

2013/2018A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

不育症における抗リン脂質抗体標準化に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北折 珠央

平成26(2014)年 3月

目次

I. 総括研究報告書	
抗リン脂質抗体標準化に関する研究	1
北折 珠央、杉浦 真弓、渥美 達也、奥 健志、尾崎 康彦	
II. 分担研究報告書	
1. 不育症における血液凝固Ⅻ因子活性と遺伝子多型	8
北折 珠央、杉浦 真弓、橋本 恵理子	
2. 抗リン脂質抗体測定法に関するアンケート調査	10
杉浦 真弓、村島 温子、北折 珠央	
3. 産科的抗リン脂質抗体症候群（APS）におけるフォスファチジルセリン依存性 抗プロトロンビン抗体測定系の標準化	17
渥美 達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果に関する刊行物・別冊	23

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
総括研究報告書

不育症における抗リン脂質抗体標準化に関する研究

研究代表者	北折珠央	名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学助教
研究分担者	杉浦真弓	名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学教授
研究分担者	渥美達也	北海道大学大学院医学研究科免疫代謝内科学分野教授
研究協力者	奥 健志	北海道大学大学院医学研究科免疫代謝内科学分野助教
研究協力者	尾崎康彦	名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学准教授

研究要旨

ループスアンチコアグラント（PL 中和法）とフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の産科的有用性が明らかになった。PL 中和法は国際学会の基準にも含まれており、欧米では普及しているが、国内では13%の施設でしか使用されていないため、早急な啓発が必要と考えられた。抗カルジオリピン IgG/M は国際学会の基準に用いられているが、古典的抗カルジオリピン IgG/M とは全く異なっており、産科的有用性に疑義が示された。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体は不育症の原因の10%を占め、唯一治療可能な原因であるが、抗リン脂質抗体は多様な抗体の集まりであるため測定法は多数あり、標準化されていない。村島温子研究班による「抗リン脂質抗体測定法に関するアンケート調査」でも明らかなように、医療者側も正しい知識が不足していることが多いため、不適切な検査、過剰な抗凝固療法をなされていることが少なくないことが本邦の不育症診療の問題点である。本研究では一般臨床医が測定可能な11種類の委託検査法の産科的有用性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

子宮奇形と夫婦染色体異常を除く同意を得た560名の不育症患者を対象とした前向き研究を行った。非妊娠時に採血し、従来法 β 2GPI依存性抗カルジオリピン(aCL)抗体、ループスアンチコアグラント(LA)-希釈ラッセル蛇毒法 RVVT、LA-aPTT法の有用性が証明された3種の検査法

と、11種類の外注検査可能なLA-リン脂質(PL)中和法、フォスファチジルセリンプロトロンビン(aPS/PT) IgG・M、古典的aCL IgG・M、aCL IgG・M・A、 β 2GPI IgG・M・A (Phadia)を測定した。臨床的検査である従来法3種が陽性の場合には抗凝固療法を行った。検証する11種の測定は治療バイアスを除外するため、凍結保存して、帰結後に測定して解析を行った。

その後の出産率と胎児染色体異常を除外した出産率を陽性・治療群、陽性・無治療群、陰性無治療群の3群間で多変量解析を行った。陽性の時に治療によって出産率が上昇する場合、無治療群で陽性の場合に出産率が低下する場合を「産科的有用性あり」とした。検査法についてはそれぞれの相関、特異度を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」）に則り倫理面への配慮を行い名古屋市立大学倫理審査委員会の承認を得ている。本研究は、臨床検査時の採血で同時に採取し保存していた血漿検体を用いた為、研究対象者に対する不利益はない。対象者には文書で検体

保存と研究目的の使用に同意を得ている。

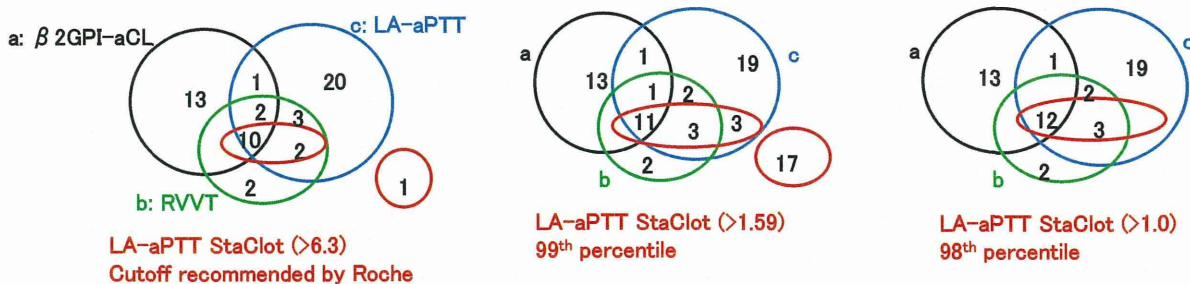
C. 研究結果

陽性率は従来法 β 2GPIaCL4.6%、LA-aPTT6.8%、LA-RVVT3.4%だった。11種類の測定法の健常人の99パーセンタイルを基準とした陽性率はPL中和法6.1%、aPS/PT IgG4.5%、IgM 0.7%、古典的aCL IgG 2.1%、IgM 0%、CL IgG/M/A 5.9%、1.4%、2.1%、 β 2GPI IgG/M/A2.0%、2.9%、8.7%だった。11種類とも従来法を基準としたAPSに対して90-100%の強い特異度を認めた。

β 2GPI aCL、古典的CL IgG、 β 2GPI IgG、CL IgG またLA-aPTT、LA- RVVT、PL 中和法の間に強い相関を認めた。

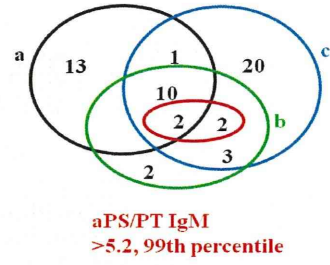
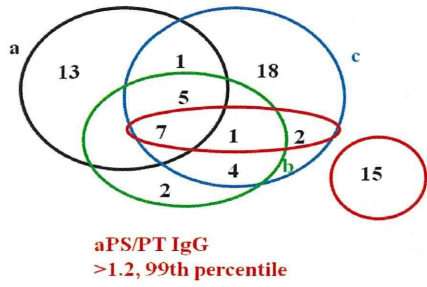
PL 中和法 (StaClot) に関して、検査会社の基準を用いるとおおむね従来法陽性に含まれた。健常人99パーセンタイル、98パーセンタイルを基準とした場合、陽性治療群・陽性無治療群の出産率は82.4% vs 58.8%および85.7% vs 59.3%であり、染色体異常を除いて有意差がみられた。

