
原 著

夫婦間リンパ球混合培養遮断抗体に 対応する絨毛細胞膜抗原の解析

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内正七教授）

後 藤 重 則

Studies on the Antigens Expressed on Trophoblasts
Related to MLR-blocking Antibodies

Shigenori GOTO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata
University School of Medicine*

(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)

The purpose of this study is to investigate the antigenic nature of trophoblasts and its relation to mixed lymphocyte reaction-blocking antibodies (MLR-BABs).

Mixed culture of lymphocytes and syncytiotrophoblasts plasma membrane (STPM) (MLSC) and absorption study of MLR-blocking effect with STPM were performed in the present experiments. Lymphocytes were obviously stimulated in the 9 MLSCs. And like MLR, this stimulation was specifically inhibited by corresponding mothers' sera, suggesting that lymphocytes were stimulated in MLSCs by alloantigens expressed on STPM.

Nineteen sera were obtained from normal pregnant women and habitual aborters after immunotherapy. And these sera were absorbed with STPM from respective mothers' placenta (autologous STPM) and unrelated mothers' (allogeneic STPM) as a control. The HLA types of cord blood lymphocytes corresponding to these STPM were then determined. The MLR-blocking effect of every serum was removed by autologous STPM absorption, nevertheless it was removed or unaffected by allogeneic one. Comparison of paternal stimulator and cord blood lymphocytes HLA-DR types showed that some of positive absorptions with allogeneic STPM could be explained by coincidence of HLA-DR types.

Reprint requests to: Shigenori GOTO,
Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学医学部産科婦人科学教室

後 藤 重 則

These findings suggested that MLR-BAbs were directed against some alloantigens expressed on trophoblasts that might be related to HLA-DR antigens.

Key words: trophoblast, blocking antibodies, mixed lymphocyte reaction.

絨毛細胞, 遮断抗体, リンパ球混合培養.

I 緒 言

半同種移植片としての胎児が母体よりの免疫的拒絶をのがれ、生着、増殖する妊孕現象の免疫的維持機構の解明のため、母体血清中に観察される種々の免疫抑制因子および胎児と母体の接点である絨毛細胞の特殊な抗原性などが従来より検討されてきている。血清中の免疫抑制因子として特に、夫リンパ球を刺激細胞とした夫婦間のリンパ球混合培養を特異的に抑制する夫婦間リンパ球混合培養遮断抗体 (Mixed Lymphocyte Reaction-blocking antibodies, MLR-BAbs) が妊娠の免疫的維持機構に重要な役割を持つことが指摘されている¹⁻³⁾。夫婦間のリンパ球混合培養に対する抑制活性 (MLR-blocking effect) により検出されているこの抗体は、正常妊婦血清中に観察されるが、原因不明習慣性流産患者においては多くの場合観察されない²⁾。さらに、近年、その有効性が認められつつある、習慣性流産患者に対する免疫感作療法 (夫リンパ球の輸注療法) 後の血清中にも全例に出現することより、その治療効果発現の機構への関与が、強く示唆されている²⁾。また、絨毛細胞の障害が認められる流産患者に比較して、正常妊娠あるいは絨毛細胞の著明な増殖をきたす胎奇胎患者において MLR-BAbs の産生が強いこと¹⁾⁴⁾、流産患者においても絨毛細胞の viability と MLR-BAbs の産生との間に正の相関が認められること⁵⁾ などより絨毛細胞の増殖と MLR-BAbs 産生の関連性を示唆する報告が多くみられる。以上のことより、MLR-BAbs が妊娠の免疫学的な維持、とくに絨毛細胞の免疫的な保護に重要な役割を担っていることが強く示唆される。

絨毛細胞上には、リンパ球と共通するいくつかのアロ抗原が発現されていることが証明されている⁶⁾⁷⁾が、MLR-BAbs に対応する抗原が発現されているか否かに関しては、現在まで検討されていない。今回、リンパ球と絨毛細胞膜を混合培養すること、あるいは絨毛細胞膜による MLR-BAbs の吸収実験を行うことにより、MLR-BAbs に対応するアロ抗原が絨毛細胞膜上に発現されていることを証明し、さらにその抗原と HLA-DR 抗原との関連についても検討した。

