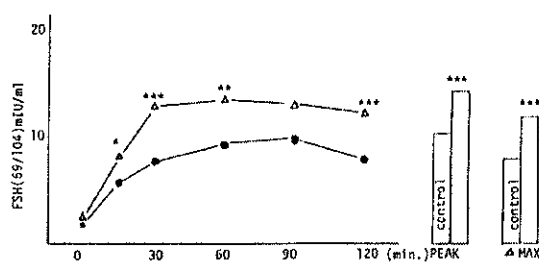


図 4



●—● 健常男児の平均、△—△ プロゲステロン
投与の既往のある尿道下裂例の平均

★ $p < 0.05$ (対 健常男児)

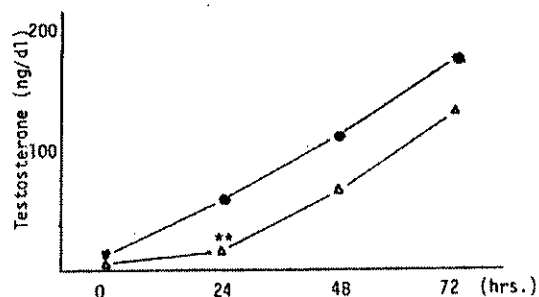
★★ $p < 0.01$ (対 健常男児)

★★★ $p < 0.005$ (対 健常男児)

★ $p < 0.05$ (対 健常男児)

★★★ $p < 0.005$ (対 健常男児)

図 6



●—● 健常男児の平均、△—△ プロゲステロン
投与の既往のある尿道下裂例の平均

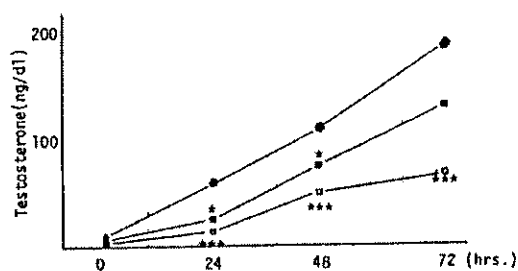
★★ $p < 0.01$ (対 健常男児)

3) hCG刺激試験におけるテストステロン 値の検討

近位および遠位尿道下裂群とも基礎値は健常男児に比較して有意差を認めなかったが、近位尿道下裂群は、hCG刺激後 24、48、72 時間値が有意に低値であり、遠位尿道下裂群でも 24、48 時間値は有意に低値であった (図 5)。

プロゲステロン投与の既往のある尿道下裂群は、健常男児に比較して 24 時間値のみ有意に低値を示したが、基礎値、48、72 時間値に有意差を認めなかった (図 6)。

図 5



●—● 健常男児の平均、■—■ 遠位尿道下裂例
の平均、□—□ 近位尿道下裂例の平均

D. 考察

尿道下裂(hypospadias)は、男児外陰の疾患としては停留精巣に次いで頻度の高い疾患である。最近、尿道下裂の発生頻度の増加を指摘する報告が米国、英国、スカンジナビアから相次いでなされ、内分泌かく乱物質(endocrine disruptors)との関連も注目されている。1970 年前後に比較して 1993 年前後では尿道下裂の発生は全出生の約 0.2%から 0.4%へと 2 倍に増加し、これは単に病院を受診する軽症の尿道下裂例が増加したからではなく、重症例も同様の頻度で増加していることが指摘されている[1]。尿道下裂発生と環境因子の問題は今後、様々な疫学的調査により検証される必要がある。

以前から尿道下裂の家族内発生の頻度は、一般の尿道下裂発生頻度より高いことが知られており、尿道下裂の兄弟発生のリスクは約 14%、また尿道下裂患児の父親の約 8%は尿

尿道下裂の既往を有するとされている。今回の検討でも家族内発生が 6.6%の頻度でみられた。このような事実から、尿道下裂の発生に何らかの遺伝学的要素が関与することは明らかであろう。

一方、最近のデンマークからの報告によると、尿道下裂と停留精巣の発生に関与する最大のリスクファクターは出世時の低体重であるとされている[2]。今回の検討でも、尿道下裂症例の約 27%に未熟児あるいは低体重出生児が認められた。したがって先に述べた遺伝学的要素に加えて、低体重出生につながるような何らかの環境因子・母体側の因子が尿道下裂の発生に深く関与することが示唆される。