PL中和法 (StaClot)



		Live birth rate % (n)	Multivariable logistic regression		Live birth rate excluding abnormal EK % (n)	Multivariable logistic regression	
			OR (95% CI)	P-value		OR (95% CI)	P-value
StaClot > 1.59	Positive No treatment	58.8% (10/17)	Reference		71.4% (10/14)	Reference	
	Positive treatment	82.4% (14/17)	4.99 (0.77-32.39)	0.09	93.3% (14/15)	53.58 (0.938-3061.24)	0.05
	negative	70.7% (260/367)	1.72 (0.63-4.67)	0.29	79.5% (260/326)	1.57 (0.47-5.24)	0.46
StaClot > 1.0	Positive No treatment	59.3% (16/27)	Reference		66.7% (16/24)	Reference	
	Positive treatment	85.7% (18/21)	6.84 (1.21-38.61)	0.03	94.7% (18/19)	32.95 (1.76-616.95)	0.02
	negative	70.9% (254/357)	1.76 (0.78-3.94)	0.17	80.1% (254/316)	2.11 (0.86-5.21)	0.11

aPSPT

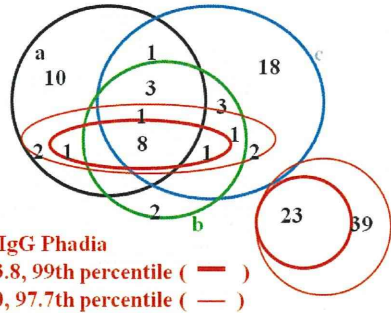
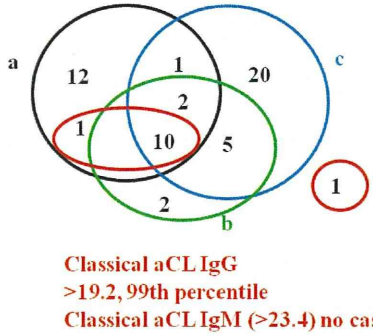


		Live birth rate % (n)	Multivariable logistic regression		Live birth rate excluding abnormal EK % (n)	Multivariable logistic regression	
			OR (95% CI)	P-value		OR (95% CI)	P-value
aPS/PT IgG > 1.2	Positive No treatment	50% (5/10)	Reference		50.0% (5/10)	Reference	
	Positive treatment	73.3% (11/15)	2.49 (0.38-16.26)	0.34	84.6% (11/13)	4.99 (0.58-42.72)	0.14
	negative	71.2% (264/371)	2.61 (0.73-9.35)	0.14	80.7% (264/327)	4.48 (1.23-16.13)	0.02
aPS/PT IgG > 1.0	Positive No treatment	54.5% (6/11)	Reference		54.5% (6/11)	Reference	
	Positive treatment	72.2% (13/18)	2.07 (0.39-10.85)	0.39	81.3% (13/16)	3.26 (0.54-19.77)	0.20
	negative	71.1% (263/370)	2.17 (0.64-7.35)	0.21	80.7% (263/326)	3.70 (1.08-12.66)	0.04

aPS/PT-IgG に関して、陽性無治療群・陰性無治療群の出産率は 50.0% vs 71.2% であり、染色体異常を除くと陽性無治療群の出産率が有意に低いことが判った。

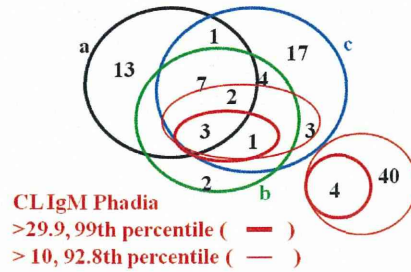
CL IgG 陽性例は従来法陽性におおむね含まれた。頻繁に測定されている Harris の変法を用いた CL IgG, IgM はいずれの基準を用いても有用性は認められなかった。

Anticardiolipin IgG



		Live birth rate % (n)	Multivariable logistic regression		Live birth rate excluding abnormal EK % (n)	Multivariable logistic regression	
			OR (95% CI)	P-value		OR (95% CI)	P-value
CL IgG > 23.8	Positive No treatment	64.3% (9/14)	Reference		69.2% (9/13)	Reference	
	Positive treatment	68.4% (13/19)	1.41 (0.29-6.76)	0.67	72.2% (13/18)	1.60 (0.27-9.62)	0.61
	negative	70.6% (274/388)	1.36 (0.44-4.17)	0.60	80.4% (274/341)	1.83 (0.54-6.17)	0.33
CL IgG > 10	Positive No treatment	74.4% (32/43)	Reference		82.1% (32/39)	Reference	
	Positive treatment	61.1% (22/36)	0.624 (0.23-1.71)	0.36	68.8% (22/32)	0.56 (0.17-1.87)	0.35
	negative	69.9% (251/359)	0.81 (0.39-1.67)	0.56	79.7% (251/315)	0.87 (0.36-2.07)	0.75
Classical CL IgG > 19.2	Positive No treatment	0% (0/2)	Reference		0% (0/2)	Reference	
	Positive treatment	77.8% (7/10)	-	-	87.5% (7/8)	-	-
	negative	70.8% (267/377)	-	-	80.2% (267/333)	-	-

Anticardiolipin IgM



		Live birth rate % (n)	Multivariable logistic regression		Live birth rate excluding abnormal EK % (n)	Multivariable logistic regression	
			OR (95% CI)	P-value		OR (95% CI)	P-value
CL IgM > 29.9	Positive No treatment	80% (4/5)	Reference		80% (4/5)	Reference	
	Positive treatment	100% (3/3)	-	-	100% (3/3)	-	-
	negative	70.3% (279/397)	0.56 (0.06-5.21)	0.61	80.7% (279/349)	1.00 (0.11-9.45)	1.00
CL IgM > 10	Positive No treatment	65.9% (27/41)	Reference		79.4% (27/34)	Reference	
	Positive treatment	78.6% (11/14)	1.87 (0.44-7.93)	0.40	84.6% (11/13)	1.35 (0.24-7.77)	0.74
	negative	70.9% (256/361)	1.24 (0.62-2.48)	0.54	80.0% (256/320)	1.04 (0.43-2.51)	0.93

D. 考察

PL 中和法と aPS/PT IgG は産科的に有用であった。国際学会の基準は健常人の 99 パーセントイルを推奨しているが、産科的には基準は 98 パーセントイルでも有用であると思われた。