II 対象及び方法

1) 対象症例

11例の正常妊娠分娩例および8例の原因不明習慣性流産患者に関して検討を行った。習慣性流産患者は全例が高桑らの方法²⁾により、免疫感作療法 (夫リンパ球の輸注療法) を受け、その後妊娠が成立し満期で正常分娩に至った。血清は正常妊娠分娩例では分娩時採取し、習慣性流産患者からは、免疫療法後3週間目に採取した。コントロール血清としては、ブールした正常男子AB血清を用いた。全例において分娩時に胎盤を得て、絨毛細胞膜成分 (syncytiotrophoblast plasma membrane, STPM) の分離を行った。また10例に関しては臍帯血を同時に採取し HLA のタイピングを行った。

2) 絨毛細胞膜成分 (STPM) の分離

Smith らの方法⁸⁾により胎盤より分離した placental villous surface membrane を STPM として用いた。分離は娩出後ただちに4℃で行った。分離の概要は、胎盤より羊膜、脱落膜、血管などを取り除いた後、細切し生理食塩水および0.11Mの塩化カルシウムで洗浄し生理食塩水中に浮遊させ、30分間緩やかに攪拌した。その後、800g および10,000gの遠心分離により上清を得、100,000gの超遠心によりSTPMを分離し、さらにリン酸緩衝生理食塩水により2回洗浄した。

分離が正確であることは、電子顕微鏡によって確認した。分離したSTPMはリン酸緩衝生理食塩水に浮遊させ、-80℃で使用するまで保存し、また蛋白量の測定は、Lowry らの方法⁹⁾により測定した。

3) リンパ球-絨毛細胞膜成分混合培養 (Mixed Culture of Lymphocyte and STPM, MLSC)

産褥5日から30日の間に母体より末梢血を採取し、Ficoll-Hypaque 比重分離液により単核球を遠心分離しRPMI 1640に浮遊させた。保存されているSTPMは超遠心により抽出した後、無菌的にガラスホモジェナイザーを用いて、RPMI 1640に浮遊させ混合培養に用いた。1ウェルあたり 3×10^5 個のリンパ球を、50 μ g/mlの蛋白濃度のSTPMとともにあるいは単独で、29%の非働化したコントロール血清または母体血清の存在下で、

96ウエルの平底の培養プレート (Corning 25860) 上で混合培養した。培養は, triplicate で, 37℃で5%のCO₂を含む空気中で144時間行い, その後グラスファイバー上にハーベストした。ハーベストの18時間前に1ウエルあたり 0.6μCi のトリチウムサイミジンを添加し, サイミジンの取り込み量を液体シンチレーションカウンタにより測定し DNA 合成量として評価した。

4) 夫婦間リンパ球混合培養および抑制試験

混合培養および抑制試験は以前に報告した方法により行った²⁾。産褥の母体およびその夫より末梢血を採取し Ficoll-Hypaque 比重分離液により単核球を分離した。

1ウエルあたり 1.5x10⁵ 個の妻リンパ球を反応細胞として, 1.5x10⁵ 個のマイトマイシンにより処理した夫リンパ球を刺激細胞として, 29%のコントロール血清および被検血清の存在下で96ウエルの培養プレート上で144時間培養した。培養終了の18時間前に1ウエルあたり 0.6 μCi のトリチウムサイミジンを加え, ハーベストし, それを液体シンチレーションカウンタにより測定した。被検血清の抑制効果は夫婦間リンパ球混合培養抑制効果 (MLR-blocking effect) として以下の式により計算した。

$$\begin{aligned} & \text{MLR-blocking effect} \\ &= \left(1 - \frac{\text{cpm of culture in tested serum}}{\text{cpm of culture in control serum}}\right) \\ & \times 100 (\%) \end{aligned}$$

5) 血清の絨毛細胞膜成分による吸収

0.8ml のコントロール血清および被検血清を蛋白量にしてそれぞれ 10mg の STPM とともにガラスホモジェナイザーによりホモジェナイズし, 4℃で12時間吸収を行った。吸収後, 超遠心により STPM を取り除いた。

