

当院における免疫細胞子宮腔内注入法の有効性の検討

The Effect of Intrauterine Administration of Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells before Embryo Transfer

岸 千春 上地栄里奈 池崎 公彦 田村 俊男 藤井亜希子
小島 瞳 池澤 有加 浅利 真司 長崎 貴幸 笹森弥真人
安澤 圭昭 田中 雄大

CHIHARU KISHI, ERINA UECHI, KIMHIKO IKEZAKI, TOSHIO TAMURA, AKIKO FUJII, HITOMI KOJIMA,
YUKA IKEZAWA, SHINJI ASARI, TAKAYUKI NAGASAKI, YAMATO SASAMORI, YOSHIKI ANZAWA, YUDAI TANAKA

Medical Park Shonan, 1-24-7 Shonandai, Fujisawa, Kanagawa 252-0804, Japan

要旨：生殖補助医療の技術は日々進歩し続けており、昨今の体外受精の成績はめざましい。しかしながら、良好胚が得られるにもかかわらず、移植を何度試みても妊娠に至らない反復不成功症例が存在し、こうした症例は「着床障害」と呼ばれている。着床に関して免疫細胞の関与が示唆されており、免疫細胞を用いた着床率向上の試みが報告されている。今回われわれは、融解胚移植前の自己免疫細胞子宮腔内注入が着床率向上に有効かどうか検討した。2013年1月1日から2014年3月31日まで単一融解胚移植を行った436症例646周期を対象とし、融解胚移植2日前にフィコール液を用いて遠心分離した自己免疫細胞を子宮腔内に注入した免疫細胞注入群259周期と免疫細胞注入を行わなかった非注入群387周期について検討を行った。全体の臨床妊娠率は免疫細胞注入群で40.2% (104/259)、非注入群で45.2% (175/387)であり、2群間に有意差はみられなかったものの免疫細胞注入群がやや低い傾向にあった。40歳以上の臨床妊娠率の比較では、平均胚移植施行回数が免疫細胞注入群で有意に多く、臨床妊娠率は免疫細胞注入群が25.6% (22/86)、非注入群が30.3% (37/122)と有意差は見られなかったものの免疫細胞注入群がやや低い傾向にあった。また過去融解胚移植回数2回以上の臨床妊娠率は、免疫細胞注入群が33.7% (28/83)、非注入群が38.8% (31/80)であり有意差は見られなかった。免疫細胞注入群は非注入群と比較して臨床成績は有意な改善は見られず、自己免疫細胞子宮腔内注入の有効性は見出だせなかった。

キーワード：融解胚移植、着床障害、免疫細胞

ABSTRACT: It was reported that intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is associated with embryo implantation. Intrauterine administration of PBMC has been reported to improve the pregnancy rate of patients with repeated failures of IVF-ET. In this study, we examined the effect of intrauterine administration of PBMC. The subjects of this study were 646 cycles of 436 patients who received frozen-thawed embryo transfer at our facility. The PBMCs were isolated from each patient and administered into the uterine cavity. Embryo transfer was performed within three days of the administration of PBMC. The clinical pregnancy rates in PBMC treated group and non-treated groups were 40.2% (104/259) and 45.2% (175/387), respectively. The difference was not statistically significant between the two groups. For patients over the age of 40, the pregnancy rate of each group was 25.6% (22/86), and 30.3% (37/122), respectively. Once again, the difference was not statistically significant. Intrauterine administration of PBMC did not improve the pregnancy rate of patients with repeated IVF failures.

