

学位論文題名

Increased apoptosis of human fetal membranes
in rupture of the membranes and chorioamnionitis

(破水および絨毛膜羊膜炎によりヒト卵膜のアポトーシスは増加する)

学位論文内容の要旨

はじめに

破水(ROM)は早産の主要な原因のひとつであるが、卵膜が破綻するメカニズムについては、いまだ十分には解明されていない。しかし、破水に先行して、卵膜に形態学的そして生化学的にダイナミックな変化が起こることは明らかであり、結合組織の膨化や、絨毛膜と脱落膜の菲薄化、卵膜のコラーゲン量の減少などが報告されている。一方、絨毛膜羊膜炎(CAM)が破水をきたしやすいことはよく知られているが、CAMの際に卵膜の結合組織の剥離が見られることが報告されている。1999年に McLaren らは未陣痛、未破水の子宮口部の絨毛膜と脱落膜では局所的に cellularity が低下し、アポトーシスが增加していることを示し、破水に先行する卵膜の形態学的変化にアポトーシスが関与している可能性を示唆した。本研究では、ROM および CAM の有無と卵膜でのアポトーシス発現の程度とが関係するかを高感度アポトーシス検出法を用いて定量的に調べ、卵膜破綻機構におけるアポトーシスの関与について検討することを目的とした。

対象と方法

インフォームドコンセントが得られた 44 人の単胎産婦から採取した卵膜を本研究の検討に用いた。ROM および CAM の有無により以下の 4 群に分類した。Group I (n=19): ROM (-) CAM (-)、Group II (n=5): ROM (-) CAM (+)、Group III (n=13): ROM (+) CAM (-)、Group IV (n=7): ROM (+) CAM (+)。人工破膜例は除外した。胎盤は病理学的検索を行い、Blanc 分類 II 以上を CAM とした。分娩後直ちに子宮口部と子宮底部に鉗子にて目印を付け、4-5cm²の卵膜を採取した。採取された卵膜を直ちに phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4)にて洗浄し、TUNEL 染色用に一部を切除してホルマリンで固定した。残りの卵膜は DNA の抽出のために羊膜と脱落膜を分離してそれぞれ -80℃で保存した。DNA を分離後、化学発光法にて DNA ladder を検出した。電気泳動画像解析システム EDAS にて DNA 分子量マーカーの sum intensity (SI) に対する 1198bp 未満の低分子量 DIG-labeled DNA の SI の比率(relative ratio)を求めてアポトーシスを定量化した。統計学的解析には、Kruskal-Wallis test、Mann-Whitney U test、Wilcoxon signed rank test、Spearman rank correlation、ANOVA、Fisher's PLSD test を用いた。p<0.05 を統計学的に有意差ありと設定した。

成績

1) 卵膜および絨毛膜に apoptotic DNA ladder pattern が観察された。また、TUNEL 染色にてアポトーシス細胞が検出された。2) 子宮口部羊膜の relative ratio は、Group I に比べ Group III で有意(p<0.05)に高く、ま

た、Group I に比べ Group II で有意 ($p < 0.05$) に高かった。しかし、絨毛膜では、子宮口部でも子宮底部でも、Group I -IV に有意な差を認めなかった。3) 子宮口部と子宮底部の羊膜の比較では、Group I では relative ratio の有意な差は認められなかったが、Group III では子宮口部で高い傾向 ($p = 0.059$) が認められた。また、子宮口部と子宮底部の絨毛膜の比較では、Group I で子宮口部と子宮底部の間に relative ratio の有意な差は認められなかったが、Group III では子宮口部で有意 ($p < 0.05$) に高く認められた。4) 破水から検体採取までの時間と relative ratio の間に Group III の子宮口部の羊膜で相関は認められなかった。5) Group I および III のなかで陣痛を有した症例において、子宮口部の羊膜で、陣痛開始から検体採取までの時間と relative ratio の間には相関を認めなかった。6) 帝王切開群と経膈群との relative ratio の比較では、relative ratio の中央値は、羊膜で、子宮口部 : 0.98 vs 1.07; 子宮底部 : 0.91 vs 0.92 (帝王切開群 vs 経膈群)、絨毛膜で、子宮口部 : 2.82 vs 1.60; 子宮底部 : 1.28 vs 1.28 (帝王切開群 vs 経膈群) であり、各々に有意な差を認めなかった。

