

—原著—

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子含有培養液の有効性の検討

Evaluation of the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in embryo transfer medium

田口 可奈*・平田 麗・青木 瞳・小郷 真文・花谷 美香・高橋 浩美・氏平 聖子・川原 結貴・斎藤 寛恵・川上 典子・青井 陽子・増本 由美・小坂 由紀子・寺田 さなえ・吉岡 奈々子・羽原 俊宏・林 伸旨

Kana Taguchi*, Rei Hirata, Hitomi Aoki, Maya Ogo, Mika Hanatani, Hiromi Takahashi, Seiko Ujihira, Yuuki Kawahara, Hiroe Saito, Noriko Kawakami, Yoko Aoi, Yumi Masumoto, Yukiko Kosaka, Sanae Terada, Nanako Yoshioka, Toshihiro Habara and Nobuyoshi Hayashi

医療法人社団岡山二人クリニック 〒701-1152 岡山市

Okayama couple's clinic, 285-1 Tsudaka, Kita-ku, Okayama 701-1152, Japan

要旨： GM-CSFはサイトカインの一つであり、妊娠と関連があることが報告されている。今回、単一融解胚盤胞移植を対象とし、胚移植に使用する培養液中にGM-CSFを含む(GM-CSF群)、GM-CSFを含まない(従来群)の違いが、妊娠率、流産率および生児獲得率に及ぼす影響を比較検討した。2020年12月から2021年3月までに、当院にてホルモン補充周期での単一融解胚盤胞移植を行った362症例431周期を対象とした(GM-CSF 230周期、従来群 201周期)。妊娠率と生児獲得率では有意な差は認められなかったが、流産率はGM-CSF群が低値だった($P < 0.05$)。これまでに流産および死産の既往がある症例に限定した臨床成績(GM-CSF 106周期、従来群 96周期)は、流産率はGM-CSF群が低値であり、生児獲得率はGM-CSF群が高値だった($P < 0.01$)。GM-CSFを含む胚移植用培養液の流産率改善効果が示され、特に流産既往のある症例では有効であり、生児獲得率向上に寄与する可能性が示唆された。

キーワード： GM-CSF, 融解胚移植, 流産率, 生児獲得率

Abstract: The cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is reportedly relevant to pregnancy. In this study, we compared pregnancy, miscarriage, and live birth rates across on the culture medium used for embryo transfer. We also evaluated the effectiveness of GM-CSF-containing culture medium in single frozen-thawed blastocyst transfer (sFET). Among 362 women, a total of 431 FET cycles resulting in sFET between December 2020 and March 2021 were analyzed (GM-CSF group 230 cycles, control group 201 cycles). The miscarriage rate in the GM-CSF group was lower than in the control group; however, there were no differences in the pregnancy and live birth rates. In the women who had previously experienced at least one miscarriage (GM-CSF group 106 cycles, control group 96 cycles), a significant decrease in the miscarriage rate and an increase in the live birth rate were noted for the GM-CSF group. These results suggest that GM-CSF had a highly significant effect for women who have previously had a miscarriage.

Key words: GM-CSF, Frozen-thawed Blastocyst transfer, Miscarriage rate, Live birth rate

(受付 2022年7月13日 / 受理 2022年10月4日)

別刷請求先：〒701-1152 岡山市北区津高285-1 医療法人社団岡山二人クリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: labo@futari.or.jp

はじめに

サイトカインの一つである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、卵管および子宮の上皮細胞から分泌されており^{1, 2)}、子宮内腔液に豊富に存在していることが報告されている³⁾。また、GM-CSF を添加した培養液を用いると胚発育が向上したとの報告もある^{4, 5)}。さらに、原因不明の反復流産症例では血中のGM-CSF量が低かったとの報告があり⁶⁾、GM-CSF と妊娠に関する報告が散見される^{7, 8)}。そこで本研究では、単一融解胚盤胞移植を対象とし、胚移植に使用する培養液にGM-CSF を含む、含まないの違いが妊娠率、流産率および生児獲得率に及ぼす影響を比較することで、GM-CSF 含有培養液の有効性を検討した。

