

組織学的絨毛羊膜炎を合併した常位胎盤早期剥離の 発症機序に関する研究

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

The Study on Mechanism of Abruption Placentae Caused by Chorioamnionitis

Katsuaki ANDO, and Naohiro KANAYAMA

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

概要 最近, 常位胎盤早期剥離 (早剥) の原因として組織学的絨毛羊膜炎 (chorioamnionitis: CAM) が関与しているという報告が散見される。早剥では脱落膜細胞内とその間質で児娩出前に剥離が起きる。脱落膜細胞及びその間質に存在するフィブロネクチン (FN), フィブロネクチンリセプター (FNR) はその接着に重要な役割を果たしていることから, それらは早剥の発症機序に深くかかわると考えられる。一方, CAM 等の炎症では好中球由来の顆粒球エラスターゼ (Ela.) は重要な炎症性メディエーターの一つと考えられている。そこで CAM による早剥発症の機序について早剥例, 非早剥例の胎盤, 卵膜の脱落膜細胞に存在する FN, FNR と Ela. を酵素抗体法により免疫染色し組織学的に検討した。その結果, CAM による早剥例では胎盤, 卵膜に高度の Ela. の放出が認められ, 妊娠中毒症 (中毒症) 及び CAM のない非早剥例 (正常胎盤) と比較して剥離部分, 非剥離部分共に脱落膜細胞の FNR の染色性の低下が認められた。CAM のある非早剥, 早産例では CAM による早剥例ほどの Ela. の放出は認められず脱落膜細胞の FNR の染色性に変化はなかった。中毒症を合併した例では早剥例, 非早剥例共に Ela. は認められず, 脱落膜細胞の FNR は濃染し間質に滲み出すような所見を呈した。中毒症及び CAM のない (原因不明) 早剥例では Ela. は認められず FNR の染色性も正常胎盤と同じであった。FN はいずれの症例においても差を認めなかった。

次に Ela. と FNR を二重染色したところ, Ela. の浸潤した部位での FNR の低下が確認された。また, 脱落膜細胞に Ela. を添加して培養したのち FNR を免疫染色したところ, FNR の染色性の低下が認められた。以上より CAM を合併した早剥の発症機序は好中球の浸潤に対する防御機構のバランスが高度に失調し脱落膜細胞の FNR が Ela. により分解, 不活化等の変化を受け脱落膜の接着性が低下して胎盤の剥離が起きると推論された。

Synopsis The cause of abruption placentae has not been elucidated yet. Although preeclampsia is frequently associated with abruption placentae, the rate of abruption placentae caused by preeclampsia has decreased recently. Many current reports have indicated that chorioamnionitis is an important cause of abruption placentae. To clarify the relationship between chorioamnionitis and abruption placentae, we performed immunostaining for fibronectin, fibronectin receptor and granulocyte elastase of placenta with or without abruption placentae. In cases of abruption placentae caused by chorioamnionitis, granulocyte elastase was stained strongly and fibronectin receptor was stained weakly in decidual cells, especially in the parts of granulocyte elastase invaded. In III stage chorioamnionitis without abruption placentae, granulocyte elastase was stained moderately and the intensity of fibronectin receptor did not decrease. There was no difference between fibronectin staining in all cases. When purified granulocyte elastase was added to the cultured decidual cells, the staining intensity of fibronectin receptor became weak in those cells. These results suggest that marked imbalance between neutrophil invasion and an inhibitor, such as α_1 antitrypsin, initiates granulocyte elastase release and promotes the reduction of the fibronectin receptor in decidual cells resulting in weakening of the adherence of decidual cells. This may be one of the mechanisms of abruption placentae caused by chorioamnionitis.

