

卵膜の修復機転におけるフィブロネクチンの意義

浜松医科大学産科婦人科学教室 (主任: 寺尾俊彦教授)

安藤 勝秋 金山 尚裕 寺尾 俊彦

The Role of Fibronectin in Repairing Fetal Membrane

Katsuaki ANDO, Naohiro KANAYAMA and Toshihiko TERAO

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

概要 卵膜の裂口部分の修復が前期破水の根本的治療法であるが、現時点では一度破綻した卵膜の修復は難しい。最近、創傷治癒の特に初期の段階では、フィブロネクチンの関与が示唆されているが卵膜の修復におけるフィブロネクチンの役割についての報告はいまだない。そこでわれわれは、破綻した卵膜の修復におけるフィブロネクチンの意義について検討した。妊娠15週より30週の9例の妊婦より無菌的に卵膜を採取し、以下の4群の条件下で卵膜が修復され得るか否かを検討した。A群: フィブリノーゲンとトロンビンで裂口部分を被覆し培養したところ、フィブリンは卵膜に接着せず、したがって裂口部分は全く被覆されなかつた。B群: フィブリノーゲンとトロンビンにヒトフィブロネクチンを添加して裂口部分を被覆し培養したところ、フィブリンは強固に卵膜に接着し、裂口部分はフィブリンにより被覆されたものの、裂口部分の面積に変化はなかつた。C群: ヒトフィブロネクチンを培養液に添加し卵膜を培養したところ、著明な線維芽細胞の増殖、コラゲン線維の増生が認められ、裂口部分は狭小化した。D群: 培養液のみで卵膜を培養しコントロール群としたところ、創断端へのフィブロネクチンの集積、コラゲン線維の増生が認められたが、明らかな裂口部分の狭小化は認められなかつた。同様の実験を卵膜から絨毛膜を剥離して羊膜のみで行ったところ、フィブリンのみでは羊膜に接着せず、フィブロネクチンを添加するとやはり強固に接着した。再生、修復像はいずれの群でも認められなかつた。以上よりフィブリンにフィブロネクチンを添加することにより裂口部分の被覆が可能となること、卵膜の修復機転においては絨毛膜が重要な役割を演ずること、自然の修復過程において他の組織同様フィブロネクチンが関与すること、フィブロネクチンに卵膜の組織修復促進作用のあることが示唆された。

Synopsis The fibrin adhesion technique is being recognized as a way to prevent amniotic fluid leakage in the case of preterm premature rupture of the fetal membrane (PROM). However, the effect of fibrin adhesion is still not clear. The aim of this study is to investigate the implications of fibronectin in repairing the fetal membrane. We divided 9 normal fetal membranes into 4 groups. In all the groups, an incision was made in the membrane with a sterile knife.

Group A: The incisions in the membranes were sealed with fibrinogen and thrombin (N=9).

Group B: The incisions in the membranes were sealed with fibrinogen and thrombin with fibronectin (N=9).

Group C: Fibronectin was added to the culture medium containing fetal membranes (N=9).

Group D: The fetal membranes were cultured in the medium alone (N=9).

All membranes were cultured for 6 days in 10% fcs added to MEM and analyzed histologically.

In group A, fibrin clots did not attach to the membranes at all. In group B, fibrin clots attached closely to the membranes. In group C, fibroblasts increased remarkably at the incision sites on the fetal membranes. In group D, fibronectin accumulated at the incision sites on the fetal membranes.

These results suggest that fibronectin is important in repairing fetal membrane.

Key words: Fibrin adhesion technique • Preterm PROM • Fibronectin • Fibrin sealant • Fetal membrane

緒言

妊娠37週未満の前期破水 (preterm PROM) の管理は、発症時妊娠週数、胎児の肺成熟度、感染の有無、胎内環境条件、胎児 well-beingなどを考慮し保存的療法か積極的な児娩出かが決定される

が、一般的に妊娠30~32週以前は胎児の未熟性から、保存的療法が選択されている。しかし、妊娠20~25週の preterm RPOM の管理はいまだに生存可能な時期まで保存的療法で妊娠を維持することが困難であり、たとえ維持できても Wilson-

