

### Contact activation

Factor XII is a single-chain zymogen with no detectable enzymatic activity. It has a molecular weight of 80 to 90 kD, is synthesized in the liver, and circulates in plasma at a concentration of 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>1, 2)</sup>. The protein has distinct domains homologous to fibronectin, plasminogen and plasminogen activators<sup>3, 4)</sup>.

Contact activation is initiated by the activation of factor XII. Factor XII can be autoactivated by contact with negatively charged surfaces or by exposure to proteases such as plasma kallikrein and plasmin, which produce enzymatic cleavage. These two mechanisms have been referred to as solid- and fluid-phase activation, respectively<sup>5)</sup>. Although there are many candidate physiologic negatively charged surfaces that *in vitro* can induce factor XII autoactivation, the concept of autoactivation itself has never been a sufficiently convincing mechanism to explain contact system activation *in vivo*. The basement membrane of endothelial cell matrix may support contact activation, but this has not been demonstrated *in vivo*. Collagen, long thought to be an initiator, was proven to be ineffective and the activity reported was possibly due to contaminating matrix proteins<sup>1)</sup>. Alternative mechanisms have been sought for factor XII activation *in vivo*. Recently, Motta et al.<sup>6)</sup> reported a novel mechanism for contact activation. Surprisingly, they reported that assembly of contact proteins, high molecular weight kininogen (HK) and prekallikrein, on cultured human endothelial cells resulted in prekallikrein activation independent of factor XII. Furthermore, factor XII activation by this pathway can occur<sup>2)</sup>.

Activated factor XII (factor XIIa) converts prekallikrein to kallikrein and kallikrein digests HK to liberate the vasoactive, proinflammatory mediator, bradykinin. Factor XIIa also activates factor XI to continue the intrinsic coagulation cascade. The prekallikrein activation pathway on

endothelial cells participates in two pathways for fibrinolysis. First, kallikrein cleaves HK to liberate bradykinin, which is the most potent and specific stimulator of endothelial cell tissue-type plasminogen activator liberation<sup>7)</sup>. Second, kallikrein induces kinetically favorable conversion of single-chain urokinase into two-chain urokinase<sup>6)</sup>.

Deficiencies of contact proteins are not associated with clinical bleeding despite marked prolonged activated partial thromboplastin time (aPTT), a surface-activated coagulation protein screening test. Paradoxically, studies suggest that contact proteins have anticoagulant, profibrinolytic functions in a physiologic milieu, on endothelial cells<sup>8-13)</sup>. Numerous clinical studies suggest that contact protein deficiencies may be associated with impaired contact factor-dependent fibrinolysis. This result may contribute to an increased incidence of thrombosis in patients with congenital factor XII deficiency, an increased incidence of factor XII deficiency in patients with venous thrombosis, and acquired thrombotic disorders such as myocardial infarction and re-thrombosis of coronary arteries after thrombolytic therapy<sup>12-15)</sup>. However, other studies suggest that factor XII plays no role in ischemic vascular disease<sup>16)</sup>. Thus, it is unclear from existing literature whether a factor deficiency leads to thrombophilia.

### Autoantibodies to contact proteins

Recently, numerous studies have suggested an association between contact protein deficiencies and recurrent pregnancy losses<sup>17-19)</sup>, and between autoantibodies to contact proteins and recurrent pregnancy losses<sup>20, 21)</sup>. Sugi and McIntyre<sup>21)</sup> reported that certain antiphosphatidylethanolamine antibodies (aPE) are not specific for phosphatidylethanolamine (PE) *per se*, but are directed to PE-binding plasma proteins, kininogens. Sugi et al. tested recurrent pregnancy loss patients for aPE, especially those patients who lose during the embryonic period (<10 weeks' gestation).

They showed a strong association between recurrent pregnancy loss and aPE, the latter of which requires the presence of kininogen or other plasma proteins<sup>22,23</sup>. In this study, 90.5% of the patients who were positive for plasma protein-dependent IgG aPE were kininogen-dependent. These data suggest that aPE may therefore represent a significant risk factor for early recurrent pregnancy loss.

Schved et al.<sup>17</sup> reported the cases of three young women with a factor XII deficiency (two homozygous and one heterozygous) and a clinical history of spontaneous abortion. Brulke et al.<sup>18</sup> reported on 8 patients with moderately reduced level of factor XII found among 43 patients with repeated abortions. Recently, Gris et al.<sup>19</sup> reported the prevalence of haemostasis abnormalities in 500 unexplained primary recurrent aborters. They found 9.4% of the patients with an isolated factor XII deficiency. Gallimore and Winter<sup>24</sup> reported a high incidence (20.9%) of apparently true factor XII deficiency in patients who were lupus anticoagulant (LA) positive. They have hypothesized that antibodies to factor XII might be present in some patients who are LA positive and that immune complexes may be formed leading to reduced levels of factor XII. They studied plasma samples from LA positive patients for the presence of antibodies to factor XII and reported that many patients were positive for antibodies to factor XII detected by ELISA and surface plasmon resonance<sup>25</sup>. Jones et al.<sup>26</sup> reported that when levels of factor XII were compared in patients with and without antibodies to factor XII, significantly lower levels of factor XII were seen in patients with antibodies to factor XII. This suggests that the immune complex formation and subsequent sequestration resulted in reduced levels of factor XII. They also reported that antibodies to factor XII showed a strong and statistically significant association with recurrent fetal loss (odds ratio 5.4,  $p=$

0.025)<sup>27</sup>. Autoantibodies to factor XII rather than factor XII deficiency may be a risk factor for thromboembolism and recurrent pregnancy losses.

Although some studies have identified factor XII deficiency as a risk factor for recurrent pregnancy loss<sup>17-19</sup>, others failed to find such a relationship<sup>28</sup>. Recently, Pauer et al generated mice deficient for factor XII using a gene targeting approach<sup>29</sup>. Homozygous factor XII knockout mice showed no factor XII plasma activity and had a markedly prolonged aPTT. Interestingly, they reported that matings of factor XII<sup>-/-</sup> males and XII<sup>-/-</sup> females resulted in normal litter sizes demonstrating that total factor XII deficiency in XII<sup>-/-</sup> females does not affect pregnancy outcome<sup>29</sup>. Iwaki et al also reported that in female mice homozygous for a total factor XII deficiency, normal deliveries occurred with normal litter sizes<sup>30</sup>. In contrast, Jones et al reported that antibodies to factor XII showed a strong and statistical significant association with recurrent fetal loss (odds ratio 5.4,  $p=0.025$ )<sup>27</sup>. They reported that when levels of factor XII were compared in patients with and without antibodies to factor XII, significantly lower levels of factor XII were seen in patients with antibodies to factor XII<sup>26</sup>. This suggests that the immune complex formation and subsequent sequestration resulted in reduced levels of factor XII. Autoantibodies to factor XII rather than factor XII deficiency may be a real risk factor for recurrent pregnancy losses.

HK inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting the binding of thrombin to platelets<sup>31</sup>. Domain 3 of HK is responsible<sup>32</sup>. Recently, the binding site on platelets, which mediates this effect, was shown to be glycoprotein (GP) Ib-IX complex<sup>33</sup>. It has been reported that HK and factor XII compete for the same binding site on endothelial cells<sup>34</sup>.

Bradford et al reported that factor XIIa also inhibits thrombin interaction with platelets in a

mechanism also involving binding to the same receptor<sup>35)</sup>. HK and factor XII both directly bind to glycofibrin, the extra cellular subunit of GP Ib $\alpha$ , in a Zn<sup>2+</sup>-dependent manner. They also reported that factor XII binding to platelets was inhibited by monoclonal antibody B7C9, whose noncontiguous epitopes have been mapped to amino acids 1-28 and an icosapeptide in the "finger region" of factor XII<sup>36)</sup>. Interestingly, we reported that among plasmas from 17 recurrent pregnancy loss patients who were positive for autoantibodies to factor XII, 13 patients (76.5%) recognized amino acids 1-30<sup>37)</sup>. This suggests that autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses may inhibit factor XII binding to platelets and may cause pregnancy loss.

