

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860470

研究課題名(和文) 羊水塞栓症におけるアナフィラクトイド反応の関与に関する検討

研究課題名(英文) Investigation on involvement of anaphylactoid reaction in amniotic fluid embolism

研究代表者

竹下 裕史 (TAKESHITA, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70387075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、羊水塞栓症におけるアナフィラキシー様(アナフィラクトイド)反応について、妊娠ラットへの羊水の静脈投与による血中成分への影響、ならびにアナフィラキシー反応の主体である肥満細胞に対する羊水曝露の影響について検証した。その結果、妊娠ラットへの羊水投与実験では、アナフィラトキシン(C3a、C5a)ならびに補体経路の活性化に関与するC1INHの血中濃度に有意な変動を認めなかった。一方、形成されたフィブリン血栓の溶解を示すD-ダイマーの血中濃度は有意な増加を認めた。また、羊水に曝露した培養肥満細胞は脱顆粒反応を認めなかった。したがって、羊水は血液凝固機能に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of amniotic fluid embolism is thought to be anaphylactoid-like (anaphylactoid) reaction caused by inflow of amniotic fluid into the maternal circulation, but it has not been experimentally verified. In this study, we examined the effect of amniotic fluid intravenous administration on the blood components of pregnant rats, and the influence of amniotic fluid exposure on mast cells, the main constituent of anaphylactic reaction. As a result, no significant fluctuation of were observed in anaphylatoxin (C3a, C5a) and C1 inhibitor in pregnant rats administered amniotic fluid. In addition, cultured mast cells exposed to amniotic fluid did not induced degranulation. On the other hand, D-dimer increased significantly in the amniotic fluid administration group, suggesting that thrombus formation occurs by intravenous injection of amniotic fluid. Therefore, it was suggested that amniotic fluid affected blood coagulation function.

研究分野：法医学

キーワード：羊水塞栓症 アナフィラクトイド反応 アナフィラトキシン 肥満細胞 血液凝固機能

## 1. 研究開始当初の背景

羊水塞栓症は分娩前後に原因不明の胸痛、呼吸困難、血圧低下、意識低下、血管内血液凝固等を生じる産科疾患で、発症率は非常に低い致死率は著しく高い。加えて、本疾患による死亡は診断に苦慮することが多く、原因不明の死亡との判断や、遺族側への配慮などにより警察への異状死届出がなされ、司法解剖が施行される場合もある。こうした現状から、臨床のみならず法医学分野においても本疾患の病態解明ならびに迅速な診断法の確立が必要不可欠である。

羊水塞栓症の病態に関しては、羊水成分や胎便などによる肺血管の塞栓とする説や、母体循環への羊水流入によるアナフィラキシー様（アナフィラクトイド）反応とする説が知られている[1,2]。しかしながら、羊水塞栓症例では皮膚発赤や紅斑、喉頭浮腫など、アナフィラキシー反応の典型的な所見が出現したとする報告はみられない。さらに、正常分娩後の女性の循環血中にも羊水成分が存在しているとの報告[3]がある一方、羊水の血管内流入が母体に及ぼす影響を確認した研究報告はなく、本疾患の原因が羊水であることも未だ証明されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

### (1) 羊水の血管内流入が及ぼす影響

現在考えられている羊水塞栓症の仮説では、いずれも羊水の血管内流入が原因として挙げられている。しかしながら、羊水の血管内流入が本疾患のさまざまな症状を引き起こすメカニズムについては実験的に証明されていない。そこで本研究では、羊水塞栓症のメカニズムとして考えられているアナフィラクトイド反応について、その原因となる補体の活性化と羊水の血管内流入の関係を明らかにすることを目的とした。また、羊水の血管内流入が補体以外の血液成分に影響を及ぼす可能性も考えられることから、症状の一つである血管内血液凝固に着目し、血液凝固関連物質への影響についても検証することとした。

### (2) 羊水による肥満細胞刺激に関する検証

羊水塞栓症におけるアナフィラクトイド反応（図1）は、母体の血管内に流入した羊水成分や胎児成分を異物として認識し、これによって活性化した補体経路から産生されたアナフィラトキシン（C3a、C5a）が肥満細胞を刺激することで発症すると考えられている[1]。