Key words: frozen-thawed embryo transfer, implantation failure, PBMC

緒 論

体外受精において、治療の成否を最も大きく左右するのは移植胚の質であろう。しかし良好胚盤胞を移植しても妊娠に至らない反復不成功症例も少なからず存在する。こうした着床障害の原因の一つとして、移植胚自体の着床能以外にも、子宮内膜側の着床能に原因がある可能性が推測される。子宮内膜が胚を受容する機序には種々の

受付日：2014年11月10日／受理日：2014年11月18日

メディカルパーク湘南：〒252-0804 神奈川県藤沢市湘南台
1-24-7

TEL: 0466-41-0331 FAX: 0466-41-0332

e-mail: labo_shonan_ivf@yahoo.co.jp

サイトカインが関与しており、エンドクラインを介した授受によって着床に適した環境が整えられる。こうした機序に免疫細胞が深く関与していることが、様々な研究から推測されている。例えば妊娠マウスの脾臓細胞を偽妊娠マウスに投与することで直接子宮内膜の変化に作用し、本来胚が着床しない時期でも胚の着床を促進することが報告されている¹⁾。また非妊娠マウスの免疫細胞でも子宮内膜の変化と胚の着床を誘導するとの報告もある²⁾。妊娠女性の免疫細胞によって、マウス胚とヒト絨毛細胞由来のBeWo細胞の浸潤が亢進することが確認された³⁾。非妊娠女性の免疫細胞にhCGを添加することにより胚の浸潤作用が増強されることもわかっており、免疫細胞と胚の着床には密接な関わりがあることが示唆されている⁴⁾。

こうした報告を受けて着床不全の治療法として新しく考案された方法が、免疫細胞を用いた着床率向上の試みである⁵⁾。患者自身の血液から単離した免疫細胞を子宮腔内へ注入する方法で、体外受精反復不成功症例に対してこの治療法を採用したところ臨床妊娠率が向上したという報告が近年見られる⁵⁻⁷⁾。

本研究では、前述の報告に基づき、融解胚盤胞移植を行った患者に対して、免疫細胞子宮腔内注入が有効であるか検討した。

対象と方法

2013年1月1日から2014年3月31日の間に、単一融解胚盤胞移植を行った症例のうち、436症例646周期を対象とした。本検討は当院の倫理委員会の承認を得て行った。融解胚移植2日前にフィコール液を用いて遠心分離した自己免疫細胞を子宮腔内に注入した免疫細胞注入群259周期と免疫細胞注入を行わなかった非注入群387周期について比較検討した。免疫細胞注入はインフォームドコンセントを行い患者より同意の得られた症例に対して行った。

1. 胚盤胞凍結

調節卵巣刺激によって採卵された卵に対してUniversal IVF medium (オリジオ・ジャパン株式会社, Japan)を用い6.0% CO₂, 5.0% O₂, 89.0% N₂の条件下で3~4時間の前培養を行い、conventional IVFまたはICSIを施行した。翌日、正常受精が確認された胚はGlobal (Life Global, USA)にて培養を継続し、day5もしくはday6にGardner分類にて3BB以上の良好胚盤胞をVitrification Kit (北里バイオファルマ, Japan)を用いて凍結保存した。

2. 凍結融解胚移植施行

凍結融解胚移植は自然周期もしくはホルモン補充周期によって行った。移植5日前に、子宮内膜が7 mm以下である場合には移植キャンセルとした。凍結胚盤胞はThawing Kit (北里バイオファルマ, Japan)を用いて融解し3~4時間の回復培養の後に、胚移植を行った。移植には全例ETカテーテル(北里メディカル, Japan)を用いた。

3. 免疫細胞抽出方法

免疫細胞抽出の方法は徐らの方法に従った⁶⁾。融解胚移植2日前に患者より採血した8 mlの血液検体を等量の生理食塩水で希釈し、Lymphoprep™ (コスモ・バイオ株式会社, Japan)上に重層して800 g, 20分の遠心分離を行った。得られた免疫細胞を500 g, 10分遠心処理し、0.3 ml生理食塩水を用いて調整し、サフィード®ネラトンカテーテル(テルモ株式会社, Japan)を用いて子宮腔内に注入した。免疫細胞の子宮腔内注入は融解胚移植の1~3日前に行った。