Key words: Abruption placentae • Chorioamnionitis • Fibronectin receptor • Granulocyte elastase • Decidual cell

緒 言

常位胎盤早期剝離（早剥）の原因として従来より妊娠中毒症（中毒症）が重視されており，中毒症の合併率は報告者により異なるものの6.12%から100%¹⁾とされてきた。しかし最近では中毒症を合併しない早剥も多く，平塚ら²⁾の報告によると中毒症を合併していたものは，わずか15.5%と少なく，むしろ原因不明の場合が76.2%を占めていた。最近 Darby et al.³⁾は早産例の早剥において41%に組織学的絨毛羊膜炎（chorioamnionitis: CAM）が認められたと報告している。しかしCAMと早剥の関連について基礎的検討は全くなされていない。早剥は胎児娩出前に脱落膜の中で剝離が起きる⁴⁾ことから脱落膜細胞とその間質との接着性にその原因を求めることができる。Haselback et al.⁵⁾, Pritchard⁶⁾は congenital afibrinogenemia の妊娠例が早剥を起こしたことを報告している。また稲本と寺尾⁷⁾はフィブリノーゲンを補充することにより congenital afibrinogenemia に早剥を発症させずに分娩させた例を報告している。さらに小林ら⁸⁾はフィブロネクチンリセプター（FNR）の先天性異常が原因と思われる早剥例において脱落膜細胞のFNRの染色性の低下を報告している。これらは早剥の発症に脱落膜の接着因子が深く関与することを示唆している。細胞とその間質の接着には従来よりフィブロネクチン(FN), FNR⁹⁾等の接着蛋白が重要な役割を持つとされている。最近 Kanayama and Terao¹⁰⁾が中毒症が原因の早剥では血中FNRが上昇し，免疫染色によると脱落膜細胞のFNRも染色性が亢進することを報告している。これも早剥と接着分子の関連を示唆するものといえよう。一方CAMの際に細菌感染に伴って胎盤や卵膜に浸潤する好中球が脱顆粒する際に顆粒球エラスターゼ(Ela.)が放出され，これが組織の分解に働くことが知られている。それゆえにCAM合併の早剥では脱落膜に浸潤した好中球から放出されるEla.がFN, FNRに何らかの作用を及ぼしているのではないかと推論される。そこでCAMを合併した早剥と合併しない早剥について胎盤，卵膜の脱落膜細胞のEla., FN, FNRの存

在を非早剥例と共に病理組織学的に検討した。

実験材料と実験方法

I. 実験材料

1. 平成2年1月1日より平成4年12月31日までの間に当科で経験した14例の早剥症例ならびにコントロールとして188例の胎盤，卵膜を研究対象とした(表1参照)。早剥の原因として考えられるものは中毒症が2例，CAMが4例(いずれもBlancの分類のStage III)，残りの8例は原因不明であった。CAMによる早剥の4例は在胎週数21, 22, 29, 36週で，同週数の早剥も中毒症もCAMもない正常胎盤，卵膜のそれぞれ21週2例，22週

表1 実験材料(胎盤，卵膜)の在胎週数別分布

—平成2年1月1日より平成4年12月31日まで—

在胎週数	コントロール(188例)				常位胎盤早期剝離(14例)			
	妊娠中毒症⊖		妊娠中毒症⊕		妊娠中毒症⊖		妊娠中毒症⊕	
	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕
20								
21	2					1		
22	1					1		
23	2							
24	1							
25	1	1						
26		1						
27		1	1			1		
28	1	1						
29	4	1				1	1	
30	4					1		
31	4	1						
32	5							
33	2					1		
34	8							
35	7	2	1			1		
36	10						1	
37	13	1	1					
38	32	4				3		
39	31	2						
40	28	3						
41	6	2				1		1
42	3							
計	165	20	3	0	8	4	2	0

CAM: chorioamnionitis

1例, 29週4例, 36週10例をコントロールとした。また, 中毒症はないがCAMのある25週1例, 26週1例, 27週1例, 28週1例, 29週1例, 31週1例, 35週2例及び中毒症はあるがCAMのない27週1例, 35週1例, 37週1例の胎盤, 卵膜を早剥例と比較検討した(すべての実験材料は病理組織学的にCAMの有無について確認した)。

