

Asakura H, Fukami T, Kurashina R, Tateyama N, Doi D, Takeshita T.	Significance of cervical gland area in predicting preterm birth for patients with threatened preterm delivery: comparison with cervical length and fetal fibronectin.	<i>Gynecol Obstet Invest.</i>	68(1)	1-8	2009
Doi D, Boh Y, Konishi H, Asakura H, Takeshita T.	Combined chemotherapy with paclitaxel and carboplatin for mucinous cystadenocarcinoma of the ovary during pregnancy.	<i>Arch Gynecol Obstet.</i>	280(4)	633-6	2009
Akira S, Mine K, Kuwabara Y, Takeshita T.	Efficacy of long-term, low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy (draw-back therapy) for adenomyosis.	<i>Med Sci Monit.</i>	15(1)	CR1-4	2009
里見操緒, 竹下俊行	【生殖と免疫をめぐって】夫リンパ球免疫療法後の続発性不妊症	臨床免疫・アレルギー科 (1881-1930)	52(2)	176-179	2009
峯克也, 富山僚子, 桑原慶充, 稲川智子, 阿部崇, 西弥生, 明楽重夫, 成相孝一, 佐藤嘉兵, 竹下俊行	排卵誘発時の卵胞液中hexanoyl-lysine濃度とART臨床背景の検討	日本受精着床学会雑誌 (0914-6776)	26(1)	114-117	2009
竹下俊行(日本医科大学 産婦人科)	【周産期医療とinflammatory response】不育症	周産期医学 (0386-9881)	39(6)	719-722	2009
竹下俊行	不育症の診断と治療 子宮奇形の検査と治療	日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌 (0285-8096)	46(2)	132	2009

竹下俊行(日本医科大学 産婦人科学)	不育症と母性 流産死産後の心理ケア	神奈川母性衛生学会誌 (1343-831X)	12(1)	73-74	2009
竹下俊行(日本医科大学 産婦人科学教室)	【ここが聞きたい 不妊・不育症診療ベストプラクティス】 不育症の検査・診断 内分泌・代謝因子 【内分泌・代謝異常】 不育症における甲状腺機能異常の病態について教えてください. 本当に流産との関係はあるのでしょうか	臨床婦人科産科 (0386-9865)	63(4)	639-641	2009
竹下俊行(日本医科大学 産婦人科学教室)	【ここが聞きたい 不妊・不育症診療ベストプラクティス】 不育症の検査・診断 内分泌・代謝因子 【内分泌・代謝異常】 生殖内分泌異常, 甲状腺機能異常, 糖尿病の検査の実際について教えてください	臨床婦人科産科 (0386-9865)	63(4)	636-637	2009

分担研究報告 18

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：免疫グロブリン大量療法は習慣流産患者の末梢血 NK 細胞 CD94 発現を増強する

分担研究者 山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科 教授
(外科系講座 産科婦人科学分野)
研究協力者 島田 茂樹 北海道大学病院 助教
天野真理子 神戸大学医学研究科 助教

研究要旨

4 回以上流産歴がある原因不明で難治性の習慣流産 53 妊娠を対象に妊娠初期免疫グロブリン大量療法 (high dose of intravenous immunoglobulin, HIVIg; 5 日間合計 100g) を実施した。既往流産回数は 4~8 回であった。HIVIg により 38 人で生児が得られたが、14 人が流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。10 例で胎児染色体異常が確認され、2 例は染色体正常であった。2 例で絨毛培養が不良で核型分析不可能であった。胎児染色体異常による自然流産では治療効果判定は不可能であるため、この 10 例を除いて治療効果を判定すると有効率は 88% (38/43) であった。難治症例にもかかわらず有効率は高く、妊娠初期 HIVIg は難治性習慣流産 (原因不明、4 回以上の流産歴) に有用であると考えられる。

フローサイトメトリー法で 8 人において、NK 細胞、細胞障害性 T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージの各種マーカー発現の変化を調べた結果、NK 細胞抑制型レセプターである CD94 発現が HIVIg によって有意に上昇することが明らかとなった。習慣流産患者において、HIVIg は NK 細胞活性を抑制することによって流産抑制効果をもたらす可能性が示された。

A. 研究目的

難治性である、つまり 4 回以上の自然流産歴があり、かつ精査によっても原因不明な習慣流産を対象とし、妊娠初期 HIVIg を実施してきた。以下の要件を満たす症例を HIVIg の対象とした。①不育症に関する諸検査を施行し原因不明である。②4 回以上の自然流産歴があり、主に妊娠初期流産である。③Ig アレルギーや IgA 欠損症がない。④文書にて同意が得られる。投与量と期間は、免疫修飾作用とその有効性が証明されている特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) に準じて、intact 型 Ig 20g/日、5 日間 (合計 100g) とし、追加投与は行わなかった。既往流産時期に達する前に HIVIg を完了することを意図して、原則として妊娠 4~5 週に治療を開始した。

これまで 53 妊娠に実施した。年齢は 24~44 歳、既往流産回数は 4~8 回であった。38 人で生児が得られたが、14 人が流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。10 例で胎児染色体異常が確認され、2 例は染色体正常であった。2 例で絨毛培養が

不良で核型分析不可能であった。染色体異常頻度が高いのは、対象が比較的高齢であるためと思われる。胎児染色体異常による自然流産では治療効果判定は不可能であるため、この 10 例を除いて治療効果を判定すると有効率は 88% (38/43) であった。難治症例にもかかわらず有効率は高く、妊娠初期 HIVIg は難治性習慣流産 (原因不明、4 回以上の流産歴) に有用であると考えられる。

この流産抑止効果は、どのような免疫学的修飾機能によって発揮するかを調べる目的で、HIVIg 前後の患者末梢血中の NK 細胞、細胞障害性 T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージの各種マーカー発現の変化をフローサイトメトリー法で調べた。

B. 研究方法

4 回以上 (平均 4.9 回、4~7 回) の流産歴があり、前の妊娠時に低用量アスピリン、ヘパリン、黄体ホルモン、副腎皮質ステロイドなどの治療にもかかわらず流産に至った経験のある、いわゆる治療抵抗性かつ原因

不明の習慣流産患者8人より同意を取得して、当該妊娠時に妊娠初期HIVIgと本研究を実施した。妊娠4〜5週にHIVIgを開始した。HIVIg直前と投与完了1〜3日後に末梢血を採取した。6人が正常産となり、2人は胎児染色体異常流産に至った。

フローサイトメトリー解析で、NK細胞に対して、Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (PerCP)-conjugated anti-CD3 (SK7) mAb, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD3 (HIT3a) mAb, allophycocyanin (APC) -conjugated anti-CD56 (NKH-1), anti-CD158a (EB6)- R-phycoerythrin (PE) and anti-CD94 (HP-3B1)-PEを用いた。

細胞障害性T細胞には、(PerCP)-conjugated anti-CD3 (SK7) mAb, anti-CD8 (B9.11)-APC, anti-CD28 (CD28.2)-PEを用いた。細胞内perforinは処置後、mouse anti-human perforin (dG9), rabbit anti-mouse RPE-Cy5-conjugated F(ab)2 fragment, anti-CD3 (SK7)-FITC, anti-CD56 (NKH-1)-PE, anti-CD8 (B9.11)-APCを用いて測定した。

制御性T細胞には、(PerCP)-conjugated anti-CD4 (SK3) mAb, anti-CD25 (2A3)-APC, anti-FOXP3 (PCH101)-FITC, anti-CD28 (CD28.2)-FITC, anti-CD152 (BN13)-PE, anti-CCR4 (1G1)-PEを用いた。

マクロファージには、anti-CD163 (GHI/61)-PE, FITC-conjugated anti-CD68 (KIM7) mAb, anti-CD80 (MAB104)-PE, anti-CD86 (FUN-1)-R-phycoerythrin: Cyanine-5.18 (PE-Cy5), anti-HLA-DR (L243)-PerCP, anti-CD206 (19.2)-APC, mouse anti-MMP-9 (56-2A4)-purified, mouse anti-PPAR-g (E-8)-purified, goat anti-mouse IgG (H+L)-PE, anti-CD36 (NL07)-APCとanti-CCL22 (57203)-PEを用いた。3/4カラーフローサイトメトリーにはFACS Calibur flow cytometerを用い、CellQuest Softwareで解析した。

