

正常妊娠における Ganglioside GM 2 の組織局在, 血中動態および対応抗体の解析

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 竹内正七教授)

鈴木孝明

Analysis of GM2 and Anti-GM2 Antibody as to the Kinetics in Pregnant
Sera and the Tissue Localization in Placenta and Decidua

Takaaki SUZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University

School of Medicine, Niigata

(Director: Prof. Shoshichi Takeuchi)

Oncofetal antigen (OFA-I), an antigen common to the fetal brain and some malignant tumors (derived from ectoderm), is immunogenic in human and anti-OFA-I antibody appears in sera of not only malignant patients but also pregnant women. Biochemical analysis revealed that OFA-I is gangliosides GM2 and GD2. In the present study, GM2 and anti-GM2 antibody were investigated as to the kinetics in pregnant sera and the tissue localization in placenta and decidua. The results obtained were as follows; (1) GM2 was detected by thin layer chromatogram-immunostaining methods in the gangliosides extracted from decidua and from term placenta. GM2 was, however, undetectable in the gangliosides extracted from villi at early stage. (2) A concentration of GM2 was 64.9 pmol/ml (mean) in pregnant sera and 10.9 pmol/ml (mean) in cord sera. GM2 was not measurable in sera of non-pregnant women. (3) In immunohistological analysis for GM2, positive findings were observed in decidua and in villous stroma of term placenta. In contrast, no distinct positive findings were observed in trophoblast at any stage. (4) Anti-GM2 antibody appeared in pregnant sera of early stage and was detectable up to 5 th day of postpartum.

Key words: Ganglioside • GM2 • Placenta • Decidua • Pregnancy.

ガングリオシド • GM2 • 胎盤 • 脱落膜 • 妊娠.

Reprint requests to: Takaaki SUZUKI,
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1番町
新潟大学医学部産科婦人科学教室
鈴木孝明

細胞膜の重要な構成成分の一つである糖脂質は，細胞の腫瘍化にともない量的，質的に変化し，多くの腫瘍抗原の抗原決定基となっていることが報告されている¹⁾²⁾。

また，糖脂質は細胞相互の認識や，機能，形態の変化に重要な働きをしており，さらに固体発生に直接に関与する重要な分子としても報告されてる³⁾。一方，メラノーマ細胞と胎児脳組織に共通な抗原として報告された OFA-I⁴⁾ は，抗原解析の結果，糖脂質の ganglioside GM2⁵⁾ および GD2⁶⁾ であることが判明した。GM2，GD2 は，脳以外の正常組織ではごく微量にしか含まれておらず，腫瘍化にともない多量に表現されるようになり，その強い抗原性故に，悪性腫瘍患者血中には高率に対応抗体の出現が報告されている⁷⁾。健康人では認められない抗 OFA-I 抗体が正常妊婦血中に高率に認められ⁸⁾⁹⁾，OFA-I が妊娠現象特に関連との関連に於て，重要な働きをなしている可能性が指摘される。

今回，OFA-I のうち GM2 につき，妊娠時におけるその局在，血中濃度および対応抗体の出現動態を検討したので報告する。

研究材料および研究方法

1. 血清

正常妊娠 135例より 264検体を採取し，血清分離後直ちに -20°C にて使用時まで凍結保存した。うち24例は妊娠初期，中期，後期，分娩時，産褥5日目，産褥30日目と連続的に採血した。なお健康男子12例，健康未妊女子16例の血清を対照とした。

2. 組織材料

凍結切片材料として，子宮筋腫など医学的適応により摘出された初期妊娠子宮着床部（7週～9週）5例，分娩時胎盤（前置癒着胎盤のため帝切後子宮全摘した1例を含む）10例，流産絨毛4例を用いた。採取後直ちに Tissue Tek O.C.T. compound (Miles Laboratories, Inc.) に包埋後，液体窒素中で急速に凍結し，厚さ $5\mu\text{m}$ の切片を cryostat にて作成し，acetone にて10分間固定し染色材料とした。

また，gangliosides の抽出用として，人工妊娠中絶時および子宮摘出時得られた初期絨毛4例，子宮摘出時得られた脱落膜4例，子宮内容清掃術施行時得られた流産絨毛3例，分娩時得られた正常胎盤2例を用いた。

3. Gangliosides

ウシ脳組織より単離した GM1，GM2，GM3，GD1a を Biosynth A.G. より購入し，薄層クロマトグラフィー (TLC) にて単一の band になる事を確認し実験に供し

た。GM4，sialylparagloboside は平林義雄博士（静岡薬大）より供与された。

4. 使用抗体

GM2 で免疫した家兎血清を affinity purify したものを，抗 GM2 抗体¹⁰⁾ として用いた。また，mouse monoclonal 抗体 (M2590)¹¹⁾ を GM3 および sialylparagloboside の検出に用いた。いずれも平林博士より供与された。入江礼子博士 (UCLA) より供与された mouse monoclonal 抗体 (202)¹²⁾ を GM4 の検出に用いた。

5. gangliosides の抽出方法

gangliosides の抽出は，Leeden et al. の方法¹³⁾ に従った。まず組織を homogenizer にて細かくし，methanol-chloroform-蒸留水 (60:30:8, v/v/v) にて，30分間2度溶出し粗脂質画分を得た。この粗脂質画分を DEAE-Sephadex A-25 column にかけて酸性脂質画分を得，アルカリ処理 (0.2N NaOH in methanol, 37°C ，2時間) し，氷酢酸にて中和したのち，Sep-Pak C₁₈ (Waters 社 USA) にて脱塩した。さらに，シリカゲルカラム (Iatrobeads 6RS-8060) にかけて，gangliosides を精製した。

6. gangliosides の検出方法

1) TLC-Resorcinol 法

gangliosides を HPTLC60 プレート (Merck 社) 上にスポットし，methanol-chloroform-0.02% CaCl₂ (55:45:10, v/v/v) の溶媒系にて展開し，resorcinol-HCl 試薬 (resorcinol 0.6g を水 10ml に溶解し，これに濃塩酸 80ml，0.1M 硫酸銅 0.25ml を添加，全体が 100ml になるように水を加える) を噴霧の後， 95°C で30分間加熱し発色させた。gangliosides の定量は島津二波長 TLC スキャナーを用いた。

2) TLC-Immunostaining 法

TLC-Immunostaining 法にて gangliosides 中の GM2 量を定量した¹⁴⁾。まず，Polygram-Sil G (Macherey-Nagel 社) 上で methanol-chloroform-0.02% CaCl₂ (55:45:10, v/v/v) の溶媒にて gangliosides を展開し，プレートを 1% Bovine albumine，1% polyvinyl pyrrolidone，0.02% NaN₃ を含む 0.01M PBS (溶液A) に1時間浸した。つぎにラビット抗 GM2 抗体をプレートに注ぎ ($100\mu\text{l}/\text{cm}^2$) 4°C overnight で反応させ，0.1% Tween 20-0.01M PBS にて洗浄後，再び溶液Aに15分間浸した。ビオチン化ヤギ抗ラビット IgG をプレートに注ぎ，室温にて30分間反応させ，0.01 M PBS で洗浄後，Avidin Biotin Peroxidase Comp-

lex (ABC) をプレートに注ぎ室温にて30分間反応させた。PBS で洗浄後、4-chloro-1-naphthol-H₂O₂ (4-chloro-1-naphthol を 3mg/ml で methanol に溶解し、5倍量の 100mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) で希釈し、さらに最終濃度 0.01% になるように H₂O₂ を加える) を室温で15分間反応させ、水で洗浄後乾燥させた。反応部位は青紫色スポットとして検出され、これを、島津二波長 TLC スキャナーにて定量した。

3) 組織酵素抗体染色法

GM2 の組織局在を酵素抗体法にて検出した。acetone 固定した組織切片を、PBS に充分浸し、一次抗体としてラビット抗 GM2 抗体を室温にて2時間反応させ、Avidin Biotin peroxidase Complex 法にて処理し、Diaminobenzidine (DAB)・H₂O₂ にて褐色に発色させた。核染色には methyl green を用いた。

7. 血清中抗 GM2 抗体測定方法

血清中抗 GM2 抗体の測定は、Tai et al.¹⁵⁾ の ELISA による方法に若干の変更を加えた。つまり、抗原である GM2 を95%の ethanol に溶解し、96 well microtiter plate (Nunc-Immuno Plate I) に 1μg/well 分注し、乾燥により抗原を固相させた。次に、200μl の 0.01M phosphate-buffered saline + 1% human albumin (PBS+HA) を室温にて30分間加え、蛋白の非特異的結合を阻止した。1次抗体として、50μl の被験血清を加え、室温にて60分間反応させた後、PBS-HA にて2回洗浄した。2次抗体として、PBS-HA にて1000倍に希釈した 100μl のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗人免疫グロブリン (Cappel Lab.) を加え、室温にて60分間反応させた後、PBS にて6回洗浄した。o-phenylenediamine を phosphate-citrate buffer に 40mg/100ml 溶解し、30% H₂O₂ を 40μl/100ml を加え、37℃にて20分間発色させ、50μl の 2N H₂SO₄ を加えて発色を停止させた。波長 455.5nm での吸光度を測定 (ラボサイエンス社 SLT210) した。

8. 抑制試験

血清 100μl あたり GM1, GM2, GM3, GD1a をそれぞれ 10μg~10⁻⁵μg 加え、4℃ overnight 反応させ、遠心後、ELISA にて抗 GM2 抗体活性を測定した。操作前後の抗体活性を測定し、抑制率を以下の式により求めた。

%抑制率=

$$\left(1 - \frac{\text{操作後抗 GM2 抗体活性}}{\text{操作前抗 GM2 抗体活性}} \right) \times 100$$

実験結果

1. 血清中抗 GM2 抗体の検討

血清中の抗 GM2 抗体活性を ELISA を用いて測定したところ、妊婦では妊娠初期より抗体活性の上昇が認められ、産褥5日目まで持続し、産褥30日目には低下していた (Table 1)。妊娠16週以後より産褥5日目までの期間と、健康男子との間に統計学的有意差が認められた。

つぎに、経産婦19例、初産婦5例を妊娠初期より産褥30日目まで連続的に採血し、症例ごとに抗 GM2 抗体活性の推移を検討した (Fig 1)。健康男子の平均+2 S.D. を正常範囲の上限とし、一度でも正常範囲を超えた症例を抗 GM2 抗体陽性例とすると、陽性例は経産 7/19例 (36.8%)、初産 2/5 例 (40.0%)、計 9/24例 (37.5%) であった。この抗 GM2 抗体陽性例9例中7例は、妊娠初期 (最も早い症例では6週) より抗体活性の上昇を認め、以後産褥5日目まではほぼその抗体活性レベルを保ち、産褥30日目には低下する傾向を示した。

つぎに、これらの陽性例の血清中抗 GM2 抗体活性の特異性を検討した。

血清 100μl あたり 10μg の gangliosides を用いた場合の抑制率を、Table 2. に示した。全検体とも GM2

Table 1 Anti-GM2 Activity of Serum

Serum	No	A 455.5 ^{a)}
Healthy Control		
male	12	0.162±0.244 ^{b)}
female	16	0.275±0.333
Pregnant		
<16weeks	59	0.326±0.392
16≤ <28weeks	16	0.547±0.590 ^{c)}
28≤ <36weeks	59	0.470±0.458 ^{d)}
36≤	29	0.476±0.391 ^{d)}
At Delivery	50	0.454±0.463 ^{d)}
Postpartum		
5days	30	0.382±0.443 ^{c)}
30days	21	0.255±0.482

a) absorbance at 455.5nm in ELISA.

b) each samples were tested in triplicate and values represent the Mean±S.D.

c) p<0.05 compared with healthy male.

d) p<0.01 compared with healthy male.

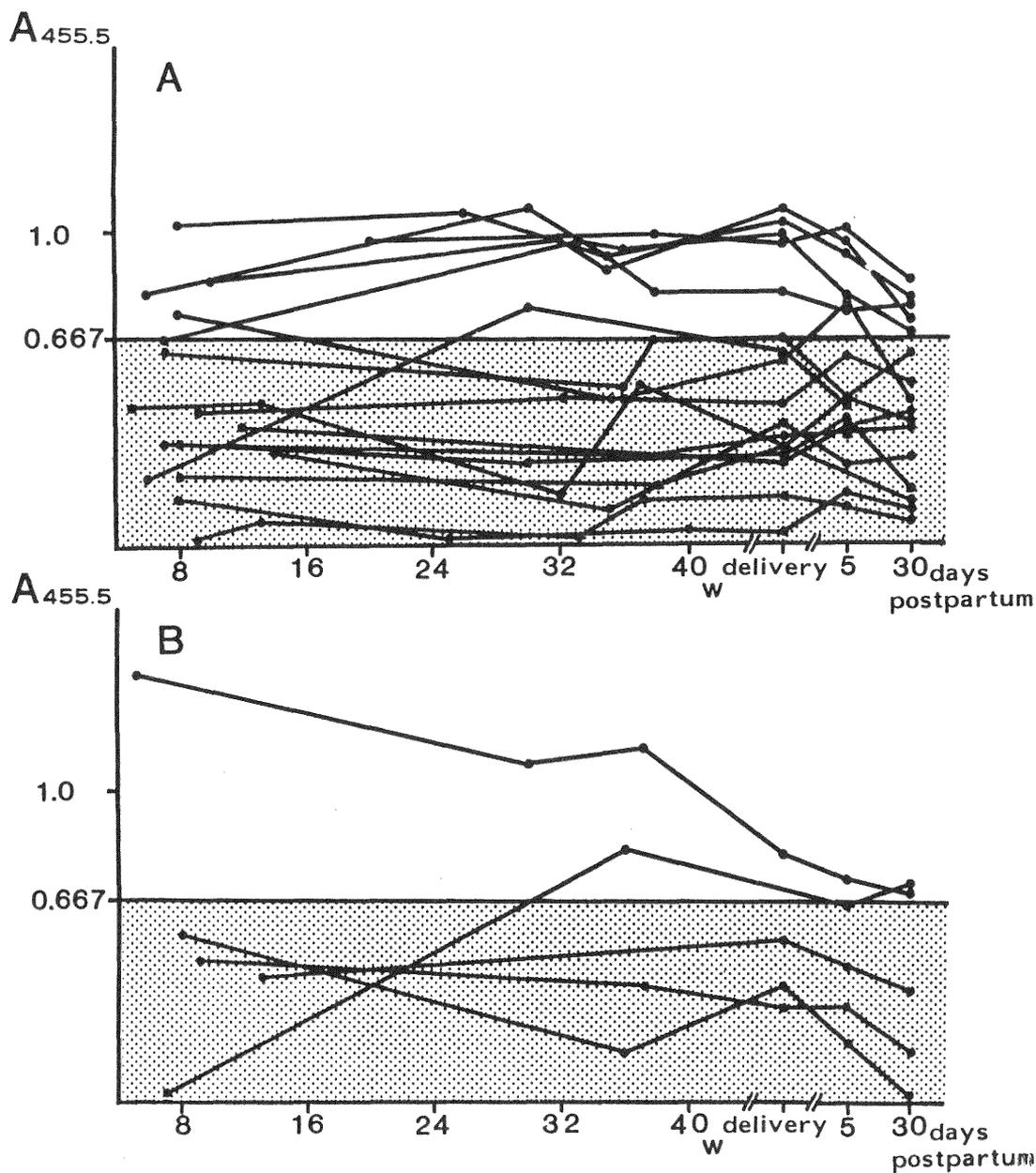


Fig. 1 The kinetics of anti-GM2 antibodies in serum from (A) multipara and (B) primipara. The activity of anti-GM2 antibody was measured by ELISA. The cut-off level was set the mean value for the healthy men plus 2 standard deviation ($A_{455.5}$: 0.667).

Table 2 Absorption Rate of Anti-GM2 Activity in pregnant Sera.

GSL ^{a)}	GM1	GM2	GM3	GD1a
Serum(A _{455.5})				
1 (1.121) ^{b)}	0%	100%	1.4%	8.6% ^{c)}
2 (1.554)	0%	100%	5.1%	0%
3 (1.681)	0%	79.5%	22.3%	21.2%
4 (1.128)	0%	88.7%	11.3%	24.7%
5 (1.257)	0%	88.8%	4.1%	32.6%
6 (1.317)	0%	100%	9.7%	100%
7 (1.027)	19.1%	100%	34.2%	80.7%
8 (1.167)	1.2%	31.6%	53.5%	12.2%
9 (1.588)	0%	27.6%	30.0%	14.7%

a) gangliosides used for inhibition : 10 μ g/100 μ l

b) anti-GM2 activity measured by ELISA at 455.5nm

c) % inhibition :

$$\left(1 - \frac{\text{anti-GM2 activity after inhibition}}{\text{anti-GM2 activity before inhibition}}\right) \times 100$$

により抗体活性は明らかに抑制されるが、5/9例(55.6%)では他の gangliosides による抑制効果がほとんど認められず、GM2 に特異的な抗体が主体をなしていることが確認された。血清1の抑制実験結果を Fig. 2 に示す。GM2 10⁻² μ g より抗体活性は低下しはじめ、10 μ g ではほぼ完全に吸収された。しかし、他の gangliosides では 10 μ g を用いても、抗体活性はほとんど抑制されなかった。

2. 抗 GM2 抗体特異性の検討

GM2 の検出に用いるラビット抗 GM2 抗体の特異性を Immunostaining 法にて確認した (Fig. 3)。GM2 と特異的に反応し、他に gangliosides とは反応しなかった。

3. 絨毛組織の gangliosides の分析

初期絨毛4検体、流産絨毛3検体、分娩時胎盤3検体、計10検体の絨毛組織より gangliosides を抽出し、それぞれ HPTLC プレート上で展開し、Resorcinol-HCl 試薬にて発色させると、全検体とも主に5本にバンドが得られ (Fig. 4)、移動度の大きいものより1から5ま