LA-aPTT と PL 中和法は原理が同じだが、試薬が異なることで別の患者を特定するため、aPTT 試薬に関する研究が必要と思われた。

CL IgG/M は村島温子研究班の「抗リン脂質抗体測定法に関するアンケート調査」でも多くの施設が測定しており、国際学会の基準に用いられているが、古典的 CL IgG/M とは測定法、陽性率、陽性となる患者、陽性治療例で出産率が改善するかどうかという産科的有用性の点で全く異なっており、産科的有用性に疑義が示された。

aPS/PT IgG に関しては北大研究室で測定したため、委託検査会社で再度測定し、再現性の確認を行う予定である。

E. 結論

PL 中和法の産科的有用性が明らかになった。国際学会の基準にも含まれており、欧米では普及しているが、まだ発売されて日が浅く医療者の認識不足のため国内では 13%の施設でしか使用さ

れていないことがアンケート調査で明らかになっている。PL 中和法の有用性と CL IgG/M の産科的有用性がないことを、医師に対しては日本産科婦人科学会の産科診療ガイドライン 2014 年版、総説、講演を通じて、患者に対してはホームページ（名古屋市立大学産婦人科 HP：http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_huiku.html）、講演を通じて、普及啓発を行う予定である。

F. 健康危険情報

本研究による健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M, Oku K, Papisch W, Ozaki Y, Katano K, Atsumi T. Determination of clinically significant tests for antiphospholipid antibodies and cutoff levels for obstetric APS. submitted.

Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T. Frequency of

recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: The Okazaki Cohort Study in Japan. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013; 39: 126-31.

Hayashi Y, Sasaki H, Suzuki S, Nishiyama T, Kitaori T, Mizutani E, Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analyses for polymorphisms of *ANXA5* gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2013; 100 (4): 1018-1024.

Nakano Y, Akechi T, Furukawa T, Sugiura-Ogasawara M. Cognitive behavior therapy for psychological distress in patients with recurrent miscarriage. *Psychology Research and Behavior Management* 2013; 6: 37-43.

Katano K, Suzuki S, Ozaki Y, Suzumori N, Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M. Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent pregnancy loss: a large cohort study. *Fertil Steril* 2013; 100 (6): 1629-34.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Management of recurrent miscarriage. invited review *J Obstet Gynecol Res* in press

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Müllerian anomalies and recurrent miscarriage. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2013; 25: 293-298.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012; 27: 2297-2303.

Souri M, Sugiura-Ogasawara M, Saito S, Kemkes-Matthes B, Meijers JC, Ichinose A. Increase in the plasma levels of protein Z-dependent protease inhibitor in normal pregnancies but not in non-pregnant patients with unexplained recurrent miscarriage. *Thromb Haemost* 2012; 107: 507-512.

Suzumori N, Obayashi S, Kumagai K, Goto S, Yoshida A, Sugiura-Ogasawara M. A case of microangiopathic antiphospholipid-associated syndromes (MAPS) during pregnancy- review of the literature. *Case report in Medicine* 2012; 2012: 827543.

Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. *Hum Reprod* 26: 1259-1266, 2011
Sugiura-Ogasawara, M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Mizutani E. Uterine Anomaly and Recurrent Pregnancy Loss. *Semin Reprod Med* 29; 514-521, 2011

Hirshfeld-Cytron J, Sugiura-Ogasawara M, Stephenson MD. Management of Recurrent Pregnancy Loss Associated with a Parental Carrier of a Reciprocal Translocation: A Systematic Review. *Semin Reprod Med* 29; 470-481, 2011

杉浦真弓、北折珠央、尾崎康彦「特集不育症を知る:日本における不育症の現状」*助産雑誌* 2012; 66: 817-823.

杉浦真弓、北折珠央、尾崎康彦「特集不妊・不育「妊娠を維持するメカニズムとその病態」*BIRTH* 2012; 4: 23-34.

杉浦真弓、尾崎康彦、北折珠央、鈴森伸宏「オフィスギネコロジー特集号:不育症における染色体異常」*臨床婦人科産科* 2012; 66:90-93.

杉浦真弓、水谷栄太、北折珠央「不育症に関する遺伝的要因」*臨床婦人科産科* 2012; 66: 232-239.

杉浦真弓「不育症における遺伝学的探索」第63回日本産科婦人科学会学術集会シンポジウム講演要旨 *日本産科婦人科学会雑誌* 2011; 63: 2143-2152.

杉浦真弓「妊娠高齢化の現状とリスク」日本医事新報 2011; 4557: 60-61.

杉浦真弓. 「抗リン脂質抗体症候群」周産期医学 2011; 41: 1041-1044.

杉浦真弓、尾崎康彦、片野衣江、鈴森伸宏. 「染色体異常と不育症」特集 不育症最前線 産婦人科の実際 2011; 60: 1431-1436

杉浦真弓、尾崎康彦、片野衣江、鈴森伸宏. 「習慣流産・不育症の遺伝学的要因」特集産婦人科の遺伝医療と遺伝カウンセリング 産婦人科の実 2011;60:1287-1291.

2 学会発表

Sugiura-Ogasawara M, Kitaori T, Ozaki Y, Katano K, Atsumi T. Trial for standardization of the measurement for antiphospholipid antibodies in recurrent pregnancy loss. 14th International congress on Antiphospholipid antibodies. 2013. 18-21. Rio de Janeiro.

Sugiura-Ogasawara M. Management of recurrent miscarriage. 63th Korean Society for Reproductive Medicine Special lecture 2012. 11. 30-12. 2. Seoul. (invited)

北折珠央、林裕子、水谷栄太、尾崎康彦、鈴森伸宏、杉浦真弓「シンポジウム不育症診療における新しい展開：原因不明不育症における遺伝子の関与」第 58 回日本生殖医学会. 2013. 11. 15-16. 神戸ポートピアホテル.

杉浦真弓「不育症の検査と治療」第 45 回日本臨床検査自動化学会サテライトセミナー. 2013. 10. 11. パシフィコ横浜.

杉浦真弓「不育症の検査と治療」第 50 回関甲信支部医学検査学会ランチョンセミナー. 2013. 10. 6. つくば国際会議場.

杉浦真弓「いつか子どもを持ちたいあなたへ」福島県民公開講座. 2013. 7. 27. 会津大学.