The kininogens can inhibit platelet aggregation induced by thrombin. Domain 3 of the kininogen heavy chain was found to inhibit thrombin from binding to the platelet thrombin receptor. By using specific monoclonal antibodies, Jiang et al showed that it is the domain 3 region that is responsible for the inhibition of thrombin binding to platelets<sup>32)</sup>. Kunapuli et al found that recombinant domain 3 inhibited thrombin-induced platelet aggregation<sup>38)</sup>. Sugi and McIntyre<sup>21)</sup> reported that certain aPE are not specific for PE per se, but are directed to PE-binding plasma proteins, kininogens. Several studies report strong association of aPE with thrombosis and recurrent pregnancy losses<sup>22, 23, 39)</sup>. Sugi and McIntyre hypothesized that when bound by aPE, the platelet-kininogen complex may no longer render the platelet refractory to thrombin activation, thus predisposing to aggregation and thrombosis. Their *in vitro* data<sup>40)</sup> support these observations as they demonstrated that kininogen-dependent IgG-aPE purified from several aPE-positive patient plasmas caused marked augmentation of thrombin-induced platelet aggregation, but did not affect ADP-induced platelet aggregation. More-

over, kininogen-independent IgG-aPE did not affect thrombin-induced platelet aggregation. For this to occur, it is possible that aPE may recognize the domain 3 region of kininogens subsequent to their binding platelet. Herwald et al.<sup>41)</sup> reported that a monoclonal antibody to domain 3, HKH15, which interferes with the complex formation between kininogen and papain, also blocked the cell binding of kininogens and was directed to the extreme carboxyl-terminal portion of domain 3. The epitope of HKH15, which binds to domain 3 and blocks the binding of kininogens to platelets and endothelial cells, was mapped using synthetic peptides, which span the entire domain 3 sequence. They reported that one peptide, LDC27, specifically bound to HKH15. Fine mapping of the epitope of HKH15 has also revealed a minimal 13-residue segment in LDC27, named CNA13, to be the antibody-binding site. Katsunuma et al.<sup>42)</sup> reported that among plasmas from 24 recurrent pregnancy loss patients who were positive for kininogen-dependent IgG-aPE, 17 (70.8%) recognized the LDC27 peptide. They mapped the aPE-binding region to domain 3 using a plasma specimen from a recurrent pregnancy loss patient. Interestingly, the aPE of a patient recognized CNA13, which is identical to the epitope of HKH15. Leu331-Met357 (LDC27) and Cys333-Lys345 (CNA13) are located on the carboxyl-terminal portion of kininogen domain 3, which is known as the major kininogen heavy chain cell attachment site where it overlaps its cysteine protease inhibitory region. Because aPE interferes with the balance of hemostasis *in vitro*, aPE may therefore induce a similar condition in patients thereby causing thrombosis and recurrent pregnancy losses.

Many patients with recurrent pregnancy losses have both factor XII deficiency and aPE. In factor XII deficient patients with recurrent pregnancy losses, 32.4% were positive for aPE (Sugi T, unpublished data). From our epitope mapping

studies, both autoantibodies to factor XII and kininogen-dependent aPE may block factor XII and kininogen-binding to GP Ib-IX-V complex and augment thrombin-induced platelet aggregation. Thus autoantibodies to factor XII and kininogens may cause thrombosis and recurrent pregnancy losses.

Recently, Harris et al reported the antigenic binding site(s) of antibodies to factor XII associated with the antiphospholipid syndrome<sup>43)</sup>. They investigated plasma samples from 12 female patients with definite antiphospholipid syndrome for the presence of antibodies to factor XII. To investigate the antigenic binding site(s) of factor XII, 150 peptides of the known factor XII sequence were synthesized. Seven patients positive for factor XII antibodies were chosen and each patient's purified IgG or IgM was tested against each peptide. Plasma from only one of the seven patients showed binding to the synthetic peptides. In this patient, two regions were identified as possible antigenic binding site(s) for factor XII antibodies: one in the growth factor domain and the other in the catalytic domain. There was no convincing explanation how these antibodies may inhibit the physiological function of factor XII and contribute to the clinical symptoms suffered by this patient group. In our recent study, we tested the antigenic binding site(s) of antibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses. We reported that among plasmas from 17 recurrent pregnancy loss patients who were positive for autoantibodies to factor XII, 13 patients (76.5%) recognized amino acids 1-30<sup>37)</sup>. A difference between their study and our study is no patients studied fulfilled criteria for definite antiphospholipid syndrome in our study.

#### Kallikrein-kinin system

The kallikrein-kininogen-kinin system is involved with inflammatory processes that occur in many

tissues of the body. An acute phase induced inflammatory response is generally characterized by increased vascular permeability and tissue edema. Ovulation, endometrial proliferation, and decidualization/implantation evoke a similar inflammatory response, suggesting that activation of the kallikrein-kininogen-kinin system is involved with these biological events<sup>44,45)</sup>. Evidence for the presence of the kallikrein-kinin system in fetoplacental vessels has accumulated in several studies<sup>46,47)</sup>. Mutoh et al.<sup>48)</sup> indicated that a kinin generating activity of the kallikrein-kinin system is localized within the uteroplacental unit. Hermann et al.<sup>49)</sup> reported that kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein were present at the endothelial cells of placental villous capillaries. In larger placental blood vessels and umbilical cord, neither kininogens nor kallikreins were detected. The co-localization of kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein suggests that kinins could be generated locally in placental capillaries. Gene expression for plasma kallikrein, factor XII, and HK were detected in endometrium but not early conceptus tissues in the pig<sup>50)</sup>. Interestingly, although the liver is considered to be the major source of HK, plasma kallikrein, and factor XII, gene expression was detected in porcine endometrium. These results suggest that endometrium can exert a local effect on bradykinin release through endometrial synthesis of plasma kallikrein and factor XII. The functional spectrum of biologically active kinins, such as vasodilatation, vasoconstriction, smooth muscle contraction and relaxation, could influence placental blood flow regulation. With the indication that kinins induce increased microvascular permeability and vascular growth, the kallikrein-kininogen-kinin system may play a major role in uterine and placental angiogenesis essential for embryonic and fetal survival<sup>51)</sup>. Moreover, kinins could also have anti-thrombotic/profibrinolytic activities<sup>2,7)</sup>. Kinins, which are

released within the placenta, may play a role in regulating placental blood flow and transplacental transport of substrates and metabolites<sup>49)</sup>. To influence placental circulation and nutrient supply to the fetus effectively, components of the kallikrein-kinin system should be situated within or close to the placental vasculature.

High molecular weight kininogen (HK) is divided into a heavy chain and a light chain. The heavy chain and light chain are linked by D4, which contains the sequence of bradykinin (BK). After releasing BK by proteolytic cleavage, the cleaved HK (HKa) contains a heavy chain and a light chain that remain connected by a single disulfide bond. Recent studies have revealed that HKa inhibits angiogenesis while BK and intact HK promotes angiogenesis<sup>52)</sup>. It has long been known that HK bind to heparin, i.e., the mast cell-derived glycosaminoglycan (GAG)<sup>53)</sup>. Recently it has been demonstrated that HK attaches to endothelial cell surfaces through Leu331-Met357 (LDC27) in domain 3 (D3) and His479-His498 in domain 5 (D5) by docking to the heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) chains of proteoglycans<sup>54)</sup>. Cell-bound HK was almost exclusively in the uncleaved form which is pro-angiogenic, because binding to GAG protects HK from proteolytic processing<sup>55)</sup>. Renne et al. reported that affinity-purified antibodies to LDC27 inhibited HK binding to HS<sup>54)</sup>. This strongly suggests that kininogen-dependent aPE which also recognize LDC27 may inhibit HK binding to HS. Detachment of HK from cell surface GAG induce proteolytic processing and the products are HKa and BK. The  $t^{1/2}$  of BK is 30s while the  $t^{1/2}$  of HKa is 9h<sup>56)</sup>. Therefore, it may be possible that aPE induce HKa generation which inhibit placental angiogenesis and may cause pregnancy loss.