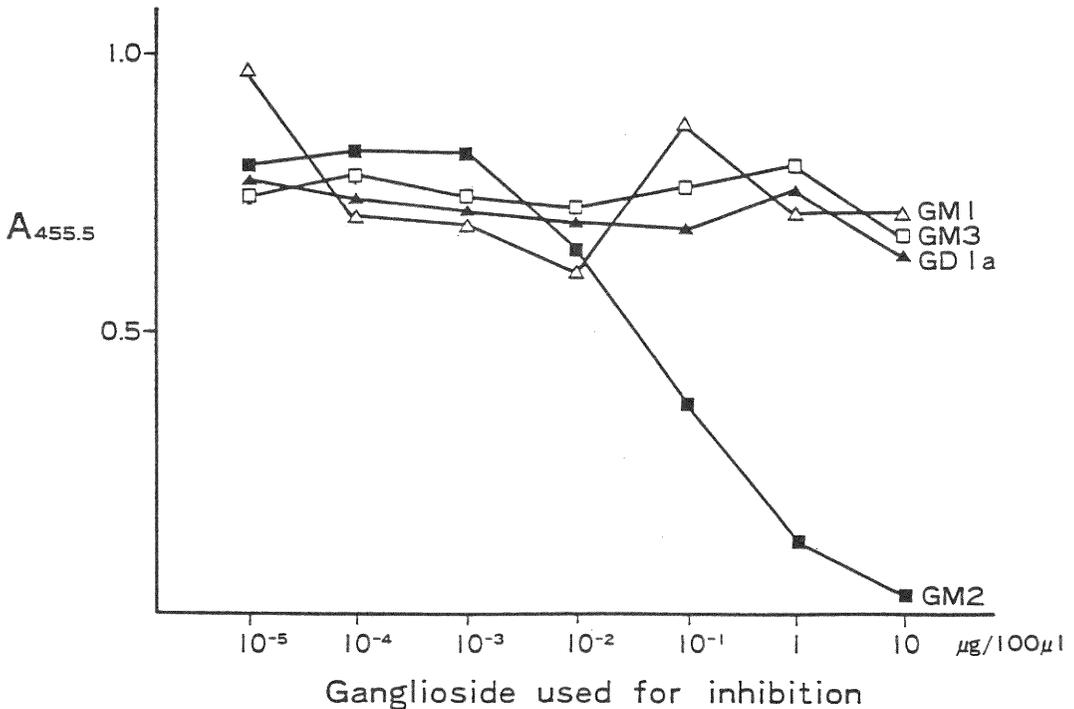


Fig. 2 Inhibition test of anti-GM2 antibody (serum 1) by gangliosides. 100 μ l of serum was incubated with various concentration of gangliosides at 4°C over night and tested its activity in ELISA. Each samples were tested in triplicated.

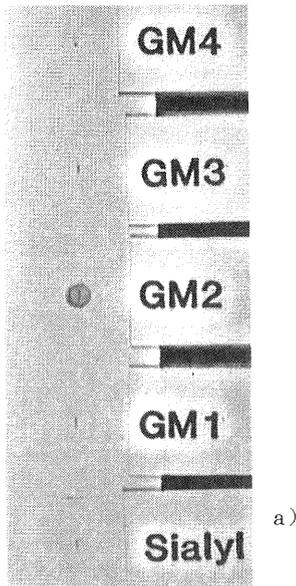


Fig. 3 Specificity of rabbit anti-GM2 antibody. Gangliosides were spotted on Polygram-Sil G plate and the plate were treated with rabbit anti-GM2 antibody followed by Avidin Biotin peroxidase complex method as described under "Materials and Methods".
a): sialylparagloboside

で番号を記した。バンド1は GM3 とほぼ同一の移動度を示し，バンド2は Sialylparagloboside および GM2 とほぼ同一の移動度を示した。そこで，抗 GM2 抗体と M2590 抗体を用い TLC-Immunostaining 法を施行したところ，M2590 抗体はバンド1および2と反応したが，抗 GM2 抗体はバンド1から5のいずれの gangliosides ととも反応しなかった (Fig. 5)。以上より，バンド1は GM3，バンド2は Sialylparagloboside で

Table 3 Quantitative Analysis of Gangliosides isolated from Villi^{a)}

Band No.	% of amount
1	34.3% (21.6-51.2%)
2	10.6% (2.2-17.9%)
3	19.6% (5.3-38.4%)
4	19.2% (11.8-31.3%)
5	10.9% (3.5-27.0%)

a) total sialic acide=30.0 μg/g

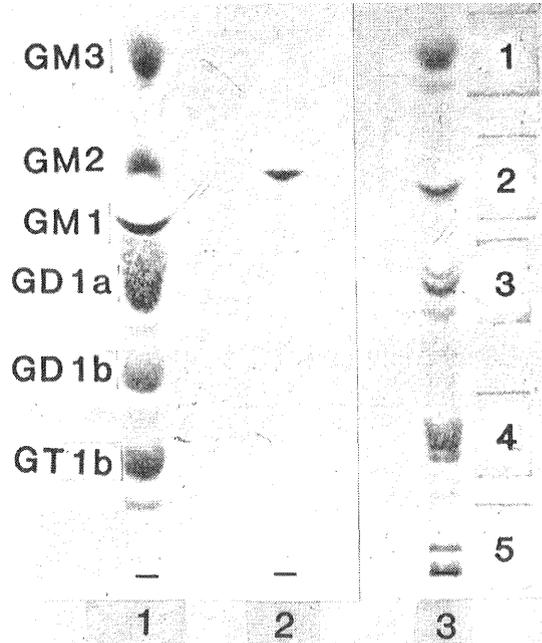


Fig. 4 Thin layer chromatogram of gangliosides from villi. Gangliosides were separated by thin layer chromatography on a HPTLC plate in chloroform-methanol-0.02% CaCl₂ (55; 45; 10, v/v/v). After development, the plate was stained with resorcinol-HCl reagent. Lane 1: a mixture of standard gangliosides, Lane 2: sialylparagloboside, Lane 3: gangliosides from villi of early pregnancy.

あり，GM2 は存在してもごく微量であることが判明した。各バンドの含有比率を Table 3. に示した。gangliosides の量は，シアル酸量にして 3.5-60.0 μg/g (平均 30.0 μg/g) であった。

4. 組織中の GM2 量の測定

各組織中の GM2 量を TLC-Immunostaining 法にて測定した (Fig. 6)。その結果，妊娠初期脱落膜4検体中2検体に 75pmol/g, 70pmol/g の GM2 を認めた。しかし，初期絨毛4検体より抽出した gangliosides 中には GM2 は検出されなかった。また，分娩時胎盤2検体のうち1検体に 25pmol/g の GM2 が検出された。今回提示しなかったが，流産絨毛3検体および子宮筋層2検体中に GM2 は検出されなかった。

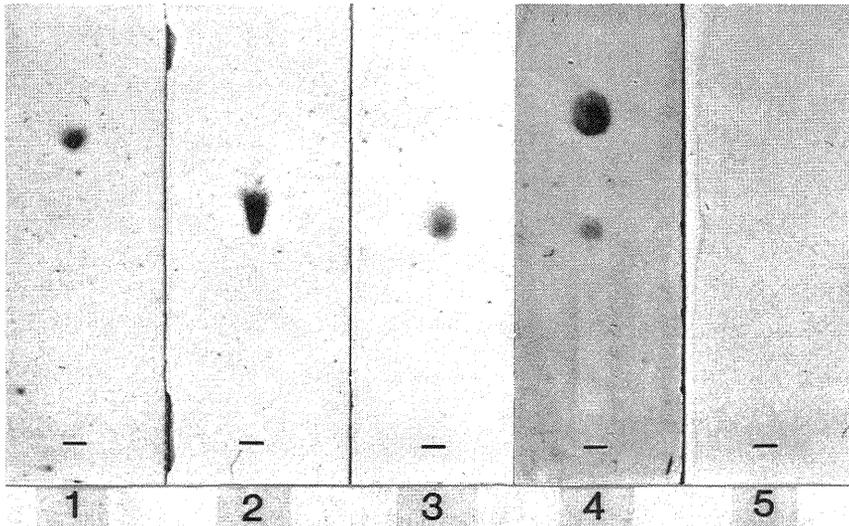


Fig. 5 Thin layer chromatogram of gangliosides isolated from villi. Gangliosides were separated by thin layer chromatography on Polygram-Sil G plate in chloroform-methanol-0.02% CaCl_2 (55; 45; 10, v/v/v). After development, the reference lane (lanes 1 to 3) was cut out and stained with resorcinol-HCl reagent, and the lanes for the gangliosides from villi (lane 4 and 5) were treated with antibodies (lane 4: M2590 mouse monoclonal antibody, lane 5: rabbit anti-GM2 antibody) followed by staining with Avidin Biotin peroxidase complex method.

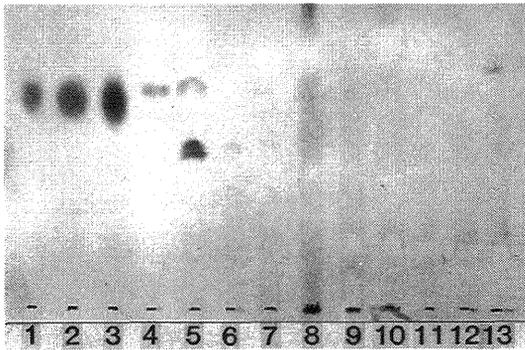


Fig. 6 Thin layer chromatogram of gangliosides isolated from various tissues. Gangliosides were separated by thin layer chromatography on Polygram-Sil G in chloroform-methanol-0.02% CaCl_2 (55; 45; 10, v/v/v). After development, the plate was treated with rabbit anti-GM2 antibody followed by staining with ABC method. Lane 1; GM2 10 pmol, Lane 2; GM2 20 pmol, Lane 3; GM2 50 pmol, Lanes 4 to 7; gangliosides from decidua of early pregnancy, Lanes 8 to 11; gangliosides from villi of early pregnancy, Lanes 12 and 13; gangliosides from placenta at normal delivery.

5. GM2 組織局在の検討

初期妊娠子宮着床部5検体, 流産絨毛4検体, 正常胎盤10検体の凍結切片上での GM2 局在を, 免疫酵素抗体法 (ABC 法) により検討した. 初期妊娠子宮着床部では脱落膜細胞層内に陽性所見が得られたが, 絨毛細胞および絨毛間質には全検体とも陽性所見は認められなかった (Fig. 7). 流産絨毛でも, 絨毛細胞および絨毛間質に陽性所見は認められなかった. 妊娠末期胎盤では脱落膜層内および絨毛間質に陽性所見を認めるものの, やはり絨毛組織には陽性所見は得られなかった (Fig. 8).

6. 血中 GM2 の測定

血中 GM2 量を TLC-Immunostaining 法にて測定した. 正常分娩5症例の分娩時血中 GM2 量は, 臍帯血・母体血それぞれ, 3.0~22.0pmol/ml 平均 10.9pmol/ml, 5.0~90.0pmol/ml 平均 64.0pmol/ml 測定され, 母体血中により高濃度に GM2 が含有されていた (Fig. 9). 対照群の血中には, GM2 を認めなかった. また, 妊娠初期から産褥30日目まで連続的に正常分娩5症例の血中 GM2 量を調べると, 8.8pmol/ml~136.0

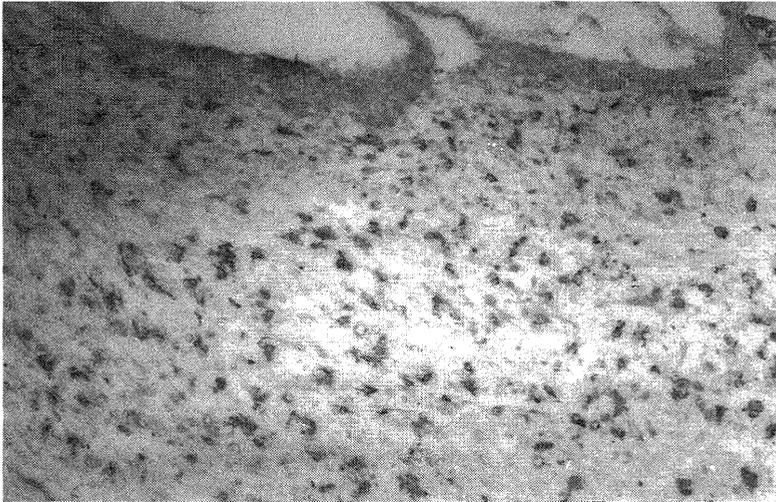
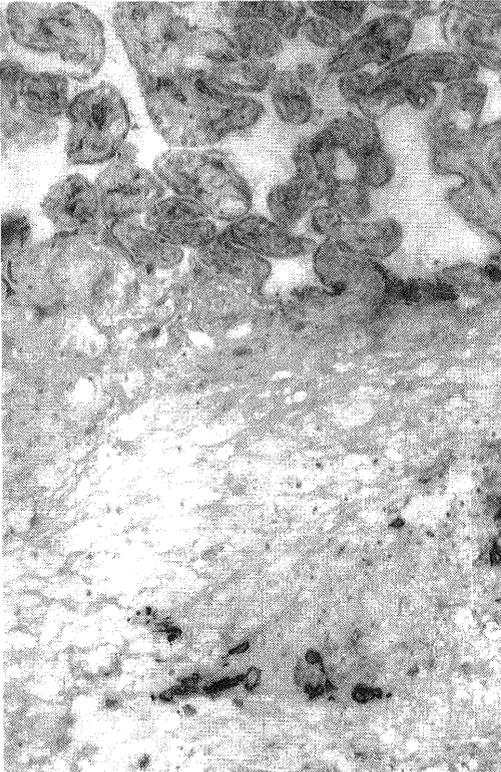


Fig. 7 Immunohistochemical staining of GM2 in the implantation site of 8 gestational weeks ($\times 100$). The GM2 positive cells were scattered in the decidua, but positive findings of GM2 were not observed on trophoblast (the upper part).



pmol/ml といずれの検体にも GM2 が認められた (Fig. 10).

考 察

胚および胎児に特異的に出現する抗原は、固体が成立する過程で、細胞間の相互認識や器官の形成に直接関与する重要な分子として注目される。その代表的な例は F9¹⁶⁾ 抗原であろう。マウスの teratocarcinoma F9 には、初期胚と共通の抗原があり、これの対応抗体で認識される抗原が盛んに研究された。そして、Solter らの stage-specific embryonic antigen (SSEA) 抗体シリーズ作成¹⁷⁾¹⁸⁾ や、神奈木らの生化学的解析¹⁹⁾²⁰⁾ の結果、抗原エピトープは X-hapten 構造を有する糖脂質であることが判明し、さらに、多価の X-hapten が初期胚細胞の decompaction をひき起こすことが Fenderson により示された²¹⁾。SSEA 系は、teratocarcinoma の

Fig. 8 Immunohistochemical staining of GM2 of the normal placenta at delivery ($\times 100$). The positive findings of GM2 were observed on the cells in the decidua layer and villous stroma, but no positive finding were observed on trophoblast.

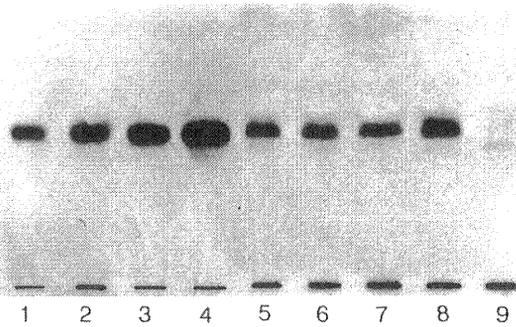
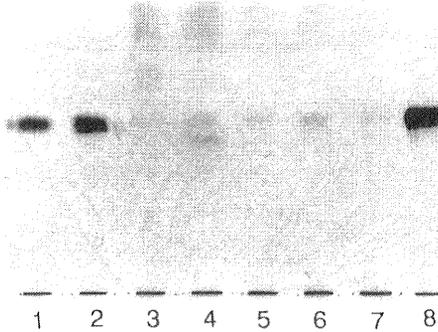
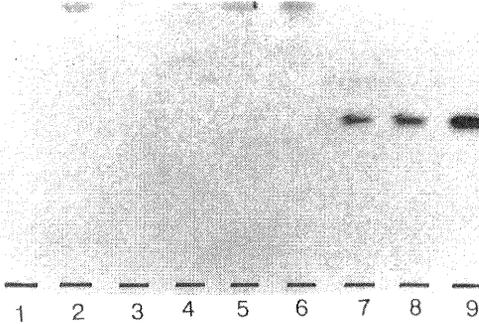
A: Pregnant**B:** Cord blood**C:** Healthy control

Fig. 9 Thin layer chromatogram of gangliosides isolated from (A) pregnant sera, (B) cord blood and (C) healthy control. Gangliosides were separated on Polygram-Sil G and treated with rabbit anti-GM2 antibody followed by staining with ABC method. (A) lane 1; GM2 10 pmol, lane 2; GM2 20 pmol, lane 3; GM2 50 pmol, lane 4; 100 pmol, lane 5 to 9; pregnant sera at delivery. (B) lane 1; GM2 20 pmol, lane 2; GM2 50 pmol, lane 8; GM2 100 pmol, lane 3 to 7; cord blood. (C) lane 1 to 6; healthy non-pregnant women, lane 7; GM2 10 pmol, lane 8; GM2 20 pmol, lane 9; 50 pmol.