杉浦真弓「不育症」第 135 回東北連合産科婦人科学会招請講演. 2013. 6. 9. 山形テルサ

杉浦真弓「抗リン脂質抗体症候群と不育症」第 35 回日本血栓止血血液学会ランチョンセミナー 2013. 6. 1. 山形

杉浦真弓「不育症のエビデンス」第 62 回高知県産科婦人科学会. 2012. 12. 8. 高知県総合あんしんセンター

杉浦真弓「不育症の診断と治療」第 51 回徳島・不妊・内分泌研究会特別講演. 2012. 9. 20. ホテルクレメント徳島

杉浦真弓「不育症の診断と治療」和歌山ウーマンズヘルス懇話会. 2012. 9. 15. 和歌山東急イン

杉浦真弓「不育症の診断と治療」滋賀県産科婦人科医会特別講演. 2012. 9. 8. 琵琶湖ホテル

杉浦真弓「不育症 エビデンスは何か」産婦人科臨床懇話会. 2012. 8. 18. 新横浜

北折珠央、大林伸太郎、熊谷恭子、片野衣江、尾崎康彦、杉浦真弓「不育症における抗リン脂質抗体標準化に関する検討」第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2012. 4. 13-15. 神戸

杉浦真弓「不育症との闘い」瑞友会講演会 2012. 3. 8.

北折珠央、杉浦真弓「不育症の疫学」第 6 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム. 2012. 1. 21.

北折珠央、大林伸太郎、熊谷恭子、片野衣江、尾崎康彦、杉浦真弓「不育症における抗リン脂質抗

体標準化に関する検討」第 26 回日本生殖免疫学会シンポジウム.2011. 12. 2-3. ウィンク愛知

杉浦真弓「不育症における遺伝学的探索」第 63 回日本産科婦人科学会学術集会シンポジウム流産の原因と対策. 2011. 8. 29-31. 大阪

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

不育症における血液凝固 XII 因子活性と遺伝子多型

研究協力者 橋本恵理子 名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学大学院生
研究分担者 杉浦 真弓 名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学教授
研究代表者 北折 珠央 名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学助教

研究要旨

ループスアンチコアグラントは XII 因子活性を低下させることがわかった。原因不明不育症において XII 遺伝子多型 CT は流産の危険因子であったが、次回妊娠に影響を与えるものではなかった。また、XII 因子活性低下も次回流産率と全く関係がなかった。XII 因子活性を測定する意義はなかった。

A. 研究目的

不育症はかつて約 7 割が原因不明といわれていたが、胎児染色体解析を行うと胎児染色体異常が約 4 割を占めていることが我々の研究で明らかとなり、真の原因不明は 25%程度である。そこには血栓性疾患や遺伝子多型が関与していると考えられている。かつて血液凝固 XII 因子活性低下が次回流産の危険因子であり、遺伝子多型頻度は健常人と変わらないと報告したが、(Iinuma ら Fertil Steril) 症例数が十分ではなく、さらなる研究が必要であると結論づけた。村島温子研究班の抗リン脂質抗体測定法に関するアンケート調査によれば、本邦では 34.4%の施設が不育症の原因検索のために XII 因子活性を測定して活性低下があると抗凝固療法を行っている。しかしながら遺伝子多型により活性値が異なることから活性のみを測定しては活性値が高低を正しく診断できているとはいえず、過剰治療となっている懸念がある。そこで XII 因子活性値と抗リン脂質抗体の関係、遺伝子多型と活性値、その後の妊娠帰結について検討した。

B. 研究方法

子宮奇形と夫婦染色体異常を除く同意を得た 279 名の不育症患者と健常女性 100 名を対照とし

た。

XII 因子多型(CC, CT, TT)の有無と XII 因子活性低値・中等度・高値にわけ、抗リン脂質抗体の有無と次回妊娠帰結について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」）に則り倫理面への配慮を行い名古屋市立大学倫理審査委員会の承認を得ている。本研究は、臨床検査時の採血で同時に採取し保存していた血漿検体を用いた為、研究対象者に対する不利益はない。対象者には文書で検体保存と研究目的の使用に同意を得ている。

C. 研究結果

ループスアンチコアグラント(LA)陽性患者では XII 因子活性は 60.7%と有意に低値を示したが、抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体陽性患者では 87.3%であり、XII 因子活性低下はみられなかった。

そこで以下の研究は抗リン脂質抗体陽性例を除く 270 例について検討を行った。CT 多型が不育症患者で有意に頻度が高く、不育症の危険因子であることがわかった。

しかし、CC、CT、TT 多型によって次回流産率(22.7%, 24.5%, 30.5%) の差はみられなかった。また、XII 因子活性低下でも次回妊娠の流産率を上昇させることはなかった。

XII 因子活性と遺伝子変異による次回妊娠流産率

		流産率	多変量解析	
			OR ^a (95% CI ^b)	P-value
XII因子活性	-61	17.8%	reference	
	62-87	31.0%	2.12 (0.92-4.85)	0.08
	88-113	38.6%	2.92 (1.30-6.62)	0.01
	114-	20.5%	1.17 (0.43-3.16)	0.76

XII 因子活性が低くても次回流産率は低くならない

D. 考察

原因不明不育症において XII 因子遺伝子多型 CT は流産の危険因子であったが、次回妊娠に影響を与えるものではなかった。また、XII 因子活性低下も次回流産率と関係がなかった。XII 因子活性を測定する意義はなかった。

E. 結論

血液凝固 XII 因子遺伝子多型 CT は不育症の危険因子である。ループスアンチコアグラント陽性例を除外した場合、XII 因子活性低下は次回流産率を上昇させることはない。

従って、XII 因子活性を測定する意義はなかった。アンケート結果から 34.4%の産科施設が XII 因子活性の測定を行っていることが判っており、この XII 因子活性測定の意義がないことを今後啓蒙していく。

医師に対しては日本産科婦人科学会産科診療ガイドライン、総説、講演を通じて、患者に対してはホームページ（名古屋市立大学産婦人科 HP：http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_hui ku.html）、講演を通じて、啓発を行う予定である。

F. 健康危険情報

本研究による健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analysis for the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII and the involvement of XII activity in patients with recurrent pregnancy loss. submitted.

