
原 著

胞状奇胎に関する免疫病因論的研究

—特に免疫グロブリンの役割—

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内正七教授）

源 川 雄 介

Studies on the immunologic pathogenesis of Hydatidiform Mole
—The Role of Immunoglobulins in the Pathogenesis—

Yusuke MINAGAWA

*Department of Obstetrics & Gynecology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoushichi Takeuchi)*

For the purpose of elucidating immunological role in the pathogenesis of hydatidiform mole, the author examined the localization and the content of immunoglobulin in chorionic tissue, and also serum antibodies reacting with trophoblastic membrane extract in molar pregnancy, normal pregnancy and spontaneous abortion.

The results obtained were as follows ;

1. By immunohistological staining, IgGs were observed to locate on the surface of syncytiotrophoblasts of early normal pregnancy and hydatidiform mole. The fluorescence of IgGs was stronger in hydatidiform mole than in normal pregnancy. IgGs were to be attenuated in spontaneous abortion compared with normal or molar pregnancy. There was no remarkable change in the localization of IgMs among mole, normal pregnancy and abortion.
2. The amount of IgG eluated from molar tissue was larger than that from normal or abortive chorionic tissue.
3. IgG antibodies, which reacted with plasma membrane vesicles preparing from molar tissue, were detected in the sera of molar patients by enzyme linked immunosorbent assay.

In conclusion, IgGs found in molar tissue were considered to play an important role as one of immunological factors in relation to the pathogenesis of hydatidiform mole.

Key word: hydatidiform mole, immunoglobulinG, plasma membrane vesicles, ELISA.
胞状奇胎, 免疫グロブリンG, 細胞膜表面物質 ELISA.

Reprint requests to: Yusuke Minagawa,
Department of Obstetrics & Gynecology,
Kido Hospital, Kamikido 777, Niigata
City, 950, JAPAN.

別刷請求先: 〒950 新潟市上木戸777
新潟医療生活協同組合 木戸病院
源川雄介

概 要

胞状奇胎の発生機序に関しては、現在のところ統一された見解は得られていない。しかしながら、近時そこ何らかの免疫的機序の作用していることが解明されつつある。そこで、免疫学的手法を用いて胞状奇胎絨毛組織及びその患者血清について解析を行い、正常妊娠との対比において、以下の成績を得た。

1. 蛍光抗体法直接法により各絨毛組織における免疫グロブリン（以下 Ig）の局在について比較検討したところ、IgG に関しては胞状奇胎絨毛組織、正常絨毛組織、流産絨毛組織との間に明瞭な差異が観察された。すなわち、胞状奇胎絨毛組織では正常絨毛組織よりも強い蛍光が観察され、流産絨毛組織では蛍光が観察されなかった。
2. 各絨毛組織より Ig を抽出し、その重量を測定比較したところ、胞状奇胎絨毛組織より抽出された IgG の収量は、正常初期絨毛組織、流産絨毛組織より抽出された IgG に比較して多いことが観察された。
3. 胞状奇胎絨毛組織より得られた膜表面成分 plasma membrane vesicles（以下 PMV）を固相化して行った酵素免疫測定法により、胞状奇胎患者血清中にはその絨毛組織 PMV と反応する抗体、特に IgG 抗体が存在することが観察された。

以上より、胞状奇胎絨毛組織、特にその表面に観察される IgG が、その絨毛組織を母体（患者）よりの免疫的拒絶から保護し、生着存続に対して促進的に作用している可能性を指摘しており、胞状奇胎の発生過程に、この IgG 抗体が重要な役割を果たしていることを推察された。

