

Thesis

習慣流産に対する免疫療法の治療効果評価における抗 HLA 抗体と
NK 活性測定の意味に関する研究

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

(指導：竹田 省教授)

齊藤 正博

Significance of Anti-HLA Antibodies and Natural Killer (NK) Cell Activity on the Assessment of Immunotherapy in the Case of Habitual Abortion

Masahiro Saito (Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kawagoe, Japan)

Production of anti-HLA antibodies and changes of natural killer (NK) cell activity were analyzed in 51 patients who had the previous history of habitual abortion (HA). The patients were immunized with their husband's lymphocytes and the serological studies were carried out before, during, and after the immunotherapy.

Anti-HLA antibodies were positive in 26 out of 51 patients (51.0 %) after immunotherapy and 32 out of 41 pregnancies (78.0 %) resulted in successful outcome. However, there was no statistical correlation between the presence of antibodies and the fate of pregnancy. Anti-HLA antibodies were detected in the patients who had no shared HLA B antigen or HLA B and HLA DR antigens with their husbands ($P < 0.05$). Sixteen out of 26 anti-HLA antibodies produced were directed against HLA A antigen. Meanwhile, there was a significant suppression of average NK cell activity induced by immunotherapy ($P < 0.05$). In particular, NK cell activity were suppressed after immunotherapy in the patients who no shared HLA B or HLA DR antigen with their husbands. The patients with high NK cell activity before the immunotherapy mostly resulted in subsequent pregnancy loss even after the suppression of NK cell activity was achieved. These results suggest that the production of anti-HLA antibodies reflect the HLA sharing between wives and their husbands but the antibodies may not be a good indicator for the successful outcome of pregnancy after the immunotherapy. On the other hand, immunotherapy induced suppression of NK cell activity which may contribute for the maintenance of early pregnancy at least in a part of cases with HA history.

Keywords: habitual abortion, immunotherapy, NK activity, lymphocyte cytotoxicity test

緒言

習慣流産（不育症）とは、妊娠はするものの流産を反復する病態を示し、定義上は3回以上連続して自然流産を繰り返すことを指す。

自然流産は全妊娠の約10%に認められ、その原因として胎児側の要因が多いといわれている。しかし、流産が連続的に繰り返されるときは、何らかの原因が夫婦間に潜んでいる可能性が考えられる。そのため、習慣流産については必要な検査を行ない、明らかとなった原因に対して適切な治療を行うことが重
医学博士 乙第814号 平成14年3月22日(埼玉医科大学)

要である。最近では、2回連続した流産歴を持つ反復流産に対しても、原因検索を行なう方がよいとされる。一方、一般的な検査により明らかな原因が見つからない習慣流産症例が多数あることが判明してきた¹⁾。

妊娠現象は母体にとってみれば、半同種移植片 (semiallograft)、すなわち、自己と同一のHLAハプロタイプを1/2共有する妊卵、胎児や胎盤が生着するという現象である。血液そのものの交流がない点では移植とは異なるものの、免疫学的な機序が妊娠継続の成否に何らかの形でかかわっている可能性がある。そのため、近年、着床および妊娠の維持を一つの移植とし

て考え、原因不明の習慣流産患者の中に免疫学的妊娠維持機構の破綻によるものが存在することが考えられている。また、移植免疫学的見地から、反復流産夫婦と HLA 抗原の関連について 1977 年 Komlos²⁾らは反復流産患者の夫婦間における HLA 抗原の共有数が多いことをはじめ報告した。それ以来、産婦人科領域の母児免疫における HLA 抗原の役割が注目されてきた。また、今日まで習慣流産症例における HLA 抗原に関して種々の検討がなされてきた。

他方、原因不明の習慣流産患者に対して Taylorら³⁾および Beerら⁴⁾が 1981 年に夫リンパ球を用いた免疫療法の有効性を初めて報告して以来、本療法の有効性に関する報告⁵⁻⁹⁾が多数ある。そこで、原因不明の習慣流産患者に対する本療法の治療効果が十分に期待できると考え、当科においても 1988 年以来、原因不明の習慣流産患者に対して免疫療法を施行し、諸家と同等の成績を示してきた^{10,11)}。

しかし、免疫療法の作用機序については未だ明らかでない点が多い。また、免疫療法の有効性を評価する指標として、臨床的には妊娠の継続率、検査学的には抗 HLA 抗体の産生、blocking factor の産生、NK 活性の変化等が提案されてきた。しかし、未だ、臨床経過と検査所見について、一致した見解を得るに至っていない。

そこで、本論文ではまず、免疫療法を行った習慣流産夫婦について妻血清中の抗 HLA 抗体を測定し、抗 HLA 抗体の産生の有無と妊娠の転帰および抗 HLA 抗体産生機序について検討した。

初期妊娠の維持には母体の子宮脱落膜内免疫担当細胞がバランス良く胎児抗原を認識することが、妊娠維持に必要である¹²⁾。反復流産患者群では末梢血 NK 活性値が高く、その後の流産率も高いことが Aokiらの報告¹³⁾で示された。また、高い NK 活性を示す例では 71%の確率でその後、再度流産するという。さらに、反復流産患者では妊娠初期に末梢血の NK 細胞数が有意に増加しているという報告¹⁴⁾もある。また、原因不明の反復流産患者の非妊時の分泌期子宮内膜中に NK 活性の強い CD56⁺CD16⁺NK 細胞が有意に増加している¹⁵⁾。これらのことから、一部の反復流産患者において、末梢血 NK 細胞が増加していること、また、脱落膜内 T 細胞の胎児抗原の認識が不適当であるため、NK 細胞に起因した流産が起こることが考えられる。そこで、本論文では次に、免疫療法における NK 活性の変化を免疫療法前から免疫療法中、免疫療法後の 3 点で測定し、免疫療法が NK 活性に与える影響を明らかにすることを試みた。

対象および方法

1. 習慣流産に対する免疫療法における抗 HLA 抗体の産生の検討

1-1 対象

1988 年 12 月より 1996 年 10 月までの 8 年間に当院で習慣流産のために夫リンパ球による免疫療法を施行した 51 例を対象とした。なお、免疫療法の対象症例は習慣流産の原因 (Table 1) をスクリーニング検査 (Table 2) し、明らかな原因が存在しない症例に対して免疫療法を行った。

