

習慣流産免疫療法前後の母体免疫能の変動

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

杉 俊隆 牧野 恒久 豊島 究 酒井 淳
丸山 哲夫 野澤 志朗 飯塚 理八

Maternal Immune Responses Induced by the Immunotherapy
for Patients with Recurrent Spontaneous Abortions

Toshitaka SUGI, Tsunehisa MAKINO, Kiwamu TOYOSHIMA,
Atsushi SAKAI, Tetsuo MARUYAMA, Shiro NOZAWA
and Rihachi IZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

概要 近年習慣流産患者にいわゆる免疫療法が行なわれ、著明な効果をあげているが、その作用機序は完全には解明されていない。本研究では胎児を一種の semi-allograft とみなし、免疫治療により、移植免疫におけるいわゆる生着反応と同様の機序が働くと考えてその特異的免疫抑制機構について解析した。

当院不育症外来に通院する反復流産患者に対して諸検査を施行し、免疫学的流産と思われる患者に対して夫リンパ球による免疫治療を行ない、その前後の MLC, T 細胞サブセット、抗イディオタイプ抗体の変化を調べたところ、以下の成績を得た。

1. 免疫治療前後の MLC 変動を40組について調べたところ、著明な抑制がみられ($p < 0.001$)、その平均抑制率は $50.5 \pm 25.6\%$ (mean $\pm$ SD)であつた。また、14組について第三者のリンパ球を stimulator とした系をつくり、検討したところ夫を stimulator とした場合が平均 $61.2 \pm 23.7\%$ の抑制率であつたのに対し、第三者では $34.9 \pm 42.5\%$ と有意に ($p < 0.05$) 低かつた。

2. T 細胞サブセットの変化を19症例について調べたところ、suppressor T 細胞は有意に ($p < 0.01$) 増加し、cytotoxic T 細胞は有意に ($p < 0.05$) 減少した。helper T 細胞と inducer T 細胞は、有意な変化は認められなかつた。

3. 抗イディオタイプ抗体については、フローサイトメーターを用いた二重染色法により、約5%の夫リンパ球に刺激された妻リンパ芽球に自己抗体の結合が認められ、免疫療法後妻血清中に抗イディオタイプ抗体が存在することが示唆された。

以上の結果により、免疫療法により、液性免疫についても細胞性免疫についても免疫抑制機構が働くことが示された。

Synopsis The mechanism of the beneficial effect of immunotherapy for human reproductive wastage remains to be elucidated. The induction of blocking antibodies such as anti-HLA class II antibodies and anti-idiotypic antibodies was investigated as the mechanism of specific immunosuppression in pregnancy. We reported that changes in a mixed lymphocyte culture (MLC), T-cell subsets and generation of anti-idiotypic antibodies after immunotherapy compared to before. MLC was significantly ($p < 0.001$) inhibited after the immunization. The mean inhibition rate was 50.5%, suggesting that MLC blocking antibodies were induced by immunotherapy. We demonstrated that this blocking effect was specific to the husband, because the inhibition of one-way MLC reactions which were set up with responding maternal lymphocytes and MMC-treated stimulating lymphocytes of third parties were significantly low ($p < 0.05$) compared to stimulation with paternal lymphocytes. The binding of autoantibodies to alloactivated maternal lymphoblasts against the paternal lymphocytes was detected in post-immunization cases in two-color flow-cytometric experiments. This strongly suggests that anti-idiotypic antibodies were induced by the immunotherapy. The percentage of cytotoxic T cells was significantly decreased ($p < 0.05$) and the percentage of suppressor T cells was significantly increased ($p < 0.01$) after the immunotherapy, suggesting that a cell-mediated immune response was induced by the immunotherapy.

