

子宮内膜症における腹腔貯留液中 Macrophage, および

Interleukin-1の不妊因子としての意義

—動物実験による検討—

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 須川 信教授)

宇 田 聡 梅 咲 直 彦

The Role of the Peritoneal Macrophage in Infertility

Associated with Endometriosis

—Animal Experiment—

Satoshi UDA and Naohiko UMESAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University Medical School, Osaka

(Director : Prof. Tadashi Sugawa)

概要 子宮内膜症患者の不妊の原因については単に器質的障害に限らず他の要因も考慮されねばならない。本研究は内膜症患者腹腔貯留液 (peritoneal fluid: 以下 PF) 中の Macrophage (以下 $M\phi$) と、それに関連した PF 中 Interleukin-1 (以下 IL-1) の不妊, 不育への関与につき臨床例での検討とともに動物実験による検討を加えたものである。

はじめに内膜症患者の PF 中の $M\phi$ 数および IL-1 β 濃度を調べた結果, 内膜症患者の PF 中に $M\phi$ 数が増加した例, また IL-1 β 濃度の高い例が各々 1/3 の例に認められた。次にメスマウスを用い, OK-432 (中外製薬) の腹腔内投与 (以下 ip) によつて腹腔 $M\phi$ を増殖させた群, および IL-1 β を ip した群をそれぞれ交配させ, 各群での妊娠率, 胎仔数を調べた。さらに腹腔内の $M\phi$ 増加例に対し, $M\phi$ の IL-1 産生を抑える目的で prednisolone (以下 pred) を連日 ip した群における交配実験後の妊娠率, 胎仔数を調べた。

その結果, (1) メスマウス腹腔内に $M\phi$ が増加した群において妊娠率, および平均胎仔数の有意な減少が認められた。(2) IL-1 を ip した群においてもその妊娠率, 平均胎仔数が有意に減少を示した。(3) 腹腔 $M\phi$ 数の増加例に pred を ip し IL-1 産生を抑制した群においては妊娠率, 平均胎仔数の低下が軽度であつた。

以上より腹腔 $M\phi$, とくに IL-1 の存在が子宮内膜症患者の妊孕能低下の要因の一つであることが強く示唆された。

Synopsis In this study, the role of the peritoneal macrophage ($M\phi$) in the infertility of endometriosis patients was investigated through clinical and animal experiments. In addition, the effect of prednisolone as a treatment of infertility caused by endometriosis was evaluated in animal experiments. The number of $M\phi$ and the level of IL-1 in the peritoneal fluid were measured. The results showed that the number of $M\phi$ and the level of IL-1 increased in 1/3 of patients with endometriosis. Next, the effect of $M\phi$ and IL-1 on the pregnancy rate and the number of conceptions was studied in animal experiments. The conception rate and litter number significantly decreased when $M\phi$ increased in the animal peritoneal cavity after injection of OK-432. In the experiment with IL-1 injection into the peritoneal cavity, similar results were obtained, and in the group of animal with suppression of $M\phi$ function due to prednisolone administration, both of the rate of pregnancy and the number of litters increased remarkably. It can therefore be assumed that the mechanism of infertility in women with endometriosis is associated with peritoneal $M\phi$, or, more specifically, with $M\phi$ -produced IL-1.

Key words: Endometriosis • Infertility • Peritoneal macrophage • IL-1 • Prednisolone

緒 言

子宮内膜症 (以下内膜症) 患者は不妊をきたす

ことが多く, その主な原因として卵管通過障害が考えられてきた³⁾⁶⁾¹³⁾¹⁴⁾。しかし卵管の閉塞がみら

れない例においても, しばしば不妊, 不育が存在し, 近年その原因として免疫の関与¹⁾²⁾⁷⁾が考えられるようになってきている. すなわち子宮内膜症患者の腹腔貯留液(peritoneal fluid:以下PF)中には正常婦人に比べMacrophage(以下M ϕ)が増加し, 同時にInterleukin-1(以下IL-1)濃度も上昇しているという報告⁸⁾⁹⁾があり, そのPF中のM ϕ の増加が内膜症での不妊, 不育の原因として関与する可能性が示唆されている⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾. 本研究は, まず内膜症患者のPF中のM ϕ 数とIL-1 β 濃度を検討し, 次にマウスを用いた動物実験で, メスの腹腔内に前もってOK-432(中外製薬)の投与を行い腹腔内にM ϕ を増加させた条件, あるいはM ϕ より分泌されるIL-1を腹腔内に投与した条件を作り, それが妊孕性に与える影響につき検討を加えた. さらにOK-432の腹腔内投与(以下ip)により亢進したM ϕ のIL-1産生能を抑制する目的でprednisolone(以下pred)を投与し, その妊孕性への影響を検討した.

