

- possible mechanism of thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:206–10.
- 20 Atsumi T, Khamashta MA, Haworth RS, Brooks G, Amengual O, Ichikawa K *et al.* Arterial disease and thrombosis in the antiphospholipid syndrome: a pathogenic role for endothelin 1. *Arthritis Rheum* 1998;41:800–7.
 - 21 Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol* 2006;135:214–9.
 - 22 Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N *et al.* Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004;91:667–73.
 - 23 Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GRV. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998;79:276–81.
 - 24 Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A *et al.* The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 2004;16:1633–41.
 - 25 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F *et al.* Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594–604.
 - 26 Zhou H, Wolberg AS, Roubey RA. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep. *Blood* 2004;104:2353–8.
 - 27 Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McCrae KR. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem* 2000;275:15541–8.
 - 28 Zhang J, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* 2005;105:1964–9.
 - 29 Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A *et al.* Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2003;101:3495–500.
 - 30 Satta N, Dunoyer-Geindre S, Reber G, Fish RJ, Boehlen F, Kruithof EK *et al.* The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood* 2007;109:1507–14.
 - 31 Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrews RK *et al.* Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum* 2006;54:2558–67.
 - 32 Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, Van-Hoorelbeke K, Urbanus RT *et al.* Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ialpha and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost* 2007;5:369–77.
 - 33 Kaczan-Bourgeois D, Salles JP, Hullin F, Fauvel J, Moisan A, Duga-Neulat I *et al.* Increased content of annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta* 1996;17:669–76.
 - 34 Romay-Penabad Z, Montiel-Manzano MG, Shilagard T, Papalardo E, Vargas G, Deora AB *et al.* Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood* 2009;114:3074–83.
 - 35 Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V *et al.* Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1327–33.
 - 36 Sorice M, Longo A, Capozzi A, Garofalo T, Misasi R, Alessandri C *et al.* Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum* 2007;56:2687–97.
 - 37 Alard JE, Gaillard F, Daridon C, Shoenfeld Y, Jamin C, Youinou P. TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I. *J Immunol* 2010;185:1550–7.
 - 38 Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Leheste JR, Christensen EI, Willnow TE. beta2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) and beta2-glycoprotein-I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *J Clin Invest* 1998;102:902–9.
 - 39 Pennings MT, van Lummel M, Derksen RH, Urbanus RT, Romijn RA, Lenting PJ *et al.* Interaction of beta2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family. *J Thromb Haemost* 2006;4:1680–90.
 - 40 Andersen OM, Benhayon D, Curran T, Willnow TE. Differential binding of ligands to the apolipoprotein E receptor 2. *Biochemistry* 2003;42:9355–64.
 - 41 Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem* 2003;278:33831–8.
 - 42 Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, Derksen RH, Pennings MT, Papalardo E *et al.* Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2011;117:1408–14.
 - 43 Sikara MP, Routsias JG, Samiotaki M, Panayotou G, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG. {beta}2 Glycoprotein I ((beta)2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;115:713–23.
 - 44 Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, Pericleous C, Branch W, Rice J *et al.* Effects of polyclonal IgG derived from patients with different clinical types of the antiphospholipid syndrome on monocyte signaling pathways. *J Immunol* 2010;184:6622–8.
 - 45 Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO *et al.* Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:236–50.
 - 46 Dunoyer-Geindre S, De Moerloose P, Galve-De Rochemonteix B, Reber G, Kruithof E. NFkappaB is an essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti-beta(2) glycoprotein 1 antibodies. *Thromb Haemost* 2002;88:851–7.
 - 47 Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum* 2004;50:2911–9.
 - 48 Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2005;52:1545–54.
 - 49 Lopez-Pedreira C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N *et al.* Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006;54:301–11.
 - 50 Agar C, van Os GM, Morgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT *et al.* Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations:

- implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;**116**:1336–43.
- 51 Ioannou Y, Zhang JY, Passam FH, Rahgozar S, Qi JC, Giannakopoulos B *et al*. Naturally occurring free thiols within beta 2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells, and regulation of oxidative stress-induced cell injury. *Blood* 2010;**116**:1961–70.
 - 52 Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW *et al*. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006;**38**:550–5.
 - 53 Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N *et al*. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:1746–53.
 - 54 Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S *et al*. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:1366–7.
 - 55 Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010;**376**:1498–509.
 - 56 Peaceman AM, Rehnberg KA. The immunoglobulin G fraction from plasma containing antiphospholipid antibodies causes increased placental thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1992;**167**:1543–7.
 - 57 Rand JH, Wu XX, Guller S, Gil J, Guha A, Scher J *et al*. Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;**171**:1566–72.
 - 58 Meroni PL, di Simone N, Testoni C, D'Asta M, Acaia B, Caruso A. Antiphospholipid antibodies as cause of pregnancy loss. *Lupus* 2004;**13**:649–52.
 - 59 Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS *et al*. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002;**195**:211–20.
 - 60 Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D *et al*. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003;**112**:1644–54.
 - 61 Berman J, Girardi G, Salmon JE. TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol* 2005;**174**:485–90.
 - 62 Girardi G, Yarin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 2006;**203**:2165–75.
 - 63 Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2008;**118**:3453–61.
 - 64 Seshan SV, Franzke CW, Redecha P, Monestier M, Mackman N, Girardi G. Role of tissue factor in a mouse model of thrombotic microangiopathy induced by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2009;**114**:1675–83.
 - 65 Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004;**10**:1222–6.
 - 66 Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2007;**196**:167e1–5.
 - 67 Salmon JE, Heuser C, Triebwasser M, Liszewski MK, Kavanagh D, Roumenina L *et al*. Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med* 2011;**8**:e1001013.
 - 68 Francis J, Rai R, Sebire NJ, El-Gaddai S, Fernandes MS, Jindai P *et al*. Impaired expression of endometrial differentiation markers and complement regulatory proteins in patients with recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:435–42.
 - 69 Girardi G. Role of tissue factor in the maternal immunological attack of the embryo in the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;**39**:160–5.
 - 70 Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005;**52**:2120–4.
 - 71 Romay-Penabad Z, Liu XX, Montiel-Manzano G, Papalardo De Martinez E, Pierangeli SS. C5a receptor-deficient mice are protected from thrombophilia and endothelial cell activation induced by some antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;**1108**:554–66.
 - 72 Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T *et al*. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:1030–5.
 - 73 Goldfarb RD, Parrillo JE. Complement. *Crit Care Med* 2005;**33**:S482–4.
 - 74 Niculescu F, Niculescu T, Rus H. C5b-9 terminal complement complex assembly on apoptotic cells in human arterial wall with atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 2004;**76**:17–23.
 - 75 Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004;**21**:401–9.
 - 76 Marceau F, Hugli TE. Effect of C3a and C5a anaphylatoxins on guinea-pig isolated blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;**230**:749–54.
 - 77 Speidl WS, Exner M, Amighi J, Kastl SP, Zorn G, Maurer G *et al*. Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005;**26**:2294–9.
 - 78 Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med* 1981;**153**:665–76.
 - 79 Huber-Lang M, Sarma JV, Zetpune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR *et al*. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006;**12**:682–7.
 - 80 Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997;**77**:394–8.
 - 81 Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood* 1986;**68**:875–80.