対象と方法

2020年12月から2021年3月までに、当院にてホルモン補充周期での単一融解胚盤胞移植を行った444症例543周期のうち、インフォームドコンセントが得られた362症例431周期を対象とした。検討対象者には、対象者が胚移植培養液を選択できないこと、検討に不同意または同意撤回した場合は当院でこれまで使用していたGM-CSF を含まない培養液を使用して胚移植を行うことを説明した。GM-CSF 含有培養液 (GM-CSF 群) と、当院でこれまで使用していたGM-CSF を含まない培養液 (従来群) 間での移植あたりの妊娠率、生児獲得率および妊娠あたりの流産率を比較した。なお、本検討は岡山二人クリニックの倫理委員会の承認を得て行った (2020-07)。

検討開始1週目：GM-CSF 群，2週目：従来群，3週目：GM-CSF 群，4週目：従来群となるように使用する胚移植

培養液を変え、症例を振り分けた。検討期間に複数回胚移植を行った症例も含まれ、GM-CSF 群：204症例230周期、従来群：183症例201周期であった。また、流産および死産の既往 (化学妊娠は含まない) がある症例は、GM-CSF 群：95症例106周期、従来群：86症例96周期であった。

胚盤胞融解

移植当日に胚盤胞を融解し、融解液はThawing Media (北里コーポレーション，静岡，日本) を使用した。融解後、ミネラルオイル (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) で被覆した15 μ l 培養液 (ONE STEP Medium[®]，ナカメディカル，東京，日本) 中へ胚を入れ、37 $^{\circ}$ C，6.5%CO₂，5.0%O₂，88.5%N₂ 気相条件下で2時間回復培養を行った。また、回復培養中にレーザー装置 (Saturn 5[™], RI, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、胚盤胞の全周約1/6以上開口するよう透明帯にレーザーを照射し、アシステッドハッチングを行った。

胚移植 (図1)

移植培養液として、GM-CSF 群はSAGE 1-Step[™] GM-CSF (origio, Malov, Denmark) を用い、従来群はUTM[™] Transfer Medium (origio) にDextran Serum Supplement (Irvine Scientific) を添加し用いた。胚移植前日に2well dish (Falcon[®], Corning, Arizona, USA) の中央well に培養液700 μ l を分注し、37 $^{\circ}$ C，6.5%CO₂，5.0%O₂，88.5%N₂ 気相条件下で平衡化した。胚移植直前に回復培養液から移植培養液に浸漬し、胚移植カテーテル (Wallace[®], origio) を用いて経腹超音波ガイド下で胚移植を行った。

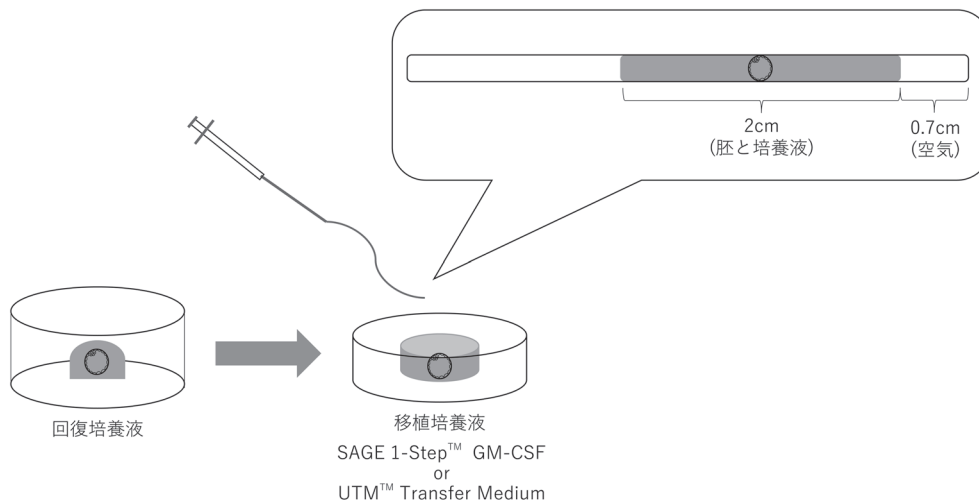


図1 胚移植方法

胚移植直前に融解した胚盤胞を回復培養液から移植培養液 (SAGE 1-Step[™] GM-CSF または UTM[™] Transfer Medium) に浸漬した。テルモシリンジ[®] ツベルクリン用1 ml (テルモシリンジ[®]，東京，日本) に胚移植カテーテルを接続し、シリンジ1目盛 (0.01 ml) まで空気を吸う。その後、培養液と胚を2 cm、さらに空気を0.7 cm 吸って、経腹超音波ガイド下で胚移植を行った。

統計学的解析

統計ソフトJMP® ver.11 (SAS Institute Japan, 東京, 日本) を用いて, Student's t test 検定および χ^2 検定 (chi-square test) を実施した. $P < 0.05$ をもって統計学的有意とした.