1-2 免疫療法

夫リンパ球による免疫療法は、夫の感染症検査 (梅毒血清反応, HBs 抗原, HCV 抗体, HTLV-I 抗体, HIV-I 抗体等) に異常のないことを確認後に、以下のよう施行した。

夫より採取したヘパリン加静脈血 40 ml より Ficoll-Conray を用いた比重遠沈法によりリンパ球を分離し、滅菌生理食塩液で洗浄後、 $2-4 \times 10^7$ 個/ml に濃度を調整した。これを放射線照射 (20Gy) 後に妻の前腕皮内 4 ケ所、左に 0.1, 0.3 ml, 右に 0.3, 0.3 ml を皮内注射し^{10,11)}、同様の接種を 2 週毎に計 4 回繰り返した (Table 3)。

1-3 HLA タイピングと抗 HLA 抗体の検出

対象症例全例において夫婦両者の HLA タイピングを既報のように施行した^{16,19)}。すなわち、末梢血をヘパリン加採血し、Ficoll 比重法でリンパ球を分離した。分離したリンパ球を用いて NIH 標準リンパ球補体依存性細胞障害試験にて class I, class II の血清学的タイピングを行なった^{16,17)}。さらに、残りの顆粒球層からフェノール・クロロホルム法もしくはグアニジン法をもちいて DNA を抽出した。DNA タイピングは HLA class II の DRB1 について解析を行なった。また、解析の方法は polymerase chain reaction (PCR) - single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を用いた¹⁸⁾。SSCP 法は PCR で増幅された 2 本鎖 DNA 断片を 1 本鎖に解離し、その塩基配列に依存した高次構造の変化をポリアクリルアミドゲルに電気泳動することにより 1 塩基の置換が移動度の差として検出できる方法である¹⁸⁾。SSCP 法による泳動パターンで判定が困難であったものは、PCR - restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法によってタイピングした¹⁹⁾。RFLP 法は制限酵素を用いて二本鎖 DNA の目的とする塩基配列を切断する方法で、切断点の有無もしくは断片の長さによって塩基配列を判定する方法である。

抗 HLA 抗体は、免疫前後の患者血清中よりその存在についてパネルリンパ球を用いた Lymphocyte cytotoxicity test (LCT) 法により検討した。T 細胞に反応した抗リンパ球抗体は HLA class I 抗原に対する抗体であり、これを抗 HLA 抗体とした。さらに、29 名の既に HLA タイピングをされたパネル細胞に対する

Table 1 . Factors involved early pregnancy loss

- 1 Uterine malformation or other uterine disorders
- 2 Chromosomal anomalies
- 3 Gynecological endocrinological disorders : luteal insufficiency, hyperprolactinemia, occult hyperprolactinemia
- 4 Infections : toxoplasmosis, rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, chlamydia, syphilis, etc
- 5 Non gynecological endocrinological disorders : diabetes mellitus, hyperthyroidism
- 6 Auto-immune diseases : systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome, etc
- 7 unknown

Table 2. Screening tests for couples with habitual abortion

I. tests for wife

1. endocrine tests

- a) glucose tolerance test or glycosylated hemoglobin levels
- b) thyroid function test : T3, T4, TSH
- c) luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin, TRH test, midluteal plasma progesterone

2. immunological screening : antinuclear antibody,

- anti SS-A antibody, anti SS-B antibody, lupus anticoagulant, anticardiolipin antibody, β_2 GP I

3. coagulation test : aPTT, PT, α_2 PIC, TAT

4. Uterine disorders : hysterosalpingogram, hysteroscopy

5. Infection : chlamydia, toxoplasmosis, cytomegalovirus, rubella virus, herpes simplex virus

II. tests for couples

1. karyotype

2. HLA typing

TRH: thyrotrophin releasing hormone

Table 3. Schedule of immunotherapy

	Immunotherapy				
	1st	2nd	3th	4th	8
weeks from commencement of immunotherapy	0	2	4	6	8
immunotherapy	●	●	●	●	●
anti HLA antibody	●				●
NK activity	●		●		●

反応性をみて産生された抗 HLA 抗体の抗原特異性を検討した。なお、抗 HLA 抗体の産生は治療開始 8 週後（免疫療法 4 回目終了後 2 週間後）の採血時に判定した。

これらの方法により免疫療法後の妊娠についてその妊娠継続率、抗 HLA 抗体産生率、抗 HLA 抗体の産生と夫婦間の HLA 共有抗原数の関係や抗 HLA 抗体の抗原特異性を検討した。

2. 免疫療法による NK 活性の変化の検討

2-1 対象

1988 年 12 月より 1999 年 6 月までの 8 年間に当院

で習慣流産のために夫リンパ球による免疫療法を施行した 61 例のうち NK 活性を測定した 34 例を対象とした。なお、免疫療法の対象症例は習慣流産の原因をスクリーニング検査し、原因不明の症例に対して免疫療法を行った。

2-2 NK 活性

NK 活性は、凍結保存したリンパ球を一括して解凍し、⁵¹Cr 遊離法にて測定した。解凍したリンパ球を 2×10^5 個 /well に調整したものをエフェクター細胞とし、 3.7×10^5 Bq の ⁵¹Cr にてラベルした K562 細胞をターゲット細胞 (1×10^4 個 /well) として両細胞を

96wellのU底プレートに植え込み、37℃下4時間インキュベーションした。その後、上清をガラスフィルターにて回収し、ガンマーカウンターで放射活性を測定した。細胞障害率は以下の式で求めた。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{各実験遊離 (cpm)} - \text{自然遊離 (cpm)}}{\text{最大遊離 (cpm)} - \text{自然遊離 (cpm)}} \times 100$$

NK活性は、治療前・治療中(治療開始4週後)・治療後(治療開始8週後)に測定し、その変動を調べた。さらに夫婦間のHLA抗原の共有性とNK活性の変化についても比較、検討した。なお、NK活性値は、E (effector) / T (target) 比20:1の値とした。

また、習慣流産患者群では末梢血NK活性値が41.0%以上の症例では次回妊娠予後が不良という報告¹³⁾を基にNK活性値を41%以上を基準値とした。

3. 統計学的検討

統計学的検討は χ^2 およびt検定により行なわれ、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成績

