

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 45, No. 5, pp. 464—470, 1993 (平5, 5月)

ムチン母核構造を認識する抗体 TKH-2を用いた 羊水塞栓症の新しい病理学的診断法

浜松医科大学産科婦人科

大井 豪一 小林 浩 寺尾 俊彦

A New Histologic Diagnosis for Amniotic Fluid Embolism by Monoclonal Antibody TKH-2 that Recognizes Mucin-type Glycoprotein

Hidekazu OHI, Hiroshi KOBAYASHI and Toshihiko TERAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu

概要 ムチン母核構造を認識する5種類のモノクローナル抗体 TKH-2, MA54, MA61, B72.3及びCC49を用い、胎児小腸のムチンに対する免疫染色の染色性を比較検討した結果、TKH-2抗体が最も染色性がよいことが確認された。また、この抗体を用いたムチン染色は、パラフィン切片における染色性も良好であることが確認された。そこで、この抗体 TKH-2を用いた羊水塞栓症の病理診断に関する新しい染色法の有用性を動物実験モデルにおいて検討した。10%胎便懸濁液を作成し、これを日本白色種ウサギの耳静脈より1ml/kgの割合でone shot 静注した。静注1, 2, 4, 8, 12及び24時間後に肺、腎臓及び肝臓を摘出し、抗体 TKH-2を用いた Streptavidin Biotin Complex 法にて免疫染色を行った。その結果、肺小動脈内、肺静脈内、肝臓門脈内に TKH-2抗体により染色されたムチンが認められた。この免疫染色により、病理学的にムチンが肺や肝臓の末梢血管内に局在していることを診断することが可能であつた。同部位の連続切片にてアルシャンブルー染色と比較検討したところ、アルシャンブルー染色陽性部位はすべて TKH-2染色陽性であつた。また、アルシャンブルー染色陰性部位にも TKH-2染色が弱陽性の部位が存在し、従来のアルシャンブルー染色より感度がよいことが確認された。一方、ヘマトキシリソエオジン染色ではムチンの存在は全く診断されなかつた。以上より TKH-2抗体を用いた免疫染色は、羊水塞栓症の病理学的診断に有用なことが示唆された。

Synopsis Sialyl Tn structure (NeuAc α -2-6 GalNAc 1-O-Ser/Thr) recognized by monoclonal antibody TKH-2 is a characteristic component in meconium- and /or amniotic fluid-derived mucin. The purpose of this study was to evaluate whether immunohistochemical staining employing antibody TKH-2 is a sensitive method for histological diagnosis of amniotic fluid embolism (AFE). The intravenous injection of 10% meconium solution (1ml/kg) into rabbits was carried out. Formalin-fixed, paraffin-embedded lung, liver, and kidney tissue sections were obtained at various time interval after injections. Specimens were stained by the Streptavidin Biotin Complex method. The results of immunostaining were compared to those of hematoxylin and eosin (H & E) stain or a conventional Alcian blue stain. Remarkable positive stainings were easily seen within the pulmonary artery vasculature in experimental rabbits. Meconium-derived mucin can be easily missed on H & E sections. Compared to TKH-2 staining, Alcian blue staining may also be insufficient to demonstrate intravascular mucin in the lung sections. TKH-2 staining is the most sensitive method to use in detecting meconium-derived mucin in the lung sections of rabbits with an AFE experimental model.

Key words: Amniotic fluid embolism • Immunohistochemical stain • Monoclonal antibody TKH-2 • Alcian blue stain

緒 言

羊水塞栓症は稀な産科合併症であるが、母体死亡率が80%と高く産科的に重要な疾患の一つである。その確定診断は現在のところほとんどが死後の剖検によるものであり、その組織染色としてへ

マトキシリソエオジン染色以外に、ムチン染色、コロイドイオン染色などの特殊染色が必要である¹⁾。前回われわれは、羊水及び胎便成分中のムチンに着目し、ムチン母核構造を認識するモノクローナル抗体 TKH-2が羊水塞栓症の血清学的診

1993年5月

大井他

465

断に有用であることを報告した²⁾。この抗体は、ムチン糖蛋白の NeuAc α 2-6GalNAc 1-O-Ser/Thr)を特異的に認識するものであり、卵巣癌、大腸癌などの腫瘍マーカーとして日常使用されている^{3)~5)}。

