

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：免疫グロブリン大量療法は習慣流産患者の末梢血 NK 細胞 CD94 発現を増強する

分担研究者 山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科 教授  
(外科系講座 産科婦人科学分野)  
研究協力者 島田 茂樹 北海道大学病院 助教  
天野真理子 神戸大学医学研究科 助教

研究要旨

4 回以上流産歴がある原因不明で難治性の習慣流産 53 妊娠を対象に妊娠初期免疫グロブリン大量療法 (high dose of intravenous immunoglobulin, HIVIg; 5 日間合計 100g) を実施した。既往流産回数は 4-8 回であった。HIVIg により 38 人で生児が得られたが、14 人が流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。10 例で胎児染色体異常が確認され、2 例は染色体正常であった。2 例で絨毛培養が不良で核型分析不可能であった。胎児染色体異常による自然流産では治療効果判定は不可能であるため、この 10 例を除いて治療効果を判定すると有効率は 88% (38/43) であった。難治症例にもかかわらず有効率は高く、妊娠初期 HIVIg は難治性習慣流産 (原因不明、4 回以上の流産歴) に有用であると考えられる。

フローサイトメトリー法で 8 人において、NK 細胞、細胞障害性 T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージの各種マーカー発現の変化を調べた結果、NK 細胞抑制型レセプターである CD94 発現が HIVIg によって有意に上昇することが明らかとなった。習慣流産患者において、HIVIg は NK 細胞活性を抑制することによって流産抑制効果をもたらす可能性が示された。

A. 研究目的

難治性である、つまり 4 回以上の自然流産歴があり、かつ精査によっても原因不明な習慣流産を対象とし、妊娠初期 HIVIg を実施してきた。以下の要件を満たす症例を HIVIg の対象とした。①不妊症に関する諸検査を施行し原因不明である。②4 回以上の自然流産歴があり、主に妊娠初期流産である。③Ig アレルギーや IgA 欠損症がない。④文書にて同意が得られる。投与量と期間は、免疫修飾作用とその有効性が証明されている特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) に準じて、intact 型 Ig 20g/日、5 日間 (合計 100g) とし、追加投与は行わなかった。既往流産時期に達する前に HIVIg を完了することを意図して、原則として妊娠 4-5 週に治療を開始した。

これまで 53 妊娠に実施した。年齢は 24-44 歳、既往流産回数は 4-8 回であった。38 人で生児が得られたが、14 人が流産に至った。流産では絨毛培養による染色体核型分析を行った。10 例で胎児染色体異常が確認され、2 例は染色体正常であった。2 例で絨毛培養が

不良で核型分析不可能であった。染色体異常頻度が高いのは、対象が比較的高齢であるためと思われる。胎児染色体異常による自然流産では治療効果判定は不可能であるため、この 10 例を除いて治療効果を判定すると有効率は 88% (38/43) であった。難治症例にもかかわらず有効率は高く、妊娠初期 HIVIg は難治性習慣流産 (原因不明、4 回以上の流産歴) に有用であると考えられる。

この流産抑止効果は、どのような免疫学的修飾機能によって発揮するかを調べる目的で、HIVIg 前後の患者末梢血中の NK 細胞、細胞障害性 T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージの各種マーカー発現の変化をフローサイトメトリー法で調べた。

B. 研究方法

4 回以上 (平均 4.9 回、4-7 回) の流産歴があり、前の妊娠時に低用量アスピリン、ヘパリン、黄体ホルモン、副腎皮質ステロイドなどの治療にもかかわらず流産に至った経験のある、いわゆる治療抵抗性かつ原因

不明の習慣流産患者8人より同意を取得して、当該妊娠時に妊娠初期HIVIgと本研究を実施した。妊娠4~5週にHIVIgを開始した。HIVIg直前と投与完了1~3日後に末梢血を採取した。6人が正常産となり、2人は胎児染色体異常流産に至った。

フローサイトメトリー解析で、NK細胞に対して、Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (PerCP)-conjugated anti-CD3 (SK7) mAb, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD3 (HIT3a) mAb, allophycocyanin (APC) -conjugated anti-CD56 (NKH-1), anti-CD158a (EB6)-R-phycoerythrin (PE) and anti-CD94 (HP-3B1)-PEを用いた。

細胞障害性T細胞には、(PerCP)-conjugated anti-CD3 (SK7) mAb, anti-CD8 (B9.11)-APC, anti-CD28 (CD28.2)-PEを用いた。細胞内perforinは処置後、mouse anti-human perforin (dG9), rabbit anti-mouse RPE-Cy5-conjugated F(ab)2 fragment, anti-CD3 (SK7)-FITC, anti-CD56 (NKH-1)-PE, anti-CD8 (B9.11)-APCを用いて測定した。