1. 習慣流産に対する免疫療法における抗HLA抗体の産生とNK活性について

1-1 対象症例の妊娠の転帰 (Table 4)

免疫療法施行者51例中、未妊娠症例15例を除いた36例の41妊娠について妊娠継続率を検討した。41妊娠中32妊娠が継続し、妊娠継続率は78.0%であった。流産率は22.0%で、いずれも初期流産であった。

1-2 抗HLA抗体の産生率および妊娠転帰 (Table 4)

抗HLA抗体はいずれの症例も免疫療法前には検出されていなかったが、治療後は51例中26例/51.0%に出現した。

免疫療法後の抗体産生の有無と妊娠転帰を比較すると、抗体陽性者では妊娠継続率が72.7% (16/22)、抗体陰性者では84.2% (16/19)となり、両者間に有意差はなかった。

1-3 夫婦間のHLA抗原の共有性と抗HLA抗体の産生との関連 (Table 5)

- 夫婦間のHLA A抗原の共有性と抗HLA抗体の産生において有意差は認められなかった。
- 夫婦間のHLA B抗原について、少なくとも一つ以上共有した夫婦において抗HLA抗体は有意に($p = 0.02$)産生しにくかった。
- 夫婦間のHLA DR抗原およびDRB1抗原の共有性と抗HLA抗体の産生において有意差は認められなかった。
- 夫婦間のHLA B抗原およびDR抗原について、それぞれ少なくとも一つ以上共有した夫婦において抗HLA抗体は有意に($p = 0.02$)産生しにくかった。

1-4 抗HLA抗体の特異性 (Table 6)

抗HLA抗体はHLA A抗原に対する特異性を示した症例が16例(61.5%)、HLA B抗原に対する特異性を示した例が2例(7.7%)であった。HLA A抗原に対する特異性のある例がより多い傾向にあった。

2. 免疫療法によるNK活性の変化

2-1 免疫療法前後におけるNK活性の平均値の変化 (Fig. 1)

免疫療法前と比較して、免疫療法中(治療開始4週後)のNK活性は有意に($p = 0.0498$)低下した。しかし、治療後(治療終了後2週間)にはNK活性の低下に有意差は認められなかった。

2-2 免疫療法後の妊娠の転帰とNK活性の変化

- 免疫療法後の妊娠の転帰
免疫療法前、免疫療法中、免疫療法後に、NK活性を測定しえた34例中、24例が妊娠した。そのうち、妊娠継続例は20例(83.3%)、流産例は4例(16.7%)であった。

Table 4. Production of anti HLA antibody and the outcome of pregnancy according to anti HLA antibody

	anti HLA antibody				total	%
	positive	%	negative	%		
No of cases without pregnancy	6		9		15	
No of cases with pregnancy	20		16		36	
subsequent pregnancies	22		19		41	
live births	16	72.7	16	84.2	32	78.0
subsequent abortions	6	27.3	3	15.8	9	22.0
anti HLA antibody	26	51.0	25	49.0		

Table 5. Correlation between the number of shared HLA antigen in couples and production of anti HLA antibody

HLA antigen shared	HLA A antigen	HLA B antigen	HLA DR antigen	HLA DRB1 antigen	HLA B and DR antigen
0	12/18 (66.7%)	23/37* ¹ (62.2%)	16/27 (59.3%)	19/33 (57.6%)	24/42* ² (59.5%)
1 or 2	14/33 (42.4%)	3/14* ¹ (21.4%)	10/24 (41.7%)	7/18 (38.9%)	1/9* ² (11.1%)

*1-*1 : p<0.05

*2-*2 : p<0.05

Table 6. Characteristics of anti HLA antibodies

	no. of cases	%
HLA A antigen	16	(61.5)
HLA B antigen	2	(7.7)
unknown	8	(30.8)

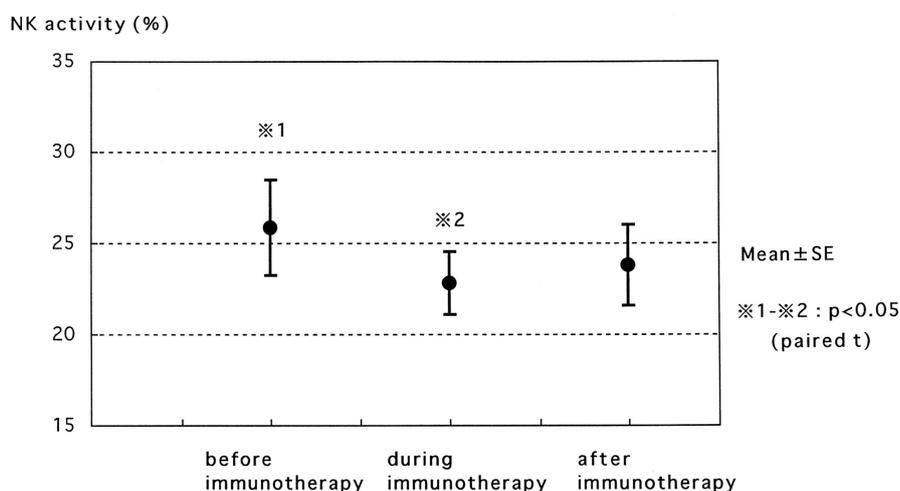


Fig. 1. Suppression of NK activity after immunotherapy (n = 34).

- b. 妊娠継続例における NK 活性の変化 (Fig. 2)
妊娠継続例では NK 活性は治療前 22.3% であったが、免疫療法中（治療開始 4 週後）には 21.4%，治療後（治療終了後 2 週間）には 21.7% を示したが、治療期間中に有意な変動はみられなかった。
- c. 流産例における NK 活性の変化 (Fig. 2)
流産例では、NK 活性は治療前に 44.4% と、妊娠継続例に比し高い傾向にあった。免疫療法により NK 活性値は免疫療法中（治療開始 4 週後）28.6% へ有意に (p = 0.0118) 低下した。また、治療前と比較して治療後（治療終了後 2 週間）においても引き続き 32.4% へ有意に (p = 0.0252) 低下した。しかし、流産例では妊娠継続例と比較して免疫療法後も NK 活性は高い傾向を示した。
- d. 流産となった 4 症例の NK 活性の検討 (Table 7)
流産となった症例のうち、2 例は免疫療法前に特に NK 活性が高値を示した。4 例中 3 例は

