

羊水と羊水細胞の生理学的研究

出生前診断における羊水液成分の診断的意義に関する研究 第2報

大阪大学医学部

倉 智 敬 一

尾 崎 公 巳

A. 羊水中遊離アミノ酸濃度について

ま え が き

先天代謝異常症の出生前診断学は過去数年間に著しい進歩をとげた。このほとんどは、培養羊水細胞を用いる方法で診断されており、非培養羊水細胞や羊水液成分を用いる方法よりも正診率が高いと云われている。しかし、遺伝形質の発現が出生後に起る疾患群や培養羊水細胞に遺伝情報の発現されない疾患群などは、出生前診断が困難である。

これら培養羊水細胞で診断困難な疾患の中に腎尿細管でのアミノ酸再吸収機構の障害に基づく疾患群がある。この再吸収障害疾患と over flow 型のアミノ酸尿を示す異常胎児の出生前診断が羊水液成分中のアミノ酸を定量する方法によって試みられて来ている。

一方、羊水中アミノ酸の動態に関する著者らの妊娠家兎での検討によると遊離アミノ酸は母体血中から羊水中に急速に移行し、さらに羊水中アミノ酸は胎仔や胎盤へも移行することが確かめられた。また、羊水形式に関する研究から、胎児尿を介する羊水中へのアミノ酸移行も当然考えられ、羊水中遊離アミノ酸量を決定する多くの因子の存在が考えられる。

本論文では、妊娠中期、妊娠末期における羊水中遊離アミノ酸の定量と、羊水中に高濃度アミノ酸を注入した時の変動について検討を加え、羊水液成分を用いて異常アミノ酸尿を示す異常胎児の出生前診断の可能性について検討した。

研究 方 法

(1) 羊水材料の採取

妊娠末期の材料は原則として分娩時に経膈的羊水穿刺によって採取し、その他の妊娠期羊水は原則として経腹壁羊水穿刺によって採取した。対象妊産婦は特に合併症のない婦人とし、採取した羊水のうち肉眼的に血液、胎便の混入したものは除外した。

(2) 羊水中遊離アミノ酸の分析

羊水を800gで10分速沈し、細胞成分を分離し、その上清3mlに1%ピクリン酸15mlを加えて除蛋白し、その後Dowex 2 X 8 C1-のイオン交換樹脂によってピクリン酸を除去した。その eluate を凍結乾燥した後 lithium buffer に溶解し、アミノ酸自動分析計を用いて19のアミノ酸を定量した。

研 究 成 果

(1) 妊娠中期羊水中の各遊離アミノ酸の濃度

妊娠中期12例の羊水について各遊離アミノ酸濃度を検討した。その結果の平均値を羊水1mlあたりの μmole で表わすと、表1に示す如く、リジン0.1379、ヒスチジン0.0940、アルギニン0.0456、アスパラギン酸0.0107、スレオニン0.0939、セリン0.0214、グルタミン酸0.1210、プロリン0.0899、グリシン0.0965、アラニン0.1950、シスチン0.0502、バリン0.0983、メチオニン0.0115、イソロイシン0.0211、ロイシン0.0449、チロジン0.0277、フェニールアラニン0.0354、アスパラギン0.0388、グルタミン0.1135であった。

(2) 妊娠末期羊水中の各遊離アミノ酸濃度

妊娠末期13例の羊水中各遊離アミノ酸濃度を検討し、表2にその平均値($\mu\text{mole/ml}$)と標準誤差を示した。

リジン0.1592、ヒスチジン0.0468、アルギニン0.2327、アスパラギン酸0.0197、スレオニン0.1498、セリン0.0564、グルタミン酸0.1470、プロリン0.0755、グリシン0.1570、アラニン0.1658、シスチン0.0678、バリン0.0764、メチオニン0.0081、イソロ

イシン0.0184, ロイシン0.0382, チロシン0.0363, フェニールアラニン0.0274, アスパラギン0.0558, グルタミン0.1548であった。

(3) 羊膜腔内へ高濃度アミノ酸混合液注入後の濃度変化

妊娠第15週の妊娠中絶施行例で羊膜腔内にゾーアミン2.0cc注入前後、および注入24時間後の各羊水について、測定可能であった各遊離アミノ酸の濃度変化を表3に示した。

