

分担研究報告 14

分担課題:制御性 T 細胞の着床、妊娠維持に関する役割についての研究

研究代表者 齋藤 滋 富山大学産科婦人科学教授
研究協力者 島 友子 富山大学産科婦人科学助教
中島彰俊 富山大学産科婦人科学助教
伊藤実香 富山大学産科婦人科学研究生

研究要旨

父親抗原特異的 Treg 細胞の有無を確認するために、BALB/c マウス(♀)×DBA/2 マウス(♂)のアロ交配を用いて、妊娠マウスにおける父親抗原特異的 T 細胞の推移をフローサイトメトリーにて確認した。父親抗原特異制御性 T 細胞は同系妊娠では変動を認めなかったが、アロ妊娠では着床前(妊娠 3.5 日)、着床直後(妊娠 5.5 日)に所属リンパ節で上昇し、子宮では着床直後(妊娠 5.5 日)以降に上昇を認めた。アロ妊娠では父親抗原特異的制御性 T 細胞が着床前より子宮の所属リンパ節で増殖を開始しており、着床以降はさらに胎児母体局面である子宮で増殖していることがわかった。以上よりアロ妊娠において制御性 T 細胞は父親抗原特異的に妊娠の成立維持に関与ことが明らかとなった。

A. 研究目的

アロ妊娠の際、胎児(仔)は父親抗原を有するが、母体免疫系の変化により胎児は拒絶されずに妊娠は継続される。胎児許容機構の中で CD4+CD25+制御性 T 細胞の果たす役割は大きく、妊娠時に制御性 T 細胞が増加すること、流産例では制御性 T 細胞が減少することがこれまで知られていた。平成 21 年度の報告で、抗 CD25 抗体投与により制御性 T 細胞を減少させる方法を用いた実験系で、妊娠 2.5 日目のマウスに投与するとアロ妊娠では妊娠せず(着床障害)、同系妊娠では妊娠が確認されること、また、妊娠 4.5 日目および 7.5 日目の抗 CD25 抗体投与でアロ妊娠では高率に流産を生じるが同系妊娠では流産を生じないことより、アロ妊娠では制御性 T 細胞は着床と妊娠初期の妊娠維持に重要な役割を果たすことを明らかにしたと報告した。

アロ妊娠でのみ着床障害、流産が誘導されることから、父方抗原特異的制御性 T 細胞が存在する可能性に注目し、マウス妊娠時の父親抗原特異的制御性 T 細胞の同定とその変動を検討した。

B. 研究方法

父親抗原特異的 Treg 細胞の有無を確認するた

めに、アロ妊娠マウス群として、BALB/c マウス(♀)×DBA/2 マウス(♂)のアロ交配を用いた。DBA/2 マウスの保持している Mls I a 抗原に対して反応性 T 細胞受容体(TCR)である Vβ6 に注目した。同時に細胞増殖の有無を確認するため、Ki-67 抗原を染色し、妊娠 BALB/c マウスにおいて Ki67⁺Vβ6⁺Foxp3⁺T 細胞(父親抗原特異的制御性 T 細胞)の変動を解析した。妊娠 3.5(着床前)、5.5(着床後)、11.5(中期)、18.5(後期)日の妊娠各時期に、子宮局所、子宮所属リンパ節、全身表在リンパ節、脾臓の各臓器より単核球を分離し、フローサイトメトリーを用いて解析した。コントロール群として BALB/c マウス(♀)×BALB/c マウス(♂)の同系交配、および非妊娠 BALB/c マウス(♀)を用いた。

C. 研究結果

マウスは交配後 4.5 日に着床する。アロ妊娠では着床前(妊娠 3.5 日)、着床直後(妊娠 5.5 日)に子宮所属リンパ節で父親抗原特異的制御性 T 細胞率が有意に増加し、子宮では着床直後(妊娠 5.5 日)以降に有意に増加した。一方、アロ妊娠の脾臓、全身表在リンパ節、および同系妊娠では父親抗原特異的制御性 T 細胞の有意な変動は認めなかった。すなわち、アロ妊娠では胎児抗原特異的 Treg 細胞

が着床前より子宮の所属リンパ節で増殖を開始しており、着床以降はさらに胎児母体局面である子宮で増殖していることがわかった。

D. 考察・E. 結論

アロ妊娠において着床直前から母子接点の場においてのみ父親抗原特異的制御性 T 細胞が増殖していることから、性交渉後、腔内では樹状細胞が父親抗原を認識し、着床前日には所属リンパ節内で樹状細胞により父親抗原が制御性 T 細胞に抗原提示され、活性化された父親抗原特異的制御性 T 細胞が増殖し、着床後にはこれらの父親抗原特異的制御性 T 細胞が子宮に動員されて妊娠成立に関与するものと考えられた。

アロ妊娠の妊娠成立、妊娠維持に制御性 T 細胞は必須であり、さらに父親抗原特異的制御性 T 細胞の重要性が明らかとなった。

今後はヒトの原因不明不育症や着床障害の原因究明のために、ヒトにおける父親抗原特異的制御性 T 細胞の検索が必要となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shima T, Sasaki Y, Ito M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, Saito S. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. *J.Reprod.Immunol.* 85(2):121-129, 2010.
- 2) Saito S, Shima T, Nakashima A, Lin Y. Immune surveillance during pregnancy. *Indian J.Physiol Pharmacol.* 54(5):60-63,2010
- 3) 齋藤 滋, 島 友子, 中島彰俊:着床、妊娠維持における制御性(regulatory)T 細胞の重要性. *医学のあゆみ*, 233: 129-134,2010.