4. 統計学的処理

統計学的処理には、Student t検定およびカイ二乗検定を用いた。P<0.05を以て有意な差として判定した。

結果

患者背景の比較検討では、胚移植時年齢、移植胚数、胚移植時内膜厚では、免疫細胞注入群と、非注入群の2群間には有意な差はみられなかった。過去胚移植施行回数数は免疫細胞注入群が有意に多かった(表1)。

免疫細胞注入群および非注入群の全体の成績は、化学妊娠率がそれぞれ49.8% (129/259) 対56.0% (217/387)、臨床妊娠率が40.2% (104/259) 対45.2% (175/387)、着床率が35.5% (92/259) 対40.3% (156/387)、流産率が23.1% (24/104) 対20.6% (36/175)であった。いずれも有意差は見られなかった(図1)。

患者年齢を40歳以上の症例のみで検討した。免疫細胞注入群と非注入群それぞれの成績は、化学妊娠率が39.5% (34/86) 対46.7% (57/122)、臨床妊娠率が25.6% (22/86) 対30.3% (37/122)、着床率が18.6% (16/86) 対25.4% (31/122)、流産率が27.3% (6/22) 対27.0% (10/37)であった。いずれの群も有意な差は見られなかった(図2)。

過去に融解胚移植を2回以上施行し、妊娠に至っていない反復不成功例だけを対象に比較検討した。免疫細胞注入群、非注入群それぞれの成績は、化学妊娠率が43.4% (36/86) 対48.8% (39/80)、臨床妊娠率が33.7% (28/83) 対38.8% (31/80)、着床率が32.5% (27/83) 対

表1 全体の成績

	非注入群	リンパ球 注入群
対象症例数	303	212
対象周期数	259	387
平均年齢	37.0 ± 4.2	37.4 ± 4.2
平均胚移植回数*	1.8 ± 1.8	2.2 ± 2.0
平均融解胚移植回数*	0.8 ± 1.2	1.2 ± 1.4
平均移植時内膜厚*	9.8 ± 2.1	10.2 ± 2.5
化学妊娠率	56.0% (217/387)	49.8% (129/259)
臨床妊娠率	45.2% (175/387)	40.2% (104/259)
着床率	40.3% (156/387)	35.5% (92/259)
流産率	20.6% (36/175)	23.1% (24/104)

*: P < 0.05.

31.2% (25/80), 流産率が17.8% (5/28) 対 29.0% (9/31) であり, 有意な差は見られなかった(図3)。

考 察

げっ歯類やヒトではimplantation windowと呼ばれる子宮内膜が胚を受容できる限られた期間が存在する⁸⁾。この期間の着床の成立には, 子宮内膜に作用する種々の因子が関与している。エストロゲンとプロゲステロンは子宮内膜上皮に作用して種々のサイトカインを誘導し, 胚が着床する環境を整える。こうしたステロイドホルモンによるエンドクライン機構以外に, 着床が成立するには胚と子宮内膜のシグナル伝達によるcross talkが必要であると考えられている⁷⁾。その他にも, 胚を受容する機序として, 胚の存在下では子宮内膜のケモカイン・接着分子・レプチン・アポトーシスの調節が変化し, 着床に適した環境に変化していることも報告されている⁹⁾。さらに免疫細胞もこのエンドクラインシステムに部分的に関与している。緒論に記した通り, 免疫細胞は胚の存在を認識して機能を変え, 子宮内膜の分化や胚の浸潤に対して促進的な役割を果たすことがマウスを用いた研究で明らかになっている²⁻⁴⁾。こうした理論に基づいて, 反復不成功症例に対する妊娠率向上を目的とした免疫細胞子宮腔内注入を行った報告がいくつかある。

