

シンポジウム 子宮内環境と胎児

胎児の生体防御機構としての羊水、卵膜の役割とその破綻

浜松医科大学産科婦人科教室 (主任: 寺尾俊彦教授)

金 山 尚 裕

Intrauterine Defensive Mechanism of Amniotic Fluid
and Fetal Membranes

Naohiro KANAYAMA

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

緒 言

子宮内環境としての羊水、卵膜、子宮は活発な代謝を必要とするいわば動的な環境の胎盤に比較し胎児発育の場として静的な環境の維持が必要である。したがって羊水、卵膜、子宮といったユニットの妊娠維持機構の破綻は胎児にとって大きな侵襲となり臨床的には早産という転帰にいたる。そこで羊水の主たる成分である胎児尿が羊水、卵膜、子宮という子宮内環境のユニットに対しどのような静的な環境を作り出しているかをみることを研究主題とした。ことに胎児尿中トリプシンインヒビター (UTI) に着目し各部位での意義について検討した。

方 法

1. 羊水中、胎児尿中 UTI 量測定, UTI の局在
羊水穿刺あるいは破水時得た妊娠20週から41週 (48例) までの羊水を3,000rpm 15分遠心し上清を採取し測定した。新生児尿は正常分娩後の第一尿 (25例) を採取し同様に遠心し上清を採取した。これを便宜上胎児尿とした。また乳児尿 (8例), 成人男子尿 (8例), 成人女子尿 (9例) も同時に測定した。UTI の測定は competitive enzyme immuno assay で行った。UTI の局在は UTI ポリクローナル抗体を用い ABC 法で行った。胎脂は正常新生児から採取し新生児の腸管は無脳児で死産し病理解剖が得られた症例を使用した。

2. 胎児尿中トリプシン・エラスターゼ抑制活性, 羊膜コラーゲンタイプ分析

トリプシン活性は S2222 (第一化学), エラス

ターゼ活性測定は S2484 (第一化学) を用いた。胎児尿および胎児尿を UTI 抗体で吸収させたものをトリプシン400U/ml あるいはエラスターゼ60U/ml と23°C, 30分インキュベートし S2222あるいは S2484 (1mg/ml) を添加した。コラーゲンタイプ分析は羊膜コラーゲンを抽出後, 好中球 10^6 /ml を添加した群と UTI+好中球 10^6 /ml 添加した群を 8 時間インキュベート後, 途中還元 SDS-PAGE 法で行った¹⁾。

3. 羊膜上皮細胞, 子宮平滑筋細胞の培養, 共焦点レーザー顕微鏡による外来性 UTI の局在

分娩時羊膜を採取し0.15%トリプシンにて羊膜上皮細胞を取り出し EGMUV 培地 (クラボウ) にて培養し継代2代目細胞を使用した。また子宮平滑筋細胞は良性疾患で子宮全摘出した子宮切片を EGMUV 培地で組織培養後単離細胞を継代, 3代目を使用した。羊膜上皮細胞を4穴のwellで培養し, UTI (100U/ml), LPS (10 μ g/ml), UTI → LPS 添加し固定後の UTI 局在をみるため蛍光抗体間接法を行い染色後共焦点レーザー顕微鏡 (BIO RAD) で観察した。

4. 胎児尿 (UTI), 亜鉛コプロポルフィリンの羊膜, 子宮への拡散

UTI-FITC (1,000U/ml) を妊娠ラット (妊娠18日) 羊水腔に注入し2時間後に子宮を取り出し凍結切片を作成し UTI の局在を観察した。羊水中の物質がヒトでも卵膜, 子宮に移行するか否か検討するため我々が以前から報告してきた羊水中胎児特異物質亜鉛コプロポルフィリンを使用した²⁾。

羊水, 卵膜, 子宮筋は帝王切開時インフォームドコンセントを得て採取した。湿重量を測定し1%の生理食塩水中でホモゲナイズし遠心後上清を採取し上清中の亜鉛コプロポルフィリンをHPLC法により測定した。

5. 頸管熟化抑制実験

妊娠15日の家兎にインターロイキン8 (IL-8) 100ng 腔坐薬を作成し5日間家兎腔内に挿入した。また妊娠13日, 14日にUTI腔坐薬(5,000U)を腔内に挿入後IL-8坐薬を同様に挿入した。妊娠20日目に子宮を取り出し肉眼所見, 顕微鏡所見, コラーゲン量, 水分量を測定した。

コラーゲン量はpicrosirius染色からまた水分量は水分計(フジテクニカ)で測定した³⁾。

6. 子宮平滑筋収縮実験

妊娠ラット子宮筋, および良性疾患にて摘出したヒト子宮体部から $3 \times 10 \times 2$ mm大の子宮切片を取り出しKrebs-Ringer液中で0.5gでつりあげ95%酸素を環流させ等尺性収縮を記録した。Krebs-Ringer液にUTI(1,000U/ml), 選択的帝王切開時羊水をプレインキュベートしオキシトシン(0.05U/ml), プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ (2 μ g/ml), LPS(10 μ g/ml)を添加した。またオキシトシン(0.05U/ml), プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ (2 μ g/ml), LPS(10 μ g/ml)を先に投与しその後UTI(1,000U/ml), 羊水を添加した。

7. 細胞内カルシウム測定

羊膜上皮細胞, 子宮平滑筋細胞をスライドガラス上で培養しconfluentになったところで細胞にFura 2 AMを3.3 μ g/mlに添加し30分37°Cでインキュベート。UTI 100U/mlになるように添加しその後LPS 10 μ g/ml加えた。single cellのカルシウムの変化を落射型蛍光顕微鏡, 画像処理用蛍光検出装置ニコンTMD, 画像処理装置ARUGAS(浜松ホトニクス)を用いて検討した⁴⁾。励起波長F340とF380を瞬時に変換し蛍光波長510nmで測定した。細胞内カルシウムはF340/F380の比からあらかじめ既知のFura 2から作成した標準曲線より換算した。平均のカルシウム濃度は10個以上の細胞内カルシウムの平均を測定した。

8. 羊膜上皮細胞におけるIL-8発現のUTIによる抑制

選択的帝王切開時に得た羊膜をMEM medium中で組織培養し, LPS(10 μ g/ml)を添加したものとUTI(100U/ml)を3時間プレインキュベートしLPS(10 μ g/ml)を添加したものを作成した。組織を3%パラホルムアルデハイドで固定後ABC法でIL-8の局在を検討した。

9. G蛋白とUTIの結合

ブタ脳より G_0 蛋白を芳賀らの方法により精製した。UTI(1,000U/ml)を0.1M Na_2CO_3 , 50mM NaHCO_3 96穴のwellにコートし, 2%BSA phosphatebuffered saline pH 7.3にてブロッキングし G_0 蛋白を0~3.2 μ g/mlを添加した(4°C overnight)。家兎抗 G_0 蛋白抗体を添加し反応させその後ビオチン標識抗家兎IgG, ペルオキシダーゼ標識アビチンを加えTMBにて発色させて405nmのEIA readerで測定した。

成 績

1. 羊水中, 胎児尿中UTI量測定, UTIの局在
各種尿中UTI量を測定した結果, 胎児尿では 94 ± 34 U/mlであり, 乳児尿では 16 ± 13 U/ml, 成人男子尿では 8 ± 6 U/ml, 成人女子尿では 9 ± 7 U/mlであった。胎児尿は成人尿の100倍近くのUTI量を含んでいた(図1)。羊水中のUTI量は20~29週では 88 ± 37 U/ml, 30~36週では 78 ± 35 U/ml, 37~41週では 42 ± 20 U/mlで週数とともにやや減少する傾向にあった(図2)。

UTIの局在をみると胎脂(図3a), 胎児消化管上皮(図3b), 羊膜上皮細胞(図3c)に強く染色された。羊水の接する部位にはUTIの局在を認めた。

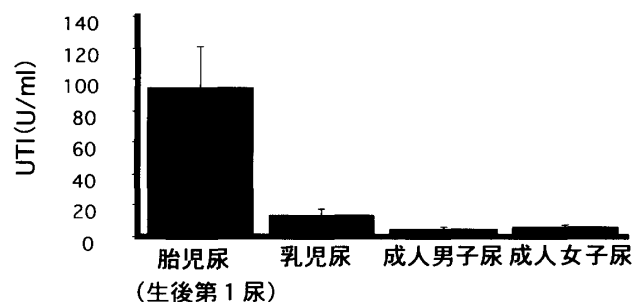


図1 各種尿におけるUTI量

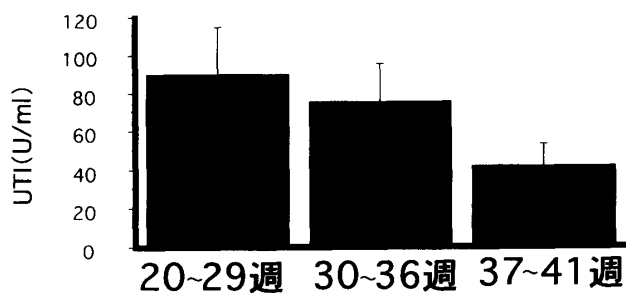


図2 各週数別羊水中 UTI 量

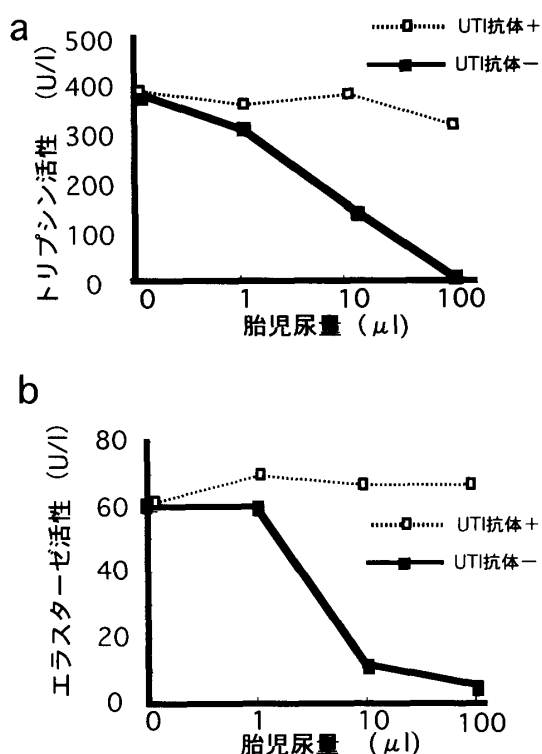


図4 a. トリプシン活性の胎児尿による抑制, b. エラスターゼ活性の胎児尿による抑制

2. 胎児尿中トリプシン・エラスターゼ抑制活性, 羊膜コラーゲンタイプ分析

トリプシン・エラスターゼ活性とも尿量の増加により減少し, 100μl にて両活性はほぼ完全に抑制された。一方, UTI 抗体で吸収させた胎児尿はトリプシン・エラスターゼ活性とも抑制されなかった(図4)。羊膜と顆粒球をインキュベートした群ではコントロールに比し type III コラーゲンが顆粒球添加群ではおもに分解された。それに UTI (100U/ml) を加えると type III コラーゲンの分解は抑制された(図5a)。羊膜と胎便をインキュベートした群でもコントロールに比し type III

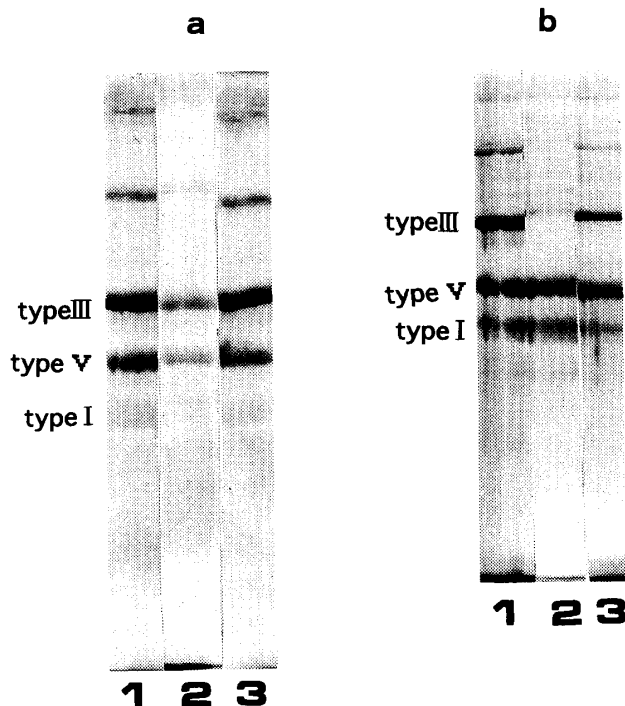


図5 a. LPS 活性化顆粒球による羊膜コラーゲンの分解. 1. 羊膜, 2. 羊膜+活性化顆粒球, 3. 羊膜+活性化顆粒球+UTI (100U/ml). b. 胎便による羊膜コラーゲンの分解. 1. 羊膜, 2. 羊膜+胎便10μl (1%懸濁液), 3. 羊膜+胎便+UTI (100U/ml)

コラーゲンが胎便添加群では特異的に分解された。それに UTI (100U/ml) を加えると type III コラーゲンの分解は抑制された(図5b)。

3. 共焦点レーザー顕微鏡による外来性 UTI の局在

UTI 添加群では弱く細胞内に染色されたが, UTI → LPS 群では羊膜上皮細胞は UTI を多量にトラップした。LPS のみでも染色性が亢進したが UTI → LPS 群ほどでなかった(図6)。

4. 胎児尿 (UTI), 亜鉛コプロポルフィリンの羊膜, 子宮への拡散

ラット羊水腔に注入した UTI-FITC の蛍光は胎児皮膚, 卵膜, 子宮筋, 胎盤にも確認された(図7)。UTI がそれらの部位に拡散したことを意味する。各組織中の亜鉛コプロポルフィリンのピークは羊水が最も高く, ついで羊膜, 絨毛膜, 脱落膜の順にピークを認めた。卵膜, 子宮(脱落膜)にも明らかに亜鉛コプロポルフィリンが存在しており羊水成分が卵膜, 子宮へも移行する具体的な例であろう(図8)。

