

周産期における各種体液中のSAAならびにCRPの 定量・定性解析と免疫生物学的意義

尾形正裕, 佐藤喜根子¹, 佐藤祥子¹, 山本藍子, 桂田かおり²,
佐藤公美², 清水ひとみ², 久光玲子², 和田厚文³

東北大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

¹東北大学医学部保健学科 看護学専攻

²東北大学医療技術短期大学部 専攻科助産学特別専攻

³栄研化学(株) 生物化学研究所

An Immunobiochemical Significance to Do Quantitative and Qualitative Analysis of Serum Amyloid A Protein (SAA), C-reactive Protein (CRP) Included in Various Body Fluid Obtained from Mother and Perinate on Perinatal Period

Masahiro OGATA, Kineko SATOH¹, Sachiko SATOH¹, Aiko YAMAMOTO,
Kaori KATSURADA², Tomomi SATOH², Hitomi SHIMIZU²,
Reiko HISAMITSU² and Atsufumi WADA³

Department of Medical Technology, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Tohoku University

¹*Department of Nursing, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Tohoku University*

²*Course of Maternity Nursing, College of Medical Sciences, Tohoku University*

³*Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical Co., Ltd*

Key words: Human whey serum amyloid A protein, C-reactive protein, Colostrum,
Western blotting, Umbilical cord blood

Serum amyloid A protein (SAA) and C-reactive protein (CRP) are one of the human plasma proteins that have been recognized as an important host defense molecule. It is reported that SAA is produced with the mammary gland which is an extrahepatic producing tissue in various mammals except human and being secreted into colostrum. We have previously made clear that CRP is included in human colostrum and also what an automated commercially available latex-enhanced assay is effective to explore SAA in human colostrum and to measure its concentration. Consequently, the immunobiological significance of SAA and CRP contained in human colostrum has been of major concern. In this study, we examined to measure of these concentration by the high sensitive assay and to investigate the molecular attributes by western blotting.

SAA was contained in the all of breast milk obtained from seventeen cases available. The mean concentration of SAA included in the breast milk increased from $0.135 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ of the childbirth day to $1.494 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$ in the observed puerperal period. There was a peak of the level of SAA

on the third puerperium day. It was in contrast with the level of the milk CRP having reached a peak on the second puerperium day, and both levels of the blood SAA and CRP having become a peak on the first puerperium day. The molecular weight of SAA included in breast milk was 12 kDa the same as maternal blood, but CRP had a difference among the two materials in contrast with SAA. As for the molecular weight of CRP included in colostrum, different two molecules were observed. One was 23 kDa with a known molecule same as being included in the maternal blood, the other was larger in about 50 kDa. Though CRP had not been included in feces of infant after ablactation, the CRP molecules included in neonatal feces after lactation was molecular weight of 23 kDa the same as breast milk. Furthermore CRP was also contained in meconium, but the molecular weight was not identified.

This is the initial report that showed that SAA included in human breast milk is arrived in maximum on the third puerperium day, and showed that CRP have different molecular weight between maternal blood and colostrum whereas SAA don't have a difference. That SAA in mammary gland epithelial cells is induced by prolactin or lipopolysaccharide, that SAA increases intestinal mucin to provide a protective barrier and inhibits adhesion to the gut wall of enteropathogenic *Escherichia coli* has been recently reported by other researchers. When we consider them and evaluate this study, it is speculated that SAA and CRP which would be transferred from mother to a newborn infant through colostrum carry an important role to confer phylaxis ability on the newborn infant.

はじめに

母乳は多くの免疫関連成分を含み新生児の感染防御に深く関わっていることは周知の事柄である。C反応性蛋白(C-reactive protein, 以下CRP)、血清アミロイドA蛋白(serum amyloid protein A, 以下SAA)はともに急性相反応蛋白で、炎症マーカーとして広く知られている。

近年、CRPは単なる炎症マーカーとしての視点にとどまらない基礎的研究が展開されつつある¹⁾。そして、初乳にも比較的高濃度に含有されていることが判明し²⁾、その免疫生物学意義が注目される。一方、SAAは主に肝臓で産生されて炎症時に顕著に上昇すること、2次性アミロイドーシスにおいて沈着するアミロイドA蛋白の前駆体であることは広く知られている。CRPと同様に最近、上皮細胞などの肝外組織での産生³⁾と、ヒトを除く健常な哺乳動物の初乳への分泌⁴⁾などの報告をもとに新たな展開を期しつつある。しかし、その免疫生理機能の詳細については依然として不明な蛋白である。

我々は僅か2症例のみの測定とはいえヒトの初

乳中にもSAAが含まれることを見いだしたので⁵⁾、今回はさらに症例数を積み重ねるとともに、周産期の母体血、羊水、臍帯血、便などのSAAとCRPを定量と定性の両面から解析した。その結果、両者の動態および分子性状に関して興味ある知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 対象

検体採取は東北大学病院で行い、研究について理解し承諾を得られた妊産褥婦18例を対象とした。各症例より妊娠末期、分娩前後と退院時(産褥5日目)の母体血、羊水、臍帯血、胎便、分娩後から産褥5日目までの母乳、産褥期の母体便と哺乳後の新生児便を採取した。それらの各試料の調製法と保存法は既報^{2,5)}に従った。その概略は、母乳は採取した新鮮全乳を速やかに -30°C に凍結保存し、血液と羊水は低速遠心分離した血清または上清を、便はリン酸緩衝化生理的食塩液で溶解・抽出した上清を各々 -30°C に凍結保存した。各種試料は解凍後分析に供したが、母乳についてはSAAの解析用には全乳のままを、CRP解析用に

は 10,000 g で 10 分間遠心分離後の乳清を被検試料とした。

2. 分析方法

2-1. SAA, CRP 含有濃度の定量法

各種試料中の含有濃度は試薬として血清アミロイド A 蛋白測定用 LZ テスト‘栄研’ SAA, または LZ テスト‘栄研’ CRP-HG (いずれも栄研化学株式会社) と, 汎用自動分析装置として日立 7170S (日立製作所) を組み合わせた高感度測定用のラテックス凝集免疫比濁法 (Latex agglutination turbidimetric immunoassay, 以下 LATIA 法)⁵⁾ で定量した。SAA ならびに CRP の LATIA 法による検出限界はそれぞれ 0.08 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であるため, それ未満の微量濃度は自家製の酵素免疫測定法 (以下, ELISA 法)^{5,6)} を用いて定量した。

2-2. SAA, CRP 分子の定性的解析

各試料中の SAA と CRP の分子性状の解析はウエスタンブロット法でおこなった。電気泳動関連資材は, 既製のポリアクリルアミドゲル平板として‘パジェル・コンパクト’, 電気泳動装置に‘コンパクト PAGE’, セミドライ方式ウエスタンブロット装置に‘コンパクトブロット’, ブロットングメンブランとして PVDF からなる‘クリアブロット P 膜’ (いずれもアトー社) を用いた。蛋白試料の電気泳動は SDS 変性系の Laemmli 法および未変性系の Ornstein-Davis 法にそれぞれ準拠して型通り実施した。各試料の抗原蛋白濃度を約 1 $\mu\text{g/ml}$ を目安に調製し, ロード量は 0.01 $\mu\text{g/lane}$ 前後とした。分離蛋白の染色には CBB-R350 (Amersham Pharmacia Biotech 社, PhastGel™ BlueR) を使用した。SAA の同定には栄研化学 (株) 生物化学研究所にて作製されたウサギ抗ヒト SAA 抗体と抗ウサギ IgG-ペルオキシダーゼ標識二次抗体を, CRP の同定には市販のウサギ抗ヒト CRP 一次抗体, ブタ抗ウサギ IgG-ビオチン標識二次抗体 (F(ab')₂), ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (いずれも Dako Cytomation 社) を用いた。シグナルの検出はジアミノベンチジン (DAB) の発色による。CRP 標準品は市販のキャリブレーションの他, オリエ

ンタル酵母工業 (株) より恵与された recombinant CRP (以下, r-CRP) も用いた。分子量マーカーとして Ornstein-Davis 法用には「第一」・I を, Laemmli 法用には「第一」・III (いずれも第一化学薬品社) または着色マーカー (Amersham Pharmacia Biotech 社, RPN800) を使用した。