2. 学会発表

- 1) Tomoko Shima:「Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation」the XI International Congress of Reproductive Immunology. Travelars award 受賞 2010.8

- 2) Tomoko Shima:「Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation, and are necessary for maintenance of allogeneic pregnancy 」The 30th American society reproductive immunology annual meeting. Travelars award 受賞 2010.5

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
Shima T, Sasaki Y, Ito M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, Saito S	Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice.	J. Reprod. Immunol	85(2)	121-129	2010
Saito S, Shima T, Nakashima A, Lin Y.	Immune surveillance during pregnancy.	Indian J. Physiol Pharmacol	54(5)	60-63	2010
齋藤 滋, 島 友子, 中島彰俊	着床、妊娠維持における制御性(regulatory)T細胞の重要性.	医学のあゆみ	233	129-134	2010

分担研究報告 15

分担課題: 習慣流産に対する免疫療法ならびに抗凝固療法症例の臨床的検討

研究分担者 田中 忠夫 (東京慈恵会医科大学・産婦人科・教授)
研究協力者 川口 里恵, 梅原 永能, 高橋 絵理, 土橋 麻美子, 齋藤 幸代,
仲田 由紀, 和田 誠司(東京慈恵会医科大学・産婦人科・助教)
大浦 訓章 (東京慈恵会医科大学・産婦人科・准教授)

研究要旨

平成 20 年・21 年度に引き続き, 22 年度も症例を追加して研究を行ったが, 今年度は特に同種免疫異常に対する夫リンパ球用いた免疫療法(LIT)に関する研究を行った. LITによる妊娠維持率は約 70~80%であるが, 同種免疫異常と診断する検査方法・基準, また治療効果の判定法をなお検討する必要がある.

A. 研究目的

妊娠初期の流産を繰り返す不育症(反復あるいは習慣流産:RSA)の原因は多岐に渡っているが, 特に免疫学的因子が関与する病態は未だ完全には解明されておらず, いわゆる「原因不明」として分類されることが多く, 実際の臨床に際して, その管理指針が定まっていないのが現状である.

そこで本研究では, 同種免疫異常の存在を明らかにし, それらを検出する適切な検査法, および効果的かつ個別的な治療法の確立を目指す.

B. 研究方法

妊娠 12 週までの妊娠初期自然流産を 2 回以上繰り返しているために, 原因精査・加療を目的として慈恵医大病院・不育症外来を受診した症例を対象とし, 同意を得たうえで, まず既報のごとくスクリーニング検査を施行した. それらの検査で異常を認めない症例に対して, 次に特殊検査(natural killer(NK)細胞活性, 抗 HLA 抗体, 夫婦間混合リンパ球反応(MLR), および Th1/Th2 細胞比.)を施行し, LIT の適応症例を選別した.

なお, 本研究の施行に際しては事前に東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得た.

1. LIT の適応症例の選別:原則として MLR-BE 低値, 抗 HLA 抗体陰性, NK 細胞活性高値, あるいは Th1/Th2 比亢進のどれかに該当す

る症例を LIT の適応症例とした.

2. LIT 施行の実際:夫(パートナー)リンパ球は放射線処理後, $1\sim 5 \times 10^7$ 個/生食水 1ml に調整し, 妊娠前に 2 週間毎に 3 回, 妊娠成立後にさらに追加免疫として妊娠 12 週まで 2 週間毎に上腕皮内に接種した
3. LIT の治療成績および効果判定:121 例を対象として検討した.

C. 研究結果

1. LIT の治療成績

LIT を行った 121 例の中 78 例に妊娠が成立し, そのうち 55 例(70.5%)の妊娠維持に成功した. 23 例が流産したが, 絨毛染色体を検査できたのは 9 例であり, その中 7 例は異常, 14 例は染色体検査を施行できなかった. したがって, 染色体異常例を除くと, LIT の成功率は 77.5%であった.

2. LIT の効果判定

LIT 施行前後で, 前述の同種免疫関連特殊検査の結果と妊娠維持率との間の関連を検討した. その結果, MLR(抑制群と非抑制群), 抗 HLA 抗体(陽転化群と非陽転化群), NK 細胞活性(低下群と非低下群)そして Th1/Th2 比(低下群と非低下群)のいずれにおいても, 妊娠維持率とそれらの検査結果との間に有意な関連性は認めなかった.

3. LIT の副作用

LIT による母体への有害事象はなく, また妊娠経過ならびに出生児経の異常も認めなかった. ただ

し、抗体出現の有無を継続的に検査し得た 171 例において、aCL-IgG が 13 例(10.7%)で陽転化した。LA は 6 例(5.0%)、その他(ANA, β 2-GP1)は各 1 例であり、aDNA が陽転化した例は認めなかった。なお、aCL-IgG が陽転化した 14 例中 9 例(64.3%)は 1 年後には陰性化した。

D. 考察

LIT の効果に関しては未だ論議されており、結論はでていない。その大きな理由は母児間の同種免疫応答異常に起因する流産の存在は知られているが、それを検出する適切な検査、そして行われている LIT の有効性の評価は定まっていないからである。

今回の検討では、いずれの特殊検査も有意な関連性を示せなかった。今後は、LIT 前後の IDO の発現など、新しいマーカーとなり得るものを検討する予定である。

E. 結論

同種免疫異常と思われる症例に対する LIT は約 70%の妊娠維持率であった。しかし、LIT のより厳密な適応基準を決めることにより、一層の効果を得ることができると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高橋絵理, 川口里恵, 田中忠夫, 他. 抗リン脂質抗体からみた不妊症と不育症の相同性. 第 6 回 日本産科婦人科学会学術講演会 2010.04(東京).