結果

患者の凍結時年齢, 融解時年齢, 移植回数には両群間で有意差は認められなかった (表1). また, 採卵後5日目 Gardner 分類 3BB以上で凍結した胚を良好胚盤胞とし, 各群の良好胚盤胞の割合に有意差は認められなかった (GM-CSF群: 60.4%, 従来群: 62.2%, $P = 0.71$).

臨床成績において, 妊娠率と生児獲得率では有意な差は認められなかったが, 流産率はGM-CSF群 (18.7%) が従来群 (30.9%) と比較して有意に低値だった ($P < 0.05$) (表2).

これまでに流産および死産の既往 (化学妊娠は含まない) がある症例に限定した患者では, 凍結時年齢, 融解時年齢, 移植回数において両群間で有意差は認められなかった (表3). また, 各群の良好胚盤胞の割合に有意差は認められなかった (GM-CSF群: 60.4%, 従来群: 60.4%, $P = 0.99$). 流産率はGM-CSF群 (11.8%) が従来群 (37.8%) と比較して低値であり, 生児獲得率はGM-CSF群 (42.5%) が従来群 (24.0%) と比較して高値だった ($P < 0.01$) (表4).

考察

今回我々は, GM-CSF含有培養液の有効性を明らかにするため単一融解胚盤胞移植を対象とし, これまで使用していたGM-CSFを含まない培養液と臨床成績を比較した.

GM-CSF群で従来群と比較して流産率が有意に低値だった (表2). この結果は, サイトカインが添加されていない培養液と比べ, GM-CSF含有培養液で妊娠継続率が向上した

とする Ziebeらの報告と一致する⁹⁾.

さらに, これまでに流産および死産の既往 (化学妊娠は含まない) がある症例では, GM-CSF群は従来群と比較して流産率が低値であり, 生児獲得率が有意に高値であった (表4). ESHRE RPL ガイドラインによると, 反復流産の原因として, 染色体異常, 内分泌異常, 子宮異常, 免疫異常などが挙げられるが, 原因不明である場合が多い¹⁰⁾. Perriconeらにより, 原因不明の反復流産症例は血中のGM-CSF量が低いことが報告されている⁶⁾. 一方, Jasperらは, 反復流産症例の子宮内膜でのGM-CSFのmRNA発現量は, 流産経験のない対象症例と比較して変化がなかったと報告している¹¹⁾. 我々のプロトコールでは, 胚移植カテーテル内に培養液と胚を2 cm吸い子宮内腔へと移植しており, その際の培養液量は約10 μ lであった. また, SAGE 1-Step™ GM-CSFのGM-CSF含有量は2 ng/mlであり, 子宮内腔に放出されるGM-CSF量は0.02 ngと推定される. GM-CSFは子宮内膜での免疫反応の調節因子であり¹²⁾, GM-CSFが樹状細胞を増加させることにより制御性T細胞が増加し, この細胞によって母体の胚に対する免疫応答が抑制されていることが報告されている¹³⁾. そのため, これまでに流産既往のある症例において, 特にGM-CSF含有培養液が有効な結果であったことから, 子宮内腔に放出されたGM-CSFが子宮内膜の免疫反応を正常に調節し, 妊娠継続に寄与した可能性がある.

今回の検討では, 単一融解胚盤胞移植を対象とし, これまで使用していた培養液と臨床成績を比較した結果, GM-CSF含有培養液群における流産率の低下を示した. さらに, 流産既往のある症例においては, 生児獲得率も高値であり, GM-CSF含有培養液が有効であることが示唆された.

表1 患者背景

	GM-CSF群	従来群	P value
	204症例	183症例	
凍結時年齢 (歳)	35.1 \pm 0.32	35.2 \pm 0.35	0.85
融解時年齢 (歳)	36.1 \pm 0.32	36.3 \pm 0.34	0.73
移植回数 (回)	2.43 \pm 0.11	2.24 \pm 0.12	0.24

Mean \pm S.D. で表示.