実験結果

1. 母体血中における SAA と CRP 濃度の経時的推移

母体血を比較的継続して採取することができた 7 例の血中の SAA と CRP の平均濃度の推移を図 1 に示す。また, 妊娠末期から分娩, 退院にいたる期間中, 毎日入手可能であった症例 (# 03-03) における血中動態を図 2 に示す。

母体血中の SAA および CRP は陣痛の開始に伴って上昇し, 分娩直後から産褥一日目に最も高くなり以後漸減するという, ほぼ類似の動態を示した。なお, SAA のマグニチュードが CRP よりも大であることが確認された (図 1)。

2. 母乳中における SAA, CRP の経時的推移

母乳を採取できた 17 例において, SAA が全例の母乳から検出され, 定量された。この全 17 例の

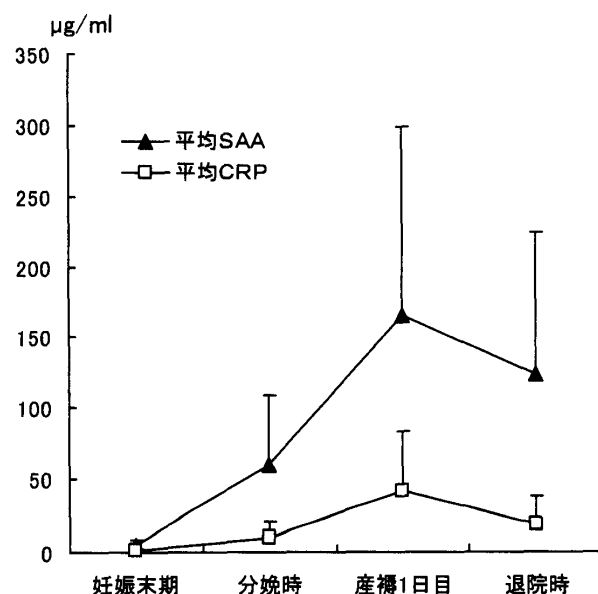


図 1. 母体血中における SAA, CRP の平均濃度の推移

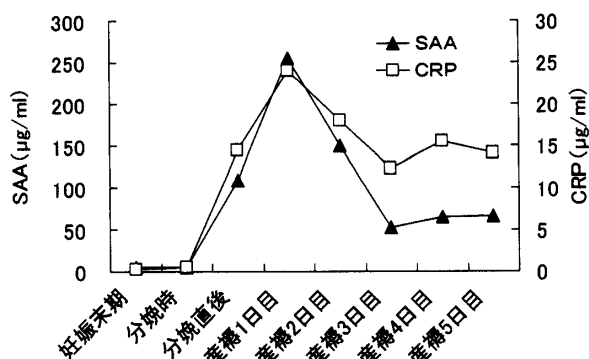


図2. 一症例におけるSAAとCRPの血中動態

SAAとCRPの平均濃度(µg/ml)の経時的推移を図3に示す。

母乳中SAAは、CRPのピークが産褥2日目であったのに対し、産褥3日目にピークがあった。個々の症例においてSAAは産褥後3~5日と遅れる傾向がみられた。

3. 羊水・臍帯血・胎便のSAA, CRP含有濃度

羊水, 臍帯血, 胎便のSAAとCRPの平均含有濃度をそれぞれ図4に示す。羊水(n=11)ではSAAが 0.52 ± 0.70 µg/ml, CRPが 0.37 ± 0.30 µg/ml, 臍帯血(n=14)ではそれぞれ 7.81 ± 6.72 µg/ml, 0.48 ± 0.24 µg/mlであった。胎便(n=9)ではSAAが 0.02 ± 0.01 µg/mlであったのに対して, CRPは 0.44 ± 0.18 µg/mlであった。臍帯血で

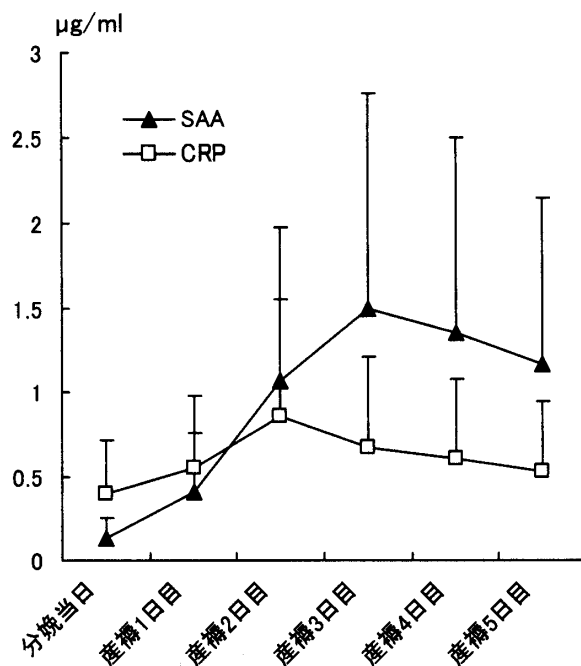


図3. 母乳中におけるSAAとCRPの平均濃度の推移

はSAA, 胎便ではCRPの濃度がより高く, 両者において有意な含有濃度の差(臍帯血; $p < 0.05$, 胎便; $p < 0.01$)がみられた。

4. 一症例における各種試料中SAAとCRPの全動態

全試料を採取できた症例における各試料中の

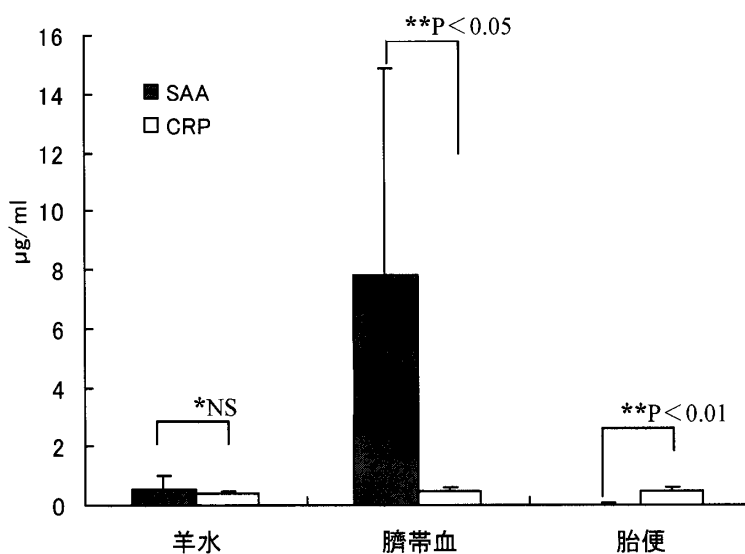


図4. 羊水, 臍帯血, 胎便の含有濃度

SAA と CRP の濃度を図 5 に示す。この症例 (#03-03) が、妊娠末期および分娩時から入院期間中の連日、母体血を入手可能であったことは前述した。母体血中の SAA および CRP は陣痛の開始とともに上昇し、分娩直後から産褥一日目に最も高くなり以後漸減した。

母乳中濃度の推移は CRP が産褥 3 日目、SAA が産褥 3 日目に急増しさらに 5 日目へかけて増加した。

羊水では SAA と対照的に CRP は殆ど含有を見ず、臍帯血中 CRP も SAA の 1/10 以下とごく微量であった。逆に胎便には CRP と対照的に SAA は殆ど含まれないなどこれらの試料中における両者の含有量には乖離がみられた。なお、産褥 3 日と 5 日に得られた母体便には SAA がそれぞれ 0.64, 0.31 $\mu\text{g/ml}$ 含まれ、CRP は検出限界未満であった。

5. 各種試料中 SAA のウェスタンブロッティング解析

各種試料中の SAA の分子性状を解析した成績

を図 6 に示す。

母体血中と母乳中の SAA は分子量 12 kDa の蛋白が免疫染色され、母乳中 SAA は既知の血中 SAA と同一の分子量であった。

臍帯血においては母体血中と同一分子量のものと、約 9 kDa のより低分子量の SAA が検出された。

6. 各種試料中 CRP のウェスタンブロッティング解析

CRP についての解析結果を図 7 に示す。母体血では 23 kDa のバンドが CRP であると同定された。

母乳では 23 kDa のバンドと約 50 kDa 前後のより高分子のバンドも免疫染色された。これに対して臍帯血では約 12 kDa とより低分子の他の試料には見られないバンドが検出され、母乳と臍帯血には母体血中の CRP とは異なる分子形状のものが存在した。

なお、哺乳後の新生児便では 23 kDa の CRP が同定された。

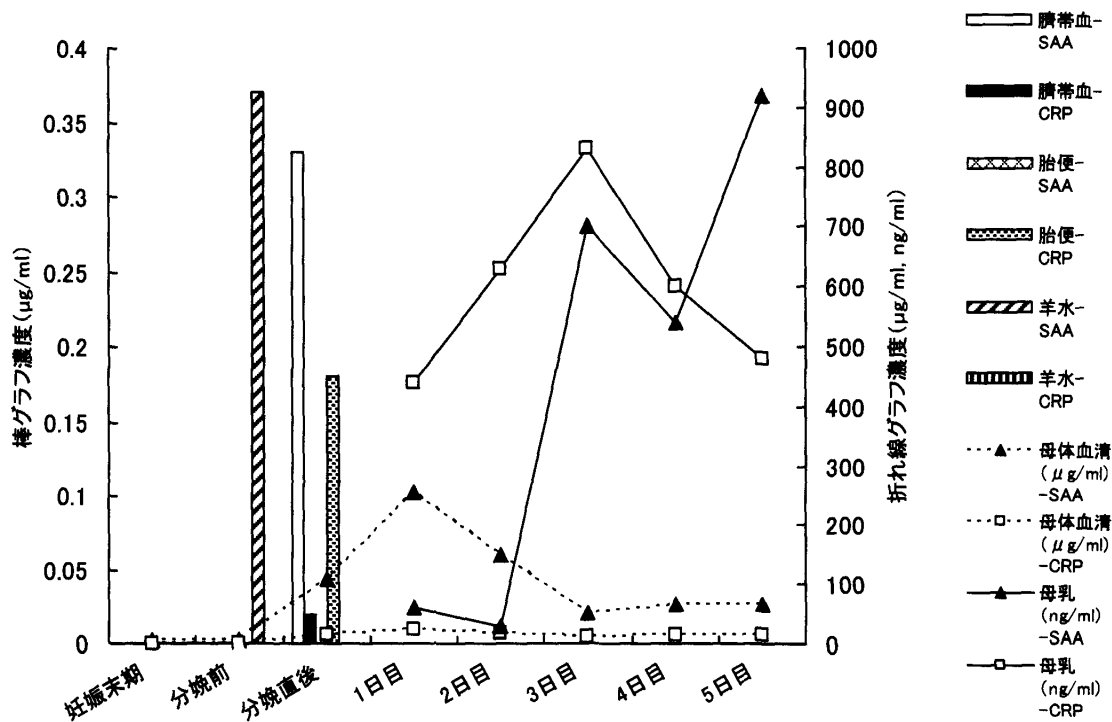


図 5. 周産期における各種試料中の SAA と CRP の濃度とその動態

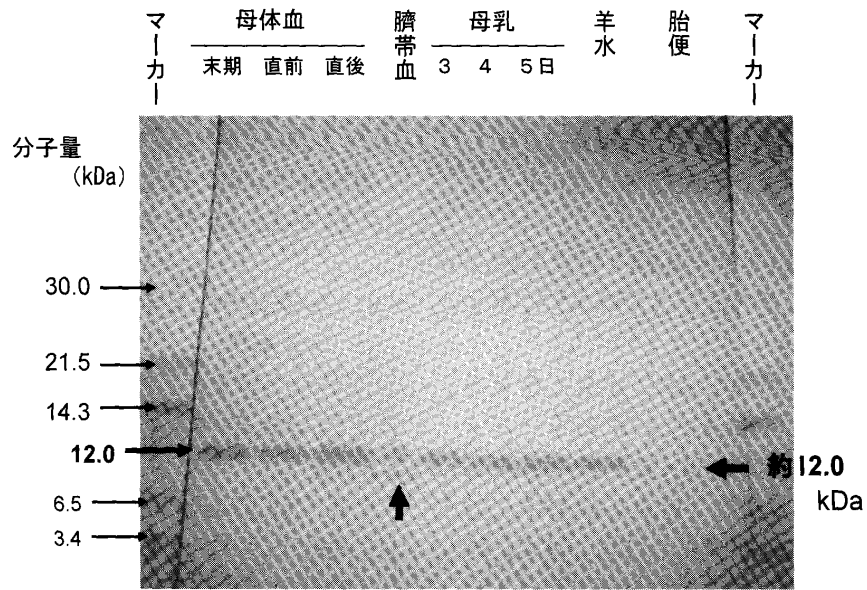


図6. 母乳, 臍帯血などにおける SAA の分子量

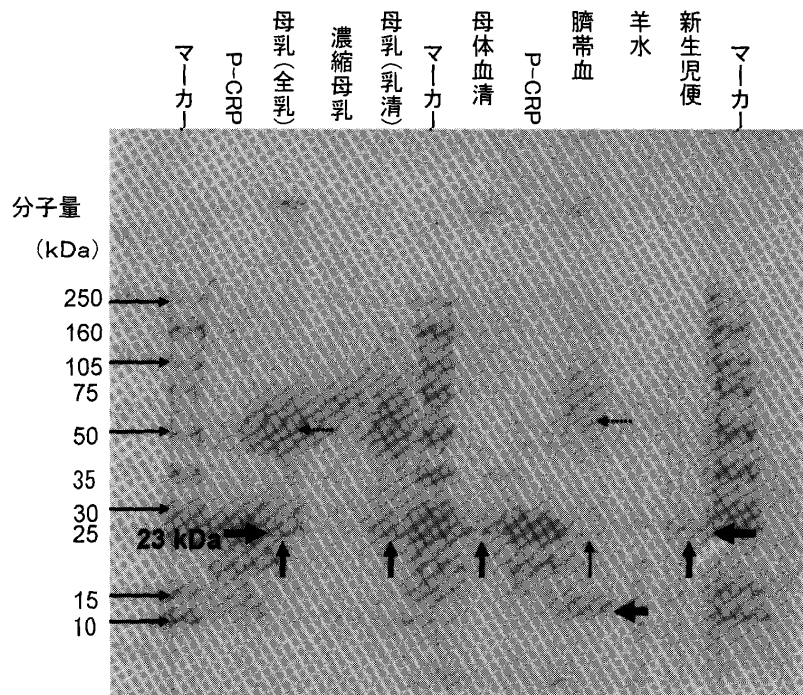


図7. 各種試料に含まれる CRP の western blotting による分子性状の解析

考 察

CRP は分子量 23 kDa のポリペプチドが5つ会合した5量体で, pentraxin family に属する蛋

白である⁷⁾。CRP は急性相反応蛋白であり, CRP の測定は高感度定量法の導入を契機に, 近年, 新生児感染症などの急性炎症にとどまらず動脈硬化などの血管炎症の病態診断に新たな有用性が知ら

れている⁸⁾。CRP の生理活性に関する研究においても、トランジェニックマウスを用いた解析などから生体防御上の抗感染・抗炎症の両面を担う分子として新たな位置づけがなされている¹⁹⁾。

一方、SAA の分子量は 12 kDa で CRP よりも低分子な蛋白であることが知られている。アミロイド A 蛋白の前駆体として血中に見いだされた SAA は急性相反応蛋白の一種であり、刺激に対する反応性の速いことや血中の増減幅が大きいことから炎症マーカーとして臨床面からも注目され CRP との相違が検討されてきた¹⁰⁾。そしてウイルス感染症や局所炎症、悪性腫瘍、移植拒絶などのマーカーとして臨床応用がなされていることは周知のことである。

SAA は遺伝子多型に基づくいくつかのアイソタイプからなる¹¹⁾。SAA1～SAA4 のうち、急性相反応蛋白として定量の対象となっているものは SAA1 と SAA2 で、市販の抗体も主としてこれらに対するポクローナル抗体が用いられている¹⁰⁾。SAA3 遺伝子は偽遺伝子と考えられていたが、近年、哺乳動物の乳腺組織などにおいてこの遺伝子の発現が証明され¹²⁾、肝外産生性 SAA の免疫生理機能をめぐる研究の口火が切られた。

今回、母乳中 SAA の検出を試みたところ 17 例の全例から SAA が定量され、雌牛の SAA3 が蛋白分子として発現し初乳に分泌されるのと同様⁴⁾、ヒトの母乳にも分泌されていることが確認された。その分子性状であるが、ポリクローナル抗 SAA 抗体を用いたウエスタンブロッティング解析によって、ヒト初乳中 SAA は既知の血中 SAA と同一の分子量 12 kDa からなる完全分子性状を有する SAA であることが初めて明らかとなった。

母乳中 SAA が母体血中と同一の分子性状を有し、CRP よりもかなり低分子であるために母体血中の SAA は CRP に比してより母乳中に移行しやすいと予測した。しかし、母乳中の SAA は CRP よりも遅れてピークに達し、また血中 SAA のピークよりも二日は遅れることが示された。母乳は、血液成分を主材料として乳腺から分泌されるが、S-IgA のみならず SAA3 は乳腺組織におけ

る独自の産生が報告されている^{4,12)}。これらのことから、SAA のピーク遅延の背景として母乳中 SAA は母体血から移行するものをベースに、新たに乳腺組織で産生される SAA の加算によることが考えられた。

母乳中の S-IgA 濃度は産褥 1 日目をピークとして、それ以降漸減することが知られている。母乳中 CRP については、既に明らかにしたように産褥 2～3 日目にピークを迎えるが²⁾、今回の研究によって SAA はそれよりも遅れてピークを迎えることが明らかとなった。したがって、母乳中の各種免疫関与物質はそれぞれの免疫生理活性を発揮する時期を異にすると考えられる。乳腺における SAA 遺伝子の発現にはプロラクチンの関与が示唆されており¹²⁾、乳腺由来 SAA の一部のペプチドによる腸管粘膜におけるムチンの発現¹³⁾と病原性大腸菌の腸管壁への付着阻害も報告されている¹⁴⁾。以上のことから、ヒト初乳に含有される 12 kDa からなる SAA はその免疫生理活性を他の因子と協働で、感染防御能を児へ賦与する重要な役割を担っているのではないかと推察する。

CRP に関しては、健常成人と離乳後の小児の便から検出されない CRP が哺乳中の新生児の便に含まれることから、母乳の経口摂取により児へ移行すると考えたが²⁾、今回の研究で新たに胎便中にも比較的高濃度に含まれていることが判明した。

CRP が体外から胎児へ移行する経路としては羊水、臍帯血が考えられる。羊水に関しては羊水中 CRP がほとんど含有を見ないことから、この経路による移行は否定的であろう。臍帯血に関しては一般に CRP は胎盤通過性がないとされているが¹⁵⁾、当時の CRP 定量法の感度が必ずしも高感度なものではなかった。今回の高感度定量法によって微量の CRP が含有されることが判明したものの、その濃度は母体血中の CRP よりもきわめて微量である。しかも臍帯血中と母体血中の CRP の分子性状が異なっていることから、母体血からの単純な経胎盤移行性は否定されると考えられる。これらのことから、非感染で正常な胎児の胎便や臍帯血中の CRP は羊水の経口摂取、母体か

らの経胎盤移行ではなく、分娩時のストレスなどに対する生体防御反応として胎児自身の肝臓によるCRPの産生が背景にあると考えられる。なお、哺乳中の新生児便のCRPが23 kDaと母乳中のCRPと同一の分子性状であった。このことは以前の研究において、母乳由来のCRPが経口摂取により児の消化管を経て新生児の便中へ排泄されるのではないかとした考え²⁾を支持する。なお、母体便へのSAAの排泄が確認されたが、分娩時のストレスによって肝臓で産生されて母体血中に高含有されたSAAは、半減期が55分⁹⁾と短いために便へ排泄されたと考えている。

胎便および羊水中CRPの分子性状については、シグナル検出をジアミノベンチジンの発色に依拠したため解析できなかった。今後、化学発光によるより高感度な方法で再検討し、胎児自身によるCRPの産生を裏づける必要がある。

結 論

今回の研究によって以下のことが明らかとなった。

1) 分子量12 kDaからなるSAAがヒト初乳中に含まれている。

2) SAAはCRP同様、分娩の侵襲により母体血中濃度が急上昇する。しかし、母乳中SAAは母体血から移行するのみならず乳腺組織に由来するものを含有する可能性がある。

3) 初乳中CRPには母体血中CRPと同一の23 kDaと、それとは異なり分子量50 kDa前後の会合体を示唆する分子形状のものも含有する。

4) 胎便はCRPを含有し、その由来は胎児自身の産生の可能性が推定される。また、臍帯血中のCRPは極微量であるのみならず、母体血、母乳とは異なる分子量約12 kDaの分子形状からなる。

以上のことから、初乳に含まれるCRPのみならずSAAの免疫生理活性の解明をさらに伸展させる必要がある。

文 献

1) Szalai, A.J., Agrawal, A., Greenhough, T.J.,

- Volanakis, J.E.: C-Reactive Protein; Structural biology and host defense function, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 265-270, 1999
- 2) 尾形正裕, 佐藤喜根子, 佐藤祥子, 高林俊文, 丸山暁子, 相川智美: ヒト初乳中免疫成分の解析(第3報), 母体由来のCRPは胎盤を介さず授乳により新生児へ賦与される, *日臨化東北会誌*, **12**, 18-22, 2003
- 3) Thorn, C.F., Lu, Z.Y., Whitehead, A.S.: Tissue-specific regulation of the human acute-phase serum amyloid A genes, SAA1 and SAA2, by glucocorticoids in hepatic and epithelial cells, *Eur. J. Immunol.*, **33**, 2630-2639, 2003
- 4) McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., Weber, A.: Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A (M-SAA3) into colostrum, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **83**, 203-211, 2001
- 5) 尾形正裕, 山本藍子, 佐藤喜根子, 佐藤祥子, 和田厚文: 臍帯血や胎便などに含まれる微量なCRP定量法の確立と血中SAA定量法による初乳中のSAA測定に関する検討, *東北医保健学科紀要*, **13**, 133-142, 2004
- 6) 和田厚文, 山田俊文, 伊藤喜久, 以東紘一: SAA(血清アミロイドA蛋白)の高感度測定法の確立とクリアランス測定への応用, *臨床病理*, **46**, 1252-1257, 1998
- 7) Volanakis, J.E.: Human C-Reactive Protein; expression, structure and function, *Mol. Immunol.*, **38**, 189-197, 2001
- 8) Kanda T.: C-Reactive Protein (CRP) in the Cardiovascular System, *Rinsho Byori*, **49**, 395-401, 2001
- 9) Mortensen, R.F.: C-Reactive Protein, inflammation, and innate immunity, *Immunol. Res.*, **24**, 163-176, 2001
- 10) Yamada, T.: Serum amyloid A (SAA); A concise review of biology, assay methods and clinical usefulness, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 381-388, 1999
- 11) Schreiber, B.M.: Serum amyloid A; in search of function, *Amyloid: J. Protein Folding Disord.*, **9**, 276-278, 2002
- 12) Larson, M.A., Wei, S.H., Weber, A., Weber, A.T., McDonald, T.L.: Induction of human

- mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 1030-1037, 2003
- 13) Mack, D.R., McDonald, T.L., Larson, M.A., Wei, S., Weber, A.: The conserved TFLK motif of mammary-associated serum amyloid A3 is responsible for up-regulation of intestinal MUC3 mucin expression in vitro, *Pediatr. Res.*, **53**, 137-142, 2003
- 14) Larson, M.A., Wei, S.H., Weber, A., Mack, D.R., McDonald, T.L.: Human serum amyloid A3 peptide enhances intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 531-540, 2003
- 15) De Villiers, W.J., Louw, J.P., Strachan, A.F., Estebeth, S.M., Shephard, E.G., De Beer, F.C.: C-reactive protein and serum amyloid A protein in pregnancy and labour, *Brit. J. Obs. Gynae.*, **97**, 725-730, 1990