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 16

分担課題:不育症治療における低用量アスピリン療法の安全性に関する検討

研究分担者 竹下俊行 日本医科大学産婦人科学教授
研究協力者 峯 克也 日本医科大学産婦人科学講師
平原史樹 横浜市立大学医学部教授

研究要旨

不育症の原因は多岐にわたるが、抗リン脂質抗体症候群はもっとも検出頻度が高く、因果関係に関するエビデンスレベルの高い報告が多くなされている。また、最近では血栓性素因と不育症の関連も明らかになってきた。このような素因を持つ女性が妊娠すると、その治療として低用量アスピリンが投与されることが多くなり、妊娠中の使用はかつてない頻度になっていると考えられる。本分担研究ではアスピリンの、妊娠中の服用に関する安全性を検証することを本研究の目的とした。

今回の調査では、既存のデータベースからアスピリン服用歴のある群を抽出し解析した。データベースは日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)のものを用いた。1994年～2008年に登録された先天異常児のうち、アスピリン服用歴のある症例は121例あった。先天異常の頻度(順位)は、登録された児全体の順位と大きく異なるものではなく、アスピリン服用群に特異的な先天異常は抽出されなかった。

今回の調査は、アスピリン服用群と非服用群を比較したものではないが、過去の海外の調査結果なども合わせ考えると、アスピリンは概ね安全に使用できる薬剤であることが確認された。

A. 研究目的

不育症の原因は多岐にわたるが、抗リン脂質抗体症候群はもっとも検出頻度が高く、因果関係に関するエビデンスレベルの高い報告が多くなされている。また、最近では第XⅡ因子欠乏症やプロテインC、プロテインS欠乏症をはじめとする血栓性素因と不育症の関連も明らかになってきた。このような素因を持つ女性が妊娠すると、その治療として低用量アスピリンとヘパリンの併用療法が行われている。本研究の使命として、アスピリンとヘパリンの安全性と有効性を検証することは意義の高いことと考えられた。本分担研究では、アスピリンに関する調査を担当した。

低用量アスピリンは、抗血小板療法として脳梗塞や心筋梗塞の予防薬として広く用いられている。抗リン脂質抗体症候群では、静脈血栓、動脈血栓ともに起こりうるため、動脈血栓予防薬として抗血小板作用を有するアスピリンを用いることは理にかなっている。

ところが、抗リン脂質抗体を保有する妊婦に対する低用量アスピリン療法の有効性を示すエビデンスレベルの高い報告はきわめて少ない。Pattisonらは、

RCTによりアスピリン単独療法群とプラセボ群の比較を行った(Am J Obstet Gynecol, 2000)が、生児獲得率に有意差は見いだせなかった。他の報告でも優位性を示すものはほとんどなく、またいずれも小規模のサンプルサイズであった。アスピリンの有効性に関する大規模サンプルサイズによるRCTが必要であることに異論を挟む者はないが、現在わが国で低用量アスピリン療法を受けている妊婦は相当数に上り、今からRCTを企画することの妥当性は低いと考えられる。

しかし、RCTの施行が難しいとすると、その前提として妊娠中の服用に対する安全性が担保されている必要がある。アスピリンはきわめて汎用性の高い薬であり、解熱鎮痛を目的とした一般的な用法のほか、抗リン脂質抗体症候群や妊娠高血圧症候群の予防としても広く用いられているため、妊娠中のアスピリン服用の安全性に関する報告は少なくない。最近の最も大規模な調査は、2002年にKozerらによって行われたメタアナリシスである(Kozer E. Et al: Am J Obstet Gynecol. 2002, 187(6):1623-30.)。これによると、妊娠

第1三半期のアスピリン服用は、先天奇形の全体的な発生率を上昇させることはない結論している。しかしながら、腹壁破裂のリスクは上昇するとしている(表1)。

以上より、近年不育症に関する関心が高まる中、処方される機会が増加していると考えられるアスピリンの、妊娠中の服用に関する安全性を検証することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

アスピリンの不育症に対する有効性に関する検証は、本研究の研究期間と予算規模では不可能と判断し、後の研究に譲ることとした。

アスピリンの妊娠中の服用に関する安全性を検証する方法として、以下のような方策が考えられる。

1) 前向き調査

全国の病院、診療所で不育症診療を行っている施設にアスピリン(低用量)処方患者の登録を依頼し、妊娠予後、出生児の状態(先天異常の有無など)などを調査する。また、本研究班の施設には不育症患者が集まり、短期間に多くのデータ集積が可能と考えられる。そこで、各施設でそれぞれコホートを組み、予後調査を行う。

2) 後ろ向き調査

既存のデータベースを活用する方法である。わが国には周産期、および妊産婦の薬剤服用に関するデータベースはいくつか存在する。

a. 日本産科婦人科学会周産期委員会登録事業報告

b. 国立成育医療研究センター(妊娠と薬情報センター)データベース

c. 日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)・横浜市立大学国際先天異常モニタリングセンター データベース

これらデータベースからアスピリン服用に関するデータを抽出する。

C. 研究結果

1) 前向き調査

本研究の研究期間は本年度で終了する関係で、前向き調査は実施しなかった。

2) 後ろ向き調査

a. 日本産科婦人科学会周産期委員会登録事業報告の登録様式には、薬剤服用の項目がなく、先天異常の発生はある程度掌握できるものの、薬剤服用との因果関係はこの調査結果からは判定し得ない。

b. 国立成育医療研究センター(妊娠と薬情報センタ

一) データベース

今回の研究期間中には当該センターへの情報提供は依頼しなかった。

c. 日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)(横浜市立大学国際先天異常モニタリングセンター)データベースによる解析

