

氏名	小林 八郎 こばやし はちろう
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第574号
学位授与の日付	昭和56年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	ヒト末梢リンパ球の幼若化反応におよぼす性ステロイドの影響に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 花岡正男 教授 市川康夫 教授 西村敏雄

### 論文内容の要旨

組織適合抗原を異にする胎児が、母体による拒絶反応をまぬがれている機序の1つとして、母体の免疫能の低下が考えられている。1971年、Kasakura は妊婦血清中にリンパ球混合培養反応 (MLR) を抑制する因子の存在を報告したが、その実体は不明である。1973年、Adcock III はヒト絨毛性ゴナドトロピンが PHA 刺激によるリンパ球の幼若化反応を抑制することを報告した。その後、胎盤より分泌されるホルモンが、免疫の見地より再検討されはじめた。今回私は、妊娠時胎盤より活発に分泌される性ステロイドに注目し、同種移植免疫に主役を演じる T-cell の機能に及ぼす性ステロイドの影響を知るため、PHA 刺激によるリンパ球の幼若化反応、及びリンパ球混合培養反応に及ぼす性ステロイドの影響を検討した。

健康成人男女の末梢血約 20ml を、ヘパリン処理した注射筒にて採血した。対照の中にピル服用者は含まれていない。Ficoll-metrizoate 法にて末梢血よりリンパ球を分離し、自家血漿を40%の割合に含む培養液にて  $2 \times 10^6$  個/ml 又は  $1.5 \times 10^6$  個/ml のリンパ球浮遊液を作成した。培養には東大医科研式マイクロテストプレートを使用した。テストプレートの各 well にリンパ球浮遊液 0.1ml, PHA 3 $\mu$ g 及びステロイド稀釈液 0.1ml, 又は刺激及び反応リンパ球浮遊液 0.05ml ずつ、及びステロイド稀釈液 0.1ml 加え、quadruplicate にて培養した。炭酸ガス培養器中にて、5% CO<sub>2</sub> 95% 空気の気相下、37℃にて、PHA 刺激実験は3日間、MLR は6日間培養後、1.25 $\mu$ Ci 又は 0.5 $\mu$ Ci の <sup>3</sup>H-thymidine を加え、さらに PHA 刺激実験は24時間、MLR は18時間追加培養を行った。追加培養後、5% 三塩化酢酸を加え、ガラスファイバーペーパーに酸不溶性分画を吸引し、液体シンチレーションカウンターにて DNA 中への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを計数した。検討した性ステロイドは、estrone, estradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>), estriol, testosterone, androstendione, dehydroepiandrosterone, progesterone(P), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone(20 $\alpha$ -P) の9種であり、10<sup>-1</sup>~10<sup>4</sup>ng/ml の濃度範囲にて検討した。性ステロイドの溶解に使用したエタノールは、PHA 刺激実験では1%以下、MLR では0.2%以下において影響のないことを最初に確認した。細胞毒性実験は、MLR と同様に培養し、trypan blue dye exclusion を

指標とし、生存リンパ球を算定し、対照群と比較、検討した。

その結果、Pは $2 \times 10^3 \text{ ng/ml}$ 以上の濃度において統計的に有意の抑制効果を示し、抑制効果は濃度の上昇とともに増強し、 $10^4 \text{ ng/ml}$ において最大であった。

$E_2$ はMLRに対して、 $10^4 \text{ ng/ml}$ において統計的に有意の抑制効果を示したが、PHA刺激実験においては、抑制効果を示さなかった。一方、 $20\alpha\text{-P}$ はPHA刺激実験において、 $10^4 \text{ ng/ml}$ において統計的に有意の抑制効果を示したが、MLRにおいては抑制効果を示さなかった。この結果の相異をもたらした機序は不明である。

検討した他の6種の性ステロイドは、PHA刺激実験やMLRにおいて、抑制効果も促進効果も示さなかった。

以上より、妊娠全期間を通じて、胎盤におけるPの濃度は $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3 \text{ ng/g wet tissue}$ であり、又Pは $2 \times 10^3 \text{ ng/ml}$ 以上の濃度において、PHA刺激によるリンパ球の幼若化反応やMLRを抑制することから、Pは妊娠中、特にPが高濃度に存在する妊娠初期に、胎盤局所において母体の免疫能を抑制している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

妊娠の成立と維持に関与する性ステロイドの免疫的意義を検討するため、PHA刺激によるリンパ球の幼若化反応、及びリンパ球混合培養反応(MLR)に及ぼす性ステロイドの影響を検討した。健康成人男女の末梢血よりリンパ球を分離し、 $1.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6 \text{ 個/ml}$ のリンパ球浮遊液を作成し、マイクロテストプレートにて、PHA( $15 \mu\text{g/ml}$ )刺激実験は4日間、two way MLRは7日間培養を行い、9種の性ステロイドを $10^{-1} \sim 10^4 \text{ ng/ml}$ の濃度範囲にて添加し、これらによる影響を検討した。即ち培養終了18~24時間前に $^3\text{H-TdR}$ を加え、DNA中への $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを計数、比較検討した。その結果プロゲステロン(P)のみが $2 \times 10^3 \text{ ng/ml}$ 以上の濃度において取り込みを有意に抑制し、しかも抑制効果を示したPの濃度が胎盤局所のPの濃度( $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3 \text{ ng/g wet tissue}$ )と一致することから、Pは胎盤局所において母体の免疫能を抑制している可能性のあることを示唆したのである。以上の論文は、妊娠の維持に関与するプロゲステロンの免疫的意義を初めて明らかにしたものであり、医学博士の学位論文として価値あるものと認める。