

すなわちA2アレルを持つものの、A1/A1、すなわちA2アレルを持たないものに対するORは1.52 (0.46-5.09)であった。

E. 考察

CYP17 多型とアンドロゲンやエストロゲン・プロゲステロン活性の関連が報告されている。Makridakis, et al (8)によれば、コーカシアン男性において、A1 ホモは少なくとも一つのA2を持つタイプより、アンドロゲン活性が有意に高い。また、Feigelson et al (9)によれば、コーカシアン女性において、少なくとも一つのA2を持つタイプはA1 ホモより、エストロゲン・プロゲステロン活性が高い。男児泌尿生殖器の発生は胎生初期のアンドロゲン依存性であり、停留精巣の発生には胎児精巣機能の低下が推定されていることから、CYP17 多型によって尿道下裂発生のリスクが増す可能性がある。

本研究では児のCYP17 多型は尿道下裂発症に有意な関連を認めなかった。尿道下裂の発生に胎児精巣機能の低下が示唆されているが、少なくとも、児のCYP17 多型は尿道下裂に関与していると本研究からはいえない。重症型や停留精巣・合併奇形のあるものは、テストステロン合成系の以上やtestosterone 5 α -reductase, アンドロゲン受容体遺伝子, 染色体異常などの頻度が高いことが指摘されている。Aaronson らによれば、合併奇形のないpenile typeで近位に尿道が開口するものやscrotal typeの尿道下裂30例のテストステロン合成系の酵素活性を調べ、半数の15例に3 β -hydroxysteroid dehydrogenaseや17,20-lyaseの活性の異常や欠損を認めて

表5 軽症型で停留精巣・他奇形を合併しない尿道下裂患者と対照者のCYP17 遺伝子型

genotype	Cases (n=16)	Controls (n=98)	OR (95%CI)
A1/A1	4 (25.0%)	33 (33.7%)	1.00
A1/A2	7 (43.8%)	44 (44.9%)	1.31 (0.35-4.86)
A2/A2	5 (31.3%)	21 (21.4%)	1.96 (0.47-8.16)
A2/A2 *1	5 (31.3%)	21 (21.4%)	1.67 (0.52-5.33)
A1/A2+A2/A2 *2	12 (75.0%)	65 (66.3%)	1.52 (0.46-5.09)

*1: A1/A1+A1/A2に対するOR *2: A1/A1に対するOR

いる。Albersら(6)は重症尿道下裂33例中12例(36%)に遺伝子異常や染色体異常を認めている。Boehmerら(7)によれば、重症尿道下裂63例を調べたところ、17例(26.5%)に遺伝子異常や染色体異常を認めたという。一方、SilverとRussel(5)は合併奇形や停留精巣を伴わない軽症型の尿道下裂81例を調べ、8.6%に5 α -reductase遺伝子(SRD5A2)の変異を認めている。これらから、重症型や停留精巣・合併奇形を伴うものと、軽症型で停留精巣や合併奇形を伴わないものでは、異なる遺伝要因が推定される。

本研究でも、重症型や停留精巣・合併奇形を伴うものと、軽症型で停留精巣や合併奇形を伴わないものに分けて解析を行った。どの場合も統計学的に有意なものではないが、重症型や停留精巣・合併奇形を伴うものにおいては、A2アレルがあることは尿道下裂のリスクを軽減する傾向が認められた。軽症型で停留精巣や合併奇形を伴わないものでは、A2アレルがあることは尿道下裂のリスクを増加する傾向が認められた。

重症型で高頻度に報告されている遺伝子異常、染色体異常などは、多くは著明なホルモン異常を伴い、CYP17 多型で報告されてい

るような軽度のアンドロゲン活性の低下を本研究で検出するのは期待できない。一方、本研究の軽症型で停留精巣や合併奇形を伴わないものにおいて、A2 アリルがあることは尿道下裂のリスクを増加する傾向が認められたことは、尿道下裂発生の機序に胎児精巣機能の低下が推定されていることから、Makridakis, et al (8) による、A2 で A1 よりアンドロゲン活性が低いとする報告に矛盾しない。今後は、停留精巣や合併奇形を伴わない軽症型の症例数を増やして、更に検討する必要がある。また、5 α -reductase 遺伝子 (SRD5A2) をふくむ、テストステロン合成系に関与する遺伝子、内分泌かくらん作用のある外来性化学物質の代謝に関わる遺伝子についても検討する必要がある。一方 Feigelson (9) は、女性で A2 を少なくとも一つ持つとエストロゲン・プロゲステロン活性が高いことを示した。エストロゲン作用のある化学物質によって、停留精巣・尿道下裂をはじめとする泌尿・生殖器の発生異常を生じることが、様々な動物実験で示されている。母親が A2 を持つ場合にリスクの上昇があるかもしれない、これも今後検討される必要がある。