本データベースの基礎は日本産婦人科医会(日本母性保護医協会、日母)により1972年から開始されたもので、現在本邦における唯一の全国レベル調査である。全国330病院の協力(病院ベース)により、全国の出産児の約10%をモニターしている。満22週以降、生後7日以内に診断された先天異常を登録し、妊娠中の罹患、服薬、X線被曝、嗜好、環境因子などが調査項目として記載される。データはファイルメーカー・プロに入力され、図1のような様式で報告されてくる。横浜市立大学国際先天異常モニタリングセンターがこのデータを管理している。当センターは、本邦の先天異常発生データの集計、解析を行っており、ICBDSR(国際先天異常監視研究機構、WHO)の日本支部を兼ね、国際先天異常監視機構本部への報告・情報交換を担っている。

結果1

- ・ 1994年～2008年の15年間の報告例のうち、アスピリン服用の記載があるものは121例あった(報告児総数は不明)。
- ・ うち、抗リン脂質抗体症候群や不育症と推測されるものは47例(38.8%)であった。
- ・ 1997年～2005年の9年間に報告された801,267児のうち、アスピリン服用歴のある先天異常例は80例(0.01%)であった。

結果2

- ・ 1999年～2006年までの8年間に登録された680,551児の詳細は表1の通りである。
- ・ 1994年～2008年におけるアスピリン服用群の先天異常の頻度(順位)は、1999年～2005年の801,267児全体の順位と大きく異なるものではなく、アスピリン服用群に特異的な先天異常は抽出されなかった(表2)。

D. 考察

アスピリンの不育症に対する有効性に関する検証は、本研究の研究期間と予算規模では不可能と判断し、後の研究に譲ることとした。

アスピリンの妊娠中の服用に関する安全性を検証する方法として、前向き調査は必須であるが、本研

究の研究期間は本年度で終了する関係で前向き調査は実施しなかった。

後ろ向き調査のうち、短期間に実施する方法は既存のデータベースの解析である。今回用いたデータベースは、日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)・横浜市立大学国際先天異常モニタリングセンターが保有するデータベースで、横浜市立大学医学部産婦人科平原史樹教授の協力により解析を行った。

この調査は全国 330 病院の定点調査により、全国の出産児の約 10%をモニターするものであり、満 22 週以降、生後 7 日以内に診断された先天異常を登録し、出生後に妊娠中の罹患、服薬、X 線被曝、嗜好、環境因子などを調査項目として記載する。したがって、アスピリン服用の有無は母親の記憶に頼るものである。本データベースからは、アスピリンの服用量、服用時期、期間についての情報は得られず、不育症(抗リン脂質抗体症候群、第 XII 因子欠乏症、プロテイン C、S 欠乏症など)でよく用いられる服用法に特異的な異常が抽出されているわけではない。また、今回目的とした低用量アスピリンか成人の常用量かは、本調査では区別できない。しかし、アスピリン服用の記載があった 121 例のうち、抗リン脂質抗体症候群や血栓性素因などの合併症のために服用したとの記載があるもの、また自然流産回数が 3 回以上の不育症のために服用したと考えられるものは 47 例(38. 8%)で、これらは低用量アスピリンを服用したものと推測される。

また、アスピリンの情報が記載されているのは異常が認められた症例のみであり、服用群と非服用群の比較はできない。

そこで、アスピリン服用群の奇形発生の特徴を抽出するため、先天異常の頻度別順位を、ほぼ同様の調査期間である 1999-2005 年に調査対象となった 801,267 児全体の順位と比較した。その結果、全体の順位と大きく異なるものではなく、アスピリン服用群に特異的な先天異常は抽出されなかった。

目的の項で述べたように、アスピリンの妊娠初期における曝露が先天異常発生に及ぼす影響として無視できないのが腹壁破裂である。過去、アスピリンと腹壁破裂の関連性を示唆する論文は少なくない(Martinez-Frias ML et al.: Teratology 1997, Torfs CP et al.: Teratology 1996, Drongowski RA et al.: Fetal Diagn Ther 1991, Gierup J et al.: Z Kinderchir 1997, Werler MM et al.: Am J Epidemiol 2002)。われわれも、最近アスピリン・ヘパリン療法を行った症例

で腹壁破裂を経験しており、このことが今回の研究開始の動機付けにもなっている。今回の調査で、アスピリン群において腹壁破裂が 2 例に認められた。腹壁破裂と鑑別要する疾患に臍帯ヘルニアがあるが、アスピリン群で 7 例の臍帯ヘルニアが報告されている。両者の鑑別は困難ではないが、仮に臍帯ヘルニアと診断した症例の中に腹壁破裂が紛れているとすれば、統計結果に大きく影響が出ることになる。

冒頭に述べたように、妊娠中のアスピリン曝露の影響を調べるには、コホートを組んだ前向き調査が必要であることは言うまでもない。今後、今回解析に用いた日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)のデータベースをコントロールとして全国規模のコホートを組み、低用量アスピリン療法の安全性を検証する作業が是非とも必要である。

なお、今回の調査からアスピリンの安全性はほぼ確認されたと考えてよいが、より安全を期すために妊娠の初期(胎盤が完成する 16 週まで)にはヘパリン療法のみとし、それ以降はヘパリンの代わりにアスピリンを投与するプロトコルを策定し(図 2)、現在臨床試験を開始したことを付記する。

