

Met アリルは、野生型 Val に比べ、3～4 倍活性が低下することが知られている (6)。COMT 遺伝子機能性 Val158Met 多型と胎児の成長との間に関連があるかを明らかにするため、本研究を行った。

B. 研究方法

2001～2005 年に北海道大学病院で単胎児を出産し、本研究に参加することに同意の得られた女性 412 名を対象とした (Table 1)。なお、自己免疫疾患、抗リン脂質症候群、先天性血栓傾向の既往のある者、妊娠糖尿病発症者、先天異常児出産者は除外した。対象者の末梢血白血球より DNA を抽出し、allelic discrimination assay によって COMT 遺伝子 Val158Met 多型の遺伝子型を判定した。この多型と低出生体重 (LBW, 2,500g 未満) と IUGR (10 パーセントイル未満/−1.5 標準偏差 (SD) 未満) との関連をロジスティック回帰分析により解析し、出生体重との関連を重回帰分析により解析した。統計解析には、ウィンドウズ版 SPSS ver.13 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の倫理規定に従って実施し、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」に基づいて行っている。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、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払っている。

C. 研究結果

低活性アリル (COMT^L) をホモ接合 (Met/Met) に持つ女性の LBW に対するオッズ比 (OR) は、2.98、95%信頼区間 (CI) は 1.10-8.11、IUGR に対する OR は、2.63/2.57、95%CI は 1.14-6.05/0.96-6.88 であり、出生体重とも負の関連傾向がみられた (Tables 2, 3)。

D. 考 察

妊婦のカテコールエストロゲンの血清濃度および尿中排出量は、妊娠開始とともに増加し、妊娠後期にプラトーに達することが知られている (7)。カテコールエストロゲンは非常に不安定な化合物で、酸化ストレスを生じる。LBW は酸化ストレスと関連があることが報告されている (8)。本研究より、COMT^L をホモ接合に持つ妊婦では、カテコールエストロゲンを効率よく不活化できないため、IUGR が引き起こされることが示唆された。今後、このような IUGR に感受性のある妊婦に対しては、ビタミン C、E などの抗酸化物質を投与することによって、LBW/IUGR を予防できないか検討することが必要である。

E. 結 論

COMT 遺伝子の低活性アリルは、IUGR を引き起こす重要な要因と推測された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishia R. Functional Maternal Catechol-*O*-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction, submitted

2. 学会発表

佐田文宏, 鈴木佳奈, 西條泰明, 山田俊, 山田秀人, 水上尚典, 岸玲子: 母親の機能性カテコール-O-メチル転移酵素遺伝子多型と児の出生体重, 第 16 回日本疫学会学術総会, 名古屋, 平成 18 年 1 月 23-24 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

1. 参考文献

- (1) Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: Programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006; 66:38-44.
- (2) Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287:195-202.
- (3) Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight. *Lancet* 2002; 359:1036-1037.
- (4) 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.
- (5) Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:203-232.
- (6) Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996; 6:243-250.
- (7) Berg FD, Kuss E. Serum concentration and urinary excretion of "classical" estrogens, catecholestrogens and 2-methoxyestrogens in normal human pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 1992; 251:17-27.
- (8) Scholl TO, Stein TP. Oxidant damage to

DNA and pregnancy outcome. *J Matern Fetal Med* 2001; 10:182-185.

Table 1 Characteristics of 412 mothers by infant birth weight

| | Infant birth weight < 2,500 g (N = 103) | | Infant birth weight ≥ 2,500 g (N = 309) | | Pvalue* |
|---------------------------|--|------|--|------|---------|
| | Number | % | Number | % | |
| Age | | | | | |
| ≤ 29 years | 32 | 31.1 | 113 | 36.6 | 0.40 |
| 30–39 years | 66 | 64.1 | 175 | 56.6 | |
| ≥ 40 years | 5 | 4.9 | 21 | 6.8 | |
| COMT genotype (Val158Met) | | | | | |
| Val/Val | 46 | 44.7 | 145 | 46.9 | 0.03 |
| Val/Met | 40 | 38.8 | 140 | 45.3 | |
| Met/Met | 17 | 16.5 | 24 | 7.8 | |
| Parity | | | | | |
| 0 | 56 | 54.4 | 165 | 53.4 | 0.86 |
| ≥ 1 | 47 | 45.6 | 144 | 46.6 | |
| Gestational age | | | | | |
| < 37 weeks | 63 | 61.2 | 11 | 3.6 | < 0.01 |
| ≥ 37 weeks | 40 | 38.8 | 298 | 96.4 | |
| Infant gender | | | | | |
| Male | 47 | 45.6 | 177 | 57.3 | 0.04 |
| Female | 56 | 54.4 | 132 | 42.7 | |

*chi-square test

Table 2 Adjusted associations of maternal COMT Val158Met polymorphism with infant birth weight

| | Logistic Regression* Low Birth Weight (LBW) | | | | Multiple Linear Regression* Birth Weight, g | | |
|---------|--|-----------|------------------|--------|--|--------|--------|
| | Number | LBW (%) | OR (95% CI) | Pvalue | B (SE) | β | Pvalue |
| Val/Val | 191 | 46 (24.1) | 1.00 | | (reference) | | |
| Val/Met | 180 | 40 (22.2) | 0.78 (0.40–1.56) | 0.49 | 21.4 (38.0) | 0.017 | 0.57 |
| Met/Met | 41 | 17 (41.5) | 2.98 (1.10–8.11) | 0.03 | –111.9 (62.2) | –0.054 | 0.07 |

*Adjusted for maternal age, parity, gestational age and infant gender

Table 3 Adjusted associations of maternal COMT Val158Met polymorphism with IUGR using two different definitions (birth weight <10th percentile or < mean – 1.5 SD)

| | Birth weight < 10th percentile | | | | Birth weight < mean – 1.5 SD | | |
|---------|--------------------------------|-----------|------------------|--------|------------------------------|------------------|--------|
| | Number | IUGR (%) | OR* (95% CI) | Pvalue | IUGR (%) | OR* (95% CI) | Pvalue |
| Val/Val | 191 | 27 (14.1) | 1.00 | | 17 (8.9) | 1.00 | |
| Val/Met | 180 | 22 (12.2) | 0.81 (0.43–1.53) | 0.52 | 15 (8.3) | 0.94 (0.44–1.99) | 0.86 |
| Met/Met | 41 | 11 (26.8) | 2.63 (1.14–6.05) | 0.02 | 7 (17.1) | 2.57 (0.96–6.88) | 0.06 |

*Unconditional logistic regression analysis adjusted for maternal age, parity and infant gender

