

平成7年度厚生省心身障害研究  
「多胎妊娠の管理及びケアに関する研究」

着床環境とIL-8に関する研究  
(分担研究：多胎妊娠の予防に関する研究)

分担研究報告書

分担研究者 浜松医科大学産婦人科学教室  
寺尾俊彦

【要約】〔目的〕精漿中には非常に高濃度のインターロイキン8 (IL-8) が存在すると言われている。また精漿は、通常妊娠成立周期には、排卵期の腔内に多く存在しているものである。我々はこれらの精漿中のIL-8がその後の子宮内膜の変化に対して何らかの役割を果たしているのではないかと考えた。IL-8は、毛細血管の透過性を亢進させることにより組織間質に浮腫をひきおこす特殊なサイトカインであり、子宮内膜間質を着床期に類似した浮腫状の状態に変化させるということに矛盾はない。我々はまずIL-8が、精漿中に実際どの程度の含まれているかを調べ、次に子宮頸管粘液中には通常どの程度存在するのか、さらにIL-8は子宮内膜間質を浮腫状の状態に変化させ得るかどうかを検討した。〔方法〕(1)人工授精時に同意を得て採取したヒト精漿中のIL-8を、EIA法で測定した。(2)不妊治療患者を対象に、子宮頸管粘液中のIL-8を内膜周期別にEIA法で測定した。(3) GnRH<sub>a</sub> 0.3mg/kgを前投与し排卵抑制状態とした5週齢雌マウスに、IL-8を0.85mg/kg腹腔内投与し、15時間後の子宮内膜の状態を観察した。〔結果〕(1)ヒト精漿中のIL-8値は、平均(±SD)：3152±1342pg/ml、最大値：6979pg/ml、最小値：856pg/mlであった。(2)ヒト子宮頸管粘液中IL-8値は、卵胞期(n=4)；平均1120 pg/ml、排卵期(n=11)；平均1604 pg/ml、黄体期(n=8)；平均1580 pg/mlと、血中(0~100pg/ml)に比し著しく高値であった。(3)IL-8投与群ではコントロール群に比し、子宮内膜上皮下間質の浮腫状変化が著明であった。腺管細胞や間質細胞においては、核小体の消失やN/C比の減少など細胞の成熟徴候が認められた。〔結論〕IL-8は、ヒト精漿中にやはり非常に高濃度(856~6979pg/ml)に存在することが立証された。また通常のヒト子宮頸管粘液中にも、血中に比し大量に存在していた。さらにIL-8はマウス子宮内膜間質に、組織学的に着床期と類似した浮腫状変化をひきおこすことが判明した。

【見出し語】精漿、IL-8、子宮内膜

【研究方法】

- ①人工授精時に同意を得て採取したヒト精漿中のIL-8を測定した。原精液中に白血球の多いもの(1.0×10<sup>6</sup>/ml以上)は除外した。精漿は、ヒト人工授精用培養液 GPM<sup>®</sup>(セローノ・ジャパン) 8mlに溶解し採取し、測定時まで凍結保存した。
- ②不妊治療時に同意を得て採取した子宮頸管粘液中のIL-8を測定した。頸管粘液は、綿棒にて採取し緩衝液 PBS 1mlに溶解、測定時まで凍結保存した。
- ③5週齢雌マウスに、GnRH<sub>a</sub> 0.3mg/kgを皮下投与し、排卵抑制状態となった1週間後にIL-8を0.85mg/kg腹腔内投与した。投与15時間後に子宮内膜を採取し、コントロール群(GnRH<sub>a</sub>のみ投与)と比較した。また同時に採取した血中プロゲステロン値(P<sub>4</sub>)を比較した。

※IL-8測定方法は下図に示す。

IL-8測定方法

抗ヒトIL-8抗体 coating plate  
 検体 100 $\mu$ l またはヒトIL-8標準溶液 100 $\mu$ l  
 ↓室温, 2時間 incubation  
 洗浄 400 $\mu$ l/well, 4回  
 Horseradish peroxidase標識抗ヒトIL-8抗体 200 $\mu$ l  
 ↓室温, 2時間 incubation  
 洗浄 400 $\mu$ l/well, 4回  
 基質溶液; 過酸化水素加Tetramethylbenzidine 200 $\mu$ l  
 ↓室温, 20分 incubation  
 反応停止液; 1M 硫酸 50 $\mu$ l  
 ↓30分以内  
 吸光度測定; OD450nm

【結果】

1) 精漿中のIL-8濃度は以下の如くであった。

検体	IL-8濃度 (pg/ml)	検体	IL-8濃度 (pg/ml)	検体	IL-8濃度 (pg/ml)
1	2899	11	1035	21	2035
2	4029	12	1984	22	3696
3	5061	13	2307	23	2056
4	2491	14	2203	24	4696
5	2392	15	3701	25	3243
6	3429	16	4003	26	4541
7	2643	17	3851	27	2581
8	3717	18	2560	28	2227
9	<u>6979</u>	19	<u>856</u>	29	2488
10	2488	20	6101	30	2270

