

切迫早産におけるウリナスタチン膣座剤の効果

浜松医科大学産科婦人科教室

金山 尚裕 リンバラパス・シャイナロン
 成瀬 寛夫 山本 信博 藤城 卓
 前原佳代子 森田 泰嗣 寺尾 俊彦

The Effect of Granulocyte Elastase Inhibitor (Urinastatin) Vaginal
 Suppository on Patients with Imminent Premature Delivery

Naohiro KANAYAMA, Limvarapuss CHINARONG, Hiroo NARUSE,
 Nobuhiro YAMAMOTO, Suguru FUJISHIRO, Kayoko MAEHARA,
 Yasutsugu MORITA and Toshihiko TERAO

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

概要 切迫早産において頸管に浸潤した顆粒球から放出される顆粒球エラスターゼ（エラスターゼ）が頸管の熟化、開大に密接に関係することが知られている。エラスターゼのインヒビターであるウリナスタチン（UTI）の膣剤が切迫早産の治療に有効であるかを検討した。

43例の切迫早産を4群に分類し次の治療法を行った。A群(N=12)：Ritodorine点滴，B群(N=9)：UTI(1,000U)頸管内投与，C群(N=14)：Ritodorine点滴+UTI頸管内投与，D群(N=8)：Ritodorine点滴+UTI頸管内投与+全身抗生物質療法。これら4群のエラスターゼ値は治療前A群 $0.76 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ (Mean \pm SD)，B群 $0.93 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ ，C群 $0.85 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ ，D群 $0.90 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ で各群間で有意差を認めなかった。治療開始後(3日目から7日目)のエラスターゼ値はA群 $0.75 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$ ，B群 $0.27 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ ，C群 $0.27 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ ，D群 $0.30 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ となりB，C，D群は著明に下降した。子宮収縮の改善度を検討すると，子宮収縮が30分に1回以下になるまでの時間は，A群 65 ± 66 分，B群 375 ± 336 分，C群 70 ± 64 分，D群 58 ± 53 分で，B群が有意($p < 0.05$)に時間を要した。4日以上子宮収縮抑制が得られた時点で上記治療を中止した。その後の子宮収縮の再発率はA群58%，B群11%，C群14%，D群13%でA群の再発率が高かった。

以上よりUTI膣剤の頸管内投与は頸管内エラスターゼ量を低下させ子宮収縮抑制の補助療法として極めて有用であることが判明した。

Synopsis Cervical maturation, dilatation and uterine contraction in imminent premature delivery are closely related to chemical mediators from activated granulocytes which infiltrate into the cervix. It is known that urinastatin (urinary trypsin inhibitor, UTI) inhibits many kinds of chemical mediators from granulocytes and macrophages such as granulocyte elastase (elastase) and interleukin 1. We examined the effect of a UTI suppository on uterine contraction and the elastase level in cervical mucus in cases of imminent premature delivery.

We treated 43 cases of imminent premature delivery with tocolysis index 3 or 4 with 4 kinds of therapy: Group A (N=12): ritodorine drop infusion therapy; Group B (N=9): daily UTI suppository (1,000U) therapy; Group C (N=14): daily UTI suppository + ritodorine drop infusion therapy; Group D: daily UTI suppository + ritodorine drop infusion + antibiotics (oral cepharosporine) therapy. The elastase level of cervical mucus before treatment was $0.76 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ in group A, $0.93 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ in group B, $0.85 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ in group C and $0.90 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ in group D. There was no significant difference between these groups. The elastase level in cervical mucus was $0.75 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$ in group A, $0.27 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ in group B, $0.27 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ in group C and $0.30 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ in group D, respectively. The elastase level was decreased significantly in groups B, C and D. The time taken to depress uterine contraction was 65 ± 66 min in group A, 375 ± 336 min in group B, 70 ± 64 min in group C and 58 ± 53 min in group D, respectively. After tocolysis continued for 4 days, we stopped the treatments and then observed the uterine contraction. The recurrence rate of uterine contraction was 58% in group A, 11% in group B, 14% in group C and 13% in

group D.

