Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 47, No. 1, pp. 1—6, 1995 (平7, 1月)

卵巣過剰刺激症候群における血栓形成機序に関する基礎的検討

秋田大学医学部産科婦人科学教室（主任：田中俊誠教授）
軽 部 裕 子

A Study on the Mechanism of Thrombosis in Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS)

Hiroko KARUBE
Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita
(Director : Prof. Toshinobu Tanaka)

概要 外因系凝固系路の起点となる組織因子活性 (procoagulant activity, 以下 PCA とする) が卵巣過剰刺激症候群 (以下 OHSS とする) における血栓形成機序に関与するか否かを明らかにすることを本研究の目的とした. OHSS 患者血清およびコントロール血清 (卵胞期婦人) による PCA は, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の表面上に発現した組織因子量として定量した. また, 血清中に含まれる PCA 発現作用を有する物質の部分精製を行い, その性質を検討した.

(1) OHSS 患者の血清は, 卵胞期婦人の血清より有意に ($p<0.01$) 高い PCA 発現作用を示した. また, 臍帯血清には, OHSS 患者血清より高い PCA 発現作用が存在した.

(2) OHSS 患者血清中の estradiol (以下 E_2 とする) および progesterone (以下 P_4 とする) 濃度と PCA の間には相関関係は認められなかった.

(3) 血清中の PCA 発現因子は熱不安定性で, ヘパリン親和性を有する分子量100,000前後の物質であることが予想された.

以上の成績から, (1) PCA は OHSS 患者の血栓形成機序に関与していること, (2) 血清の PCA 発現作用には E_2 および P_4 は関係していないことを明らかにした.

Synopsis The purpose of this study was to investigate whether endothelial cell procoagulant activity (PCA), which triggers the extrinsic coagulation pathway, is involved in thrombosis in patients with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). PCA in OHSS sera was measured by an activation of tissue factor expression on cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The substance responsible for the expression of PCA in sera was partially purified and characterized. The results obtained were as follows. (1) OHSS sera contained significantly ($p<0.05$) higher PCA than in controlled women (during the follicular phase). Fetal cord sera contained very strong PCA. (2) There was no correlation between PCA and the level of either estradiol (E_2) or progesterone (P_4) in OHSS sera. (3) The substance that expresses PCA in fetal cord sera was heat-labile with high affinity for heparin sulfate and had a molecular weight of approximately 100,000. These results support these conclusion : (1) PCA is involved in thrombosis in patients with OHSS and (2) neither the serum level of E_2 nor that of P_4 is associated with PCA.

Key words : Ovarian hyperstimulation syndrome・Tissue factor・Human umbilical vein endothelial cells・Procoagulant activity

緒 言

近年, 不妊症治療において, ゴナドトロピン療法による排卵誘発は, 重症無排卵症のみならず体外受精の採卵の目的のためにも汎用されている. しかし, その強力な卵巣刺激作用のために多胎妊娠や卵巣過剰刺激症候群 (以下 OHSS とする) の発生が問題とされている. OHSS においては, 過剰に刺激された卵巣からの estradiol (以下 E_2 とする) の分泌が亢進し, 卵巣腫大, 腹水の貯留といった症状を呈する. さらに, 血管内脱水に基づ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

く血液粘稠度上昇による血栓形成傾向が高まり，突発性血栓症が惹起される[1)2)]との報告も散見される．血栓症が発症するには血管内皮細胞の障害とそれに基づく外因系凝固系路の作動が必要であると思われるが，その発症メカニズムはいまだ明らかにされてはいない．

血管内皮細胞は正常な状態では，ほとんど外因系凝固系路の起点となる組織因子活性(procoagulant activity，以下PCAとする）を有していない．しかし，血管内皮細胞はエンドトキシン（lipopolysaccharide，以下LPSとする）[3)]，interleukin-1β[4)]，tumor necrosis factorα[5)]などの刺激に応じてRNA合成を介してアポ蛋白を合成し，血管内凝固に関与することが知られている．

本研究においては，PCAのOHSSにおける血栓形成機序への関与を明らかにすることを目的とした．OHSS患者血清およびコントロール血清（卵胞期婦人）によるPCAは，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells，以下HUVECとする）表面上に発現した組織因子（tissue factor，以下TFとする）量として定量した．また，血清中に含まれるPCA発現作用を有する物質の部分精製を行い，その性質を検討した．