F. 文献

- (1) Harris EL. Genetic epidemiology of hypospadias. *Epidemiologic Reviews* 1990; 12:29-40.
- (2) Batch JA, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN. Mutations of the androgen receptor gene identified in perineal hypospadias. *J Med Genet* 1993; 30: 198-201.
- (3) Hiort O, Knauber G, Cendron M, Sinnecker GHG, Keim L, Schwinger E, et al. Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hypospadias. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 317-21.
- (4) Nordenskjöld A, Friedman E, Tapper-Persson M, Söderhäll C, Leviav A, Svensson J, Anvret M. Screening for mutations in candidate genes for hypospadias. *Uro Res* 1999; 27: 49-55.
- (5) Silver RI, Russell DW. 5 α -reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol* 1999; 162: 1142-5.
- (6) Albers N, Ulrichs C, Glüer S, Hiort O, Sinnecker GH, Mildenerger H, Brodehl J. Etiologic classification of severe hypospadias: Implications for prognosis and management. *J Pediatr* 1997; 131: 386-92.
- (7) Boehmer ALM, Nijman RJM, Lammers BAS, de Coninck SJF, van Hemel JO, Themmen APN, et al. Etiologic studies of severe familial hypospadias. *J Urol* 2001; 165: 1246-54.
- (8) Makridakis N, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Shi CY, Yu MC, Henderson BE, Reichardt JK. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Res.* 1997; 57: 1020-2.
- (9) Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17 α gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res.* 1998;58(4):585-7.
- (10) Aaronson IA, Cakmak MA, Key LL. Defects of the testosterone biosynthetic pathway in boys with

hypospadias. J Urol 1997; 157: 1884-8.

G. 発表

第 73 回日本衛生学会総会 平成 15 年 3
月 27 日 大分 尿道下裂患者の CYP17
遺伝子多型 笠井世津子、倉橋 典絵、佐
田 文宏、岸 玲子、村雲 雅志、柿崎 秀
宏、野々村 克也、小柳 知彦

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

母親の異物代謝酵素の遺伝子多型と尿道下裂の発生との関連

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）

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）

研究協力者 笠井 世津子、倉橋 典絵

（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）

野々村 克也、柿崎 秀宏、柴田 隆

（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）

研究要旨

母親の代謝酵素の遺伝子多型と、尿道下裂の発生とを明らかにするために、北海道大学医学部附属病院泌尿器科で、尿道下裂の手術を受けた児の母親 14 人を症例群とし、北海道大学医学部附属病院産婦人科で産後健診をうけている、尿道下裂など先天異常をもたない男児を出産したことがある経産婦 29 人を対照群とし、CYP1A1、GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型を解析した。いずれの遺伝子多型の頻度においても、尿道下裂の発生に有意な関連は見られなかった。

今後もサンプル数を増やし、解析を継続し、さらに、母親の環境要因と遺伝子多型との複合的な影響や、児の遺伝子多型との関連を含めて検討する必要がある。

A. 研究目的

近年、欧米で、尿道下裂の発生率の増加が報告されている。日本でも、発生率は増加傾向にある、と報告されている。また、疫学研究では、尿道下裂と母親の農薬曝露との関連などが指摘されており、内分泌攪乱物質との関連が疑われているが、いまだ明らかではない。

男児外性器の形成は、胎生 14 週で完成するので、妊娠初期の内分泌攪乱物質による

胎内曝露が関連している可能性が考えられる。

また、胎内曝露は、母親と胎児、双方の代謝特性が関連している可能性がある。

ダイオキシンなどの多環芳香族炭化水素は、Ah レセプターに結合し、CYP1A1(P4501A1)を誘導することが知られている。シトクロム P450 酵素による代謝の第 1 相反応で反応性の化合物が形成され、グルタチオン転移酵素(GST)によ

る第2相反応で抱合されて解毒される。胎児への毒性は、①母親の、異物代謝酵素の遺伝子多型による酵素の活性の有無により、胎児へ影響を与える可能性。②胎児本人の異物代謝酵素の遺伝子多型による酵素の活性の有無により、影響を与える可能性。③代謝酵素とは独立して、直接胎児へ到達する可能性、が考えられる。

本研究では、母親の代謝酵素の遺伝子多型と、尿道下裂の発生とを明らかにすることを目的として行った。

B. 研究方法

北海道大学医学部附属病院泌尿器科で、尿道下裂の手術を受けた児の母親14人を症例群とし、北海道大学医学部附属病院産婦人科で産後健診をうけている、尿道下裂など先天異常をもたない男児を出産したことがある経産婦29人を対照群とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽出し、シトクロムP450のアイソザイムであるCYP1A1、グルタチオン転移酵素のアイソザイムであるGSTM1、GSTT1の遺伝子多型を解析した。CYP1A1はMsp I多型をPCR-RFLP法により対象者の遺伝子型を判定し、GSTM1、GSTT1はPCR法により、欠損の有無を判定した。

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・中止は自

由意志により、不参加・中止によって不利益を被らないように配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。

C. 研究結果

母親の特性については、母親の出産時年齢・教育歴・喫煙習慣に有意な差はなかった(表1)。児の特性については表2にまとめた。出生時体重が症例群で有意に少なかった。(表2)

症例群及び対照群の母親のCYP1A1、GSTT1、GSTM1遺伝子多型における遺伝子の頻度を表3に示し、野生型を1としたときのオッズ比を求めた。どの遺伝子にも、多型の頻度に有意な差、オッズ比の上昇は認められなかった。

表1：母親の特性

	症例群	対照群	P値
出産時年齢 (才)	32.3± 5.5	30.8± 5.6	
母親の教育歴 (%)			
<9年	0	3.8	
10-12年	44.4	35.0	
13-16年	55.6	30.8	
>17年	0	15.4	
妊娠前の喫煙 (%)	33.3	30.8	
妊娠中の喫煙 (%)	11.1	19.2	

