

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

反復あるいは習慣流産の原因として、原発性あるいは続発性流産にかかわらず、抗リン脂質抗体(aPL)陽性の頻度が約 70%であり、最も多かった。aPL 陽性症例に対する抗凝固療法は、全体として 90%を超える症例で妊娠維持に成功した。aPL の種類、抗体価の多寡、あるいはアイソタイプ別の治療成績は、各層別間での差はなく同等に良好であった。しかし、aPL の陽性判定基準の再検討が必要である。同種免疫異常に対する夫リンパ球用いた免疫療法は 70%を超える成功率であったが、同種免疫異常と診断する検査方法・基準をさらに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、特に血液凝固因子あるいは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、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、RSA における血液凝固異常、あるいは自己免疫ならびに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. 研究対象と方法

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、以下に示す検査・治療を施行した。

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. 検査項目

1) スクリーニング検査:子宮形態・染色体・内分泌・凝固因子などの一般的検査に加え、以下の検査を行った。抗 DNA 抗体、抗核抗体、抗 cardiolipin-IgG および IgM 抗体(aCL-IgG, -IgM), 抗 cardiolipin β 2-GP1 抗体(β

2-GP1), 抗 phosphatidylserine-IgG, -IgM 抗体(aPS-IgG, -IgM), 抗 phosphatidylethanolamine-IgG, -IgM 抗体(aPE-IgG, -IgM), lupus anticoagulant(LA), protein-C および-S 活性(抗原量), および血液凝固第 XII 因子。なお、aPL 抗体価の判定基準は、実測値 95～99 パーセントイルを弱陽性、99 パーセントイル以上を強陽性とした。

2) 特殊検査:上記スクリーニング検査で異常を認めない場合、以下の検査を行った。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。

2. 治療方法の選択基準

1) 抗凝固療法:一般的検査では異常を認めない症例について、自己抗体ならびに aPL の検査結果により、原則的に以下の基準にしたがって治療した:(A) β 2-GP1 を除いた一つの項目のみ陽性を示す症例で、かつ LA 弱陽性、aCL-IgM あるいは aPS-IgM のみ陽性の症例に対しては、アスピリンを単独投与した。(B) LA 強陽性、 β 2-GP1 陽性、aCL-IgG 陽性、aPS-IgG 陽性、aPE-IgG あるいは IgM 陽性、あるいは二つ以上の項目が陽性の症例に対しては、アスピリン+柴苓湯+ヘパリンの併用を行った。なお、アスピリン(100mg/日)は妊娠前から服用し、妊娠 32 週まで投与した。柴苓湯(9g/日)は

妊娠前から服用し、妊娠成立後に中止した。ヘパリン(5,000 単位 x2 回/日)は胎嚢確認後から妊娠 37 週まで投与した。

- 2) 夫リンパ球免疫療法:スクリーニング検査で異常を認めない症例について、同種免疫関連の特殊検査結果により、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に対して夫(パートナー)リンパ球を用いた免疫療法(LIT)を行った。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. 対象症例の内訳

- 1) スクリーニング検査の異常出現頻度:2004 年 1 月から 2010 年 8 月までに初診受診した 776 症例(原発性 570 例:続発性 206 例、反復流産 371 例:習慣流産 405 例)を対象とし、以下の 9 項目について検討した。子宮形態、染色体、内分泌、ANA、aDNA、aPLs、proein-C、protein-S、血液凝固第 XII 因子。
- 2) aPL 出現頻度と抗凝固療法の治療成績:2005 年 11 月から 2010 年 8 月までの間の aPL 陽性 457 症例を対象に、(1)aPL の出現頻度を、抗体種別、isotype 別および抗体価別に検討した。(2)抗凝固療法による妊娠帰結を、それらの検査結果と併せて比較検討した。
- 3) LIT の治療成績:2002 年 1 月から 2010 年 8 月まで間に LIT を施行した 121 症例を対象に、(1)LIT による妊娠帰結と同種免疫関連の検査結果を併せて比較検討した。(2)LIT 後の症例について、aPL、ANA、aDNA の陽転化率を検討した。