出生後の発育・成長という面から尿道下裂症例を観察すると、手術時には年齢相当の健康児と比較し、身長、体重とも有意差を認めなかったことから、尿道下裂症例は全身的発育という面では基本的に障害がないことが確認された。

尿道下裂に合併する異常としては、従来の報告と同様、陰囊内容の異常が高頻度であった。停留精巣がもっとも多く、無精巣症、精巣形成不全といった明らかなテストステロン分泌障害例も含まれた。さらに尿道下裂症例に男性隆が高頻度に認められたことなどを考えあわせると、尿道下裂の成因を考える上で、胎児精巣機能およびステロイド代謝機能とアンドロジェン依存性の高い外陰形成や精巣下降の過程に関与する諸因子の解明が極めて重要であると思われる。今回の検討では、尿道下裂全体の約 30%の例でプロゲステロン投与の既往が確認された。In vitro でプロゲステロンはステロイド代謝経路において重要な酵素である 3β -hydroxysteroid dehydro-

genase 活性を低下させる。したがって母体を通じてのプロゲステロンへの曝露、特に胎児尿道が完成する妊娠 3 ヶ月以内のプロゲステロンへの曝露は、尿道下裂の発生に深く関与することが推測される。さらに、最近の報告によると、母親が妊娠中に植物エストロジェンの多い食物を摂取した場合に尿道下裂が発生しやすいとされており[3]、外因性女性ホルモンへの胎児の曝露と尿道下裂発生との因果関係は、今後多角的な疫学的調査により明らかにされる必要があるであろう。

今回の検討では、chordee without hypospadias 症例の 33.3%においてプロゲステロン投与の既往が確認され、これは尿道下裂における頻度(30.2%)とほぼ同程度であった。しかしながら chordee without hypospadias 症例でプロゲステロンが投与された例はすべて妊娠 4 ヶ月以降の投与であったことは興味深い。索変形(chordee)に関しては尿道が完成した後、胎生後期に出現する可能性があること、早産児、未熟児の出生直後の索変形は自然消失する可能性があることが指摘されており、胎生後期の内分泌環境の変化が索変形の成因に関与することが示唆されている。妊娠 4 ヶ月以降の外因性プロゲステロンが胎児の内分泌環境に影響を与え、索変形の発生に関与したと推測されるが、妊娠 4 ヶ月以降のプロゲステロン投与が陰茎の形成に実際どのような影響を与えているのかは不明であり、今後の検討課題のひとつであろう。

思春期前尿道下裂症例の内分泌環境についてはこれまでも種々の報告がなされている。今回の検討では、LH-RH に対するゴナドトロピンの過剰反応が明らかになり、特に LH は有意に過剰反応を示した。また hCG 刺

激に対するテストステロンの反応は尿道下裂症例で有意に低下していることも明らかとなった。このように幼小期の尿道下裂症例では、下垂体-精巣機能に何らかの異常が認められ、尿道下裂の程度が高度な例により顕著に認められることが示された。しかしこれらの異常が胎児期の精巣機能をそのまま反映しているのか、これらの内分泌学的反応の障害が尿道下裂の発生に直接的に関与するのか、という根本的問題は今後の解明を待たなければならない。

先に述べたように、尿道下裂症例では思春期前の段階からなんらかの精巣機能障害、特にライディヒ細胞の機能障害が存在することが判明した。その後の追跡調査により、一部の症例では思春期に達してもLH-RH試験、hCG刺激試験における異常反応パターンが残存しており、また陰茎發育不全、女性化乳房を呈する例も認められた。したがって尿道下裂の一部の症例においてはこのような内分泌学環境の異常は不可逆的であることが示唆されている。

E. 結論

当科で経験した尿道下裂 61 例につき臨床統計的ならびに内分泌学的検討を加えた。

尿道下裂の程度分類は、glandular type 22 例 (36.1%)、penile type 18 例 (29.5%)、penoscrotal type 10 例 (16.4%)、perineal type 3 例 (4.9%)、chordee without hypospadias 8 例 (13.1%) であった。