E. 結論

近年広く行われるようになった不育症患者へのアスピリン療法の安全性を検証した。日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)のデータベースをもとに分析した結果、アスピリン服用群の先天異常の頻度(順位)は、対照群と大きく異なるものではなく、アスピリン服用群に特異的な先天異常は抽出されなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake H, Iwasaki N, Nakai A, Suzuki S, Takeshita T.: The influence of assisted reproductive technology on women with pregnancy-induced hypertension: a retrospective study at a Japanese Regional Perinatal Center. J Nippon Med Sch. 2010 Dec;77(6):312-7.
- 2) Kawabata I, Nagase A, Oya A, Hayashi M, Miyake H, Nakai A, Takeshita T.: Factors influencing the

- accuracy of digital examination for determining fetal head position during the first stage of labor. J Nippon Med Sch. 2010 Dec;77(6):290-5.
- 3) Abe T, Amano I, Sawa R, Akira S, Nakai A, Takeshita T.: Recovery from peripartum cardiomyopathy in a Japanese woman after administration of bromocriptine as a new treatment option. J Nippon Med Sch. 2010 Aug;77(4):226-30.
 - 4) Kurashina R, Shimada H, Matsushima T, Doi D, Asakura H, Takeshita T.: Spontaneous uterine perforation due to clostridial gas gangrene associated with endometrial carcinoma. J Nippon Med Sch. 2010 Jun;77(3):166-9.
 - 5) Inde Y, Yamaguchi S, Kamoi S, Takeshita T.: Transition of cytomegalovirus seropositivity in Japanese puerperal women. J Obstet Gynaecol Res. 2010 Jun;36(3):488-94.
 - 6) Hayashi M, Oya A, Miyake H, Nakai A, Takeshita T.: Effect of urinary trypsin inhibitor on preterm labor with high granulocyte elastase concentration in cervical secretions. J Nippon Med Sch. 2010 Apr;77(2):80-5.
 - 7) Yagi Y, Watanabe E, Watari E, Shinya E, Satomi M, Takeshita T, Takahashi H.: Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by Toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages. Immunology. 2010 Aug;130(4):597-607. Epub 2010 Apr 6.
 - 8) Takeuchi H, Takahashi M, Norose Y, Takeshita T, Fukunaga Y, Takahashi H.: Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding. Biomed Res. 2010;31(1):53-61.
 - 9) 市川智子, 神戸沙織, 阿部崇, 富山僚子, 峯克也, 桑原慶充, 里見操緒, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹下俊行: アスピリン・ヘパリン療法不成功不育症例の臨床遺伝学的検討. 日本受精着床学会雑誌(0914-6776)27 巻 1 号 260-263. 2010.
 - 10) 峯克也, 桑原慶充, 神戸沙織, 市川智子, 阿部崇, 富山僚子, 西弥生, 明楽重夫, 竹下俊行: アスピリン・ヘパリン療法中に絨毛膜下血腫を呈し、アスピリン中止後子宮内胎児死亡に至った胎児腹壁破裂症例. 日本受精着床学会雑誌(0914-6776)27 巻 1 号 252-255. 2010.
 - 11) 中西一步, 阿部崇, 中尾仁彦, 大内望, 市川智子, 峯克也, 澤倫太郎, 磯崎太一, 明楽重夫, 竹下俊行: 抗凝固療法を行ったにも関わらず脳梗塞を合併した抗リン脂質抗体陽性妊婦の一例. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌(0285-8096)47 巻 2 号. 2010
2. 学会発表
 - 1) 根岸靖幸, 熊谷善博, 高橋秀実, 竹下俊行: マウス周産期における樹状細胞亜分画の変化. 第62回日本産科婦人科学会総会・学術集会 2010.4
 - 2) 中井晶子, 三宅秀彦, 川端伊久乃, 桑原知仁, 山岸絵美, 渡邊建一郎, 岩崎奈央, 林昌子, 大屋敦子, 中井章人, 竹下俊行: 後期切迫流産症例における流産・早期早産に関与する因子の検討. 第62回日本産科婦人科学会総会・学術集会 2010.4
 - 3) 市川智子, 里見操緒, 阿部崇, 峯克也, 明楽重夫, 竹下俊行: 化学妊娠を反復する症例は不育症として扱うべきか? 第62回日本産科婦人科学会総会・学術集会 2010.4
 - 4) Osamu Ishibashi, Shan-Shun Luo, Takashi Ohba, Hidetaka Katabuchi, Toshiyuki Takeshita, Toshihiro Takizawa: RNA duplexes elicit interferon-independent apoptosis of ovarian granulosa cells via RIG-I in cell type- and length-dependent manner. International Symposium for Immunology of Reproduction (ISIR-Osaka 2010) Osaka, Japan 2010.8
 - 5) Yuri Mase, Osamu Ishibashi, Gen Ishikawa, Kazushige Kiguchi, Hidetaka Katabuchi, Takashi Ohba, Toshiyuki Takeshita, Toshihiro Takizawa: Identification of functional microRNAs in human ovarian granulosa cells. International Symposium for Immunology of Reproduction (ISIR-Osaka 2010) Osaka, Japan 2010.8
 - 6) Yasuyuki Negishi, Hidemi Takahashi, Toshiyuki Takeshita: Kinetics and internal balance of two distinct subsets of murine dendritic cells during pregnancy. International Symposium for Immunology of Reproduction (ISIR-Osaka 2010) Osaka, Japan 2010.8
 - 7) Tomoko Ichikawa-Inagawa, Takashi Abe, Katsuya Mine, Yoshimitsu Kuwabara, Shigeo Akira, Toshiyuki Takeshita: Heparin Reduces Serum Granulysin Levels in Women with Recurrent

