

在胎週数≤36	10.5	5.4	2.00	0.60-6.64	1.93	0.52-7.19
出生時体重≤2500g	40.8	15.6	3.00	1.41-6.38	5.57	1.92-16.17
停留精巣の合併	16.7	0.0	∞		∞	
帝王切開	44.9	18.2	3.63	1.66-7.93	3.83	1.45-10.01
妊娠初期の飲酒	39.0	40.3	0.96	0.54-1.70	1.38	0.69-2.74
妊娠初期の喫煙	34.5	29.5	1.22	0.66-2.28	1.58	0.70-3.55
農業	3.8	6.4	0.60	0.14-2.51	0.82	0.09-7.58
歯科治療	32.1	21.8	1.13	0.44-2.88	1.80	0.83-3.90
豆腐を週一回以上 食べる	88.5	84.7	1.43	0.54-3.75	0.85	0.23-3.12
納豆を週一回以上 食べる	67.9	76.4	0.63	0.31-1.30	0.46	0.18-1.16
きのこ類を週一回以上 食べる	55.1	66.7	0.65	0.34-1.25	0.35	0.14-0.91
海藻類を週一回以上 食べる	63.6	67.1	0.80	0.42-1.54	0.67	0.29-1.53
果物を週一回以上 食べる	61.5	62.3	1.00	0.52-1.92	0.98	0.41-2.32

*: 児出生年をマッチ, §: 児出生年をマッチ, 両親の児出生時年齢, 収入を調整

D 考察

先行研究によってさまざまなリスク要因が報告されている。

特に流産防止薬として妊娠中にホルモン製剤を使用した場合に尿道下裂のリスクが上昇することは複数の報告がある。プロゲステロン製剤による抗アンドロゲン作用が示唆されており、複数の動物実験によって支持されている。この研究でも、統計学的に有意ではないが、切迫流産のある妊娠やそれに伴う流産防止薬投与でリスクの上昇傾向が認められた。マッチすることの出来るペアの数を増やしたり、マッチング比を1:1から上昇させることにより、切迫流産のある妊娠やそれに伴う流産防止薬投与が尿道下裂のリスクになるか検討する必要がある。

妊娠中毒症でも高いリスク上昇を認めた。胎盤機能の低下が、やはり有意なリスク上昇をみとめた低出生時体重児の原因となっているとも考えられる。在胎週数が短い場合には有意なリスク上昇を認めていないが、発育遅延の有無を今後解析に入れる必要があると考えられた。

帝王切開でリスクが上昇しているが、帝王切開となった理由の主だったものは、胎児仮死、前置胎盤、骨盤位、前回帝切などである。今後解析対象ペアが増えた時点でこれらの帝王切開理由も解析する予定である。

妊娠中の薬剤使用のうちで、尿道下裂に関連があると報告されているものには、ホルモン製剤のほかに、抗てんかん薬、抗糖尿病薬、アスピリン、抗生物質がある。これらのリスクを解析するには、これらに曝露された対象の数がまだ不足していると考えられた。

North らは、肉の代替品として大豆を多く食べる菜食主義者に尿道下裂が生まれるリスクが高いと報告されている(3)。大豆に付着している農薬との交絡も考えられるが、今回の結果では特に関連が認められなかった。頻度のみならず、摂取量を解析する必要があると考えられた。また、先行文検討では指摘されていないが、きのこ類を週に一回以上食べる母親に尿道下裂児出生のリスクが増していた。今後、解析対象を増やして詳しく調べる必要があると考えられた。

E 研究発表

1. 学会発表

倉橋典絵、笠井世津子、加藤静恵、西條泰明、近藤朋子、玉置淳子、佐田文宏、岸 玲子：胎児期曝露による子供への影響——先天異常（尿道下裂・停留精巣）と精神神経発達などの次世代影響に関する研究の実際と課題. 第72回日本衛生学会総会ワークショップ，津市，2002年3月27日。

笠井世津子，倉橋典絵，佐田文宏，岸 玲子：尿道下裂の症例対照研究. 第11回臨床環境医学会総会，札幌市，2002年7月5-6日。

参考文献

- 1 Paulozzi LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 297-302.
- 2 Sumiyoshi Y, Hirahara F, Sakamoto S. Studies of the frequency of congenital malformations in Japan and Asian countries. *Congenital Anomalies* 2000;40:S76-86.
- 3 North K, et al. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *Br J Urol Int* 2000; 85:107-113.

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

停留精巣リスク要因に関する疫学研究

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 小柳 知彦 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教授
研究協力者 佐田 文宏、笠井 世津子、倉橋 典絵（公衆衛生学分野）
野々村 克也、柿崎 秀宏、村雲 雅志（腎泌尿器外科学分野）
富樫 正樹、関 利盛（市立札幌病院泌尿器科）
福島 直樹（市立札幌病院小児科）
多田 実（埼玉県立小児医療センター泌尿器科）
辻 克和（社会保険中京病院泌尿器科）
黒川 泰史（徳島大学大学院医学研究科泌尿器科）

研究要旨

北海道大学附属病院泌尿器科、市立札幌病院泌尿器科にて停留精巣の手術歴のある児 106 名に生活習慣や環境曝露に関する調査票を郵送し、76 名から回収した。病院対照として、北海道大学附属病院小児科入院中、市立札幌病院小児科外来中の停留精巣を持たない男児とその両親を対象とし、87 名から回収した。調査内容は、児要因として①出生時体重②在胎期間③先天奇形合併、産科要因として①妊娠経過②妊娠時・出産時における問題（妊娠中の出血・切迫流産・帝王切開・異常分娩・妊娠悪阻・子癇前症）③過去の妊娠歴・出産歴、母親の要因として①母親の病歴・薬剤服用歴②母親の喫煙・飲酒、父親の要因として、① 父親の病歴（不妊治療、泌尿器系疾患）②父親の喫煙・飲酒、化学物質曝露に関して①内分泌かく乱物質の職業性曝露・食物からの摂取②農作業・家庭菜園での作業における農薬への曝露、等である。症例と対照を出生年で 1 対 1 でマッチさせ、リスク要因について解析、検討した。児要因である在胎期間・出生時体重に差はみられなかった。妊娠中の要因であるつわり・切迫流産・胎出血についても差はみられなかった。父親の停留精巣の既往が症例の 5.3%に認められた。妊娠前・妊娠中の母親の飲酒、妊娠前の母親の喫煙については差はみられなかったが、妊娠中の母親の喫煙で有意に高いオッズ比（4.4：95%CI=1.2-16.8）を示した。さらに、父親の妊娠前の喫煙・妊娠中の喫煙でも高いオッズ比（1.8：95%CI=0.9-3.8、2.0：95%CI=0.96-4.2）を、父親の妊娠前の職業性ガソリン曝露で有意に高いオッズ比（4.3：95%CI=1.1-16.1）を認め、身近な化学物質と停留精巣との関連が示唆された。

