

シンポジウム 妊娠の成立機構—胚発生から着床まで—

## 超早期妊娠関連物質の発現機構と胚成長への関与の研究 —early pregnancy factor の構造決定と相同物質の解析—

慶應義塾大学産婦人科学教室 (主任: 野澤志朗教授)

末 岡 浩

### Comprehensive Study on the Expression Mechanism of the Early Pregnancy Associated Substances and the Implication for Embryo Development —Structural Determination of Early Pregnancy Factor Molecule and Analysis of its Homologous Peptides

Kou SUEOKA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

## 共同研究者

小林 俊文, 森定 優, 名取 道也, 杉村 和男, 伊藤 仁彦  
郭 宗正, 宮崎 豊彦, 青木 類, 長谷川清志, 黒田優佳子  
中野 孝之, 中野真佐男\*, 吉村 慎一\*, 小林 淳一\*, 小西 康博\*  
大野虎之進\*\*, 小田 高久\*\* (済生会神奈川県病院\*, 東京歯大市川病院\*\*)

## 緒 言

妊娠成立は、初期胚と母体との間で行われている物質の交換や環境因子によつて強く影響をうけている。妊娠成立に関与する特異的因子の中で、着床を待たずに出現する超早期因子として early pregnancy factor (EPF) と血小板活性化因子 (platelet activating factor: PAF) が報告されている<sup>1)2)</sup>。しかし、その存在や生物学的作用の詳細については、検出法や精製における困難性のため、いまだ十分に解明されていない。これらの物質の生成機構、構造解析、生体内作用の解明は、妊娠成立機構や免疫抑制など、胚発生から着床に至る環境因子の関与を知るために不可欠である。この命題に沿い、まず EPF の生化学特性や生物活性を知るうえで、完全な分離精製を行い、単離糖タンパクのペプチド構造を解析した。この精製 EPF と最近報告された他のホモロジー物質との相違についての検討を行った。また EPF の産生部位、産生機転、胚の発育や PAF を含めた他因子との関連について、in vitro および in vivo の両生体システムで検討し、EPF の複雑な発現機構の解明に一考察を加えた。そして最後に、妊娠成立過程における受精現象と胚の予後に関与する

EPF 活性の意義を臨床における知見を含め、検討した。

## 方 法

## 1. EPF の構造解析と関連物質の検索

a) 精製素材 精製にあつて、極めて微量にしか含まれない EPF の素材を選択することが重要である。しかも、ヒトの素材を大量に収集することは、さらに困難である。そこで、最も大量に収集できるヒト妊婦尿由来のタンパクを精製素材とした<sup>3)</sup>。尿中の EPF 含有量は、血液に比較し約 1/100 であるが、妊婦尿を安息香酸沈澱法により回収、アセトン洗浄の後、酢酸ナトリウム—エタノール抽出により部分精製された hCG 粗原抹 10g を初期材料として選択し、精製を開始した。

b) 精製法 精製プロトコールは、これまでに種々の精製法について検討した結果、EPF の生物活性を失わない条件の設定が必要であり、さらに単一なタンパクとするために、最終的に極めて複雑な精製法の選択となつた。これまでに検討を重ねてきたレクチン・アフィニティーカラムや、抗  $\beta$ -hCG 抗体アフィニティーカラムなどから得た生化学的性質をもとに、新たにゲ

ル濾過カラム, イオン交換カラム, 疎水性カラム, 逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の各クロマトグラフィー, およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離精製を行い, EPF の単離を試みた。

c) 精製 EPF の分子構造を決定するため, アミノ酸配列分析を行った。EPF のアミノ酸一次構造から, ホモロジー検索を行い, その相同ペプチドから, 妊娠成立に関わる生体内意義の考察を行った。

d) 精製タンパクのアミノ酸配列に従って, タンパク合成機による合成ペプチドを作成し, この合成ペプチドを家兎に免疫して, 抗体を得た。この抗体を用いて, これまでに報告された相同物質との関連について検討した。

## 2. EPF の発現機構の解明

a) EPF の産生機転を解明する目的で, 交配後又は偽妊娠の家兎を用いて, *in vivo* と *in vitro* の卵巣・卵管灌流実験を行い, EPF 活性の変動と胚の成育との関連性を検討した。

b) EPF 産生の誘導因子を解明する目的で, 胚が受精後に放出する PAF を a) のシステムに添加した際に, 卵巣・卵管が EPF 活性を生じるか否かを検討した。

## 3. EPF の臨床意義

EPF が受精によつて出現し, 早期胚の発育過程に反映するか否かを, 臨床的観点から明らかにするために, ヒト体外受精において胚移植後の血中 EPF 活性を分析した。

## 4. EPF 活性の検出法と活性の評価

EPF 活性は, 抗リンパ球抗体によるロゼット形成抑制を EPF が増幅する反応 (ロゼット抑制反応) で検出した。ヒトの EPF 検出法では, 男性末梢血リンパ球を Ficoll を用いて遠心分離後, 非働化した検体と共にインキュベートし, 洗浄の後に, 倍数稀釈した抗リンパ球抗体 (OKT-11) と補体を加えて再度インキュベートする。その後, ヒツジ赤血球を加えて遠心し, 最後に E-ロゼットの形成率を鏡検する。この際, 精製検体に対しては, ハンクス液で透析を行つてから活性検出に供した。

