

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

不妊・不育症患者における異物代謝酵素遺伝子多型解析ならびに母体血・羊水中のビスフェノール A 濃度の年次推移

主任研究者

岸 玲子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授）

分担研究者

藤本征一郎（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野教授）

研究要旨

北海道大学附属病院産婦人科を受診した不育症および不妊症の症例対照研究により，GSTM1 遺伝子完全欠損型は，不育症・不妊症ともに危険因子となることが示唆された．また，高齢妊娠の適応で妊娠 16 週時に出生前羊水染色体検査を受け，胎児染色体核型が正常であった女性の 10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果，母体血では減少傾向が認められた．羊水の BPA 濃度は，母体血中濃度に比較して低レベルであった．したがって，母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた．しかしながら，症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ，BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた．

研究協力者

山田 秀人（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野講師）

古田伊都子（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座周産期医学分野助手）

平山 恵美（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野）

三國 雅人（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座婦人科学分野助手）

奥山 和彦（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座周産期医学分野助教授）

佐田 文宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）

貢 英彦（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）

，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研究報告が散見できるが，根本的な原因解明は未だなされていない．内分泌攪乱物質や遺伝的素因が不育症の発症機構に関与している可能性も存在する．

子宮内膜症は生殖年齢層の女性の妊孕能を障害し，不妊症や少子化にも関与する．有病率も高く，本疾患の成因を解明することは社会的に見ても意義は大きいといえる．近年増加傾向にあるため，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．近年，ダイオキシンとの関連が報告されたことから，内分泌攪乱物質と子宮内膜症との関連を解明することの意義は大きく，発症予

研究目的

難治性不育症（習慣流産）においては

防につながる可能性がある。

難治性不妊症に関して、現在わが国では出生数の低下が進行中であり、出産人口の一層の減少を来し、老齡化社会におこる諸問題をさらに深刻化させるところが危惧される。男性乏精子症、女性排卵障害ならびに生殖器奇形は、内分泌環境および母体内での影響（胎内環境）と関連するため、その発症における内分泌攪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、出生数の増加の他、医療経済的にも莫大なメリットがあり、本疾患の解明・予防は社会的に極めて重要と推察される。

先天異常に関しては、多遺伝子要因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攪乱物質の関与に関する研究実績は未だ十分とはいえない。

したがって、難治性不育症、子宮内膜症、難治性不妊症ならびに先天異常例に対して内分泌攪乱物質の関与の有無を調べることは斬新な手法であり、有用な解析結果が得られる可能性が極めて高いと考えられる。

研究方法

1) 従来より保存していた子宮内膜症・不妊・不育症の患者血液およびDNAを用いて、GSTM1, NQO1, CYP1A1, CYP17, の遺伝子多型をPCR-RFLP法を用いて解析を行う。

2) 母体血と羊水中のビスフェノールA (BPA)を測定し、両者の濃度相関ならび年次変化を調べることを目的とした。1989年から1998年の期間に北海道大学

医学部附属病院において、高齡妊娠（35歳以上）の適応で妊娠16週時に出生前羊水染色体検査を受け、胎児染色体核型が正常であった女性のうち、各年20人（平均年齢36歳）合計200人を無作為に選択した。空腹時に採取され凍結保存されていた出生前診断時の母体血清および羊水（200組）中のBPAをエコ・アッセイ ビスフェノールA ELISA キット（大塚製薬）を用いて測定した。

また、同一期間において胎児染色体核型が異常（主に21, 18トリソミー）であった女性71人の母体血と羊水中のBPAを測定した。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水中のBPAを上記方法で測定し、各々の濃度相関を調べることを目的とした。2001年から現在までに北海道大学医学部附属病院において妊娠36週から40週までに分娩した女性11人を無作為に選択し対象とした。

4) 前方視的に正常児ならびに胎児奇形症例の臍帯血、母体血、羊水を検体採取、保存を行い、PCB、ダイオキシンおよびBPAなどの内分泌攪乱物質を測定し、その濃度の比較検討を行う。

倫理面への配慮

出生前羊水染色体検査時には、羊水穿刺に対する同意文書を作成しすべて同意が得られている。羊水穿刺時の母体血ならびに羊水中のホルモン測定については、口頭で同意が得られている。分娩時母体血、臍帯血および羊水の採取については、文書にて採取と使用について同意書を取得している。

結果と考察

1) 現在までに解析の終わった予備的な結果として、GSTM1 遺伝子の完全欠損型は、不育症では 65% (56/86)、不妊症では 51% (40/86) の頻度でみられたのに対し、対照群では 22% (11/51) に過ぎず、不育症においては、オッズ比 5.1 (95%信頼区間 2.3-11.1)、不妊症では、オッズ比 3.7 (95%信頼区間 1.7-8.2) となり、GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症、不妊症の危険因子になることが示唆された。NQ01 遺伝子の HinfI 多型 (P187S) は、不育症では C/C 型 44% (37/84)、C/T 型 43% (36/84)、T/T 型 13% (11/84) みられ、不妊症では C/C 型 52% (38/73)、C/T 型 40% (29/73)、T/T 型 8% (6/73) みられた。一方、対照群では C/C 型 59% (32/54)、C/T 型 32% (17/54)、T/T 型 9% (5/54) みられた。NQ01 遺伝子 HinfI 多型は、いずれの疾病にも有意な影響を与えなかった。CYP1A1 遺伝子 MspI 多型 (3'側) に関しては、不育症例では m1/m1 型 48% (40/84)、m1/m2 型 42% (35/84)、m2/m2 型 11% (9/84) みられ、不妊症では m1/m1 型 68% (32/47)、m1/m2 型 21% (10/47)、m2/m2 型 11% (5/47) みられた。不妊症では m1/m1 型のホモ接合の割合が多く、ヘテロ接合の割合が少ない傾向がみられた。CYP17 遺伝子 MspA1I 多型 (5'側) に関しては、不育症例では A1/A1 型 21% (18/86)、A1/A2 型 52% (45/86)、A2/A2 型 27% (23/86) みられ、不妊症例では A1/A1 型 18% (4/22)、A1/A2 型 55% (12/22)、A2/A2 型 27% (6/22) みられた。

今後、解析を継続し、さらに CYP1A2、CYP1B1、GSTT1 遺伝子など内分泌かく乱物質の代謝に関与する酵素遺伝子の多型を解析する予定である。

2) 母体血の BPA 濃度 ($M \pm SD$ ng/ml) は、 6.18 ± 2.43 (1989 年)、 2.66 ± 1.22 (90 年)、 5.16 ± 3.17 (91 年)、 3.28 ± 1.82 (92 年)、 3.67 ± 3.46 (93 年)、 3.73 ± 3.34 (94 年)、 2.84 ± 2.83 (95 年)、 1.88 ± 0.81 (96 年)、 1.50 ± 0.50 (97 年) および 1.05 ± 0.49 (98 年) を示し、近年、減少傾向が認められた。一方、羊水の BPA 濃度は、各々 0.25 ± 0.59 、 0.22 ± 0.23 、 0.27 ± 0.21 、 0.29 ± 0.34 、 0.68 ± 0.14 、 0.63 ± 0.20 、 1.13 ± 1.26 、 0.53 ± 1.21 、 0.46 ± 1.03 および 0.41 ± 0.63 ng/ml であり、母体血中濃度に比較して低いレベルであった。妊娠 16 週では母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、羊水 BPA 濃度が 2 ng/ml 以上を示した 8 例 (2.80~5.62 ng/ml) のうち 7 例では、羊水 BPA 濃度が母体血濃度を超過していたことから、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、したがって BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。

胎児染色体核型が異常であった女性 71 人の母体血と羊水中の BPA は、現在、測定結果を解析中であり、早々に何らかの結論を出す予定である。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水の BPA 濃度 ($M \pm SD$ ng/ml) はそれぞれ、 3.58 ± 1.37 、 5.63 ± 2.91 、 4.40 ± 2.36 であった。有意差はなかったが、臍帯血や羊水の BPA 濃度は母体血より高値であった。

4) に関しては、現時点で胎児奇形 7 症例の臍帯血、母体血、羊水の検体保存が完了しているが、内分泌攪乱物質の測定

は未だなされていない。対照例を含めて十分な検体数が確保できた時点で測定を行う予定である。

結論

GSTM1 遺伝子完全欠損型は、不育症・不妊症ともに危険因子となることが示唆された。また、10 年間にわたり妊娠 16 週時の BPA 濃度を解析した結果、母体血では減少傾向が認められた。羊水の BPA 濃度は、母体血中濃度に比較して低レベルであった。したがって、母体血から羊水への BPA の移行ないし蓄積は軽微であると考えられた。しかしながら、症例によっては羊水への BPA の移行および蓄積が認められ、BPA の胎児に対する影響は無視できないと考えられた。今後、胎児染色体異常、胎児奇形例での BPA 濃度を解析することによって、BPA の胎児に対する影響を明らかにしていきたい。また、PCB やダイオキシンなど他の内分泌攪乱物質の関与についても、十分な例数と検体数が集積できた時点で測定を行う予定である。

研究発表

1. 論文発表

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

Yamada H, Hoshi N, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, Sagawa T, Matsuno K, Fujimoto S. Novel mutation (E113X) of antithrombin III gene (AT3) in a woman with gestational

recurrent thrombosis. *Am J Med Genet* 91:348-350, 2000.

Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia in Japanese women. *Am J Med Genet* 93:122-125, 2000.

Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, Kishida T, Yamada H, Okuyama K, Sagawa T, Shimizu K, Satomura S, Fujimoto S. Alpha-fetoprotein microheterogeneity: a potential biochemical marker for Down's syndrome. *Clin Chim Acta* 304:137-141, 2001.

Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi S, Fujimoto S. Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).

Kobashi G, Hata A, Shido K, Yamada H, Kato EH, Kanamori M, Kishi R, Fujimoto S, Kondo K. Multivariate analysis of genetic and acquired factors: T235 variant of angiotensinogen gene as a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*, 2001 (in press).

Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Sakuragi S, Fujimoto S. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

Tsutsumi A, Atsumi T, Yamada H, Kato

EH, Ichikawa K, Fujimoto S, Koike T. Anti-phosphatidylserine/prothombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 2001 (in press).

山田秀人, 平山恵美, 森川 守. ガンマグロブリン大量療法. 不育症診療の新展開. 産科と婦人科 68 (6), 2001 (印刷中).

2. 学会発表

Massive immunoglobulin treatment in women with four or more recurrent spontaneous primary abortions of unexplained etiology. 6th International Symposium Japanese- German Society of Obstetrics and Gynecology, Erlangen, June, 2000.

Sata F, Yamada H, Wada S, Kobashi G, Tozaki S, Tanabe H, Hirayama EK, Fujimoto S, Kishi R. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and susceptibility to female infertility and recurrent spontaneous abortion. 3rd Asian-Pacific Congress of Epidemiology, Kita-kyushu, September, 2001.