

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

分担課題：不育症患者の血小板機能の検討 -レーザー散乱粒子計測法を用いた検討-

研究分担者 杉 俊隆 東海大学医学部産婦人科非常勤教授

研究要旨

抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体や第 XII 因子欠乏症など thrombophilia は不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。今回我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。レーザー散乱粒子計測法による血小板凝集能検査は、不育症の risk factor の病原性解明に有用であるのみならず、不育症のスクリーニング検査として有用であると思われた。

A. 研究目的

不育症の原因はいまだ不明の事が多く、これまでのところ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。我々は、新たな不育症の risk factor として抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体と抗第 XII 因子抗体を既に報告してきたが、これらの自己抗体が不育症の原因であるのかを証明するために、疫学的研究と平行して基礎的研究を施行した。不育症患者の中で、抗 PE 抗体陽性者の約 1/3 に第 XII 因子活性低下があり、その多くは抗第 XII 因子抗体を持つ事を我々は既に報告した。抗 PE 抗体陽性者の中でも、第 XII 因子活性低下をもつ症例がもっとも流産率が高いと考えられ、抗 PE 抗体と抗第 XII 因子抗体の関係を追求する事が不育症の病原性解明に重要と思われる。抗 PE 抗体や第 XII 因子欠乏症など thrombophilia は不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。我々は、抗 PE 抗体が *in vitro* で血小板凝集能を亢進させることは既に報告したが (Thromb Res, 84, 97, 1996)、従来の aggregometer では感度が悪く、*in vivo* の変化を捉える事が困難であった。

B. 研究方法

今回我々は、インフォームドコンセントのもとでレーザー散乱粒子計測法 (PA-20, KOWA)

を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。レーザー散乱粒子計測法は、フローサイトメーターに応用されている方法であり、従来の aggregometer の 100 倍感度が良いとされている。攪拌のみで生じる血小板の自然凝集を従来の aggregometer で検出することはまれであるが、本方法により多くの不育症患者に自然凝集が見い出された。

本臨床疫学研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づく倫理的原則を遵守して実施した。疫学研究に関する倫理指針の第 3 インフォームド・コンセント等によれば、本研究は既存資料のみを用いる観察研究に相当するため、口頭のみ同意とした。また、研究を実施していること・内容・方法などに関する情報を広報し (ポスターの公示)、また、研究に参加したくない場合に拒否できる機会を設けた。

C. 研究結果

我々は 94 人の不育症患者に対してレーザー散乱粒子計測法を施行し、thrombophilia との関係を検討した。94 人中、自然凝集を認めたのは 38 人 (40.4%) であった。一方、正常対照群では 30 人中 2 人 (6.7%) に自然凝集を認めた。さらに、自然凝集を中等度以上に認めた 14 人について検討すると、抗 PE 抗体陽性は 42.9%、第 XII 因子欠乏は 50.0% に認められ、自然凝集の無い群 (それぞれ、28.8%、20.0%) に比較して高率であった。一方で、プロテイン S 欠乏、抗カルジオリピン抗体陽性の頻度と自然凝集

の有無との間には関連を認めなかった。

#### D. 考察

我々はすでに、不育症患者のもつ抗第 XII 因子抗体の 76.5%が第 XII 因子の heavy chain の N 末端のアミノ酸 1-30 を認識する事を報告した。この部位は、第 XII 因子の血小板 glycoprotein Ib $\alpha$  への結合部位である。高分子キニノーゲンと第 XII 因子は、どちらも glycoprotein Ib $\alpha$  の細胞外サブユニットである glycalicin に競合的に結合し、トロンビンによる血小板活性化を阻害する事が報告されている。したがって、抗第 XII 因子抗体は、第 XII 因子が血小板の GP Ib-IX-V に結合する事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。ちなみに、高分子キニノーゲンの血小板への結合部位は、キニノーゲン、ドメイン 3 の Cys333-Lys345 (CNA13) であり、抗 PE 抗体の認識部位と同一である事が分かっている。第 XII 因子欠乏不育症患者の 32.4%に抗 PE 抗体が陽性であり、抗第 XII 因子抗体と抗 PE 抗体は、非常に類似した抗体である事が、合成ペプチドを用いた検討で分かっている。まとめると、不育症患者の持つ第 XII 因子とキニノーゲンに対する自己抗体は、第 XII 因子とキニノーゲンが血小板の GP Ib-IX-V に結合してトロンビンによる血小板活性化を防ぐ事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。今回、我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を調べたところ、抗 PE 抗体陽性+第 XII 因子欠乏の患者で亢進がみられ、これらの患者で *in vivo* でも血小板が活性化している事が示唆された。

#### E. 結論

不育症患者の血小板凝集能は *in vivo* でも亢進している傾向が示唆された。中でも、抗 PE 抗体および第 XII 因子欠乏と、血小板凝集能亢進との間に関連が認められ、我々の *in vitro* では抗 PE 抗体は血小板凝集能を亢進させるというデータを裏付ける結果が得られた。一方で抗カルジオリピン抗体やプロテイン S 欠乏症は、血小板を介さない病原性がある事が示唆された。レーザー散乱粒子計測法による血小板凝集能検査は、不育症の risk factor の病原性解

明に有用であるのみならず、不育症のスクリーニング検査として有用であると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sugi T. Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses. *Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol*; 18: 67-76, 2009.
- 2) 杉 俊隆。不育症と自己免疫性 thrombophilia (抗リン脂質抗体、抗第 XII 因子抗体、抗キニノーゲン抗体)。血栓止血誌; 20: 510-518, 2009.
- 3) 杉 俊隆。抗 phosphatidylethanolamine 抗体と抗第 XII 因子抗体。医学のあゆみ。(in press)
- 4) 杉 俊隆。習慣流産と血液凝固阻害薬。産科と婦人科。(in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 杉 俊隆。抗体検査、ヘパリン療法。第 117 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会。都市センターホテル。2009。(シンポジウム)
- 2) 杉 俊隆。不育症患者の血小板凝集能の検討—レーザー散乱粒子計測法を用いた検討—。第 24 回日本生殖免疫学会。京王プラザホテル。2009。

#### 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
<u>Sugi T</u>	Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses.	Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol	18	67-76	2009
<u>杉 俊隆</u>	不育症と自己免疫性 thrombophilia (抗リン脂質抗体、抗第XII因子抗体、抗キニノーゲン抗体)	血栓止血誌	20	510-518	2009
<u>杉 俊隆</u>	抗 phosphatidylethanolamine抗体と抗第XII因子抗体	医学のあゆみ		in press	
<u>杉 俊隆</u>	習慣流産と血液凝固阻害薬	産科と婦人科		in press	