研究方法

A. 内膜症患者PF中のM ϕ 数およびIL-1の測定

1. PFの採取

内膜症患者よりのPFの採取は手術時および, 腹腔鏡施行時に行った. 採取したPFはシリコンコーティングのスπιツに移し, PF中M ϕ の管壁への付着を少なくした. なお対照群として子宮筋腫患者より採取したPFを用い, それぞれの試料はただちに測定に供した.

2. M ϕ 数の測定

PF試料からFicoll-Hypaque比重遠心法を用い単核球を採取し, その数を測定した. さらに単核球をスライドグラスに塗抹しM ϕ を特異的に染色する α -naphtyl butylate染色を行い, 単核球中に占めるM ϕ の比率を求めた. そして単核球数にその比率を乗じ, PF 1mlあたりのM ϕ 数を算定した.

3. IL-1の測定

PFを遠心し, 上清のIL-1 β 濃度をELISAキット(大塚製薬)を用い測定した.

B. M ϕ 機能抑制実験

1. M ϕ 分画の分離

ヒト末梢血よりFicoll-Hypaque比重遠心法を用い単核球を分離採取した. 採取した細胞はPBSで洗浄後, RPMI 1640medium(GIBCO)に浮遊させ, 3×10^6 個/mlに調整した. そしてその3mlをMAP-plate(JIMRO)に添加し, 37°Cで1時間培養しM ϕ を付着させた. 遊離細胞は培養上清とともに除去し, その後cold MSP-S液(JIMRO)に30分間4°Cで培養して付着細胞を剝離させた. そして集めた細胞をM ϕ 分画として用いた.

2. ステロイドホルモン

prednisolone(萬有製薬), estradiol(Sigma), progesterone(萬有製薬)を使用した. それぞれのホルモンは100%エタノールで溶解し, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} Mに調整した. またエタノールの最終濃度は0.5%となるようにPBSにて希釈し実験に用いた.

3. M ϕ の培養および培養上清の採取

各ステロイドホルモンを添加した後に5%CO₂ 95%room air, 37°Cで48時間培養した. なおコントロールはエタノール濃度が0.5%となるように調整した. その後採取した培養上清は遠心後, IL-1濃度測定まで-80°Cで冷凍保存した.

C. 動物実験

1. 実験動物

実験動物は10週齢のICRマウス(ケアリ)を用いた.

2. 腹腔M ϕ の誘導方法とM ϕ 数の測定

M ϕ の腹腔内への誘導はマウスに溶連菌製剤であるOK-432 0.1KEをipすることにより行なった. OK-432のip後4日目にマウスを屠殺し, 腹腔内に生食10mlを注入した. マウスの腹部を1分間マッサージしPFと混合した後, 腹腔内の生食をxml回収し, その中の1mlあたりの単核球数(c)を測定し $c \times 10/x$ を腹腔内の総単核球数とした. それに α -naphtyl butylate染色により算定したM ϕ の比率を乗じてM ϕ 数として表した.

3. 交配実験

メスマウスに, DAY 1にpregnant mare serum gonadotropin(PMS, 帝国臓器)5IUを, 48時間後のDAY3にhuman chorionic gonadotropin

(hCG, 持田製薬) 10IU をそれぞれ ip して排卵を促し, その 7 時間後に交配させ, 翌日の DAY 4 に腔栓を確認した.

1) 腹腔 M ϕ 存在下での交配実験

DAY 1 に OK-432 0.1KE, DAY 5 に PMS 5IU, DAY 7 に hCG 10IU ip する. 以下交配実験を同様に行つた.