治療中に NK 活性値が 41.0% 以下になったが、1 例は免疫療法を施行して 41.0% 以上を示した。しかし、治療中 2 例においては免疫療法を施行しても NK 活性は低下したものの、依然高値を示していた。

- e. NK 活性値による妊娠予後の検討 (Table 8)
免疫療法前の NK 活性値によりカットオフ値を 3 通りにした 2 グループに症例を分類し流産率を検討したが、有意差は認めなかった。また、免疫療法中（治療開始 4 週後）の NK 活性値による検討でも同様であった。

2-3 夫婦間の HLA 抗原の共有性と NK 活性の平均値の変化

- a. 夫婦間で HLA B 抗原を共有していない場合、NK 活性は治療前から治療中にかけて有意に (p = 0.008) 低下した。しかし、治療後には

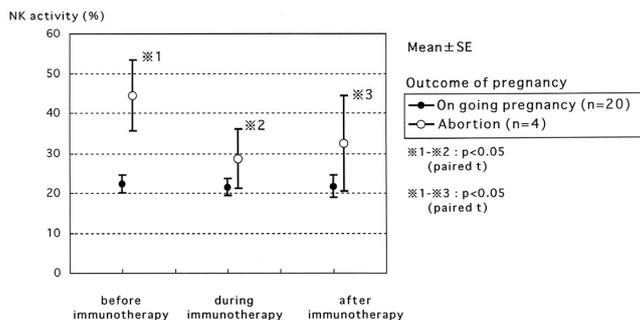


Fig. 2. Suppression of NK activity after immunotherapy according to outcome of pregnancy.

Table 7. NK activity in four cases resulted in spontaneous abortion

Case	before immunotherapy	during immunotherapy	after immunotherapy
1	61.8	36.6	55.4
2	26.2	9.1	14.0
3	32.7	25.3	10.0
4	56.8	43.2	50.0

Table 8. Prognosis of pregnant cases according to NK activity

I. NK activity before immunotherapy										
NK activity (%)	total	No of cases		No of cases		No of cases		No of cases		P value
		without pregnancy	with pregnancy	aborted	%	on going pregnancy	%			
1	overe 41.0%	5	2	3	2	(66.7)	1	(33.3)	N.S	
	under 41.0%	29	8	21	3	(14.3)	18	(85.7)		
2	overe 35.0%	6	2	4	2	(50.0)	2	(50.0)	N.S	
	under 35.0%	28	8	20	2	(10.0)	18	(90.0)		
3	overe 30.0%	9	3	6	3	(50.0)	3	(50.0)	N.S	
	under 30.0%	25	7	18	17	(94.4)	1	(5.6)		

II. NK activity during immunotherapy										
NK activity (%)	total	No of cases		No of cases		No of cases		No of cases		P value
		non pregnant women	pregnant women	abortion	%	successful case	%			
1	overe 41.0%	2	1	1	1	(100.0)	0	(0.0)	N.S	
	under 41.0%	32	9	23	3	(13.0)	20	(87.0)		
2	overe 35.0%	5	1	4	2	(50.0)	2	(50.0)	N.S	
	under 35.0%	29	9	20	2	(10.0)	18	(90.0)		
3	overe 30.0%	6	1	5	2	(40.0)	3	(60.0)	N.S	
	under 30.0%	28	9	19	2	(10.5)	17	(89.5)		

NK 活性の低下に有意差は認められなかった (Fig. 3).

- b. 夫婦間で HLA DR 抗原を共有していない場合では、NK 活性は治療前から治療中にかけて有意に (p = 0.046) 低下した。しかし、治療後には NK 活性の低下に有意差は認められなかった (Fig. 4).
- c. 夫婦間で HLA DRB1 抗原を共有していない場合には、NK 活性は治療前から治療中にかけて有意に (p = 0.016) 低下した。しかし、治療後には NK 活性の低下に有意差は認められなかった (Fig. 5).

- d. 夫婦間で HLA B および DR 抗原を各々少なくとも一つ以上共有している場合では、症例数は 3 例と少ないものの、NK 活性は治療前から治療後にかけて有意に (p = 0.020) 低下した (Fig. 6).

考 察

自然流産は全妊娠の約 10% に認められ、主な原因として胎児側の要因が多いといわれている。たとえば、初期流産組織の染色体分析では約 60 - 70% もの高率に染色体異常が認められ²⁰⁾、自然流産の多くは染色体異常などを持つ受精卵に対する自然淘汰現象と考えら

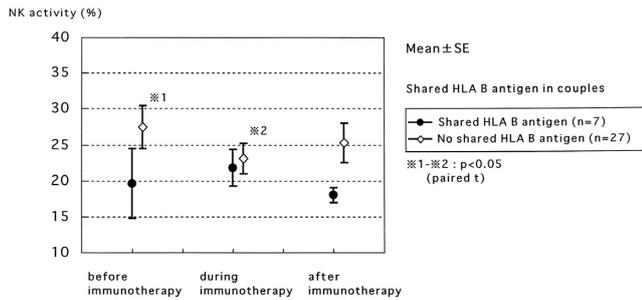


Fig. 3. Suppression of NK activity after immunotherapy according to shared HLA B antigen in couples.

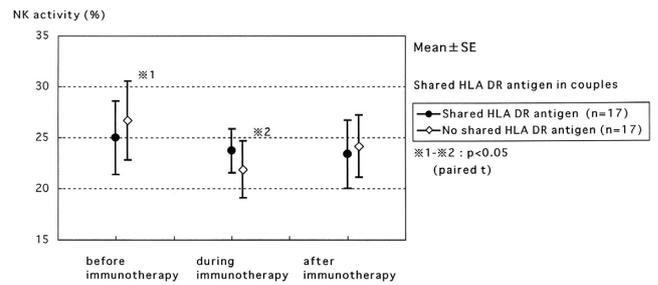


Fig. 4. Suppression of NK activity after immunotherapy according to shared HLA DR antigen in couples.

