化学物質との直接的因果関係を前向きコーホート研究で評価するものである。妊娠中の母親への環境化学物質曝露が胎児期および乳幼児期～学童期の子どもの健康に及ぼす影響の解明と健康障害を予防する方策を明らかにすることを目的としている。平成15年1月から平成23年10月末までの参加妊婦19,806名のうち、新生児個票が提出された新生児の先天異常有病率を種類別に算出した。対象とした18,383件(生産、死産、流産含む)のうち、先天異常のある児の総数は354名、マーカー異常248件、その他の異常136件で、先天異常を有する児の出産頻度は1.93%であった。また、JAOG分析基準の在胎22週以降では、出産数18,119名、先天異常のある児は307名で、出産頻度1.69%はJAOG平成18年度報告1.80%とほぼ同程度であった。

妊娠初期の母体血清葉酸値が先天性単発奇形発生リスクに関連があるかについて検討したが、妊娠初期血清葉酸値は先天性単発奇形発症と関連はなかった。さらに、教育年数、世帯収入、葉酸サプリメント摂取、妊娠初期の喫煙習慣で層別して解析したが、いずれも妊娠初期血清葉酸値と先天性単発奇形発症との関連は認められなかった。

妊娠初期(第1三半期)の母体血清葉酸濃度と後期流産・早産、在胎週数、胎児発育に関連があるかについて単胎妊婦で検討したが、妊娠初期の血清葉酸濃度は、これらの妊娠転帰と関連しないことが示唆された。

妊婦の受動喫煙が出生時体格に及ぼす影響について、非喫煙妊婦の母体血漿中コチニン濃度を4群に分類して検討したところ、第1四分位(0.15ng/mL)群に対して、第4四分位(0.81ng/mL)群の出生時体重は61.4g(p=0.002)、出生時身長は0.6cm(p=0.002)、出生時頭囲は0.5cm(p=0.007)有意に低下した。また、男女別でみると、男児では、出生時体重が70.0g(p=0.012)、出生時頭囲が0.5cm(p=0.037)と有意に低下し、女児では、出生時身長が0.8cm(p=0.011)有意に低下した。

PCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物(PFOS/PFOA)、水銀などの環境化学物質は妊婦から胎児へ移行して、その発育を阻害する可能性がある。体内の曝露量に影響する要因は国や地域によって異なるが、わが国の妊婦の曝露量と生活・食習慣などの多様な要因を検討した報告はわずかであるため、一般生活環境の母体血および毛髪中の環境化学物質濃度に関連する要因を検討した。PFOAを除く環境化学物質濃度は分娩年経過と共に低下し、環境中の曝露レベルの低下を反映していることが示唆された。妊娠前、妊娠中の喫煙により母体血中ダイオキシン類とPFOS濃度が低下したことから、喫煙による酵素誘導が胎児や胎盤を含む母体外への排出を亢進させていること、また、妊娠中の飲酒、魚摂取量、

牛肉摂取により母体血中濃度が増加したことから、食生活の欧米化が曝露源の変化や飲酒による肝代謝変化が関与することが考えられた。

曝露評価のために、血液および母乳中ダイオキシン・PCB類一斉分析法の精製工程を検討し、水酸化PCB(OH-PCB)を同時に測定できる分析法を追加した。本研究の対象となる1970年以降に出生した妊婦の血液中総PCB濃度平均は0.3 ppbであることから、妊婦の血液中OH-PCBを測定するためにはより高感度にOH-PCBを検出できるための精製法および測定法の改良が必要となった。血液中総PCB濃度の高い検体(0.5ppb以上)のOH-PCB濃度を測定したところ、総OH-PCB濃度の平均は37pg/g、最も濃度の高い水酸化PCBの異性体は4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB(4OHCB146)であった。今後は、検出感度を検討しながら順次低濃度の検体のOH-PCB濃度を測定する。今回の分析法開発により少量の血液で多種類の化学物質の測定が可能になり、母体の環境化学物質による汚染実態の解明に大きく貢献することが期待できる。ヒト試料のPFCsの測定系の確立を検討した。標準血清(NIST standard reference material (SRM) 1957)を用いて血中PFCs濃度14種を世界の他機関との測定値を比較したところ、同様の測定値が得られた。さらに、研究対象者である妊婦4名の予備測定を実施したところ、母体血漿中PFOS濃度は平均5.94 ng/ml、PFOA濃度は平均1.48 ng/mlであり、東豊コーホースタディのPFOS・PFOA濃度と同様の結果であったことから、ヒト血清中もしくは血漿中PFCsの一斉分析の測定系を確立することができた。血液中BPAの測定分析法には、同位体希釈LC-MS/MS法を採用して、前処理方法と組合せた血中BPAの分析方法を確立した。本方法を用いて、ヒト血液70検体に適用し結果を得た。

PubMed, 医中誌などの検索エンジンを使用して、注意欠損・多動性障害(Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)発症の養育環境要因, 環境要因, 遺伝要因および交互作用に関する検索を行った。養育環境要因では、母性的暖かさや授乳期間、ダイエットがADHDの症状を緩和・改善する一方で、TVやDVDの視聴時間が発症リスクに影響していた。脳内神経伝達物質と養育環境の交互作用は、ドーパミン系あるいはセロトニン系物質の候補遺伝子多型について検討していた。環境要因として、生活環境(喫煙, 飲酒), 環境化学物質(フタル酸エステル類, 有機フッ素系化合物, 有機塩素系化合物), 農薬(有機リン系, 有機ハロゲン系), 無機ヒ素について検討されていた。遺伝要因については、脳内神経伝達物質が関与する遺伝子多型の研究が中心だった。今後、ADHDの発症に関わる要因を明らかにするためには、その他の環境化学物質についても、環境化学物質の曝露要因とその代謝酵素や神経伝達物質の遺伝子多型, および家庭の養育環境要因との交互作用など総合的な研究を行う必要がある。

研究分担者

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)
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)

千石 一雄
(旭川医科大学医学部
産婦人科学講座教授)
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

腎泌尿器科外科学分野教授)

有賀 正

(北海道大学大学院医学研究科

生殖・発達医学講座小児科学分野教授)

梶原 淳睦

(福岡県保健環境研究所

保健科学部生活化学課 課長)

松村 徹

(いであ株式会社環境創造研究所

副所長)

石塚 真由美

(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教授)

安住 薫

(北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター特任講師)

佐々木 成子

(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助教)

吉岡 英治

(旭川医科大学医学部健康科学講座

地域保健疫学分野准教授)

研究協力者

荒木 敦子, 池野 多美子, Yila
Thamar, 伊藤 佐智子, 金澤 文子

(北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター)

宮下 ちひろ, 馬場 俊明

Braimoh Titilola, 檜野 いく子

岡田 恵美子, 小林 澄貴

伊藤 久美子

(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)

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)

長 和俊, 山田 俊

(北海道大学病院周産母子センター)