研究方法

1．血管内皮細胞培養とPCA測定法

1）血管内皮細胞培養

臍帯は，正期産の妊婦から娩出されたものを用い，分離培養は，Jaffe et al.[6)]の方法に従った．培養液はM199（Earle's salts，Gibco）を基本培地として，10%牛胎仔血清（Hyclone），10%Nu-serum（Collaborative Research，Inc.），100μg/mlストレプトマイシン（Sigma），100unit/mlペニシリンG(Sigma)を添加したものを用いた．今回の実験には3継代目までの細胞を使用した．

2）HUVEC表面PCA測定法（図1）

PCAは大山[7)]の方法に準じて測定した．すなわち，2.5×10^4/mlに調整した細胞浮遊液を24ウェルコラーゲンプレートに500μlずつ分注し，各ウェルがコンフルエントになった状態で実験に使用した．1μg/ml LPS加M199 500μl/ウェルに

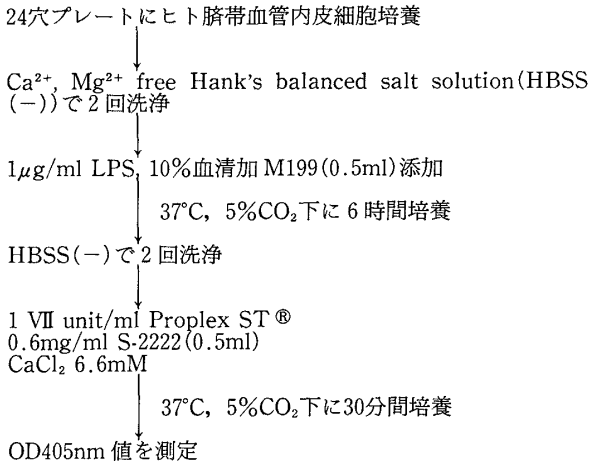


図1　組織因子活性(Procoagulant activity)測定法（文献[7)]より引用）

10%各種ヒト血清を添加し37°C，5%CO_2下で6時間培養した．その後，Ca^{2+}，Mg^{2+} free Hank's balanced salt solution（pH 7.4）（以下，HBSS（−）とする）でHUVECを2回洗浄し，PCAを以下のような方法で測定した．すなわち，第VII，第X因子を含む凝固因子製剤Proplex ST®（Baxter）を第VII因子に換算して1unit/mlと$CaCl_2$ 6.6mMおよび，合成基質S-2222（Kabi）0.6mg/mlを含むassay buffer（HEPES 20mM，NaCl 0.15M（pH 7.4））を500μl/ウェル添加し，37°C，30分間加温後，OD405nm値を吸光度計（DU-68，Beckman）で測定した．検量線は，Thromborel S®（ヒト胎盤抽出トロンボプラスチン，ヘキストジャパン）の希釈系列を用いて作製し，OD405nm値をトロンボプラスチン濃度に換算して，定量した．実験はtriplicateで行い，平均値と標準偏差(SD)を求めた．有意差はStudent's T testを用いて検定した．

2．PCAに対する血清濃度の影響

PCAに対する血清の影響を検討するために，最終濃度が0，0.5，1，2，5，10，15，20%となるようにヒト臍帯血清を加え，PCAを測定した．

3．OHSS患者血清添加によるPCA

1）対象，検体採取

1991年7月から1992年10月までに当科に入院した，WHO分類grade IIIの重症OHSS患者13名（平均年齢32.2±3.2歳）を対象とした．採血は発

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

症時，および発症時から1～3日ごとと軽快時に行った．なお，月経周期中，比較的E_2濃度が低い卵胞期初期に，成人健常女性7名(平均年齢30.9±4.1歳，E_2濃度83.8±49.9pg/ml，P_4濃度0.86±0.56ng/ml)から得た血清をプールし，コントロールとして使用した．OHSS患者血清によるPCAは，10%コントロール血清によるPCAの平均値を100%とする%PCAで表現した．

2）血清中のE_2，P_4濃度の測定

E_2はDPCエストラジオールキット（日本DPCコーポレーション)を用いたRIA法で，P_4はエルモテック—プロゲステロン（持田製薬）を用いたELISA法により測定した．

4．E_2添加前培養によるPCAの変化

HUVECに最終濃度が10^{-11}～10^{-7}Mとなるように17β-E_2（Sigma）を加え，37°C，5%CO_2下に48時間前培養した．HBSS(－)で2回洗浄後，10%臍帯血清を添加し，PCAを測定した．また，E_2がHUVECに対し細胞障害性に働くか否かを確認するために，前培養を行わずに直接10^{-11}～10^{-7}MのE_2を添加し，PCAを測定した．