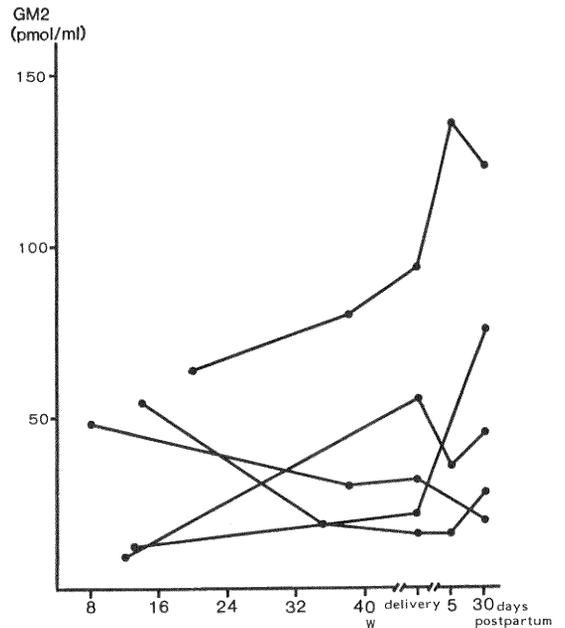


Fig. 10 GM2 contents in sera collected at various times from 5 pregnant women. The content ranged from 8.5~136.0 pmol/ml.

みならず他の癌細胞にも表現され、その対応抗体は tumor marker として臨床応用されるに至っている²²⁾。

一方、melanoma 細胞にも胎児脳と共通する抗原があり、Oncofetal Antigen (OFA-I) と命名され、その後、ganglioside GM2 および GD2 であることが判明した。OFA-I は胎児に出現する点や、生化学的性状としては糖脂質に属する点など SSEA 系と似ている。

ところが、正常妊婦血中における対応抗体の陽性率を見ると、SSEA 系では低値²³⁾であるのに対し、本研究でも示した如く OFA-I では高値を示した。このことは、OFA-I が妊娠維持など妊娠生理に関する研究にとって、大変重要である事を示唆している。しかし、現在まで OFA-I の局在や生理活性、対応抗体の推移など不明な点が多く、生化学的検討を含めその解明が待たれている。そ

ここで，本研究では，OFA-I のうちまず GM2 に関し妊娠時におけるその局在，血中濃度および対応抗体の推移を生化学的並びに免疫学的手法により検索した。

従来，抗 OFA-I 抗体測定法として Immune Adherence (I.A.) 法が用いられていたが，I.A. 法では抗 GM2 抗体と抗 GD2 抗体の区別が困難であり，個々の gangliosides に対する免疫応答の検討が出来なかった。そこで，本研究では ELISA を応用し，抗 GM2 抗体を計測した。その結果，妊娠により GM2 と反応する抗体が血清中に高頻度に出現し，そのうちの 55.6% が GM2 特異的であることを抑制試験にて認識した。この事実は，妊娠により GM2 の感作が行われたことを示唆している。同一症例の抗 GM2 抗体の推移を調べても，妊娠現象とよく平行し，妊娠初期より活性の上昇を認め，産褥5日目までその活性を維持し，妊娠現象の終息する産褥30日目では活性が低下していた。

そこで，筆者は妊娠中どこに GM2 が存在するのか検討した。GM2 の起源の可能性として，胎児側と母体側に大別することが出来る。GM2 は胎児脳に多量に含まれていることから，胎児脳より胎児血中に遊出し胎盤を経由して母体血中に出現する可能性がまず考えられる。しかし，本研究の母体血中と胎児血中の GM2 量の測定結果では，母体血中により多量に GM2 が含有されていた。また，胎児脳が GM2 の起源であれば，糖脂質の代謝動態より考えて，産褥30日目には血中に GM2 が存在しないはずである。ところが，今回産褥30日目に測定した5例全例に，悪性腫瘍患者の血中濃度²⁴⁾に匹敵する多量の GM2 が証明でき，GM2 の起源が母体側であることが強く示唆された。そこで，妊娠子宮の各部分の GM2 量を，TLC-Immunostaining 法により検索した。従来は，絨毛細胞，特に流産絨毛に GM2 が存在すると考えられていたが⁹⁾，絨毛組織より抽出した gangliosides には GM2 は証明できず，脱落膜の 2/4 例に高濃度の GM2 が証明された。免疫組織染色の結果も同様に，流産絨毛も含めいずれの絨毛細胞上にも陽性所見が見られず，脱落膜内の細胞群および分娩時胎盤の絨毛間質に陽性所見が認められた。さらに，血中 GM2 が産褥30日目にも多量に測定された事実より，GM2 を遊離する細胞は分娩後かなり長期間体内に存在すると考えられ，絨毛細胞に比べ脱落膜細胞は分娩後体内にとどまりやすい事からも，妊娠血中に存在する GM2 は脱落膜に由来すると考えられる。よって，分娩時胎盤の 1/2 例に含有されていた 25pmol/g の GM2 は胎盤中の脱落膜由来の GM2 と考えられる。当教室では，入江博

士より GM2 と反応する抗体 (mouse monoclonal antibody: 202) の供与を受け，正常妊娠や妊娠中毒症における変化を観察し，絨毛細胞上に 202抗体と反応する抗原が存在する事も報告してきた。しかし，202抗体は GM2 とも反応するが，それより遙かに強く GM4 と反応することが判明し¹²⁾，絨毛細胞上の 202抗体と反応する抗原は GM2 より GM4 と考えられる。

一方，OFA-I 抗体は *in vitro* の補体存在下で腫瘍細胞に対し cytotoxic に作用することが報告されており²⁵⁾，臨床応用もされている²⁶⁾。このように細胞障害性を有する抗 GM2 抗体は妊婦生体内ではどのような働きをしているのであろうか。抗 GM2 抗体は IgM であり，胎盤通過性はなく，胎児には直接影響はしないと考えられる。では，妊娠維持に大切な絨毛細胞と脱落膜に対してはどうであろうか。絨毛細胞は GM2 を表現しておらず標的細胞とはなりにくいし，仮に微量の GM2 が表現されているとしても，遮断抗体との相互作用が考えられ，細胞障害性には働かないと考えられる。予備実験ではあるが，高い抗 GM2 抗体活性を有する妊婦血清は，GM2 を多量に含む melanoma 細胞 (M14) に対しては，殺細胞効果を認めるが，GM2 の表現されていない正常絨毛細胞に対しては，やはり殺細胞効果を認めなかった。では，GM2 を表現する脱落膜に対してはどうであろうか。筆者らの報告の如く⁸⁾，妊娠が継続する正常妊娠や胎状奇胎妊娠では，高い抗 GM2 抗体活性を有する例が多いのに対し，流産例ではいずれも低い抗体活性を示す。このことは，脱落膜に対しても抗 GM2 抗体は，細胞障害性には働かないことを示唆している。抗 GM2 抗体は，妊娠維持に対し，調節的役割を果たしているのではなからうかと推察され，今後の重要な研究課題である。

