

羊水塞栓症補助診断マーカーとしての血清SCCAの有用性の解明

奈良県立医科大学附属病院 産婦人科 赤坂 珠理晃

要約

羊水塞栓症は羊水成分が母体の全身循環に流入し、妊婦の心肺虚脱を引き起こす重篤な疾患である。羊水にはSquamous cell carcinoma antigen(SCCA)が極めて高濃度に含まれている。羊水塞栓症で死亡した妊婦は血清SCCA濃度が高いことがこれまでに報告されており、SCCAは羊水塞栓症の補助診断のための有望なマーカーと考えられている。本研究の目的は、分娩形態に応じた分娩前後の母体血清SCCA濃度の変化を明らかにし、羊水SCCAの起源を調査することであった。464人の患者(経膈分娩群339例、陣痛なしの帝王切開群97例、陣痛ありの帝王切開群28例)を対象として前方視の研究を実施した。患者の入院時、産後2時間後、産後3日目に採取した血清を用いて、SCCA濃度の測定を行った。羊水および新生児尿のSCCA濃度も測定した。胎盤および胎児皮膚におけるSCCAの発現を免疫組織化学染色で評価した。経膈分娩群では入院から産後2時間までSCCA濃度の有意な上昇が見られ、産後3日目にはSCCA濃度が分娩前の状態に戻っていた。帝王切開群では、入院時と産後2時間後の血清SCCA濃度に差はなかった。陣痛なしの帝王切開群と陣痛ありの帝王切開群ではSCCA濃度に差はなかった。免疫組織化学染色では、胎盤および胎児皮膚でSCCAの発現は認められなかった。出生直後の新生児尿中のSCCA濃度は羊水中と同程度に高く、SCCAは胎児尿に由来する可能性が示唆された。したがって、本研究は、胎児尿に由来する可能性のある羊水中のSCCAが経膈分娩時に母体循環に入る可能性を示唆している。また、陣痛と子宮口が全開大となることが羊水成分が母体循環に流入する原因だと考えられる。

緒言

羊水塞栓症は重篤な産科合併症であり、妊産婦死亡の主要な原因となっている(1)。羊水塞栓症の発症予測は困難であったが近年、分子生物学の進歩によって以前より病態がわかるようになってきた。羊水中に豊富に存在する成分で母体血液中に微量に存在する物質として、亜鉛-コプロポルフィリン-1(Zn-CP1)、シアリルTn(STN)、インスリン様成長因子結合タンパク質-1(IGFBP1)などが報告されており、母体血循環への羊水流入を示す血清マーカーとみられている(2-7)。これまでに著者の所属する研究グループが羊水と母体の濃度比が非常に高い物質としてSCCAを新たに同定し報告した。2017年、著者の所属する研究グループは、剖検で証明された羊水塞栓症患者4人の母体血清中のSCCA濃度が極めて高いことを報告した(8)。羊水が母体循環に入ることは以前に実証されていた。羊水成分への最初の曝露時にアナフィラキシー反応およびアナフィラクトイド反応が起こる可能性がある。

方法

患者情報

血液、羊水、尿、組織試料の採取は、奈良県立医科大学倫理委員会の承認を得た(第579号、第579-2号、第873号、第873-2号)。参加者全員から同意を得た。今回の前向き初回コホート研究は、2011年12月から2015年10月までの間、奈良県立医科大学附属病院において分娩様式に関連した分娩前後の妊婦血清SCCA濃度の変化を測定するために実施した。対象は全て単胎妊婦で、初産婦、経産婦ともに対象とした。器械分娩症例、妊娠高血圧症などの合併症を有する女性は除外した。悪性疾患を有する妊婦はいなかった。経膈分娩(n=339)、陣痛発来前の予定帝王切開(n=97)、陣痛発来後の緊急帝王切開(n=28)を受けた女性が含まれた。2017年9月から2019年12月までの間に、羊水中のSCCAの起源を調べるために、第2コホート研究を実施した。

