

59: 2825-2828, 1999.

5. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17a gene (*CYP17*) polymorphism is associated with serum oestrogen and progesterone concentration. *Cancer Res* 58: 585–587, 1998.

表2 最近報告された主な産科異常、先天異常と遺伝子多型との関連

Anomaly	Gene	Mutation/polymorphism	Finding	First author
Low birthweight	IGF-1	Allele 191, 198	215g lower interaction interaction	Arends N (2002)
	CYP1A1 GSTT1	Promoter polymorphism MspI (maternal smoking) null (maternal smoking)		Vaessen N (2002) Wang X (2002) Wang X (2002)
Hypospadias	AR	CAG repeats	negative isolated	Muroya K (2001)
	SRD5A2	A49T, L113V, H231R		Silver RI (1999)
Cryptorchidism	SRD5A2		negative	Suzuki Y (2002)
NTDs	MTHFR	C677T, A1298C	OR 6.1	De Marco P (2001)
		C677T (mother, child)		Al-Gazali LI (2001)
		C677T (mother)		Martinez de VLE (2001)
		677CT/1298AC		Richter B (2001)
	MTRR	C677T	negative	Johanning GL (2000)
		C677T (parent)		Davalos IP (2000)
		C677T (mother)		Lucock M (2000)
		677CT/1298CC, 677TT/1298CC		Isotalo PA (2000)
	RFC-1	C677T	OR 5.8	Mutchinick OM (1999)
		C677T		Johnson WG (1999)
CBS	C677T (combined MTRR variant)	OR 2.9, 4.1	Wilson A (2000)	
	A1298C		Trembath D (1999)	
MS	A66G (low cobalamin)	OR 2.5, 4.8	Wilson A (2000)	
	A80G		De Marco P (2001)	
PDGFRA	844ins68	interaction interaction	Richter B (2001)	
	844ins68		Speer MC (1999)	
NAP1L2	A2756G		GL (2000)	
	A2756G (mother)		Lucock M (2000)	
EPHX1	SNPs in the CpG island		Rogner UC (2002)	
	promoter haplotypes		Joosten PH (2001)	
Cleft lip and palate	MTHFR	maternal genotype	negative	Blanton SH (2002)
		C677T		Prescott NJ (2002)
	GSTM1 GSTT1 CYP1A1	C677T	OR 3.2	Gaspar DA (1999)
		null (maternal smoking)	negative	Mills JL (1999)
		null (maternal smoking)	OR 3.2	Hartsfield JK (2001)
EPHX1	Ile/Val (maternal smoking)	negative	van Rooij IA (2001)	
	Tyr113His (maternal smoking)	negative	van Rooij IA (2001) Hartsfield JK (2001)	
Down syndrome	MTHFR	C677T (mother)	p=0.74	O'Leary VB (2002)
		C677T (mother, child)		Al-Gazali LI (2001)
		C677T (mother)		Hobbs CA (2000)
		C677T (mother)		James SJ (1999)
	MTRR	A66G (mother)	p=0.0028	O'Leary VB (2002)
A66G (mother)		OR 2.6	Hobbs CA (2000)	

カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク

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
分担研究者 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 助教授
水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野 教授

研究要旨

カフェイン摂取・CYP1A2 遺伝子多型と不育症との関連を明らかにすることを目的に本研究を行った。北大附属病院産科を受診した不育症患者 81 人、健常経産婦 226 人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々 53 人（回答率 65.4%）、144 人（回答率 63.7%）から回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球より DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により、CYP1A2 遺伝子型を判定した。不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。CYP1A2 遺伝子の CYP1A2 遺伝子の *CYP1A2*1F*(C731A)多型の AA 型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1 日当たりの平均カフェイン摂取量が 300mg 以上で、オッズ比 5.22（95%信頼区間 1.02–26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。これまでのカフェイン摂取と不育症に関する報告を支持するとともに遺伝要因と環境要因の交互作用と CYP1A2 酵素の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

【研究協力者】

山田 秀人
（北海道大学大学院医学研究科生殖・
発達医学講座産科・生殖医学分野助教授）
西條 泰明、鈴木 佳奈
（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）
平山 恵美
（北海道大学医学部附属病院周産母子センター）

