

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

浜松医科大学産科婦人科教室

大井 豪一 小林 浩 杉村 基 寺尾 俊彦

A New Method for Diagnosis of Amniotic Fluid Embolism by Means of Monoclonal Antibody TKH-2 that Recognizes Mucin-type Glycoprotein, a Component in Meconium

Hidekazu OHI, Hiroshi KOBAYASHI, Motoi SUGIMURA
and Toshihiko TERA0

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抗体を用いて羊水塞栓症の血清診断に関する基礎的検討を行った。胎便抽出液を96穴 multititer plate に固相し胎便 plate を作成し、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, CC49) の胎便抽出液に対する反応性をELISA法にて検討した。また、各種 mono-, di-, oligosaccharides, ovine submaxillary mucin (OSM) を用いて胎便抽出液に対する各種抗体の結合阻害実験を行った。その結果、TKH-2が最も低濃度で胎便抽出液と反応し、次に、CC49, MA61, MA54の順に反応がみられた。一方、B72.3の胎便抽出液に対する反応は非常に弱かった。また、OSMに対する阻害実験の結果、CC49ではその阻害程度は低い、それ以外の抗体はすべてOSMにより完全に阻害された。また、胎便抽出液を neuraminidase 処理することにより、TKH-2, MA54, MA61の反応は消失したが、B72.3, CC49はほとんど影響を受けなかった。以上の実験より、胎便抽出液との反応はTKH-2が最も感度がよく、このTKH-2は他の抗体に比較して NeuAc α 2-6GalNAc (sialyl Tn; STN) を特異的に認識していることが確認された。

そこで、まず、TKH-2を利用して羊水中STN抗原濃度を測定した。肉眼的に混濁のない症例のSTN濃度のmean \pm SDは86.1 \pm 100.6U/mlであるのに対し、肉眼的に混濁のあった症例のSTN濃度は783.2 \pm 237.2U/mlであり、後者は前者に比較して有意に高値を示した ($p < 0.03$)。STN抗原濃度測定により羊水混濁の程度、すなわち、羊水に混入した胎便の量を客観的かつ定量的に評価することが可能であることが判明した。羊水塞栓症により死亡した症例の母体血清STN抗原濃度は189U/mlおよび82U/mlと高値を示したため、羊水塞栓症の血清診断としてSTN抗原が利用できる可能性が示唆された。

Synopsis Five monoclonal antibodies (moABs TKH-2, MA54, MA61, B72.3, and CC49), directed toward the O-linked mucin-type glycoprotein, showed signs of specific reactivity with human meconium. The reactivity of these moABs with meconium extract was examined by solid-phase ELISA with different native and sialidase-treated glycoproteins. All moABs react with meconium extract, whereas the reactivities of TKH-2, MA54, and MA61 are sialidase sensitive and the reactivity of TKH-2 with meconium extract was only inhibited by ovine submaxillary mucin (OSM), indicating that TKH-2 is the most sensitive and specific antibody clearly directed to the sialyl Tn antigen in meconium. The possible application of TKH-2 to diagnose amniotic fluid embolism (AFE) has been preliminarily investigated. We demonstrated that the concentration of sialyl Tn antigen in the serum of patients with AFE was significantly increased, indicating that meconium was released into the maternal circulation. Our method for detecting sialyl Tn antigen in the serum of AFE patients is a direct way to demonstrate the release of meconium into the maternal circulation, and is a simple, rapid, non-invasive and sensitive method for the diagnosis of AFE.