Mikity 症候群や胎児形成不全症候群(肺低形成, 顔面四肢異常など)等の発生リスクが高い。これは羊水の漏出や感染に伴う陣痛発来の抑制が困難なためと考えられる。これを克服するためには羊水漏出の防止と感染防止が重要な鍵となる。従来より施行されている治療法としては, 抗生物質の投与, 腔内の消毒による上行性感染の予防, β_2 stimulant, マグネシウム製剤, サイクロオキシゲナーゼインヒビター製剤の投与による子宮収縮抑制, プロムフェンスによる羊水漏出の抑制, 生理食塩液による人工羊水の補充等が行われてきた。preterm RPOM の根本的治療は裂口部分の修復による羊水漏出と感染の防止にあり, Baumgarten and Moser¹⁾のフィブリン・アドヘージョン法はその根本的治療法の一つとして考案された。フィブリン・アドヘージョン法とは頸管縫縮術後, フィブリノーゲン, トロンビン製剤である Tisucol[®](本邦ではベリプラスト[®]P)を子宮頸管内に注入し, fibrin clot を sealant として用い羊水の漏出を防ぎ, 破綻した卵膜の再生, 修復を期待する方法であり, 本邦でも久保ら²⁾³⁾の報告がある。しかし, sealant として用いたフィブリンがどのように作用した変化するのか, 卵膜の裂口部分は再生して閉鎖するのかなど fibrin clot のいまだ不明な部分も多く, また, われわれの追試では必ずしも満足な治療成績が得られなかつた。

最近, 創傷治癒の特に初期の段階でフィブロネクチンの関与が示唆されている。そこで今回は

フィブロネクチンが持つとされる細胞接着, 伸展の促進作用と組織修復作用が卵膜の再生, 修復過程においてどのような役割を果たすのかを実験的に検討した。

材 料

帝王切開時あるいは中期中絶時に無菌的に採取した妊娠15週から30週の卵膜9例を対象とした。

方 法

実験1. 卵膜(羊膜と絨毛膜)を生理食塩液にて洗浄後, メスにて鋭的に約0.5mmの裂口部分を作製した。

A群: 裂口部分をフィブリノーゲン40mg と トロンビン150単位(ベリプラスト[®]P; ヘキストジャパン)で被覆し培養。

B群: 裂口部分をフィブリノーゲン40mg と トロンビン150単位(ベリプラスト[®]P; ヘキストジャパン)にヒトフィブロネクチン0.1mg (fibronectin; Sigma., U.S.A.)を添加して裂口部分を被覆し培養。

C群: 培養液1ml に対し, ヒトフィブロネクチン0.2mg (fibronectin; Sigma., U.S.A.)を添加し卵膜を培養。

D群: 卵膜を培養液のみで培養。

実験2. 卵膜より絨毛膜を手動的に剝離し羊膜のみとしたのち, 実験1と同様に裂口部分を作製し, A, B, C, Dの4群に分類した。

10% fetal calf serum (Gibco., U.S.A.) 添加 MEM 液(ニッスイ)10ml にて5%CO₂下37℃

表1 各種処理による組織反応の結果

群	組 織	組織への接着	線維芽細胞の増殖	I型コラーゲンの増生	III型コラーゲンの増生
A (N=9)	羊 膜	-	-	-	-
	絨毛膜	-	+	+	±
B (N=9)	羊 膜	+++	-	-	-
	絨毛膜	+++	++	++	±
C (N=9)	羊 膜	/	±	-	-
	絨毛膜	/	+++	+++	+
D (N=9)	羊 膜	/	-	-	-
	絨毛膜	/	+	+	±

