

分担課題: 不育症患者に対する免疫グロブリン治療 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、前年度に引き続き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。その中で今年度は不育症に対する新たな治療法として免疫グロブリン治療に注目した。これまでに 8 症例に対して本治療が行われたが、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ている。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

全妊娠の約 15%に発生する流産を繰り返す場合は不育症と呼称され、全女性の約 2~5%は不育症患者であると推定されている。昨年度に引き続き本年度も、多施設共同研究により、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前方視的研究で解析しているが、本年度は、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、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。

また自然流産に対する遺伝学的解析においては、昨年度から引き続いてアレイ CGH 法による解析症例を蓄積し、FISH 法や STR 法など先端的遺伝学的診断技術を組み合わせた解析手法の有用性に関して検討した。

B. 研究方法

【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】

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

CGH マイクロアレイとしては、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)を用いた。

(2) STR 解析

倍数体や絨毛検体への母体由来 DNA の混入の有無を検索するために、検体と母体由来の DNA に対して STR(short tandem repeat)解析を行った。

(3) FISH 解析

凍結された保存検体に対して、13、18、21、X/Y 染色体に対するプローブを用いて FISH 法を行い倍数体の有無を検索した。

(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2次利用の同意書」に基づいて解析を行った。アレイ CGH 法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を対象とした。

C. 研究結果

1) 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。また継続的に抗体価を測定した症例では、妊娠週数に伴い抗体価が低下する傾向を示した。

2) 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

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。検体には通常の流産手術時に得られた検体だけでなく、進行流産となった検体も含まれた。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、E. 結論

本研究班では、多施設共同研究により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いる。当センターからは本年度計113組の不育症カップルが登録された。集積されたデータの解析結果は今後の不育診療体系の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)。

今回当施設では、不育症に対する新たな治療法として可能性のある大量ヒト免疫グロブリン治療に注目した。種々の治療が奏功しない原因不明不育症患者や、標準的治療として確立した抗凝固療法(ヘ

パリン+アスピリン製剤)に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者に対して、大量ヒト免疫グロブリン治療を行い、その有用性を検討した。症例数は少ないものの、結果的にほとんどの症例で生児獲得に成功した。

習慣流産に対する免疫グロブリン療法の作用期序としては、マクロファージのFcレセプターのブロック、補体介在性障害の減弱、免疫複合体性炎症の抑制、自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体作用、Th1 サイトカインの産生抑制、細胞増殖の抑制などが挙げられている(日産婦誌、2002;54(9):N416-22)。その有益性について現在のところ立証はされていないが、原因不明の場合に行われる治療手段の選択肢は限定されており、今後さらに症例数を蓄積して検討していくべきである。

また、抗凝固療法などの従来の標準的な治療法によっても奏功しない難治性抗リン脂質抗体症候群(intractable Antiphospholipid syndrome=iAPS)合併不育症患者においても、現在有効性の確立された治療法は存在せず、実際の臨床現場では妊娠を断念せざるを得ないこともある。今回の症例では、妊娠中期の前期破水や重症妊娠高血圧症候群の発症などにより早産となった症例はあったが、すべての症例で最終的に生児を獲得することに成功した。抗凝固療法とは異なり、免疫グロブリン治療は細胞性免疫から液性免疫、局所の炎症に至るまで広範囲な抑制が期待でき、妊娠という環境下で活性化される抗リン脂質抗体の産生とそれに伴う組織障害を直接抑制する作用を持つ可能性がある(Rheumatology. 2008;47:645-651)。

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。これまで最も高頻度な胎児要因である染色体異常を検索する方法として、細胞培養後のG-banding法による染色体分析が主流であったが、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。そのため最近では、培養操作を必要としないDNAを用いた検索手段が生殖・周産期領域にも応用されてきており、流産検体、出生前診断としての羊水検体に対する試みが国内外で報告されてきている(Am J Med Genet A 2006;140:2786-93)。

今回の検討より自然流産検体に対して、必要な量のDNAが確保できればアレイCGH法を用いて染色体異常が正確に解析できることが確認された。アレ

イCGH法など先端的遺伝学的診断技術を組み合わせることは、従来の染色体検査の技術的問題を補完すると同時に、全染色体を網羅的に高解像度で検索することが可能であり、流死産の遺伝学的要因で高頻度に発生する染色体異常を正確に検出する上でも、また新たな流死産の遺伝学的メカニズムを同定するためにも重要な意義があると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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) 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)
- 2) 小澤伸晃、他：流死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)
- 3) Ozawa N、他：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)

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
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