ヒスチジンは注入直後11.0120, 注入24時間後3.9812, アルギニンは注入直後28.014, 注入24時間後8.4970, フェニールアラニンは注入直後20.2196, 24時間後に7.3565であり、注入直後の濃度の約 $\frac{1}{2}$ は24時間以内に羊水から流出し、約 $\frac{1}{2}$ は羊水中に残存していた。メチオニンは注入直後9.7254, 24時間後5.6705, イソロイシンは注入直後11.4138, 24時間後6.7950と約 $\frac{1}{2}$ が流出し、約 $\frac{1}{2}$ が残存していた。

考 察

1958年Wirtschafterは羊水中の各種遊離アミノ酸をpaper chromatographyにより半定量的に測定して、白鼠では母体血清より羊水に高濃度に存在し、ヒトでは母体血清の方がやや高値を示すが、何れも妊娠時期により変動し、各遊離アミノ酸にそれぞれ独自の濃度変化が認められるとして、動的状態にあることを推論している。その後著者は ^{35}S -methionineを家兎に投与してトレーサー実験を行い、母体血清中の遊離アミノ酸は速やかに羊水中に移行し、羊水中の遊離アミノ酸は胎児へ移行し、胎児の蛋白源として利用されていることを確かめた。(尾崎, 1962)

一方、Hutchinsonらによると羊水の水分は約3時間でその全量が交換されるというが、羊水中に存在する物質が総べて水と共に同じ経路を経て同じ速度で更新するものではなく、むしろ各物質が独自の動態を示すと考える方が妥当であろう。遊離アミノ酸は水分ほどではないにしてもかなりの速度で更新されているはずである。従って、妊娠个体差、妊娠時期による変動、食事との関連などでの日内変動などによる羊水中各種アミノ酸濃度のバラツキが考えられる。そこで、著者らは妊娠中期、末期妊婦羊水中の各種遊離アミノ酸濃度を検討した結果グルタミンなど2,3の例外を除けば、比較的狭い濃度範囲内にあり

動的に変動しなからも何らかの調節機構が介在しているものと考えられた。さらに、羊水のアミノ酸濃度を大きく変化させた時、24時間でどの程度に元に復するものかを、羊膜腔内への高濃度アミノ酸注入実験を行って検討した。その結果アミノ酸により多少の違いはあるが、アミノ酸注入直後の濃度の $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ が24時間後に残存していた。

この様に羊水中アミノ酸は動的に変動はするが水分に比較するとその速度は遅く、特異なアミノ酸尿を示す異常胎児の場合には、出生前診断が出来る可能性を持っている。しかしながら、そのdynamicityから考えると繰り返しての検索が必要と思われる。

B. 羊水中 β_2 -microglobulinについて

ま え が き

β_2 -microglobulinは100個のアミノ酸から成る分子量約11,800の小さな蛋白質であり、そのアミノ酸配列もほぼ決定されている(Peterson 1972)この構造はIgGのconstant domain(定常領域)と同様と考えられていたが、1973年NakamuroらによつてHistocompatibility antigen(組織適合抗原)としてリンパ球表面などにみられるHLA抗原のsubunitポリペプチド鎖であることが明らかにされた。

この様に細胞表面に存在する β_2 -microglobulinは一部血液中に遊離し、低濃度ではあるが、血清、尿、脳脊髄液、唾液、羊水などに見出されている。腎系球体では β_2 -microglobulinの如き分子量3万以下のものは比較的自由にその基底膜を通過し、その内必要なものは尿細管において吸収されるのが普通である。このことは蛋白尿患者において尿中Albumin濃度と β_2 -microglobulin濃度を検索することによつて、その蛋白尿が、糸球体不全によるか、尿細管不全によるかを鑑別する手段を与える。すなわち尿中 β_2 -microglobulinの増量は尿細管での蛋白再吸収能の低下を示す指標になると思われる。

胎児腎の機能的成熟につれて β_2 -microglobulinの胎児尿への排泄は減少する筈であり、羊水中の β_2 -microglobulin測定は胎児の未熟性判定の

一つの指標となる可能性がある。心身障害児発生の大きな原因となる未熟児出産を予防する上で、一つの手段を提供するために、著者らは母体血清、羊水中の β_2 microglobulin 濃度を測定した。

研 究 方 法

(1) 測定試料

羊水は遊離アミノ酸分析の場合と同様に採取した。羊水採取直前に母体血を採取し臍帯血は胎児娩出直後に採取して血清を分離した。

(2) β_2 - microglobulin 濃度の測定

Phadebas β_2 - micro test キットを使用し一抗体法により二重測定を行なった。

研 究 成 果

妊娠4～6カ月、妊娠7～9カ月、妊娠10カ月の三群に分けて検討したが、図1に示す如く各群とも β_2 - microglobulin 濃度は羊水>臍帯血>母体血の順であった。また、母体血、臍帯血濃度は妊娠期が進行するにつれて下降した。一方羊水では妊娠4～6カ月、妊娠7～9カ月と殆んど変動を示さず、妊娠10カ月になると約 $\frac{1}{2}$ の値に下降した。(図1)

考 察

羊水による胎児成熟度判定に現在用いられている方法のうち腎機能の発達と関連すると考えられるのは creatinine 濃度であり、胎児筋組織と胎児腎機能の発育によって羊水中に増量する。羊水中 creatinine 濃度は妊娠37週以後には殆んど2.0 mg/dl以上になると云われている。

著者らの β_2 - microglobulin の検討によると羊水中の濃度は妊娠10カ月になると下降し、腎成熟の一つの指標となり得るものと思われる。しかしながら、妊娠中期の症例でも低値を示す場合もあり、今後更に検討を要するものと思われた。

C. 羊水中のHCGについて

胎盤が産生する蛋白系ホルモンのうち最も早くその存在を確認されたHCG

は主に母体血中に分泌され、臍帯血中には殆んど見出されていない。この様に母児間で濃度差の大きい物質は母体から羊水への直接の物質移行についてのmarker となり得る。羊水中HCG濃度測定そのものが出生前診断に有意義とは思われないが、羊水代謝を検討するために以下の実験を行った。

研究 方 法

(1) 測 定 試 料

羊水、母児血清は β_2 -microglobulinと同様に採取し、同時に採取した母体尿と共に測定試料とした。

(2) 測 定 方 法

2抗体法によるradioimmunoassay法にて測定した。

各測定値の平均値を標準誤差と共に図2に示した。

母体血(●印)、母体尿(×印)では妊娠第4カ月にピークを持ち、第5カ月以降は低値を示した。羊水では妊娠4~5カ月に高値で6カ月以降は低値となった。この様に月数別変動パターンは3者共類似したが、その絶対値については、母体血、母体尿は羊水の50倍以上の高値であった。臍帯血については妊娠第4~5カ月のものより測定出来なかったが、羊水中より更に $\frac{1}{20}$ の低値であ

考 察

羊水中のHCG値は母体血、母体尿に比較すると約 $\frac{1}{50}$ の低値ではあったが、月数別変動パターンは類似しており、母体血から直接羊水へ移行したと考えてもおかしくない成績であった。また臍帯血については妊娠末期の成績は低いが、非常に低値で、羊水の約 $\frac{1}{20}$ 程度であり、たとえ羊水がすべて胎児尿で構成されたとして考えても、胎児尿=臍帯血の仮定が成立するならば、胎児が羊水中HCGのmain originであるとは考えにくい。

これらのことからHCGの如き高分子物質も卵膜を介して羊水中へ移行することが推察される。

D. 羊水中 prolactin について

ま え が き

最近数年間にヒトプロラクチンに関する研究は著しく進歩した。ヒトプロラクチンは分子量22000、約200個のアミノ酸から成る蛋白ホルモンであり、向乳腺作用の他に黄体、腎、循環系などに対する生理作用が見出されて来ている。著者らは正常妊婦におけるヒトプロラクチンの濃度を、母体血、臍帯血、羊水について測定した。

研 究 方 法

(1) 測 定 試 料

前述の如く、母体血、羊水、臍帯血を採取して、血清、羊水液成分を分離した。

(2) 測 定 方 法

2抗体法によるradioimmunoassayによって測定した。

研 究 成 果

妊娠第17～第24週、第25～第32週、第33～第40週に分けて、その平均値を検討した。母体血、臍帯血いずれも、妊娠週数の進むにつれて増加し、妊娠第32週までは母体血>臍帯血であったが、妊娠後期には臍帯血>母体血となった。羊水中プロラクチン濃度は母体血より、はるかに高濃度で17週～32週では1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の値を示し妊娠後期には600 ng/ml レベルに下降した。(図3)

考 察

羊水中に非常に大量に存在するヒトプロラクチンの生理的意義は未だ不詳であり、その産生源についても不明であるが、母体血から羊水へ直接能動的に移

行したと考えるより、羊水を取り囲む直接の環境、すなわち胎児、胎盤などからの移行を考える方が妥当ではなからうか。著者らの検討によると臍帯血の濃度は羊水に比較すると非常に低値であり、胎児脳下垂体から分泌されたものが main origin であるとの積極的な証拠は得られなかった。一方胎盤に関する研究によると、胎盤がヒトプロラクチンを産生するという成績と、産生しないという成績がみられ、羊水中ヒトプロラクチンの main origin が胎盤であるとも断言できない。羊水中ヒトプロラクチンの生理的意義と産生源についての一層の検討が望まれる。

表1 Concentrations of each amino acids in amniotic fluid (second trimester)

amino acids	Concentrations (μ mole/ml)
LYS	0.1379 \pm 0.0396
HIS	0.0940 \pm 0.0268
ARG	0.0456 \pm 0.0160
ASP	0.0107 \pm 0.0017
THR	0.0939 \pm 0.0230
SER	0.0214 \pm 0.0034
GLU	0.1210 \pm 0.0250
PRO	0.0899 \pm 0.0266
GLY	0.0965 \pm 0.0228
ALA	0.1950 \pm 0.0532
CYS	0.0502 \pm 0.0152
VAL	0.0983 \pm 0.0288
MET	0.0115 \pm 0.0036
ILEU	0.0211 \pm 0.0070
LEU	0.0449 \pm 0.0153
TYR	0.0277 \pm 0.0091
PHE	0.0354 \pm 0.0101
ASn	0.0388 \pm 0.0108
GLn	0.1135 \pm 0.0732

Means of 12 determinations and standard errors

表2 Concentration of each amino acids in amniotic fluid (term)

amino acids	Concentrations (μ mole/ml)
LYS	0.1592 \pm 0.0365
HIS	0.0468 \pm 0.0086
ARG	0.2327 \pm 0.0041
ASP	0.0197 \pm 0.0079
THR	0.1198 \pm 0.0169
SER	0.0564 \pm 0.0103
GLU	0.1470 \pm 0.0277
PRO	0.0755 \pm 0.0190
GLY	0.1570 \pm 0.0298
ALA	0.1658 \pm 0.0313
CYS	0.0678 \pm 0.0341
VAL	0.0764 \pm 0.0135
MET	0.0081 \pm 0.0017
ILEU	0.0184 \pm 0.0035
LEU	0.0382 \pm 0.0074
TYR	0.0363 \pm 0.0117
PHE	0.0274 \pm 0.0044
ASn	0.0558 \pm 0.0296
GLn	0.1548 \pm 0.0504

Means of 13 determinations and standard errors

表3 Changes of Amino Acid Concentration after Injection of Amino Acid Solution

	before Injection	5 min after Injection	24 hours after Injection
LYS	0.4559		18.3697
HIS	0.1923	11.0120	3.9812
ARG	0.1113	28.014	8.4970
MET	0.0305	9.7254	5.6705
ILEU	0.0757	11.4138	6.7950
LEU	0.1828		9.3415
PHE	0.1106	20.2196	7.3565

μ mol/ml

図1 β_2 Microglobulin Concentration in Amniotic Fluid and Maternal and Fetal Serum and Fetal Serum

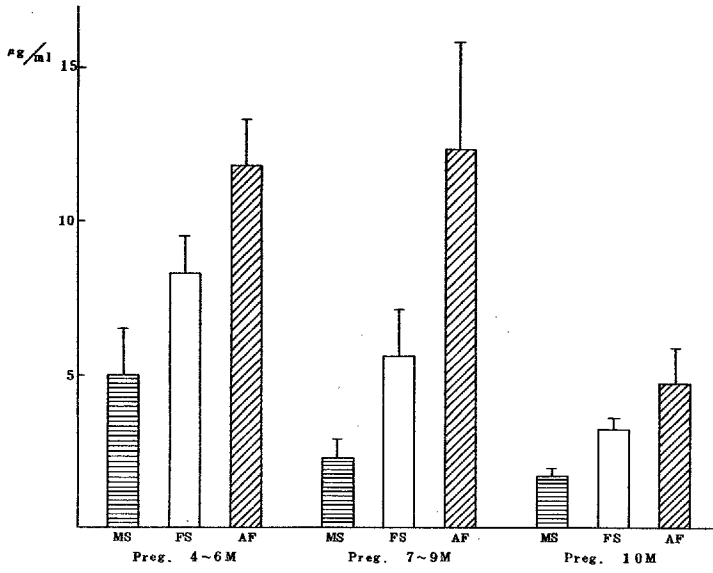


図2 Concentration of HCG in Amniotic Fluid, Maternal Urine and Maternal and Fetal Serum

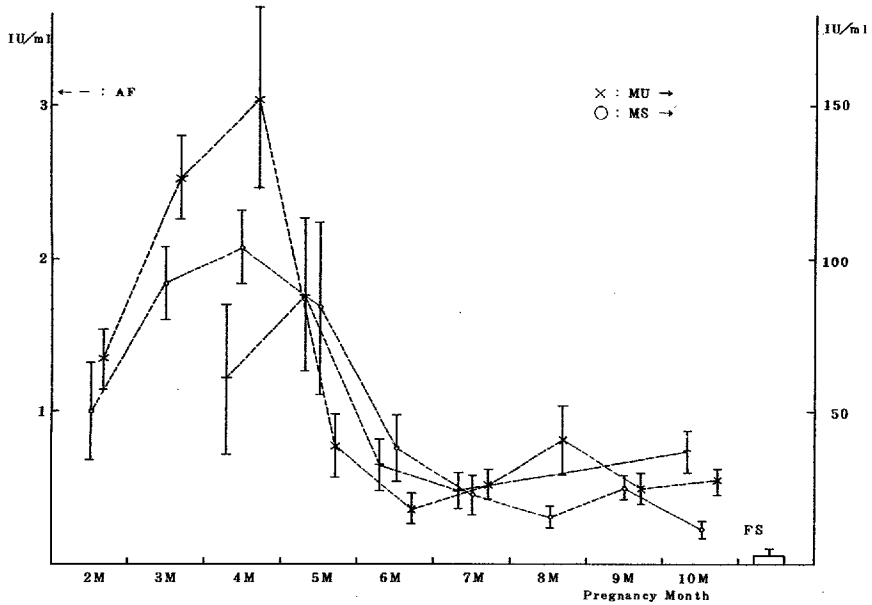
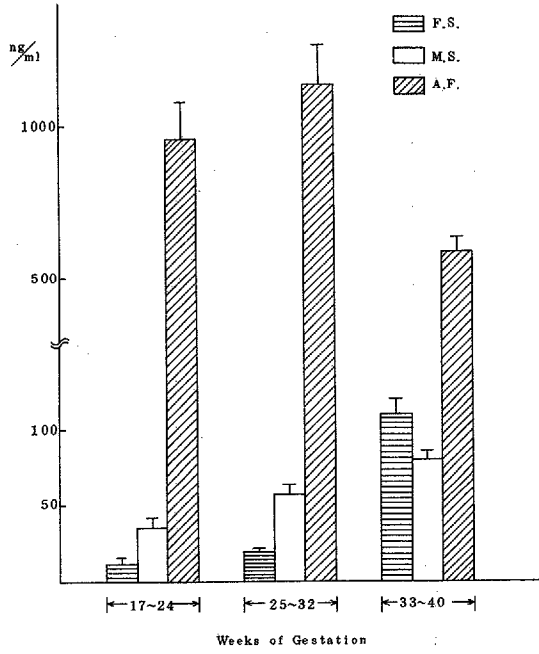


图3 孕期中催乳素浓度的变化



↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

まえがき

先天代謝異常症の出生前診断学は過去数年間に著しい進歩をとげた。このほとんどは、培養羊水細胞を用いる方法で診断されており、非培養羊水細胞や羊水液成分を用いる方法よりも正診率が高いと云われている。しかし遺伝形質の発現が出生後に起る疾患群や培養羊水細胞に遺伝情報の発現されない疾患群などは、出生前診断が困難である。