A: フィブリン(フィブリノーゲン+トロンビン)で裂口部分を被覆

B: フィブリン(フィブリノーゲン+トロンビン)+フィブロネクチンで裂口部分を被覆

C: 培養液にフィブロネクチンを添加 D: 培養液のみ

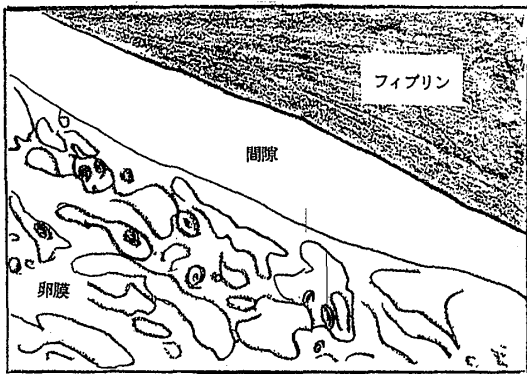


図 1

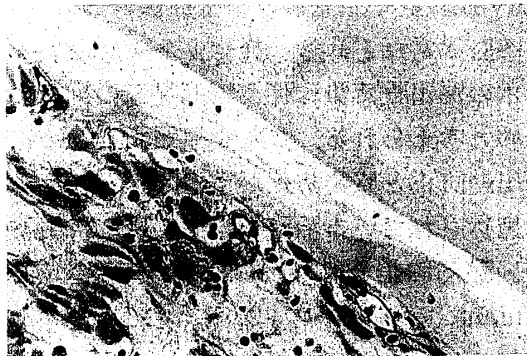


写真 1

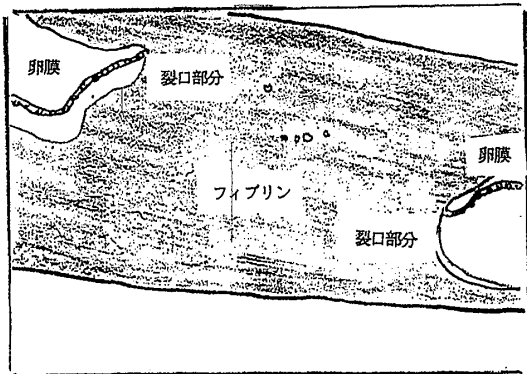


図 2

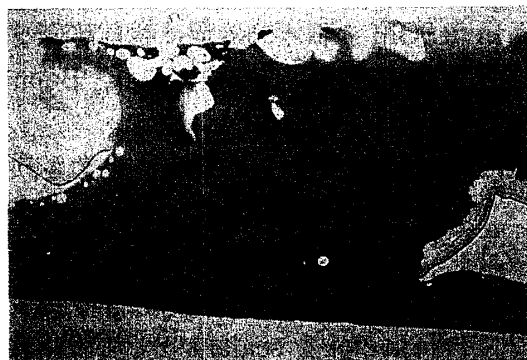


写真 2

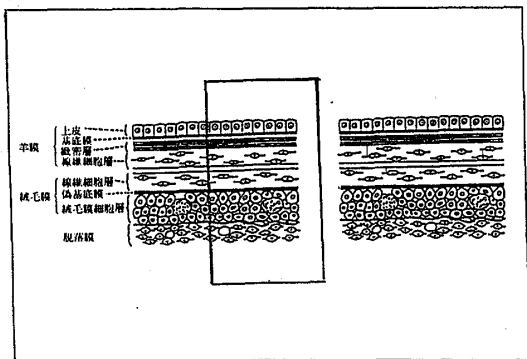


図 3



写真 3



写真 4

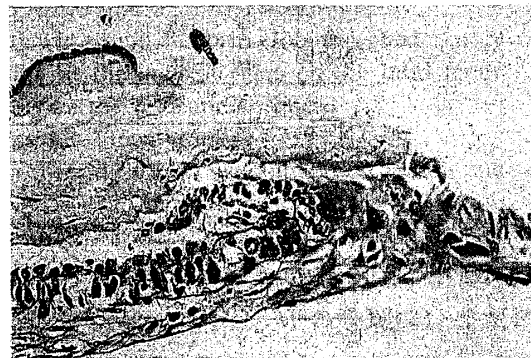


写真 5

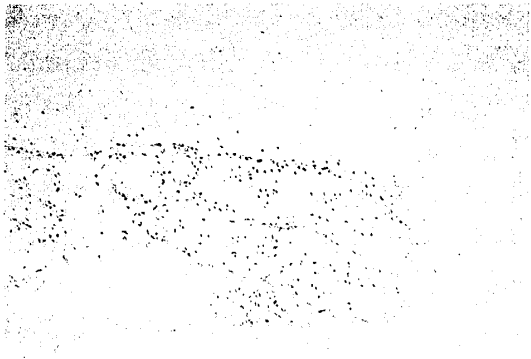


写真6

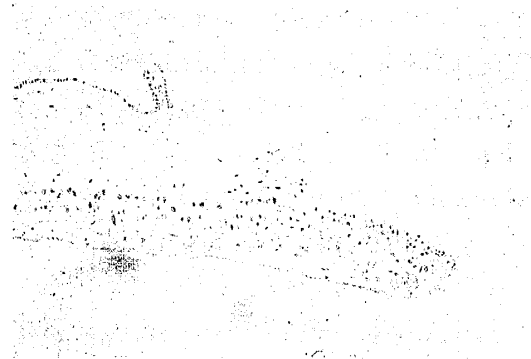


写真7



写真8

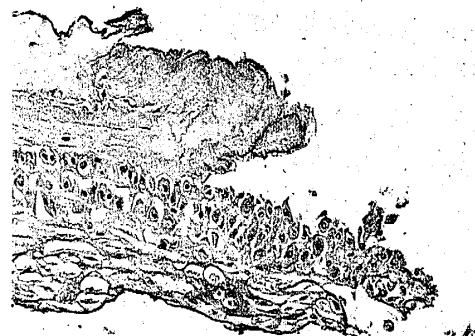


写真9



写真10

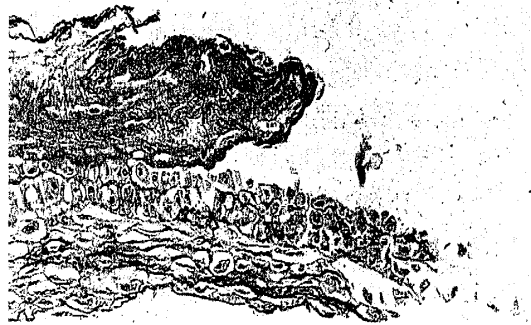


写真11



写真12

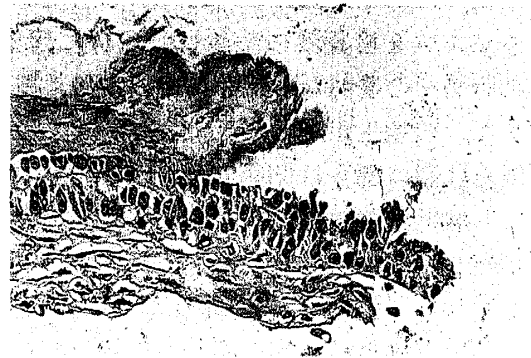


写真13

incubator で培養後、培養 6 日目に 20% ホルマリンにて固定し、組織切片を H.E. 染色、ならびに抗ヒトフィブロネクチン抗体 (Biomedical Technologies, England), 抗ヒト I 型コラーゲン抗体 (Chemicon International, U.S.A.), 抗ヒト III 型コラーゲン抗体 (Chemicon International, U.S.A.) を用いたストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法にて免疫染色し、鏡検にてそれらの動態を検討した。SAB 法はヒストファイン (ニチレイ) を用い、脱パラフィン後 0.3% H_2O_2 加メタノールで内因性ペルオキシダーゼ反応を除去した後、10% 正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、ビオチン標識二次抗体を添加し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 和光純薬) で発色させ、マイヤー-HX にて核染色した。

結 果 (表 1 参照)

実験 1. A 群ではすべての例でフィブリンと卵膜 (絨毛膜側) は全く接着せず、レンズ状の fibrin clot になつて剝離しており、裂口部分は被覆されなかつた (図 1, 写真 1)。フィブリンは接着しないため、卵膜の再生、修復所見は D 群と同一であり (写真 5, 7, 9, 11, 13 参照)、線維細胞層での線維芽細胞の増殖、I 型コラーゲンの軽度増生が認められたが、裂口部分の面積に変化はなかつた。フィブロネクチンは創の断端及び脱落膜側で強陽性であつた。III 型コラーゲンはフィブロネクチンの局在と極めて近似した。

B 群ではすべての例においてフィブリンは強固に卵膜 (絨毛膜側) に接着し、裂口部分は完全に被覆されたものの (図 2, 写真 2)、裂口部分の面積に変化はなかつた。組織の再生、修復所見はフィブロネクチンを培養液に添加した C 群に類似し、線維細胞層での著明な線維芽細胞の増殖、主に I 型コラーゲンの増生が認められた。

C 群では裂口部分は閉鎖しなかつたものの、D 群に比し絨毛膜の線維細胞層では著明に線維芽細胞が増殖し (写真 4)、また培養液にフィブロネクチンを添加しているため、卵膜は全体的にフィブロネクチンが濃染し、創断端への集積もみられた (写真 8)。そして D 群に比し明らかに創断端でコ

ラーゲン線維が増生し、I, III 型コラーゲン共増生したが、特に I 型コラーゲンの増生が顕著であつた (写真 10, 12)。これに伴い裂口部分の面積はやや狭小化した。

D 群では C 群ほどではないが、線維細胞層での線維芽細胞の増殖 (写真 5)、創断端へのフィブロネクチンの集積 (写真 9)、フィブロネクチンの集積部分への I 型コラーゲン線維の増生 (写真 11) が認められたが、裂口部分の面積に明らかな変化はなかつた。III 型コラーゲンの局在はフィブロネクチンの局在に極めて近似した (写真 13)。

実験 2. A 群ではフィブリンは羊膜に全く接着せず、レンズ状の fibrin clot になつて剝離しており、裂口部分は被覆されなかつた。羊膜線維細胞層での線維芽細胞の増殖はほとんど認められず、コラーゲン線維の増生もなく裂口部分の面積に変化はなかつた。

B 群ではフィブリンは強固に羊膜に接着し、フィブリンと羊膜の間に間隙がなく裂口部分は被覆された。羊膜の線維細胞層での線維芽細胞の増殖もほとんど認められず、コラーゲン線維の増生もなく裂口部分の面積に変化はなかつた。

C 群では羊膜の線維細胞層での線維芽細胞の増殖がわずかに認められた。D 群に比し、細胞の変性は少なかつたが、フィブロネクチンの創断端への集積、コラーゲン線維の増生もほとんど認められず、裂口部分は狭小化しなかつた。

D 群では羊膜の線維細胞層での線維芽細胞の増殖は認められず、細胞の変性部分が多かつた。フィブロネクチンの集積、コラーゲン線維の増生も認められず裂口部分の面積に変化はなかつた。

考 案

fibrin sealant を人体に初めて用いたのは Cronkite et al.⁴⁾ や Tidrick and Warner⁵⁾ であり、創傷面を遊離皮膚移植片で sealing する際にフィブリンを用いた。preterm PROM の治療法として羊水の漏れをフィブリンにより sealing し破綻した卵膜を再生、修復する可能性を初めて報告したのは Genz⁶⁾ であり、その後 Fettig and Heilmann⁷⁾, Ludwig et al.⁸⁾ もこの手法を推奨している。しかし Kurz and Hugh⁹⁾ は羊膜の sealing を何例か試

みたが、失敗に終わったと報告している。

Baumgarten and Moser¹⁾の報告によれば、fibrin clotには羊水漏出をとめ、絨毛膜と羊膜の再生作用があると予想している。しかし、われわれの追試では羊水の漏出がかなりあり完全なsealantとなつていないとは考えにくく、卵膜を培養した本実験によりフィブリン単独では裂口部分の修復が困難であることを確認した。さらにフィブリン・アドヘージョン法では絨毛膜と羊膜の再生、修復が促進されることを期待しているが、preterm PROMの原因の多くは絨毛羊膜炎であり、幼若なIII型コラーゲンの広範な変性が主であることを考えると、進行した絨毛羊膜炎では卵膜が自然に再生、修復することは難しいと思われる。

今回の *in vitro* での実験によると、フィブリン単独で卵膜への接着はほとんど認められなかった。また同様にフィブリン塊内での組織修復もみられなかった。ところがフィブロネクチンを添加することによりフィブリンが卵膜に強固に接着した。さらにまた卵膜の自然修復過程においてフィブロネクチンが創断端に集積することが確認された(写真9)。特にこれは絨毛膜細胞に観察された。また絨毛膜のフィブロネクチンの周囲にはI、III型コラーゲンが増生しており、特にI型コラーゲンの増生が顕著であることがわかった。これらのことから卵膜の修復機序におけるフィブロネクチンの重要性が推察されるが、この機序としてまずフィブロネクチンとコラーゲンの親和性が考えられる。卵膜欠損部の被覆にはコラーゲンの増生が不可欠であるが、このコラーゲンの局在とフィブロネクチンの局在は極めて一致していた。このことからフィブロネクチンによるコラーゲンの増生が示唆される。次にフィブロネクチンの卵膜の修復作用としてフィブロネクチンによる線維芽細胞の遊走、増殖が考えられる。フィブロネクチン添加群(C群)で線維芽細胞の増殖がみられたことはこの仮説を支持するものと思われる(写真4, 5)。さらに裂口部分をフィブリンにフィブロネクチンを添加することにより完全に被覆することには成功した。しかし創断端に線維芽細胞が集積しコラーゲン線維が増生したものの、裂口部分の完全修復や創断端

部分の再生による間隙の狭小化は認められなかった。これはfibrin sealantが卵膜に強固に接着しすぎたために、創断端の線維芽細胞の移動が妨げられたのではないかと考えられる。