考察

アポトーシスは、細胞死のひとつの形であり、形態学的には、核の凝縮、核の断片化、細胞の縮小などで特徴づけられる。TUNEL 染色は断片化した DNA を検出することによりアポトーシス細胞を判定する方法である。低頻度のアポトーシス細胞を検出できるという利点もあり、アポトーシスの確認および定量に好んで使われる方法である。しかし、その観察は必ずしも容易なものではなく、検者間の誤差も問題になる。一方、アポトーシスの際には DNA のヌクレオソーム単位 (約 180bp の整数倍) での断片化が起こるが、これを生化学的に検出することもアポトーシスの検出および定量に用いられている。すなわち、アガロースゲル電気泳動法によりアポトーシスに特徴的な DNA ladder pattern を検出する方法である。本研究においては、TUNEL 染色にてアポトーシスを確認し、さらに高感度の断片化 DNA の検出法を用いてアポトーシスを定量的に検討した。多くの研究者が胎盤でのアポトーシスの発現を報告している。Fortunato らは早産期および正産期の陣痛を有した症例に比べ、早期産の premature ROM 症例のほうが卵膜での断片化 DNA が多く発現していることを示した。本研究では、CAM (-) のとき、ROM (-) に比べ ROM (+) で子宮口部羊膜のアポトーシスの発現は高かった。しかし、絨毛膜においては、有意な差は認められなかった。Artal らによれば、羊膜はコラーゲンに富む組織で、絨毛膜に比べ 6-9 倍の強度を持つという。本研究の結果は、羊膜でのアポトーシスの亢進が破水につながる卵膜の脆弱化に関与していることを示唆するものと思われた。また、CAM (-) ROM (+) の症例の羊膜と絨毛膜において、子宮底部よりも子宮口部でアポトーシスの発現が多く認められたが、CAM (-) ROM (-) の症例においてはこのような現象は見られなかった。この子宮口部の局所的なアポトーシスの亢進が、卵膜の局所的な脆弱化を引き起こし、さらに ROM へとつながっていく可能性が推察された。CAM を伴わない破水症例において破水から検体採取までの時間と relative ratio の間に子宮口部の羊膜で相関は認められなかった。羊膜のアポトーシスは ROM の発症機構に関連しているのであって、ROM により亢進されるわけではないものと考えられた。CAM (-) で陣痛を有した症例において、子宮口部の羊膜で、陣痛開始から検体採取までの時間と relative ratio の間には相関を認めなかった。したがって、本研究の検討からは、陣痛は羊膜でのアポトーシスの発現には影響を与えていないものと考えられた。CAM の有無で卵膜のアポトーシスの発現を比較検討した報告はいまだない。本研究では、この比較を初めて行った。ROM (-) のとき、CAM (-) に比べ CAM (+) で子宮口部羊膜のアポトーシスの発現は高かった。CAM はアポトーシスの発現を促進している可能性が推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

Increased apoptosis of human fetal membranes in rupture of the membranes and chorioamnionitis

(破水および絨毛膜羊膜炎によりヒト卵膜のアポトーシスは増加する)

破水(ROM)は早産の主要な原因のひとつであるが、卵膜が破綻するメカニズムについては、いまだ十分には解明されていない。破水に先行して、卵膜に形態学的そして生化学的にダイナミックな変化が起こることは明らかであり、結合組織の膨化、絨毛膜と脱落膜の菲薄化、卵膜のコラーゲン量の減少などが観察される。一方、絨毛膜羊膜炎(CAM)が破水をきたしやすいことはよく知られている。本研究では、ROM および CAM の有無と卵膜でのアポトーシス発現の程度とが関係するかを高感度アポトーシス検出法を用いて定量的に調べ、卵膜破綻機構におけるアポトーシスの関与について検討した。