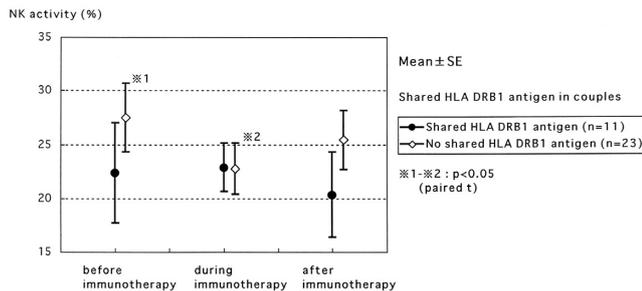


Fig. 5. Suppression of NK activity after immunotherapy according to shared HLA DRB1 antigen in couples.

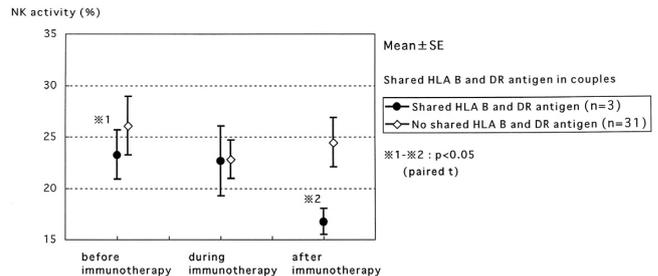


Fig. 6. Suppression of NK activity after immunotherapy according to shared HLA B and DR antigen in couples.

れている。ところが、流産が連続的に繰り返されるときは、散発性流産と異なる何らかの原因が夫婦間に潜んでいる可能性が考えられる。

習慣流産の原因として、これまでに Table 1 に示すような多くの要因が考えられている。また、その診断のために Table 2 に例を示すようなスクリーニング検査が用いられている。ここでは、原因不明の習慣流産と診断し、本論文の対象例とするために必要な事項についてまず簡単に述べる。

第一に、妊娠が成立し継続する場である子宮に異常がある。双角子宮や中隔子宮等の子宮奇形や子宮筋腫等による子宮内腔の変形により物理的に流産に至ることが知られており、その頻度は習慣流産患者の 10-20%といわれる^{1,21,22)}。

次に、遺伝的な問題がある。これは、夫婦のどちらかの染色体異常があり、そのために配偶子である卵子あるいは精子に遺伝情報の量的異常をきたし、習慣流産に至る。具体的には、様々なタイプの転座保因者などがある。この頻度は 4-8.5%とされている^{1,21,23)}。

第三に、母体の内科的疾患があげられる。頻度の高い内科的疾患としては、糖尿病、甲状腺機能亢進症、自己免疫疾患等がある。これらの疾患は、時として、習慣流産を主訴として産婦人科を受診し、検査により初めて診断される症例もある。特定の原因が明らかになった場合はそれに対する特異的な治療法を施行する。

特に、近年、自己免疫疾患については、習慣流産との関連について特に注目されている。自己免疫疾患を合併した妊娠は、流産や子宮内胎児死亡、あるいは子宮内胎児発育遅延の発症頻度が高いこと^{20,24)}が従来から知られていた。しかし、習慣流産や不育症の原因の一つとして、抗リン脂質抗体症候群を代表とする自己免疫異常が注目されている^{1,20-22,24-26)}。

第四に、生殖内分泌学的原因が考えられる。受精から着床さらに妊娠維持にとって黄体により産出される黄体ホルモンは必要不可欠なホルモンである。黄体ホルモンの減少や産生期間の短縮あるいは黄体ホルモンに対する子宮内膜の反応性の低下は妊娠初期の流産を来たすことが知られている^{21,22)}。すなわち、いわゆる、黄体機能不全は習慣流産の原因となる。また、高プロラクチン血症や潜在性高プロラクチン血症も黄体機能不全を示すことから、間接的に習慣流産の原因となる可能性^{1,21,22)}が示唆される。

第五の原因として、トキソプラズマ感染症、風疹、サイトメガロウイルス感染症、ヘルペスウイルス感染症といった TORCH 症候群やクラミジア感染症が習慣流産に関与する可能性が考えられている^{21,22)}。

このように習慣流産の原因は多岐にわたっており、習慣流産患者に対して Table 2 に示したスクリーニング検査を系統的に行うことが必要である。しかし、実際にはこれらの原因では説明しがたい、原因不明の

習慣流産が存在する。そして、このような原因不明の習慣流産患者の中に、「母児間の免疫反応がうまく作動しないことにより発生する同種免疫異常による習慣流産が存在する」という仮説が考えられた。

このため、われわれは2回以上の反復流産症例を対象として、流産原因を検索し、原因が明らかになった症例に対して各種治療を試みて、その成績を報告してきた¹⁾。

他方、妊娠の維持に関する免疫学的メカニズムに関しては様々な検討がなされてきた。たとえば、従来、妊娠維持のためには母体免疫系が抑制されるためと考えられてきた。しかし、妊娠子宮においては母体免疫系が活性化している部分があることが示され^{27,28)}、これら免疫担当細胞が担当するサイトカインの中に胎児成長に有利に働くものや流産に結びつくものがあること、胎児はサイトカインのバランスに影響を与え細胞性免疫を抑制し、液性免疫優位の状態にしていること、細胞性免疫優位の状態ではNK細胞、T細胞による胎児への攻撃により流産にいたることなどが報告²⁹⁻³¹⁾された。つまり、正常妊娠においては胎児に対する細胞性免疫は抑制されており、液性免疫が優位に関与している。また、Th1/Th2バランスにおいてはTh2が優位になることで妊娠が維持されていると考えられている。ところが、近年、反復流産患者において、末梢血のNK活性値が高い¹³⁾あるいはNK細胞数が増加している³²⁾、Th1/Th2比が高い³³⁾、CD16⁺NK細胞が増加し、CD16⁻CD56^{bright}NK細胞が減少している¹⁴⁾、とする報告がなされている。また、同様に、子宮脱落膜においてもCD16⁻CD56^{bright}NK細胞が減少し、CD16⁺NK細胞が増加している¹⁵⁾ことが報告された。すなわち、反復流産患者においてはTh1/Th2比においてTh1優位になっている可能性が考えられる。

原因不明の習慣流産に対する免疫療法として1981年Taylorら³⁾およびBeerら⁴⁾の報告以来、世界的に夫リンパ球あるいは第三者白血球免疫療法が施行されている。当科では当初2回以上の原因不明の習慣流産患者を対象としたが、その後、1993年からは3回以上の原因不明の習慣流産患者に対して施行してきた。しかし、免疫療法の有効性については免疫療法の適応、治療対象の選択基準が一定でないことから未だに評価が一定していない。