活性の評価は, 抗体の処理をしないロゼットと比較し, 75% 以下にロゼット形成を抑制する抗体の最大稀釈倍数の対数をロゼット抑制度数 (RIT) とし, さらに測定条件の再現性を高めるために対照の RIT との差を解離値 (DV) とした。また DV = 2 以上を EPF 活性陽性と判定した。

## 成 績

### 1. EPF の構造解析と関連物質

#### a) 生化学的特徴

これまでに行つてきたヒト妊婦尿由来の粗原抹からの精製過程で得られた生化学的性質は, EPF が Concanavalin A に吸着し, 糖タンパクであり, また,  $\beta$ -hCG の C 末端に対するモノクローナル抗体アフィニティーカラムに吸着せず, 一部類似した生化学的特徴を持つ hCG と異なる物質であつた<sup>3)</sup>。さらに EPF は, 72°C 以上の加熱処理や Trifluoroacetate 処理で完全失活し, ロゼット抑制反応で EPF の存在を確認しながら精製するためには, 生物活性を失わない分離精製法の選択が要求されてきた。Sodium dodecyl Sulphate (SDS) には安定であり, 硫酸塩析では, 70% で沈澱分画, 30% で上清分画に分離された。これらの性質は, 血液由来の EPF 部分精製に関する Mehta et al. の報告にほぼ一致するものであつた<sup>4)</sup>。

#### b) 精製・構造解析

EPF の完全精製に向けて, 新たにゲル濾過, 陰イオン交換, および疎水性クロマトグラフィーを用い, HPLC などでも溶出条件を検討した後に, その条件に従つてオープンカラムで大量精製を行った。

まず Sepharose CL-6B ゲル濾過クロマトグラフィーにより大まかに EPF 分画を抽出し, とくに hCG 分画から分離することを主眼とした。次いでこのゲル濾過カラムによる EPF 活性分画をプールし, 陰イオン交換カラムである Q Sepharose CL-4B クロマトグラフィーによつて, さらに EPF の精製を行った。EPF は Q Sepharose に吸着し, Tris HCl に, NaCl のグラジエントをかけて溶出すると, EPF の高い分離効率を得ることができた。

次にタンパク質に含まれるアラニン・メチオニン・フェニールアラニンなどの非極性アミノ酸が作る疎水性スポットとカラムの疎水性気質が相互作用を生じることを利用して分離精製する疎水性クロマトグラフィーとして, Phenyl Sepharose CL-4B クロマトグラフィーを用いた。あらかじめ, Phenyl Superose fast protein liquid クロマトグラフィーを用いて, 少量の検体で溶出条件を検討した後にこのオープンカラムでの精製を行ったが, EPF の生物活性を失わず, 極めて有効な精製法であつた。最も高い EPF 活性分画を, 部分精製 EPF として抽出した<sup>5)</sup>。

この部分精製 EPF について, 逆相 HPLC を行い, その精製プロフィールを確認した後に, 活性を確認で

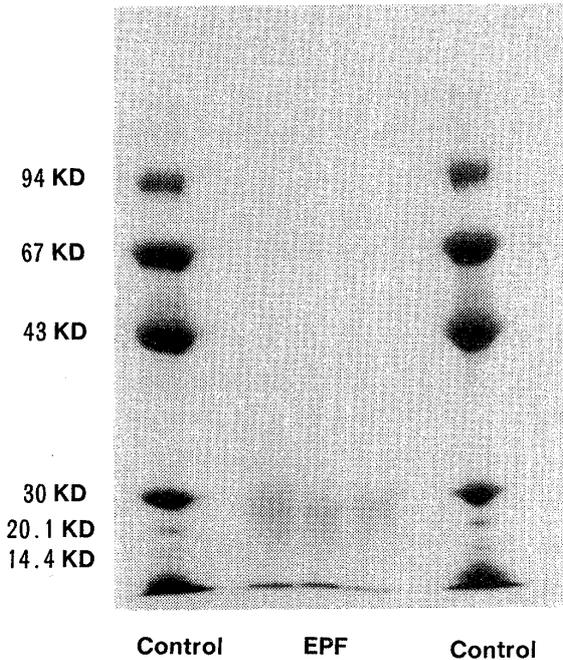


図1 SDS-PAGEでの精製

きる分離法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行つた。図1に示すように3回に分けて抽出して得た部分精製 EPF は、いずれも分子量26KD を中心に、24から30KD の間にやや広いバンドとして泳動された。このバンドは、EPF が糖タンパクであることから広くなつたものと考えられ、このバンドについて、まず50mM の炭酸アンモニウム水溶液でゲルの切り出し抽出を行い、EPF 活性の存在を確認した。さらに、図2に示すように、この SDS-PAGE 抽出分画について逆相 HPLC を行い、部分精製 EPF、すなわち電気泳動の切り出し抽出を行う前の逆相 HPLC で示したピークとほぼ同一の保持時間の位置に、しかも単一のピークとして認めた。等電点電気泳動の結果、等電点は3.5~3.75の酸性糖タンパクであることを示した。

#### c) 構造決定・相同ペプチド

精製した EPF は、前述のように逆相-HPLC および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一物質であることを証明した。さらに Edman 分解によるアミノ酸配列決定を行つた。

EPF の N 末端より16残基の解析結果から、システインなど確定しづらいアミノ酸を除き、11残基に関し、コンピューターで相同ペプチドを検索したところ、ヒト上皮増殖因子 (epidermal growth factor : EGF) の前駆体の部分構造に一致を認めた<sup>6)</sup>。

