

学 位 論 文 題 名

Massive Intravenous Immunoglobulin Treatment
in Women with Four or More Recurrent Spontaneous
Abortions of Unexplained Etiology: Down-Regulation
of NK Cell Activity and Subsets

(4回以上の自然流産を繰り返した原因不明習慣流産に対する
ガンマグロブリン大量療法: NK細胞活性およびサブセットの抑制)

学位論文内容の要旨

はじめに

習慣流産において、約半数が原因不明である。これらの症例に対して新たな手法を用いてその病因・病態を少しでも解明し、新しい有効な治療法を確立することが急務である。本研究では、4回以上の自然流産を繰り返した原因不明習慣流産に対して、独自のプロトコールでのガンマグロブリン大量療法(MIVIg)を施行し、その有効性ならびに効果機構を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

対象は、1993年1月から1999年12月までの期間に北海道大学医学部附属病院産婦人科不育症外来を受診した4回以上の妊娠初期流産(妊娠 7.4 ± 3.0 週, $M \pm SD$)を繰り返した原因不明の習慣流産女性で、文書にて同意が得られた15女性(18妊娠)を対象とした。対象に対して、妊娠反応陽性時の4~7週(妊娠 4.9 ± 0.7 週に開始)にMIVIg(20g/日, 5日間, 合計100g)を施行し、それ以降の追加投与は行わなかった。18妊娠中8妊娠(7女性)においてMIVIgの前後に末梢血NK細胞活性ならびにサブセットを測定した。

なお、全例において非妊時に不育症に関連する以下の有無に関する精査が行われた。1. 自己免疫疾患または抗リン脂質抗体、2. 内分泌異常(卵巣・黄体機能不全、高プロラクチン血症、甲状腺疾患など)、3. 凝固因子異常、4. 染色体転座、5. 子宮形態異常(奇形、頸管無力症、子宮筋腫)。以上の諸検査を施行し異常が認められなかった場合に「原因不明」とした。

対象より末梢血を採取し以下の項目を測定した。

NK細胞活性: ^{51}Cr 遊離法を用いて、末梢血単核球NK細胞(2×10^4 個)のK562標的細胞(1×10^4 個)に対する障害活性を測定した。

NK細胞サブユニット: フローサイトメーターを用い、 $\text{CD}56^+ \text{CD}16^-$ NK細胞と $\text{CD}56^+ \text{CD}16^+$ NK細胞の末梢血リンパ球に占める比率を測定した。二重カラーフローサイトメトリ解析では、FACScan、EPICS XL-MCL(Beckman Coulter Inc.)を用いて行った。 5×10^3 個の細胞すべてが測定された。

統計学的解析には、Mann Whitney U検定またはWilcoxon符号順位検定を用いて、

$p < 0.05$ を有意と判定した。

研究成績

18 妊娠中 4 例は稽留流産（妊娠 6,7,9,7 週）に至ったが、胎児染色体異常（46XX/48XX,+16,+18、92XXXX、47XY+21、mos46,XY,dic(8)(8;9)+9[8]/46,XY[16]）が確認された。14 例が妊娠 30~41 週で染色体異常などのない生児を分娩し、うち 13 例が正期産で、1 例が子宮内胎児発育遅延（IUGR）および胎児仮死のため妊娠 30 週に早産に至った。母体に頭痛、紅斑、掻痒などの副作用がそれぞれ 2 例ずつ観察された。したがって、胎児側因子（染色体異常）による自然流産 4 例を除き、14 例中全例で生児が得られた。

18 妊娠中 8 例において、NK 細胞活性および NK 細胞サブセットを測定した結果は、MIVIg 直後（妊娠 5.4 ± 0.5 週）の NK 細胞活性（ $15.0 \pm 7.9\%$ ）は、MIVIg 直前（妊娠 4.4 ± 0.5 週）の NK 細胞活性（ $40.9 \pm 17.0\%$ ）に比べて有意（ $p < 0.05$ ）に抑制されていた。NK 細胞活性は妊娠 10 週まで 30%以下で維持されていた。また、同様に NK 細胞サブセットにおいても、MIVIg 直後の $CD56^+16^-$ （ $3.0 \pm 2.2\%$ ）ならびに $CD56^+16^+$ （ $11.1 \pm 6.9\%$ ）は MIVIg 直前（妊娠 4~5 週）の $CD56^+16^-$ （ $3.5 \pm 2.1\%$ ）ならびに $CD56^+16^+$ （ $16.8 \pm 8.8\%$ ）に比べてそれぞれ有意（各 $p < 0.05$ ）に抑制されていた。

考察

原因不明の習慣流産に対して、各国でガンマグロブリン療法（IVIg）が行われ、多くの研究者によって無作為二重盲検法にてその有効性が調べられてきた。しかしながら、その結果は無効であるとする報告が多い。これらの報告には 2 つの問題点がある。

1 つ目の問題点は、ドイツの報告を除いて、流産に至った場合に胎児組織の染色体分析がなされていないか部分的にしか分析されていない。この場合、治療効果を正確に判定できないという問題が生じる。本研究では、妊娠転帰が自然流産に至った場合には、全ての例で胎児組織の染色体分析を施行した。

