

博士(医学) 古田直美

## 論文題目

Immunohistochemical detection of meconium in the fetal membrane, placenta and umbilical cord  
(卵膜・胎盤および臍帯における胎便の免疫組織学的検出)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

胎児が迷走神経の反射により羊水中に胎便を排出することで羊水が混濁すると考えられている。この羊水混濁は6~25%の分娩で認められる。従来、胎便排出の誘因として胎児の低酸素状態の関与が想定されてきたが、近年、胎児成熟に伴う生理的な現象であるという見解もある。羊水中の胎便を胎内や出生時に多量に吸引すると、重篤な呼吸障害をきたす胎便吸引症候群を発症する場合があるが、混濁した羊水に曝されても、順調な経過で出生し、新生児予後に影響しない場合もある。このように羊水混濁の誘因ならびに新生児予後への影響については未だ一定の見解がなされていない。これは羊水混濁の診断が分娩時における羊水の肉眼的所見に基づいており、客観的な診断基準がない事が原因の一つと考えられる。今回、羊水混濁を客観的に診断し得る免疫染色方法を開発することを研究目的とした。

我々は胎便中に胎児固有のポルフィリンである亜鉛コプロポルフィリン(zinc coproporphyrin : ZnCP-)が存在することを報告してきた。そして新生児尿中のZnCP-を検出することで胎便吸引症候群の診断に、母体血中のZnCP-を測定することにより羊水塞栓症の診断に臨床応用してきた。羊水混濁が生じた場合、羊水に接している卵膜、胎盤および臍帯は胎便に暴露され、その組織中のマクロファージが胎便を貪食する。今回新たにZnCP-に対する特異的なモノクローナル抗体を開発し、卵膜、胎盤および臍帯の胎便沈着を指標とした羊水混濁の免疫組織学的診断を試みた。

[材料ならびに方法]

抗体作成方法はZnCP-にヘモシアニン(スカシガイ由来)を結合させ、BALB/cマウスを用い免疫感作を行った後、その脾臓細胞とミエロマ細胞を用いて細胞融合を行った。Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (HAT)培地により陽性ハイブリドーマ約100株を得た。これらを用いて限界希釈法によるクローニングを行い5株のハイブリドーマを得た。この5株のハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔に注入し、腹水を採取、プロテインAを用いてIgGに精製した。ELISAを用いてポルフィリン関連物質との交差性を確認し、抗ZnCP-抗体(clone 3E9)を確立した。

2009年6月から2011年4月の間の当院における分娩のうち、分娩時の助産師の記録より羊水混濁なし(-)28例、羊水混濁あり(軽度+、中等度~高度++)50例の計78例を後方視的に選択した。卵膜を含む胎盤および臍帯を採取し直ちに遮光した後、10%ホルマリン固

定、パラフィン包埋した。これらの組織切片を用いて抗 ZnCP- モノクローナル抗体による免疫組織学的検討を行った。

#### [結果]

まず、ELISA を用いて種々のポルフィリンとの交差反応性の評価を行った。ZnCP- と抗 ZnCP- 抗体の反応を 100%とした場合、coproporphyrin (0.6%)、coproporphyrin (0.1%)、uroporphyrin (4.4%)、uroporphyrin (1.4%)、protoporphyrin (0.1%未満)と低い交差反応性を示し ZnCP- に特異的な抗体であることが確認された。また、ZnCP- ならびに胎便を用いた吸収試験を行い、抗 ZnCP- 抗体の特異性を確認した。