表2：児の特性

	症例群	対照群	P 値
出産時体重 (g)	2198±741	2791±545	<0.05
第1子 (%)	37.5	50	

表3:母親の GSTT1・GSTM1・CYP1A1 遺伝子型の頻度

	症例群 (%)	対照群 (%)	OR (95%CI)
CYP1A1			
Homozygous	7.1	20.7	0.2 (0.02-1.9)
Heterozygous	35.7	48.3	0.4 (0.1-1.6)
Wild type	31.0	57.1	1
GSTT1			
Null	64.3	58.6	1.3 (0.3-4.8)
Present	35.7	41.4	1
GSTM1			
Null	35.7	48.3	0.6 (0.2-2.2)
Present	64.3	51.7	1

D. 考察

Irisらは、母親の環境因子と遺伝子多型と、口蓋裂の発生との関連について、GSTT1 欠損型をもち、妊娠初期に喫煙をしている母親は、野生型をもち、喫煙をしていない母親と比較すると、口蓋裂の発生のリスクが3倍高くなることを報告している。CYP1A1との関連も見られなかった。本研究では、GSTT1、CYP1A1との有意な関連はみられなかった。CYP1A1の遺伝子多型については、日本

人健康男性で、CYP1A1の Msp I 多型と芳香族炭化水素水酸化酵素 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)の誘導性の関連を調べたところ、ホモ接合体遺伝子多型でAHHの誘導性が高い、との報告がある。一方、アジア人、白人、African-Americanでは、CYP1A1の Msp I 多型ではなく、exon7における多型が酵素の活性と関連している、との報告もあり人種によって差があるようである。今後は、サンプル数を増やして解析を継続し、さらに、母親の環境要因と遺伝子多型との関連、児の遺伝子多型との関連、CYP1A1の exon7 における多型との関連を検討する必要がある。

参考文献

- Paulozzi JL International Trends in Rates of Hypospadias and Cryptorchidism ;Environ Health Perspect. 1999(107)4:297-302
- Kristensen P, Irgens LN, Andersen A, Birth defects among offspring of Norwegian Farmers;1967-1991. Epidemiology.1997 Sep;8(5):537-44
- Iris A.L.M.van Rooij, et al. Smoking, Genetic Polymorphism in Biotransformation Enzyme, and Nonsyndromic Oral Clefting: A Gene-Environment Interaction Epidemiology 2001;12:502-507
- Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S. The relationship between aryl

hydrocarbon hydroxylase and
polymorphisms of the CYP1A1 gene.
Jpn J Cancer Res 1996;87:18-24

Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma
GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ.
Functional significance of different
human CYP1A1 genotypes.
Carcinogenesis 1994;300:271-276

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

停留精巣の遺伝要因－異物代謝酵素の遺伝子多型

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

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）

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）

研究協力者 笠井 世津子、倉橋 典絵

（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）

野々村 克也、柿崎 秀宏、柴田 隆

（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）

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（徳島大学医学部泌尿器科）

研究要旨

児の薬物代謝酵素の遺伝子多型と、停留精巣の発生とを明らかにするために、停留精巣の手術を受けた児 12 人を症例群とし、停留精巣を持たない健康男性 32 人を対照群とし、CYP1A1、GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型を解析した。いずれの遺伝子多型の頻度においても、停留精巣の発生に有意な関連は見られなかった。

今後もサンプル数を増やし、解析を継続し、さらに、母親の環境要因と遺伝子多型との関連、児の環境要因との関連を検討する必要がある。

A. 研究目的

近年、欧米で、停留精巣の発生率の増加が報告されており、その原因として、内分泌攪乱物質との関連が疑われているが、いまだ成因は明らかではない。

停留精巣の発症原因として、疫学研究では、妊娠中の母親の農薬曝露、妊娠中の喫煙、など化学物質の胎内曝露との関連が示唆されている。また、Hosie らが、ドイツにお

いて、脂肪中における有機塩素化合物 26 種類の蓄積量を、停留精巣患者とコントロール計測し、比較したところ、停留精巣患者においてヘプタクロルエポキシド Heptachlore-epoxide(HCE) (P=0.009)、ヘキサクロロベンゼン Hexachlorobenzene(HCB) (P=0.012) が高濃度に蓄積されていた、との報告があり、内分泌攪乱物質との関連が示唆されている。

一方、ダイオキシンなどの多環芳香族炭化水素は、Ah レセプターに結合し、CYP1A1(P4501A1)を誘導することが知られている。シトクロム P450 酵素による代謝の第 1 相反応で反応性の化合物が形成され、グルタチオン転移酵素(GST)による第 2 相反応で抱合されて解毒される。

日本人健康男性で、CYP1A1 の Msp I 多型と芳香族炭化水素水酸化酵素 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)の誘導性の関連を調べたところ、ホモ接合体遺伝子多型で AHH の誘導性が高い、との報告がある。

そこで、本研究では、児の内分泌攪乱物質の代謝に関与する遺伝子多型 CYP1A1・GSTT1・GSTM1 と、停留精巣との関連を明らかにするために分子生物学的検討を行った。