I. 諸 言

妊娠初期に妊卵ないし胎芽が死亡した場合、現象論的に、一方では自然流産となって壊死におちいった絨毛組織が観察され、また他方では胞状奇胎となって水腫化した絨毛組織が観察される。いずれも妊娠という同種移植の成立における異常現象でありながら、前者では絨毛組織を含む妊娠物 conceptus が子宮内より拒絶排出され、後者では子宮内におおる期間生着存続する。この二つがどのような機序によって選択されるのかという問題は極めて興味ある課題である。それぞれの絨毛組織に賦与された染色体レベルの異常の他に、その選択の場には免疫レベルの異常の他に、その選択の場には免疫的因子の関与する可能性が指摘されてきた¹⁾。教室ではこの方面の研究を重点的に進めてきており、今回は胞状奇胎の発

生病因との関連において、胞状奇胎絨毛組織と免疫グロブリンとの interaction に関して解析した。

II. 対象と方法

1. 実験対象

胞状奇胎（妊娠 8—14週、全胞状奇胎）12例を対象とした。比較対象群として、正常妊娠（6—12週）57例および自然流産（6—12週）20例を選択し、また正常男子20例の血清も使用した。

2. 実験方法

(1) 絨毛組織における免疫グロブリン（以下 Ig）の局在に関する検討（蛍光抗体法直接法による）

a. 抗血清

rabbit FITC 標識 anti-human IgG, IgM, IgA 血清 (Hoechst 社) をリン酸緩衝液 (pH 7.2, 0.25mol) (以下 PBS) にて 10—20倍に希釈して使用した。また、ブロッキングには rabbit 非標識 anti-human IgG, IgM, IgA 血清 (Hoechst 社) を使用した。

b. 蛍光抗体法

採取した絨毛組織を生理食塩水中にて十分洗浄して挟雑物を除去後、再度 PBS で洗浄し標本を作成した。凍結切片は、組織を dry-ice—hexan acetone bath (—70℃) 内で急速凍結し、cryostat (Bright 社) にて 4—6 μm の連続切片を作成し、無蛍光ガラス (松波 No. 1) に載せ、室温にて30分間乾燥固定した。パラフィン切片は、組織を periodate-lysine-paraphormardehyde (以下 PLP) にて 6—12時間固定した後、パラフィン抱埋し、マイクロームにて 2—4 μm の連続切片を作成し、無蛍光ガラスに載せて脱パラフィンを行った。各切片は冷却 PBS にて10分間3回洗浄した後、FITC 標識血清を湿潤箱内 (37℃) にて45分間反応させた。反応後冷却 PBS にて3回洗浄し、直ちに glycerine PBS にて封入した後、B.H.F. 型蛍光顕微鏡 (オリンパス社) にて観察した。各蛍光の強さは (—) から (±), (+), (++)、(+++) の5段階評価法で判定した。

(2) 絨毛組織よりの Ig 抽出収量の検討

胞状奇胎絨毛組織、正常絨毛組織、流産絨毛組織より組織結合性 IgG, IgM を Faulk らの方法²⁾ に準じて抽出した。すなわち、採取した絨毛組織を直ちにヘパリン加 PBS 中にて十分に洗浄して挟雑物を除去後、細切し、これを2倍量の37℃加温クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.7, 0.1mol) 中に2時間浸した。この間、適宜クエン酸を添加し、緩衝液の pH 2.7 を維持した。得られた溶液を 10000—15000rpm にて10分間遠心し、そ

の上清を採取して pH 7.4 に調整後、IgG, IgM 濃度をレーザーネフェロメトリー (Boering 社) にて測定し、各絨毛組織の単位重量あたりの収量を算出した。