2. 人工妊娠中絶時に無菌的に採取した妊娠6週から8週の3例の脱落膜を対象とした。

II. 実験方法

1. 胎盤, 卵膜のEla., FN, FNRを免疫染色し, 鏡検にてそれらの動態を病理組織学的に検討した。

染色法1(酵素抗体法), LSABキット(ダコ・ジャパン)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, 一次抗体として monoclonal mouse anti-human neutrophil elastase (Dako), rabbit anti-human fibronectin polyclonal antisera (Biomedical Technologies) 又は rabbit anti-human fibronectin receptor polyclonal antisera (Chemicon International Inc) と反応させ, 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, 3%AEC(3-アミノ-9-エチルカルバゾール)で発色させ, マイヤーヘマトキシリンにて核染色した。

染色法2(酵素抗体法+アルカリフォスファターゼ標識法による二重染色), 染色法1と同じ手順でSAB法にてEla.をDAB(ジアミノベンジン; 和光純薬)にて発色させた後, アルカリフォスファターゼ標識法を用いて一次抗体として抗FNR抗体を反応させ, 二次抗体として alkaline phosphatase conjugated goat IgG anti-rabbit IgG (Binding Site Ltd) を添加し, Fast Red Method(Naphthol AS-MX phosphate, free acid 2mg+N, N-dimethylformamide 0.2ml+0.1M Tris buffer pH 8.2 9.8ml+1M Levamisole 0.01ml+Fast-Red TR salt 10mg)にてFNRを発色させ, マイヤーヘマトキシリンにて核染色した。

2. 妊娠初期脱落膜のFNR染色

人工妊娠中絶時に無菌的に採取した脱落膜に ELASTASE, Human Neutrophil (Calbiochem Corporation)を非添加, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/mlの4群の濃度で培養液に添加し5% CO_2 下37 $^{\circ}C$ incubatorで3時間培養した。培養液は fetal calf serum free MEM液(ニッスイ)を用いた。染色はSAB法にて染色法1と同様の手順でFNRを免疫染色し病理組織学的に検討した。

実験成績

1. 胎盤, 卵膜のEla., FN, FNRの染色(表2参照)

染色法1. ①Ela.染色: CAMのない例では早剥例, 非早剥例いずれもEla.はほとんど認められなかった(写真1)。CAMのある非早剥, 早産例ではBlancの分類Stage II, IIIでも高度のEla.の放出, すなわち脱顆粒は認められず中程度までであった(写真3)。CAMが原因の早剥例では剥離部分, 非剥離部分共に高度のEla.放出が認められた(写真5)。②FN染色: FNは在胎週数, 中毒症の有無, CAMの有無, 早剥の有無にかかわらず染色性に差を認めなかった。③FNR染色: 中毒症及びCAMのない非早剥例(正常胎盤)では在胎週数によるFNRの染色性にほとんど差を認めずKanayama and Terao¹⁰⁾の報告と一致した(写真2)。中毒症はないがCAMのある非早剥, 早産例では正常胎盤と比較してごく一部にFNRの染色性に低下を認めたものの全体的には正常胎盤と差を認めなかった(写真4)。一方CAMが原因の早剥例では剥離部分, 非剥離部分を問わず脱落膜細胞において高度にFNRの染色性が低下しFNRの染色性が保たれていた部分のほんのごく一部であった(写真6, 8)。中毒症合併例では早剥例, 非早剥例共に正常胎盤と比較し脱落膜細胞のFNRの染色性が亢進し脱落膜細胞の間質に強くしみ出していた(写真9)。中毒症及びCAMのない(原因不明)早剥例ではFNRの染色性は正常胎盤と差を認めなかった(写真7)。

染色法2. 二重染色ではCAMによる早剥例の場合, 同一切片においても脱落膜細胞のEla.の非浸潤部位に比べて浸潤部位は特にFNRの低下が認められた(写真10)。