Miscarriage Associated with Antiphospholipid Syndrome. 30th Annual Meeting of ASRI, Pittsburg, USA, 2010 May

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

表1. 1999年～2006年の年度毎奇形出現頻度

年度	分娩数	出産児総数	奇形児総数	奇形総数	奇形児出現頻度	アスピリン服用歴あり	全奇形児数に対する割合	全出生児数に対する割合
1999	90,110	92,125	1,363	2,055	1.48%	4	0.2935%	0.0043%
2000	89,215	91,354	1,294	2,111	1.42%	11	0.8501%	0.0120%
2001	94,968	97,389	1,651	2,833	1.70%	10	0.6057%	0.0103%
2002	86,757	89,255	1,555	2,842	1.77%	6	0.3859%	0.0067%
2003	82,049	84,644	1,555	2,696	1.84%	11	0.7074%	0.0130%
2004	74,943	77,233	1,366	2,399	1.77%	12	0.8785%	0.0155%
2005	70,064	72,229	1,409	2,516	1.95%	13	0.9226%	0.0180%
2006	73,981	76,322	1,377	2,528	1.80%	6	0.4357%	0.0079%
計	662,087	680,551	11,570	19,980	1.70%	73	0.6309%	0.0107%

表2. A

アスピリン服用群の先天異常発生状況

1994～2008年までの15年間に報告された先天異常モニタリングデータベースより

121例中(例)

1	心室中隔欠損	19
2	多指症	12
3	動脈管開存	8
4	口唇ノ口蓋裂	8
5	心房中隔欠損	7
6	ダウン症候群	7
7	臍帯ヘルニア	7
8	口唇裂	6
9	耳介の異常	6
10	合趾症	6
11	鎖肛	5
12	口蓋裂	5
13	欠指症(小指列・中央列)	5
14	肺動脈狭窄	4
15	18トリソミー	4
16	十二指・小腸閉鎖	4
17	短肢症	4
18	尿道下裂	3
19	髄膜瘤	3
20	ファロー四徴	3
21	大血管転位	3
22	大動脈狭窄	3
23	両大血管右室起始	3
24	欠趾症	3
25	のう胞性腎奇形	2
26	水頭症	2
27	三尖弁閉鎖	2
28	総肺静脈還流異常	2
29	腹壁破裂	2
30	外耳道欠損・閉鎖	2

表2. B

1997～2005年までの9年間に報告された先天異常モニタリングデータベース(801,267児)より

対10,000児

1	心室中隔欠損	17.4
2	口唇口蓋裂	12.3
3	ダウン症候群	9.6
4	多指症	8.1
5	耳介低位	7.5
6	水頭症	7.4
7	心房中隔欠損	6.1
8	動脈管開存	6
9	口唇裂	5.8
10	十二指腸・小腸閉鎖	5.5
11	横隔膜ヘルニア	5.4
12	合指症	5.1
13	鎖肛	5
14	多趾症	4.7
15	二分脊椎	4.6
16	口蓋裂	4.3
17	耳介変形	4
18	臍帯ヘルニア	3.9
19	嚢胞性腎奇形	3.8
20	尿道下裂	3.7

症例調査票_1

施設番号 9304 分娩年月 99年 10月 受付番号 10101

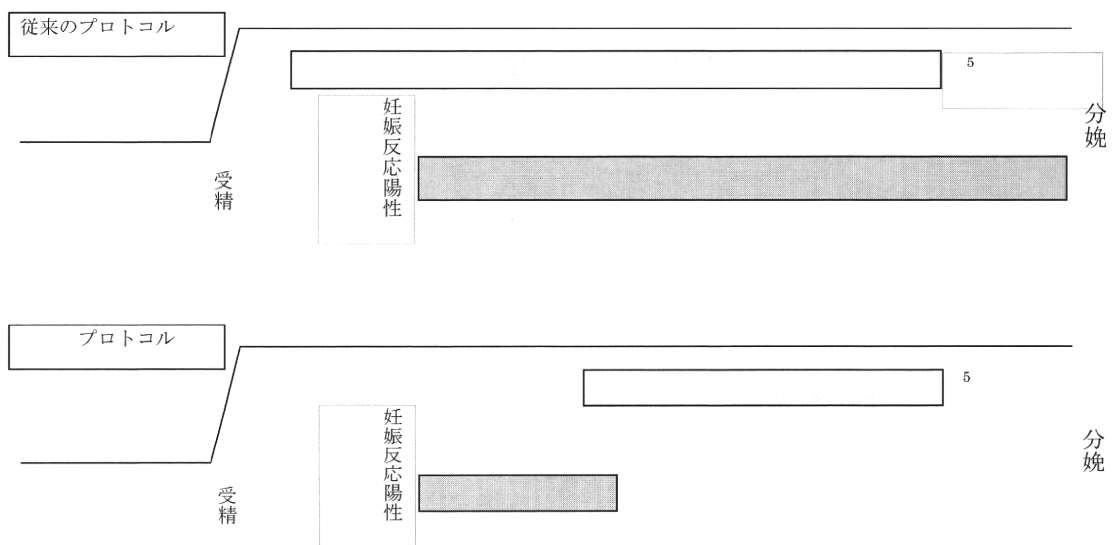
妊娠週数 0	胎齢年齢 1	初産産別 1	1.初産 2.経産 3.不明	既往妊娠 流産 0回 人L 0回
現体重 99	性別 2	現数 1	1.単胎 2.双胎 3.胎数以上	死産 0回 年産 0回
出生状況 4	1.生産 2.分娩(産生) 3.分娩(死亡) 4.死産	発見時期 3	1.胎前 2.胎中 3.胎後	発見週数(日) (未)
染色体検査 0	0.無 1.有	生後検死日数 0	剖検の有無 0	0.無 1.有
高熱数 1	項目1 痲疹発熱	項目5		
	項目2	項目7		
	項目4	項目8		
	項目6	項目9		