サンプルの採取

初回コホート研究では、各参加者から9mlの静脈血を採取した。母体の血清は入院時、産後2時間、産後3日目に採取した。第2コホート研究では、胎盤組織と羊水を帝王切開時に採取した。新生児の尿(n=7)は、分娩時に出生後2日以内に採取した。血清と尿は、遠心分離により1,400xg、5分間、室温で分離し、-80℃で保存した。羊水は子宮筋層切開後の破膜時に無菌的に採取した。羊水を清澄羊水(n=27)と胎便混濁羊水(n=4)に分類した。奈良県立医科大学附属病院から正規産の胎盤3例、子宮頸癌3例のパラフィンブロックを病理資料室から入手した。妊娠35週の胎児から得られた市販の胎児皮膚組織スライドを購入した(パントミクス社)。SCCAタンパク質発現を免疫組織化学により評価した。

羊水サンプルの調製

羊水は胎児皮膚ケラチノサイト、羊膜上皮細胞、類上皮細胞、線維芽細胞および多能性幹細胞を含んでいる。手術中に約20mlの羊水を得た。羊水の細胞ブロック切片をアルギン酸ナトリウム法で調製し、ヘマトキシレン・エオジン染色および免疫組織化学染色に供した。細胞ペレットを10%パラホルムアルデヒドで12時間室温で固定した。ホルマリン固定したペレットをパラフィンに埋め込んだ。染色されていない切片(厚さ3μm)をヘマトキシレンで5分間、エオジンで2分間、室温で染色した。スライドは、オリンパスCX41顕微鏡(オリンパス株式会社)を用いて検査・撮影した。

SCCAの測定

血清中のSCCA濃度はBML社から市販されているキットを用いて、cLIA法により測定した。標準曲線に基づく平均光学密度を用いて算出した。検出限界は0.1ng/mlであった。

免疫組織染色

SCCAタンパク質の発現を検出するために、ヘマトキシレン・エオジン染色に続いて免疫組織染色を行った。免疫組織染色のために、パラフィン切片(厚さ3μm)をポリ-L-リジンコーティングされたスライドに載せた。胎児皮膚、胎盤および子宮頸癌組織を含むサンプルを、パンサイトケラチンAE1/AE3に対するマウス特異的抗体(ab27988; Abcam;

1:100希釈)、SCCA1/A2に対するモノクローナル抗体(sc-28384; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:100希釈)、正常ウサギIgG(#3900; Cell Signaling Technology, Inc.; 1:100希釈)で室温で1時間インキュベートした。切片を増幅試薬(Simple Stain MAX PO; Nichirei Biosciences)で室温で30分間置き、次いでジアミノベンジジン(Simple Stain DAB Solution; Nichirei Biosciences)で5分間インキュベートした。

統計解析

統計解析は、SPSS Statistics version 25(日本IBM)を用いて行った。データの分布はShapiro-Wilk検定で確認し、全群が非正規分布を示した。データをKruskal-Wallis検定を用いて解析し、その後、母体年齢、胎児の妊娠年齢、SCCA濃度の入院時、産後2時間、産後3日の3群間での差を評価するために、ボンフェローニ補正を用いた事後解析を行った。群間の出産回数を比較するためにピアソンのカイ二乗検定を行った。<0.05のP値は、統計的に有意な差を示すと考えられた。

結果

患者背景を表1に示した。経膈分娩群と2つの帝王切開群の間には、母体年齢、妊娠年齢、出産回数に関して有意な差があった(いずれもP<0.001)。母体年齢は帝王切開群より経膈分娩群の方が低かったが、分娩週数は帝王切開群よりも高かった。陣痛発来後の緊急帝王切開群では、71.4%(20/28)の母体が初産婦であったのに対し、経膈分娩群では51.3%(174/339)、陣痛発来前の予定帝王切開群では24.7%(24/97)であった。入院時、産後2時間後、産後3日目の血清検体数を表2に示す。全群の血清SCCA濃度は試験期間中に有意に変化した。経膈分娩群では、SCCA濃度は入院時から産後2時間後まで有意に上昇し、産後3日目に低下した。SCCA濃度は産後3日目に最も低かった。2つの帝王切開群では、入院時と産後2時間後の血清SCCA濃度に有意な差はなかった(それぞれP=0.999、0.999)。すべての群で、入院時または産後2時間後から産後3日目までの間に、SCCA濃度は顕著な減少を示した(経膈分娩群ではP<0.001またはP<0.001、陣痛発来後の緊急帝王切開群ではP=0.002またはP=0.003、陣痛発来前の予定帝王切開群ではP<0.001またはP<0.001;