Early gestation pregnancy loss often may be associated with the autoantibody-associated disruption of the plasma contact system or kalli-

krein-kinin system. Because the kallikrein-kinin system is localized within the uteroplacental unit, it may play a role in regulating placental blood flow and transplacental transport of substances and metabolites. Disruption of this system may be a risk factor for early gestational loss.

#### Acknowledgements

Support from the Japan Society for the Promotion of Science to T. Sugi (#18591815) is gratefully acknowledged.

#### References

1. Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, Ghebrehiwet B, Silverberg M. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: Assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* 1997; 66: 225-72.
2. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and pro-inflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819-43.
3. Cool DE, Edgell CS, Louie GV, Zoller MJ, Brayer GD, Macgillivray RTA. Characterization of human blood coagulation Factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of Factor XII and the tertiary structure of beta-Factor XIIa. *J Biol Chem* 1985; 260: 13666-76.
4. Cool DE, Macgillivray RTA. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. *J Biol Chem* 1987; 262: 13662-73.
5. Cochrane CG, Revak SD, Wueppeer KD. Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. *J Exp Med* 1973; 138: 1564-83.
6. Motta G, Rojkaer R, Hasan AK, Cines DB, Schamier AH. 1998. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: A novel mechanism for contact activation. *Blood* 1998; 91: 516-28.

7. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 1997; 77: 522.
8. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819-43.
9. Wuepper KD, Miller DR, Lacombe MJ. Flaujeac trait. Deficiency of human plasma kininogen. *J Clin Invest* 1975; 56: 1663-72.
10. Saito H, Ratnoff OD, Waldmann R, Abraham JP. Fitzgerald trait: Deficiency of a hitherto unrecognized agent, Fitzgerald factor, participating in surface mediated reactions of clotting, fibrinolysis, generation of kinins, and the property of diluted plasma enhancing vascular permeability (PF/DIL). *J Clin Invest* 1975; 55: 1082.
11. Halbmayr WM, Haushofer A, Schon A, Mannhalter C, Stromer E, Baumgartner K, Fischer M. The prevalence of moderate and severe factor XII (Hageman factor) deficiency among the normal population: Evaluation of the incidence of factor XII deficiency among 300 healthy blood donors. *Thromb Haemost* 1994; 71: 68-72.
12. Lammle B, Wuillemin WA, Huber I, Krauskopf M, Zurcher C, Pflugshaupt R, Furlan M. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency-A study on 74 subjects from 14 swiss families. *Thromb Haemost* 1991; 65: 117-21.
13. Halbmayr WM, Mannhalter C, Feichtinger C, Rubi K, Fisher M. The prevalence of factor XII deficiency in 103 orally anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb Haemost* 1992; 68: 285-90.
14. Mannhalter C, Fischer M, Hopmeier P, Deutsch E. Factor XII activity and antigen concentrations in patients suffering from recurrent thrombosis. *Fibrinolysis* 1987; 1: 259-63.
15. Jespersen J, Munkvad S, Pedersen OD, Gram J, Kluft C. Evidence for a role of factor XII-dependent fibrinolysis in cardiovascular diseases. *Ann NY Acad Sci* 1992; 667: 454.
16. Oguchi S, Ito D, Murata M, Yoshida T, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Ikeda Y, Watanabe K. *Thromb Haemost* 2000; 83: 178-9.
17. Schved JF, Dupaigne D, Gris JC, Mares P, Neveu S. Factor XII congenital deficiency and early spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1989; 52: 335-6.
18. Braulke I, Hinney B, Pruggmayer M, Kostering H, Melloh P, Gunther E. Factor XII (Hageman) deficiency in women with habitual abortion: new subpopulation of recurrent aborters? *Fertil Steril* 1993; 59: 98-101.
19. Gris JC, Neveu SR, Maugard C, Tailland ML, Brun S, Courtieu C, Biron C, Hoffet M, Hedon B, Mares P. Prospective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1096-103.
20. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Sugi T. Phospholipid binding plasma proteins required for antiphospholipid antibody detection-an overview. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 101-10.
21. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood* 1995; 86: 3083-9.
22. Sugi T, Katsunuma J, Izumi S, McIntyre JA, Makino T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril* 1999; 71: 1060-65.
23. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, Dan L,

- Makino T. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30: 326-32.
24. Gallimore MJ, Winter JM. Factor XII determinations in the presence and absence of phospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79: 87-90.
25. Jones DW, Gallimore MJ, Harris S, Winter M. Antibodies to FXII associated with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1999; 81: 387-90.
26. Jones DW, Gallimore MJ, Mackie IJ, Harris SL, Winter M. Reduced factor XII levels in patients with the antiphospholipid syndrome are associated with antibodies to factor XII. *Br J Haematol* 2000; 110: 721-6.
27. Jones DW, Mackie IJ, Gallimore MJ, Winter M. Antibodies to factor XII and recurrent fetal loss in patients with the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2001; 113: 550-2.
28. Matsuura T, Kobayashi T, Asahina T, Kanyama N, Terao T. Is factor XII deficiency related to recurrent miscarriage? *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 115-20.
29. Pauer HU, Renne T, Hemmerlein B, Legler T, Fritzlar S, Adham I, Muller-Esterl W, Emons G, Sancken U, Engel W, Burfeind P. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene—a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 2004; 92: 503-8.
30. Iwaki T, Castellino FJ. Plasma levels of bradykinin are suppressed in factor XII-deficient mice. *Thromb Haemost* 2006; 95: 1003-10.
31. Puri RN, Zhou F, Hu CJ, Colman RF, Colman RW. High molecular weight kininogen inhibits thrombin-induced platelet aggregation and cleavage of aggrecan by inhibiting binding of thrombin to platelets. *Blood* 1991; 77: 500-7.
32. Jiang YP, Muller-Esterl W and Schmaier AH. Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets. *J Biol Chem* 1992; 267: 3712-7.
33. Bradford HN, Dela Cadena RA, Kunapuli SP, Dong JF, Lopez JA, Colman RW. Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 1997; 90: 1508-15.
34. Reddigari SR, Shibayama Y, Brunnee T, Kaplan AP. Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 11982-7.
35. Bradford HN, Pixley RA, Colman RW. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 2000; 275: 22756-63.
36. Clarke BJ, Cote HCF, Cool DE, Clark-Lewis I, Saito H, Pixley RA, Colman RW, MacGillivray RTA. Mapping of a putative surface-binding site for human coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1989; 264: 11497-502.
37. Inomo A, Sugi T, Fujita Y, Matsubayashi H, Izumi S-I, Mikami M. The antigenic binding sites of autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses. *Thromb Haemost* 2008; 99: 316-23.
38. Kunapuli SP, Bradford HN, Jameson BA, DeLa Cadena RA, Rick L, Wassel RP, Colman RW. Thrombin-induced platelet aggregation is inhibited by the heptapeptide Leu-271-Ala277 domain 3 in the heavy chain of high molecular weight kininogen. *J Biol Chem* 1996; 271: 11228-34.
39. Sanmarco M, Alessi MC, Harle JR, Sapin C, Aillaud MF, Gentile S, Juhan-Vague I, Weiller PJ. Antibodies to phosphatidylethanolamine