徐ら⁹⁾の報告では, 新鮮胚移植周期において免疫細胞子宮腔内注入を行った症例と注入しなかった症例につい

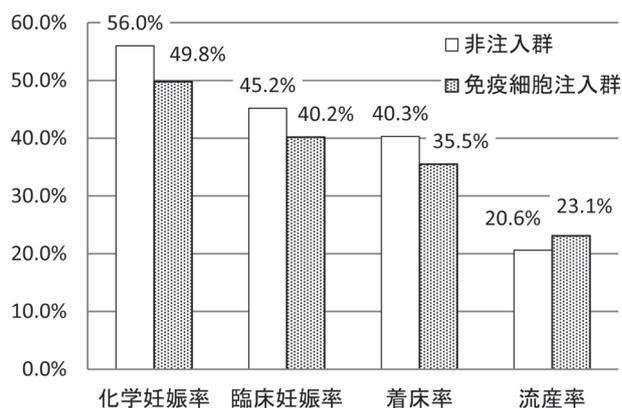


図1 全体の成績

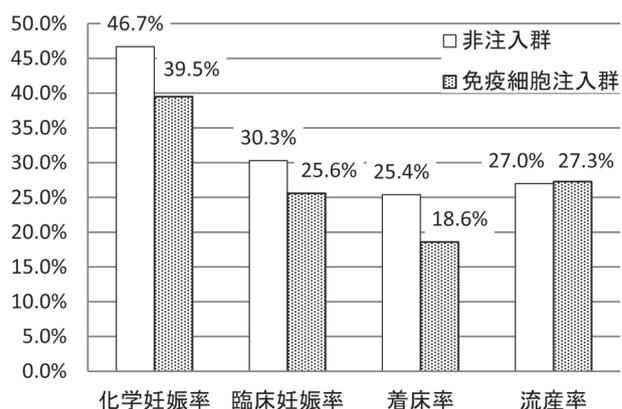


図2 40歳以上の症例での成績

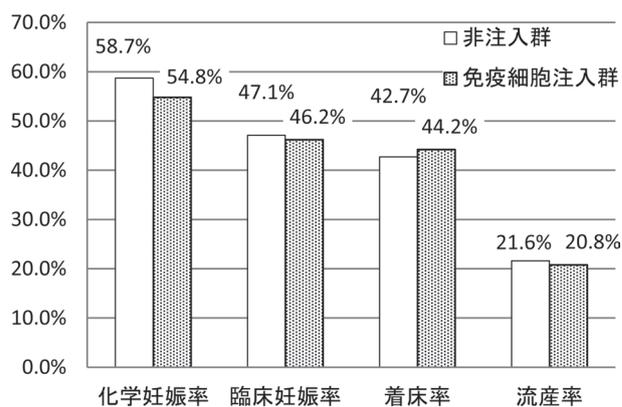


図3 過去融解胚移植回数2回以上の症例での成績

て臨床成績の比較検討を行ったところ、体外受精反復不成功症例において免疫細胞注入群が非注入群より妊娠率が有意に高かった。また40歳以上の症例では、既往回数が免疫細胞注入群の方が有意に多いにもかかわらず免疫細胞注入群で妊娠率が高い傾向にあり、胚移植前の免疫細胞子宮腔内注入は体外受精反復不成功症例に対して有効性が示唆されたと報告している。

Yoshiokaら⁵⁾はhCG処理後2日間培養して活性化させた患者自己免疫細胞と注入当日採取した免疫細胞を合わせて子宮腔内へ注入する方法を用い、反復不成功症例の臨床妊娠率が改善したことを報告している。注入群と非注入群の臨床妊娠率は41.2%対11.1%、着床率は23.4%対4.1%、出生率は35.3%対5.5%となり、注入群で有意に高かった。

Okitsuら⁷⁾の報告では融解胚移植周期に子宮腔内免疫細胞注入を行うことで、体外受精反復不成功症例に対して臨床妊娠率が向上したと報告している。全体での成績では注入群と非注入群の妊娠率は21.6%対21.7%、着床率は21.1%対21.8%と有意な差はないが、反復不成功症例においては、妊娠率は42.1%対16.7%、着床率は25.0%対9.4%とが注入群が有意に高くなったと報告している。

