

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861485

研究課題名(和文)抗コプロポルフィリン抗体を用いた羊水塞栓症の組織学診断および迅速診断法開発の検討

研究課題名(英文)histological diagnosis of amniotic fluid embolism using immunostaining of zinc coproporphyrin I

研究代表者

古田 直美(Furuta, Naomi)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80647595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛コプロポルフィリンに対する特異的なモノクローナル抗体を用い卵膜・胎盤・臍帯の免疫染色を行い胎便被曝である羊水混濁の有無を組織学的に診断した。羊水混濁の重症度に関して客観的なステージ分類を提案した。分娩時に肉眼的に羊水中に混濁を認めない症例でも多くの例で卵膜は胎便被曝を受けていた。羊水中に排出される胎便が胎児成熟のシグナルとして卵膜や胎盤に作用する可能性を想定した。経膈分娩において胎便汚染による内因性の前期破水があることが示された。新生児死亡あるいは胎児死亡症例の肺組織を用い抗亜鉛コプロポルフィリン抗体の免疫染色を行った。胎便吸引と新生児死亡の病態の関連の有無を検討した。

研究成果の概要(英文)：Immunoreactivity of ZnCP- clearly and specifically identified meconium in the placenta, fetal membrane, and umbilical cord. Meconium was detected in clear amniotic fluid at delivery, especially in cases of premature rupture of membrane, suggesting previous exposure. We suggested that the meconium effect at onset of labor as a signal of the fetal maturation. Immunohistochemical detection of ZnCP-I is a highly sensitive histological diagnosis. Clear immunostaining of ZnCP- was detected in the lung tissues. In cases of acute or subacute exposure to meconium, ZnCP-I immunostaining was observed in dependent of macrophage-specific CD68. By contrast, ZnCP-I and CD68 was observed in the identical cells at the case of chronic exposure to meconium. Monoclonal antibody for ZnCP- would be useful to establish the histological diagnostic criteria for the lung of meconium aspiration syndrome.

研究分野：周産期

キーワード：胎便 胎盤 抗亜鉛コプロポルフィリン抗体

## 1. 研究開始当初の背景

胎便(胎糞)は胎児の腸管内で産生され羊水中に排出される。羊水中に排出された胎便(胎糞)は羊水混濁の原因となる。分娩時に羊水中の胎便(胎糞)を大量に吸引した場合、胎生期の低酸素あるいは感染と相まって胎便吸引症候群となり、重症の新生児仮死あるいは新生児死亡をきたすこともある。胎便(胎糞)や胎脂などの羊水成分が母体循環血に混入した場合に羊水塞栓症を発症すると母体死亡の高リスクとなる。羊水塞栓症は1994年以降我が国の妊産婦死亡の第一位を占めている。

金山尚裕らは亜鉛コプロポルフィリンは胎便中に特異的に存在し(Clin Chem 1991;37:1173-7)、母体血清中の亜鉛コプロポルフィリン濃度の上昇は羊水塞栓症の補助診断となることを明らかにした(Clin Chem 1992;38:526-9)。日本産婦人科医会の後援により1993年から羊水塞栓症血清検査事業を行っており、全国の羊水塞栓症を発症した母体の血清において、亜鉛コプロポルフィリンならびにSTN抗原(胎便中に存在するムチン)の濃度を測定している。

このような背景を元に、亜鉛コプロポルフィリンに対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、卵膜、胎盤、臍帯の免疫染色に応用し、胎便被曝である羊水混濁の有無を組織学的に診断することを可能とした(Furuta et al., Placenta 33; 24-30, 2012)(図1A,B)。抗亜鉛コプロポルフィリン抗体を用いた免疫染色により羊水混濁の重症度に関して客観的なステージ分類を提案した(図1B)。

今回の研究目的は、病理学的検討として上記の如く最近確立した抗コプロポルフィリン抗体を用いて、胎盤、卵膜、臍帯のみならず、剖検児の肺組織、羊水塞栓症で死亡した母体の肺組織の検討などを行い、それらに加え母体血清中の亜鉛コプロポルフィリン濃度を抗コプロポルフィリン抗体を