These data showed that the UTI suppository depressed uterine contraction and the elastase level in cervical mucus. We conclude that UTI therapy is very effective in treating imminent premature delivery.

Key words: Imminent premature delivery • Urinary trypsin inhibitor • Granulocyte elastase • Vaginal suppository

緒 言

頸管熟化の機序として、顆粒球が頸管に浸潤しその顆粒球からエラスターゼ等のケミカルメディエーターが放出され、それが頸管のコラーゲンを分解し頸管の熟化が起こることが知られている⁸⁾⁹⁾。切迫早産においても頸管の軟化に伴い顆粒球が浸潤し頸管粘液中のエラスターゼ値が高値をとることが報告されている¹⁰⁾。ことに絨毛羊膜炎による切迫早産は多量の顆粒球が頸管に認められエラスターゼ値は極めて高値をとる²⁾。またそのような症例は tocolysis に抵抗性で早産になる率が高いことが明らかになつてきた。我々は頸管粘液中エラスターゼ量の測定法を開発しその値の高い例ほど早産になる率が高いことを報告した¹⁰⁾。そこでエラスターゼは、切迫早産の頸管の軟化、開大における一つの重要なケミカルメディエーターであると考えられてきている⁹⁾。

このように切迫早産の主たる発症原因の一つは頸管に浸潤してきた顆粒球から放出されるさまざまなケミカルメディエーターであることが明らかになつてきた。しかしその治療法に関しては β_2 stimulant による子宮平滑筋抑制剤の全身投与が主体で、ケミカルメディエーターの抑制に対する治療法は今まで行われていなかった。そこで我々はエラスターゼのインヒビターでありヒト尿から抽出されたウリナスタチン (urinary trypsin inhibitor, UTI) の腔座剤を作成し、それが切迫早産の治療に有効であるか基礎的、臨床的検討を行つた。

研究方法

基礎的検討

UTI (ミラクリッド®) は (持田, 東京), 顆粒球エラスターゼ (Calbiochem, USA), 顆粒球エラスターゼ合成基質 S2484 (第一化学, 東京), Lipopolisaccharide (LPS) (Sigma, USA), Interleukin 1β 測定 kit (大塚, 徳島), TNF 測定 kit

(大塚, 徳島) を使用した。

1) UTI のエラスターゼ抑制

精製したエラスターゼ (160, 320U/ml) を磷酸緩衝液 1ml に溶解した。これに各種濃度の UTI (10, 100, 1,000U) を加え 10 分間 37°C でインキュベートし、その溶液を 50 μ l 取りエラスターゼの合成基質 S2484 (50 μ mol) と Tris buffer 1.5M NaCl pH 8.4, 50 μ l を混合し経時的に 405nm の吸光度を BIO RAD EIA reader で測定した。エラスターゼ活性は、エラスターゼ活性 = $\Delta A \times 305$ で求めた²⁾。つぎにバンキングしてある頸管粘液を用いて実験を行つた。18, 40, 124U/ml のエラスターゼ活性を持つ頸管粘液に 1ml に UTI 1,000U を加え経時的にエラスターゼの変化を測定した。

2) UTI によるマクロファージ産生 Interleukin 1β , tumor necrofizing factor (TNF) 抑制

正常非妊婦から血液を 50ml 採取し Ficoll 法にて単球を分離し洗浄後、Hanks' 緩衝液中で 2×10^6 /ml に調整した。これに UTI (0~100U) を加え 37°C, 4hr CO₂ incubater 内でプレインキュベーションした。その後 LPS (10 μ g/ml) を添加し 37°C, 18hr CO₂ incubater 内でインキュベートした。100 \times g で遠心後上清を採取し、上清中 Interleukin 1β , TNF を Interleukin 1β kit, TNF kit にて測定した。