今後、さらに症例対照の数を多く集めて、検討する必要がある。

A. 研究目的

近年、内分泌かく乱物質による人体への影響が指摘されている。内分泌かく乱物質は、次世代影響が大きいのが問題である。我々は、その中でも、特に、内分泌かく乱物質との関連が疑われている停留精巣に注目し、症例対照研究で、症例の母および父が、患児の出生前、特に生殖器が分化形成する時期に、内分泌かく乱物質（有機塩素系殺虫剤、PCB、医薬品、食物性エストロゲンなど）への曝露の有無、種類などを調査し、その因果関係を明らかにする。

B. 研究方法

1. 対象

北海道大学附属病院泌尿器科、市立札幌病院泌尿器科で停留精巣の手術の既往のある過去15年間に生まれた児106名を対象とし、76名から回収した（回収率72%）。これらの症例は、外来診療録と手術を行ったときの入院診療録より、合併先天奇形、染色体異常所見、その他の周産期の異常の有無と、手術所見（停留精巣の位置、状態など）の情報が得られている。病院対照として、北海道大学附属病院小児科入院中、市立札幌病院小児科外来中の停留精巣を持たない男児とその両親を対象とし、87名から回答を得た。

2. 方法

質問紙調査法を用い、過去に手術を受けた男児については質問紙を患児の保護者宛に郵送した。

調査票の主な内容は、以下の通りである。

I. 児要因

- ① 出生時体重
- ② 在胎期間

③ 先天奇形合併

II. 産科要因

- ① 妊娠経過
- ② 妊娠時・出産時における問題（妊娠中の出血・切迫流産・帝王切開・異常分娩・妊娠悪阻・子癇前症）
- ③ 過去の妊娠歴・出産歴

III. 母親の要因

- ① 母親の病歴・薬剤服用歴
- ② 母親の喫煙・飲酒

IV. 父親の要因

- ① 父親の病歴（不妊治療、泌尿器系疾患）
- ② 父親の喫煙・飲酒

V. 化学物質曝露

- ① 内分泌かく乱物質の職業性曝露・食物からの摂取
 - ② 農作業・家庭菜園での作業における農薬への曝露
- 等である。

（倫理面への配慮）

停留精巣の成因を調査するための医学的研究であること、研究への参加は両親、本人の自由意志であること、もし研究への参加に同意しない場合でも今後の診療上のいかなる不利益を設けないこと、等を主治医から十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で調査に参加していただいた。

C. 研究結果

出生年で1対1でマッチングした61組を対象に単変量解析を行った。

1. 児要因（表1）

平均在胎週数、平均出生時体重について差はみられなかった。症例で在胎週数37週

未満が多い傾向であったが有意差はみられなかった。出生時体重 2500 g 未満も有意な差は認められなかった。第 1 子にも有意差は認められなかった。

表 1：児要因

	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比 (95%CI)	検定
平均在胎週数(週)	37.5	38.4		P=0.1
平均出生体重(g)	2865.0	2866.0		P=1.0
在胎週数 37週未満	23.6	13.3	2.0(0.7-5.8)	
出生時体重 2500g未満	20.7	21.3	0.9(0.4-2.3)	
帝王切開	31.7	16.4	2.4(0.99-5.6)	
第1子	56.7	59.3	0.9(0.4-1.9)	

2. 妊娠中の要因 (表 2)

妊娠中のつわりは、対照群で高い割合を示した。妊娠中毒症は症例群で比較的多くみられたが、有意な差は認められなかった。切迫流早産、妊娠中の膣出血についてはほとんど差がみられなく、それに伴う流産防止薬の服用にも、有意な差は認められなかった。症例群で帝王切開の高い割合がみられたが、有意な差は認められなかった。

表 2：妊娠中の要因

	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比 (95%CI)	検定
つわり有り	23.3	40	0.5(0.2-1.0)	
妊娠中毒症	13.1	8.2	1.7(0.5-5.5)	
切迫流早産	11.5	18	0.6(0.2-1.6)	
流産防止薬服用	16.4	19.7	0.8(0.3-2.0)	
妊娠中の膣出血	11.5	11.5	1.0(0.3-3.0)	
帝王切開	31.7	16.4	2.4(0.99-5.6)	

3. 親要因 (表 3)

母親の年齢の平均に有意な差を認めた。母親の出産時年齢 35 歳以上群で、オッズ比が有意に低下した。妊娠中および妊娠前の飲酒については、1 度でも飲んだことのある人と 1 度でも飲んだことのない人との間に差はなかった。妊娠前の喫煙については差は認めなかったが、妊娠中の喫煙については、症例で 10 本以上の喫煙をしている群に有意に高いオッズ比を認めた。

表 3：母親の要因

	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比 (95%CI)	検定
年齢				
<19才	1.6	0		
20-29才	45	33.3		
30-39才	53.3	61.7		
40才<	0	5		
平均(才)	29.2	35		P=0.04
出産時年齢				
35歳以上	8.3	23.3	0.3(0.1-0.9)	*
妊娠前の飲酒	60.3	62.3	0.92(0.4-1.9)	
妊娠中の飲酒	24.1	23.7	1.0(0.4-2.4)	
妊娠前の喫煙 (10本以上/日)	37.3	33.3	1.2(0.6-2.5)	
妊娠中の喫煙 (10本以上/日)	18.6	4.9	4.4(1.2-16.8)	*

4. 父親要因（表4）

父親の年齢に有意差は認められなかった。症例で、父親の停留精巣の既往が5.3%みられたが、対照にはみられなかった。妊娠前、および妊娠中の喫煙については、症例で高い割合がみられた。

表4：父親の要因

	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比 (95%CI)	検定
年齢				
<19才	0	0		
20-29才	36.7	35.1		
30-39才	58.3	50.9		
40-49才	5	12.3		
50才<	0	1.8		
平均(才)	31.6	35		P=0.18
停留精巣の 既往	5.3	0		
妊娠前の喫煙 (10本以上/日)	66.7	52.5	1.8(0.9-3.8)	
妊娠中の喫煙 (10本以上/日)	64.4	47.5	2.0(0.96-4.2)	