B. 研究方法

北海道大学医学部附属病院泌尿器科・社会保険中京病院泌尿器科・徳島大学医学部附属病院泌尿器科で、停留精巣の手術を受けた男児 12 人を症例群とし、尿道下裂・停留精巣など先天異常をもたない健常男性 32 人を対照群とした。対象者の末梢血から通常の方法で DNA を抽出し、シトクロム P450 のアイソザイムである CYP1A1、グルタチオン転移酵素のアイソザイムである GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型を解析した。CYP1A1 は Msp I 多型を PCR-RFLP 法により対象者の遺伝子型を判定し、GSTM1、GSTT1 は PCR 法により、欠損の有無を判定した。

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・中止は自由意志により、不参加・中止によって不利益を被らないように配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。

C. 研究結果

症例群及び対照群の母親の CYP1A1、GSTT1、GSTM1 遺伝子多型における遺伝子の頻度を表 1 に示し、野生型を 1 としたときのオッズ比を求めた。どの遺伝子にも、多型の頻度に有意な差、オッズ比の上昇は認められなかった。

表 1：児の GSTT1・GSTM1・CYP1A1 遺伝子型の頻度

	症例群 (%)	対照群 (%)	OR (95%CI)
CYP1A1			
Homozygous	16.7	16.7	1.3 (0.2-9.5)
Heterozygous	50.0	40.0	1.6 (0.4-7.2)
Wild type	43.3	33.3	1
GSTT1			
Null	50.0	37.5	1.7 (0.4-6.4)
Present	50.0	62.5	1
GSTM1			
Null	41.7	50.0	0.7 (0.2-2.7)
Present	58.3	50.0	1

D. 考察

今回の研究では、児の遺伝子多型の頻度と、停留精巣の発生に有意な関連は見られなかった。CYP1A1 の遺伝子多型について、今回は、ホモ接合体遺伝子多型で AHH の誘導性が高い、との報告がある Msp I 多型を調べたが、アジア人、白人、African-American では、CYP1A1 の Msp I 多型ではなく、exon7 における多型が酵素の活性と関連している、との報告もある。停留精巣の遺伝要因としては、動物実験において、DES により子宮内曝露されたマウス胎仔の精巣における Ins3(Insulin-like factor3)の mRNA 量を測定したところ、停留精巣の発生と共に mRNA 量の減少が見られたという報告があり、内分泌攪乱物質が Ins3 遺伝子をターゲットとして発現を阻害することによって停留精巣を誘導する可能性も疑われていたが、ヒトでは関連が見られなかった、とする報告もある。また、日本人男性における 5α -reductase(type 2) の変異と停留精巣との関連を調べたが、関連が見られなかった、とする報告もある。今後は、サンプル数を増やして解析を継続し、さらに、母親の環境要因と遺伝子多型との関連による胎内曝露の可能性、児の環境要因との関連、CYP1A1 の exon7 における多型や、Ins3 遺伝子、 5α -reductase 変異などとの関連についても検討する必要がある。

参考文献

- Paulozzi.JL International Trends in Rates of Hypospadias and Cryptorchidism ;Environ Health Perspect. 1999(107)4:297-302
- Hosie.S,Loff.S Is There a Correlation Between Organochlorine Compounds and Undescended Testes? ;Eur J Pediatr Surg 2000(10)304-309
- Weidner.IS , Moller.H, Cryptorchidism and Hypospadias in Sons of Gardeners and Farmers;Environl Health Perspect. 1998(12)106:793-796
- Kristensen P, Irgens LN, Andersen A, Birth defects among offspring of Norwegian Farmers:1967-1991. Epidemiology.1997 Sep;8(5):537-44
- Mary LB, Atar B. Cathy WC. Maternal, Delivery, and Perinatal Characteristics Associated with Cryptorchidism: A population-Based Case-Control Study among Births in Washington State Epidemiology 2002;13:197-204
- Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. Jpn J Cancer Res 1996;87:18-24
- Emmen.JMA,Mclisky.A,Adham.IM,Engel .W,Verhoef-post.M,Themmen.APN,Groot egoed.JA,Brinkmann.AO,Involvement of Insulin-Like Factor(InsI3) in Diethylstilbestrol-Induced

Cryptorchidism;Endocrinology2000(141)2
:846-849

Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma

GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ.
Functional significance of different
human CYP1A1 genotypes.

Carcinogenesis 1994;300:271-276

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

当科で経験した胎児の形態異常と超音波検査について

分担研究者 工藤隆一
札幌医科大学産婦人科

研究協力者 林 卓宏、藤松正明、山崎清大、遠藤俊明
札幌医科大学産科・周産期科

近年超音波診断技術の進歩により、大奇形に関しては通常の妊婦検診の際にも発見が容易となったと言われている。そこで今回札幌医大産科・周産期科を受診ないし紹介された妊婦に対してなされた胎児奇形の診断に対する超音波検査の結果を検討した。

今回はまず、リスクのない妊婦に関して、希望者に対して妊娠中期に超音波スクリーニングにより胎児の先天異常を妊婦健診時に検出できるかどうかを検討した。

超音波スクリーニングの対象妊婦の平均年齢は 31.8 ± 4.9 (mean \pm SD) 歳 (20-42 歳) であった。超音波スクリーニングにおける各部計測値の正常症例は 146 例で、これら正常群は出生後の小児科診察においても異常を認めなかった。また、1 回目の検査で測定値異常を疑われた 14 症例の全てが、2 回目の検査で異常を認めず、出生後の小児科的診察でも異常を認めなかった。

