

習慣流産とヒト組織適合抗原系,
特にクラスII抗原系との関連性

— PCR-RFLP 法による解析 —

新潟大学医学部産科婦人科学教室

高桑 好一・石井 桂介・安達 博・今井 勤・本多 啓輔
菊池 朗・荒川 正人・東野 昌彦・田中 憲一

長岡中央総合病院産婦人科

幡 谷 功

竹山病院産婦人科

田 村 正 毅

長岡赤十字病院産婦人科

安 田 雅 子

Studies of the Relationship Between the HLA-Class II Genotypes
and Unexplained Recurrent Abortion—Analysis by
Means of PCR-RFLP Method

Koichi TAKAKUWA, Keisuke ISHII, Hiroshi ADACHI, Tsutomu IMAI,
Keisuke HONDA, Akira KIKUCHI, Masato ARAKAWA,
Masahiko HIGASHINO and Kenichi TANAKA

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine.*

Isao HATAYA

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagaoka Chuo General Hospital.*

Masaki TAMURA

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Takeyama Hospital.*

Masako YASUDA

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagaoka Red Cross Hospital.*

In Order to elucidate the implication of HLA-class II antigens in the genesis of unexplained recurrent abortion, the frequency of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1 genotypes in patients with unexplained recurrent abortion and the compatibility of the genotypes between patient couples were studied by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Twenty-eight patients with unexplained primary recurrent abortion and their husbands were typed for HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1 genotypes. Polymorphic regions at the second exon of HLA-DRB1, -DQB1, or -DPB1 were selectively amplified by using the PCR-primers. After amplification, DNAs were digested with restriction endonucleases, and subjected to electrophoresis in a 12% polyacrilamide gel to determine each HLA genotypes. In this study, the frequency of some genotypes was significantly higher in patients group compared with normal population, although no significant compatibility of HLA genotypes could be observed between patient couples compared with normal fertile couples. These data may represent a new class II association with the genesis of unexplained recurrent abortion.

Key words: Genotype/HLA-Class II, PCR-RFLP, Recurrent abortion
遺伝子型, HLA クラスII, PCR-RFLP, 習慣流産

はじめに

妊孕現象は同種移植の自然成立例と考えられるが、一般の移植免疫とは逆に、母体（レシピエント）の胎児・胎盤系（移植片）に対する積極的な免疫応答の重要性が指摘されている。自然流産を反復する習慣流産ではこのような免疫応答の欠如が推察され、このことから患者群での HLA 抗原系の頻度、夫婦間の HLA 抗原系の類似性などが検討されている。われわれも、習慣流産症例と HLA 抗原系との関連性について解析を行いその一部はすでに報告を行っている^{1) 2)}が、とくに習慣流産と HLA クラスII抗原系（DNA タイピング法により判定）との関連性について解説する。

対象、方法および結果

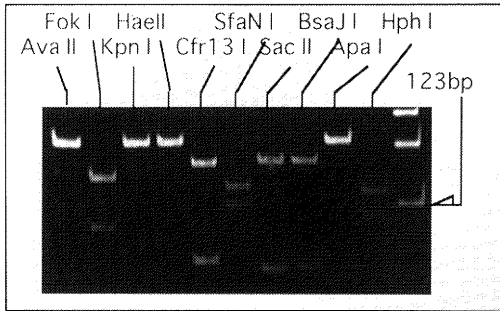
初期自然流産を3回以上反復し、それ以外の妊娠歴のないいわゆる原発性習慣流産症例を対象とした。これらの症例について一般的原因検索を行い、原因が不明である習慣流産症例およびその夫28組についてインフォーム

ドコンセントを得た後、解析を行った。

HLA クラスII抗原（HLA-DR, -DQ, -DP 抗原）については、東海大学移植学教室の猪子教授らの報告による PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) 法に従い判定を行った³⁾⁻⁵⁾。この方法の概略は以下のとおりである。末梢血リンパ球からフェノールクロロフォルム法により DNA を抽出し、HLA-DRB1, -DQB1 および -DPB1 遺伝子のアロ多型性を有する領域を特異的プライマーで増幅した。この際 DRB1 遺伝子領域は7組、DQB1 遺伝子領域は2組、DPB1 遺伝子領域は1組のプライマーを使用した。増幅された DNA をそれぞれの遺伝子領域に特異的な制限酵素で切断し、切断片を12% polyacrylamide gel 上で電気泳動した。それぞれの型の抗原型、遺伝子型はその泳動パターンにより決定した。

図1に HLA-DRB1 遺伝子型判定の一例を示した（解説は図を参照）。夫婦間の HLA 抗原型の類似性の有無を判定するためのコントロールとして正常経産婦女

Reprint requests to: Koichi TAKAKUWA, M.D. 別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通1-757
Department of Obstetrics and Gynecology, 新潟大学医学部産科婦人科学教室 高桑好一
1-757, Asahimachi-dori, Niigata,
951-8510, Japan



Genotype; DRB1*1302

図1 PCR-RFLP 法による HLA 遺伝子型判定の一例

本例は習慣流産症例の一例(妻)であり DRB1 遺伝子領域の増幅でハプロタイプのひとつとして DR3, 5, 6, 8 が増幅された。その DNA を制限酵素 (Ava II, Fok I, Kpn I, Hae II, Cfr13 I, SfaN I, SacII, BsaJ I, Apa I, Hph I) で切断したものである。図の左カラムより順に上記の制限酵素による切断片の泳動パターンが示されている。右端は 123 bp ladder (泳動マーカー) である。泳動パターンより DRB1*1302 (DR13は DR6 のサブタイプ) と判定される。

婦29組について HLA 抗原型を判定した。また、習慣流産症例において疾患感受性あるいは抵抗性を示す HLA 抗原型が存在するか否かのコントロールとして、新潟地区在住の健常人 118 名について HLA 抗原型を判定した。

結果であるが、習慣流産夫婦について共有する抗原型あるいは遺伝子型の数を検討し、コントロール夫婦と比較したが有意の差は観察されなかった。

一方、各々の抗原型の頻度については、HLA-DRB1*0410 が習慣流産症例群においてコントロール群に比較し、有意に高い頻度で観察された。HLA-DQB1 については習慣流産症例群とコントロール群で有意の差は観察されなかったものの、DPB1 については DPB1*04 の頻度が習慣流産症例群において有意に高率であった(表1)。

考 察

自然の同種移植成立例と考えることができる妊孕現象では、母体内でさまざまな免疫反応が生じている。この

表1 習慣流産症例における各 HLA-DPB1 遺伝子型保有率

DPB1 遺伝子型	習慣流産症例 (n=28)	コントロール (n=118)	有意差
*0101	0 (0.0%)	1 (0.8%)	n.s.
*0201	8 (28.6%)	52 (44.1%)	n.s.
*0202	1 (3.6%)	6 (5.1%)	n.s.
*0301	4 (14.3%)	8 (6.8%)	n.s.
*0401	5 (17.8%)	12 (10.2%)	n.s.
*0402	9 (32.1%)	19 (16.1%)	n.s.
*0501	17 (60.7%)	75 (63.6%)	n.s.
*0601	0 (0.0%)	2 (1.7%)	n.s.
*0801	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.s.
*0901	2 (7.1%)	18 (15.3%)	n.s.
*1001	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.s.
*1101	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.s.
*1301	3 (10.7%)	3 (2.5%)	n.s.
*1401	0 (0.0%)	5 (4.2%)	n.s.
*1501	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.s.
*1601	0 (0.0%)	2 (1.7%)	n.s.
*1701	4 (14.3%)	5 (4.2%)	n.s.
*1801	0 (0.0%)	1 (0.8%)	n.s.
*1901	1 (3.6%)	2 (1.7%)	n.s.
*04	14 (50.0%) #	31 (26.3%) #	p<0.05#

; Odds 比 ; 2.81, 95% C.I. ; 1.20-6.54

ことに関連して母体にとって半同種移植片 (semi-allograft) と捉えることのできる妊卵あるいは胎児・胎盤系がなぜ免疫的拒絶を免れるかについての研究が進み、妊娠の免疫的維持機構についてのさまざまな理論が提唱されている。その中で近年注目されているものが、Wegmann らにより提唱された妊娠維持に関する免疫刺激説 (Immunotrophism) である⁶⁾。これは、母体免疫系により着床局所で胎児 (父系) 抗原の認識が行われ、それに基づき細胞増殖因子、サイトカインなどの産生が亢進し、絨毛組織の増殖が促進され、結果として妊娠維持に有利に作用するという理論である。教室の青木らは、各種細胞増殖因子、サイトカインの絨毛細胞増殖に及ぼす影響を検討し、インシュリン、PDGF (platelet derived growth factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) などが絨毛細胞の増殖に促進的に作用することを報告している⁷⁾。

最近では Immunotrophism 理論に関連し, Th2 (2型ヘルパー T細胞; 液性免疫を誘導) が Th1 (1型ヘルパー T細胞; 細胞性免疫を誘導) に対し優位になることが妊娠の免疫的維持に重要であることが指摘されつつある⁸⁾⁹⁾.