今回、ムチン母核構造を認識する5種類のモノクローナル抗体、TKH-2, MA54, MA61, B72.3及びCC49を用い、パラフィン切片における胎児小腸の免疫染色を施行し、その染色性を比較検討した。また、一般的なヘマトキシリソエオジン染色、ムチンの特殊染色であるアルシャンブルー染色、及びTKH-2免疫染色を用いて、羊水塞栓症動物実験モデルの肺、肝臓及び腎臓において、各染色法のムチンに対する染色性につき比較検討した。

実験材料及び方法

1. 胎児小腸をムチン母核構造を認識する5種類のモノクローナル抗体、TKH-2, MA54, MA61, B72.3及びCC49を1 μ g/mlの濃度でStreptavidin Biotin Complex法を用いて免疫染色を施行し、各抗体の胎児小腸由来のムチンに対する反応性を比較検討した。染色性の判定は2名の産婦人科医により決定した。

2. 胎児懸濁液

妊娠中合併症を認めず妊娠39週に正常分娩(Apgar score 10点)にて出生した出生時の新生児胎便1gを生理的食塩水10mlに溶解しPolytronでhomogenizeし10%の胎便懸濁液を作成し、使用まで-20°Cに保存した。

3. 実験動物

日本白色種ウサギ雄(体重3.65~4.15kg)を用いた。

4. 実験方法

ウサギをペントバルビタール静脈麻酔下に、10%胎便懸濁液を1ml/kgの割合で耳静脈よりone shot静注して実験的羊水塞栓症モデルを作成した。この量ではウサギは死亡することはなかつた。静注1, 2, 4, 8, 12, 24時間後に肺、肝臓及び腎臓を摘出した。摘出後これらの臓器はただちに、PBS加10%中性ホルマリンにて固定しパラフィン切片を作成した。このパラフィン切片

を脱パラフィンし、0.1M Tris buffered saline, pH 7.6 (TBS)にて洗浄後、10%goat serumにてblocking(30min, 23°C), TBSにて洗浄後一次抗体としてTKH-2 (0.5 μ g/ml, 大塚アッセイ研究所より提供)を添加(16h, 4°C)し、洗浄後二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス IgGを添加(10min, 23°C)し、洗浄後酵素試薬としてストレプトアビジンペルオキシダーゼ添加(10min, 23°C)し、洗浄後3-amino-3-ethyl-carbazole (AEC)を用いて(以上はDako LSAB Kit 683を使用した)赤色に発色させた。核染色はマイヤー染色を施し、Crystal mount (Cosmo Bio Co., Ltd.)にて封入し光学顕微鏡にて観察した。negative controlとしてnon-immune murine IgGを用いた。positive controlには胎児小腸を用いた。また、連続切片において、アルシャンブルー染色及びヘマトキシリソエオジン染色を行い比較検討した。

5. 血清STN抗原濃度の減衰動態

ウサギの耳静脈より10%胎便懸濁液を1ml/kgの割合で静注した時の血清STN抗原濃度の減衰動態を検討した。

6. 血清STN測定法

ウサギ血清中のSTN抗原濃度は「STN オーツカ」によるcompetitive radioimmunoassay kit(大塚アッセイ研究所)によりduplicateで測定した。

結果

1. ムチン母核構造を認識する5種類の抗体に対する胎児小腸ムチンの反応性(写真1)

TKH-2抗体が胎児小腸ムチンに対し最も反応性がよく、以下CC49, MA61, MA54, B72.3の順に反応性が低下した。

2. 実験的羊水塞栓症モデルにおけるムチン染色

1) 肺の染色

胎便懸濁液のかわりに生理的食塩水を耳静脈より投与したコントロール群のウサギにおいては、TKH-2免疫染色の結果、気管支ゴブレット細胞のみ顆粒状に陽性に染色された。一方、アルシャンブルー染色ではTKH-2免疫染色と同様にゴブ