出生後の小児科診察で異常を認めた 2 例はいずれも超音波スクリーニングでは指摘不可能な色素失調症、喉頭軟化症などの機能的先天性疾患であった。

次に、紹介症例では 2001 年の場合、母体年齢 30.9 ± 5.0 歳 (26-44 歳) で異常内容は多彩で 18 トリソミーが 5 例で最も多く、小腸閉鎖 2 例、水頭症 2 例、髄膜瘤 2 例、その他小脳低形成、水腎症、胎児水腫、卵巣腫瘍、横隔膜ヘルニア、13 トリソミーなどであった。2002 年は母体年齢は 27.5 ± 3.8 歳 (25-33 歳) で、胎児水腫 3 例、食道閉鎖 2 例、胎便性腹膜炎 2 例、18 トリソミー 2 例、その他ポッター症候群、胎児腹水、腎嚢胞などであった。

(目的)

近年超音波診断技術の進歩により、大奇形に関しては通常の妊婦検診の際にも発見が容易となったと言われている。そこで今回札幌医大産科・周産期科を受診ないし紹介された妊婦に対してなされた胎児奇形の診断に対する超音波検査の結果を検討した。

今回はまず、リスクのない妊婦に関して、希望者に対して妊娠中期に超音波スクリーニングにより胎児の先天異常を妊婦健診時に検出できるかどうかを検討した。

また市中病院からの胎児奇形の確定診断のため紹介となった症例で当科で分娩した例に関してその胎児奇形内容に関してまとめ、若干の考察を加えた。さらに環境ホルモンが起因したと考えられる胎児奇形を早期に診断可能かも検討した。

(方法)

1988 年 3 月から当科において妊婦検診を行った単胎症例のうち、妊娠 17 週から 22 週の時期に超音波スクリーニングを希望した妊婦 186 例、そのうち 146 例が分娩後当院小児科医により診察を受けており、これらの症例が対象となった。超音波スクリーニングで異常が推測された場合、必ず再度超音波検査を行い異常の有無を再確認することにした。超音波再検で異常を認めなかった場合は、超音波スクリーニング正常群に含めることにした。測定項目は、BPD (児頭大横径)、APTD (胎児腹部前後径)、TTD (胎児腹部横径)、HL (上腕骨長)、FL (大腿骨骨長)、羊水ポケット、後頭蓋窩、後頸部、側脳室 atrium を計測した。また、胎児心および外性器を中心とし

た詳細な観察も同時に施行した。このスクリーニング検査には通常1人約30分を要した。

また、2001年と2002年に市中病院で胎児奇形を疑い当科に紹介となりそのまま当科での分娩したそれぞれ15、12症例の確定した異常内容を検討した。なお、超音波精査後に紹介もとの病院にもどった症例は除外した。

(結果)

超音波スクリーニングの対象妊婦の平均年齢は 31.8 ± 4.9 (mean \pm SD) 歳 (20-42歳) であった。超音波スクリーニングにおける各部計測値の正常症例は146例で、これら正常群は出生後の小児科診察においても異常を認めなかった。また、1回目の検査で測定値異常を疑われた14症例の全てが、2回目の検査で異常を認めず、出生後の小児科的診察でも異常を認めなかった。

出生後の小児科診察で異常を認めた2例はいずれも超音波スクリーニングでは指摘不可能な色素失調症、喉頭軟化症などの機能的先天性疾患であった。胎児心および外性器の詳細な超音波観察では、すべての症例で異常を認めず、出生後小児科診察においても尿道下裂に代表される環境ホルモンに起因すると考えられる外性器異常は認めなかった。

次に、紹介症例では2001年の場合、母体年齢 30.9 ± 5.0 歳 (26-44歳) で異常内容は多彩で18トリソミーが5例で最も多く、小腸閉鎖2例、水頭症2例、髄膜瘤2例、その他小脳低形成、水腎症、胎児水腫、卵巣腫瘍、横隔膜ヘルニア、13トリソミーなどであった。2002年は母体年齢は 27.5 ± 3.8 歳 (25-33歳) で、胎児水腫3例、食道閉鎖2例、胎便性腹膜炎2例、18トリソミー2例、その他ポッター症候群、胎児腹水、腎嚢胞などであった。

(考察)

本邦における先天異常に関する信頼できる調査として、日本産婦人科医会の外表奇形等統計調査がある。この調査は、1972年から全国規模で開始されている。この調査でもっとも新しい報告は2000年度の報告であるが、これによると全国199施設において調査がなされた。それによると、分娩総数89215人で出生児総数は

91354人であった。そのうち奇形児総数は1294人で奇形児出産頻度は1.42%であった。

なお、北海道ブロックの調査では届出施設は4箇所分娩総数1942件で出産時総数は1959人であった。奇形児総数は18人で奇形児出産頻度が0.71%で全国平均の半数である。この原因は不明であるが、登録施設の数が少なく分娩数も少ないことから、症例に偏りがあるのかもしれない(1)。

当科では奇形の診断後紹介先に症例を戻す場合が多く、当科で分娩し異常内容が確定した症例がむしろ少ない。したがって当科の症例で奇形の発生率を論じることが出来ない。

これは当然のことながら当科は大学病院であり紹介患者が多いことに起因しており、札幌地区の実際の奇形発生率を反映していない。事実リスクのない超音波スクリーニングでは外表奇形を1例も発見できなかった。勿論これは母数が146名と少数であることから全国平均からしてもせいぜい1-2名見つかるかどうかというところである。この研究に関しては、当初その有用性を期待したが、一人の超音波検査に約30分を要すること、また大奇形は通常の妊婦健診時の超音波検査で発見可能であることから、現在は実施しておらず、妊婦健診時の超音波検査で対応している。しかし、このスクリーニング検査を正しく評価するには、諸家の報告では圧倒的に多数の症例での検索によって評価しており(2)、我々の限られた症例での評価は困難である。

市中病院からの紹介症例では、頭部異常・消化器異常など比較的超音波診断が容易な症例がほとんどであった。何れも環境ホルモンとの関連性が報告されていない異常であった。環境ホルモンのうち母体が食物中に含まれるエストロゲン様物質を摂取することが原因として考えられている代表的先天性疾患に尿道下裂が報告されている。当科では過去1000例の分娩の中で、市中病院からの搬送症例で妊娠38週で900gという極端な子宮内胎児発育不全症例1例に尿道下裂を経験しているが、これは例外的な症例で環境ホルモンとの関連性は薄いと考えられる。

また食事・喫煙などの環境要因との関連が指摘されているものに神経管欠損、口唇・口蓋裂があるが、今回紹介症例には髄膜瘤症例の分娩があったが、症例数が少なく環境要因との関連性の判断は不可能である。

しかし、今後症例を増やし、超音波検査で胎児奇形が発見された場合、その妊婦の生活環境あるいは生活習慣を詳細に調べることによりある種の胎児奇形と環境要因の関連性を明らかに出来ることも期待され今後も超音波検査を重要視しなければならないと考えられた。

文献

- 1) 平成12年度 外表奇形等統計調査結果 平成13年11月 日本産婦人科医会編
- 2) ACOG practice patterns. Routine ultrasound in low-risk pregnancy. Number 5, August 1997. American College of Obstetrics and Gynecologists. Int J Gynaecol Obstet 1997 59:273-8.

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書（平成 14 年度）

婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）患者における
ダイオキシン類の汚染状況に関する検討

分担研究者 石川睦男 旭川医科大学産婦人科教授
研究協力者 田熊直之 旭川医科大学産婦人科助手
研究協力者 山下 剛 旭川医科大学産婦人科講師

研究要旨

ダイオキシン等の内分泌攪乱物質と子宮内膜症の関連に関して、我々は平成 11-13 年度厚生科学研究（生活安全総合研究事業）において検討してきた。その事業の一つである簡便なダイオキシン類の測定に関して CALUX 法（株式会社日吉）が有用かつ安価であることを報告した。今回我々は CALUX 法を用い、婦人科疾患患者におけるダイオキシン類を実際に測定し、その汚染状況と婦人科疾患の関連について検討する。

A. 研究目的

各種卵巣腫瘍の発症にダイオキシン類が関与するか否かを実際に生体（皮下脂肪）に蓄積されているダイオキシン類濃度を測定し検討する。

ダイオキシン類濃度に有意な差は認められなかった。

B. 研究方法

子宮内膜症性嚢胞を含む卵巣腫瘍患者において、当科で核出手術、あるいは摘出手術を施行した患者から文書で同意を得、術中に創部（下腹部）の皮下脂肪約 1 グラムの供与を受け、CALUX 法にてダイオキシン類濃度を測定した。全てのサンプルは匿名化（ナンバー化）され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

D. 考察

今回測定した良性婦人科疾患におけるダイオキシン類濃度の平均値は CALUX 法及び、HRGCMS 法にて男女無作為に測定した株式会社日吉の資料と比較して、現在のところ特に有意差は認められていない。また各種卵巣腫瘍毎の比較は症例数を増やした上での今後の課題である。さらに今後は良性卵巣腫瘍のみならず、卵巣癌などの悪性腫瘍患者においても測定値の検討を加える予定である。

C. 研究結果

現在（平成 14 年度末）までに 21 症例を測定しそのダイオキシン類濃度の平均値は 24.92 (pgTEQ/gfat)であった。また、現段階で子宮内膜症患者とその他の良性卵巣腫瘍患者の間で、

E. 結論

生体に蓄積されているダイオキシン類汚染状況からみた現在までの検討において、婦人科疾患（良性卵巣腫瘍）にダイオキシン類が関与している可能性は見いだされなかった。

F. 健康危険情報
特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第47回日本不妊学会

岐阜 (10/2-4/02)
シンポジウム
内分泌攪乱物質と生殖生理
アрил炭化水素レセプター系

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

不育症発症機構に関わる免疫学的異常の解明

分担研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科 教授
(生殖・発達医学講座周産期医学分野)