A. 研究目的

これまでに行われた疫学研究の結果から、カフェインの摂取と不育症発症との有意な関連が示唆されている^{1,4}。CYP1A2 遺伝子にはいくつかの遺伝子多型が知られており、その中には機能に影響を及ぼすものも含まれている^{5,6}。5' -上流プロモーター領域にある *CYP1A2*1C* (G-2964A) は誘導性の低下と関連し⁵、イントロン 1 にある *CYP1A2*1F* (C731A) は誘導性の増大と関係すると考えられている⁶。CYP1A2 はカフェインの代謝に関与する酵素の一種であり、CYP1A2 活

性と不育症リスクとの関連を示した報告もある⁷。本研究では、カフェイン摂取・CYP1A2 遺伝子多型と不育症との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

北大附属病院産科を受診した不育症患者 81 人、健常経産婦 226 人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々 53 人（回答率 65.4%）、144 人（回答率 63.7%）から回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球より DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により、CYP1A2 遺伝子型を判定した。ロジスティック回帰分析により、オッズ比と 95%信頼区間を求めた。統計解析には SPSS ウィンドウズ版を用いた。

（倫理面への配慮）

疫学調査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」、「疫学研究に関する倫理指針」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。

C. 研究結果

不育症例では、対照に比べ、カフェインを多く摂取する傾向がみられ、1日当たりカフェインを300mg以上摂取する場合、不育症に対するオッズ比は2.61と上昇するが、有意ではなかった（表1）。CYP1A2 遺伝子の *CYP1A2*1C* 多型の AA 型（活性低下型）は不育症例にはみられず、他の遺伝子型には、有意なリスクの変化はみられなかった（表2）。CYP1A2 遺伝子の *CYP1A2*1F* 多型の AA 型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間 1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた（表3）。

表1 不育症例と対照における1日当たりの平均カフェイン摂取量

カフェイン摂取量(mg/day)	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
0-99	35.8	47.2	1.00
100-299	47.2	43.8	1.40(0.69-2.84)
≥300	17.0	9.0	2.61(0.94-7.25)
			P for trend 0.07

*年齢調整ロジスティック回帰分析

表2 不育症例と対照におけるCYP1A2 遺伝子型

CYP1A2 遺伝子型	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
<i>CYP1A2*1C</i>			
GG	53.1	64.7	1.00
GA	46.9	31.7	1.88(0.95-3.71)
AA	0	3.6	—
<i>CYP1A2*1F</i>			
CC	7.8	8.3	1.00
CA	51.0	43.1	1.21(0.35-4.14)
AA	41.2	48.6	0.99(0.28-3.43)

*年齢調整ロジスティック回帰分析

表3 *CYP1A2*1F* 多型の1日当たりの平均カフェイン摂取量

<i>CYP1A2*1F</i> 多型のカフェイン摂取量(mg/day)	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
CC/CA (低活性)			
0-99	43.3	44.6	1.00
100-299	40.0	45.9	0.87(0.34-2.23)
≥300	16.7	9.5	1.68(0.44-6.43)
AA (高活性)			
0-99	25.0	50.0	1.00
100-299	55.0	41.4	2.63(0.81-8.52)
≥300	10.0	8.6	5.22(1.02-26.7)
			P for trend 0.03

*年齢調整ロジスティック回帰分析

D. 考察

これまでの疫学研究から、カフェイン摂取量が多い程、カフェイン代謝酵素CYP1A2の活性が高いほど、不育症のリスクが高くなることが報告されていたが、本研究では、酵素活性が高いと考えられている遺伝子型 (*CYP1A2*1F* 多型 AA 型) で、カフェイン摂取量が多くなると不育症のリスクが高くなることを示した。これらの結果はこれまでの報告を支持するとともに遺伝要因と環境要因の交互作用とCYP1A2の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

E. 結論

不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。*CYP1A2* 遺伝子の *CYP1A2* 遺伝子の *CYP1A2*1F*(C731A)多型の AA 型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間 1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。これらにより遺伝要因と環境要因の交互作用とCYP1A2 酵素の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Tamaki J, Minakami H, Kishi R. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 9(11):725-728, 2003.
2. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H. A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 10(1):49-53, 2004.
3. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kishi R. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss in Japanese women. *Fertil Steril* 81(2):374-378, 2004.
4. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kataoka S, Shimada S, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Interleukin-4 gene polymorphism is not involved in the risk of recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 52(2):143-146, 2004.
5. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato EH, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*, in press

