

正常初妊婦における Blocking Antibodies の動態とその免疫的性状

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 竹内正七教授)

丸橋 敏 宏

Kinetics of Blocking Antibodies Observed in Sera of Normal
Pregnant Women and its Immunological Characterization

Toshihiro MARUHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata

University School of Medicine

(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)

Blocking assay on one-way mixed lymphocyte culture reaction (MLR) between wife and husband, using sera serially obtained from 19 primigravidas, fourteen of which had normal pregnant course, two of them had threatened stage resulted in successful pregnancies and remaining three were inevitably reduced to spontaneous abortion, were performed to elucidate kinetics of blocking antibodies (BAs).

The BAs were characterized by MLR-blocking assay using the IgG fraction of maternal sera and the sera after absorption with husband's platelets, T cells and B cells, and by MLR using donor's cells with known HLA as stimulators to analyse specificity of the BAs for HLA-DR antigen.

The BAs were observed in three of 14 primigravidas with successful pregnancies at 7 weeks of gestation. and found to be detected in the all sera at 16 weeks. The sera in three primigravidas resulted in spontaneous abortion had no blocking effect (BE) on MLR in contrast with that in the two with threatened stage who could avoid spontaneous abortion. The BE of sera on MLR using donors' cells which shared HLA-DR antigens with husband's as stimulators was significantly great for that on MLR using the unshared ones. Furthermore, BE was suggested to be attributed to BAs which were included in IgG fraction of maternal sera and closely associated with HLA-DR antigens of husbands.

It was implied from these results that BAs continue to be produced during pregnancy and may play a key role in materno-fetal immunological relationship.

Key words: Blocking Antibodies (BAbs), Pregnancy, Mixed Lymphocyte Culture
Reaction (MLR), HLA D/DR.

遮断抗体, 妊娠, リンパ球混合培養, HLA D/DR 抗原系.

Niigata Cancer Center Hospital
Kawagishicho 2, Niigata 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市川岸町 2-15-3
新潟県立がんセンター

概 要

妊娠の免疫的維持機構に重要な役割をはたすとされる妊婦血中 blocking antibodies (BAbs) の動態とその免疫的性状の解析を行う目的で one-way mixed lymphocyte culture reaction (MLR) を行い、以下の結果を得た。

- 1) 正常初妊婦において、MLR-blocking effect (BE) 妊娠7週前後より出現し、妊娠経過に伴い増強し、分娩直前にその最高値をとり、分娩後次第に消失する傾向を示した。
- 2) 予後良好であった切迫流産患者の MLR-BE は正常初妊婦と同様の動態を示したが、流産に終わった患者は有意の MLR-BE を示さなかった。
- 3) この MLR-BE を示す物質は IgG 分画に存在し、夫血小板・T cell には吸収されないが、夫 B cell に吸収された。
- 4) HLA DR 既知の第三者リンパ球を刺激細胞として使用した MLR において、夫と HLA DR を共有する群では、非共有群に比し有意の MLR-BE が観察された ($P < 0.01$)。

これらの結果より以下のことを示唆した。

- 1) BAbs は妊娠初期より出現し、妊娠の免疫的維持機構の重要な役割をはたしている。
- 2) BAbs には夫 B cell 表面抗原主として HLA D/DR 抗原系に対する IgG 抗体が含まれている。

I. 緒言

父系の組織適合抗原 (MHC) を継承した胎児・胎盤系の生着、増殖という現象は、一種の同種移植片 allograft の生着とみなすことができる。しかし、母体が胎児側の抗原に対して細胞性および体液性の免疫反応を示している¹⁾にも関わらず、その胎児・胎盤系を最終的に拒絶しないという現象は、移植免疫学の基本的理論に反するものである。妊娠という現象においては、MHC 抗原の相違は胎児・胎盤系の生着・増殖にむしろ有益に働いていることを示唆する知見が²⁾³⁾⁴⁾報告されている。Voisin ら⁵⁾は、免疫応答において、現象論的には拒絶反応のみならず促進反応というべき現象が観察されることから、妊娠の免疫維持機構は両反応のバランスによって成り立っていることを提唱した。

1976年、Rocklin ら⁶⁾は、妊娠母体リンパ球を反応細胞、その夫リンパ球を刺激細胞とした培養上清による macrophage migration inhibition test に対し、この反応を特異的に遮断 block する IgG 抗体が妊婦血