Key words: Habitual abortion • Immunotherapy • T-cell subset • Mixed lymphocyte culture • Flow-cytometry

緒 言

近年習慣流産患者に対して、夫リンパ球を妻に皮内注射する免疫療法が行なわれ、効果をあげているが、その作用機序はいまだ完全には解明されていない。胎児は父親からの HLA 抗原を半分受け継いでおり、母体にとって免疫学的に semi-allograft であると考えられるが、正常妊娠においていかなる機構が働き、拒絶されることなく分娩に至るのかもいまだ不明の点が多い。父親由来の抗原に対して blocking antibody が産生されたり、また suppressor T 細胞が増えるなどの細胞性免疫の抑制機構が働き、胎児に有利な方向に働いているという報告がいくつかみられるが⁹⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、妊娠と同じ夫由来の抗原刺激である免疫療法においても同様のメカニズムが働き、免疫学的流産に対して効果をあげているという仮定のもとに、本研究を行ない、以下の成績を得たので報告する。

研究対象と研究方法

1. 対象

当院不育症外来に通院する、2回以上の反復流産の既往をもつ患者に対してスクリーニングテスト（表1）を施行し、免疫学的流産と判断して免疫療法の適応とされた夫婦を対象とした。

2. 免疫療法

夫のヘパリン加末梢血30mlより Ficoll-Conray 比重遠心法にてリンパ球を分離し、 $4.0 \pm 0.5 \times 10^7$ 個/ml になるように滅菌生理食塩水で濃度調整し、これを妻の上腕と前腕に6～8カ所皮内接種した。これを2～4週間隔で4回施行した。

表1 不育症スクリーニングテスト

1. 問診、基礎体温測定	9. 出血凝固系検査
2. 末梢血、血沈、血型など	10. 子宮卵管造影検査
3. 月経血培養	11. HLA 検査
4. 子宮内細菌検査	12. 染色体検査
5. ウィルス抗体価	13. 抗精子抗体、精液検査
6. 内分泌検査	※ 子宮鏡、腹腔鏡
7. 子宮内膜組織検査	※ 負荷試験
8. 血清自己抗体	(GTT, LH-RH test)

3. Mixed Lymphocyte Culture

免疫療法終了後、妻リンパ球を responder, mitomycin-C 処理した夫または第三者（男性）のリンパ球を stimulator とした一方向 Mixed Lymphocyte Culture (MLC) を施行した。MLC は、非働化した免疫療法前妻血清を加えた系と、免疫療法後妻血清を加えた系を同時に施行し、6日間培養後³H-thymidine を加え、18時間培養後取り込みをカウントし、免疫療法前後の変化を調べた。

4. T 細胞サブセット

免疫療法前後の妻の T 細胞サブセットの変化を、フローサイトメーターFACScan (Becton Dickinson, CA, USA) を用いた二重染色法で測定した。本研究では、CD8⁺+CD11b⁺ (suppressor T) 細胞、CD8⁺+CD11b⁻ (cytotoxic T) 細胞、CD4⁺+Leu8⁻ (helper T) 細胞、CD4⁺+Leu8⁺ (inducer T) 細胞の全リンパ球中に占める割合について調べた。

5. 抗イディオタイプ抗体

免疫療法により、妻血清中に抗イディオタイプ抗体が産生されることを、FACScan を用いた二重染色法により証明を試みた。まず、妻リンパ球を20%AB血清を含む RPMI 1640 medium 中で、mitomycin-C 処理した夫リンパ球を stimulator として一方向 MLC を行なつた。7日間培養後、medium を交換し、IL-2 (Electro-Nucleonics, Silver Springs, Md.) を加え、再度 mitomycin-C 処理した夫リンパ球を加えて再刺激とし、さらに7日間培養した。培養した妻リンパ芽球を回収し、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、免疫療法前後の妻血清を加え、4℃、30分間インキュベーションした。さらにPBSで洗浄した後、fluorescein-isothiocyanate (FITC) ラベル F(ab')₂ goat 抗ヒト免疫グロブリン抗体 (Organon Teknika Corp. West Chester, UK) と Phycoerythrin (PE) ラベル抗 Leu-4 (CD3, Becton Dickinson Monoclonals, Mountain View, CA) を加え、4℃、30分間インキュベーションし、FAC-

Scan にて解析した。

研究成績

1. Mixed Lymphocyte Culture

図1は免疫療法前後のMLCの変動を示したものである。40組について調べたところ、ほとんどの例で著明な抑制がみられ、その平均抑制率は $50.5 \pm 25.6\%$ (mean $\pm$ SD)であり、統計学的に有意であつた($p < 0.001$)。これは、抗HLA class II抗体や、抗イディオタイプ抗体等といった blocking antibody が免疫療法によつて産生されたことを示唆する。