5．PCA発現因子の部分精製

1）血清の加熱前処理によるPCAの変化

HUVECに40～60°Cで30分間加熱処理した10%臍帯血清，OHSS患者血清もしくはコントロール血清を添加し，PCAを測定した．

2）臍帯血清中PCA発現因子の部分精製

以下に述べる方法でカラムクロマトグラフィーを行い，それぞれのフラクションをCa^{2+}，Mg^{2+} free phosphate buffered saline（pH 7.4）（以下，PBS（－）とする）で透析後，10%の各溶液で刺激し，PCAを測定した．

(1) Blue sepharose CL-6B chromatography

臍帯血清12ml（蛋白濃度70mg/ml）を，50mM Tris-HCl (pH 7.0) で平衡化された3.2×10cmのBlue sepharose CL-6Bカラム（Pharmacia Fine Chemical）に添加し，1.5M KCl Tris-HCl（pH 7.0）で溶出した．

(2) Sephadex G-100 chromatography

臍帯血清3ml(蛋白濃度2.1mg/ml)を，PBS(－)(pH7.2)で平衡化された1.0×50cmのSephadex G-100カラム（Pharmacia Fine Chemical）に添加しgel filtrationを施行した．

(3) Heparin sepharose chromatography

結合した蛋白を0.3M KClおよび1.5M KCl 50 mM Tris-HClによりstepwiseに溶出し，同時にアルブミンを除去した．溶出された分画25ml（蛋白濃度0.9mg/ml）をPBS（－）で平衡化された1.2×5cmのHeparin sepharoseカラム（Pharmacia Fine Chemical）に供し，0～0.9M NaClのlinear gradient法により溶出した．

研究成績

1．PCAに対する血清濃度の影響

LPS刺激によるPCAは，図，表には示してはいないが10%の臍帯血清添加で最大活性を示した．PCA発現を示す臍帯血清の最低濃度は1%であった．

2．OHSS患者の血清添加によるPCA（図2）

OHSS発症時の患者血清添加によるPCAは121.0±24.3%と高値を示し，症状軽快時には101.5±12.0%と，有意な(発症時vs軽快時；$p<0.02$，増悪時vs軽快時；$p<0.01$)低下を認めた．なお，10%臍帯血清添加によるPCAは150.9±18.2%と高値を示した．

3．OHSS患者血清添加によるPCAとE_2，P_4濃度との関係（図3）

OHSS患者血清添加によるPCAと患者血清中

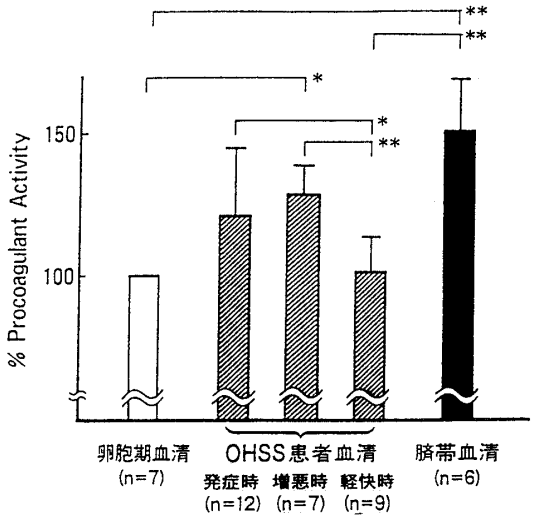
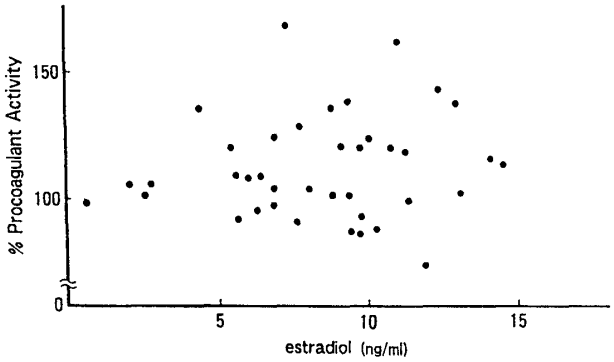