1993年免疫療法に関する世界規模の共同研究が行なわれ、全ての治療方法を全て総括した場合においても治療群では対象群に比し約1.2倍の生児獲得率が得られ、有効であることが示された³⁴⁾。さらに、詳細な検討では生児出産歴がなく、抗核抗体等の自己抗体陰性、抗夫リンパ球抗体という抗HLAアロ抗体がない患者における治療群では対照群に比し約1.5倍の生児獲得率が得られることが明らかにされた³⁵⁾。

しかし、依然として免疫療法のメカニズムについて

は不明な点が多く、治療効果を適切に判定する手段として有効な検査については合意が得られていない。

抗HLA抗体は免疫療法の治療効果を判定したり、妊娠予後を推定する一助となるかどうかは未だ議論の多いところである。そこで、われわれは夫リンパ球による免疫療法によって産生される抗HLA抗体にまず着目し、抗HLA抗体と妊娠継続率について検討を行った。これまで、抗HLA抗体の産生と妊娠の継続率に関する報告として、抗HLA抗体の産生が見られた症例において次回の妊娠継続率が上がるとする報告^{9,34)}、抗HLA抗体は妊娠継続率に寄与しないとする報告^{10,11,36)}、抗HLA抗体により妊娠継続率が低下する報告^{37,38)}など様々である。今回のわれわれの検討では、抗HLA抗体の産生の有無は妊娠継続率に影響を与えなかった。

次に、免疫療法を施行した夫婦間のHLA抗原の共有数と抗HLA抗体産生の有無の関係について検討した。Lagaaij等の心臓、腎移植後の抗HLA抗体の産生の検討では、抗HLA抗体の産生はHLA DR抗原の一致しない症例で有意に多く産生されるという³⁹⁾。しかし、HLA抗原共有数と抗HLA抗体の産生に関する別の報告^{9,37)}では、Kilpatrick⁴⁰⁾等の抗HLA抗体産生とHLA B8の関連に関する報告を除いて、HLA抗原共有数と抗HLA抗体の産生の間に一定の相関を認めなかった。今回のわれわれの検討では、抗HLA抗体産生の有無とHLA DR抗原共有数の関係に有意差は認めなかった。一方、抗HLA抗体を産生した例では夫婦間のHLA B抗原を共有しない場合あるいはHLA BおよびDR抗原を共有しない場合に有意に多く、共有する場合は抗体を産生する例は有意に少なかった($p=0.022$)。すなわち、抗HLA抗体の産生は妊娠継続率と関係がなく、むしろ夫婦間のHLA抗原の共有度に影響される可能性が示唆された。つまり、抗HLA抗体の産生を検討することのみでは免疫療法の有効性評価の指標とはなり得ないと考えられる。

抗HLA抗体の特異性の検討では、抗体産生者26例中16例(61.5%)にHLA A抗原に対する特異性が認められた。また、夫婦間でHLA B抗原を共有しない時に産生された抗HLA抗体の特異性がHLA B抗原ではなく、A抗原に対するものであったことも明らかになった。これらのことから、同じHLA class I抗原でありながらHLA A抗原とB抗原では、抗HLA抗体産生における役割が異なることが示唆された。

免疫療法の治療効果は、II型ヘルパーT細胞優位の状態に誘導することによるとする考え方がある³¹⁾。あるいは、免疫療法により、免疫学的寛容の状態を誘導することによると説明される場合がある¹²⁾。また、免疫療法を行なうことにより末梢血NK活性は低下すること^{41,42)}やTh1/Th2比が健常者に比し有意に高い習慣流産群においてもTh1/Th2比は低下すること

が報告されている^{33, 43)}。さらに、免疫療法は NK 活性を低下させ、Th1 優位の状態から Th1 を低下させ、Th1/Th2 を低下させ正常化することが示唆される⁴²⁾。つまり、習慣流産患者においては Th1/Th2 比が高いが免疫療法により Th1/Th2 比が低下し、正常化することにより、妊娠維持に有利な方向に働く可能性があると考えられる。

さらに、免疫療法の予後を検討すると、免疫療法により NK 活性が低下した群では次回妊娠の予後が良く⁴⁴⁾、免疫療法を施行したにもかかわらず NK 活性の低下しない群では次回の妊娠維持ができないことが多いと報告されている⁴⁵⁾。

今回の検討では、免疫療法により NK 活性が有意に治療経過中に低下し、Th1/Th2 比が低下した可能性が考えられる。治療後も流産となった群においては治療前の NK 活性は妊娠が維持された群に比し治療前から高値を示しており、治療経過中、治療後において有意に低下しているものの、なお妊娠継続群より高値を示していた。流産になった 4 例の個々の検討では、2 例においては NK 値は正常範囲内に低下したが、1 例においては NK 活性は 43.2% と高値を示していた。すなわち、NK 活性の高い例では妊娠継続率が低いことは明らかであるが、免疫療法により NK 活性が低下しただけでは、必ずしも妊娠継続につながる訳ではないことが示唆される。流産症例の絨毛染色体検査は施行していないため、今回の検討のみで胎児側の流産は否定できないが、いずれにせよ今回の検討のみで免疫療法が有効か無効か判断できるものではない。しかし、前述した他の報告からも、これら習慣流産群に対する現在の免疫療法のみでは治療効果が不十分である可能性が高い。一方、このような NK 活性の高い症例に ITP 等の自己免疫疾患の治療薬に用いられる γ グロブリン大量静注療法が NK 細胞レベルや NK 活性を低下させるという報告⁴⁶⁻⁴⁸⁾があること、子宮内膜症の治療薬であるダナゾールにより NK 活性が低下することが報告されており^{49, 50)}、異なるアプローチによる治療法として、今後検討する必要がある。

一般に、同種輸血においては NK 活性等の細胞性免疫が低下することが知られている。白血球を除去していない同種輸血を行なうと、末梢血 NK 活性は術後 4 週間まで低下しつづけることが知られている⁵¹⁾。免疫療法では、夫リンパ球を分離し皮内注射するが、この方法でも同種輸血と同様に、末梢血 NK 活性値は低下した。習慣流産に対する免疫療法がはじめられた当初は同種輸血で行なわれていたが、この結果からも、現在行なわれているリンパ球免疫によっても、NK 活性に対する効果は同等であるといえる。