(3) 胞状奇胎絨毛組織よりの細胞膜表面成分 plasma membrane vesicles (以下 PMV) の分離およびこれに対する反応性抗体の測定

a. PMV の分離

Smith らの方法³⁾に準じ、胞状奇胎絨毛組織より PMV, すなわち微絨毛 microvilli の分離を行った。すなわち、排出直後の胞状奇胎絨毛組織を小片を細切し、これをまずヘパリン加 PBS 中にて十分に洗浄して挟雑物を除去後、冷却等張塩化カルシウム液にて洗浄し、さらに冷却生理食塩中にて30分間マグネットスターラーを使用して緩徐に攪拌処理した。得られた溶液を、800G にて10分間遠心して上清を収集し、これを 10000G にて30分間遠心し、その pellet を採取し、これを PMV とした。その蛋白濃度を Follin-Lolly 法にて測定した後、PBS (pH 7.4, 0.01mol) に浮遊させ、-80℃にて凍結保存した。なお pellet の一部を 2% glutaraldehyde 加 PBS にて処理し、透過型電子顕微鏡 (日立製作所, HS9, H800) にて観察した。

b. 酵素免疫測定法 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) による PMV 反応性抗体の測定

対象血清について PMV 反応性抗体の有無を Davies らの方法⁴⁾に準じて検討した。すなわち、蛋白濃度 50 μg/ml とした PMV の炭酸緩衝液 (pH 9.6, 0.05mol) 懸濁液をマイクロタイタープレート (Nunc) の各 well に 50μl ずつ分注し、室温で60分間反応付着させた。非付着性 PMV 懸濁液を吸収除去後、これに0.1% glutaraldehyde 加炭酸緩衝液 200μl を分注して3分間反応させ、付着 PMV を固定した。ブロッキングは0.5% bovine serum albumin にて行った。血清 (被検およびコントロール) 50μl を各 well に分注し、37℃30分間反応させた。洗浄用緩衝液にて洗浄した後、100倍希釈 urease 標識 sheep anti-human IgG ないし、IgM 抗体 (Sera-Lab 社) 50μl を文注し、37℃30分間反応させた。洗浄用緩衝液および脱イオン水にて十分洗浄した後、urease 基質としての bromocresol 紫加尿素溶液 (Sera-lab 社) 50μl を文注し37℃30分間反応させ、最後に 1% thiomersal 溶液 20μl にて反応を停止させた。反応の程度は肉眼的に紫色に変化している最終希釈倍数 2x に対し、(x + 1) をもって抗体価とし半定量化した。なお positive control には反応強陽性を示した血清を標準血清として使用し、negative control には男

子血清を使用した。

Ⅲ. 結 果

1. 絨毛組織における免疫グロブリン Ig の局在 (表 1, 写真 1, 2, 3)

凍結切片ではパラフィン切片に比較して蛍光が鮮明であったが、組織構築や蛍光陽性部位の識別はパラフィン切片の方が明確であった。

胞状奇胎絨毛組織では正常絨毛組織とはほぼ同様の所見であった。すなわち、IgG については、syncytiotrophoblast (以下 SyTr) および基底膜につよい蛍光が観察され、特に胞状奇胎絨毛の SyTr ではその表層のみでなく細胞質にも蛍光が観察された。cytotrophoblast (以下 CyTr) および絨毛間質に蛍光は認められなかった。IgM および IgA については、いずれの組織にも蛍光は観察されなかった。なお、流産絨毛組織では SyTr および基底膜での IgG の蛍光は弱く、反面、それらの部位には弱いながら IgM の蛍光が観察された。

2. 絨毛組織よりの免疫グロブリン Ig 抽出収量

抽出した IgG 量は、胞状奇胎絨毛組織 3例では 0.3285mg/g, 正常絨毛組織57例では 0.2084mg/g であり、また流産絨毛組織20例では 0.1848mg/g であった。すなわち、胞状奇胎絨毛組織、正常絨毛組織は IgG

表 1 胞状奇胎絨毛組織、正常絨毛組織、流産絨毛組織における免疫グロブリン G, M, A の局在 (蛍光抗体法直接法による)

	IgG	IgM	IgA
胞状奇胎絨毛組織			
syncytiotrophoblast	+++	-	-
cytotrophoblast	±	-	-
basement membrane	+	-	-
villous stroma	-	-	-
正常絨毛組織			
syncytiotrophoblast	++	-	-
cytotrophoblast	±	-	-
basement membrane	+	-	-
villous stroma	-	-	-
流産絨毛組織			
syncytiotrophoblast	±~-	+	-
cytotrophoblast	-	-	-
basement membrane	±	-	-
villous stroma	-	-	-

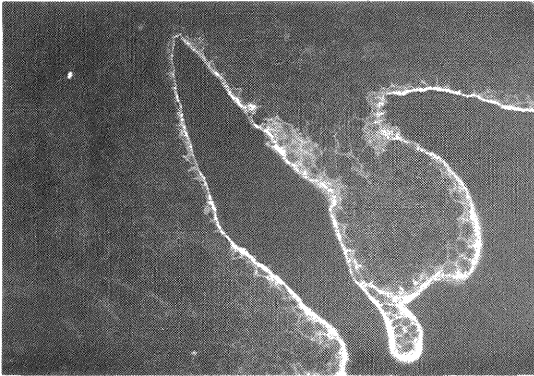


写真 1 正常初期絨毛に対する抗 IgG 蛍光抗体法直接法
絨毛組織合胞細胞表層に蛍光を認める。(×100)

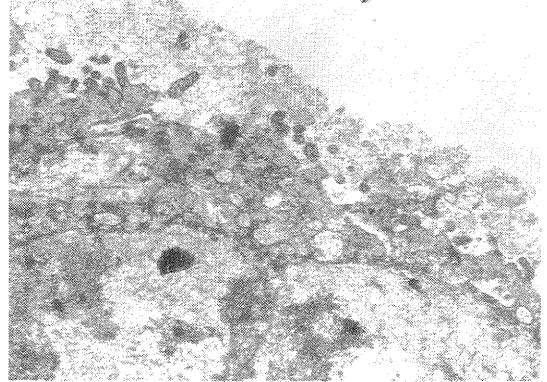


写真 4 胞状奇胎絨毛組織の電子顕微鏡写真。
絨毛細胞の表面に microvilli と思われる細胞膜表面物質の存在を認める。(7×10³倍)

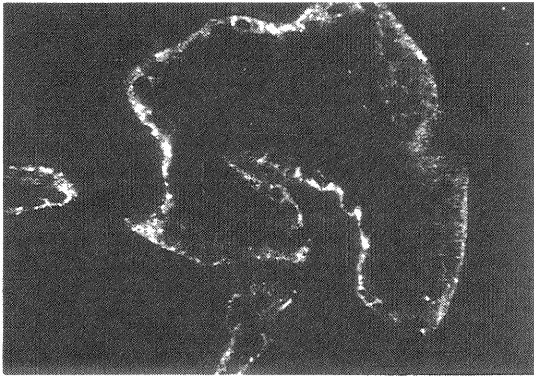


写真 2 胞状奇胎絨毛組織に対する抗 IgG 蛍光抗体法直接法
絨毛組織合胞細胞表層に正常絨毛組織よりも更に強い蛍光を認める。(×100)

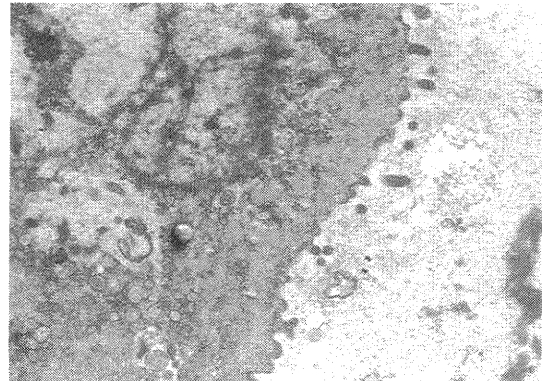


写真 5 攪拌処理を施行後の胞状奇胎絨毛細胞の電子顕微鏡写真。絨毛細胞表面の細胞膜表面物質が除去されているのが認められる。(7×10³倍)