UTI 腔座剤の作成

UTI 腔剤はウレテブゾール W35 (ミツバ) を 55°C で 300ml 溶解した。Vortex にて粉末化した UTI 30万単位 (ミラクリッド®, 持田) を添加し攪拌した。それを 1ml (1,000U) ずつ採取し座薬用のコンテナーに入れ 4°C に冷却した。以上の操作はすべて無菌的に行つた。我々は頸管粘液中エラスターゼ値を測定してきたが、その中でエラスターゼ活性が 300U/ml を越えるものは存在しなかつたので腔剤の UTI 含量は 1,000U とした。

EIA によるエラスターゼ測定

表1 Characteristics of cases

	group A (N=12)	group B (N=9)	group C (N=14)	group D (N=8)
ages	25±4.0	27±4.3	25±5.1	24±4.6
parity	0.6±0.7	1.1±1.0	0.7±0.7	0.8±0.5
gestational weeks at admission	29±2.6	30±2.2	30±2.6	29±2.3
tocolysis index at admission	3.4±0.5	3.5±0.5	3.5±0.5	3.5±0.5

あらかじめエラスターゼの polyclonal 抗体 (Bindingsite 社, USA) でコートしてある well にサンプルを添加した (23°C, 1hr). サンプルは綿棒にて採取した頸管粘液を使用した. それを 1ml の磷酸緩衝液 (PBS) 中にて攪拌し 100×g で遠心する. その上清 50μl を 96穴の well に添加した (37°C, 1hr). PBS にて洗浄後, ペルオキシダーゼ標識エラスターゼ抗体にて 23°C, 1hr インキュベートした. 洗浄後, o-phenylenediamine を加え発色させ 492nm の吸光度を BIO RAD EIA にて測定した¹⁰⁾.

臨床的検討

妊娠 24 週から 35 週までの PROM のない切迫早産例で Baumgarten et al. の Tocolysis Index 3~4 の 43 例を対象にした. それらが無作為に 4 群に分類し次の治療法を行った. A 群 (N=12): Ritodrine 点滴 (50~300μg/ml), B 群 (N=9): 連日の UTI 腔剤 (1,000U) 頸管内投与, C 群 (N=14): Ritodrine 点滴 (50~300μg/ml) + 連日 UTI 腔剤 (1,000U) 頸管内投与, D 群 (N=8): Ritodrine 点滴 (50~300μg/ml) + 連日 UTI 腔剤 (1,000U) 頸管内投与 + 全身抗生物質療法 (セフェム系経口あるいは静注). これら 4 群の症例について分析したのが表 1 である. 分娩回数, 年齢, Tocolysis Index に差は認めなかつた. そしてこれら 4 群の転帰について検討した.

さらに A 群, B 群については頸管粘液を経時的に採取し, 頸管液中エラスターゼ量を EIA にて測定しその変化をみた.

また分娩後胎盤を採取し胎盤の病理学的検査を行い, 絨毛羊膜炎の有無を検討した.