5. 化学物質曝露（表5）

児の両親が専業・兼業農家である農業従事者の割合には差がなかった。また、農業従事者と、それ以外に家庭菜園での農薬使用者を加えた農薬曝露にもほとんど差がみられなかった。一方、職業性の化学物質曝露については、症例で、父親の妊娠前のガソリン曝露のオッズ比が有意に高かった。その他、妊娠前・妊娠中における父親の化学物質曝露については、症例で全て高い割合がみられたが、有意な差はなかった。母親

の職業性化学物質曝露の割合は少ないが、症例の母親に曝露がみられた。

表5：化学物質曝露

	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比 (95%CI)	検定
農業従事	3.3	3.3	1.0(0.1-7.3)	
農薬曝露 (農業・家庭菜園)	10.9	13.7	0.7(0.2-2.5)	
妊娠前				
父親				
ガソリン曝露	18	4.9	4.3(1.1-16.1)	*
ディーゼル曝露	13.1	4.9	2.9(0.7-11.6)	
有機溶剤曝露	11.5	8.3	1.4(0.4-4.8)	
母親				
ガソリン曝露	3.3	1.6	2.0(0.2-23.0)	
ディーゼル曝露	3.3	0		
有機溶剤曝露	1.6	0		
妊娠中				
父親				
ガソリン曝露	16.4	4.9	3.8(0.99-14.5)	
ディーゼル曝露	11.5	4.9	2.5(0.6-10.2)	
有機溶剤曝露	11.5	8.2	1.5(0.4-4.9)	
母親				
ガソリン曝露	1.7	0		
ディーゼル曝露	1.7	0		
有機溶剤曝露	1.7	0		

D 考察

精巣下降は機械的因子とホルモン因子の相互作用によって生まれる結果と考えられる。詳細な下降メカニズムは不明であるが、第1相の腹腔内下降 transabdominal phase と第2相の鼠径陰嚢部下降 inguinoscrotal phase の2段階に分かれて

いると考えられている。機械的因子としては、精巣導体の収縮による牽引説、発達した精巣上体による圧迫説、胎児の発育に伴う相対的下降説、腹圧による押し出し説、などがある。ホルモン因子としては、Sertoli 細胞から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (MIS)、Leidig 細胞から分泌されるテストステロンが重要と考えられている。精巣下降の第 1 相は、アンドロゲンの関与は少なく非アンドロゲンのホルモンや、胎児の精巣から分泌されるミューラー管発育阻止物質 (MIS) が腹腔内精巣下降をコントロールしていると考えられている。第 2 相は、胎児の Leidig 細胞から分泌されるアンドロゲン依存性だと考えられている。

母親の妊娠中の内外からのエストロゲン曝露が、精巣下降第 1 相において関係するといわれる MIS の作用を阻害し、また、胎児の Leidig 細胞の前駆細胞を抑制することで第 2 相に関係するといわれるテストステロンの分泌を阻害し、停留精巣の発生に関与すると考えられる。

過去の国外の疫学研究によると、停留精巣のリスク要因の主なものとして、児要因としては、低出生体重児・早産児、妊娠中の要因としては、つわり・薬剤服用歴・帝王切開、母親の要因としては高齢出産、父親の要因としては、停留精巣の既往を持つ遺伝的な要因が報告されている。化学物質（内分泌かく乱物質）との関連はほとんど報告がない。

停留精巣は胎児の成長に伴い下降し、出生時に下降していなくても 1 才までの下降が期待できる。そのため、低出生体重児、早産児では高率に停留精巣がみられる。今回の調査では、低出生体重児、早産児にも

いずれも有意な差は示さなかった。化学物質蓄積の影響を最も受けやすいとされる第 1 子についても有意な差はみられなかった。妊娠中のリスク要因と考えられる妊婦のエストロゲン高値の状態を反映すると言われる、つわりについても今回は差を認めず、逆にオッズ比の低下を認めた。

今回の調査では、高齢の母親にオッズ比の低下を認めた。しかし、対象者の属性をみると、症例と対照で年齢の平均値に有意な差がみられ、参加者の選択バイアスの可能性が考えられる。妊娠前、妊娠中の母親の飲酒、妊娠前の喫煙に有意な差は認められなかったが、妊娠中の喫煙には症例で高いオッズ比=4.4(95%CI=1.2-16.8)を認めた。

停留精巣には家族歴がみられることから、遺伝要因も関連していると考えられている。今回の調査でも、対象にはみられなかったが、症例の父親の 5.3%に停留精巣の既往がみられた。また、妊娠前、妊娠中の喫煙で、1.8、2.0 のオッズ比を認めており、副流煙の影響も考えられる。

今回の調査では、職歴を詳細に聞き、職業性の化学物質との関連を調べた。過去に報告されている農薬との関連は認められなかったが、父親の妊娠前、妊娠中のガソリン曝露に 4.3 (95%CI=1.1-16.1)、3.8(95%CI=0.99-14.5)と高いオッズ比を認めた。職業の内容は、整備工場、運送業、タクシー・トラックの運転手等であった。自動車を使用した自営業であったり、自動車での帰宅などにより母親にもガソリン曝露の機会が多い可能性があるのかもしれない。

その他、ディーゼル燃料、有機溶剤曝露

では、有意ではないが、症例の父親で割合が高い傾向が認められた。

今回は、喫煙・ガソリンといった身近にある化学物質が停留精巣に影響を及ぼすことが示唆される結果となった。内分泌かく乱物質は、次世代影響が一つの問題である。胎児へ悪影響を与える物質との接触は最小限に押さえる努力が必要である。今後、さらに症例対照の数を多く集めて、検討する必要がある。

E. 結論

停留精巣の症例対照研究を行い、妊娠中の母親の喫煙のみならず、父親の喫煙、職業生化学物質曝露によるオッズ比の上昇を認め、関連が示唆された。胎児へ悪影響を与える物質との接触は最小限に押さえる努力が必要である。

F. 研究発表

1. 学会発表

倉橋典絵、笠井世津子、加藤静恵、西條泰明、近藤朋子、玉置淳子、佐田文宏、岸玲子：胎児期曝露による子供への影響——先天異常（尿道下裂・停留精巣）と精神神経発達などの次世代影響に関する研究の実際と課題。第72回日本衛生学会総会ワークショップ，津市，2002年3月27日。

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

尿道下裂患児とその両親のステロイド代謝に関する研究

分担研究者 小柳知彦 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教授

研究協力者 野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志

三上篤（札幌市衛生研究所）

研究要旨

当科で経験した尿道下裂 12 症例とその両親（11 家族）コントロール 1 例（1 家族）、末梢血計 32 検体について、アンドロジェン生合成系における異常の有無を調べるため、血清中の 3-ヒドロキシステロイド（Pregnenolone, 17-Hydroxypregnenolone, Dehydroepiandrosterone）、3-ケトステロイド（Progesterone, 17-Hydroxyprogesterone, Androstenedione）を測定して、その比をとることによって代謝酵素の活性を求めた。