Key words: Amniotic fluid embolism • Meconium • Monoclonal antibody • Mucin glycoprotein • sialyl Tn

緒 言

羊水塞栓症は羊水中の胎便成分が何らかの原因で母体血中に流入し、胎児成分やムチンが血管腔内に塞栓し、血流遮断ないし乏血のためその血管支配臓器の機能障害をもたらす、さらに胎便中の chemical mediator 等により播種性血管内凝固症候群を併発する疾患である⁴⁾⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。主として肺動脈に塞栓して急激な重症ショック症状、出血をおこし、母体致死率は80%と非常に高い。確定診断は剖検によるものがほとんどであり、非剖検による診断方法の確立が望まれる⁵⁾¹⁷⁾。剖検による確定診断には組織染色としてヘマトキシリン・エオジン染色、ムチン染色、コロイドイオン染色等が行われている²¹⁾。そこでわれわれは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が羊水塞栓症の非観血的診断法として臨床応用可能かどうかを検討するために、各種抗体を用いて基礎的検討を行った。

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-2¹²⁾、MA54、MA61²⁰⁾、B72.3²³⁾、およびCC49⁸⁾は卵巣癌の血清診断として現在使用されており、TKH-2が認識する抗原をSTN(大塚アッセイ研究所)、MA54とMA61により認識される抗原をMA54/61(持田製薬)、B72.3とCC49により認識される抗原をCA72-4(東レフジバイオニクス)として使用されている。いずれの抗体もムチンの母核構造であるNeuAc α 2-6GalNAc α 1-0-Ser/Thr (sialyl Tn; STN)¹⁵⁾¹⁶⁾を認識していることが推定されているが意見の一致をみていない。

そこで、これらの抗体の性質を比較検討するとともに、胎便と特異的に反応する抗体を確認するために胎便抽出液を用いた胎便 plate を作成し、binding assay および competition assay を行い、その抗原解析を試みた。さらに羊水塞栓症の非観血的診断法として有用な抗体を選定し臨床応用を行った。

実験材料および方法

1. 抗体

本研究に使用したモノクローナル抗体はTKH-2¹²⁾、MA54、MA61²⁰⁾、B72.3²³⁾および

CC49⁸⁾である。TKH-2は大塚アッセイ研究所、MA54とMA61は持田製薬、B72.3とCC49は東レフジバイオニクスから提供していただいた。

2. 胎便 plate の作成

胎便に5倍量の0.6M 過塩素酸を氷冷下で加え、Warning blender で homogenize する。遠心後上清を回収し、1N NaOH で中和した後、蒸留水で透析し、ゲルろ過にて void volume 分画を集めて胎便抽出液とした。

3. 胎便抽出液に対する各種抗体の反応性

胎便抽出液を96穴 multititer plate (Costar, Cambridge, MA)に固相し、Tris buffered saline (0.02M Tris, 0.125M NaCl, pH 8.5; TBS), 0.05% Tween 20にて洗浄、2% bovine serum albumin 加 TBS (TBS-BSA)にて blocking 後、各種抗体を添加し(23°C, 60min)、二次抗体 biotin-conjugated anti-mouse IgG (1.5 μ g/ml, DAKO, 23°C, 60min)、さらに avidine-peroxidase (0.4 μ g/ml, DAKO, 23°C, 60min)添加後、3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine にて発色させ、ELISA reader (OD450, BIO-RAD, Model 2550, Richmond)にて吸光度を測定した。使用した一次抗体の濃度は図1に示したごとく0~4 μ g/mlである。

4. Neuraminidase 処理胎便抽出液に対する各種抗体の反応性

胎便抽出液を multititer plate に固相した後、0.05M neuraminidase (Sigma) にて37°C, 3h 反応させ、洗浄後に3.と同様の方法で各種抗体の反

