

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09225

研究課題名(和文) 羊水塞栓症の病態解明に向けた羊水胎児成分と母体の反応系に関する基礎的研究

研究課題名(英文) A basic study on the reaction system of amniotic fluid fetal component and maternal for the pathogenesis of amniotic fluid embolism

研究代表者

田村 直顕 (Tamura, Naoaki)

浜松医科大学・医学部・講師

研究者番号：90402370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では羊水と母体血液の直接的な接触に注目し、血液凝固線溶系全容を評価できるRotational thromboelastometry (ROTEM)を用いて検討を行い、羊水添加によって用量依存的に血餅硬度が減少したことから、羊水が線溶亢進を惹起するのではなく血小板に作用し脆弱な血餅が形成される結果を得た。さらに、羊水と母体血液の反応をAPCsrおよび内因性トロンビン産性能について検討し、羊水による母体血漿のAPC活性の抑制による血液凝固の促進、増強作用を確認した。これらの結果は、分娩後早期の組織因子経路活性化に伴う血栓形成が羊水塞栓症の発症に関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊水と母体血液の反応として、羊水は血液凝固反応を促進し血小板凝集を活性化したが線溶亢進を誘導しなかった。羊水によってさらに活性化された組織因子経路のもとでは血小板に影響し、脆弱な血餅がつくられた。これらの結果は、羊水塞栓症による肺動脈塞栓のメカニズムとして、羊水・胎児成分による機械的閉塞だけでなく、分娩後早期の組織因子経路活性化に伴う播種性血管内凝固症候群および血栓塞栓が関与することを示唆しており、羊水塞栓症における心肺虚脱の病態解明につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： We analysed the direct reaction between amniotic fluid and maternal blood by utilizing Rotational thromboelastometry (ROTEM). Our data suggests amniotic fluid accelerated thrombin production and activated platelet aggregation without inducing hyperfibrinolysis in whole blood. The activated tissue factor tissue factor pathway with amniotic fluid produced soft and fragile clots due to its influence on platelets.

We also measured ETP with four different amounts of amniotic fluid followed by the calculation of APC-sr. Our result indicates amniotic fluid reduced susceptibility to APC and attenuated the maternal APC anti-coagulation system, which may have partly contributed to enhanced maternal blood coagulation caused by amniotic fluid contamination.

研究分野：周産期医学

キーワード：羊水塞栓症 播種性血管内凝固 凝固線溶系 血栓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初、本邦の妊産婦死亡の原因として羊水塞栓症が最も多い疾患とされていた。羊水塞栓症を取り巻く問題として、羊水・胎児成分の母体循環内への流入による機械的塞栓やアナフィラキシー様反応が発症機序として示唆されていたが、症状を主体とした臨床的な診断基準が先行した結果、原因不明の妊産婦の呼吸不全・心停止・異常出血・播種性血管内凝固や胎児機能不全のほぼ全例が羊水塞栓症として扱われ、病態の理解と治療戦略が定まりにくいことであった。我々が行ってきた羊水塞栓登録事業は主に羊水流入マーカーと補体値の測定であったが、母体血中にZnCP1とSTNが検出されなかったからといって羊水流入がなかったことを証明したわけではなく、また、補体値が低下していたとしても羊水塞栓症以外の生体反応として低下している場合も考えられていた。この様に病態が解明されていない中、羊水塞栓症に特徴的な血液凝固異常に着目し、羊水・胎児成分が母体の凝固線溶系に与える影響について検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

羊水は分娩時に母体の血液と接触し、母体循環に流入することが知られている。我々は先行研究で羊水が活性化された組織因子経路を介して血液凝固機能や血小板凝集を促進することを報告し、特に帝王切開分娩後早期の血栓形成に関連する可能性を示した。しかし、羊水の接触によりどのように血液凝固亢進に傾くのか詳細に知られていない。また、羊水塞栓症では重症の播種性血管内凝固を生じるが、その発症機序を含めた病態は明らかになっていない。そこで、羊水が血液凝固系にどのような影響を与えるか、母体全血に羊水を添加しその血液凝固線溶系への影響を血餅形成の速度や硬さ、溶解の度合いを指標として rotational thromboelastometry (ROTEM)を用いた検討、活性化プロテインC系への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