6) HLA タイピング

3組の夫婦および10例の臍帯血の HLA 抗原の同定を行った。Terasaki らのリンパ球障害試験によりヘキストジャパン社の HLA プレートを用いて行った。

III 結 果

1) 絨毛細胞膜リンパ球混合培養におけるリンパ球の反応および母体血清の抑制効果

11例の正常妊娠例のうち, 9例に関して MLSC をコントロール血清および自己母体血清の存在下で行った。コントロール血清下での MLSC は9例いずれにおいても, STPM を添加しないリンパ球の単独の培養に比べて明らかに大きなトリチウムサイミジンの取り込みが認められ, stimulation index は1.5から最高13.0を示した (Table 1)。STPM はリンパ球に対して明らかに抗原性を持つと考えられた。また母体血清を用いた MLSC においては, いずれの例においてもコントロール血清を用いた場合に比較して反応が低く, 母体血清は MLSC 反応に対して抑制効果を持つと考えられた。抑

Table 1 Mixed Lymphocyte-STPM culture and effect of maternal sera on it

Case	Lys-solo ^a in AB serum (cpm)	MLSC ^b in AB serum (cpm)	S.I. ^c	MLSC in maternal serum (cpm)	MLSC blocking effect (%) ^d
1	688	1389	2.0	901	35.0
2	286	3713	13.0	2399	35.4
3	557	3913	7.0	1365	65.1
4	3100	5872	1.9	1103	81.2
5	1347	2432	1.8	1359	44.1
6	856	4972	5.8	712	85.7
7	525	5804	11.1	211	96.4
8	924	1360	1.5	762	44.0
9	610	4606	7.6	1910	58.5
	988.1±846.8	3784.6±1731.6	5.7±4.3	1191.3±661.5	60.6±22.9

^a Lymphocytes-solo culture

^b Mixed lymphocyte-syncytiotrophoblast culture

^c Stimulation index = $\frac{\text{cpm of MLSC in AB serum}}{\text{cpm of Lys-solo in AB serum}}$

^d Blocking effect = $\left(1 - \frac{\text{cpm of MLSC in maternal serum}}{\text{cpm of MLSC in AB serum}}\right) \times 100 (\%)$

制効果は MLSC-blocking effect として計算すると 35.0 から 96.4 を示した (Table 1).

この母体血清の抑制効果は非特異的な効果かあるいはアロ特異的なものが検索するために症例5に関して、6例の他人母体血清を用いて血清の抑制効果を調べた。表2に示したように、他人母体血清は抑制効果が観察されるものとされないものが存在した。

2) 夫婦間リンパ球混合培養抑制効果の絨毛細胞膜成分による吸収

血清の吸収は、自己の胎盤より分離した STPM (自己 STPM) あるいはコントロールとして他人の胎盤より分離した STPM (他人 STPM) により行い比較検討した。11例の正常妊娠血清のうち、4例を自己 STPM

Table 2 Effect of 6 allogeneic pregnancy sera on MLSC

Serum	MLSC reactivity (cpm)	MLSC blocking effect (%)
A B	2432	
5(maternal)	1359	44.1
1	2044	16.0
2	1120	53.9
3	245	90.0
4	2866	-17.8
6	2550	-4.9
7	2506	-3.0