2. 学会発表

1. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH,

Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Minakami H, and Kishi R: A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. 15th Conference of the International Society for Environmental Epidemiology, Perth (2003.9.23-26)

2. 山田秀人, 佐田文宏, 西條泰明, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 岸 玲子, 水上尚典: 「習慣流産と遺伝子多型: GSTM1, IL-6, CYP17」、第 18 回日本生殖免疫学会、山口 (2003.11.28)
3. 佐田文宏, 鈴木佳奈, 近藤朋子, 西條泰明, 平山恵美, 山田秀人, 水上尚典, 岸玲子: 「カフェイン摂取, CYP1A2 遺伝子多型と不育症リスク」、第 74 回日本衛生学会総会、東京 (2004.3.24-27)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G, Clausson B, Ekbohm A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 2000;343(25):1839-45.
2. Dlugosz L, Belanger K, Hellenbrand K, Holford TR, Leaderer B, Bracken MB. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion: a prospective cohort study. *Epidemiology*. 1996;7(3):250-5.
3. Infante-Rivard C, Fernandez A, Gauthier R, David M, Rivard GE. Fetal loss associated with caffeine intake before and during pregnancy. *JAMA*. 1993;270(24):2940-3.

4. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health*. 1992;82(1):85-7.
5. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)*. 1999;125(4):803-8.
6. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(4):445-9.
7. Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekblom A, Rane A, Cnattingius S. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. *Obstet Gynecol*. 2001;98(6):1059-66.

不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる 遺伝学的因子の解明

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の役割を解明することを目的とした。また，子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に各種遺伝子多型を解析した。

子宮内膜中NK 細胞数，NKT 細胞比率には差異を認めなかったが，習慣流産女性（n=20）では，コントロール（n=17）に比較して子宮内膜中 CD3+ 細胞，CD4+IFN- γ +細胞，CD4+TNF- α +細胞比率が有意に低値であった。Th1/Th2 バランスは両群間で差異を認めなかった。

染色体正常流産ないし化学妊娠に至った 17 人の非妊娠時 NK 細胞活性/細胞比率は，生産に至った 59 人に比較し有意に高く，染色体異常流産に至った 9 人と同レベルであった。非妊娠時の高 NK 細胞活性（>46%）/高細胞比率（>16.4%）は，その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子（相対危険率 3.6/4.9）であることを明らかにした。

習慣流産患者の NK 細胞における CD158a 発現は，コントロールに比較して有意に低値を示した。perforin，CD94，CD161，CD158b，CD244 発現は両群間で差異はなかった。NK 細胞で抑制型レセプターである KIR2DL1（CD158a）の発現低下が認められ，習慣流産の病因に関連していると考えられる。

CYP17 A1 allele ホモ型（n=44）の IUGR 頻度は，A2 allele キャリア（n=90）の頻度に比較して有意に高かった（OR =3.41）。また，GSTM1 null 型（n=67）の分娩週数は，GSTM1 presence（n=67）に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連することを解明した。

【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 Th1/Th2 細胞，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す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。

また，子宮内胎児発育遅延では，その成因に遺伝学的因子および内分泌攪乱物質を含めた生活環境因子が関与するものと考えられている。

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の役割を解明することを目的とした。また，子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に各種遺伝子多型を解析した。

B. 研究方法

- 1) 習慣流産 20 人と正常女性 17 人における黄体期中期の子宮内膜中 CD56+NK 細胞数, CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT 細胞数, CD4+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) 習慣流産患者 113 人における非妊娠時末梢血中の NK 細胞活性 (Cr 遊離法), 細胞比率 (FCM) とその後の妊娠の帰結との関連を前方視的に検討した。
- 3) 習慣流産 20 人と正常女性 15 人における末梢血 CD3-CD56+NK 細胞マーカー, perforin, CD94, CD161, CD158a, CD158b, CD244 を解析 (FCM) した。
- 4) コホート研究として, 北大で 24 週をこえて出産した 134 女性から末梢血 DNA を採取し, PCR/PCR-RFLP 法による各種遺伝子多型: CYP1A1 (MspI), CYP17 (MspAI), GSTP1 (BsmAI), GSTM1 (presence/null), GSTT1 (presence/null) と出生体重, 分娩週数, 子宮内胎児発育遅延 (IUGR) 頻度, 早産頻度, 妊娠中毒症頻度との関係を調べた。