- as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses. *Thromb Haemost* 2001; 85: 800-5.
40. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to kininogen-phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 1996; 84: 97-109.
  41. Herwald H, Hasan AAK, Godovac-Zimmermann J, Schmaier AH, Muller-Esterl W. Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain 3. *J Biol Chem* 1995; 270: 14634-42.
  42. Katsunuma J, Sugi T, Inomo A, Matsubayashi H, Izumi S-I, Makino T. Kininogen domain 3 contains regions recognized by antiphosphatidylethanolamine antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 132-8.
  43. Harris SL, Jones DW, Gallimore MJ, Nicholls PJ, Winter M. The antigenic binding site(s) of antibodies to factor XII associated with the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 969-75.
  44. Gao X, Greenbaum LM, Mahesh VB, Brann DW. Characterization of the kinin system in the ovary during ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1992; 47: 945-51.
  45. Valdes G, Figueroa CD, Corthorn J. Temporo-spatial changes of kallikrein-like enzymes during the estrous cycle and pregnancy in the rat uterus. *Biol Reprod* 1996; 55: 236-45.
  46. Miatello RM, Lama M, Gonzalez S, Damiani T, Nolly H. Biochemical evidence for a kallikrein-like activity in rat reproductive tissue. *Hypertension* 1994; 23 (Suppl 1): 193-7.
  47. Weerasinghe KM, Gadsby JE. The presence of glandular kallikrein in rabbit fetal placental conditioned medium. *Endocrinology* 1992; 131: 1777-81.
  48. Mutoh S, Kobayashi M, Hirata J, Itoh N, Maki M, Komatsu Y, Yoshida A, Sasa H, Kuroda K, Kikuchi Y, Nagata I, Ohno Y. Studies on blood coagulation-fibrinolysis system regarding kallikrein-kinin system in the utero-placental circulation during normal pregnancy, labor and puerperium. *Agents Actions* 1992; 38/II: 320-9.
  49. Hermann A, Buchinger P, Somlev B, Rehbock J. High and low molecular weight kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein in villous capillaries of human term placenta. *Placenta* 1996; 17: 223-30.
  50. Vonnahme KA, Fernando SC, Ross JW, Ashworth MD, DeSilva U, Malayer JR, Geisert RD. Porcine endometrial expression of kininogen, factor XII, and plasma kallikrein in cyclic and pregnant gilts. *Biol Reprod* 2004; 70: 132-8.
  51. Fabre J-E, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 1999; 99: 3043-9.
  52. Colman RW, Pixley RA, Sainz IM, Song JS, Isordia-Salas I, Muhamed SN, Powell JA Jr, Mousa SA. Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high-molecular-weight kininogen. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 164-70.
  53. Pixley RA, Lin Y, Isordia-Salas I, Colman RW. Fine mapping of the sequence in domain 5 of high molecular weight kininogen (HK) interacting with heparin and zinc. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1791-8.
  54. Renne T, Dedio J, David G, Muller-Esterl W. High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation of endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 33688-96.
  55. Renne T, Schuh K, Muller-Esterl W. Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J Immunol* 2005; 175: 3377-85.
  56. Schmaier AH, Wahl R, Fisher SJ, Brenner D. The pharmacokinetics of the kininogens. *Thromb Res* 1998; 92: 293-7.



## 要 旨

女性の生殖器系は、体内で2番目にキニノーゲンおよびその代謝産物の豊富な部位であると言われている。カリクレイン-キニン系は胎児、胎盤の血管に存在していることが最近明らかになってきている。胎盤の大きな血管や臍帯ではなく、絨毛の毛細血管内皮細胞にキニノーゲンやプレカリクレイン、カリクレインが存在する事が報告されており、キニンが胎盤の毛細血管に限局して産生されていることが示唆されている。キニンは抗凝固、線溶促進作用だけでなく、血流を増加させるなどの生物学的活性をもったペプチドであり、胎盤内で放出され、胎盤の血流や代謝産物の経胎盤輸送などを調節する重要な役割を担っている可能性が指摘されている。また、ブラジキニンの血管新生作用も報告されており、胎盤形成に重要な役割を果たしている可能性がある。つまり、カリクレイン-キニン系は、全身の血液凝固、線溶系のみならず、特に生殖の領域で非常に重要な位置を占めていると考えられる。

最近、第XII因子欠乏症などカリクレイン-キニン系の蛋白の欠乏と反復流産との関係が報告されている。また、キニノーゲン依存性抗PE抗体や、抗第XII因子抗体など、カリクレイン-キニン系蛋白に対する自己抗体と反復流産との関係も報告されている。カリクレイン-キニン系は、妊娠維持に重要な役割を果たしていると考えられるので、その破綻は流産に直結する可能性がある。

カリクレイン-キニン系の破綻による流産の特徴は、妊娠10週未満に起きる事である。現時点での治療は、低用量アスピリン療法やヘパリン療法などの抗凝固療法が挙げられる。しかしながら、最近筆者は、ヘパリンがELISA中で劇的に抗PE抗体の抗体価を低下させる事を報告しており、ヘパリンの抗体中和作用または吸着作用が重要である可能性がある。さらにヘパリンは、カリクレイン-キニン系、特にブラジキニンを介して血管新生、つまりは胎盤形成を促進するという報告もあり、直接胎盤に作用して流産を防止する可能性もある。ヘパリンは単に血液凝固系に作用するのみならず、妊娠維持に直接重要な役割を果たしている可能性がある。

## 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

富山大学産科婦人科<sup>1)</sup>、名古屋市立大学産科婦人科<sup>2)</sup>、東京慈恵会医科大学産科婦人科<sup>3)</sup>、東京大学産科婦人科<sup>4)</sup>、  
杉ウイメンズクリニック<sup>5)</sup>、慶應義塾大学産科婦人科<sup>6)</sup>、日本医科大学産科婦人科<sup>7)</sup>、神戸大学産科婦人科<sup>8)</sup>、  
国立成育医療センター周産期診療部<sup>9)</sup>、大阪大学産科婦人科学<sup>10)</sup>、日本大学産科婦人科<sup>11)</sup>、弘前大学産科婦人科<sup>12)</sup>、  
岡山大学保健学<sup>13)</sup>、川崎医科大学産科婦人科<sup>14)</sup>

齋藤 滋<sup>1)</sup> 杉浦 真弓<sup>2)</sup> 田中 忠夫<sup>3)</sup> 藤井 知行<sup>4)</sup> 杉 俊隆<sup>5)</sup>  
丸山 哲夫<sup>6)</sup> 竹下 俊行<sup>7)</sup> 山田 秀人<sup>8)</sup> 小澤 伸晃<sup>9)</sup> 木村 正<sup>10)</sup>  
山本 樹生<sup>11)</sup> 藤井 俊策<sup>12)</sup> 中塚 幹也<sup>13)</sup> 下屋浩一郎<sup>14)</sup>

## ワークショップ12「不育症の新たな原因探索と治療」

## 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

富山大学産科婦人科<sup>1)</sup>、名古屋市立大学産科婦人科<sup>2)</sup>、東京慈恵会医科大学産科婦人科<sup>3)</sup>、東京大学産科婦人科<sup>4)</sup>、  
杉ウイメンズクリニック<sup>5)</sup>、慶應義塾大学産科婦人科<sup>6)</sup>、日本医科大学産科婦人科<sup>7)</sup>、神戸大学産科婦人科<sup>8)</sup>、  
国立成育医療センター周産期診療部<sup>9)</sup>、大阪大学産科婦人科学<sup>10)</sup>、日本大学産科婦人科<sup>11)</sup>、弘前大学産科婦人科<sup>12)</sup>、  
岡山大学保健学<sup>13)</sup>、川崎医科大学産科婦人科<sup>14)</sup>

齋藤 滋<sup>1)</sup> 杉浦 真弓<sup>2)</sup> 田中 忠夫<sup>3)</sup> 藤井 知行<sup>4)</sup> 杉 俊隆<sup>5)</sup>  
丸山 哲夫<sup>6)</sup> 竹下 俊行<sup>7)</sup> 山田 秀人<sup>8)</sup> 小澤 伸晃<sup>9)</sup> 木村 正<sup>10)</sup>  
山本 樹生<sup>11)</sup> 藤井 俊策<sup>12)</sup> 中塚 幹也<sup>13)</sup> 下屋浩一郎<sup>14)</sup>