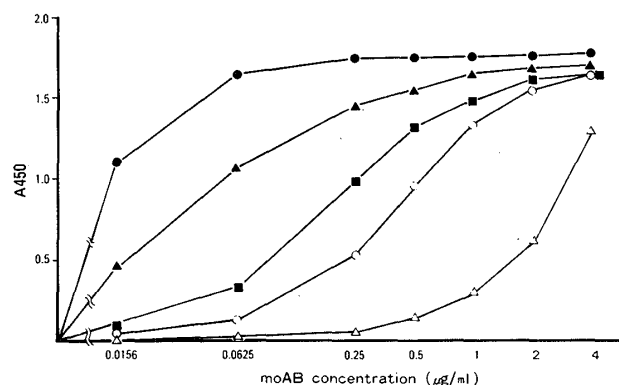


図1 胎便抽出液に対する各種抗体の反応性
(●) TKH-2, (▲) CC49, (■) MA61, (○) MA54, (△) B72.3

応性を測定した。

5. 胎便 plate に対する各種抗体の mono-, di-, oligosaccharides, および OSM による阻害実験

阻害実験に使用したのは monosaccharide として D(+) glucose (Glu), D(+) galactose (Gal), D(+) fucose (6-deoxy-D-galactopyranose; Fuc), N-acetylglucosamine (2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose; GluNAc), N-acetylgalactosamine (2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose; GalNAc), N-acetylneuraminic acid (sialic acid; NeuAc), D(+) mannose (Man), disaccharide として α -lactose (4-O- β -D-galactopyranosyl- α -D-glucose; Gal-Glu), maltose (4-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucose; Mal) を, oligosaccharide として N-Acetylneuramine-lactose (N-Acetylneuraminy (2-3)-and (2-6)- β -D-galactopyranosyl (1-4)-D-glucopyranose; NeuAc-Gal-Glu) および OSM を用いた。これらの糖鎖 (0~250mM) を同量の各種抗体 (0.67 μ g/ml) と反応させ (23°C, 60min), これらの混合液を胎便 plate に添加し (23°C, 60 min), competition assay を行い³。と同様の方法で各種抗体の反応性を測定した。

6. 羊水中, 母体血清および検体中 STN 抗原の測定

肉眼的に混濁のない羊水 (23例; 羊水穿刺により 5 例 [16~19週] および分娩時に 18例 [35~41週]) と混濁を認めた羊水 (14例; すべて分娩時に採取 [35~40週]) を用いた。すべての羊水は 3,000 rpm, 15min 遠心しその上清を測定に用いた。23例の母体血清は正常妊娠 9~41週までに採血されたものを測定に用いた。そのうち分娩時に肉眼的に羊水混濁を認めなかった症例の血清は 13例で, 混濁を認めた症例は 10例である。すべての検体は -20°C に保存した。2 例の羊水塞栓症の母体血清が入手できた。症例 1 (鹿児島市立病院より入手) は 24歳の 2 回経産婦であり, 妊娠 39週に正常分娩後に呼吸困難とショックを呈した症例であり, 母体血清は発症 14時間後に採血した。症例 2 (秋田大学より入手) は 26歳の 3 回経産婦であり, 妊娠 37週に帝王切開術後に前胸部痛, 呼吸困難とショックを呈した症例であり, 母体血清は発症 6

時間後に採血した。2 例とも剖検により羊水塞栓症が確定診断されている。検体の 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¹³⁾。

7. 有意差検定

群間の有意差検定は non-parametric Wilcoxon test を用いた。

結 果

1. 胎便抽出液に対する各種抗体の反応性 (図 1)

すべての抗体は胎便抽出液と反応した。しかし, その親和性は異なり, TKH-2が最も低濃度で胎便抽出液に反応した。次に CC49, MA61, MA54の順に反応が良好であり, B72.3の胎便抽出液に対する反応は最も低かった。

2. Neuraminidase 処理胎便抽出液に対する各種抗体の反応性 (図 2)

胎便抽出液を固相した plate を neuraminidase 処理することにより, TKH-2, MA54, MA61の反応は完全に抑制されたが, B72.3, CC49の反応は比較的保たれた。

3. 胎便抽出液に対する各種抗体の mono-, di-, oligosaccharides, および OSM による阻害実験 (図 3)