研究結果

UTI とエラスターゼのインキュベーションの結果を図 1 に示した. UTI の濃度依存的にエラス

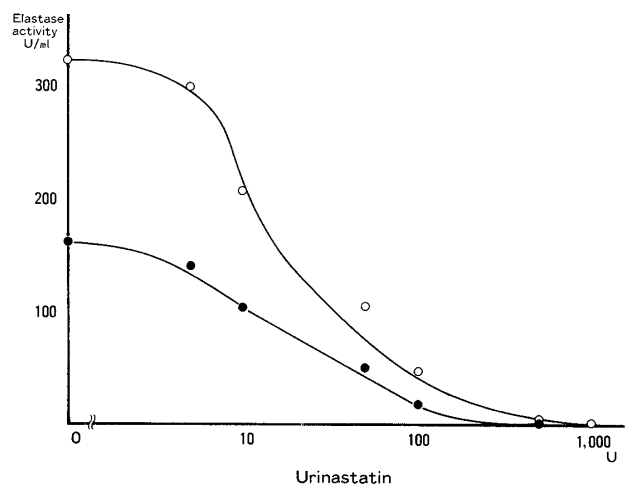


図1 各種濃度ウリナスタチンによる精製エラスターゼの抑制

○320U/ml の精製エラスターゼ, ●160U/ml の精製エラスターゼ

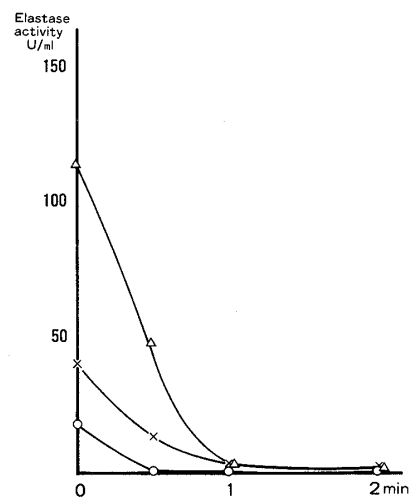


図2 ウリナスタチンによる各種頸管粘液中エラスターゼ活性抑制時間

○18U/ml の活性を持つ頸管粘液, ×40U/ml の活性を持つ頸管粘液, △124U/ml の活性を持つ頸管粘液

ターゼ活性を抑制した. 1,000U の UTI は 320U/ml, 160U/ml のエラスターゼを 100% 抑制した. 図 2 は UTI と実際の頸管粘液中エラスターゼの抑

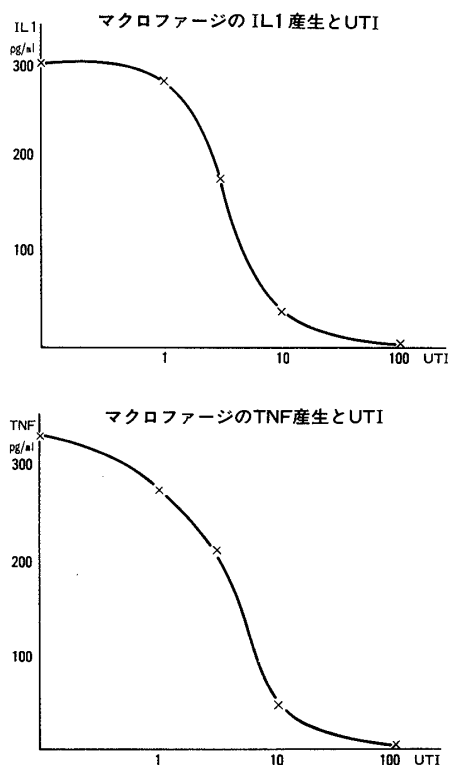


図3 ウリナスタチンとマクロファージ産生 IL1 β (上), TNF (下) との関係

表2 The change of granulocyte elastase level in cervical mucus

	before treatment ($\mu\text{g/ml}$)	after treatment + ($\mu\text{g/ml}$)
group A (ritodrine)	0.76 ± 0.40	0.75 ± 0.47
group B (UTI)	0.93 ± 0.43	$0.27 \pm 0.35^*$
group C (ritodrine+UTI)	0.85 ± 0.40	$0.27 \pm 0.33^*$
group D (ritodrine+UTI + antibiotics)	0.90 ± 0.41	$0.30 \pm 0.19^*$

* $p < 0.01$ + 3~7 days after treatment started

制をみたものである。1,000UのUTIは各種の頸管粘液のエラスターゼ活性(18, 40, 124U/ml)を約1分にて100%抑制した。図3はUTIによるマクロファージが産生するInterleukin 1 β , TNFへの影響をみたものである。UTIは濃度依存的にInterleukin 1 β , TNFの産生あるいは放出を抑制し、100UのUTIによりマクロファージが産生および放出するInterleukin 1 β , TNFは完全に抑制された。表2に臨床例の各群のエラスターゼ値の