各ステロイド中間代謝産物のうち、Pregnenolone は分析不可能で、その他も測定感度以下の例が 17-Hydroxypregnenolone 20/32 (62.5%), Dehydroepiandrosterone 26/32 (81.25%), Progesterone 27/32 (84.38%), 17-Hydroxyprogesterone 10/21(31.25%), Androstenedione 6/32 (18.75%)と多数に認められた。したがって、これらのステロイドの比より求めるステロイド代謝酵素活性に何らかの異常を見出すことができなかった。近位型尿道下裂の 1 例において、 $\Delta 5$ 系ステロイドの高値、 $\Delta 4$ 系ステロイド低値あるいは測定感度以下で 3β 水酸化ステロイド脱水素酵素の欠損異常が疑われた。

尿道下裂症例におけるアンドロジェン合成系の異常の検討には同一の手法による検索は非効率的であり、感度・特異度が低く、経済的負担も大きいと考えられた。今後は感度・特異度の面で安定した測定法を確立する必要がある。また、その対象症例も家族発生例や近位尿道下裂例などに絞って検討していく必要がある。さらに、存在するステロイド代謝異常が遺伝子変異として認められるのか、その変異が内分泌攪乱物質とどのように関連しているのかなどが今後の課題である。

A. 研究目的

尿道下裂の成因に関しては不明な点が多くさまざまな説が提唱されているが、近年では胎児期の内分泌環境の異常がクローズアップされており、内分泌攪乱物質との関連についても深い関心が持たれている。

われわれは一昨年度の研究において、尿道下裂症例では思春期前の段階から刺激に

対するテストステロン分泌の反応性が低下しており、精巣機能障害とくにライディッヒ細胞の機能障害が存在する可能性を指摘した¹⁾。昨年度はその詳細をより明らかにするためにアンドロジェン生合成に関与するステロイド代謝酵素の異常を検索する目的で、ステロイド代謝経路において重要な中間代謝産物について測定系を確立し、実

際に尿道下裂患児およびその両親についてアンドロジェン生合成系に問題がないかどうか検索を行い、少ない症例の検討ではあるが、尿道下裂症例にステロイド代謝異常が高頻度で認められ、また代謝異常が家族性に見られることを報告した²⁾。

尿道下裂症例においてこのようなステロイド代謝異常が一定頻度で存在するのか、昨年と同様にステロイド中間代謝産物の測定を尿道下裂患児およびその両親について行った。

B. 研究方法

当科にて2001年3月から2002年2月までに尿道下裂形成術を受けた症例のうち、協力の得られた12例/11組の父母を対象として検討した。また、同意が得られた、性腺・精路に異常のない泌尿器科疾患患児（腎盂尿管移行部狭窄症）およびその父母1組をコントロールとし、末梢血計32検体について検討した。

血清中のステロイド代謝産物を測定するために、患児から2ml、両親から3mlの静脈血をヘパリン添加採血管に採取して、すみやかに血清を分離し-20℃で冷凍保存した。測定の対象としたのはヒト副腎におけるテストステロン生合成系の中間代謝産物である、

- 1) Pregnenolone (Preg.)
- 2) 17-OH Pregnenolone (17-OH Preg.)
- 3) Progesterone (Prog.)
- 4) 17-OH Progesterone (17-OH Prog.)
- 5) Dehydroepiandrosterone (DHEA)
- 6) Androstenedione (A.)

の6種類である。これらの中間産物の中で、前駆物質と生成物質との比を指標として、

テストステロン生合成において重要な3つの酵素～3βヒドロキシステロイド脱水酵素（以下3βHSD）、17α水酸化酵素（以下17αOHase）、17-, 20-リアーゼ～の活性を推定した。中間代謝産物の分析は液体クロマトグラフィー法(HPLC)で行い、高感度セミマイクロラム対応システム（資生堂ナノスペース SI-1）を用いた（使用カラムCAPCELL PAK C18UG120S3、35℃、流速100μl/minで波長254nmにて検出）。

（倫理面への配慮）

本研究における検討項目のうち臨床的背景については、尿道下裂に対する手術的治療の方針決定のために必要な臨床情報であることを良く説明し、両親の了解を得てから、詳細な問診と理学的所見の検討、必要に応じて超音波検査や尿路画像診断を行った。また、ステロイド代謝酵素の測定に関しては、治療に関して必須な検査ではないこと、尿道下裂における代謝異常を検討するための医学的研究目的であること、研究への参加は保護者である両親の自由意志によるものであること、もし研究に参加しない場合でも今後の診療においていかなる不利益を被ることはないことを主治医から十分に説明して、インフォームドコンセントを受けた上で採血・検査を行った。

C. 研究結果

（1）臨床的背景

本年度中に協力を得られたのは12家族であり、いわゆるchordee without hypospadias 1例、遠位型が9例、近位型が2例であった。コントロールを含めて他の合併異常はなく、母親の妊娠・分娩経過も正常で、妊娠中の薬剤使用歴はなく、家族歴にも特記すべきことはなかった。

(2) ステロイド中間代謝産物測定結果
各中間代謝産物はコントロールを含め、Prog.は紫外ラベル化などの条件を最適化できず分析不可能であった。他の5種類のステロイド中間代謝産物も、測定感度以下の例が17OHpreg.20/32 (62.5%), DHEA 26/32 (81.25%), Prog. 27/32 (84.38%), 17OH prog 10/21(31.25%), A. 6/32 (18.75%)と多数にみとめられた。したがっ

て、3βHSD 活性の指標としては 17-OH Preg./17-OH Prog. DHEA/Andro. の比を求めた (図 1, 2)。17αOHase 活性の指標にはProg./17-OH Prog. の比を (図 3)、また 17-, 20-リアーゼ活性には 17-OH Preg./DHEA, 17-OH Prog. /A.の比 (図 4, 5) を計算できるサンプルのみで求めたが、一定の傾向や特定の酵素活性の異常は見出せなかった。