早産、低出生体重、子宮内発育遅延と *IL1A*、*IL1B* 遺伝子多型との関連

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

研究要旨

早産や低出生体重は新生児疾患と関連する予防医学上重要な問題である。早産には免疫系の関与が大きく、早期陣痛の発来には、IL-1をはじめとするいくつかの炎症性サイトカインが関与していると考えられている。本研究では、母親の *IL1A*A114S(G340T)、*IL1B*-511C/T 遺伝子多型を解析し、早産、低出生体重、子宮内発育遅延との関連を調べた。単体児を出産した母親 452 名を対象とし、末梢血白血球より DNA を抽出し、allelic discrimination assay によって *IL1A* A114S、及び *IL1B*-511C/T の遺伝子型を判定した。これらの多型と早産(PTB)、及び低出生体重(LBW)と子宮内発育遅延(IUGR)との関連をロジスティック回帰分析により解析した。*IL1A*A114S の多型については G/T、T/T 型のオッズ比が PTB との関連で 2.67、2.49、LBW との関連で 2.23、2.36 と、それぞれ上昇した。また、T/T 型のみ IUGR との関連で 2.88(10 パーセントイル)、4.55(-1.5SD)と、オッズ比が上昇した。*IL1B*-511C/T は PTB、LBW、IUGR とともにオッズ比の上昇は見られなかった。本研究の結果、*IL1A*A114S 遺伝子多型と早産、低出生体重、子宮内発育遅延との関連が示唆された。

【研究協力者】

岸 玲子、西條 泰明、戸屋 真吾、
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
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
山田 俊
北海道大学病院周産母子センター

A. 研究目的

早産は週産期において予防医学上重要な問題であり、新生児のおよそ 10%が早産児であり、そのうちの 70-80%が新生児疾患と関連する(1)。

早産には免疫系の関与が大きく、原因の一つは早期陣痛の発来であり、IL-1をはじめとするいくつかの炎症性サイトカインが関与している(2)。

IL1A は A114S(G340T)、*IL1B* は -511C/T の一塩基多型があり、活性、発現量が変化する可能性

が考えられ、それに伴い、早産のリスクが変化することが予想される。

本研究では、母親の *IL1A*A114S、*IL1B*-511C/T 遺伝子多型を解析することにより、早産との関連を明らかにすることを目的とした。また、同時に低出生時体重、子宮内発育遅延との関連についても調べた。

B. 研究方法

2001~2005 年に北海道大学病院にて単胎児を出産し、本研究に同意の得られた 18~44 歳の女性の内、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫疾患、先天性血栓性素因（プロテイン C,S 欠損症）、妊娠糖尿病と糖尿病、奇形を除いた 452 名を対象とした。対象者の末梢血白血球より DNA を抽出し、allelic discrimination assay によって *IL1A* A114S、及び *IL1B*-511C/T の遺伝子型を判定した。これらの多型と早産(PTB)、低出生体重(LBW)、子宮内発育遅延(IUGR)との関連をロジスティック回帰分析により解析した(SPSS ver 12.0J を使用)。

PTB は在胎週数 37 週未満、LBW は出生体重 2500g 未満とし、IUGR は 10 パーセント未満と、平均体重-1.5SD 未満の二通りの定義について解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、参加病院または代表研究機関の倫理委員会にて、全て承認されている。本研究のデータ保管は、個人情報管理者を置き、厳格な管理が行われ、調査結果の公表に際しては、個人名を公表したり、個人を特定できる形にはせず、妊婦のプライバシーは厳重に保護されている。

C. 研究結果

表 1 に基本的属性を示した。それぞれ早産との関連について、カイ二乗検定を行った。出生体重 ($P<0.01$)、*IL1A* A114S ($P=0.02$)が有意な結果となった。

表 2 では *IL1A*A114S、*IL1B*-511C/T と PTB、LBW、IUGR についてロジスティック回帰分析を行った(年齢、出産歴、出産児の性別で調整)。*IL1A*A114S は G/T、T/T 型において、PTB(2.67、2.49)、LBW(2.23、2.36)のオッズ比が上昇した。また、T/T 型のみ IUGR 2.88(10 パーセント)、4.55(-1.5SD)のオッズ比が上昇した。

IL1B-511C/T は PTB、LBW、IUGR ともに有意な結果は得られなかった。

D. 考察

*IL1A*A114S については T アリルをホモまたはヘテロとして持つ場合、PTB、LBW のオッズ比がそれぞれ有意に上昇した。

この結果から、*IL1A* が 114S アリルを持つ場合、*IL1A* の活性または発現量が上昇し、妊娠時の早期陣痛の発生の可能性が高まり、早産のリスク上昇に繋がったと考えられる。PTB リスクの増加に伴い、LBW も増加したと考えられ、T アリルとの関連が見られた。IUGR との関連については、T/T 型の場合のみ有意となった。G/T 型の場合には有意差はないので、G アリルをホモまたは

ヘテロとして持っていれば、IUGR のリスク増加を避けられると考えられる。

IL1B については、先行研究において *IL1B* +3953 の多型と早産の関連について有意な相関が見出された報告がある(3)。本研究では *IL1B*-511 C/T の遺伝子多型と PTB との有意差は見られなかった。この結果から、*IL1B* -511 アリルの変化だけでは、早期陣痛発生に影響を与えるほどの発現量増加には繋がらないと考えられる。培養細胞を用いた先行研究でも、-511T アリルは-511C に比べ、わずかに発現量が増加しただけであった(4)。

E. 結論

先行研究では *IL1A*、*IL1B* と早産との関連については、いくつかの報告があるが、*IL1A* A114S または *IL1B* -511C/T の多型と早産の関連についての報告はなかった。本研究では初めて *IL1A* A114S 多型と早産との関連が示唆され、また同時に、低出生体重と子宮内発育遅延との関連についても有意差が見られた。特に *IL1A* と IUGR との関連についてはほとんど報告されていないので、今後詳細に検討する必要がある。

（参考文献）

- (1) Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:1500-07.
- (2) Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160:1117-23
- (3) Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 ;187:157-63.
- (4) Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced *IL-1*beta production in vitro. *Scand J Immunol.*

1998;47:195-8

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shingo Toya, Fumihiko Sata, Kana Suzuki, Yasuaki Saijo, Takashi Yamada, Hideto Yamada, Hisanori Minakami, Reiko Kishi. Association of preterm birth, low birth weight and intrauterine growth restriction with *IL1A* A114S (G340T) and *IL1B* -511 polymorphisms. (submitted)