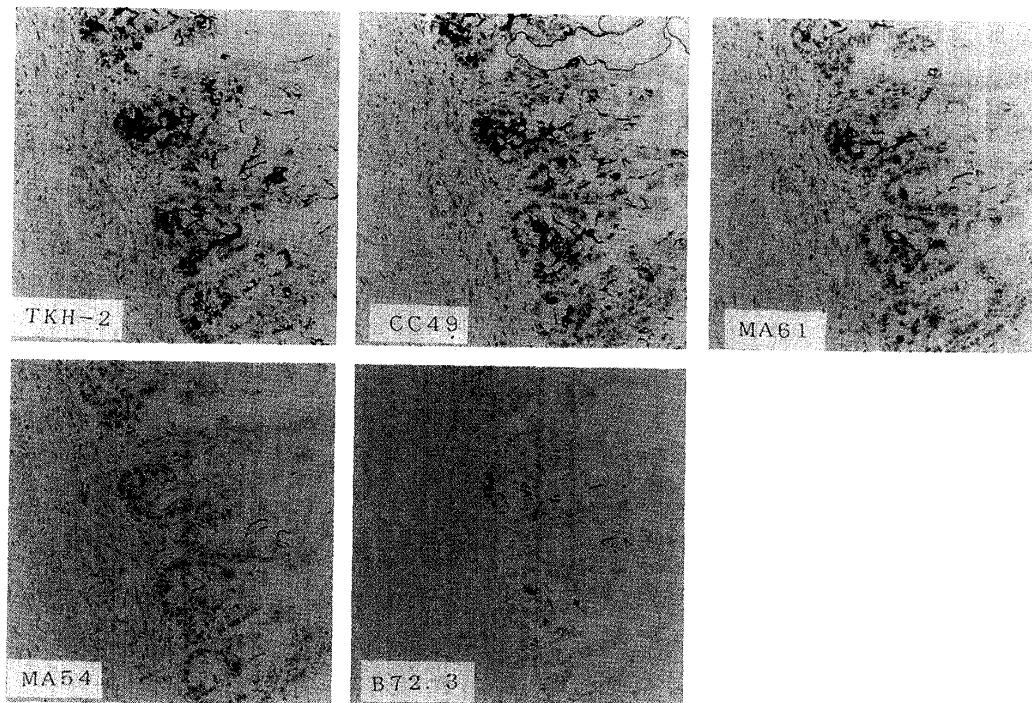


写真1 胎児小腸における5種類のムチン母核構造を認識する抗体を用いた免疫染色
ゴブレット細胞及びその分泌物に染色を認める。胎児小腸（撮影倍率50倍）。

胎便懸濁液(1ml/kg)静注後1時間 肺 (撮影倍率100倍)

