

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670704

研究課題名(和文) 羊水特異物質を用いた羊水塞栓症診断法の開発

研究課題名(英文) Diagnosis of amniotic fluid embolism by serum SCC

研究代表者

小林 浩 (Kobayashi, Hiroshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40178330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：羊水塞栓症の血清マーカーとしてZnCP1とSTNが用いられているが、羊水混濁がないと上昇しにくい欠点があった。そこで、羊水特異的物質としてSCCを発見したため、正常分娩後のSCCの変化および実際の羊水塞栓症における診断精度を評価した。SCCはELISAで測定した。正常経膈分娩では分娩直後に血清SCC値は上昇し、分娩後には正常値に戻ることが判明した。ROCカーブでカットオフ値を計算するとSCC値が8.8 ng/mlとなり、羊水塞栓症患者と健常者は感度、特異度が100%、97%で識別可能であった。この値は他の血清マーカーを有意に凌駕したため、羊水塞栓症の診断マーカーになりうる。

研究成果の概要(英文)：The levels of SCC and STN were measured by commercially available chemiluminescence enzyme immunoassay (CLIA) kit and radioimmunoassay (RIA) kit, respectively. The sensitivity in diagnosis of AFE was compared among SCC, STN and ZnCP1. We found significantly elevated serum levels of SCC in 4 cases with autopsy-proven AFE disease relative to control individuals with a normal delivery ( $112.0 \pm 169.4$  ng/ml vs.  $4.4 \pm 2.2$  ng/ml,  $p=0.0009$ ). Sensitivity and specificity of the SCC cut-off value (8.8 ng/ml) for differentiating patients with AFE from those with AFE-free individuals were 100% and 97%, respectively, whereas the sensitivities of ZnCP1 and STN were 75% and 25%. Compared with ZnCP1 and STN, serum SCC has a higher sensitivity in diagnosis of fatal AFE. More research is required for identification and validation of AFE.

研究分野：周産期

キーワード：羊水塞栓症

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では羊水塞栓症は母体死亡の第1位を占める。私は1993年に羊水特異的物質として胎便由来のシアリル Tn 抗原(STN)を発見した。剖検例において肺血管内への羊水成分の流入を証明する手法として、STN 特異抗体を用いた免疫組織染色により容易に羊水成分を検出することができ、本法における羊水塞栓症の研究及び診療に飛躍的な進歩をもたらした。しかし、清澄羊水では STN 濃度が低いため、母体血中への流入を的確に診断することはできないという欠点があった。すなわち、血清 STN 値の羊水塞栓症診断における感度、特異度はそれぞれ 26%、97%であり、母体血中の STN 値が高ければ、羊水塞栓症と診断できるが、低値であるからといって疾患を否定することはできないのが現状である。そこで、我々は同一妊婦において羊水にのみ存在し母体血中には存在しない(あるいは極少量しか存在しない)物質を探索した。二次元電気泳動・質量分析技術を駆使して網羅的に探索した結果、44種類の物質を羊水特異的タンパクとして同定することができた(Kobayashi H. Open Women's Health J. 5;7-15,2011. Kobayashi H. 6;24-29,2012.)。ELISA 測定系が市販されている6種類のタンパクを羊水と母体血中で測定した結果、Interleukin (IL)-6 と Squamous cell carcinoma (SCC)の羊水/母体血中比が、STN より 20 倍高値を示した。

### 2. 研究の目的

羊水塞栓症は羊水成分の母体血中流入を契機に、突然の心肺停止を呈する死亡率の高い原因不明の周産期疾患である。羊水中のみに特異的に存在するタンパクを発見し、これを母体血中で測定できれば羊水塞栓症を確定診断できる。我々は1993年に羊水特異的物質としてシアリル Tn 抗原(STN)を発見したが、特異度は高い(97%)ものの感度が低い(26%)ため、実地臨床応用は困難であった。最近、我々はプロテオミクス解析により羊水特異的なタンパクを44種類発見することができた。これらの物質の中から最適マーカーを選定し、簡易診断マーカーを開発する。

### 3. 研究の方法

1) 満期陣痛発来前と陣痛発来後の妊婦の羊水と母体血を採取し、我々が予備実験で同定した44種類のタンパクの羊水特異性の確認試験を行う。方法は追加検体を用いて、2次元電気泳動・質量分析法により羊水特異物質としての確定を行う。

2) 羊水特異的物質44種類のうち、約20種類の抗体を現在入手し保管してある。同一妊婦の羊水と母体血のドットプロットアッセイを行い羊水濃度の高いタンパク上位10位を選別する。

3) 上位10位までのタンパクに対して定量的濃度測定を行う。

4) 保存してある羊水塞栓症症例の血清を用いて、その感度・特異度を調べる。もし、羊水塞栓症診断で新規タンパクが十分その診断能力がないと判断された場合は、破水診断法の研究に切り替える予定である。そのために、

5) 本研究と同時進行して妊娠各週数の頸管粘液・膣分泌物を採取しておく。これにより、羊水特異的物質を用いた破水診断に応用可能であり、従来よりも感度の高い破水診断キットが作成される。

### 4. 研究成果

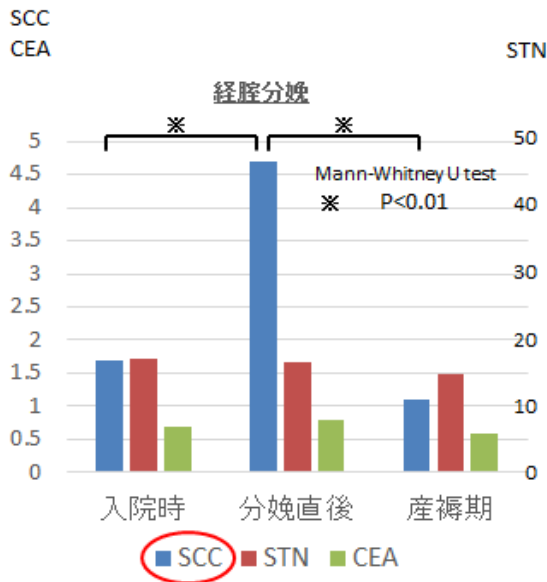
羊水特異物質が同定できれば、羊水成分の母体血中への流入、あるいは破水による膈内への羊水流出を簡易に測定するキットが得られる。この考えは従来からあるものの、羊水特異的物質の同定はここ10年以上皆無であった。

我々の実験では、IL-6 と SCC の羊水/母体血中比が、従来の STN より 20 倍高値を示した。IL-6 は陣痛の有無により羊水中濃度の変化があるが、SCC は陣痛の有無による濃度差は認めないため、安定して測定することができる。さらに、実際臨床応用されている破水診断キットである IGFBP-1 も我々が同定した羊水特異的物質の1つであるが、IL-6 と SCC の羊水/母体血中比が、IGFBP-1 より 6~7 倍高値を示したことから、より感度の高い破水診断キットが作成される。

非侵襲的な簡易キットの開発は、いつでもどこでも短時間で検査でき、母児の予後を改善するためには、きわめて斬新で新たなチャレンジ性を有している。

最近の研究により、羊水塞栓症には2つのタイプが存在することが判明した。1つは心肺停止をきたすタイプ、2つ目は子宮出血・DIC をきたすタイプである。いずれも早期確定診断が不可欠であるが、現時点では客観的迅速診断法は存在しない。羊水塞栓症は現在、母体死亡の第1位であり、本測定法が実地臨床で使えるようになれば、早期に本症を診断でき、抗ショック治療やDIC治療を的確に行うことにより母体救命率は確実に上昇するものと考えられる。なお、IL-6 および SCC に対しては「羊水塞栓症および破水の検査方法」として特許取得した(特願 2009-151914 および PCT/JP2010/060616)。

図1は正常経膈分娩時における SCC 値の推移を示したものである。従来の羊水祖 k 戦勝マーカーである STN と ZnCP1 はともに変化を認めなかったが、SCC は分娩直後に上昇し、羊水が母体血中へ流入していることを証明した。



次に、確定羊水塞栓症の4例（症例 4 から 4 まで）と臨床的羊水塞栓症 23 例（症例 5 から 27 まで）の血清を用いて、3 種類の血清マーカーの優劣を比較した。その時の cutoff 値は ZnCP 1、STN、SCC はそれぞれ 1.6、29.1、9.1 を使用した。

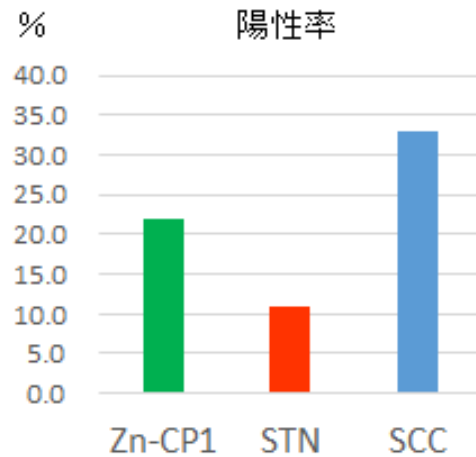
その結果、確定的羊水塞栓症では 4 例中 4 例（100%）、臨床的羊水塞栓症 23 例中 5 例（22%）が陽性となり、他のマーカーより感度が高いことが判明した。

	Zn-CP1	STN	SCC	
1	9.3	10.0	38.1	確定
2	121.3	1920.7	365.5	
3	1.6	15.6	11.6	
4	9.0	13.1	32.6	
5	1.6	17.0	7.9	臨床的
6	1.6	12.9	44.5	
7	1.6	16.7	2.9	
8	1.6	38.9	19.1	
9	1.6	10.0	8.0	
10	1.6	10.2	2.4	
11	1.6	11.2	10.5	
12	1.9	94.3	12.2	
13	1.6	11.4	2.7	
14	1.6	10.5	1.1	
15	1.6	10.0	2.7	
16	1.6	10.2	4.8	
17	1.6	10.0	11.0	
18	1.6	12.6	2.9	
19	2.3	10.0	8.1	
20	1.9	13.5	7.3	
21	1.6	13.0	2.9	
22	1.6	13.0	7.6	
23	1.6	7.2	4.8	
24	1.6	14.0	2.9	
25	1.6	10.0	4.5	
26	1.6	10.0	4.8	
27	1.6	10.0	4.4	

1.6は1.6未満 10.0は10.0未満

閾値 = 平均値 + 2 × 標準偏差

Zn-CP1	1.6
STN	29.1
SCC	9.1



上図に 3 種類の血清マーカーの陽性率を示したが、確定羊水塞栓症と臨床的羊水塞栓症を合わせても、SCC の感度が最も高いことがわかる。

まとめ

1. SCC は母体血中への羊水流入を証明するためのマーカーとして最も優れている。
2. 正常分娩周辺期における母体血中 SCC 値は、分娩後 2 時間以内の採血で最も高値を示した。
3. 正常分娩時における母体血中への羊水流入が生化学的にも示唆された。
4. 今後さらなる症例の積み重ねにより、SCC が羊水塞栓症の原因解明および診断に使用できるかどうかを検討していく。

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 3 件)

Ito F, Akasaka J, Koike N, Uekuri C, Shigemitsu A, Kobayashi H. Incidence, diagnosis and pathophysiology of amniotic fluid embolism. J Obstet Gynaecol. 2014 Oct;34(7):580-4.

Oi H, Naruse K, Koike N, Tsunemi T, Shigetomi H, Kanayama N, Kobayashi H. Predictor of mortality in patients with amniotic fluid embolism. J Obstet Gynaecol Res. 2014 Apr;40(4):941-5.

Imanaka S, Naruse K, Akasaka J, Shigemitsu A, Iwai K, Kobayashi H. Vaginal delivery after placental abruption and intrauterine fetal death, including failed cases. Int J Gynaecol Obstet. 2014 Aug;126(2):180-1.

〔学会発表〕(計 3 件)

大井豪一、成瀬勝彦、常見泰平、重富洋志、赤坂珠理晃、小池奈月、岩井加奈、新納恵美子、山田有紀、今中聖悟、中村春樹、小林 浩. 正常分娩時における母体血中への羊水流入の弛緩出血への影響 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 東京 2014 年 4 月 18-20 日(ポスター)

岩井加奈、大井豪一、成瀬勝彦、小林 浩. 羊水特異マーカーSCC を用いた羊水塞栓症の血清学的補助診断法 第 3 回近畿・東海周産期クリティカルケアフォーラム 大阪市 2014 年 3 月 29 日(口演)

岩井加奈、大井豪一、今中聖悟、中村春樹、新納恵美子、山田有紀、赤坂珠理晃、常見泰平、重富洋志、成瀬勝彦、小林 浩. 羊水流入を推定する新規母体血清マーカーの検討 第 31 回周産期医療研究会 東京 2013 年 11 月 9 日(口演)

〔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：  
出願年月日：  
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

小林 浩 (Hiroshi Kobayashi )

研究者番号 : 40178330

(2)研究分担者

成瀬 勝彦 (Katsuhiko Naruse )

研究者番号 : 70453165