

201428012A

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 26 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

水上 尚典

札幌医科大学医学部産婦人科学講座

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

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門生命有機化学分野

松浦 英幸

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

石塚真由美

北海道大学環境健康科学研究教育センター

花岡 知之

東京医科歯科大学難治疾患研究所

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

池野多美子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

北海道大学大学院医学研究科社会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

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I.	はじめに	1
II.	総合研究報告書	
	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とケースコホートを用いた曝露リスク評価に関する研究 (岸 玲子, 水上 尚典, 遠藤 俊明, 千石 一雄ほか)	28
2.	血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析 (松村 徹)	42
3.	Prenatal exposure to bisphenol A and child neurodevelopment: The Hokkaido Study (岸 玲子, 池野多美子, 佐々木成子, 松村 徹ほか)	48
4.	ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 - 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状, 感染症との関連 - (佐々木 成子, 松村 徹, 岸 玲子)	70
5.	Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy (岸 玲子, 池野多美子ほか)	77
6.	Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood <i>IGF2/H19</i> Methylation and Associations with Birth Size (岸 玲子, 佐々木 成子, 石塚 真由美ほか)	87
7.	PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による 42 か月児の認知発達への影響 (池野多美子, 梶原 淳睦, 佐々木 成子, 岸 玲子, ほか)	107
8.	妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響 (岸 玲子, 梶原 淳睦ほか)	120
9.	胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響 (岸 玲子, 石塚 真由美ほか)	134
10.	有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後の免疫に与える影響 (岸 玲子, 松村 徹, 宮下 ちひろほか)	144

11. 有機塩素農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影響 (岸 玲子, 松村 徹ほか)	156
12. 妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型による出生時体格への影響 (佐々木 成子, 岸 玲子ほか)	167
13. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計 (花岡 知之ほか)	177
14. 児の出生体重と母親の社会経済要因との関連について (花岡 知之ほか)	185
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	198

I はじめに

PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物、有機塩素系農薬などは、環境での蓄積性や残留性が強いことから、いわゆる POPs (Persistent Organic Chemicals) として、世界的に生産や使用が制限されていますが、半減期が長いので、私たちの体内から容易にはなりません。さらにプラスチック可塑剤などとして使われているフタル酸エステル類やビスフェノール A などは、半減期は短いのですが広範囲に使用されているため、多くの人々の血液から検出されます。このような化学物質の人への影響は、大人よりも小児、胎児期に大きいことが懸念されています。たとえば尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、その原因が器官形成期のアンドロゲンの作用に依存しますので、いわゆる環境ホルモン作用を示すといわれる PCBs・ダイオキシン類などとの関係を調べる必要があります。しかし、世界的にも次世代への直接的な影響と因果関係は、未だ解明されるには至っておりません。さらに、ADHD など小児の軽度発達障害、あるいはアレルギーは、最近各国で増加していると報告されていますが、わが国では地域の一定集団を対象に環境リスクを評価することが全くなされていませんでした。

そこで、私たちは 2002 年から 2 つの前向き研究を立ち上げて研究を行っています。そのうち札幌市の 1 産院で説明し同意を得た妊婦様 514 人の母体血とお子様の臍帯血について、PCBs・ダイオキシン類、水酸化 PCB 類、有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)、農薬、フタル酸エステル類およびビスフェノール A の測定を行い、種々のアウトカムとの関係を調べています。また、北海道全域の北海道 (大規模) コーホートでは、母子ペアで参加者が 20929 名になり 2 万組を超えました。妊娠初期に同意を得た妊婦様全員の葉酸、コチニン (ニコチンの代謝物) 濃度を測定し、母体血の有機フッ素化合物もより詳しく PFDA・PFNA・PFHxS・PFUnDA など 11 種類の測定を行い、出生時体重やアレルギーへの影響を研究し、今後は先天異常や疾病との関係について解析を進めます。いずれのコーホートも、次世代影響を評価するために思春期まで追跡させていただくよう、参加者の皆様をお願いしています。

一方、最近のゲノムおよびエピゲノム研究の進歩から、化学物質の影響の強さは、曝露された個体の異物 (薬物) 代謝酵素類の遺伝子多型や疾病感受性遺伝子等によっても修飾されることが考えられます。このような研究は、同じ曝露濃度でも遺伝的ハイリスク群である場合、より予防的な対応を進める必要があります。

本研究は臨床家と環境疫学専門家の協力で進めています。このような地域をベースに胎児期から立ち上げ、環境リスク評価を行っている研究は、最近増えてきていますが、本研究はその先駆的な位置づけになります。今後、遺伝と環境の両面からのアプローチで予防医学的な数多くの成果が出ることを期待されますので、引き続き皆様のご協力をお願い申し上げます。

最後に多くの皆様のご尽力により研究を継続することができ、本年度報告書をこのようにまとめることができましたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成 27 年 3 月

研究代表者 岸 玲子

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

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 特任教授

研究要旨

本研究は2つの前向きコホートで妊娠中の環境化学物質曝露が胎児期および小児期に与える健康影響をリスク評価し、遺伝的感受性を含めて障害を予防する方策を明らかにすることを目的とする。地域ベースの37医療機関における大規模コホートでは、妊娠初期の12週までに同意を得た妊婦を対象に、母体血および臍帯血のPCBs・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）、フタル酸エステル類などの環境化学物質濃度を測定し、曝露による先天異常、Small for Gestational Age（SGA）および低出生体重（LBW）、免疫アレルギーへの影響と児の神経発達への直接的因果関係の評価する。平成25年度に登録妊婦は20,929名に達し、これまで新生児個票が得られた18,333名の妊娠転帰は、生産18,083名（98.74%）、死産102名（0.56%）、自然流産92名（0.50%）、人口流産37名（0.20%）であった。先天異常総数は358件（1.95%）、そのうちマーカー奇形243件であった。最も頻度が高かったのは心室中隔欠損症35人、次いで停留精巣・非触知精巣14人、ダウン症候群20人、口唇口蓋裂16人、水腎症16人などであった。

ダイオキシン類曝露について、超微量血液からOH-PCB類との一斉分析ができる簡便な方法を開発し、分析精度の信頼性を確認した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患145名について曝露評価を行っている。PCB・ダイオキシン類は先天性心疾患118名コントロール118名合計236名が測定済みである。PFCsは先天性心疾患145名コントロール145名が測定済みである。今後も引き続きPCB・ダイオキシン類、PFCsの曝露評価を継続すると共に、環境化学物質の関与が示唆されるマーカー奇形の尿道下裂・停留精巣78名をケースとして妊娠初期（器官形成期）の母体血血清を用いてBPA・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。早産およびSmall for Gestational Age（SGA）と社会経済要因（世帯収入、最終学歴、母親の職業の有無）との関係をCoxハザード分析したところ、母親の最終学歴が大学である児は、中学校である児と比較して早産リスクが1.12倍、およびSGAリスクが1.12倍有意に高くなった。海外と同様に日本においても母親の社会的経済要因が児の出生体重の低下に影響していることが考えられた。