2. 学会発表

戸屋真吾, 佐田文宏, 鈴木佳奈, 西條泰明, 山田俊, 山田秀人, 水上尚典, 岸玲子, 早産, 低出生体重とインターロイキン-1 遺伝子多型との関連, 第76回日本衛生学会 (2006.3.25-28)

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

表 1. 基本的属性

| | case(N=77) | | control(N=375) | | Pvalue* |
|------------------------|------------|-------|----------------|-------|---------|
| | n | % | n | % | |
| 年 齢 | | | | | |
| ≤ 29 | 22 | 28.6 | 134 | 35.7 | 0.40 |
| 30-39 | 51 | 66.2 | 217 | 57.9 | |
| ≥ 40 | 4 | 5.2 | 24 | 6.4 | |
| 出生児の性別 | | | | | |
| 男 | 35 | 45.5 | 212 | 56.5 | 0.08 |
| 女 | 42 | 54.5 | 163 | 43.5 | |
| 出産歴 | | | | | |
| 無し | 46 | 59.7 | 196 | 52.3 | 0.23 |
| 有り | 31 | 40.3 | 179 | 47.7 | |
| 出生体重 | | | | | |
| <2500g | 66 | 85.7% | 46 | 12.3% | <0.01 |
| ≥2500g | 11 | 14.3% | 329 | 87.7% | |
| <i>IL1A</i> A114S 遺伝子型 | | | | | |
| G/G | 51 | 68.0% | 312 | 85.2% | 0.02 |
| G/T | 18 | 24.0% | 40 | 10.9% | |
| T/T | 6 | 8.0% | 14 | 3.8% | |
| <i>IL1B</i> -511 遺伝子型 | | | | | |
| C/C | 22 | 28.9% | 97 | 26.6% | 0.27 |
| C/T | 31 | 40.8% | 183 | 50.3% | |
| T/T | 23 | 30.3% | 84 | 23.1% | |

* カイ二乗検定

表2. *IL1A*A114S, *IL1B*-511 の多型と 早産, 低出生時体重, 子宮内発育遅延との関連
(年齢, 出産歴, 出産児の性別で調整)

IL1A A114S

| | N (合計) | PTB | | | LBW | | |
|---------|-----------|-----------|------------------|----------------|-----------|------------------|----------------|
| | | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value |
| G/G | 363 | 51 (14.0) | 1.00 | | 82 (22.6) | 1.00 | |
| G/T | 58 | 18 (31.0) | 2.67 (1.42-5.04) | <0.01 | 24 (41.4) | 2.23 (1.23-4.02) | 0.01 |
| T/T | 20 | 6 (30.0) | 2.49 (0.91-6.83) | 0.08 | 8 (40.0) | 2.36 (0.93-6.03) | 0.07 |
| G/T+T/T | 78 | 24 (30.8) | 2.62 (1.48-4.64) | 0.01 | 32 (41.0) | 2.26 (1.34-3.82) | 0.02 |

| | N (合計) | 出生体重 < 10 パーセントイル | | | 出生体重 < -1.5 SD | | |
|---------|-----------|-------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|
| | | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value |
| G/G | 363 | 51 (14.0) | 1.00 | | 34 (9.3) | 1.00 | |
| G/T | 58 | 9 (15.5) | 1.19 (0.55-2.60) | 0.67 | 4 (6.9) | 0.74 (0.25-2.20) | 0.59 |
| T/T | 20 | 6 (30.0) | 2.88 (1.03-8.04) | 0.04 | 6 (30.0) | 4.55(1.61-12.91) | 0.04 |
| G/T+T/T | 78 | 15 (19.2) | 1.56 (0.81-2.98) | 0.18 | 10 (12.8) | 1.48 (0.69-3.18) | 0.31 |

IL1B-511

| | N (合計) | PTB | | | LBW | | |
|---------|-----------|-----------|------------------|----------------|-----------|------------------|----------------|
| | | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value |
| C/C | 119 | 22 (18.5) | 1.00 | | 29 (24.4) | 1.00 | |
| C/T | 214 | 31 (14.5) | 0.73 (0.40-1.34) | 0.31 | 46 (21.5) | 0.83 (0.49-1.42) | 0.50 |
| T/T | 107 | 23 (21.5) | 1.14 (0.59-2.21) | 0.70 | 35 (32.7) | 1.45 (0.80-2.60) | 0.22 |
| G/T+T/T | 321 | 54 (16.8) | 0.86 (0.50-1.49) | 0.59 | 81 (25.2) | 1.02 (0.62-1.66) | 0.95 |

| | N (合計) | 出生体重 < 10 パーセントイル | | | 出生体重 < -1.5 SD | | |
|---------|-----------|-------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|
| | | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value | n (%) | OR (95%CI) | <i>P</i> value |
| C/C | 119 | 19 (16.0) | 1.00 | | 10 (8.4) | 1.00 | |
| C/T | 214 | 27 (12.6) | 0.74 (0.39-1.40) | 0.35 | 21 (9.8) | 1.19 (0.54-2.63) | 0.67 |
| T/T | 107 | 18 (16.8) | 1.04 (0.51-2.13) | 0.92 | 12 (11.2) | 1.44 (0.59-3.53) | 0.42 |
| G/T+T/T | 321 | 45 (14.0) | 0.83 (0.46-1.50) | 0.54 | 33 (10.3) | 1.28 (0.61-2.71) | 0.52 |

習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白A遺伝子多型

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

研究要旨

妊娠初期に妊娠関連血漿蛋白A（PAPP-A）の血清濃度が低いと胎児発育遅延や流産のリスクが高まることが報告されている。*PAPPA* 遺伝子にはアミノ酸置換(Ser1224Tyr)の C3671A 多型が知られているが、この多型と習慣流産との関連を検討した報告はない。本研究では、この *PAPPA* 遺伝子多型と習慣流産との関連をあきらかにすることを目的とした。北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=215）を症例、産後外来を受診した健常経産婦（n=420）を対象とし、症例対照研究を行った。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球から DNA を抽出し、*PAPPA* 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連を調べた。3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられ、特に、少なくとも1回、妊娠9週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した（AA型に対するAC型のOR, 1.54; 95% CI, 0.95-2.49; CC型のOR, 2.83; 95% CI, 1.00-8.05; *P* for trend, 0.02）。*PAPPA* 遺伝子 C3671A 多型は、ある種の習慣流産と関連があることが示唆された。今後、胎児の成長と関連があるインスリン様増殖因子を含めて検討が必要である。

【研究協力者】

岸 玲子、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
山田 秀人、敦賀 律子
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