未熟児あるいは低体重出生児 (2,500 グラム以下) として出生した症例が 28.1% を占めたが、その後の身体的發育には健常児と有意差を認めなかった。

合併異常は 61 例中 36 例 (59%) にみられ、

そのうち停留精巣をはじめとした陰囊内容の異常が 47.2% と最多であった。

妊娠中にプロゲステロン投与を受けたものが 59 例中 18 例 (30.5%) にみられた。

31 例の尿道下裂患児に対し、LH-RH 試験、hCG 負荷試験を行い、18 例の同年代の健常男児と比較検討した。尿道下裂例では健常児に比してゴナドトロピンは LH-RH に対し過剰反応を示し、hCG 刺激に対してテストステロンは低反応を示した。尿道下裂の程度が高いものほどこの傾向は顕著であった。以上の結果から、尿道下裂症例では思春期前の段階からすでに何らかの程度の精巣機能障害、特にライディヒ細胞の機能障害が存在することが判明した。

以上、尿道下裂は尿道、陰茎の発生学的・解剖学的特徴を把握したその手術的治療の確立に努力するとともに、好発する合併奇形、胎児期の内分泌学環境の異常の解明を通じて、その発生を予防することが最重要課題であると考えられた。

<今後の課題>

男児の外陰の正常な形成・発達には胎生早期におけるテストステロンの役割が不可欠であり、テストステロン生合成に関与する様々なステロイド代謝酵素の異常は尿道下裂の発生に深く関与することが推測されている。尿道下裂発生とステロイド代謝酵素異常との関連を調査するために、症例対照研究として、手術時に尿道下裂症例から採血を行い、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17α -hydroxylase, $17,20$ -lyase の 3 項目につきその酵素代謝活性を検討する。同年代の対照群において同様の検討を行い、尿道下裂発生に関与するステロイド代謝酵素異常を明らか

にする。基礎的研究として、想定される内分泌かく乱物質を妊娠ラットに暴露し、胎児ラットにおけるステロイド代謝酵素異常の発生の有無につき検討する。以上の検討により、内分泌かく乱物質が胎児のステロイド代謝酵素異常を引き起こすことにより尿道下裂発生に関与する可能性を明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

「尿道下裂に対する形成術式の開発と確立」

日本医師会雑誌 平成12年1月1日号

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

特になし

H. 参考文献

[1] Paulozzi LJ, Erickson JD and Jackson RJ: Hypospadias trends in two US surveillance systems. Pediatrics 100: 831-834, 1997

[2] Weidner IS, Moller H, Jensen TK and Skakkebaek NE: Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. J Urol 161: 1606-1609, 1999

[3] North K, Golding J and The Alspac Study Team. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. Brit J Urol 85: 107-113, 2000

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

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とことが危惧される。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 *Mnl I*, *Hinf I*) 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

II. 先天異常の発生動向

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 奥山 和彦, 星 信彦, 岸田 達朗

研究要旨

先天異常の発生動向と内分泌攪乱物質との関連を明らかにすることを目的に、過去 21 年間にわたって当科で保存している羊水、臍帯血、母体血、絨毛・胎盤組織などの保存状況、保存検体数を調査した。

A. 研究目的

周産期領域における先天異常（胎児染色体異常、胎児奇形など）および異常妊娠（羊水量の異常、子宮内胎児発育遅延、子宮内胎児死亡など）の原因究明の一端として、内分泌攪乱物質の関与を検討する。

B. 研究方法

当科では、胎児染色体異常の検出を目的として genetic amniocentesis を過去 25 年にわたって実施してきた。また、胎児形態異常や異常妊娠の原因の究明を目的として、羊水穿刺、臍帯穿刺などにより胎児血の染色体検査を行うとともに、分娩後には絨毛・胎盤の染色体検査、病理組織学的検査などを行ってきた。この過程で、将来の再検査等を目的として検体の一部を保存してきた。

そこで、本研究に供することが可能な症例をデータベースから抽出し、その検体の保存状態、保存量などを確認すること、年次別の検体数を把握することを本年度の研究の主眼とした。

C. 研究結果

平成 12 年 3 月現在、羊水検査を行った症例数は 5,238 件に達する。再検査症例も含めると保存総数は 5,408 検体であった（表 1, 表 2）。検体は 1979 年から現在に至る 21 年間にわたって保存されているが、十分な量（1.8ml 以上）が保存されている検体は、1979 年から 1988 年の期間に 299 検体、1989 年 4 月以降現時点までの期間では 4,907 検体の 5,206 検体であった。

これらの症例の染色体検査理由は、約 70%が高年妊娠、20%が胎児異常および妊娠の異常、残りが、染色体異常児分娩の既往、先天奇形を有する児の分娩既往、家系内の染色体異常者、本人あるいは夫が染色体異常保因者、不安（薬剤投与、X 線被曝など）、補助生殖医療による妊娠などであった。