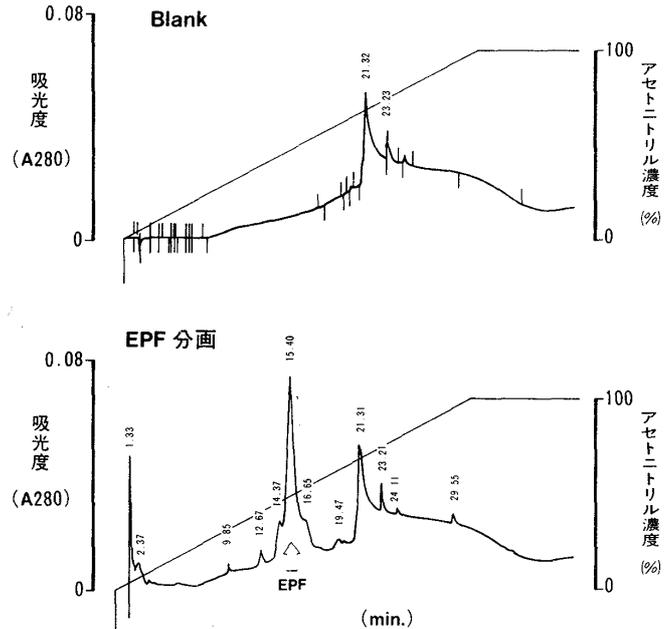


図2 逆相 HPLC の溶出プロフィール

これに対し、これまでに報告された精製、又は部分精製 EPF との比較を検討すると、Mehta et al.の得た血液由来の部分精製 EPF は、生化学的に尿由来の EPF に近似しているが、最近、Clarke et al.によつて報告された胎盤由来の thioredoxin 相同タンパクは、後述するように全く異なる物質と考えられた<sup>7)</sup>。電気泳動から分子量を推定し、EPF の全アミノ酸配列が EGF 前駆体の部分構造に完全に一致すると仮定すると、この構造に EGF を含む計算になる。しかし、糖タンパクであることから分子量の正確な同定が難しいため、アミノ酸配列分析ができた N-末端から13残基、次いで予想される EPF の構造のうち、動物の種差のない15残基、さらに EGF を含まないが C-末端よりの部分15残基という三つの配列について、合成ペプチドを作成し、それを各々 EPF-2, EPF-3, EPF-5 とした。そして、この合成ペプチドを抗原として家兎に免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。このうち、EPF-5 に対してのみ抗体価の上昇を認めた。

この抗 EPF-5 抗体を用いて、EPF と相同物質の関係について検討した。まず、ドット・プロットによる EGF との交叉についてみると、EPF-5 抗体では EPF-5 に濃度依存性に反応し、また部分精製 EPF に対しても弱くではあるが反応した。しかし、ヒト EGF、および他の合成ペプチドに対しては全く反応を示さなかつた。一方、抗ヒト EGF モノクローナル抗体を用いて同様のドット・プロットを行うと、EGF に対してのみ反応

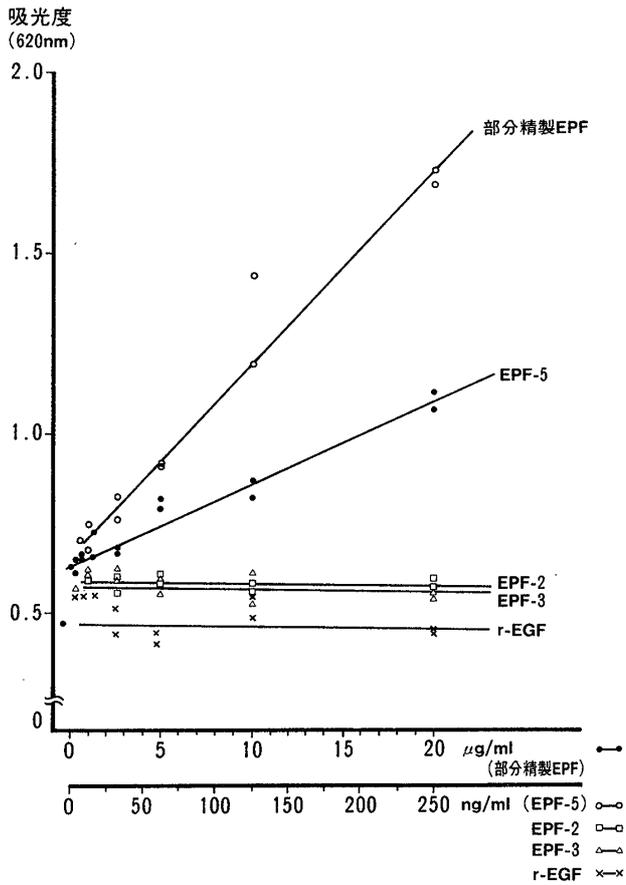


図3 抗EPF-5抗体を用いたELISA測定 (EPF・EGF)

を示し、部分精製EPFやEPF-5を含む合成ペプチドに対しては、反応を示さなかつた。

次に、抗EPF-5抗体を用いたELISA法を行い、EPFとEGFの交叉についてさらに検討すると、図3に示すように、部分精製EPF、およびEPF-5は濃度依存性に検出されたが、EGFや他の合成ペプチドには検出されず、ドット・プロットと同様の結果を得た。すなわちEPFはEPF-5までのアミノ酸配列を構造内に有していることを強く示唆した。

また抗EPF-5抗体を用いたELISAでヒトthioredoxinであるADF(Adult type T cell leukemia factor)の組換え体についてEPF活性の検出をしたが、図4に示すように反応を示さなかつた。

反対に抗ADF抗体と抗EGF抗体を用いてELISAを行い、部分精製EPFのthioredoxin活性とEGF活性を測定すると、全く活性を検出しなかつた。このことは、少なくとも免疫活性からは、今回精製したEPFがEGFやthioredoxinと異なる物質であることを示唆した。

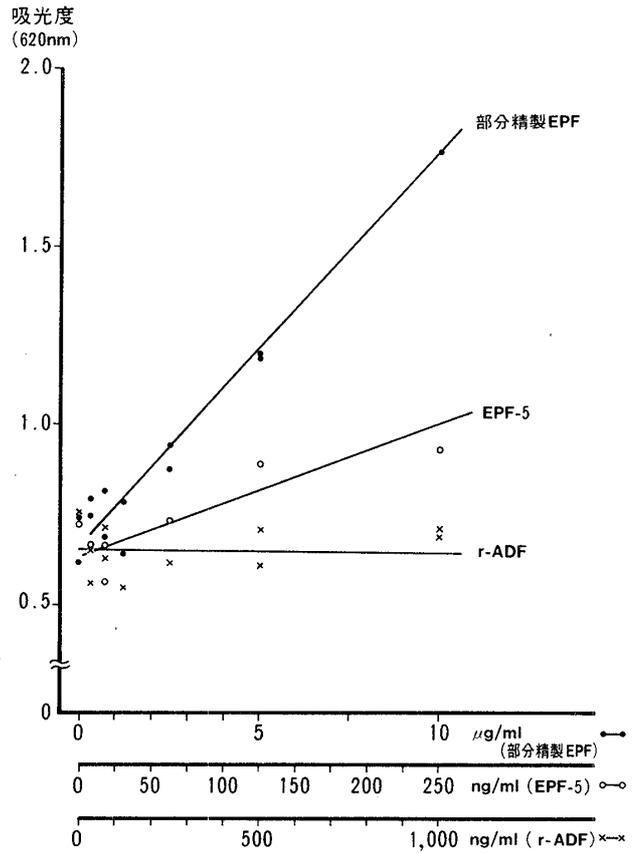


図4 抗EPF-5抗体を用いたELISA測定 (EPF・ADF)

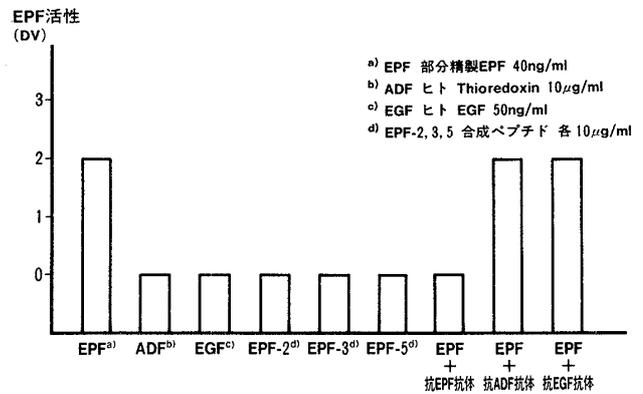


図5 EPF・ADF・EGFのEPF活性

EPFの生物活性の観点から、合成ペプチドやthioredoxin, EGFについて、そのEPF活性を測定し、図5でその結果を示す。thioredoxin, EGF、および各合成ペプチドにはロゼット抑制反応によるEPF活性を認めなかつた。また、部分精製EPFを用いて、これらの物質に対する抗体の活性への影響を検討した。EPF陽性の部分精製EPFに対し、抗EPF-5抗体で中和すると、EPF活性は消失し、このEPF-5のアミノ酸配列

部分が活性に関係していることを示唆した。これに対し、抗 ADF 抗体、抗 EGF 抗体での中和反応では、EPF 活性に変化を認めなかった。

これらの結果から、EGF との関連についての知見として、EPF はアミノ酸配列分析で EGF 前駆体に極めて高い相同性を認め、その N-末端は EGF のエクソン部分に一致しておらず、この事実は、EPF が前駆体から酵素によるプロセッシングによつて産生される可能性を示唆した。また、EGF には EPF の生物活性を認めず、ELISA およびドット・プロットによる検討で、EGF が EPF と少なくとも免疫的に全く交叉しないことを示した。thioredoxin との相違についての知見をまとめると、アミノ酸配列に関するホモロジー検索上、異なる物質であり、組換え体の ADF には EPF の生物活性を認めず、相互の抗体による中和反応でも ELISA による検出でも、EPF と ADF は全く交叉を示さなかった。thioredoxin 相同物質は塩基性タンパクとして抽出され、すなわち、Clarke et al.が報告した thioredoxin 相同物質と我々が精製した物質は、生化学的性質が全く異なることが示唆された。

EGF は卵丘細胞を介して卵子成熟に関与し、胚分割以降の胚成長の調筋機構に関わるとともに、黄体期には、prostaglandin 産生を高めることにより、着床環境をコントロールすることが報告されている。一方、妊娠超早期に発現する EPF も、妊娠成立機構の中で、胚

