

早産発来の内分生化学的研究

— CPC による Rh 不適合の検討および SDS - polyacrylamide gel 電気泳動による妊娠中蛋白の変動について —

九州大学医療技術短期大学部

久永幸生

九州大学医学部産婦人科

藤田寿一・下川浩

小野山佳道

浜の町病院産婦人科

荒川公秀

目 的

(1) 従来までの本研究班における検討により、Rh 感作例は未感作例と比較して早産率が有意に高率であることが明らかとなり、羊水中各種 parameter の本症診断に対する意義について検討してきたが、本年は coil planet centrifuge (CPC) を用いて赤血球の動的浸透圧抵抗と高ビ血症、CPC の免疫血清学的応用について検討を行い、CPC による Rh 不適合の診断的意義を明らかにしようと考えた。

(2) 妊娠中には胎盤に由来する特異蛋白が多数見出され、その純化同定と臨床的意義が検討されており、われわれは昨年 SP-1 について早産児の子後との関係を検討したが、一方では、蛋白を分子量によって分離し、その分画の妊娠中における変動 pattern と早産との関係を明らかにしようと考え、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法により非妊婦、妊娠各期血清、臍帯血について測定を行った。

研究 方法

(1) CPC により濃度勾配 30~200 mOsM NaCl 充填 coil を用い、正常成熟児臍帯血清 153 例、非溶血清高ビ血症 25 例、Rh 感作例 6 例、ABO 不適合 2 例についてその溶血開始点 (HSP) と溶血終了点 (HEP) を測定するとともに、成人 HSP を 110 mOsM として荻田らの Neonatal Icterus Index (NII) につ

いて検討を行った。ついで 12% PVP (K=30, M.W.=40,000), pH=7.2 を濃度勾配をつけずに coil 内に充填し、血球泥 2.5 cm をとり、感作血球の coil 内移動距離を測定し、対照と比較した。

(2) SDS-PAGE は Weber-Osborn-Sano の変法により 5% SDS-polyacrylamide gel を用い、内径 5 mm, 長さ 11 cm のガラス管によるディスク電気泳動法を行い (1 管あたり 8 mA で 2.5 時間泳動), 1% アミドブラック 10 B で染色、酢酸による脱色後、densitometry を行った。対象は非妊娠 22 例、妊婦 79 例、褥婦 9 例、臍帯血 19 例である。

研究 結果

(1) CPC による Rh 不適合の診断

i) 正常群 153 例の最小抵抗値は 125.0 ± 6.0 (mOsM), 最大抵抗値は 56.8 ± 7.4 (mOsM) であり、高ビ血症計 33 例では、それぞれ 124.4 ± 1.06 , 58.5 ± 7.4 であって両群間に有意差は認められず、Rh 不適合の HSP は 123.8 ± 11.9 であった。

ii) $NII = A / (A+B) \times 100(\%)$ をプランメータで測定して比較すると、正常群は $10.2 \pm 6.8(\%)$, 高ビ血症群は $11.2 \pm 10.2(\%)$, Rh 不適合では $9.3 \pm 7.8(\%)$ となり、NII による高ビ血症の予測はできなかった。

iii) 臍帯血清ビ値と高ビ血症発生との関連性

を検討すると、 1.9mg/dl 以下では $5.3\sim 5.5\%$ の発生率であるのに対して、臍帯血清ビ値 $0.2\sim 2.4\text{mg/dl}$ では $17/51$ (33.3%)、 2.5mg/dl 以上では $9/16$ (56.3%) と高率に高ビ血症が発生し、臍帯血ビ値との関連性が認められた。

iv) 12% PVP coil 内の移動距離は、正常群では 2.2 ± 0.4 (cm)、非容血性高ビ血症では 2.4 ± 0.3 (cm) で両者に差を認めなかったが、Rh 不適合では軽症例でも敏感に反応して移動距離が延長し、交換輸血を要するような例では全例 shooting を起していた。

v) この方法を用いて既知の濃度の抗 D 抗体で臍帯血球を感作し、この感作血球の CPC coil 内移動距離とクームス法とを比較した。その結果、coil 内移動距離では $0.49\ \mu\text{g/ml}$ まで抗 D 抗体検出可能であるのに対して、クームス試験では $1.95\ \mu\text{g/ml}$ までしか抗体検出はできなかった。

(2) SDS-PAGE による検討成績

i) 正常非妊婦群は分子量 28×10^4 から 2.3×10^4 の 15 分画に分離され、妊娠中に有意な変化が認められたのは帯 5、10~11、19 であった。

ii) 増加を示した蛋白は各々 peak に達する時期が異なり、帯 5 は妊娠初期に増加して以後、21~24 週まで plateau となり、25 週以降は非妊時の値に低下を示した。これに対して帯 10~11 と 19 はそれぞれ妊娠 21~24 週、25~28 週まで増加し、その後は分娩まで plateau となり、産褥 1 カ月の血清では非妊時の値まで下降していた。

iii) 臍帯血では分子量の大きい帯 1~4 が認められず、これに反して帯 14、15、22 と他群では認められない分画が出現した。

iv) 早産例について現在までの検討例では、正常群に比して有意な特異 pattern は認めなかった。

考察および要約

Rh 不適合の CPC による溶血 pattern が、対照正常群と差がないという結果は、脆弱赤血球がすでに子宮内において溶血により消費されているという推測も可能である。しかし、感作の程度と HSP の値が一致しないこと、非溶血性高ビ血

症においても対照正常群と差が認められないことから、赤血球膜の動的浸透圧抵抗の変化からは高ビ血症の予測は困難であると考えられた。また、黄疸発症予知指数 (NII) についてもわれわれの検討では高ビ血症の予測はできなかった。しかし、粒子の半径の 4 乗に比例して coil 内を移動する性質を利用した感作血球の検出では、クームス法に比して約 4 倍の鋭敏性をもつことが明らかとなった。このことは、今回使用した 12% PVP に優る膠質溶液を見出すことができれば、分離能はさらによくなり、応用の範囲も拡大することを示している。

SDS-PAGE による妊婦血清蛋白の検討では、本法により妊娠中に変化する蛋白分画のうち、帯 5 は α_2 -macroglobulin、帯 10~11 は transferrin、hemopexin、haptoglobin、帯 19 は α -lipoprotein が含まれることが判っている。このうち帯 5 と α_2 -macroglobulin の変動はよく一致するが、帯 10~11 と帯 19 は各々の含有蛋白である transferrin や lipoprotein の変化とは一致せず、他の蛋白が含まれている可能性を有している。従って、その蛋白を分離、精製し同定することによって妊娠特異蛋白を発見できる可能性があると考えられる。現段階ではこれらの帯の変化と各種異常妊娠との関連性を検討することによって、逆にそれらの帯に含まれるかも知れない特異蛋白の臨床的意義を見出そうと考えたが、早産例については現在までのところ正常群との間に有意な変化は認めない。

表 1. CPC による溶血パターンと Rh 不適合

正常群と高ビリ血症群の臍帯血 CPC パターンと
A/(A+B) 値の検討

	n	最小抵抗値 (mOsM)	最大抵抗値 (mOsM)	A / (A + B) 値 (%)
正常群	153	125.0 ± 6.0	56.8 ± 7.4	10.2 ± 6.8
高ビリ血症群	33	124.4 ± 10.6	58.5 ± 7.4	11.2 ± 10.2
Rh 不適合	6	123.8 ± 11.9	60.2 ± 8.2	9.3 ± 7.8
ABO 不適合	2	132.5	67.0	12.0
非溶血性 高ビリ血症	25	124.0 ± 10.7	58.1 ± 7.4	11.0 ± 11.0

(両群間に有意差なし。t 検定)

新生児溶血性疾患の CPC パターンと PVP coil 内移動距離

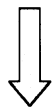
Rh 不適合								
NO.	氏名	不適合 因子	妊娠週数	ビリ値	最小抵抗値	最大抵抗値	PVP 距離	備 考
1	R.S.	D	37 + 1	/	114 (mOsM)	60 (mOsM)	shooting	交換 3回 + 光療法
2	A.M.	D	39 + 5	2.1	123 "	70 "	8.0 (cm)	光 療 法
3	T.M.	E	37 + 6	2.6	120 "	62 "	5.8 "	光 療 法
4	K.H.	D	41 + 3	1.8	114 "	48 "	6.0 "	治療なし
5	S.M.	D	36 + 3	3.9	126 "	67 "	shooting	交換 2回 + 光療法
6	M.A.	D	37 + 2	2.8	146 "	54 "	"	交換 1回 + 光療法
ABO 不適合								
1	S.Y.	B	41 + 3	4.4	130 "	74 "	3.8 "	光 療 法
2	K.R.	A	38 + 3	6.4	135 "	60 "	2.1 "	交換 1回 + 光療法

表2. CPC の免疫血液学的応用による抗 D抗体検出感度の検討

Tube NO.	Concentration of anti-D($\mu\text{g/ml}$)	Coombs' test	CPC によるPVP coil 内移動距離
1	125	(+++)	shooting
2	62.5	(+++)	"
3	31.25	(+++)	"
4	15.63	(+++)	"
5	7.81	(++)	7.1 (cm)
6	3.90	(+)	5.9
7	1.95	(+)	5.2
8	0.98	(-)	4.8
9	0.49	(-)	4.2
10	0.24	(-)	3.2
11	0.12	(-)	3.1
12	0.06	(-)	3.1

表3 脐带血清19例の各分画

分画番号	分子量($\times 10^4$)	平均値 \pm S.D.(%)
1	280	-
2	260	-
3	250	-
4	210	-
5	185	2.5 \pm 0.9
6	160	-
7	155	3.8 \pm 1.0
8	135)	
9	110	7.1 \pm 1.8
10	88	5.5 \pm 1.5
11	80)	
12	60	65.6 \pm 7.2
13	56)	
14	45	1.3 \pm 1.3
15	38	2.2 \pm 1.9
16	30	2.5 \pm 0.8
17	29)	
18	25	5.2 \pm 1.9
19	23	1.9 \pm 0.8
20	22	-
21	19	-
22	16	1.7 \pm 1.8
23	13	-



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



考察および要約

Rh 不適合の CPC による溶血 pattern が, 対照正常群と差がないという結果は, 脆弱赤血球がすでに子宮内において溶血により消費されているという推測も可能である。しかし, 感作の程度と HSP の値が一致しないこと, 非溶血性高ビ血症においても対照正常群と差が認められないことから, 赤血球膜の動的浸透圧抵抗の変化からは高ビ血症の予測は困難であると考えられた。また, 黄疸発症予知指数(NII)についてもわれわれの検討では高ビ血症の予測はできなかった。しかし, 粒子の半径の 4 乗に比例して coil 内を移動する性質を利用した感作血球の検出では, クームス法に比して約 4 倍の鋭敏性をもつことが明らかとなった。このことは, 今回使用した 12%PVP に優る膠質溶液を見出すことができれば, 分離能はさらによくなり, 応用の範囲も拡大することを示している。

SDS-PAGE による妊婦血清蛋白の検討では, 本法により妊娠中に変化する蛋白分画のうち, 帯 5 は 2-macroglobulin, 帯 10~11 は transferrin, hemopexin, haptoglobin, 帯 19 は lipoprotein が含まれることが判っている。このうち帯 5 と 2-macroglobulin の変動はよく一致するが, 帯 10~11 と帯 19 は各々の含有蛋白である transferrin や lipoprotein の変化とは一致せず, 他の蛋白が含まれている可能性を有している。従って, その蛋白を分離, 精製し同定することによって妊娠特異蛋白を発見できる可能性があると考えられる。現段階ではこれらの帯の変化と各種異常妊娠との関連性を検討することによって, 逆にそれらの帯に含まれるかも知れない特異蛋白の臨床的意義を見出そうと考えたが, 早産例については現在までのところ正常群との間に有意な変化は認めていない。