(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に配慮する。

C. 結果

- 1) 子宮内膜中 NK 細胞数, NKT 細胞比率には差異を認めなかった。習慣流産女性では, コントロールに比較して CD3+ 細胞 (平均 40.3 vs. 56.5%), CD4+IFN- γ +細胞 (28.4 vs. 39.5%), および CD4+TNF- α +細胞 (32.9 vs. 45.8%) 比率が有意に低値であった。Th1/Th2
- バランスは両群間で差異を認めなかった。習慣流産患者の子宮内膜では, Th1 優位, NK 細胞, NKT 細胞異常などは認められず, これは従来の仮説と異なり, Th 細胞の減少, つまり immunodystrophism が病因に関連していることが初めて示された。(Shimada et al., Hum Reprod, 2004)
- 2) 習慣流産患者 85 人がその後妊娠した。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った 17 人の非妊娠時 NK 細胞活性/細胞比率 (平均 47%/17.1%) は, 生産に至った 59 人の 33%/13.1% に比較し有意に高く, 染色体異常流産に至った 9 人の 27%/15.7% は生産群と同レベルであった。ROC 解析からカットオフ値をそれぞれ設定した。非妊娠時の高 NK 細胞活性 (>46%) /高細胞比率 (>16.4%) は, その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子 (相対危険率 3.6, 95%CI 1.6-8.0/4.9, 1.7-13.8) であることが初めて明らかとなった。(Yamada et al., Am J Reprod Immunol, 2003)。
 - 3) 習慣流産患者の NK 細胞における CD158a 発現は, コントロールに比較して有意に低値 (平均 22.9% vs. 33.6%) を示した。perforin, CD94, CD161, CD158b, CD244 発現は両群間で差異はなかった。NK 細胞で抑制型レセプターである KIR2DL1 (CD158a) の発現低下が認められ, 習慣流産の病因に関連していることが初めて示唆された。(Yamada et al., Am J Reprod Immunol, 2004)。
 - 4) CYP17 A1 allele ホモ型 (A1A1) (n=44) の IUGR 頻度 (<10th percentile/< -1.5 SD; 22.7%/11.4%) は, A2 allele キャリア (A1A2/A2A2) (n=90) の頻度 (7.8%/2.2%) に比較して有意に高かった (OR =3.41, 95% CI = 1.18-9.84)。また, GSTM1 null 型 (n=67) の分娩週数 (Mean \pm SD, 37.5 \pm 3.1 週) は, GSTM1 presence (n=67) の週数 (38.5 \pm 2.4 週) に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺

伝子多型が IUGR の病因に関連していることが初めて明らかとなった。(Yamada et al., Mol Hum Reprod, 2004; Yamada et al., Semin Thromb Hemost, 2004).

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。この仮説に従い、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。我々は、14 年度の研究により習慣流産女性では非妊娠時の末梢血レベルで Th2, Tc2 優位であることを明らかにし、今回 15 年度の研究では、子宮内膜レベルで、Th 細胞の減少 (immunodystrophism) が病因に関連していることを解明した。これらの成果は、従来の仮説を覆すものであり、生殖免疫学領域の学究に与えた影響は大きい。一方、非妊娠時の NK 細胞高活性／高比率がその後の染色体正常流産と関連し、染色体異常流産とは関連しなかったことから、この NK 細胞異常が流産の原因として強く示唆された。あわせて NK 細胞上の抑制型レセプターの減弱が高活性を惹起するものと推察される。今後は脱落膜内での Th 細胞、NK 細胞と表面マーカーを解析して、さらに論拠を固めたい。

これまで、IUGR の病因には遺伝学的因子と生活環境因子が交絡して関与していると推察されていた。Thrombophilia (FV Leiden, プロトロンビン, MTHFR), 毒物代謝酵素 (CYP1A1), 成長因子 (IGF-I), アンジオテンシノーゲンなどの変異や多型が IUGR と関連することが 2001～2003 年にかけて相次いで報告された。今回我々は、cytochrome P450c17enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連していることを初めて明らかにした。P450c17enzyme は 17 α -hydroxylase と 17,20-lyase 活性をもち、pregnenolone から 17 α -OH-pregnenolon ,

dehydroepiandrosterone (DHEA)を誘導する。DHEA は androstenedione, estrone の前駆体である。CYP17 A1 allele ホモ型では estrogen 産生が低下すると推察されており、妊娠中の低 estrogen レベルが胎盤を介して IUGR を惹起するものと考えられる。

E. 結 論

習慣流産の発症機構に、末梢血レベルでの Th2/Tc2 優位、NK 細胞高活性／高比率と KIR2DL1 発現の減弱、子宮内膜レベルでの Th 細胞の減少 (immunodystrophism) が関連することを解明した。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連していることを初めて明らかにした。今後は、習慣流産、IUGR 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さらに解明する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H: Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. Am J Reprod Immunol 2003; 49: 84-89.