染色体異常は、genetic amniocentesis の症例から 3%（表 1）に、胎児形態異常や妊娠の異常など何らかの異常が指摘された症例から 9.1%（表 2）に認められた。したがって、保存検体の大部分が染色

体正常と判断された症例から得られたものである。また、胎児形態異常や異常妊娠の原因の大部分が不明のままになっているのが現状である。

絨毛・胎盤等、羊水以外の組織の保存状況を見てみると、1984 検体が保存されており、その内容は、胎児形態異常、自然流産、早産・死産、胎児染色体異常、胞状奇胎などの症例から得られた絨毛、胎盤、分娩時臍帯血、何らかの妊娠の異常が見いだされた母体の血液、不育症夫婦の血液などに分類された(表3)。これらの検体から検出された染色体異常の頻度は、19.4%であった。

検体のすべてで本研究に供することのできる十分な量が確保できているわけではないが、羊水にて異常な数値を示す内分泌攪乱物質が指摘されれば、対応する他種の検体で調査できる可能性がある。

C. 考察

内分泌攪乱物質がヒトの妊娠におよぼす影響は今のところ明らかになっていない。しかし、他の動物では生殖系への影響など、これまで原因不明であった異常が内分泌攪乱物質の関与で説明される可能性が指摘されている。

表2に示したように、明らかな妊娠の異常があっても原因をつきとめられなかった症例が多数あるが、臨床的には妊娠初期の母体内分泌環境の異常が一つの可能性と指摘されていることから、内分泌攪乱物質の母

体内濃度等はこれらの異常の成因を考察するうえで重要な情報である。

今回のわれわれの調査で、妊婦における過去21年間にわたる羊水中、母体血中、組織中の内分泌攪乱物質の濃度の変化を検索できる可能性が示された。妊娠の異常や胎児異常に同物質がどのような関与を示すかは今後の測定を待たねばならないが、経時変化とともに妊娠の異常に何らかの関連が指摘できれば、これからの周産期管理に計り知れない恩恵をもたらすものと考えられる。

D. 結論

当科における羊水、組織、分娩時臍帯血等の検体保存状況・保存状態を調査し、過去21年間にわたり、内分泌攪乱物質の濃度を測定できる可能性が確認された。われわれの施設を訪れる症例に限った検討にはなるが、地域内における内分泌攪乱物質の生体内への取り込み、妊娠におよぼす影響などに関する貴重な情報が得られるものとする。

E. 研究業績

論文発表

1. 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
2. 星 信彦, 半田 康, 藤本征一郎

- (1999) : 産婦人科領域における性分化異常症の細胞・分子遺伝学的解析. 科と婦人科 66 : 894-900
- 性差医学 5 : 70-77
3. 星 信彦, 山田秀人, 藤本征一郎
(1999) : 先天形態異常と染色体. 産

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質・性ステロイド代謝に関与する遺伝子の多型と機能の解析

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

研究協力者 佐田 文宏、戸崎 静香、貢 英彦、片倉 洋子

研究要旨

シトクロム P450 (CYP) 遺伝子スーパーファミリーは、非常に多くの薬物、発癌物質、毒素などの外因性化学物質およびステロイド、脂肪酸、プロスタグランジンなどの内因性化合物の酸化代謝を触媒する一群のヘム蛋白質をコード化している。このうち CYP1A1, 1B1, 3A4 などは、Ah 受容体などの核内受容体とともに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) などの内分泌かく乱物質やテストステロン、エストラジオールなどの性ステロイドの代謝に関わり、グルタチオン転移酵素 (GST) など抱合反応により不活化 (解毒) を担う第 2 相の酵素群と連携している。CYP3A4 はヒトの肝臓、腎臓および小腸で発現し、臨床的に、生理学的におよび中毒学的に重要な多くの化合物の代謝に関与している。テストステロンの 2 β , 6 β , 15 β の水酸化反応やエストラジオールの 16 α の水酸化反応などには、この酵素が関わっている。

本研究では、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を遺伝子レベルで明らかにすることを目的として、尿道下裂等の先天異常の患者と親および不育・不妊症例の遺伝子多型を検索し、機能の不明な変異に関しては、*in vitro* の発現系を用い、薬物動態の解析を行う。

CYP3A4 遺伝子の変異型アリル CYP3A4*2 (Ser222Pro) は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6 β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。不育症例において、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。