B. 研究方法

北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=215）を症例、産後外来を受診した健常経産婦（n=420）を対象とし、症例対照研究を行った（Table 1）。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球から DNA を抽出し、*PAPPA* 遺伝子 C3671A 多型を、リアルタイム PCR 法で解析し、習慣流産との関連をロジスティック回帰分析で解析した。統計解析には、ウィンドウズ版 SPSS ver.13 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の倫理規定に従って実施し、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」に基づいて行っている。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、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払っている。

A. 研究目的

妊婦の妊娠関連血漿蛋白A（PAPP-A）濃度は、妊娠経過とともに上昇する（1）。妊娠初期に血清 *PAPP-A* 濃度が低いと胎児発育遅延（IUGR）や流産のリスクが高まることが報告されている（2、3）。*PAPPA* 遺伝子にはアミノ酸置換（Ser1224Tyr）の C3671A 多型が知られているが、この多型と習慣流産との関連を検討した報告はない。本研究では、この *PAPPA* 遺伝子多型と習慣流産との関連をあきらかにすることを目的とした。

C. 研究結果

PAPPA 3671C アリルを持つ女性は習慣流産のリスクが高まる傾向がみられた（AA 型に対する AC 型の OR, 1.17; 95% CI, 0.82–1.68; CC 型の OR, 2.06; 95% CI, 0.87–4.90; P trend, 0.10）（Table 2）。特に、少なくとも 1 回、妊娠 9 週以降に流産を経験するリスクは有意に上昇した（AA 型に対する AC 型の OR, 1.54; 95% CI, 0.95–2.49; CC 型の OR, 2.83; 95% CI, 1.00–8.05; P trend, 0.02）（Table 3）。

D. 考 察

妊娠初期～中期にかけて、妊婦の血清 *PAPP-A* 濃度が低値を示す場合は、流産のリスクが上昇する（2-6）。血清 *PAPP-A* 濃度は、胎児が生存している時に流産を予知する最も鋭敏な指標であると報告されている（7）。最近、妊娠初期における母親の血清 *PAPP-A* 濃度の低値と IUGR との関連も報告されている（2, 8–10）。

血清 *PAPP-A* 濃度が低値になると、胎盤や胎児の発達初期にインスリン様増殖因子 2 型 (IGF-II) の取り込みが抑制される（11）。栄養膜や脱落膜に存在する *PAPP-A* は、インスリン様増殖因子結合蛋白 (IGFBP) の分解酵素であることが同定された（12）。このように、*PAPP-A* は IGF と密接に関連し、胎児の成長に大きな影響を及ぼすと考えられている。

PAPPA 遺伝子にはアミノ酸置換 (Ser1224Tyr) の C3671A 多型があることが報告されている（13）。しかし、この多型の酵素活性や発現との関連は知られていない。本研究により、ある種の習慣流産との関連が示唆されたので、今後、さらに胎児の成長に及ぼす影響を、IGF を含めて検討することが必要であると考えられる。

E. 結 論

PAPPA 遺伝子 C3671A 多型は、ある種の習慣流産と関連があることが示唆された。今後、胎児の成長と関連がある IGF を含めて検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki K, Sata F, Yamada H, Saijo Y, Tsuruga N, Minakami H, Kishi R. Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss, submitted

2. 学会発表

鈴木佳奈、佐田文宏、西條泰明、敦賀律子、山田秀人、水上尚典、岸玲子：「習慣流産リスクと妊娠関連血漿蛋白 A 遺伝子多型」、第 75 回日本衛生学会総会、新潟（2005.3.27-30）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

該当なし

I. 参考文献

- (1) Westergaard, J.G., Teisner, B., Grudzinskas, J.G., 1983. Serum *PAPP-A* in normal pregnancy: relationship to foetal and maternal characteristics. Arch. Gynecol., 233, 211-215
- (2) Kwik, M., Morris, J., 2003. Association between first trimester maternal serum pregnancy associated plasma protein-A and adverse pregnancy outcome. Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol. 43, 438-442.
- (3) Goetzl, L., Krantz, D., Simpson, J.L., Silver, R.K., Zachary, J.M., Pergament, E., Platt, L.D., Mahoney, M.J., Wapner, R.J., 2004. Pregnancy-associated plasma protein A, free beta-hCG, nuchal translucency, and risk of pregnancy loss. Obstet. Gynecol., 104, 30-36.
- (4) Westergaard, J.G., Sinosich, M.J., Bugge, M., Madsen, L.T., Teisner, B., Grudzinskas,

- J.G., 1983. Pregnancy-associated plasma protein A in the prediction of early pregnancy failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145, 67-69.
- (5) Yaron, Y., Heifetz, S., Ochshorn, Y., Lehavi, O., Orr-Urtreger, A., 2002. Decreased first trimester *PAPP-A* is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 22, 778-782.
- (6) Santolaya-Forgas, J., De Leon, J.A., Cullen Hopkins, R., Castracane, V.D., Kauffman, R.P., Sifuentes, G.A., 2004. Low pregnancy-associated plasma protein-A at 10(+1) to 14(+6) weeks of gestation and a possible mechanism leading to miscarriage. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 456-461.
- (7) Westergaard, J.G., Teisner, B., Sinosich, M.J., Madsen, L.T., Grudzinskas, J.G., 1985. Does ultrasound examination render biochemical tests obsolete in the prediction of early pregnancy failure? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92, 77-83.
- (8) Smith, G.C., Stenhouse, E.J., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Cameron, A.D., Connor, J.M., 2002. Early-pregnancy origins of low birth weight. *Nature* 417, 916.
- (9) Smith, G.C., Stenhouse, E.J., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Cameron, A.D., Connor, J.M., 2002. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1762-1767.
- (10) Bersinger, N.A., Odegard, R.A., 2004. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 83, 37-45.
- (11) Santolaya-Forgas, J., De Leon, J.A., Cullen Hopkins, R., Castracane, V.D., Kauffman, R.P., Sifuentes, G.A., 2004. Low pregnancy-associated plasma protein-A at 10(+1) to 14(+6) weeks of gestation and a possible mechanism leading to miscarriage. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 456-461.
- (12) Giudice, L.C., Conover, C.A., Bale, L., Faessen, G.H., Ilg, K., Sun, I., Imani, B., Suen, L.F., Irwin, J.C., Christiansen, M., Overgaard, M.T., Oxvig, C., 2002. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2359-2366.
- (13) Frosk, P., Weiler, T., Nylen, E., Sudha, T., Greenberg, C.R., Morgan, K., Fujiwara, T.M., Wrogemann, K., 2002. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in *TRIM32*, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 663-672.

Table 1. Characteristics of 215 cases with recurrent pregnancy loss (RPL) and 420 controls in a Japanese population

| | Cases | | Controls | |
|----------------|--------|------|----------|------|
| | Number | % | Number | % |
| Age | | | | |
| ≤29 | 58 | 27.0 | 167 | 39.8 |
| 30–39 | 139 | 64.7 | 230 | 54.8 |
| ≥40 | 18 | 8.4 | 23 | 5.5 |
| Pregnancy loss | | | | |
| 2 | 92 | 42.8 | — | — |
| 3 | 74 | 34.4 | — | — |
| ≥4 | 49 | 22.8 | — | — |
| Primary RPL | 178 | 82.8 | — | — |
| Secondary RPL | 37 | 17.2 | — | — |
| <9 weeks | 122 | 56.7 | — | — |
| 9–13 weeks | 78 | 36.3 | — | — |
| ≥14 weeks | 15 | 7.0 | — | — |

Table 2. Distribution of *PAPPA* genotypes among 215 cases with RPL and 420 controls

| | Cases | | Controls | | OR ^a (95% CI) | P value |
|----------|--------|------|----------|------|--------------------------|---------|
| | Number | % | Number | % | | |
| AA | 135 | 62.8 | 282 | 67.1 | 1.00 (reference) | |
| AC | 69 | 32.1 | 127 | 30.2 | 1.17 (0.82–1.68) | 0.39 |
| CC | 11 | 5.1 | 11 | 2.6 | 2.06 (0.87–4.90) | 0.10 |
| | | | | | <i>P</i> for trend, | 0.12 |
| A allele | 339 | 78.8 | 691 | 82.3 | | |
| C allele | 91 | 21.2 | 149 | 17.7 | | |

^a Age-adjusted logistic regression analysis.

Table 3. Distribution of *PAPPA* genotypes among 93 cases experienced at least one pregnancy loss after 9 weeks of gestation and 420 controls

| | Cases | | Controls | | OR ^a (95% CI) | P value |
|---------|--------|------|----------|------|--------------------------|---------|
| | Number | % | Number | % | | |
| AA | 52 | 55.9 | 282 | 67.1 | 1.00 (reference) | |
| AC | 35 | 37.6 | 127 | 30.2 | 1.54 (0.95–2.49) | 0.08 |
| CC | 6 | 6.5 | 11 | 2.6 | 2.83 (1.00–8.05) | 0.05 |
| | | | | | <i>P</i> for trend, | 0.02 |
| AC + CC | 41 | 44.1 | 138 | 32.9 | 1.65 (1.04–2.62) | 0.03 |

^a Age-adjusted logistic regression analysis.

IgG avidity と PCR 法を用いた先天性トキソプラズマ症の管理

主任研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科 教授
(生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野)

研究要旨

先天性トキソプラズマ症では、胎児・新生児の水頭症、網脈絡膜炎、脳内石灰化、精神神経・運動障害などをきたす。本研究の目的は、初感染時期を判断するために有用とされるトキソプラズマ IgG avidity 検査とトキソプラズマ PCR 検査法を確立し、臨床応用することによって、先天性トキソプラズマ症の管理方針を新たに作成することである。

北海道における地域別の抗体陽性率(HA 抗体, IgM)を調べた結果、1000 妊婦中、4-11 人に初感染が疑われ、精査・治療対象となり得ることが判明した。前方視的研究として、妊娠初期にトキソプラズマ抗体(HA)が陽性で、かつ IgM 抗体が陽性の妊婦に対して、同意を得て母体血トキソプラズマ IgG avidity を測定した。また、母体血、羊水、出生時の臍帯血を採取し、PCR 法(Nested PCR)でトキソプラズマの有無を検討した。新生児感染の有無を調べた。現在まで、HA 抗体陽性かつ IgM 陽性の 25 妊婦がエントリーした。IgG avidity 値は、3-80%を示した。3 症例において、母体血トキソプラズマ PCR が陽性であった(陽性率 12%)。うち 1 症例で、出生前および分娩時羊水中でトキソプラズマ PCR が陽性だった。その新生児は、脳内石灰化を認めたが、臍帯血 PCR と IgM は陰性で、髄液 PCR も陰性であった。本症例妊婦の IgG avidity 値は、23% (28 週)であった。

以上の結果から、トキソプラズマ IgG avidity 値が 25-30%未満で、急性感染症が疑われる。また、羊水 PCR 陽性は、先天性トキソプラズマ症の診断マーカーとして有用と考えられた。したがって、トキソプラズマ感染疑いの妊婦において、IgG avidity と PCR を用いた妊娠・新生児管理は有用と考えられた。

【研究協力者】

山田 秀人

北海道大学大学院医学研究科

山田 俊

北海道大学病院周産母子センター

長 和俊

北海道大学病院周産母子センター

太田智佳子

北海道大学病院周産母子センター

は時に、慢性感染にいたり、脳や筋肉内にシストが形成される。

先天性トキソプラズマ症では、胎児・新生児の水頭症、網脈絡膜炎、脳内石灰化、精神神経・運動障害が、典型的な 4 大症状とされる。感染時期により、胎児への感染率と症状が異なる。妊娠 6 ヶ月以前の初感染では、通常、胎児感染は認められず、妊娠 14 週以前では、10%以下の胎児感染率であるが、流死産や重度な症状を呈する。妊娠 15-30 週では、20%の胎児感染率で、不顕性や軽度症状が多い。妊娠 31 週以降では、65%の胎児感染率だが、不顕性が多い。不顕性感染児では、出生時血清学的異常のみが認められるが、その 82%が小児期から 20 歳までに網脈絡膜炎を発症する。

今日まで、母体血中トキソプラズマ IgM の有無

A. 研究目的

先天性トキソプラズマ症は、妊婦が原虫の *toxoplasma gondii* をシストないしオーシストの形態で経口摂取し経胎盤性に児に感染することによって発症する。生肉・レバー摂食、ネコ科動物の糞便、土いじりなどが感染リスクである。母体

によって初感染時期が判断されてきた。しかしながら、近年、数ヶ月から数年間も IgM が陽性な persistent IgM の症例が存在することが知られてきたため、必ずしも IgM の有無によって感染時期を正確に推定することはできないと言える。また、国内では、PCR 法によるトキソプラズマ検査が可能な施設は極めて限られている。

本研究の目的は、初感染時期を判断するために有用とされるトキソプラズマ IgG avidity 検査とトキソプラズマ PCR 検査法を新たに確立し、臨床応用することによって、先天性トキソプラズマ症の管理方針を新たに作成することである。

B. 研究方法

- 1) 2004 年の北海道における地域別の抗体陽性率（HA 抗体、IgM）を調べ、比較検討した。
- 2) 前方視的研究として、妊娠初期にトキソプラズマ抗体（HA）が陽性で、かつ IgM 抗体が陽性の妊婦に対して、同意を得て母体血トキソプラズマ IgG avidity を測定（IDL）した。また、母体血、羊水、出生時の臍帯血を採取し、PCR 法（Nested PCR）でトキソプラズマの有無を検討（札幌ジェネティックラボ）した。新生児感染の有無を調べた。

（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において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) 妊婦における HA 抗体陽性率と HA 抗体陽性者中の IgM 陽性率は、以下の通りであった。札幌東豊病院（2.7%、13%）、NTT 東日本札幌病院（3.9%、27%）、帯広協会病院（5.0%、18%）、市立室蘭病院（4.2%、9.1%）であっ

た。妊婦において初感染が疑われる IgM 陽性者の率は、各々、0.4%、1.1%、0.9%、0.4% と計算された。したがって、これらの地域では、1000 妊婦中、4～11 人に初感染が疑われ、精査・治療対象となり得ることが判明した。

- 2) 現在まで、HA 抗体陽性かつ IgM 陽性の 25 妊婦がエントリーし、うち 11 人で分娩が終了した。25 妊婦において、トキソプラズマ IgG avidity 値は、3～80%を示した。

Nested PCR 法では、検体あたり数～10 ゲノムコピーで診断が可能で、30 例の陰性コントロールでは、すべて陰性であった。3 症例において、母体血トキソプラズマ PCR が陽性であった（陽性率 12%）。うち 1 症例で、出生前および分娩時羊水中でトキソプラズマ PCR が陽性だった。その新生児は、脳内石灰化を認めたが、臍帯血 PCR と IgM は陰性で、髄液 PCR も陰性であった。本症例妊婦の IgG avidity 値は、23%（28 週）であった。

D. 考案

以上の結果から、トキソプラズマ IgG avidity 値が 25～30%未満で、急性感染症が疑われると考えられた。

また、羊水 PCR 陽性は、先天性トキソプラズマ症の診断マーカーとして有用と考えられた。IgG avidity 高値でかつ母体血 PCR 陽性が 2 例存在した。これは、トキソプラズマの慢性（持続）感染を示唆する結果かもしれない。

トキソプラズマ感染疑いの妊婦において、IgG avidity と PCR を用いた妊娠・新生児管理は有用と考えられた。

E. 結論

これまでの結果から、トキソプラズマ感染スクリーニング法として、HA 抗体陽性者で IgM 陽性者は、IgG avidity 測定を実施し、25～30%未満では初感染が疑われるため、アセチルスピラマイシン治療が必要と考えられる。30～35%以上では、既往（慢性）感染が疑われる。

また、母体血ないし羊水 PCR 陽性者においてもアセチルスピラマイシンやファンシダールを用いた治療が必要と推察された。

PCR 法はさらに、新生児感染症の診断に有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. (2005) Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* 31(3),334-345.

Kobashi G, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ohta K, Fujimoto S, Minakami H, Yamada H. (2005) *MTHFR* C677T polymorphism and Leiden mutation of factor V are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women. *Semin Thromb Hemost* 31(3),266-271.

Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K. (2005) Insertion/ deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in Japanese patients. *Semin Thromb Hemost* 31(3),346-350.

Kobashi G, Ohta K, Shido K, Hata A, Yamada H, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K. (2005) The egogram is a potent, independent risk factor for hypertension in pregnancy. *Semin Thromb Hemost* 31(3),302-306.

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Wada S, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H. (2005) Failure of thromboprophylaxis in pregnancy caused by dual deficiencies of protein S and protein C. *Semin. Thromb. Hemost.* 31(3), 261-265.

Morikawa M, Cho K, Kataoka S, Kato EH, Yamada T, Yamada H, Minakami H. (2005) Magnetic resonance image findings of placental lake: report of two cases. *Prenat Diagn* 25(3), 250-252.

Yamada H, Morikawa M. (2005) Recurrent miscarriage and embryonic loss (letter to the editor). *Hum Reprod* 20, 2036-2037.

Morikawa M, Yamada T, Kataoka S, Cho K, Yamada H, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H. (2005) Changes in antithrombin activity and platelet counts in the late stage of twin and triplet pregnancies. *Semin Thromb Hemost* 31(3), 290-296.

Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H. (2005) Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype. *Mol Human Reprod* 11(6), 451-457.

Yamada H, Cho K, Yamada T, Minakami H. (2005) Early-onset group B streptococcal neonatal infection in the Hokkaido University Hospital during the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Journal of the Hokkaido Obstetrical and Gynecological Society* 48(1), 20-22.

Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. (2006) Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasma in early pregnancy. *J Clin Microbiol* 44(1), 51-55.

Morikawa M, Yamada T, Yamada H, Cho K, Minakami H. Prenatal diagnosis and therapy of persistent cloaca : a case report. *Fetal Diagn*

Ther (in press)

Morikawa M, Yamada H, Yamada T, Minakami H. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on the uterine arteriovenous malformation. *Obstet Gynecol*(in press)

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（2005）脊髄損傷合併妊娠の1例。周産期医学 35、427-430。

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（2005）胎児尿管遺残の1例。周産期医学 35、875-877。

山田秀人（2005）妊娠・出産にかかわる疾患の治療と注意点—不育症・習慣流産—「妊産婦と薬物治療—EBM時代に対応した必須知識」。臨床婦人科産科 59(10)、625-627。

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、水上尚典（2005）妊娠中毒症と抗リン脂質抗体、特集：抗リン脂質抗体症候群、産婦人科の実際 54、567-578。

山田秀人（2005）血液凝固異常合併妊娠の管理、「産婦人科の実際ハイリスク合併妊婦の増加を考える—キャリアオーバー疾患管理のポイント」産婦人科の実際、54、1235-1248。

山田秀人、島田茂樹、森川 守、西田竜太郎、武田真光、水上尚典（2005）不育症と免疫グロブリン療法。産婦人科治療 91、169-177。

長 和俊、岡嶋 覚、内田雅也、上田恵子、小西祥平、山田 俊、山田秀人、水上尚典（2005）慢性肺障害児の栄養管理。周産期医学 35、571-574。

山田秀人（2005）前期破水。今日の治療指針 2005版、山口 徹、北原光夫編、医学書院、東京、894。

2. 学会発表

Yamada H. (2005) Immunologic/ Genetic Background and Immunoglobulin Therapy in Recurrent Miscarriage. 3rd Annual Meeting of Youngnam Infertility Society. April 23, Daegu, Korea (招請特別講演).

Yamada H. (2005) Genetic/ Immunologic Background and Immunoglobulin Therapy in Recurrent Miscarriage. 1st International symposium on declining birthrate and aging society. October 14-16, Sapporo, (シンポジウム)

山田秀人、山田 俊、長 和俊、水上尚典（2005）早産と前期破水のオーバービュー「早産をめぐる諸問題」。第18回実地医家と助産師のための周産期セミナー（シンポジウム）。7月31日、札幌。

山田秀人、小橋 元、渥美達也、太田智佳子、敦賀律子、平山恵美、太田薫里、西田竜太郎、小池隆夫、水上尚典（2005）妊婦抗リン脂質抗体スクリーニングによる産科異常の前方視的関連解析。第20回日本生殖免疫学会（シンポジウム）。12月2-3日、守口。

山田秀人（2005）免疫グロブリンを用いた先天性CMV感染症と先天性パルボB19ウイルス感染症の治療経験。第1回免疫グロブリン胎児医療研究会、7月29日、小樽

山田秀人、松田秀雄、上塘正人、丸山有子、佐藤朗、松岡 隆、古谷健一、八重樫信生、水上尚典（2005）免疫グロブリンを用いた胎児治療、特に母子ウイルス感染治療の可能性。第3回北海道周産期談話会。9月17日、札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究

分担研究者 遠藤 俊明 札幌医科大学 助教授
共同研究者 斉藤 豪 札幌医科大学 教授
共同研究者 林 卓宏 札幌医科大学 講師

研究要旨

妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いて 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)添加実験を行い、m-RNA および蛋白レベルでの glucose transport protein (GLUT)発現につき検討した。JEG-3 細胞株 10nM TCDD 添加 24 時間後に、一時的ではあるが GLUT4 m-RNA および蛋白発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

環境ホルモンの一種である 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は、その摂取によりベトナム戦争軍人の統計から、2 型糖尿病との関連が報告されている。また、血中の TCDD が高濃度の群では、糖尿病を発症しなかった場合でも高インスリン血症を示し、いわゆる TCDD によるインスリン抵抗性の存在が推測されている。

現在我々の生活においても TCDD は日常的に食物から経口摂取されており、血中脂質 TCDD 濃度は 2.5 ppt ときには 10ppt を超える場合もあるとされている。10-15 ppt を超えると、インスリン抵抗性の出現可能性が高まると報告されている。

胎盤は胎児の発育のために、母体から栄養分および酸素を運搬する重要な臓器であるが、特に母体糖分は胎児にとって重要な栄養源である。同時に、胎盤の機能を維持するためには大量の糖分を必要とすることから、胎盤は糖要求性の高い臓器であるといえる。マウスの実験では、TCDD を投与することによりグリコーゲンの生成が増加し胎盤の胎児への糖輸送能が低下、遅れて glucose transport protein(GLUT 3) m-RNA の発現が変化し、胎盤への糖取り込みも変化することによ

り胎盤の糖輸送能のかく乱を生じて、最終的に胎児の発育異常や子宮内死亡に至ると報告されている。従ってヒト妊婦の場合でも、日常的に TCDD の暴露を受けた場合に、胎盤の糖輸送能に変化を及ぼし、胎児の発育状況に悪影響を与える可能性が考えられる。

今回我々は、妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いて TCDD 添加実験を行い、m-RNA および蛋白レベルでの GLUT 発現につき検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養法

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3 を 10% fetal bovine serum 加 RPMI1640 にて培養。単離浮遊細胞を 10cm ディッシュに 1.0×10^5 cells 37°C、5% CO₂ インキュベータ内で 2 日間培養後、DMSO に溶解した TCDD を濃度 10nM 添加し培養 0、24、48 時間後の上清ならびに細胞を回収した。なお、コントロールとして同量の DMSO を加えた培養液で同様に添加・培養した。

2. 上清 β -hCG 測定

培養細胞の分化程度を決定するため、 β -hCG RIA キットを用いて得られた上清の濃度を測定した。

3. RT-PCR

培養細胞を ISOGEN にて処置し、その溶解液から total RNA を採取。これら 5 μ g RNA から DNase 1 による m-RNA 精製後、random oligodeoxynucleotide primers を用い一本鎖 cDNA を作成し PCR を施行した。PCR 条件は 95°C、5 min の後、95°C、60°C、72°C それぞれ 30 sec を 35 サイクルの後 72°C、7 min とした。

今回用いたプライマーは、以下のごとくである。

GLUT1 (NM006516)

L: tcaactgtgctcctggttctg

R: cctgtgctcctgagagatcc

product size 233bp

GLUT3 (NM006931)

L: accggcttctcattacctt

R: aggctcgatgctgttcac

product size 159bp

GLUT4 (NM001042)

L: cttcgagacagcaggggtag

R: aggagcagagccacagtc

product size 180bp

GLUT9 (NM001001290)

L: tacaacctgtcgggtggtgaa

R: gcagaaattgcaaaccatt

product size 236bp

GLUT12 (NM145176)

L: acatcgcagagattgctcct

R: tgcaattgcttgcaaaact

product size 179bp

また、housekeeping 遺伝子として β アクチンを用いた。

4. Western analysis

超音波破碎を行った細胞溶解から蛋白質を抽出し 1 xSDS サンプルバッファーに溶解した 100 μ g を電気泳動、膜トランスファーの後 GLUT 各種抗体を作用させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体を作用し、 β アクチンを基準に NIH image にて画像解析した。

C. 研究結果

1. 細胞増殖および β hCG 分泌量

JAR 細胞株では、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後には約 2.7 倍、48 時間後には約 5 倍の細胞増殖を認めた(図 1)。JEG-3 細胞株でも同様に、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後に約 2 倍、添加 48 時間後に約 4 倍の細胞増殖を認めた(図 2)。以上より JAR および JEG-3 細胞株どちらも TCDD 添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。

次に、JAR 細胞株の細胞数 105 個あたりの β hCG 分泌量を検討したところ TCDD 1nM 添加 24 時間後でコントロールと比較し 1.4 倍、TCDD 10nM 添加では 1.6 倍の分泌量増加を認めた。しかしながら 48 時間後では、いずれの濃度においてもコントロールと同様の分泌量となった(図 3)。JEG-3 細胞株ではいずれの濃度・添加時間でもコントロールと比較し変化はなかった(data not shown)。