C. 研究結果

1. スクリーニング検査の異常出現頻度

何らかの aPL が陽性であった症例は、原発性 70.5%、続発性 66.9%であり、スクリーニング検査の中で異常頻度が最も多かった。次いで、内分泌異常(原発性 10.1%:続発性 10.4%、以下同様)、染色体異常(5.5%:1.7%)、血液凝固第 XII 因子(12.1%:11.5%)、子宮形態異常(1.5%:0%)であった。流産回数別(2 回、3 回以上)にみると、aPLs 陽性頻度はその回数の多寡にかかわらず約 70%と変わらなかったが、染色体異常の頻度は、原発性の場合、流産回数が増

えるにつれて増加した(各々、2.9%、8.4%)。

2. aPL 出現頻度

1)抗体種別の出現頻度:8 種類の aPLs の中で最も出現頻度が高かったのは、全体(原発性+続発性)としてみると aPS-IgM (55.7%)、次いで aCL-IgM (54.2%)、LA(35.9%)と続き、最も低いのは β 2-GP1 (0.3%)であった。この傾向は原発性と続発性に分けてみても変わりはなく、またこの両者間の aPL 出現頻度に有意差は認められなかった。

2)抗体価別の出現頻度:全体としてみると、いずれの aPL においても弱陽性の頻度が強陽性の頻度を大きく上回り、aPS-IgM では各々 38.9%:16.8%、aCL-IgM (38.2%:16.0%)、LA (34.4%:1.5%)であった。この傾向は原発性と続発性とに分けてみても変わりなかった。

3. 抗凝固療法の治療成績

抗凝固療法を行った aPL 陽性 457 例中 310 例が妊娠した。その中、妊娠維持に成功したのは 252 例(81.3%)、また流産に終わった症例が 58 例(18.7%)であった。流産 58 例中、絨毛の染色体異常を認めた症例あるいは染色体検査を施行できなかったものが 50 症例であった。したがって、治療成績の検討は、妊娠維持例 252 例と流産絨毛の染色体が正常であった 8 例の計 260 症例を対象とした。

1)抗体種別の治療成績:いずれの aPL 陽性例においても妊娠維持率は高く、最も低いものでも aPE-IgM の 94.0%であり、他の aPL のそれは 95%を超えていた。aPL の種類による妊娠維持率に有意差は認めなかった。

2)抗体価別の治療成績:いずれの aPL においても、弱陽性あるいは強陽性にかかわらず妊娠維持率は高く、最も低いものでも aCL-IgG 強陽性の 80.0%であった。

いずれの aPL においても、抗体価の多寡による妊娠維持率に有意差は認めなかった。

3)isotype 別の治療成績:IgG 陽性例と IgM 陽性例の妊娠維持率は各々 91.2%:90.0%であり、両者の間に有意な妊娠維持率の差は認めなかった。

4)aPL 陽性数別の治療成績:aPL の単独陽性例と複数陽性例の妊娠維持率は各々 91.2%:91.5%であり、両者の間に有意な妊娠維持率の差は認めなかった。

5)治療法別の治療成績:アスピリン単独療法(LDA)とアスピリン+ヘパリン(+柴苓湯)併用療法(LDA+Hep)を、isotype 別あるいは陽性抗体数別に比較した。いずれにおいても高い妊娠維持率であ

り、最も低いものでも LDA 群の IgG 陽性例の 80.0% であった。それら aPL-profile と両治療法による妊娠維持率との間に有意な関連性は認めなかった。

4. 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。LIT 前後での同種免疫関連の特殊検査結果(MLR-BE の有無、抗 HLA 抗体陽転の有無、NK 細胞活性の変動、あるいは Th1/Th2 比の変動)と妊娠維持率との間に有意な関連性は認めなかった。また、LIT 後の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。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

近年、自己免疫異常と関連する aPL の存在、あるいは血液凝固因子の異常などによる血栓性素因が流産原因として注目され、それらに対する抗凝固療法の有効性が報告されてきた。しかし、aPL の種類、抗体価、あるいはアイソタイプの種類などと抗凝固療法の種類、あるいは治療成績との関連は未だ十分に検討されておらず不明な点が少なくない。

今回検討した症例では、陽性 aPL の数あるいはアイソタイプにより LDA 療法と LDA+Hep 療法を使い分けることによって、いずれも高い妊娠維持率を得た。したがって、aPL の IgM 単独陽性例では LDA 療法だけでも有効であり、aPL-profile によっては LDA+Hep 療法は必ずしも必要ないかもしれない。今後、aPL 抗体価なども加味したさらに詳細な aPL-profile と治療法別の関連を解析する予定である。また、aPL の陽性判定基準を再検討する必要があるかもしれない。

また、母児間の同種免疫応答異常に起因する流産の存在も知られているが、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。

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。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

3 年間の総合分担研究報告として、現在までに蒐集した RSA 症例について、その原因の頻度および治療成績を中心にまとめた。aPL 陽性例では抗凝固療法により約 90%の高い妊娠維持率が得られ、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。

抗凝固療法あるいは免疫療法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

- 1) Okamoto S, Tanaka T, et al. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol Rep* 21:1209~1214, 2009.
- 2) Omi H, Kawaguchi R, Tanaka T, et al. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Med* 23:229~236, 2009.
- 3) Kawaguchi R, Tanaka T, et al. Priming of peripheral monocytes with prolactin sensitizes IFN-gamma-mediated indolamine 2,3-dioxygenase expression without affecting IFN-gamma signaling. *J Reprod Immunol* 77: 117-125, 2008.
- 4) Itoh H, Tanaka T, et al. A case-control study of the association between urinary cadmium concentration and endometriosis in infertile Japanese women. *Science of the Total Environment* 2008;402:171~175.
- 5) Ueda K, Tanaka T, et al. Association of extracellular matrix metalloprotease inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3. *Oncol Rep* 17;731-735, 2007.
- 6) Takao M, Tanaka T, et al. Increased synthesis of indolamine-2,3,-dioxygenase protein is

positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 17; 1333-1339, 2007.

2. 学会発表

- 1) 高橋絵里, 川口里恵, 田中忠夫, 他. 不妊症と不育症, その移行症例の臨床的解析. 第61回 日本産科婦人科学会学術講演会 2009.04 (京都).
- 2) Takahashi E, Kawaguchi R, Tanaka T, et al. Clinical analyses for transitional cases of infertility and recurrent pregnancy loss. 15th Conference of International Federation of Placental Association 2009.10 (Adelaide, Australia).
- 3) Umehara N, Kawaguchi R, Tanaka T, et al. Therapeutic outcome in recurrent spontaneous abortions with antiphospholipid antibodies ~ The influence of titers, varieties, isotypes, positive numbers of antiphospholipid antibodies ~. 15th Conference of International Federation of Placental Association 2009.10 (Adelaide, Australia).
- 4) 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

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
Ueda K, <u>Tanaka T</u> , et al.	Association of extracellular matrix metalloprotease inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3.	Oncol Rep	17	731-735	2007
Takao M, <u>Tanaka T</u> , et al.	Increased synthesis of indolamine-2,3,-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer.	Oncol Rep	17	1333-1339	2007
<u>Kawaguchi R</u> , <u>Tanaka T</u> , et al.	Priming of peripheral monocytes with prolactin sensitizes IFN-gamma-mediated indolamine 2,3-dioxygenase expression without affecting IFN-gamma signaling.	J Reprod Immunol	77	117-125	2008
Itoh H, <u>Tanaka T</u> , et al.	A case-control study of the association between urinary cadmium concentration and endometriosis in infertile Japanese women.	Science of the Total Environment	402	171~175	2008
Okamoto S, <u>Tanaka T</u> , et al.	Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts.	Oncol Rep	21	1209~1214	2009
Omi H, <u>Kawaguchi R</u> , <u>Tanaka T</u> , et al.	Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation.	Int J Mol Med	23	229~236	2009