## Key words

habitual abortion  
recurrent pregnancy loss  
risk factors  
treatment

**要旨** 日本における不育症のリスク因子を前方視的に検討したところ、夫婦染色体異常(10.7%)、子宮形態異常(4.7%)、甲状腺機能異常(4.3%)、抗リン脂質抗体症候群(11.0%)、抗PE抗体陽性(35.6%)、XII因子欠乏症(18.0%)、プロテインS欠乏症(7.0%)、原因不明(35.1%)であった。今後、これらの症例の治療法別の生児獲得率を明確にする必要がある。

## はじめに

不育症患者は1~3%程度に存在すると考えられているが、わが国における実態は不明である。また不育症の要因もしくは関連する因子については多種存在するが、我が国における実態は日本産科婦人科学会の報告<sup>1)</sup>があるのみで、いまだ十分に解明されていない。また不育症に関する明確な治療方針もなく、不育症専門外来を設置する医療機関もわずかである。そこで平成20年度、21年度厚生労働科学研究費補助金による「子ども家庭総合研究：不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究班」を立ち上げ、班員施設による不育症のリスク因子につき前方視的検討を行った。

## 研究方法

班員による14施設の協力のもと、2007年~2008年に不育症精査のため受診した538組の不育症例につき前方視的に表1の検査を施行した。なおcut off値は $\beta_2$ GPI依存性抗CL抗体は1.8、抗カルジオリピンIgMは8、ループスアンチコアグラント(LA)は1.3、抗PE IgG抗体は0.3、高PE IgM抗体は0.45、XII因子、プロテインS、プロテインCは60%、抗核抗体は80倍、

NK活性は40%とした。本調査にあたっては、各所属機関で倫理委員会の承認を得ている。

## I. 不育症リスク因子

表2に結果を示す<sup>2)</sup>。538組の不育症例の登録があったが、検査途上にある症例や、一部保険診療外の検査も含まれるため全例にすべての検査が行われていない。原因不明例は、ほぼすべての検査をされている症例の中で異常が確認されないものとした。日本産科婦人科学会で以前行った調査での不育症リスク因子も併記した(表3)。

その結果、夫婦染色体異常は10.7%、子宮形態異常が4.7%、甲状腺機能異常が4.3%、抗リン脂質抗体と診断される症例(不育症で、かつ $\beta_2$ GPI依存性抗CL抗体、抗CL IgG抗体、抗CL IgM抗体もしくはループスアンチコアグラント(LA)が一つでも陽性の症例)が11.0%、 $\beta_2$ GPI依存性抗CL抗体が3.4%、抗CL IgG抗体が7.2%、抗CL IgM抗体が3.0%、LAが0.7%、凝固因子異常としてXII因子欠乏症が17.9%、プロテインS欠乏症が7.0%、プロテインC欠乏症が0%であった。

表2に示す如く、抗リン脂質抗体の1つであるが、

表 1 不育症スクリーニング検査

<必須検査項目> 1. 子宮形態検査 子宮卵管造影検査 (HSG) (340 点) (嚙管法による検査が望ましい) 2. 内分泌学的検査 下垂体機能                   PRL (day 3 ~ 7) (140 点) 甲状腺機能検査            fT4 (190 点), TSH (150 点) 糖尿病検査                 (空腹時) 血糖 (14 点) 卵巢機能検査               P4 値 (黄体期中期) (220 点) 3. 染色体検査 (G バンド核型分析) 患者および夫 (2,400 点)     [ 2 回流産例には可能な限り行う ] 4. 自己抗体および抗リン脂質抗体                                     [ 3 回以上の流産症例には全例 ] 自己抗体 抗核抗体 (85 点) 抗リン脂質抗体 抗 CL・β <sub>2</sub> GPI 複合体抗体 (310 点) ループスアンチコアグラント (330 点) 抗 CL 抗体 IgG (330 点), IgM (保険未収載) 抗 PE 抗体 IgG, IgM (保険未収載) 5. 凝固因子活性 aPTT, PT (87 点), XII 因子活性 * (320 点) プロテイン C 抗原 *, 活性 * (各 300 点), プロテイン S 抗原 * (220 点)	
<選択項目> 1. 同種免疫検査 NK 活性 (保険未収載)	

表 2 不育症例のデータベース構築

(問題点) : 本邦における不育症例のデータベースが十分でない。

(研究方法) : 厚労省研究班員により, 前方視的に新規症例を登録し, 不育症と関連するリスク因子の抽出と各種治療法による生児獲得率を明確にする。

(結果) : 538 組の不育症例の登録があった。

不育症リスク因子の頻度

染色体異常	30/281 (10.6%)	凝固因子異常	
子宮形態異常	18/379 (4.7%)	XII 因子欠乏	77/429 (18.0%)
抗リン脂質抗体異常	50/453 (11.0%)	プロテイン S 欠乏	32/458 (7.0%)
β <sub>2</sub> GPI 依存性抗 CL 抗体	15/441 (3.4%)	プロテイン C 欠乏	0/286 (0%)
抗 CL IgG 抗体	28/390 (7.1%)	甲状腺機能異常	16/373 (4.3%)
抗 CL IgM 抗体	11/369 (3.0%)	免疫異常	
LA	3/439 (0.7%)	NK 活性	9/38 (23.7%)
抗 PE 抗体	148/416 (35.6%)	抗核抗体	20/447 (4.5%)
IgG	82/416 (19.7%)	原因不明	97/276 (35.1%)
IgM	83/377 (22.0%)		

(考案) : 今後さらに症例を追加するとともに各リスト因子毎の各種治療法による生児獲得率を明らかにする (次年度継続予定)。

抗リン脂質抗体症候群の診断基準に含まれない抗 PE IgG 抗体異常が 20.1%, 抗 PE IgM 抗体異常が 22.1%, 両者のいずれか一方が陽性の割合が 35.9%であった。

その他免疫異常として抗核抗体陽性者が 4.6%, 症例は少ないが NK 活性高値は 23.7%に認められた。

今回の調査で明らかになったことは不育症例で抗リ

表3 我が国における不育症リスク因子

不育症リスク因子	厚労省研究		日本産科婦人科学会		計	
夫婦染色体異常	30/281	(10.7%)	52/678	(7.7%)	82/959	(8.6%)
子宮形態異常	18/379	(4.7%)	67/711	(9.4%)	85/1,090	(7.8%)
内分泌異常						
甲状腺機能異常	16/373	(4.3%)	55/791	(7.0%)	71/1,164	(6.1%)
抗リン脂質抗体	50/453	(11.0%)	ND		ND	
$\beta_2$ GPI 依存性抗 CL 抗体	15/441	(3.4%)	7/623	(1.1%)	22/1,064	(2.1%)
抗 CL IgG 抗体	28/390	(7.2%)	ND		ND	
抗 CL IgM 抗体	11/369	(3.0%)	ND		ND	
ループスアンチコアグラント	3/439	(0.7%)	12/751	(1.6%)	15/1,190	(1.3%)
凝固因子異常						
XII因子欠乏	77/429	(17.9%)	86/304	(28.3%)	163/733	(22.2%)
プロテイン S 欠乏	32/458	(7.0%)	ND		ND	
プロテイン C 欠乏	0/286	(0.0%)	ND		ND	
原因不明	97/276	(35.1%)		約 49%	ND	

ND：記載なし，CL：カルジオリピン

抗リン脂質抗体陽性は上記の4つのうち1つ以上を陽性とするもの

表4 染色体異常を有する不育症例のその後の妊娠予後

(問題点)：不育症例のカップルで染色体異常があった場合，患者は結果を絶望的と受けとめ妊娠を諦めてしまうことも稀でない，これは不育症例で染色体異常と診断された後の妊娠での生児獲得率が知られていなかったからである。

(研究方法)：厚労省研究班により染色体異常例の次回妊娠婦結を後方視的に調査した。

(結果)：対象は2,382組の不育症カップル

不育症における染色体異常の割合		次回妊娠婦結	
		生児獲得率	
染色体異常カップル	129/2382 (5.4%)	相互転座	29/46 (63.0%)
		Robertson 転座	3/5 (60.0%)
染色体転座	85/2382 (3.6%)	逆位	5/7 (71.4%)
		Low-frequency mosaicism	9/17 (52.9%)
Robertson 転座	13/2382 (0.5%)	染色体正常不育症例	950/1207 (78.7%)