不妊・不育
助産師に今、求められる知識とケア

2

妊娠を維持する メカニズムとその病態

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

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

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


POINT

- ① 不育症の原因について学びましょう！
- ② 年齢と妊娠の関係について学びましょう！
- ③ 精神的支援の重要性を学びましょう！

はじめに

流産は妊娠 22 週未満の娩出と定義されますが、妊娠 10 週未満の早期流産が大多数を占めます。超音波検査がなかった時代は妊娠の診断が現在よりかなり遅く、後期流産しか認識されていませんでした。「階段

から落ちて流産する」というような場面をドラマなどでもしばしばみかけますが、このような外傷性後期流産はきわめてまれです。しかし一般の人は女性の労働、不摂生のために流産は起こると現在も思っているの

自分を責めないで 
女性の仕事や運動によって流産が起こるという科学的根拠はありません。自分を責める必要はないことを言ってあげましょう。

ここに注目！

でしょう。労働が原因で流産が起こるという科学的根拠はありません¹⁾。流産は妊娠最大の合併症であり、約 15% の妊婦に起こります。また女性の加齢とともに増加し、40 代では 50% にも上ります (図 1)。



習慣流産は3回以上連続する流産、不育症は妊娠はするけれど流産・死産によって生児を得られない場合、と定義されています。私たちが実施した日本初の疫学研究岡崎コホート研究によれば、一般集団における習慣流産頻度は0.9%、不育症は4.2%、妊娠したことのある女性の38%が流産を経験していました³⁾。

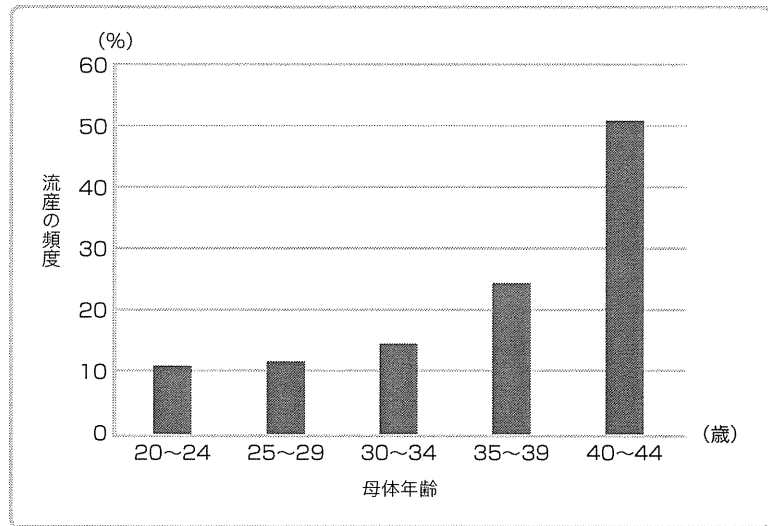


図1 加齢による流産の頻度²⁾

早期流産と染色体異常

流産、とくに早期流産のほとんどは胎児（胎芽含む）の染色体異常によって起こります。

女性の卵は胎生20週頃に最大数の700万個になり、閉経までアポトーシスにより減少し続けます。個々の卵は第一減数分裂の途中で停止しており、排卵の時点で減数分裂

を再開します。加齢によって、排卵時に各染色体の分配が正常に起きない不分離現象が起こりやすくなり、染色体数の異常を引き起こすことがあります。胎児の50~70%に染色体異常がみられると報告されていますが、私たちの検討では76%でした⁴⁾。このばらつきは女性の平均年

齢によるものです。

染色体異常の種類としては16番トリソミーが最も多く、45, Xを除くモノソミーは流産児にはみられません。染色体異常は発生早期ほど高率にみられ、モノソミーはより重篤なため、不妊となると推定されています。

妊娠を維持するメカニズムとその病態

妊娠の維持には成長因子やサイトカインが関与しています(図2)。白血球抑制因子(leukemia inhibitory factor; LIF)は子宮内膜、脱落膜から分泌され子宮内膜の脱落膜化と着床の両方に必須です。着床にはプロスタグランジン産生が必要であり、Cyclooxygenase-2が着床においてこれを制御しています。着床後

は絨毛性ゴナドトロピンにより、黄体からプロゲステロンの産生が維持され、プロゲステロンにより、子宮内膜は脱落膜に変化します。脱落膜のVascular endothelial factorは血管新生に、interleikin-1, colony-stimulating factor 1, transforming growth factors α , β は絨毛の増殖に重要な役割を担っています。

絨毛表面にはHLA-Gが表出しており、ヒトの他の組織にみられるclass IIの抗原は表出していません。胎児は母体にとって、半分は他人の抗原を持つ異物であり、これが免疫学的拒絶を受けない理由はHLA-Gにあると推定されています。子宮脱落膜にはナチュラルキラー細胞とマクロファージが多数存在しており、

これらは HLA-G を認識したうえで胎児を拒絶することなくサイトカインを介して絨毛の発育を促進します。これが免疫学的寛容、すなわち免疫学的妊娠維持機構です。これらの一部に異常が生じれば流産となることが推定されます。

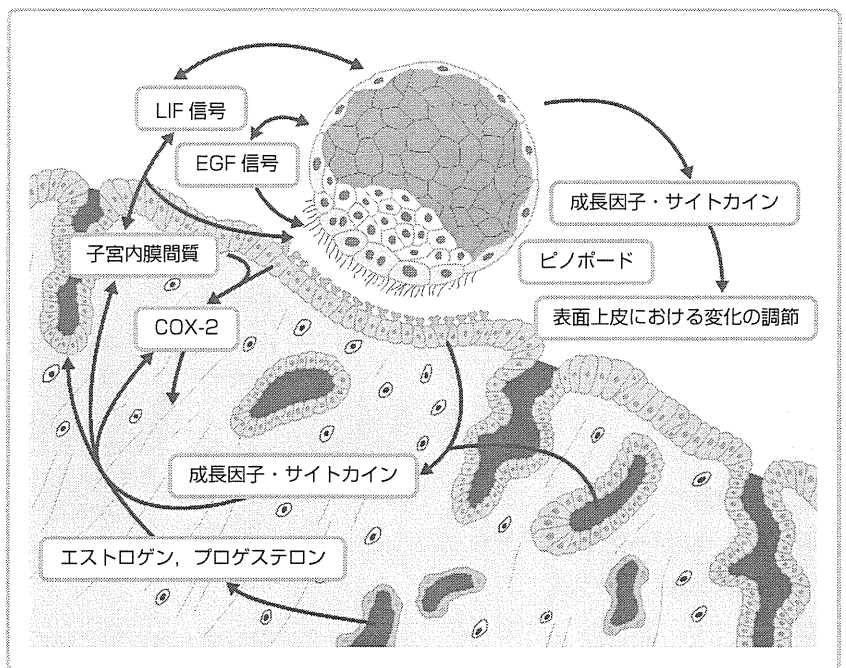


図2 受精卵と子宮脱落膜のクロストーク⁵⁾

不育症原因精査のための検査

不育症の原因は、抗リン脂質抗体 10%、子宮奇形 3.2%、夫婦どちらかの染色体異常 6%、糖尿病・甲

状腺機能異常・多のう胞性卵巣症候群などの内分泌異常 12%と考えられます (表1)。生殖内分泌異常、

免疫異常、血栓性疾患、遺伝子異常、精神的ストレスなどの関与も報告されていますが、まだ研究段階です。

表1 不育症に必要な検査項目とその意義

	頻度	推奨検査	学会推奨レベル ²⁾	
抗リン脂質抗体	10.7%	β 2glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体 (230) ^{※1} ループスアンチコアグラント (dRVVT 290) ^{※1} ループスアンチコアグラント (希釈 aPTT 法) ^{※1}	陽性率は 2%程度、特異度は高い 陽性率は 2%程度、特異度は高い 陽性率は 15%、中和試験によって確認する 陽性の場合 12 週間後に再検査し、陽性が持続したら抗リン脂質抗体症候群と診断	A
子宮奇形	3.2%	子宮卵管造影 (512) ^{※1} と超音波検査 (530)	双角子宮、中隔子宮、重複子宮、単角子宮は流産の原因 手術によって生児獲得率が改善するという証拠はまだ得られていない 弓状子宮は流産の原因とならない	A
夫婦染色体異常	6%	G 分染法 (3130)	転座は流産の原因 9 番逆位は正常変異	B
内分泌異常	12%	糖尿病：空腹時血糖 (11) 甲状腺機能異常：TSH (115)、FT4 (140) 多のう胞性卵巣症候群：超音波検査と月経異常の問診		C
凝固系検査		aPTT (29)	抗リン脂質抗体症候群では延長する 抗リン脂質抗体を測定するなら必要ない 妊娠中は短縮するためヘパリンのモニターとしては使えない	C
胎児染色体異常	51%	絨毛染色体 G 分染体	数的異常が多く、明らかな原因	C

^{※1} 習慣流産として保険採用されている。スクリーニングとして検査する場合は保険採用できない。(2012年4月)