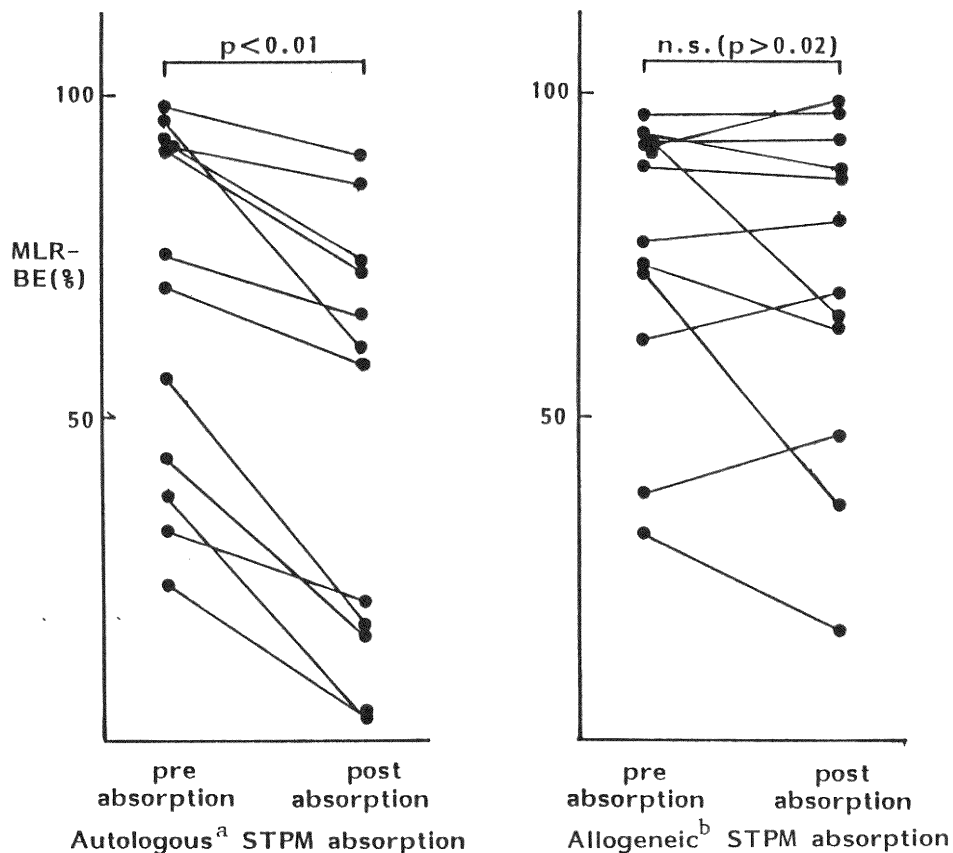


Fig. 1 Absorption of MLR-blocking effect with autologous and allogeneic STPM

- Autologous STPM: STPM prepared from respective mothers' placentas
- Allogeneic STPM: STPM prepared from unrelated mothers' placentas

のみにより、3例を自己および他人 STPM により、また4例は他人 STPM のみにより吸収した。8例の習慣性流産患者の血清に関しては、3例を自己 STPM のみにより、2例は自己および他人 STPM、また残りの3例を他人 STPM により吸収した。吸収前後の血清の MLR-blocking effect を測定しそれぞれ比較検討した。これら自己 STPM による吸収12例と他人 STPM による吸収12例をそれぞれに関して、吸収前と吸収後の MLR-blocking effect を一括して **Figure 1**. に示した。自己 STPM による吸収においては、12例全例において吸収により MLR-blocking effect の減少が認められ、吸収後の MLR-blocking effect は吸収前に比較して有意に低値を示した (paired t-test, $p < 0.01$)。一方、他人 STPM による吸収では、12例中4例において明らかな MLR-blocking effect の減少がみられたが、残りの8例においては吸収による変化を認めなかった。吸収前後の MLR-blocking effect の比較でも有意な差はみられなかった (paired t-test, $p > 0.2$)。

3) 他人絨毛細胞膜による吸収効果と HLA-DR 抗原の共通性

他人 STPM による吸収では明らかに吸収効果が認められるものと変化が認められないものが存在することが、上記の検討から示されたが、一方 MLR-BABs はこれまでの検討から、夫のもつ HLA-DR 抗原に関連した抗原に対する抗体であることが、示唆されている²⁾。その様な観点から3例の習慣性流産患者について、血清を10例の他人 STPM 各々により吸収を行い、さらにその3例の習慣性流産患者およびその夫の HLA タイピングを行い、また10例の STPM に関しては、各々の臍帯血を採取して HLA タイピングを行った。各 STPM による吸収効果の有無と、夫の持つ HLA-DR 抗原と STPM の HLA-DR 抗原の一致について検討した。

Table 3 に3例の夫婦の HLA 抗原を、**Table 4** には

Table 3 HLA antigens of the couples used for 10 separate allogeneic STPM absorptions

	HLA antigens			
	A	B	C	DR
Couple A Wife	1,24	7,51	3,-	4,11
Husband	2,24	60,-	1,3	<u>1</u> ,11
Couple B Wife	24,33	44,61	3,-	11,-
Husband	2,24	52,-	1,-	<u>3</u> ,11
Couple C Wife	9,-	51,7	-, -	1,3
Husband	2,10	15,48	-, -	<u>1</u> , <u>4</u>

Underlined numbers indicate husband's HLA-DR types incompatible with the wife.

3例の血清の、10例の STPM による吸収前後の MLR-blocking effect および各 STPM の HLA-DR 抗原を示した。

夫と STPM の HLA-DR 抗原が一致する例は5例認められたが、うち4例においては明らかに MLR-blocking effect の吸収効果が認められた (**Table 4**)。しかし HLA-DR 抗原の一致しない場合においても吸収が認められる例が少なからず存在した。HLA-DR 抗原の一致する場合は、吸収を認めやすい傾向があると考えられた。

IV 考 察

現在まで絨毛細胞の抗原性について多くの検討がなされてきている。これらにおいては、絨毛組織、培養された絨毛細胞あるいは今回の実験に使用した絨毛細胞膜などを用いて行われてきた¹⁰⁻¹²⁾。しかし絨毛組織を用いた場合は間質などが含まれるため、絨毛細胞としての純性は低く、また絨毛細胞の長期培養は難しく、長期の培養による抗原性の変化なども考慮しなくてはならない。今回の実験に用いた STPM は、Smith らが1976年に

Table 4 MLR-blocking effect of 3 sera after absorption with 10 separate allogeneic STPM

Couple and Serum	Unabsorbed	STPM1 (1,8) ^a	2 (2,-)	3 (2,-)	4 (2,9)	5 (3,12)	6 (4,13)	7 (4,-)	8 (4,8)	9 (9,13)	10 (8,12)
A	70.1	31.1 ^b	47.7	42.7	66.4	44.5	62.7	72.1	61.0	48.9	64.6
B	62.0	15.7	51.6	64.7	65.7	16.4 ^b	62.0	69.3	69.3	63.4	69.7
C	72.5	9.6	9.7	71.7	69.5	72.1	27.7 ^b	72.1 ^b	37.4 ^b	77.1	36.3

^a HLA-DR types of STPM determined with cord blood lymphocytes

^b Paternal incompatible HLA-DR types are common to those of STPM

報告して以来、その後の多くのこれを用いた実験系により純度および免疫学的な材料としての価値が確認されてきているといえる⁶⁾¹²⁾¹³⁾。今回のような混合培養および吸収実験に対しては、非常に優れた材料と考えられる。

母体血清中には夫婦間の MLR を抑制する因子が存在することは広く認められており、この因子は IgG 分画に存在することより MLR-BAbs として現在まで検討され、妊娠の免疫学的な維持に重要であることが示唆されてきている¹⁻⁵⁾¹⁴⁾。MLR-BAbs は夫に対する MLR を特異的に抑制すること、また夫のリンパ球により吸収されることなどより夫リンパ球上の MLR を誘導するアロ抗原に対応する抗体であることが、示唆されている¹⁵⁾。しかしその様なアロ抗原が絨毛細胞上に発現されているか否かは、現在まで検討されていない。今回 STPM とリンパ球の間で混合培養を行い、さらに MLR の場合と同様に母体血清が抑制効果を持つか検討した。STPM は混合培養において、明らかにリンパ球の増殖反応を誘導し、この反応は母体血清によりアロ特異的に抑制された。これらの反応および特異的抑制は、夫婦間の MLR と共通した結果であり、このことは MLR を誘導する抗原あるいは MLR-BAbs により抑制される抗原が STPM 上にも発現されていることを間接的に示唆するものであると考えられる。また MLSC におけるリンパ球の反応性は MLR に比べて明らかに弱いことが観察された。これは STPM 自体が細胞性免疫を抑制する効果を持つこと¹⁶⁾、また刺激源として細胞そのものを使ったのではなく細胞膜を用いたことによるものと考えられる。

直接的に MLR-BAbs が STPM 上の抗原に対応するか否か知る目的で、MLR-blocking effect の自己の胎盤より分離した STPM による吸収実験を行った。MLR-BAbs はアロ抗原に対応する抗体と考えられており、吸収のコントロールとして他人の STPM を用いた。自己の STPM による吸収ではいずれも明らかに吸収効果が認められたが、他人の STPM によっては、吸収効果が認められる場合と認められない場合が存在した。この様に自己と他人の STPM による吸収で差が認められたことは、絨毛細胞上には、MLR-BAbs に対応するアロ抗原が存在することを示すものと考えられる。

MLR-BAbs は夫リンパ球上の HLA-DR 関連抗原に対応していることが示唆されている²⁾。その観点から、STPM 上の MLR-BAbs に対応するアロ抗原が HLA-DR 抗原と関連を持つか否かを検討するために、10種類の他人の STPM による吸収実験を行った。その吸収

効果の有無と HLA-DR の一致について検討した。その結果、夫リンパ球と STPM の間で HLA-DR 抗原の一致する例では吸収効果を認めやすい傾向がみられたが、しかし一致しない多数例でも吸収効果がみられた。このことより、STPM 上の対応抗原は HLA-DR 抗原そのものである可能性は少ないと考えられた。これは、過去の酵素抗体法などの検討により絨毛細胞上に HLA-DR 抗原の発現は今のところ確認されていないこと¹⁷⁾と一致する結果であると思われた。しかし HLA-DR 抗原の一致例では吸収効果を認めるものが多いことより、HLA-DR 抗原と関連した抗原、特に broader specificity をもった HLA-DR 関連抗原の存在の可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Takeuchi, S.: Immunology of spontaneous abortion and hydatidiform mole, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1: 23~28, 1980.
- 2) Takakuwa, K., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.: Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent aborters. The role in successful pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 10: 1~9, 1986.
- 3) Labarrere, C., Althabe, O., Caletti, E. and Muscolo, D.: Deficiency of blocking factors in intrauterine growth retardation and its relationship with chronic villitis, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10: 14~19, 1986.
- 4) Hanaoka, J. and Takeuchi, s.: Individual specificity of blocking antibodies in molar and normal term placenta-bound IgG, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 3: 119~123, 1983.
- 5) 茅原 保: 早期自然流産の病態に関する総合的臨床研究, *日産婦誌*, 40: 1365~1371, 1988.
- 6) McIntyre, J.A. and Faulk, W.P.: Allotypic trophoblast-lymphocyte crossreactive (TLX) cell surface antigens, *Human Immunol.*, 4: 27~35, 1982.
- 7) Sunderland, C.A. and Redman, C.W.G. and Stirrat, G.M.: HLA A,B,C, antigens are expressed on nonvillos trophoblast of the early human placenta, *J. Immunol.*, 127:

- 2614~2615, 1981.
- 8) Smith, N.C. and Brush, M.G.: Preparation of human placental villous surface membrane, *Nature*, **252**: 302~303, 1974.
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. and Farr, A.L.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275, 1951.
- 10) Taylor, P.V., Gowland, G., Hancock, K.W. and Scott, J.S.: Effect of length of gestation on maternal cellular immunity to human trophoblast antigens, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **125**: 528~531, 1975.
- 11) Taylor, P.V. and Hancock, K.W.: Antigenicity of trophoblast and possible antigen masking effect during pregnancy, *Immunol.*, **28**: 973~982, 1975.
- 12) Faulk, W.P., Temple, A. and Smith, N.: Antigens of human trophoblast: A working hypothesis for their role in normal and abnormal pregnancies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 1947~1951, 1978.
- 13) Davies, M. and Browne, C.M.: Antitrophoblast antibody responses during normal human pregnancy, *J. Reprod. Immunol.*, **7**: 285~297, 1985.
- 14) Kajino, T., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.: Blocking effects of maternal serum-IgG and placental eluate-IgG on materno-fetal mixed lymphocyte reaction and their individual specificity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **4**: 27~32, 1983.
- 15) Maruhashi, T.: Studies on the MLR-blocking antibodies observed in sera of normal pregnant women, To be published
- 16) Khalfoun, B., Degenne, D., Crouzat-Reynes, G. and Bardos, P.: Effect of human syncytiotrophoblast plasma membrane-soluble extracts on in vitro mitogen-induced lymphocyte proliferation. A possible inhibition mechanism involving the transferrin receptor, *J. Immunol.*, **137**: 1187~1193, 1986.
- 17) Brami, C.J., Sanyal, M.K., Dwyer, J.M., Johnson, C.C., Kohorn, E.I. and Naftolin, F.: HLA-DR antigen on human trophoblast, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **3**: 165~174, 1983.

(平成元年1月23日受付)