本研究目的(1)にて、羊水投与の血管内流入と補体活性化の関係を検証するのに伴い、羊水に含まれる何らかの成分が母体の肥満細胞を刺激する可能性について検証する必要があると考えた。そこで、ラット肥満細胞株（RBL-2H3）を用い、羊水曝露による肥満細胞の脱顆粒反応の有無について検証することとした。

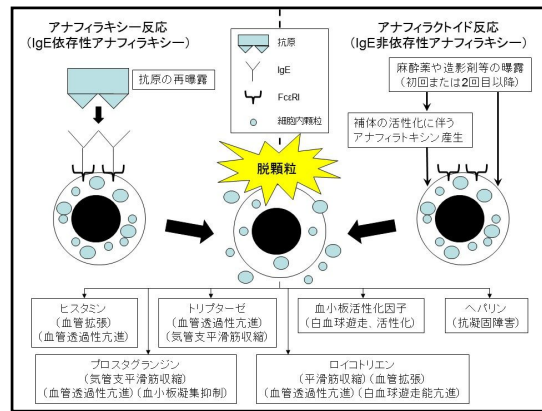


図 1. アナフィラキシー反応とアナフィラクトイド反応（光畑裕正 編「アナフィラキシーショック」から引用、一部改変）。

## 3. 研究の方法

### (1) 妊娠ラットへの羊水の静脈投与による補体ならびに血液凝固関連物質への影響

妊娠ラットからの羊水採取

麻酔下にて、妊娠満期の Wistar ラットから羊水を採取した。

各期間のラットへの羊水投与

で羊水を採取したラットとは異なる系統の Wistar ラットを非妊娠群、妊娠初期群、中期群、後期群に分けた。麻酔下にて各群のラットの大腿静脈から羊水 200  $\mu$ L を注入した後、30 分後に血液を採取した。また、対照として、生理食塩水 200  $\mu$ L を大腿静脈から投与後、同様に採血を行なった。さらに、妊娠による各種血中成分の変動とも比較するため、各群と同時期の無処置ラットから採血を行なった。

各種血中成分濃度測定

採取した血液を試料として、補体関連としてアナフィラトキシンである C3a および C5a、補体経路の活性化を抑制する C1 エステラーゼインヒビター（C1INH）、血液凝固関連としてフィブリン血栓の前駆体であるフィブリノゲン、フィブリン血栓の最終分解産物である D-ダイマーを対象とし、ELISA 法を用いて濃度を測定した。

### (2) ラット肥満細胞株（RBL-2H3）を用いた羊水曝露における脱顆粒反応の検証

妊娠ラットからの羊水採取

麻酔下にて、妊娠満期の Wistar ラットを開腹し、羊水を採取した。

RBL-2H3 の培養

ラット肥満細胞株（RBL-2H3）は解凍後、37  $^{\circ}$ C、飽湿、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて、1% penicillin-streptomycin および 10% fetal bovine serum (FBS) を含有する Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM) 中で培養した。

#### β-hexosaminidase を指標とした RBL-2H3 脱顆粒反応試験

RBL-2H3 を用いた脱顆粒抑制試験[4]を参考に実験を行なった。培地を除去した RBL-2H3 (2.5×10<sup>5</sup> cell)に MT buffer で希釈した羊水を各々に添加し、2 時間培養した(図 2)。なお、RBL-2H3 を Anti DNP-IgE (Mouse monoclonal anti-dinitrophenol) で感作後に DNP-HSA (DNP-labeled human serum albumin)を添加し、脱顆粒反応を惹起させた群を陽性対照とした。また、Anti DNP-IgE で感作せずに DNP-HSA を添加し、脱顆粒反応が生じない群を陰性対照とした。

培養後、培養上清と細胞破碎液に分離し、各々を 50 μL ずつマイクロプレートに分取した(図 2 および )。分取した上清と細胞破碎液に、β-hexosaminidase の基質として *p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-β-D-glucopyranoside 100 μL を添加した。次いで glycine buffer 100 μL を加えて反応を停止させた後、β-hexosaminidase の作用により基質から遊離した *p*-nitrophenol の吸光度 (405nm) を測定した(図 2)。得られた吸光度から全体の β-hexosaminidase 量における上清中の β-hexosaminidase 量を計算し、放出率として算出した。