^{※2} 日本産科婦人科学会ガイドライン推奨レベル



一方、散発性流産の約70%が胎児染色体数的異常によりますが、繰り返す流産はそのような偶然によるものではない、ということが長い間信じられてきました。しかし、不育症の集団にも胎児染色体異常を繰り返している症例が約51%存在することがわかってきました⁴⁾。胎児染色体検査は行われないことが多く、ほとんどの論文で「不育症において半数以上が原因不明」と記載されています。しかし、胎児異常も原因として追究すれば真の原因不明は約20%になります(図3)。

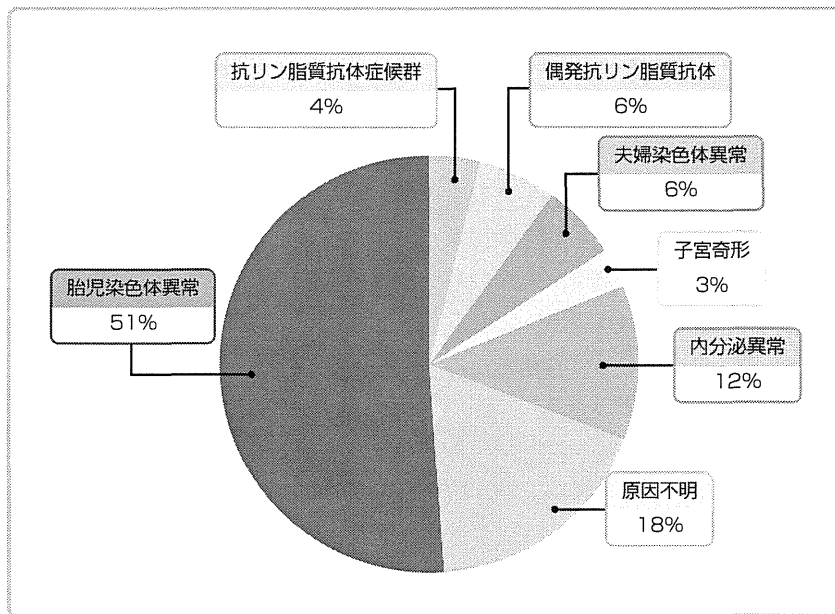


図3 名古屋市立大学の不育症患者1676組の異常頻度

抗リン脂質抗体症候群の診断方法

抗リン脂質抗体とは

抗リン脂質抗体の測定法にはリン脂質 cardiolipin (CL), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PL), phosphatidylethanolamine (PE) に対する IgG, IgA, IgM を ELISA 法で測定する場合と凝固時間を測定する Lupus Anticoagulant (LA) があります。1990年には抗CL抗体の真の対応抗原はCLではなくβ2glycoprotein I (β2GPI) であることが判明しました。その後、血漿中のリン脂質結合蛋白である Prothrombin, kininogen (KN), Annexin V, Protein C, Protein S

表2 抗リン脂質抗体症候群診断基準⁶⁾

臨床所見
動静脈血栓症
妊娠合併症
●妊娠10週未満の3回以上連続した原因不明な習慣流産
●妊娠10週以降の原因不明な子宮内胎児死亡
●妊娠34週未満の重症妊娠高血圧腎症・子癇や胎盤循環不全による早産
検査所見 (12週間以上の間隔で2回以上陽性)
Lupus anticoagulant (LA) 陽性 (国際血栓止血学会ガイドラインに準じた方法)
(β2glycoprotein I 依存性) 抗カルジオリピン抗体 IgG もしくは IgM が中高力価
抗β2glycoprotein I 抗体 IgG もしくは IgM が陽性

などが対応抗原として報告されましたが、現在もこれらを抗リン脂質抗体と呼んでいます。

APS 診断基準

抗リン脂質抗体症候群 (anti-phospholipid syndrome ; APS) 診

断基準を表2に示しました。反復流産、子宮内胎児発育遅延、子宮内胎児死亡、妊娠高血圧症候群、胎盤早期剥離、羊水過少などに抗リン脂質抗体陽性が疑われ、とくに早期流産よりも子宮内胎児死亡との関連が強いと考えられています。

抗リン脂質抗体の測定法

国際学会診断基準には中等量以上の抗カルジオリピン IgG, IgM (SRL 社では 18IU 以上), β 2GPI 依存性抗 CL 抗体, LA が含まれており, 12 週以上あけて陽性が持続することを条件とすることで疑陽性を除外しています。

対応抗原が多様なため多数の測定法がありますが, 「陽性だと流産する」ことが確認されている検査は限られます。抗カルジオリピン抗体の検査会社の基準値は 10IU 以上ですが, 私たちはこの検査で弱陽性の場合, 無治療でも流産しないことを確認しました (論文未発表)。日本では陽性率が高い検査が好まれますが, 陽性率が高ければ偽陽性が多く, 不要なヘパリン療法を実施して肉体的, 経済的負担を患者に強いること

になります。

私たちは aPTT 試薬を 5 倍希釈し, 標準血漿と混合試験を行う LA (aPTT-LA 杉浦法) を確立し, 無治療での次回産率 53.8% が抗凝固療法によって 19.6% に改善できることを証明しました⁷⁾。現在, 国際学会の診断基準にある 3 種類の抗リン脂質抗体 (LA-RVVT, β 2GPI 依存性抗 CL 抗体, aPTT-LA 杉浦法) の測定を行っており, 約 10.7% がいずれかの検査が陽性ですが, 12 週間後の再検査で陽性となり診断基準を満たす APS は約 4.5% でした。委託検査法では aPTT 希釈法が杉浦法とほぼ同じ患者を検出することを確認しています。

抗リン脂質抗体は SLE 患者の 30% にみられることから不育症においても抗核抗体がしばしば測定されますが, 抗リン脂質抗体陰性で抗核

抗体だけが陽性の症例は, 陰性の場合と生児獲得率の差はなく, 治療の必要はありません⁸⁾。

抗 PE 抗体は国際学会の診断基準に含まれていませんが, 日本では陽性率が高い (IgG, M あわせて 20 ~ 35%) ためにしばしば測定され, 抗凝固療法が実施されています。私たちの検討では偽陽性が多く, 本物の APS を検出しないことが判明しました⁹⁾。治療の際には「過剰な治療をしている可能性」についても言及すべきです。

産科合併症における抗リン脂質抗体の測定法はいまだ標準化されていない研究領域です。委託検査をする場合, LA-RVVT, β 2GPI 依存性抗 CL 抗体, LA-aPTT 希釈法をお勧めします。これらは国際基準に含まれ, 保険採用もされています。

抗リン脂質抗体症候群の治療

抗リン脂質抗体が 12 週間持続する症例に対する流産予防としては低用量アスピリンと未分画ヘパリンもしくは低分子ヘパリンによる抗凝固療法が標準的治療法であり, 生児獲得率は 70 ~ 80% です^{10) 11)}。基礎体温を記録し, 高温 14 ~ 15 日に妊娠の自己判定をし, アスピリン内服 (81mg もしくは 100mg/日) とカプロシン[®] (5000IU を 2 回/日 皮下注射) 自己注射を行います (図 4)。診断基準をみたく抗リン

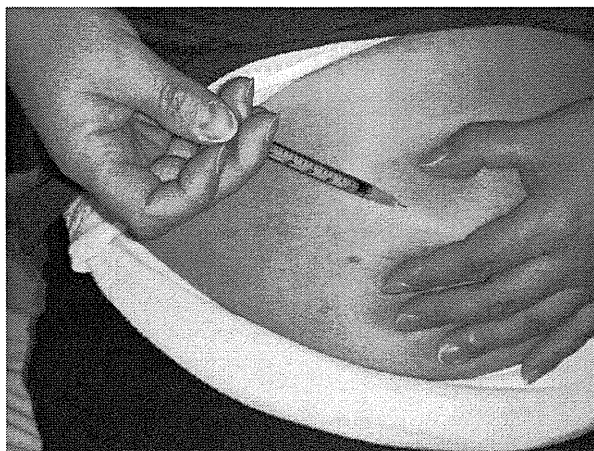


図 4 抗リン脂質抗体症候群の治療
低用量アスピリン+ヘパリン



脂質抗体症候群では2012年1月から保険採用となりました。

LA-RVVT, β 2GPI 依存性抗 CL 抗体, LA-aPTT 希釈法の複数の抗体が強陽性で持続する症例は「本物」の APS であり, 将来的に若年性脳梗塞, 心筋梗塞, 肺梗塞を起こす可能性があり, 分娩後の血栓予防を膠原病内科に依頼する必要性があります。