中に存在することを観察した。さらに、この抗体が流産患者血清中に存在しないことから、この抗体が妊娠の維持継続の場において重要な免疫的抑制因子となっていると推察した。以来、この IgG 抗体について多くの研究者^{7)~15)}が検討を加え、妊娠の免疫的維持機構になんらかの重要な役割をはたす抗体である可能性が考察されてきた。しかし、このような免疫的抑制因子について、同一症例の妊娠経過に伴った経時的動態、あるいは妊娠成立前との比較における妊娠初期の動態の検索は現在までのところ極めて断片的である。本研究においては、この特異的な免疫的抑制因子の系統的な解析を目的とし、まず、妊婦血清が夫婦間リンパ球混合培養反応 (mixed lymphocyte culture reaction, MLR) にたいして、どのような抑制活性を示すかを経時的に検討した。次に、その抑制活性の免疫学的性状について解析を加え、興味ある知見がえられた。そこで、この免疫的抑制因子が母児間免疫反応において、どのような生物学的意義をもちうるかにつき若干の考察を加え報告する。

II. 研究対象

新潟大学医学部附属病院産科外来を受診した輸血のない正常初妊婦14例、切迫流産患者5例(結果的に流産に終わったもの3例、妊娠を継続したもの2例)を対象とした。

III. 研究方法

(1) 血清の採取と保存

輸血のないA B血液型正常男子5名から採取した血清を混合し、対照血清とした。被検血清は妊娠初期より経時的に採取した。さらに、2例においては、妊娠成立前より、すなわち非妊時より妊娠成立後にかけて血清を採取することができた。対照血清及び被検血清は -80°C で保存し、実験時に 56°C 、30分非働化し、millipore filter (pore size $0.22\mu\text{m}$, MILLEX GS) にて濾過して使用した。

(2) IgG 分画の採取

血清を 0.1M トリス・リン酸緩衝液 (pH 8.5) で24時間透析後に遠心して得られた上清を、トリス・リン酸緩衝液で緩衝化した DE-32 cellulose column chromatography (Whatman) で処理し、非吸収分画を採取、濃縮した。最終的に $550\sim 600\text{mg/dl}$ 濃度に調整した後、全ヒト血清抗体を用いた免疫電気泳動法にて IgG の純化を確認した。 0.15M phosphate buffered saline, PBS (pH 7.4) にて24時間透析し、millipore filter にて濾過して実験に使用した。

IV. 研究成績

(1) MLR-BE の有意性に関する検討

3組の正常夫婦間 MLR に対し、正常未妊婦人14例より採取した血清を各々添加し、合計42回の MLR-BE を測定した結果、MLR-BE は $4.0 \pm 7.9\%$ であった。