研究要旨

正常の生殖機構および免疫学的生殖不全、特に習慣流産における、NK 細胞、NKT 細胞、Th1/Th2 サイトカインバランス、MIF の役割を解明することを目的とした。また、習慣流産マウスモデルを作成し、AIF-1 発現や γ グロブリンの有効性を調べることを目的とした。習慣流産 15 人と正常女性 15 人における黄体期中期の末梢血 NKT 細胞数、CD4+ (CD8+) 細胞における細胞内 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 発現をフローサイトメーター法 (FCM) で調べた。結果、NKT 細胞比率には差異を認めなかったが、習慣流産女性では、Th2/Tc2 リンパ球優位であった。 γ グロブリン大量療法 (MIVIg) の薬理作用機構を調べるために、MIVIg 前後の末梢血 Th1/Th2 サイトカイン濃度を高感度 ELISA 法で、末梢血 Th1/Th2 細胞比率を FCM で測定し比較検討した。結果、MIVIg 後に末梢血 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 濃度は上昇し、Th1/Th2 細胞比率が低下した。習慣流産 78 人の妊娠初期において、MIF 末梢血濃度を ELISA 法で測定し、その後の妊娠帰結と MIF 濃度との関連を調べた。結果、染色体正常流産に至った群では、正常分娩群や染色体異常流産群に比較して、MIF 濃度が有意に低値であった。マウス自然流産モデルである CBA/J x DBA/2 の系を用いて、非妊娠時ならびに妊娠時マウス子宮における AIF-1 の発現をノーザンブロット法、RT-PCR 法および免疫組織化学染色によって解析した。poly (I:C) によって流産を高率に惹起させてその発現を調べた。また、 γ グロブリン療法の有効性を調べる目的で、CBA/J x DBA/2 の系で poly (I:C) 200 μ g を妊娠 day 7 に腹腔内投与後、day 7-9 に γ グロブリン 0.8 g/kg/day 腹腔内投与を行い、流産率の変化を調べた。その結果、子宮における AIF-1 mRNA 発現は estrus で最も発現が強く、その後減少し、着床期に発現が上昇した。正常妊娠の day 5 以降は AIF-1 発現が認められなかったが、poly (I:C) 負荷したマウス子宮では、AIF-1、TNF- α 、NOS2 発現が上昇した。CBA/J x DBA/2 の系では PBS 投与で胎仔吸収率は 21% であり、poly (I:C) 投与によって、胎仔吸収率は 55% に上昇した。しかし、 γ グロブリン投与によって、胎仔吸収率は 8.5% にまで減少した。習慣流産発症機構に、Th1/Th2 バランス、MIF、AIF-1、NK 細胞など種々の免疫学的異常が関与していることが本研究によって明らかとなった。 γ グロブリンは、これら免疫学的異常を矯正することによって治療効果をもたらす可能性がある。

(研究協力者)

山田 秀人 北海道大学大学院医学研究科

A. 研究目的

生殖医学領域において、遺伝的要因と後天的環境要因が交絡して発症する生活習慣病が存在する。特に不育症（習慣流産）は、その発症機構に遺伝的因子、環境因子が関与し、さらに何らかの免疫学的異常が強く関与することが強く示唆されている。また近年、各種サイトカインや NK・NKT 細胞などの異常が習慣流産など免疫学的生殖不全に関与していることが明らかになりつつある。これらの免疫学的異常を惹起する環境因子として、内分泌攪乱物質が注目されている。

本研究の目的は、正常の生殖機構および免疫学的生殖不全、特に習慣流産における、NK 細胞、NKT 細胞、Th1/Th2 サイトカインバランス、

macrophage migration inhibition factor (MIF) の役割を解明することを目的とした。また、習慣流産マウスモデルを作成し、正常の生殖機構および習慣流産における、NK 細胞、NKT 細胞、Th1/Th2 サイトカインバランス、allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) の役割を解明することを目的とした。合わせてこのマウスモデルを用いて、各種治療法（ガンマグロブリン、リンパ球免疫、副腎皮質ステロイドなど）の習慣流産に対する有効性および免疫学的修飾機構について解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 習慣流産 15 人と正常女性 15 人における非妊娠時黄体期中期の末梢血中 CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT 細胞数、CD4+ (CD8+) 細胞における細胞内 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 発現をフローサイトメーター法 (FCM) で調べ比較した。

2) 難治性習慣流産に有効である γ グロブリン大量療法 (MIVIg) の薬理作用機構を調べるために、9人のMIVIg前後の末梢血Th1/Th2サイトカイン濃度を高感度ELISA法で測定し、4人のMIVIg前後の末梢血Th1/Th2細胞比率の変化をFCMで測定し比較検討した。

3) 習慣流産78人の妊娠初期(4-6週)において、炎症性サイトカインであり細胞増殖分化に関与するMIF末梢血濃度をELISA法で測定し、その後の妊娠帰結とMIF濃度との関連を調べた。

4) マウス自然流産モデルであるCBA/J x DBA/2の系を用いて、非妊娠時ならびに妊娠時マウス子宮におけるAIF-1の発現をノーザンブロット法、RT-PCR法および免疫組織化学染色によって解析した。また、poly (I:C) (NK細胞活性化剤)によって流産を高率に惹起させてその発現を調べた。

5) 習慣流産マウスモデルにおける γ グロブリン療法の有効性を調べる目的で、CBA/J x DBA/2の系でpoly (I:C) 200 μ gを妊娠day 7に腹腔内投与後、day 7-9に γ グロブリン0.8g/kg/day腹腔内投与を行い、流産率の変化を調べた。

(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にな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配慮する。