症例調査票_2

虫歯経過 0	0.無 1.有	父親年齢 32	
職業 1	1.職業不明		
受胎本人 0	0.無 1.1-2回本 2.3回以上	受胎配偶者 3	0.無 1.1-2回本 2.3回以上 3.本数不明
飲酒 0	0.無 1.少量 2.中等量 3.多量		
複性合併疾患 4	0.無 1.有	使用薬剤(プレノンD)mg	有の場合の感染症名
			有の場合の感染症名
感染症(4度以上)発熱 0	0.無 1.有	感染症 0	
感染症(4度以上)発熱原因			
内服薬 1	有の場合の薬名	プレノンD アスピリン	
出血 0	有の場合の診断名		
複数注射薬投与の有無 0	有の場合の投与箇所		
不正胎動等排胎誘発等	誘発の場合方法		
体外受精	体外受精有の場合方法		
薬物または薬物を含む総合ビタミン剤の服用(妊娠12週未満)			
胎位 0		開始時期	
備考			

図1. 調査個票

図2. アスピリン・ヘパリン療法－新プロトコル



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
Miyake H, Iwasaki N, Nakai A, Suzuki S, <u>Takeshita T.</u>	The influence of assisted reproductive technology on women with pregnancy-induced hypertension: a retrospective study at a Japanese Regional Perinatal Center	J Nippon Med Sch.	77(6)	312-7	2010
Kawabata I, Nagase A, Oya A, Hayashi M, Miyake H, Nakai A, <u>Takeshita T.</u>	Factors influencing the accuracy of digital examination for determining fetal head position during the first stage of labor.	J Nippon Med Sch.	77(6)	290-5	2010
Abe T, Amano I, Sawa R, Akira S, Nakai A, <u>Takeshita T.</u>	Recovery from peripartum cardiomyopathy in a Japanese woman after administration of bromocriptine as a new treatment option.	J Nippon Med Sch.	77(4)	226-30.	2010
Kurashina R, Shimada H, Matsushima T, Doi D, Asakura H, <u>Takeshita T</u>	Spontaneous uterine perforation due to clostridial gas gangrene associated with endometrial carcinoma	J Nippon Med Sch	77(3)	166-9	2010
Inde Y, Yamaguchi S, Kamoi S, <u>Takeshita T.</u>	Transition of cytomegalovirus seropositivity in Japanese puerperal women.	J Obstet Gynaecol Res	36(3)	488-94	2010
Hayashi M, Oya A, Miyake H, Nakai A, <u>Takeshita T.</u>	Effect of urinary trypsin inhibitor on preterm labor with high granulocyte elastase concentration in cervical secretions.	J Nippon Med Sch.	77(2)	80-5	2010
Yagi Y, Watanabe E, Watari E, Shinya E, Satomi M, <u>Takeshita T.</u> , Takahashi H.	Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by Toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages.	Immunology	130(4)	597-607	2010
Takeuchi H, Takahashi M, Norose Y, <u>Takeshita T.</u> , Fukunaga Y, Takahashi H.	Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding	Biomed Res.	31(1)	53-61	2010;

市川智子, 神戸沙織, 阿部崇, 富山僚子, 峯克也, 桑原慶充, 里見操緒, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹下俊行	アスピリン・ヘパリン療法不成功 不育症例の臨床遺伝学的検討.	日本受精着床 学会雑誌 (0914-6776)	27(1)	260-263	2010
峯克也, 桑原慶充, 神戸沙織, 市川智子, 阿部崇, 富山僚子, 西弥生, 明楽重夫, 竹下俊行	アスピリン・ヘパリン療法中に絨 毛膜下血腫を呈し、アスピリン中 止後子宮内胎児死亡に至った胎 児腹壁破裂症例.	日本受精着床 学会雑誌 (0914-6776)	27(1)	252-255	2010
中西一步, 阿部崇, 中尾仁彦, 大内望, 市川智子, 峯克也, 澤倫太郎, 磯崎太一, 明楽重夫, 竹下俊行	抗凝固療法を行ったにも関わらず 脳梗塞を合併した抗リン脂質抗体 陽性妊婦の一例.	日本産科婦人 科学会関東連 合地方部会誌 (0285-8096)	47(2)	222	2010

分担研究報告 17

分担課題:治療抵抗性、難治性習慣流産に対する免疫グロブリン療法の有用性の検討

研究分担者 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 天野真理子 神戸大学医学研究科 助教
研究協力者 前澤 陽子 神戸大学医学研究科 医員

