

分担課題: 不育症のリスク因子抽出と各病態の治療成績(免疫グロブリン治療を中心に) 自然流産に対する遺伝学的解析

研究分担者: 小澤伸晃 国立成育医療研究センター周産期診療部医長

研究要旨

国立成育医療研究センター周産期診療部不育診療科を受診された不育症患者を対象とし、不育症のリスク因子と各病態の治療成績に関する調査を行った。その中で治療としては、免疫グロブリン治療に注目したが、難治性不育症患者ならびに抗凝固療法で奏功しない抗リン脂質抗体症候群患者に対して良好な成績が得られた。また流産染色体分析として、通常の染色体分析に加えてアレイ CGH 法による解析を行っており、FISH 法や STR 法による解析を併用することにより、不育症診療における新たな流産染色体分析法としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

本研究班では多施設共同研究により、不育症に関連すると考えられる遺伝的要因、免疫学的要因、血液凝固学的要因、子宮形態的要因等について統計学的に分析し、各要因別の治療法の有効性を前方視的研究で解析した。そのなかで当施設では、不育症に対する新たな治療法として大量ヒト免疫グロブリン治療に注目しており、難治性不育症患者ならびに抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者における本治療の有用性を検討した。

また、自然流産検体に対する染色体分析法として、アレイ CGH 法など DNA を用いた解析法に当施設は注目してきた。アレイ CGH 法など先端的遺伝学的解析法は従来の G-banding 法の問題点を解決できる可能性があり、内外で生殖・周産期領域に応用されているが、現状ではいずれも明確な有効性に関しては不明であり、今後の診療へ応用できるレベルには達していない。そこで本研究では、流産検体に対して先端的遺伝学的手法を用いた解析を行い、将来の臨床応用が可能かどうか検討することを目的とした。

B. 研究方法

国立成育医療センター周産期診療部不育診療科を受診された不育症患者を対象とし、不育症一般検査を行い、治療方針を決定し妊娠管理を行った。治療を行うも流産に至った場合は、流産絨毛染色体検査を行い、胎児側要因による流産であるかどうかの鑑別を行った。臨床経過、検査結果、治療方法、治

療結果などの診療情報を記載したシートを作成し、データを解析した。

【不育症に対する免疫グロブリン治療】

各種治療に抵抗する難治性不育症患者ならびに抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者を対象に、大量ヒト免疫グロブリン治療(妊娠初期に 20g 点滴静注x5 日間 1クール)を行った。

【流産染色体分析における先端的遺伝学的診断技術の応用】

一部の流産検体に対して、各種遺伝学的手法により染色体分析を行った。

(1)G-banding 法

(2)アレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization) 法

東京医科歯科大学難治疾患研究所で開発された MCG Genome-Disorder Array(既知の疾患座位ならびに各染色体のサブテロメア領域を 550-660 個の BAC クローンでカバーしたアレイ)を使用した。

(3) STR 解析

(4) FISH 解析

(倫理面への配慮)

臨床データの集約の際は、「診療情報に対する二次利用の同意書」に基づいて解析を行った。アレイ CGH 法など先端的遺伝学的診断技術を用いた解析に関しては、施設倫理委員会承認の下にインフォームドコンセントが得られた症例のみを対象とした。

C. 研究結果

2008年4月から2010年10月までに不育症カップル計194組が登録された。登録患者の平均年齢は35.3歳、平均BMIは20.5、平均既往流産回数(10週未満)は2.39回であった。本研究班では多施設共同研究として、本邦不育症患者におけるリスク因子の抽出と治療効果の判定を行っており、集積されたデータの解析結果は今後の不育診療体系を確立に貢献すると考えられる(詳細な結果に関しては別項参照)。

【難治性不育症ならびに抗リン脂質抗体症候群に対する免疫グロブリン治療の試み】

これまで難治性不育症患者に対しては、3名(各々の既往初期流産回数は7回、10回、8回)に免疫グロブリン治療が行われたが、1名は流産に至り(絨毛染色体正常)、1名は出産に至り、1名は現在妊娠継続中である。

また過去に抗凝固療法を行うも子宮内胎児死亡や重症妊娠高血圧症候群や血栓症などを呈した、抗リン脂質抗体症候群患者5名に対して、抗凝固療法に加えて免疫グロブリン治療を行った。いずれも最終的に生児獲得には成功したが、妊娠中期に早期破水となった症例や再度妊娠中期に重症妊娠高血圧症候群を発症し娩出を余儀なくされた症例が1例ずつ認められた。

【流産染色体分析における先端的遺伝学的診断技術の応用】

G-banding法はこれまでに、計168例の自然流産に対して行われたが、21例(12.5%)は培養不良のため結果が得られなかった。したがって147例の分析結果となったが、染色体異常は113例に観察され、常染色体トリソミー、Xモノソミー、倍数体、不均衡型構造異常の順に高頻度に検出された。

自然流産検体に対するGDアレイによる解析は、これまでに計108例に行い、すべて解析は可能で、そのうち74例(68.5%)に異常が検出された。異常を認めた74例の内訳は、ゲノムコピー数の過剰がありトリソミーが疑われた症例が59例、ゲノムコピー数の欠失がありモノソミーが疑われた症例が12例、両者ともに認め不均衡型転座が疑われた症例が1例であった。

また、GDアレイ正常でXXを呈した症例19例に対してSTR解析を行ったが、2例で3倍体、7例で母体DNAの混入が確認された。一方、GDアレイ正常例で行ったFISH解析の結果では、17例中7例で3倍体あるいは4倍体の可能性が考えられた。そのため

最終的な染色体異常率は80.2%となった。

D. 考察

難治性習慣流産患者や抗凝固療法抵抗性の抗リン脂質抗体症候群患者に対する免疫グロブリン療法に関して散発的に内外で報告が続いているが、その有益性について現在のところ立証はされていない。本研究では難治性習慣流産患者3名中2名、抗凝固療法抵抗性の抗リン脂質抗体症候群患者5名全員で生児獲得に成功したが、免疫グロブリン療法を行っても奏功しない症例も存在することより、今後更なる検討が必要である。

流産や胎児異常の多くは遺伝学的異常に起因しており、そのなかで最も高頻度なものが染色体異常である。現在染色体異常の検索としては、細胞培養後のG-banding法による染色体分析が主流となっているが、G-banding法による解析では培養操作を必要とし煩雑であると同時に、解像度の上で限界があり、系統的に効率よく遺伝学的検索が行われているとは言い難い。今回導入したアレイCGH法による解析では、検査に必要な量のDNAが抽出さえできれば検索が可能であり、培養による影響は受けず、自然排出検体からの診断も可能である。また、母体組織(DNA)混入の鑑別や倍数体などの同定には、今回行ったSTR法やFISH法を併用した解析手法が有用であった。

E. 結論

今回不育症に対する新たな治療法として大量ヒト免疫グロブリン治療に注目したが、種々の治療が奏功しない原因不明不育症患者や、抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者に対して、その有用性が示唆された。

また、流産が母体要因であるか胎児要因であるかを判定することは不育診療上きわめて重要であるが、アレイCGH分析など先端的遺伝学的診断技術を用いた染色体異常の解析手法は従来のG分染法の問題点を解決できる可能性があり、不育診療においては有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozawa N, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Arase T, Ishimoto H, Yoshimura Y. Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss. *Fertil Steril* 90(4):1301-4, 2008
- 2) 小澤伸晃:【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】不育症の管理(解説/特集). *産科と婦人科*. 76(6), 703-708. 2009.
- 3) 小澤伸晃, 他: 高齢妊娠と流産リスク. *産婦の実際* 59(2):167-172, 2010.
- 4) 小澤伸晃, 他: 産婦人科領域におけるアレイCGH 3.産科領域のCGH解析. *産婦の実際* 59(2):237-243, 2010.
- 5) 小澤伸晃, 他: 流産胎児の遺伝学的解析. *産婦の実際* 59(12):2009-2014, 2010.

2. 学会発表

- 1) Ozawa N, et al: Cytogenetic analyses of spontaneous abortions by array comparative genomic hybridization (24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. 2008.7).
- 2) 小澤伸晃, 他: アレイ CGH 法を用いた流産原因の遺伝学的解析(第 53 回 日本人類遺伝学会 2008.9).
- 3) 小澤伸晃, 他: 夫婦染色体異常と胎児染色体異常(第 45 回日本周産期・新生児医学会 2009.7).
- 4) Ozawa N, et al: Cytogenetic investigation of miscarriage by DNA-based analysis combined with FISH analysis(25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. 2009.7).
- 5) 小澤伸晃, 他: アレイ CGH による分析(第 54 回日本人類遺伝学会 2009.9).
- 6) 小澤伸晃, 他: アレイ CGH 法を用いた流産原因の遺伝学的解析と不育症診療への応用(第 50 回日本先天異常学会 2010.7).
- 7) 小澤伸晃, 他: 流産症例における原因検索と次回妊娠予後(第 46 回日本周産期・新生児医学会 2010.7).
- 8) Ozawa N, et al: The potential use of

array-based comparative genomic hybridization for cytogenetic analysis of spontaneously expelled miscarriages (IFFS 20th World Congress on Fertility and Sterility 2010.9).

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
Ozawa N, et al	Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss.	Fertil Steril	90(4)	1301-4	2008
小澤伸晃	【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】 不育症の管理(解説/特集)	産科と婦人科	76(6)	703-709	2009
小澤伸晃、他	高齢妊娠と流産リスク	産婦の実際	59(2)	167-172	2010
小澤伸晃、他	産婦人科領域におけるアレイCGH 3.産科領域のCGH解析	産婦の実際	59(2)	237-243	2010
小澤伸晃、他	流産胎児の遺伝学的解析	産婦の実際	59(12)	2009-2014	2010