また、40組中14組について夫以外の第三者の男性のリンパ球を stimulator とした系をつくり、検討したところ、夫を stimulator とした系の免疫後の平均抑制率は、 $61.2 \pm 23.7\%$ であつたのに対し、第三者を stimulator とした系では平均抑制率は $34.9 \pm 42.5\%$ と有意に($p < 0.05$)低かつた。これは、免疫療法により、夫に特異的な免疫抑制が働くことを示唆するものである。

2. T細胞サブセット

図2は免疫療法前後の suppressor T細胞と cytotoxic T細胞の変動を示したものである。それぞれ19症例について検討したところ、suppressor T細胞は免疫療法前は平均 $10.2 \pm 3.5\%$ であつたのが、免疫療法後は平均 $12.6 \pm 4.0\%$ に増加

し、対応のある場合のT検定にて有意差($p < 0.01$)が確認された。これに対して cytotoxic T細胞は、免疫療法前は平均 $19.3 \pm 6.9\%$ であつたのが、免疫療法後は平均 $16.6 \pm 6.8\%$ となり、有意に($p < 0.05$)減少した。

図3は免疫療法前後の helper T細胞と inducer T細胞の変動を示したものである。同じく19症例について検討したところ、helper T細胞は免疫療法前は平均 $11.2 \pm 3.9\%$ 、免疫療法後は平均 $13.0 \pm 5.8\%$ で、増加傾向にあるものの、対応のある場合のT検定にて有意差は認められなかつた。inducer T細胞は、免疫療法前は平均 $29.3 \pm 7.4\%$ 、免疫療法後は $27.7 \pm 7.6\%$ で減少傾向にあ