(J. Hum Genet 2008 ; 53 : 622-628)

(考案)：染色体異常を持つ不育症カップルでも十分に高い確率で生児を獲得することができることが判明した。今後不育症患者に情報を公開する予定。

これらの生児獲得率は着床前診断 (PGD) による成功率を上まわっていた。

ン脂質抗体症候群である可能性のある症例が11%存在することである。診断基準では再検して再度抗リン脂質抗体が陽性であることが求められているので，今回のデータだけでは正確な率を求めることはできないが，約1割の不育症例が抗リン脂質抗体症候群であることの意義は大きい。また凝固因子異常の中でプロテイン S 欠乏症の頻度も7.0%と比較的高率であることが判明した。

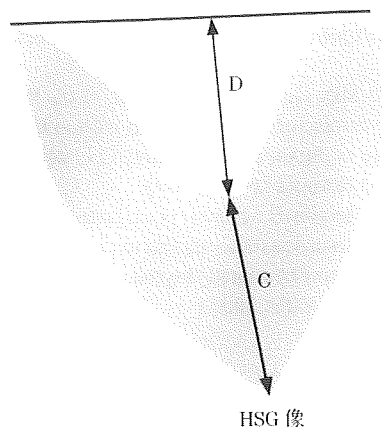
また，ほぼすべての検査を行っても異常を認めない症例が35.1%にも認められており，これらの症例にどのように対応するかも課題として指摘された。

## II. 各リスク因子毎の対応策

### 1) 染色体異常を有する不育症例への対応

不育症のカップルで染色体異常が判明した際，患者は結果を絶望的にとらえ妊娠を諦めてしまうことも稀でない。また最近では着床前診断を行うことも試みられている。これらの背景として染色体異常の不育症例の生児獲得率が極めて悪いと思われていたためであるが，症例数が少ないため染色体異常と診断された後の妊娠での生児獲得率がこれまで知られていなかった。そこで班員により，染色体異常を有する不育症例を各施設で集め，これら症例の次回妊娠婦結を後方視的に調査した<sup>3)</sup>(表4)。対象は2,382組の不育症カップルで，5.4%に染色体異常が認められた。染色体相互転座が

図1 子宮中隔 (D) と子宮腔 (C) と流産率の関係  
D/C 比が 0.61 とした際、D/C 比が 0.61 以上の人が次回妊娠時に流産となることが、感度 80%、特異度 76.5% で予測できる。



3.6%、Robertson 転座が 0.5% であった。

これらの症例で、経過観察中に妊娠した症例の生児獲得率は相互転座 63.0%、Robertson 転座 60%、逆位 71.4%、Low-frequency mosaicism 52.9% であった。これらの率は同時期の染色体正常不育症例の生児獲得率の 78.7% に比して、低値ではあるが、決して悲観する値でないことも判明した (表 4)。相互転座ならびに Robertson 型転座の場合、不均衡型になる率が 50%、67% となり、さらに 15% の自然流産率を加えると流産率はそれぞれ 60 ~ 65%、約 80% になるはずであるが、実際の流産率は理論値より低率であった。他の報告でも、染色体異常例での妊娠予後は比較的良好であるので<sup>4)</sup>、不均衡型の配偶子や胚が maturation arrest で早期に淘汰されている可能性がある。

いずれにしても、染色体異常例では正常例に比し若干生児獲得率は低いですが、理論値よりは十分に高い確率で生児を得ることができることが今回の調査で明らかになった意義は大きく、患者を勇気づけるデータとなった。

## 2) 子宮奇形を有する不育症例への対応

不育症のスクリーニングで双角子宮や中隔子宮等の異常が今回の調査で 4.7% に認められたが、これら奇形例でのそのあとの生児獲得率を正常子宮の患者と比較した研究はない。班員の杉浦らの報告により、双角子宮・中隔子宮と診断された後の初回妊娠成功率は 59.5% (25/42) と、正常子宮例の値 71.7% (1096/1528) に比し低値となる傾向を認めた。流産となった症例での胎児染色体異常率は双角子宮・中隔子宮で 15.4% と、正常子宮例の 57.5% に比し有意に低率であった<sup>5)</sup>。このことは、子宮奇形がある場合、胎児染色体が正常でも流産する率が高いことを示唆している。さらにどのよ

うな症例で流産率が高くなるかを調査したところ、図 1 に示すように子宮中隔の高さを D、残りの空洞 (子宮内腔) の高さを C とした際、流産群の D/C 比は出産群の D/C 比より有意に大きく、ROC 曲線により流産を最適に予測する D/C 比は 0.61 で、感度 80%、特異度 76.5% であった<sup>6)</sup>。このことより D/C 比が 0.61 未満の症例には待機療法が 1 つの選択肢となるのかもしれない。逆に D/C 比が 0.61 以上の症例では、子宮形成術が有効であるかどうか、今後検討することが必要であろう。

## 3) 抗リン脂質抗体症候群に対する対応

2009 年の Cochran Library には、ヘパリン+低用量アスピリン療法を行うと、流・死産率が低用量ヘパリン群に比し 0.46 にまで低下すると述べられている<sup>6)</sup>。今回の調査で不育症は日本で年間 7.9 万人生じていることが判明し、抗リン脂質抗体陽性者が 11% 存在するので年間 8,000 人の不育症例がヘパリン+低用量アスピリン療法の適応となるが、皮下注射で用いるヘパリンカルシウムが保険収載されていないのが大きな問題点である。またヘパリン皮下注の自己注射も認められていない。

さらに抗リン脂質抗体の 1 つである抗 PE 抗体陽性者に対してどのような治療を行うかは、今後の課題である。

## 4) 凝固因子欠乏症に対する対応

凝固因子の中で XII 因子欠乏症は 18.0% と高頻度であったが、低用量アスピリン療法や低用量アスピリン+ヘパリン療法が行われている。どちらの治療法が良いのかというエビデンスレベルの高い報告はない。低用量アスピリン療法で十分なのか、もしくは低用量アスピリン療法にヘパリンを併用した方が良いのか、検討していく必要がある。プロテイン S 欠乏症はアジア人に比較的多いが、今回、7.0% の頻度で不育症例に存在することがわかった。妊娠 10 週以降の流・死産の既往のあるプロテイン S 欠乏症の不育症例に低用量アスピリン療法を行った際の生児獲得率は 7% と低く、ヘパリン療法を行った際の生児獲得率が 79% との報告がある<sup>7)</sup> ので、妊娠 10 週以降の流・死産の既往のあるプロテイン S 欠乏者には積極的にヘパリン療法を行うことが勧められる。ただし妊娠 10 週未満の流・早産を繰り返す症例についての、ヘパリン療法とアスピリン療法との治療成績については未だ十分に検討されていない。

## おわりに

これまで日本における不育症の病因や治療法については明らかでなかったが、今回の調査でようやく実態が見えてきた。今後、これらリスク因子を持つ不育症例の各種治療成績が明らかになっていくと思われる。この中で、特に注目したいのが、抗 PE 抗体陽性例に

対する対処法，中隔子宮例に対する手術療法の効果ならびに精神療法の有効性の有無であろう。

#### 文 献

- 1) 齋藤滋，石原理，久保春海 他：ヒト生殖のロス（習慣流産等）に対する臨床実態の調査小委員会（生殖・内分泌委員会）日産婦会誌 2005；57：1057-1059
- 2) 齋藤滋．厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）「不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究」平成 20 年度総括研究報告書 pp19-24
- 3) Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, et al. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J. Hum Genet* 2008；53：622-628
- 4) 齋藤滋．不育症の原因と治療．日本医師会雑誌 2008；137：39-43
- 5) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, et al. Midline uterine defect size correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases. *Fertil Steril* in press
- 6) Empson MB, Lassere M, Craig JC, et al. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochran Database of Systemic Reviews* Issue 2, 2009
- 7) Gris JC, Mercier E, Quéré I, et al. Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood* 2004；103：3695-3699.