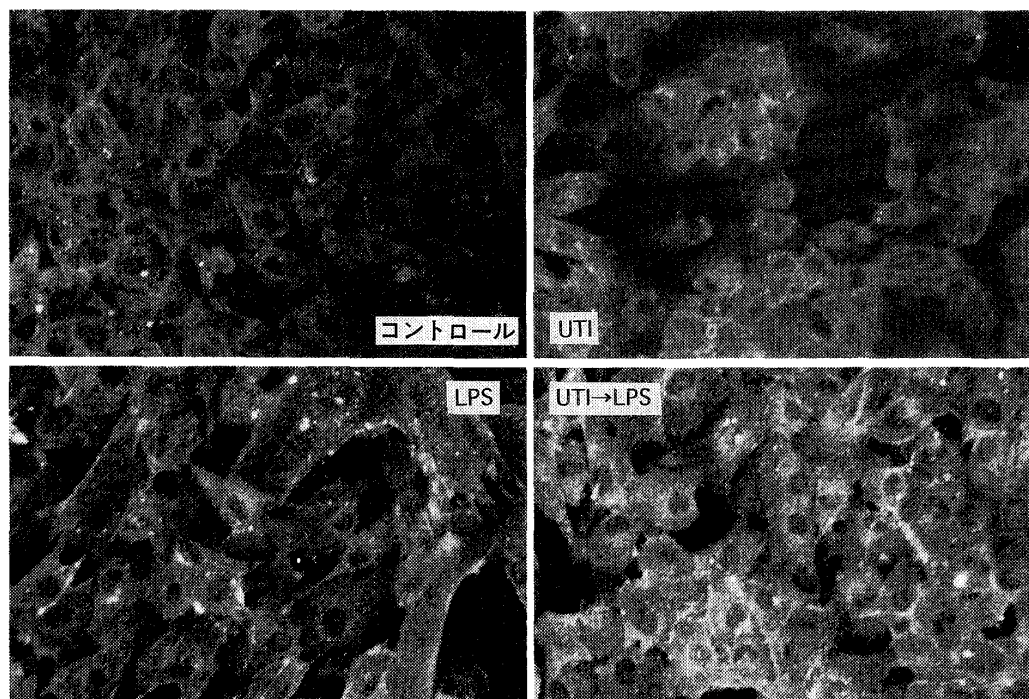


図6 LPS 刺激による羊膜上皮細胞の UTI 局在

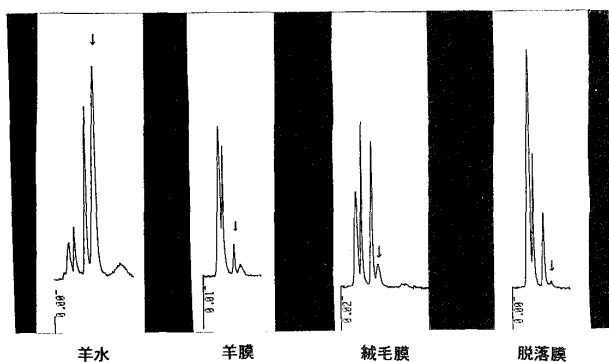


図8 各組織中亜鉛コプロポルフィリン

5. 頸管熟化抑制実験

IL-8坐薬投与家兎は肉眼的に膨化し水腫となり著明な熟化所見がみられた(図9)。一方、IL-8に引き続いて UTI 坐薬を投与した家兎は全く熟化がみられなかった(図9)。その HE 染色を図10に示す。IL-8投与例ではコラーゲン線維の分解が顕著に起こり水腫変化が病理学的にもみられるが、UTI 坐薬投与例では間質組織が密になっていて熟化が認められない。それらを定量的にみたのが図11である。コラーゲン量の減少と水分量の増加が IL-8投与群にみられるが、UTI を IL-8に先立って投与すると頸管組織中コラーゲン量と水分

量はコントロールに比較し同等であった。

6. 子宮平滑筋収縮実験

妊娠ラット子宮筋に UTI (1,000U/ml) を加え子宮筋の自律収縮の変化をみたのが図12である。UTI の添加後自律収縮頻度は徐々に減少し4時間後には全く消失した。ヒト子宮筋にオキシトシン、プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ を添加すると著明な子宮収縮が cameしたが、あらかじめ UTI を添加しておくとそれらの刺激に対して全く子宮収縮が起こらなかった(図13)。次にオキシトシンを先に加えそのあと UTI を添加すると子宮収縮の中等度抑制がみられた(図14)。プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ は図には示していないがオキシトシンと同様であった。切迫早産のモデルと考えられる LPS 添加では子宮収縮が cameしたあと相乗的に増加しオキシトシン、プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ とは子宮収縮曲線が異なった(図15)。LPS 添加前に UTI を加えると LPS 刺激による子宮収縮は全く発現しなかった。妊娠中期の羊水をこの系に加えると自律収縮は減弱し30分では全く自律収縮が消失した(図16)。その後オキシトシンを加えても子宮収縮は cameせず wash 後にオキシトシンを添加すると再び子宮収縮がみられた。妊娠中期の羊水

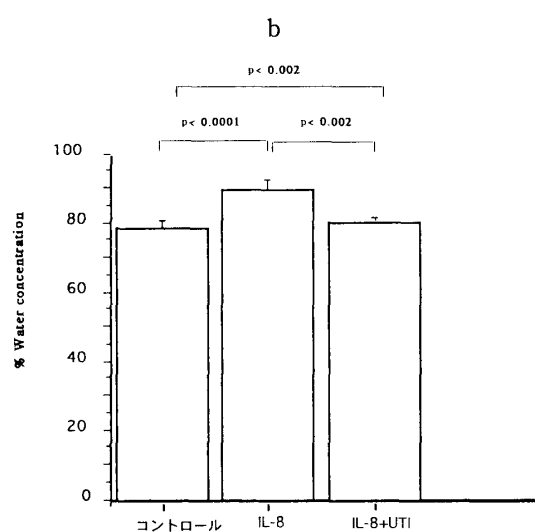
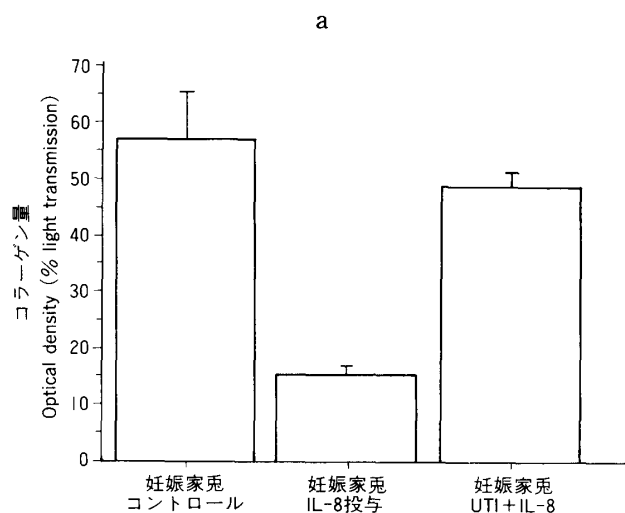


図11 a. UTI による頸管熟化の抑制 (コラーゲン量), b. UTI による頸管熟化の抑制 (水分量)

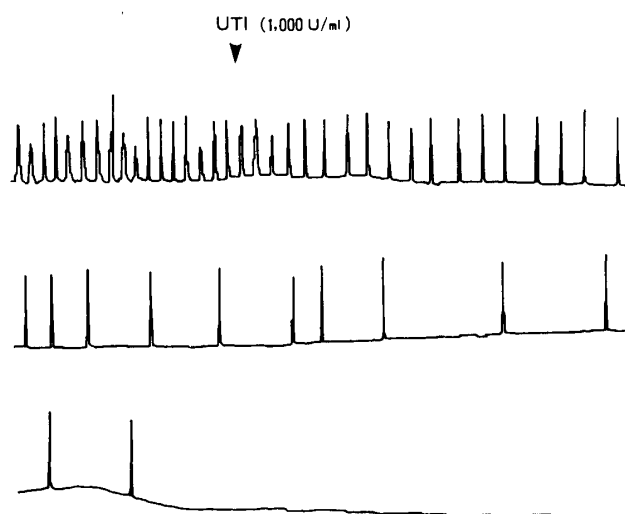


図12 UTI 投与後の子宮筋自律運動の変化. 等尺性子宮収縮 (妊娠ラット子宮筋)

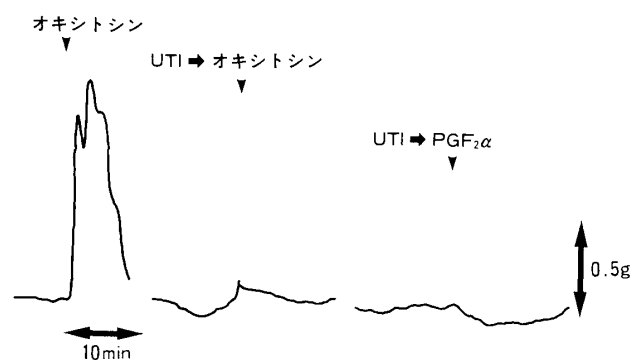


図13 UTI によるオキシトシン子宮収縮の抑制 (ヒト子宮筋)