制御性T細胞には、(PerCP)-conjugated anti-CD4 (SK3) mAb, anti-CD25 (2A3)-APC, anti-FOXP3 (PCH101)-FITC, anti-CD28 (CD28.2)-FITC, anti-CD152 (BN13)-PE, anti-CCR4 (1G1)-PEを用いた。

マクロファージには、anti-CD163 (GHI/61)-PE, FITC-conjugated anti-CD68 (KIM7) mAb, anti-CD80 (MAB104)-PE, anti-CD86 (FUN-1)-R-phycoerythrin: Cyanine-5.18 (PE-Cy5), anti-HLA-DR (L243)-PerCP, anti-CD206 (19.2)-APC, mouse anti-MMP-9 (56-2A4)-purified, mouse anti-PPAR-g (E-8)-purified, goat anti-mouse IgG (H+L)-PE, anti-CD36 (NL07)-APCとanti-CCL22 (57203)-PEを用いた。3/4カラーフローサイトメトリーにはFACS Calibur flow cytometerを用い、CellQuest Softwareで解析した。

統計解析には、paired t-test ( $P < 0.05$ )を用いた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントは、研究実施時点で通例行われている方法に則り、患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益にならないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払い、対象者が研究に参加することによって不利益を

被ることがないように配慮した。

### C. 研究結果

HIVIg後、CD3+CD56+ NKT細胞%は増加したが有意差はなかった ( $P=0.08$ )。Va24+Vb11+ cells/CD3+CD4-CD8-としてNKT細胞%を解析した場合には変化を認めなかった。CD3-CD56+NK細胞, CD3+CD8+細胞障害性T細胞, CD4+CD25+制御性T細胞%には有意な変化は無かった。CD68+マクロファージ%は増加したが有意差は無かった ( $P=0.06$ )。

CD94を発現するNK細胞は、平均59%から71%に有意に増加した ( $P=0.01$ )。流産に至った2人を除いて解析した場合、 $P=0.003$ であった。PerforinないしCD158aを発現するNK細胞%には変化は無かった。

Perforin発現CD3+CD8+細胞障害性T細胞%には有意な変化は無かった。CD28発現CD3+CD8+細胞障害性T細胞は平均77%から71%に低下した ( $P=0.05$ )。

Foxp3, CD28, CD152ないしCCR4を発現する制御性T細胞%には有意な変化は無かった。

CD80, CD86, MMP9, CD206, CD163, HLA-DR, PPAR-g, CD36ないしCCL22を発現するCD68+マクロファージ%には有意な変化は無かった。

### D. 考案

免疫グロブリン療法 (IVIg) は、約25年前にITPでその有効性が確認されて以来、大規模症例対照研究によって、Guillain-Barré症候群 (GBS)、慢性炎症性多発神経根障害、重症筋無力症、皮膚筋炎、川崎病、移植片対宿主病、多発性硬化症、自己免疫性ブドウ膜炎、抗好中球細胞質自己抗体陽性血管炎などの自己免疫疾患や炎症性疾患において、その有効性が確定した。現在、自己免疫性血友病、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、SLE、クローン病で有効性が期待されている。重要なことは、0.4g/kg、5日間に代表されるような大量療法でなければ、上記疾患の多くに対してその効果は認められない点である。

想定される一般的なIVIgの作用機構を以下にまとめる。①Fcレセプター：マクロファージ (Mφ) FcγRのブロック (ITP)、Mφ抑制型FcγRIIBの誘導 (ITP)、抗体依存性細胞障害の抑制 (脱髄性神経疾患)。②炎症：補体介在性障害の減弱 (川崎病、皮膚筋炎)、免疫複合体介在性炎症の抑制 (糸球体腎炎)、IL-1産生の

抑制 (川崎病, GBS). ③B 細胞・抗体: 自己抗体に対する抗イディオタイプ作用 (自己免疫性血友病), Fc $\gamma$ RIIB を介した抗体産生抑制. ④T 細胞: Th1 サイトカイン産生の抑制 (多発性硬化症, ブドウ膜炎), スーパー抗原の中和. ⑤細胞増殖の調節.

習慣流産患者で, HIVIg の際に末梢血 NK 細胞活性や比率を測定してこれまでに報告した. HIVIg 直前 (妊娠 4~5 週) の NK 細胞活性 (平均 41%) は HIVIg 終了後 15% に抑制され, この抑制は 10 週まで維持された. 同様に, CD56 陽性 CD16 陰性 (3.5%), CD56 陽性 CD16 陽性 (16.8%) 細胞比率もそれぞれ 3.0%, 11.1% に抑制された. 血清中の Th1 および Th2 サイトカイン値の変化を ELISA 法で解析した結果, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  値は, HIVIg 後に上昇した. フローサイトメトリー法による末梢血 Th1/Th2 細胞比率は, 投与後に低下した. このように, HIVIg にはヒト末梢血で NK 細胞活性を抑制し, Th バランスを修飾する作用があると推察されていた.