今後、尿道下裂、停留精巣など先天異常に関し、親の機能異常を伴う遺伝子型による次世代影響を、不育症に加え不妊症および子宮内膜症における症例の遺伝子型の関与を検討する予定である。

A. 研究目的

本研究では、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を遺伝子レベルで明らかにすることを目的

としている。内分泌かく乱化学物質の代謝に関係の深いシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ、グルタチオン転移酵素などの薬物代謝酵素、ステロイド代謝・合成酵素および Ah 受

容体、アンドロゲン受容体などの核内受容体の遺伝子多型について検討する。このような遺伝子多型による個体の感受性の検討は予防上重要である。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質の代謝に関連のあると考えられている CYP1A1、1B1、3A4、GSTM1、Ah 受容体等の薬物・ステロイド代謝酵素、核内受容体の遺伝子多型の解析を行う。尿道下裂等の先天異常の患者と親および不育・不妊症例および対照群とする妊婦は出産時に採取した血液から、DNA 抽出し、PCR-RFLP 法により、遺伝子型をスクリーニングし、一部はシーケンスも行う。機能の不明な変異に関しては、*in vitro* の発現系を用い、薬物動態の解析を行う。最終年度に、これらの結果を基に、内分泌かく乱化学物質の、次世代の先天異常の神経内分泌系への影響や生殖毒性を総合的に検討する。

(倫理面への配慮)

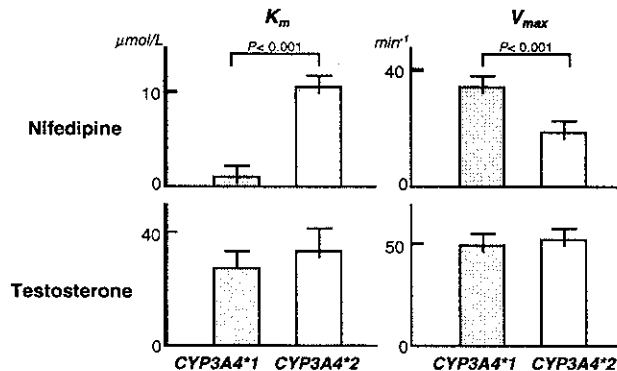
疫学調査におけるインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づき、調査研究を行った時点で最良と考えられている方法を採用している。患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮している。対象者のプライ

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している。

C. 研究結果

テストステロンやエストラジオールの代謝に関与する CYP3A4 遺伝子のエクソン7にある 222 番目のセリンがプロリンに代わる変異型アレル CYP3A4*2 の機能を、バキュロウィルスを用いた cDNA 発現系を用いて明らかにした。CYP3A4*2 は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6 β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。不育症例において、CYP1A1 の 3' 側の変異型アレル 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。今後、尿道下裂、停留精巣など先天異常に関し、親の機能異常を伴う遺伝子型による次世代影響を、不育症に加え不妊症および子宮内膜症における症例の遺伝子型の関与を検討する予定である。

図 野生型 *CYP3A4*1* と変異型 *CYP3A4*2* のニフェジピンとテストステロンに対するミカエリス定数 (K_m) と最大速度 (V_{max})



D. 考察

Baranova ら (1997, 1999) は、子宮内膜症患者に GSTM1 の完全欠損型および NAT2 の代謝遅延型の頻度が高いことを示し、Fritsche ら (1998) は、*CYP1A1* 遺伝子の変異が、Dowsing ら (1999) は、アンドロゲンレセプター遺伝子の CAG 繰り返し部分の長さが、男性不妊のリスクを高めることを示している。いずれも内分泌かく乱化学物質の生殖機能への影響の可能性を指摘している。本研究では、不育症とグルタチオン転移酵素遺伝子の機能欠損型との関連など新しい知見が得られ、さらに詳細に内分泌かく乱化学物質との関連を検討することが必要と考えられた。

E. 結論

CYP3A4 遺伝子の変異型アリル

*CYP3A4*2* (Ser222Pro) は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。また、不育症例において、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, and Gonzalez FJ: CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exon 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 67: 48-56, 2000.

Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Jarvisalo J, Impivaara O, Vainio H, and Hirvonen A: CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behavior. *Pharmacogenetics* 10:5-10, 2000.

2. 学会発表

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Raunio H and Gonzalez FJ: A CYP3A4 polymorphism involving an amino acid substitution in exon 7. 11th International Conference on Cytochrome P450, Sendai,

August 29-September 2, 1999

G. 知的所有権の所有状況
該当なし