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H: Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003; 109: 21-26.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada

- S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 616-620.
- Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K, Tamashiro H: Association between a variant of the glutathion S-transferase P1 (GSTP1) gene and hypertension in pregnancy in Japanese: Interaction with parity, age and genetic factors. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 653-660.
- Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K: Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 104-112.
- Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 334-339.
- Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H: Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies* 2003; 43: 72-78.
- Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H: Prevalence of diverse anti-phospholipid antibodies in women with recurrent abortion. *Fertil Steril* 2003; 80: 1276-1278.
- Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H: Preconceptional natural-killer-cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-354.
- Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 49-53.
- Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ebina Y, Sakuragi N, Suzuki S, Minakami H: Anti-cardiolipin β 2-glycoprotein I antibody: Is a high titer related to pregnancy complication ? *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 639-644.
- Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H: Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2004; 79
- Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoe K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. *Am J Reprod Immunol* (2004, in press)
- Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi

K, Nishida R, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer or natural-killer-T cell population, but aberrant T helper population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* (2004, in press)

Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K: A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet* (2004, in press)

Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H: Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenatal Diag* (2004, in press)

Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* (2004, in press)

山田秀人, 森川 守, 島田茂樹：
免疫グロブリン大量療法, 今日の生殖医療,
産婦人科治療, 増刊号 88(3), 101-104, 2004

2. 学会発表

Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and fetal growth restriction. 6th World Congress of Perinatal Medicine, (September 13-16, Osaka) 2003

山田秀人：
自己免疫疾患合併妊娠の管理,
北海道産婦人科医学会学術研修会, 学術研修講演(札幌, 6月14日) 2003年

山田秀人, 佐田文宏, 西條泰明, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 岸 玲子, 水上尚典：
習慣流産と遺伝子多型: GSTM1, CYP17, IL-6,
第18回日本生殖免疫学会, (山口, 11月28-29日) 2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

妊娠維持機構および免疫学的生殖不全病態の解明

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

研究要旨

マウスモデルおよびヒト材料を用いて、妊娠維持機構および免疫学的生殖不全、特に不育症（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、Mφの役割を解明することを目的とした。

その結果、新たな習慣流産の原因として、Th diminution (immunodystrophism) が存在すること、および染色体正常の自然流産原因として、NK細胞抑制受容体低下が関与することを新発見した。

Poly(I:C) 誘導免疫学的生殖不全マウスモデル実験では、intact型免疫グロブリンでは流産抑止効果が認められたが、Fab型では流産率は変化しなかった。MACS法でT細胞、B細胞、NK細胞を除去して養子移入しても、流産率は各22%、10%、23%と流産抑止効果は残存したが、Mφを除去した場合、流産率49%と流産抑止効果が消失した。一方、免疫グロブリン投与非妊娠donorマウスにCL2MDP-liposome i.p.投与し、Mφを完全除去した脾細胞を分離して養子移入実験を行った結果、流産抑止効果は消失した。免疫グロブリンは、Mφを介して流産抑止効果を発揮することを世界で初めて証明した。

免疫学修飾療法を用いた習慣流産の治療方法開発がさらに展開可能となった。

【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Th1/Th2細胞、NK・NKT細胞、Mφ異常が習慣流産など免疫学的生殖不全に関与す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、正常の妊娠維持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、Mφの役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 前方視的コホート研究として、自然流産の脱落膜中CD3-CD56+NK細胞のperforin, CD94, CD161, CD158a, CD158b, CD244発現を、およびCD8陽性T細胞のperforin発現をフローサイトメトリー法で解析し、同時に絨毛染色体核型分析を行った。染色体正常流産、異常流産、人工中絶間で比較検討した。