研究要旨

6 回以上流産歴がある原因不明で治療抵抗性、難治性の習慣流産を対象に妊娠初期免疫グロブリン療法(intravenous immunoglobulin, IVIg; 3 日間合計 60g)の有用性を検討することを目的とした。投与前後で母体血 NK 細胞活性および単球分画の変化を調べた。結果として、5 人の患者に IVIg を実施した。既往流産回数は 6~14 回であった。1 例が妊娠 28 週で継続中であるが、4 例は妊娠 6~8 週に染色体正常の稽留流産に至った(有効率 20%)。IVIg 投与前後に、NK 細胞活性(mean 29.8 v.s. 22.8%)と単球分画(mean 5.2 v.s. 7.3%)は有意($P<0.05$)に変化した。特記すべき副作用は観察されなかった。継続して、原因不明で治療抵抗性、難治性の習慣流産に対する 60gIVIg の有用性を検討している。

A. 研究目的

臨床試験委員会の承認を得て、6 回以上流産歴がある原因不明で治療抵抗性、難治性の習慣流産を対象に、妊娠初期免疫グロブリン療法(intravenous immunoglobulin, IVIg; 3 日間合計 60g)の有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

以下の要件を満たす症例を IVIg 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。②6 回以上の自然流産歴がある。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。末梢血でどのような免疫学的修飾が起こるかを調べる目的で、投与前後で母体血 NK 細胞活性および単球分画の変化を調べた。統計解析には、paired t-test ($P<0.05$)を用いた。妊娠帰結を検討した。

(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

これまで 5 人に実施した。年齢は 30~39 歳、既往流産回数は 6~14 回であった。

1 例が妊娠 28 週で継続中であるが、4 例が稽留流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。4 例とも染色体正常であった。有効率は 20%(1/5)であった。

IVIg 投与直前と 1 週後に、末梢血 NK 細胞活性(mean \pm SD)を測定した結果、 $29.8 \pm 18.5\%$ が $22.8 \pm 19.9\%$ に有意($P<0.05$)に減少した。また、同様に末梢血単球分画(mean \pm SD)は、 $5.2 \pm 1.5\%$ が $7.3 \pm 1.1\%$ に有意($P<0.05$)に増加した。

D. 考案

免疫グロブリン療法は、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。

我々は、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 (high dose of intravenous immunoglobulin, HIVIg; 5 日間合計 100g)を実施してきた。これまで 60 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。41 人で生児が得られ、順調に 3 人が継続中である。15 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。11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、染色体異常の11例を除いて治療効果を判定すると有効率は89% (41/46)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 HIVg 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。

しかしながら、今回の60g IVIgの有効率は20%と低かった。実施症例数が少ないため、ないし、より難治性であるために60g IVIgは無効である可能性があると考えられる。

習慣流産患者で、HIVg(100g)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。HIVg直前(妊娠4~5週)のNK細胞活性(平均41%)はHIVg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、HIVg後に上昇した。フローサイトメトリー法による末梢血Th1/Th2細胞比率は、投与後に低下した。このように、HIVg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。

今回の検討では、60g IVIg前後に有意なNK細胞活性の抑制と単球分画の増加が認められた。しかしながら、100g HIVgに比べて、NK活性抑制効果は低い(mean 29.8 v.s. 22.8%)。有効であった1例が最も抑制率が高く、20%が5%に低下した。IVIgの有効性は、NK細胞抑制効果と関連があるのかもしれない。継続して検討を行う予定である。

E. 結論

既往流産回数は6~14回の難治性、治療抵抗性の習慣流産患者5人に妊娠初期60g IVIgを実施した。

1例が妊娠28週で継続中であるが、4例が稽留流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。4例とも染色体正常であった。有効率は20%(1/5)であった。

IVIg投与直前と1週後に、末梢血NK細胞活性(mean \pm SD)を測定した結果、29.8 \pm 18.5%が22.8 \pm 19.9%に有意(P<0.05)に減少し、また、末梢血単球分画(mean \pm SD)は、5.2 \pm 1.5%が7.3 \pm 1.1%に有意(P<0.05)に増加した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Mitsuhashi T, Warita K, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Sugawara T, Hayashi F, Wang ZY, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Ebina Y, Yamada H, Sakuragi N, Yokoyama T, Nanmori T, Kitagawa H, Kant JA, Hoshi N. Global gene profiling and comprehensive bioinformatics analysis of a 46,XY female with pericentric inversion of the Y chromosome. *Congenit Anom (Kyoto)* 50:40-51, 2010
- 3) Mitsuhashi T, Warita K, Sugawara T, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Hayashi F, Wang ZY, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Ebina Y, Yamada H, Sakuragi N, Yokoyama T, Nanmori T, Kitagawa H, Kant JA, Hoshi N: Epigenetic abnormality of SRY gene in the adult XY female with pericentric inversion of the Y chromosome. *Congenit Anom (Kyoto)* 50:85-94, 2010
- 4) Shimada S, Yamada H, Atsumi T, Yamada T, Sakuragi N, Minakami H. Intravenous immunoglobulin therapy for aspirin-heparinoid-resistant antiphospholipid syndrome. *Reprod Med Biol* 9:217-221, 2010
- 5) Yamada H, Ohara N, Amano M. Current concepts on immunological etiologies in recurrent spontaneous abortion and intravenous immunoglobulin therapy. *Res. Adv. in Reproductive Immunology*.1, 1-21, 2010
- 6) 山田秀人. 難治性習慣流産の免疫グロブリン療法. 週間日本医事新報 4487, 52-57, 2010
- 7) 山田秀人, 小橋 元, 渥美達也. 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. 産婦人科の実際 59(5), 789-794, 2010
- 8) 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 59(12), 1969-1983, 2010
- 9) 山田秀人. 不育症の病因と治療-難治性習慣流産に対する免疫グロブリン療法-. 北産婦医会報第123号, 2-11, 2010