や胎盤の増殖成長など、何らかの関与をしている可能性が示唆される結果となった。

## 2. EPF の生物作用

EPF が生体内での生物作用の解明を目的として、リンパ球に対する作用について検索した。

### a) フローサイトメトリー分析

リンパ球のロゼット抑制反応に対する EPF の作用機序について検索する目的で、フローサイトメトリーを用いて、リンパ球に EPF が吸着しているかどうかを検討した。ロゼット抑制反応と同様に、リンパ球に部分精製 EPF を処理し、洗浄の後、その上に一次抗体として抗 EPF (EPF-5) 抗体を処理し、さらに FITC で標識した二次抗体(抗ウサギ IgG)を処理し、最終的に再度洗浄の後に、フローサイトメトリーで蛍光強度を分析した。図 6 にそのヒストグラムを示すように、(A) リンパ球に二次抗体のみ処理、(B) 一次抗体および二次抗体処理、(C) EPF を処理した後に一次抗体、二次抗体処理、(D) リンパ球のリセプターが 37°C で一極に集中するキャッピング現象を検討するために、(C)と同様の処理を 37°C で行うという、4 群について比較分析した。二次抗体は Fc 部分を含んでいるため、リンパ球のヒストグラムの肩に小さなピークを形成した。(A)に比較し、(B)では一次抗体が加わることによつて、そのピークの細胞は蛍光強度の強い右方向へシフトした。(C)および(D)の EPF 処理群では、共

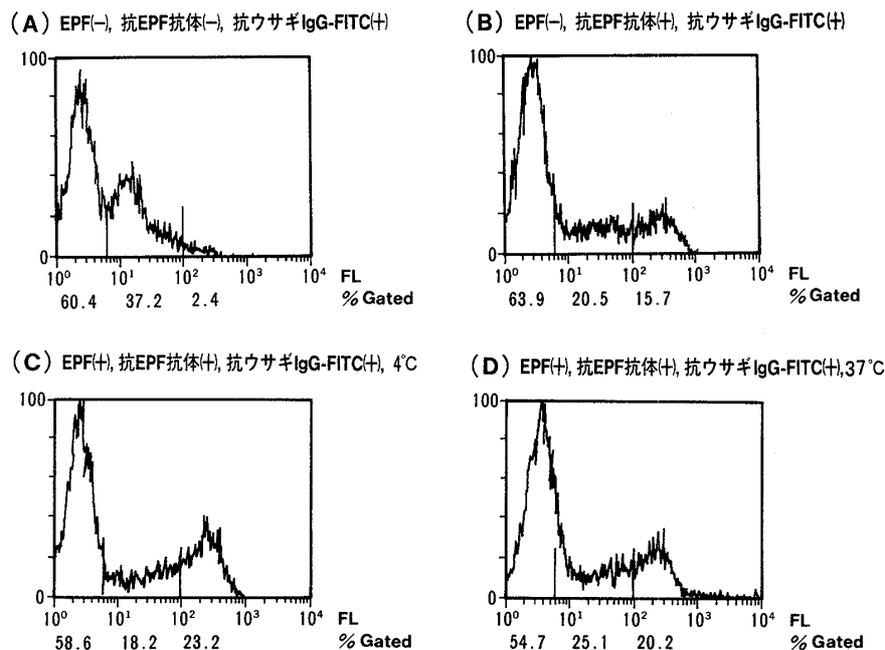


図 6 各リンパ球処理群におけるフローサイトメトリーのヒストグラム

に(B)に比べ、ヒストグラムにおける細胞分布に差を認めなかつた。すなわち、EPF はリンパ球の表面に吸着することにより、ロゼット形成の抑制を増幅するのではなく、リンパ球に吸着以外の何らかの影響を及ぼすことで生物活性を示すことが示唆された。

b) マイトジェンによるリンパ球幼若化反応への効果

Phytohaemoagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Pork Weed Mitogen (PWM) の3種のマイトジェンを用い、部分精製EPFと合成ペプチドEPF-2, EPF-3, EPF-5, および抗EPF抗体のリンパ球増殖に対する作用を検討した。PHA, Con A, PWM共に<sup>3</sup>H標識したサイミジンの取り込みは、各EPFおよび抗EPF抗体添加群で明らかな差を認めず、この反応に対してEPFは少なくとも明らかな影響を及ぼさない結果を示した。

c) ヒツジ赤血球に対するマウス脾細胞の抗体産生能への影響

マイトジェンによるリンパ球幼若化反応のような強い反応に比較し、マイルドな反応として、ヒツジ赤血球を抗原とするマウス脾細胞の抗体産生能を、Plaque forming cell法で検索すると、部分精製EPFおよび抗EPF抗体、さらに合成ペプチドのEPF-2, EPF-3には影響を及ぼさないが、EPF-5は抗体産生能を有意に増強させる効果を示した。

2. EPFの発現機構

a) 発現機転

家兎を用いてEPFの出現機転の検討を、in vivoお

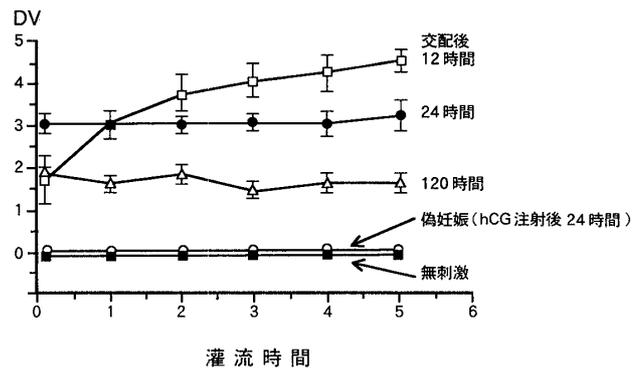


図7 家兎卵巣+卵管灌流液中EPF活性の推移

よび in vitro で行つた。家兎を交配させ、経時的に耳静脈から採血して、そのEPF活性を測定すると、血液中に初めて活性の出現がみられたのは交配後16時間で、その後EPF活性は持続し、妊娠7~9日目で一時活性の低下を示したが、再度活性は陽性化して、妊娠19日目まで陽性域を維持した後、再び分娩の32日目までの間、活性は消失した。動物種により妊娠期間は大きく異なるが、EPFの出現は種にかかわらず二相性の出現経過を示し、妊娠の成立と維持への関与という観点から極めて興味深い事実と考えられた<sup>8)</sup>。

次いで受精の起こる局所循環からEPFがどのような状態で出血してくるかについて、in vitroにおける卵巣および胚を含む卵管の灌流実験を行い、検討した。卵巣動脈と静脈に各々カニューラを挿入した後に、卵巣のみを摘出して卵巣単独灌流、子宮卵管角で切断して摘出し、卵巣および卵管の局所灌流実験を行つた。

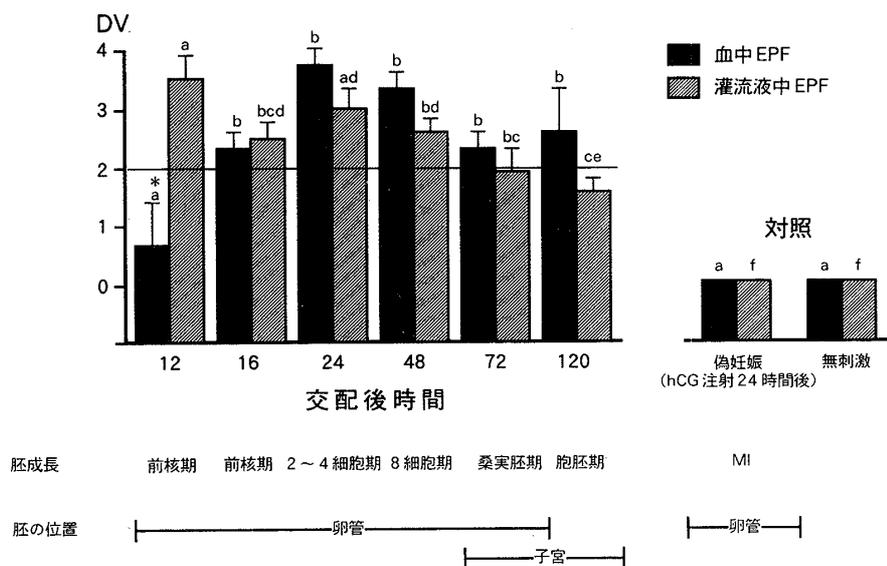


図8 交配家兎の血中および卵巣・卵管灌流液中EPF活性の推移と胚の位置

初期胚を伴った卵管を含む卵巣・卵管灌流系と、対側の卵巣を用いた卵巣単独灌流系の間でEPF活性の推移を比較すると、交配後24時間の家兎で、灌流開始直後は共にEPF活性陽性を示したが、1時間後には卵巣単独の灌流液中の活性は消失した。一方、卵巣および胚を含む卵管灌流液では、5時間の灌流中、陽性のEPF活性は持続した。このことは、EPF活性の発現において、卵管および初期胚が必要であることを示唆した。

局所灌流におけるEPF活性と交配後の経過時間の関係を検討することを目的として、交配後12, 16, 24, 48, 72, 120時間の家兎から臓器を摘出し、灌流実験を行った結果の一部を図7に示す。対照に用いたhCG注射後24時間の偽妊娠群および無刺激群では、EPF活性を認めないが、12時間の群では灌流開始後13時間、受精後推定3時間以内でEPF活性を検出し、灌流時間中、持続的に活性の亢進を認めた。受精後の時間が経過するほど、EPF活性は低下し、120時間でEPFは陰性化した。図8に示すように、血液と局所循環のEPFを比較すると、血液に出現するEPFは、卵巣・卵管の局所循環に比べ、3時間遅れて検出された。灌流終了後にただちに胚を卵管より採取し、胚の成育およびその位置、そしてEPF活性を検討すると、前核期に最も高い活性を示し、その後、桑実胚期まで持続するが、胚の成育と共にEPF活性は低下し、胞胚期では灌流液からのEPF活性は陰性域を示した。また、胚の位置に関して、桑実胚ではすべての胚が卵管内に留まつた例と、すべて子宮腔へ移動し、局所灌流内に存在しなかつた例との間に差がなく、初期胚の存在はEPFの発現に必要なが、一旦EPF活性が発現した後は、その消失後も少なくとも5時間は卵巣・卵管の局所における発現が持続することを示唆した<sup>2)8)</sup>。

#### b) 産生誘導物質

上記結果より、胚の存在がEPF産生の誘導に必要であることが判明したが、同時に、受精後に胚がPAFを遊離することが報告され、EPFと同様に、妊娠の超早期に発現する物質として注目されている。この二つの物質の関係を検討する目的で、合成のPAFをマウスに投与してEPF活性の発現を得たとの報告があり、家兎の系でこれを確認する動物実験を行った。合成のPAF 15 $\mu$ gを家兎の耳静脈よりゆつくり注入し、経時的に血中EPF活性を測定すると注入後わずか30分で活性出現を認めた。また、卵巣・卵管を手術的に摘除した家兎では、注入後の4時間以内にEPF活性

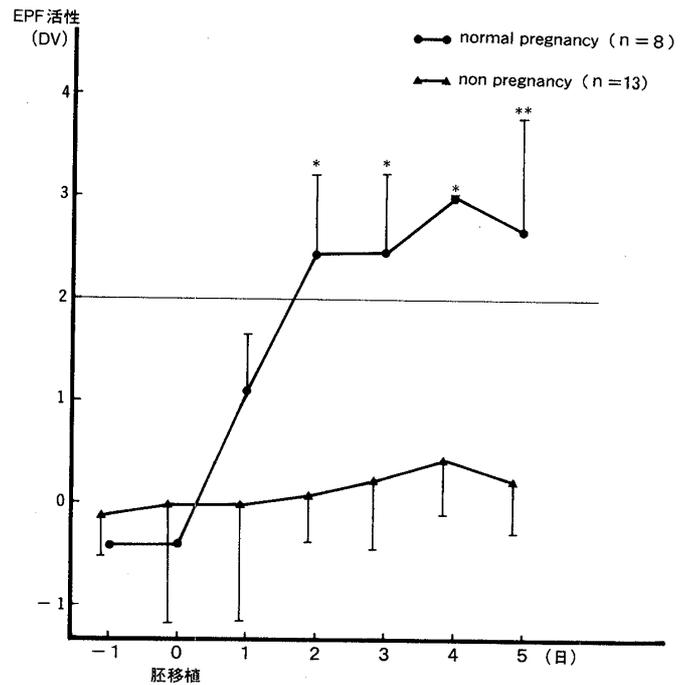


図9 体外受精-胚移植における血液中EPF活性の推移

を認めなかつた。さらに、卵巣・卵管の局所灌流の系で同様の実験をすると、注入後1時間から2時間でEPF活性は陽性域に亢進した。しかし、in vivoへの投与実験と比較して、その発現に時間を要した。このことより、胚由来のPAFがEPF産生の誘導物質の一つと考えられたが、このほかの詳細な発現機構の解明が必要である<sup>2)</sup>。PAFは、それ自体に白血球幼弱反応や、インターロイキン2産生を抑制する作用があることが報告されており、EPF産生を含め、相互に妊娠成立における免疫調節に関与している可能性を示唆した。

#### 3. EPFの臨床意義

ヒトにおけるEPF活性の発現は、他のホルモンの推移と異なり、受精後48時間以内に末梢血液中出现し、その後着床期頃から一時的に活性の低下を認めることがあるが、再度亢進を示し、その活性はsecond trimesterの終わりまで維持された。

このヒトEPFの出現機転を検討するために、体外受精-胚移植による血液中EPF活性の変化を検索した。この結果を図9に示すが、胚移植は採卵後44時間で行い、妊娠成立例では、胚移植後2日経過した時点で陽性域に到達し、一方妊娠不成立例ではEPF活性の一時的な上昇例を認めたが、少なくとも胚移植2日後には陰性となつた。体外受精において胚の存在が体

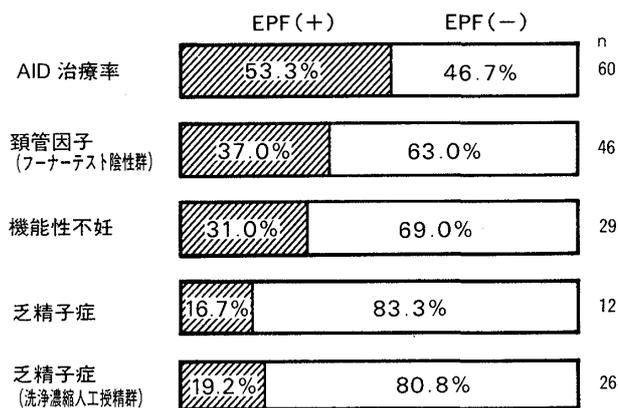


図10 人工授精患者における不妊因子別 EPF 活性の出現率

内に存在しない時点では、EPF 活性は検出されず、体内に戻されてから活性を血液中に認めるまでに約2日を要した。さらに胚の位置が卵管内ではなく子宮内でも活性の亢進を認めたことになるが、その発現は受精後4日を経過していた<sup>9)</sup>。

ヒトの EPF は、受精により出現し、胚の予後を反映することから、妊娠成立における環境因子の評価に極めて有効と考えられた。そこで人工授精患者における不妊因子別 EPF 活性の出現率を検討すると、授精前を対照に、授精後3, 5, 7日目に採血し、EPF 活性の一度でも陽性を示した例を集計し、その不妊原因によつて分類した結果を図10に示す。明らかな不妊原因を有さない非配偶者間人工授精(AID)例で55.3%に活性を認め、正常の受精環境における授精周期ごとの体内受精効率は、50%以上である可能性を示唆した。これに対し、頸管因子、機能性不妊、乏精子症例ではこの順に効率の低下を示し、妊娠成立のための環境因子としての改善を図る必要を指摘できる。より高度の乏精子症に対し実施した洗浄濃縮人工授精例では、通常的人工授精よりもむしろやや高い EPF 出現率を示し、環境因子の整備、すなわち治療が妊娠成立のために重要であり、いまだ明確ではないが EPF の関与の可能性が示唆され、その解明が望まれるところである。さらに男性因子に限定して、妊孕係数に対する人工授精患者の EPF 出現率の関係をみると、妊孕係数の高さに順じて EPF 活性も高率に出現した。

#### 総括

受精後超早期に発現する EPF が実在することを明らかにし、EPF の完全精製および分子構造の決定に成功した。この結果、EPF は分子量24~30KDの糖タンパクで、その一次構造の N-末端アミノ酸配列上、ヒト

EGF 前駆体の部分構造と強い相同性を認めた。この発見は、卵子成熟、胚および着床環境に対し、EPF の成長発育因子としての関与を示唆し、妊娠成立機構の分子生物学的解明に一灯を点じたものといえよう。また、われわれの精製した EPF はこれまでに thioredoxin 相同タンパクとして報告された胎盤由来の精製物質とは、生化学的にも、免疫的にも全く異なる物質であることを証明した。

EPF の発現機構の検索から、EPF は胚の存在下において卵巣・卵管循環中に出現し、前核期胚の際に最も急速に産生され、局所循環では受精後3時間以内に検出された。この EPF の急速な発現メカニズムに関与する物質の一つとして、初期胚由来の PAF が示唆され、卵巣・卵管での EPF 発現を誘導し、他の因子と相互的で、密接かつ複雑な関与によつて EPF 活性が生じるという新たな発現機序を示唆した。そして受精に関与する環境因子の臨床的分析を EPF 活性発現と不妊因子との関係から検討することが可能であり、EPF が胚発生から初期妊娠時までにこの環境因子と深く関わり、その改善が妊娠成立に極めて重要であることを示唆した。

#### 謝辞

研究発表の機会を与えて下さつた高見澤裕吉会長ならびに会員各位、また座長の労をおとり戴いた森 崇英教授、廣井正彦教授に謹んで謝意を表します。また野澤志朗慶應義塾大学教授の懇篤な御指導に深く感謝申し上げますとともに、永年に亘り御指導戴きました飯塚理八名誉教授に深謝申し上げます。本研究を遂行するうえで御指導賜つた慶應義塾大学病理学教室の秦 順一教授、山崎一人博士、同微生物学教室の多田隈卓史助教授、小高千加子博士、Johns Hopkins 大学の Wallach 教授、京都大学農学部の入谷 明教授、細井美彦博士、永年御協力戴いた明治製菓株式会社の村上博志、真壁 博、馬場 淳、草間 健の各氏、また味の素株式会社の平川 忠、三井 彰の各氏に感謝いたします。

#### 文献

1. Morton H, Hegh V, Clunie GJA. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test. *Nature* 1974; 249: 459-460
2. Sueoka K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. Platelet activating factor-induced early pregnancy factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduct. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 1580-1584
3. Sueoka K, Kusama T, Baba J, Wallach EE, Iizuka R. Biochemical consideration of human early pregnancy factor (EPF). *Prog Clin Biol*

- Res 1989 ; 294 : 317—329
4. *Mehta AR, Eessalu TE, Aggarwal BB.* Purification and characterization of early pregnancy factor from human pregnancy sera. *J Biol Chem* 1989 ; 246 : 2266—2271
  5. 末岡 浩, 黒田優佳子, 小林淳一, 中野真佐男, 森定 優, 小林俊文, 野澤志朗, 飯塚理八, 多田隈卓史. Early pregnancy factor の精製過程における疎水性クロマトグラフィーの有用性について. *日受精着床誌* 1991 ; 8 : 273—275
  6. *Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku L, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R.* Human epidermal growth factor precursor : cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucl Acid Res* 1986 ; 14 : 8427—8446
  7. *Clarke FM, Orozco C, Perkins AV, Cock I, Tonissen KF, Robins AJ, Wells JRE.* Identification of molecules involved in the early pregnancy factor phenomenon. *J Reprod Fertil* 1991 ; 93 : 525—539
  8. *Sueoka K, Dharmarajan AM, Michael E, Atlas SJ, Wallach EE.* Detection of early pregnancy factor (EPF) using the rabbit ovary and oviduct perfused in vitro. *J Reprod Fertil* 1988 ; 84 : 325—331
  9. 伊藤仁彦. Early pregnancy factor の産生機序と不妊症診断への応用に関する研究. *日不妊誌* 1989 ; 34 : 31—36
  10. *Sueoka K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE.* In-vivo and in vitro determination of components of rabbit early pregnancy factors. *J Reprod Fertil* 1989 ; 87 : 47—53

### Synopsis

The human early pregnancy factor (EPF) has been solidly isolated under the conditions without losing its rosette inhibition activity. The activity fraction has been purified as a glycoprotein with 24—30KD molecular weight. The peptide structure was determined in 16 amino acid sequences from N-terminal which was demonstrated to have a strong homology with a part of human epidermal growth factor precursor. This molecule has been identified from the thioredoxin homologous peptide originated from human placenta which has been recently reported as a EPF molecule by Clarke et al.

The rabbit in vitro-perfusion experiments have been performed to elucidate the expression mechanisms of EPF activity. EPF has been first detected within 3 hours after fertilization in the local circulation of ovary and oviduct contained embryos. Although the embryo-derived platelet activating factor (PAF) has been known as another preimplantation factor, the exposure of synthetic PAF induced EPF activity. Many other factors should implicate to express the activity and biofunction of EPF. The data of EPF activity on the human in vitro fertilization and artificial insemination cases suggested that it demonstrated the conceptive circumstances and that EPF might be implicated in some regulations for the pregnancy establishment.