抗リン脂質抗体が陽性を示したが12週間後に陰性となった場合(偶発抗リン脂質抗体), アスピリン単独投与群 84.6% (44/52) では

無治療群 50.0% (8/16) と比較して生児獲得率が高いことを確認しました¹⁰⁾。胎児染色体異常を除くと95.7%であり, 偶発例も治療を考慮します。ただし, LA-RVVT, β 2GPI 依存性抗 CL 抗体, LA-aPTT 希釈法を組み合わせた検査以外では治療の有効性はわかりません。

アスピリンは胎盤を通過し, その血小板凝集能抑制は不可逆的であり, 効果は1~2週間持続するため妊娠36週0日に中止しますが, 出血による問題は臨床的にはあまり心配ありません。先天異常に関して,

腹壁破裂の頻度が上昇すると報告されています。

未分画ヘパリンも低分子ヘパリンも胎盤通過性がないため児の出血は問題ありませんが, 母体の出血傾向, 血小板減少, 骨粗鬆症が重要です。日本では不育症患者の希望により, 過剰な抗凝固療法が実施されている実態があります。私たちはヘパリン惹起性血小板減少症(HIT)を起こした本物のAPSを経験しており, 不必要な治療は慎むべきと考えています。

夫婦染色体均衡型転座

De Braekeleerらは2回以上の流産を経験した22199組のカップルの染色体異常の頻度をデータベースから調べ, 死産における染色体構造異常の頻度は新生児における頻度(相互転座0.085%, ロバートソン転座0.092%, 逆位0.012%)よりも高く, 既往流産回数が増加するにしたがって頻度も上昇することから, これらの構造異常が流産と関係することを示しました¹¹⁾。一方, 性染色体の数的異常は新生児にみられる頻度と差がなく, 流産と関係ありませんでした。また, 夫よりも妻の構造異常の頻度が高いこともわかりました。

私たちは1284組の反復流産夫婦の染色体を調べ, 均衡型転座を持つ

夫婦のその後の自然妊娠締結を世界ではじめて報告しました¹²⁾。相互転座を持つ夫婦と染色体正常夫婦の診断後初回妊娠での生児獲得率は31.9% (15/47) とそれぞれ71.7% (849/1184) であり, 均衡型相互転座保因者の流産率が高いことがわかりました。累積生児獲得率は68.1%でした。

その後の日本の多施設共同研究の診断後初回生児獲得率は63%であり¹³⁾, オランダのコホート研究でも累積生児獲得率83%と高い成績でした(表3)。

日本でも流産予防を目的とした着床前診断が始まりました。体外受精によって得られた受精卵の割球を採取して診断し, 均衡型の受精卵のみ

を胚移植して流産を防止する技術です。現在出産成功率を明記している報告は4つあり, 採卵あたりの成功率は23.7%, 47.2%, 6.2%, 22.1%でした。しかし, 着床前診断によって自然妊娠よりも出産成功率が改善できるとした比較研究の報告はありません。着床前診断は体外受精が前提なので1回あたりの妊娠率は女性の年齢に依存し, 約10~30%です。成功率は年齢, 過去の流産回数に依存して減少します。均衡型転座と判明した直後の自然妊娠において30~60%の高い生児獲得率が得られるにもかかわらず, すべての保因者に着床前診断を行うことは過剰治療であり, 交互分離(正常な配偶子)の割合を推測する方法をみつけるこ

表3 相互転座患者の妊娠成功率¹⁴⁾

	着床前診断				自然妊娠			
	Chun KL	Otani T	Feyereisen	Fischer J	Sugiura M	Stephenson M	Japan	Franssen MTM
患者数(人)	43	29	35	192	47	20	46	157
年齢(歳)	31.5	32.7		34.0	29.1		31.0	
流産回数(回)		3.4					3.1	
採卵(件)	59	36	81	272				
流産(件)	22	17		69				
分娩(件)	14	17	5	60	15	13	29	131
出産率(%)	32.6	58.6	14.3	31.3	31.9	65.0	63.0	
採卵(%)	23.7	47.2	6.2	22.1				
累積生児獲得率(%)					68.1	90.0		83.0
掲載誌					F&S	HR	JHG	BMJ



図5 「着床前診断に反対するシンポジウム」風景

表4 着床前診断に関する見解

- ① 本法はきわめて高度な技術を要する医療行為であり、臨床研究として行われる。
- ② 本法の実施者は、生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師であり、かつ遺伝性疾患に対して深い知識と出生前診断の豊かな経験を有していることを必要とする。
- ③ 本法を実施する医療機関は、すでに体外受精・胚移植による分娩例を有し、かつ出生前診断に関して実績を有することを必要とする。また、遺伝子診断の技術に関する業績を有することを要する。
- ④ 本法は重篤な遺伝性疾患に限り適用される。適応となる疾患は日本産科婦人科学会において申請された疾患ごとに審議される。なお、重篤な遺伝性疾患を診断する以外の目的に本法を使用してはならない。

とが今後の課題です。

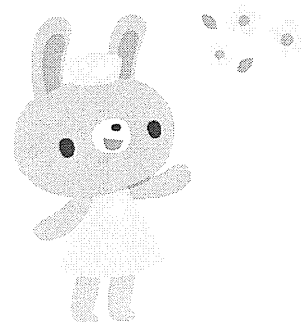
着床前診断

着床前診断には、

- 罹患胚を廃棄することは生命の選別である。
 - 優生思想につながる。
 - 体外受精の合併症を伴う。
- という倫理的問題があり、反対する

マイノリティの存在を明記しておきます(図5)。

日本産科婦人科学会は着床前診断に関する見解を示し、重篤な遺伝性疾患について実施し、各症例を審議して承認する規則を作成しました(表4)。また、臨床遺伝専門医が遺伝カウンセリングを行うことが承認の条件です。





子宮奇形

子宮奇形のスクリーニングとして子宮卵管造影法と超音波検査を行い、MRI・子宮鏡・腹腔鏡を組み合わせで確定診断します。

当院の1676例の反復流産患者の検討で単角単頸子宮、重複子宮、双角子宮、中隔子宮の大奇形は3.2%にみられました。子宮奇形をもつ患者と正常子宮を持つ患者の非手術診断後初回妊娠成功率はそれぞれ

59.5% (25/42), 71.7% (1096/1528, $p=0.084$), 累積成功率は78%, 85.5%であり、子宮奇形を持つ患者の成功率が低い傾向にありました。

胎児染色体異常率は15.4% (2/13), 57.5% (134/233, $p=0.006$)であり、子宮奇形を持つ患者は胎児染色体正常流産を起こすことがわかりました¹⁵⁾ (表5)。また、子宮奇形を持つ患者において欠損が大き

いほど有意に流産率が増加しました ($p=0.006$)。双角子宮に対して形成手術、中隔子宮に対して内視鏡的中隔切除術が行われていますが、手術を施行しなくても生児獲得しており、手術例・非手術例の生児獲得率を比較した報告はなく、慎重な説明が必要です。

表5 子宮奇形を持つ患者の非手術生児獲得率¹⁵⁾

	生児獲得率			累積生児獲得率		
	子宮奇形 (n=42)	正常子宮 (n=1528)	P	子宮奇形 (n=41)※	正常子宮 (n=1528)	P
1st	25/42 (59.5%)	1096/1528 (71.7%)	0.084	25 (61.0%)	1096 (71.7%)	0.133
2nd	5/9 (55.6%)	166/275 (60.4%)	0.772	30 (73.2%)	1262 (82.6%)	0.119
3rd	2/2 (100%)	38/69 (55.0%)	0.207	32 (78.0%)	1300 (85.1%)	0.215
4th		4/18 (22.2%)			1304 (85.3%)	
5th		3/9 (33.3%)			1307 (85.5%)	
6th		0/6 (0%)			1307 (85.5%)	
Final follow up				32 (78.0%)	1307 (85.5%)	