表1. 本研究の患者背景

Characteristic	正常経膣分娩	陣痛ありの帝王切開群	陣痛なしの帝王切開群	P 値
分娩数	339	28	97	
母体の年齢				<0.001
平均値 ± SD	32.1 ± 5.6 ^a	34.8 ± 4.9 ^b	34.3 ± 4.4 ^c	
中央値 (範囲)	33.0 (17-46)	35.0 (26-43)	34.0 (22-46)	
妊娠週数				<0.001
平均値 ± SD	39.1 ± 1.5 ^d	38.4 ± 2.3 ^e	37.6 ± 1.5 ^f	
中央値 (範囲)	39 (26-41)	38.0 (29-41)	38.0 (29-41)	
これまでの分娩数				<0.001
0	174	20	24	
≥1	165	8	73	

All P-values were obtained using the Kruskal-Wallis test. a vs. b, P=0.054; b vs. c, P=1.000; a vs. c, P=0.002; d vs. e, P=0.134; e vs. f, P=0.001; and d vs. f, P<0.001, determined by the Kruskal-Wallis test with post hoc analysis with Bonferroni correction. CS, cesarean section.

表2. 入院時、分娩2時間後、分娩3日後のSCCA値の推移

分娩様式	入院時	分娩2時間後	分娩3日後	P-value
経膣分娩 (n)	231	277	150	<0.001
平均値 ± SD	1.83 ± 1.86 ^a	4.15 ± 2.42 ^b	0.96 ± 0.99 ^c	
中央値 (範囲)	1.60 (0.40-19.30)	3.70 (0.60-18.80)	0.8 (0.40-11.80)	
陣痛ありの帝王切開群 (n)	23	14	8	0.001
平均値 ± SD	1.78 ± 1.35 ^d	1.83 ± 1.05 ^e	0.78 ± 0.16 ^f	
中央値 (範囲)	1.40 (0.70-6.80)	1.60 (0.80-4.20)	0.85 (0.50-0.90)	
陣痛なしの帝王切開群 (n)	70	60	53	<0.001
平均値 ± SD	1.58 ± 1.82 ^g	1.43 ± 0.56 ^h	0.85 ± 0.53 ⁱ	
中央値 (範囲)	1.30 (0.60-16.10)	1.30 (0.60-3.40)	0.80 (0.40-3.70)	

All P-values were obtained using the Kruskal-Wallis test. a vs. b, P<0.001; b vs. c, P<0.001; a vs. c, P<0.001; d vs. e, P=0.999; e vs. f, P=0.003; d vs. f, P=0.002; g vs. h, P=0.999; h vs. i, P<0.001; and g vs. i, P<0.001 determined by the Kruskal-Wallis test with post hoc analysis with Bonferroni correction. CS, cesarean section; SCCA, squamous cell carcinoma antigen.

表3. 清澄羊水、混濁羊水、新生児尿のSCCA値

清澄羊水 (n=27)	混濁羊水 (n=4)	新生児尿 (n=7)	P 値
569.37 ± 432.32	378.08 ± 57.82	322.83 ± 427.74	0.147

P-value was obtained using the Kruskal-Wallis test.

表2)。

次に羊水中のSCCAの起源を同定した。その結果、清澄羊水、胎便混濁羊水、新生児尿の間ではSCCA濃度に有意な差はなく、いずれも極めて高い値を示した(表3)。最後に本研究では、胎盤、羊水セルブロック、胎児皮膚にSCCAが発現しているかどうかを調べた。胎盤、羊水セルブロック、胎児皮膚、子宮頸癌組織をサイトケラチンとSCCAの免疫染色で調べた(図1)。サイトケラチンは上皮細胞、トロホプラストおよび子宮頸癌細胞の同定および特徴付けのためのマーカーとして広く使用されている(図1A、D、GおよびJ)。SCCAの免疫染色のために子宮頸癌組織をポジティブコントロールとして使用した(図1K)。サンプルはサイトケラチン、SCCAおよびnon-immune IgGの発現評価のために経験豊富な病理医によって評価された。羊膜、胎盤中のトロホプラストや間葉系細胞にはSCCAは染色されなかった