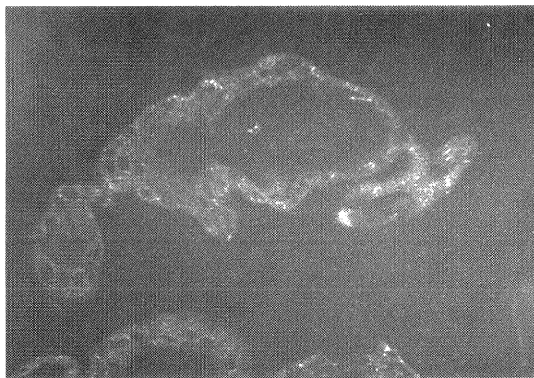


写真 3 流産絨毛組織に対する抗 IgG 蛍光抗体法直接法
流産絨毛組織には IgG の局在を認めなかった。(×100)

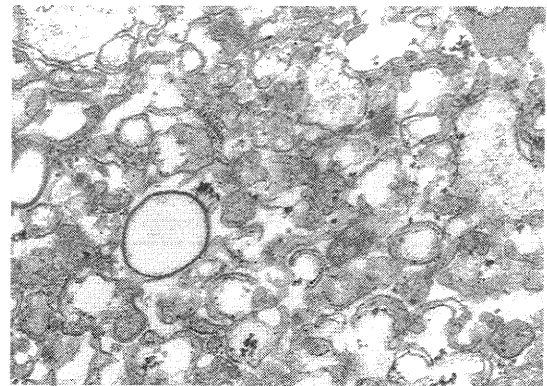


写真 6 攪拌処理にて除去された絨毛細胞の細胞膜表面物質を含む浮遊液に、超遠心操作を加え、得られた pellet の電子顕微鏡写真。(3×10⁴倍)

収量が多かった。また、IgM についてはその収量が痕跡的であり、相互の比較は不可能であった。

3. 胞状奇胎絨毛組織よりの表面膜成分 PMV の分離とこれに対する反応性抗体の測定

(1) PMV の電子顕微鏡所見 (写真 4, 5, 6)

胞状奇胎絨毛組織 4 例より PMV の分離を行った。写真 4, 5 は分離操作前後の細胞表面に電顕所見であり、操作後の細胞表面は操作前に比較して微絨毛 microvilli が明らかに除去されており、また得られた PMV には、その微絨毛と判断される物体の存在が観察された (写真 6)。

(2) PMV 反応性抗体の測定 (表 2, 3)

上で得られた胞状奇胎絨毛組織 4 例の PMV を抗原とする ELISA によって、それぞれの胞状奇胎患者血清、正常妊婦 3 例の血清、コントロールとして正常男子 20 例の血清について、その抗体値を測定した。まず、正常男子血清 20 例についての反応では、4 例の胞状奇胎絨毛組織よりの PMV-1, -2, -3, -4 に対する抗体価 Mean \pm 2 S.D. は、IgG 抗体でそれぞれ 1.30 \pm 1.80, 1.25 \pm 1.53, 1.25 \pm 2.09, 1.55 \pm 2.14 であり、IgG 抗体でそれぞれ 0.65 \pm 1.71, 0.60 \pm 1.33, 0.45 \pm 1.18, 0.55 \pm 1.18 であった。そこでここでは、IgG 抗体、IgM 抗体ともその抗体価 5 以上をもって陽性と定義した。

胞状奇胎患者血清 4 例、正常妊婦血清 3 例についての IgG、および IgM 抗体価は表 2, 表 3 の如くであった。すなわち、胞状奇胎患者血清の IgG 抗体については、自己の PMV に対しては 7 ~ 8 の高い抗体価を示し、

表 2 胞状奇胎患者血清、正常妊婦血清中の胞状奇胎絨毛組織 PMV に対する反応性 IgG 抗体価 (ELISA 法による)