※流産後に1例は手術を実施。

胎児染色体数的異常流産

散発流産の50～70%に胎児染色体異常がみられますが、それは偶然起こることであって、習慣流産の原因ではないとして、長い間“胎児染色体異常による流産”の存在は認識されませんでした。反復流産患者の

1309例の妊娠について調べたところ、既往流産回数が増えるに従って流産率は高くなり、染色体異常率は有意に減少しました (表6)。しかし、既往流産回数2～4回の集団では染色体異常流産率は50%以上で

した。反復流産患者においても胎児染色体異常は重要な原因です。ただし、胎児染色体異常がみられたときの次回妊娠の成功率は、胎児染色体正常であったときよりも有意に高率でした (62% vs 38%, オッズ比2.6)。

表6 既往流産回数別流産率³⁾

過去の流産回数	流産率	染色体異常率
2	23.2 (105/452)	63.6 (35/55)
3	32.4 (149/460)	59.0 (46/78)
4	37.0 (71/192)	55.3 (21/38)
5	48.7 (38/78)	38.9 (21/38)
6	64.1 (25/39)	28.6 (4/14)
7	66.7 (16/24)	50.0 (4/8)
8	70.6 (12/17)	0 (0/7)
9	78.6 (11/14)	28.6 (2/7)
10以上	93.9 (31/33)	11.0 (1/9)

平均年齢31歳の患者の散発性流産（1回の流産）における胎児染色体数的異常は76%でした。比較ゲノムハイブリダイゼーション法（CGH法）を用いると流産の80%に染色体微細欠失を含む胎児染色体異常がみつかりと報告されています。胎児染色体異常をn回繰り返している確率は $(0.8)^n$ と推定します。すなわち平均3回流産歴をもつ習慣流産集団の約51%は胎児染色体異常によると考えます。

胎児染色体数的異常に対する着床前スクリーニングも欧米では広く行われています。しかし、生児獲得に関する有効性はまったく示されておらず、ヨーロッパヒト生殖医学会も「有効性がないまま着床前スクリー

ニングが広まってしまったことがIVFの問題点である」と、コメントしています。

胎児異常による流産は前述のとおり、生児獲得もしやすく、「いい結果」であることを伝えるのが遺伝カウンセリングのポイントです。

ここに
注目!

声のかけ方

不育症の半数は胎児染色体異常によって起こります。16番トリソミーのお子さんは妊娠7週が寿命です。「寿命いっぱい育ててあげた」と思うと“流産”が変わるかもしれません。

胎児に関連する遺伝学的要因

片親性ダイソミー、メチル化異常などのエピゲノム異常も流産に関与していることが報告されています。ヒトの染色体は両親から由来しますが、相同染色体の両方が片親から由来した片親性ダイソミー（UPD）に先天異常や流産が起こることが知られています。

絨毛染色体正常の81症例についてマイクロサテライト多型解析を行って両親の由来を調べたところ、7番染色体と14番染色体のUPD2

症例を見つけました¹⁶⁾。習慣流産には胎児先天異常によるものが私たちの想像よりもはるかに多く起こっているのでしょうか。

2009年に染色体不分離に関与する遺伝子SYCP3変異が習慣流産患者26人中2人にみつかりました¹⁷⁾。もし事実であれば、偶然ではなく必然的に胎児染色体異常流産を起こしていることを示唆しており、7.7% (2/26) が関与するとすれば不育症における転座、子宮奇形の原因より

も大きな割合を占めることとなります。私たちはSYCP3遺伝子変異について追試を行いました¹⁸⁾。

患者101例と出産歴のある対照82例についてエクソン7～8のシーケンスを行ったところ両者に1例ずつ変異がみつかったが、その患者の過去2回の絨毛は46, XY, 46, XYであり、SYCP3変異は胎児染色体異常を起こす遺伝子ではないことが明らかになりました。



内分泌異常

糖尿病，甲状腺機能低下症，多くの胞性卵巣症候群が関与しています。糖尿病，甲状腺機能低下症が不育症の原因かどうかは研究が限られますが，これらを認めた場合，内分泌学的治療が必要です。

国際基準によれば不育症患者の約6%に多くの胞性卵巣症候群を認めました。メトフォルミン療法の有効性が報告されていますが，確立された治療とまではいえません。多くの胞性卵巣症候群では甲状腺機能低下

を起こす症例があり，共通の原因が存在するのかもしれませんが。

流産に対する黄体ホルモン補充，hCG投与が頻用されていますが，習慣流産に有効かどうかははまだ確証に至っていません。

血栓性疾患

Protein C, S 欠乏症は血栓を起こすことが知られており，これら血栓性疾患と不育症の関与の報告が散見され，Lancet のメタアナリシスによれば PS 欠乏症と子宮内胎児死亡は関係しそうです¹⁹⁾。私たちの報告でも初期流産と PS, PC, AT は関係しませんでした (図6)。胎盤形成後の子宮内胎児死亡と早期流産は発症機序が異なり，それらを区

別した研究は限られています。また，PC, PS, XII 因子は抗リン脂質抗体症候群において低下することが知られており，aPTT-LA 陰性かつ PS 低下初期流産例は治療の必要がありません。

凝固第 XII 因子の低下も不育症との関係が報告されています。XII 因子活性は遺伝子多型が関与しており，日本人は低いことが知られてい

ます。私たちは患者と健常人の遺伝子多型を調べましたが，多型頻度の差はなく，患者では XII 因子活性のみが低下していることがわかりました (表7)。最近のメタアナリシスでも同様の結論が述べられており，PS, XII 活性低下は抗リン脂質抗体を介して不育症に関与すると考えます。

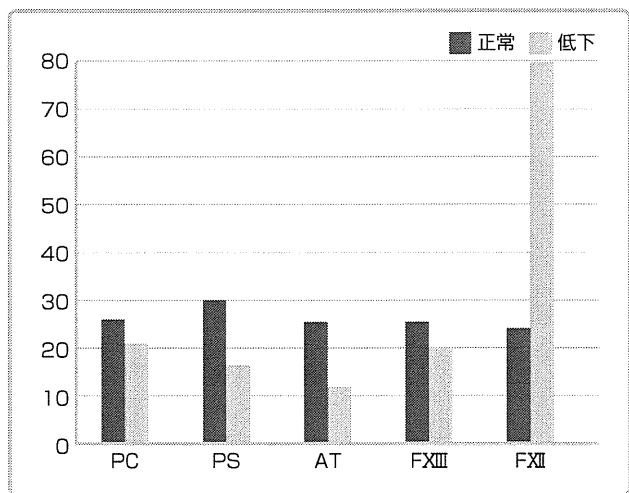


図6 凝固第XII因子活性と遺伝子多型の関与⁷⁾
XII因子活性低下は流産の危険因子

表7 凝固第XII因子活性と遺伝子多型の関与²⁰⁾

	反復流産		健常人	
	頻度 (%)	活性 (%)	頻度 (%)	活性 (%)
CC	9.6	154.8	16.4	164.6
CT	43.4	112.7	29.9	114.3
TT	47	66.2	53.7	70.4

XII因子活性は患者群で低下しているが，46C/T多型頻度は変わらない。

おわりに

不育症において約半数が原因不明とされていますが、絨毛検査を行えば真の原因不明は約20%です。しかし絨毛検査が実施されている症例は限られており、約70%が原因不明になってしまいます。

原因不明不育症には確立された治療法はなく、一定の確率で成功できます。16トリソミーに対して薬物投与をしても有効なはずはありません。当院の検討で、2回流産なら76% (444/582), 3回70% (83/118), 4回79% (19/24), 5回50% (3/6)の無治療成功率でした(論文未発表)。また、次回生児獲得率 p は、下記の計算式で推定できます²¹⁾。

$$\text{logit}(ps) = 3.964 - 0.0652 \times (\text{年齢}) - 0.408 \times (\text{既往流産回数})$$

夫リンパ球免疫療法、ピシパニール療法、アスピリン療法、ステロイド療法などは私たちが先進して実施した治療法ですが、薬物投与なし群と比較して生児獲得率の差はありませんでした。

臨床家の多くは流産の患者に対して治療をしないことがはばかられ、低用量アスピリン、アスピリン・ヘパリン療法を行っているのが現状ですが、原因不明習慣流産に対し無作為割り付け試験を行い、これらの治療の有効性がないことが証明されました²²⁾。

患者らは流産を繰り返すと生涯子どもに恵まれないのか、と絶望的になりますが、私たちの検討とオランダの報告から不育症夫婦の85%が

ここに
注目!