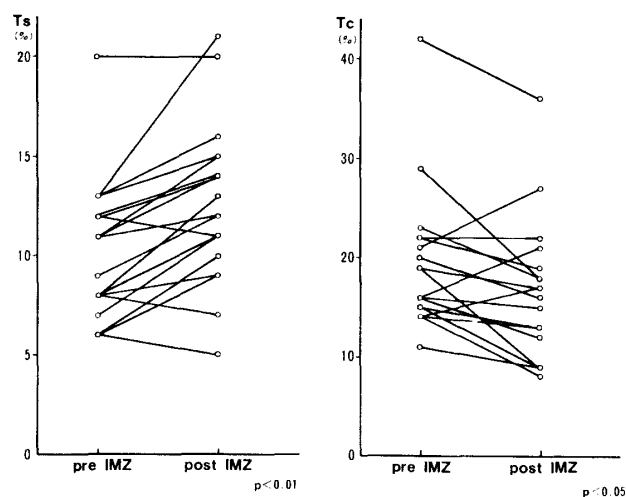


図2 免疫療法前後の suppressor T細胞, cytotoxic T細胞の変動

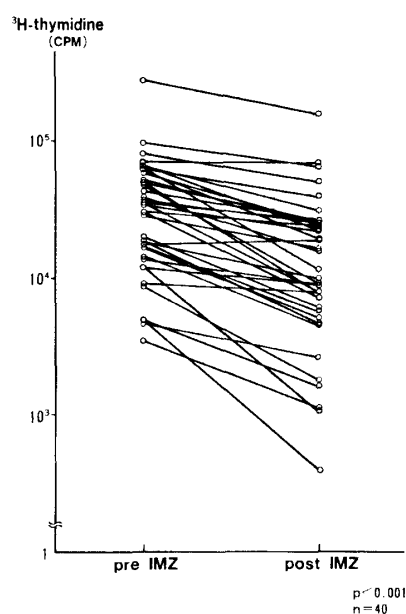


図1 免疫療法前後のMLCの変動

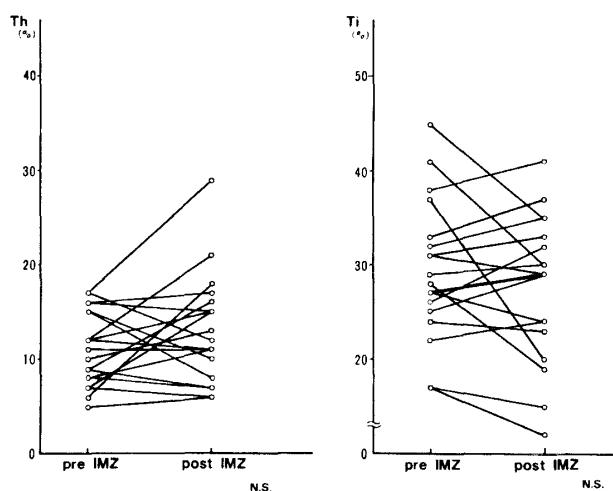


図3 免疫療法前後の helper T細胞, inducer T細胞の変動

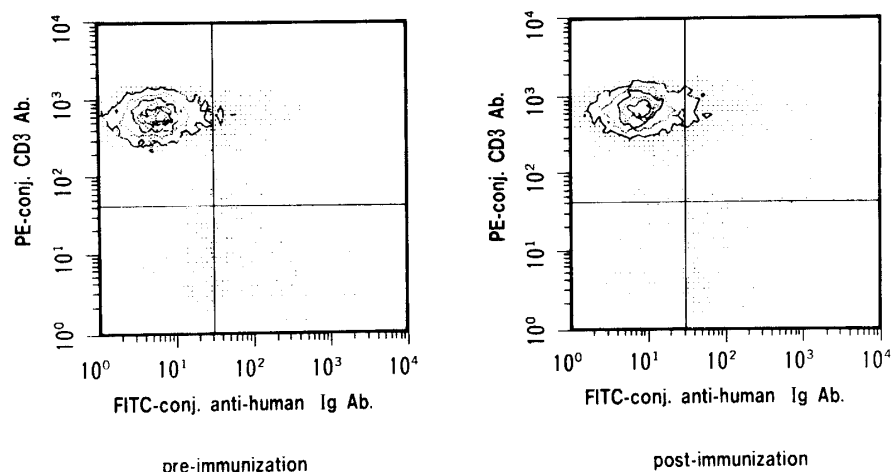


図4 免疫療法前後の抗イディオタイプ抗体

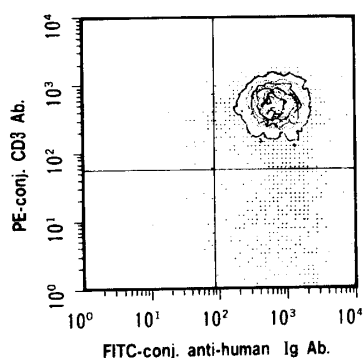


図5 positive control

るものの、同じく有意差は認められなかった。

3. 抗イディオタイプ抗体

培養して得られた妻リンパ芽球をFACSscanに流し、forward scatter および side scatter による gating をかけ、死細胞、とくに stimulator cell や、cell debris を除外して解析を行なった。図4は免疫療法前後の比較を示したものである。CD3⁺細胞群は免疫療法後に右に移動し、約5%の細胞がFITC陽性となった。これは、夫リンパ球に刺激された妻リンパ芽球に結合する自己抗体が免疫療法後妻血清中存在することを示しており、免疫療法により、妻血清中に抗イディオタイプ抗体が産生されることが示唆された。

図5は逆に mitomycin-C 処理した妻リンパ球で刺激した夫リンパ芽球を免疫療法後妻血清とインキュベーションしたものを示している。CD3⁺細胞群は明らかに右に移動している。これはこの

assay の positive control である。

考 案

近年、習慣流産患者に対して、夫リンパ球を用いた免疫療法が行なわれるようになり、当院においても1990年3月時点で393人の患者に対して免疫療法を施行し、79.2%の成功率をあげている。また、ヒトだけでなく、マウスやウマにおいても夫リンパ球による免疫が流産を阻止することは明らかである⁷⁾¹¹⁾。しかしながら、免疫療法の作用機序はいまだ完全には解明されていない¹⁴⁾。母体にとって胎児は免疫学的には異物であり、semi-allograft と考えられる²⁾⁸⁾⁹⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。もちろん、feto-placental barrier の存在など、臓器移植とは根本的に異なる点もあるが、免疫学的には習慣流産の免疫療法は腎臓移植等の前に行なわれる donor specific transfusion (DST) に非常によく似ていると考えられる。DST は、臓器移植における拒絶反応を劇的に減少させるが、そのDSTの作用機序もまだ完全には解明されていない。しかし、抗イディオタイプ抗体や suppressor cells の誘導が一つの機序であるという報告もみられる⁵⁾¹³⁾²⁰⁾。また、妊娠により、抗HLAレセプターに対する抗イディオタイプ抗体が誘導されるという報告もあり¹⁵⁾¹⁶⁾、妊娠と同じ夫由来の抗原刺激である免疫療法によつてもそれが誘導されることは充分考えられる。