図2　各種血清添加による血管内皮表面PCAの発現
＊ $p<0.05$，＊＊ $p<0.01$（mean±SD）

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology



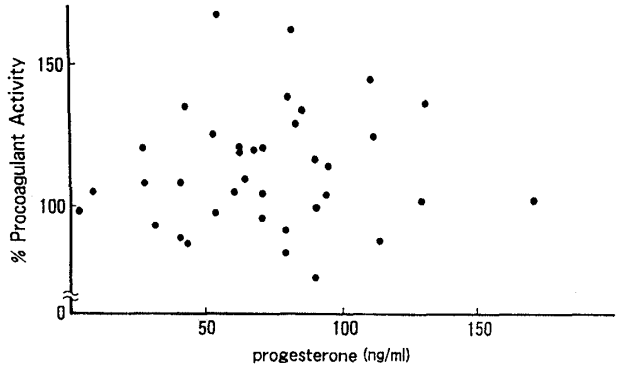


図3　OHSS患者血清添加による血管内皮表面PCAと血清中estradiol，progesterone濃度

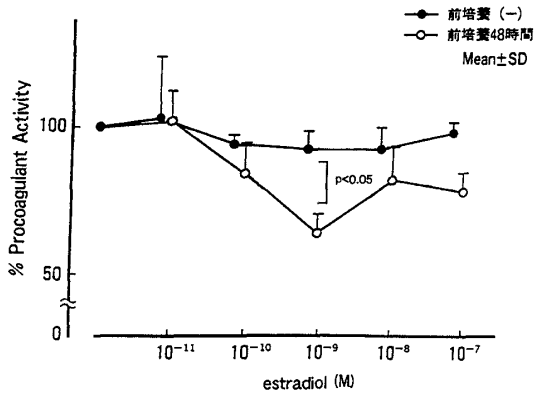


図4　estradiol添加前培養による血管内皮表面PCAの発現

のE_2，P_4濃度との間には相関は認められなかった．

4．E_2添加前培養によるPCAの変化（図4）

前培養をしなかった場合は，10^{-11}〜10^{-7}MのE_2添加ではPCAに影響を与えなかった．E_2添加前培養48時間後のPCAは，前培養をしなかった場合と比較して10^{-9}MでPCAの有意な（$p<0.05$）低下を認めた．

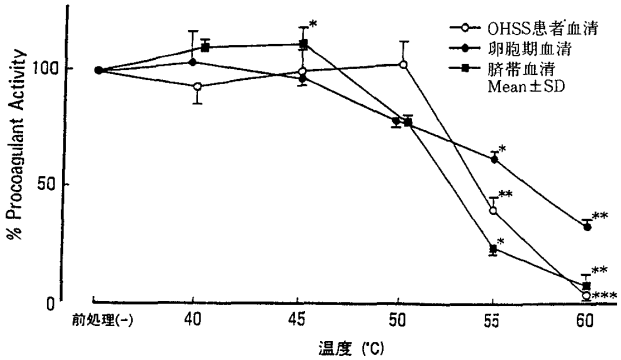


図5　血清加熱前処理によるPCAの変化
＊ $p<0.02$，＊＊ $p<0.01$，＊＊＊ $p<0.001$ vs 血清加熱前処理（−）群

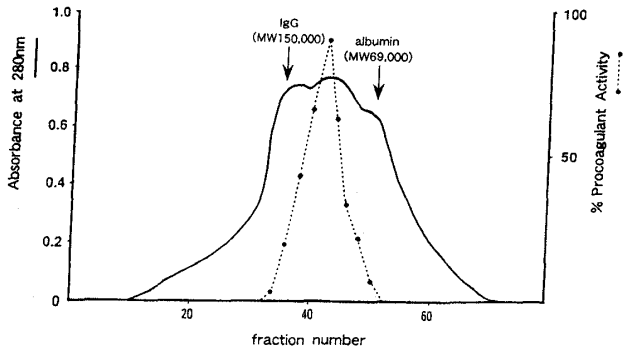


図6　Sephadex G-100 chromatography

5．血清加熱前処理によるPCAの変化（図5）

45℃までの加熱処理血清はPCAに有意な影響を与えなかったが，45℃以上の高温処理ではOHSS患者，卵胞期，臍帯のいずれの血清においても温度依存性にPCAが低下した．

6．部分精製

Blue sepharose CL-6Bカラムの非吸着分画の添加ではPCAの発現は認められず，溶出分画添加により発現が認められた．Sephadex G-100カラムではIgGとアルブミンとの間の分画にPCA発現作用が認められた（図6）．このことから，血清中のPCA発現因子の分子量は100,000前後であることが推察された．Heparin sepharoseカラムでは，非吸着分画添加によるPCA発現は認められず，0.5M NaCl前後で溶出されるフラクション24，25，26にPCA発現作用が認められた（図7）．これにより，目的の物質はヘパリン親和性を有するものと考えられた．

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

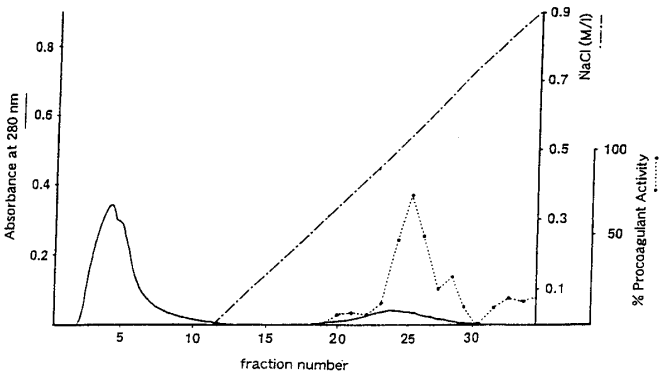


図7　Heparin sepharose chromatography

考　察

TFは263個のアミノ酸からなるアポ蛋白で，リン脂質複合体を形成することにより，第VII因子のレセプターとして機能し，外因性凝固系路開始機構に関与することが知られている[8]．脳，肺，胎盤，腫瘍組織などには常時存在し，組織損傷により，血液と接触すると外因系凝固系路を動かし止血機構を営む．一方，血管内皮細胞や線維芽細胞，血管平滑筋細胞では正常な状態ではほとんどTF活性を有しないが，エンドトキシンなどによる刺激に応じてRNA合成を介してアポ蛋白を合成し，これが細胞のリン脂質二重層と結合することにより，活性を発現することが知られている[9]．

従来，血栓形成機序としては内皮細胞が障害を受けて剥離脱落し，連続性が欠如して内皮下組織が直接血液に接触することにより，血栓が形成されると考えられていた．しかし，マウスにトロンビンを投与すると，電顕的に内皮細胞の形態的変化がみられない微小血管内にもフィブリン血栓が見出されたという報告[10]があり，また培養血管内皮細胞をエンドトキシンで刺激すると，第VII, IX, VIII, X, II, I因子の存在下でフィブリンが形成されることが電顕的に証明された[11]．これらの報告から，血管内皮細胞の障害を伴わなくとも，内皮細胞の機能的変化により外因系凝固系路が細胞膜上で進行している可能性が示唆された．

血管・凝固系に作用する物質の一つとしてエストロゲンがあげられるが，動脈硬化や冠動脈疾患が閉経前の女性には少ないことから，エストロゲンは動脈硬化抑制作用を有すると考えられている[12]．しかし，一方ではエストロゲン製剤を服用している女性に血栓症が多いことも知られており，エストロゲンのこれらの相反するような作用についていまだ解明されていない点も多い．筆者は，臨床的に高エストロゲン・高プロゲステロン血症をきたし，血栓症の報告も散見されるOHSSに着目し，OHSS患者血清がPCA発現に与える影響について検討を行った．その結果，OHSS患者血清添加によるPCAは発症時に高値を示し，軽快時には，正常レベルに低下することが示された．しかし，PCAと血清中のE_2, P_4濃度の間には全く相関が認められなかった．また，in vitroでの添加実験からもE_2，P_4濃度がPCA発現に関与している可能性は低く，血清中にはE_2，P_4以外のPCA発現因子が含まれていると考えられた．

そこで，この物質が如何なる性質のものであるかについて，次に検討を加えた．血清を加熱処理すると温度依存性に有意にPCAが低下することから，本物質は熱不安定な蛋白の一種と推察された．また，本実験系において添加する血清の種類によりPCA発現に差異がみられ，成人血清よりも臍帯血清が有意にPCA発現を促進することが確認された．そこで，臍帯血清を用いてPCA発現因子の分離を試みた．その結果，分子量100,000前後でヘパリン親和性を有する物質であることが判明した．この分画についてさらに分離を試みたが，サンプルの凍結融解を繰り返すことにより失活しやすく，カラム操作で溶液が希釈されると，本実験の測定系ではPCAを検出することが困難であったことから分離することはできなかった．

臍帯血清が何故高いPCA活性を有しているかは不明である．臍帯血清は種々の成長因子を含んでおり，成長因子がPCA発現に関与しているという報告も散見される．EGF (epidermal growth factor) およびTGF (transforming growth factor) β[13]は線維芽細胞を刺激してPCAを発現することが報告されている．OHSSにおいても卵巣から着床，胚の発育に関する各種の成長因子が多量に放出されることは推察される．しかし，成績は示していないが，EGF, TGFβのHUVECへの添加実験ではPCA発現は明確ではなく，成長因

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

子の関与は特定できなかった．

和田ら[14]は，血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)や播種性血管内凝固症候群（DIC）患者血漿をHUVECに添加培養すると，組織因子産生が亢進したと報告している．TTP患者血漿ではTNF，IL-1，IL-6，可溶性IL-2レセプターが上昇しており，高サイトカイン血症が血栓傾向に関与しているのではないかと述べている．また，Branch and Rodgers[15]は，抗リン脂質抗体症候群の患者血清をHUVECに添加培養すると健常人血清と比較して高い組織因子の発現がみられ，その発現は患者血清中のIgG分画に由来すると報告している．一般的に過凝固を呈する病態における患者血清はPCA活性を有すると考えられるが，その発現因子は一様ではないと思われる．OHSSにおいては，PCA発現因子の性質，分子量および病態からは，サイトカイン，IgG以外の因子が存在すると考えられた．

以上の研究より，OHSSの血栓形成において外因系凝固系路に関与する物質の性質の一端が明らかとなった．今後，この物質を同定してその動態を明らかにすることがOHSSの病態の解明および，血栓症の予防に役立つものと考えられた．

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました恩師真木正博名誉教授，田中俊誠教授に深甚なる謝意を捧げます．また，直接本研究に御指導，御鞭撻を頂きました児玉英也博士，福田淳博士，佐藤宏和博士，大山則昭博士に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の一部は第44回日本産科婦人科学会学術講演会において発表いたしました．

文　献

1. *Mozes M, Bogokowsky H, Antebi E, Lunenfeld B, Rabau E, Sen DM, David A, Salomy M.* Thromboembolic phenomena after ovarian stimulation with human gonadotropins. Lancet 1965; 11: 1213—1215
2. *Engel T, Jewelewicz R, Dyrenfurth I, Speroff L, Vande Wiele RL.* Ovarian hyperstimulation syndrome, Report of a case with notes on pathogenesis and treatment. Am J Obstet Gynecol 1972; 112: 1053—1060
3. *Collucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semeraro N.* Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. J Clin Invest 1983; 71: 1893—1896
4. *Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA.* Interleukin 1 (IL-1.) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. J Exp Med 1984; 160: 618—623
5. *Nawroth PP, Stern DM.* Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med 1986; 163: 740—745
6. *Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J Clin Invest 1973; 52: 2745—2756
7. **大山則昭．** 血管内皮細胞における組織因子発現と凝固抑制蛋白質calphobindinに関する基礎的研究．日産婦誌　1992; 44: 1119—1126
8. *Spicer EK, Horton R, Bloem L, Back R, Williams KR, Guha A, Klaus J, Lin TC, Nemerson Y, Konigsberg WH.* Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: Primary structure of the protein and cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5148—5152
9. **小林紀夫．** 血栓形成における組織トロンボプラスチンの役割に関する研究．日内会誌　1987; 76: 2—7
10. **畑中　薫，山本　章．** 血栓形成における血管周囲組織の関与．最新医学　1985; 40: 2062—2066
11. *Stern DM, Nawroth P, Handley D, Kisiel W.* An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 2523—2527
12. *Sporrong T, Mattsson LA, Samsioe G, Stigendal L, Hellgren M.* Haemostatic changes during continuous oestradiol-progestogen treatment of postmenopausal women. Br J Obstet Gynecol 1990; 97: 939—944
13. *Ranganathan G, Blatti SP, Subramaniam M, Fass DN, Maihle ME, Getz ME.* Cloning of murine tissue factor and regulation of gene expression by transforming growth factor type β1. J Biol Chem 1991; 266: 496—501
14. **和田英夫，南　信行，白川　茂．** TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）病態—各種の指標から—サイトカイン．日本臨床　1993; 51: 151—154
15. *Branch DW, Rodgers GM.* Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: A possible mechanism of thrombosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 206—210

（No. 7556　平6・9・16受付）

NII-Electronic Library Service