本研究においては、初妊婦を対象としており、未妊婦血清の平均 ± 2 標準偏差より有意の MLR-BE を20%以上と設定した。

(2) 妊娠経過中の MLR-BE の動態

正常初妊婦7例より妊娠全経過を追って採取した血清

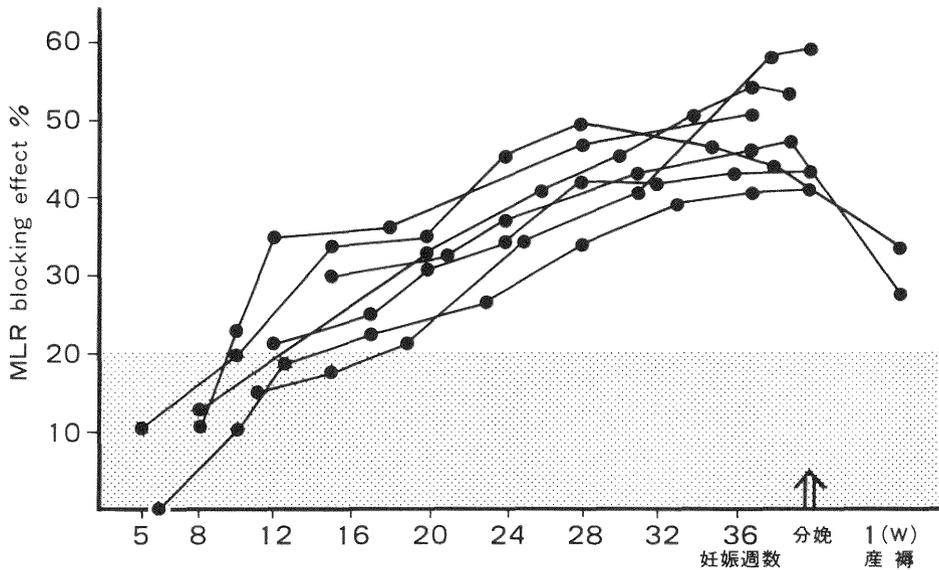
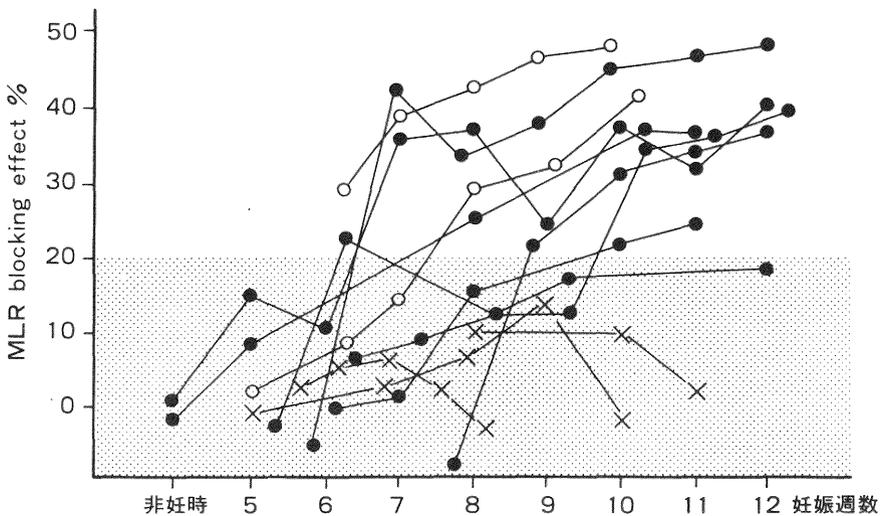


図2 正常初妊婦血中の MLR-BE の動態



- 正常初妊婦
- 切迫流産患者(予後良好群)
- × 切迫流産患者(予後不良群)

図3 妊娠初期初妊婦血中の MLR-BE の動態

について、分娩後2ないし4週に施行した夫婦間 MLR に対する MLR-BE を検討した。図 2 に示したように、妊娠10週においてすでに有意の MLR-BE が観察され、妊娠16週以降においては全例に有意の MLR-BE が観察された。その後 MLR-BE は妊娠経過とともに漸次増強し、分娩前に最強となり、分娩後減弱する傾向が観察された。

次に、妊娠初期における MLR-BE の動態を詳細に検討する目的で、正常初妊婦7例、切迫流産患者（結果的に流産に終わったもの3例、妊娠を継続したもの2例）よりほぼ1週毎に血清を採取し、正常経過をたどった例では妊娠16ないし20週に、流産に終わった例では流産後2週に夫婦間 MLR を施行し、それぞれの血清についてその MLR-BE を検討した。図 3 に示したように、正常初妊婦では妊娠7週において7例中3例に有意の MLR-BE が観察され、妊娠10週において7例中6例に有意の MLR-BE が観察された。残りの1例は14週で有意の MLR-BE が観察された。流産に終わった切迫流産患者3例では、その妊娠経過中いずれも有意の MLR-BE は観察されず、その低下ののち子宮内容物の排出が認められた。妊娠を継続しえた切迫流産患者2例では、正常初妊婦とほぼ同様の MLR-BE の動態が観察された。

(3) MLR-BE の免疫的性状

妊娠後期の正常初妊婦5例の血清を吸収操作して得られた血清（夫血小板吸収血清、夫 T cell 吸収血清、夫 B cell 吸収血清）について、その夫婦間 MLR に対する MLR-BE を検討した結果、非吸収血清の MLR-BE は $47.2 \pm 6.8\%$ 、夫血小板吸収血清の MLR-BE は $45.1 \pm 8.8\%$ 、夫 T cell 吸収血清の MLR-BE は $39.7 \pm 8.8\%$ 、夫 B cell 吸収血清の MLR-BE は $11.3 \pm 6.1\%$ であり（表 1）、非吸収血清の MLR-BE は夫 B cell によって明確に吸収されることが観察された。

次に、分画した IgG について、その夫婦間 MLR に対する MLR-BE を検討すると、対照血清より抽出した IgG 5例では $3.9 \pm 8.1\%$ 、妊娠後期の正常初妊婦血清より抽出した IgG 5例では $48.0 \pm 10.2\%$ であった（表 2）。

これらの結果により、MLR-BE は血清 IgG 抗体に依存し、夫の血小板および T cell では吸収されず、夫 B cell で吸収されることが判明した。

妊娠後期正常初妊婦5例について、血清の MLR-BE が、その夫婦間 MLR に対する場合、すなわち、刺激細胞が夫リンパ球である場合と、刺激細胞が HLA DR 既知のリンパ球である場合とでどのように異なるかを検討した。（図 4）刺激細胞としての第三者リンパ球が夫

表 1 夫血小板, T cell, B cell による吸収操作とリンパ球混合培養

症例	対照血清	母 体 血 清			
		非 吸 収	吸 収		
			血 小 板	T cell	B cell
1	17481*1	10138 (42.0)*2	10803 (38.2)	11485 (34.3)	16746 (4.2)
2	22120	10449 (52.8)	10419 (52.9)	11480 (48.1)	19001 (14.1)
3	11109	4710 (57.6)	4732 (57.4)	5332 (52.0)	9131 (17.8)
4	16478	9327 (43.4)	9457 (42.6)	10679 (35.2)	13758 (16.5)
5	10827	6475 (40.2)	7112 (34.3)	7676 (29.1)	10427 (3.7)

平均 MLR-BE

*1 平均 cpm

*2 MLR-BE %

47.2 ± 6.8 45.1 ± 8.8 39.7 ± 8.8 11.3 ± 6.1

表 2 IgG 添加リンパ球混合培養

症例	血清の MLR-BE	対照 IgG	母体 IgG
1	42.0* ¹	19599* ²	11581 (40.9)* ³
2	52.8	24593	10355 (57.9)
3	57.6	11271	4239 (62.4)
4	43.4	18792	10880 (42.1)
5	40.2	10058	6356 (36.8)
	47.2±6.8		48.0±10.2

*¹ MLR-BE %
*² 平均 cpm
*³ IgG 添加 MLR-BE

リンパ球と HLA DR 抗原を共有している場合に、有意の MLR-BE が観察される傾向にあることが判明した ($p < 0.01$).

V. 考案

母児間の免疫反応にかかわる妊婦血中の免疫抑制因子には、hCG、 α -Fetoprotein、Steroid hormone、Prostaglandin などの非特異的因子も存在することが示唆されているが、胎児・胎盤系に関与する特異的因子、なかも特異抗体 (blocking antibodies, BAbs) が母児間の免疫的維持機構に重要な役割を担っている可能性が示されている。しかし、Rocklin ら⁶⁾の報告以来、BAbs がいくつかの異なった実験系で解析されてきたが、すべての正常妊婦血中に BAbs が観察されないといったことから、その生物学的意義が疑問視されてきた¹⁷⁾。また妊娠経過に伴う BAbs の動態に関して Herva ら⁷⁾や Rocklin ら¹³⁾の報告があるがこれらは断片的であり、妊娠における BAbs の重要性を解明するためには、同一症例を対象とした分娩前から妊娠を経て分娩後に至るまでの経時的な観察が必要である。図 2 に示した妊娠