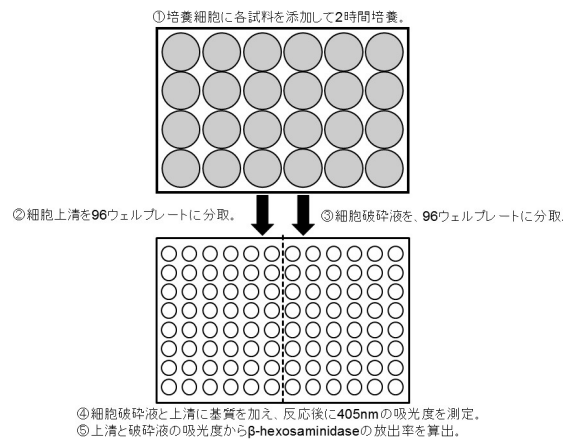


図 2. 脱顆粒反応試験の模式図

#### 4. 研究成果

(1) 非妊娠および各妊娠期のラットについて、無処置群、対照群または羊水投与群を作製し、各処置後に採取した血液を試料として各種濃度を測定した。その結果、C3a は妊娠期の経過や羊水投与による有意な変動を認めなかった(図 3)。C5a は一部の妊娠期間を除いて、対照群および羊水投与群は無処置群に比べて有意な増加を認めたが、対照群と羊水投与群の間に有意な差は認められなかった(図 4)。C1INH は非妊娠期を除き、妊娠期間の経過および羊水投与による有意な変動は認められなかった(図 5)。フィブリノゲンは妊娠後期にすべての群が有

意に増加したが、羊水投与による変動が認められたのは妊娠初期のみであった(図 6)。D-ダイマーは非妊娠期を含むすべての妊娠期間において、羊水投与群が対照群に比べて有意な増加を認めた(図 7)。

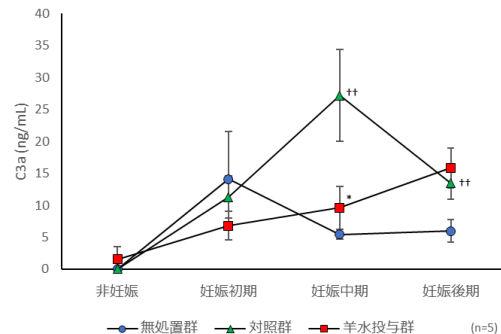


図 3. 各妊娠期における C3a 濃度.

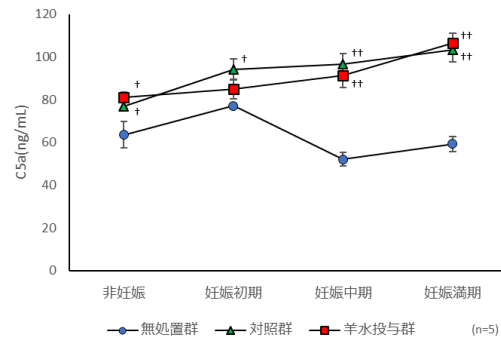


図 4. 各妊娠期における C5a 濃度.

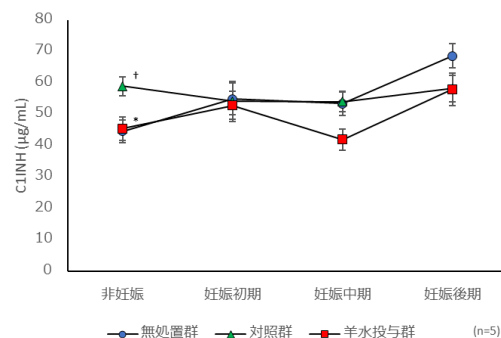


図 5. 各妊娠期における C1INH 濃度.

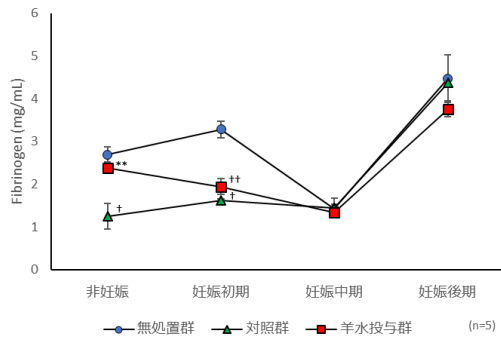


図 6. 各妊娠期におけるフィブリノゲン濃度.