次に、抗 ZnCP- 抗体を用いて、高度羊水混濁を認めた症例の卵膜、胎盤および臍帯を免疫組織染色したところ、絨毛膜羊膜中のマクロファージの細胞質が陽性であった。対象症例の免疫組織学的検討の結果から、胎盤における抗 ZnCP- 抗体を用いた羊水混濁の診断基準を初めて提唱した。免疫組織染色陰性を stage 0、羊膜まで陽性を stage 1、絨毛膜板まで陽性を stage 2 とした。この stage 分類を用い対象症例を分類したところ、肉眼的に中等度から高度の羊水混濁が認められた 14 例中 12 例(85.7%)は stage 2 であった。一方、肉眼的に羊水混濁の認められなかった 28 例においても stage 1 が 8 例(28.6%)、stage 2 が 9 例(32.1%)存在し、半数以上が免疫組織染色陽性であった。また、高度の羊水混濁症例のうち絨毛膜羊膜炎のため炎症細胞の浸潤が強い症例や、絨毛膜下血腫に伴うヘモジデロシスの強い症例においては、通常の HE 染色では胎便沈着の判定が困難であったが、抗 ZnCP- 抗体の免疫組織染色を行う事で胎便を容易に可視化することが可能になった。

#### [考察]

抗 ZnCP- 抗体による免疫組織染色を行うことで卵膜、胎盤および臍帯に沈着した胎便を精度よく診断でき、従来診断基準の無かった羊水混濁を客観的に診断する事が可能となった。出生時羊水混濁の認められない症例においても、妊娠経過中胎便に暴露されていた可能性が初めて明らかとなり、胎便の排出機序あるいはその生理的意義を新たに研究する端緒が得られた。胎便の生理的作用の解明が今後の課題である。

#### [結論]

本研究により抗 ZnCP- 抗体による卵膜、胎盤および臍帯の免疫組織染色が羊水混濁の客観的診断方法として確立された。

### 論文審査の結果の要旨

正常の妊娠経過中に胎児が羊水中に排便することはないとされているが、低酸素などの非生理的状态では羊水中に排便する。その胎便を大量に吸引することによって生じる胎便吸引症候群は新生児の呼吸障害を引き起こすことで有名であるが、羊水中の胎便の有無は分娩時羊水の混濁の有無として肉眼で判断されており、客観的な診断方法は確立されていない。そこで、申請者は胎便のみに含まれるポルフィリンである亜鉛コプロポルフィリン

(ZnCP-) が、妊娠経過中に胎便に晒された卵膜、臍帯および胎盤に沈着するという仮説を立て、卵膜、臍帯および胎盤における ZnCP- を免疫組織学的に検出することを試みた。まず、ZnCP- にヘモシアニンを結合させ、マウスに免疫した後、定法通りに ZnCP- に対するモノクローナル抗体を樹立した。抗 ZnCP- 抗体は他の 4 種類のポルフィリン関連物質とはほとんど交差せず、ZnCP- に対してのみ強く反応することを確認した。当院における分娩 78 例 (肉眼的羊水混濁陰性 28 例、羊水混濁陽性 50 例) の卵膜、臍帯および胎盤に対して抗 ZnCP- 抗体を用いて免疫組織学的染色を行うと、抗 ZnCP- 抗体に対する陽性反応はマクロファージに認められた。さらに、抗 ZnCP- 抗体陽性マクロファージの分布に基づいて、stage 分類 (陽性マクロファージが認められないものを stage 0、羊膜内だけに認められるものを stage 1、絨毛膜板まで広範囲に認められるものを stage 2) を行うと、肉眼的羊水混濁陽性 50 例では、stage 0 が 1 例 (2%)、stage 1 が 7 例 (14%)、stage 2 が 42 例 (84%) であり、49 例 (98%) の分娩例において肉眼的判断と免疫組織学的判断が一致した。肉眼的羊水混濁陰性 28 例では、stage 0 が 11 例、stage 1 が 8 例、stage 2 が 9 例であり、17 例 (61%) の分娩例においては肉眼的判断では陰性であるにもかかわらず、免疫組織学的に胎便の存在が証明された。

HE 染色では同定が困難である胎便成分を卵膜、臍帯および胎盤において免疫組織学的に可視化する客観的な診断方法を確立したこと、また、分娩時羊水の肉眼判断よりも鋭敏に胎便を検出したことを審査委員会は高く評価した。

審査委員会では研究方法論および実験結果の解釈を中心に詳細な質疑がなされ、申請者は妥当な回答をした。以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀  
副査 緒方 勤 副査 平川 聡史