

## 分担研究報告 22

## 分担課題:化学妊娠の発生頻度と患者背景に関する前方視的検討

研究分担者 福井 淳史 弘前大学産科婦人科学助教

### 研究要旨

化学妊娠の発生頻度と患者背景を、不妊外来に通院している患者を対象として前方視的に検討した。45 例 184 周期のうち 15 例 17 周期(周期あたり 9.2%)に妊娠を確認した。このうち 4 例 4 周期(周期あたり 2.2%、妊娠あたり 23.5%)が化学妊娠に終わった。このうち 2 例が多嚢胞性卵巣症候群、1 例が原因不明不妊、1 例が抗リン脂質抗体陽性不育症であった。

### A. 研究目的

化学妊娠は、血中に hCG が検出されるにもかかわらず胎嚢が確認される臨床的妊娠徴候を確認できずに月経をみるものである。現在、臨床的妊娠からは除外されており、原因や発生頻度は不明である。

不育症患者の中には化学妊娠を繰り返すものもみられ、化学妊娠を臨床的妊娠として検査・治療をした方がよい場合もあると考えられる。化学妊娠を臨床的妊娠として取り扱うよう臨床指針を改めるためには、基礎的なデータを集め病態を把握する必要がある。

### B. 研究方法

弘前大学医学部附属病院産科婦人科不妊外来に定期的に通院している患者のうち、明らかな不妊原因を認めない subfertility、排卵因子以外は正常な多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)および不育症患者を対象とした。

月経発来予定日に尿 hCG 高感度定性試薬による自己検査を実施した。月経発来予定日は、LH サージあるいは hCG 投与の 15 日後、または基礎体温の高温相 14 日目とし、妊娠反応陽性例は尿検体と血液とで hCG を定量して妊娠を確認した。なお黄体補充には hCG を用いなかった。

(倫理面への配慮)

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

対象は 45 例 184 排卵周期であり、内訳は subfertility 18 例、PCOS 13 例、不育症 14 例であつ

た。妊娠(化学妊娠と臨床的妊娠)は 15 例 17 周期(周期あたり 9.2%)で成立した。このうち 4 例 4 周期は化学妊娠(周期あたり 2.2%)であり、臨床的妊娠は 11 例 13 周期(周期あたり 7.1%)であった。すなわち妊娠あたり 23.5%が化学妊娠であった。化学妊娠に終わった 4 例のうち 2 例が PCOS、1 例が subfertility、1 例が抗 PE 抗体陽性不育症であった。また臨床的妊娠における流産率は 7.6%(1/13)であった。

### D. 考察

一昨年度の生殖補助医療周期を対象とした後方視的検討でも、化学妊娠に終わった患者は subfertility と抗リン脂質抗体陽性者、そして流産の既往を持つものが多かった。昨年度・本年度の排卵周期で通常の性交によって成立した妊娠を対象とした前方視的検討では、血清 hCG が陽性となった周期のうち 23.5%もの妊娠が化学妊娠に終わっていることが明らかとなった。また患者背景には有意差を認めなかった。現時点は患者背景には差を認めていないが、何らかの背景が化学妊娠の原因となっている可能性もあり、詳細が検討が必要であると思われる。

### E. 結論

自然妊娠周期においても化学妊娠は高率に発生していることが明らかとなった。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 福井淳史, 他. 黄体中期子宮内膜および流産脱落膜 Natural Killer 細胞における Natural Cytotoxicity Receptors 発現. 日本受精着床学会雑誌 27 (1): 369-374, 2010
- 2) Lee SK, Fukui A, et al. Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women. J Immunol, 185: 756-762, 2010

### 2. 学会発表

- 1) Fukui A, et al. The expression of natural cytotoxicity receptors on natural killer cells from midsecretory endometrium and aborted decidua. Reproductive Medicine and Endocrinology, 7 (4): 265, 2010 (20<sup>th</sup> World Congress of Fertility and Sterility)
- 2) Fukui A, et al. The expression of natural cytotoxicity receptors and the NK cell cytokines production in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss and pregnancy induced hypertension. Reproductive Medicine and Endocrinology, 7 (4): 265, 2010 (20<sup>th</sup> World Congress of Fertility and Sterility)
- 3) Fukui A. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy losses, implantation failures or preeclampsia. J Reprod Immunol, 86 (2): 87, 2010 (8<sup>th</sup> European Society for Reproductive Immunology)
- 4) Fukui A. NK cell and its role in reproduction. Am J Reprod Immunol, 64 Suppl1: 1, 2010 (2<sup>nd</sup> International Conference on reproductive Immunology)

## 3. その他

なし

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lee SK, <u>Fukui A</u> , et al.	Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women	J Immunol	185	756-762	2010
<u>福井淳史</u> , 他	黄体中期子宮内膜および流産脱落膜Natural Killer細胞におけるNatural Cytotoxicity Receptors発現	日本受精着床学会雑誌	27 (1)	369-374	2010



## 分担研究報告 23

## 分担課題: 不育症症例に対する $\gamma$ グロブリン療法

研究分担者 福井 淳史 弘前大学産科婦人科学助教

### 研究要旨

NK 細胞活性が高値である不育症症例に対して妊娠成立すぐから $\gamma$ グロブリンを4週間毎に周期的投与した。NK 細胞活性高値である6例に1回 15g の $\gamma$ グロブリンを4週間毎に投与した。うち5例で分娩または妊娠継続となった。1例は染色体異常流産となった。NK 細胞活性高値例に対する $\gamma$ グロブリン周期的投与法は有効である可能性が示された。

### A. 研究目的

NK 細胞は末梢血や子宮内膜・脱落膜に存在し、子宮における免疫機構の維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。原因不明不育症と診断されるカップルの中にはNK 細胞活性が高値を示すものが見受けられ、細胞傷害性の増加が不育症の原因の一つである可能性が示唆されている。また妊娠では一般に T 細胞産生タイプ2サイトカインが有意となるT細胞のタイプ2シフトが認められるが、不育症患者にはT細胞のタイプ1シフトが起こるものがあることが知られている。

高レベルのタイプ1サイトカイン(Th1 シフト)はNK 細胞活性を高めることが知られており、これらが相まって流産となる可能性が考えられる。一方、 $\gamma$ グロブリンは Th1 シフトを抑制し、それによりNK 細胞活性を抑制することが知られている。そこでNK 細胞活性高値例に対する $\gamma$ グロブリン療法が有効であるかを明らかにすることを目的に検討を行った。

### B. 研究方法

弘前大学医学部附属病院産科婦人科外来に通院している不育症患者のうち、妊娠成立前にNK 細胞活性が高値(40%以上)であった6例を対象とした。

無月経あるいは妊娠反応が陽性になったら可及的速やかに来院してもらい、妊娠反応が陽性であることを確認のうえ、患者への十分な説明と同意のもと $\gamma$ グロブリン投与を開始した。なお $\gamma$ グロブリンは一回あたり15gを4週間に1度投与した。

### (倫理面への配慮)

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

NK 細胞活性が高値である不育症症例6例に対し周期的 $\gamma$ グロブリン療法を施行し、うち5例(83.3%)が分娩あるいは妊娠継続中である。1例(16.7%)が流産となったが絨毛染色体検査で染色体異常を認めた。また $\gamma$ グロブリン療法投与後にはNK 細胞活性値の低下を認めた。毎週NK 細胞活性を測定し得た症例をみると、 $\gamma$ グロブリン投与後3週間後に再びNK 細胞の上昇を認め、その翌週の $\gamma$ グロブリン再投与でNK 細胞活性の低下を認めている。

### D. 考察

NK 細胞活性高値は妊娠初期では流産に、また妊娠経過中を通じて妊娠高血圧症候群に関与している可能性があり、NK 細胞活性値をコントロールすることは生殖ロスを減じるための有効な手段の一つであると考えられる。 $\gamma$ グロブリン療法の半減期が約4週間であること、 $\gamma$ グロブリン投与によりNK 細胞活性が低下すること考慮するとまだ症例は少ないものの、4週間毎の周期的 $\gamma$ グロブリン療法は有効であると考えられた。

### E. 結論

NK 細胞活性高値例に対する妊娠成立後可及的速やかに投与開始される周期的 $\gamma$ グロブリン療法は原因不明不育症の中でNK 細胞活性が高値である症例に対して有効である可能性があると思われた。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 福井淳史, 他. 黄体中期子宮内膜および流産脱落膜 Natural Killer 細胞における Natural Cytotoxicity Receptors 発現. 日本受精着床学会雑誌 27 (1): 369-374, 2010
- 2) Lee SK, Fukui A, et al. Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women. J Immunol, 185: 756-762, 2010

2. 学会発表

- 1) Fukui A, et al. The expression of natural cytotoxicity receptors on natural killer cells from midsecretory endometrium and aborted decidua. Reproductive Medicine and Endocrinology, 7 (4): 265, 2010 (20<sup>th</sup> World Congress of Fertility and Sterility)
- 2) Fukui A, et al. The expression of natural cytotoxicity receptors and the NK cell cytokines production in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss and pregnancy induced hypertension. Reproductive Medicine and Endocrinology, 7 (4): 265, 2010 (20<sup>th</sup> World Congress of Fertility and Sterility)
- 3) Fukui A. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy losses, implantation failures or preeclampsia. J Reprod Immunol, 86 (2): 87, 2010 (8<sup>th</sup> European Society for Reproductive Immunology)
- 4) Fukui A. NK cell and its role in reproduction. Am J Reprod Immunol, 64 Suppl1: 1, 2010 (2<sup>nd</sup> International Conference on reproductive Immunology)

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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lee SK, <u>Fukui A</u> , et al.	Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women	J Immunol	185	756-762	2010
<u>福井淳史</u> , 他	黄体中期子宮内膜および流産脱落膜Natural Killer細胞における Natural Cytotoxicity Receptors発現	日本受精着床学会雑誌	27 (1)	369-374	2010



## 分担研究報告 24

分担課題: 不育症患者の血小板機能の検討 -レーザー散乱粒子計測法を用いた検討-

研究分担者 杉 俊隆 東海大学医学部産婦人科非常勤教授

研究要旨

抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体や第 XII 因子欠乏症などは不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。今回我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討したところ、抗 PE 抗体および第 XII 因子欠乏と、血小板凝集能亢進との間に有意な相関が認められた。レーザー散乱粒子計測法による血小板凝集能検査は、不育症の risk factor の病原性解明に有用であるのみならず、不育症のスクリーニング検査として有用であると思われた。

A. 研究目的

我々は、新たな不育症の risk factor として抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体と抗第 XII 因子抗体を既に報告してきたが、これらの自己抗体が不育症の原因であるのかを証明するために、疫学的研究と平行して基礎的研究を施行した。不育症患者の中で、抗 PE 抗体陽性者の約 1/3 に第 XII 因子活性低下があり、その多くは抗第 XII 因子抗体を持つ事を我々は既に報告した。抗 PE 抗体陽性者の中でも、第 XII 因子活性低下をもつ症例がもっとも流産率が高いと考えられ、抗 PE 抗体と抗第 XII 因子抗体の関係を追求する事が不育症の病原性解明に重要と思われる。抗 PE 抗体や第 XII 因子欠乏症など thrombophilia は不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。我々は、抗 PE 抗体が *in vitro* で血小板凝集能を亢進させることは既に報告したが、従来の aggregometer では感度が悪く、*in vivo* の変化を捉える事が困難であった。

B. 研究方法

今回我々は、インフォームドコンセントのもとでレーザー散乱粒子計測法 (PA-20, KOWA) を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。レー

ザー散乱粒子計測法は、フローサイトメーターに応用されている方法であり、従来の aggregometer の 100 倍感度が良いとされている。攪拌のみで生じる血小板の自然凝集を従来の aggregometer で検出することはまれであるが、本方法により多くの不育症患者に自然凝集が見い出された。

(倫理面への配慮)

本臨床疫学研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づく倫理的原則を遵守して実施した。疫学研究に関する倫理指針の第 3 インフォームド・コンセント等によれば、本研究は既存資料のみを用いる観察研究に相当するため、口頭のみでの同意とした。また、研究を実施していること・内容・方法などに関する情報を広報し(ポスターの公示)、また、研究に参加したくない場合に拒否できる機会を設けた。

C. 研究結果

不育症患者 94 人中、自然凝集を認めたのは 40.4%であった。一方、正常対照群では 6.7%に自然凝集を認めた。さらに、自然凝集を中等度以上に認めた 51 人について検討すると、抗 PE 抗体陽性は 39.2%、第 XII 因子欠乏は 37.3%、抗 PE 抗体陽性 and/or 第 XII 因子欠乏は 64.7%に認められ、自然凝集の無い 80 人の各陽性率(それぞれ、28.8%、20.0%、40.0%)に比較して高率であり、抗 PE 抗体陽性 and/or 第 XII 因子欠乏群では、統計学的に有意(64.7% vs 40.0%;  $p=0.006$ )であった。

#### D. 考察

我々はすでに、不育症患者のもつ抗第 XII 因子抗体の 76.5%が第 XII 因子の heavy chain の N 末端のアミノ酸 1-30 を認識する事を報告した。この部位は、第 XII 因子の血小板 glycoprotein Ib  $\alpha$  への結合部位である。高分子キニノーゲンと第 XII 因子は、どちらも glycoprotein Ib  $\alpha$  の細胞外サブユニットである glycocalicin に競合的に結合し、トロンビンによる血小板活性化を阻害する事が報告されている。したがって、抗第 XII 因子抗体は、第 XII 因子が血小板の GP Ib-IX-V に結合する事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。ちなみに、高分子キニノーゲンの血小板への結合部位は、キニノーゲン、ドメイン 3 の Cys333-Lys345 (CNA13)であり、抗 PE 抗体の認識部位と同一である事が分かっている。第 XII 因子欠乏不育症患者の 32.4%に抗 PE 抗体が陽性であり、抗第 XII 因子抗体と抗 PE 抗体は、非常に類似した抗体である事を、我々は既に平成 20 年度の合成ペプチドを用いた検討で報告した。まとめると、不育症患者の持つ第 XII 因子とキニノーゲンに対する自己抗体(抗 PE 抗体)は、第 XII 因子とキニノーゲンが血小板の GP Ib-IX-V に結合してトロンビンによる血小板活性化を防ぐ事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。今回、我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を調べたところ、抗 PE 抗体陽性+第 XII 因子欠乏の患者で亢進がみられ、これらの患者で *in vivo*でも血小板が活性化している事が示唆された。

#### E. 結論

不育症患者の血小板凝集能は *in vivo*でも亢進している傾向が示唆された。中でも、抗 PE 抗体および第 XII 因子欠乏と、血小板凝集能亢進との間に有意な相関が認められた。一方で抗カルジオリピン抗体やプロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症は、血小板を介さない病原性がある事が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 杉 俊隆。抗 phosphatidylethanolamine 抗体と抗第 XII 因子抗体。医学のあゆみ; 233: 169-174, 2010.
- 2) 杉 俊隆。習慣流産と血液凝固阻害薬。産科と婦人科; 77: 925-930, 2010.
- 3) 杉 俊隆。不育症。講義録 産科婦人科学。編集 石原 理、柴原浩章、三上幹男、板倉敦夫。メジカルビュー社。244-245。2010.
- 4) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群。日産婦誌; 62: N150-154, 2010.
- 5) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体。生殖医療ガイドライン 2010。日本生殖医学会編。金原出版。278-280, 2010.
- 6) 杉 俊隆。不育症とは。月刊地域保健。東京法規出版。2010.6.38-43.
- 7) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群と静脈血栓塞栓症。臨床婦人科産科。(in press)
- 8) Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, Kitaori T, Katano K, Suzuki S, Sugiura-Ogasawara M. Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be an independent risk factor for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol; 85: 186-192, 2010.
- 9) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群の診療。産婦人科治療。2011 年増刊大特集。不妊診療のすべて。(in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群。第 62 回日本産科婦人科学会。生涯研修プログラム。クリニカルカンファレンス4。不育症。東京国際フォーラム。2010.
- 2) 杉 俊隆。不育症診療 Up To Date。第24回横浜市西部地域産婦人科研究会。特別講演。2010.
- 3) Sugi T. Spontaneous small platelet aggregate formation in patients with recurrent pregnancy losses and its association with thrombophilia. International symposium for immunology of reproduction. Icho Kaikan, Osaka University. 2010.
- 4) 杉 俊隆。流産、習慣流産、不育症について。第18回横浜臨床医学会。2010.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
杉 俊隆	不育症	石原 理、 柴原浩章、 三上幹男、 板倉敦夫	講義録 産科 婦人科学	メジカルビ ュー社	東京	2010	244-245
杉 俊隆	抗リン脂質抗体	日本生殖 医学会	生殖医療ガイ ドライン2010	金原出版	東京	2010	278-280

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
杉 俊隆	抗phosphatidylethanolamine抗体 と抗第XII因子抗体	医学のあゆみ	233	169-174	2010
杉 俊隆	習慣流産と血液凝固阻害薬	産科と婦人科	77	925-930	2010
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群	日産婦誌	62	N150-154	2010
杉 俊隆	不育症とは	月刊地域保健	6	38-43	2010
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群と静脈血 栓塞栓症	臨床婦人科産科			In press
Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, Kitaori T, Katano K, Suzuki S, Sugiura-Ogasawara M.	Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be an independent risk factor for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss.	J Reprod Immunol	85	186-192	2010
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群の診療	産婦人科治療			In press



分担研究報告 25



## 分担課題: 不育症に係わる遺伝要因、環境要因及びそれらの交互作用

研究分担者 佐田 文宏 国立保健医療科学院疫学部社会疫学室 室長  
山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科産科婦人科学講座 教授

### 研究要旨

原因不明の不育症は、一種の生活習慣病とみなされ、遺伝要因に環境要因が加わり、交互に影響し合うことにより発症するものと考えられている。環境要因を評価しようとする場合、交絡要因をコントロールするのが難しく、正確な曝露量を評価したデータを取るものが困難であるため、一致した結果は得られていない。しかしながら、喫煙、コカイン服用、中等度の飲酒、カフェイン摂取、肥満は不育症と関連があるという報告がある。今年度は、生活習慣と関連の深い遺伝子多型と不育症との関連を症例対照研究の形で検討した。2001～2006年に北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性(n=116)と産後外来を受診し、流産、子宮内膜症、子宮腺筋症、子宮内発育遅延等の既往のない健常経産婦(n=306)に対し、葉酸やアルコール代謝等に係るアミノ酸置換を伴う8種類の一塩基多型(SNPs)、即ち *MTHFR* 遺伝子 rs1801133(Ala222Val)、rs1801131(Glu429Ala)、*MTR* 遺伝子 rs1805087(Asp919Gly)、*PPARG* 遺伝子 rs1801282(Pro12Ala)、*ADH1B* 遺伝子 rs1229984(His48Arg)、*MTRR* 遺伝子 rs10380(His595Try)、*ADRB3* 遺伝子 rs4994(Trp64Arg) 及び *ALDH2* 遺伝子 rs671(Glu504Lys) を allelic discrimination (TaqMan) assay により、遺伝子型を解析した。喫煙・飲酒習慣を考慮しない場合には、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 の TT 型、*MTR* 遺伝子 rs1805087 の AG 型及び *ALDH2* 遺伝子 rs671 の AA 型において、不育症のリスクが約 0.3～0.4 倍に低下した。喫煙・飲酒習慣を考慮しても、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 の TT 型及び *MTR* 遺伝子 rs1805087 の AG 型において、不育症リスクは、依然、有意に低下していたが、*ALDH2* 遺伝子 rs671 の AA 型は、有意なリスクの変化はみられなかった。本研究により、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 及び *MTR* 遺伝子 rs1805087 は、喫煙・飲酒習慣にかかわらず、不育症リスクが低下することが示唆された。

### A. 研究目的

不育症の病因としては、転座や子宮形態異常のような原因の明白なものを除けば、一種の生活習慣病とみなされ、遺伝要因に環境要因が加わり、交互に影響し合うことにより発症するものと考えられている。環境要因としては、食事・生活習慣、居住環境およびストレス要因などが不育症のリスクに関与することに関心が持たれている。このような環境要因を評価しようとする場合、交絡要因をコントロールするのが難しく、正確な曝露量を評価したデータを取るものが困難で

あるため、一致した結果は得られていない(1)。しかしながら、いくつかの環境要因が妊娠アウトカムに影響を与えることは報告されてきた(1-6)。喫煙は、栄養膜機能に悪影響を及ぼし、量依存的に不育症のリスクを上昇させる(2)。コカイン服用は喫煙とともに、不育症のリスクを上昇させる(3)。中等度の飲酒は、妊娠初期の不育症のリスクを上昇させる(4)。カフェイン摂取も量依存的に不育症リスクとの関連が見られ、1日当たり300mg以上の摂取で不育症リスクを有意に上昇させる(5)。BMI 30kg/m<sup>2</sup>を超える肥満は、

妊娠初期の流産、不育症のリスクを上昇させる(6)。本研究では、生活習慣と関連の深い、葉酸やアルコール代謝等に係る遺伝子多型が、不育症に及ぼす影響を明らかにすることを目的に実施した。

## B. 研究方法

2001~2006年に北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性(n=116)と産後外来を受診し、流産、子宮内膜症、子宮腺筋症、子宮内発育遅延等の既往のない健常経産婦(n=306)に対し、食事・生活習慣、居住環境、職業、妊娠初期の健康状態、産科既往歴、ストレスと関連した質問紙調査を実施し、採血を行った。葉酸やアルコール代謝等に係るアミノ酸置換を伴う8種類の一塩基多型(SNPs)、即ち *MTHFR* 遺伝子 rs1801133 (Ala222Val)、rs1801131 (Glu429Ala)、*MTR* 遺伝子 rs1805087 (Asp919Gly)、*PPARG* 遺伝子 rs1801282 (Pro12Ala)、*ADH1B* 遺伝子 rs1229984 (His48Arg)、*MTRR* 遺伝子 rs10380 (His595Try)、*ADRB3* 遺伝子 rs4994 (Trp64Arg) 及び *ALDH2* 遺伝子 rs671 (Glu504Lys) を allelic discrimination (TaqMan) assay により、遺伝子型を解析した(表1)。不育症をアウトカムとして、母親の年齢及び喫煙・飲酒習慣で調整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 17.0 を用いた。

### (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及び国立保健医療科学院において承認のうえ実施した。インフォームドコンセントは「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」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。

## C. 研究結果

不育症例と対照の *MTHFR* 遺伝子 rs1801133、rs1801131、*MTR* 遺伝子 rs1805087、*PPARG* 遺伝子 rs1801282、*ADH1B* 遺伝子 rs1229984、*MTRR* 遺伝子 rs10380、*ADRB3* 遺伝子 rs4994 及び *ALDH2* 遺伝子 rs671 のアレル頻度及び遺伝子型頻度を図1に示す。不育症例-対照間の *MTHFR* 遺伝子 rs1801133 及び *ALDH2* 遺伝子 rs671 のアレル頻度に有意差がみられた( $P < 0.05$ )。また、不育症例-対照間の *MTHFR* 遺伝子 rs1801133、*MTR* 遺伝子 rs1805087 及び *ALDH2*

遺伝子 rs671 の遺伝子型頻度に有意差がみられた( $P < 0.05$ )。

喫煙・飲酒習慣を考慮しない場合には、各 SNP における遺伝子型のアレル別、優性遺伝型モデル及び劣性遺伝型モデルのオッズ比を図2に示す。*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 の TT 型及び劣性遺伝型モデルでは、不育症のリスクが、各々0.31 倍(95%信頼区間 0.13-0.75)及び0.35 倍(95%信頼区間 0.15-0.81)に低下した。また、*MTR* 遺伝子 rs1805087 の AG 型では、不育症のリスクが0.47 倍(95%信頼区間 0.26-0.85)に低下した。さらに、*ALDH2* 遺伝子 rs671 の AA 型及び劣性遺伝型モデルでは、不育症のリスクが、各々0.44 倍(95%信頼区間 0.21-0.93)及び0.41 倍(95%信頼区間 0.20-0.84)に低下した。

喫煙・飲酒習慣を考慮した場合には、各 SNP における遺伝子型のアレル別、優性遺伝型モデル及び劣性遺伝型モデルのオッズ比を図3に示す。*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 の TT 型、優性遺伝型モデル及び劣性遺伝型モデルでは、不育症のリスクが、各々0.23 倍(95%信頼区間 0.07-0.71)、0.51 倍(95%信頼区間 0.27-0.95)及び0.28 倍(95%信頼区間 0.10-0.83)に低下した。また、*MTR* 遺伝子 rs1805087 の AG 型及び優性遺伝型モデルでは、不育症のリスクが、各々0.36 倍(95%信頼区間 0.18-0.75)及び0.44 倍(95%信頼区間 0.23-0.85)に低下した。一方、*ALDH2* 遺伝子 rs671 では、不育症の有意なリスクの変化はみられなかった。

## D. 考察

これまで、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 と不育症リスクに関しては、多くの報告があるが、一致した結果は得られていない(7-11)。メタアナリシスによって、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 は、中国人以外には不育症のリスク要因とはならないことが示されている(11)。日本人においても、不育症のリスク要因とはならないとする報告がある(9, 10)。一方、*MTR* 遺伝子 rs1805087 及び *ALDH2* 遺伝子 rs671 と不育症リスクとの関連に関しては、これまで報告がない。前者は *MTHFR* 遺伝子 rs1801133 とともに、妊婦の血中ホモシステイン濃度の予測変数としての役割を果たしていると報告がある(12)。また、中等度の飲酒は、妊娠初期の不育症のリスクを上昇させると報告がある(4)。今後、メチオニン-ホモシステイン及びアルコール-アルデヒド代謝系等を中心に、生活習慣を含めて詳細に検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

本研究では、*MTHFR* 遺伝子 rs1801133 及び *MTR*

遺伝子 rs1805087 において、喫煙・飲酒習慣にかかわらず、不育症リスクを低下させることが示唆された。

[参考文献]

1. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006 Aug 12;368(9535):601-11. Review.
2. Lindbohm ML, Sallmén M, Taskinen H. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health*. 2002;28 Suppl 2:84-96.
3. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, Kline J. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 1999 Feb 4;340(5):333-9.
4. Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol*. 2002 Jan-Feb;37(1):87-92.
5. Rasch V. Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003 Feb;82(2):182-8.
6. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod*. 2004 Jul;19(7):1644-6.
7. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz J, Abramovici H. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Jul;181(1):126-30.
8. Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol*. 2002 Apr;99(4):614-9.
9. Makino A, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N, Suzumori K. No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2004 Jul;52(1):60-6.
10. Kobashi G, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ohta K, Fujimoto S, Minakami H, Yamada H.

MTHFR C677T Polymorphism and factor V Leiden mutation are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Jun;31(3):266-71.

11. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006 Dec;86(6):1716-22.
12. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, Braga RC, Hirata RD, Hirata MH, Sampaio-Neto LF, Allen RH, Guerra-Shinohara EM. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr*. 2008 Aug;62(8):1010-21.

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 天野真理子, 森實真由美, 山田秀人. 不育と遺伝因子. *産婦人科の実際* 2010;59(12):1969-83.
- 2) 佐田文宏, 山田秀人. 早産と遺伝因子. *産婦人科の実際* 2010;59(12):1991-2000.

2. 学会発表

- 1) Sata F, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Nakao H, Imai H. Maternal smoking and alcohol use during pregnancy, common metabolic polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. 2010 Joint Conference of International Society of Exposure Science & International Society for Environmental Epidemiology, Seoul, Korea, August 28 - September 1, 2010.
- 2) 佐田文宏, 江藤亜紀子, 中尾裕之, 今井博久, 水上尚典, 岸 玲子, 山田秀人. 不育症に係わる遺伝要因、環境要因及びそれらの交互作用. 第 21 回日本疫学会学術総会, 札幌, 平成 23 年 1 月 21, 22 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表1 解析した一塩基多型(SNP)

遺伝子	シンボル	rs 番号	染色体	座位
methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MTHFR</i>	rs1801133	1	Ala222Val
methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MTHFR</i>	rs1801131	1	Glu429Ala
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	<i>MTR</i>	rs1805087	1	Asp919Gly
peroxisome proliferator-activated receptor gamma	<i>PPARG</i>	rs1801282	3	Pro12Ala
alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	<i>ADH1B</i>	rs1229984	4	His48Arg
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	<i>MTRR</i>	rs10380	5	His595Try
beta-3-adrenergic receptor	<i>ADRB3</i>	rs4994	8	Trp64Arg
aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	<i>ALDH2</i>	rs671	12	Glu504Lys

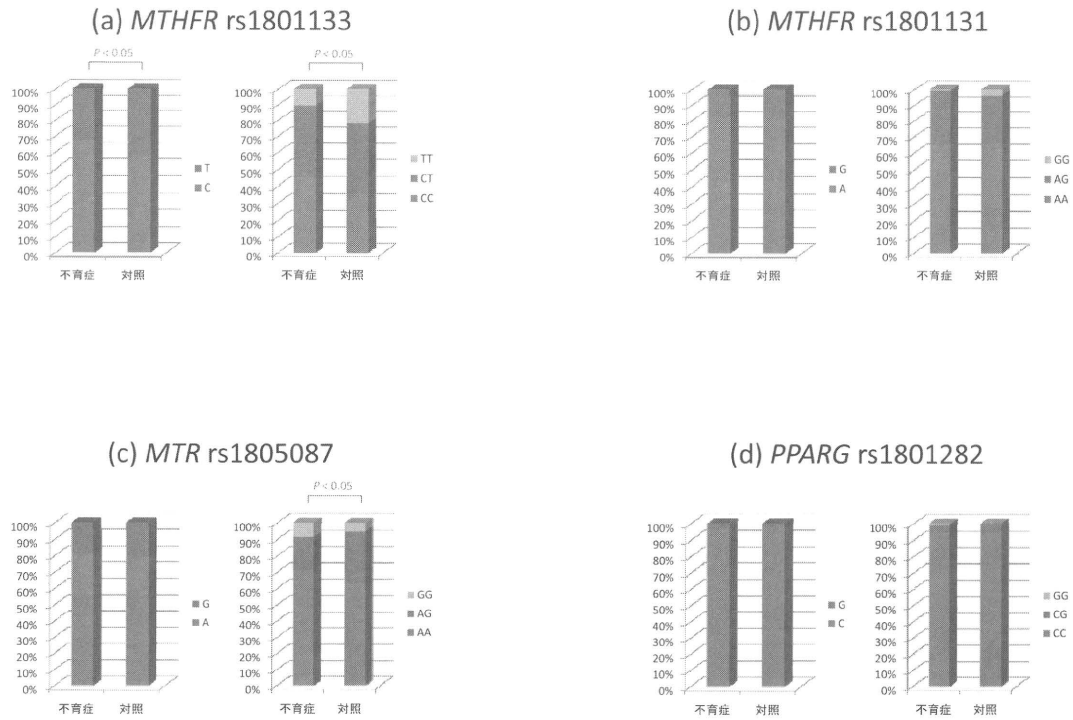


図1 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型のアレル及び遺伝子型頻度

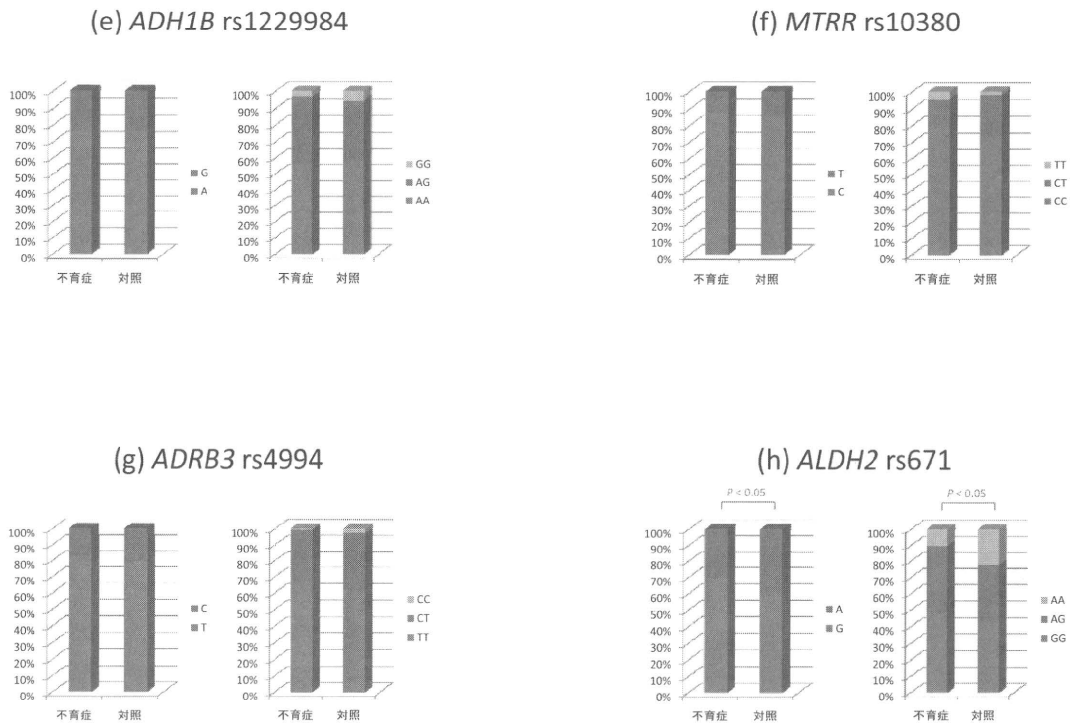
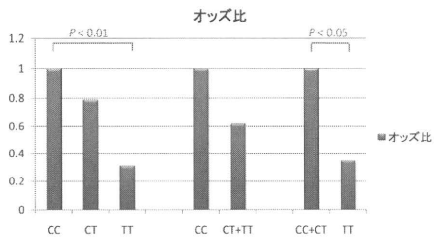


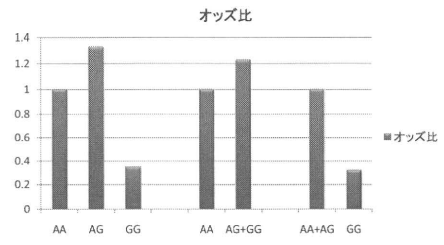
図1 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型のアレル及び遺伝子型頻度（続き）



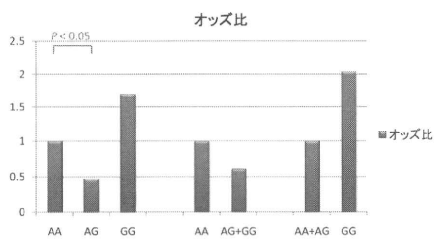
(a) *MTHFR* rs1801133



(b) *MTHFR* rs1801131



(c) *MTR* rs1805087



(d) *PPARG* rs1801282

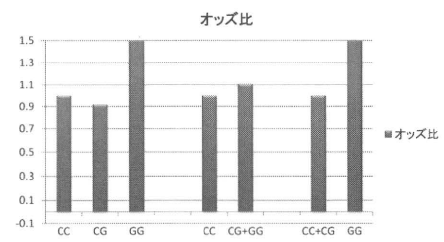
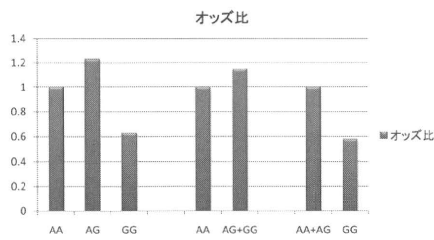
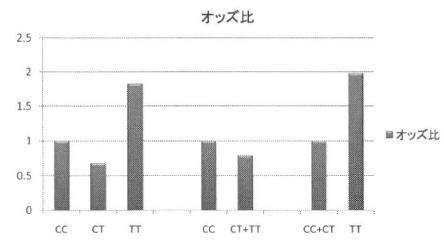


図2 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型と不育症リスクとの関連：年齢調整オッズ比

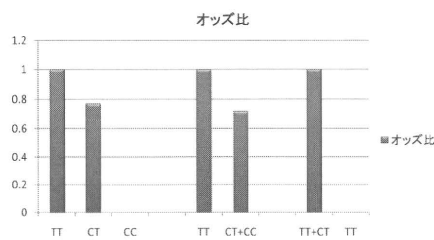
(e) *ADH1B* rs1229984



(f) *MTRR* rs10380



(g) *ADRB3* rs4994



(h) *ALDH2* rs671

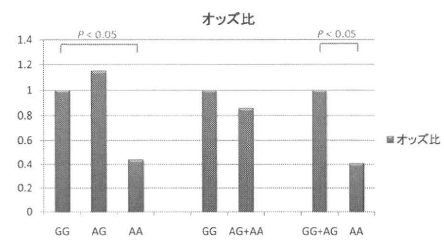


図2 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型と不育症リスクとの関連：年齢調整オッズ比（続き）

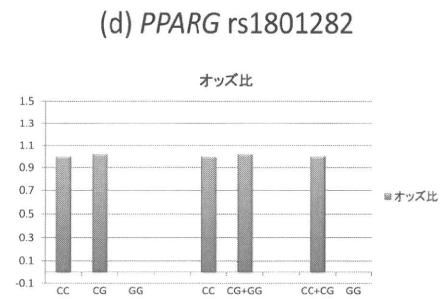
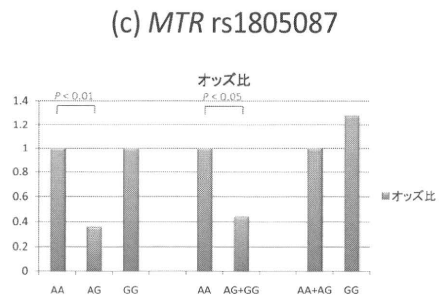
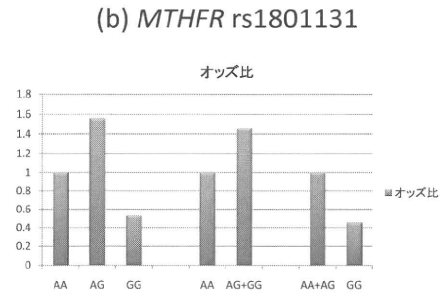
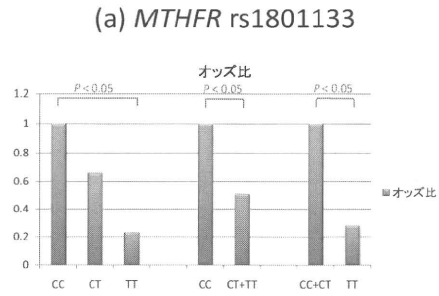


図3 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型と不育症リスクとの関連：年齢、喫煙・飲酒習慣調整オッズ比

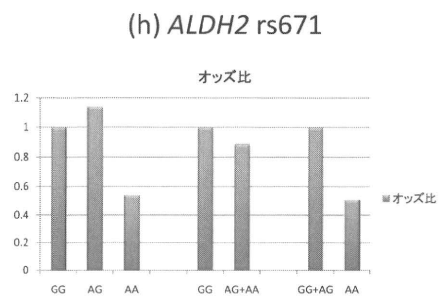
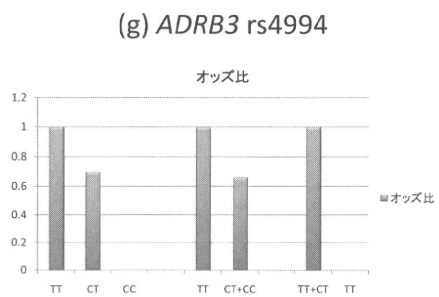
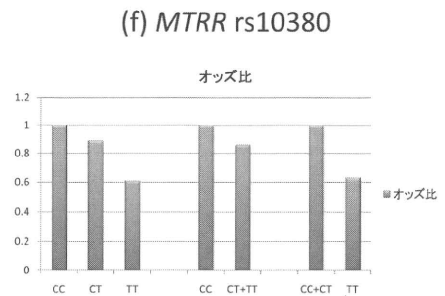
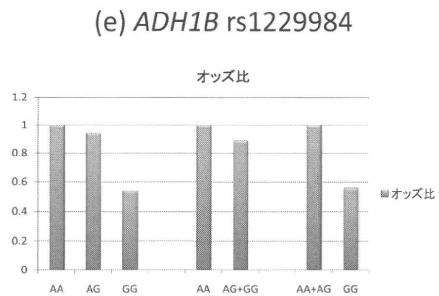


図3 生活習慣と関連の深い8種類の一塩基多型と不育症リスクとの関連：年齢、喫煙・飲酒習慣調整オッズ比（続き）