図 1, 2. 3βヒドロキシステロイド脱水酵素活性の指標 図 3 17α水酸化酵素活性の指標

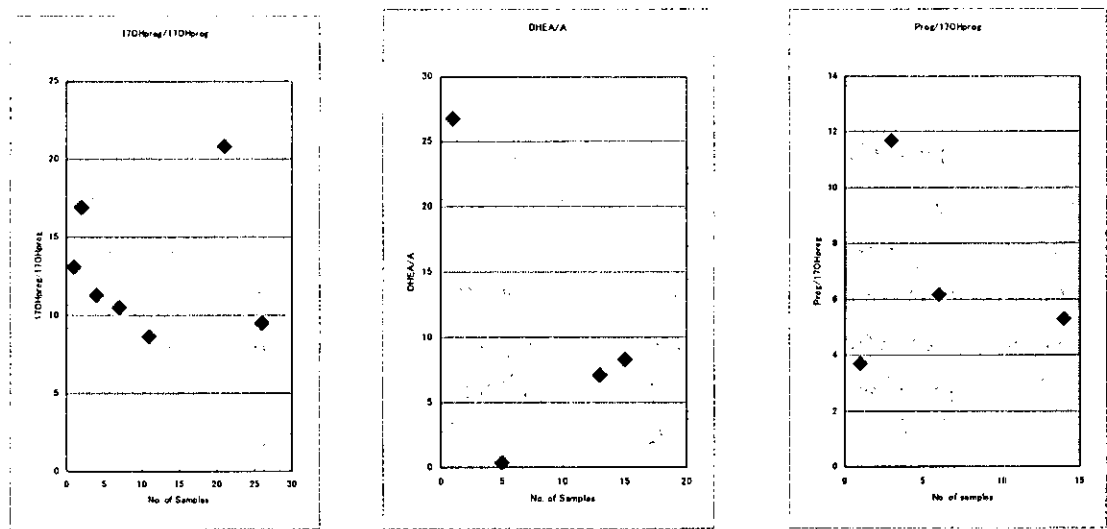
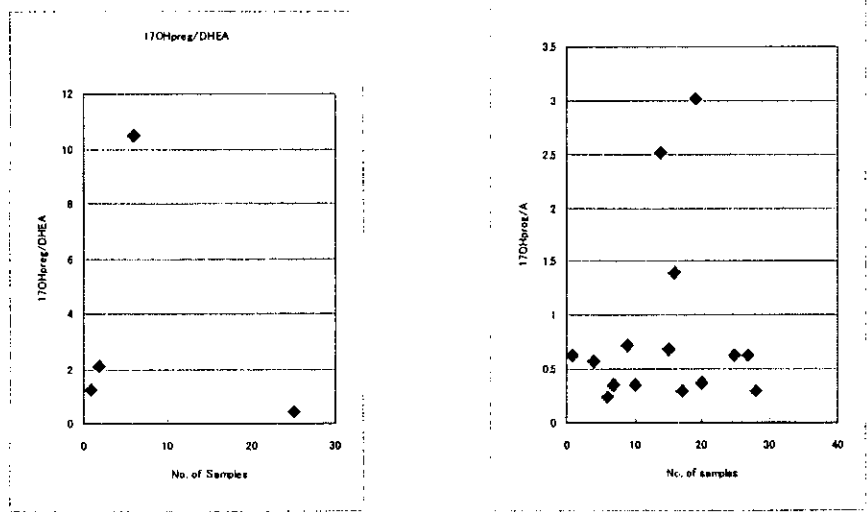


図 4, 5 17-, 20-リアーゼ活性の指標



近位型尿道下裂の1例でProg., Aは感度以下で測定不可能であったが、 $\Delta 5$ 系ステロイドである17OHpreg, DHEA 高値であり、 3β HSD 欠損が疑われた。しかし、患児母親の $\Delta 5$ 系ステロイドの高値は認められなかった。

D. 考察

尿道下裂にはアンドロジェン合成異常が高頻度に合併することが知られており、当科で経験した症例においても平成11年度本研究報告に述べた^{1),3)}。また、平成12年度本研究報告にも述べたように、妊娠中のプロゲステロン投与が、 3β HSD 活性を低下させることが知られている。こうしたことから、尿道下裂の成因として胎児期の精巢機能やステロイド代謝の異常が深く関与することが従来指摘されてきた⁴⁾。一方、男性仮性半陰陽の原因として、ステロイド代謝異常を示す先天性副腎過形成が知られており、平成12年度および今回検索した 3β HSD、 17α OHase、17-, 20-リアーゼ活性の欠損はその代表的な疾患として知られている⁵⁾。しかし、これら多くの尿道下裂症例のステロイド代謝に関してはステロイド中間産物の測定系が不安定であったことや、測定のためには比較的大量の血液を必要としたことなどから、尿道下裂とステロイド代謝異常との関係については十分な検討がなされないままとなっていた。

そこで、前年度は尿道下裂の成因としてのステロイド代謝異常の重要性を具体的に指摘したAaronsonらと同様にHPLCを用いpilot studyとしてステロイド中間代謝産物を測定した所、高率に 3β HSD や 17-, 20-リアーゼなどの酵素異常を示唆する所見が得られ、今年度はその症例数を増やし

て測定した結果、多くの症例・検体でステロイド中間代謝産物が測定感度より低い値であった^{2),4)}。したがって、今回酵素異常が疑われる症例は1例のみに留まった。その原因として、今回の症例の多くは遠位型尿道下裂であり、元来ステロイド代謝に異常がみられない症例を対象としたことが今回の結果に繋がった可能性がある。さらに、血中に微量に含まれるこれらのステロイド中間代謝産物の僅かな変化を捉えるのに今回のHPLC法がどれだけ鋭敏かという疑問が残った。しかし、昨年度の本報告も含め家族発症例や近位尿道下裂例では 3β HSD 欠損を示唆する所見が得られていることから、これら微量のステロイド中間代謝産物の簡便かつ正確な測定法を確立した上で、対象を限定して検索を続けることは有意義と思われる。

また、 3β HSD やチトクローム P-450 の仲間である 17α OHase、17-, 20-リアーゼの欠損は女子の先天性副腎過形成としても知られ、そのclassical typeでは種々の遺伝子変異がみられる一方、多毛症などで発見される遅発型(non-classical or late-onset type)では遺伝子の異常が見出されない^{6),7)}。したがって、われわれが見出し得た高度な尿道下裂例のアンドロジェン合成酵素異常が遺伝子変異に伴うものであるか否かを検討する必要がある。今後、数多くのアンドロジェン合成酵素異常を有する尿道下裂症例において分子生物学的手法を用いた解析により、尿道下裂の発生と内分泌攪乱物質をはじめとする環境因子との関連性が解明されることが期待される。