今回の検討では免疫療法による抗 HLA 抗体の産生について、夫婦間の HLA B 抗原あるいは HLA B および DR 抗原各々一つ以上を共有している場合、抗体産

生はされ難い。一方、共有していない場合に抗体は比較的産生されやすい。また、NK 活性についてみると、夫婦間の HLA 抗原の共有にかかわらず低下する傾向を認めたが、特に、HLA B, DR, DRB1 抗原を一つも共有しない夫婦間では、治療中に有意に NK 活性は低下した。HLA B, DR 抗原を共有しない場合は、抗 HLA 抗体は産生されやすく、NK 活性等の細胞性免疫は抑制され、治療により Th1/Th2 比が抑制されるという報告^{33, 42, 43)}とも符合するものである。一方、例数は 3 例と少ないが、夫婦間の HLA B, DR 抗原を少なくとも一つ以上共有している場合は、治療後（治療終了 2 週間後）に NK 活性値は有意に低下した。このことは、同種輸血においては donor/recipient の関係において HLA B および DR 抗原を共有すると、CTL (cytotoxic T lymphocyte) が誘導されないことが知られており^{52, 53)}、今回の検討から、夫リンパ球免疫療法においても同種輸血と同様に CTL が抑制されている可能性がある。

同種免疫による NK 活性値の低下の誘導は HLA 抗原共有度により異なる機序により引き起こされて可能性がある。

妊娠予後についてみると、免疫療法前の NK 活性値の高い症例、および免疫療法を施行したにもかかわらず高い NK 値を示す場合は、次回妊娠において流産となる可能性が高い。しかし、NK 活性値に一定のカットオフ値を設定しても、妊娠予後を予測することは困難であった。すなわち、免疫療法が NK 活性に影響を及ぼすことは明らかであるが、妊娠の予後を決定する要因は NK 活性のみではないことが同時に示唆された。

今回の検討においても、流産になった 4 例中 2 例は免疫療法により NK 活性は低下しており、胎児側の因子が否定できていないものの、少なくとも NK 活性については治療が有効であったといえる。しかし、妊娠継続のための治療として有効でなかったと言わざるを得ない。また、同種免疫異常による習慣流産の中に、免疫療法無効の例が含まれることが知られ²⁴⁾、今後、原因不明習慣流産例をさらにサブグループに分類し対応していくことで、免疫療法の効果が正確に評価されていくものと思われる。

以上をまとめると今回の検討で、免疫療法による抗 HLA 抗体の産生は、夫婦間の HLA B あるいは B 抗原および DR 抗原が少なくとも一個以上共有した場合に産生されがたいことが明らかとなった。また、免疫療法により末梢血 NK 活性は夫婦間の HLA 抗原共有の有無にかかわらず、治療前に比較し治療中には有意に低下することが明らかになった。

妊娠予後については、免疫療法前の NK 活性値の高い症例および免疫療法を施行したにもかかわらず高い NK 値を示す場合、次回妊娠において流産となる可能性が高い傾向があった。また、このような症例におい

では現在の免疫療法のみでは治療効果が不十分と考えられた。NK活性の測定は原因不明の習慣流産患者をさらにサブグループに分類して治療方針を立てる上で有用な指標となる可能性が示唆された。

結 論

今回の検討から、抗HLA抗体産生は夫婦間のHLA共有に関連するが、妊娠予後には影響しない可能性が示唆された。また、NK活性は免疫療法により夫婦間のHLA抗原共有にかかわらず低下し、このことにより習慣流産歴を有した一部の患者に対して初期妊娠維持に寄与する可能性が示唆された。また、NK活性の測定は、原因不明の習慣流産患者をさらにサブグループに分類して治療方針を立てる上で有用な指標となる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました埼玉医科大学総合医療センター産婦人科学教室竹田省教授に深謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、直接御指導を頂きました同輸血部前田平生教授、埼玉医科大学産婦人科石原理教授に深謝いたします。HLAタイピングおよび抗HLA抗体検査を御指導いただきました同輸血部平田蘭子技師、NK活性測定を御指導いただきましたBML西本徹技師に深謝いたします。

文 献

- 1) 齊藤正博, 石原理, 林直樹, 荒井邦子, 竹田省, 木下勝之, 他. 反復流産カップルにおけるスクリーニング検査と治療成績の検討. 日本不妊学会誌 1998;43:186-93.
- 2) Komlos L, Zamir R, Joshua H, Halbrecht I. Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol* 1977;7:330-5.
- 3) Taylor C G, Faulk W P. Prevention of recurrent abortion by leukocyte transfusions. *Lancet* 1981;2:142-9.
- 4) Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:987-99.
- 5) 中塚幹也, 錦織恭子, 長谷川淳, 平野由紀夫, 片山隆章, 野間純, 他. 習慣流産の免疫前後における免疫学的変化について. 日本不妊学会誌 1993;38:72-9.
- 6) Takakuwa K, Goto S, Hasegawa I, Ueda H, Kanazawa K, Takeuchi S, et al. Result of immunotherapy on patients with unexplained recurrent abortion: A beneficial treatment for patients with negative blocking antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 1990;23:37-41.
- 7) 青木耕治, 松本祐人, 辻朝子, 尾崎康彦, 梶浦詳二, 金原敏弘, 他. 原因不明習慣流産患者に対する免疫療法の安全性に関する検討. 日不妊会誌 1992;44:405-11.
- 8) Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, Reginald PW, Underwood JL, Beard RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal cells. *Lancet* 1985;1:941-3.
- 9) Carp HJ, Toder V, Gazit E, Orgad S, Mashiach S, Nebel L, et al. Immunization by paternal leukocytes for prevention of primary habitual abortion: Results of a matched controlled trial. *Gynecol Obstet Invest* 1990;129:16-21.
- 10) 齊藤正博, 竹田 省, 関 博之, 木下勝之, 坂元正一. 習慣流産に対する免疫療法について. 日本産婦人科学会埼玉地方部会誌 1990;20:87-9.
- 11) 齊藤正博, 石原理, 関博之, 竹田省, 木下勝之, 平田蘭子, 他. 反復流産症例に対する免疫療法と抗HLA抗体の産生について. 日本不妊学会誌 1997;42:83-9.
- 12) Tafuri A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 1995;270:630-3.
- 13) Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-2.
- 14) Emmer PM, Nelen WLD, Steegers EAP, Hendriks JCM, Veerhoek M, Joosten I. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56^{pos}CD16^{pos} cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Human Reprod* 2000;15:1163-9.
- 15) Lachapelle MH, Miron P, Hemmings RH, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol* 1996;156:4027-34.
- 16) Maeda H, Juji T. A new B-cell alloantigen, TB21, coded for in the HLA-D/DR region. *Tissue Antigens* 1982;20:327-34.
- 17) 平田蘭子, 前田平生. 抗血清によるHLAタイピングの方法. *Medical Technology* 1993;21:659-64.
- 18) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-70.