85%が出産へ

不育症夫婦の85%が最終的に出産に至っているという研究報告があります。伝えることで気が楽になってもらえるかもしれません。

流産をくりかえす人の

85%が

無事に出産までたどりつきます。

40%の女性が生涯に流産を経験します。妊娠しても流産や死産をくりかえしてしまう場合、それは「不育症」です。原因は人それぞれですが、検査と治療によって85%もの不育症患者が出産にたどりつくことがわかっています。あきらめる前に検査と治療を受けましょう。

厚生労働省不育症研究班

図7 不育症啓発のためのポスター

最終的に出産に至っていることも分かっています^{14, 15)}。患者と社会への啓発も重要です(図7)。

岡崎コホート研究では流産患者の離婚率が高いこともわかりました⁴⁾。患者のなかには流産のショックのために避妊する方も少なくない

ですが、「加齢は流産の危険因子なので避妊している時間はもったいなく、出産の可能性が充分高い」ことを説明し、励まし続ける精神的支援が原因不明不育症の唯一の治療かもしれません。



文献

- 1) Klebanoff MA, Shiono PH, Rhoads GG: Outcomes of pregnancy in a national sample of resident physicians. *N Engl J Med*, 323: 1040-1045, 1990.
- 2) Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, *et al.*: Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*, 320: 1708-1712, 2000
- 3) Ogasawara M, Aoki K, Okada S, *et al.*: Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*, 73: 300-304, 2000.
- 4) Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, *et al.*: Frequency of recurrent miscarriage and its influence on further marital relationship and illness: The Okazaki Cohort Study in Japan. submitted.
- 5) Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ: Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, 345: 1400-1408, 2001.
- 6) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, *et al.*: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 4: 295-306, 2006.
- 7) Ogasawara MS, Aoki K, Katano K, *et al.*: Factor XII but not protein C, protein S, antithrombin III or factor XIII is a predictor of recurrent miscarriage. *Fertil Steril*, 75: 916-919, 2001.
- 8) Ogasawara M, Aoki K, Kajiura S, *et al.*: Are antinuclear antibodies predictive of recurrent miscarriage? *Lancet*, 347: 1183-1184, 1996.
- 9) Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, *et al.*: Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be independent risk factor for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*, 85: 186-192, 2010.
- 10) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Nakanishi T, *et al.*: Occasional antiphospholipid antibody positive patients with recurrent pregnancy loss also merit aspirin therapy: A retrospective cohort-control study. *Am J Reprod Immunol*, 59: 235-241, 2008
- 11) De Braekeleer M, Dao TN: Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reprod*, 5: 519-528, 1990.
- 12) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, *et al.*: Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril*, 81: 367-373, 2004.
- 13) 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*, 53: 622-628, 2008.
- 14) Franssers MTM, Korevaar JC, van der Veen F, *et al.*: Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index (corrected)-control study. *BMJ*, 332: 759-763, 2006.
- 15) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, *et al.*: Midline uterine defect size correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases. *Fertil Steril*, 93:1983-1988, 2010.
- 16) Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, *et al.*: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. *J Hum Genet*, 50: 112-117, 2005.
- 17) Bolor H, Mori T, Nishiyama S, *et al.*: Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet*, 84: 14-20, 2009.
- 18) Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, *et al.*: SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. *Hum Reprod*, 26: 1259-1266, 2011.
- 19) Rey E, Kahn SR, David M, *et al.*: Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*, 361: 901-908, 2003.
- 20) Iinuma Y, Sugiura-Ogasawara M, Makino A, *et al.*: Coagulation factor XIII activity, but not an associated common genetic polymorphism (46C/T), is linked to recurrent miscarriage. *Fertil Steril*, 77: 353-356, 2002.
- 21) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, *et al.*: Live birth rate according to maternal age and previous number of recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 62: 314-319, 2009.
- 22) Kaandorp SP, Goddijn M, van der Post JA, *et al.*: Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage. *N Engl J Med*, 362: 1586-1596, 2010.

Profile

杉浦真弓 (すぎうら まゆみ)

名古屋市立大学大学院 医学研究科 産科婦人科学 教授

1985年 名古屋市立大学医学部卒業。国立浜松病院産婦人科勤務、名古屋市立緑市民病院産婦人科勤務などを経て、2006年1月より現職。生殖医学、とくに習慣流産（不育症）のエビデンスが専門。

北折珠央 (きたおり たまお)

名古屋市立大学大学院 医学研究科 産科婦人科学 助教

2001年 名古屋市立大学医学部卒業、2006年同大学大学院卒業を経て、2007年より現職。医学博士。専門は不育症、周産期。

尾崎康彦 (おざき やすひこ)

名古屋市立大学大学院 医学研究科 産科婦人科学 准教授

1986年 杏林大学医学部 医学科卒業。同年名古屋市立大学 産科婦人科教室入局。名古屋市立城西病院、名古屋市立大学生化学生物学教室、スウェーデン・イエテボリ大学周産期センターを経て2010年より現職。主に不育症を中心に生殖医学とプロテアーゼの関連を研究。またヒト補助生殖技術の稀少動物繁殖計画への応用を試みている。

SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy

Eita Mizutani¹, Nobuhiro Suzumori^{1,*}, Yasuhiko Ozaki¹,
Kumiko Oseto¹, Chisato Yamada-Namikawa², Makoto Nakanishi²,
and Mayumi Sugiura-Ogasawara¹

¹Department of Obstetrics & Gynecology, Nagoya City University Graduate School of Medicine, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan ²Department of Biochemistry II, Nagoya City University Graduate School of Medicine, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

*Correspondence address. Tel: +81-52-853-8241; Fax: +81-52-842-2269; E-mail: og.n.suz@med.nagoya-cu.ac.jp

Submitted on December 4, 2010; resubmitted on January 12, 2011; accepted on January 19, 2011

BACKGROUND: SYCP3 mutations have been shown to generate an aberrant synaptonemal complex in a dominant-negative manner and to contribute to abnormal chromosomal behavior that might lead to recurrent miscarriage. We examined whether SYCP3 mutation is associated with recurrent miscarriage caused by embryonic aneuploidy.

METHODS: The SYCP3 657T>C mutation was examined using PCR and sequencing in 101 patients with a history of three or more unexplained recurrent miscarriages and 82 fertile controls with no history of miscarriage. The embryonic karyotype in the aborted conceptus was analyzed.

RESULTS: The 657T>C mutation of SYCP3 was identified in one patient with a history of six recurrent miscarriages with embryonic euploidy and one fertile woman in the control group. Patients with abnormal and normal chromosome were found to repeat miscarriage with abnormal and normal chromosome, respectively.

CONCLUSIONS: The 657T>C mutation of SYCP3 may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. We found no clinical significance of routine examination of the SYCP3 mutation because only one benign mutation was ascertained in 101 patients.