E. 結論

当科で経験した尿道下裂 12 例とその両親について (計 11 家族) およびコントロール 1 例 (1 家族) の血清中のステロイド中間代謝産物を測定した。下裂の程度は **chordee without hypospadias** 1 例、遠位型 9 例、近位型が 2 例であった。全例、合併異常などを認めなかった。主として、測定法の問題で、**Preg.** は測定不能、他の 5 種のステロイド中間代謝産物も測定感度以下の症例が多く生じ、明らかなステロイド代謝異常例を見出し得なかった。近位型の 1 例に 3 β HSD 欠損が疑われた。

〈今後の課題〉

ステロイド中間代謝産物の測定に関し、感度・特異度の面で安定した測定法を確立する必要がある。また、効率・経済的観点からも、その対象症例を家族発症例や近位尿道下裂例などに絞って検討していく必要がある。さらに、存在するステロイド代謝異常が遺伝子変異として認められるのか、その変異が内分泌攪乱物質とどのように関連しているのかなどの疑問に答えるには分子生物学的手法を用いた検索が必要である。

研究発表

F. 論文発表

- 1) Nonomura K, Koyama T, Kakizaki H, Murakumo M, Shinohara N, Koyanagi T.: Testis-sparing surgery for the prepubertal testicular tumor.: Experience of two cases with large cell calcifying Sertoli cell tumors. Eur. Urol. 40: 699-704, 2001.
- 2) 野々村克也: 北海道医師会少子化対策 (2)-こどもたちは北海道の希望です-シンポジウムⅢ 生殖医療からみた少子化対

策-男性不妊治療の現況- 北海道医報 968: 14-19, 2001

G. 学会発表

柿崎秀宏、野々村克也、村雲雅志、柴田隆、小柳知彦: ビデオシンポジウム「尿道形成術不成功例に対する再手術」 日本小児泌尿器科学会総会、2001 年 7 月 13 日、東京

H. 参考文献

- 1) 小柳知彦、野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志: 先天性外陰奇形 (尿道下裂) の内分泌環境に関する症例対照研究. 平成 11 年度厚生科学研究費補助金研究報告書. 内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、とくに生殖泌尿器系・先天異常の成因に関する疫学的研究 pp35-42.
- 2) 小柳知彦、野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志: 先天性外陰奇形 (尿道下裂) の内分泌環境に関する症例対照研究. 平成 12 年度厚生科学研究費補助金研究報告書. 内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、とくに生殖泌尿器系・先天異常の成因に関する疫学的研究
- 3) Nonomura K, Fujieda K, Sakakibara N, Terasawa K, Matsuno T, Matsuura N, Koyanagi T: Pituitary and gonadal function in prepubertal boys with hypospadias. J. Urol. 132: 595-598, 1984
- 4) Aaronson IA, Cakmak MA, Key LL: Defects of the testosterone biosynthetic pathway in boys with hypospadias. J. Urol. 157: 1884-1888, 1997

- 5) 藤枝憲二:先天性副腎過形成の遺伝子診断。小児科臨床 50: 637-646, 1997
- 6) Eldar-Geva T, Hurwitz A, Vecsei P, Palti Z, Milwidsky A, Rosler A: Secondary biosynthetic defects in women with late-onset congenital adrenal hyperplasia. N. Engl. J. Med. 323: 855-863, 1990
- 7) Zerah M, Rheaume E, Mani P, Schram P, Simard J, Labrie F, Mew MI: No evidence of mutations in the gene for type I and type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD) in nonclassical 3β HSD deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab. 79: 1811-1817, 1994

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

不育症・不妊症例における遺伝要因－異物代謝酵素等の遺伝子多型

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 遺伝子完全欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された（オッズ比 2.8、95 %信頼区間 1.6-5.1）。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度、GSTP1 遺伝子 BsmAI 多型または IL6 遺伝子 BsrBI 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で低い傾向と CYP2C9*3 多型または CYP17 遺伝子 MspAII 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で高い傾向がみられた。Ah レセプターを介する代謝系（aryl hydrocarbon gene battery）では、第 I 相よりも第 II 相反応酵素の機能欠損により生殖毒性が引き起こされる可能性が示唆された。今後、解析を継続し、遺伝子同士の交互作用等も含めて詳細に検討する必要がある。

研究協力者

佐田 文宏、近藤 朋子、片倉 洋子
貢 英彦、西條 泰明、佐々木成子
國田 智美、柘植 明子、永瀬 園子
山岸 洋

（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）

山田 秀人、三國 雅人、平山 恵美

（北海道大学医学部附属病院産科婦人科）

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。内分泌かく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、内分泌かく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

研究目的

難治性不育症（習慣流産）においては、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

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、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。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、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。

したがって、難治性不育症、子宮内膜症、難治性不妊症に対して内分泌かく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。

内分泌かく乱物質の代謝に関与する異物代謝酵素の遺伝子多型等とヒト生殖機能との関連を明らかにすること、特に、異物を活性化する第1相反応を担うシトクロムP450 酵素遺伝子と解毒作用を示す第2相反応を担うグルタチオン転移酵素の遺伝子多型と不育症（習慣性流産）と不妊症（子宮内膜症を含む）の関連を明らかにすることを目的として本研究を行った。

研究方法

北海道大学医学部附属病院を受診した不育症、不妊症（子宮内膜症を含む）の患者および少なくとも1度正常分娩を経験した流産の既往のない性、年齢、居住地を合わせた健常女性を対象とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽出した。シトクロムP450のアイソザイムであるCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C9、CYP2C19、CYP17、グルタチオン転移酵素のアイソザイムであるGSTM1、GSTT1、GSTP1、キノン還元酵素のNQO1およびサイトカインのインターロイキンの1種

のIL6の遺伝子多型を解析した。各遺伝子の代表的な多型であるCYP1A1 MspI 多型、CYP1A2 ApaI 多型およびDdeI 多型、CYP1B1 Eco57I 多型、CYP17 MspA1I 多型、GSTP1 BsmAI 多型、NQO1 HinfI 多型、IL6 BsrBI 多型およびHinfI 多型をPCR-RFLP法により、対象者の遺伝子型を判定した。GSTM1、GSTT1 遺伝子の欠損の有無は、 β -globinをポジティブコントロールとするPCR法により判定した。また、CYP2C9*3 多型、CYP2C19*2 多型、CYP2C19*3 多型は、Real-time PCRを用いたTaqMan allele-specific amplification (ASA)法により判定した。

倫理面への配慮

本研究は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」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た。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえ行った。