2) IL-1 β ip 後の交配実験

DAY 1 に PMS 5IU, DAY 3 に hCG 10IU を ip, その 5 時間後に recombinant IL-1 β (大塚製薬) を 1,000pg または 100pg を ip し, 2 時間後に交配させた.

3) 腹腔 M ϕ の機能抑制下での交配実験

DAY 1 に OK-432 0.1KE を ip, DAY 2, 3, 4 に pred 1 μ g を ip する. DAY 5 に PMS 5IU, DAY 6 にさらに pred 1 μ g を ip, DAY 7 に hCG 10IU を ip 後同様に交配実験を行う.

以上の交配実験はすべて交配後 14 日目に屠殺し妊娠率, 妊娠例の胎仔数を調べた.

成 績

A. 内膜症患者 PF 中の M ϕ 数

内膜症患者の PF 中 M ϕ 数は, 検討した症例の約 1/3 に増加が認められ, 最高 2.5×10^6 個/ml であった (図 1).

B. 内膜症患者の PF 中 IL-1 β 濃度

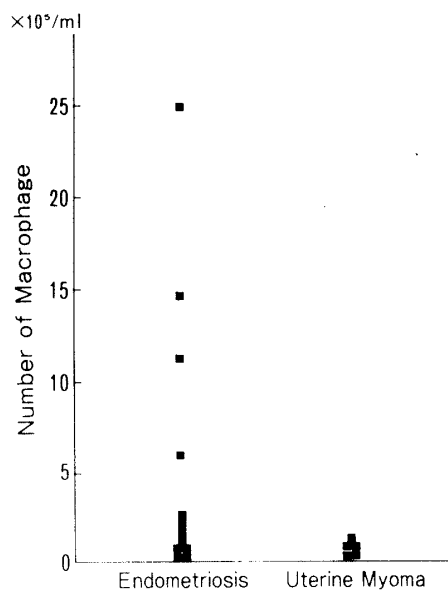


図 1 子宮内膜症患者腹水中の M ϕ 数

図 2 に示すように対照群はすべて 5pg/ml 以下であつたのに比べ, 内膜症患者では, 17 例中 6 例が 9.5~72.0pg/ml と高値を示した. しかし M ϕ 数と IL-1 β 濃度との間に一定の相関は認められなかつた.

C. M ϕ の IL-1 産生能に及ぼす pred の影響

pred 添加における M ϕ の IL-1 β 産生能は, 対照を 100 として比較したところ, 10^{-7} M 添加にお

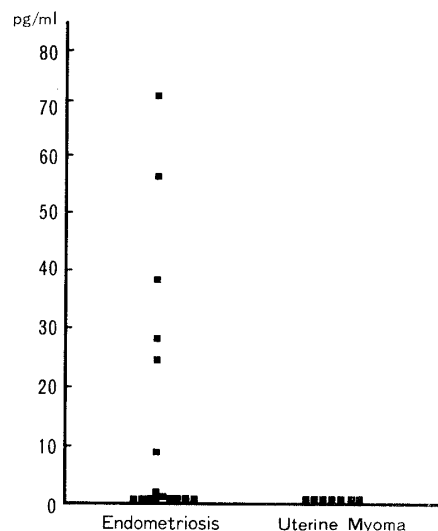


図 2 子宮内膜症患者腹水中の IL-1 β 濃度 (pg/ml)

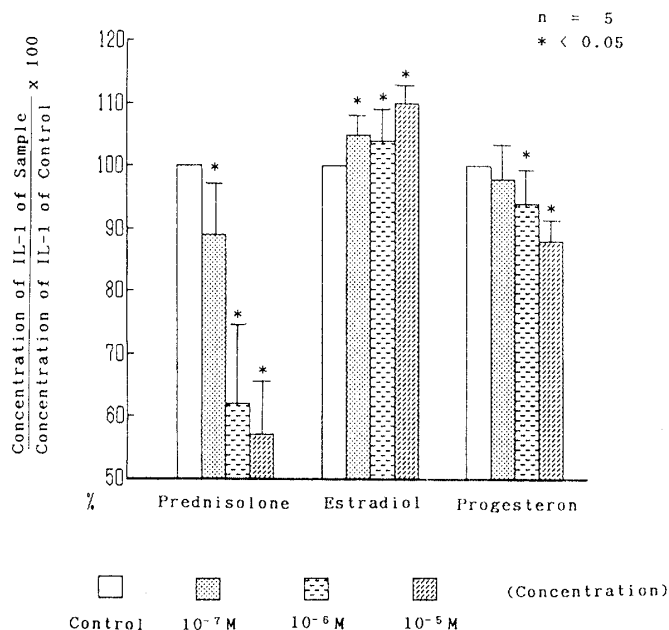


図 3 M ϕ の IL-1 β 産生能に及ぼす各種濃度の prednisolone, estradiol および progesterone の影響

いて約10%, 10^{-6} M で約40%と抑制された. なお progesterone は 10^{-6} M 以上の濃度ではやや産生が抑制された. 一方 estradiol では逆に産生は亢進した(図3).

D. OK-432のマウス ip 後に誘導された腹腔 Mφ 数

OK-432の ip 後4日目のマウス腹腔 Mφ 数は表1に示すごとく $55.2 \pm 23.5 \times 10^5$ と対照の $8.1 \pm 6.3 \times 10^5$ に比べ有意に増加した.

E. 交配実験

表1 OK-432 ip 後4日目のマウス腹腔の Mφ 数

Group	Exp. No.	Mφ number
OK-432	20	$55.2 \pm 23.5 \times 10^5$
Control	10	$8.1 \pm 6.3 \times 10^5$

] $p < 0.01$

表2 OK-432または IL-1 ip 後の黄体数

Group	No. of Corpus Luteum
OK-432	27.0 ± 4.97
IL-1	24.3 ± 4.99
Control	24.5 ± 5.45

NS

NS

表3 OK-432 ip 後のマウス妊娠率および平均胎仔数

Group	No.	Preg. Rate	Litter Number
OK-432	33	12% (4)	6.00 ± 3.56
Control	30	77% (23)	14.1 ± 5.26

] $p < 0.01$

表4 IL-1β ip 後のマウス妊娠率および平均胎仔数

Group	No.	Preg. Rate	Litter Number
IL-1 (1,000pg)	30	33% (10)	3.70 ± 2.54
IL-1 (100pg)	20	30% (6)	8.67 ± 8.64
Control	30	77% (23)	14.1 ± 5.26

] $p < 0.1$

] $p < 0.01$

表5 OK-432 ip 後に prednisolone を ip した場合の妊娠率および平均胎仔数

Group	No.	Preg. Rate	Litter Number
OK-432†	33	12% (4)	6.00 ± 3.56
OK-432 & Pred‡	21	43% (9)	16.1 ± 8.72
Control	30	77% (23)	14.1 ± 5.26

] $p < 0.05$

†0.1KE of OK-432 was administrated intraperitoneally

‡0.1KE of OK-432 and 1μg of prednisolone was administrated intraperitoneally

1. 黄体数

OK-432, IL-1投与群の黄体数を対照群と比較した結果, OK-432投与群が 27.0 ± 4.97 , IL-1投与群が 24.3 ± 4.99 と対照群の 24.5 ± 5.45 と有意差は認められなかつた(表2).

2. 腹腔 Mφ 誘導後の妊娠率および平均胎仔数

表3に示すごとく OK-432 ip 群では妊娠率は12%と対照の77%に比し低下し, 妊娠例の胎仔数も 6.00 ± 3.56 と対照群の 14.1 ± 5.26 に比べ有意に減少した.

3. IL-1β ip 後の妊娠率および平均胎仔数

IL-1β ip 後の妊娠率は100pg 群で30%, 1,000pg 群は33%と対照の77%に比べ低く, また妊娠例の平均胎仔数も100pg 群が8.67, 1,000pg 群が3.70 と対照の14.1に比し有意に減少していた(表4).

4. pred による腹腔 Mφ の IL-1β 産生能抑制下での妊娠率および平均胎仔数

pred の ip による腹腔 Mφ の IL-1β 産生能抑制の結果, 妊娠率は43%, 平均胎仔数は16.1と低下が有意に軽度であつた(表5).

考 察

子宮内膜症に伴う不妊, 不育の原因として, 腹腔内の Mφ が関与するか否かにつき検討すべく, まず内膜症患者の PF 中 Mφ の数, ならびに PF 中 IL-1β 濃度を測定した. ついで実験動物において腹腔内に Mφ を誘導し, それで実際に妊娠現象に影響を与えるか, また Mφ から分泌される物質

の一つである IL-1 が同じく妊孕現象に影響を与えているか否かを検討した。さらに腹腔 M ϕ の IL-1 産生能を抑制したときの妊孕能の変化について検討を加えてみた。

今回の検討では約 1/3 の内膜症患者に PF 中の M ϕ 数の増加がみられ、IL-1 β 濃度も約 1/3 の症例で増加がみられた。M ϕ の IL-1 産生は IL-1 β が優位を占めるため今回は IL-1 β の測定のみとした。以下の実験系においても、IL-1 α と IL-1 β の生物活性はほぼ同様のため IL-1 として IL-1 β を用いた。なお M ϕ 数と IL-1 β 濃度との相関はみられなかった。これは M ϕ の活性化の程度が症例によって異なっているためと考える。

このように内膜症患者 PF 中の M ϕ 数の増加例、IL-1 β 濃度の上昇例があることが明らかとなった。そこで M ϕ 、IL-1 の妊孕性に及ぼす影響を実験動物によつて検討した。OK-432 は溶連菌製剤で一般には biological response modifier (BRM) として臨床に用いられており、ip により多数の M ϕ を腹腔内に浸潤させることが知られている¹⁰⁾。我々の検討においても OK-432 の ip 後 4 日目のマウス腹腔内浸出 M ϕ 数が対照に比し有意に高値となることが確認された。ただマウス腹腔内に M ϕ が遊出した時に IL-1 を実際に分泌しているかどうかについてのマウス IL-1 の測定は行っていない。しかしヒト M ϕ の検討で OK-432 を M ϕ 培養系に添加した時に IL-1 産生が増加することから、OK-432 ip 後のマウス腹腔内には多量の IL-1 が存在していると考えられる。以上の検討の後腹腔内に M ϕ が多数存在している環境下で交配実験を行つた。その結果、妊娠率は低下し、妊娠例の平均胎仔数も低下した。それゆえ腹腔 M ϕ が妊孕性の低下に影響していることが推察された。なお OK-432 が直接妊孕能に影響を与えた可能性も考えられるが、黄体数に影響はなく、また後に行つた M ϕ 機能抑制の際に妊娠率、胎仔数が上昇したことから否定され得る。

次に IL-1 β の ip による影響を調べた。IL-1 β の ip は hCG 注入後 5 時間目とし交配はこの 2 時間後に行つた。この時間に IL-1 β を ip したのは IL-1 β の ip による細胞浸潤の影響を少なくするため

である。hCG ip 後の IL-1 β ip 投与は、対照群に比し黄体数の減少をきたすことはなかった。IL-1 β の ip 後の交配実験においても妊娠率、平均胎仔数は低下し、腹腔 M ϕ 、PF 中 IL-1 が妊孕性の低下に関わっていることが強く推察された。

そこで腹腔 M ϕ の機能抑制、とくに IL-1 産生能を抑制することが妊孕能の回復をもたらすかについて検討した。まず副腎皮質ホルモンが M ϕ 機能を抑制することから pred を用いて M ϕ の IL-1 産生能に及ぼす影響につき検討した。なお予備実験として M ϕ の代用として末梢血から分離した単球で検討した。その結果 pred は有意に M ϕ の IL-1 産生を抑制した。そこで交配実験で OK-432 ip の翌日から連日 pred を ip し、過排卵後に交配させた。その結果妊娠率、平均胎仔数の低下は軽度となった。このことから腹腔内の M ϕ 、とくに IL-1 の存在が妊孕現象を抑制することがより一層明確なものとなった。

以上腹腔 M ϕ 、とくに M ϕ から分泌される IL-1 が妊孕性を障害すること、次に M ϕ からの IL-1 産生を抑制したとき妊孕性の回復がみられることを動物を用いた実験系で示した。では M ϕ または IL-1 はいかなる機序で不妊、不育を引き起こしているのであろうか。排卵機構に関しては問題がないことは確かめられたが、M ϕ による精子の貪食³⁾¹¹⁾、また IL-1 による精子の運動能の低下(水野ら)、受精率の低下、卵分割能の低下¹⁰⁾など妊孕現象の初期の各段階に直接影響を与えている可能性、また子宮内膜組織や脱落膜組織への影響を介して妊孕現象に影響を与える可能性があり、不妊、不育両面への関与が考えられる。今回の検討ではマウスの妊娠率、胎仔数への影響という点のみでみているため不妊を引き起こしているのか、不育を引き起こしているのか厳密には考察はできない。しかし IL-1 が妊卵の分割に直接影響しないという報告¹⁵⁾があること、またマウスにおいては、卵巣と卵管は膜に包まれており腹腔内に卵が出ることがなく、それにもかかわらず腹腔内に投与された IL-1 が妊孕能に影響すること、これらから IL-1 が妊卵の発育、着床において直接的ではなく間接的に働いて不育に関わっている可能性が強いと考え

ている。今後妊卵の着床環境に焦点をしばらく検討を加えてみたい。

稿を終るに際し御校閲を賜った大阪市立大学医学部産科婦人科学教室須川 佶教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Badawy, S.Z., Cuenca, V. and Stizel, A.: Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.*, 68: 271, 1984.
2. Badawy, S.Z., Cuenca, V. and Stizel, A.: Immune rosettes of T and B lymphocytes in infertile women with endometriosis. *J. Reprod. Med.*, 32: 194, 1987.
3. Chacho, K.J., Andreson, P.J. and Scommegna, A.: The effect of peritoneal macrophage incubates on the spermatozoa assay. *Fertil. Steril.*, 48: 694, 1987.
4. Czernobilsky, B. and Silverstein, A.: Salpingitis in ovarian endometriosis. *Fertil. Steril.*, 30: 45, 1978.
5. Fakin, H., Baggett, B., Holtz, G., Tsang, K.-Y., Lee, C.L. and Williamson, H.O.: Interleukin-1: A possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 47: 213, 1987.
6. Forrest, J., Buckley, C.H. and Fox, H.: Pelvic endometriosis and tubal inflammatory disease. *Int. J. Gynec. Pathol.*, 3: 343, 1984.
7. Gleicher, N., El-Roeiy, A. and Confino, E.: Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet. Gynecol.*, 70: 115, 1987.
8. Halme, J., Becker, S., Hammond, M.G., Raj, M. H.G. and Raj, S.: Increased activation of pelvic macrophage in infertile women with mild endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145: 333, 1983.
9. Haney, A.F., Misukonis, M.A. and Weinberg, J. B.: Macrophages and infertility: Oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil. Steril.*, 39: 310, 1983.
10. Morcos, R.N., Gibsons, W.E. and Findley, W. E.: Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryo; Possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 44: 678, 1985.
11. Muscato, J.J., Haney, A.F. and Weinberg, J.B.: Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: A possible cause of infertility in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144: 503, 1982.
12. Olive, D.L., Weinberg, J.B. and Haney, A.F.: Peritoneal macrophages and infertility: The association between cell number and pelvic pathology. *Fertil. Steril.*, 44: 772, 1985.
13. Otsuka, N.: Study on pathogenesis of adhesion in endometriosis. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 32: 1758, 1980.
14. Punnonen, R., Soderstrom, P. and Alanen, A.: Isthmic tubal occlusion: Etiology and histology. *Acta Eur. Fertil.*, 15: 39, 1984.
15. Schneider, E.G., Daniele, A.E. and Polan, M. L.: Lymphokines (interleukin 1 and 2) are not toxic to early mouse embryo development. Annual Meeting of the American Fertility Society, Reno, N.V., September, 28. 1987.
16. Umesaki, N., Ooshika, Y., Kawabata, M., Sako, H. and Sugawa, T.: Experimental and clinical efficacy of locally administrated OK-432, in particular against gynecological cancer. Reprinted from New application of OK-432, 102. Excerpt Medica, Tokyo, 1986.

(No. 6939 平3・1・12受付)