

学位申請論文

血漿中 α -defensins 1-3濃度は妊娠末期陣痛発来後及び 正常妊娠産褥期における好中球活性化の指標となる

獨協医科大学 産科婦人科学

岡崎 隆行

要 旨 近年、正常妊娠における弱い好中球活性化が報告された。我々は好中球内の抗菌ペプチド α -defensins 1-3に着目し、妊娠・産褥期における血漿中濃度が好中球活性化の指標となるかどうか検討した。非妊娠健康者21名、正常妊婦184名、正常産婦55名の血漿中 α -defensins 1-3濃度をELISA法にて測定し、好中球活性化マーカー CD11b及び好中球寿命に関与する Toll-like receptor-4 (TLR-4) の発現強度をフローサイトメトリー法にて測定した。血漿中 α -defensins 1-3濃度は満期陣痛発来群において他の全ての群より有意に高値であり、分娩後低下したが産褥1ヶ月においても非妊娠群より有意に高値であった。CD11b並びにTLR-4の発現強度は陣痛発来群において非妊娠群より有意に高値であったが、産褥3日目では、CD11bが非妊娠群よりも有意に高値であったのに対し、TLR-4は非妊娠レベルまで低下した。妊娠・産褥期においてCD11b発現強度と同様の変化を示したことより、血漿中 α -defensins 1-3濃度が好中球活性化の指標となる可能性が示された。

Key Words : defensin, 好中球, 陣痛, CD11b, TLR-4

緒 言

好中球は哺乳動物の感染防御機構において重要な役割を果たしている。抗菌ペプチド defensin 属には、 $\alpha \cdot \beta \cdot \theta$ の3種類があり、哺乳動物には α と β が存在する。 α -defensinの5個のサブタイプのうち1-3は好中球アズール顆粒にほぼ特異的に存在し、 α -defensins 5-6は小腸パネト細胞に存在する。 α -defensins 1-3は各々約30個のアミノ酸から成るアルカリ性ペプチドで、構造・性質ともほぼ相同である。いずれも親水性と疎水性の両方の性質を持ち、細菌、真菌、ウイルスの細胞膜に虫食い穴をあけるように侵入して細胞を破壊する¹⁾。この他 α -defensins 1-3には、好中球やマクロファージを刺激してその遊走や食作用を活発にさせる、肥満細胞からのヒスタミン遊離を増加させて血管透過性を亢進させる、上皮細胞のインターロイキン-8産生を増加させる等の作用があり、炎症反応に強く関与している²⁾。

正常妊娠において、トロフォブラスト由来の壊死物質が母体血中に混入することにより軽度の好中球活性化が起こることが報告された³⁾。陣痛が開始するとこれらの物質の母体血中への混入量が増加し、全身性の炎症反応(systemic inflammatory response)が引き起こされて^{4~8)}分娩後数週間持続することが報告されている⁹⁾。しかし産褥期の炎症反応における好中球の役割については未だ詳細に検討されていない。

本研究では、正常妊娠と産褥期における血漿中 α -defensins 1-3濃度を測定し、好中球活性化マーカー CD11b及び好中球寿命に関与する Toll-like receptor-4 (TLR-4) の発現強度の変化を比較することにより、好中球活性化の指標として用いることが出来るかどうか検討した。

方 法

本研究への協力については、学内倫理委員会の承認を得た同意書に基づいて説明し同意を得た。

血漿中 α -defensins 1-3濃度の測定

血漿検体採取者の内訳は、非妊娠女性10名、正常妊婦184名(初期53名・中期43名・後期52名・37~40週の

平成18年11月27日受付、平成18年12月19日受理
別刷請求先：岡崎隆行

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 産科婦人科学

陣痛未発来10名・37～40週陣痛発来26名), 正常分娩後褥婦55名(産褥1週間以内37名・産褥1ヶ月18名)であった。「陣痛発来」は、分娩第一期の周期的な子宮収縮と定義した。検体採取は、2003年6月より2005年1月まで当科外来において妊婦健診を受診した合併症を有さない健常妊婦を対象とし、除外条件は38℃以上の発熱、明らかな感染兆候、中等度以上の合併症(糖尿病、喘息、子癇前症、切迫早産など)とした。また、血漿中 α -defensins 1-3濃度の性差を確認するため、健常男性11名についても調査した。

好中球の脱顆粒化を避けるため、静脈血をヘパリン採血した後直ちに300 gで30分間遠心して血漿を採取した¹⁰⁾。測定にはサンドイッチ法 ELISA キット (Human HNP 1-3 ELISA Test Kit, HyCult Biotechnology b.v, Uden, The Netherlands) を用いた。血漿検体を1000倍希釈 duplicate で反応させた後、マイクロプレートリーダー (Biotrak II Visible Plate Reader, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) を用いて450 nmにおける吸光度を測定した。

好中球数算定

血漿を採取した妊婦のうち136名に対しては、同時に好中球数も算定した。EDTA加2 mlスピッツに採血し、当院中央検査室において白血球数および好中球分画を測定した (CELL-DYN 4000, ABBOT JAPAN, Tokyo, Japan)。当院における白血球数および好中球分画の基準値はそれぞれ $4.0-9.0 \times 10^9/l$, 37-73%である。

好中球表面マーカー発現強度の測定

非妊娠健常女性5名、陣痛の発来した妊娠満期健常妊婦3名、分娩後3日目の正常褥婦5名より静脈血をヘパリン採血し、90分以内に2%デキストラン溶液にて希釈、Ficoll-Paque 溶液 (Ficoll-Paque PLUS, 比重1.077, Amersham Biosciences Corp.) を用いて濃度勾配法により好中球を単離した。好中球表面マーカー CD11bおよび TLR-4発現強度の測定にはフローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いた。好中球を0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁して 5×10^5 個/500 μ lとし、PE標識抗ヒトCD11bモノクローナル抗体 (eBioscience Inc., San Diego, CA) 10 μ lを添加後4℃で20分間インキュベート、あるいはPE標識抗ヒトTLR-4モノクローナル抗体 (eBioscience Inc.) を1 μ l添加後15分間室温でインキュベートした。PE標識抗マウスIgG2a抗体 (eBioscience Inc.) をコントロールとした。抗体反応後洗浄し、2 mlリン酸緩衝液で再希釈して、好中球が91%以上検出できる検体に

おいて20,000細胞あたりの発現強度を測定した。解析ソフトはCellQuest software (Becton Dickinson) を用いた。

統計学的解析

α -defensins 1-3測定260名各群の年齢の解析は、正規性の検定およびBartlett 検定で等分散を確認した後、one-way ANOVA法を用いて行った。血漿中 α -defensins 1-3濃度および好中球数、好中球表面マーカー発現の各群については、F検定で等分散でないことを確認した後ScheffeのF検定とKruskal-Wallis法を用いて多群比較を行った。全ての検定において、帰無仮説を棄却しうる確率水準を5% ($p < 0.05$) とした。

結 果

血漿中 α -defensins 1-3濃度の変化

検体採取260例各群の平均年齢に有意差を認めなかった (表1)。各群の血漿中濃度を図1に示した。非妊娠健常者の defensin濃度は男性 45.0 ± 39.0 ng/ml, 女性 35.8 ± 26.3 ng/ml (median \pm SEM) で、性差を認めなかった。正常妊婦における defensin濃度は、妊娠8-12週, 23-30週, 33-36週, 37-40週陣痛未発来, 37-40週陣痛発来の各群でそれぞれ 38.9 ± 14.3 ng/ml, 71.8 ± 21.0 ng/ml, 80.0 ± 17.5 ng/ml, 96.8 ± 21.1 ng/ml, 275 ± 85.6 ng/ml (すべて median \pm SEM) であった。産褥1週間以内と産褥1ヶ月群では各々 251 ± 34.2 ng/ml, 134 ± 60.8 ng/ml (median \pm SEM) であった。陣痛発来群における血漿中 α -defensins 1-3濃度は他の全ての群よりも有意に高値であり、産褥1ヶ月においても非妊娠時よりも有意に高値であった。

血漿中 α -defensins 1-3濃度と好中球数の相関

血漿中 α -defensins 1-3濃度と好中球数を同時に測定した136例について、両者の相関関係を検索した。好中球数は陣痛発来群において他の全ての群よりも有意に高値であったが、分娩後1ヶ月では非妊娠時と同等のレベルまで低下していた (表1)。血漿中 α -defensins 1-3濃度と好中球数との間には相関が認められなかった (図2)。

好中球表面マーカー TLR-4およびCD11b発現強度

TLR-4蛍光強度中央値は非妊娠群64, 陣痛発来群185であった ($p < 0.05$)。産褥3日目には44で、非妊娠群との間に有意差を認めなかった。CD11b蛍光強度中央値は陣痛発来群303と非妊娠群(120)よりも有意に高値であり ($p < 0.05$)、産褥3日目(253)においても非妊娠群

表 1 対象と好中球数

グループ	N	年齢 (歳)	好中球数 ($10^9/L$)
非妊娠健常者			
男性	11	29.4 ± 1.2	—
女性	10	28.9 ± 1.5	—
正常妊婦			
8 - 12 週 (初期)	53	29.6 ± 5.2	5.62 ± 1.56
23 - 30 週 (中期)	43	29.7 ± 4.6	6.43 ± 1.39
33 - 36 週 (後期)	49	30.6 ± 5.1	5.84 ± 1.93
37 - 40 週 (陣痛未発来)	13	28.9 ± 1.4	—
37 - 40 週 (陣痛発来)	26	32.1 ± 5.3	8.71 ± 1.35*
正常褥婦			
産褥1週間以内	37	30.8 ± 6.2	6.98 ± 2.17
産褥1ヶ月	18	29.0 ± 5.9	4.21 ± 0.76

年齢・好中球数は、平均値 ± 標準誤差。

* $p < 0.05$ vs. 全群 (Scheffe の F 検定)

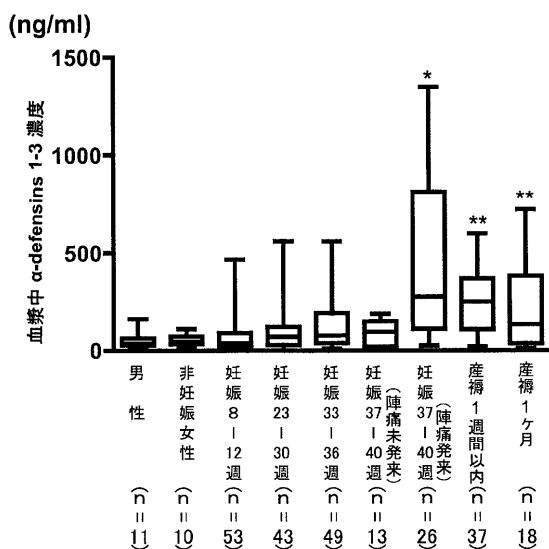


図 1 正常妊婦褥婦における血漿中 α -defensins 1-3 濃度の推移。血漿検体は非妊娠健常者、正常妊婦 (妊娠 8 ~ 12 週, 23 ~ 30 週, 33 ~ 36 週, 37 ~ 40 週陣痛未発来, 37 ~ 40 週陣痛発来), 正常経陰分娩後褥婦 (1 週間以内・1 ヶ月) より採取した。* $p < 0.001$ vs. 全群, ** $p < 0.05$ vs. 非妊娠健常者 (Scheffe の F 検定)