結果

現在までに解析の終わった予備的な結果ではあるが、不育症例、不妊症例および対照のCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C9、CYP2C19、CYP17、GSTM1、GSTT1、GSTP1、NQO1 およびIL6 遺伝子多型における遺伝子型の頻度を表1および2に示した。GSTM1 遺伝子完全欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された（オッズ比2.8、95%信頼区間1.6-5.1）。また、CYP1A2 遺伝子DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度、GSTP1 遺伝子BsmAI 多型またはIL6 遺伝子

BsrBI 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で低い傾向と CYP2C9*3 多型または CYP17 遺伝子 MspAII 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で高い傾向がみられた。

表 1 不育症例における各遺伝子型の頻度

	症 例 人数(割合)	対 照 人数(割合)	オッズ比 (95%信頼区間)
CYP1A1(MspI)	84	71	
m1/m1	40 (48%)	31 (44%)	1.0
m1/m2	35 (42%)	30 (42%)	0.9 (0.5-1.8)
m2/m2	9 (11%)	10 (14%)	0.7 (0.3-1.9)
m1/m2+m2/m2	44 (52%)	40 (56%)	0.9 (0.5-1.6)
CYP1A2(ApaI)	80	73	
A/A	31 (39%)	37 (51%)	1.0
A/C	39 (49%)	26 (36%)	1.8 (0.9-3.6)
C/C	10 (13%)	10 (14%)	1.2 (0.4-3.2)
A/C+C/C	49 (61%)	36 (49%)	1.6 (0.9-3.1)
CYP1A2(DdeI)	77	72	
G/G	51 (66%)	43 (60%)	1.0
G/A	24 (31%)	22 (31%)	0.9 (0.5-1.9)
A/A	2 (3%)	7 (10%)	0.2 (0.1-1.2)
G/A+A/A	26 (34%)	29 (40%)	0.8 (0.4-1.5)
CYP1B1	71	78	
Leu/Leu	56 (79%)	64 (82%)	1.0
Leu/Val	14 (20%)	13 (17%)	1.2 (0.5-2.8)
Val/Val	1 (1%)	1 (1%)	1.1 (0.1-18)
Leu/Val+Val/Val	15 (21%)	14 (18%)	1.2 (0.5-2.8)
CYP2C9 (*3)	86	85	
A/A	80 (93%)	84 (99%)	1.0
A/C	6 (7%)	1 (1%)	6.3 (0.7-54)
C/C	0	0	
CYP2C19 (*2)	62	86	
G/G	31 (50%)	40 (47%)	1.0
G/A	24 (39%)	35 (41%)	0.9 (0.4-1.8)
A/A	7 (11%)	11 (13%)	0.8 (0.3-2.4)
G/A+A/A	31 (50%)	46 (53%)	0.9 (0.5-1.7)

	症 例 人数(割合)	対 照 人数(割合)	オッズ比 (95%信頼区間)
CYP2C19 (*3)	83	82	
G/G	63 (76%)	69 (84%)	1.0
G/A	20 (24%)	13 (16%)	1.7 (0.8-3.7)
A/A	0	0	
CYP17 (MspA1)	86	80	
A1/A1	18 (21%)	25 (31%)	1.0
A1/A2	45 (52%)	39 (49%)	1.6 (0.8-3.4)
A2/A2	23 (27%)	16 (20%)	2.0 (0.8-4.8)
A1/A2+A2/A2	68 (79%)	55 (69%)	1.7 (0.9-3.5)
GSTM1	80	121	
+/+ + +/0	25 (31%)	68 (56%)	1.0
0/0	55 (69%)	53 (44%)	2.8 (1.6-5.1)
GSTT1	80	121	
+/+ + +/0	38 (47%)	57 (47%)	1.0
0/0	42 (53%)	64 (53%)	1.0 (0.6-1.7)
GSTP1	78	86	
Ile/Ile	67 (86%)	65 (76%)	1.0
Ile/Val	9 (12%)	21 (24%)	0.4 (0.2-1.0)
Val/Val	2 (2%)	0	
Ile/Val+Val/Val	11 (14%)	21 (24%)	0.5 (0.2-1.1)
NQO1	81	116	
Pro/Pro	36 (44%)	57 (49%)	1.0
Pro/Ser	34 (42%)	48 (41%)	1.1 (0.6-2.1)
Ser/Ser	11 (14%)	11 (10%)	1.6 (0.6-4.0)
Pro/Ser+Ser/Ser	45 (56%)	59 (51%)	1.2 (0.7-2.1)
IL6 (-634C/G)	81	80	
C/C	62 (77%)	51 (64%)	1.0
C/G	17 (21%)	29 (36%)	0.5 (0.2-1.0)
G/G	2 (2%)	0	
C/G+G/G	19 (23%)	29 (36%)	0.5 (0.3-1.1)
IL6 (-174G/C)	74	81	
G/G	74(100%)	81(100%)	
G/C	0	0	
C/C	0	0	

表 2 不妊症例における各遺伝子型の頻度

	症 例 人数(割合)	対 照 人数(割合)	オッズ比 (95%信頼区間)
GSTM1	101	121	
+/+ + +/0	55 (54%)	68 (56%)	1.0
0/0	46 (46%)	53 (44%)	1.1 (0.6-1.8)
GSTT1	108	121	
+/+ + +/0	45 (42%)	57 (47%)	1.0
0/0	63 (58%)	64 (53%)	1.3 (0.7-2.1)
NQO1	77	116	
Pro/Pro	38 (49%)	57 (49%)	1.0
Pro/Ser	34 (44%)	48 (41%)	1.1 (0.6-1.9)
Ser/Ser	5 (6%)	11 (10%)	0.7 (0.2-2.1)
Pro/Ser+Ser/Ser	39 (51%)	59 (51%)	1.0 (0.6-1.8)

考察

グルタチオン転移酵素は、シトクロム P450 酵素などの第Ⅰ相酵素により活性化された化合物をグルタチオン抱合することにより、親水性の化合物に変え、細胞外に排泄する。この酵素をコードする遺伝子群に属する GSTM1 および GSTT1 遺伝子は、ヒトの肝臓、胃、脳などで発現するのであるが、全く蛋白を生成しない完全欠損型が健常人の場合でも比較的高頻度にみられる。このうち GSTM1 遺伝子完全欠損型を中心に異物代謝酵素遺伝子多型はヒト生殖機能に影響を及ぼし、子宮内膜症、不育症などとの関連が報告されている¹⁻⁸。本研究でも GSTM1 遺伝子完全欠損型は不育症のリスクを高くすることが示唆された。GST 酵素は第Ⅱ相反応酵素として、多環芳香族炭化水素などを解毒する働きを担っている。CYP 酵素とともに Ah レセプターを介し、環境中の多くのがん原物質、ダイオキシン類などの内分泌かく乱物質の代謝に関係している。このような代謝系 (aryl hydrocarbon gene battery) では、第Ⅰ相よりも第Ⅱ相反応酵素の機能欠損により生殖毒性が引き起こされる可能性