Key words: SYCP3 / recurrent miscarriage / fetal chromosome / meiosis / polymorphism

Introduction

SYCP3 mutations in women were found to generate an aberrant synaptonemal complex in a dominant-negative manner and to contribute to abnormal chromosomal behavior that might lead to recurrent miscarriage (Bolor *et al.*, 2009). Bolor *et al.* (2009) found SYCP3 mutations in 2 of 26 (7.7%) patients with recurrent miscarriage. SYCP3 is a DNA-binding protein and a structural component of the synaptonemal complex, which mediates the synapsis or homologous pairing of chromosomes during meiosis of the germ cells. Male mice homozygous for the null mutation of the *Sycp3* gene are sterile as a result of massive apoptotic cell death in the testis during meiotic prophase (Yuan *et al.*, 2000). *Sycp3*-deficient female mice are subfertile with a severely reduced oocyte pool. Although two-thirds of mouse offspring are healthy, one-third is affected by aneuploidy and succumbs during development *in utero* (Yuan *et al.*, 2002). This is consistent with the observations that in humans, a mutation in SYCP3 was identified in

two patients with azoospermia (Miyamoto *et al.*, 2003), and that the lack of SYCP3 gene expression in human testis may have a negative effect on spermatogenesis and male fertility (Aarabi *et al.*, 2006).

The identifiable causes of recurrent miscarriage may include abnormal chromosomes in either partner (particularly translocations), anti-phospholipid antibodies (aPL) and uterine anomalies (Farquharson *et al.*, 1984; Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2004, 2010). A currently prevailing hypothesis is that recurrent miscarriage may be a polygenetic disorder associated with both genetic and environmental determinants. Polymorphisms related to thrombophilia, such as Leiden mutation and prothrombin mutation, are known to be associated with recurrent miscarriage, although the mutations are not found in the Asian population (Nelen *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 2003; Rai and Regan, 2006; Suzumori and Sugiura-Ogasawara, 2010). However, whether Factor V Leiden and Factor II prothrombin polymorphisms are risk factors for recurrent miscarriage is controversial (Coulam *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2006).

An abnormal embryonic karyotype causes not only sporadic spontaneous abortion but also recurrent miscarriage because it was found in 51% of recurrent cases (Ogasawara *et al.*, 2000; Carp *et al.*, 2001). Bolor *et al.* (2009) could not prove an association between the *SYCP3* mutations found in 7.7% of patients and embryonic aneuploidy.

Preimplantation genetic screening (PGS) for aneuploidy has been performed widely; however, there is no evidence of its ability to improve delivery rates (Platteau *et al.*, 2005; The ACOG., 2009; Harper *et al.*, 2010). The *SYCP3* mutation might be a candidate for selection of cases for PGS if an association between the mutation and aneuploidy is established. Also, the 7.7% frequency of *SYCP3* mutation is relatively high because the frequency of translocations, aPL and major uterine anomalies is 4.5% (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2004), 10.7% (Balasch *et al.*, 1990) and 3.2% (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2010), respectively. Here we investigate whether *SYCP3* mutations may be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy.

Materials and Methods

Patients

All patients underwent a systematic examination, including hysterosalpingography, chromosome analysis for both partners, determination of aPL, including lupus anticoagulant and β 2glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies (Ogasawara *et al.*, 1996), and blood tests for hyperthyroidism, diabetes mellitus and hyperprolactinemia before subsequent pregnancy in Nagoya City University Hospital between 2007 and 2010. A blood sample was taken at the examination and frozen at -70°C before analysis. Patients with identifiable causes of miscarriage, such as translocations, aPL and uterine anomalies, were excluded. The 81 patients for whom a previous or subsequent embryonic (or fetal) karyotype was ascertained at least one time were studied. A further 20 patients for whom the embryonic karyotype was unknown were added.

In Japan, miscarriage is defined as loss within 22 weeks gestation and stillbirth is defined as loss at 22 or more weeks of gestation. Stillbirths after 22 weeks gestation were included in the present study and shown as prior history in Table 1.

A total of 101 patients with a history of three or more (3–16) unexplained consecutive first-trimester miscarriages were examined. Subsequent pregnancies were followed up until October 2010. The mean age of participants at examination was 34.4 ± 3.8 years, and the average number of previous miscarriages was 3.8 ± 2.7 . Twenty-four patients had a history of live birth and two patients experienced recurrent miscarriage after changing partner, having had a live birth by a previous partner. The mean number of previous live births was 0.27 ± 0.5 .

Gestational age was calculated based on basal body temperature charts. Ultrasonography was performed once a week from 4 to 8 weeks of gestation. Dilution and curettage was carried out when miscarriages were diagnosed, and the karyotypes of aborted conceptuses were determined using a standard G-banding technique.

The 82 fertile women with no history of recurrent miscarriage and complications of pregnancy were examined as controls. The fertile controls were recruited in Nagoya City University Hospital and Asamoto Women's Clinic. The mean age of women in the control group was 32.3 ± 6.2 years, and the average number of deliveries was 1.53 ± 0.6 .

The study was approved by the Research Ethics Committee of Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences. Each patient provided their written consent after full disclosure about the purpose and methods to be employed.

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples with the Midi Blood DNA Extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan). Oligonucleotide primers were designed to amplify each coding sequence, as well as exon–intron boundaries of the human *SYCP3* gene, encompassing exons 7–9 (GenBank accession number NM_153694). The sense and antisense PCR and sequence primers for *SYCP3* were, respectively, 5'-GATGGCGTG TGCCTATAATCCAAG-3' and 5'-CGTCTTTATTTAATTGACAGTGT TAG-3'. Additional direct sequence primers were 5'-GTCAT GTTGCTCAGGCTGGTC-3', 5'-TCTGTGGATTGATAATTATCTACT G-3', 5'-TCCAATGCTCTGAGAACC-3' and 5'-TCACCACAGC AAGTTGTG-3'. The coding exons 7–9 and exon–intron boundaries of human *SYCP3* gene were amplified by PCR and sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a 3100 automated sequencer.

Results

Heterozygous 657T>C mutation in exon 8 of *SYCP3* was ascertained in one of 101 patients who had had six recurrent miscarriage and in one of the 82 fertile controls (Fig. 1). The IVS7-16_19 delACTT previously reported in one patient with recurrent miscarriage or 643delA previously reported in two patients with azoospermia was not found in any patients with recurrent miscarriage or in fertile controls. No other new mutation was found in patients with recurrent miscarriage or controls.

Thirty-two patients experienced miscarriage with a normal embryonic (fetal) chromosome karyotype, and 47 patients presented an abnormal embryonic (fetal) karyotype (Table 1). Two patients had miscarriages with both normal and abnormal karyotype.

Patient No. 77 with the 657T>C mutation was 31 years old and experienced a total of six miscarriages and no live birth. Available fetal karyotypes were shown as 46, XX and 46, XY. The control with the 657T>C mutation had a history of one live birth and no miscarriage.

Nine patients (No. 39–47) had repeated miscarriage with an abnormal karyotype, and seven patients (No. 75–81) had repeated miscarriage with a normal karyotype. Only 2 out of 18 (11.1%) patients had experienced miscarriages with both abnormal and normal embryonic karyotypes.

Discussion

In the present study, we found a heterozygous 657T>C mutation in exon 8 of the *SYCP3* gene in one patient and one fertile control. We could not find the IVS7-16_19 delACTT reported in one patient with recurrent miscarriage or 643delA reported in two patients with azoospermia in any patients with recurrent miscarriage or in fertile controls (Miyamoto *et al.*, 2003; Bolor *et al.*, 2009). No other new mutation was found in patients with recurrent miscarriage or controls.

Bolor *et al.* (2009) reported that 7.7% (2 of 26) patients with unexplained recurrent miscarriage were found to carry independent heterozygous nucleotide alterations, IVS7-16_19delACTT and 657T>C in *SYCP3*, neither of which was present among a control group of 150 fertile women. They also reported that analysis of transcripts from minigenes harboring each of these two mutations revealed that both mutations affected normal splicing, possibly resulting in the

Table I Previous miscarriage, live birth and subsequent pregnancy outcome with karyotype analysis (n = 101 patients).