514人の小規模コホートの児については、詳細な発達調査を実施している。今年度は微量血液試料中BPAを迅速処理、高精度で測定する生体試料分析法を同位体希釈LC/MS/MS法を開発確立した。さらにBPAフリー体の分析方法を開発し、保存中の血液試料からはBPAフリー体は検出されなかったため、試料採取から保存までの操作における試料のコンタミネーションはなかったと考えられた。胎児期のBPAの曝露が、児の甲状腺ホルモンや神経行動発達に与える影響を、甲状腺ホルモン濃度と6、18か月ベイリーテストのスコアを用いて検討した。胎児期のBPA曝露は児の甲状腺ホルモン濃度（TSH、FT4）や6、18か月での神経行動発達には有意な影響を与えていなかったが、女兒では6か月のMDIスコアと、TSHレベルでBPA濃度と負の関連がみられた。臍帯血IgEおよび乳幼児期のアレルギー症状、感染症との関連を検討した。臍帯血中IgE濃度との関連は認められなかったが、男児では、臍帯血中BPA濃度が約2.7倍になると、生後18ヵ月ま

での中耳炎のオッズ比が 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。PFOS/PFOA の胎児期曝露が生後 6・18 か月の神経行動発達に与える影響を検討した。血清中 PFOS および PFOA の濃度を LC/MS/MS 法を用いて分析した結果、母体血中 PFOA 濃度が高くなるほど出生後 6 か月のベイリー2 運動発達スコアが女児で有意に低下した。しかし生後 18 か月では有意な関連が認められなかった。PFCs11 種類 (PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFOS) の一斉分析の測定系を確立して検討した結果、2003 年から 2011 年で母体血中 PFOS, PFOA 濃度は有意に減少した。一方で、PFNA, PFDA 濃度は有意に上昇したことを報告しており、今後は炭素鎖が長いために半減期が長く生体影響が持続すると考えられる PFCs の代替物質の影響も含めて、胎児期 PFCs 曝露が出生後の神経行動発達へ及ぼす影響について明らかにする予定である。

我々はこれまでダイオキシン類の胎児期曝露が 6 か月の神経行動を特に男児で低下させると報告した。今年度はダイオキシン類の胎児期曝露が生後 42 か月児の認知発達におよぼす影響について検討したところ、ダイオキシン類曝露濃度が高いほど習得度尺度の得点が高くなった。社会経済要因（収入や教育歴）の高い妊婦の方は年齢が高く、同時に母親の年齢は化学物質曝露量にも相関しているため、年収で層別に解析したところダイオキシン類濃度と神経行動発達との関連は認められなかった。児の神経行動発達は生後の養育環境や栄養状態などに影響を受けるため、生後早期に認められた胎児期の環境化学物質曝露による負の影響が、42 か月の調査では生後の家庭環境要因（HOME など）の影響が大きくなり見えづらくなると考えられた。母体血中ダイオキシン類濃度とその代謝に関与する遺伝子多型が出生時体重におよぼす影響を調べた。母の解毒代謝 SNPs

(AHR,CYP1A1,GSTM1) の組合せにより、母体血中 PCDF 毒性等価量が 10 倍になる毎に児の出生時体重が 471g 低下し、化学物質に高感受性である遺伝的ハイリスク群の存在が示唆された。エピゲノム解析は PFOA 曝露による IGF2 低メチル化、ダイオキシンの PCDFs 曝露による男児での IGF2 低メチル化、高塩素化 PCBs の NoCBs・DeCB 曝露による女児での H19 高メチル化が示された。また、IGF2 のメチル化は出生時体格指数との間に有意な正の相関が認められ、化学物質曝露による出生体重低下に IGF2 メチル化が関与する可能性が示唆された。

母体血中有機塩素系農薬 29 種類を測定したところ、国内で使用実績のない農薬マイレックス、トキサフェンが検出され、輸入工業製品や生活環境からの曝露が示唆された。有機塩素系農薬の胎児期曝露による臍帯血 IgE の増加と生後 18 か月時の感染症リスク低下との関連が認められ、生後の免疫機能に影響し将来のアレルギーリスクを増加させる可能性が示された。神経行動発達への影響について、母体血中有機塩素系農薬と生後 6 か月、18 か月時のベイリー2 運動発達スコアとの関連を検討したところ、有意な関連は認められなかった。本研究の有機塩素系農薬の曝露レベルでは生後の神経行動発達に与える影響は低い可能性が示された。先行研究で妊婦のカフェイン摂取による流産や出生時体重減少のリスクは結果が一致せず、カフェイン代謝能の個体差が一因として示唆されることから、妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型が胎児発育に及ぼす影響を検討した。妊娠中のカフェイン摂取は出生時体格に有意な影響はなかったが、遺伝子多型を考慮すると CYP1A2 遺伝子多型が CC/CA 型で 100 mg 未満のカフェイン低摂取群と比較して、AA 型で 300 mg 以上のカフェイン高摂取群では、出生時頭囲が有意に減少した。さらに、非喫

煙妊婦では出生時体重にも有意な減少があった。日本人妊婦の不育症リスクが高くなった報告では、カフェイン代謝物であるパラキサンチンの関与が示唆されており、胎児に対する影響はカフェインそのものより代謝物であるパラキサンチンの方が大きいことが考えられた。

研究分担者

水上 尚典

（北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座産科教授）

遠藤 俊明

（札幌医科大学医学部
産婦人科学講座准教授）

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
腎泌尿器外科学分野名誉教授）

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長）

松村 徹

（いであ株式会社環境創造研究所
取締役・環境創造研究所副所長）

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
准教授）

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教室教授）

池野 多美子

（北海道大学環境健康科学研究教育センター
特任講師）

宮下 ちひろ

（北海道大学環境健康科学研究教育センター
特任講師）

荒木 敦子

（北海道大学環境健康科学研究教育センター
准教授）

花岡 知之

（北海道大学環境健康科学研究教育センター
客員教授）

佐田 文宏

（東京医科歯科大学難治疾患研究所
非常勤講師）

佐々木 成子

（北海道大学大学院医学研究科社会医学講座
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

伊藤 佐智子, Houman Goudarzi, 湊屋 街子,
小林 澄貴, 山崎 圭子, 小林 祥子, 田村 菜
穂美, アイツバマイ ゆふ, 西原 進吉, 喜多 歳
子, Yila Thamar, 金澤 文子, 松島 愛子