2. GLUT1、3 および 12 m-RNA の発現

JAR、JEG-3 細胞株ともに、GLUT1 および 3 m-RNA 発現を認め、TCDD 添加による m-RNA 発現変化は認めなかった(図 4、5、6)。

3. GLUT4 m-RNA の発現

JEG-3 細胞株において、TCDD 1 および 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めた。しかし、TCDD 添加 48 時間後では、どちらの濃度においても control と同程度の GLUT4 m-RNA 発現に復帰した(図 7)。

4. GLUT9 m-RNA の発現

JAR 細胞株では GLUT9 m-RNA 発現は認めなかったが、JEG-3 細胞株ではいずれの条件でも同様に発現を認めた(図 8)。

5. GLUT4 蛋白発現の検討

次に JEG-3 細胞株に絞って TCDD 添加による

GLUT4 蛋白発現を、免疫染色法を用いて検討した。GLUT4 m-RNA 発現と同様に、TCDD 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 蛋白発現の減弱を認めたが、添加 48 時間後には control と同程度の蛋白発現に復帰した。

D. 考 察

TCDD 添加による細胞増殖能の変化は JAR および JEG-3 両細胞株で認めなかったが、細胞あたりの β hCG 分泌量においては JAR 細胞株の添加 24 時間で増加を認めることから、TCDD は細胞増殖には影響がないものの細胞分化の面では一時的に分化促進に働く傾向のあることが示唆された。

JAR および JEG-3 両細胞株の GLUT1、3 および 12 m-RNA 発現において、今回用いた TCDD 濃度・作用時間ではその発現に変化のないことから、TCDD は今回実験に用いた濃度ではこれら GLUT に対する作用はないと考えられた。GLUT9 m-RNA 発現において、細胞株による発現の違いが示唆された。

一方で、JEG-3 細胞株において、TCDD1 および 10nM 添加 24 時間後に一時的に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めたことより、TCDD 添加によるインスリン抵抗性の誘導が示唆された。GLUT4 蛋白発現も同様の変化を認めている。しかし、TCDD 添加 48 時間後では、どちらの濃度においても control と同程度の GLUT4 m-RNA および蛋白発現に復帰したことから、インスリン抵抗性の誘導は一時的なものと推測された。

E. 結 論

TCDD は、増殖・分化能に影響のない低濃度であっても、胎盤の糖取り込みに影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 準備中

E. 知的所有権の取得状況

なし

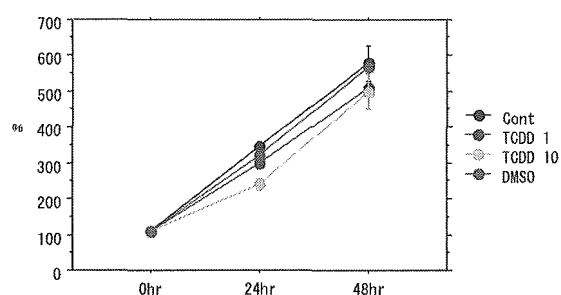


図1. JAR 細胞増殖曲線

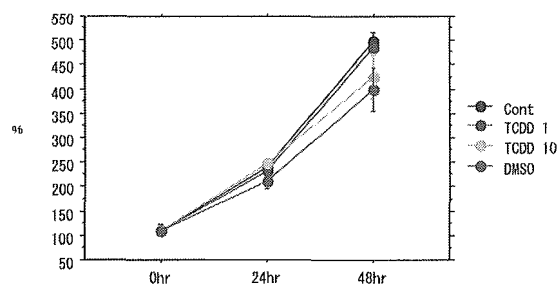


図2. JEG-3細胞増殖曲線

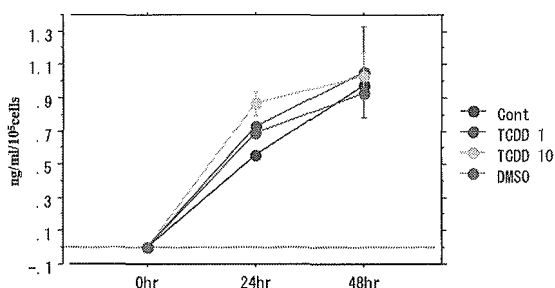


図3. JAR 10⁵細胞あたりの β -hCG分泌量

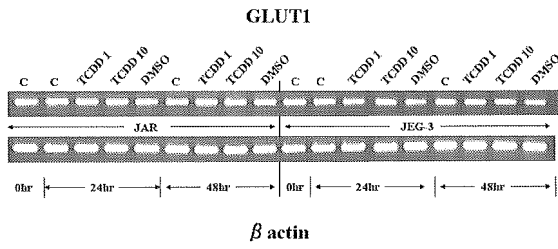


図4. TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT1発現の経時的変化

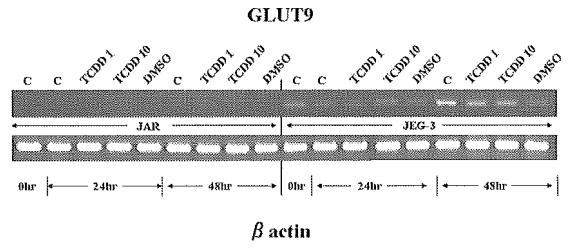


図8. TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT9発現の経時的変化

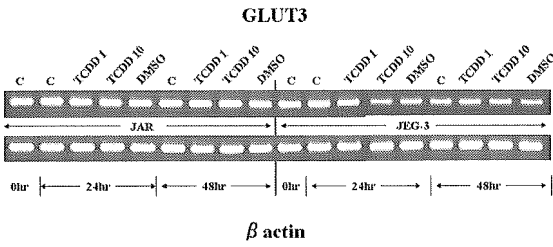


図5. TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT3発現の経時的変化

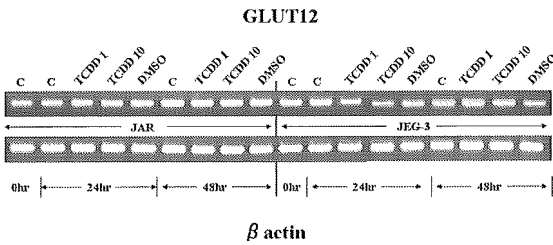


図6. TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT12発現の経時的変化

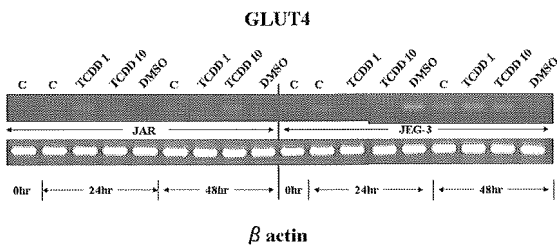


図7. TCDD添加JARおよびJEG-3細胞におけるGLUT4発現の経時的変化