C. 結果

1) 末梢血中NKT細胞比率には差異を認めなかったが、習慣流産女性では、CD4+IL-4+細胞やCD8+IL-4+細胞比率が正常女性に比較して有意

に高値であった。また、習慣流産女性でCD4+IFN- γ +IL-4-/CD4+IL-4+IFN- γ - (Th1/Th2)細胞比率、CD8+IFN- γ +IL-4-/CD8+IL-4+IFN- γ - (Tc1/Tc2)細胞比率が有意に低値を示した。このことから、習慣流産女性では、非妊娠時にTh2/Tc2リンパ球優位であることが初めて明らかとなった (Shimada et al., Am J Reprod Immunol, 2003a)。

2) MIVIg後には、有意に末梢血IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10濃度は上昇し、Th1/Th2細胞比率が低下することが判明した (Yamada et al., Am J Reprod Immunol, 2003)。

3) 採血(妊娠4-6週)後に染色体正常流産に至った群では、正常分娩群や染色体異常流産群に比較して、MIF濃度が有意に低値であることが初めて明らかとなった (Yamada et al., Hum Reprod, 2003)。

4) 子宮におけるAIF-1 mRNA発現はestrusで最も発現が強く、その後減少し、着床期に発現が上昇した。正常妊娠のday 5以降はAIF-1発現が認められなかったが、poly (I:C)負荷したマウス子宮では、AIF-1、TNF- α 、NOS2発現が上昇した (Shimada et al., Am J Reprod Immunol, 2003b)。

5) CBA/J x DBA/2の系ではPBS投与で胎仔吸収率は21%であり、poly (I:C)投与によって、胎仔吸収率は55%に上昇した。しかし、 γ グロブリン投与によって、胎仔吸収率は8.5%にまで減少した。

D. 考案

現在、習慣流産の発症機構に種々の免疫学的異常が関与していることが明らかとなりつつある。非妊娠時に比べて、妊娠中にTh2優位になることが、通常の妊娠維持に重要であると仮説されてきた。このことから、習慣流産女性では

Th1 優位の病態が存在すると推察されてきた。しかしながら、今回の研究によって、習慣流産女性では非妊娠時にはTh2, Tc2 優位であることが末梢血レベルで初めて明らかとなり、これまでの仮説に反する結果となった。妊娠時のTh1-overimmunity に対する準備状態である可能性もあり、今後子宮内膜、脱落膜でのTh1/Th2 バランスをさらに検討する必要があると考えられる。

MIVIg は難治性習慣流産に有効であることをこれまで我々は報告してきた。今回の解析からその薬理作用機構として、macrophage などの賦活化(Th1/Th2 サイトカインの上昇)や、Th1/Th2 バランスの修飾などが考えられる。今後、動物実験等によって解析する必要がある。

妊娠に関連したMIFについての報告はこれまで無かった。染色体正常流産に至った女性では妊娠初期末梢血中MIF 濃度は低値を示した。MIF 濃度は、染色体異常流産に至った女性では正常分娩群と差がなかったことから、MIF 濃度低値は流産の結果ではなく、原因と関連すると考えられる。MIF は生理的に何らかの妊娠維持作用をもつと推察される。

ヒト検体を用いた生殖医学研究には倫理的に限界があるため、動物実験による解析は有用である。poly (I:C)によって高率に流産を惹起させるCBA/J x DBA/2 の系は、習慣流産マウスモデルとして有望である。今回の研究から、γグロブリンはこのマウスモデルにおいても有効であることが初めて証明された。今後 adoptive transfer 実験による有効性の解析が必要である。AIF-1 は習慣流産マウスモデルにおいて、TNF-α, NOS2 と協調して、胎仔吸収に関与していることが初めて明らかとなった。

E. 結論

以上のように習慣流産発症機構に、Th1/Th2 バランス、MIF、AIF-1、NK 細胞など多くの免疫学的異常が関与していることが本研究によって明らかとなった。γグロブリンは、これら免疫

学的異常を矯正することによって治療効果をもたらす可能性がある。今後は、習慣流産発症に関わる環境因子として内分泌攪乱物質と免疫学的異常との関連を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S: Bisphenol A concentrations at early second trimester in maternal serum and amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 735-9.

Sata F, Yamada H, Kondo T, Yingyan G, Tozaki S, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R: Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 165-9.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in spontaneous abortions with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 616-20.

Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H (2003): Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies* (in press)

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH,

Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H (2003): Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. Am J Reprod Immunol (in press)

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H (2003): Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol (in press)

Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H (2003a): No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. Am J Reprod Immunol (in press)

Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K (2003b): Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. Am J Reprod Immunol (in press)

森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 小林範子, 渡利道子, 片岡宙門, 長 和俊, 奥山和彦, 水上尚典, 藤本征一郎: 胎児消化管閉塞 29 例の臨床的特徴, 周産期医学, 32(6), 825-830, 2002

山田秀人, 藤本征一郎: 性分化異常総論 A. 早期診断と取り扱い, 121 頁-130 頁 (武谷雄二ら編: 新女性医学大系 第 17 巻 性の分化とその異常, 中山書店, 東京) 2002

2. 学会発表

山田秀人: クリニカル Update—不育症をどう扱う—: ガンマグロブリン大量療法と NK 細胞, 第 54 回日本産科婦人科学会, 生涯研修プログラム (東京, 4 月 6-9 日) 2002 年

山田秀人: 不育症—その病態解明と治療へのアプローチ—, 第 50 回北日本連合地方部会, 特別講演 (富山, 9 月 20-21 日) 2002 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし