妊娠中毒症における自己抗体の存在とその意義

山本 樹生・吉村 幸子・下司 有美・森 宏之

Jpn. J. Clin. Immun., 18 (2) : 146~151, 1995.

Role of autoantibody in preeclampsia

Tatsuo Yamamoto, Sachiko Yoshimura, Yumi Geshi, Hiroyuki Mori

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

【Summary】

The role of anti-ssDNA and dsDNA antibody in preeclampsia were studied. Serum samples were taken from 38 pregnant with preeclampsia including 19 cases of severe type. Also, 26 normal pregnant women were studied as the control. Anti-ssDNA and dsDNA antibody were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Anti-phospholipid antibody (APA), was measured by ELISA. Anti-dsDNA antibody was positive in 1 of the 38 preeclampsia. Anti-ssDNA antibody was positive in 15 out of the 38 cases (39.4%) in preeclampsia. Incidence of anti-ssDNA positive preeclampsia is related to it's severity of symptom as following : Six of 19 mild preeclampsia (26.3%) were positive. In severe cases, 10 of 19 (52.6%). However, the relationship between anti-ssDNA antibody and IUGR in preeclampsia, was not confirmed, although the antiphospholipid antibody was related to the IUGR.

From these results, we concluded that the autoantibody, such as anti-DNA antibody, might be produced in preeclampsia and the B cell activation might play a role of exaggeration of preeclampsia.

Key words : anti-DNA antibody,
preeclampsia,
pregnancy induced hypertension,
autoantibody

【概 要】

妊娠中毒症における自己抗体の存在とその意義について検討した。38人の妊娠中毒症（うち19例は重症型）

と対照として26例の正常妊婦の血清を採取した。抗ssDNAとds-DNA抗体の測定はenzyme linked immunosorbent assay (ELISA) によった。子宮内胎児発育遅延を合併した例については同時に抗カルジオリピン抗体、抗フォスファチジルセリン抗体などの抗リン脂質抗体をELISA法により測定した。抗dsDNA抗体は正常妊婦ではすべて陰性であった。妊娠中毒症では38例中1例に出現がみられた。また抗ssDNA抗体は38例中15例(39.4%)に陽性であった。抗ssDNA抗体の出現頻度は高血圧や蛋白尿などの症状が重症となるほど高くなり、軽症型では26.3%、重症型では52.6%が陽性であった。しかし、子宮内胎児発育遅延と抗ssDNA抗体の出現とは相関がみとめられず抗リン脂質抗体のほうが関連していた。

妊娠中毒症において自己抗体が高頻度に出現することが判明した。これより自己抗体を生ずるBリンパ球活性化が妊娠中毒症の病態に関連する可能性が推察された。

I. はじめに

妊娠中毒症における免疫学的検討にはさまざまなアプローチが行われてきた。しかし、自己抗体の出現とそれらの役割に関する報告は比較的少ない。すなわち、抗核抗体、抗カルジオリピン抗体、抗血管内皮細胞抗体などの出現が報告されているにすぎない¹⁻³⁾。

抗DNA抗体は自己抗体の1つであるが、DNAのsingle strandまたはdouble strandのどの状態に結合するかにより抗dsDNA抗体、抗ds/ss DNA抗体、抗ssDNA抗体の3種類に分類される。すなわち抗ssDNA抗体はsingle strand DNAと結合する抗体である。

抗リン脂質抗体には抗カルジオリピン、抗フォスファチジルセリン抗体などが知られている。これらの抗体は習慣性流産、子宮内胎児死亡、胎児発育遅延との関係が近年注目されている。今回の研究では妊娠中毒症における自己抗体の存在とその意義について検討するため、抗ssDNA抗体の発現頻度、その存在と臨床症状、子宮内胎児発育遅延との関係をしらべ、さらに子宮内胎児発育遅延の存在した例では抗リン脂質抗体の存在もあわせ検討した。

II. 対象、方法

38人の純粋型妊娠中毒症、うち19例は日本産婦人科学会分類⁴⁾による重症型、19例は軽症型、さらに26例の31週から41週の正常妊婦を対象とした。妊娠後期、分娩発来以前に静脈血を採取し血清に分離し、測定まで-20°Cにて保存した。妊娠中毒症と対照群の両者間で年齢、妊娠週数には差を認めなかった。さらにこれらの症例では、膠原病や抗リン脂質抗体症候群にみられる症状所見は認められなかった。

III. 抗ssDNA抗体、抗dsDNA抗体の測定

MBL社のMESACUP ssDNAおよびdsDNA Gテストを使用した。正常非妊婦人の平均値の2標準偏差以上、すなわち2 U/ml以上を陽性とした。測定はduplicateで行った⁵⁾。

IV. 抗リン脂質抗体の測定

Loizouらの方法を改良したenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法によった⁶⁾。カルジオリピン、フォスファチジルセリン(50 µg/mlの50 µl)(Sigma)を96穴マイクロプレート(imuron III)に固相化した。1% Bovine Serum Albumin (BSA)-Phosphate buffered saline (PBS)で3時間ブロッキングを行った。このプレートに5% FCS (fetal calf serum)を含む100倍希釈標準および被検血清を30分、室温で反応させた。Tween 20 PBSで洗浄後、100 µlのHorse-Radish Peroxidase (HRP) 標識抗ヒトIgG、IgM抗体(DAKO)を室温1時間反応させた。非結合抗体を洗浄後、オルトフェニレンジアミンを30分反応させ発色、2 N 硫酸で反応停止後、マイクロプレートリーダー(MPRA 4 TOYO SODA Inc.)にて492 nmの吸光度を測定、正常人の平均値の3標準偏差以上を陽性とした。測定はTriplicateで行った。

子宮内胎児発育遅延(IUGR)の判定は仁志田らの基準によった⁷⁾。

V. 結 果

1. 抗ssDNA抗体値、陽性率(図1, 2)

抗ssDNA抗体価の平均は正常妊婦 0.68 ± 0.43 U/mlに対して妊娠中毒症では軽症型で 1.48 ± 1.43 U/ml、重症型では 2.05 ± 1.63 U/mlであり、正常妊婦に比し軽症型、重症型とも高値を示した($p < 0.05$)。

図 1 正常妊娠および妊娠中毒症における抗 ssDNA 抗体の値

抗 ssDNA 抗体の陽性率は、妊娠中毒症 38 例中 15 例 (39.4%) であった。軽症型では 26.3%，重症型では 19 例中 10 例 52.6% が陽性であった。3 例の子潤では全例で陽性であった。

2. 抗 dsDNA 抗体の出現頻度

抗 dsDNA 抗体は 38 例中 1 例に陽性であった。抗 dsDNA 抗体陽性 1 例の抗体価は 2.4 U/ml であったが、SLE の臨床所見は認めなかった。正常妊婦ではすべて陰性であった。

3. 抗 ssDNA 抗体の出現頻度と症状の重症度

抗 ssDNA 抗体の出現頻度は症状の重症度との関係は、高血圧は軽症では 21% であったのに対し重症で

図 2 正常妊娠および妊娠中毒症における抗 ssDNA 抗体の陽性頻度

図 3 症状の重症度による抗 ssDNA 抗体の出現頻度

表 1 抗 ssDNA 抗体の出現の有無による子宮内
発育遅延の発生頻度

抗-ssDNA 抗体	妊娠中毒症		
	全体	重症	軽症
陽性	5/15(33%)a	4/10(40%)c	1/5 (20%)e
陰性	5/23(22%)b	4/9 (44%)d	1/14(7%)f
a—b, c—d, e—f $p>0.05$ χ^2 analysis			

表 3 抗 ssDNA 抗体および抗リン脂質 (APA) 抗
体出現の有無による子宮内発育遅延の発生頻
度の相違

	陽性	陰性
抗 ssDNA 抗体	4/9 (44%)	4/6 (67%)
APA antibody	4/5 (80%)a	4/10(40%)b
a—b: $p<0.05$ χ^2 analysis with Yate's correction		

は 60% であった。蛋白尿は軽症では 20% であったのに対し重症では 67% であった。高血圧や蛋白尿などの症状が重症となるほど抗 ssDNA 抗体の出現頻度が高くなった (図 3)。

4. 抗 ssDNA 抗体の有無と子宮内胎児発育遅延 (表 1)

抗 ssDNA 抗体の有無と子宮内胎児発育遅延発現との関連を検討したところ、抗 ssDNA 抗体の陽性例で 33%、陰性例で 22% であり、抗 ssDNA 抗体陽性例で高い傾向がみられたが有意差は認められなかった。軽症、重症に分け検討したが抗 ssDNA 抗体の出現と子宮内胎児発育遅延の関連はみとめられなかった。

5. 妊娠中毒症における抗リン脂質抗体の発現頻度 (表 2)

妊娠中毒症 33 例における抗リン脂質抗体の発現頻度は抗カルジオリピン抗体 IgG で 12.1%、IgM 抗体で 15.1%、抗フォスファチジルセリン抗体 IgG 抗体で 18.1% であったが IgM 抗体陽性例は認められなかった。

6. 抗リン脂質抗体と抗 ssDNA 抗体との子宮内胎児発育遅延発生との関連

15 例の妊娠中毒症につき抗 ssDNA 抗体と抗リン脂質抗体を同時に測定した。抗リン脂質抗体陽性例は 5 例あり、その種類は抗 cardiolipin IgG 抗体陽性 2 例、抗 cardiolipin IgM 抗体陽性 1 例、抗 phos-

表 2 妊娠中毒症における抗リン脂質 (APA)
抗体の頻度

	陽性数	陽性率
抗カルジオリピン抗体		
IgG	4/33	12.1%
IgM	5/33	15.1%
抗フォスファチジルセリン抗体		
IgG	6/33	18.1%
IgM	0/33	0%

phatidylserine IgG 抗体陽性 2 例であった。IUGR の発生は抗 ssDNA 抗体陰性例の 67% に、陽性例の 44% に認められ、抗リン脂質抗体陰性例の 40% に、陽性例の 80% にみとめられた。すなわち抗 ssDNA 抗体陽性例よりも抗リン脂質抗体のほうが子宮内胎児発育遅延発生と関連していた。抗リン脂質抗体陽性例中、4 例は IUGR であったが、抗 cardiolipin IgG 抗体陽性 1 例は IUGR ではなかった (表 3)。

VI. 考 察

妊娠中毒症における抗 ssDNA 抗体価は正常妊婦より有意に高く、その陽性例の出現頻度は 39.4% であった。また病型別にみると重症型では陽性例は 52.6% であり、重症型の頻度は軽症型の頻度より高かった。妊娠中毒症において自己抗体が存在したという報告はいくつかみられる。すなわち Torre らは抗核抗体の、Branch らは抗カルジオリピン抗体の、さらに Rappaport らは抗血管内皮細胞抗体の出現について報告している¹⁻³⁾。筆者らも抗リン脂質抗体や抗ラミニン抗体の出現について報告した^{8,9)}。これらのことは妊娠中毒症の病態に自己抗体が関与することを示している。

われわれがかつて検討した妊娠中毒症での抗核抗体、抗 DNA 抗体の陽性頻度は indirect immuno-fluorescent test (IF) 法および passive haemagglutination (PHA) 法では、それぞれ 25.9% と 3.6% であった。今回の検討で抗 ssDNA 抗体の頻度は 39% であり、以前の報告よりも高頻度で自己抗体を検出できた。測定法の違いがこの差を生じていると思われる。今回の検討では抗 dsDNA 抗体は 38 例中 1 例 (2.6%) に陽性であったが、PHA 法による抗 DNA 抗体の出現率と同様に低出現率であった。

青塚は同一の方法を用い SLE や他の膠原病での抗 ssDNA 抗体の頻度はそれぞれ 80%、30% と報告し

ている¹⁰⁾。中毒症における抗 ssDNA 抗体の頻度は SLE のそれより低い。他の膠原病における頻度に類似していた。また妊娠中毒症における抗 ssDNA 抗体価はいずれも 10 IU/ml 以下であり、報告されている非活動期の SLE の値 (mean±SD, 12.4±12.1 U/ml) より低値を示した。

妊娠中毒症における自己抗体の出現の原因として、自己抗体産生は polyclonal B cell activation によることが推察される。通常、抗 DNA 抗体の産生は lipopolysaccharide や graft versus host reaction による polyclonal B cell activation により生ずる¹¹⁾。trophoblast の成分は polysaccharide をもつことや、子宮筋層内に進入する extravillous または invasive trophoblast は Class 1 抗原を発現していることより、polyclonal B cell activator となる可能性がある。また妊娠中毒症ではホルモンによる unknown polyclonal B cell activator が関係している可能性が示唆される。さらに suppressor autoreactive T cell の減少や helper autoreactive T cell の増加が自己抗体産生に役割を演じていることが考えられる¹¹⁾。

抗 ssDNA 抗体と妊娠中毒症の症状との関係では重症度との関連がみいだされた。抗 DNA 抗体は腎臓の血管内皮や血小板と結合して血管収縮や血小板凝集を生じ、蛋白尿や高血圧の重症化に関連すると考えられる¹¹⁾。

近年、妊娠中毒症において免疫複合体の出現が報告されている¹²⁾。また妊娠中毒症の腎糸球体に免疫グロブリン、補体の沈着が報告されている¹³⁾。これらのことは蛋白尿や高血圧の出現に自己抗体が関与している可能性が示唆される。

自己抗体の胎児の発育に関する影響として、抗リン脂質抗体出現と IUGR の関係が報告されている¹⁴⁾。妊娠中毒症における IUGR の頻度は約 30% と非合併例の約 5% より高頻度である。とくに重症型では 70% との報告もある。この理由として持続する高血圧を原因とするという説があるが、高血圧が出現する以前より胎児発育が遅延する例、高血圧がなくても IUGR が出現する例もあり、これらのことより自己抗体の関与が推察されてきた。今回の検討では、抗 ssDNA 抗体が出現すると IUGR が増加するという関

係は認められなかった。この結果は抗リン脂質抗体や抗ラミニン抗体が出現すると IUGR が増加するという関係とは異なっていた^{8,9)}。筆者らも妊娠中毒症における抗リン脂質抗体の出現と抗リン脂質抗体陽性例で IUGR が増加することを報告した。すなわち抗リン脂質抗体が出現すると IUGR の頻度は 42.9% であったのに比し、抗リン脂質抗体が出現しないと IUGR の頻度は 18.0% であった⁹⁾。妊娠中毒症では重症例で IUGR の頻度が多い。Sibai は妊娠中毒症が重症化すると IUGR が出現することを統計学的に証明している¹⁵⁾。今回の結果では重症妊娠中毒症では抗 ssDNA 抗体が高頻度に出現したが、抗 ssDNA 抗体陽性例で IUGR の頻度は増加しなかった。抗 ssDNA 抗体の出現は症状の重症度に関連していたが、IUGR の出現には関連していなかった。Kwak らは IUGR よりも強く胎児が障害されたと考えられる流産や死産の予知には抗 ssDNA 抗体は役立たず、しかし抗カルジオリピン抗体はこれらの予知に役立つとしている¹⁶⁾。そこで抗カルジオリピンおよびフォスファチジルセリン抗体の 2 種類の抗リン脂質抗体を抗 ssDNA 抗体と同時に測定し IUGR 発生との関係を比較した。その結果 IUGR は抗リン脂質抗体陽性群で高頻度に認められた。これに比し抗 ssDNA 抗体の頻度は有意な差を認めなかった。すなわち諸家の報告と一致し、IUGR を予測するには抗 ssDNA 抗体より抗リン脂質抗体のほうが優れていた。