より有意に高値 ($p < 0.05$) であった (図 3)。

考 察

これまでに妊娠中および産褥期における血漿中 α -defensins 1-3 濃度の推移についての報告は無く、本研究で初めて明らかにした。妊娠中に好中球数が増加し、分娩後速やかに減少して産褥 1 ヶ月では非妊娠時レベルに戻ることは既に報告されており^{11,12)}、臨床的にもよく知ら

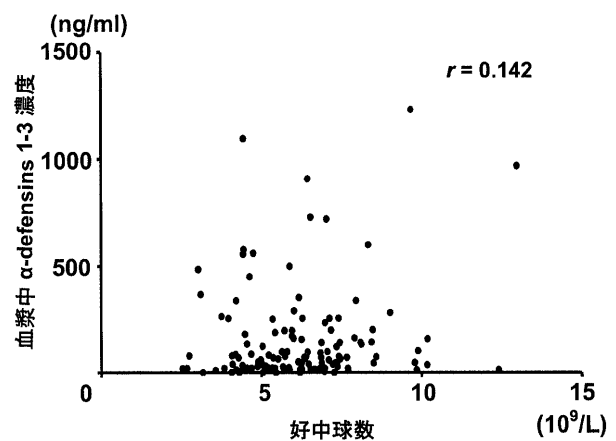


図 2 正常妊婦褥婦における血漿中 α -defensins 1-3 濃度と好中球数との相関。 $p = 0.105$ (ランク検定による Spearman の相関係数)

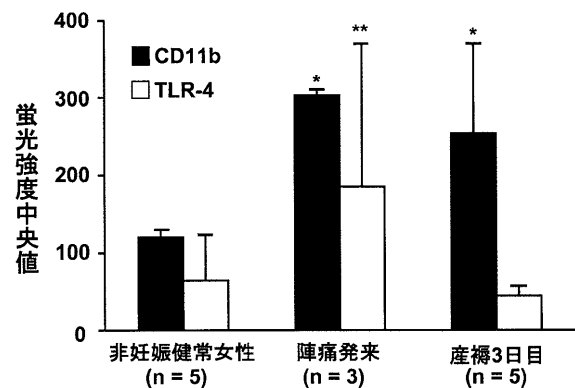


図 3 好中球における CD11b・TLR-4 の発現。非妊娠健常女性 (正常対照), 陣痛発来正常妊婦, 産褥 3 日目正常妊婦。* $p < 0.05$ vs. 正常対照, ** $p < 0.05$ vs. 全群 (Scheffe の F 検定)

れている。妊娠中の好中球数の増加はアポトーシスの遅延によるものである¹³⁾。TLR-4は好中球寿命の主要な制御因子であり、NF κ B並びにプロテインキナーゼカスケードを介して作用する。また、TLR-4によって活性化された単球から放出される物質が好中球のアポトーシスを遅延させるため、単球も大変重要な役割を果たしている¹⁴⁾。

我々の結果では、妊娠産褥期における血漿中 α -defensins 1-3濃度と好中球数との間には相関が認められなかった。 α -defensins 1-3が活性化された好中球より放出されることより、血漿中 α -defensins 1-3濃度は好中球数ではなく好中球活性化の程度に依存するものと考えた。次に、好中球活性化マーカーCD11b^{9,15,16)}および好中球アポトーシス遅延のマーカーTLR-4の発現強度を非妊娠女性・満期陣痛発来妊婦・褥婦(分娩3日後)において検討したところ、CD11b発現強度と血漿中 α -defensins 1-3濃度とは陣痛発来群並びに産褥3日目において非妊娠女性よりも有意に高値を示した。一方、TLR-4発現強度は陣痛発来群では非妊娠女性よりも有意に高値であったが、産褥3日目には非妊娠レベルまで低下していた。これらの結果は、血漿中 α -defensins 1-3濃度は好中球活性化を反映するものであってアポトーシスの遅延すなわち好中球数には依存しないことの根拠となる。

子癇前症は妊娠20週以降に出現する高血圧・浮腫・蛋白尿を3大症状とする疾患で、好中球の活性化¹¹⁾や着床障害¹⁷⁾が原因と考えられており、重症例では高度なsystemic inflammatory responseが認められる^{18,19)}。もし正常妊娠における好中球活性化の程度を定量的に検出することができれば、子癇前症の早期診断において有用であろう。また、好中球は分娩開始の引き金となる因子の一つとも考えられている。分娩開始に際して子宮筋層の上部よりも下部に多くの好中球が集簇することから、分娩は局所における炎症反応の結果と考えられるのである⁴⁾。従って、 α -defensins 1-3は正常分娩や切迫早産における子宮頸管の成熟に関与するものと考えられる。血漿中 α -defensins 1-3濃度測定は臨床的有用性については、子癇前症あるいは切迫早産患者の測定値とその予後に関して今後検討する必要がある。

結 論

本研究で、正常妊娠・産褥期における血漿中 α -defensins 1-3濃度の推移を初めて明らかにした。また本研究の結果より、陣痛発来後及び妊娠産褥期における血漿中 α -defensins 1-3濃度の上昇は、好中球活性化と関連する事が示唆された。

文 献

- 1) Ganz T. Defensins : antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **3** : 710-720, 2003.
- 2) Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. : Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity : receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leuk Biol*, **69** : 691-697, 2001.
- 3) Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. : Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*, **59** : 153-160, 2003.
- 4) Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJR, Cameron IT, et al : Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition : further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod*, **14** : 229-236, 1999.
- 5) Robelo I, Carvalho-Guerra F, Pereira-Leute L. : Comparative study of lactoferrin and other blood markers of inflammatory stress between preeclampsia and normal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **64** : 167-173, 1996.
- 6) Delgado I, Neubert R, Dudenhausen JW. : Changes in white blood cells during parturition in mothers and newborn. *Gynecol Obstet Invest*, **38** : 227-235, 1994.
- 7) Amtzen KJ, Lien E, Austgulen R. : Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **76** : 55-60, 1997.
- 8) Hartmann KE, Barrett KE, Reid MJ. : Clinical usefulness of white blood cell count after cesarean section delivery. *Obstet Gynecol*, **96** : 295-300, 2000.
- 9) Molloy EJ, O'neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al : Labor induces a maternal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, **190** : 448-455, 2004.
- 10) Panyutich AV, Voitenok NN, Lehrer RI, Ganz T. : An enzyme immunoassay for human defensins. *J Immunol Methods*, **141** : 149-155, 1991.
- 11) Barden A, Ritchie J, Walters B, Micael C, Rivera J, Mori T, et al : Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in pre-eclampsia. *Hypertension*, **38** : 803-808, 2001.
- 12) Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T. : Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and

- neutrophil number in pregnancy. *Transfusion*, **44** : 581-585, 2004.
- 13) von-Daselszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al : Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, **181** : 408-414, 1999.
- 14) Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al : Selective roles for Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 in the regulation of neutrophil activation and lifespan. *J Immunol*, **170** : 5268-5275, 2003.
- 15) Cowland JB, Borregaard N. : The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leuk Biol*, **66** : 989-995, 1999.
- 16) Elghetany MT, Lacombe F. : Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression : impact of age, gender, pregnancy, race and stress. *J Leuk Biol*, **75** : 157-162, 2004.
- 17) Matthiessen L, Berg G, Emerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Shama S. : Immunology of preeclampsia. *Chem Immunol Allergy*, **89** : 49-61, 2005.
- 18) Redman CW, Sargent IL. : Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol*, **24** : 565-570, 2004.
- 19) Redman CW, Sargent IL. : Pre-eclampsia, the placenta and the maternal inflammatory response : a review. *Placenta*, **24**(Suppl A) : S21-27, 2003.