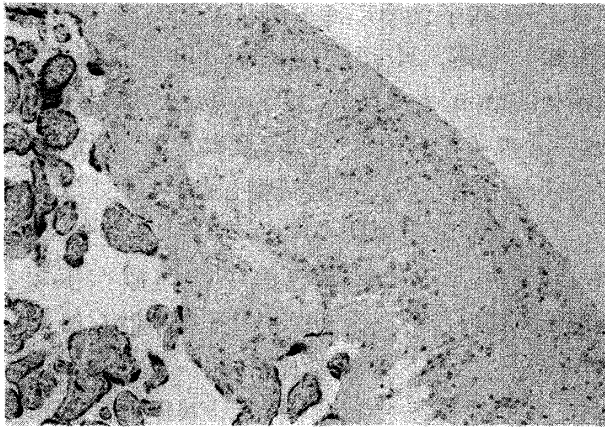


写真1 妊娠中毒症及びCAMのない非早剥例の胎盤（正常胎盤）のEla.染色, ×100. Ela.の脱落膜細胞等への浸潤は認められない。

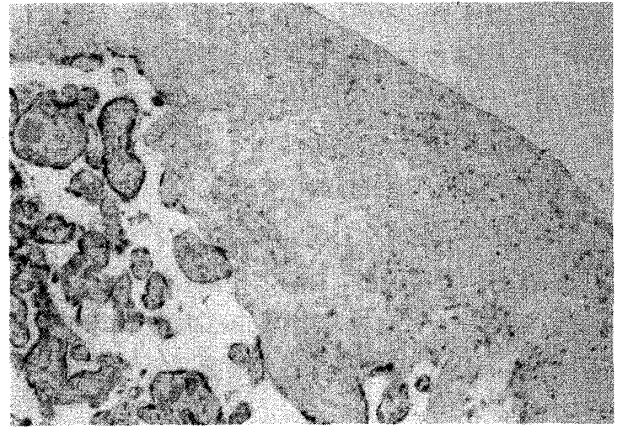


写真2 写真1と同一切片のFNR染色, ×100. 脱落膜細胞でのFNRは中程度に染色されている。

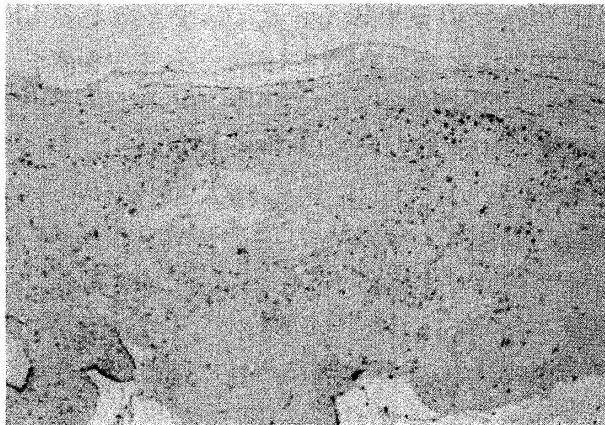


写真3 CAMのある非早剥, 早産例の胎盤のEla.染色, ×100. Blancの分類Stage IIで好中球は羊膜直下まで浸潤しているがEla.の放出は軽度で脱落膜細胞のみに認められる。