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

抗リン脂質抗体測定法に関するアンケート調査

研究分担者 杉浦真弓 名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学教授
研究協力者 村島温子 国立成育医療研究センター周産期・母性診療センター主任副センター長
研究代表者 北折珠央 名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学助教

研究要旨
産科的に有用な PL 中和法の普及率が 13%と極めて低いことが判った。また、有用性に疑問がある抗カルジオリピン抗体、PE 抗体、PS 活性、PC 活性、XII 因子活性の測定が高頻度に行われている我が国の不育症診療の実態が明らかになった。

A. 研究目的

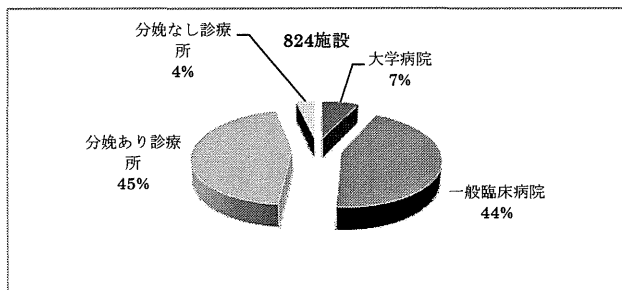
抗リン脂質抗体症候群(APS)に対するアスピリン・ヘパリン併用療法は 70-80%の出産成功率が報告されている。抗リン脂質抗体測定法は凝固時間を測定する Lupus Anticoagulant (LA)と ELISA 法を用いて抗体価を測定する方法がある。抗リン脂質抗体の真の対応抗原は β 2glycoprotein I (β 2GPI), prothrombin, kininogen など、凝固線溶系の蛋白が報告されており、測定法は多岐にわたる。患者も医師も“原因不明“に不安を感じるため、陽性率の高い検査が好まれ、過剰な治療をされている現状が散見される。本調査はこのような現状を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

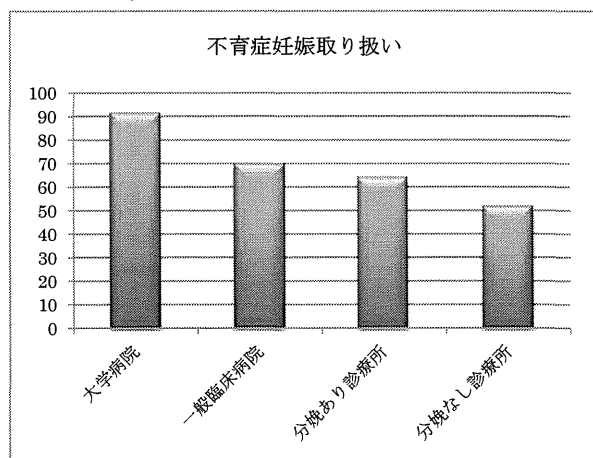
全国の妊婦健診施設 2700 施設の産婦人科長、不育症専門クリニック施設長に添付資料の調査票を郵送した。14 通が閉院等により返送され 831 人から回答を得た。

C. 研究結果

831 人から回答を得た (30.9%)。大学 7.2%，一般臨床病院 43.9%，診療所 (分娩有) 45.0%，診療所 (分娩無) 3.5%だった。



不育症患者を取り扱っていたのは大学 91.5%，病院 69.6%，診療所分娩有 64.1%，診療所分娩無 51.7%だった。



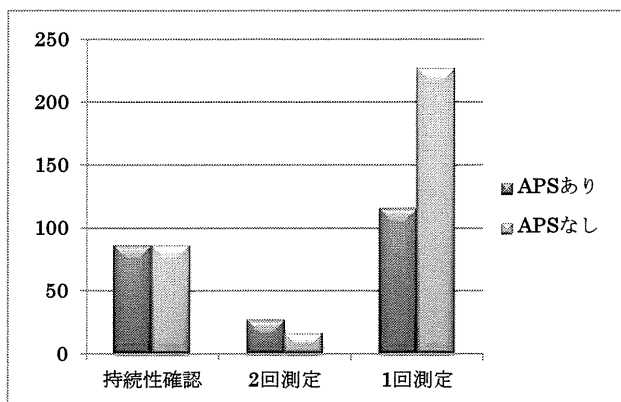
不育症の妊娠を取り扱う 554 施設で年間 5483.3 妊娠が管理され、抗リン脂質抗体症候群は 611.2 例だった。APS の頻度は 11.1%と推定された。

年間 1.5 といった回答もあり、概数を回答している場合もあると推定された。

	不育症の妊娠取り扱い (554施設)		APS (247施設)	
	Mean (SD)	範囲	合計年間妊娠数	合計年間妊娠数
大学	22.4 (36.4)	1-200	1167	150.5
臨床病院	6.4 (8.4)	0.5-50	1597	228.7
診療所	9.0 (33.6)	0.5-440	2133.8	194.0
診療所分娩なし	39.0 (86.1)	0.5-250	585.5	38.0
合計	9.9 (29.4)	0.5-440	5483.3	611.2

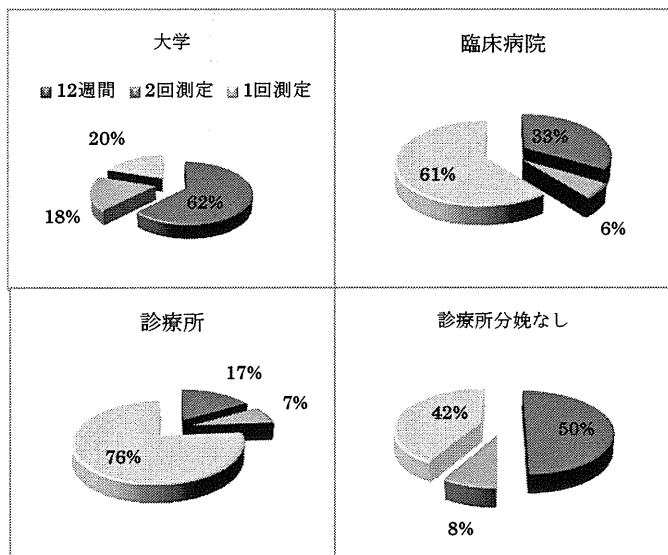
APS の診断に関して、国際学会の基準通り 2 回測定している施設は 30.7% (171/557)、1 回しか測定していない施設は 61.8% (344)だった。

また、APS 妊娠取扱ありと回答しながら 1 回しか測定していない施設が 115 施設存在し、APS の頻度 11.1% というのは偶発抗リン脂質抗体を相当数含んでいると考えられた。