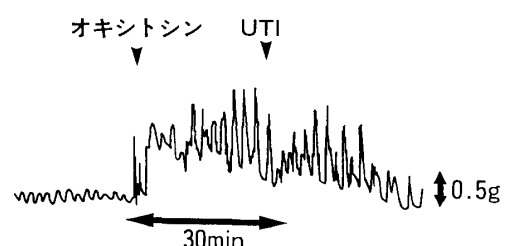


図14 子宮収縮剤 → UTI 投与における子宮の収縮の変化

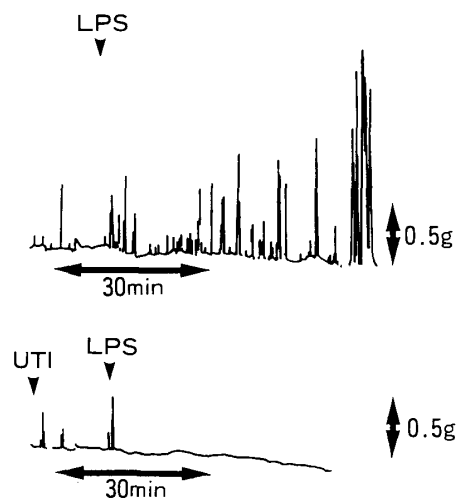


図15 UTI → LPS における子宮収縮の変化

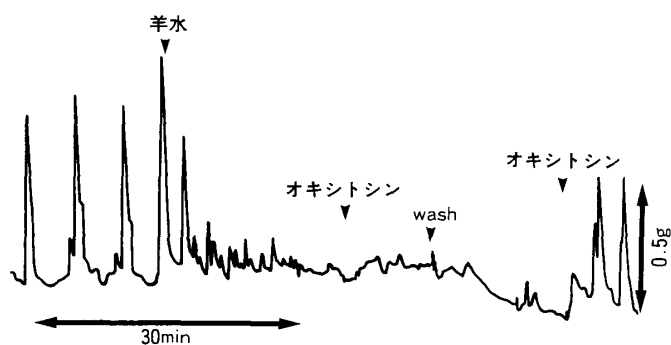


図16 羊水による子宮収縮の抑制

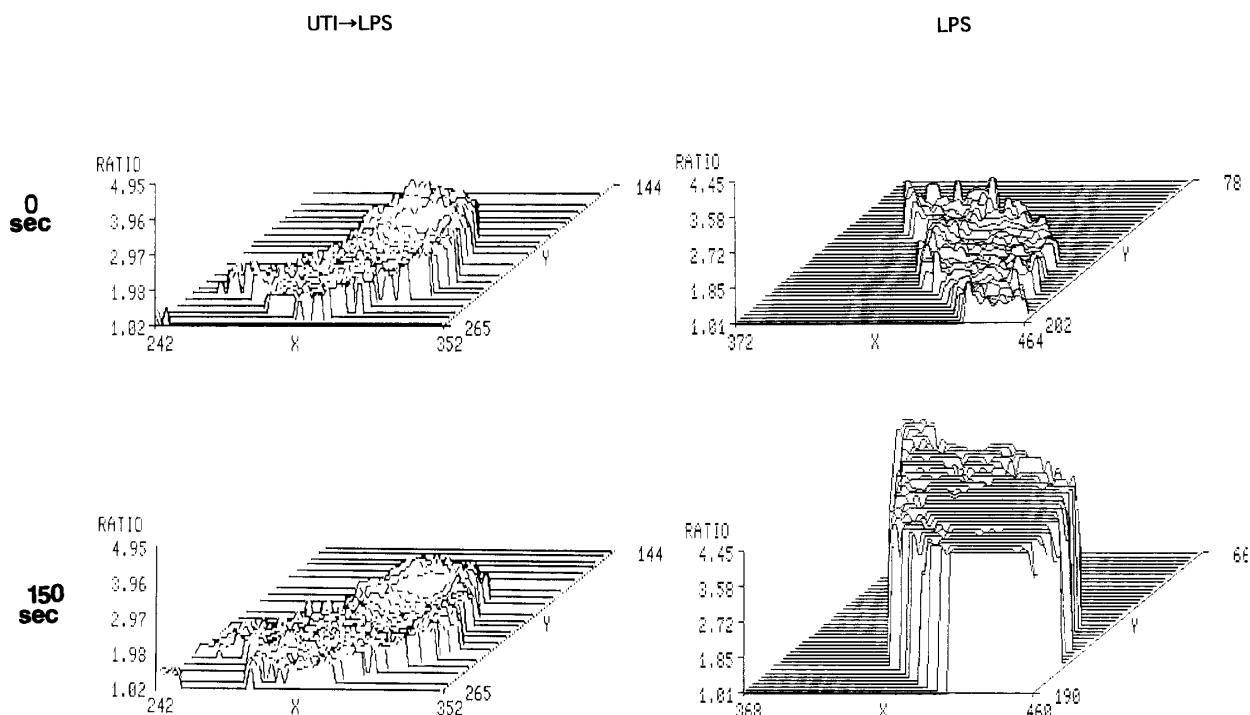


図19 single cell の細胞内カルシウム変化 (子宮平滑筋細胞)

は子宮収縮抑制作用があることが判明した。

7. 細胞内カルシウム測定

UTI の頸管熟化抑制作用や子宮収縮抑制作用の作用機序をみるため、子宮収縮と最も関係する細胞内カルシウムが UTI により変化するか検討した。カルシウムインフラックスを起こすことが知られている LPS を培養羊膜上皮細胞、子宮平滑筋細胞に添加した。一方、UTI をあらかじめ投与しその後 LPS を加えて細胞内カルシウムを測定した。羊膜上皮細胞でも子宮平滑筋細胞でも LPS によりカルシウムインフラックスが起こり著しく細胞内カルシウムが上昇したが、UTI をインキュベートしておくとも LPS 刺激に対して細胞内カルシウム濃度の上昇はみられなかった(図17, 18)。3 分間の観察期間では UTI 投与群では細胞内カルシウムの上昇は全く抑制された。培養液中に EGTA を加えておくと LPS 刺激に対して細胞内カルシウムが約 3 分の 1 に減少したが、この上昇分も UTI は抑制した (data not shown)。図 19 には single cell の細胞内カルシウムの変化を示した。UTI は LPS 刺激に対し single cell のレベルでも明らかに細胞内カルシウムの上昇を抑制した。胎児尿をこの系に加えてみて細胞内カルシ

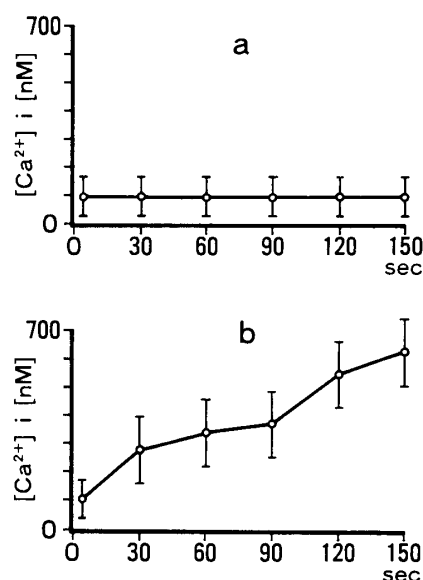


図20 LPS によるカルシウムインフラックスと胎児尿による抑制 (羊膜上皮細胞)

a. 胎児尿 (100 μ l) \rightarrow LPS (10 μ g/ml), b. LPS (10 μ g/ml)