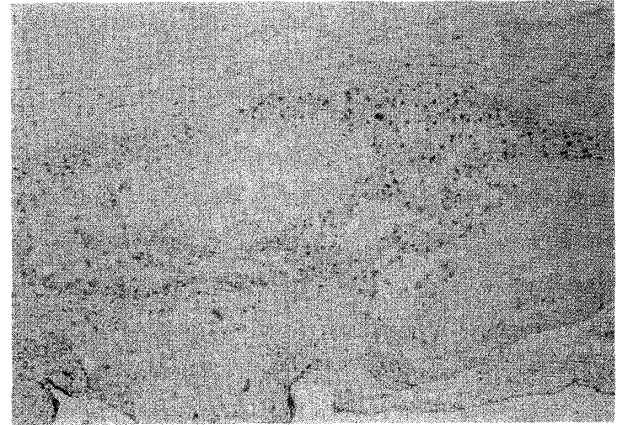


写真4 写真3と同一切片のFNR染色, ×100. FNRの脱落膜細胞における染色性は中程度であり, 正常胎盤と差を認めない。

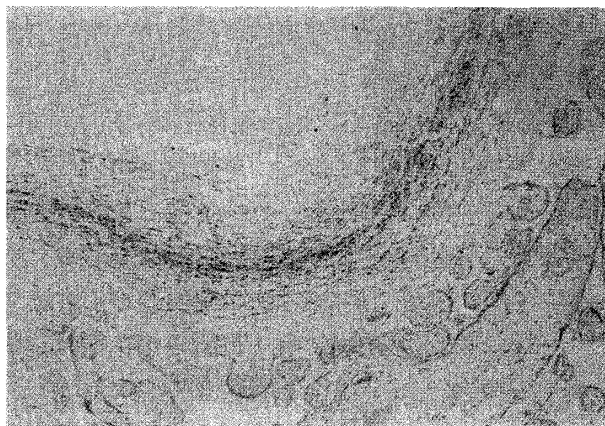


写真5 CAMが原因の早剥例の胎盤のEla.染色, ×100. Blancの分類Stage IIIであり好中球の浸潤に伴い脱落膜細胞から羊膜細胞までへの著明なEla.の浸潤を認める。

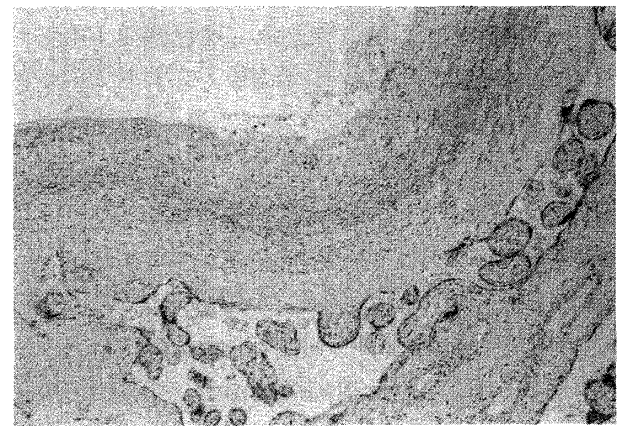


写真6 写真5と同一切片のFNR染色, ×100. 脱落膜細胞におけるFNRの著明な染色性の低下を認める。

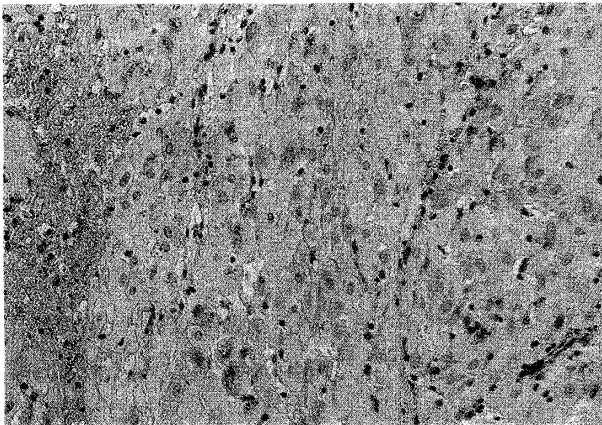


写真7 妊娠中毒症及びCAMのない(原因不明)早剥例の胎盤の脱落膜細胞のFNR染色, ×200. FNRの染色性は中程度である.

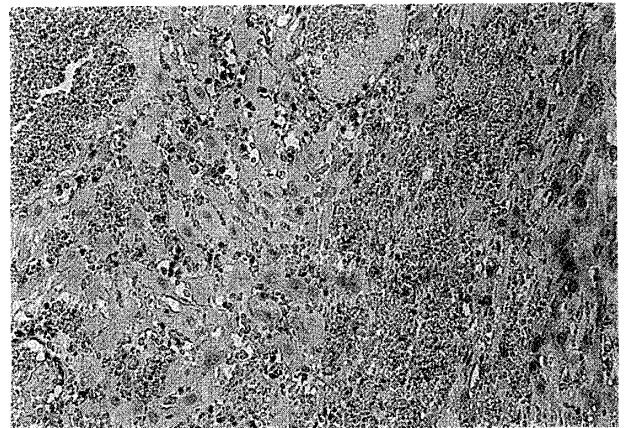


写真8 CAMが原因の早剥例の胎盤の脱落膜細胞のFNR染色, ×200. FNRの染色性は高度に低下している.

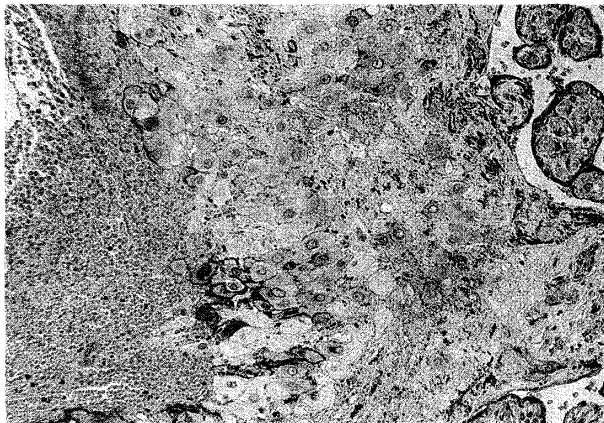


写真9 妊娠中毒症が原因の早剥例の胎盤の脱落膜細胞のFNR染色, ×200. FNRの染色性は亢進し間質に滲み出している.

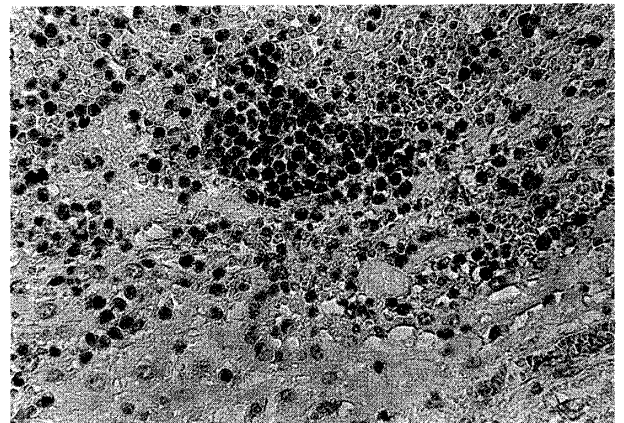


写真10 CAMが原因の早剥例の胎盤の脱落膜細胞の二重染色(Ela. + FNR), ×400. Ela.の浸潤部位ではほとんどFNRが染色されず, 特に低下している.

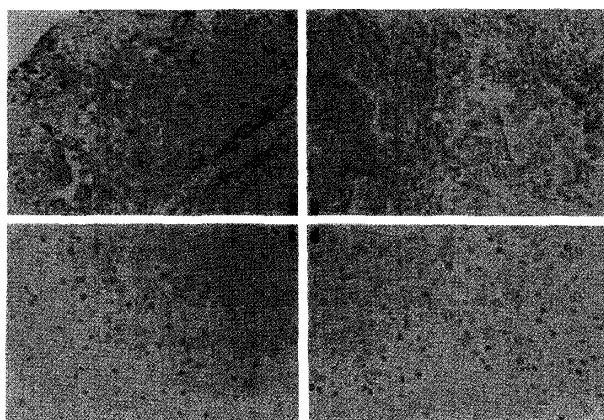


写真11 a: 顆粒球エラスターゼ非添加, b: 顆粒球エラスターゼ0.1µg/ml添加, c: 顆粒球エラスターゼ1µg/ml添加, d: 顆粒球エラスターゼ10µg/ml添加. 脱落膜細胞のFNR染色, ×400.