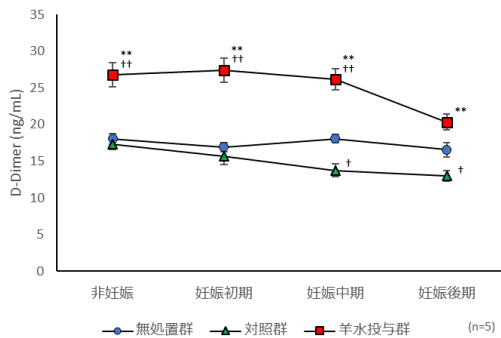


図 7. 各妊娠期における D-ダイマー濃度.

(2)ラット肥満細胞株 (RBL-2H3) に羊水希釈系列を 2 時間曝露し、細胞内顆粒の一成分である  $\beta$ -hexosaminidase の放出率を算出し、羊水曝露による脱顆粒反応の有無を検証した (図 8)。その結果、すべての羊水希釈系列の  $\beta$ -hexosaminidase 放出率は、陽性対照と比較して有意に低値を示し、陰性対照との有意差を認めなかった。したがって、羊水成分もしくは胎児成分による肥満細胞への刺激と、それに伴う脱顆粒反応は生じない可能性が示唆された。

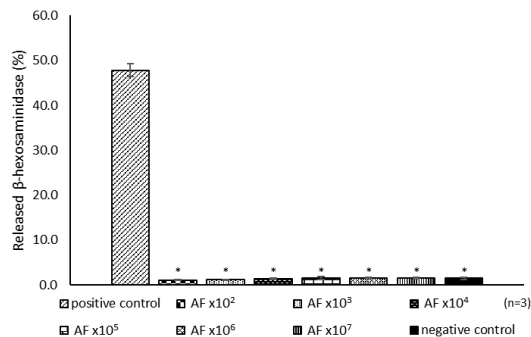


図 8. 羊水の濃度変化に対する RBL-2H3 の脱顆粒反応.

本研究では、羊水投与によってアナフィラトキシンである C3a と C5a の増加、および補体活性化を抑制している C1INH の減少は確認されなかった。したがって、羊水塞栓症

例でみられるとされる補体関連物質の低下は、羊水の血管内流入を原因とする現象ではない可能性が示唆された。また、肥満細胞株への羊水曝露実験においても脱顆粒反応は確認されなかった。これにより、羊水に含まれる成分が肥満細胞を直接刺激する可能性は低いことが示唆された。これらの結果をまとめると、羊水の血管内流入によって補体活性化からアナフィラキシー反応に至る一連の反応が生じる可能性は低いと推測された。

一方、羊水投与によって D-ダイマーの有意な増加が認められた。D-ダイマーの増加はフィブリン血栓の形成と分解を示しており、また羊水塞栓症で認められる検査所見である。したがって、羊水塞栓症でみられる血液凝固障害は、羊水の血管内流入に基づいた血管内血液凝固を起因とする消耗性凝固障害である可能性が推測された。

#### < 引用文献 >

(1) Benson MD. Current concepts of immunology and diagnosis in amniotic fluid embolism. Clin Dev Immunol. 2012.

(2) Kanayama N, Tamura N. Amniotic fluid embolism: Pathophysiology and new strategies for management. J Obstet Gynaecol Res. 2014;40:1507-1517.

(3) Nakagami H, Kajihara T, Kamei Y, Ishihara O, Kayano H, Sasaki A, Itakura A. Amniotic components in the uterine vasculature and their role in amniotic fluid embolism. J Obstet Gynaecol Res. 2015;41:870-875.

(4) 井手三津子, 新本洋士. ラット細胞株 (RBL-2H3) を用いた脱顆粒抑制試験. 食品機能性評価マニュアル(I). 日本食品化学工学会. 2009. 94-99.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(0 件)

〔学会発表〕(0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

竹下 裕史 (TAKESHITA, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70387075