ウムの変化をみたのが図20である。各時間細胞20個以上の細胞内カルシウムを測定し平均を取り図に示した。胎児尿でも UTI と同様 LPS 刺激に対して細胞内カルシウムの上昇を抑制した。細胞内カルシウム上昇と UTI の量を見ると0.1 μ M (16

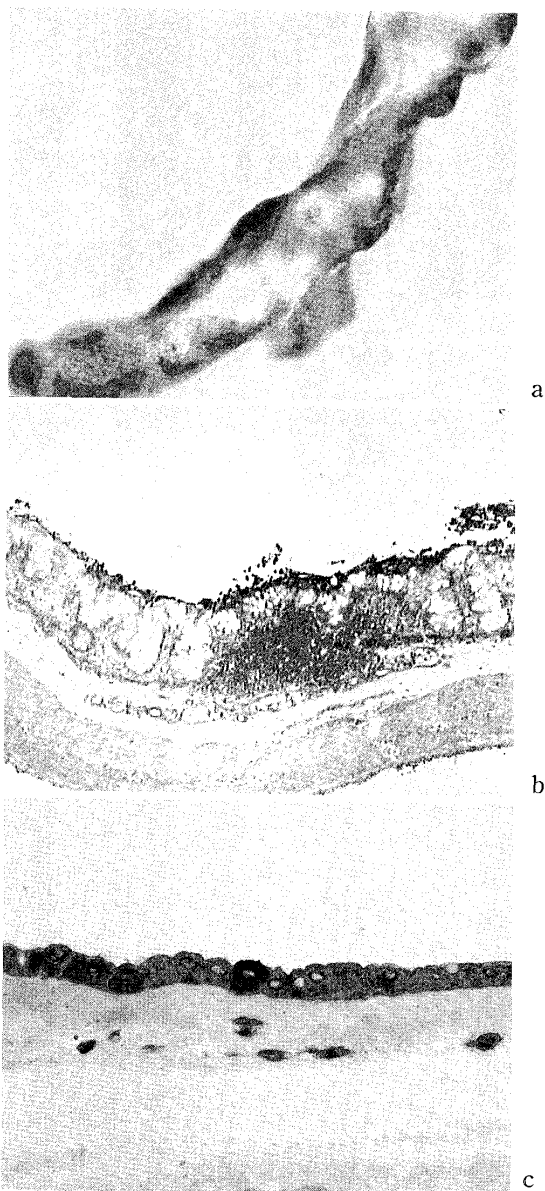


図3 UTIの局在
a. 胎脂, b. 回腸, c. 羊膜

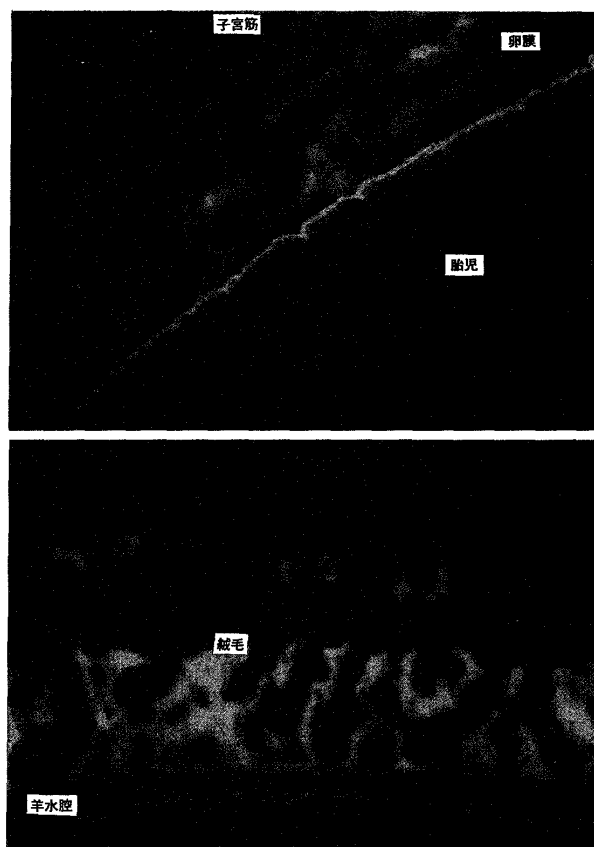


図7 妊娠ラット羊水腔に注入した UTI-FITC の局在

Pregnant rabbit IL-8 Pregnant rabbit IL-8 + UTI

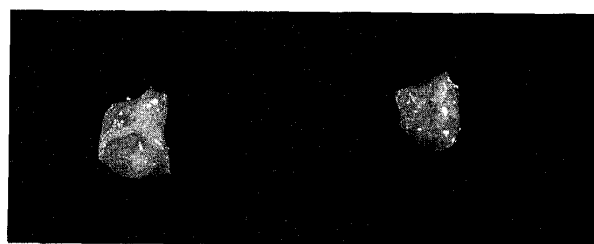


図9 IL-8腔坐薬による頸管熟化の UTI による抑制

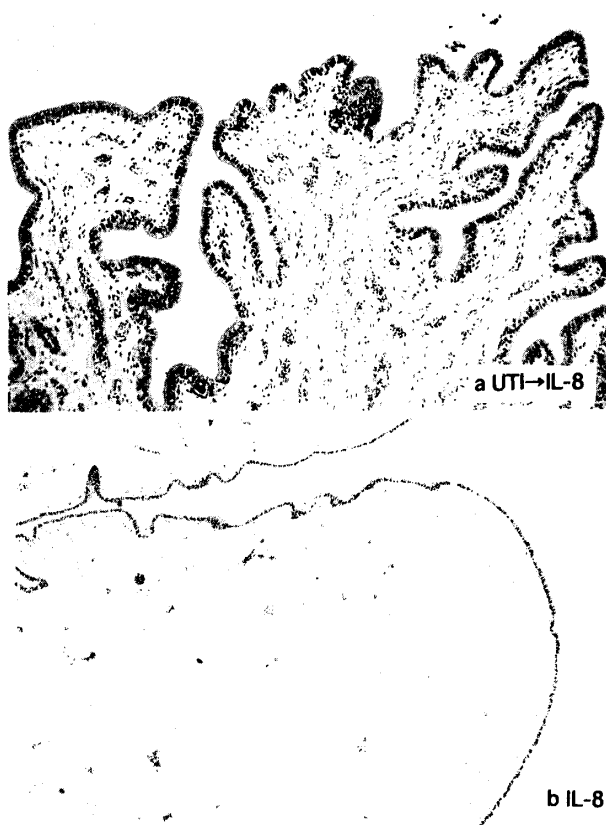


図10 IL-8誘発頸管熟化の UTI による抑制 (HE 染色)

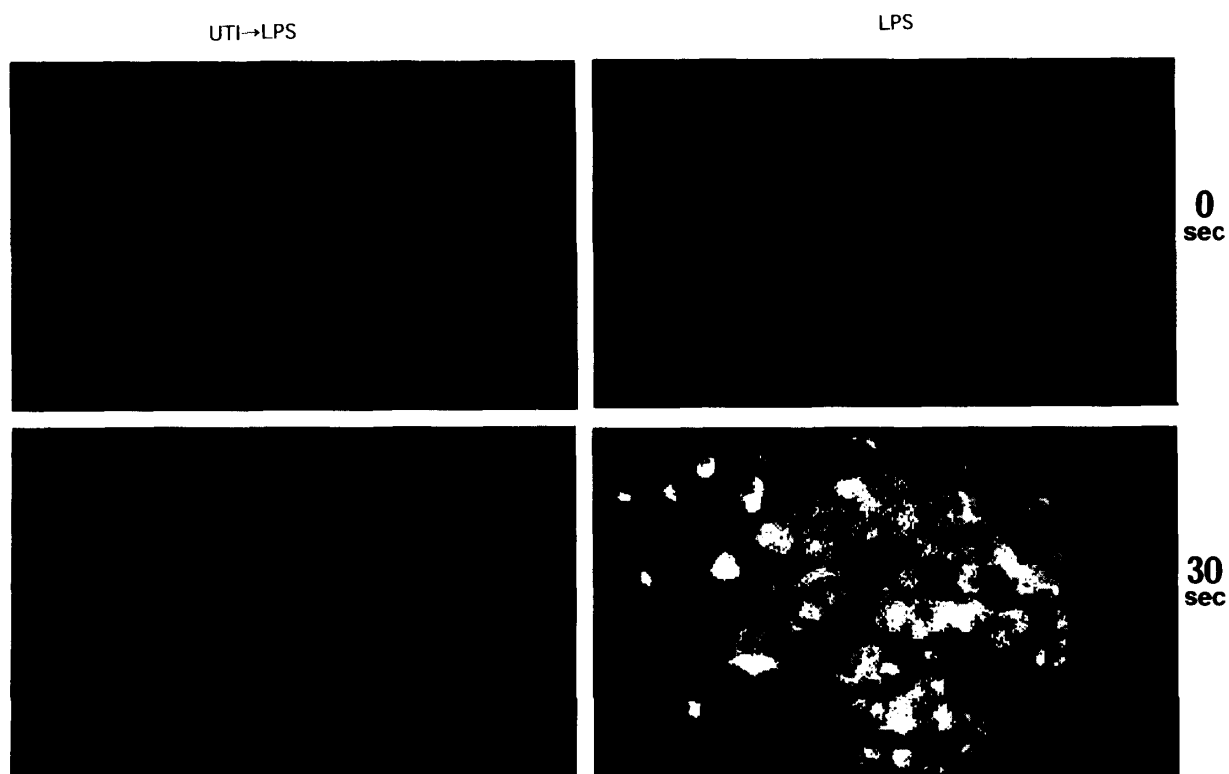


図17 カルシウムインフラックスの UTI による抑制 (羊膜上皮細胞)

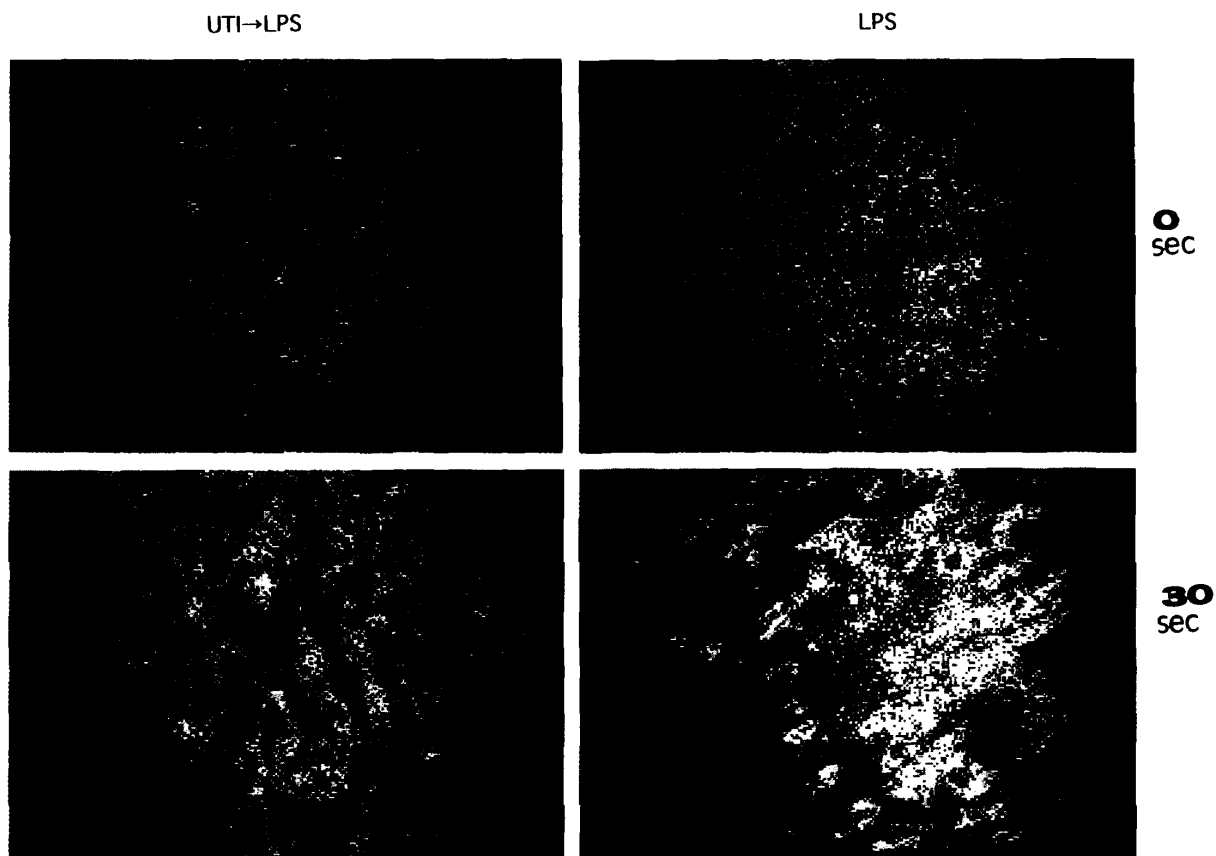


図18 カルシウムインフラックスの UTI による抑制 (子宮平滑筋細胞)

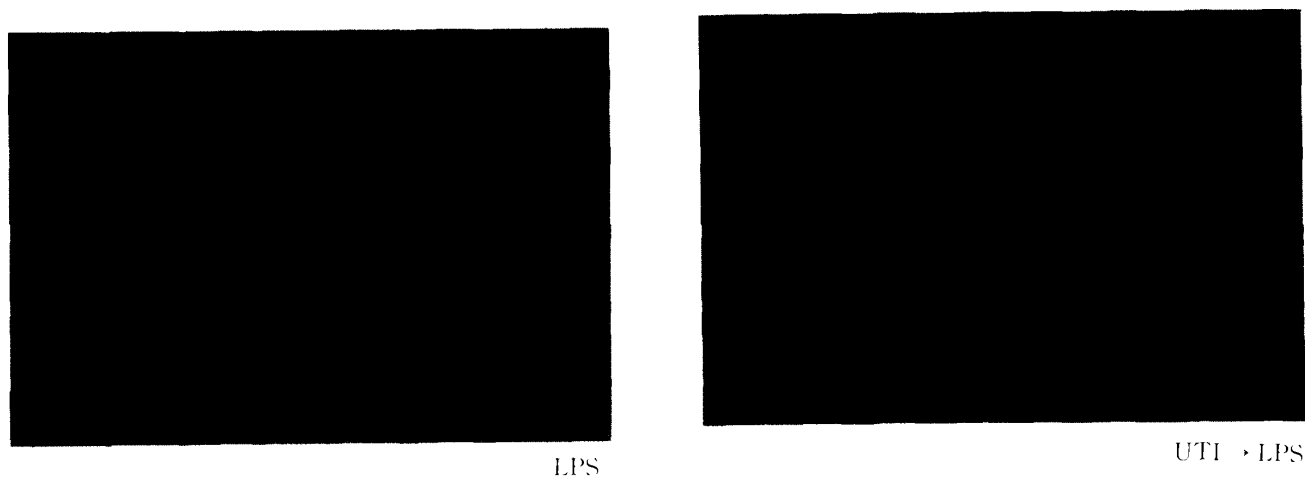


図22 LPS 刺激による HL-8 の発現と UTI による抑制 (羊膜上皮細胞)

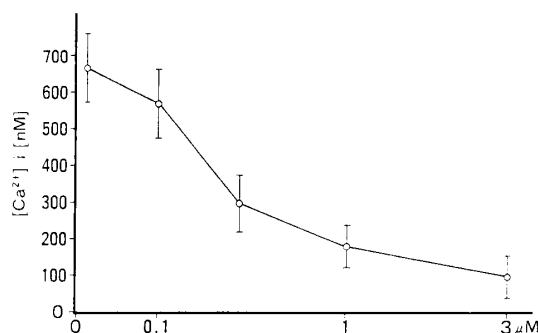


図21 UTI量とカルシウムインフラックス抑制の関係 (羊膜上皮細胞)

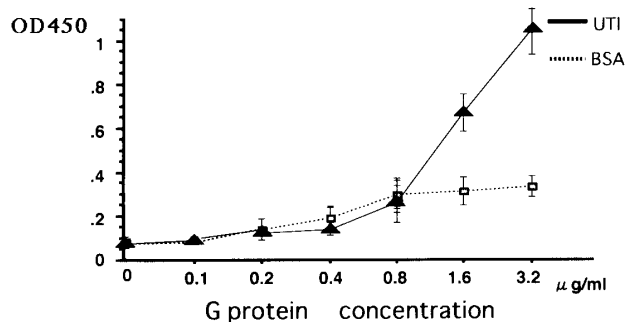


図23 G蛋白とUTIの結合

U/ml) で軽度, 1μM (160U/ml) でほぼ完全にカルシウムインフラックスを抑制した(図21)。これは極めて羊水中 UTI レベルに近いことがわかった。

8. 羊膜上皮細胞における IL-8 発現の UTI による抑制

LPS を添加した羊膜上皮細胞は IL-8 が強く染色された。それに対し UTI を前処理したものは LPS 刺激に対しても IL-8 の発現はコントロールと比し変化がなかった (図22)。

9. G 蛋白と UTI の結合

UTI をコートした well に G 蛋白が濃度依存性に結合した (図23)。

考 察

胎児尿は羊水の主成分であるにもかかわらず、それが羊水、卵膜、子宮に及ぼす作用については系統的研究があまりなされていなかった。一つには胎児尿中物質で羊水中での明確な生理活性があると証明された物質が少ないことなどによる。我々は前期破水の成因を研究していく過程で胎児尿中の UTI が胎児中トリプシンを中和するとい

う生理活性に気づき羊水混濁を胎児尿が浄化するという発想にいたった⁵⁾。今回この UTI が羊水以外の部位でも作用しているとの作業仮説をたて胎児、卵膜、子宮における UTI の役割を研究した。その結果 UTI は胎児、卵膜、子宮にも存在し重要な生理活性をもつ。胎児においては UTI は胎脂、消化管、肺胞に存在し、羊水の接する部位では必ず局在があることが判明した。胎児尿産生のない Potter 症候群では各部位の UTI の局在がなく、Potter 症候群の乾燥皮膚、肺形成不全は UTI の欠損に関連すると考えられた。

卵膜では羊膜上皮細胞に強い局在を認めた。羊膜分解因子である顆粒球や胎便を加えると羊膜の弾力性を担っている type III コラーゲンが特異的に分解されるがこれに UTI を加えることにより抑制された。これらの事実より UTI は卵膜の分解を防御し胎児の居住スペースを維持していることがわかった。また切迫早産のように卵膜炎症時には羊膜は羊水から UTI を積極的に取り込み卵膜機能を保持していることが証明された。

子宮にも UTI が作用するかみるため UTI-FITC を妊娠ラット羊水腔に投与すると子宮にも移行することが明らかになった。また羊水特異物質である亜鉛コプロポルフィリンが脱落膜に存在することを認めたことから羊水成分が子宮に移行することが見出された。妊娠維持機構における子宮の役割は頸管熟化の抑制と子宮収縮の抑制にある。そこでまず UTI が頸管熟化を抑制するか動物実験で検討したところ、UTI は家兎の頸管熟化を効果的に抑制した。胎児尿が頸管に働き、頸管熟化を抑制することが示唆された。

子宮収縮に対しての UTI の作用を等尺性子宮収縮測定装置で測定したところ、UTI は子宮筋の自律収縮を抑制した。またあらかじめ UTI を投与するとオキシトシンやプロスタグランジン F_{2α} による子宮収縮を完全に抑制した。胎児は子宮筋に UTI を作用させ子宮収縮を抑制し自らへのストレスを減少させていることが推測された。切迫早産のモデルである LPS 誘発子宮収縮に対しても UTI は抑制した。UTI は外的な炎症性メディエーターも中和していることがわかった。静的な

環境を維持する必要がある羊水、卵膜、子宮というユニットに UTI が働き胎児防御機構の重要な役割を占めていると考えられる。

我々は新たな UTI の生理活性として頸管熟化抑制作用、子宮収縮抑制作用があることを見出したわけであるが、このような UTI の作用機序は UTI のどのような特性によるのであろうか。UTI は羊膜上皮細胞、子宮平滑筋細胞の刺激 (LPS) に対して細胞内カルシウムの上昇を抑制した。小胞体からのカルシウムの放出、カルシウムインフラックスを両方抑えた。羊膜上皮細胞や子宮平滑筋細胞では細胞外のカルシウムを EGTA でキレートしたときには LPS による細胞内カルシウムの上昇は軽度であることから UTI の主な作用はカルシウムインフラックス抑制作用にあるといえる。胎児尿そのものでも純粋な UTI と同じくカルシウムインフラックスを抑制した。カルシウムインフラックス抑制作用が子宮平滑筋弛緩作用の本体であろう。

LPS を羊膜に添加すると非常に強く IL-8 が羊膜上皮細胞に発現したが UTI を前処理することによりそれは強く抑制された。頸管熟化の中心的役割をなす IL-8 の産生を UTI が抑制することは UTI が頸管熟化の初期段階を抑制すると考えられる。IL-8 産生抑制作用がカルシウムインフラックスと関係するかは明らかでない。しかし細胞内カルシウムが刺激で上昇しないことが細胞内の protein kinase の活性化を抑制し IL-8 の産生低下をもたらす可能性はあるであろう。

UTI のカルシウムインフラックス抑制作用のメカニズムをみるためカルシウムチャンネルの開閉に関係するといわれる G 蛋白と UTI の相互関係を調べた⁶⁾。UTI と G 蛋白の結合実験をしたところ in vitro においては G 蛋白と UTI は結合することが証明された。したがって UTI は G 蛋白の活性を調節することによりカルシウムチャンネルを制御している可能性が予想された。

本研究より胎児尿 (UTI) の卵膜の保持、頸管熟化抑制、子宮収縮抑制という新しい生理活性が見出された。この UTI の作用を使い臨床応用について紹介したい。妊娠維持機構の破綻は臨床的に

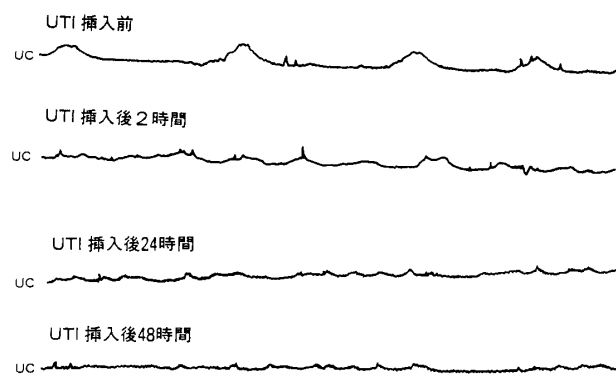


図24 症例。A.A., 29歳, 1G1P 31w2d, 切迫早産

は早産という転帰になる。UTI の妊娠維持効果を用いて切迫早産の治療、前期破水の予防に使用するという試みである⁷⁾。UTI 腔坐薬を作成し切迫早産例に使用している。現在全国レベルで検討中であるが良好な結果を得ている。図24に切迫早産に UTI (1 万単位) 挿入後の子宮収縮の変化を示した。UTI 坐薬を腔内に挿入後 2 時間で子宮収縮の頻度と収縮力が減少し始め24時間でほぼ完全な tocolysis が得られた。UTI 坐薬は ritodorine と異なり即効性は若干劣るが、子宮収縮再発率が低くしたがって妊娠維持効果に優れているのが特徴である。今後即効性のある ritodorine と根本療法といえる UTI 坐薬の併用は早産減少に有効な手段となろう。また胎胞形成例でも妊娠の長期維持例を我々は数例経験しているがこれは UTI の子宮収縮抑制作用、熟化抑制作用、卵膜保護作用が効果的に作用した結果といえよう⁸⁾。