今回のわれわれの報告では、免疫療法により、MLCは著明に抑制された。これは、免疫療法によ

り、抗 HLA 抗体や抗イディオタイプ抗体などの blocking antibody が産生されたことを示唆する。夫以外の第三者のリンパ球を stimulator とした系では夫を stimulator とした系に比べて抑制がかからなかつたことから、この blocking effect は夫に特異的であることが分かる。しかしながら、第三者のリンパ球を用いても平均34.9%の抑制がかかつたということは、必ずしも夫でなければ効果がないということではない。免疫療法の特異性については、数少ないが in vivo における報告がみられる。夫リンパ球で免疫した場合は¹¹⁾¹⁰⁾もちろん、第三者リンパ球で免疫した場合は¹⁹⁾²¹⁾妊娠継続に有利であるという報告や、さらに Mowbray et al. は夫リンパ球と第三者リンパ球を用いて double blind で免疫療法を行ない、夫リンパ球のほうが第三者リンパ球よりも有意に成功率が高いと報告した¹⁰⁾。

また、免疫療法によつて抗イディオタイプ抗体が産生されるかということについては、夫リンパ球を stimulator とした妻リンパ芽球に結合する自己抗体が免疫療法後の妻血清中に出現するという今回の結果は、免疫療法により抗イディオタイプ抗体が産生されたということを強く示唆するものである。今回のわれわれの結果は、約5%の細胞に結合がみられ、あまり多いとはいえないが、Sciu-Foca et al. によれば、抗イディオタイプ抗体の多くが抗 HLA 抗体と結合し、フリーのものが少ないために見かけ上検出できないこともあるということであり、そう考えると必ずしも不思議ではない。われわれの方法では、2週間の培養の後に回収した細胞の多くは夫 HLA class II 抗原を認識するレセプターをもつリンパ芽球であると考えられ、したがって今回検出された抗イディオタイプ抗体は、そのレセプターを認識するものである可能性がある。レセプターの構造を考えると、その場合抗イディオタイプ抗体が CD3 抗体の結合を邪魔する可能性があるため、CD5 抗体でも試みたが、結果に差は認められなかつた。

リンパ芽球上には Fc レセプターが存在し、免疫グロブリンの非特異的結合がおこる可能性があるが、今回われわれは免疫療法前後の変化をみて

いるので、その影響はあまり考える必要はない。しかしながら念のために F(ab')₂ 抗ヒト免疫グロブリン抗体を使用した。また、FITC ラベル非特異的免疫グロブリンをリンパ芽球に加え、非特異的結合を見出そうと試みたが、今回われわれの方法ではほとんど観察できなかつた。

流産の1モデルである CBA×DBA/2 mouse model において、免疫療法を行なうと流産率は劇的に減少するが、その機序の一つとして、suppressor cell activity の増加が報告されている⁴⁾²²⁾。今回のわれわれの報告でも、末梢血中の suppressor T 細胞の有意な増加とさらに cytotoxic T 細胞の有意な減少がみられた。このことは、免疫療法により液性免疫だけではなく細胞性免疫においても特異的免疫抑制機構が働くことを示唆している⁶⁾。

最近 Immunotrophism Hypothesis が提唱され、maternal T cell が trophoblast 上の抗原を認識することにより、GM-CSF や CSF-1, IL-3 といった cytokine が分泌され、妊娠維持に有利に働いているという報告がある³⁾²²⁾。これは従来の免疫学的仮説だけでは妊娠維持機構は説明できないことから提唱されたものである。今回われわれの報告した40例は、免疫療法終了後いまだ妊娠に至らない例も含まれており、その予後との因果関係は現在経過観察中であるが、MLR の抑制が認められていながら予後の悪かつた症例もすでにみられている。妊娠維持は母親の免疫学的拒絶機構における suppression と attack のバランスだけではなく、さらにそのうえに、こういった cytokine の働きや、feto-placental barrier といった解剖学的障壁、あるいは内分泌学的環境の上に成り立っているであろう。

文 献

1. Beer, A.E., Semprini, A.E., Zhu, X. and Quebeman, 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, 1985.
2. Cheney, R.T., Tomaszewski, J.E., Raab, S.J.,