表3 流産および死産の既往 (化学妊娠は含まない) がある症例に限定した患者背景

	GM-CSF群	従来群	P value
	95症例	86症例	
凍結時年齢 (歳)	36.3 \pm 0.46	36.2 \pm 0.48	0.96
融解時年齢 (歳)	37.6 \pm 0.43	37.5 \pm 0.45	0.87
移植回数 (回)	3.1 \pm 0.18	2.8 \pm 0.19	0.22

Mean \pm S.D. で表示.

表2 臨床成績

	GM-CSF群	従来群	P value
	230周期	201周期	
妊娠率	46.5% (107/230)	46.8% (94/201)	0.96
流産率	18.7% (20/107)	30.9% (29/94)	<0.05
生児獲得率	37.8% (87/230)	32.3% (65/201)	0.23

表4 流産および死産の既往 (化学妊娠は含まない) がある症例に限定した臨床成績

	GM-CSF群	従来群	P value
	106周期	96周期	
妊娠率	48.1% (51/106)	38.5% (37/96)	0.17
流産率	11.8% (6/51)	37.8% (14/37)	<0.01
生児獲得率	42.5% (45/106)	24.0% (23/96)	<0.01

文 献

- 1) Zhao, Y., Chegini, N. and Flanders, K.C. (1994): Human fallopian tube expresses transforming growth factor (TGF beta) isoforms, TGF beta type I-III receptor messenger ribonucleic acid and protein, and contains [125 I] TGF beta-binding sites. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79, 1177–1184.
- 2) Giacomini, G., Tabibzadeh, S.S., Satyaswaroop, P.G., Bonsi, L., Vitale, L., Bagnara, G.P., Strippoli, P. and Jasonni, V.W. (1995): Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony – stimulating factor in human endometrium. *Hum. Reprod.*, 10, 3259–3263.
- 3) Paiva, P., Hannan, N.J., Hinks, C., Meehan, K.L., Pruyssers, E., Dimitriadis, E. and Salamonsen, L.A. (2011): Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Hum. Reprod.*, 26, 1153–1162.
- 4) Sjoblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. (1999): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum. Reprod.*, 14, 3069–3076.
- 5) Sjoblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. (2002): Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Acts Independently of the Bate Common Subunit of the GM-CSF Receptor to Prevent Inner Cell Mass Apoptosis in Human Embryos. *Biol. Reprod.*, 67, 1817–1823.
- 6) Perricone, R., De Carolis, C., Giacomelli, R., Guarino, M.D., De Sanctis, G. and Fonana, L. (2003): GM-CSF and Pregnancy: Evidence of significantly Reduced Blood Concentrations in Unexplained Recurrent Abortion Efficiently Reverted by Intravenous Immunoglobulin treatment. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 50, 232–237.
- 7) Sjoblom, C., Roberte, C.T., Wikland, M. and Robertson, S.A. (2005): Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alleviates Adverse Consequences of Embryo Culture on Fetal Growth Trajectory and Placental Morphogenesis. *Endocrinology*, 146, 2142–2153.
- 8) Wenhui, Z., Dapeng, C., Wei, S., Lei, F. and Yuan, L. (2016): Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor supplementation in culture medium on embryo quality and pregnancy outcome of woman aged over 35 years. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 33, 39–47.
- 9) Ziebe, S., Loft, A., Povisen, B.B., Erb, K., Aderholm, I., Aasted, M., Gabrielsen, A., Hnida, C., Zobel, D.P., Munding, B., Bendz, S.H. and Robertson, S.A. (2013): A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 99, 1600–1609.
- 10) ESHRE Early Pregnancy Guideline Dvelopment Group. (2017): ESHRE Recurrent Pregnancy Loss Guideline.
- 11) Jasper, M.J., Tremellen, K.P. and Robertson, S.A. (2007): Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.*, 73, 74–84.
- 12) Moldenhauer, L.M., Keenihan, S.N., Hayball, J.D. and Robertson, S.A. (2010): GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. *J. Immunol.*, 185, 7085–7096.
- 13) Guerin, L.R., Prins, J.R. and Robertson, S.A. (2009): Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: anew target for infertility treatment? *Hum. Reprod.*, 24, 2703–2708.