被検血清	胞状奇胎絨毛組織 PMV			
	症例 1 (PMV-1)	症例 2 (PMV-2)	症例 3 (PMV-3)	症例 4 (PMV-4)
胞状奇胎患者				
症例 1	<u>7</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>7</u>
症例 2	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
症例 3	0	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>6</u>
症例 4	<u>5</u>	4	<u>6</u>	<u>8</u>
正常妊婦				
症例 1	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>7</u>
症例 2	4	4	<u>6</u>	<u>7</u>
症例 3	<u>6</u>	3	<u>7</u>	<u>7</u>

アンダーラインの数値は陽性を示す

表 3 胞状奇胎患者血清、正常妊婦血清中の胞状奇胎絨毛組織 PMV に対する反応性 IgM 抗体価 (ELISA 法による)

被検血清	胞状奇胎絨毛組織 PMV			
	症例 1 (PMV-1)	症例 2 (PMV-2)	症例 3 (PMV-3)	症例 4 (PMV-4)
胞状奇胎患者				
症例 1	3	4	3	2
症例 2	3	<u>5</u>	3	3
症例 3	1	4	2	3
症例 4	2	3	3	3
正常妊婦				
症例 1	2	3	3	2
症例 2	3	3	4	2
症例 3	2	<u>5</u>	3	3

アンダーラインの数値は陽性を示す

また、他の患者の PMV に対しても陽性を示すものが多かった。正常妊婦血清の IgG 抗体については、胞状奇胎絨毛組織 PMV に対して陽性を示すものが 75% に観察された。一方、胞状奇胎患者血清および正常妊婦血清の IgM 抗体については、陽性を示すものはわずかに 5 ~ 8% にすぎなかった。

IV. 考 察

妊婦の成立維持に關与する因子は複雑多岐にわたっているが、近時、免疫的因子が重要な問題として提起されている。そして、この免疫的因子は単に妊娠の成立維持に關与しているのみでなく、妊娠の病理においても、いろいろなかわりあいをしてなしていることが指摘されつつある⁵⁾。中でも、妊娠のごく初期に胎芽が何等かの原因で死亡した場合、これに付随する絨毛組織が壊死性変化をきたして子宮外に排出されて流産となるか、水腫様変化をきたして子宮内に存続して胞状奇胎となるか、その選択の場に免疫的因子の關与する可能性が指摘されてきた¹⁾。

さて、近年、細胞遺伝学的研究により (全) 胞状奇胎のほとんどは androgenesis によって発生することが明らかとなった⁶⁾。したがって胞状奇胎絨毛組織は父系由来の遺伝子によってのみ構成され、母体にとっては完全な同種移植片 allograft とみなされる。このことは、正常妊娠および流産の絨毛組織が半同種移植片 semiallograft であることと異なるところである。しかし、その同種移植片が母体よりの免疫的拒絶を免れるのみなら

ず、逆にある程度まで生着存続するという事実は移植免疫学的に極めて興味深い現象である。従来、絨毛組織の免疫学的役割として、絨毛組織そのものは主要組織適合抗原 major histocompatibility complex, MHC 抗原を欠如し、胎芽、胎児を母体よりの免疫的反応から保護するものという考えがあった。しかし、近年絨毛組織そのものにも MHC 抗原の表現されている可能性が指摘されてきた⁷⁾。今回の研究においても、胞状奇胎絨毛組織の PMV に対するその胞状奇胎患者血清中の抗体を検索し、PMV に反応する抗体、特に IgG 抗体の存在することが観察された。この結果は絨毛組織にも母体に対して免疫反応を惹起させうる抗原の存在することを強く示唆している。