用いて簡便に測定するELISA法の開発も目標とする。

## 2. 研究の目的

亜鉛コプロポルフィリンを認識する特異的なモノクローナル抗体を開発し胎盤などにおいて胎便の特異的な免疫染色に応用した。(Furuta et al., Placenta 33;24-30,2012)。今回の研究計画ではこの胎便を認識する特異的な抗体を用いて、胎盤、卵膜、臍帯のみならず胎児の剖検症例から得られた肺組織、羊水塞栓症で死亡した母体から得られた肺組織において免疫染色を行い病態形成への胎便成分の関与を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 亜鉛コプロポルフィリンは胎便中に特異的に存在する。亜鉛コプロポルフィリン

に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、卵膜、胎盤、臍帯の免疫染色に応用し、胎便被曝である羊水混濁の有無を組織学的に診断することを可能とした(Furuta et al., Placenta 33; 24-30, 2012)(図1A,B)。抗亜鉛コプロポルフィリン抗体を用いた免疫染色により羊水混濁の重症度に関して客観的なステージ分類を提案した(図

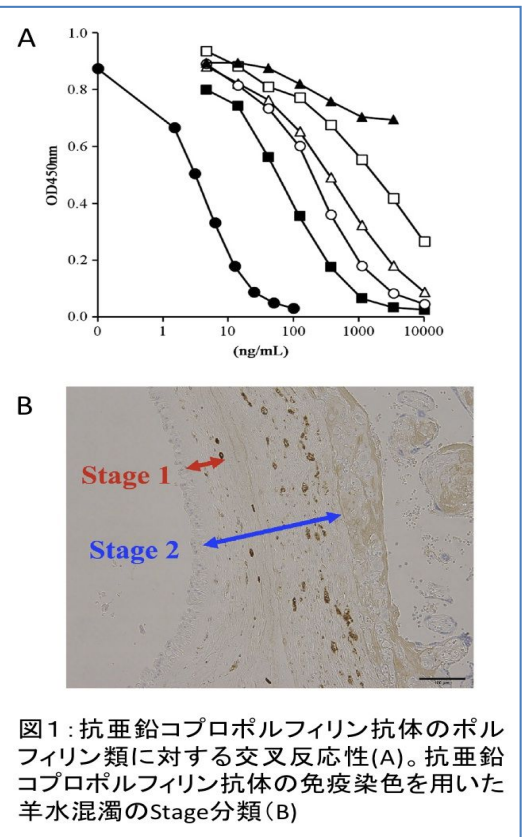


図1: 抗亜鉛コプロポルフィリン抗体のポルフィリン類に対する交叉反応性(A)。抗亜鉛コプロポルフィリン抗体の免疫染色を用いた羊水混濁のStage分類(B)

1 B)。本研究計画では平成25年度の1年間で浜松医科大学附属病院で分娩した症例について胎盤、卵膜、臍帯においてHE染色と抗亜鉛コプロポルフィリン抗体の免疫染色を行い、羊水混濁の客観的な組織学的診断基準の確立を目指す。

2) 羊水混濁が陣痛発来、前期破水に及ぼす影響の解析

予備的な検討により、分娩時に肉眼的に羊水中に混濁を認めない症例であっても、多くの例で卵膜は胎便被曝を受けている可能性が判明している。この現象より、羊水中に排出される胎便が、胎児成熟のシグナルとして卵膜や胎盤に作用する可能性を想定した。諸家の報告により、羊水中への胎便の排出は胎児成熟を反映していることが明らかとなりつつある。一方、分娩発来のプロセスにおいて脱落膜はプロスタグランジンF<sub>2</sub>の主要な産生組織と考えられている。早産、正期産、過期産、陣痛発来前の帝王切開症例における卵膜を組織学的に検討する。さらに、羊膜細胞は胎便に直接的に曝露することから、培養羊膜細胞に亜鉛コプロポルフィリンあるいは分画化した胎便成分を添加してプロスタグランジンE<sub>2</sub>(陣痛発来を想定して)の産生やマトリックスメタロプロティナーゼ発現(破水を想定して)への影響を検討する。

3) 新生児死亡で剖検となった症例の肺組織の検討

過去30年間に浜松医科大学で新生児死亡あるいは胎児死亡症例に対して行われた剖検において組織が保存されている症例について、肺組織に亜鉛コプロポルフィリンの免疫染色による検討を行う。炎症所見と低酸素・虚血の所見ならびに産科と新生児科の臨床医録を後方視的に検討し、胎便吸引と新生児死亡の病態の関連の有無を検討する。

4) 羊水塞栓症を発症し母体死亡となった症例の肺組織の検討 浜松医科大学では日本

産婦人科医会の後援により1993年から羊水塞栓症血清検査事業を行っており、全国より羊水塞栓症で死亡した母体の剖検肺組織が送られてくる。これらの組織において抗亜鉛コプロポルフィリン抗体による胎便特異的な免疫染色を行い、胎児機能不全、心肺虚脱などの臨床経過との関連を後方視的に検討する。

#### 4. 研究成果

1) 羊水混濁の組織学的客観的な診断基準の確立 羊水混濁の重症度は分娩時の羊水中の肉眼的な印象によってなされ、客観的な診断基準は確立されていない。一方亜鉛コプロポルフィリンは胎便中に特異的に存在する。抗亜鉛コプロポルフィリン抗体を用いた免疫組織染色により羊水混濁の重症度に関してステージ分類に基づき当院にて分娩した症例の胎盤免疫組織学的染色を行い羊水混濁の客観的な組織学的診断が可能となった。2) 羊水混濁が前期破水、陣痛発来に及ぼす影響の解析 経膈分娩において前期破水のなかった症例と前期破水のあった症例を比較すると後者ではCAMがなく、胎便汚染があるものが多く存在し、内因性の前期破水があることが示唆された。一方、分娩発来のプロセスにおいて脱落膜はプロスタグランジンF<sub>2</sub>の主要な産生組織と考えられている。そこで、胎便が胎児成熟のシグナルとして脱落膜に影響をおよぼして分娩発来機序に関与するとの仮説を想定し、抗ZnCP-I抗体を用いて、脱落膜組織における胎便成分の検討を行った。自然に分娩が発来して経膈分娩に至った症例および分娩発来前に選択的に帝王切開となった症例について抗ZnCP-I抗体を用いた免疫染色を行い、胎盤基底盤の脱落膜組織における胎便成分有無について比較検討した。脱落膜組織においてZnCP-I免疫染色は多様な染色パターンを呈した。経膈分娩は全

例において脱落膜組織内に抗 ZnCP- 抗体陽性所見を認めた。一方、選択的帝王切開症例 56%では陽性所見を認めたが 44%では陰性であった。プロスタグランジン F2 の産生経路にかかわる COX-2 に対する免疫染色を行ったところ、脱落膜において抗 ZnCP- 抗体と同様の部位での陽性所見が認められ、胎便は胎児成熟のシグナルとして、分娩発来に何らかの影響をおよぼしている可能性が示唆された。

3) 新生児死亡で冒険となった症例の肺組織の検討 過去 30 年間の浜松医科大学で新生児死亡あるいは胎児死亡症例に対して行われた剖検において組織が保存されている症例について、肺組織に亜鉛コプロポルフィリンの免疫組織染色による検討を行った。従来胎児成分としてムチンを染色する目的で用いられてきたアルシアンブルー染色に比べて、抗亜鉛コプロポルフィリン抗体による免疫染色は胎便成分を極めて明瞭に検出できることが明らかとなった。抗マクロファージ抗体 (CD68) を用いた免疫組織染色と比較すると胎便成分がマクロファージに貪食された形で免疫染色される症例と肺のマクロファージとは無関係に胎便成分が検出される症例が存在した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Immunohistochemical detection of meconium in the fetal lung

Furuta N, Yaguchi C, Ithoh H, Kanayama N  
Arch Gynecol Obstet. 2013 Nov; 288(5): 967-9

[学会発表](計 3 件)

第 21 回日本胎盤学会

(H25.10.25~26) 愛知

亜鉛コプロポルフィリン 抗体を用いた

卵膜中の胎便検出とその意義

第 65 回日本産婦人科学会学術講演会  
(H25.5.10~12) 札幌

胎児肺における胎便の免疫組織学的染色の検討: 剖検例より

第 66 回日本産婦人科学会学術講演会  
(H26.4.9~12) 横浜

分娩発来に胎便が関与する可能性について  
亜鉛コプロポルフィリン免疫染色を用いた  
検討

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 直美 (Furuta Naomi)

浜松医科大学附属病院 産婦人科 診療助教

研究者番号: 80647595