表2 脱落膜細胞におけるEla., FN, FNRの染色性

脱落膜細胞での染色性	コントロール				常位胎盤早期剥離(特に剥離部)			
	妊娠中毒症⊖		妊娠中毒症⊕		妊娠中毒症⊖		妊娠中毒症⊕	
	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕	CAM⊖	CAM⊕
顆粒球エラスターゼ(Ela.)	-	+~++	-	-	-	###	-	-
フィブロネクチン(FN)	++	++	++	++	++	++	++	++
フィブロネクチンリセプター(FNR)	++	(+~)++	###	###	++	-~+	###	###

2. 妊娠初期脱落膜における FNR の染色

Ela. 非添加群では FNR は中程度に染色された。Ela. を $0.1\mu\text{g/ml}$ 濃度で添加した群は FNR の染色性は軽度抑制を受け、 $1\mu\text{g/ml}$ 以上では高度に抑制された (写真 11a, b, c, d)。

考 案

従来早剥の原因としては機械的外力(腹部打撲, 転倒, 外回転術など, 過短臍帯), 子宮内圧, 羊膜腔内圧の低下(羊水過多, 双胎), 栄養代謝障害(葉酸代謝異常), 特殊妊娠合併症(中毒症, 血液凝固障害), 胎盤の異常(副胎盤, 周廓胎盤など), 免疫学的因子(免疫学的反応による小血管の障害)などさまざまな原因が考えられてきた。このうち外回転術などの機械的外力により早剥が起きるような因果関係がはっきりしているものは少ない。これまでは中毒症が重視されてきたが最近では平塚ら²⁾の報告するように中毒症非合併例が多い。中毒症に代わって原因の多数を占めるようになったのは原因不明例であり, 平塚らはその占める割合は76.2% (21例中16例), 当科では57.1% (14例中8例)であった。平塚らの原因分類に CAM はないが Darby et al.³⁾が1989年に早産例の早剥と CAM との関連を報告している。当科の成績でも CAM を合併した早剥4例はいずれも37週未満に発症しており, 彼らの報告が裏付けられ早剥との関連も存在することが確認された。従来の早剥のリスクファクターとしては高血圧, 喫煙, 前回早剥等があげられているが, CAM もその一つとして数えられよう。Foulon et al.¹¹⁾は胎盤のウレアプラズマ感染による早剥例を報告しており, Darby et al.³⁾, Hillier et al.¹²⁾は胎盤や卵膜の細菌感染を早剥や早産の原因と考えているが, それ以上のことは言及していない。寺尾と金山¹³⁾は CAM で胎盤, 卵膜に浸潤する好中球が脱顆粒する際に放出される Ela. が早産, preterm PROM の病態と深く関与するとして注目している。そこで今回 CAM が原因の早剥の場合も好中球が脱顆粒して放出する Ela. が早剥の発症に関与していると予想した。一方 congenital afibrinogenemia ではフィブリノーゲンを補充しない限り早剥が必ず発症することが知られている。これは細胞外マ

トリクス蛋白が胎盤の接着に大切な働きをしていることを意味する。この中でも特に接着分子として脱落膜細胞及び細胞外マトリクスに重要な働きをする FN, FNR に注目した。その結果, 脱落膜細胞の FNR が Ela. によって染色性が抑制されるという興味深い結果を得た。これは CAM においては好中球が Ela. 等のプロテアーゼを放出し, 脱落膜細胞の間に浸潤するためと考えられる。通常は CAM があっても Goetzl¹⁴⁾が報告するように α_1 アンチトリプシン (α_1 AT)等の防御機構が働いて好中球の組織破壊を防御しているが Ela. と α_1 AT などのプロテアーゼインヒビターとのバランスが失調したとき proteolytic な力が胎盤や卵膜に働く。Blanc の分類 Stage III の CAM でも Ela. の脱顆粒, 放出は非早剥例では早剥例と比較してそれほど著明でなく FNR の染色性も保たれていることより, そのバランスが高度に失調をきたした場合にそのプロテアーゼによって FNR 等の接着分子が分解されるのであろう。そこで子宮壁と胎盤の接着性が低下し, 子宮収縮等の弱い刺激でも胎盤が剝離し部分早剥になると思われる。二重染色の結果より同一症例においても Ela. の浸潤部位では非浸潤部位に比べて明らかに FNR の染色性が低下しており, Ela. が FNR の染色性を抑制していると考えられた。Azghani et al.¹⁵⁾が細菌性エラスターゼが線維芽細胞上の FNR を減少させることを報告しているが, それと同様に Ela. も FNR を低下させるのではないかと推論される。一方 FN は CAM の有無にかかわらずはっきりした染色性の差は認められなかった。この原因として第一に FN は血漿中に多量にあり CAM という炎症により局所で分解されても補充される可能性があること, 第二に我々の使用した抗 FN 抗体はポリクローナル抗体なので degradation も同時に検出していることなども考えられる。以上より CAM による早剥は胎盤, 卵膜に浸潤した好中球(攻撃因子)と α_1 AT 等(防御因子)とのバランスが何らかの原因で大きく失調をきたし攻撃因子優位となって大量の Ela. が放出され脱落膜細胞の FNR の染色性を抑制あるいは分解, 不活化させる。その結果胎盤の子宮壁への接着性が低

