

## Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency

AGING 2020, Vol. 12, No. 1 10211-10222

### 「早発卵巣不全患者に対する 自己多血小板血漿の卵巣内注入の効果について」

#### Abstract

目的：早発卵巣不全（POI）の女性において、自己多血小板血漿（PRP）の卵巣内注入が、卵巣刺激に対する反応と体外受精（IVF）の結果を改善するかどうかを検討する。

対象：ESHRE（欧州ヒト生殖医学会）基準に基づいて POI と診断された女性（N=311、年齢 24～40 歳）に、卵巣内 PRP 注入を行った。

評価項目：卵巣予備能のマーカーと体外受精の結果を追跡した。

結果：PRP の投与により、胞状卵胞数（AFC）と抗ミュラー管ホルモン（AMH）が増加したが、卵胞刺激ホルモン（FSH）には大きな変化はなかった。PRP 注入後、23 名（7.4%）が自然妊娠した。201 名（64.8%）が体外受精を試み、そのうち、82 名（26.4%）が分割期胚を得られた。このうち 25 名は胚を凍結保存し、57 名は胚移植を行い、13 名が妊娠した（全体の 4%）。合計すると、PRP 治療を受けた 311 名の女性のうち、25 名（8.0%）が妊娠継続/出生し、25 名（8.0%）が胚を凍結保存できた。

結論：今回の結果から、POI の女性に対して、自己 PRP の卵巣内注入を治療の選択肢として検討できる可能性が示唆された。

※欧州ヒト生殖発生学会（ESHRE）の POI 診断基準

- (i) 4 か月以上の無月経
- (ii) 4 週間間隔で 2 回の血清 FSH > 25 IU/l の上昇
- (iii) 40 歳未満の発症

※参考

PRP (Platelet Rich Plasma) 多血小板血漿

PFC-FD (Platelet-derived Factor Concentrate Freeze Dry) 血小板由来因子濃縮物凍結乾燥

←PRP を作製したのち、細胞成分を取り除いて成長因子を濃縮し、凍結乾燥（フリーズドライ）したものをを用いる方法。PFC-FD を用いた治療は PRP 療法と同等の効果が期待できる。

・ PFC-FD の子宮内投与に関して

血小板には組織の修復、損傷部位の血管新生、創傷の治癒に必要な成長因子 (PDGF・TGF-β・VEGF・EGF 等) が多く含まれている。この成長因子を多く含む PRP を子宮内に投与することにより、子宮内膜における細胞増殖、血管新生を良好にすることで、胚着床率の改善、および妊娠維持が期待できると考えられる。

不妊症領域での治療の歴史はまだ十分ではないが、現在では海外において子宮内膜非薄症例や反復着床不全症例に対する研究が盛んに行われている。

・ HRC 周期凍結融解移植における PRP 治療の報告 (海外データ)

References	対象症例	治療群	(n)	PRP 投与回数	胚着床率/ET (%)	臨床妊娠率/ET (%)	安全性
Eftekhari M et al. 2018	胚移植直前 子宮内膜厚<7mmによる 治療を必要とする (HRT-FET)	PRP治療群	40	1-2回	42.4%*	39.4%*	N/A
		コントロール群	43	-	24.7%*	18.2%*	N/A
Coksoy H et al. 2019	RIF→3ET (HRT-FET)	PRP治療群	34	1回	61.8%*	50.0%*	N/A
		コントロール群	36	-	36.1%*	33.2%*	N/A
Natali L et al. 2019	RIF→3ET (HRT-FET)	PRP治療群	49	1回	53.1%*	44.9%*	N/A
		コントロール群	48	-	27.1%*	16.2%*	N/A

## <Introduction>

POI は生殖年齢女性の 1% が罹患しており、40 歳前に卵巣予備能が著しく低下することが特徴である。現在、POI に対する唯一の確立された治療法は卵子提供であるが、日本を始め、倫理的・宗教的な問題から卵子提供を制限している国は多い。

多血小板血漿 (PRP) は、末梢血を遠心分離して得られた血漿に含まれる高濃度の血小板で構成されている。血小板が活性化されると、さまざまな生理活性タンパク質が放出され、細胞の増殖、成長、分化や血管形成を促進する。この効果を利用し、卵巣における卵子の発育を促進することが示唆されている。