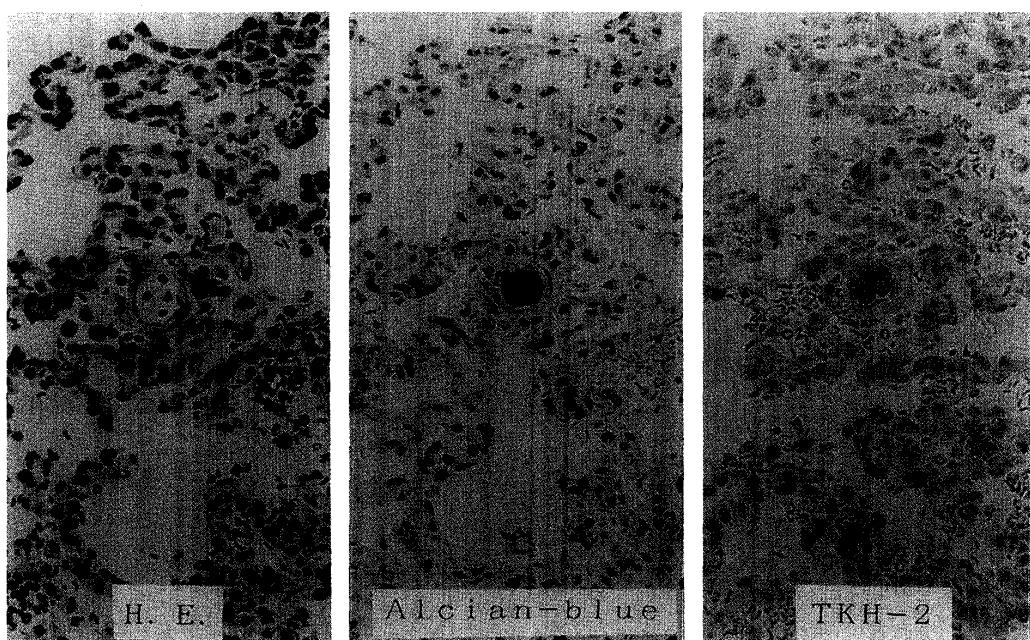


写真2 ウサギに10%胎便懸濁液(1ml/kg)を静注した1時間後の肺におけるH.E.,アルシャンブルー染色及びTKH-2免疫染色
アルシャンブルー染色及びTKH-2免疫染色において肺小動脈内に塞栓した胎便由來のムチンを認める。

1993年5月

大井他

467

胎便懸濁液(1ml/kg)静注後2時間 肝臓 (撮影倍率100倍)

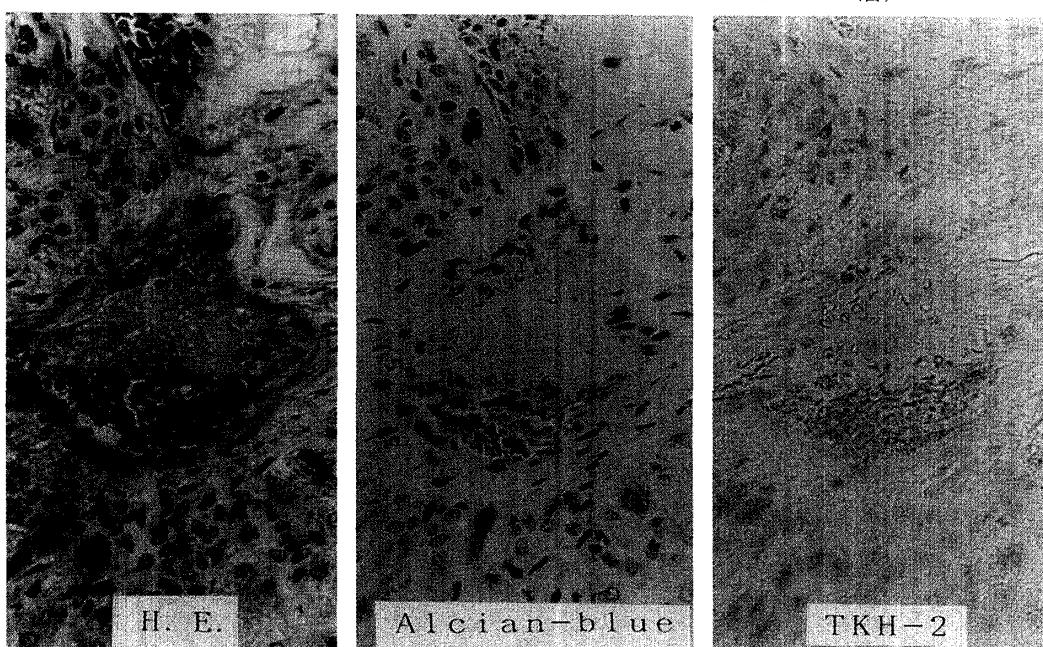


写真3 ウサギに10%胎便懸濁液(1ml/kg)を静注した2時間後の肝臓におけるH.E.,
アルシャンブルー染色及びTKH-2免疫染色
TKH-2免疫染色において肝臓門脈内に淡く染色される胎便由来のムチンを認める。
しかし、同部位においてアルシャンブルー染色及びH.E.染色では、ムチンは識別できない。

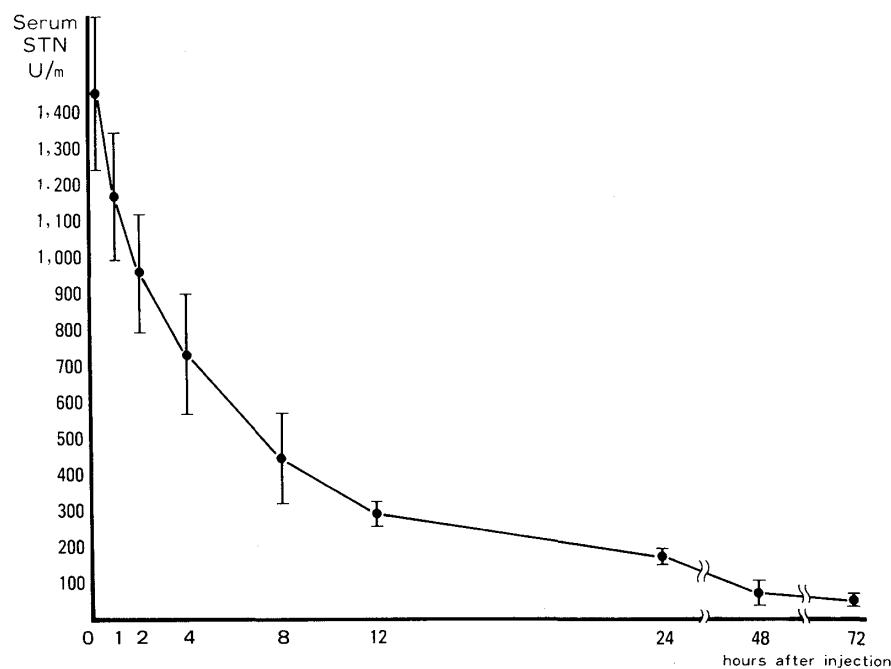


図1 10%胎便懸濁液(1ml/kg)を静注したウサギにおける血清STN抗原濃度減衰曲線

●はmean±SDを示す。

レット細胞に染色が認められる以外に気管支軟骨にも陽性所見を認めた。

胎便懸濁液静注後 1 時間と 2 時間後のウサギにおいては、TKH-2免疫染色の場合、肺小動脈内及び肺末梢動脈内に赤色に染色される胎便由来のムチンを認めた。アルシャンブルー染色においても同部位が青色に染色される(写真 2)。肺静脈内にも弱陽性ながら TKH-2陽性部位を認めた。しかし、アルシャンブルー染色においてはこの部位は染色されなかつた。ヘマトキシリソエオジン染色においては、各時間ともムチンの存在を識別することができなかつた。静注後 4 時間以降のウサギにおいては、今回われわれが使用した胎便懸濁液静注量では、TKH-2及びアルシャンブルー染色法において陽性所見は得られなかつた。

2) 肝臓の染色(写真 3)

胎便懸濁液静注後 1 時間と 2 時間後のウサギにおいては、TKH-2免疫染色の場合、肝門脈内に弱陽性に染色される胎便由来のムチンを認めた。しかし、アルシャンブルー染色ではこの部位は染色されなかつた。静注後 4 時間以降のウサギにおいては、肺と同様に、各染色とも陰性であつた。ヘマトキシリソエオジン染色では、各時間ともムチンを識別することができなかつた。なお、コントロールのウサギにおいては、肝臓動脈及び門脈を含め肝臓実質は全く染色されなかつた。

3) 腎臓の染色

TKH-2免疫染色、アルシャンブルー染色及びヘマトキシリソエオジン染色のいずれも、各時間とも腎臓動脈及び静脈には全く染色されなかつた。

3. 血清 STN 抗原濃度の減衰動態(図 1)

10%胎便懸濁液を静注した直後の血清 STN 濃度は $1,450 \pm 210$ (mean \pm SD) U/ml, 8 時間後に 440 ± 130 U/ml, 12 時間後には 290 ± 30 U/ml となり、以後漸減した。また、半減期は約 4 時間であった。

考 察

羊水塞栓症は、羊水及び胎便成分が母体血中に流入し、胎児成分やムチンなどの物理的因子が血管腔内に塞栓し組織障害を起こし、また羊水中及び胎便中の液性因子が凝固系を異常亢進させ播種

性血管内凝固症候群(DIC)を続発する疾患である^{6~9)}。最近では羊水中の tissue factor が羊水塞栓症の臨床症状である DIC を引き起こす因子の一つであるという考え方¹⁰⁾や、 leukotriene が、羊水塞栓症の重篤性を発症させる要因の一つであるとの推論もある¹¹⁾。羊水塞栓症は、羊水成分及び胎便成分の母体血中流入なしでは発症しない。そこで両者に含まれるムチンに着目し以下の研究を行つた。

ムチン型糖蛋白質は超巨大分子であり、その蛋白質含有量及び糖含有量は動物種により多少量的な違いはあるが、おおよそ 10~35%, 65~90%といわれ、構成糖は N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、シアル酸よりなる。粘液糖蛋白質は、糖鎖はいずれもアセチルグルコサミンを介して、セリン、又はスレオニンに O-グリコシド結合した典型的なムチン型糖蛋白質である。われわれは、ヒト新生児胎便や羊水中にはムチン母核構造を認識する抗体 TKH-2 と反応する STN が多量に(胎便中の 10% を占める、未発表データ)含まれることを確認した。この TKH-2 抗体は、ヒツジ頸下腺抽出液をマウスに免疫し作成されたものであり、卵巣癌、大腸癌及び肺癌などに対する腫瘍マーカーとして現在臨床応用されている¹²⁾。われわれは羊水塞栓症の患者血清中には STN 抗原が高値であることを証明し、STN 抗原の測定は羊水塞栓症の血清学的診断に有用なことを報告した²⁾。

また、同様に TKH-2 抗体以外の一次抗体として、ムチン母核構造を認識する MA61, MA54, CC49, B72.3 を用いて胎児小腸及び大腸における染色性を検討したが、TKH-2 抗体が最もよい反応性を示すことを確認した。さらに、胎便や羊水よりムチンを精製分離し、Dot blot 法にて各種抗体に対するムチンの感度を検討したが、この方法においてもやはり TKH-2 が最も優れていた(未発表データ)。胎便抽出液を用いての ELISA 法においても、TKH-2 抗体が最も反応性及び特異性が高いことを前回報告した。羊水塞栓症を診断するには、5 種類の抗体の中では TKH-2 抗体が血清診断及び組織染色において最も優れていることを再

1993年5月

大井他

469

確認した。

1972年, Attwood¹³⁾は、羊水塞栓症により死亡した患者の肺の染色法にヘマトキシリソエオジン染色は不適当であり、1958年に彼自身¹⁴⁾が発見した染色法であるアルシャンフロキシン染色がよいとの報告をした。このアルシャンフロキシン染色においては、胎便中のムチンがグリーンに染色される。1970年 Peterson and Taylor は、Attwood の染色法及びコロイドイオン染色法にて、羊水塞栓症で死亡した40剖検例の肺小動脈内にすべての症例でムチンを、80%に胎児由来扁平上皮が存在したことを報告した¹⁵⁾。1983年に Garland and Thompson は、ヒトケラチンに対する抗体を用いた免疫組織染色法を報告した¹⁶⁾。この方法により、胎児扁平上皮細胞が染色され羊水塞栓症の病理学的診断の一診断法となつた。現在、これらの方法を用いた病理学的診断が、羊水塞栓症の確定診断となつている。

その病理学的診断において最も多く証明されている胎児成分はムチンである。TKH-2免疫染色を用いた羊水塞栓症の病理学的診断は、胎便中のムチンを染色する以外に清澄羊水の沈渣中のムチンをも染色できる(未発表データ)。羊水塞栓症を発症した患者の羊水が胎便により汚染されていたとの報告は30%前後であり全例が羊水混濁を示していない¹⁷⁾。しかし、われわれの示すTKH-2免疫染色は、清澄羊水中のムチンをも染色できる感度を有するため、羊水中のムチンが肺動静脈に塞栓した場合に胎児由来のムチンを証明する可能性は、アルシャンブルー染色に比較し高いことが推察される。

種族が異なる動物種による実験結果であるが、ウサギにおける血清STN抗原濃度の減衰動態曲線を作成した。この曲線によると、10%胎便懸濁液静注直後の平均血清STN抗原濃度は1,450U/mlであり、1時間後は1,170U/ml、2時間後は960U/ml、4時間後は730U/ml、12時間後は290U/mlであった。実際の羊水塞栓症により死亡した4症例の分娩後6, 10, 12及び14時間に採血した血清STN抗原濃度は各々82, 72, 142及び189U/ml(平均105.6U/ml±SD 59.0U/ml)であつたが、これ

と比較すると、高濃度のSTN抗原、つまり胎便がウサギに静注されたにもかかわらず、ウサギは羊水塞栓症の症状を示さなかつた。これは従来より報告されているように種族の異なる動物にヒトの胎便を静注して羊水塞栓症の動物実験モデルを作成するという方法は必ずしもヒトと同じ状態を再現できないという結果と一致するものと考えられる^{6)18)~20)}。

このムチン性糖蛋白は胎児消化管のうち、食道、胃の粘膜細胞ではTKH-2抗体で染色されず、小腸、大腸のゴブレット細胞においてTKH-2抗体で染色されることより、小腸以下の消化管において分泌され胎児期のみにその合成分泌が亢進していると思われる。また、出生4日目において新生児便中のSTN抗原濃度は極端に減少した(未発表データ)。

従来、羊水塞栓症においてムチンを染色するにあたりアルシャンブルー染色が一般的に行われているが、われわれが行つたTKH-2免疫染色は、胎便及び羊水由来のムチンの存在を診断するのにはアルシャンブルー染色より優れていることが確認された。

文 献

- Roche WD, Norris HJ. Detection and significance of maternal pulmonary amniotic embolism. *Obstet Gynecol* 1974; 43: 729-731
- 大井豪一, 小林 浩, 杉村 基, 寺尾俊彦. 胎便に反応するムチン母核構造を認識する抗体を用いた羊水塞栓症の診断に関する基礎的検討. *日産婦誌* 1992; 44: 813-819
- Itzkowits SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS. Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 197-204
- Itzkowits SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS. Sialosyl Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 1990; 66: 1960-1966
- Kobayashi H, Terao T, Kawashima Y. Clinical evaluation of circulating serum sialyl Tn antigen levels in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1991; 9: 983-987
- Clark SL. New concepts of amniotic fluid embolism: A review. *Obstet Gynecol Surv*

- 1990; 45: 360-368
7. *Esposito RA, Grossi EA, Coppa G, Giangola G, Ferri DP, Angelides EM, Andriakos P.* Successful treatment of postpartum shock caused by amniotic fluid embolism with cardiopulmonary bypass and pulmonary artery thromboembolectomy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 572-574
 8. *Morgan M.* Amniotic fluid embolism. *Anesthesia* 1979; 34: 20-32
 9. *Mulder JL.* Amniotic fluid embolism. An overview and case report. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152: 430-435
 10. *Lookwood CJ, Bach R, Guha A, Zhou X, Miller WA, Nemerson Y.* Amniotic fluid contains tissue factor, a potent initiator of coagulations. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1335-1341
 11. *Azegami M, Mori N.* Amniotic fluid embolism and leukotrienes. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1119-1124
 12. *Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl 2-6α-N-Acetylgalactosaminyl (sialosyl Tn) epitope. *Cancer Res* 1988; 48: 2214-2220
 13. *Attwood HD.* Amniotic fluid embolism. *Pathol Ann* 1972; 7: 145-172
 14. *Attwood HD.* The histological diagnosis of amniotic fluid embolism. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76: 211-215
 15. *Peterson EP, Taylor HB.* Amniotic fluid embolism. An analysis of 40 cases. *Obstet Gynecol* 1970; 35: 787-793
 16. *Garland IWC, Thompson WD.* Diagnosis of amniotic fluid embolism using an antiserum to human keratin. *J Clin Pathol* 1983; 36: 625-627
 17. 寺尾俊彦, 渥美正典, 小山田浩子. 羊水塞栓症. *産婦の世界* 1983; 35: 59-66
 18. *Clark SL.* Amniotic fluid embolism. *Clin Perinatal* 1986; 13: 801-811
 19. *Richards DS, Carter LS, Corke B, Spielman F, Cefalo RC.* The effect of human amniotic fluid on the isolated perfused rat heart. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 210-214
 20. *Stolte L, Kessel H, Seelen J, Eskes T, Wagatsuma T.* Failure to produce the syndrome of amniotic fluid embolism by infusion of amniotic fluid and meconium into monkey. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98: 694-697
- (No. 7330 平5・1・18受付)