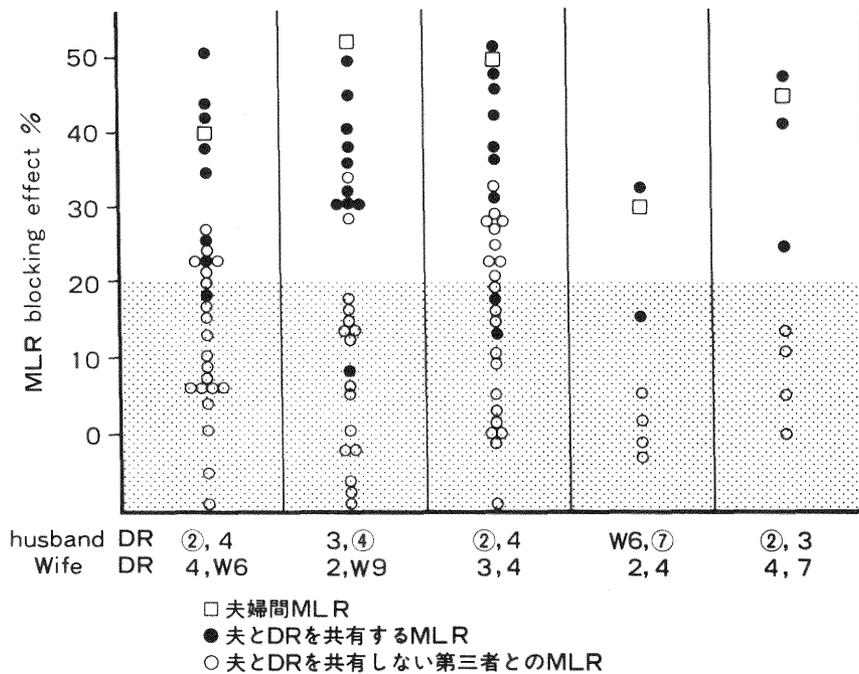


図 4 HLA DR 既知の第三者とのリンパ球混合培養

反応細胞：母体リンパ球
刺激細胞：夫又は第三者

全経過の MLR-BE の動態において、有意の MLR BE が妊娠初期妊婦血清中にすでに観察され、妊娠中期において全例に認められ、妊娠経過に伴い増強し、分娩前に最大値を示し、分娩後減弱傾向を示すことが観察された。Herva らの報告では分娩後1週間で MLR-BE が消失するとされているが、今回の結果はその消失にはより長い期間を要することを推測させるものである。妊娠初期における MLR-BE の動態を図 3 に示したが、正常妊娠においては7例中3例に妊娠7週より MLR-BE を観察し、妊娠10週において7例中6例に観察しえた。一方、切迫流産患者において、その臨床経過に相応した MLR-BE の動態が観察された。すなわち、予後良好群の MLR-BE の動態は正常妊婦の動態と同様であるにもかかわらず、予後不良群においては有意の MLR-BE は観察されなかった。MLR-BE としてとらえられる BAbs が妊娠7週という妊娠初期においても、輸血歴のない初妊婦血中に観察されたことは、妊娠における免疫維持機構の1つとして BAbs が妊娠初期より何らかの役割をはたしていることを示唆するものである。

MLR における妊婦血清の BE は従来非特異的であるとするもの⁷⁾ や特異的であるとする報告⁶⁾ があるが、Kajino ら¹⁵⁾ は母児間 one-way MLR において、児 B cell を刺激細胞とした場合には特異的抑制活性を観察したが、全リンパ球を刺激細胞とした場合には観察されなかったと報告し、MLR BAbs として観察される因子の中には夫 B cell 表面抗原と密接な関係のあることを示唆した。今回の吸収実験の結果、MLR-BE は夫血小板・T cell に吸収されず、夫 B cell に吸収されることから、BAbs と B cell 表面抗原との関連をより一層強く示唆している。さらに妊娠母体リンパ球を反応細胞、HLA DR 既知の第三者リンパ球を刺激細胞とした one-way MLR において、第三者リンパ球が夫 HLA DR 抗原の1つ以上を共有する MLR に対する妊婦血清の BE はそうでない MLR の BE に比し強い傾向を示すことを観察した。このことから BAbs は夫由来の B cell 表面抗原、特に HLA DR 抗原に対する抗体を含んでいることが示された。また妊婦血清より抽出した IgG 分画が MLR BE を示すことより、BAbs は IgG 分画に存在することが確認された。この IgG 分画の MLR-BE は胎盤抽出 IgG、胞状奇胎抽出 IgG においても観察され、母体血清中と同一の BAbs を含んでいると推測される。しかし、胎盤抽出 IgG は血清 IgG に比し強い MLR-BE を示すことから、胎盤抽出 IgG において高濃度の BAbs が存在することが示唆されて

おり¹⁴⁾、このことは胎児・胎盤系の免疫的拒絶への防御機構を考える上で興味深い現象といえよう。

しかし、初妊婦血中あるいは胎盤に結合し存在している BAbs とくに抗 HLA DR 抗体がいかなる機序により産生してきたのか未だ明らかではないが、胎盤形成以前の妊娠7週の時点ですでに観察されること、あるいは妊娠経過に伴い増加傾向を示すことから、着床卵の外層を形成し、将来胎盤となる絨毛細胞によって BAbs が誘起されると推測される。しかしながら、従来の免疫組織学的検討によれば BAbs の標的とされる HLA DR 抗原は絨毛細胞上には観察されていない。これに対し、最近 HLA DR 抗原と並びヒト Class II 抗原のひとつである HLA DP 抗原が絨毛組織上に観察されることが報告されている¹⁸⁾。HLA DP 抗原の意義に関してはいまだ不明な点が多く、BAbs との HLA DP 抗原との関連性は明らかではないが今後徐々に解明されていくものと推察される。