Pt.	Prior history		Karyotype of previous miscarriage	Age (year)	Subsequent pregnancy		Karyotype	Cumulative live birth	
	No. of P.M.	No of L.V.			Outcome	Karyotype of miscarriage			
1	2	2		37	f		47,XX,+16	A	y
2	3	0	#3 47,XY,+16	34	s	s		A	y
3	4	1		39	f		47,XX,+22	A	y
4	2	1		37	f	s	47,XX,+21	A	y
5	2	0		38	f	s	48,XX,+8,+22	A	y
6	3	0		28	f	s	47,XY,+16	A	y
7	3	0	#3 69,XXY	34	s			A	y
8	4	1	#3 47,XY,-13,+i(13)(p10),+ i(13)(q10)[11]/46,XY, -13,+i(13)(q10)[19]	33	no			A	y
9	4	1	#2 47,XY,+18 stillbirth 32w	32	s			A	y
10	2	0		31	f	s	47,XX,+22	A	y
11	3	0	#3 45,X	42	s			A	y
12	4	1	#4 48,XY,+10,+13[12]/ 47,XY,+13[8]	35	no			A	y
13	3	0	#3 47,XX,+12	40	s			A	y
14	4	0	#4 46,XY,5cenh+,add(8)(p23) [7]/46,XY,5cenh+[13]	32	s			A	y
15	4	1	#3 47,XY,+7	38	s			A	y
16	4	1	#4 47,XY,+3	34	no			A	y
17	3	1	#3 47,XY,+16	36	s			A	y
18	4	0	46,XX,del(6)(q27)[12]/ 46,XX,add(6)(q27)[3]/ 46,XX,add(6)(q27)[2]/ 46,XX,der(6)t(1;6)(q11;q27)[2]/ 46,XX,der(6)t(6;9)(q27;q12)[1]	37	s			A	y
19	2	0		33	f	s	48,XX,+15,+20	A	y
20	3	0	#3 45,XY,-21	30	f	s	ND*	A	y
21	3	1	#3 45,X	32	no			A	y
22	2	0	#2 47,XX,+22	32	f	s		A	y
23	3	1		40	f	s	48,XX,+14,+15	A	y
24	3	0	#3 47,XY,+16	31	s			A	y

Continued

Table I Continued

Pt.	Prior history			Age (year)	Subsequent pregnancy		Karyotype	Cumulative live birth
	No. of P.M.	No of L.V.	Karyotype of previous miscarriage		Outcome	Karyotype of miscarriage		
25	4	0	#3 47,+22	39	s		A	y
26	2	0		37	f	47,XY,?	A	n
27	3	0		34	f	47,XY,+16	A	n
28	2	0		39	f	47,XX,+16	A	n
29	2	0		32	f	47,XY,+16	A	n
30	5	0	#5 46,X,+16	27	f	Bio Misc	A	n
31	3	0		28	f	47,XX,+13	A	n
32	5	0		46	f	47,XX,+22	A	n
33	3	0	#3 47,XX,add(2)(q37),+20	42	no		a	n
34	4	0	#1 stillbirth 16w; #4 47,XY,+15	39	no		a	n
35	3	0		41	f	47,XX,+16	a	n
36	4	0		43	f	48,XY,+16,+21	a	n
37	4	0		38	f	46,X,+3	a	n
38	6	0	#1 stillbirth 33w; #4 45,X	37	no		a	n
39	7	0	#5 47,XX,+16; #7 45,X	30	s		aa	y
40	6	0	#6 47,XY,+16	32	f s	47,XX,+13	aa	y
41	2	1	47,XY,+21 ^{***}	30	f	47,XX,+5	aa	y
42	3	0	#3 47,XX,+16	29	f s	47,XX,+3	aa	y
43	6	1	#6 47,XX,+16	41	f	47,XX,+12	aa	y
44	2	0	#2 46,XY,add(8)(p23)	33	f	47,XY,+16	aa	n
45	4	0	#2 45,X; #4 47,XX,+idic(8)(q?21.2)	35	no		aa	n
46	2	0		30	f f	47,XX,+15;45,X	aa	n
47	2	0	#2 47,XX,+15	35	f	45,X	aa	n
48	14	2	#12 47,XX,+16 #14 46,XY, 2 children with previous husband	45	no		an	y
49	4	1	#3 47,XY,+16;#4 46,XX	30	f	46,XY	ann	y
50	4	0	#4 46,XY	35	s s		n	y
51	4	0	#1 Stillbirth 28w; #4 46,XX	28	s	On-going preg.EDC06/27/11	n	y
52	4	0	#3 Stillbirth 18w	35	f s	46,XY stillbirth 33w	n	y
53	3	0	#3 46,XY	33	s		n	y
54	5	1	#5 46,XY	36	s		n	y
55	4	1	#3 46,XY	36	no		n	y

56	3	0	#3 46,XX	30	s			n	y	
57	3	0	#3 46,XX	32	s			n	y	
58	2	0		34	f	s	46,XX	n	y	
59	3	1	#3 46,XX	35	no			n	y	
60	3	1	#3 46,XX	33	s			n	y	
61	4	0	#4 stillbirth 15w	37	f	s	46,XX stillbirth 13w	n	y	
62	3	0	#3 46,XX	33	s			n	y	
63	3	1	#3 46,XY	37	s			n	y	
64	3	0		26	f		46,XX	n	n	
65	3	0		34	f		Normal Karyotype	n	n	
66	5	0	46,XY	40	no			n	n	
67	2	0		32	f		46,XX	n	n	
68	3	0	#3 46,XY	35	f		NT**	n	n	
69	2	0		39	f		46,XX	n	n	
70	3	0	#3 46,XX	28	no			n	n	
71	2	0		36	f		46,XX	n	n	
72	2	0		30	f		46,XY	n	n	
73	3	0	#3 46,XX	34	no			n	n	
74	2	0		31	f		46,XY	n	n	
75	3	0	#2 46,XX; #3 46,XY	31	s			nn	y	
76	2	0	#2 46,XY	22	f	s	46,XY; On-going preg.EDC 05/27/11	nn	y	
77	5	0	#5 46,XY	31	f		46,XY	nn	n	
78	5	0	#3 46,XX; #4 46,XY; #5 46,XY	36	f	f	s	46,XX,t(11;19)(q21;q13.1)[4]/46,XX[26], Bio Misc	nnnn	y
79	6	0	#3#,4#,6 46,XX,inv(9); #5 46,XY,inv(9)	31	s			On-going preg.EDC 02/23/11	nnnn	y
80	9	0	#5 46,XX;#6 46,XX;#8 46,XY	38	f			46,XX	nnnn	n
81	13	0	#4 46,XY; 46,XX; 46,XX; 46,XX	33	f	f	f	46,XX; 46,XX; 46,XX	Nnnnnnn	n
82	3	0		31	s					y
83	3	0		39	s					y
84	3	0		26	s					y
85	3	0		38	s					y
86	23	0		33	s					y
87	3	1		35	f			Bio Misc		y
88	3	0		28	s					y
89	3	0	#2 stillbirth 15w	30	s					y
90	3	1		35	no					y

Continued

Table I *Continued*

Pt.	Prior history		Karyotype of previous miscarriage	Age (year)	Subsequent pregnancy		Karyotype	Cumulative live birth
	No. of P.M.	No of L.V.			Outcome	Karyotype of miscarriage		
91	3	2	2 children with previous husband	34	s		y	
92	3	1		38	s	On-going preg.EDC03/24/11	y	
93	3	0		36	s		y	
94	5	0		34	f	ND*	n	
95	2	0		28	f	Bio Misc	n	
96	4	0		41	no		n	
97	4	0		42	no		n	
98	3	0		33	no		n	
99	4	0		31	no		n	
100	3	0	#1 stillbirth 18w; #3 stillbirth 23w	32	no		n	
101	4	0		37	f	Bio Misc	n	
	3.782178	0.267327		34.347				
	2.681805	0.507762		4.4033				

*ND, not detected; **NT, not tested; ***Live birth, He is 8 years old; Pt., patient; P.M., previous miscarriage; L.V., Live Birth; Bio Misc, biochemical miscarriage, decreasing hCGs < 1500 mIU/ml; age, age at examination karyotype; a, aneuploidy; n, normal karyotype (euploidy) from Pt. 1-81, karyotype were known in prior history or subsequent pregnancy; 'Outcome' reflect the conclusion of subsequent pregnancy; 's' means success in live birth delivery; 'f' means failure, miscarriage.