著者らは妊娠の免疫的維持に関与する要因として, 妊娠に伴い発現する特異的免疫抑制因子である遮断抗体を正常妊娠, 習慣流産症例などで測定し, さらに後述の習慣流産に対する免疫療法に際しての動態を検討し, 妊娠維持との関連性を指摘している¹⁰⁾¹¹⁾. 遮断抗体の測定系は夫婦間リンパ球混合培養であり, 父系抗原に対する母体の免疫反応を制御する抗体である. 母体の免疫応答の結果産生される液性因子として捉えた場合 Immunotrophism の理論, Th2/Th1 と妊娠との関連性に関する理論に合致しているものと考えられる.

このように妊娠が免疫的に維持される場合には一般の移植免疫とは逆に, 母体の胎児・胎盤系に対する積極的な免疫応答が重要であることが指摘されている. これに対し, 自然流産特に反復する自然流産(習慣流産: 日本産科婦人科学会の定義では3回以上の自然流産を反復すること)の原因のひとつとして, 妊娠の免疫的維持機構の破綻が想定されている. また, 治療として夫リンパ球を用いたいわゆる免疫療法が応用され, その有効性が報告されている¹⁰⁾⁻¹⁷⁾.

ヒト主要組織適合抗原系である HLA 抗原系はヒトの抗原系の中で最も豊富な多型性を持ち, 免疫反応特に免疫担当細胞の抗原認識において重要な役割を果たしていることから, 各種疾患との関連性が検討されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾. 上述のように習慣流産に関しても, 免疫的機序が関与する可能性が強いことから, HLA 抗原系との関連性が検討されてきているが, いまだ結論が得られていない¹⁴⁾¹⁷⁾²¹⁾⁻²³⁾. 特に HLA クラスII 抗原系に関しては, 従来より行われている血清学的判定法の信頼性の問題が指摘されており²⁴⁾, DNA タイピングによる検討の結果が報告されつつある²⁵⁾⁻²⁷⁾.

本研究では, クラスII 抗原に関し正確な判定が可能である HLA タイピング法のひとつである PCR-RFLP 法を用い検討した. その結果, 習慣流産症例夫婦の間には, 正常経産婦夫婦に比較し有意の類似性は認められなかった. これに対し, 習慣流産症例でいくつかの HLA クラスII 抗原の型の頻度が有意に高率であった. このような結果は, 習慣流産に関し, 疾患感受性を有する HLA の型が存在することを示唆するものと判断される.

今後さらに症例を増やし, 検討を進めていく予定である.

謝 辞

本研究にあたり貴重な症例をご紹介いただきました新潟大学医学部産科婦人科学教室関連病院の諸先生方に深謝いたす次第です.

(本研究の一部は, 平成10年度文部省科学研究費(課題番号: 10671524, 代表研究者: 高桑好一)により行われた.)

参 考 文 献

- 1) Takakuwa, K., Higashino, M., Ueda, H., Yamada, K., Asano, K., Yasuda, M., Ishii, S., Kazama, Y. and Tanaka, K.: Significant compatibility does not exist at the HLA-DQB gene locus in couples with unexplained recurrent abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28: 12~16, 1992.
- 2) Takakuwa, K., Hataya, I., Arakawa, M., Kikuchi, A., Higashino, M., Yasuda, M., Kurabayashi, T. and Tanaka, K.: Possible susceptibility of the HLA-DPBI *0402 and HLA-DPBI *04 alleles to unexplained recurrent abortion. Analysis by means of polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method. *Am. J. Reprod. Immunol.*, in press, 1999.
- 3) Ota, M., Seki, T., Fukushima, K., Tsuji, K. and Inoko, H.: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens*, 39: 187~202, 1992.
- 4) Nomura, N., Ota, M., Tsuji, K. and Inoko, H.: HLA-DQB1 genotyping by a modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens*, 38: 53~59, 1991.
- 5) Ota, M., Seki, T., Nomura, N., Sugimura, K., Mizuki, N., Fukushima, H., Tsuji, K. and Inoko, H.: Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping. *Tissue Antigens*, 38:60~71, 1991.
- 6) Wegmann, T.G.: Placental immunotrophism: Maternal T cells enhance placental growth and function. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 15: 67~70, 1987.
- 7) 青木陽一: 絨毛細胞の増殖能に及ぼす各種 Growth