下したために部分早剥が発症することが示唆された。これが進行すれば完全早剥に進行するのかもしれない。一方、中毒症を合併した早剥は竹内ら¹⁾のいうように脱落膜螺旋動脈の攣縮により壊死変性を伴い壊死後血管からの出血の結果剥離が起きるものと思われる。FNRは脱落膜細胞の虚血により変性し、細胞表面から遊離するため間質に滲んでくるのではないかと予想される。

最近では、早剥の原因として妊娠中毒症に代わって最も多いとされる原因不明例のうち、なかでもCAMは原因不明例のかなり多数を占めるものと思われる。今後頸管粘液中のEla.(三和化学, エラスターゼキット), FN(Adeza, PTD Check),あるいはFNR(検討中)などを測定することによりCAM由来の早剥の発症の予知, 予防が可能となるかもしれない。

文 献

1. 竹内正七, 徳永昭輝, 花岡仁一. 常位胎盤早期剥離. 産婦人科 Mook, 東京: 金原出版, 1980; 11: 137-147
2. 平塚圭祐, 高崎彰久, 蔵元武志, 森岡 均. 常位胎盤早期剥離の臨床的検討. 産婦の実際 1992; 41: 1245-1250
3. Darby MJ, Caritis SN, Shen-Schwarz S. Placental abruption in the preterm gestation: An association with chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 1989; 74: 88-92
4. 福田 透, 平林稔之. 常位胎盤早期剥離. 産婦の世界 1983; 35: 9-14
5. Hasselback R, Marion RB, Thomas JW. Congenital hypofibrinogenemia in five members of a family. *Canad Med Ass* 1963; 88: 19-22
6. Pritchard JA. Chronic hypofibrinogenemia and frequent placental abruption. *Obstet Gynecol* 1961; 18: 146-151
7. 稲本 裕, 寺尾俊彦. Congenital afibrinogenemia の分娩. 産婦の実際 1985; 34: 703-713
8. 小林隆夫, 横沢協子, 川口欽也, 朝比奈俊彦, 金山尚裕, 寺尾俊彦. 接着性物質と妊娠の維持. 産婦児血液誌 1991; 1: 41-49
9. 長谷川孝幸, 林 正男. フィブロネクチンレセプターと細胞表面. 蛋白質核酸酵素 1986; 31: 425-435
10. Kanayama N, Terao T. Plasma fibronectin receptor levels during pregnancy complicated by preeclampsia and abruptio placentae. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 33: 147-152
11. Foulon W, Naessens A, Dewaele M, Lauwers S, Amy JJ. Chronic Ureaplasma urealyticum amnionitis associated with abruptio placentae. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 280-282
12. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988; 319: 972-978
13. 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
14. Goetzl EJ. Modulation of human neutrophil polymorphonuclear leucocyte migration by human plasma alpha-globulin inhibitors and synthetic esterase inhibitors. *Immunology* 1975; 29: 163-174
15. Azghani AO, Kondepudi AY, Johnson AR. Interaction of pseudomonas aeruginosa with human lung fibroblasts: role of bacterial elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 652-657

(No. 7371 平5・4・7受付)