VII. 結 論

妊娠中毒症において抗 ssDNA 抗体のような自己抗体が出現する例があり、抗 ssDNA 抗体の出現頻度は症状の重症度と関係していた。抗 ssDNA 抗体と子宮内胎児発育遅延発現は関連せず、抗リン脂質抗体発現のほうが子宮内胎児発育遅延発現と関連していた。これより自己抗体を生ずる B リンパ球活性化が妊娠中毒症の病態に関連する可能性が推察された。

本論文の要旨は第 21 回日本臨床免疫学会で発表した。

(第 21 回日本臨床免疫学会総会 座長推薦論文)

文 献

1) De La Torre, G., Vazquez, L.H., Vazquez, J.

A., Ornelas, A.R.: Prevalence of antinuclear

- antibodies in patients with habitual abortion and in normal and toxemic pregnancies. *Rheumatol. Int.*, 4 : 87~89, 1984.
- 2) Branch, D.W., Andres, R., Digre, K.B., Rote, N.S., Scott, J.R. : The association of anti-phospholipid antibodies with severe preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 73 : 541~545, 1989.
- 3) Rappaport, V.S., Hirata, G., Yap, H.M., Jordan, S.C. : Anti-vascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162 : 138~146, 1990.
- 4) 妊娠中毒症の病型分類の改訂について, 日産婦会誌, 42 : 219~220, 1990.
- 5) 今井順子・佐藤久美子・森下芳孝・竹内 純 : ELISA を用いた抗 ds- および抗 ss-DNA 抗体価測定キットの基礎的検討. 臨検機器・試薬, 12 : 929~933, 1989.
- 6) Loizou, S., McCrea, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., Harris, E.N. : Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : Standardization and quantitation of results. *Clin. Exp. Immunol.*, 62 : 738, 1985.
- 7) 仁志田博司・坂上正道・倉智敬一・浅田昌宏・久保 平・舟川幡夫 : 日本人の胎児発育曲線. 日新生児会誌, 20 : 90~97, 1984.
- 8) 山本樹生・吉村幸子・荒井 清 : 妊娠中毒症における抗ラミニン抗体の存在. 日臨免疫会誌, 14 : 9~16, 1991.
- 9) Yamamoto, T., Yoshimura, S., Sakamoto, T., Ogino, M., Kobayashi, T., Arai, K. : Anticardiolipin antibody in preeclampsia. 日臨免疫会誌, 15 : 467~474, 1992.
- 10) 青塚新一・横張龍一 : ELISA キットによる抗 DNA 抗体と免疫複合体の検出. MBL 技術レポート, 9 : 2, 1~17, 1989.
- 11) Schwarz, R.S., Stollar, B.D. : Origin of anti-DNA autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 75 : 321~327, 1985.
- 12) Yamamoto, T., Kondo, Y., Takagi, S. : Immunological capacity and immune complex during pregnancy and abnormal pregnancy. *J. Reprod. Immunol. Supp.*, 46, 1983.
- 13) Petrucco, O.M., Thomson, N.M., Lawrence, J. R., Weldon, M.W. : Immunofluorescent studies in renal biopsies in preeclampsia. *Br. Med. J.*, 1 : 473~476, 1974.
- 14) Branch, D.W., Scott, J.R., Kochenour, M.D., Hershgold, E. : Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. *N. Engl. J. Med.*, 313 : 1322~1326, 1985.
- 15) Sibai, B.M., Spinnato, J.A., Watson, D.L., Hill, G.A., Anderson, G.D. : Pregnancy outcome in 303 cases with severe preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 64 : 319~325, 1984.
- 16) Kwak, J.Y.H., Sachs, A.G., Beaman, K.D., Beer A.E. : Autoantibodies in woman with primary recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *J. Reprod. Immunol.*, 22 : 15~31, 1992.