- Factor の効果に関する解析. 日産婦誌 43: 627~632, 1991.
- 8) Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S. and Wegmann, T.G.: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, 151: 4562~4573, 1993.
 - 9) Marzi, M., Vigano, A., Trabattoni, D., Villa, M.L., Salvaggio, A., Clerici, E. and Clerici, M.: Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 106: 127~133, 1996.
 - 10) Takakuwa, K., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.: Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent aborters: The role in successful pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10: 1~9, 1986.
 - 11) Takakuwa, K., Goto, S., Hasegawa, I., Ueda, H., Kanazawa, K., Takeuchi, S. and Tanaka, K.: Result of immunotherapy on patients with unexplained recurrent abortion: A beneficial treatment for patients with negative blocking antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 23: 37~41, 1990.
 - 12) Takakuwa, K., Ueda, H., Goto, S., Hasegawa, I., Yamada, K., Kazama, Y., Kimura, M., Kanazawa, K. and Tanaka, K.: Influence of immunotherapy on the cellular immunity of unexplained recurrent aborters. *J. Reprod. Immunol.*, 20: 153~163, 1991.
 - 13) Takakuwa, K., Higashino, M., Yasuda, M., Ishii, S., Ueda, H., Asano, K., Kazama, Y. and Tanaka, K.: Is an additional vaccination necessary for a successful second pregnancy in unexplained recurrent aborters who were successfully immunized with their husband's lymphocytes before the first pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 29: 39~44, 1993.
 - 14) Beer, A.E., Semprini, A.E., Xiaoyu, Z. and Quebbeman, J.F.: Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles: HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization. *Exp. Clin. Immunogenet.*, 2: 137~153, 1985.
 - 15) Mowbray, J.F., Gibbings, C.R., Liddell, H., Reginald, P.W., Underwood, J.L. and Beard, R.W.: Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*, i: 941~943, 1985.
 - 16) Unander, A.M. and Lindholm, A.: Transfusion of leucocyte-rich erythrocyte concentrates: a successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154: 516~520, 1986.
 - 17) Smith, J.B. and Cowchock, F.S.: Immunological studies in recurrent spontaneous abortion: effect of immunization of women with paternal mononuclear cells on lymphocytotoxic and mixed lymphocyte reaction blocking antibodies and correlation with sharing of HLA and pregnancy outcome. *J. Reprod. Immunol.*, 14: 99~113, 1988.
 - 18) Margulies, D.H.: The major histocompatibility complex. In: Paul, W.E. (Ed), *Fundamental Immunology*, Fourth Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 263~285, 1999.
 - 19) Thomson, G.: Human HLA genetics and disease associations. In: Weir, D.M., et al. (Eds), *Handbook of Experimental Immunology*. Vol 3. Blackwell Scientific Publications, Oxford, chap 102, pp 3~5, 1986.
 - 20) Thomson, G.: HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 32: 183~219, 1995.
 - 21) Gerencer, M., Drazancic, A., Kuvacic, I., Tomaskovic, Z. and Kastelan, A.: HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil. Steril.*, 31: 401~404, 1979.
 - 22) Cauchi, M.N., Tait, B. and Wilshire, M.I.: Histocompatibility antigens and habitual abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 18: 28~31, 1988.
 - 23) Ho, H., Gill, T.G., III, Nsieh, R., Hsieh, H. and Lee, T.: Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163: 178~188, 1990.
 - 24) Opelz, G., Mytilineos, J., Scherer, S., Dunckley,

- H., Trejaut, J., Chapman, J., Middleton, D., Savage, D., Fischer, O., Bignon, J.D., Bensa, J.C., Albert, E. and Noreen, H.: Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. *Lancet*, 338: 461~463, 1991.
- 25) Christiansen, O.B., Riisom, K., Lauritsen, J.G., and Grunnet, N.: No increased histocompatibility antigen sharing in couples with idiopathic habitual abortions. *Hum. Reprod.*, 4: 160~162, 1989.
- 26) Christiansen, O.B., Rasmussen, K.L., Jersild, C. and Grunnet, N.: HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens*, 44: 225~233, 1994.
- 27) Ober, C., Steck, T., Van der Ven, K., Wagenknecht, D.R., Green, K.M. and McIntyre, J.A.: Analyses of HLA-DQ alleles in recurrent spontaneous abortion (RSA) couples. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 37: 1~6, 1997.
-