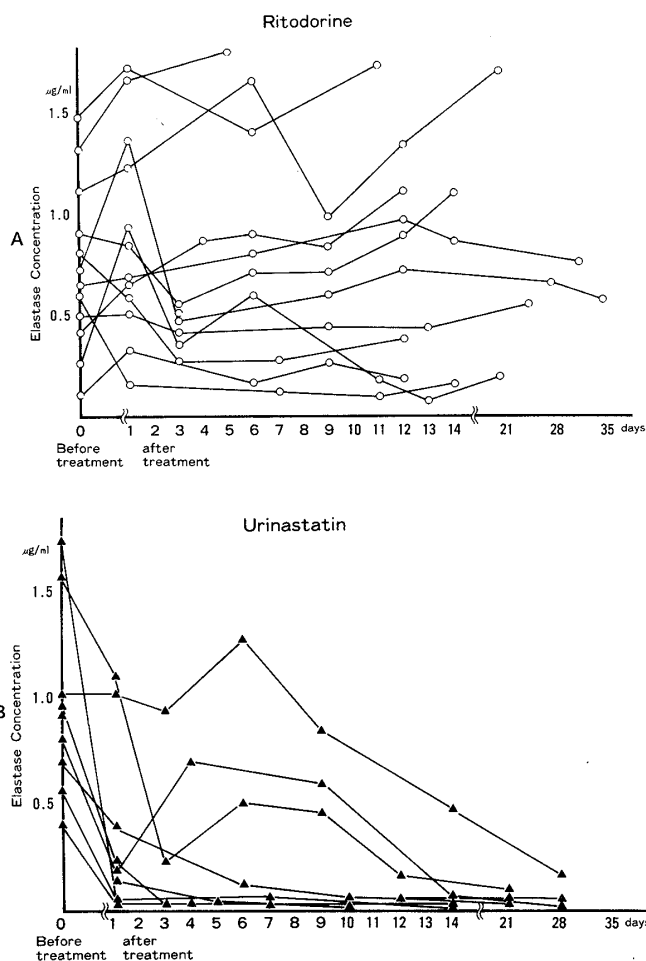


図4A Ritodrine 単独投与群の頸管粘液中エラスターゼの変化, 4B Urinastatin 単独投与群の頸管粘液中エラスターゼの変化

変化を示した。エラスターゼ値は治療前A群 $0.76 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD), B群 $0.93 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$, C群 $0.85 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$, D群 $0.90 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ で各群間で有意差を認めなかつた。治療開始後(3日目から7日目)のエラスターゼ値はA群 $0.75 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$, B群 $0.27 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$, C群 $0.27 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$, D群 $0.30 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ となりB, C, D群は著明に下降した。図4A, BにA群, B群の各症例のエラスターゼ値の変化を示した。A群ではエラスターゼ値がほとんど変化していないが, B群では多くの症例で投与後1日以降に著明に低下していることがわかる。図5に子宮収縮の改善度, および子宮収縮の再発率をみた。改善度は子宮収縮が30分に1回以下になるまでの時間を記した。A群 65 ± 66 分, B群 375 ± 336 分, C群

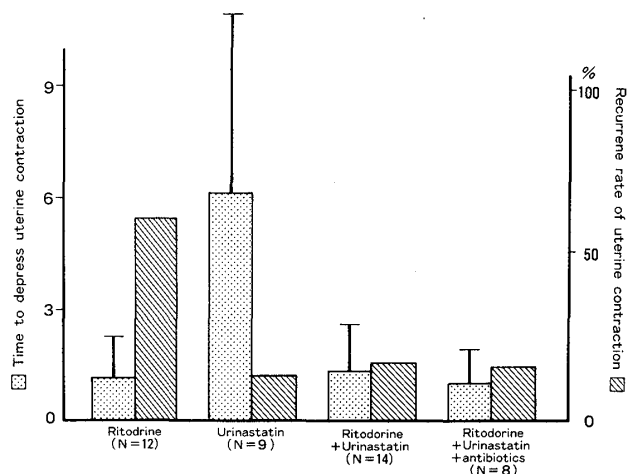


図5 各種治療法と子宮収縮抑制時間と子宮収縮再発率

子宮収縮抑制時間は子宮収縮（30秒以上）が30分に1回以下になるまでの時間，子宮収縮再発は4日以上子宮収縮が抑制された後治療中止し，その後子宮収縮が30分に1回以上発現したものを。

70±64分，D群58±53分で，B群が有意に時間を要した（ $p<0.05$ ）。4日以上子宮収縮抑制が得られた時点で上記治療を中止した。その後の子宮収縮の再発率を検討するとA群（7/12例）58%，B群（1/9）11%，C群（2/14）14%，D群（1/8）13%でA群の再発率が高かった。再発例では再度同じ治療を施行したが，A群で3例（それぞれ絨毛羊膜炎，前期破水，胎児仮死）早産に至った。B，D群では早産はなく，C群で絨毛羊膜炎による早産が1例あった。

胎盤の病理学的検索では，絨毛羊膜炎（Blanc II，III）を認めたのはA群で1例，C群で1例であった。

考 案

切迫早産，前期破水の原因として絨毛羊膜炎が注目されている。今井らは切迫早産の26%，前期破水の58%に絨毛羊膜炎（Blanc II，III）が認められたと報告している¹⁾。絨毛羊膜炎の前段階としては絨毛羊膜下炎（subchorionitis，Blanc I）や頸管炎が考えられるので切迫早産や前期破水がそれらを伴う率はさらに高いと予想される。頸管粘液中顆粒球エラスターゼと切迫早産の関係を検討すると切迫早産の70%に頸管粘液中エラスターゼ高値が認められた¹⁰⁾。このことから切迫早産

の主たる原因は頸管の炎症およびそれから波及した絨毛羊膜炎であると推測される。

これらの観点を踏まえて切迫早産の治療について考えてみると，現時点での切迫早産の主な治療は β_2 stimulantによる子宮収縮抑制であり絨毛羊膜炎に対する治療はほとんどされていない。絨毛羊膜炎・頸管炎の原因の多くは細菌感染による。切迫早産の頸管開大は細菌に対し遊走してきた顆粒球から放出されるプロテアーゼの直接作用がまず考えられる。マクロファージから放出されたInterleukin 1やTNFなどのサイトカインが頸管の線維芽細胞に働きその結果，産生されたコラゲナーゼも頸管開大に深く関与している⁶⁾⁷⁾。さらにマクロファージから放出されたサイトカインが線維芽細胞に作用しプロスタグランディンを合成し子宮収縮が起こると考えられている。このように切迫早産の病態に白血球のケミカルメディエーターが密接に関連していることは明白である。そこで我々はこのケミカルメディエーターを抑制する物質としてUTIを採用した。UTIはエラスターゼを主とする強力な多価酵素プロテアーゼインヒビターであると同時にInterleukin 1やTNFに対しても抑制的に働くことが確かめられている⁴⁾。したがって切迫早産の治療薬として理論的に優れているといえる。UTI 1,000Uは320U/mlのエラスターゼ活性を1分で100%抑制し，124U/mlのエラスターゼを含む頸管粘液を完全に抑制した。そこでUTI 1,000Uは頸管粘液中エラスターゼを抑制する1日量としては充分であると考えられた。またUTIはヒト胎児尿，羊水中に多量に含まれており，胎児由来蛋白と考えられ安全性は高いと考えられる³⁾。そこでUTI 1,000Uを含む腔錠を作成し切迫早産に有効か否か検討した。連日UTI腔錠投与群は子宮収縮抑制までの時間は要するものの12時間以内にRitodrin点滴と同様に子宮収縮はほとんど抑制された。さらに重要なことは連日UTI腔錠投与群は一旦子宮収縮が抑制されるとUTI腔錠投与を中止しても子宮収縮が再発することがきわめて少ないことが判明した。一方Ritodrine点滴単独療法は子宮収縮抑制までの時間は速やかであるが，Ritodrin点滴中

止後の子宮収縮再発率は約60%にも及んだ。このことは Ritodorin 点滴療法は切迫早産における対照的治療法と考えられる。一方 UTI 腔剤療法はより根本的療法に近いものと考えられる。ただし今回の検討はあくまで Tocolysis Index 3~4 と限定したものであり進行した切迫早産 (Tocolysis Index 5点以上) においては局所療法だけでは不十分と考えられるのでさらに検討が必要であろう。切迫早産中等度 (Tocolysis Index 3~4) における UTI 腔剤の投与は切迫早産の子宮収縮抑制に極めて効果のあることが判明した。また図には示していないがエラスターゼ値が高値の切迫早産ほど UTI による子宮収縮抑制が良好になる傾向が強いことが認められた。

また分娩時胎盤の病理学的検索においても絨毛羊膜炎 II, III度を認めたのは2例(A群1例, C群1例)のみであった。しかし切迫早産で頸管内エラスターゼ高値のものが多いことから切迫早産のうちかなりの症例に早期の絨毛羊膜炎・頸管炎が合併していると考えられる。したがってそのような症例にはエラスターゼインヒビターである UTI が効果的であったと考えられる。

妊娠後期には頸管に好中球, マクロファージの浸潤がみられる。そこから Interleukin 等のサイトカインが子宮筋細胞のカルシウムレベルを上昇させ、また α レセプターを上昇させ β レセプターを下降させることにより筋細胞中 cAMP が低下し磷酸アクトミオシンが増加する。その結果子宮収縮が発現すると考えられている⁵⁾。Ritodorin は β 刺激剤であるのに対して UTI はサイトカイン (Interleukin 1, TNF) の抑制剤である。しかるに UTI は子宮収縮機構のより上位を抑制していることになる。この作用機序の違いが寛解導入, 再発率に深く関与していると思われる。細胞内カルシウムの上昇, α レセプターの増加は Interleukin のほかに胎盤から産生されるホルモンも関与している。たとえばエストロゲン/プロゲステロン比の上昇は子宮収縮に密接に関連する⁵⁾。UTI が内分泌系にも働き子宮収縮を抑制しているかは不明である。

プロテアーゼインヒビターである UTI 腔座剤

が切迫早産の治療に極めて効果的であることが判明した。そのメカニズムとしてエラスターゼを抑制することにより頸管の熟化・開大を抑制し、またサイトカインの抑制によりプロスタグランディン産生を減少させ、子宮収縮を抑制することが考えられた。従来の β_2 stimulant 療法とこの UTI 腔剤療法の併用により切迫早産の治癒率の改善が期待される。

UTI 腔剤の作成に協力していただいた持田製薬に深謝する。

文 献

1. 今井史郎, 中山雅弘: 早期(妊娠32週未満)早産の成因と胎盤病理の相関性に関する研究. 日産婦誌, 40: 861, 1988.
2. 金山尚裕, 寺尾俊彦: 切迫早産例における頸管内顆粒球エラスターゼ活性と予後との関連. 日産婦誌, 40: 917, 1988.
3. 寺尾俊彦, 金山尚裕: PROMの成因に関する生化学的アプローチ. 周産期学シンポジウム, 4: 76, 1986.
4. Endo, S., Inada, K., Taki, K., Hoshi, S. and Yoshida, M.: Inhibitory effects of urinastatin on the production of cytokines: Implications for the prevention of septic shock. Clin. Therap., 12: 323, 1990.
5. Huszar, G. and Naftolin, F.: The myometrium and uterine cervix in normal and preterm labor. N. Engl. J. Med., 311: 571, 1984.
6. Ito, A., Goshowaki, H., Sato, T., Mori, Y., Yamashita, K., Hayakawa, T. and Nagase, H.: Human recombinant interleukin-1 α -mediated stimulation of procollagenase production and suppression of biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases in rabbit uterine cervical fibroblasts. F.E.B.S., 234: 326, 1988.
7. Ito, A., Sato, T., Iga, T. and Mori, Y.: Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. F.E.B.S., 269: 93, 1990.
8. Junqueira, L.C.C., Zugaib, M. and Montes, G.S.: Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. Am. J. Obstet. Gynecol., 138: 273, 1980.
9. Kanayama, N. and Terao, T.: The relationship between granulocyte elastase-like activity of cervical mucus and cervical maturation. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 70: 29, 1991.
10. Kanayama, N. and Terao, T.: Granulocyte elastase in cervical secretions is a sensitive marker for preterm delivery. J. Perinat. Med., 19: 141, 1991.

(特別掲載 No. 7157 平4・1・13受付)