

## 論文の内容の要旨

論文題目:子宮胎盤虚血によるラット羊水中の

神経栄養因子の上昇

:胎児仮死における特異的生化的マーカー

指導教官:武谷雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 堀越嗣博

子宮内の胎児状態を正確に診断することは妊娠経過を管理するうえで非常に重要であり、Non Stress Test や超音波診断が使用されている。超音波診断としては、胎児計測、胎動観察の他に羊水量の計測が胎児・胎盤機能の評価に利用されてきた。羊水は量の問題も重要であるが、低酸素等の胎児に対するストレスが存在する場合には質的な変化をきたすことが知られている。胎児仮死において羊水中の $\beta$ -エンドルフィンや副腎皮質刺激ホルモン、コルチゾール、神経伝達物質が上昇すること、そしてエリスロポエチンやエンドセリン-1、アクチビン A と同様に慢性的低酸素に対して反応することも知られている。今回我々はその物質が子宮内環境に対して相関関係がないか、そしてそれらが子宮内環境を判断し得るマーカーになりえはしないか考えてみた。また羊水を包んでいる羊膜についても胎児同様に様々な物質を生成・分泌されているこ

とが知られている。特にカテコールアミン、アセチルコリンに関してはその存在の局在を証明した。ヒト羊膜細胞においてアセチルコリン、ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパ、DOPAC といった神経伝達物質、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、nerve growth factor (NGF)、neurotrophin-3 (NT-3) といった神経栄養因子、そしてアクチビンやノギンなどヒトの発生・発達に欠くことのできない物質が合成・分泌されていることが知られている。今回予備実験として行った臍帯駆血したヒツジの羊水では NT-3 値がその前後で上昇していた。これは NT-3 が子宮内環境の悪化に反応し胎児・胎盤・羊膜から分泌されたものとして考えられるが、このほかにも前記した物質が NT-3 と同様に反応し得ないか測定し、それらが胎児仮死や子宮内胎仔発育遅延に対して生化学的マーカーの一つになり得ないか、羊水そして羊膜という観点からも含めて検討した。

羊膜及び羊膜上皮細胞はインフォームドコンセントのとれた妊婦の選択的帝王切開時に無菌的に採取した胎盤から作成した。機械的に剥離し洗浄したものを羊膜とし、さらに滅菌ヘラにて羊膜上皮細胞の下層を除去、細胞成分を分離・培養したものをヒト羊膜上皮細胞とした。この羊膜上皮細胞の低酸素環境における神経栄養因子の分泌について検討した。羊膜上皮細胞に酸素 20%、二酸化炭素 5%、窒素 75%の混合気体で培養した培養液を control 群、低酸素環境下として低酸素組成の混合気体(酸素 2%、二酸化炭素 5%、窒素 93%)を持続的に流入するチャンバーにて培養した培養液を hypoxia 群として 48 時間の細胞培養を行った。神経栄養因子の測定には酵素免疫法を用いた。統計解析には Wilcoxon signed-rank test にて行い、 $p < 0.05$  にて有意とした。その結果、いずれの神経栄養因子でもその濃度の上昇傾向を認めたが、特に NT-3 においては有意な上昇を認めた。

続けて子宮内胎仔発育遅延モデルラットを作成し、神経栄養因子、アクチビン A、神経伝達因子の羊水中濃度を測定した。子宮内胎仔発育遅延モデルラットの作成法は妊娠 17 日目ウイスターラットをエーテル麻酔下に腹部正中切開すると腔を中心に非対称に数珠上に直列したラット子宮に子宮動静脈が併走している。その片側の動静脈の遠位端、近位端を 30 分間挟鉗しその後子宮動静脈を再還流させ、アンピシリンナトリウムを腹腔内投与して閉腹した。後日再開腹しそれぞれの羊水を抽出した。非挟鉗側羊水を control 群、挟鉗側羊水を ischemia 群として神経栄養因子、神経伝達物質、アセチルコリン、アクチビン A を測定した。カテコールアミンは高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)、アセチルコリンの測定には放射免疫測定 (RIA) を、アクチビン A の測定には大日本製薬社 (大阪、日本) より購入したアクチビン A 測定キット (ELISA 法) を用い

た。その結果、神経栄養因子について、BDNF は測定値に大きな偏りがあり結果を提示できず、また NGF はラット羊水中に認められなかった。今回 NT-3 のみ測定でき、48 時間後に有意な上昇を認めた。アクチビンについては 24 時間後では差を認めず 48 時間後で有意差を認めた。神経伝達物質ではノルエピネフリン、アセチルコリンでは上昇するも有意差を認めず、ドーパミン(DA)では 24 時間後で、DOPAC では 24、48 時間後どちらでも有意な上昇を認めた。

胎児、及び胎盤・羊膜といった子宮内環境の悪化に伴い、羊水中に様々な物質が生成・分泌が亢進することが示唆された。神経伝達物質については既知とされていたが、今回神経栄養因子についても同様のことが言えた。元来神経栄養因子は中枢神経系の発生・発達において欠くことのできない物質であり、胎児がストレスを受けた際に胎児・胎盤・羊膜が、最も影響を受けやすい中枢神経の保護のため敏感に反応したのではないかと思われた。また羊膜という観点から考えると本来胎児の周囲を覆い、羊水を保持するものとしてしか考えられていなかったが、様々な物質が生成・分泌され、胎児と同様に周囲の環境に敏感に反応していることは非常に興味深い。特に NT-3 は BDNF や NGF といった他の神経栄養因子と異なり、出生後よりむしろ胎仔期にピークを迎えることより、出生前診断という点においてより適していると思われる。今回カテコールアミンやアセチルコリンについては羊膜における生成・分泌の局在を示すことができたが、子宮内胎仔発育遅延や胎児仮死と羊水中に存在する生理活性物質についての関連についてはアクチビン、DA、DOPAC についてのみ示すことができた。DA、DOPAC での時間的相違は DOPAC が DA の代謝産物であるためと思われる。そして DA、DOPAC の時間的相違を考察することにより子宮内胎仔発育遅延や胎児仮死の発生の起点についても言及することができるのではないかと思われた。

これらのことより NT-3 や DA、DOPAC は低酸素・子宮内胎仔発育遅延の出生前診断に有用と思われる。特に DA、DOPAC を測定することによって低酸素・子宮内胎仔発育遅延の時間的経緯を調べるのが可能ではないかと思われた。