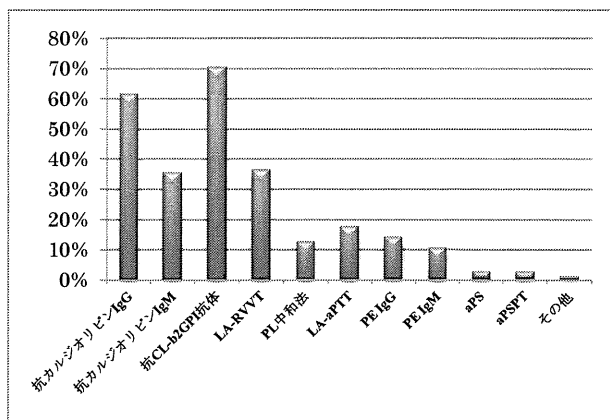


診断基準通りの測定を行っている施設は大学 62.5%、臨床病院 33.6%、診療所 16.5%、診療所分婉なし 50.0% だった。

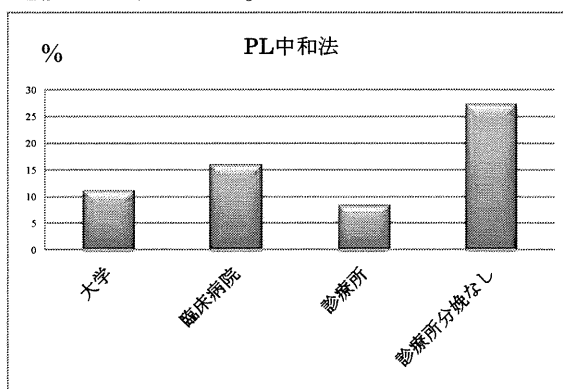
臨床病院、診療所では 12 週間以上あけて 2 回測定するという APS 診断基準に沿った検査をしていない施設が有意に多いことが明らかになった。



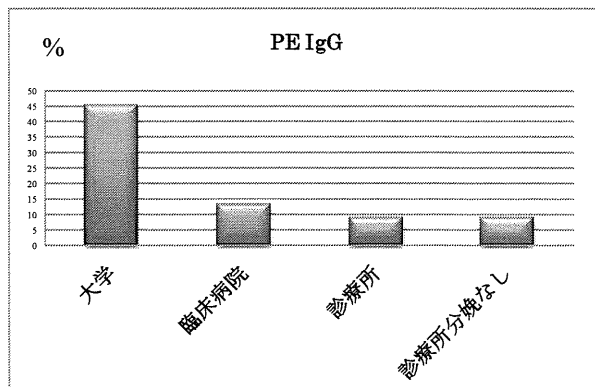
臨床的に測定している抗リン脂質抗体の方法については、79.8% (566/709) の施設が抗カルジオリピン抗体もしくは抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体のどちらかを測定していたが、51.3% が理論的に同じ両者を測定していることも明らかになった。18.6% は抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体のみ、9.9% は抗カルジオリピン抗体のみの測定だった。20.2% の施設は国際学会基準に含まれているにもかかわらずどちらも測定していなかった。



aPTT 試薬を用いた LA 実施施設は 13% にとどまった。本来希釈 aPTT 法による凝固時間が延長した場合に確認試験を行うことが正しい方法だが、確認試験である PL 中和法のみを行っている施設が 13% だった。



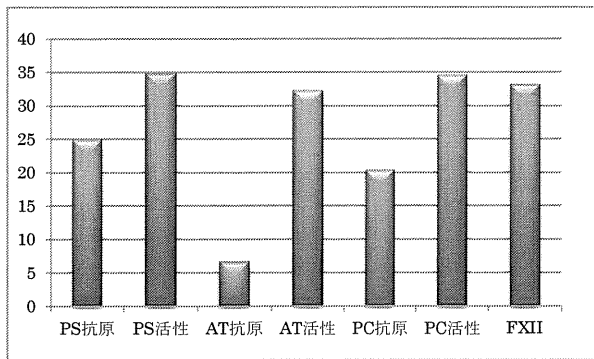
抗フォスファチジルエタノールアミン PE IgG 測定施設は 14.0% だった。PL 中和法は診療所分婉無で、PE IgG は大学で測定される傾向があった。なお、基準値を検査会社が定めるものと別に設定している施設は、抗カルジオリピン IgM の 4.4% (31/709) を除くと、いずれも 1% 未満だった。



血栓性素因に関しては、34.8% の施設で PS 活性、34.5% の施設で PC 活性、33.1% の施設で凝固第 XII 因子活性の測定が行われていた。

22.6% (145/641) が PS 活性と XII 因子の両方を測

定していた。



D. 考察

大学 91.5%, 病院 69.6%, 診療所分娩有 64.1%, 診療所分娩無 51.7%が不育症の妊娠を取り扱っていた。

国際学会の基準は抗カルジオリピン抗体 IgG, IgM が中高力価もしくは健常人の 99 パーセント以上、aPTT もしくは RVVT を用いた LA 陽性であり、12 週間持続することを条件としているが、30.7%のみが持続性を調べていた。これは日本の高齢女性にとって3か月次回妊娠を待機することが苦痛であること、治療の閾を低くしたい医師側の意識を反映している。

51.3%(364/709) の施設が抗カルジオリピン抗体と抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体の両方を測定していた。抗カルジオリピン抗体の真の対応抗原は β 2GPI であり、抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体は感染症タイプではなく血栓症、不育症に関係する抗体の測定が可能である。ただし、 β 2GPI非存在下の抗カルジオリピン抗体を同時測定するように依頼しないと感染症タイプの除外ができない。また、健常人の 99 パーセントは 1.9U であり、検査会社の基準 3.5U ではない。

国際学会は膠原病内科の参加が多く、この基準は必ずしも産科的 APS の基準として適切かどうかはまだ議論の余地がある。

本研究班「不育症における抗リン脂質抗体標準化に関する研究」では aPTT を用いた LA である PL 中和法の有用性が確認された。しかし、本研究では PL 中和法の普及率は 13%のみであった。特に大学での実施は低く、逆に偽陽性が多く、有用性が乏しい PE 抗体の測定が大学で実施されていたのは間違った情報が伝わっているためと思われる。PE IgG の陽性率は 10.1%と高いが、次回妊娠において陽性治療例・陽性無治療例の出産率は 66.7% vs 71.4%であり、測定の有用性はみられ

なかった。

また、北折班研究では抗カルジオリピン抗体 IgG, IgM も産科的意義が乏しいことも明らかになった。

血栓性素因に関しては 34.8%の施設で PS 活性、34.5%の施設で PC 活性、33.1%の施設で凝固第 XII 因子活性の測定が行われていた。

PS, PC 欠損症と不育症の関係が報告されているが、横断研究が多くを占めている。前方視的研究は少ないが、われわれは PS, PC, AT 活性が正常でも低下していてもその後の出産率に差はないことを報告している。