## 特集Ⅰ 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\*

里見操緒<sup>\*\*1)</sup>  
竹下俊行<sup>\*\*</sup>

**Key Words** : paternal leukocyte immunization, recurrent miscarriage, alloimmune mechanisms, the secondary infertility

### はじめに

習慣流産に対するリンパ球輸注療法(夫リンパ球免疫療法)は, 最初に行われてから4半世紀を経た現在に至っても作用機序に関する研究はほとんど進展をみていない. 最近のメタアナリシスでは, 免疫療法の有効性は確認できておらず, 米国FDAが発した, 免疫療法は有効性と安全性が確認できるまではしばらく行わないという勧告により, 本療法は過去の遺物のような存在になってしまった. 一方, 夫リンパ球免疫療法を施行した患者が, その後一定期間妊娠に至らない続発性不妊症に移行する症例が存在する. その一部の患者に自己免疫異常が誘導されたとの報告もある. 本稿では, 当科の夫リンパ球免疫療法の実績, 治療成績なども加えて, 夫リンパ球免疫療法の意義について考えてみたい.

### 当科での不育症の精査

不育症は「妊娠はするものの流産・死産を繰り返す, 生児が獲得できない状態」とされる. 表1に不育症の原因となる疾患, 病態を列挙した<sup>1)</sup>.

表1 不育症の原因

1. 子宮形態異常  
子宮奇形, 粘膜下筋腫, 子宮腔癒着(Asherman症候群)など
2. 内分泌代謝異常  
糖尿病, 甲状腺機能異常, 黄体機能不全, 高プロラクチン血症など
3. 感染症
4. 血液凝固異常  
抗リン脂質抗体症候群, 第XII因子低下症など
5. 免疫異常  
自己免疫異常(抗リン脂質抗体症候群を含む), 同種免疫異常
6. 染色体異常
7. その他(精神的要因など)

当科では, 不育症原因精査を目的として当科外来を訪れた患者に対して, 表2に示すようなスクリーニングを行っている. これらの検査項目は日産婦生殖内分泌委員会の推奨項目に準じている<sup>2)</sup>. 系統的な検査を行うと, 反復流産で60~70%, 習慣流産で70~80%の症例になんらかの異常所見が認められた.

当科不育症外来における不育症原因の異常検出率は重複する症例もあるが, 子宮奇形16%, 高プロラクチン血症(潜在性も含む)25.4%, 抗核抗体陽性20.2%, 抗リン脂質抗体陽性24.0%, 高NK細胞活性症例37.2%などであった<sup>1)</sup>.

\* The secondary infertility after paternal leukocyte immunization.

\*\* Misao SATOMI, M.D., Ph.D. & Toshiyuki TAKESHITA, M.D., Ph.D.: 日本医科大学産婦人科(〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5); Department of Obstetrics and Gynecology, Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, JAPAN

<sup>1)</sup> 現 日本赤十字社葛飾赤十字産院(〒124-0012 東京都葛飾区立石5-11-12); Japanese Red Cross Katsushika Maternity Hospital, Tokyo 124-0012, JAPAN



表 2 当科における不育症スクリーニング項目

一般検査		一次スクリーニング	二次スクリーニング
血算 CRP クラミジア抗原 膣分泌物培養 梅毒検査	子宮形態異常	経膈超音波* 子宮卵管造影検査*	子宮鏡 ソノヒステログラフィー MRI
	内分泌検査	PRL, TRH test* LH, FSH(卵胞期) fT4, TSH* (空腹時)血糖* P4(黄体中期)*	75gOGTT HbA1c
	染色体検査	患者および夫	
	免疫系検査	抗核抗体* 抗CL-β <sub>2</sub> GPI複合体抗体 抗CL IgG抗体* 抗CL IgM抗体* 抗PE IgG抗体* 抗PE IgM抗体* 抗PS IgG抗体* 抗PS IgM抗体*	抗DNA抗体 抗SSA・RO抗体 NK活性* Th1/Th2比 遮断抗体活性 抗HLA抗体 補体系(CH50, C3, C4, C5a)
	自己抗体 抗リン脂質抗体症候群 同種免疫異常		
	凝固活性	aPTT* PT* 第XII因子活性*	Protein C(活性, 抗原) Protein S(活性, 抗原) ATIII

\* は必須項目.

表 3 夫リンパ球免疫療法の適応症例

- (1) 生産歴がない3回以上初期流産している原因不明症例
- (2) 自己免疫異常(抗核抗体あるいは抗リン脂質抗体)のない症例
- (3) 抗夫リンパ球抗体あるいは遮断抗体のない症例

(文献<sup>2)</sup>より引用)

### 夫リンパ球免疫療法

母体にとって胎児は同種移植片であるにもかかわらず、母体で拒絶することなく発育を続けているのは、母体と胎児間での免疫応答(免疫学的妊娠維持機構)が働いていると考えられる。このメカニズムの破綻により起こるのが同種免疫異常による流産の概念である。

夫リンパ球免疫療法は、腎臓移植前の輸血が移植腎の生着率を向上させたということにヒントを得て、約30年前よりTalor, Beerらにより臨床応用されはじめた。当時不育症に対する有効な治療法が少なかった時期に、画期的な治療法として大いに期待を集めたものであった。その後、1985年のMowbrayらのRCTを皮切りに多くのRCTが行われ<sup>3)</sup>、有効性を強調する報告が相

次いだ。ところが、1999年、「Lancet」に掲載されたOberらの報告でその有効性がほぼ完全に否定され<sup>4)</sup>、2003年、Scottが行った18のRCTをまとめたメタアナリシスで夫リンパ球免疫療法の有効性が確認できず<sup>5)</sup>、しだいに免疫療法を行う施設は減少していった。決定的となったのは、米国FDAが発した勧告であった。すなわち、免疫療法は有効性と安全性が確認できるまではしばらく行わないというものであった。その結果、夫リンパ球免疫療法を行う施設は米国においては無論のこと、わが国でも激減してしまった。

安全性に関しては、輸血と同様の治療行為であることを念頭に置き、感染症伝播の問題、GVHDに留意することが、日産婦生殖内分泌委員会からも注意が喚起されている<sup>2)</sup>。

### 当科における夫リンパ球免疫療法の成績

当科では、原則として日産婦生殖内分泌委員会の適応基準(表3)<sup>2)</sup>に従っているが、これに加えて染色体異常のない流産を2回反復している症例で、NK細胞活性が高値、またはTh1/Th2比高値を示したものを対象に治療を行っている。

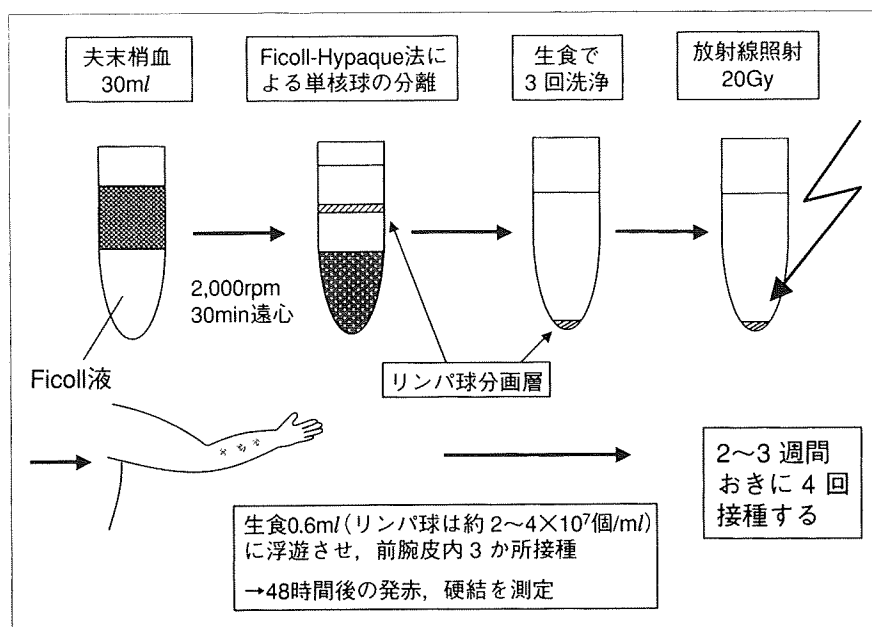


図1 夫リンパ球免疫療法の実際(文献<sup>2)</sup>より引用改変)