(図1B)。羊水細胞の大部分ではサイトケラチン免疫染色が強かった(図1D)が、SCCAの発現は散在しており、弱陽性であった(図1E)。胎児皮膚表皮細胞ではサイトケラチンが陽性であった(図1G)が、SCCAの発現は限定的であった(図1H)。胎児皮膚では、SCCAは角質化領域(角質層)や毛母細胞の散在する細胞に局在していた(図1H)。

考 察

本研究はSCCAを含む羊水成分が正常な経膣分娩時に母体循環に入ること、および羊水SCCAが胎児尿に由来する可能性があることを初めて示唆した。第一に羊水中のSCCA濃度は母体血清中のSCCA濃度よりもはるかに高く、羊水塞栓症の診断マーカーとして血清中のSCCA濃度が臨床的に有用な可能性がある。本研究では分娩前後の母体血清SCCA濃度の変化を分娩様式と関連させて検討した。経膣分娩

では血清SCCA濃度は入院時から産後2時間まで有意に上昇し、産後3日後に低下した(表2)。経膈分娩のすべての症例で羊水成分が母体循環に入ることがわかったが、羊水塞栓症を示唆する心肺症状を示した女性はいなかった。

第二に帝王切開時、帝王切開創部から羊水の流入により母体の血清SCCA濃度が上昇するという仮説を立てた。予想外の結果として母体の血清SCCA濃度は陣痛の有無にかかわらず入院時のものと比較して、産後2時間で変化しないままであった。しかし、経膈分娩群のSCCA濃度は、陣痛発来後の緊急帝王切開群よりも有意に高かった(1.83 ± 1.86 ng/ml vs. 1.58 ± 1.82 ng/ml, $P=0.033$, 表2)。さらに、子宮口開大後の経膈分娩群では、SCCA濃度が非常に高

かった(4.15 ± 2.42 ng/ml)。これらのデータは、陣痛の開始がSCCA濃度の上昇の主な要因であり、子宮頸管が全開大となることが羊水-母体血液関門での微小な創から羊水が母体の循環に入ることができるとを示唆している。ベンソンらは、羊水、胎児細胞、毛髪や他の破片は、子宮口全開大時に胎盤-子宮血管循環バリアを破って母体の循環に流入することができることを示唆した(9)。つまり、陣痛と子宮口全開大の両方が起きることで母体循環への羊水成分が流入すると考えられる。

第三に本研究では羊水中のSCCAの起源を調べた。清澄羊水と胎便混濁羊水では羊水のSCCA量に有意な差は認められなかった(表3)。胎便は羊水中のSCCAの発生源ではないことが示唆された。胎盤