2 つ目の問題点は、ドイツやイタリアの報告を除いてその対象に原因が不明とはいえ、2 回の自然流産既往の反復流産や妊娠中期の反復死産などを包含し、対象が必ずしも均一とはいえないことがあげられる。本研究は、無作為二重盲検法ではないが、より難治性、つまり生児を得る確立が極めて低い 4 回以上の妊娠初期流産を繰り返した原因不明の習慣流産を対象とした。

各国の無作為二重盲検法による研究における IVIg の総投与量と投与期間は、ドイツ：150g/約 20 週間、デンマーク：465g/30 週間、アメリカ：約 240g/約 30 週間、カナダ：約 30g/卵胞期にのみ、イタリア：75g/4 週間、スウェーデン：80g/10 週間であった。本研究の MIVIg の治療法の特徴は、妊娠反応陽性時から 5 日間で 100g の大量投与が施行されたことである。

近年、習慣流産女性において、非妊時の血中 NK 細胞活性高値例や NK 細胞数が多い例で、その後の妊娠の際に流産率が高いことが報告された。合わせて、習慣流産女性では正常妊婦に比較して、妊娠初期の血中 NK 細胞活性は高値を呈し、 $CD56^+NK$ 細胞数が多いことが知られている。また、IVIg によって末梢血 NK 細胞活性およびサブセットが抑制され、原因不明の習慣流産において生児獲得率を向上させることが報告された。本研究では投与前後に測定した、末梢血 NK 細胞活性ならびにサブセットは MIVIg 投与後では MIVIg 投与前に比べて有意に抑制された。すなわち、原因不明習慣流産に対する MIVIg の効果機構として、NK 細胞活性ならびにサブセットの抑制が考えられた。

妊娠初期における MIVIg は原因不明習慣流産に対して有効な治療法であることが始めて示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

Massive Intravenous Immunoglobulin Treatment in Women with Four or More Recurrent Spontaneous Abortions of Unexplained Etiology: Down-Regulation of NK Cell Activity and Subsets

(4回以上の自然流産を繰り返した原因不明習慣流産に対する
ガンマグロブリン大量療法: NK細胞活性およびサブセットの抑制)

4回以上の自然流産を繰り返した原因不明習慣流産に対して、独自のプロトコールでのガンマグロブリン大量療法(MIVIg)を施行し、その有効性ならびに効果機構を明らかにすることを目的とした。

4回以上の妊娠初期流産(妊娠 7.4 ± 3.0 週, $M \pm SD$)を繰り返した原因不明の習慣流産女性で、文書にて同意が得られた15女性(18妊娠)を対象とした。対象に対して、妊娠反応陽性時の4~7週(妊娠 4.9 ± 0.7 週に開始)にMIVIg(20g/日, 5日間, 合計100g)を施行し、それ以降の追加投与は行わなかった。18妊娠中8妊娠(7女性)においてMIVIgの前後に末梢血NK細胞活性ならびにサブセットを測定した。

18妊娠中4例は稽留流産(妊娠6,7,9,7週)に至ったが、胎児染色体異常が確認された。14例が妊娠30~41週で染色体異常などのない生児を分娩し、うち13例が正期産で、1例が子宮内胎児発育遅延(IUGR)および胎児仮死のため妊娠30週に早産に至った。したがって、胎児側因子(染色体異常)による自然流産4例を除き、14例中全例で生児が得られた。

18妊娠中8例において、NK細胞活性およびNK細胞サブセットを測定した結果は、MIVIg直後(妊娠 5.4 ± 0.5 週)のNK細胞活性($15.0 \pm 7.9\%$)は、MIVIg直前(妊娠 4.4 ± 0.5 週)のNK細胞活性($40.9 \pm 17.0\%$)に比べて有意($p < 0.05$)に抑制されていた。NK細胞活性は妊娠10週まで30%以下で維持されていた。また、同様にNK細胞サブセットにおいても、MIVIg直後の $CD56^+16^-$ ($3.0 \pm 2.2\%$)ならびに $CD56^+16^+$ ($11.1 \pm 6.9\%$)はMIVIg直前(妊娠4~5週)の $CD56^+16^-$ ($3.5 \pm 2.1\%$)ならびに $CD56^+16^+$ ($16.8 \pm 8.8\%$)に比べてそれぞれ有意(各 $p < 0.05$)に抑制されていた。

本研究では投与前後に測定した、末梢血NK細胞活性ならびにサブセットはMIVIg投与後ではMIVIg投与前に比べて有意に抑制された。すなわち、原因不明習慣流産に対する

MIVIg の効果機構として、NK 細胞活性ならびにサブセットの抑制が考えられた。妊娠初期における MIVIg は原因不明習慣流産に対して有効な治療法であることが始めて示唆された。

公開発表に際し、副査の吉木教授から、本プロトコールと他の治療法との相違について、妊卵環境での NK 細胞活性測定（動物）の必要性について、抗リン脂質抗体症候群への本プロトコールの応用について、また主査の小林教授からは、投与量を 100g に決めた背景、NK 細胞活性を低下させる機序、FC 部分の必要性などについて質問があった。副査の藤本教授から、ガンマグロブリンの局所投与の可否について、着床不全に対する本治療法の効果について質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の解析結果、最新の文献情報、これまでの臨床経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果と申請者の研鑽を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。