2) Poly(I:C) 誘導の免疫学的生殖不全マウスモデルを作成した。CBA/J×DBA/2J妊娠マウスにPoly(I:C) 60~200 μ g をi.p. (Day7) して胎仔吸収率（流産率）をDay13に調べた結果、Poly(I:C)用量依存性に流産率が上昇し、200 μ g i.p.によってプラトーに達し、コントロールの流産率20%から55 \pm 5 (M \pm SD) %に上昇した (p<0.01)。

このマウスモデルを用いて、免疫グロブリン投与によって、流産率変化を解析した。

（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) 中絶群や染色体異常流産に比し、染色体正常流産では脱落膜中NK細胞では、CD158a+細胞やCD94+細胞が減少し、NK細胞とT細胞のperforin発現が有意に増加していた。またNK細胞におけるCD158a とCD94発現には、負の相関関係が認められた。NK細胞抑制型レセプターの減少と細胞障害性perforinの増加が、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（投稿中）。
- 2) Poly(I:C) 誘導免疫学的生殖不全マウスモデルにPoly(I:C) i.p.後、intactないしFab型ヒト免疫グロブリン 0.8g/kgを3日間i.p.したところ、intact型では流産率が8%に減少し、流産抑止効果が認められたが、Fab型では流産率は変化しなかった。この流産抑止効果はFc部分を介するものと考えられた。

免疫グロブリン投与非妊娠donorマウスからの脾細胞を分離し、Poly(I:C) 投与妊娠recipientマウスに尾静脈から注入して、未分画脾細胞、Thy1.2陽性T-、B220陽性B-、DX5陽性NK細胞、F4/80陽性Mφの流産抑止効果を調べた（養子移入実験）。この養子移入実験の結果、未分画脾細胞の移入によって、流産率は $13 \pm 3\%$ に抑制された（ $p < 0.0001$ ）。MACS法でT細胞、B細胞、NK細胞を除去して移入しても、流産率は各22%、10%、23%と流産抑止効果は残存したが、Mφを除去した場合、流産率49%と流産抑止効果が消失した。一方、免疫グロブリン投与非妊娠donorマウスにCL2MDP-liposome i.p.投与し、Mφを完全除

去した脾細胞を分離して養子移入実験を行った結果、流産抑止効果は消失した。

以上の一連の研究結果から、マウスモデルでPoly(I:C) 誘導流産作用が、免疫グロブリンのMφを介した作用機構によって、完全にうち消されることが明らかとなった。免疫グロブリンには、流産抑止効果があることを世界で初めて証明した（投稿中）。

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。今回の研究によって、染色体正常の自然流産脱落膜では、NK細胞抑制型レセプターが減少していることを明らかになった。孤発性の自然流産においても、免疫学的異常が関与することを初めて解明した。

また、Poly(I:C)誘導流産マウスモデルにおいては、NK細胞が胎仔吸収に介在することが知られている。免疫グロブリンには、流産抑止効果があり、Mφ機能修飾を介して、この効果が発現することを世界で初めて証明した。

これらの成果が、生殖免疫学領域の学究に与える影響は極めて大きいと考えられる。

E. 結 論

新たな習慣流産の原因として、Th diminution (immunodystrophism) が存在すること、および染色体正常の自然流産原因として、NK細胞異常が関与することが明らかとなった。免疫グロブリンは、Mφを介して流産抑止効果を発揮すると考えられる。

今後、免疫学修飾療法を用いた習慣流産の治療方法開発がさらに展開可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H: Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent

spontaneous abortion. Hokkaido Igaku Zasshi 2004; 79: 237-241.

Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. Am J Reprod Immunol 2004; 51: 241-247.

Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer or natural-killer-T cell population, but aberrant T helper population in the endometrium of women with repeated miscarriage. Hum Reprod 2004; 19(4): 1018-1024.

Morikawa M, Yamada H, Kato E.H, Shimada S, Yamada T, Minakami H. Embryo loss pattern is predominant in miscarriages with normal chromosome karyotype among women with repeated miscarriage. Hum Reprod 2004; 19: 2644-2647.

Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H: Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. Prenatal Diag 2004; 24: 45-49.

Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. Semin Thromb Hemost (2004, in press)

山田秀人, 森川 守, 島田茂樹:
免疫グロブリン大量療法, 今日の生殖医療,
産婦人科治療, 増刊号88(3), 101-104, 2004

森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 片岡宙門, 島田茂樹, 渡利道子, 山田 俊, 長 和俊, 森本裕二, 水上尚典. 脊髄損傷合併妊娠の1例. 周産期医学 (印刷中)

森川 守, 山田秀人, 山田 俊, 平山恵美, 島田茂樹, 片岡宙門, 長 和俊, 水上尚典. 胎児尿管遺残の1例. 周産期医学 (印刷中)

2. 学会発表

Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Kato EH, Nishida R, Minakami H. Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on natural killer cells in the decidua of spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. 9th International Congress of Reproductive Immunology. October 12-15, Hakone, 2004

山田秀人. 不育症における免疫学的異常と遺伝学的素因. 第7回阪神不妊治療懇話会 (特別講演) 9月16日, 尼崎, 2004

山田秀人, 敦賀律子, 平山恵美, 古田伊都子, 小橋 元, 渥美達也, 小池隆夫, 松浦栄治, 水上尚典. 抗リン脂質抗体と妊娠中毒症との関連. 第25回日本妊娠中毒症学会 (ワークショップ). 9月24-25日, 東京, 2004

山田秀人, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 櫻木範明, 佐田文宏, 岸 玲子, 水上尚典. 習慣流産の遺伝学的素因: GSTM1, CYP17, IL-6. 第56回日本産科婦人科学会, 4月10-13日, 東京, 2004

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Nishihira J, Minakami H: Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. 第19回日本生殖免疫学会, 10月11-12日箱根, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

研究要旨

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。

【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)

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。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。

D. 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は出来ない。

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見出されることから、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ぬと考えられた。

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.

妊娠中毒症の病態解析に関する研究

分担研究者 工藤 隆一 札幌医科大学医学部産婦人科

研究要旨

妊娠中毒症は、臨床的には妊娠中に高血圧・蛋白尿・浮腫の1つもしくは2つ以上の症状が見られ、かつこれらの症状が単なる妊娠偶発合併症によるものではないものと定義されている。妊娠中毒症の病態を研究するにあたり、我々は胎盤の詳細な検討、胎盤絨毛細胞培養および絨毛細胞モデルを用いて、低酸素条件下においての変化が予想される老化抑制遺伝子 *klotho* と、aromatases P450 (CYP19)の発現様式について検討する。

【研究協力者】

林 卓宏、遠藤 俊明、北島 義盛、林 巧
(札幌医科大学医学部産婦人科)

A. 研究目的

妊娠中毒症は、臨床的には妊娠中に高血圧・蛋白尿・浮腫の1つもしくは2つ以上の症状が見られ、かつこれらの症状が単なる妊娠偶発合併症によるものではないものと定義されている。これら症状は、一般的に胎盤が子宮内に存在することによって生じ、胎盤が娩出された分娩後に軽快する疾患と解釈され、病態生理学的には「placental trigger」と考えられている。また、胎児の存在しない絨毛性疾患においても妊娠中毒症が観察されることより、胎盤と妊娠中毒症の密接な関連が容易に推測される。従って、妊娠中毒症を理解するためのひとつの手法として、胎盤あるいは絨毛細胞を用いた基礎的研究が非常に重要であると考えられる。

胎盤を構成している細胞のうち、特に cytotrophoblast(CT) から分化した syncytiotrophoblast(ST)は直接母体血と接することより、母体とのガス交換や物質交換にとって非常に重要であり、このことは血管内皮細胞と同様の役割を果たしていると考えられる。また、ST細胞は、胎児の成長に必要な不可欠なホルモン産生や妊娠維持のために重要な物質の産生を行って

る。妊娠中毒症胎盤では胎盤に還流する母体血流の低下により低酸素もしくは hypoxia-reoxygenation がもたらされることから、これら胎盤絨毛細胞の分化異常それに伴うステロイドホルモンや種々の遺伝子発現変化が報告されている。今回我々は、ST細胞から分泌される内皮細胞保護作用を有する老化抑制遺伝子 *klotho* と、C₁₉ステロイドをエストロゲンに変換する aromatases P450(CYP19)の発現様式を中心に検討する。

B. 研究方法

B-1) 妊娠中毒症および正常胎盤の採取

全例、帝王切開による分娩時に、無菌的に胎盤を採取し、採取より15分以内に液体窒素下に凍結・保存もしくは直ちに絨毛細胞培養のため Kliman らの方法に準じた処理を行う。一部は組織学的検討のため、凍結およびパラフィン包埋に供する。