BAbs が妊娠維持機構に重要な役割をはたしているものか、ただ単にその結果として出現してくるものであるのかという問題に関する議論がある¹⁷⁾。原因不明習慣性流産患者に夫リンパ球あるいは pool 白血球の免疫によって、有意の MLR-BE を観察し、その治療効果を認めているという事実¹⁹⁾ を考慮すると、単に結果として発現したものではなく、そのすべてではないにしても妊娠の免疫維持機構に重要な役割をはたしているものであると推測される。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました竹内正七教授に深謝の意を表します。また直接御指導いただいた金沢浩二助教授、梶野徹助手に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Beer, A.B. and Billingham, R.E.: Immunology of mammalian reproduction, *Adv. Immunol.* 14: 1, 1971.
- 2) Lauritsen, J.G., Kristensen, T. and Grunnett, N.: Depressed mixed lymphocyte culture reactivity in mothers with recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125: 35, 1976.
- 3) Komlos, L., Zamir, R., Joshua, H. and Halbrecht, I.: Common HLA Antigens in Couples with Repeated Abortions, *Clin.*

- Immunol. Immuno-pathol. 7: 330, 1977.
- 4) Beer, A.E., Scott, J.R. and Billingham, R.E.: Histo incompatibility and maternal immunological status as determinants of fetoplacental weight and litter size of rodents, *J. Exp. Med.* 142: 180, 1975.
 - 5) Voisin, G.A. and Chaouat, G.: Demonstration, nature and properties of maternal antibodies fixed on placenta and directed against paternal antigens, *J. Reprod. Fertil.* 21: 89, 1974.
 - 6) Rocklin, R.E., Kitzmiller, J.L., Carpenter, C.B., Garvoy, M.R. and David, J.R.: Absence of an Immunologic Blocking Factor from the Serum of Women with Chronic Abortions, *N. Eng. J. Med.* 295 (22), 1209, 1976.
 - 7) Herva, E. and Jouppila, O.: mixed lymphocyte culture reactions between paternal cells in pregnancy and puerperium, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C*, 85: 99, 1977.
 - 8) Albrechtsen, D., Solheim, B.G. and Thorsby, E.: Antiserum Inhibition of the Mixed Lymphocyte Culture (MLC) Interaction, Inhibitory Effect of Antibodies Reactive with HLA-D-Associated Determinants, *Cell. Immunol.* 28: 258, 1977.
 - 9) Stimson, W.H. and Strechan, A.F.: Studies on the maternal immune response to placental antigens: absence of a blocking factor from the blood of abortion-prone women, *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 86: 41, 1979.
 - 10) Takeuchi, S.: Immunology of Spontaneous Abortion and Hydatidiform Mole, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1: 23, 1980.
 - 11) Beer, A.E., Quebbeman, J.F., Ayers, J.W.T. and Hains, R.F.: Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 15: 987, 1983.
 - 12) Fizet, D. and Bousquet, J.: Absence of a factor blocking a cellular cytotoxicity reaction in the serum of women with recurrent abortions, *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 90: 453, 1983.
 - 13) Rocklin, R.E., Kitzmiller, J.L. and Garvoy, M.R.: Maternal-Fetal Reaction, II. Further Characterization of an Immunologic Blocking Factor That Develops during Pregnancy, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 22: 305, 1982.
 - 14) Hanaoka, J. and Takeuchi, S.: Individual Specificity of Blocking Antibodies in Molar and Normal Term Placenta-Bound IgG, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 4: 27, 1983.
 - 15) 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. Replod. Immunol.* 4: 27, 1983.
 - 16) Gatti, R.A., Yunis, E.J. and Good, R.A.: Characterization of a serum inhibitor of MLC reactions, *Clin. Exp. Immunol.*, 4: 27, 1983.
 - 17) **Editorial**: Maternal blocking antibodies, the fetal allograft, and recurrent abortion, *Lancet*, ii, 1175, 1983.
 - 18) Starkey, P.M.: Reactivity of human trophoblast with an antibody to the HLA class II antigen, HLA-DP, *J. Reprod. Immunol.*, 11: 63, 1987.
 - 19) Takakuwa, K., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.: Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent aborters, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 1: 23, 1986.

(平成元年1月25日受付)