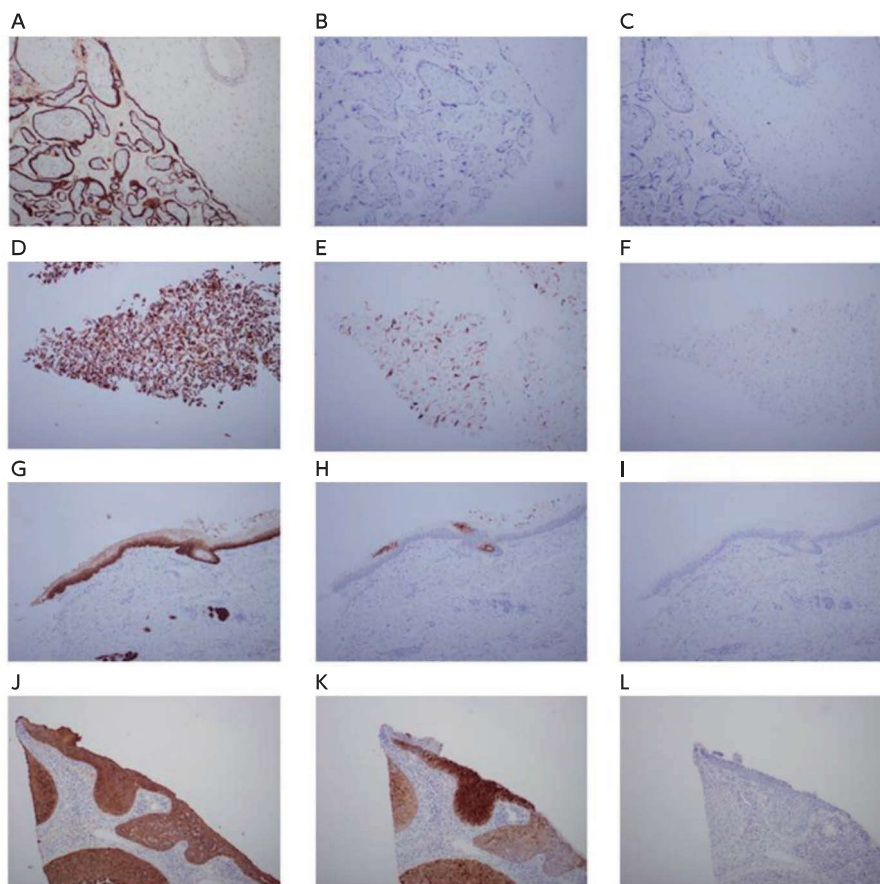


図1

Distribution of cytokeratin and squamous cell carcinoma antigen (SCCA) in fullterm placentas, amniotic fluid cell blocks, fetal skin, and cervical cancer tissues. The distribution of (A, D, G and J) cytokeratin, (B, E, H and K) SCCA, and (C, F, I and L) normal rabbit IgG in the (A, B and C) fullterm placentas, (D, E and F) amniotic fluid cell blocks, (G, H and I) fetal skin and (J, K and L) cervical cancer tissues is shown by representative immunostaining. The fullterm placenta was (A) positive for cytokeratin AE1/AE3 and (B) negative for SCCA (magnification, x100). Cytokeratins were present in the epidermis and all kinds of trophoblasts. Amniotic fluid cell blocks exhibited (D) intense labeling for AE1/AE3, but (E) weak and scattered staining for SCCA (magnification, x100). Fetal skin epidermal cells were negatively labeled for SCCA. SCCA was localized in scattered cells of the keratinization area and hair matrix cells. As positive controls for immunostaining, cervical cancer tissues were positively labeled for (J) cytokeratin and (K) SCCA (magnification, x100).

はSCCA免疫染色陰性であった。これまでに成体皮膚表皮細胞の細胞質がSCCAに対して陽性に染色されていたことが報告されている。胎児皮膚の顆粒層、表在性有棘細胞層、深在性有棘細胞層、基底層ではSCCAは発現していなかった。この違いは、胎児皮膚表皮細胞の分化が不十分なためと考えられる。注意深く観察すれば、胎児皮膚の角化層にSCCA陽性細胞を局所的に検出することができる。さらに、羊水細胞の免疫染色では、SCCA陽性細胞が散在しており、SCCA陽性ケラチノサイトが羊水中に放出されている可能性が示唆された。これらの結果は、羊水SCCAが胎盤や羊水細胞、胎便に由来する可能性は低いことを示唆している。羊水中のSCCA濃度は胎児尿に由来する可能性があり、新生児尿中のSCCA濃度は羊水中のSCCA濃度とほぼ同じくらい高かった(表3)。したがってSCCAの起源に関する研究では胎児尿がより可能性が高いことが示唆されている。

第四に、ZnCP-1、STN、IGFBP1およびSCCAを含む血清バイオマーカーは、感度が低いこと、方法の標準化がなされていないこと、疾患の急性期にマーカーを測定することが困難であること、およびその使用が実験的なままであることなどのいくつかの制限のために、臨床現場では広く使用されていない。著者らは以前、剖検で証明された羊水塞栓症患者のSCCA濃度(平均112.0ng/ml)が正常分娩のコントロール群(平均4.4ng/ml)に比べて血清SCCA値が25倍高かったことを報告している。SCCA濃度は羊水塞栓症を診断の精度を上昇させることができる(感度、60.0%; 特異度、89.2%)。羊水中のSCCAは、羊水塞栓症の診断を補助するのではなく、母体循環への羊水の流入を示すための有用なマーカーになるかもしれない。