それではこのような抗原、特に MHC 抗原を保有すると想定される絨毛組織が拒絶されることなく生着し続ける、特に allogeneity の強い胞状奇胎絨毛組織が生着存続するという逆説的な現象は、どのように合理的に説明しうるであろうか。まず胞状奇胎患者を含む妊婦の血清は、その夫婦間リンパ球混合培養反応 mixed lymphocyte culture reaction に対して抑制活性を示すことが認められている¹⁾。そして、この抑制活性は、妊婦血清に共通に存在する因子（例えば、増量したステロイドホルモンなど）の他に、最も重要な因子としての血清 IgG 分画に存在する抗 MHC 抗原抗体（特に MHC class II 抗原抗体）によって mediate されていることが明らかにされている⁸⁾。他方、流産患者血清はこのような抑制活性を示しにくいことも認められている¹⁾。さらに、正常絨毛組織および胞状奇胎絨毛組織より抽出した IgG 分画も同様の抑制活性を示すことが観察されている⁹⁾。すなわち、胞状奇胎患者を含む妊婦血清には、絨毛組織の生着存在と密接な関わり合いをもつと推察される抗 HMC 抗原、IgG 抗体が存在している。それでは、この IgG 抗体は絨毛組織という局所でどのような役割を果たしているのであろうか。今回の研究において、蛍光抗体法により絨毛組織における Ig の局在を検討したところ、IgG に関しては、胞状奇胎絨毛組織、正常絨毛組織、流産絨毛組織との間に明瞭な差異が観察された。すなわち、胞状奇胎絨毛組織では正常絨毛組織よりも強い蛍光が観察され、流産絨毛組織では蛍光が観察されなかった。また、各絨毛組織より Ig を抽出し、その重量を測定比較したところ、IgG に関しては、胞状奇胎絨毛組織において収量の多いことが観察された。すなわち、胞状奇胎妊娠では、正常妊娠との比較において、①その絨毛組織には免疫組織的に IgG が強く付着して

いること、②このことはその IgG 抽出収量からも裏付けられること、③患者血清にはその絨毛組織細胞膜成分と反応する抗体、特に IgG 抗体が存在すること、が示された。これらの知見は、胞状奇胎絨毛組織、特にその表層に観察される IgG が、その絨毛組織を母体（患者）よりの免疫的拒絶から保護し、生着存続に対して促進的に作用している可能性を指摘しており胞状奇胎の発生過程に、この IgG 抗体が重要な役割を果たしていることを推察させた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました竹内正七教授に深く感謝いたします。

また、直接の御指導、御協力をいただきました産婦人科学教室の金沢浩二助教授、高桑好一助手ほか諸先生に深謝いたします。

尚、本論文要旨の一部は、第10回日本臨床免疫学会（1982年、大阪）において発表した。

参 考 文 献

- 1) Takeuchi, S.: Immunology of spontaneous abortion and hydatidiform mole, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1: 23, 1981.
- 2) Faulk, W.P., Jeannet, M., Creighton, W.D., and Carbonara, A.: Immunological studies of the human placenta, *J. Clin. Invest.*, 54: 1011, 1974.
- 3) Smith, N.C., Brush, M.G. and Luckett, S.: Preparation of human placental villous surface membrane, *Nature*, 252: 302, 1974.
- 4) Davies, M.: An ELISA for the detection of maternal anti-trophoblast antibodies in human pregnancy, *J. Immunol. Methods*, 77: 109, 1985.
- 5) 竹内正七、徳永昭輝：免疫と異常妊娠、産婦人科 MOOK, No. 8, 28: 1977, 南江堂、東京。
- 6) Wake, N., Takagi, N. and Sasaki, N.: Androgenesis as a cause of hydatidiform mole, *J. Natl. Cancer Inst.*, 60: 51, 1978.
- 7) 笹川 基、本間 滋、大野雅弘、金沢浩二、竹内正七：正常妊娠 trophoblast における HLA 抗原に関する研究、*日産婦誌*, 37: 1806, 1985.
- 8) 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.* 3: 119, 1983.

specificity of blocking antibodies in molar and normal term placenta-bound IgG, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 3: 119, 1983.

9) **Hanaoka, J. and Takeuchi, S.:** Individual

(昭和63年 8月10日受付)