今回の研究により, 抑制型レセプター CD94 を発現する NK 細胞% が HIVIg により増加することが明らかとなった. また, マクロファージ% が増加し, 細胞障害性 T 細胞% は低下した. 以上のことから, HIVIg はレセプター発現を修飾して NK 細胞の細胞障害活性を抑制し, 合わせて, マクロファージの活性化や細胞障害性 T 細胞の抑制によって, 難治性習慣流産に対して流産抑止効果を発揮すると推察された.

#### E. 結論

4 回以上流産歴がある原因不明で難治性の習慣流産 53 妊娠を対象に HIVIg を実施した結果, 染色体異常妊娠を除いた有効率は 88% (38/43) であった. HIVIg により抑制型レセプター CD94 を発現する NK 細胞% が増加することが明らかとなった. HIVIg は NK 細胞の細胞障害活性を抑制し, マクロファージの活性化や細胞障害性 T 細胞の抑制などの機構によって, 難治性習慣流産に対して流産抑止効果を発揮すると推察された.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. (2009) Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79:188-195.
- 2) Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R. (2009) Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birth weight in a Japanese population. *Mol Hum Reprod* 15(2):121-130.
- 3) Shimada S, Yamada H, Hoshi N, Kobashi G, Okuyama K, Hanatani K, Fujimoto S. (2009) Specific ultrasound findings associated with fetal chromosome abnormalities. *Congenit Anom (Kyoto)* 49(2):61-65.
- 4) Shimada S, Takeda M, Nishihira J, Kaneuchi M, Sakuragi N, Minakami H, Yamada H. (2009) A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 62(5):301-307.
- 5) Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. (2010) Anti- $\beta$  2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. *J Reprod Immunol* 84:95-99.
- 6) 齋藤 滋, 杉浦 真弓, 田中忠夫, 藤井知行, 杉俊隆, 丸山哲夫, 竹下俊行, 山田秀人, 小澤伸晃, 木村 正, 山本樹生, 藤井俊策, 中塚幹也, 下屋浩一郎 (2009) : 本邦における不育症のリスク因子とその予後に関する研究. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4) : 1144-1148.
- 7) 山田秀人 (2009) : 抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4) : 1149-1151.
- 8) 天野真理子, 山田秀人 (2009) : 不育症と先天性凝固異常. *日本血栓止血学会誌* 20(5), 506-509.

## 2. 学会発表

- 1) 山田秀人 (2009) 不育症の原因・治療と新たな展開. 北海道産婦人科医会ウエルカムガイダンス学術研修会 (特別講演), 6月20日, 札幌
- 2) 山田秀人 (2009) 抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する. 第45回周産期・新生児医学会学術集会 (ワークショップ 不育症の新たな原因探索と治療), 7月12-14日, 名古屋
- 3) 山田秀人 (2009) 不育症の原因・治療と進展. 位育会臨床セミナー (特別講演), 8月23日, 神戸
- 4) Yamada H. (2009) Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. 3rd Society for Gynecologic Investigation International Summit 2009 "Preeclampsia". November 12-14, Sendai (シンポジウム)
- 5) 山田秀人 (2009) 不育症医療とは. 尼崎市産婦人科医会学術講演会 (特別講演), 11月28日, 尼崎
- 6) 山田秀人 (2009) 自己免疫疾患合併妊娠の管理. 兵庫県周産期医療研修会 (特別講演), 12月19日, 神戸

## 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
Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H.	Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes.	J Reprod Immunol	79	188-195	2009
Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R.	Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birth weight in a Japanese population.	Mol Hum Reprod	15(2)	121-130	2009
Shimada S, Yamada H, Hoshi N, Kobashi G, Okuyama K, Hanatani K, Fujimoto S.	Specific ultrasound findings associated with fetal chromosome abnormalities.	Congenit Anom (Kyoto)	49(2)	61-65	2009
Shimada S, Takeda M, Nishihira J, Kaneuchi M, Sakuragi N, Minakami H, Yamada H.	A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion.	Am J Reprod Immunol	62(5)	301-307	2009
Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G.	Anti- $\beta 2$ glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study.	J Reprod Immunol	84	95-99	2010

齋藤 滋, 杉浦 真, 田中忠夫, 藤井知行, 杉 俊隆, 丸山哲夫, 竹下俊行, 山田秀人, 小澤伸晃, 木村 正, 山本樹生, 藤井俊策, 中塚幹也, 下屋浩一郎	本邦における不育症のリスク因子とその予後に関する研究.	日本周産期・新生児医学会雑誌	45(4)	1144-1148	2009
山田秀人	抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する.	日本周産期・新生児医学会雑誌	45(4)	1149-1151	2009
天野真理, 山田秀人	不育症と先天性凝固異常.	日本血栓止血学会誌	20(5)	506-509	2009