B-2) 細胞培養法

培養実験として、上記絨毛細胞のほかに絨毛モデルとして絨毛癌細胞株 (BeWo) を用いる。培養条件は低酸素培養（酸素濃度5%以下）下での培養と air condition 下での培養を比較検討する。また、hypoxic-reoxygenation 条件での培養も行う。

B-3) 遺伝子解析

抽出物および培養細胞の *CYP19* および

klotho m-RNA 発現を Northern blot, in situ hybridization および real time RT-PCR 法を用いて定量・局在に関し検索する。

B-4) 関連蛋白解析

CYP19 発現を抑制する human Mash-2 (mammalian achaete/scute homologue 2) と 2 種類の *Klotho* 蛋白発現・局在につき、Western blot および免疫組織染色を施行する。

B-4) 機能評価実験

それぞれの遺伝子につきアンチセンス実験や他の抑制遺伝子発現により、細胞の生存率や分化状況・ホルモン産生能の変化を解析する。また、これとは反対に、過剰発現させた場合の機能変化についても検討する。

（倫理面への配慮）

胎盤採取の際、本人および家族からの了解を文書あるいは口頭にて得ている。

C. 研究結果

現在までの予備実験で、2 種類の *klotho* 遺伝子 (membrane-bound form と secreted form) 発現において、どちらのタイプにおいても正常胎盤と妊娠中毒症胎盤との間に m-RNA レベルでの差はなく、どちらも secreted form が有意に発現していることが判明した。*Klotho* 蛋白もこれら m-RNA がコードする 2 種類 membrane form と secreted form の存在が確認されており、これらはさらに 2 種類の domain (hKL1 と hKL2) により構成されている。membrane form は hKL1 と hKL2 両者により、また secreted form は hKL1 のみで構成されており、膜と結合している domain は hKL2 である。予備実験では hKL2 が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方で hKL1 の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかった。免疫組織学的検討では hKL2 が妊娠中毒症胎盤 syncytiotrophoblast に強い染色を認めた。

D. 考 察

klotho 遺伝子解析で、胎盤全体で secreted form が有意に発現していることは、ほかの組織においても secreted form が有意に発現しているとされている報告に一致した。また、慢性腎不全・高血圧症・糖尿病などの循環不全が慢性的に経過する疾患において、腎臓などの臓器で *klotho* 遺伝子発現が著明に減少していることとする報告から、妊娠中毒症の病態は急性の循環不全であると考えられた。

蛋白の検索では、hKL2 が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方で hKL1 の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかったことから、妊娠中毒症胎盤において membrane form が hKL1 と hKL2 とに切断され、hKL1 (secreted form) が母体血中に遊離されている可能性が示唆された。さらに、hKL2 の発現は、妊娠中毒症胎盤 ST に、より強い染色を認めたことから、①妊娠中毒症というストレスは、胎盤絨毛細胞に内皮細胞障害保護作用のある *Klotho* 蛋白を誘導し、いわゆるストレス抵抗性を示している可能性が示唆された、②母体血中の *Klotho* 蛋白を測定することにより妊娠中毒症マーカーとして応用することが可能であると考えられた。

E. 結 論

今後、引き続き上記実験系を妊娠中毒症モデルを用いて *in vitro* においても検討し、同時に臨床的には年齢別正常非妊婦と合併症を有さない正常妊婦の血清 *klotho* 蛋白濃度を基準として、中毒症に罹患した妊婦の同蛋白濃度を妊娠週数ごとに測定し、妊娠中毒症の早期診断さらにはその重傷度を推測するマーカーとなり得ないか明らかにする。また、*Klotho* 蛋白 secreted form を過剰発現もしくは投与したときに妊娠中毒症病態の回避もしくは改善を認めないか、マウスを用いた *in vivo* 実験系で明らかにすることを計画している。また、妊娠中毒症胎盤および低酸素モデルにおける *CYP19* 発現に関する研究も同時に施行する予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Hayashi T, Endo T, Yamazaki K, Kitajima T, Hayashi T, Kudo R. The expression of *klotho* gene and protein in the placenta of preeclampsia. *Placenta* 2003, 24: A. 42.
- 2) 林 卓宏、北島義盛、山崎清大、遠藤俊明、工藤隆一：妊娠中毒症胎盤における老化抑制遺伝子(*klotho* gene)の発現について、第55回日本産婦人科学会、福岡、2003年4月12～15日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし