重要な関与をしていることがわかっている。一方、iNKT 細胞は子宮脱落膜にも存在することがわかっており、trophoblast が CD1d 抗原を発現していることと合わせて、妊娠免疫に CD1d 抗原が重要な働きをしていることが考えられる。また、CD1d 分子は、抗 CD1d 抗体により分子架橋反応をおこし、細胞内のリン酸化カスケードにより、interleukin (IL)-12 などのサイトカイン分泌を誘導し、Th1 反応を導くことも知られている。さらに、human leukocyte antigen (HLA)がペプチドを細胞表面に提示するのと異なり、CD1d 抗原はリン脂質を提示する作用を有していることから、不育症の原因である抗リン脂質抗体症候群の病態に重要な関与をしている可能性がある。

そこで昨年度の研究において、trophoblast上のCD1dを介したβ2GPI依存性aPLによる流産メカニズムを解明することを目的とし、特に、1．trophoblast上のCD1dがリン脂質を抗原提示し、このリン脂質にβ2GPIが結合していること、2．抗β2GPI抗体により、CD1dの分子架橋反応が誘導されて、trophoblastからIL12 などのサイトカイン分泌が起こること、の 2 点について検討した。その結果、CD1dを恒常的に発現するtrophoblast株Jeg3/CD1dの表面において、CD1d発現に一致してPS、β2GPIが存在していることを確認し、また、抗CD1d抗体に加え、抗β2GPI抗体でも架橋反応によるIL-12 の発現が認められ、抗β2GPI抗体が、PS-β2GPI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β2GPI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。

本年度の研究においては、まず、この現象が、患者血清でも誘導されるか検討した。また、妊娠局所である子宮においては、脱落膜内にCD1dを認識して反応するnatural killer T (NKT)細胞が存在しており、抗β2GPI抗体による上記反応に影響している可能性がある。そこで本年度の研究において、脱落膜iNKT細胞とtrophoblastとの相互作用を明らかにすることにした。

B．研究方法

1. β2GPI依存性抗cardiolipin抗体陽性不育症の患者血清をJeg3/CD1d培養系に添加し、培養上清中へのIL-12 の分泌を、ELISAで検討した。
2. 人工中絶症例から採取したヒト脱落膜を用いて脱落膜リンパ球を分離し、iNKT 細胞の増殖誘導剤αGalCer を添加して 7 日間培養した。
3. この脱落膜リンパ球を Jeg3/CD1d もしくは Jeg3 と共培養した。
4. Interferon (IFN)-γ、IL-4、IL-12 誘導を ELISA 法および定量的 RT-PCR 法で観察した。
5. IFN-γ産生細胞の存在を ELISPOT 法で観察した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の採取、使用は、施設倫理委員会の承認のもと、インフォームド・コンセントを取得して、実施した。

C．研究結果

1. β2GPI依存性抗cardiolipin抗体陽性不育症の患者血清をJeg3/CD1d培養系に添加すると、上清中へのIL-12 の分泌が確認された。
2. フローサイトメトリー法による解析で、ヒト脱落膜リンパ球に対するαGalCer 刺激によりVα24Vβ11 陽性の脱落膜iNKT 細胞数が増加することが確認された。
3. ELISA 法では、Jeg3/CD1d との共培養で IL12 誘導が確認されたが、Jeg3 との共培養

では確認できなかった。

4. RT-PCR法でJeg3/CD1d 細胞でIL12誘導が確認され、IL12 は Jeg3/CD1d 由来であることが分かった。
5. ELISA 法では脱落膜 iNKT 細胞からの IL4、IFN-γ誘導は確認できなかった。
6. ELISPOT 法で IFN-γ産生細胞を認めたが、IFN-γ産生細胞数は Jeg3/CD1d との共培養、Jeg3 との共培養で差がなかった。

D．考察

今回の研究により、β $_2$GPI依存性抗cardiolipin抗体陽性不育症の患者血清中抗体によってもCD1dの架橋反応が起こることがわかり、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。脱落膜iNKTとCD1dとの相互作用に関する研究では、脱落膜iNKT細胞は、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がiNKTからのIFN-γの分泌を特異的に増やしているという証拠は得られなかった。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iNKTに添加し、IFN-γが誘導されるか検討する予定である。

E．結論

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。また、脱落膜 iNKT 細胞は、CD1d を介して絨毛細胞からの炎症性サイトカインの産生を調節し、上記流産発症に関わっている可能性が示唆された。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 岩澤有希, 川名敬, 藤井知行, 永松健, 松本順子, 三浦紫保, 吉田志朗, 兵藤博信, 山下隆博, 上妻志郎, 武谷雄二: 絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、β2glycoproteinI依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討. 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 京都, 2009.4.

2) Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Miura S, Yamashita T, Hyodo H, Kozuma S, Taketani Y: A possible pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with β2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through the function of CD1d. 29th Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology, Orlando, FL, USA, 2009.6.

3) Iwasawa Y, Kawana K, Miura S, Fujii T: A novel pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with β2glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through CD1d on the trophoblast. 14th International Congress of Mucosal Immunology. Boston, MA, USA, 2009.7.

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

分担研究報告 22

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 β2-GPI 抗体による絨毛癌細胞での Tool like receptor (TLR)の発現亢進

研究分担者　山本樹生　日本大学産科婦人科学教授

研究要旨
絨毛癌細胞（JEG-3 細胞）に抗β2-GPI抗体IgGを添加、培養しJEG-3 細胞におけるTLRのmRNA発現を検討した。抗β_2-GP I 抗体はJEG-3 細胞に作用し　TLR 3, 4mRNA　の発現を亢進した。β_2-GPI抗体陽性例では、TLRを介した炎症反応 が亢進され、これらは妊娠の維持に障害を与え、 不育症病態形成に関与する可能性が推察される。

A．研究目的

抗 β2-GPI 抗体は、血管内皮細胞の TLR4 に結合し作用するメカニズムが知られている。しかし、胎盤絨毛細胞における TLR との関係はあまり知られていない。今回、抗 β2-GPI 抗体陽性ＩｇＧを作用させた時の 絨毛癌細胞での TLR mRNA 発現に対する影響を検討した。

B．研究方法

絨毛癌細胞（JEG-3 細胞）に抗 β2-GPI 抗体陽性 IgG を添加、培養し JEG-3 細胞における TLR の mRNA 発現を検討した。

1）IgG は正常非妊娠婦人血清、抗 β2-GPI 抗体陽性婦人血清より Protein G affinity column を用いて抽出。

2）　JEG-3 細胞を 6-well tissue culture plate で培養し、培養液に抗 β2-GPI 抗体陽性 IgG を添加し 24 時間培養した。

3）培養後細胞を採取し、total-RNA を抽出した。 TLR の mRNA の発現を real time PCR にて 検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は日本大学医学部臨床研究委員会の承認のもと行われた。

C．研究結果

抗 β_2GP I 抗体は JEG-3 細胞に作用し TLR13, 4 の発現を亢進した。 TLR7, 8 では発現の亢進を認めなかった。

D．考察

抗β_2-GPI抗体の作用としてβ_2-GPIを介して内皮細胞の活性化をもたらすことも知られている。しかし、抗β_2-GPI抗体の結合する血管内皮細胞におけるレセプターの詳細は不明である。抗β_2-GPI抗体は血管内皮細胞に結合しさまざまな作用が発現すると考えられる。少なくとも３つのメカニズムが考えられる。１つは血管内皮細胞表面の陰性荷電部（陰性荷電リン脂質）とβ_2-GPIの結合、２つ目はAnnexin IIに結合したβ_2-GPIの結合である。３つ目はTLRを介した作用である。絨毛癌細胞でのTLR発現機序は、今後検討を要するが、正常絨毛でも抗 β_2GP I 抗体によりTLRの発現が亢進すると考えられる。

E．結論

β_2GP I 抗体陽性例では、絨毛細胞上でTLRを介した炎症反応 が亢進され、これらは妊娠の維持に障害を与え、 不育症の病態に関与する可能性が推察された。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1.　論文発表

市川　剛、山本樹生　抗β_2GP I 抗体による絨毛障害　臨床免役・アレルギー科 52(2)947-953, 2009

2.　学会発表

第24回日本生殖免役学会　2009年11月

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
市川　剛、 山本樹生	抗β_2GPⅠ抗体による絨毛障害	臨床免役・アレルギー科	52(2)	947-953	2009

分担研究報告 23

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：化学的流産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　藤井　俊策　弘前大学大学院医学研究科准教授

研究要旨
化学的流産の発生頻度と患者背景を，不妊外来に定期的に通院している患者を対象として前方視的に検討した。30 例の 110 排卵周期中 7 例の 8 周期(周期あたり 7.2%)で妊娠を確認し，うち 3 例の 3 周期(周期あたり 2.7%，妊娠あたり 37.5%)が化学的流産に終わり，2 例は多嚢胞性卵巣症候群，1 例は抗リン脂質抗体陽性不育症であった。

A．研究目的

化学的流産は，血中に hCG が検出されたにもかかわらず臨床的妊娠徴候を確認できずに月経をみたものである。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。

化学的流産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）および不育症カップルを対象とした。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，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，黄体補助療法に hCG は用いなかった。

（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 30 例の 110 排卵周期であり，内訳は subfertility 8 例，PCOS 10 例，不育症 12 例であった。7 例の 8 周期(周期あたり 7.2%)で妊娠を確認し，うち 3 例の 3 周期(周期あたり 2.7%，妊娠あたり 37.5%)が化学的流産であった。化学的流産に終わった 3 例のうち 2 例は PCOS，1 例は anti-phosphatidyl ethanolamine (aPE)-IgG 陽性不育症であり，PCOS の 1 例と aPE 陽性例は流産の既往を有した。

D．考察

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は，化学的流産となった患者は原因不明不妊と流産の既往があり，抗リン脂質抗体陽性者が多かった。一方，今回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 30%が化学的流産に終わり，2 例は PCOS，1 例は抗リン脂質抗体陽性という患者背景を有した。まだ観察周期数が少ないため，統計学的検討は行えなかった。

E．結論

自然妊娠周期でも化学的流産は高率に発生している可能性がある。また，何らかの背景因子が原因となっている可能性もあり，引き続き検討を要する。

F．健康危険情報

特になし

G．研究発表

1．論文発表

1）Fukui A, Fujii S, et al. Correlation between natural cytotoxicity receptors and intracellular cytokine expression of peripheral blood NK cells in women with recurrent

pregnancy losses and implantation failures. Am J Reprod Immunol 62, 371-380, 2009.
2) Kimura H, Fukui A, Fujii S, et al. Timed sexual intercourse facilitates the recruitment of uterine CD56(bright) natural killer cells in women with infertility. Am J Reprod Immunol 62, 118-124, 2009.
3) 藤井俊策, 他. 着床のメカニズム「NK細胞」. Hormone Frontier in Gynecology 16, 60-67, 2009.
4) 福井淳史,藤井俊策,他: 受精卵着床不全におけるNK細胞の役割. 臨床免疫・アレルギー科 52:158-165, 2009.
5) 福井淳史,藤井俊策,他.着床不全症例におけるNK細胞上natural cytotoxicity receptors発現とNK細胞産生サイトカイン. 日本受着会誌 26:341-347, 2009.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
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
Fukui A, Fujii S, et al.	Correlation between natural cytotoxicity receptors and intracellular cytokine expression of peripheral blood NK cells in women with recurrent pregnancy losses and implantation failures.	Am J Reprod Immunol	62	371-380	2009
Kimura H, Fukui A, Fujii S, et al.	Timed sexual intercourse facilitates the recruitment of uterine CD56(bright) natural killer cells in women with infertility.	Am J Reprod Immunol	62	118-124	2009
藤井俊策, 他	着床のメカニズム「NK細胞」	Hormone Frontier in Gynecology	16	60-67	2009
福井淳史, 藤井俊策, 他	受精卵着床不全におけるNK細胞の役割	臨床免疫・アレルギー科	52	158-165	2009
福井淳史, 藤井俊策, 他	着床不全症例におけるNK細胞上natural cytotoxicity receptors発現とNK細胞産生サイトカイン	日本受着会誌	26	341-347	2009

分担研究報告 24

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：不育症患者における子宮奇形などに関する検討

研究分担者　高桑好一　新潟大学医歯学総合病院周産母子センター教授

研究要旨

不育症の原因は多岐にわたるが、子宮の先天性形態異常も原因のひとつとして重要なものである。このたびの研究においては、不育症症例における先天性子宮奇形の関連性について検討した。また、不育症症例の臨床的事項を検討するための共同研究のため、症例の登録を行った。不育症症例における子宮奇形の臨床的検討については以下のような検討を行った。すなわち、新潟大学医歯学総合病院産婦人科不育外来で診療を行っている不育症症例に対し、原因検索のためのルーチン検査として子宮卵管造影検査を実施しているが、これまで同検査を実施した 1168 例の結果を検討した。その結果、双角子宮 22 例、不全中隔子宮 5 例、単角子宮 2 例が明らかな子宮形態異常として認められ、合計 29 例であり、その頻度は 2.48%であった。その後の妊娠予後について検討したところ、手術未施行例においてその妊娠継続率は約 85%であり、良好であった。症例の登録については平成 20 年から 21 年にかけて管理した不育症症例 52 例についての登録を行った。

A．研究目的

不育症の原因は多岐にわたるが、子宮形態異常、夫婦の染色体異常、自己免疫異常、血液凝固異常、同種免疫的異常などの関与が指摘されている。子宮形態異常は先天的異常である双角子宮、中隔子宮、単角子宮などがあり、その治療法として、子宮形成手術などが実施されることもある。今回の研究では不育症におけるこれら子宮形態異常の頻度およびその後の手術的治療の要否に関する検討を行った。

B．研究方法

新潟大学医歯学総合病院産婦人科不育外来を受診した症例に関して、原因検索のためのルーチン検査として、夫婦染色体検査、抗リン脂質抗体を含む自己抗体検査、遮断抗体活性などの同種免疫的検査、甲状腺ホルモン検査を含む内分泌学的検査、子宮卵管造影検査などを実施している。これまで子宮卵管造影検査を実施した 1168 例に関して、子宮形態異常の頻度を検討した。さらに、不育症の種類による子宮形態異常の頻度について検討した。また、平成 20 年以降不育外来を受診、原因検索を行った症例に関して多施設共同研究の一環として症例の登録を行った。

（倫理面への配慮）

不育症症例に対しては、不育症の原因、必要な検査などについて、子宮卵管造影検査も含め十分な説明の後同意を得て検査を実施し、治療方針の決定に応用している。このたびの検討は、不育症症例の集団内における頻度などの検討であり倫理的に問題ないものと判断している。

C．研究結果

新潟大学医歯学総合病院産婦人科不育外来において子宮卵管造影検査を実施した 1168 例における子宮形態異常症例は 29 例（2.48%）であった。その内訳は、双角子宮 22 例、不全中隔子宮 5 例、単角子宮 2 例であった。946 症例に関し、不育症の種類別に子宮形態異常を検討したところ、原発性反復流産症例（分娩経験がなく 2 回以上の初期流産を反復している症例）719 例では 14 例(1.95%)に、続発反復流産症例（分娩を経験した後 2 回以上の初期流産を反復している症例）186 例では 1 例（0.54%）、死産症例（妊娠 12 週以降の子宮内胎児死亡経験例）では 41 例中 7 例(17.1%)であり、死産経験例で高率であった。その後の予後については、子宮形成手術を施行せず次回妊娠予後を追

跡した症例が 13 症例で 14 妊娠あったが、11 妊娠（78.6%）で満期分娩、1 例が 31 週の早産であり 12 例（85.7%）で生児を獲得し得た。これらの中には甲状腺機能亢進症合併例、プロテインＳ活性低下例などが存在し、それぞれ必要な治療が施行された。他の 2 症例は胎児異常が認められ後期流産に終った。一方、本研究班で多施設共同で実施している不育症症例の登録に関しては 52 症例について登録を実施した。

E．結論

不育症の原因として種々の要因が指摘されている。夫婦の染色体異常、抗リン脂質抗体を中心とした自己免疫異常、血液凝固異常、同種免疫異常、甲状腺機能異常、耐糖能異常などがそれらであるが、不育症症例については、これらの原因検索を系統的に実施することが重要であるが、原因の一つとして先天性の子宮形態異常が重要視されている。

子宮は、発生過程において左右のミュラー管が癒合して中隔部分が消失することにより、完成するが、発生段階の異常により各種の子宮奇形が生ずる。子宮は受精卵の着床、胎児発育の場であることから、子宮奇形の存在は不妊症、不育症などの原因として検討されてきた。アメリカ不妊学会では子宮奇形を 7 種類に分類している。I 型は低形成あるいは無形性、II 型は単角子宮、III 型は重複子宮、IV 型は双角子宮、V 型は中隔子宮、VI 型は弓状子宮、VII 型は Diethylsibesterol の被曝によるものであるが、これらの中で多いものは双角子宮と中隔子宮である。一般婦人における頻度について Raga らは 1289 例を対象に行った検討で 0.4%に双角子宮が、1.5%に中隔子宮が認められることを報告している（Raga F et al. Hum Reprod, 1997）。今回の検討では、不育症症例 1168 症例を対象とした検討で、2.48%に明らかな子宮形態異常が認められ、一般婦人集団よりやや高率であり、不育症の原因として関与していることが推察された。

一方、不育症の種類別に検討したところ、初期流産を反復している症例では、原発性であれ、続発性であれ 1%前後に子宮形態異常が認められるのみであったが、子宮内胎児死亡経験例は 17%と高率であり、子宮内胎児死亡とより関連することが考慮された。

従来から、不育症症例に関して、子宮形態異常が認められた場合には、手術による子宮形成術が実施されてきた。これに対し手術療法を施行せず、次回妊娠を管理し、再度流産に至った場合に手術療法を考慮するという考え方もあり（Heinonen PK, J Am Assoc Gynecol Laparosc, 1997）、結論は得られていない。研究者の施設では、以前は手術療法を行っていが、上記のような考えに沿い、患者に説明し方針を決定している。その結果手術療法を施行せず、次回妊娠を管理している症例があり、それらの症例の中で約 85%に生児を獲得するという結果を得ている。今後も症例を増やし、手術療法の要否に関する検討を行っていくことが重要であると判断している。また、子宮形態異常が存在する症例であって、他の原因検索で異常が認められた症例についてはその原因に関する治療を実施しており、そのことが妊娠継続に資する可能性もあり、不育症の原因に関する系統的な検査が重要であると考えられる。

F．健康危険情報

なし。

G．研究発表

1. 論文発表

1) Serikawa T, Takahashi Y, Ichikawa K, Uemura R, Kikuchi A, Takakuwa K, Sakakibara S, Matsunaga M, Tanaka K: A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia from human platelet antigen 5b incompatibility. Reprod Immunol Biol, 24: 18-20, 2009.

2) Wada Y, Sakamaki Y, Kobayashi D, Ajiro J, Moro H, Murakami S, Ooki I, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K, Sato T, Nakano M, Narita I: HELLP syndrome, multiple liver infarctions, and intrauterine fetal death in a patient with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Intern Med, 48: 1555-1558, 2009.

3) Serikawa T, Ichikawa K, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K: A case of a pregnant patient with a congenital heart block

accompanied by left isomerism and uncontrolled type 2 diabetes who was treated successfully with ritodrine. Gynecol Obstet Invest, 69: 193-196, 2009.

4) Nonaka T, Kikuchi A, Kido N, Takahashi Y, Yamada K, Usuda T, Takakuwa K, Tanaka K: Prenatal diagnosis of unilateral pulmonary agenesis in a pregnant woman undergoing chronic hemodialysis due to chronic renal failure. Prenat Diagn, 29: 707-709, 2009.

2. 学会発表

1) 能仲太郎、明石真美、大木泉、高桑好一、田中憲一：習慣流産におけるCytochrome P450(CYP1A1) 及び Glutathione S-transferase (GSTs)の遺伝子多型に関する解析、第61回日本産科婦人科学会、2009年4月3-5日、京都市。

2) 明石真美、能仲太郎、大木泉、高桑好一、田中憲一：不育症における抗プロテインS抗体の意義に関する検討、第61回日本産科婦人科学会、2009年4月3日-5日、京都市。

3) 能仲太郎、明石真美、大木泉、高桑好一、田中憲一：習慣流産に対する免疫療法の有効性に関する検討 ー特に年齢による有効性の差異に関する検討-、第54回日本生殖医学会、2009年11月22日、23日、金沢市。

4) Koichi Takakuwa, Taro Nonaka, Mami Akashi, Izumi Ooki, Kenichi Tanaka: Studies on the prophylactic therapy for patients who had experienced severe preeclampsia positive for anti-phospholipid antibodies using Sairei-to, low dose aspirin and prednisolone, 3rd International Summit 2009, Preeclampsia, 2009年11月12日-14日、仙台市。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

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
Serikawa T, Takahashi Y, Ichikawa K, Uemura R, Kikuchi A, Takakuwa K, Sakakibara S, Matsunaga M, Tanaka K	A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia from human platelet antigen 5b incompatibility	Reprod Immunol Biol	24	18-20	2009
Wada Y, Sakamaki Y, Kobayashi D, Ajiro J, Moro H, Murakami S, Ooki I, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K, Sato T, Nakano M, Narita I	HELLP syndrome, multiple liver infarctions, and intrauterine fetal death in a patient with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome	Intern Med	48	1555-1558	2009
Serikawa T, Ichikawa K, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K	A case of a pregnant patient with a congenital heart block accompanied by left isomerism and uncontrolled type 2 diabetes who was treated successfully with ritodrine	Gynecol Obstet Invest	69	193-196	2009

Nonaka T, Kikuchi A, Kido N, Takahashi Y, Yamada K, Usuda T, Takakuwa K, Tanaka K	Prenatal diagnosis of unilateral pulmonary agenesis in a pregnant woman undergoing chronic hemodialysis due to chronic renal failure	Prenat Diagn	29	707-709	2009

分担研究報告 25

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：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 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。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。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

不育症の原因はいまだ不明の事が多く、これまでのところ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。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 (Thormb Res, 84, 97, 1996)、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。撹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。

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

我々は 94 人の不育症患者に対してレーザー散乱粒子計測法を施行し、thrombophilia との関係を検討した。94 人中、自然凝集を認めたのは 38 人（40.4%）であった。一方、正常対照群では 30 人中２人(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 14 人について検討すると、抗 PE 抗体陽性は 42.9%、第 XII 因子欠乏は 50.0%に認められ、自然凝集の無い群（それぞれ、28.8%、20.0%）に比較して高率であった。一方で、プロテインＳ欠乏、抗カルジオリピン抗体陽性の頻度と自然凝集

の有無との間には関連を認めなかった。

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 Ibα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 Ibα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が、合成ペプチドを用いた検討で分かって来ている。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関連が認められ、我々の *in vitro* では抗PE抗体は血小板凝集能を亢進させるというデータを裏付ける結果が得られた。一方で抗カルジオリピン抗体やプロテインS欠乏症は、血小板を介さない病原性がある事が示唆された。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。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

1) Sugi T. Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses. Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol; 18: 67-76, 2009.

2) 杉　俊隆。不育症と自己免疫性thrombophilia（抗リン脂質抗体、抗第XII因子抗体、抗キニノーゲン抗体）。血栓止血誌; 20: 510-518, 2009.

3) 杉　俊隆。抗phosphatidylethanolamine抗体と抗第XII因子抗体。医学のあゆみ。(in press)

4) 杉　俊隆。習慣流産と血液凝固阻害薬。産科と婦人科。(in press)

2. 学会発表

1) 杉　俊隆。抗体検査、ヘパリン療法。第117回日本産科婦人科学会関東連合地方部会。都市センターホテル。2009。（シンポジウム）

2) 杉　俊隆。不育症患者の血小板凝集能の検討—レーザ-散乱粒子計測法を用いた検討—。第24回日本生殖免疫学会。京王プラザホテル。2009。

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