総 括

胎児は羊水腔という限られた居住スペースで生活し、成長している。成長は主に胎盤を通して栄養素、酸素等を摂取することによる。子宮内環境における胎盤は動的な部位といえよう。活発な代謝を行っている胎盤とは対照的に羊水、卵膜、子宮という子宮内環境のユニットは分娩まで静的な環境が必要である。そのユニットの破綻は胎児の排出、すなわち早産と考えられる。したがって胎児は外的ときには内的な羊水、卵膜、子宮というユニットへの侵襲に備えさまざまな防御機構をもつ。その防御因子のなかで胎児尿、ことに UTI は極めて重要な位置を占めている。胎児は急速に成

長し活発な代謝を行うかたわら、排出産物である尿のなかに実は自身の環境を静的に維持する物質を混じえるという巧妙なホメオステイシス機構をもつ。本研究から胎児尿による母体側へのシグナルの伝達経路があることが判明した。まだこの経路の研究は緒についたばかりといえるが、今後この分野の研究の進展は胎児サーベイランス、早産の管理に新たな tool をもたらすかもしれない。

謝 辞

本研究発表の機会を与えていただきました寺島芳輝会長ならびに会員各位、また座長の労をおとりいただきました桑原慶紀教授ならびに藤本征一郎教授に深甚なる謝意を表します。

また研究を遂行するにあたり、多大の御協力をいただいた共同研究者の皆様、さらに浜松医科大学産科婦人科教室員の皆様および同窓会の諸先生方に心より御礼申し上げます。

共同研究者

前原佳代子, Abdul Halim, Maradny El Emad, 徳永直樹, 余 力平, 成瀬寛夫, 岡田喜規, 安藤勝秋, 住本和博, 後藤淳子, 山本信博, 堀内健太郎, 藤本大三郎

文 献

1. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D. Collagen types in normal and

- prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 899—903
2. Kanayama N, Yamazaki T, Naruse H, Sumimoto K, Horiuchi K, Terao T. Determining zinc coproporphyrin in maternal plasma—a new method for diagnostic amniotic fluid embolism. *Clin Chem* 1992; 38: 526—529
3. Maradny EE, Kanayama N, Halim A, Maehara K, Sumimoto K, Terao T. Interleukin-8 induces cervical ripening in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1994 (in press)
4. 工藤佳久. 細胞内カルシウム濃度分布の画像解析法. *実験医学* 1991; 9: 89—96
5. 寺尾俊彦, 金山尚裕. Preterm PROM の成因について. *産婦の実際* 1988; 37: 159—168
6. Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B. Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 1991; 353: 43—48
7. 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. 切迫早産におけるウリナスタチン腔坐剤の効果. *日産婦誌* 1992; 44: 477—482
8. 藤城 卓, 川口欣哉, 中島 彰, 安藤勝秋, 大井豪一, 金山尚裕, 寺尾俊彦. ウリナスタチン腔内投与により長期間妊娠を維持し得た胎胞形成切迫早産の1例. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 1992; 2: 107—110

Synopsis

To determine the intrauterine defensive role of urinary trypsin inhibitor (UTI), we studied the effects of UTI in amniotic fluid, fetal membranes and myometrium. The level of UTI was $94 \pm 34 \text{ U/ml}$ in neonatal urine (compared to adult urine $8.0 \pm 6.0 \text{ U/ml}$) and $88 \pm 37 \text{ U/ml}$ in amniotic fluid. This may indicate that the main source of UTI in the amniotic fluid is the fetal urine.

UTI was found to be concentrated in vernix, fetal intestine, amniotic membranes and uterine myometrium. Immunostaining of term amnion revealed a dark staining for UTI, whereas in premature deliveries UTI staining was markedly decreased. In myometrium, the concentration of UTI was found to be increased during pregnancy compared to non pregnant myometrium. Also, placentas were well stained for UTI in term pregnancy. Thus UTI has an important role in amniotic fluid, fetal membranes, placenta and uterine muscles.

UTI has an inhibitory effect on several enzymes and cytokines. UTI was found to inhibit neutrophil elastase activity as well as trypsin activity. Its inhibitory activity was increased in the presence of lipid. LPS stimulated amnion cells trapped more UTI than unstimulated amnion cells. UTI in amnion cells was released after addition of 1% meconium solution. UTI was also found to inhibit the effect of IL-1, TNF and interleukin-8 on amnion. These results indicate that UTI localized in amnion is important in the protection of fetal membrane especially against bacterial infections and cytokines.

It is known that endothelin (ET), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) and oxytocin can induce uterine contraction. UTI could inhibit uterine contractions stimulated by ET, $\text{PGF}_{2\alpha}$ and oxytocin in isometric contraction test. UTI could also inhibit cervical maturation induced by interleukin-8. Therefore UTI is essential for maintenance of pregnancy.

From the isometric contraction tests, we assumed that UTI might works through regulation of calcium entry or availability in the cells. Initial increase in intracellular calcium was also inhibited by UTI pre incubation dose dependantly. We examined the change in intracellular calcium at single cell level by digital image analysis with Fura 2AM as a calcium probe. At resting level UTI incubation did not produce any significant changes in intracellular free calcium. Thrombin, LPS, interleukin-8 and ET-1, known calcium agonists could increase intracellular calcium in fibroblasts, amnion and uterine myocytes. Whereas as the same doses of those known calcium agonists could not change the intracellular free Ca^{2+} concentrations in UTI pre incubated fibroblasts, amnion cells and uterine smooth muscle cells. Pre incubation with 2nM EGTA could inhibit the initial rise in intracellular calcium that reflects the calcium release from intracellular stores. However pre incubation with UTI, the initial rise in intracellular calcium was also inhibited. These results agreed the result of inhibition of myometrial contraction by UTI pre incubation in isometric contraction tests. The inhibitory effect of UTI on calcium mobilization and entry was suggested by this study. Increased intracellular free calcium also functions as a second messenger that determines the cellular synthetic activities in many cells. With the idea that UTI inhibits the synthetic activities in cells, we examined the effect of UTI pre incubation on production of interleukin-8, collagenase and prostaglandin from the amniotic cells and fibroblasts. LPS stimulated amnion cells and the fibroblast cultures and significantly increased production of interleukin-8, collagenase and prostaglandin from them. Whereas as pre incubation with UTI, the production of interleukin-8, collagenase and prostaglandin from the amnion cells and fibroblasts was depressed. LPS could increase significantly the appearance of mRNA of interleukin-8 in amnion and fibroblast cells. We also examined the effect of UTI pre incubation on the appearance of mRNA in LPS stimulated cells. The appearance of mRNA of interleukin-8 in those cells was inhibited in the presence of UTI. From these series of experiments, we concluded that UTI regulates the production of inflammatory mediators by the control of intracellular free Ca^{2+} : a second messenger.

We treated mild cases of imminent preterm delivery with UTI suppository or ritodrine infusions. The treatment with UTI suppository could significantly prolong the pregnancy than that with ritodrine. The preterm birth rate was also significantly lower in UTI treated cases than in ritodrine treated cases. Therefore, treatment with UTI vaginal suppository would be a new and very useful for imminent preterm delivery.