<方法1> ROTEM は全血検体の入ったカップにピンを沈めてそのピンを回転運動させることで血液の粘稠度の変化を測定する。全血を用いるため血小板の影響を含めた凝固・止血機能の評価や、凝固から線溶まで全過程の評価が可能である。Thromboelastography (TEG)とは異なり、使用する試薬により血液凝固系の外因系、内因系、フィブリノゲン量などを評価できる。今回、妊娠35週から40週の計19例の羊水を使用した。血液は、羊水を採取した患者とは異なる Term 妊婦21人と卵胞期早期の非妊婦6人から採血した。妊婦全血300 $\mu$ lに羊水を、添加無し、5 $\mu$ l、15 $\mu$ l、30 $\mu$ l添加の4条件で測定した。非妊婦の血液は羊水添加無しの測定のみ行った。また測定系として NATEM(自然凝固)、EXTEM(外因系)、INTEM(内因系)、FIBTEM(フィブリノゲン量)の4つで評価した。それぞれの測定系のパラメータは血餅形成速度:CT(clotting time)、CFT(clot forming time)、degree、血餅の硬さ:A10、MCF(maximum clot firmness)、線溶反応:LI(lysis index)30、LI60で評価した。統計処理は、二群間のデータは Mann-Whitney U test を使用した。四群間では Kruskal-Wallis test に、群間比較のため Dunn's multiple comparison test を併用した。P<0.05を統計学的有意差があったとした。

<方法2> 妊娠後期の健康な日本人で、2018年5月から2020年2月までの間に本学附属病院で選択的帝王切開、分娩誘発のため入院した症例を対象とした。抗血小板薬、抗凝固薬の内服、血小板や血液凝固異常に関連する合併症をもつ症例は除外した。クエン酸血漿を採取し、プロテインS (PS)、第V因子 (FV)、および第VIII因子 (FVIII)の抗原量をELISAで測定した。羊水サンプルは計19例(経膈分娩3例、帝王切開分娩16例)から採取した未処理羊水を同量ずつ混和し分注して使用した。内因性トロンビン産生能(Endogenous thrombin potential, ETP)と活性化プロテインC感受性比(Activated protein C-sensitivity ratio, APC-sr)は以下のように測定した。羊水量0、1、4、および8  $\mu$ Lを各症例の血漿に同量を置換するように混合(それぞれ血漿量は80、79、76、および72  $\mu$ L)し、96 well プレート各wellで計80  $\mu$ Lとした。母体血漿に混合した羊水量は、我々の先行研究<sup>3)</sup>に基づいて選択した。我々が以前報告<sup>4)</sup>した方法と同様に、組織因子・リン脂質、蛍光基質等を用いて、APC試薬添加の有無でETP(単位nM $\times$ min)を測定した。APC添加量は健康男性プール血漿のETP抑制率が10%台となるように調整した。ETP抑制率は、APC存在下のETPをAPC非存在下のETPで除した値として算出した。

$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{ETP(APC添加有)}}{\text{ETP(APC添加無)}}$  : APC-srはサンプル血漿のETP抑制率をコントロール(健康男性プール血漿)の抑制率で除したものと定義した。

$\text{APC-sr} = \frac{\text{サンプルの抑制率}}{\text{コントロールの抑制率}}$  : したがって、APCへの感受性が低下すると同量のAPCに対するETPが上昇するため、APC-srが上昇する。データは、連続変数は平均値(標準偏差)で示した。有意差検定にはパラメトリック検定を用い $P < 0.05$ を有意とした。

#### 4. 研究の成果

<結果1> 非妊婦(n=6)と妊婦(n=21)の背景を中央値 $\pm$ 標準誤差で示す。年齢は非妊婦 $38 \pm 1.4$ 歳、妊婦 $33 \pm 1.3$ 歳、妊婦の経妊回数 $1 \pm 0.2$ 回、経産回数 $1 \pm 0.1$ 回、妊娠週数は $37 \pm 0.24$ 週であった。ROTEM測定結果をはじめに妊婦と非妊婦の比較で以下に示す。括弧内の値は中央値 $\pm$ 標準誤差を妊婦(羊水添加無し) vs. 非妊婦で示し、最後にP値を表す。有意差を認めたパラメータについて、妊婦ではNATEMでCFT短縮( $96 \pm 3.7$  vs.  $132 \pm 9.0$  sec,  $P < 0.01$ )、増大( $71 \pm 0.64$  vs.  $64 \pm 1.5^\circ$ ,  $P < 0.001$ )、A10増大( $58 \pm 1.0$  vs.  $50 \pm 1.7$  mm,  $P < 0.01$ )、MCF増大( $66 \pm 0.97$  vs.  $61 \pm 2.0$  mm,  $P < 0.05$ )、LI60上昇( $93 \pm 0.55$  vs.  $87 \pm 1.7\%$ ,  $P < 0.05$ )、EXTEMでA10増大( $63 \pm 0.82$  vs.  $59 \pm 2.0$  mm,  $P < 0.05$ )、MCF増大( $70 \pm 0.68$  vs.  $66 \pm 2.0$  mm,  $P < 0.05$ )、LI60上昇( $92 \pm 0.65$  vs.  $88 \pm 2.7\%$ ,  $P < 0.01$ )、INTEMでは増大( $78 \pm 0.46$  vs.  $76 \pm 1.4^\circ$ ,  $P < 0.05$ )、A10増大( $62 \pm 0.79$  vs.  $58 \pm 2.0$  mm,  $P < 0.05$ )、MCF増大( $68 \pm 0.76$  vs.  $64 \pm 2.4$  mm,  $P < 0.05$ )、LI60上昇( $92 \pm 0.47$  vs.  $86 \pm 1.1\%$ ,  $P < 0.001$ )、FIBTEMでA10増大( $20 \pm 0.88$  vs.  $14 \pm 1.6$  mm,  $P < 0.05$ )、MCF増大( $22 \pm 1.0$  vs.  $15 \pm 1.9$  mm,  $P < 0.05$ )、LI60上昇( $100 \pm 0.048$  vs.  $100 \pm 1.0\%$ ,  $P < 0.05$ )していた。つまり、妊婦の血液は非妊婦と比べて血餅形成後の増大速度、血餅硬度は大きく、血餅形成後の線溶反応は小さかった。つぎに妊婦の全血に羊水を添加したときの結果を以下に示す。括弧内の値は中央値 $\pm$ 標準誤差を、羊水添加無し、羊水5 $\mu$ l、同15 $\mu$ l、同30 $\mu$ lの順で、最後にP値を示す。測定した症例数はそれぞれ21、16、16、17例である。有意差を認めたパラメータを挙げる。データ右肩のアルファベットは二群間の比較において、異なる文字間のデータに有意差があることを示す。NATEMで、CT(sec)( $458 \pm 12.5^a$ ,  $168 \pm 4.73^b$ ,  $122 \pm 3.36^{bc}$ ,  $103 \pm 2.38^c$ ,  $P < 0.0001$ )、CFT(sec)( $96 \pm 3.7^a$ ,  $59 \pm 3.6^b$ ,

53 ± 1.6<sup>b</sup>, 52 ± 3.3<sup>b</sup>, P<0.0001)、(°) ( 71 ± 0.64<sup>a</sup>, 78 ± 0.66<sup>b</sup>, 79 ± 0.33<sup>b</sup>, 79 ± 0.65<sup>b</sup>, P<0.0001)、A10(mm) ( 58 ± 1.1<sup>a</sup>, 64 ± 1.1<sup>b</sup>, 65 ± 1.0<sup>b</sup>, 63 ± 1.1<sup>b</sup>, P=0.0001)、MCF(mm) ( 66 ± 0.97<sup>a</sup>, 70 ± 0.94<sup>b</sup>, 71 ± 0.96<sup>b</sup>, 69 ± 0.97<sup>b</sup>, P<0.001)、EXTEM では、CT(sec) ( 55 ± 1.3<sup>a</sup>, 50 ± 1.7<sup>a</sup>, 47 ± 0.88<sup>bc</sup>, 45 ± 0.97<sup>c</sup>, P<0.0001)、A10(mm) ( 63 ± 0.82<sup>a</sup>, 62 ± 1.1<sup>ab</sup>, 61 ± 1.1<sup>ab</sup>, 58 ± 1.0<sup>b</sup>, P<0.01)、MCF(mm) ( 70 ± 0.68<sup>a</sup>, 67 ± 0.95<sup>ab</sup>, 63 ± 1.0<sup>bc</sup>, 60 ± 1.1<sup>c</sup>, P<0.0001)、LI30(%) ( 100 ± 0.1<sup>a</sup>, 100 ± 0.25<sup>ab</sup>, 99 ± 0.35<sup>bc</sup>, 95 ± 0.85<sup>c</sup>, P<0.0001)、LI60(%) ( 92 ± 0.65<sup>a</sup>, 92 ± 0.95<sup>a</sup>, 88 ± 1.2<sup>ab</sup>, 80 ± 1.8<sup>b</sup>, P<0.0001)、INTEM は、CT(sec) ( 186 ± 6.9<sup>a</sup>, 123 ± 3.35<sup>b</sup>, 101 ± 3.16<sup>bc</sup>, 86 ± 1.8<sup>c</sup>, P<0.0001)、FIBTEM は、CT(sec) ( 51 ± 1.2<sup>a</sup>, 48 ± 1.0<sup>ab</sup>, 46 ± 1.0<sup>b</sup>, 44 ± 5.5<sup>b</sup>, P<0.001)であった。つまり、羊水を添加すると血餅形成速度が大きくなった。クエン酸全血に Ca<sup>2+</sup>を加えて凝固させた系(NATEM)では血餅の硬さも増大した。一方で、組織因子とリン脂質を加えて外因系を活性化させる系(EXTEM)では羊水添加により血餅の硬さは小さくなり、また線溶反応は大きくなった。TEG (ROTEM の NATEM に相当)を使用した羊水と全血の血液凝固反応について、羊水添加により非妊婦では R (ROTEM の CT に相当)、K (同 CFT に相当)短縮、増加、妊婦では R が短縮すると報告されている。今回、羊水添加により血餅形成時間が短縮したことは既報と同様だが、血餅の硬さが増大することが明らかとなった。一方で EXTEM の結果から、全血に組織因子とリン脂質、羊水を加えると、血餅が弱く溶解されやすい状態になったことが推測される。羊水は血液凝固反応を促進し、血小板凝集を活性化したが、線溶亢進を惹起しなかった。組織因子経路活性化状態下では羊水の添加で軟らかく、脆弱な血餅が形成された。

### 母体全血に羊水添加した時の変化

	NATEM	EXTEM	INTEM	FIBTEM
評価対象	自然凝固	組織因子経路	接触活性経路	フィブリン重合
試薬	Ca <sup>2+</sup>	組織因子 リン脂質 Ca <sup>2+</sup>	エラジン酸 リン脂質 Ca <sup>2+</sup>	サイトカラシンD 組織因子 リン脂質 Ca <sup>2+</sup>
<b>凝固反応促進</b>				
凝固反応相 (CT, CFT, alpha)	CT短縮 CFT短縮 alpha増大	CT短縮	CT短縮	CT短縮
血餅の硬さ (A10, MCF)	増加	減少	不変	不変
線溶反応相 (LI30, LI60)	不変	低下	不変	不変

血餅もろく、溶解されやすい

#### < 結果 2 >

妊娠後期 51 例の血漿を使用した。年齢 33 (4.0)歳、初産婦 15 例、BMI 26.6 (4.6) kg/m<sup>2</sup>、妊娠週数 264 (7.2)日、血小板数 24.9 (6.9)万/μL、PT-INR 0.91 (0.05)、フィブリノゲン 441 (64) mg/dL、FV 1.51 (0.75) μg/mL、FVIII 1.69 (0.80) μg/mL、PS 10.9 (3.40) μg/mLであった。すべての症例で 4 種類の異なる羊水量を添加して ETP を測定し、その後 APC-sr を算出した。図 1A は、APC の有無と羊水を混合した際の ETP の変化を示す。同量の羊水を用いた各ペア間の比較( と の比較)において、ETP はすべて APC の添加後に有意に減少した。APC を添加した群間の比較( のみの比較)では、羊水を混合すると ETP が有意に増加した。APC-sr は添加した羊水量に応じて有意に増加した(図 1B)。本研究は、妊娠後期の母体血漿中の APC に対する感受性が羊水添加により有意に低下したことを初めて示した。羊水の添加による APC 抗凝固機能低下は、先行研究<sup>3)</sup>で報告した羊水のトロンビン産生量増加作用や血小板活性化機能に加えて、母体血液凝固機能の亢進に一部影響している可能性がある。本研究で APC-sr に観察された最も顕著な差は、羊水混合なしと 8 μL の羊水を

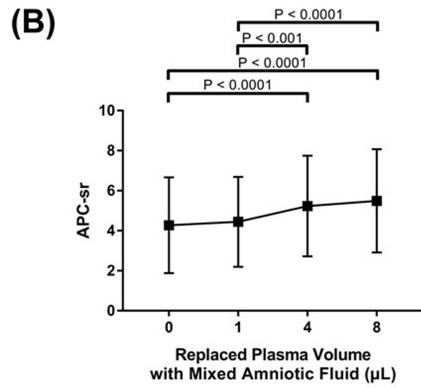
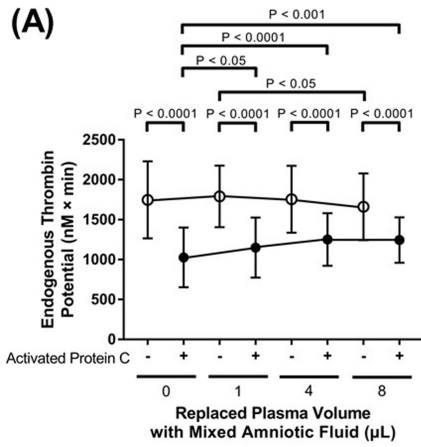


図1. (A)羊水混合によるAPC存在の有無におけるETPの変化  
(B)羊水混合によるAPC-srの変化

混合した群に平均値で約 1 の差 (図 1B)であった。これは我々の過去の報告 4)における妊娠後期と産褥 1 日目の間の変化と同程度であった。一方でこの APC-sr の差は妊娠後期と VTE 症例との差 (約 3) よりも明らかに小さかった。したがって、APC 抗凝固機能に対する羊水の阻害作用は、特に分娩周辺期の血栓形成と関連する可能性がある。妊娠後期妊婦の血漿に羊水を添加することで APC による抗凝固機能が阻害され、これが凝固亢進を促進し、羊水塞栓症による心肺虚脱の発症に関連する可能性があることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jain Divyanu, Oda Tomoaki, Kohmura-Kobayashi Yukiko, Furuta-Isomura Naomi, Yaguchi Chizuko, Uchida Toshiyuki, Suzuki Kazunao, Itoh Hiroaki, Kanayama Naohiro, Tamura Naoaki	4. 巻 139
2. 論文標題 Acute inflammation in the uterine isthmus coincides with postpartum acute myometritis in the uterine body involving refractory postpartum hemorrhage of unknown etiology after cesarean delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103116 ~ 103116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2020.103116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shen Yi, Oda Tomoaki, Tamura Naoaki, Kohmura Kobayashi Yukiko, Furuta Isomura Naomi, Yaguchi Chizuko, Uchida Toshiyuki, Suzuki Kazunao, Itoh Hiroaki, Kanayama Naohiro	4. 巻 45
2. 論文標題 Elevated bradykinin receptor type 1 expression in postpartum acute myometritis: Possible involvement in augmented interstitial edema of the atonic gravid uterus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1553 ~ 1561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14012	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda T, Tamura N, Shen Y, Kohmura-Kobayashi Y, Furuta-Isomura N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Itoh H, Kanayama N	4. 巻 172
2. 論文標題 Amniotic fluid as a potent activator of blood coagulation and platelet aggregation: Study with rotational thromboelastometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 142-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村直顕
2. 発表標題 教育講演：母体安全の提言から、妊産婦死亡の新たな主原因を探る、羊水塞栓症管理指針
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会 医会学会共同企画 生涯研修プログラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoaki Tamura
2. 発表標題 Acute myometritis in refractory postpartum hemorrhage: - the underlying pathology and the development of novel treatment for uterine-type amniotic fluid embolism-
3. 学会等名 70th Annual Congress of JSOG, 2nd J-K-T Joint Conference, 仙台 2018年5月11日 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金山 尚裕  (Kanayama Naohiro)  (70204550)	浜松医科大学・医学部・副学長    (13802)	
研究分担者	伊東 宏晃  (Itoh Hiroaki)  (70263085)	浜松医科大学・医学部・教授    (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------