統計解析には、paired t-test ($P < 0.05$)を用いた。

(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した。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した。

C. 研究結果

HIVIg後、CD3+CD56+ NKT細胞%は増加したが有意差はなかった($P=0.08$)。Va24+Vb11+ cells/CD3+CD4-CD8-としてNKT細胞%を解析した場合には変化を認めなかった。CD3-CD56+NK細胞, CD3+CD8+細胞障害性T細胞, CD4+CD25+制御性T細胞%には有意な変化は無かった。CD68+マクロファージ%は増加したが有意差は無かった($P=0.06$)。

CD94を発現するNK細胞は、平均59%から71%に有意に増加した($P=0.01$)。流産に至った2人を除いて解析した場合、 $P=0.003$ であった。PerforinないしCD158aを発現するNK細胞%には変化は無かった。

Perforin発現CD3+CD8+細胞障害性T細胞%には有意な変化は無かった。CD28発現CD3+CD8+細胞障害性T細胞は平均77%から71%に低下した($P=0.05$)。

Foxp3, CD28, CD152ないしCCR4を発現する制御性T細胞%には有意な変化は無かった。

CD80, CD86, MMP9, CD206, CD163, HLA-DR, PPAR-g, CD36ないしCCL22を発現するCD68+マクロファージ%には有意な変化は無かった。

D. 考案

免疫グロブリン療法(IVIg)は、約25年前にITPでその有効性が確認されて以来、大規模症例対照研究によって、Guillain-Barré症候群(GBS)、慢性炎症性多発神経根障害、重症筋無力症、皮膚筋炎、川崎病、移植片対宿主病、多発性硬化症、自己免疫性ブドウ膜炎、抗好中球細胞質自己抗体陽性血管炎などの自己免疫疾患や炎症性疾患において、その有効性が確定した。現在、自己免疫性血友病、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、SLE、クローン病で有効性が期待されている。重要なことは、0.4g/kg、5日間に代表されるような大量療法でなければ、上記疾患の多くに対してその効果は認められない点である。

想定される一般的なIVIgの作用機構を以下にまとめる。①Fcレセプター：マクロファージ($M\phi$)Fc γ Rのブロック(ITP)、 $M\phi$ 抑制型Fc γ RIIBの誘導(ITP)、抗体依存性細胞障害の抑制(脱髄性神経疾患)。②炎症：補体介在性障害の減弱(川崎病、皮膚筋炎)、免疫複合体介在性炎症の抑制(糸球体腎炎)、IL-1産生の

抑制 (川崎病, GBS). ③B 細胞・抗体: 自己抗体に対する抗イディオタイプ作用 (自己免疫性血友病), Fc γ RIIB を介した抗体産生抑制. ④T 細胞: Th1 サイトカイン産生の抑制 (多発性硬化症, ブドウ膜炎), スーパー抗原の中和. ⑤細胞増殖の調節.

習慣流産患者で, HIVIg の際に末梢血 NK 細胞活性や比率を測定してこれまでに報告した. HIVIg 直前 (妊娠 4-5 週) の NK 細胞活性 (平均 41%) は HIVIg 終了後 15% に抑制され, この抑制は 10 週まで維持された. 同様に, CD56 陽性 CD16 陰性 (3.5%), CD56 陽性 CD16 陽性 (16.8%) 細胞比率もそれぞれ 3.0%, 11.1% に抑制された. 血清中の Th1 および Th2 サイトカイン値の変化を ELISA 法で解析した結果, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ 値は, HIVIg 後に上昇した. フローサイトメトリ法による末梢血 Th1/Th2 細胞比率は, 投与後に低下した. このように, HIVIg にはヒト末梢血で NK 細胞活性を抑制し, Th バランスを修飾する作用があると推察されていた.

今回の研究により, 抑制型レセプター CD94 を発現する NK 細胞% が HIVIg により増加することが明らかとなった. また, マクロファージ% が増加し, 細胞障害性 T 細胞% は低下した. 以上のことから, HIVIg はレセプター発現を修飾して NK 細胞の細胞障害活性を抑制し, 合わせて, マクロファージの活性化や細胞障害性 T 細胞の抑制によって, 難治性習慣流産に対して流産抑止効果を発揮すると推察された.

E. 結論

4 回以上流産歴がある原因不明で難治性の習慣流産 53 妊娠を対象に HIVIg を実施した結果, 染色体異常妊娠を除いた有効率は 88% (38/43) であった. HIVIg により抑制型レセプター CD94 を発現する NK 細胞% が増加することが明らかとなった. HIVIg は NK 細胞の細胞障害活性を抑制し, マクロファージの活性化や細胞障害性 T 細胞の抑制などの機構によって, 難治性習慣流産に対して流産抑止効果を発揮すると推察された.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. (2009) Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79:188-195.
- 2) Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R. (2009) Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birth weight in a Japanese population. *Mol Hum Reprod* 15(2):121-130.
- 3) Shimada S, Yamada H, Hoshi N, Kobashi G, Okuyama K, Hanatani K, Fujimoto S. (2009) Specific ultrasound findings associated with fetal chromosome abnormalities. *Congenit Anom (Kyoto)* 49(2):61-65.
- 4) Shimada S, Takeda M, Nishihira J, Kaneuchi M, Sakuragi N, Minakami H, Yamada H. (2009) A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 62(5):301-307.
- 5) Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. (2010) Anti- β 2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* 84:95-99.
- 6) 齋藤 滋, 杉浦 真弓, 田中忠夫, 藤井知行, 杉俊隆, 丸山哲夫, 竹下俊行, 山田秀人, 小澤伸晃, 木村 正, 山本樹生, 藤井俊策, 中塚幹也, 下屋浩一郎 (2009) : 本邦における不育症のリスク因子とその予後に関する研究. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4) : 1144-1148.
- 7) 山田秀人 (2009) : 抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4) : 1149-1151.
- 8) 天野真理子, 山田秀人 (2009) : 不育症と先天性凝固異常. *日本血栓止血学会誌* 20(5), 506-509.

2. 学会発表

- 1) 山田秀人 (2009) 不育症の原因・治療と新たな展開. 北海道産婦人科医会ウエルカムガイダンス学術研修会 (特別講演), 6月20日, 札幌
- 2) 山田秀人 (2009) 抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する. 第45回周産期・新生児医学会学術集会 (ワークショップ 不育症の新たな原因探索と治療), 7月12-14日, 名古屋
- 3) 山田秀人 (2009) 不育症の原因・治療と進展. 位育会臨床セミナー (特別講演), 8月23日, 神戸
- 4) Yamada H. (2009) Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. 3rd Society for Gynecologic Investigation International Summit 2009 "Preeclampsia". November 12-14, Sendai (シンポジウム)
- 5) 山田秀人 (2009) 不育症医療とは. 尼崎市産婦人科医会学術講演会 (特別講演), 11月28日, 尼崎
- 6) 山田秀人 (2009) 自己免疫疾患合併妊娠の管理. 兵庫県周産期医療研修会 (特別講演), 12月19日, 神戸

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
Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H.	Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes.	J Reprod Immunol	79	188-195	2009
Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R.	Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birth weight in a Japanese population.	Mol Hum Reprod	15(2)	121-130	2009
Shimada S, Yamada H, Hoshi N, Kobashi G, Okuyama K, Hanatani K, Fujimoto S.	Specific ultrasound findings associated with fetal chromosome abnormalities.	Congenit Anom (Kyoto)	49(2)	61-65	2009
Shimada S, Takeda M, Nishihira J, Kaneuchi M, Sakuragi N, Minakami H, Yamada H.	A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion.	Am J Reprod Immunol	62(5)	301-307	2009
Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G.	Anti- β 2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study.	J Reprod Immunol	84	95-99	2010

齋藤 滋, 杉浦 真, 田中忠夫, 藤井知行, 杉 俊隆, 丸山哲夫, 竹下俊行, 山田秀人, 小澤伸晃, 木村 正, 山本樹生, 藤井俊策, 中塚幹也, 下屋浩一郎	本邦における不育症のリスク因子と その予後に関する研究.	日本周産期・新 生児医学会雑 誌	45(4)	1144-1148	2009
山田秀人	抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊 娠高血圧症候群と関連する.	日本周産期・新 生児医学会雑 誌	45(4)	1149-1151	2009
天野真理, 山田秀人	不育症と先天性凝固異常.	日本血栓止血 学会誌	20(5)	506-509	2009

分担研究報告 19

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合事業）
分担研究報告書

分担課題：本邦における不育症のリスク因子と各病態の治療成績に関する調査
自然流産に対する遺伝学的解析

分担研究者 小澤 伸晃 国立成育医療センター 周産期診療部 医長

研究要旨

国立成育医療センター周産期診療部不育診療科を受診された不育症患者を対象とし、前年度に引き続き不育症に関連すると考えられる遺伝的要因、免疫学的要因、血液凝固学的要因、子宮形態学的要因等の陽性頻度を明らかにすると同時に、各要因別の治療法の有効性を検討した。今年度は58組の不育症患者が新たに登録された。抗PE抗体陽性患者の妊娠例は当院ではこれまでに83症例みられたが、妊娠成功率は62.3%であった。今後さらに症例数を蓄積すると同時に、多施設での結果を集積して解析する予定である。また流産染色体分析として、通常の染色体分析に加えてアレイCGH法による解析を新たに検討したが、不育診療における有用性が示唆された。

A. 研究目的

全妊娠の約15%に発生する流産を繰り返す場合は不育症と呼称され、全女性の約2~5%は不育症患者であると推定されているが、現状では不育症に対するスクリーニング検査法や治療法は確立されているとは言えない。そのため患者夫婦の精神的ならびに肉体的負担は大きく、不必要な検査あるいは治療が強いられている場合もある。また我が国では不育症に造詣が深い専門医も決して多くはない。

本研究では多施設共同研究により、不育症に関連すると考えられる遺伝的要因、免疫学的要因、血液凝固学的要因、子宮形態学的要因等について統計学的に分析し、各要因別の治療法の有効性を前方視的研究で解析した。最終的にはEBM (evidence-based medicine) に基づいた不育症の診断、検査、および治療に関する指針を確立することを目的とする。また得られた研究成果は一般にも公開して、不育症に対する医療の質を向上させるとともに、患者夫婦が積極的に診療を受けられる環境づくりを行う予定である。

また今年度は流産染色体分析にアレイCGH法も加えてその有用性に関して検討を行った。

B. 研究方法

【研究対象】

国立成育医療センター周産期診療部不育診療科を受診された不育症患者を対象とした。不育症患者の定義は、以下のいずれかを有する夫婦とした。

1. 妊娠10週未満の2回以上の連続する流産（化学流

産を含まない）（続発性を含める）

- 原因不明の妊娠10週以降（CRL（頭殿長）でも10週以上の大きさを有する）の1回以上の流・死産
- 1回以上の重症の妊娠高血圧症候群（妊娠中毒症）の既往

【不育症一般検査】

当院で通常行っている不育症原因検索のための一般検査を患者夫婦に説明後施行した。尚、現在行っている検査項目は以下の通りである。

- 遺伝学的検査
夫婦染色体、流産胎児染色体検査
- 免疫学的検査
抗核抗体
抗カルジオリピン抗体IgG/IgM
抗カルジオリピン- β_2 GPI 抗体
抗PE抗体IgG/IgM
抗PS抗体IgG/IgM
- 血液凝固検査
ループスアンチコアグラント
APTT/PT
XII 因子
プロテインC/S活性、抗原
- 内分泌学的検査
FSH、LH
テストステロン
F-T3、F-T4、TSH
プロラクチン
空腹時血糖、インシュリン
高温期プロゲステロン

5. 解剖学的検査

- 子宮卵管造影
- 子宮鏡（症例により選択）
- MRI（症例により選択）

【不育症患者の管理】

前記の不育症一般検査の結果に基づいて、治療方針を決定し妊娠管理を行った。患者背景、臨床経過、検査結果、治療方法、治療結果などの診療情報を記載したシートを作成し、データを解析した。なお、当院で選択される治療法は以下の通りである。

1. ヘパリン治療
2. 低用量アスピリン療法
3. プロゲステロン補充療法
4. 甲状腺疾患治療、糖尿病治療
5. 高PRL血症治療薬
6. 手術（子宮形成術、内膜ポリープ除去、子宮筋腫核摘出、頸管縫縮術）

尚、治療を行うも流産に至った場合は、流産絨毛染色体検査を行い、胎児側要因による流産であるかどうか検討した。また、Genome-Disorder Array（既知の疾患座位ならびに各染色体のサブテロメア領域を550-660個のBACクローンでカバーしたアレイ）による解析を一部の症例で追加して行った。

（倫理面への配慮）

当院での通常の臨床行為に対する調査研究で必要とされる、「国立成育医療センター診療情報の2次利用に関する規程」に基づいて臨床データを集約し解析を行った。アレイCGH法に関しては施設倫理委員会承認の下に、インフォームドコンセントが得られた症例を対象とした。

C. 研究結果

1) 不育症患者におけるリスク因子の抽出と治療効果の判定

2008年11月から2009年10月までの当院初診患者で一般検査を当院で行った症例をデータベース上に登録したが、今年度の登録患者は57組であり、これまでに計80組の患者夫婦が登録されたことになった。登録患者の平均年齢は35.9歳、平均BMIは20.4、平均既往流産回数（10週未満）は2.5回であった。主な検査陽性率を以下に示す。

子宮内腔異常（弓状子宮や内膜ポリープも含む）：16.2%、甲状腺機能異常：8.3%、高プロラクチン血症：7.0%、染色体異常（低頻度モザイク、正常変異を除く）：3.0%、抗カルジオリピン β 2GPI抗体陽性：1.4%、LAC陽性：0%、抗カルジオリピン

抗体IgG：9.5%、抗カルジオリピン抗体IgM：11.4%、抗PE抗体IgG：17.5%、抗PE抗体IgM：6.4%、APTT（正常値26.6-40.3秒）延長：0%、短縮：42.5%、XII因子活性（正常値50-150%）低下：1.4%

2) 抗PE抗体陽性患者の妊娠予後

2002年1月から2009年12月までの当院初診患者を対象に、抗PE抗体IgG/IgM陽性で妊娠の成立した患者を抽出し、その後の妊娠成績を検討した。尚、各々のカットオフ値は以下のように設定し、APTT延長、LAC陽性、抗カルジオリピン β 2GPI抗体陽性、抗カルジオリピン抗体IgG陽性、抗カルジオリピン抗体IgM陽性者は除外した。

抗PE抗体IgG（キニノーゲン+）：0.300

抗PE抗体IgM（キニノーゲン+）：0.450

抗PE抗体IgG陽性患者の妊娠例は54例認められ、妊娠成功例は34例（63.0%）（平均妊娠時母体年齢34.0歳）で、不成功例は20例（37.0%）（平均妊娠時母体年齢34.4歳）であった。治療の内訳はヘパリン+低用量アスピリン併用療法22例、低用量アスピリン単独治療31例であり、明らかな治療成功率の差は認められなかった。一方、抗PE抗体IgM陽性患者の妊娠例は29例認められ、妊娠成功例は18例（62.1%）（平均妊娠時母体年齢34.8歳）、不成功例は11例（37.9%）（平均妊娠時母体年齢35.9歳）であった。治療の内訳はヘパリン+低用量アスピリン併用療法10例、低用量アスピリン単独治療17例であり、IgG陽性例と同様に明らかな治療成功率の差は認められなかった。抗PE抗体IgGとIgM陽性を併せた症例の妊娠成功率は、62.3%（52/83）となった。

3) 自然流産に対する遺伝学的解析

これまでに計168例の自然流産に対して染色体分析が行われたが、21例（12.5%）は培養不良のため結果が得られなかった。したがって147例の分析結果となったが、染色体異常は113例に観察され、常染色体トリソミーで、Xモノソミー、倍数体、不均衡型構造異常の順に高頻度に検出された。自然流産に至った症例の一部ではGDアレイを用いたアレイCGH分析を行ったが、異数体や不均衡型染色体異常などの染色体異常の検出が可能であり、解析を行った83症例中52例（62.7%）に異常が観察された（平均妊娠時母体年齢35.8歳）。

D. 考察・E. 結論

本研究では、多施設共同研究により不育症に対する診療体系を確立することを目指している。今

回の分担研究成果である、当院で不育症患者に対して行っている一般的なスクリーニング検査の陽性率や抗PE抗体陽性者に対する抗凝固療法など各種治療法の妊娠成績は、他の施設における臨床成績と併せて本研究の主幹施設に集積し、今後統計学的解析により不育症患者におけるリスク因子の抽出と治療効果の判定を行っていく予定である。また、流産が母体要因であるか胎児要因であるかを判定することは不育診療上きわめて重要であるが、アレイCGH分析による染色体異常の解析は従来のG分染法の問題点を解決できる可能性があり、不育診療においては有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

小澤伸晃：【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】不育症の管理(解説/特集). 産科と婦人科. 76(6), 703-708. 2009.

2. 学会発表

- 1) 小澤、他：アレイCGHによる分析（第54回日本人類遺伝学会）
- 2) 小澤、他：夫婦染色体異常と胎児染色体異常（第45回日本周産期・新生児医学会）
- 3) 小澤、他：Cytogenetic investigation of miscarriage by DNA-based analysis combined with FISH analysis (25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology)

H. 知的財産件の出願・登録状況

(予定も含む)

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
小澤伸晃	【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】 不育症の管理(解説/特集)	産科と婦人科	76(6)	703-709	2009

分担研究報告 20

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：続発性反復流産についての検討

研究分担者 木村 正 大阪大学大学院医学系研究科産婦人科 教授
筒井 建紀 大阪大学大学院医学系研究科産婦人科 講師

研究要旨

過去に妊娠・分娩歴があるにもかかわらず、その後に流産を繰り返し、生児を得ることができない症例に対し、いかなる検査・治療を行うべきかについては明らかではない。我々は、1回以上の自然妊娠・分娩歴があるにもかかわらず、その前後に2回以上の自然流産を繰り返した反復流産患者6症例について、その背景、臨床検査結果、妊娠予後について検討した。うち3症例に抗リン脂質抗体やプロテインSの異常を認めたが、そのうち1症例は抗血小板療法にて妊娠・分娩に至った。また、以前認めた抗リン脂質抗体症候群を、現在は認めず、無治療で自然妊娠・分娩に至った症例も経験した。今回の検討により、反復流産・習慣流産の原因である thrombophilia の状態は、同一個体でも常に変動している可能性が示唆された。分娩歴のある女性でも、その後に反復流産を認めれば、thrombophilia に対する検索を行い、すみやかに対処することが必要と考えられた。

A. 研究目的

過去に妊娠・分娩歴があるにもかかわらず、その後に流産を繰り返し、生児を得ることができない症例に対し、どのような検査・治療を行うべきかについては明らかではない。今回我々は、続発性習慣流産患者の取り扱いを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2005年以降に大阪大学医学部附属病院不妊外来に受診歴があり、1回以上の自然妊娠・分娩歴があるにもかかわらず、その前後に2回以上の自然流産を繰り返した反復流産患者6症例について、その背景、臨床検査結果、妊娠予後について検討した。

C. 研究結果

自然妊娠・分娩歴のある反復流産患者6症例のうち、3症例に抗リン脂質抗体やプロテインSの異常を認めた。うち、1症例は、抗血小板療法にて妊娠・分娩に至った。また、以前指摘された抗リン脂質抗体症候群を、現在は全く認められず、無治療で妊娠・分娩に至った1症例も経験した。

D. 考察

症例数には限りがあるが、今回の検討により、性成熟期の女性において、流産の原因となりうる thrombophilia の状態は、同一個体においても常に変動し、流産になりやすい時期と生産をもたらす時期が、時間の経過とともに移り変わる可能性が示唆された。

E. 結論

習慣流産・反復流産の原因の一つに thrombophilia が挙げられる。thrombophilia の状態は、その他の自己免疫疾患と同様、常に変動していると考えられる。従って、以前 thrombophilia が認められた個体においてもその状態は常に変動しており、流産の起こりやすい時期と起こりにくい時期がある可能性が示唆された。これは、thrombophilia が原因と考えられる原発性習慣流産患者が無治療で生産に至ったり、生産歴のある女性がその後 thrombophilia と考えられる流産を繰り返したりする現象の理論的裏付けとなる可能性を示唆するものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Two multipotential transcription factors, NF- κ B and Stat-3, play critical and hierarchal roles for implantation

Tadashi Kimura, Kazuhide Ogita, Keiichi Kumasawa, Shinsuke Koyama, Tateki Tsutsui, and Hitomi Nakamura
Indian J Physiol Pharmacol, 54, 27-32; 2010.

2. 学会発表

北村梨紗、筒井建紀、田畑知沙、熊澤恵一、渡辺宜信、根来英典、朝野久美子、張慶、李楠、荻田和秀、木村正
自然妊娠・分娩歴のある反復流産症例についての検討
第52回日本生殖医学会
平成19年10月25-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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
<u>Tadashi Kimura</u> , et al	Two multipotential transcription factors, NF-kappaB and Stat-3, play critical and hierarchal roles for implantation	Indian J Physiol Pharmacol	54	27-32	2010

分担研究報告 21

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：抗リン脂質抗体による不育症発症メカニズムに関する研究

研究分担者 藤井 知行 東京大学産科婦人科学准教授

研究要旨

習慣流産のリスクファクターである抗リン脂質抗体(aPL)の中で、特に β_2 GPI依存性aPLの、血液凝固異常以外の流産発症メカニズムについて、CD1d抗原に注目して研究している。CD1d抗原はヒト白血球抗原(HLA)類似の膜蛋白質であり、自己のリン脂質を含むリン脂質を提示し、初期の胎盤extravillous trophoblast表面に発現している。昨年度の研究において、我々は、抗 β_2 GPI抗体が、PS- β_2 GPI複合体と結合したtrophoblast表面のCD1dと間接的に結合し、その相互作用によってCD1dの架橋反応が起こり、CD1dを発現するtrophoblastからのIL-12誘導が起こることを明らかにした。妊娠初期に、extravillous trophoblast上のCD1dと母体抗 β_2 GPI依存性aPLが反応することにより過剰な炎症性反応が起こって、流産が発症しうると考えられた。本年度は、まず、この現象が、患者血清でも誘導されるか検討した。その結果、不育症患者血清中 β_2 GPI依存性抗cardiolipin抗体によってもCD1dの架橋反応が起こってIL-12が誘導されることがわかり、CD1dがaPLによる流産発症メカニズムに実際にかかわっている可能性が示された。本年度はまた、抗 β_2 GPI抗体による上記反応に、CD1dを認識して反応する脱落膜natural killer T (NKT)細胞がこの反応に影響している可能性を考え、脱落膜NKT細胞とtrophoblastとの相互作用を明らかにすることにした。ヒト脱落膜リンパ球からNKT細胞を誘導し、CD1dを強制発現させた絨毛癌細胞株と共培養した。その結果、ヒト脱落膜NKT細胞が、CD1dを介して絨毛細胞からの炎症性サイトカインIL12の産生を誘導することがわかった。しかし、CD1dを認識したNKT細胞からの特異的サイトカイン分泌変化は確認できなかった。次年度は、抗 β_2 GPI抗体を添加してcross-linkingを誘導したJeg3/CD1d細胞の培養上清をNKT細胞に添加し、IFN- γ が誘導されるか検討する予定である。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体(aPL)は不育症のリスクファクターである。aPLが関与する流産では血液凝固異常を介するメカニズムが提唱されており、胎盤血管内の血栓形成により胎盤機能が障害されて、流死産が起こるとされている。しかし、aPLは胎盤血管未形成の妊娠初期流産を反復する習慣流産にも関連性が報告されており、その流産発症メカニズムは必ずしも明らかになっていない。aPLの中でも、不育症を引き起こす力が特に強いと考えられている β_2 glycoprotein I (β_2 GPI) 依存性aPLは、陰性荷電を持つリン脂質と結合した β_2 GPIと反応し、血栓形成を誘導することにより、中期

流産を発症させるとされているが、最近、trophoblastへの直接的な細胞傷害作用による初期習慣流産発症機転も報告された。

CD1d 抗原は、HLA 近傍領域でコードされるHLA 類似抗原であり、trophoblast に発現されている。この抗原は HLA class I 抗原とほぼ同様の構造を持ち、invariant natural killer T cell (iNKT)に認識され、それにより双方の細胞から分泌される T helper 1 (Th1)サイトカインを介した局所炎症反応を誘導する働きを有している。実際、産婦人科領域においても、子宮頸管上皮細胞が CD1d 抗原を発現し、局所の iNKT などの免疫細胞との相互作用により、粘膜の感染防御反応に