フィブロネクチンの組織修復作用については角膜においてよく研究されている¹⁰⁾。角膜の場合でもフィブロネクチンは角膜の実質細胞層(角膜線維芽細胞層及びコラーゲンなどのextracellular matrix)切断面に出現し、角膜上皮細胞層には出現しない。そして時間の経過とともに実質細胞層上のフィブロネクチンを覆うかのように角膜上皮細胞が伸展する。卵膜もほぼ同様の機序で創傷治癒が進むと考えられる。

われわれはフィブロネクチンの組織修復作用と接着作用に着目し、preterm PROMの症例に対し妊婦自身の血漿よりフィブロネクチンを精製し¹¹⁾、これをフィブリンと共に頸管内に注入する方法を開始し、その有用性を検討中である。

以上より卵膜の修復機序におけるフィブロネクチンの重要性が確認され、臨床応用への可能性が示唆された。

図・写真説明

図1 写真1のシェーマ

図2 写真2のシェーマ

図3 写真3～13の撮影部位

写真1 A群: フィブリンと絨毛膜の接着状態。H.E. 染色, ×400

写真2 B群: フィブロネクチン添加フィブリンによる裂口部分の被覆。H.E. 染色, ×40

写真3 切開線をいれた直後の卵膜の創断端。H.E. 染色, ×100

写真4 C群: 培養液にフィブロネクチンを添加した培養6日目の卵膜の創断端。H.E. 染色, ×200

写真5 D群: 培養液のみで培養した6日目の卵膜の創断端。H.E. 染色, ×200

写真6 C群: 培養液にフィブロネクチンを添加した培養6日目の卵膜の創断端。陰性対照, ×100

写真7 D群: 培養液のみで培養した6日目の卵膜の創断端。陰性対照, ×100

写真8 C群: 培養液にフィブロネクチンを添加した培養6日目の卵膜の創断端。フィブロネクチン染色, ×200

写真9 D群: 培養液のみで培養した6日目の卵膜の創断端。フィブロネクチン染色, ×200

写真10 C群: 培養液にフィブロネクチンを添加した培養6日目の卵膜の創断端。I型コラーゲン染色,

×200

写真11 D群：培養液のみで培養した6日目の卵膜の創断端。I型コラーゲン染色，×200

写真12 C群：培養液にフィブロネクチンを添加した培養6日目の卵膜の創断端。III型コラーゲン染色，×200

写真13 D群：培養液のみで培養した6日目の卵膜の創断端。III型コラーゲン染色，×200

文 献

1. Baumgarten K, Moser S. The technique of fibrin adhesion for premature rupture of the membranes during pregnancy. *J Perinat Med* 1986; 14: 43-49
2. 久保隆彦, 西内敏文, 塚原優己, 岡本啓一, 相良祐輔. 前期破水(妊娠初期・中期)管理におけるFibrin adhesion法の有用性について. *日産婦誌* 1989; 41: S-388
3. 久保隆彦, 岡崎成実, 谷口勝紀, 相良祐輔. フィブリン・アドヘージョン(FA)による前期破水の管理—特に, latent periodと胎児・新生児の感染率に注目して. *日産婦誌* 1992; 44: S-486
4. Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA* 1944; 124: 976-978
5. Tidrick RT, Warner ED. Fibrin fixation of skin transplants. *Surgery* 1944; 15: 90-95
6. Genz HJ. Die Behandlung des vorzeitigen Blasensprungs durch Fibrinklebung. *Med Welt* 1979; 42: 1557-1559
7. Fettig O, Heilmann R. Fibrinklebung bei vorzeitigem Blasensprung. *Z Gebursh u Perinat* 1981; 185: 94-95
8. Ludwig H, Genz HJ, Gerlach H, Metzger H. Behandlung von Eihautlecks im 2. Trimenon durch Fibrinversiegelung des unteren Eipoles. *Arch Gynecol* 1981; 232: 466-468
9. Kurz CS, Hugh A. Fibrin sealing. An advanced therapy in dealing with premature rupture of membranes. *J Perinat Med* 1982; 10: 66-67
10. 西田輝夫. 角膜障害治癒過程に出現するフィブロネクチンの病態. *最新医学* 1984; 39: 2104-2108
11. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Nishibayashi C, Manabe R. Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patient's plasma. *Jpn J Ophthalmol* 1982; 26: 416-424 (No. 7278 平4・9・18受付)