平均 ( $\pm$ SD)            3152 $\pm$ 1342pg/ml  
 最大値                    6979 pg/ml  
 最小値                    856 pg/ml

2) 子宮頸管粘液中IL-8値

卵胞期 (n=4)    平均値 1120pg/ml, 中央値 670 pg/ml  
 排卵期 (n=11)  平均値 1604pg/ml, 中央値 2080 pg/ml  
 黄体期 (n=8)    平均値 1580pg/ml, 中央値 1120 pg/ml

3) IL-8投与マウスの子宮内膜 (写真1, 2)

コントロールに比し明らかに上皮間質の浮腫状変化が著明であった。また腺管細胞や内膜間質細胞では、核小体の消失やN/C比の減少など細胞の成熟徴候が認められた。内膜採取時の血中P<sub>4</sub>は、IL-8投与マウス:1.4ng/ml, コントロール:1.0ng/mlと両者に差はなく、低値であった。

【考察】興味深いことに、最近ヒト精漿中に非常に高濃度のIL-8 (2000~3000pg/ml)が含まれていることが判明した<sup>1)</sup>。精漿は通常妊娠成立周期には、排卵期の腔内に多く存在していると考えられる。よって、これらの精漿中のIL-8がその後の子宮内膜の変化に対して何らかの役割を果たしている可能性は高い。事実、IL-8の主作用に毛細血管の充血、それに続く血管透過性の亢進、血漿成分の滲出により組織間質に浮腫をひきおこすというものがある。

IL-8は、リポ多糖類 (lipopolysaccharide) 刺激ヒト末梢血単核球培養上清から単離、精製された、塩基性の強いヘパリン親和性の、8 kDの蛋白質である。<sup>2)</sup> 産生細胞は、単球およびマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、皮膚角化細胞などであり、刺激物質は、リポ多糖類、IL-1やTNFなどのサイトカイン、PMSやPSKなどのマイトジェン・レクチン等非常に多岐にわたる。その生物活性も上記の作用の他、好中球に対しては骨髓から末梢血への動員<sup>3)</sup>、炎症局所への遊走活性、局所での形態変化・脱顆粒・ライソソーム酵素の放出等に関与している。また好塩基球・Tリンパ球遊走活性も示す。その血中濃度は、およそ 0~100pg/mlである。

これらの特徴を持つIL-8であるが、最近周産期分野で、子宮頸管熟化作用があることが解ってきた。当教室の実験ではマウスの子宮頸管にIL-8、50ngを局所投与すると、頸管組織の上皮下間質に著明な浮腫状変化が認められている。

以上より今回我々は、このIL-8が、精漿中に実際どの程度の含まれているか、子宮頸管粘液中には通常どの程度存在するのか、さらにIL-8は子宮内膜間質を浮腫状の状態に変化させ得るかどうか、以上3点を検討することを目的とした。

結果、まずヒト精漿中にはやはり非常に高濃度のIL-8 (856~6979pg/ml)が含まれていることが立証された。また実験2よりIL-8は、通常のヒト子宮頸管粘液中に、血中に比し著しく大量に存在することが明らかとなった。周期的には、卵胞期には低値で、排卵期~着床期にかけてかなりの高値となると思われた。頸管粘液中のIL-8を測定した意味は、そのIL-8が子宮内膜に影響を及ぼしているのではないかと考えたからである。

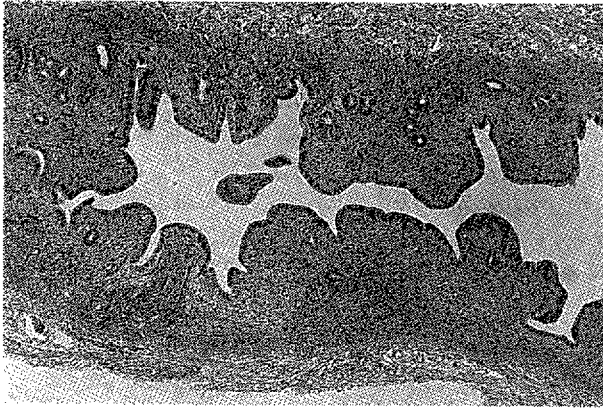
実験3より、IL-8はマウス子宮内膜間質に、着床期と酷似した組織学的変化を、黄体ホルモン (P<sub>4</sub>) を介することなく、ひきおこすことが判明した。

現段階ではまだ症例数も少なく、今後さらに研究を進めて行く必要があるが、以上の結果より次のような仮説を立てることができる。つまり、着床期の子宮内膜組織変化にIL-8はかなり高い確率で影響を及ぼしているということ、それは内因性の可能性もあるが、排卵期前後の性交による精漿に由来するものであるということ、精漿由来であるならばそれから精製したIL-8製剤の局所投与により、より良き着床環境を作り出すことが可能ではないかということである。

#### 【文献】

- (1) Shimoya, K. et al: Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertil. Steril.*, 59:885, 1993.
- (2) Matsushima, K. et al: interleukin-8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1:2, 1989.
- (3) Jagels, M. A. et al: Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis: a common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J. Immunol.* 148:1119, 1992.

《写真1 (×20倍)》

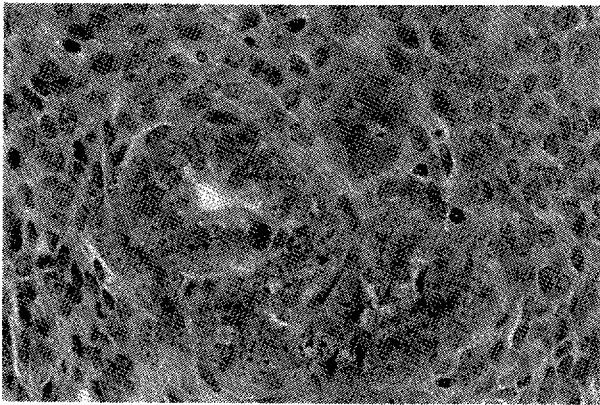


コントロール子宮内膜

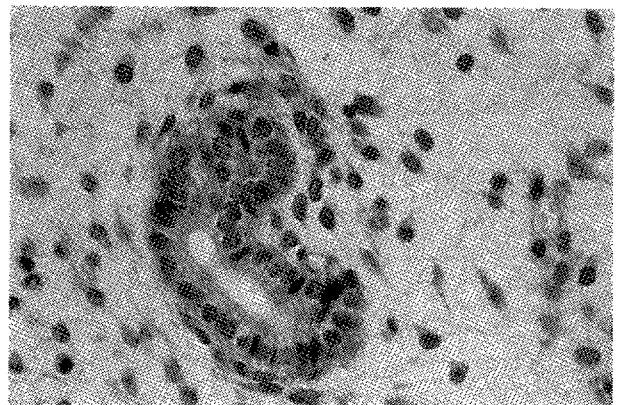


IL-8投与子宮内膜  
間質の著明な浮腫が認められる。

《写真2 (×200倍)》



コントロール子宮内膜



IL-8投与子宮内膜  
腺管細胞や内膜間質細胞では、核小体の消失やN/C比の減少  
など細胞の成熟徴候が認められる。



## 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



【要約】〔目的〕精漿中には非常に高濃度のインターロイキン 8 (IL-8)が存在すると言われている。また精漿は、通常妊娠成立周期には、排卵期の腔内に多く存在しているものである。我々はこれらの精漿中の IL-8 がその後の子宮内膜の変化に対して何らかの役割を果たしているのではないかと考えた。IL-8 は、毛細血管の透過性を亢進させることにより組織間質に浮腫をひきおこす特殊なサイトカインであり、子宮内膜間質を着床期に類似した浮腫状の状態に変化させるということに矛盾はない。我々はまず IL-8 が、精漿中に実際どの程度含まれているかを調べ、次に子宮頸管粘液中には通常どの程度存在するのか、さらに IL-8 は子宮内膜間質を浮腫状の状態に変化させ得るかどうかを検討した。〔方法〕(1)人工授精時に同意を得て採取したヒト精漿中の IL-8 を、EIA 法で測定した。(2)不妊治療患者を対象に、子宮頸管粘液中の IL-8 を内膜周期別に EIA 法で測定した。(3) GnRHa 0.3mg/kg を前投与し排卵抑制状態とした 5 週齢雌マウスに、IL-8 を 0.85ng/kg 腹腔内投与し、15 時間後の子宮内膜の状態を観察した。〔結果〕(1)ヒト精漿中の IL-8 値は、平均(±SD) :  $3152 \pm 1342$ pg/ml, 最大値: 6979pg/ml, 最小値: 856pg/ml であった。(2)ヒト子宮頸管粘液中 IL-8 値は、卵胞期(n=4); 平均 1120 pg/ml, 排卵期(n=11); 平均 1604 pg/ml, 黄体期(n=8); 平均 1580 pg/ml と、血中(0~100pg/ml)に比し著しく高値であった。(3) IL-8 投与群ではコントロール群に比し、子宮内膜上皮下間質の浮腫状変化が著明であった。腺管細胞や間質細胞においては、核小体の消失や N/C 比の減少など細胞の成熟徴候が認められた。〔結論〕IL-8 は、ヒト精漿中にやはり非常に高濃度(856~6979pg/ml)に存在することが立証された。また通常のヒト子宮頸管粘液中にも、血中に比し大量に存在していた。さらに IL-8 はマウス子宮内膜間質に、組織学的に着床期と類似した浮腫状変化をひきおこすことが判明した。