- Zmijewski, C. and Rowlands D.T. Jr. :* Subpopulations of lymphocytes in maternal peripheral blood during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 6 : 111, 1984.
3. *Clark, D.A. :* What do we know about spontaneous abortion mechanism? *Am. J. Reprod. Immunol.*, 19 : 28, 1989.
 4. *Clark, D.C., Brierley, J., Banwatt, D. and Chaouat, G. :* Hormone-induced preimplantation Lyt 2⁺ murine uterine suppressor cells persist after implantation and may reduce the spontaneous abortion rate in CBA/J mice. *Cellular Immunol.*, 123 : 334, 1989.
 5. *Daniel, V., Wendler, J. and Opelz, G. :* Search for anti-idiotypic antibodies in sera of renal transplant recipients. *Transplantation Proc.*, 19 : 758, 1987.
 6. *Gatenby, P.A., Moore, H., Cameron, K., Doran, T.J. and Adelstein, S. :* Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: Correlates with outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 19 : 21, 1989.
 7. *Gill, T.J. III and Wegmann, T.G. :* Immunoregulation and fetal survival. Oxford University Press, New York, 1987.
 8. *Head, J.R. :* Can trophoblast be killed by cytotoxic cells? : In vitro evidence and in vivo possibilities. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 20 : 100, 1989.
 9. *Milns, N.R. and Gardner, I.D. :* Maternal T cells and human pregnancy outcome. *J. Reprod. Immunol.*, 15 : 175, 1989.
 10. *Mowbray, J.F., Gibbings, C., Liddell, H., Reginald, P.W., Underwood, J.L. and Beard, R. W. :* Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion with paternal cells. *Lancet*, i : 941, 1985.
 11. *Mowbray, J.F., Gibbings, C.R., Sidgwick, A.S., Ruszkiewicz, M. and Beard, R.W. :* Effects of transfusion in women with recurrent spontaneous abortion. *Transplantation Proc.*, 15 : 896, 1983.
 12. *Reed, E., Bonagura, V., Kung, P., King, D.W. and Suciu-Foca, N. :* Anti-idiotypic antibodies to HLA-DR4 and DR2. *J. Immunology*, 131 : 2890, 1983.
 13. *Signal, D.P., Joseph, S., Ali, M., Blajchman, M. A., Smith, K.M. and Ludwin, D. :* Anti-idiotypic antibodies and suppressor cells in patients receiving pretransplant donor-specific blood transfusions. *Transplantation Proc.*, 19 : 3399, 1987.
 14. *Smith, J.B. and Cowchock, F.S. :* 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.*, 14 : 99, 1988.
 15. *Suciu-Foca, N., Reed, E., Rohowsky, C., Kung, P. and King, D.W. :* Anti-idiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80 : 830, 1983.
 16. *Suciu-Foca, N., Rohowsky-Kochan, C., Reed, E., Haars, R., Bonagura, V., King, D.W. and Reemstma, K. :* Idiotype network regulations of immune response to HLA. *Federation Proc.*, 44 : 2483, 1985.
 17. *Sugi, T., Makino, T., Maruyama, T. and Iizuka, R. :* The basic mechanism of immunotherapy for patients with recurrent spontaneous abortions. Abstract of VII th World Congress on Human Reproduction. Helsinki, 1990.
 18. *Sunderland, C.A., Redman, C.W.G. and Stirrat, G.M. :* HLA A, B, C antigens are expressed on nonvillous trophoblast of the early human placenta. *J. Immunol.*, 127 : 2614, 1981.
 19. *Taylor, C.G., Page Faulk, W. and McIntyre, J. A. :* Prevention of recurrent spontaneous abortions by leucocyte transfusions. *J. R. Soc. Med.*, 78 : 623, 1985.
 20. *Toma, H., Hayasaka, Y., Yasuo, M., Takahashi, K., Teraoka, S. and Ota, K. :* Anti-idiotypic autoantibodies after donor-specific blood transfusions. *Transplantation Proc.*, 19 : 755, 1987.
 21. *Unander, A.M. and Lindholm, A. :* Transfusions of leukocyte-rich erythrocyte concentrates: A successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154 : 516, 1986.
 22. *Wegmann, T.G. :* Placental immunotrophism: Maternal T cells enhance placental growth and function. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 15 : 67, 1987.

(No. 6887 平2・10・13受付)