本研究では、自己由来の PRP を卵巣内に注入することで、POI と診断された女性の卵巣予備能、卵巣刺激に対する反応性、体外受精の結果が改善されるかどうかを検討した。

## <Materials and Methods>

### ・患者の選択

欧州ヒト生殖発生学会 (ESHRE) の基準に基づいて POI と診断され、2018 年 11 月から 2019 年 10 月の間にトルコ・イスタンブールの Acibadem Maslak 病院で卵巣内 PRP 注入の治療を受けた患者を対象とした。対象基準は、40 歳未満で、1 年以上の不妊歴があり、少なくとも 1 つの卵巣を有することとした。除外基準は、悪性腫瘍の既往歴、遺伝的原因による卵巣機能不全、骨盤内癒着が疑われる手術の既往歴、血漿注入が禁忌である抗凝固剤の使用とした。

### ・PRP の卵巣内注入

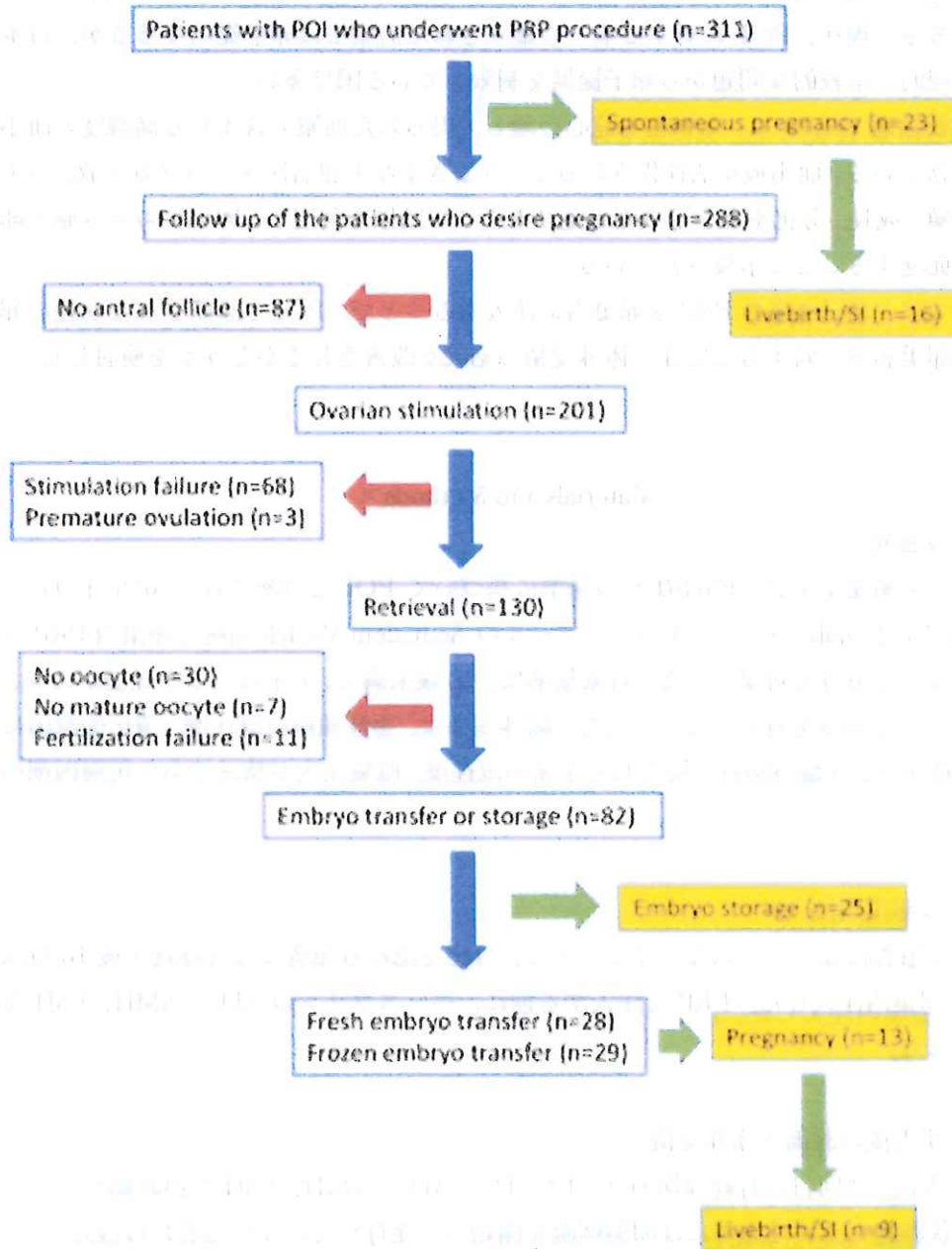
無月経の患者にはランダムなタイミングで、月経を認める患者には月経終了後 10 日以内に PRP を卵巣内注入した。PRP を注入する前に、ベースラインの AFC、AMH、FSH を同日に測定した。

### ・PRP 注入後の評価と体外受精

PRP 注入後、2 回目の月経周期の 2~4 日目に、AFC、AMH、FSH を再評価した。その時点で胞状卵胞を認めた患者には卵巣刺激を開始し、発育していない患者には最長 6 ヶ月間の経過観察を行い、卵胞発育を認めた場合には卵巣刺激を実施した。採卵後、全患者に ICSI を実施し、患者の希望に基づき胚凍結もしくは胚移植を行った。

妊娠結果は、胚移植後 12~14 日目に血清  $\beta$ -HCG 値を評価した。臨床的妊娠とは、hCG 値が高値、超音波で胎嚢または胎芽が確認されたことの両方で定義した。着床の継続は、少なくとも妊娠 12 週目まで胎児の心拍が確認された患者と定義した。

<Results>



POI と診断された女性 311 名 (平均年齢±SD : 34.8±4.3) を対象とした。

① PRP 治療後の自然妊娠：

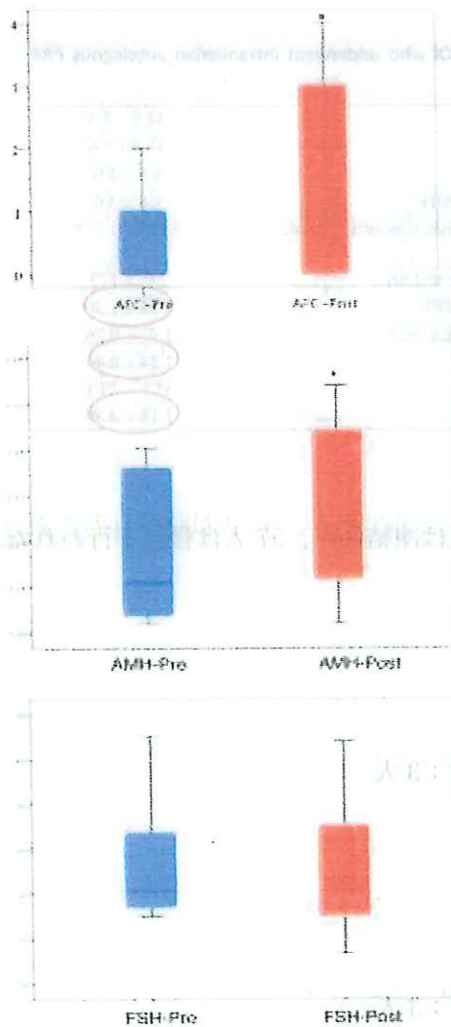
23 人 (7.4%) 平均年齢±SD : 34.6±4.0

自然流産 : 7 人

妊娠 24 週~35 週まで継続 : 5 人

妊娠 37 週~40 週で出産 : 11 人

② PRP 治療後の卵巣予備能の評価



有意な AFC の増加を認めた

( $1.7 \pm 1.4$  vs  $0.5 \pm 0.5$ ;  $p < 0.01$ )。

PRP 治療前には 311 人中 186 人が AFC : 0 であったのに対し、PRP 注入後には 99 人が卵胞数の増加 (最小 1 個、最大 3 個) を認めた。

血清 AMH も増加した

( $0.18 \pm 0.18$  vs  $0.13 \pm 0.16$ ;  $p < 0.01$ )

血清 FSH は有意差なし

( $41.6 \pm 24.7$  vs  $41.9 \pm 24.7$ ;  $p = 0.87$ )。

Figure 2. Antral follicle count, AMH and FSH levels before and after PRP injection. The ends of the boxes are the upper and lower quartiles, so the box spans the interquartile range (25th to 75th percentile). The horizontal line inside the boxplot represents the median value. The whiskers extend between 5% and 95%. \*  $P < 0.05$

### ③ 体外受精の結果

PRP 治療後に少なくとも1つの胞状卵胞を認めた201人に卵巣刺激を行った。

- ・ 卵胞発育不全により採卵出来ず：71人 (35.3%)
- ・ 採卵施行：130人 (64.7%)
  - 卵胞なし：30人
  - 成熟卵胞なし：7人
  - 受精障害：11人

少なくとも1つの胚が得られた：82人

Table 1. Clinical and IVF outcome parameters of women with POI who underwent Intraovarian autologous PRP injection (Mean  $\pm$  SD).

Patient age (all women, n=311)	34.8 $\pm$ 4.3
Partner Age (all men, n=311)	37.4 $\pm$ 5.6
Duration of infertility (years)	6.8 $\pm$ 4.9
Days of stimulation (in women who underwent ovarian stimulation; n=201)	8.6 $\pm$ 3.0
Total gonadotropin dose (IU) (in women who underwent controlled ovarian hyperstimulation; n=201)	5,156 $\pm$ 1,773
E2 level (pg/ml) on the day of hCG (in women who underwent retrieval; n=130)	231 $\pm$ 122
Number of retrieved oocytes (in women who had oocytes retrieved; n=100)	1.81 $\pm$ 1.30
Number of mature oocytes (in women who had mature oocytes retrieved; n=93)	1.37 $\pm$ 0.76
Number of 2 pronuclei embryos (in women with fertilization; n=82)	1.24 $\pm$ 0.49
Fertilization rate (%) (in women with fertilization; n=82)	55.8 $\pm$ 29.1
Number of cleavage stage embryos (in women with fertilization; n=82)	1.18 $\pm$ 0.39

### ④ 胚移植の結果

少なくとも1つの胚が得られた82人のうち、25人は凍結保存、57人は移植が行われた。

- ・ 新鮮胚移植：28人 (49.1%)
  - 妊娠：7人
    - 妊娠第1期に流産：3人
    - 妊娠24週、30週、31週まで継続中：3人
    - 妊娠34週に出産：1人
- ・ 凍結融解胚移植：29人 (50.9%)：
  - 妊娠：6人
    - 妊娠第1期に流産：1人
    - 妊娠17週、22週、36週まで継続中：3人
    - 妊娠39週に出産：2人

PRP 治療後に胚移植を行った患者のうち、合計で13/57(22.8%)が妊娠し、9/57(15.8%)が妊娠継続できた。

⑤ 治療前の卵巣予備能と治療への反応性の関連について

治療前の AFC が 0 であった患者は、AFC が 1 または 2 であった患者に比べて、成熟卵子/分割期胚の採取される確率が低いことが示された。また、血清 FSH および AMH 値についても同様の結果が得られた (表 2、3)。

Table 2. The relationship between, pre-treatment measurements of ovarian response predictors and outcome (retrieval of a mature oocyte) after PRP treatment.

AFC PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
0*	11/73 (15.1%)*	9/37 (24.3%)	14/65 (21.5%)*	34/175 (19.4%)*
1 and 2 <sup>h</sup>	19/34 (55.9%)*	10/25 (40.0%)	21/38 (55.3%)*	50/97 (51.5%)*
AMH PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
<25 <sup>th</sup> percentile <sup>e</sup> (0.01-0.02 ng/mL)	2/34 (5.9%)*	4/15 (26.7%)	11/37 (29.7%)	17/86 (19.8%)*
25 <sup>th</sup> -100 <sup>th</sup> percentile <sup>d</sup> (0.03-0.82 ng/mL)	28/73 (38.4%)*	15/47 (31.9%)	24/66 (36.4%)	67/186 (36.0%)*
FSH PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
>75 <sup>th</sup> percentile <sup>e</sup> (44.2-155 mIU/mL)	1/30 (3.3%)*	2/12 (16.7%)	2/26 (7.7%)*	5/68 (7.4%)*
0 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentile <sup>f</sup> (25-44.1 mIU/mL)	29/77 (37.7%)*	17/50 (34.0%)	33/77 (42.9%)*	79/204 (38.7%)*
TOTAL	30/107 (28.0%)	19/62 (30.6%)	35/103 (34.0%)	84/272 (30.9%)

PRP 治療前の AFC、AMH、FSH 値と、少なくとも 1 個の成熟卵子が得られる確率

Table 3. The relationship between pre-treatment measurements of ovarian response predictors and outcome (obtaining a cleavage stage embryo) after PRP treatment.

AFC PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
0	9/73 (12.3%)*	9/37 (24.3%)	11/65 (16.9%)*	29/175 (16.6%)*
1 and 2	18/34 (52.9%)*	10/25 (40.0%)	20/38 (52.6%)*	48/97 (49.5%)*
AMH PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
<25 <sup>th</sup> percentile (0.01-0.02 ng/mL)	2/34 (5.9%)*	4/15 (26.7%)	9/37 (24.3%)	15/86 (17.4%)*
25 <sup>th</sup> -100 <sup>th</sup> percentile (0.03-0.82 ng/mL)	25/73 (34.2%)*	15/47 (31.9%)	22/66 (33.3%)	62/186 (33.3%)*
FSH PRIOR TO PRP	<35 years old (N/Total (%))	35-37 years old (N/Total (%))	38-40 years old (N/Total (%))	All ages (N/Total (%))
>75 <sup>th</sup> percentile (44.2-155 mIU/mL)	1/30 (3.3%)*	2/12 (16.7%)	2/26 (7.7%)*	5/68 (7.4%)*
0 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentile (25-44.1 mIU/mL)	26/77 (33.8%)*	17/50 (34.0%)	29/77 (37.7%)*	72/204 (35.3%)*
TOTAL	27/107 (25.2%)	19/62 (30.6%)	31/103 (30.1%)	77/272 (28.3%)

PRP 治療前の AFC、AMH、FSH 値と、少なくとも 1 個の分割期胚を得られる確率

## <Discussion>

PRP は 1970 年代から利用され研究されてきたが、皮膚科、形成外科、歯科、整形外科において、創傷治癒促進のために日常的な臨床診療に導入されてきた。産婦人科領域でも、子宮や卵巣への PRP 注入の効果を調べる研究が行われている。

### ・ Kawamura らの研究

POI の女性 27 人から腹腔鏡手術で卵巣組織を摘出し、これらの組織を短冊状に切断した。Hippo シグナルを遮断し、Akt を刺激した後、断片化した小さな卵巣片を卵管の漿膜下に自家移植した。27 人のうち 8 人 (29.6%) が治療後 6 ヶ月以内に卵胞発育を認めた。体外受精にて成熟卵子を得られた 5 名 (18.5%) は、胚移植後に生児を得られた。

### ・ PRP の作用機序に関して

PRP には多くの活性物質が含まれているが、PRP の一般的な作用メカニズムや、特に卵巣における作用については、まだほとんど知られていない。

PRP 注入後に少なくとも 1 つの胞状卵胞が形成され、体外受精を受けることができた患者のうち、64% が最初の 3 サイクル以内に、さらに 21% が 4 サイクル目に開始していた。ヒトの卵胞が前胞状卵胞から排卵に至るまでには、約 85 日かかると推定されており、PRP はあらゆる時期の卵胞に直接影響がある可能性が示唆された。

また、PRP 注入時に AFC が 0 個の患者は、1 個または 2 個の患者に比して治療への反応性が低いことが示された。血清 AMH 低値と血清 FSH 高値の患者も同様であった。(表 2、3)。以上の結果から、PRP は既存の卵胞の活性化に寄与し、効果は卵巣に残っている卵胞の数に依存する可能性が示唆された。PRP 治療により、血清 FSH 値は変化せず AMH と AFC の改善を認めたことから、この結論が支持された。

### ・ 自然妊娠への効果

今回の研究対象では、PRP 治療前に自然妊娠の既往がある患者はおらず、PRP 治療後に起こった 23 人の自然妊娠は、すべて治療後 2 周期以内に認めたことは注目に値する。自然妊娠は、POI 患者では稀であり、PRP による卵巣活性化治療が自然妊娠を誘発するメカニズムについては、さらなる調査が必要と考える。

今回の研究では、独立した対照群が含まれておらず無作為化もされていないことから、長期的な臨床転機改善につながるかどうか議論の余地はあるものの、POI 患者において自己 PRP の卵巣内注入は自然妊娠または体外受精による妊娠において良好な結果をもたらす可能性が示唆された。