白石 秀明

(北海道大学病院小児科)

松浦 英幸

(北海道大学大学院農学研究院

応用生命科学部門生命有機化学分野)

馬場 剛

(札幌医科大学産婦人科学講座)

西條 泰明

(旭川医科大学健康科学講座)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

伊藤 善也

(日本赤十字北海道看護大学

臨床医学領域)

花岡 知之

(北海道療育園美幌療育病院)

平田 輝昭, 千々和 勝己, 黒川 陽一

平川 博仙, 堀 就英, 中川 礼子

芦塚 由紀, 小野塚 大介, 高尾 佳子

飛石 和夫, 安武 大輔

(福岡県保健環境研究所)

戸高 尊

(九州大学医学部)

飯田 隆雄

(北九州生活科学センター)

山本 潤, 菅木 洋一, 水谷 太

(いであ株式会社 環境創造研究所)

中澤 裕之, 斉藤 貢一, 伊藤 理恵,

岩崎 雄介, 中田 彩子, 手塚 浩子

(星薬科大学薬品分析化学教室)

蜂谷 紀之

(環境省国立水俣病総合研究センター)

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, 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, 勤医協札幌病院,

釧路赤十字病院, 慶愛病院, 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, 札幌東豊

病院, 札幌徳州会病院, 白石産科婦人

科病院, 中標津町立病院, 名寄市立総

合病院, 函館五稜郭病院, 函館中央病

院, はしもとクリニック, 朋佑会札幌

産科婦人科, 北海道大学病院, 公立芽

室病院, 市立稚内病院

A. 研究目的

ヒトでの科学的な根拠が乏しかった低濃度のダイオキシン類・非ダイオキシン系 PCB 類，有機フッ素化合物(PFCs)，ビスフェノール A(BPA)や有機塩素系農薬などの環境化学物質による先天異常，Small for Gestational Age(SGA)，アレルギー・感染症や発達などの次世代影響との関連について日本の疫学データをもって応えるために，北海道全域の地域病院に基づく尿道下裂や停留精巣等の先天異常モニタリング体制を立ち上げ，母体血および臍帯血の採取保存と曝露量の直接的測定を行ってきた。本研究では，前向きコホート研究で先天異常（マーカー奇形・異常 55 疾患）モニタリングを実施し，地域の病院ベースにおける先天異常発生率を把握する。生体試料中のダイオキシン・PCB 類，PFCs，葉酸，コチニン濃度等を測定して，出生時体格やアレルギー・感染症などとの関連を質問票から得た住環境，喫煙状況，食生活等を考慮して検討する。また，胎児期曝露による児への影響評価を行うため，水酸化 PCB(OH-PCB)や BPA の分析法を開発し，測定する。近年，環境や食品中のダイオキシン，PCB 類濃度は低下しており，妊婦の血液中 OH-PCB を測定するため，より高感度に検出できる分析法が求められていることから，OH-PCB 類濃度を誘導体化せずに LC/MS/MS を用いて直接測定する簡便な一斉分析法を開発する。ヒト試料の測定系の確立を検討することを目的に標準血清(NIST standard reference material (SRM) 1957)を用いて血中 PFCs 濃度 14 種 (PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA・PFBS・PFHxS・PFBA・PFPeA・PFHxA・PFHpA・PFDoA・PFTrDA・PFTeDA)について海外および国内の他機関との測定値を比較する。また，研究対象者である妊婦 4 名の予備測定を実

施する。BPA については，尿道下裂との関連性について幾つか報告がなされているが，血中濃度は極低濃度であり，試料間の有意な濃度差を観測するためには精確な測定値が必要である。BPA の体内負荷量を評価するヒト血液中における濃度データは，存在量が極低いため，測定分析が困難であり，確からしい結果を用いて議論されているとは言えない状況であることから，ヒト血液中の BPA を議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法が必要である。

さらに，遺伝要因として，遺伝子多型などの先天的遺伝素因と後天的遺伝素因(エピジェネティクス)を調べて，環境要因とのリスク評価をするために，レビューを行い，今後，生活習慣など交絡要因の影響評価と同時に遺伝的ハイリスク群を解明して環境と遺伝の複合的に評価する。

B. 研究方法

1. 先天異常の発生状況

平成 14 年から平成 23 年 10 月末までに，北海道内の 40 産科医療施設で妊婦健診を行い，本調査への参加に同意した妊婦は 19,806 名である。参加登録妊婦が出産した場合，出産施設に「新生児個票」への記載を依頼しており，平成 23 年 10 月末までに受け付けた新生児個票 18,383 件について先天異常発生状況を集計した。

2. 妊婦の葉酸値と先天性単発奇形との関連

北海道内の約 40 産科医療施設で実施した出生前向きコホート研究で同意を得られた妊婦のうち，平成 15 年から平成 18 年 12 月までに分娩が終了した母親 12,784 名を対象とした。妊婦健診受診施設にて妊娠初期に採血し-80℃以下で冷凍保存後，母体血清葉酸濃度を化学発光免疫測定法(CLIA 法)により(株)エスアールエルで測定した。

妊婦と配偶者の学歴，世帯収入，既往歴，妊娠・出産歴，妊娠初期の内服薬，妊娠前後のサプリメント使用，喫煙・飲酒習慣，化学物質曝露状況などの情報は妊娠初期に実施した自記式調査票，また，分娩日，児の性別，出生時体重，先天性単発奇形有無などは新生児個票（診療録）から得た。児の1歳時には健康調査票を送付して，母親の自記式で回答を得た。

対象者のうち，妊娠初期血清葉酸値，妊娠初期調査票，新生児個票があるものを解析対象とした。双胎妊娠者，糖尿病既往者，葉酸代謝障害剤の使用者，妊娠時年齢不明者，児の性別，出生時体重が不明のものは解析から除外し，最終的な解析対象者は10,185名であった。

先天性単発奇形発生と妊娠初期血清葉酸値との関連は，教育年数，世帯収入，妊娠時年齢，出産経験を交絡要因として多変量解析を行った。さらに，教育年数，世帯収入，葉酸サプリメント摂取，妊娠初期の喫煙習慣で層別して解析した。

3. 妊娠初期(第1三半期)の母体血清葉酸濃度と流早産リスク等に関する研究

北海道内の約40産科医療施設で実施した出生前向きコーホート研究で同意を得られた妊婦のうち，2003年2月から2006年3月までに妊娠初期(第1三半期)の血清葉酸濃度を測定した5,075名を対象とした。

母体血清葉酸濃度は化学発光免疫測定法(CLIA法)により(株)エスアールエルで測定した。対象者の属性(母年齢，妊娠前BMI，初経産，不妊治療，葉酸サプリメント摂取，喫煙，飲酒，年収など)は妊娠初期に実施した自記式調査票，出生時所見は新生児個票から得た。