藤原ら¹⁰⁾はこの治療法が有効であった要因として4つの機序を考察している。まず免疫細胞によって子宮内膜上皮の分化が促進する可能性、第二にカテーテル挿入と免疫細胞注入による子宮内膜上皮に対する物理的刺激が炎症反応を起こし、着床に関与している可能性、第三に免疫細胞から分泌されたプロテアーゼによって胚接着分子が分解される可能性、そして最後に注入された免疫細胞が子宮内膜上皮を通過して子宮内膜へ移動し胚の接着と浸潤に作用する可能性である。

しかし、今回のわれわれの検討では、免疫細胞注入群と非注入群とで、その臨床成績は同等となり、子宮腔内免疫細胞注入の有効性は見出すことができなかった。対象を40歳以上の高齢症例および体外受精反復不成功症例に限定した比較検討でも、着床障害の改善に有効性を見出すことができなかった。

Yoshiokaら⁵⁾の報告では、hCG添加により免疫細胞の活性化を行っている。hCGによる活性化の必要性を裏付ける報告として、*in vitro*で妊娠マウスの免疫細胞を子宮内膜細胞に添加すると子宮内膜への分化が見られるという報告がある⁴⁾。また、hCGによって活性化された免疫細胞は、絨毛癌のcell lineとして知られるBeWo細胞と子宮内膜の*in vitro*での接着を促進するとの報告もある³⁾。

今回のわれわれのプロトコールではhCGや血清を添加

していない。この点が治療成績の改善に繋がらなかった可能性はある。しかし、徐ら⁶⁾は新鮮胚移植周期において、Okitsuら⁷⁾は融解胚移植周期において、hCG添加を行わず良好な成績を得ている。今後、プロトコールを修正した上で、反復不成功症例に対しての治療法として子宮腔内免疫細胞注入を採用すべきか慎重に検討する必要があると考えている。

文 献

- 1) Takabatake, K., Fujiwara, H., Goto, Y., Nakayama, T., Higuchi, T., Fujita, J., Maeda, M., Mori, T.: Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.*, 12: 2102–2107, 1997.
- 2) Fujita, K., Nakayama, T., Takabatake, K., Higuchi, T., Fujita, J., Maeda, M., Fujiwara, H., Mori, T.: Administration of thymocytes derived from non-pregnant mice induces an endometrial receptive stage and leukaemia inhibitory factor expression in the uterus. *Hum. Reprod.*, 13: 2888–2894, 1998.
- 3) Kosaka, K., Fujiwara, H., Tatsumi, K., Yoshioka, S., Higuchi, T., Sato, Y., Nakayama, T., Fujii, S.: Human perithelial blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BeWo-cell spheroids. *Hum. Reprod.*, 18: 19–25, 2003.
- 4) Nakayama, T., Fujiwara, H., Maeda, M., Inoue, T., Yoshioka, S., Mori, T., Fujii, S.: Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion *in vitro*: HCG enhances the effects of PBMC. *Hum. Reprod.*, 17: 207–212, 2002.
- 5) Yoshioka, S., Fujiwara, H., Nakayama, T., Kosaka, K., Mori, T., Fujii, S.: Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 21: 3290–3294, 2006.
- 6) 徐東舜・清須知栄子：胚移植前の自己免疫細胞子宮内注入の有効性について。受精着床誌, 26: 198–201, 2009.
- 7) Okitsu, O., Kiyokawa, M., Oda, T., Miyake, K., Sato, Y., Fujiwara, H.: Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rate in frozen/thawed embryo transfer cycle of patients with repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.*, 92: 82–87, 2011.
- 8) 森崇英：Implantation windowを考慮した胚移植。森崇英・久保晴海・岡村均編，図説ARTマニュアル 改訂第2版，pp.191–195，永井書店，2006。
- 9) Simón, C., Dominuez, F., Remohí, J., Pellicer, A.: Embryo effects in human implantation: embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 943: 1–16, 2001.
- 10) 藤原 浩：免疫細胞を用いた着床率向上の試み。日産婦誌, 60: 399–402, 2008。