インフォームドコンセントが得られた 44 人の単胎産婦から採取した卵膜を、ROM および CAM の有無により 4 群に分類した。Group I (n=19): ROM (-) CAM (-)、Group II (n=5): ROM (-) CAM (+)、Group III (n=13): ROM (+) CAM (-)、Group IV (n=7): ROM (+) CAM (+)。胎盤は病理学的検索を行い、Blanc 分類 II 以上を CAM とした。分娩後直ちに子宮口部と子宮底部に鉗子にて目印を付け、4-5cm² の卵膜を採取した。採取された卵膜を直ちに phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4)にて洗浄し、TUNEL 染色用に一部を切除してホルマリンで固定した。残りの卵膜は DNA の抽出のために羊膜と脱落膜を分離してそれぞれ-80℃で保存した。DNA を分離後、化学発光法にて DNA ladder を検出した。電気泳動画像解析システム EDAS にて DNA 分子量マーカーの sum intensity (SI) に対する 1198bp 未満の低分子量 DIG-labeled DNA の SI の比率(relative ratio)を求めてアポトーシスを定量化した。

子宮口部羊膜の relative ratio は、Group I に比べ Group III で有意($p < 0.05$)に高く、また、Group I に比べ Group II で有意 ($p < 0.05$) に高かった。しかし、絨毛膜では、子宮口部でも子宮底部でも、Group I -IV に有意な差を認めなかった。子宮口部と子宮底部の羊膜の比較では、Group I では relative ratio の有意な差は認められなかったが、Group III では子宮口部で高い傾向($p = 0.059$)が認められた。また、子宮口部と子宮底部の絨毛膜の比較では、Group I で子宮口部と子宮底部の間に relative ratio の有意な差は認められなかったが、Group III では子宮口部で有意($p < 0.05$)に高く認められた。破水から検体採取までの時間と relative ratio の間に Group III の子宮口部の羊膜で相関は認められな

った。Group I およびⅢのなかで陣痛を有した症例において、子宮口部の羊膜で、陣痛開始から検体採取までの時間と relative ratio の間には相関を認めなかった。帝王切開群と経膈群との relative ratio の比較では、relative ratio の中央値は、羊膜で、子宮口部：0.98 vs 1.07;子宮底部：0.91 vs 0.92 (帝王切開群 vs 経膈群)、絨毛膜で、子宮口部：2.82 vs 1.60;子宮底部：1.28 vs 1.28 (帝王切開群 vs 経膈群) であり、各々に有意な差を認めなかった。

本研究では、CAM (-)のとき、ROM (-)に比べ ROM (+)で子宮口部羊膜のアポトーシスの発現は高かったが、絨毛膜においては、有意な差は認められなかった。羊膜でのアポトーシスの亢進が破水につながる卵膜の脆弱化に関与していることを示唆するものと思われた。また、CAM (-) ROM (+)の症例の羊膜と絨毛膜において、子宮底部よりも子宮口部でアポトーシスの発現が多く認められたが、CAM (-) ROM (-)の症例においてはこのような現象は見られなかった。子宮口部の局所的なアポトーシスの亢進が、卵膜の局所的な脆弱化を引き起こし、ROM へとつながっていく可能性が推察された。羊膜のアポトーシスは ROM の発症機構に関連しているのであって、ROM により亢進されるわけではないものと考えられた。CAM の有無で卵膜のアポトーシスの発現を比較検討した報告はいまだなく、本研究でこの比較を初めて行った。即ち、ROM (-)のとき、CAM (-)に比べ CAM (+)で子宮口部羊膜のアポトーシスの発現は増加し、CAM はアポトーシスの発現を促進している可能性が推察された。

公開発表に際し、副査の長嶋教授から、CAM と ROM におけるアポトーシス誘導因子の相違について、子宮口部と子宮底部でアポトーシスの程度に差がある理由について、また副査の藤本教授からは、妊娠週数あるいは卵膜への酸素・栄養供給とアポトーシス発現との関係、Blanc 分類 II 以上と CAM を規定している場合、絨毛膜でアポトーシスが亢進しない理由、などについてそれぞれ質問があった。主査の吉木教授からは、ヒト胎盤における生理的なアポトーシスの状態について、アポトーシスに関係する受容体や遺伝子の検索について質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の解析結果、最新の文献情報、自身の臨床経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果と申請者の研鑽を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。