米国胸部外科学会妊娠中の血栓予防ガイドラインでも「妊娠合併症を契機に血栓性素因を調べることを推奨しない」と述べている。

また、凝固 XII 因子活性についても抗リン脂質抗体陽性例を除いた場合、それ単独での低下は次回妊娠に全く影響しないことが明らかになった。

不育症患者らの経済的負担が大きいことが報道され、各地域で助成金が支給されている。しかし、PL 中和法、LA-RVVT、抗カルジオリピン β 2GPI 複合体抗体は保険採用されており、(PL 中和法、LA-RVVT の同時測定は認められていない)、科学的根拠の乏しい研究的検査を行うなら自費診療で高額なのはやむを得ない。しかし、患者がそれらの検査が研究的であることを理解したうえで同意書を取得して実施しているのかは不明である。

E. 結論

産科的に有用な PL 中和法の普及率が 13%と極めて低いことが判った。また、有用性に疑問がある抗カルジオリピン抗体、PE 抗体、PS 活性、PC 活性、XII 因子活性の測定が高頻度に行われている我が国の実態が明らかになった。陽性例や XII 因子活性低下例は不要な治療をされている可能性がある。患者の負担を減らすためにもこれらが研究的検査であることを啓発する必要がある。

PL 中和法、LA-RVVT の有用性と、抗カルジオリピン抗体、PE 抗体、PS 活性、PC 活性、XII 活性の測定は臨床的に有用でないことを普及・啓発する必要がある。日本産科婦人科学会の産科診療ガイドライン 2014 年版に不育症で測定すべき検査について掲載した。医師の啓発は、このガイドライン、総説、講演を通じて、H26 年度中に国内外の学会等で発表予定である。患者に対してはホ

ホームページ（名古屋市立大学産婦人科 HP：
http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_huiku.html）、講演を通じて、普及啓発を行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

「不育の基礎知識～不育検査と治療の
最新知識について～」三重県市町保健師
協議会. 2014. 2. 12. 津 三重地方自治労
働文化センター

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

抗リン脂質抗体症候群合併妊娠の管理状況についてのアンケート

【貴施設名 _____ お名前 _____】

下記の欄に、()には該当する言葉を、選択肢には数字に○をつけてください。個別的には処理はいたしませんのでご安心ください。回答には現在の状況をお書きください。

1. 先生の所属施設を以下の中からお選びください
1) 大学病院 2) 一般臨床病院 3) 診療所(分娩有) 4) 診療所(分娩無)
2. 先生の科において、不育症の患者さんの妊娠例は1年間でどのくらいありますか？
1) ある(約 _____ 例/年) 2) なし
3. 2.のうち抗リン脂質抗体症候群(APS)*と考えられる症例はどのくらいありますか？ *国際抗リン脂質抗体症候群クライテリアを満たす(検査回数以外)
1) ある(_____ 例/年) 2) なし
4. 不育症以外、すなわち動静脈血栓症や重症PIHあるいは胎盤機能不全による34w以前の早産を臨床症状とするAPS*妊娠症例はどのくらいありますか？ *国際抗リン脂質抗体症候群クライテリアを満たす(検査回数以外)
1) ある(_____ 例/年) 2) なし

*国際抗リン脂質抗体症候群クライテリア

臨床所見

1. 動静脈血栓症の既往
2. 妊娠合併症
 - a. 10w以降の、他に原因の明らかでない流産が1回以上
 - b. 重症PIHあるいは胎盤機能不全による34w以前の早産
 - c. 10w未満の他に原因の明らかでない流産が3回以上

検査基準

1. 抗カルジオライピン抗体 IgG or IgM が中力価ないし健常人の99パーセントイル以上
2. IgG or IgM 抗β2GPI抗体が健常人の99パーセントイル以上
3. ループスアンチコアグラントが陽性

臨床所見の1項目以上、かつ検査項目のうち1項目以上が12週以上の間隔で2回以上陽性

5. 不育症の患者さんに対する抗リン脂質抗体ないしは関連検査の施行状況を知るための質問です。該当する番号に○をつけてください。ご自分で治療の判断に設定している基準値があれば下線の上に記入してください。

<抗リン脂質抗体>

1	抗カルジオリピン抗体 IgG	① 測定している (基準値 10.0IU)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
2	抗カルジオリピン抗体 IgM	① 測定している (基準値 10.0IU)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
3	抗 CL β_2 GPI 複合体抗体 IgG	① 測定している (基準値 3.5IU)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
4	LAC 希釈蛇毒法 (グラディポア)	① 測定している (基準値 1.3)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
5	LAC リン脂質中和法 (Staclot LA)	① 測定している (基準値 6.3)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
6	LAC aPTT 凝固時間法 (SRL・MBL)	① 測定している (基準値 55.5)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
7	抗ホスファチジルエタノールアミン IgG	① 測定している (基準値 0.32)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
8	抗ホスファチジルエタノールアミン IgM	① 測定している (基準値 0.44)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
9	抗ホスファチジルセリン抗体	① 測定している (基準値)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
10	抗ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 IgG	① 測定している (基準値 1.2)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
11	その他 ()	① 測定している (基準値)		② 測定しない

<抗リン脂質抗体以外>

12	プロテイン S 抗原	① 測定している (基準値 65%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
13	プロテイン S 活性	① 測定している (基準値 60%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない

14	アンチトロンビン抗原	① 測定している (基準値 23.6mg/dl)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
15	アンチトロンビン活性	① 測定している (基準値 80%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
16	プロテインC抗原	① 測定している (基準値 70%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
17	プロテインC活性	① 測定している (基準値 64%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない
18	凝固第XII因子活性	① 測定している (基準値 50%)	② 測定している 基準値_____	③ 測定しない