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師竹内正七教授並びに金沢浩二助教授に篤く御礼申し上げますとともに，生化学的検査の御協力御指導と快く gangliosides や抗体を提供いただいた静岡薬科大学平林義雄先生に心から深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 神奈木玲児：ガングリオシドに対するモノクローナル抗体と腫瘍診断。日本医師会雑誌，95: 200, 1986.
- 2) Hakomori, S. and Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. J. Natl. Cancer Inst. 71:

- 231, 1983.
- 3) 神奈木玲児, 福士泰夫, 繁田勝美: 個体発生と糖脂質. 細胞工学, 5: 96, 1986.
 - 4) Irie, R.F., Irie, K. and Morton, D.L.: A membrane antigen common to human cancer and fetal brain tissues. *Cancer Research*. 36: 3510, 1976.
 - 5) Tai, T., Paulson, J.C., Cahan, L.D. and Irie, R.F.: Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5392, 1983.
 - 6) Katano, M., Saxton, R.E. and Irie, R.F.: Human monoclonal antibody to tumor associated ganglioside GD2. *J. Clin. Lab. Immuno.* 15: 119, 1984.
 - 7) 高橋正明: 癌胎児抗原 (Oncofetal antigen-I) による婦人科悪性腫瘍の予後に関する研究: 日産婦誌, 36: 2613, 1984.
 - 8) 鈴木孝明, 茅原 保, 本間 滋, 湯沢秀夫, 金沢浩二, 竹内正七: ELISA を用いた妊婦血清中抗 ganglioside GM2 抗体の測定. 日産婦誌, 40: 1773, 1988.
 - 9) 竹内 裕: Trophoblast の生体内免疫的拒絶機構における Oncofetal Antigen-I の意義. 日産婦誌, 37: 1893, 1985.
 - 10) Higashi, H., Hirabayashi, Y., Hirota, M., Matsumoto, M. and Kato, S.: Detection of ganglioside GM2 in sera and tumor tissues of hepatoma patients. *J. Cancer Res.(Gann)* 78: 1309, 1987.
 - 11) Hirabayashi, Y., Hamaoka, A., Matsumoto, M., Matsubara, T., Tagawa, M., Wakabayashi, S. and Taniguchi, M.: Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies cross-reactivity recognized GM3 a prominent ganglioside of B16 melanoma. *J. Biol. Chem.* 260: 13328, 1985.
 - 12) Tai, T., Sze, L., Kawashima, I., Saxton, R.E. and Irie, R.F.: Monoclonal antibody directs monosialogangliosides having a sialic acid $\alpha 2 \rightarrow 3$ -Galactosyl residue.: *J. Biol. Chem.* 262: 6803, 1987.
 - 13) Ledeen, R.W. and Yu, R.K.: Gangliosides. Structure, Isolation and Analysis. *Methods in enzymology.* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Academic Press, Florida, 83: 139, 1982.
 - 14) Higashi, H., Fukui, Y., Ueda, S., Hirabayashi, Y. and Naiki, M.: Sensitive enzyme-immunostaining and densitometric determination on thin-layer chromatography of N-glycolylneuraminic acid containing glycolipids, Hanganutziu-Deicher antigens. *J. Biochem (Tokyo)*. 95: 1517, 1984.
 - 15) Tai, T., Cahan, L.D., Saxton, R.E. and Irie, R.F.: Human monoclonal antibody against ganglioside GD2. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 627, 1984.
 - 16) Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D. and Condamine, H.: Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2988, 1973.
 - 17) Solter, D. and Knowles, B.B.: Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5565, 1978.
 - 18) Shevinsky, L.H., Knowles, B.B., Damjanov, I. and Solter, D.: Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell*, 30: 697, 1982.
 - 19) Kannagi, R., Nudelman, E., Levery, S.B. and Hakomori, S.: A series of human erythrocyte glycosphingolipids reacting to the monoclonal antibody directed to a developmentally-regulated antigen. SSEA-1. *J. Biol. Chem.* 257: 14865, 1982.
 - 20) Kannagi, R., Nudelman, E. and Hakomori, S.: Possible role of ceramide in defining the structure and function of membrane glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3470, 1982.
 - 21) Fenderson, B.A., Zehavi, U. and Hakomori, S.: A multivalent lacto-N-fucopentaose III-lysyllysine conjugate decompacts preimpla-

- ntation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective. *J. Exp. Med.* **160**: 1591, 1984.
- 22) 神奈木玲児，福士泰夫，箱守仙一郎：糖鎖特異的モノクローナル抗体によって認識される癌関連ムチン (cancer-associated mucin). *癌と化学療法*, **13**: 812, 1986.
- 23) 小林 浩：婦人科疾患における Sialyl SSEA-1 測定の臨床的有用性. *日産婦誌*, **40**: 828, 1988.
- 24) Yamanaka, T., Hirabayashi, Y., Hirota, M., Kaneko, M., Matsumoto, M. and Kobayashi, N.: Detection of gangliotriaose-series glycosphingolipids in serum of cord blood and patients with neuroblastoma by a sensitive TLC / enzyme-immunostaining method. *Biochem. Biophys. Acta*, **920**: 181, 1987.
- 25) Sidell, N., Irie, R.F. and Morton, D.L.: Immune cytotoxicity of human malignant melanoma by antibody to oncofetal antigen-I (OFA-I). Complement dependent cytotoxicity. *Cancer Immunol.* **7**: 151, 1979.
- 26) Irie, R.F. and Morton, D.L.: Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8694, 1986.

(昭和63年12月21日受付)