が示唆された。統計学的には有意ではないが、第Ⅰ相の酵素である CYP 酵素のうち CYP1A2、CYP2C9、CYP17、第Ⅱ相酵素の GSTP1、免疫反応や血液凝固能にも関係する IL6 遺伝子多型における遺伝子型の分布が不育症例と対照では異なる傾向がみられ、今後、解析を継続し、遺伝子同士の交互作用等も含めて詳細に検討する必要がある。

結論

GSTM1 遺伝子完全欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された (オッズ比 2.8、95 % 信頼区間 1.6-5.1)。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度、GSTP1 遺伝子 BsmAI 多型または IL6 遺伝子 BsrBI 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で低い傾向と CYP2C9*3 多型または CYP17 遺伝子 MspAII 多型で少なくとも 1 本の対立遺伝子に変異型を持つ頻度が不育症例で高い傾向がみられた。Ah レセプターを介する代謝系 (aryl hydrocarbon gene battery) では、第Ⅰ相よりも第Ⅱ相反応酵素の機能欠損により生殖毒性が引き起こされる可能性が示唆された。

研究発表

1) 論文発表

佐田文宏, 山田秀人, 小橋元, 戸崎静香, 貢英彦, 近藤朋子, 平山恵美, 藤本征一郎, 岸玲子. グルタチオン転移酵素遺伝子多型とヒト生殖機能. 日本衛生学雑誌 57(1):313, 2002.

近藤朋子, 佐田文宏, 山田秀人, 貢英彦, 國田智美, 片倉洋子, 平山恵美, 藤本征一郎, 岸玲子. シトクロム P450 遺伝子多型とヒト生殖機能. 日本衛生学雑誌 57(1):312, 2002.

2) 学会発表

Sata F, Yamada H, Wada S, Kobashi G, Tozaki S, Tanabe H, Kato EH, 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 3-5, 2001.

Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong YY, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of recurrent spontaneous abortion. XVI IEA World Congress of Epidemiology, Montreal, August 18-22, 2002.

Sata F, Kondo T, Gong YY, Saijo Y, Sasaki S, Yamagishi H, Tsuge M, Nagase S, Kato EH, Mikuni M, Yamada H, Fujimoto S, Kishi R. Genetic Polymorphisms and human female reproductive toxicity. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo, July 22-26, 2002.

参考文献

1. Arvanitis DA, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. Low-penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 76:1202-6, 2001.
2. Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, Aseev M, Belotserkovskaya R, Baranova H, Malet P, Perriot J, Mouraire P, Baskakov VN, Savitskyi GA, Gorbushin S, Deyneka SI, Michnin E, Barchuck A, Vakharlovsky V, Pavlov G, Shilko VI, Guembitzkaya T, Kovaleva L. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum Genet* 97:516-20, 1996.
3. Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, Albuisson E, Perriot S, Glowaczower E, Bruhat MA, Baranov V, Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod* 3:775-80, 1997.
4. Baranova H, Canis M, Ivaschenko T, Albuisson E, Bothorishvilli R, Baranov V, Malet P, Bruhat MA. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 5:636-41, 1999.
5. Hadfield RM, Manek S, Weeks DE, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. *Mol Hum Reprod* 7:1073-8, 2001.
6. Hirvonen A, Taylor JA, Wilcox A, Berkowitz G, Schachter B, Chaparro C, Bell DA. Xenobiotic metabolism genes and the risk of recurrent spontaneous abortion. *Epidemiology* 7:206-8, 1996.
7. Mendola P, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Schisterman EF, Graham S, Vena JE, Marshall JR, Ambrosone CB. Risk of recurrent spontaneous abortion, cigarette smoking, and genetic polymorphisms in NAT2 and GSTM1. *Epidemiology* 9:666-8, 1998.
8. Zusterzeel PL, Nelen WL, Roelofs HM, Peters WH, Blom HJ, Steegers EA. Polymorphisms in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 6:474-8, 2000.

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

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・先天異常の成因に関する疫学的研究

習慣流産の症例対照研究及び羊水・母体血中のビスフェノール A の推移

分担研究者 藤本征一郎 北海道大学大学院医学研究科婦人科学分野教授
研究協力者 山田秀人，古田伊都子

研究要旨

習慣流産に高 NK 細胞活性などの免疫学的異常が関与していることが明らかとなった。ガンマグロブリン大量療法（MIVIg）は，NK 細胞を抑制することで有効性を発揮するものと考えられる。また，第 2 三半期初期（妊娠 16 週）の羊水・母体血についてビスフェノール A（BPA）を測定した結果，近年，BPA の母体曝露は減少してきていることが判明した。母体血 BPA の羊水への移行は抑制されており，妊娠 16 週では母児間バリアが存在することが推察された。

A. 研究目的

難治性習慣流産では，内分泌かく乱物質などを介した免疫学的異常がその発症に関与することが推察される。これまで原因不明とされた習慣流産例において，新たな手法を用いてその病因を解明し，治療方法を開発することを目的とした。また，近年の BPA の母体・胎児曝露を評価し，染色体異常との関連を調べることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 習慣流産における先天性・後天性血栓形成素因の頻度を ELISA 法および PCR-RFLP 法を用いて明らかにした。
- 2) 習慣流産における NK 細胞の関与を⁵¹Cr 遊離法やフローサイトメトリーを用いて調べ，MIVIg の有効性を評価した。
- 3) 過去 10 年間の妊娠 16 週時の羊水・

母体血 200 組（染色体正常核型）および 48 組（染色体異常核型）について BPA を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

- 1) 習慣流産（289 人）において，Factor V Leiden 変異は観察されなかった。MTHFR-C677T 変異の遺伝子頻度（0.38）はコントロール（0.35）と差異はなかった。ATIII 欠損症や PC 欠損症は認められなかったが，1 例の PS 欠損症が認められた。第 XII 因子欠損症の頻度は 4.2% であった。抗 2-GPI 抗体症候群の頻度は 2.1% であったが，抗 PT/PS 抗体陽性者は観察されなかった。
- 2) 習慣流産（113 人）において，流産回数や原因と NK 細胞・サブセット比率との関連は認められなかった。その後の妊娠が染色体正常胎児の流産に至った群の非妊時 NK 細胞活性（平均 43%）は，