- 19) Ota M, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H. HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 1992;39:187-202.
- 20) 牧野恒久, 和泉俊一郎, 杉俊隆. 新女性医学体系 第 15 卷 不育症. 東京: 中山書店; 1998. p. 38-47.
- 21) 八神喜昭 花田征治. 不育症の治療法. 産婦人科治療 1995;70:62-6.
- 22) 牧野恒久, 根本泰子, 細川知俊, 染谷健一, 岩崎真也, 野澤志朗. 不育症. *Perinatal Care* 1995; 14:23-8.
- 23) 藤本征一郎. 不育症 (習慣性流死産) と染色体異常. 産婦人科の世界 1987;39:519-26.
- 24) 青木耕治. 新女性医学体系 第 15 卷 不育症. 東京: 中山書店; 1998.p.274-87
- 25) Scott JR, Rote NS, Branch DW. Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 1987;70:654-6.
- 26) 河野雅洋. 不育症婦人における自己抗体に関する研究. 日本産婦人科学会誌 1994;46:1205-12.
- 27) Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, et al. Accumulation of CD16⁻CD56⁺ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1991;3:743-50.
- 28) Saito S, Nishikawa K, Morii T, Narita N, Enomoto M, Ichijo M. Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor alpha (IL-2R α) and IL-2R β on T cells of human decidua at early stage of pregnancy. *Immunology* 1992;75:710-2.
- 29) Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, et al. Cytokine production by CD16⁻CD56^{bright} natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1993;5:559-63.
- 30) Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-Helper 1-Type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995;273:1933-6.
- 31) Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interaction in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
- 32) Beer AE, Kwark JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in fertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:376-82.
- 33) Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, Itoh T, Ishii M, Kanaeda T, Nagai N, et al. Effects of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th1/Th2 balance and TCR V β and V γ repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2000;43:107-15.
- 34) The recurrent miscarriage immunotherapy trialists group. Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogeneic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:55-72.
- 35) Daya S, Gunby J, The recurrent miscarriage immunotherapy trialists group. The effectiveness of allogeneic leukocyte immunization in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. *Recurrent miscarriage immunotherapy. Am J Reprod Immunol* 1994;32:294-302.
- 36) Hwang JL, Ho HN, Yang YS, Hsieh CY, Lee TY, Gill TJ 3rd. The role of blocking factors and antipaternal lymphocytotoxic antibodies in the success of pregnancy in patients with recurrent spontaneous abortion. *Fertil and Steril* 1992;58:691-6.
- 37) Smith JB, Cowchock FS. Immunological studies in recurrent spontaneous abortion: effects 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* 1988;14:99-113.
- 38) Unander AM. The role of immunization treatment in preventing recurrent abortion. *Transfusion Medical Reviews* 1992;6:1-16.
- 39) Lagaaij EL, Hennemann IP, Ruigrok M, de Haan MW, Persiji GG, Termijtelen, et al. Effect of one-HLA-DR-antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *N Engl J Med* 1989;32:1701-5.
- 40) Kilpatrick DC, Liston WA. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion and its relevance to leukocyte immunotherapy. *Hum Reprod* 1993;8:1645-9.
- 41) Kwak JYH, Gilman-Sachs A, Moretti M, Beaman KD, Beer AE. Natural killer cell cytotoxicity and paternal lymphocyte immunization in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:352-8.
- 42) Gafter U, Sredni B, Segal J, Kalechman Y. Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion. *J Clinical Immunology* 1997;17:408-19.
- 43) 早川智. 母体リンパ球の Th1/Th2 均衡と活性化異常からみた妊娠異常の解析. 日本産婦人科学会誌 1999;51:626-32.

- 44) Makida R, Minami M, Takamizawa M, Juji T, Fujii T, Mizuno M. Natural killer cell activity and immunotherapy for recurrent spontaneous abortions. *Lancet* 1991;338:579-80.
- 45) Higuchi K, Aoki K, Kimbara T, Hosoi N, Yamamoto T, Okada H. Suppression of natural killer cell activity by monocytes following immunotherapy for recurrent spontaneous aborters. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:221-7.
- 46) Kwak JYH, Kwak FMY, Ainfinder SW, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively down regulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J reprod Immunol* 1996;35:363-9.
- 47) Ruiz JE, Kwak JYH, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Kim YB, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:370-5.
- 48) Ruiz JE, Kwak JYH, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Kim YB, et al. Effect of intravenous immunoglobulin G on natural killer cell cytotoxicity in vitro in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 1996;31:125-41.
- 49) 猿渡善治, 星合昊. 原因不明の習慣流産に対するダナゾールの治療効果に関する検討. *産婦人科の世界* 2001;53:985-8.
- 50) 猿渡善治, 笠野有里, 堀井高久, 星合昊, 野田起一郎. 外性子宮内膜症のダナゾール治療における免疫パラメーターの推移と治療効果についての検討. *エンドメトリオーグス研究会会誌* 1991;12:87-90.
- 51) Jensen LS, Anderson AJ, Christiansen PM, Hokland P, Juhl CO, Madsen G, et al. Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *Br J surg* 1992;79:513-6.
- 52) van Twuyver, E, Mooijaart, RJ, ten Berge, IJ, van der Horst AR, Wilink JM, Kast WM, et al. Pretransplantation blood transfusion revisited. *N Engl J Med* 1991;325:1210-3.
- 53) 前田平生. 輸血による修飾. *日本輸血学会誌* 1997;43:853-61.