6. 抗リン脂質抗体は12週間あけて2回陽性を確認することとなっていますが実際はいかがですか？

- ① 12週間あけて2回陽性を確認する
- ② 12週間あけないが、2回測定する
- ③ 1回のみ測定する

●抗リン脂質抗体合併妊娠に関するご意見、本研究班に対するご要望がございましたらお書きください。

以上でアンケートは終わりです。ご協力ありがとうございました。

ご回答内容は病院名が特定される形で公表されることはございません。

今後、抗リン脂質抗体症候群合併妊娠についての症例調査を予定しています。その際にはご協力をよろしくお願い申し上げます。

連絡先：村島温子

国立成育医療研究センター母性医療診療部

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

TEL:03-5494-7220 (村島直通) FAX:03-5494-7406

E-mail:murasima-a@ncchd.go.jp

産科的抗リン脂質抗体症候群(APS)におけるフォスファチジルセリン依存性
抗プロトロンビン抗体測定系の標準化

研究分担者 渥美達也 北海道大学 大学院医学研究科免疫代謝内科学分野

研究要旨

フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)は、ループスアンチコアグラントの主要な責任抗体であり、抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断において重要な自己抗体であるとの認識が広がっている。しかしこれまで、測定系による抗体検出能の違いが示唆されていた。そこで今回、111例の患者保存血漿を用い、aPS/PT IgG/IgM測定に用いられる計4種の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) キットの抗体測定能を検定した。その結果、IgG, IgM の陽性一致率はそれぞれ 98%、82%と高い一致率を認めた。aPS/PT 測定系は IgG, IgM 共にキットの違いによらず標準化されていると考えられた。今後、妊娠合併症例における APS 診断の精度向上に寄与すると考えられる。

A. 研究目的

フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)の抗リン脂質抗体症候群(APS)診断における重要性は認識されるようになってきている。習慣流産ではヘパリン製剤が治療に用いられることが多いが、その際、ループスアンチコアグラント(LA)は測定できない。機能的(凝固検査により)に検出される抗リン脂質抗体だからである。aPS/PTは、このように制限が多く、測定が煩雑である LA の責任抗体と考えられる為、その代替として測定することで産科的 APS の診断確度を上げることができる。

一方、aPS/PT の測定系による抗体検出能の違いが示唆され、その為、再現性を持って aPS/PT の発現や抗体価の高低を検討することができないとの危惧があった。

今回、我々は aPS/PT の測定に用いられる4種の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)キットを用いて本抗体測定系の標準化を試みた

B. 研究方法

保存患者血漿 111 検体を用い、各種 ELISA を用いて aPS/PT を測定した。61 検体に対して in-house ELISA と QUANTA Lite™ aPS/PT IgG ELISA kit(Inova Diagnostics, Inc, USA)を用いて aPS/PT IgG を測定した。50 検体に対して in-house ELISA と QUANTA Lite™ aPS/PT IgM ELISA kit (Inova

Diagnostics)を用いて aPS/PT IgM を測定した。

市販キットでの測定はそれぞれ測定プロトコールに沿って行われた。In-house プロトコールは以下の通りである(Atsumi T et al, Arthritis Rheum 2000;43:1982)。

Microtiter plate(Sumilon Type S;Sumitomo Bakelite)に 50µg/ml の phosphatidylserine(Sigma) 30µl を加え 4℃で一晩乾燥させる。非特異的結合を防ぐため、各 well には 1% fatty-scid free BSA (Sigma)と 5 mM CaCl₂ を加えた(BSA-CaCl₂)Tris buffered saline(TBS) 150µl が加えられ、その後 0.05% Tween 20 (Sigma)と 5mM CaCl₂ によって3回洗浄された。その後、BSA-CaCl₂ に混和された 10µg/ml のヒト prothrombin 50µl (Diagnostica Stago) が plate 全体の半数の well に添加され、残り半数の well には BSA-CaCl₂ のみが添加された。37℃ 1 時間の incubation の後、plate は洗浄され、BSA-CaCl₂ によって 100 倍に希釈された検体(血清) 50µl が各 well に duplicate で添加され室温で 1 時間 incubation された。その後、alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG もしくは IgM が substrate と共に添加された。aPS/PT の titer は positive control により得られた検定曲線を用いて測定された。IgG, IgM の基準値(それぞれ <2.0 units/ml, <9.2 units/ml) は健康人非妊婦 13 2 名の 99 パーセントイルをカットオフ値とした。

aPS/PT IgG, IgM についてそれぞれ異なる ELISA

により検出された抗体価の一致率を統計学的に検定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」）に則り倫理面への配慮を行い。北海道大学病院倫理審査委員会の承認を得た（第 12-0010 号）。本研究は、他の研究に使用する目的で既に採取し、保存していた血漿検体を用いた為、研究対象者に対する不利益はない。検体保存に同意頂いた対象には、将来保存検体を他の研究に用いることを同意得ていたが、今回の研究にあたって、面接可能な対象には改めて対面での同意を得、また情報公開文書を作成して本研究の周知を行った。

C. 研究結果

異なる ELISA 間での陽性一致率は aPS/PT IgG において 98%、aPS/PT IgM において 82% であり、Cohen の κ 係数はそれぞれ 0.962、0.597 と異なる ELISA による測定は良好な一致率を示した。また、異なる ELISA 間における抗体価の相関は $r=0.749$ 、 $r=0.622$ (それぞれ aPS/PT IgG 及び IgM, $p<0.001$) と良好であった。

D. 考察

aPS/PT 測定の標準化が乏しいことが、これまで同抗体が APS 診断に用いられにくい主因であった。今回、aPS/PT IgG, IgM に用いられるそれぞれ 2 種の ELISA 測定系の一致率が十分に高値であったことは、aPS/PT 測定の臨床応用を進める重要な根拠になると考えられる。尚、測定キットや in-house ELISA に用いた各試薬の lot の違いによる測定値への影響は明らかでなかった。

E. 結論

aPS/PT IgG, IgM の出現や抗体価は、今回検討した範囲では異なる ELISA を用いても高い一致率で測定可能であることが判明した。

F. 健康危険情報

本研究による健康危険情報は無い。

G. 研究発表

論文発表

1.Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K,

Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* 72:310-2, 2013

2.Harigai M, Takamura A, Atsumi T, Dohi M, Hirata S, Kameda H, Nagasawa H, Seto Y, Koike T, Miyasaka N. Elevation of KL-6 serum levels in clinical trials of tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: a report from the Japan College of Rheumatology Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs. *Mod Rheumatol* 23:284-96, 2013

3.Takamura A, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Seto Y, Atsumi T, Dohi M, Koike T, Miyasaka N, Harigai M. A retrospective study of serum KL-6 levels during treatment with biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis patients: a report from the Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs of the Japan College of Rheumatology. *Mod Rheumatol* 23:297-303, 2013.

4.Amengual O, Atsumi T, Oku K, Suzuki E, Horita T, Yasuda S, Koike T. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome. *Mod Rheumatol* 23:81-8, 2013.

5.Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest* 93. 72-80, 2013.

6.Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Positive synovial vascularity in patients with low disease activity indicates smouldering inflammation leading to joint damage in rheumatoid arthritis: time-integrated joint inflammation estimated by synovial vascularity in