胎便抽出液に対する TKH-2の反応は OSM によつてのみ完全に阻害され, 他の糖鎖に対する阻

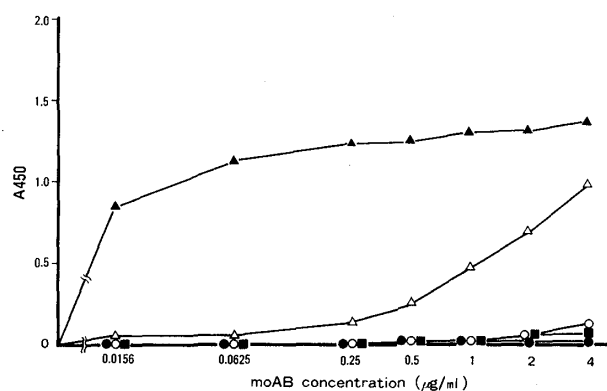


図 2 Neuraminidase 処理胎便抽出液に対する各種抗体の反応性
(●)TKH-2, (▲)CC49, (■)MA61, (○)MA54, (△) B72.3

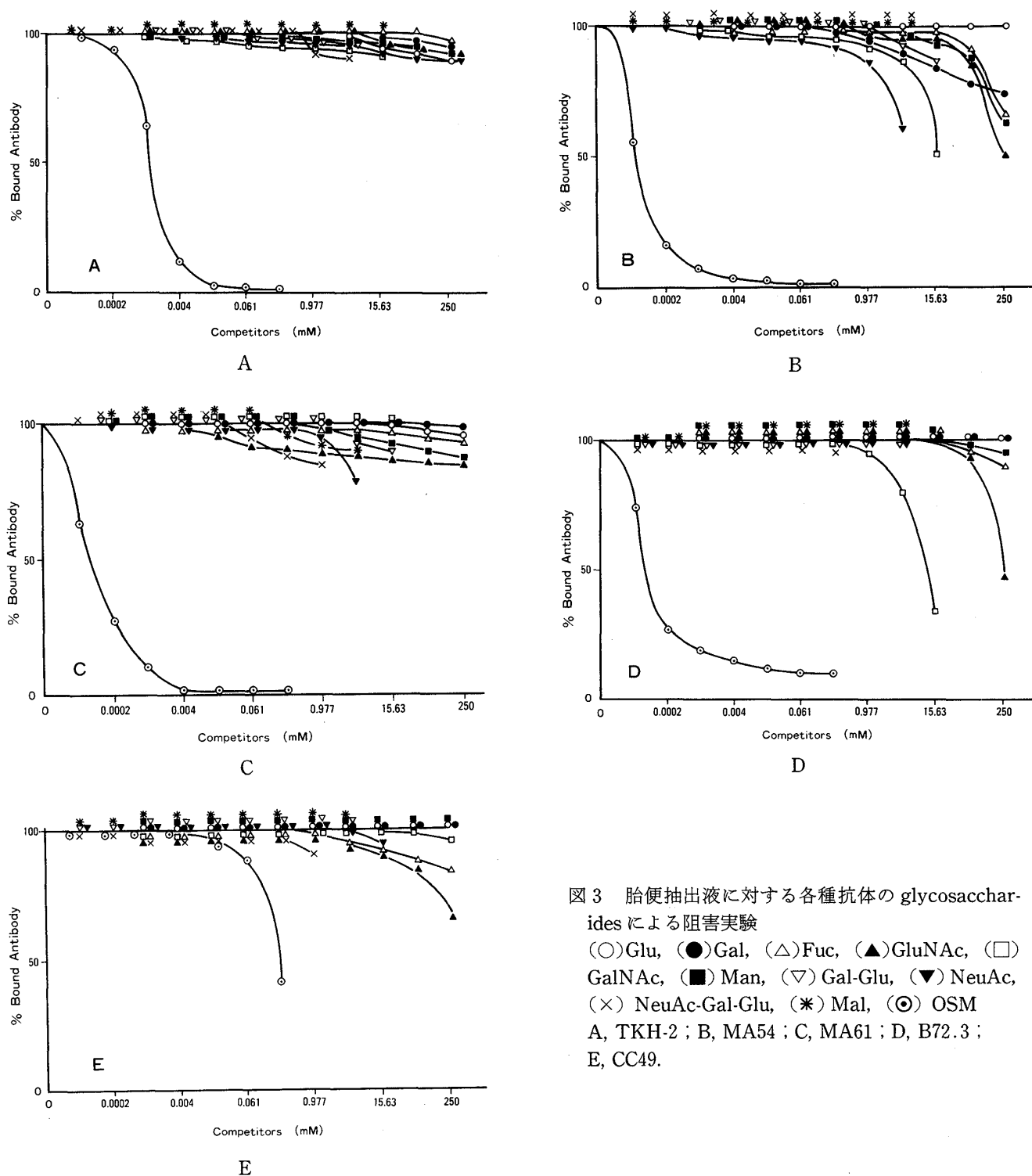


図3 胎便抽出液に対する各種抗体の glycosaccharides による阻害実験

(○)Glu, (●)Gal, (△)Fuc, (▲)GluNAc, (□)GalNAc, (■)Man, (▽)Gal-Glu, (▼)NeuAc, (×)NeuAc-Gal-Glu, (*)Mal, (⊙)OSM
A, TKH-2; B, MA54; C, MA61; D, B72.3; E, CC49.

害はほとんどみられず, STN に対する特異性が高い. CC49の胎便抽出液に対する反応は OSM を含んだいずれの糖鎖に対しても, その阻害の程度は軽度であつた. すなわち, CC49の OSM に対する親和性は TKH-2の約1/250であつた. B72.3は GalNAc と GluNAc により阻害された. しかし,

この阻害程度は非常に弱いものである (OSM の 1/65,000). これに対して, MA61の阻害様式は TKH-2に類似しており, OSM により完全に阻害された. MA54は OSM により完全に阻害されたが, 今回使用した糖鎖のうち NeuAc, GalNAc, GluNAc によつても濃度依存性に軽度阻害され

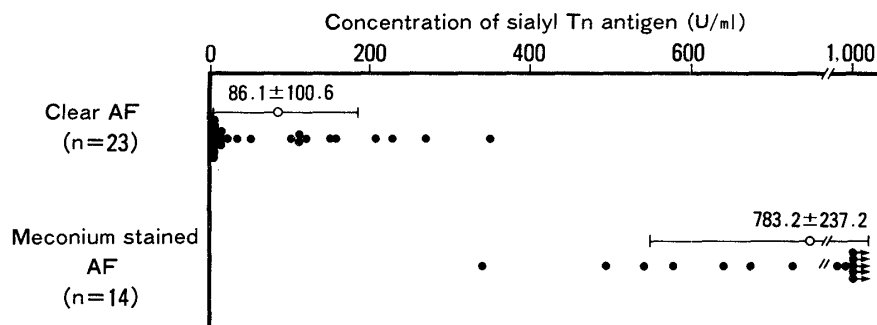


図4 羊水中の sialyl Tn 抗原濃度
Clear AF, 清澄羊水; Meconium stained AF, 混濁羊水

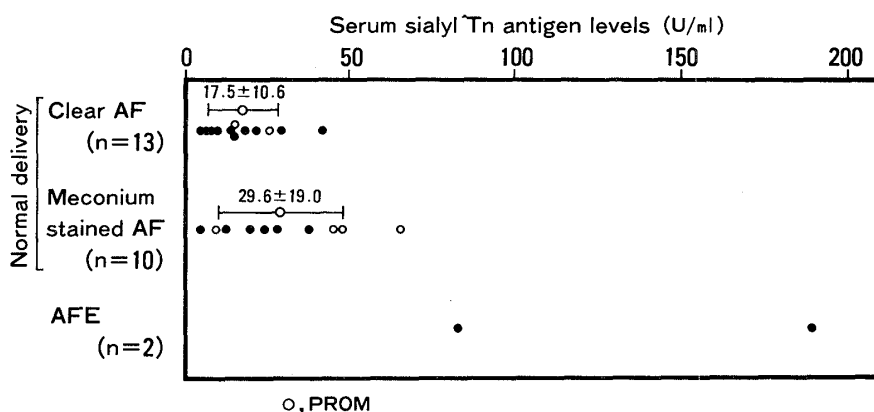


図5 母体血清中の sialyl Tn 抗原濃度
Clear AF, 清澄羊水; Meconium stained AF, 混濁羊水; AFE, 羊水塞栓症

た。

4. 羊水中 STN 抗原の測定 (図4)

羊水中の STN 濃度を測定した結果, 肉眼的に混濁のない症例の STN 濃度の mean \pm SD は 86.1 ± 100.6 U/ml であり, 肉眼的に混濁のあつた症例 (非常に軽度の羊水混濁例も含む) では 783.2 ± 237.2 U/ml であつた。後者は前者に比較して有意に高値を示した ($p=0.0263545$)。肉眼的に混濁のない症例においても STN 濃度が比較的高値を示す症例も存在した。一方, 羊水混濁例のうち, 胎便混入 (分娩時に肉眼的清澄羊水の中に胎便が存在している状態) のみの症例は比較的低値を示した。羊水中 STN 濃度が 400 U/ml 以上の症例の 96% は肉眼的混濁症例であつた。妊娠 17~20 週に採取された羊水中の STN 濃度は妊娠末期以外の時期に採取されたものより高値を示した。

5. 母体血清中の STN 抗原の測定 (図5)

分娩時に肉眼的に羊水混濁を認めなかつた症例の母体血清中 STN 濃度は 17.5 ± 10.6 U/ml であるのに対し, 羊水混濁を認めた症例の母体血清中 STN 濃度は 29.6 ± 19.0 U/ml であり, 軽度高値を示す傾向を認めた。羊水混濁症例の中でも前期破水を合併した症例に比較的高値を示した。また, 羊水塞栓症の 2 例は 189 U/ml および 82 U/ml と高値を示し, 胎便成分 (胎便ムチン中の sialyl Tn 抗原) が母体循環に流入したことが証明された。

考 察

羊水塞栓症の確定診断は羊水および胎便成分の母体血中での証明である^{5)6)16)~19)}。混濁羊水, すなわち, 胎便成分の混入が羊水塞栓症の発生には重要な所見である。羊水あるいは胎便に特異的な物質をみつけることができ, かつ容易に測定できれば, これを羊水塞栓症の確定診断に利用することが可能となるであろう。現在までに報告されている胎便特異物質の一つに亜鉛コプロポルフィリン

(Zn-CP)があり、羊水塞栓症の診断として Zn-CP を母体血中で測定することの有用性が報告されている^{1)~3)9)}。しかし、Zn-CP の測定は HPLC によってなされているのが現状でありやや繁雑である。

われわれは胎便成分の中にムチンに着目し、卵巣癌の腫瘍マーカー¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾として臨床応用可能なムチンの母核構造を認識するモノクローナル抗体 TKH-2, MA54, MA61, B72.3, CC49の胎便に対する反応性を検討した。

すべての抗体は胎便抽出液と反応するが、抗体により反応の程度が異なり、TKH-2が感度の点で最も優れていた。また、各種 mono-, di-, oligosaccharides, OSM に対する阻害実験の結果からも、TKH-2は STN に最も特異性が高いことが証明された。一方、CC49は NeuAc 要求性が低く、また、OSM による阻害がかかりにくい点より、B72.3と CC49により認識される CA72-4は STN も認識するが他のムチン型母核構造をも認識する可能性が推定される⁸⁾。また、MA54と MA61により認識される MA54/61も胎便に対する反応、neuraminidase 処理による反応は TKH-2に類似したが、glycosaccharides による阻害実験より、STN 以外も認識している可能性は否定できない²⁰⁾。しかし、現時点では今回使用した以外の glycosaccharides の入手は不可能であり、今後詳細な検討を要する。

以上の結果より、胎便成分には STN が含まれており、TKH-2が感度、特異性の両面で他の抗体に比較して優れていることが証明された。したがって、母体血中の STN 濃度を TKH-2を用いて測定すれば羊水塞栓症の確定診断をすることが可能となるであろう。また、胎便中には STN 以外にも T, Tn 抗原²²⁾等も存在する可能性があり、mucin-type glycoprotein 全般について基礎的検討を行う必要がある。

羊水中の STN 濃度を測定した結果、肉眼的混濁羊水は清澄羊水より有意に高値を示すことが確認された。さらに、まだ2例の検討ではあるが、羊水塞栓症の血清 STN 値は189U/ml, 82U/ml と高値を示したことにより、混濁羊水が母体血中に流入し、本症が発生したことが推定される。し

たがって、血清 STN 値測定は簡単で、高感度で、非侵襲的な羊水塞栓症の客観的診断として利用される。しかし、迅速性の点ではまだ改良する余地が残されており、ラテックス凝集による簡易半定量法の開発が必要と思われる。また免疫組織化学的に母体の肺を染色することにより本症の確定診断として使用できる可能性も示唆され、現在検討中である。

抗体 TKH-2の臨床応用は広く、胎便が原因で起こる疾患として、羊水塞栓症以外にも大量羊水吸引症候群等の確定診断にも使用できる可能性がある。しかし、母体循環に STN が入った時の半減期や排泄様式等解決すべき点が残されているため、動物実験で確かめる必要がある。

本研究にあたり抗体を提供してくださった大塚アッセイ研究所、持田製薬株式会社、東レフジバイオニクス株式会社に深謝いたします。また、血清、羊水を提供してくださった浜松医科大学産婦人科金山尚裕博士、成瀬寛夫博士、および秋田大学、鹿児島市立病院、磐田市立病院、富士宮総合病院産婦人科の諸先生に深謝いたしますとともに、STN を測定していただいた大塚アッセイ研究所、立川哲也博士、赤松 優博士に感謝いたします。

文 献

1. 金山尚裕, 寺尾俊彦: 羊水塞栓症. 周産期医学, 21: 260, 1991増刊号.
2. 成瀬寛夫, 住本和博, 金山尚裕, 寺尾俊彦: 螢光を用いた胎便吸引症候群(MAS)の特異的診断法に関する研究. 日産婦誌, 42: 719, 1990.
3. 住本和博, 金山尚裕, 寺尾俊彦, 川島吉良, 山下豊: 羊水混濁測定装置の開発. 産婦治療, 56: 345, 1988.
4. Clark, S.L.: New concepts of amniotic fluid embolism: A review. Obstet. Gynecol. Surv., 45: 360, 1990.
5. Clark, S.L., Pavlova, Z., Greenspoon, J., Horenstein, J. and Phelan, J.P.: Squamous cells in the maternal pulmonary circulation. Am. J. Obstet. Gynecol., 154: 104, 1986.
6. Esposito, R.A., Grossi, E.A., Coppa, G., Giangola, G., Ferri, D.P., Angelides, M. and Andriakos, P.: Successful treatment of post-partum shock caused by amniotic fluid embolism with cardiopulmonary bypass and pulmonary artery thromboembolism. Am. J. Obstet. Gynecol., 163: 572, 1990.
7. Hakomori, S.: Abberant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate

- antigens. *Avd. Cancer Res.*, 52 : 257, 1989.
8. *Hanisch, F.G., Uhlenbruck, G., Egge, H. and Peter-Katalinic, J.* : A B72.3 second-generation-monoclonal antibody (CC49) defines the muin-carried carbohydrate epitope Galb (1-3) [NeuAc α (2-6)] GalNAc *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 370 : 21, 1989.
 9. *Horiuchi, K., Adachi, K., Fujise, Y., Naruse, H., Sumimoto, K., Kanayama, N. and Terao, T.* : Isolation and characterization of Zinc coproporphyrin I: A major fluorescent component in meconium. *Clin. Chem.*, 37 : 1173, 1991.
 10. *Itzkowitz, S.H., Bloom, E.J., Kokal, W.A., Modin, G., Hakomori, S. and Kim, Y.S.* : Sialosyl Tn : A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer*, 66 : 1960, 1990.
 11. *Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L. and Kim, Y.S.* : Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.*, 49 : 197, 1989.
 12. *Kjeldsen, T., Clausen, H., Hirohashi, S., Ogawa, T., Iijima, H. and Hakomori, S.* : Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl 2-6a-N-Acetylgalactosaminyl (sialosyl Tn) epitope. *Cancer Res.*, 48 : 2214, 1988.
 13. *Kobayashi, H., Terao, T. and Kawashima, Y.* : Clinical evaluation of circulating serum sialyl Tn antigen levels in patients with epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, 9 : 983, 1991.
 14. *Kobayashi, H., Terao, T. and Kawashima, Y.* : Serum sialyl Tn an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer *J. Clin. Oncol.*, 10 : 95, 1992.
 15. *Kurosaki, A., Fukui, S., Kitagawa, H., Nakada, H., Numata, Y., Funakoshi, I., Kawasaki, T. and Yamashina, I.* : Mucin-carbohydrate directed monoclonal antibody. *FEBS Lett.*, 215 : 137, 1987.
 16. *Kurosaki, A., Kitagawa, H., Fukui, S., Numata, Y., Nakada, H., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Ogawa, T., Iijima, H. and Yamashima, I.* : A monoclonal antibody that recognizes a cluster of a disaccharide, NeuAc α 2-6 GalNAc, in mucin-type glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 263 : 8724, 1988.
 17. *Lee, W., Ginsburg, K.A., Cotton, D.B. and Kaufman, R.H.* : Squamous and trophoblastic cells in the maternal pulmonary circulation identified by invasive hemodynamic monitoring during the peripartum period. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155 : 999, 1986.
 18. *Morgan, M.* : Amniotic fluid embolism. *Anesthesia*, 34 : 20, 1979.
 19. *Mulder, J.L.* : Amniotic fluid embolism. An overview and case report. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 152 : 430, 1985.
 20. *Nozawa, S., Yajima, M., Kojima, K., Iizuka, R., Mochizuki, H., Sugawara, T., Iwamori, M. and Nagai, Y.* : Tumor-associated mucin-type glycoprotein (CA54/61) defined by two monoclonal antibodies (MA54 and MA61) in ovarian cancers. *Cancer Res.*, 49 : 493, 1989.
 21. *Roche, W.D. and Norris, H.J.* : Detection and significance of maternal pulmonary amniotic fluid embolism. *Obstet. Gynecol.*, 43 : 729, 1974.
 22. *Springer, G.F., Desai, P.R., Robinson, M.K., Tegtmeyer, H. and Scanlon, E.F.* : The fundamental and diagnostic role of T and Tn antigens in breast carcinomas at earliest histologic stage and throughout. In *Tumor Markers and Their Significance in the Management of Breast Cancer*, (eds. T. Dao, A. Brodie and C. Ip), 47. A.R. Liss, New York, 1986.
 23. *Thor, A., Ohuchi, W., Szpak, C.A., Johnston, W.W. and Schlom, J.* : Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res.*, 46 : 3118, 1986.

(No. 7192 平4・3・13受付)