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

伊藤久美子, 岡田恵美子, 馬場 俊明, Braimoh
Titilola

（北海道大学大学院医学研究科社会医学講座
公衆衛生学分野）

安住 薫

（北海道大学病院 臨床研究開発センター
臨床開発推進部門 北海道臨床開発機構・
TR 企画管理部）

榎野 いく子

（国立国際医療研究センター
疫学予防研究部）

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

（北海道大学病院周産母子センター）

山田 俊

（JCHO 北海道病院周産期医療センター）

白石 秀明

（北海道大学病院小児科）

馬場 剛

（札幌医科大学医学部産婦人科学講座）

西條 泰明

（旭川医科大学医学部健康科学講座）

宮本 敏伸

（旭川医科大学医学部産婦人科学講座）

中島 そのみ

（札幌医科大学大学院保健医療学研究科）

三井 貴彦

（北海道大学病院腎泌尿器外科）

三井 貴彦

（北海道大学病院腎泌尿器外科）

那須 民江

（中部大学生命健康科学部

スポーツ保健医療学科）

乃村 俊史

（北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野）

今野 哲、木村 孔一

（北海道大学大学院医学研究科

内科学講座呼吸器内科学分野）

伊藤 善也

（日本赤十字北海道看護大学臨床医学領域）

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、高橋 浩司、

高尾 佳子、飛石 和夫、安武 大輔、

新谷 依子、岡元 冬樹、宮脇 崇

（福岡県保健環境研究所）

戸高 尊

（九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野）

飯田 隆雄

（北九州生活科学センター）

山本 潤、小野田 優、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、岩崎 雄介

（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）

安武 章

（熊本大学大学院自然科学研究科）

研究協力機関

慶愛病院，えんどう桔梗マタニティクリニック，白石産科婦人科病院，公立芽室病院，青葉産婦人科クリニック，帯広協会病院，秋山記念病院，札幌医科大学附属病院，北海道大学病院，北見赤十字病院，五輪橋産科婦人科小児科病院，朋佑会札幌産科婦人科，函館中央病院，町立中標津病院，はしもとクリニック，王子総合病院，旭川医科大学病院，札幌徳州会病院，旭川赤十字病院，市立稚内病院，釧路労災病院，札幌厚生病院，士別市立病院，日鋼記念病院（旧室蘭日鋼記念病院），市立札幌病院，KKR札幌医療センター（旧幌南病院），市立函館病院，広域紋別病院（旧道立紋別総合病院），天使病院，函館五稜郭病院，中村病院，北見レディー

スクリニック，帯広厚生病院，名寄市立総合病院，遠軽厚生病院，釧路赤十字病院，市立釧路総合病院，勤医協札幌病院，札幌東豊病院

A. 研究目的：

ヒトでの科学的な根拠が乏しかったPCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物（PFCs）などの環境化学物質による先天異常や Small for Gestational Age（SGA）および低出生体重（LBW），免疫アレルギーや発達への影響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37の地域病院の協力を得て母体血および臍帯血の採取保存，化学物質曝露量の測定を行い，前向きコホート研究を実施する。本研究では，前向きコホート研究で，研究参加に同意した妊婦20,929名について，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。

PCBs・ダイオキシン類を代表とする残留性有機汚染物質は人体への健康影響が懸念され，胎児期曝露による低出生体重，ホルモン値の変動，精神行動発達などの関連が示されてきた。先天異常については，動物実験においてダイオキシン類の胎児期曝露が心奇形を引き起こすことが報告された（Kopf et al. 2009）。日本の疫学研究においては，母親がゴミ焼却炉から2km以内に居住する場合，その母親から生まれた先天性疾患を伴う児の死亡リスクが増加した（Tango et al. 2004）。フランスでは妊娠初期のダイオキシン濃度が高い群で，停留精巣リスクが増加（Cordier et al. 2010），デンマーク・フィンランド研究でも尿道下裂・停留精巣発症群の曝露濃度が対照群より高い傾向を認めた。しかし，これまでの疫学研究は生体試料を用いた胎児期の曝露評価が不十分で異性体レベルで測定した研究もなかった。特に生体影響がPCBsより

高いと懸念される OH-PCB に関する疫学報告は内外でほとんどない。

一方、PFOS, PFOA に代表される PFCs は、絶縁性・撥水撥油性をはじめとする優れた特性を有することから、衣類・建材・界面活性剤など幅広い分野で使用されている。人は主に飲料水や赤肉、魚介類を通して曝露され、胎児への影響が懸念されているが、十分な研究が行なわれていない。わが国でも 2010 年に PFOS, PFOSF が化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の第一種特定化学物質（一部用途以外の製造・輸入禁止）に指定された。そこで PFOS, PFOA 以外の代替品で長鎖の化合物を含めた PFCs の妊婦の曝露評価を行う必要がある。本研究では、UPLC/MS/MS を用いた一斉分析法を確立して、11 種類の PFCs 濃度を測定し曝露評価を行い、先天異常、成長発育、免疫、神経行動発達への影響を検討する。

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートやエポキシ樹脂などの原料として使用されている化学物質である。ヒトは主に経口摂取によって曝露されるが、エストロゲン類似作用やアンドロゲン阻害作用を表すことが示唆されている。近年、げっ歯類の動物実験で、従来の毒性試験で NOAEL とされた用量より低い用量の BPA 胎児期曝露で、仔の思春期早発や神経発達への影響などが報告されたが、ヒトでのデータはまだ少ない。本研究では、微量試料中 BPA の高精度測定法を開発して母体血中の BPA 濃度を測定し、胎児期 BPA 曝露による先天異常、成長発育、免疫、神経行動発達への影響を検討する。さらに、BPA フリー体の測定法を開発し、試料採取から保存におけるコンタミネーション状況の確認を行う。ヒトにおける BPA 曝露と神経発達に関するデータは多くない。いくつかの疫学研究では、胎児期の BPA 曝露と児

の神経行動への影響を様々なテスト指標を用いて検討しているが (Braun et al. 2009, 2011, 2014; Perera et al. 2012; Miodovnik et al. 2011; Harley et al. 2013; Yolton et al. 2011), これらの研究からの知見は一致していない。コホート研究以外でも、BPA を含む歯科材料を使用している児では、そうでない児と比べて、記憶力の低下や不安の増大、うつ、社会的ストレス、対人関係問題がみられたことが報告されている (Bellinger et al. 2007; Bellinger et al. 2008; Maserejian et al. 2012)。しかし、日本を含むアジア諸国からの報告はなく、また神経行動発達に重要な役割を担う甲状腺ホルモンへの影響をあわせた検討もないため、我が国での胎児期のビスフェノール A の曝露が児の精神行動発達に与える影響を調べるのが求められている。妊婦の母体尿中 BPA 濃度を胎児期曝露の指標としたヒト疫学研究では、BPA 濃度が増加すると生後 6 ヶ月児の喘鳴リスクが上昇したという報告がある一方で、胎児期 BPA 曝露は 5 歳児の喘鳴リスクと負の関連を示し、生後の BPA 曝露で幼児期の喘鳴リスクが上昇したとされるなど、まだ一致した結果は得られていない。本研究では、微量試料中 BPA 高精度測定法を用いて臍帯血中の BPA 濃度を測定し、胎児期 BPA 曝露による乳幼児期の免疫機能への影響を検討する。

PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による神経行動発達への次世代影響について、Walkowak J (2001) や Vregdenhil HJ(2002)は、乳幼児期の悪影響は、母乳保育や適切な家庭環境による知的な刺激により、学齢期には改善する傾向にあると示唆している。中島らは PCBs・ダイオキシン類濃度と生後 6 ヶ月児の BSID-II について検討し、母体血中の PCBs・ダイオキシン類の異性体及び Total, TEQ の濃度が高くなる

と PDI(運動尺度得点)が有意に低くなる、特に男児で低下することを報告した(2006)。今年度の研究では、42 か月時点の認知発達について K-ABC を用い、妊娠中の母親の喫煙や飲酒、魚摂取頻度、養育環境などを調整して、ダイオキシン類の胎児期曝露が幼児期にも影響を及ぼすか評価する。

我々は、生活環境における低レベルの胎児期ダイオキシン類濃度が出生時体重に与えることを既に小規模コーホートで示したが (Konishi et al., 2009) , 遺伝的素因の関係は調べられていない。ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体 (AHR) に結合し、シトクロム P450 (CYP) 1A1・CYP1A2・CYP1B1 によって代謝され、また転写抑制因子である AHR リプレッサー (AHRR) を刺激する。AHR・AHRR・CYP1 系遺伝子多型は種々の疾患リスクに影響することが知られている。そこでダイオキシン類曝露とその代謝に関する妊婦の遺伝子多型を解析し、出生時体重に与える影響を検討する。細胞内に入ったダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体(AHR)を介しシトクロム P450 (CYP) 1A1 および GSTM1 などのグルタチオン S-転移酵素によって代謝され体外へ排泄される。非喫煙の妊婦と比較して、喫煙している妊婦は児の出生時体格に影響を及ぼし、AHR, CYP1A1, GSTM1 遺伝子多型による遺伝的感受性があったと報告されているものの、ダイオキシン類についての報告はまだない。そこで本研究では、胎児期のダイオキシン類曝露が児の出生時体格に及ぼす影響の AHR (G>A, Arg554Lys), CYP1A1 (T>C, MspI) および GSTM1 (Present/Absent) 遺伝子多型による遺伝的感受性について検討する。

胎児期化学物質曝露などが児の DNA メチル化を始めとするエピゲノムに及ぼす影響が懸念されている。DNA メチル化は胎児期の環境と後生の表現型を結ぶ重要な因

子だと考えられている。なかでも Insulin-like growth factor 2 (IGF2) は胎児発育に重要な成長因子で、これまでにこの領域のメチル化異常と出生体重のほか、乳幼児期の肥満、また成人後の生活習慣病、肥満、大腸がんリスクとの関連も報告されている。本研究では、胎児期曝露による児への出生体重の減少等の健康影響が観察されている PFCs, ダイオキシン PCBs などの環境化学物質の胎児期曝露が臍帯血の IGF2/H19 領域、および LINE1 の DNA メチル化に及ぼす影響について検討する。

難分解性の有機塩素系農薬は内分泌攪乱作用を持つと懸念されている。有機塩素系農薬は臍帯血中の免疫グロブリンや IgE を増加させることが報告されているが、小児アレルギー発症リスクへの影響は一致した結果が得られていない (Gascon et al., 2014)。本研究の目的は有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後早期の免疫に与える影響を明らかにすることである。高濃度の有機塩素系農薬への胎児期曝露は乳幼児期初期の精神運動発達に悪影響を与えることが指摘されている。しかし、低濃度の有機塩素系農薬への曝露が及ぼす影響については、十分に明らかになっていない。本研究では、北海道における低濃度の有機塩素系農薬の胎児期曝露が、6 か月児の精神運動発達に及ぼす影響について検討する。

妊婦が摂取したカフェイン(1,3,7 トリメチルキサンチン)曝露により、神経伝達物質であるカテコールアミン濃度が増加して胎盤の血管収縮と胎児の低酸素症を引き起こし発育に影響を与えることが示唆されているが、その機序はまだよくわかっていない。先行研究では妊娠中のカフェイン摂取により、流産リスクの上昇や出生時体重が減少する報告もあるが、結果は一致しておらず、カフェイン代謝能の個体差が一因であると考えられる。CYP1A2 はカフェイン代

謝の約 95%を担っていて、胎盤や胎児に存在しない。先行研究でカフェイン代謝に特に関与する母親の CYP1A2 C164A 遺伝子多型で胎児発育との関連を検討した報告はまだない。本研究では、前向きコーホートの妊婦を対象として、妊娠中のカフェイン摂取が胎児発育に及ぼす影響を CYP1A2C164A 遺伝子多型による修飾も考慮して検討する。

「環境と子どもの健康に関する北海道コホート研究」において観察された出生アウトカム、特に妊娠期間と出生体重に関する記述を行う。また、出生児の未熟性に関する指標の将来の関連研究への応用について考察を行う。出生体重が低いことは、乳児期、幼児期、成人後の健康に悪影響を及ぼす。生下時体重の低下の原因は様々であるが、欧米諸国では母親の社会経済要因において不利であることと児の出生体重が低いことが有意に関係することが報告されている。しかし、日本の児の出生体重と母親の社会経済要因の関係については報告が少ない。そこで、本研究では日本における社会経済要因による出生体重への影響を明らかにする。

B. 研究方法

1. 前向きコーホートの生死流産、妊娠中疾患および先天異常の発生状況とケースコホートを用いた曝露リスク評価に関する研究

北海道内の産科 37 施設で妊娠初期から妊婦 20,929 名の協力を得て登録し、平成 25 年 1 月末までに新生児個票の情報が得られた全分娩（流産・死産を含む）18,333 名を対象とした。まず分娩後に医療機関で記載された新生児個票から、生死産、流産（自然・人口）を集計した。次いで生産児について、性比と単多胎数、在胎週数、出生体重を算出した。妊娠中の疾患について

発生状況を調べた。先天異常については、心奇形・尿道下裂・停留精巣等の先天異常（マーカー奇形・異常 55 疾患）、流死産、妊娠中の疾患について発生率を算出した。環境化学物質の曝露評価をケースコホート研究デザインで実施するため、大規模出生コホートからサブコホートを抽出した。先天異常のケースは出生時の新生児個票と生後の質問票から抽出し、コントロールはケースを除いたサブコホート群から出産病院、出産年、母親の出産時年齢、児の在胎週数からマッチングして抽出した。

2. 血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

これまでに血液中の BPA の測定を行うため同位体希釈・液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法（以降 ID-LC-MS/MS）を開発し、ヒト血液試料（母体血及び臍帯血）に適用した。この方法は、酵素を用いて BPA グルクロン酸抱合体の脱抱合化を行い、血液中の総 BPA を評価する方法であるが、今回は、脱抱合処理を行わず、BPA フリー体を測定する事で、血液試料のコンタミネーションの状況を確認した。

3. Prenatal exposure to bisphenol A and child neurodevelopment: The Hokkaido Study

Cord blood samples collected from the Hokkaido study participants were analyzed for BPA levels. Child neurodevelopment was assessed using mental and psychomotor development indexes (MDI and PDI) from a Bayley Scales of Infant Development II at 6 and 18 months of age (N = 121, 86, respectively). The associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment were estimated using

linear regression models adjusted for potential confounders. Data of TSH and FT4 were obtained from mass screening test for endocrine disorders conducted by Sapporo City Institute of Public Health.

4. ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 - 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状, 感染症との関連 -

札幌市内一産院コーホートに登録した母児 514 名について、自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況、食生活や教育歴、世帯収入などを調査し、医療診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。児の 18 ヶ月時には、母親による自記式質問票で児の健康調査を実施し、18 ヶ月時の体格、アレルギー症状および感染症の既往歴・現病歴、母乳栄養、集団保育歴、児の受動喫煙状況などについて 390 名から回答を得た。臍帯血中の BPA 濃度は、同位体希釈 LC-MS/MS 法（検出下限値 0.048 ng/mL）で測定した。また、臍帯血血清中総 IgE 濃度は、ELISA 法（検出下限値 0.05 IU/mL）で（株）SRL にて測定した。臍帯血中 BPA 濃度と IgE 濃度との関連をみるために、両方の測定結果が揃った 152 名を解析対象とした。BPA 濃度と IgE 濃度は自然対数変換し、検出下限値 (LOD) 以下の場合は半値を代入した。最終的に母の年齢、出産経歴、教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴および児の性別で調整した重回帰分析を行った。さらに、BPA 濃度と児の 18 ヶ月までのアレルギー症状および感染症との関連をみるために、両方のデータが得られた 136 名についてロジスティック回帰分析を行った。アレルギー症状は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴、児の性別、母乳栄養期間、18 ヶ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴、感

染症は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、児の性別、母乳栄養期間、18 ヶ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴で調整した。

5. Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy: The Hokkaido Study

A self-administered questionnaire survey was completed after the second trimester containing information related to smoking, household income and educational levels, and alcohol and caffeine intake during pregnancy. Medical information including maternal age, maternal body mass index (BMI) before pregnancy, parity, gestational age, pregnancy complications, type of delivery, infant sex, and birth size were obtained from participant medical records (Kishi et al. 2001). A 40-mL blood sample was taken from the maternal peripheral vein after the second trimester of pregnancy and maternal serum PFOS and PFOA levels were assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Nakata et al. 2009). BSIDII (Bayley 1993) were used to assess the infants' neurodevelopment at 6 and 18 months of age. This test includes mental developmental index (MDI) and the psychomotor developmental index (PDI). For data analysis, we used the following eligibility criteria for analysis of subjects: no serious illnesses or complications during pregnancy and delivery, singleton babies born at term, Apgar score of > 7 at 1 min, infants without congenital anomalies or diseases,

and BSID-II completed. We performed multiple-regression analysis to examine the association between and the levels of maternal PFCs and infant's BSID-II scores (MDI, PDI), and confounders were as follows: maternal age, parity, maternal educational levels, alcohol consumption and smoking during pregnancy, caffeine intake during pregnancy, blood sampling period, breast feeding, and total dioxin levels.

6. Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Associations with Birth Size

Two hundred thirty-five mother-child dyads from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health were included in this study. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) levels in the maternal sera were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The *IGF2* differentially methylated region (DMR), *H19* DMR and *LINE1* methylation were quantified in cord blood by pyrosequencing. Multiple linear regressions were performed.

7. PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による42か月児の認知発達への影響評価

対象者は2002年7月から2005年9月に札幌市内1産院を受診し、同意を得られた514名である。曝露評価は、妊婦426名について、妊娠23週から35週に採血した母体血中ダイオキシン類濃度 PCDDs（7異性体）、PCDFs（10異性体）、ダイオキシン様 PCBs（12異性体）を、高分解

能マススペクトロメーター（HRGC/HRMS法）で測定した。認知発達は the Kaufman Assessment Battery for Children（以下 K-ABC）で評価した。K-ABC は対面調査で認知能の認知処理過程と習得度をみている。調整因子は、分娩後5日以内に採取した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。母の認知能は WAIS-R 簡略版を用いた。自記式調査票から、母親の年齢、家族構成、両親の社会経済的要因、飲酒・喫煙、魚類の摂取など生活習慣、分娩時の児の情報、産後の母親抑うつ状態（エンジンバラ産後うつ）、養育環境を聴取した。分析対象者は、双胎6名を除き、K-ABCを実施出来た151名である。PCBs・ダイオキシン類は log 変換し重回帰分析で検討した。

8. 妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

札幌市内1産院外来を受診し同意を得た妊娠23～35週の妊婦421名について、独立変数を母体血中ダイオキシン類毒性等価量（TEQ）、従属変数を児の出生時体格とし、妊婦の AHR, CYP1A1, GSTM1 遺伝子多型で組合せ、交絡因子で調整した後、重回帰分析を行った。

9. 胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響

札幌の一産科病院で2002年7月から2005年10月までにリクルートし、同意を得た妊婦514名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から、臍帯血 DNA、の得られた238名を対象とした。臍帯血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を Epitect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)に

てバイサルファイト処理を行い、IGF2 DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2,109,519; site 2: 2,109,516; NCBI Human Genome Build 37.1), H19 DMR (chr11p15.5, site 1: 1,964,261; site 2: 1,964,259; site 3: 1,964,257; site 4: 1,964,254), LINE1 の3 遺伝子領域について、Pyromark Q24 system (Qiagen 社)にて DNA メチル化の定量を行った。

母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度は HRGC/HRMS により測定された。曝露影響評価の統計解析には重回帰分析を用い、曝露濃度は log10 変換した値を用い、また濃度が検出下限値以下の場合はその半値を代入した。ダイオキシン総量は毒性等量 (TEQ) に従い算出した (Van den Berg et al. 2005)。Σ Dioxin-TEQ は PCDDs 7 異性体, PCDFs 10 異性体, Non-ortho PCBs 4 異性体, Mono-ortho PCBs 10 異性体の総量, Σ PCBs は 58 種類の PCB 異性体の総量から計算した。

1 0. 有機塩素系農薬の胎児期曝露が乳幼児の免疫に与える影響

2002-5 年に札幌市の一産院で妊婦 514 名を環境と子どもの健康北海道スタディにリクルートした。379 名の母体血中有機塩素農薬 29 種類 (ジクロロジフェニルトリクロロエタン類 6 種 (o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT), ドリン類 3 種 (Aldrin, Dieldrin, Endrin), クロルデン類 5 種 (cis-Chlordane, trans-Chlordane, oxychlordane, cis-Nonachlor, trans-Nonachlor), ヘプタクロル類 3 種 (Heptachlor, trans-Heptachlorepoxyde, cis-Heptachlorepoxyde), ヘキサクロロシクロヘキサン類 4 種 (α-HCH, β-HCH, γ-HCH, δ-HCH), マイレックス, トキサフェン 6 種 (Parlar-26, 41, 40, 44, 50, 62) およびヘキサクロロベンゼン (HCB))

について、ガスクロマトグラフ/負イオン化学イオン化質量分析計 (GC/NCI MS) および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/HRMS) により一斉分析を行った (いであ(株)環境創造研究所)。母体血中農薬濃度と臍帯血中 IgE, 生後 18 か月児のアレルギー・感染症の発症リスクとの関連を、母の年齢, 妊娠前 BMI, 教育レベル, 出産歴, 両親アレルギー歴, 児の性別, 児の母乳栄養期間, 児の受動喫煙, 集団保育, 農薬の採血時期, および農薬の測定年で調整した多変量回帰分析で検討した。

1 1. 有機塩素系農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影響

2002 年から 2005 年に札幌市の一産院で妊婦 514 名をリクルートし, 379 名の母体血中有機塩素系農薬を測定した。有機塩素系農薬 29 種類について, ガスクロマトグラフィー/陰イオン化学イオン化質量分析計および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計により一斉分析を行った (いであ(株)環境創造研究所)。有機塩素系農薬 29 種類のうち, 検出率が 80%以上であった 15 種類を自然対数に変換した後, 統計解析した。精神運動発達については, ベイリー乳幼児発達検査-II (BSID-II) を用いて 274 名を検査した。有機塩素系農薬および BSID-II のデータがそろっており, 双胎でない 174 名について検討した。出産時年齢, 妊娠日数, 児性別, 家庭環境得点, 血液採取時期, 出産時年齢, カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙で調整した重回帰分析を行った。

1 2. 妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型による出生時体格への影響

札幌市内一産院コーホートに登録した母児 514 名について, 自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況, 食生活や教育歴, 世帯収入などを調査し, 医療

診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。妊婦の1日当たりのカフェイン摂取量は Nagata ら(1998)による自己申告質問票を用いて算出した。1日当たりのカフェイン摂取量は、各飲料の[カフェイン含有量]×[摂取回数]×[1回の量]の合計で算出し、①100mg 未満、②100-299mg、③300 mg 以上に3分類した。カフェイン摂取が100mg 未満の群を Ref. として解析した。CYP1A2C164A 遺伝子多型[rs762551]はリアルタイム PCR 法で解析した。C アレルは5'-FAM-TCCTGGGC CCACAGA-MGB-3', A アレルは5'-VIC -CGTCCTGTGCCAC-MGB-3'で CC, CA, AA 型に検出できる。CYP1A2 C164A 遺伝子多型の CC/CA 型は代謝が遅く、AA 型は代謝が早い表現型である。対象者 514 名のうち、10 名は死産、転居等で脱落した。双胎(7 名)、妊娠高血圧症候群(11 名)、妊娠性糖尿病(1 名)、胎児心疾患(1 名)と血液検体が採取できなかった 8 名を解析から除外して、最終解析は 476 名で行った。母のカフェイン摂取量および CYP1A2 遺伝子多型(CC/CA, AA)と出生時体格との関連を母の年齢、妊娠前 BMI、教育歴、妊娠中の喫煙状況、飲酒量、出産経歴、新生児性別、在胎週数で調整した重回帰分析で検討した。さらに、CYP1A2 遺伝子多型の酵素活性を亢進し、出生時体格と有意に関与するとされる母の喫煙状況との関連も検討した。最後に、カフェイン摂取量と CYP1A2 遺伝子多型を組み合わせ交絡要因で調整した重回帰分析を行い、母の喫煙状況で層別した解析も行った。

1 3. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計

本コホート研究の詳細については研究プロフィールの文献を参照されたい。2003 年 2 月から現在まで北海道内の 37 の病院

と診療所に受診した妊娠初期（13 週未満）の妊婦が研究に参加した。これらの病院と診療所は北海道内にほぼ均等に分布していた。

今回の解析に用いたデータは 2013 年末に固定したものであり、研究に参加した妊婦は 20816 名であった。このうち出生アウトカムのデータがないものを追跡不能者とした。出生アウトカムのデータがある者は 18305 名であった。このうち三つ子は 3 名のみであり、妊娠期間が 42 週以降の出生児は 33 名のみであり、これらは今回の統計解析からは除いた。

研究参加時のベースライン質問票と出産時の医療記録のデータを使用した。

各種指標の割合については exact confidence interval を併せて算出した。試験的な検討として、早産、正期産 small-for-gestational age (以下 SGA)、低出生体重児のリスクを母親の出産時年齢（35 歳以上）と研究参加時の BMI（18 以下）について general linear model を使用して算出した。

出生体重に関する指標のうち、small-for-gestational age については日本小児科学会の標準値を使用し、妊娠期間、性別、初産経産別に標準値の 10 パーセントイル未満とした。本検討では、超音波検査で測定された日本人の胎児体重標準値を使用した指標についても検討を行った。妊娠期、性別、初産経産別に標準値の 1.5SD 未満（6.7 パーセントイル未満）を small-for-reference-fetal weight（以下 SFW）とした。

1 4. 児の生下時体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究

『環境と子供の健康に関する北海道研究』の出生コホートに 2002～2012 年の間に登録した母親とその生産した児を対象

とした。早産および Small for Gestational Age (SGA) の有無をアウトカムとして、社会経済要因（母親の最終学歴、世帯収入）との関係について Cox ハザード分析を行った（有意水準 $\alpha=0.05$ ）。調整要因には、早産をアウトカムとしたハザード分析では、児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。SGA をアウトカムとしたハザード分析では、母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。

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、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「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえを行った。

C. 研究結果

1. 前向きコーホートの生死流産、妊娠中疾患および先天異常の発生状況とケースコホートを用いた曝露リスク評価に関する研究

母親の出産時年齢は平均 29.84 ± 4.83 歳であった。生産 18,083 名 (98.74%)、死産 102 名 (0.56%)、自然流産 92 名 (0.50%)、人口流産 37 名 (0.20%) であった。出産した児の男児は 9,194 名 (50.15%)、単胎は

17,998 名 (99.08%)、在胎週数は平均 38.78 ± 1.53 週、出生体重は平均 $3,030.17 \pm 419.42$ g であった。妊娠中の疾患では、切迫早産 1,005 名 (5.53%) が最も多く、次いで膈からの出血 489 名 (2.69%)、妊娠中毒症 338 名 (1.87%) であった。生産、死産、流産を含む全分娩のうち、なんらかの先天異常を有する児の総数は 358 名であり、そのうちマーカー奇形 243 件 (1.33%)、その他の先天奇形 137 件 (0.75%) であった。また、在胎 22 週以降の分娩 18,142 件中では、先天異常のある児は 316 件 (1.74%) であった。発生頻度(出産 1 万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症 19.1(35 名)であった。次いで停留精巣・非触知精巣 15.2 (14 名：男児のみ 9,194 名で算出)、Down 症候群 10.9(20 名)、口唇口蓋裂 10.9 (16 名)、水腎症 8.7 (16 名) などであった。

2002 年から 2011 年までのリクルート年毎に無作為抽出された 500 名および、最終 2012 年の全員 369 名から構成される 4869 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患 145 名について曝露評価を実施している。PCB・ダイオキシン類は先天性疾患 118 名コントロール 118 名合計 236 名が測定済みである。PFCs は先天性心疾患 145 名コントロール 145 名を測定した。

2. 血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

純水、又は血液試料を用い BPA フリー体の分析法の確認を行った。純水と血液試料それぞれに 0.5ng/mL となるように BPA を添加し、回収率の確認を行った。純水に添加した場合は、回収率 97%、血液試料に添加した場合は、回収率 101%であった。操作ブランク値及び分析法の検出下限値 (MDL: Method Detection Limit) を算出

するため、血液試料 20 検体（母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体）の分析と操作ブランク試験を 5 回実施した。操作ブランクの平均値は 0.036ng/mL であり、操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 0.037ng/mL であった。これまでの総 BPA の分析法と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

血液中の BPA フリー体を以前 BPA の分析を行い、濃度の確認の取れている試料を用いて分析した。ヒト血液試料 20 検体（母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体）について BPA フリー体の測定分析を行った。血液中の BPA フリー体の濃度は、すべての試料で ND 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。結果を表 3 に示す。全試料において回収率は 66～112%の範囲であった。なお、本分析方法は内標準法であるので回収率の数値は結果に影響を与えない。

3. Prenatal exposure to bisphenol A and child neurodevelopment: The Hokkaido Study

Overall, there were no statistical significant associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment at 6 and 18 months of age. Among female, MDI score at 6 month of age and the TSH levels was inversely associated with cord blood BPA levels with borderline significance.

4. ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 - 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状、感染症との関連 -
解析対象者 152 名の母の平均年齢は、

30.2±4.6 歳、短大・大卒以上が 56.6% (86 名) 初産婦は 50.7% (77 名)、妊娠中に喫煙した者(途中禁煙者も含む)は 35.5% (54 名) であった。両親でアレルギー既往がある者は、母が 30.9% (47 名)、父が 16.4% (25 名) であった。また、男児は 45.4% (69 名) であった。生後 18 ヶ月時の質問票に回答した 136 名では、家庭内で受動喫煙がある児が 46.3% (63 名)、集団保育されている児は 18.4% (25 名) であった (Table 1)。臍帯血中 BPA 濃度は 0.055 ng/mL (中央値)、LOD (0.048 ng/mL) 以下は 40.1% (61 名) であった。臍帯血血清中 IgE 濃度は 0.22 IU/mL (中央値)、LOD (0.05 IU/mL) 以下は 15.1% (23 名) であった (Table 2)。児の出生から 18 ヶ月までのアレルギー症状および感染症の累積罹患率は、湿疹 22.1% (30 名)、食物アレルギー 20.6% (28 名)、喘鳴 9.6% (13 名)、中耳炎 18.4% (25 名) で、男児では中耳炎の罹患が女児の約 2 倍であった (Table 3)。臍帯血中 BPA 濃度と IgE 濃度との関連を検討したが、交絡因子で調整しても有意な関連は認められなかった。また、臍帯血中 BPA 濃度と 18 ヶ月までの湿疹、食物アレルギー、喘鳴、中耳炎との関連についても調整前後で有意な関連は認められなかった。しかし、性別で層化したところ、男児では、臍帯血中 BPA 濃度が約 2.7 倍になると、中耳炎のオッズ比 (OR) が調整なしで 2.97 (95% CI: 1.05, 8.38)、調整後では 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。

5. Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy: The Hokkaido Study

The mean values of maternal PFOS and PFOA levels were 6.2 ng/mL and 1.3 ng/mL, respectively. Average of MDI and PDI scores (±SD) of infants at 6 months

of age were 90.5 (± 5.7) and 90.2 (± 10.3), respectively. Mean MDI and PDI scores of infants at 18 months of age were 84.2 (± 12.0) and 86.4 (± 10.9), respectively. In 6 months of age, we found a negative significant association between prenatal PFOA and MDI score (not PDI) only in female infants ($\beta = -0.317$, 95% confidence interval: -12.54 to -1.00). We did not find any significant association of PFOS levels with any outcomes. We also divided PFOA levels into quartiles, the quartile analysis showed significant MDI score difference the fourth quartile of PFOA compare to first quartile among female infants at 6 months of age. In 18 months of age, we did not observe convincing association between PFCs and BSID II (both MDI and PDI), and the association between PFOA and MDI in female infants disappeared.

6. Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Associations with Birth Size

The median concentrations of PFOS and PFOA were 5.0 and 1.4 ng/mL, respectively. In the fully adjusted model, the *IGF2* methylation fractions significantly decreased with a log₁₀-increase in PFOA concentration [$\beta = -1.53$, 95% confidence interval (CI): -2.93 to -0.12]. We observed a positive correlation between *IGF2* methylation and the ponderal index (kg/m³) at birth ($\beta = 0.18$, 95% CI: 0.09 to 0.27).

7. PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による42か月児の認知発達への影響評価

解析対象の基本属性は、男児 79 名 (49.1%)、第1子 76 名 (50.3%)、K-ABC 検査児月齢は平均 35.7 か月 (SD4.7) であった。K-ABC は、認知処理得点は 103.2 (SD=12.8)、習得度得点は 99.9 (SD=14.0) であった。K-ABC と関連する要因は、年収が多いほど、母親の WAIS-R 短縮版得点が高いほど、認知処理尺度得点、習得度得点の両方が高かった (年収と認知処理 $p=0.01$, 年収と習得度 $p=0.015$, WAIS-R と認知処理 $p=0.000$, WAIS-R と習得度 $p=0.026$)。ダイオキシン類濃度と年収、教育歴や魚摂取が有意な関連が認められた。年収で層別に K-ABC とダイオキシン類濃度の関連を調べたところダイオキシン類濃度と認知処理得点に関連は認められなかったが、習得度得点は年収の高い群で Total PCDD のみ関連が認められた。

8. 妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

母体血中 PCDFs の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 206g 有意に減少した ($P < 0.05$)。さらに、AHR 遺伝子多型が GA/AA 型、CYP1A1 遺伝子多型が TT/TC 型および GSTM1 遺伝子多型が Absent 型の妊婦では、児の出生時体重体格が 471g 有意に減少した ($P < 0.01$)。さらにポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン (PCDDs) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs) の 4 異性体でも同様な結果が認められた。

9. 胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響

本研究の対象者、238 組の母児の臍帯血 DNA メチル化レベル (\pm SD) は *IGF2* DMR が 48.7% (± 3.0)、*H19* DMR が 52.4% (± 1.9)、*LINE1* が 75.9% (± 1.1) であった。

また、母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度の中央値（最小値，最大値）は，ダイオキシン総量(TEQ)が 14.2 pg/g lipid (3.2 to 42.9)，PCBs 総量が 100.8 ng/glipid (16.0 to 326.8)であった。重回帰分析で交絡因子を調整後，NoCBs，特に 22'33'455'66'-NoCB (PCB-208)と H19 メチル化との間に正の関連が認められた($\beta=0.87$, 95%CI: 0.08 to 1.67)。また，男女で層別にして解析を行ったところ，男児において PCDFs と IGF2 メチル化との間に有意な負の関連が ($\beta=-4.21$, 95%CI: -7.60 to -0.83)，女児において H19 メチル化と NoCBs ($\beta=2.60$, 95%CI: 0.82 to 4.38)，DeCB ($\beta=2.77$, 95%CI: 0.76 to 4.78)と間に有意な正の関連が認められた。

10. 有機塩素系農薬の胎児期曝露が乳幼児の免疫に与える影響

農薬 29 種類のうち，15 種類が検出率 80%であった。このうち 8 種が 10 pg/g-wet 以上の中央値であった (oxychlorane (40 pg/g-wet) : trans-Nonachlor (72 pg/g-wet) : p,p'-DDE(651 pg/g-wet) : p,p'-DDT(23 pg/g-wet) : Dieldrin(16 pg/g-wet) : cis-Heptachlorepoxyde(26 pg/g-wet) : HCB(102 pg/g-wet) : β -HCH(154 pg/g-wet) (中央値))。交絡要因を調整した重回帰分析で母体血中の農薬により臍帯血 IgE が増加した (B(95%CI) : o,p'-DDT= 0.29 (0.01, 0.56), Dieldrin= 0.44 (0.02, 0.86))。また，18 か月の感染症リスクが低下した (OR (95%CI) : o,p'-DDE=0.60 (0.39, 0.93))。しかしアレルギーリスクとの関連は認められなかった。

11. 有機塩素系農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影響

BSID 得点との関連は，MDI では妊娠日

数 ($r = 0.20$, $p < .05$)，PDI では母の年齢($r = -0.19$, $p < .05$)，妊娠日数($r = 0.28$, $p < .05$)，および家庭環境得点($r = -0.16$, $p < .05$)について有意であった。有機塩素系農薬について有意な関連性はみられず，重回帰分析の結果からも，MDI, および PDI との関連性は示されなかった。

12. 妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型による出生時体格への影響

母の 1 日当たりのカフェイン摂取量，喫煙状況と CYP1A2 遺伝子多型それぞれが出生時体格に及ぼす影響を検討すると，100mg 未満のカフェイン低摂取群と比較すると，300 mg 以上のカフェイン高摂取群でも出生時体格に影響はみられなかった。CYP1A2 遺伝子多型も出生時体格と関連はなかった。喫煙状況では非喫煙妊婦と比較して喫煙妊婦の出生時体重は 87g 減少したが($p=0.019$)，出生時身長，頭囲に影響はみられなかった。母の CYP1A2 遺伝子多型と 1 日当たりのカフェイン摂取量を組み合わせると，CYP1A2 遺伝子多型が CC/CA 型で 100 mg 未満のカフェイン低摂取群と比較して，AA 型で 300 mg 以上のカフェイン高摂取群では，出生時体重および出生時身長に関連は認められなかったが，出生時頭囲は有意に減少した($p=0.023$)。さらに，母の喫煙状況で層別すると非喫煙妊婦で CYP1A2 遺伝子多型が AA 型の 300 mg 以上のカフェイン高摂取群では，出生時体重が 276g($p=0.024$)，出生時頭囲は 1.0cm 減少した ($p=0.027$)。出生時体重では交互作用も有意であった($p=0.023$)。一方，出生時身長への影響は喫煙状況で層別しても認められなかった。

13. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計

研究参加者のうち追跡不能者は 12%で

あった。出生アウトカムのデータがある者
とない者では母親の出産時年齢と研究参加
時の BMI に差はみられなかった。初産の
割合は追跡不能者で有意に高かった。

表 1 に単胎と双胎の出生アウトカムを示し
た。死産（22 週以降）は単胎で 2.6/出産
1000，双胎で 12.0/出産 1000 であった。単
胎では早産（22 週から 37 週）は 4.2%，低
出生体重児（以下 LBW）は 7.7%であった。
SGA と SFW はそれぞれ 4.3%，4.1%であ
った。双胎では単胎よりも早産は多く，低
体重に関する指標の割合は多かった。

出生体重の平均は 3044.8 で分布は左側
に小さな尾をひくガウス分布であった。単
胎では超低出生体重児は 37 週以降にはみ
られず，極低出生体重児は 32 週以降には
みられなかった。双胎では単胎よりも低体
重に関する指標の割合は多かったが，32 週
以降でその差は大きくなっていった。双胎で
は正期産でも体重が小さかった。胎児発達
率は，個々の出生児について，報告されて
いる標準値の中央値（または平均値）に対
する割合を%で示したものである。平均値
はいずれの妊娠期間でもほぼ 100%であ
ったが，超音波検査で測定された日本人の胎
児体重標準値を使用した方が若干小さい値
となった。試験的に算出した，母親の出産
時年齢と研究参加時の BMI についての早
産の相対危険度は 1.43（95%信頼区間：1.21，
1.69）と 1.28（95%信頼区間：1.08，1.54），
LBW の相対危険度は 1.39（95%信頼区
間：1.23，1.57）と 1.76（95%信頼区間：
1.56，1.97），正期産 SGA の相対危険度は
1.15（95%信頼区間：0.95，1.40）と 1.77
（95%信頼区間：1.49，2.10）であった。

1.4. 児の生下時体重と母親の社会経済要 因との関連についての疫学研究

生産の児は 18401 名で，平均在胎週数は
38.8 ± 1.53 週，平均出生体重は

3037.1±414.3g であった。Cox ハザード分
析の結果，母親の最終学歴が高校卒である
母親に対して，中学卒である母親から生ま
れた児は，早産のリスクが 1.17 倍有意に高
くなった。Cox ハザード分析の結果，母親
の最終学歴が高校卒である母親に対して，
中学卒である母親から生まれた児は SGA
のリスクが 1.16 倍有意に高くなった。世帯
年収は，早産および SGA とは有意な関係
は認められなかった。

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
地域病院ベースの情報である。日本で唯一
の全国規模調査である「日本産婦人科医会
先天異常モニタリング（JAOG）」と比較
すると，先天異常の出産頻度は 1.74%と近
似していた。しかし，形態異常ごとの頻度
をみると，尿道下裂，口蓋裂などは JAOG
よりも高い一方で，消化管系閉鎖，脊髄髄
膜瘤，水頭症などの胎児期に診断され，出
生直後に集中的な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。倉橋ら(2005)は JAOG
の尿道下裂の有病率を解釈するうえで，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ことを指摘し
ている。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。

先天異常との関係では，生産した 18,083
名を対象に，引き続いて PCBs・ダイオキ
シン類・OH-PCB，および PFCs11 種類の
分析を実施し，最終的にケースコホート
研究デザインにおいて，先天性心疾患症例