

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20207

研究課題名(和文) ヒト末梢白血球を用いた新たな分娩予測マーカーの開発

研究課題名(英文) LEUKOCYTE MIGRATION ASSAY PREDICTS PRETERM BIRTH

研究代表者

牧野 真太郎 (Makino, Shintaro)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：70570894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：白血球遊走数は2nd trimesterが1st trimesterに比べ有意に増加した( $p=0.03$ )が、仮定に反して、白血球遊走数は2nd trimesterが3rd trimesterに比較し有意に増加していた。また、今回の実験では3rd trimesterと陣痛発来時の白血球遊走数に有意差は認めなかった。遊走した白血球は約80%以上が顆粒球であり、その中でもCD11b陽性細胞が約95%と大部分を占めていた。その割合は妊娠期間に限らず一定していた。妊娠週数の変化で白血球は特異的に性質を変え、2nd trimester(と陣痛発来時)でCD11b陽性細胞が多く遊走した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分娩に至る機序が妊娠32週以前と正期産とで異なる可能性があるが、少なくとも妊娠後期から分娩においては chemoattractant に対する白血球の反応性は徐々に高くなっていることが予想された。これらの反応性を評価することで分娩誘発が成功するかどうかや急産の予測、また予定帝王切開前の陣発の予測などの臨床応用ができる可能性が示唆された。今後は、chemoattractant のなかで何に対して白血球が遊走しているのかについて研究を継続し、臨床応用の可能性について引き続き探求していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Total leukocyte (including granulocytes, NK cells, T cells, B cells and monocytes) migration increased as labor progressed (spontaneous TLvs TNLp<0.008). More leukocytes migrated at PTL than at PTNL with intact membranes ( $p<0.0001$ ). Receiver operating characteristic curve parameters indicated the cut-off point for delivery within 7 days to be 37,082 leukocytes with sensitivity 78.1%, specificity 88.9%, positive pre-dictive value 91.4%, negative predictive value 72.7%, and area under the curve 0.83. The LMA has the potential to become a much needed point-of-care clinical test to predict delivery within 7 days.

研究分野：産婦人科

キーワード：早産 胎盤 卵膜 白血球遊走能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

本邦での早産は海外に比べ低率であるが、2005 年以降はその発生率の低下を認めておらず、その適切な加療のために早産の予測が望まれている。妊婦の分娩時期を予測する検査は前回早産歴などのリスク評価や、子宮頸管長の測定、また多種のバイオケミカルマーカーがあるが、その中で陽性的中率が高い検査は現在のところ存在しない。子宮頸管長測定はその中でも比較的陽性的中率が高いと言われているが、頸管長短縮が始まっている時点ではすでに早産のカスケードが始まっており、治療を開始するには遅すぎる可能性がある。

#### 2. 研究の目的

分娩の進行はいわば炎症反応であり、さまざまな炎症性サイトカインなどの因子が関わっていると考えられている。実際、分娩後の胎盤や子宮筋を採取すると、好中球、T 細胞、単核球が活性化され組織に浸潤している像が観察できる。我々は、分娩には子宮や脱落膜などへの白血球浸潤が重要であると考え、子宮や卵膜に遊走することに着目し、本研究を行った。

#### 3. 研究の方法

共同研究先のカナダ、アルバータ大学での先行研究で、非分娩時と比較し、分娩時の卵膜へ白血球浸潤が高いことが既にわかっている。しかし、早産予測の検査として妊娠中の卵膜の採取は困難である。そこで採取が比較的容易な白血球を用いて、その卵膜への反応性の変化により分娩時期の予測ができないかと考えた。実験には白血球組織侵入アッセイモデル (Leukocyte Migration Assay (LMA)) を用いた。

Neuro probe 社の multiwell chemotaxis chamber を用いた。この装置では下段の物質に誘導され、上段の細胞は下段に侵入する。全妊娠期間中に 5 回 (1st、2nd、3rd trimester、陣発時、産褥 3 日目) 血液採取を行い、チャンパーの上段には妊婦末梢血から得られた白血球 10 万個、下段には満期産経膈分娩で娩出した卵膜から得られた抽出液を入れた。アッセイ終了後に下段の溶液を採取し、白血球及びその分画や組成をフローサイトメトリーによってカウントした。

#### 4. 研究成果

白血球を正常産陣発群、正常産予定帝王切開群から採取し比較したところ、正常産陣発群の方が有意差をもって遊走白血球数が多く、つまり chemotactic factor に対する白血球の反応性が高いという結果をえた。次に、正常産陣発群と正常産オキシトシン誘発群から採取した白血球で比較したところ、正常産陣発群の方が有意差をもって遊走白血球数が多かった。さらに、37 週未満の早産群、切迫早産群 (未陣発) から採取した白血球で比較したところ、早産群の方が有意差をもって遊走白血球数が多かった。

これらのことより自然陣発時の白血球は活性化していると考えられた。また、自然陣発後の卵膜抽出液中の何らかの物質がこの活性化された白血球の走化性因子 (chemoattractant) として働いていると考えられた。この結果から早産も含め 7 日以内に分娩になるかどうかで ROC 曲線を引いたところ、感度、特異度ともに 87.1%、95.7% と高い値となり、LMA は 7 日以内の分娩予測に有用である可能性が考えられた。

さらに、より早期に分娩のタイミングを見極められるかどうかを検討するために、正常妊娠における遊走白血球数の変化を確認することとした。妊娠 35 週以降、分娩までの期間、週 1 回採取した白血球で LMA を行ったところ分娩に至るまで遊走白血球数は漸増し

ていた。全妊娠期間を通して、どの時期に遊走白血球数が増加し始めるのか、妊娠初期から徐々に増加し分娩時に最大値になる、もしくは妊娠後期から急増するのかを確認するために、LMA を用いて遊走白血球数の推移をおった。妊婦の全血は全妊娠期間中に 5 回(妊娠初期・中期・後期、分娩時、産褥期)採取した。仮説に反して、遊走白血球数は妊娠週数を経るごとに徐々に増加するのではなく、妊娠中期の遊走白血球数がその他の時期と比較し有意差をもって増加していた。遊走白血球数は妊娠初期から中期にかけ増加、中期から後期にかけて減少、後期から分娩にかけて増加し、産褥期では急速に減少する「M 字」型のグラフを描いていた。遊走した白血球の 98% は好中球であり、活性化好中球のマーカである CD11b 陽性細胞であった。今回の研究でも妊娠後期、分娩時を二群間比較すると分娩時の遊走白血球数は有意に増加していたが、5 群間比較では有意差は出なかった。

妊娠後期に遊走白血球数が減少する要因の一つとしてオキシトシンの関与が考えられた。自然陣発群より、オキシトシンでの誘発群において遊走白血球数が減少していることより、抗炎症作用を有するオキシトシンが白血球の遊走を抑制しているのではないかと考えた。そこで、オキシトシンを添加した白血球の遊走を LMA で確認したが、in vitro model では遊走数に変化は見られなかった。オキシトシンが抗炎症作用をもつのであれば、子宮などの in vivo ではもしかすると白血球の遊走を抑制している可能性はあり、それならば妊娠中期より後期に遊走白血球数が減少すること、また自然陣発群よりオキシトシン誘発群で遊走白血球数が減少していることが説明できる。

分娩に至る機序が妊娠 32 週以前と正期産とで異なる可能性があるが、少なくとも妊娠後期から分娩においては chemoattractant に対する白血球の反応性は徐々に高くなっていることが予想されるため、分娩誘発が成功するかどうか、急産の予測、また予定帝王切開前の陣発の予測などの臨床応用ができると考える。今後は、chemoattractant のなかで何に対して白血球が遊走しているのかを引き続き研究する予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

2105 年国際胎盤学会  
2015 年日本産科婦人科学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：竹田純

ローマ字氏名：Jun Takeda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。