母体血清葉酸濃度と①在胎週数②出生体重③後期流産・早産の有無④胎児発育不全の有無を転帰とした関連について解析し

た。後期流産は「妊娠12週以降22週未満の死産」，早産は「妊娠22週以降の生産」，胎児発育不全は「妊娠22週以降に分娩となった症例の中で，我が国の在胎週数別・性別・初経産別の出生時体格基準表(板橋ら2010)において10%タイル未満のもの(SGA)」とした。ANOVAおよび χ^2 検定，Tukey HSD検定，t検定を用い， $p < 0.05$ を有意水準とした。

4. 出生時体格に影響を及ぼす妊婦の受動喫煙曝露

北海道内の約40産科医療施設で実施した出生前向きコーホート研究で，2003年から2007年まで同意を得られた妊婦のうち，非喫煙者2,792名を対象とした。対象者の属性は妊娠初期に実施した自記式調査票，出生時所見は新生児個票から得た。曝露評価のため，妊娠後期に採血を行い，母体血中コチニン濃度はELISA法により(株)コスミックコーポレーションで測定した。出生時体格をアウトカム指標として，非喫煙妊婦の受動喫煙曝露との関連を検討した。

5. 母体血液中のPCBs・ダイオキシン類，有機フッ素化合物および毛髪水銀濃度に関する要因の基礎的検討

札幌市の一般病院・産科を受診した同意を得た妊婦とその児514組を対象とした。妊婦とその配偶者から，自記式調査票により既往歴，教育歴，世帯収入，ライフスタイルなどの情報を得た。妊娠中期～後期に母親から採血し，高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトメトリー法(HRGC/HRMS法)で，426名の母体血中PCBs・ダイオキシン類濃度，およびオンライン国相抽出—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法)で447名の母体血中PFOS，PFOA濃度を測定した。分娩後5日以内に採取した430名

の母親の毛髪中総水銀濃度(Hg)を酸化燃焼金アマルガム法(AAS 法)で測定した。PCBs・ダイオキシン類を測定した 426 名のうち 1 名は PCDFs が異常高値を示したので、解析から除外した。

環境化学物質の濃度と両親の属性、飲酒、喫煙、社会経済的要因および妊婦の食事摂取頻度などの項目との関係は、Spearman の相関係数および Student's の t 検定を用いて解析した。各濃度の相関は Spearman の相関係数を用いて解析した。対数変換した各物質濃度を従属変数に、全ての関連要因を独立変数として投入し、重回帰分析のステップワイズ法により各物質濃度に有意に関連する要因を選択した。投入した変数は母親の属性(年齢、出産歴など)、両親の喫煙・飲酒状況、分娩年、採血時期、食物摂取頻度、および魚摂取量等である。毛髪水銀濃度の解析にのみ母親のパーマ状況を追加で投入した。また、PCBs・ダイオキシン類および PFOA, PFOS 濃度の解析にのみ採血時期(出産前、出産後)を追加投入した。

6. 微量ダイオキシン類、水酸化 PCB (OH-PCB)測定法の開発

昨年度までに開発した血液および母乳中ダイオキシン・PCB 類一斉分析方法の精製工程を検討し、市販の OH-PCB 標準物質が一斉分析法の工程のどの画分に分画されるか精査した。次に血液試料を用い夾雑物の有無を検討した。さらに妊婦の血液中 OH-PCB を測定するためより高感度に OH-PCB を検出できる改良として固相カラムによる精製を加えた。また、LC/MS/MS で OH-PCB を測定するため、分離用カラム、モニターイオンを検討した。

分析対象は札幌市の一般病院・産科を受診した妊婦 268 名の血液であるが、妊婦の多くは PCB の製造および使用が中止され

た 1970 年以降に出生しており、血液中総 PCB 濃度平均は約 0.3 ppb で比較的低濃度であった。そこで本年度は血液中総 PCB 濃度の高い検体(0.5ppb 以上)の OH-PCB 濃度を測定した。

7. 有機フッ素化合物(PFCs)の胎児期曝露評価と児への健康影響評価

血漿中の PFCs を測定するのに研究対象とする PFCs(PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA・PFHxS)の標準品を用いて検量線を作成した。

機器の状態を確認後、我々の開発した血漿中 PFCs 前処理方法の正確性を検討するために、標準血清を用いて血中 PFCs 濃度 14 種を世界の他機関との測定値を比較した。この時、血清に添加する内部標準物質は、PFOS-13C4・PFOA-13C4・PFNA-13C9・PFDA-13C9・PFHxS-13C3 を用いた。

8. 血液中のビスフェノール A(BPA)の分析

開発した同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(ID-LC-MS/MS)をヒト血液試料 70 検体に適用した。内標準物質として、BPA-d₁₆ をクリーンアップスパイク、BPA-2,2',6,6'-d₄(BPA-d₄)をシリジスパイクとして用いた。また、固相充填済み樹脂製カートリッジカラムとして ISOLUTE マルチモード(500mg/3mL, Biotage 社製; 904-0050-B)を用いた。

9. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる脳内神経伝達物質と養育環境要因の関係

注意欠損・多動性障害(Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)の発症には脳内神経伝達物質の関係が示唆されているが、遺伝的素因だけで

なく養育環境要因も関与すると考えられることから、ADHDの化学物質リスク評価を行うためには、これら脳内神経伝達物質および化学物質以外の環境について明らかにしておく必要がある。英語論文は、PubMedのデータベースを用いて検索した。検索キーワードは、[MeSH]を使い“Attention Deficit Hyperactivity Disorders”および“home or life or social environment”とした。脳内神経伝達物質との相互作用では、“genes”, “interaction”を追加して検索した。日本語論文は、医中誌データベースを用い、同一の検索キーワードを用いた。期間は2011年までの10年間とした。

10. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる環境化学物質(生活環境も含む)曝露とその代謝に関与する遺伝子多型と相互作用

注意欠損・多動性障害(Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)発症には、遺伝要因だけでなく、環境要因も重要である。ADHDの発症には幾つかの環境化学物質の関与が報告されている。環境化学物質の曝露要因とその代謝に関与する遺伝子多型との相互作用と、ADHDの関連を中心に、現在までの知見を整理するために、PubMedを用いて文献検索を行った。環境要因では、ADHDと内分泌かく乱化学物質(67種)、あるいは農薬(443種)を組合せた検索式とした。遺伝要因と環境-遺伝相互作用では、[MeSH]を使い ADHD および genes, さらに environment, smoking, alcohols, environmental pollutants, endocrine disruptors, agrochemicals, dioxins, perfluorooctanoic acid, pesticides, 内分泌かく乱化学物質(67種)、あるいは農薬(443種)を組合せた検索式とした。さらに、ヒト、英語、日本語、子ども(0-18歳)に制

限し、本疾患と関係なかった論文は除いた。

環境要因の研究は、欧米中心に多数行われていた。ADHDの主要な要因は周産期の障害と考えられており、特に、喫煙や飲酒といった胎児期における環境化学物質の影響に関する研究が行われていた。2003年までの文献は吉益らや著者らの総説を一部改編し、2003年以降の論文を追加した。

環境-遺伝相互作用との研究は検索期間を絞らずに検索したが、ここ10年以内の研究が多かったため、これらの研究を中心に検討した。

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび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、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で規定されている「ヒト組織およ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に行った。

C. 研究結果

1. 先天異常の発生状況

平成15年1月から23年10月までに新生児個票が送られてきた対象者は18,383名であり、生産、死産、流産を含む全出産18,383件のうち、何らかの先天異常のある児の総数は354件(1.93%)であった。その中で、マーカー奇形248件(1.35%)、その

他の先天奇形 136 件(0.74%)であった。また、在胎 22 週以降の出産 18,119 件中では、先天異常のある児は 307 件(1.69%)であった。

全出産において、出産 1 万対の有病率で最も高い先天異常は心室中隔欠損症 28 名と停留精巣・非触知精巣 13 名(男児のみ 9,197 名で算出)15.2 であった。次いで Down 症候群 13.1(24 名)、口唇口蓋裂 10.9(20 名)、多指症 9.2(17 名)などであった。マーカー奇形以外の先天異常は、中枢神経系疾患、マーカー奇形以外の染色体異常、下肢形成不良などの重篤な大奇形から、副耳、臀部母斑などの小奇形まで 80 種の報告があった。在胎 22 週以降の出産に関して先天異常有病率を平成 14-18 年度の JAOG 報告(ICBDSR Annual Report, 2008)と比較すると、尿道下裂の有病率が JAOG よりも 2.4、ダウン症が 1.8 高かった(いずれも出生 1 万対)。一方、心室中隔欠損症、ファロー四徴症、大血管転位症などの先天性心疾患、水頭症、脊髄髄膜瘤、食道閉鎖、小腸閉鎖、異形成腎、18 トリソミーなどは JAOG よりも低い有病率であった。

2. 妊婦の葉酸値と先天性単発奇形との関連

先天性単発奇形がある出生児(症例群)は、272 名(2.7%)であった。症例群と対照群の妊娠時年齢は、それぞれ 29.5 ± 4.5 歳、 29.4 ± 4.7 歳で両群に有意な差はみられなかった。教育年数区分は両群に有意な差が認められたが($p=0.042$)、世帯収入、出産歴、妊娠初期の喫煙・飲酒の有無に有意な差はみられなかった。また、妊娠前後の葉酸サプリメント使用者(マルチビタミン含む)は、症例群 45 名(18.4%)、対照群 1,542 名(17.5%)で有意な差はみられなかった。出生時体重は症例群 2762 ± 839 g、対照群群

3029 ± 469 g で症例群が有意に低かった($p<0.001$)。また、児の性別区分にも有意な差が認められた($p<0.001$)

妊娠初期血清葉酸値の平均は 8.0 ± 7.3 ng/ml で、99.4%が CLIA 法による基準値 3.1ng/ml を超えていた。また、症例群の平均血清葉酸値は 8.2 ± 4.9 ng/ml、対照群群 8.0 ± 7.4 ng/ml で両群に有意な差はみられなかった。次に、妊娠初期血清葉酸値と先天性単発奇形発症との関連を教育年数、世帯収入、妊娠時年齢、妊娠・出産歴、妊娠前喫煙習慣、世帯収入、葉酸サプリメント摂取開始時期、妊娠初期の喫煙・飲酒習慣で層別化分析を行ったが、いずれも有意な差はみられなかった。さらに、妊娠初期血清葉酸値三分位数、葉酸サプリメント摂取時期、妊娠初期までの喫煙と先天性単発奇形発生との関連を検討したが、いずれも関連性は認められなかった。

3. 妊娠初期(第 1 三半期)の母体血清葉酸濃度と流早産リスク等に関する研究

母の基本的属性と母体血清葉酸濃度との関連では、母年齢が高いほど血清葉酸濃度が高い傾向が認められた。葉酸サプリメント摂取群では、血清葉酸濃度が有意に高値であった。喫煙群では、血清葉酸濃度は有意に低かった。また、年収が高いほど血清葉酸濃度は高い傾向がみられた。

母体血清葉酸濃度四分位別による転帰をみると、後期流産率と早産率、在胎週数、出生体重、SGA の割合は、血清葉酸濃度で分けた 4 群間でいずれも有意差を認めなかった。在胎週数で分けた 4 群間で、在胎週数 37 週以上の群が、在胎週数 28-36 週の群よりも血清葉酸濃度が低かった。葉酸欠乏症に相当する血清葉酸濃度を示した 20 例(0.39%)のうち、19 例は満期産であり、出生体重は 3132 ± 321 g(平均 \pm 標準偏差)であった。

4. 出生時体格に影響を及ぼす妊婦の受動喫煙曝露

非喫煙妊婦の母体血漿中コチニン濃度を4群に分類して検討したところ、第1四分位(0.15ng/mL)群に対して、第4四分位(0.81ng/mL)群の出生時体重は61.4g($p=0.002$)、出生時身長は0.6cm($p=0.002$)、出生時頭囲は0.5cm($p=0.007$)有意に低下した。また、男女別でみると、男児では、出生時体重が70.0g($p=0.012$)、出生時頭囲が0.5cm($p=0.037$)と有意に低下し、女児では、出生時身長が0.8cm($p=0.011$)有意に低下した。

5. 母体血液中のPCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物および毛髪水銀濃度に関連する要因の基礎的検討

環境化学物質の濃度(中央値)はそれぞれPCBs=107 ng/g lipid, Total ダイオキシン類 =13.9 TEQ pg/g lipid, PFOS=5.20ng/ml, PFOA=1.30ng/ml, およびHg=1.40ppmであった。それぞれの物質濃度の相関は、PCBsとダイオキシン類が最も強く($r=0.808$, $p<0.001$)、PCBsとHg($r=0.380$, $p<0.001$)、ダイオキシン類とHg($r=0.318$, $p<0.001$)、ダイオキシン類とPFOS($r=0.257$, $p<0.001$)およびPFOSとPFOA($r=0.240$, $p<0.001$)で中程度の相関が認められた。単変量解析では、各物質濃度と母親の年齢、身長、出産歴、採血時期、分娩年、世帯収入、北海道の居住期間、母親の喫煙歴、妊娠中飲酒、1日魚摂取量、遠海魚摂取、および牛乳摂取が有意に関連した。ステップワイズ法で選択した母親の年齢、非妊娠時体重、出産歴、分娩年、採血時期、魚推定摂取量、遠海魚摂取頻度、および牛肉摂取頻度を重回帰分析の最終モデルとした。