最後に、本研究には2つの限界がある。1つ目は、この研究は単施設での研究であるため、予測不可能な選択バイアスを受けている可能性があるということである。また、当院は大学病院であるため、より重篤な疾患の症例にバイアスがかかっている可能性がある。第二に、緊急帝王切開症例数が比較的少なかったことから、今後の研究で検討する必要がある。

本研究は、陣痛時の母体血清SCCA濃度の変化が通常の経膈分娩時に羊水成分が母体循環に入る可能性を示している。陣痛と子宮口の全開大は羊水成分

が母体循環に入る主な原因である。SCCAの起源は胎児尿である可能性があるが、他の可能性を排除するものではない。胎児尿に由来している羊水中のSCCAが経膈分娩時に母体循環に入る可能性がある。羊水成分が母体循環に侵入する主な原因は、陣痛と子宮口の全開大である。

参考文献

1. Kobayashi H: Amniotic fluid embolism: Anaphylactic reactions with idiosyncratic adverse response. *Obstet Gynecol Surv* 2015;70: 511-517.
2. Kanayama N, Yamazaki T, Naruse H et al. : Determining zinc coproporphyrin in maternal plasma - a new method for diagnosing amniotic fluid embolism. *Clin Chem*, 2012. 38: 526-529.
3. Kobayashi H, Ohi H and Terao T: A simple, noninvasive, sensitive method for diagnosis of amniotic fluid embolism by monoclonal antibody TKH-2 that recognizes NeuAc alpha 2-6GalNAc. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. 168: 848-853.
4. Kobayashi H, Ooi H, Hayakawa H et al.: Histological diagnosis of amniotic fluid embolism by monoclonal antibody TKH-2 that recognizes NeuAc alpha 2-6GalNAc epitope. *Hum Pathol*, 1997. 28: 428-433.
5. Oi H, Kobayashi H, Hirashima Y et al.: Serological and immunohistochemical diagnosis of amniotic fluid embolism. *Semin Thromb Hemost*, 1998. 24: 479-484.
6. Oi H, Naruse K, Noguchi T et al.: Fatal factors of clinical manifestations and laboratory testing in patients with amniotic fluid embolism. *Gynecol Obstet Invest*, 2010. 70: 138-144.
7. Naruse K, Noguchi T, Yoshida S et al.: Identification of interleukin-6 (IL-6) and squamous cell carcinoma (SCC) as amniotic fluid-specific markers. *Open J Obstet Gynecol*, 2012. 2: 147-150.
8. Koike N, Oi H, Naruse K et al.: Squamous cell carcinoma antigen as a novel candidate marker for amniotic fluid embolism. *J Obstet Gynaecol Res*, 2017. 43: 1815-1820.
9. Benson MD, Cheema N, Kaufman MW et al.: Uterine intravascular fetal material and coagulopathy at peripartum hysterectomy. *Gynecol Obstet Invest*, 2012. 73: 158-161.

Abstract

Abstract. Amniotic fluid embolism (AFE) is a serious disease in which amniotic fluid components enter the maternal systemic circulation. It has been reported that amniotic fluid contains high levels of squamous cell carcinoma antigen (SCCA), and that pregnant women who do not survive due to AFE have high blood SCCA levels. The purpose of this study is to determine the possible mechanisms by which SCCA in amniotic fluid may enter the maternal bloodstream and the potential origin of SCCA. The prospective study included a cohort of 464 women (339 normal vaginal deliveries, 97 cesarean deliveries without labor, and 28 cesarean deliveries with labor). The dynamic changes in maternal serum SCCA levels were determined before and after delivery in relation to the mode of delivery, and SCCA levels were measured in the placenta, fetal skin, amniotic fluid cell components, amniotic fluid and neonatal urine. In vaginal deliveries, there was a significant increase in serum SCCA levels from admission to 2 h postpartum. In cesarean deliveries, the SCCA levels did not differ. Immunohistochemical staining revealed no SCCA expression in the placenta and fetal skin. The SCCA levels in neonatal urine immediately after birth were as high as those in the amniotic fluid. The present study thus suggests that amniotic fluid SCCA levels, which may be derived from fetal urine, can enter the maternal circulation during vaginal delivery. The onset of labor and full cervical dilatation are the main causes of entry of amniotic fluid components into the maternal circulation.