実際の方法を図1に示す。

2000年から2006年の間に、100名の不育症患者に対して本療法を行った。妊娠の転帰が確認できた80例のうち、妊娠が成立した症例は65名(81.3%)であり、本療法後1年以上妊娠に至らなかった症例は15名(18.7%)であった<sup>6)</sup>。妊娠成立例の中で生児獲得に至った症例は58名(89.2%)であった。

### 続発性不妊は本当に起こるのか？

生児獲得率からみた本療法の成功率は、諸家の報告例と比較しても遜色はない。しかし、本療法後に続発性不妊となった症例が20%弱に存在することは看過すべきでない。続発性不妊の問題は本療法が臨床応用された当初は指摘する向きもあったが、本件に関する論文はほとんど発表されていない。

当科での続発性不妊症群と生児獲得群との比較検討では、治療前の流産回数、治療開始期間、NK細胞活性異常検出率などに有意差は認めなかった。しかし、免疫療法施行時の平均年齢は続発性不妊症群では $35.9 \pm 4.0$ 歳に対し、妊娠維持成功症例群では $33.1 \pm 4.2$ 歳であり、前者が有意に高齢であった( $P=0.028$ )<sup>6)</sup>。加齢が不妊のリスク因子であることは言うまでもなく、適切なコントロールを設定していない以上、免疫療法とい

う医学的介入が不妊を惹起したとの解釈はあてはまらない。しかし、免疫前までは比較的短期間に妊娠を繰り返した症例が免疫後に突然不妊になってしまうことをしばしば経験すると、治療を受けた患者のみならず治療者側にとっても「免疫療法を行ったためか」との疑問を払拭できなくなる。免疫学の基礎に立ち戻ると、「免疫」は異物が二度と体内に侵入しないようにするための操作であった。本療法導入当初の懸念が、この免疫という操作による抗胎児(父方抗原)免疫であった。実際には、免疫の成立が胎児の受け入れに好都合に働くことがわかり、immunotrophismの概念が確立するに至ったが、免疫学は免疫応答の様式が個体により異なることも明らかにしてきた。

免疫療法の理論の一つに、遮断抗体の産生という考え方がある。リンパ球免疫によって夫婦間混合リンパ球反応が抑制され、遮断抗体が産生されていることが実験的に証明された。一方でこうした免疫応答の一環として、自己抗体が産生されることも示されている。リンパ球と精子の交叉免疫反応<sup>7)</sup>や抗リン脂質抗体の産生が示されており<sup>8)</sup>、不妊の原因となっている可能性は否定できない。また、免疫能の増強により不良受精卵が未然に排除されるため、臨床的に妊娠を感知できないのかもしれない。

いずれにせよ，症例数を集積し，適切なコントロールを設定した研究が必要であることは論を待たない。

### おわりに

夫リンパ球免疫療法の作用機序は，いまだに不明であると言わざるを得ない。副作用は当初懸念されたほど重篤なものはないが，輸血療法そのものであることに十分留意し，その適応基準は厳格に設定すべきである。加えて，高齢者に本療法を行う場合，続発性不妊についても留意し，実施にあたっては十分なインフォームドコンセントの上慎重に行うことが肝要であると思われる。

### 文 献

- 1) 竹下俊行. 不育症—診断と治療の最前線. 日本医事新報 2005 ; (4245) : 24.
- 2) 深谷孝夫, 水沼英樹, ほか. 日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会報告. 日産婦誌 2004 ; 56 : 859.
- 3) Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, et al. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. Lancet 1985 ; 1 : 941.
- 4) Ober C, Karrison T, Odem RR, et al. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages : a randomised trial. Lancet 1999 ; 354 : 365.
- 5) Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. Cochrane Database Syst Rev 2003 ; (1) : CD000112.
- 6) 峯 克也, 立山尚子, 富山僚子, ほか. 夫リンパ球免疫療法後一定期間以上不妊となった症例の臨床的検討. 日本生殖医学会雑誌 2006 ; 51 : 265.
- 7) Mathur S, Goust JM, Williamson HO, et al. Antigenic cross-reactivity of sperm and T lymphocytes. Fertil Steril 1980 ; 34 : 469.
- 8) 川口里恵, 田中忠夫. シンポジウム 2 原因不明習慣流産患者に対する夫リンパ球免疫療法—検査と治療の実際, およびその作用機序の検討—. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌 2009 ; 46 : 134.

\* \* \*

## 不育症

竹下 俊行

### はじめに

不育症は、妊娠はするが流産・死産を繰り返し生児が得られない状態と定義されるが、炎症反応と不育症の直接的な関連を示唆するエビデンスはない。流産時の病理所見では、多かれ少なかれ絨毛・脱膜に炎症反応が観察されるが、これが流産を反復する原因となるかどうかは不明である。不育症の原因は多岐にわたり、子宮形態異常、内分泌代謝異常、感染症、血液凝固異常、抗リン脂質抗体症候群、同種免疫異常、夫婦染色体異常(相互転座、ロバートソン転座)などが知られているが、このうち炎症反応が関与すると考えられるのは、感染症と免疫現象が主たる病態となる抗リン脂質抗体症候群、同種免疫異常である。本稿では、炎症反応と流産の一般的な関係を述べた上で、感染症と抗リン脂質抗体症候群について炎症反応との関連について考察したい。

### 妊娠は一種の炎症である

正常妊婦の体内では、あたかも敗血症患者のごとく全身性の炎症反応が起こっているが、これによって母体が障害されることはない。それは白血球増多、単核球症、食能亢進、ある種のサイトカインの増加などによって裏づけられる<sup>1)</sup>。また、古典的な炎症マーカーであるCRPも、妊娠4週で早くも微増するという<sup>2)</sup>。このように、妊娠時には、病原微生物の代わりに胎児によって引き起

こされる無菌性炎症の状態になっている。

妊娠時の炎症反応は allograft である胎児を守るために起こっていると考えるべきであり、これはサイトカイン産生パターンによって特徴づけられる。正常妊娠ではTh1/Th2バランスがTh2にシフトしていることはよく知られている。妊娠が進むにつれ徐々にTh1に傾いていくが、この制御がうまくいかないと流産や妊娠高血圧症候群などの病的妊娠に移行してしまう<sup>3)</sup>。

### 一般病理検査所見からみた炎症と不育症

流産絨毛の病理検査は必ず行うべき検査の一つであり、その目的は子宮内妊娠であったことの確認と絨毛性疾患の否定である。流産の原因に関する情報を病理検体から得ようとする試みは従来から行われていたが、あまり臨床上有用な所見は得られないことがほとんどである。Jindalら<sup>4)</sup>は、通常の臨床病理組織所見から流産を繰り返す不育症に特徴的な所見が得られないかと、文献的検索を行った。それによると、chronic histiocytic intervillitis(CHI)の所見が、ごく少数ではあるが不育症(習慣流産)の特徴的病理所見として観察されたという。しかし、多くの習慣流産に特徴的な所見は認められなかった。

### 感染症と不育症

感染症と流産の関係は古くから指摘されている。前項で述べたように、妊娠はそれ自体極めて微妙な免疫学的バランスの上に成り立っている現

たけした としゆき 日本医科大学産婦人科  
〒113-8603 東京都文京区千駄木1-1-5