各物質濃度は、母親の年齢、非妊娠時体

重、母親の妊娠中飲酒、魚推定摂取量(g/day)、遠海魚摂取頻度および牛肉摂取頻度と正の関連を示した。特に、母親年齢のPCBsおよびダイオキシン類濃度に対する標準化回帰係数(Std β)、分娩年のPFOA濃度に対する標準化回帰係数は正の関連を示す変数の中で高かった(PCBs:Std $\beta=0.469$, 95%CI ダイオキシン類:Std $\beta=0.348$, PFOA:Std $\beta=0.204$)。

一方で、各物質濃度は、母親の出産歴、母親の喫煙歴、出産後採血、北海道の居住期間と負の関連を示した。特に母親出産歴のPCBs・ダイオキシン類とPFOA濃度に対する標準化回帰係数(PCBs:Std $\beta=-0.292$, ダイオキシン類:Std $\beta=-0.359$, PFOA:Std $\beta=-0.379$)、分娩年のダイオキシン類およびPFOS濃度に対する標準化回帰係数(ダイオキシン類:Std $\beta=-0.206$, PFOS:Std $\beta=-0.455$)、測定時期のPFOS濃度に対する標準化回帰係数(PFOS:Std $\beta=-0.226$)は負の関連を示した変数の中で高かった。分娩年とPFOAを除く物質濃度は負の関連を示した。

さらに、魚推定摂取量と遠洋魚の総水銀濃度(魚摂取量/Hg:Std $\beta=0.185$, 遠洋魚/Hg:Std $\beta=0.149$)および牛肉摂取量のPCBs濃度(牛肉摂取量/PCBs:Std $\beta=0.090$)に対する標準化回帰係数は正の関連を示した。

6. 微量ダイオキシン類、水酸化PCB(OH-PCB)測定法の開発

血液および母乳中ダイオキシン・PCB類一斉分析方法ではOH-PCBは硝酸銀シリカゲルカラムに保持されていたため、50%ジクロロメタン-ヘキサンでOH-PCBを溶出した。さらに、OH-PCB画分を濃縮・乾固し、0.5mlメタノールに溶解した後、固相カラムをEnvil8カラムに変更した。精製した試料にシリンジスパイクを添加し

LC/MS/MS で測定した。モニターイオンは従来最も強度の強い M+イオンを使用した。が、塩素イオン(35)を使用しバックグラウンドの低い測定条件に変更した。今回開発した血液中ダイオキシン・PCB 類および OH-PCB 一斉分析法で測定した妊婦の血液中総 OH-PCB 濃度の平均は 37pg/g, 最も濃度の高い OH-PCB の異性体は 4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB(4OHCB146) であった。表 4 に今回の分析で検出した異性体別濃度と他機関の分析例での検出濃度を比較した。

7. 有機フッ素化合物(PFCs)の胎児期曝露評価と児への健康影響評価

標準液を用いて検量線を作成したところ、6 種類すべての PFCs において R² が 0.993 以上であり、綺麗な直線性を示した。標準血清を用いた血中 PFCs 濃度 14 種を他機関との測定値を比較した結果、ほぼ同様の結果が示された。さらに、北海道内の約 40 産科医療施設で実施した出生前向きコーホート研究(北海道スタディ)の検体の測定を行った結果、PFOS・PFOA については、同様の結果を示した。また、本研究の対象者は PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA が検出可能であった。PFBS・PFHxS・PFBA・PFPeA・PFHxA・PFHpA・PFDoA・PFTrDA・PFTeDA については検出限界以下であった。

8. 血液中のビスフェノール A(BPA)の分析

試料 70 検体は、3 ロットにわけて分析を実施した(ロット 1: 試料 ID 1~21, ロット 2: 試料 ID 22~46, ロット 3: 試料 ID 47~70)。操作ブランク試験は各ロットについて 5 回実施した。操作ブランクの平均値は 1 回目 0.088ng/mL, 2 回目 0.038ng/mL 及び 3 回目 0.088ng/mL であり 0.1 ng/mL 未

満であった。

ヒト血液試料 70 検体の分析においては、ロット毎のブランク試験とは別途、実試料の分析を行う前に、全操作ブランク試験を行い、BPA の汚染が問題ないことを確認した。血液中の BPA 濃度は、ND~0.153ng/mL(平均値 0.058ng/mL, 中央値 0.049ng/mL)であった。検体の測定における各試料の回収率(クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の値を用い、回収率を計算した。全試料の回収率は 71~113% の範囲であった。装置の変動について確認を行うため、濃度 1.0ng/mL の標準溶液を測定試料 3~5 検体毎に測定し、その相対感度係数(RRF)を検量線作成時の RRF と比較して評価を行った。各測定日における RRF は、検量線における RRF の±20%の範囲であった。また、各測定の平均値は、1.02, 1.05 及び 1.01 であった。

9. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる脳内神経伝達物質と養育環境要因の関係

海外の論文から、ADHD と養育環境要因の関連を検討したものは 4 編であった。養育環境要因と脳内神経伝達物質の交互作用を検討した報告は 9 編であった。日本における研究は見当たらなかった。

養育環境要因は、母親の温かさ(Tullu ら)や授乳期間の長さ(Julvetz ら)が ADHD 症状の緩和に関連していた。テレビやゲームの視聴時間は注意機能に関連しており、その影響は青年期も同様に認められた(Swing ら)。また、Pelsser らはダイエットと ADHD との関連について無作為化対照試験を実施し、ADHD 児への介入プログラムとしての可能性を報告していた。

養育環境と脳内神経伝達物質との交互作用では、夫婦間の葛藤・自己非難の曝露

が、*DRD4* リスク型において ADHD の不注意症状と関連していた。経済状況に絡んでは 3 編の報告があった。Nikolas らは経済的困難と両親の不仲に関する自責感と *SLC4AC* との関連を、Lasky-Su らは経済状況と *BNTF10SNPs* との関連を、Nobile らは経済状況と *COMT Val158Met* との関連を報告していた。母親のぬくもりや批判と言った愛情の曝露と遺伝交互作用では関連が認められなかった。社会認識能力と *OXTR5SNPs* との関連が、人生上の出来事と *NET*, *COMT*, *SERTPR* との関連が、心理的ストレスと *DAT1* との関連が、しつけの質と *DRD4VNTR* との関連が 1 編ずつ報告されていた。

10. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる環境化学物質(生活環境も含む)曝露とその代謝に関与する遺伝子多型と交互作用

生活環境曝露要因と ADHD については、生活環境の曝露要因は喫煙が 26 編(26 編のうち 4 編は受動喫煙も検討)、飲酒が 3 編であった。

環境化学物質曝露要因と ADHD は、環境化学物質の曝露要因について、フタル酸エステル類が 2 編、有機フッ素系化合物が 2 編、有機塩素系化合物が 1 編、有機臭素系化合物が 1 編、有機リン系農薬が 5 編、有機塩素系農薬が 1 編、無機ヒ素が 1 編であった。

ADHD に関わる環境要因と脳内神経伝達物質および環境化学物質の代謝に関わる遺伝要因では、脳内神経伝達物質が関与する遺伝要因との関連には、喫煙が 5 編、飲酒が 2 編、出生季節が 1 編であった。環境化学物質の代謝に関わる遺伝子多型との関連について、有機リン系農薬の曝露研究が 1 編あった。Eskenazi ら(2010)は、有機リン系農薬(OP)曝露と OP の解毒酵素である

パラオキシゲナーゼ 1 型(PON1)との交互作用を分析した。その結果、児の PON1-108C>T 遺伝子多型において、ベイリーテストの MDI(Mental Development Index)点数については、CC 型と比べて、CT 型が 3.9 点低く(95%CI -6.6 to -1.2; P<0.01), TT 型が 5.7 点(95%CI -9.0 to -2.5; P<0.01)有意に低かった(P for trend=0.01)。妊婦の尿中ジアルキルリン酸ジメチル代謝物(DM DAPs)と児の PON1-108C>T 遺伝子多型において、ベイリーテストの MDI 点数については、CC 型が 2.2 点低く(95%CI -8.0 to 3.6), CT 型が 3.4 点低く(95%CI -7.4 to 0.6), TT 型が 5.9 点低かった(95%CI -11.1 to -0.6; P<0.05)(P for trend=0.91)。

D. 考察

本研究で示した先天異常発生状況のデータは、わが国における初めての大規模な地域病院ベースの貴重な情報となる。先天異常データについては、これまでの報告では調査形態や対象者の選択基準が一定ではない等のために単純な比較は困難であるが、形態異常ごとの頻度をみると、水頭症、消化管閉鎖、二分脊椎症、心奇形など胎児期に診断され、出生直後の集中的対応が要求される重篤な形態異常については、JAOG 調査よりも低い傾向がみられた。JAOG 調査の協力施設は主に大学病院や地域の大規模病院であり、胎児期から出生直後に集中的治療を行う必要がある重篤疾患が集積する傾向があるのに対して、本研究の協力医療機関は、北海道全域の大規模病院、専門病院から開業産科クリニックまでさまざまな規模の施設であることから、一般的な地域の傾向を JAOG よりよく反映しているためと考えられる。また、わが国の尿道下裂は近年上昇傾向にあると報告されているが、JAOG の尿道下裂の有病率を解釈す

るうえでは、①モニタリング対象数が限定されることによる選択バイアスの存在、②モニタリング初期段階の軽症例の見落とし、③診断基準の地域差を考慮する必要があるとの指摘があり、先天異常有病率を国内外の報告と比較するにはこれらの点に留意して、発生数、年次推移を検討することが必要である。地域ベースの前向きコホート研究という特徴を有している本研究は一般的な地域の有病率を把握する上で、わが国で他に例のない非常に重要なデータと考えられる。

妊娠初期血清葉酸値による先天性単発奇形発症への影響は認められなかった。また、葉酸サプリメント摂取開始時期、妊娠初期の喫煙有無を層別化して解析したが関連はなかった。葉酸代謝物は DNA 合成、メチル化に重要な役割を果たすことがわかっており、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)に代表される補酵素の活性変化が個体発生過程に生じた場合の奇形発生への関与が検討されている。体内で葉酸が十分に活用されるには、葉酸代謝関連遺伝子やその活性に関与する環境要因との交互作用を解明することが必要である。そこで、今後は葉酸代謝関連遺伝子多型を測定し、先天性単発奇形発症に関与する遺伝子多型と環境要因との交互作用を検討していく予定である。

海外からの報告では、妊娠初期の血清葉酸濃度が低いことと早産や胎児発育不全の関連を示唆したものが幾つかある。本研究では両者の関連が認められなかったが、わが国の早産率が低い水準であることや、妊婦の栄養摂取の特徴、妊娠管理が充実していることなどが、低い血清葉酸濃度が早産や胎児発育不全の危険因子とならない一因と考えられる。また、本研究における血清葉酸値は妊婦の担当医に報告しているが、介入すべき血清葉酸値の基準は統一されて

いないため、妊婦への対応は医師に任せられている。結果を知らせた後に、葉酸摂取が行われたかについて調査されていないが、葉酸値の低いことを指摘された妊婦が、葉酸を摂取したことが影響した可能性は否定できない。

わが国では欧米諸国と比較して、いまだ男性や子育て世代となる若い女性の喫煙率が高いことが報告されている。本研究では、受動喫煙曝露の客観的指標として、血漿中ニコチン濃度を測定し、妊娠期の能動喫煙のみならず、受動喫煙が出生時体格を低下させることを明らかにした。

妊婦の母体血および毛髪中の環境化学物質濃度は母親の年齢、非妊娠時体重、出産歴、分娩年、北海道居住期間、喫煙歴、妊娠中飲酒状況、1日魚推定摂取量、遠海魚摂取頻度および牛肉摂取頻度と有意に関連することが示された。

本研究ならびにわが国における先行研究では、母親の加齢と共に PCBs・ダイオキシン類は増加していたことから、一般生活環境による日常の摂取量が排出量を上回り、結果的に加齢とともに蓄積量が増加することが示唆された。母体血中 PCBs・ダイオキシン類および PFOS・PFOA 濃度は初産妊婦より経産妊婦で低かった。妊婦を対象にした先行研究でも同様の結果が認められており、女性に特有となる PCBs・ダイオキシン類の排出経路が妊娠から出産後の時期に存在すること示した日本および諸外国の先行研究と一致した。

環境モニタリングや疫学研究では、PCBs・ダイオキシン類の環境中レベルが経年的に減少していることが報告されており、本研究でも認められた母親の加齢に伴う PCBs・ダイオキシン類濃度の増加および分娩年経過に伴う減少は、環境中レベルの経年変化や物質の体内半減期に依存する生体の長期的な曝露状況を反映した結果で

あると考えられる。一方で、わが国の環境モニタリング調査では、PFOS, PFOA の分布および経年変化は物質により異なることが報告されており、本研究で認められた分娩年と PFOS, PFOA 濃度との関連の相違は、環境中や体内曝露量の分布あるいはバックグラウンドレベルの経年変化が物質間で異なることを示していると考えられた。毛髪水銀濃度と母親年齢、分娩年には有意な関連が認められなかったが、体内半減期が 90 日程度の水銀では長期的曝露状況を反映しなかったことが考えられる。

北海道に 2 年以上住んでいる妊婦は、2 年未満の妊婦より母体血中ダイオキシン類濃度が低かった。我々の先行研究では、北海道の曝露量は日本国内および諸外国より相対的に低いレベルであると報告しており、北海道で長く住んでいる妊婦ほど曝露量が低いという結果は、母体血中濃度が過去 2 年の居住地での曝露状況を反映したと考えられた。喫煙歴がある妊婦では、PCBs・ダイオキシン類および PFOS 濃度が低かった。先行研究では喫煙が薬物代謝酵素の誘導促進を起こして、PCBs・ダイオキシン類排出が亢進することが報告されているが、本研究はダイオキシン類だけでなく、PFOS の代謝亢進も起こる可能性も初めて示した。また、妊娠中の PCBs・ダイオキシン類と PFOS の排出促進は胎児の曝露量増加と直結するため、次世代へのリスク評価を行う上で重要な要因であると考えられた。妊婦の飲酒については、PCBs・ダイオキシン類濃度の増加と有意に関連していた。日本の成人を対象者にした先行研究はアルコール摂取が肝臓代謝に悪影響を与え、この変化にダイオキシン類の代謝も影響を受ける可能性を報告しているが、本研究は、妊娠中のアルコール摂取が母体血中 PCBs・ダイオキシン類濃度を増加させる可能性も初めて報告した。

曝露源や物質の特性が類似するため PCBs とダイオキシン類濃度の間には高い相関がみられたが、関連要因には相違が認められた。PCBs・ダイオキシン類と水銀濃度の中程度の相関は、毛髪水銀が生体の環境化学物質曝露の指標になることを示したが、水銀と PFOS, PFOA 濃度の弱い相関は有機フッ素化合物の物質特性および曝露状況の違いを反映した可能性が考えられた。

OH-PCB は甲状腺ホルモンと類似した構造を持つため、生体内で甲状腺ホルモンレセプターと結合し残留あるいは甲状腺ホルモン作用をかく乱する可能性があることが報告されており、母体内で胎児に及ぼす影響が危惧されている。OH-PCB の分析法は血液から抽出、精製後誘導体化し高分解能 GC/MS 等を用いて測定する方法が報告されている。しかし、①誘導体化の際に異性体により反応性が異なる可能性があること、②LC/MS/MS を用い分離測定が出来れば誘導体化を省略できること、③我々の血液中ダイオキシン、PCB 一斉分析法で同時に OH-PCB も分析することができればより簡便になるため新たな分析法を開発した。現在、誘導体化し高分解能 GC/MS を用いた測定を行っている国内の他機関と同一試料を用いたクロスチェックを実施している。

近年、環境および食品中のダイオキシン・PCB 類濃度は低下しており、人体の血液中 PCB 類濃度も低下していることが報告されている。分析法の開発に用いた血液の Total PCB 濃度は 2.4ng/g lipid であるが、本研究で対象とする妊婦の血液中 PCB 濃度は平均 1.2ng/g lipid であった。このため、本研究で対象とする妊婦の血液中 OH-PCB 濃度も約半分程度であることが推察されたが総 OH-PCB 濃度は 1/3 程度であり、異性体では 1/2 から 1/10 程度であった。2010 年度カネミ油症検診の油症患者の

血液中 OH-PCB 濃度を測定した結果、総 OH-PCB 濃度の平均値は 514pg/g (53-1740pg/g)で最も濃度の高い OH-PCB の異性体は 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB (4OHCB187)であった。油症患者は PCB に汚染された食用油を摂取しているため血液中総 PCB 濃度の平均は約 5ppb と一般人の数倍高い値を示す。油症患者の血液中総 OH-PCB 濃度は一般人の 4 倍、本研究対象妊婦の 14 倍であり、最も濃度の高い OH-PCB の異性体も異なっていた。OH-PCB 濃度は生体の代謝機能や体内の化学物質濃度・組成により異なることが推測され今後の解析が必要と思われる。本研究で開発した分析法は 5g の血液からダイオキシン・PCB 類、OH-PCB の一斉分析が可能となるため母体の環境化学物質による汚染実態の解明に大きく貢献するものと期待される。今後も妊婦の血液中 OH-PCB 濃度を測定し、OH-PCB 濃度とダイオキシン・PCB 類濃度との相関や先天異常との関係を解析する。

胎児期の PFCs 曝露評価のために、母体血中 PFCs 濃度 14 種の一斉分析を行う。前向きコホート研究では、2003 年～2005 年の研究参加登録者 8,426 名のうち、初期調査票があるもの 7,892 名、妊娠後期の血液サンプルがあるもの 6,381 名、新生児個票があるもの(生産)5,966 名から先天異常、多胎を除外し、4 ヶ月・1 歳・2 歳調査票があるもの 2,937 名からデータ欠損者を除外した約 2,000 名を対象とする。母体血中 PFCs 濃度と出生時・1 歳 6 ヶ月・3 歳時の体格、LBW、アレルギー感染症との関連について解析を行う。

SGA をアウトカムとした Nested-ケースコントロール研究では、前向きコホート研究と同様に母体血中 PFCs 濃度を測定する約 2,000 名の中から、1 対 2 の割合でケースとコントロールを選出する。ケースで

ある SGA 224 名(7.62 %)と、児の性別、出産経歴、在胎週数でマッチングを行ったコントロール 448 名で解析を行う。

先天異常をアウトカムとした Nested-ケースコントロール研究では、前向きコホート研究のデザインで除外した先天異常を有する対象者をケースとし、母体血中 PFCs 濃度の測定を行う。コントロールは、母体血中 PFCs 濃度を測定する約 2,000 名の中から 1 対 2 の割合で選出する。ケースである先天異常 86 名(1.48 %), 児の性別、出産病院、母の年齢でマッチングを行ったコントロール 172 名で解析を行う。

これにより、北海道における妊婦の PFCs 汚染実態を把握するとともに、出生後の児の健康影響を検討することで PFCs の胎児期曝露の影響を解明することが可能となる。

ヒト血液中の BPA を議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発し、昨年度までに、固相抽出カラムを用いた前処理とそれに続く同位体希釈-液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析計 (ID-LC/MS/MS)法を検討した。さらに、血液中 BPA の分析においてはブランク値の低減が最も重要であったため、試薬ブランク、個々の前処理段階におけるブランク、カートリッジからの溶出ブランク及び全操作ブランク、並びに前処理用カートリッジカラムのコンディショニング方法の検討を行い、最終的にブランク値を 0.1ng/mL 未満のレベルに安定して抑えることが可能となった。

注意欠損・多動性障害 (Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)発症の養育環境要因、環境要因、遺伝的要因および交互作用に関する文献レビューにおいて、ADHD と養育環境の研究はまだ少なく、報告された 4 編についても遺伝的素因の検討がなされていなかった。養育

環境と脳内神経伝達物質との相互作用の研究では、ドーパミン系あるいはセロトニン系物質を中心に候補遺伝子の多型について検討していたが、前向きコーホート研究は4編のみであること、環境曝露要因が様々な観点から設定されていること、さらに、すべて児の遺伝子多型しか調べていないことなどから、相互作用について結論付けることはまだできないと考えられる。今後はADHD発症に関連する遺伝的素因を有していても発症を予防するあるいは症状を緩和する環境要因についての研究が必要である。

妊娠中の生活環境要因としては喫煙や飲酒が検討されていた。また、環境化学物質とADHDとの関連では、内分泌かく乱化学物質であるフタル酸エステル類、有機フッ素系化合物、有機塩素系化合物、有機臭素系化合物について報告があった。ADHDの環境要因、遺伝的発症要因および相互作用に関する先行研究では、喫煙に関して1編を除くすべてで遺伝子多型との相互作用が認められていたことから、相互作用の存在が強く示唆された。しかし、ADHDの候補遺伝子は18種類あった。Genome Wide Association Study (GWAS)によってさらに多数の遺伝子との関連が示唆されているが、遺伝環境相互作用を検討したGWAS研究はほとんどないことから、遺伝要因、環境要因、およびそれらの相互作用について今後もさらなる検討が必要といえる。

E. 結論

本研究の参加妊婦において、平成23年10月末までに新生児個票が提出された18,383名に関して先天異常の集計を行った。先天異常のある児の総数は354名、そのうちマーカー奇形発生数は248件、その他の先天異常発生数は136件であった。在

胎22週以降の出産を対象とした先天異常有病率は1.69%(19,119名中307名)であった。北海道全域の地域病院ベースに基づく登録数が2万人に達したため、地域病院ベースの先天異常の発生率をより正確に把握するとともに、ダイオキシン類・PCB、PFCsやBPA曝露の影響について先天異常、SGA、アレルギー・感染症やADHDのような発達障害等について出生コーホート内症例対照研究として検討できる。さらに、先天異常、発育など次世代影響の重要な交絡要因となる母体血中葉酸濃度や母の能動および受動喫煙の有無と代謝酵素遺伝子多型を考慮して、先天異常および胎児発育や乳幼児期～学童期の神経発達、免疫アレルギーなど次世代影響を世界的にも初めて実証的に解明することが可能となるであろう。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Kanazawa A, Miyashita C, Okada E, Kobayashi S, Washino N, Sasaki S, Yoshioka E, Mizutani F, Chisaki Y, Saijo Y, Kishi R. Blood persistent organochlorine pesticides of pregnant women relating to their characteristics in the Hokkaido Study on environment and children's health. *Sci Total Environ*. In press.
2. 池野多美子, 小林澄貴, 馬場俊明, 岸玲子. 注意欠損/多動性障害(ADHD)に関する文献レビュー—有病率と発症の養育環境要因. *北海道公衆衛生学雑誌*. In press.
3. Yila TA, Sasaki S, Miyashita C, Braimoh TS, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Baba T, Yoshioka E, Minakami H, Endo G, Sengoku K, Kishi R. Effects of maternal 5,10-methylenetetrahydrofolate

- reductase C677T and A1298C polymorphisms and tobacco smoking on infant birth weight in a Japanese population. *Journal of Epidemiology*. In press.
4. 那須民江, 岸玲子. 胎生期低栄養と小児の健康. *日本衛生学雑誌*. 2012;67(1):21.
 5. Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, Konishi K, Ito YM, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y, Saito K, Nakazawa H, Kishi R. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environ Res*. 2012;112(1):118-125.
 6. 岸玲子. 【地域における母子保健縦断調査の活用】 環境と子どもの健康に関する北海道コーホートの成果と今後の課題. *保健の科学*. 2011;53(2):98-104.
 7. Todaka T, Hirakawa H, Kajiwara J, Onozuka D, Sasaki S, Miyashita C, Yoshioka E, Yuasa M, Kishi R, Iida T, Uchi H, Furue M. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in blood and breast milk collected from pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere*. 2011;85(11):1694-1700.
 8. Sasaki S, Braimoh TS, Yila TA, Yoshioka E, Kishi R. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy - A validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ*. 2011;412-413:114-118.
 9. Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, Kurahashi N, Tamaki J, Endo T, Sengoku K, Nonomura K, Minakami H. Cohort Profile: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan. *Int J Epidemiol*. 2011;40(3):611-618.
 10. Miyashita C, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Okada E, Kobayashi S, Konishi K, Kajiwara J, Todaka T, Kishi R: Effects of prenatal exposure to dioxin-like compounds on allergies and infections during infancy. *Environ Res*. 2011;111(4):551-558.
- 2) 学会発表
1. 岸玲子. 第14回日本衛生学会学会賞受賞講演: 「出生コーホート研究による次世代影響解明など生涯を通じた人々の健康増進のための環境疫学研究」 第82回日本衛生学会学術総会. 京都市. Mar.24-26,2012.
 2. 宮下ちひろ, 佐々木成子, 岡田恵美子, 小林澄貴, 蜂谷紀之, 岩崎雄介, 中澤裕之, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子. 妊婦血と毛髪 of 環境化学物質に関連する要因-環境と子どもの健康北海道スタディ-. 第82回日本衛生学会学術総会. 京都市. Mar.24-26,2012.
 3. 池野多美子, 小林澄貴, 馬場俊明, 岸玲子. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の文献 Review(1)-有病率と発生に関する要因. 第82回日本衛生学会学術総会. 京都市. Mar.24-26,2012.
 4. 小林澄貴, 池野多美子, 馬場俊明, 岸玲子. 注意欠損・多動性障害(ADHD)の文献 Review(2)-環境要因と遺伝要因, その交互作用. 第82回日本衛生学会学術総会. 京都市. Mar.24-26,2012.
 5. Braimoh TS, Sasaki S, Yila TA, Baba

T, Miyashita C, Okada E, Kashino I,
Ito K, Kobayashi S, Yoshioka E,
Kishi R. Effects of prenatal
environmental tobacco smoke
exposure on infant birth size. The
American Public Health Association
(APHA) 139th Annual Meeting and
Exposition. Washington, DC, USA.
Oct.29–Nov.2,2011.

6. 岸玲子. 環境リスクの次世代影響：わが
国で最初の本格的な出生コーホートに
よる先天異常・発達・免疫アレルギー
の検討「環境と子どもの健康に関する
北海道研究」. 第28回日本医学会総会.
東京都. Sep.18, 2011.
7. Itoh S, Kato S, Yuasa M, Sasaki S,
Yoshioka E, Kashino I, Okada E,
Miyashita C, Kishi R. The effects of
PFOS and PROA in maternal serum
on maternal and infant thyroid
hormones. ISEE2011. Barcelona,
Spain. Sep.13-16,2011.
8. 山本潤,羽山真介,佐藤修之,松村徹,岸玲
子,佐々木成子,宮下ちひろ. 生体試料中
ビスフェノールA分析の検討. 日本環境
化学会第20回環境化学討論会. 熊本市.
July.16-18, 2011.
9. Braimoh TS, Sasaki S, Yila TA, Baba
T, Miyashita C, Okada E, Kashino I,
Ito K, Kobayashi S, Yoshioka E,
Kishi R. Effects of exposure to
second-hand smoke during pregnancy
on birth size. Women's Health
Conference. New York, USA. April
2,2011.

- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし