

先天異常の発生動向および不育症，不妊・子宮内膜症に関する症例対照研究
－内分泌かく乱物質との関連を中心に－

I. 不育症，不妊・子宮内膜症に関する症例対照研究

(主任研究者 岸 玲子 北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授)

分担研究者 藤本 征一郎 北海道大学医学部産婦人科学講座教授

研究協力者 山田 秀人，星 信彦，和田 真一郎，奥山 和彦，平山 恵美

佐田 文宏，小橋 元，戸崎 静香，貢 英彦，片倉 洋子

研究要旨

北大産婦人科で経験した不育症例，不妊・子宮内膜症例に関し，内分泌かく乱物質の代謝に関与する薬物代謝酵素（CYP1A1, CYP1B1, GSTM1）の遺伝子多型，NK 細胞活性ならびに NK サブセットによる免疫機能および先天性凝固異常症（Factor V Leiden Mutation および MTHFR C677T Mutation）との関連を調べた．不育症例において，CYP1A1 の 3' 側の変異型遺伝子 *CYP1A1*2A* (*MspI* 多型) の頻度は 31.5%（ホモ型 10.7%，ヘテロ型 41.7%），GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% で，後者は高頻度であった．非妊時における NK 活性は $33.1 \pm 15.8\%$ であった．NK 活性およびサブセットと流産回数や不育症原因との関連は認めなかった．非妊時 NK 活性およびサブセットと妊娠帰結とは有意な関連はみられなかった．妊娠初期の NK 活性と妊娠帰結との検討では，非流産群(C 群)において，妊娠 6-7 週の NK 活性($28.7 \pm 12.2\%$)は，4-5 週の NK 活性($33.7 \pm 13.5\%$)に比べ低下していた($p < 0.01$)．また妊娠 6-7 週における染色体異常流産群(Aa 群)の NK 活性($31.1 \pm 11.1\%$)は，C 群とは差を認めなかったが，染色体正常流産群(An 群)の NK 活性($41.7 \pm 20.3\%$)は，C 群に比べ高値であった($p < 0.05$)．妊娠 6-7 週における末梢血 NK 細胞の高活性は，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．Factor V Leiden Mutation, MTHFR C677T Mutation の頻度は，習慣流産患者とコントロールで有意差はみられなかったことより，習慣流産の発症には，先天性凝固異常症の関与は少ないと考えられた．また，1976 年以降現在まで，出生前診断施行症例および胎児異常症例について保存されている羊水，臍帯血，胎盤，胎児組織などの検体を用いて，年代毎疾患別に内分泌かく乱物質の定量と．前方視的に胎児奇形症例の臍帯血，母体血，羊水を検体採取を行い，種々の内分泌かく乱物質の定量の準備を進めている．

A. 研究目的

子宮内膜症は慢性骨盤痛や不妊をきたす疾患であり、生殖年齢にある女性の QOL, あるいは妊孕能を障害し、少子化にも関与している。さらに有病率も高く、本疾患の成因を明らかにすることの社会的意義は大きい。その発症に関しては諸説あるも未だ不明であるが、近年増加傾向にあり、現代のライフスタイルや生活環境と関連している可能性が考えられる。さらに、ダイオキシンとの関係が報告され始めており、内分泌かく乱物質と子宮内膜症の関連を調査することは意義が深く、その解明が発症予防につながり、多くの女性にとって苦しみから解放されることにつながる。難治性不妊症に関して言えば、現在わが国では生産率の低下が進行中であり、生産年齢層の減少を来し、高齢化社会におこる諸問題をさらに深刻化させることが危惧される。乏精子症、女性の排卵障害、生殖器の奇形などは内分泌環境や発生時の母体内での影響が強いとされ、内分泌かく乱物質の関与が予想される。生殖年齢にある女性の約 1 割を占めるといわれる不妊症の予防は生産年齢層の上昇のほか、医療経済的にも莫大なメリットがあり、本疾患の解明、予防は社会的にきわめて大きいと推測される。難治性不育症（習

慣流産）においても、精査を実施しても約半数はその原因が不明である。原因不明の習慣流産においては、近年、免疫学的異常や凝固能異常がその発症機構に関与していることを示唆する動物実験的および臨床的データの報告が散見できるが、根本的な原因の解明は未だなされていない。難治性不育症では、その発症要因が子宮内膜症および不妊症と重複する臨床的頻度が高いことから、内分泌かく乱物質が不育症の発症機構に関与している可能性も存在する。また、先天異常に関しては多遺伝子ならびに多くの環境要因が複雑に交絡して発症するものと考えられているが、その発症機構における内分泌かく乱物質の関与に関する研究報告は未だ乏しい。したがって、子宮内膜症、難治性不妊症、難治性不育症ならびに先天異常症例における内分泌かく乱物質の関与の有無を調べることは、極めて斬新で有用と考えられる。

B. 研究方法

1) 子宮内膜症・不妊・不育症患者において、内分泌かく乱物質の代謝に関与する薬物代謝酵素・核内受容体の遺伝子型の関与を調べる。[方法]従来より保存していた不育症例 86 検体、不妊・子宮内膜症例 110 検体（血液または DNA）を用いて、

CYP1A1, CYP1B1, GSTM1 などの遺伝子多型を PCR-RFLP 法(制限酵素 *MspI*, *BfrI*) を用いて解析を行う。

2) 不育症(習慣流産)患者における NK 細胞活性ならびにサブセットと習慣流産原因およびその後の妊娠帰結との関連を調べる。[方法] 対象は、1997 年 9 月～1999 年 8 月までに末梢血 NK 細胞活性を測定した 126 症例(非妊時のみ 52 例、妊娠時のみ 36 例、非妊時および妊娠時測定 38 例)。

全対象の流産回数は 2.5 ± 1.3 (mean $\pm$ SD)であった。NK 活性の測定は経時的に妊娠 10 週まで、 ^{51}Cr 遊離法を用いて行った。101 例においては、同時にリンパ球表面マーカーによる NK サブセット(CD56 $^{+}$ 16 $^{-}$, CD56 $^{+}$ 16 $^{+}$)を FACS で測定した。流産例では絨毛染色体核型分析を行った。妊娠帰結によって、非流産群(C 群)、染色体異常流産群(Aa 群)、染色体正常流産群(An 群)の 3 群に分類した。

3) 不育症(習慣流産)患者において、先天性凝固異常症の関与を調べる。[方法] Factor V Leiden Mutation および MTHFR C677T Mutation の頻度を PCR-RFLP 法(制限酵素 *MnlI*, *HinfI*)を用いて検討する。対象は、前者の検討で習慣流産患者 35 人、コントロール 109 人、後者の検討では習慣流産患者 90 人、コントロール 104 人である。

4) 北大産婦人科では 1976 年以降現在まで、出生前診断施行症例および胎児異常症例についてその臨床データならびに羊水、臍帯血、胎盤、胎児組織などが保存されている。これらの検体を用いて、年代毎に、また疾患別に内分泌かく乱物質の定量を行う。

5) 前方視的に胎児奇形症例の臍帯血、母体血、羊水を検体採取を行い、種々の内分泌かく乱物質の定量を行う。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントは、研究実施時点で北海道大学で通例行われている方法に則り、患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮する。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払い、対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないように配慮する。

C. 結果と考察

1) 不育症例において、CYP1A1 の 3' 側の変異型遺伝子 *CYP1A1*2A* (*MspI* 多型) の頻度は 31.5% (ホモ型 10.7%, ヘテロ型 41.7%) で、過去の報告にみられる健常日本人の頻度と大差はみられなかったが、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。CYP1B1 の Leu432Val の変異型遺伝子 *CYP1B1*3* (*BfrI* 多型) は現在

解析中である（予備的に行った少数例では数%程度の頻度であった）。

引き続き不妊・子宮内膜症例および対照群についても同様の解析を行うと同時に Ah 受容体遺伝子なども解析する予定である。

2) 非妊時における NK 活性は $33.1 \pm 15.8\%$ であった。NK 活性およびサブセットと流産回数や不育症原因との関連は認めなかった。非妊時 NK 活性と妊娠帰結との検討では、C 群($n=27$) $32.4 \pm 14.3\%$, Aa 群($n=4$) $36.5 \pm 27.0\%$, An 群($n=7$) $45.9 \pm 17.0\%$ であり、各群間で有意差を認めなかった。

NK サブセットについても関連を認めなかった。妊娠初期の NK 活性と妊娠帰結との検討では、C 群($n=38$)において、妊娠 6-7 週の NK 活性($28.7 \pm 12.2\%$)は、4-5 週の NK 活性($33.7 \pm 13.5\%$)に比べ低下していた($p<0.01$)。

また妊娠 6-7 週における Aa 群($n=6$)の NK 活性($31.1 \pm 11.1\%$)は、C 群とは差を認めなかったが、An 群($n=12$)の NK 活性($41.7 \pm 20.3\%$)は、C 群に比べ高値であった($p<0.05$)。NK サブセットの比率は各群間で差を認めなかった。

妊娠 6-7 週における末梢血 NK 細胞の高活性は、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。

3) Factor V Leiden Mutation は、習慣流産患者 35 人、コントロール 109 人

の中には一人も観察されなかった。MTHFR C677T Mutation の頻度は、習慣流産患者、コントロールともに 12%-13% であった。習慣流産患者では、コントロールに比べて、有意に頻度が高い先天性凝固異常症は同定できなかった。

習慣流産の発症には、先天性凝固異常症の関与は少ないと考えられた。

4), 5) に関しては現在、内分泌かく乱物質の定量を進めている最中であり、何らかの結論が出せる解析結果を得るまでには至っていない。

D. 結論

難治性不育症患者では、その発症機構に免疫学的異常が関与していることが、今回明らかとなった。高 NK 細胞活性などの免疫学的異常をきたす要因としての内分泌かく乱物質の関与について、今後の検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Hoshi N, Hattori R, Hanatani K, Okuyama K, Yamada H, Kishida T, Yamada T, Sagawa T, Sumiyoshi Y, Fujimoto S (1999): Recent trends in the prevalence of Down syndrome in Japan, 1980-1997. Am J Med Genet. 84:340-345

Yamada T, Hoshi N, Okuyama K, Negishi H, Sudo S, Kishida T, Yamada H, Sagawa T, Fujii H, Ishizu A, Ishikura H, Fujimoto S (1999): Morphological aspects of ectopia cordis: four case reports and a review of the literature. *J Obstet Gynaecol Res.* 25(4):237-243

Kobashi G, Hata A, Shido K, Kato EH, Yamada H, Fujimoto S, Kishi R, Kondo K (1999): Association of a variant of the angiotensinogen gene with pure type of hypertension in pregnancy in the Japanese: Implication of a racial difference and significance of an age factor. *Am J Med Genet.* 86(3):232-236

Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Kondo K, Fujimoto S (1999): The factor V Leiden mutation is not a common cause of pregnancy-induced hypertension in Japan. *Semin Thromb Hemost.* 25(5):487-489

Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Moriwaki M, Yamamoto R, Furuta I, Fujimoto S (1999): Fetal treatment of congenital heart block ascribed to anti-SSA antibody: case reports with observation of cardiohemodynamics and review of the literature. *Am J Reprod Immunol.* 42(4):226-232.

Yamada H, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kato EH, Koike T, Fujimoto S (1999): IgA class anti- β 2-glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Arthritis Rheum.* 42(12):2727-2728.

Yamada H, Negishi H, Ebina Y, Kato EH, Kobashi G, Sagawa T, Sakuragi N, Fujimoto S (1999): Prenatal diagnosis and fetal therapy for congenital cytomegalovirus infection: a trial of intraperitoneal hyperimmunoglobulin injection. *Virus Infection Seminar* 1:27-34.

Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, Hoshi N, Kobashi G, Sakuragi N, Fujimoto S (2000): Factor XII deficiency in women with recurrent miscarriage. *Gynecol Obstet Invest.* 49(2): 80-83.

Kishida T, Hoshi N, Hattori R, Negishi H, Yamada H, Okuyama K, Hanatani K, Takagi T, Sagawa T, Fujimoto S (2000): The efficacy of maternal serum screening in the prenatal detection of fetal chromosome abnormalities in Japanese women. *Fetal Diagn Ther* 15(2): 112-117.

2. 学会発表

Yamada, H., Kobashi, G., Kato, E.H.,
Fujimoto, S (2000): Recurrent pregnancy
loss and thrombophilia. 44th Annual
Meeting of Society of Thrombosis and
Hemostasis Research, Japanese-German
Symposium on Perinatal Hemostasis and
Thrombosis. (January 16-19, Freiburg)

Yamada, H., Kobashi, G., Kato, E.H.,
Suzuki, S., Fujimoto, S (2000): Recurrent
pregnancy loss and thrombophilia.
Symposium on Perinatal Thrombosis and
Hemostasis. (March 25, Sapporo)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし