

FIZによる妊婦頸管擦過細胞におけるゼラチナーゼ活性の検出

永 井 敦 井 坂 恵 一

東京医科大学産科婦人科学講座

【要旨】 妊婦子宮頸管の局所炎症を把握する目的として、妊婦の頸管擦過細胞及び粘液における MMP-2 および MMP-9 の活性を検出し、その有用性を評価した。2001 年 5 月から 2005 年 2 月までに当院にて出産した正常の分娩経過を示す妊婦 160 症例及び切迫早産 43 症例の妊婦を対象にインフォームドコンセントを行ったうえで、頸管擦過細胞および粘液を採取し、FIZ によりゼラチナーゼ活性を測定、ELISA 法により MMP-2、MMP-9 の定量を行った。また卵膜および頸管粘液を用いた基礎実験を行った。卵膜および頸管粘液には著明な MMP-2、MMP-9 の存在が認められたことから、卵膜破綻にはゼラチナーゼの関与が示唆された。このゼラチナーゼ活性を FIZ により半定量化すると、切迫早産群は正常妊娠群に比して有意にゼラチナーゼ活性が高いことを示すことから、FIZ は切迫早産の新たなマーカーとしての有用性が示唆された。

はじめに

切迫早産、前期破水は児の予後に大きく関与するので、産科疾患の中でも極めて重要であると言える。現在、児の予後の向上という観点からは切迫早産及び前期破水後の妊娠管理・治療には限界があると言わざるを得ない。従って切迫早産の状態を把握し、前期破水、早産の予防をすることが重要である。

現在、切迫早産や前期破水の原因、危険因子として、炎症（特に絨毛羊膜炎）性器出血、多胎妊娠、羊水過多、喫煙、性交、流早産の既往、子宮頸管縫縮術、円錐切除術、羊水穿刺、絨毛採取など、様々な因子が報告されている^{1)~4)}。その中でも切迫早産・前期破水と最も深い因果関係を持つと考えられているのは炎症（特に細菌感染による）である。炎症のほとんどが細菌の上行感染によるものであり、膣炎、頸管炎が卵膜、羊水中に波及し、絨毛羊膜炎を引き起こすと考えられている。局所で炎症が発生すると、その情報を組織中のマクロファージ、あるいは線維芽細胞が捉える。これらの細胞はインターロイキン-1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α など、さまざまな炎症性サイトカイン

を産生する能力を持っている。いったん、これらのサイトカインネットワークができ上がると、その刺激によって、ゼラチナーゼである Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) や Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、IL-8 の信号により遊走してきた好中球が放出する顆粒球エラスターゼなどが活性化し、卵膜を構成している主要な成分であるコラーゲンなどの細胞外マトリックスが分解される⁵⁾⁶⁾。また、炎症を起こした卵膜では、細胞外マトリックスの糖鎖の一つであるヒアルロン酸の濃度が上昇し、MMP-2、MMP-9 によってコラーゲン線維が分解されやすい状態となる。更に卵膜レベルでは、炎症性サイトカインの刺激で、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)、PGF₂ α の産生が亢進することにより惹起された子宮収縮と、前述した卵膜の変性とは相まって切迫早産、破水に至るとされている¹⁾⁷⁾⁸⁾。

頸管粘液エラスターゼの測定は、これらに基づくもので、絨毛膜羊膜炎における炎症を把握するマーカーとして臨床的にも確立されている⁹⁾。一方、ゼラチナーゼである MMP-2、MMP-9 は頸管炎や絨毛羊膜炎及び頸管熟化により活性化され、頸管組織、卵膜のコラー

2006 年 2 月 15 日受付、2006 年 2 月 28 日受理

キーワード：切迫早産、絨毛膜羊膜炎、ゼラチナーゼ、MMP-2、MMP-9

(別冊請求先：〒 160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学産科婦人科学講座 永井 敦)

ゲン分解に働き、頸管においては頸管熟化に、卵膜においては破水の原因となることが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。

そこで本研究では、妊婦の頸管擦過細胞および粘液において、強いゼラチナーゼ活性を示す MMP-2、MMP-9 を検出し、その活性が実際に分娩の進行にどのように影響しているのかを検討した。さらにゼラチナーゼが早産、及び破水についてどのように関与しているかを検討した。

研究材料及び方法

研究対象

2001 年 5 月から 2005 年 2 月までに東京医科大学病

院にて出産した正常の分娩経過をたどった妊婦 160 症例及び切迫早産 43 症例の妊婦を対象にインフォームドコンセントを行ったうえで、頸管擦過細胞および粘液を採取し、ゼラチナーゼ活性を film *in situ* zymography (FIZ) を用い検出した。採取検体の詳細は Fig. 1 に示した。さらに上記の切迫早産から採取された頸管粘液 10 検体、分娩および帝王切開時に採取された卵膜 20 検体を用い、MMP-2、MMP-9 の活性、定量を行った。また、これら卵膜における MMP-2、MMP-9 の組織局在を調べた。なお zymography、Western blotting、ELISA の実験には、帝王切開術予定の症例が前期破水し、破水後直ちに緊急帝王切開術を施行した症例より採取した卵膜破綻部および非破綻部の検体を

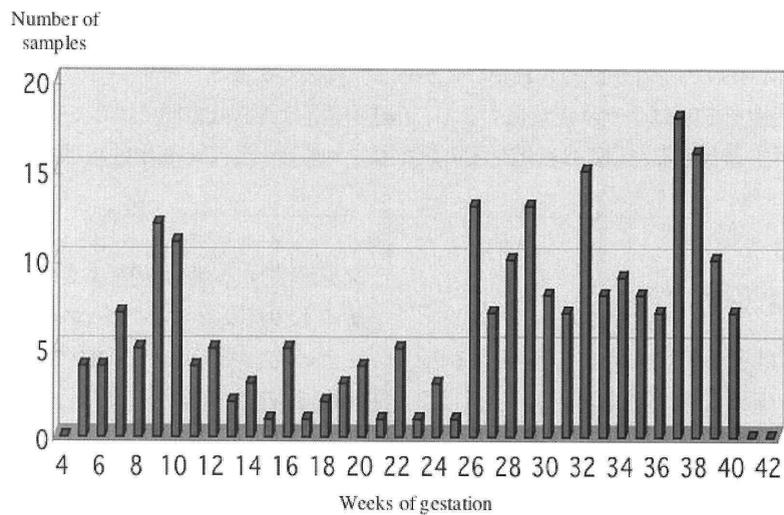


Fig. 1A Number of specimens and their weeks of gestation

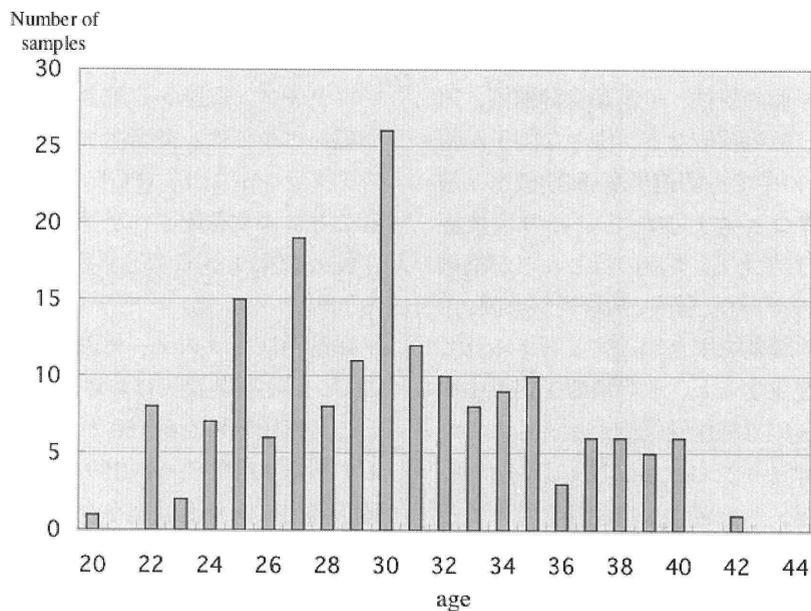


Fig. 1B Number of specimens and their age in this study

用いた。

研究材料及び研究方法

1. FIZ

1) 測定原理

本法は、ゼラチンを薄層コートしたフィルム上でゼラチナーゼ活性を検出する新しい方法¹⁴⁾であり、ゼラ

チナーゼにより分解されたゼラチンの消化痕を可視化することにより MMP-2、MMP-9の産生細胞および活性細胞の同定が可能である。さらに、従来の *in situ* zymography は、酵素活性の分布を定性的な測定しかできないが、FIZ はゼラチン膜を均一かつフィルムごとの差をなくすことにより、半定量的に判定できるのが特徴である。その詳細を Fig. 2 に示す。

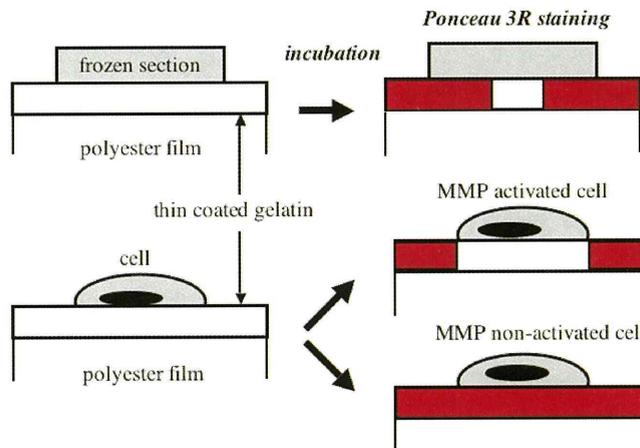


Fig. 2 Principle of film *in situ* zymography (FIZ)

Particularly processed gelatin is placed on a polyester film. Thereafter a sample consisting of exfoliated cervical cells are applied on this film. This film is incubated at 37°C (99°F) for 24 hours, then double staining is performed using Ponceau-R and hematoxylin solutions. When gelatin is digested by gelatinase, the red stain of gelatin disappears and film becomes transparent.

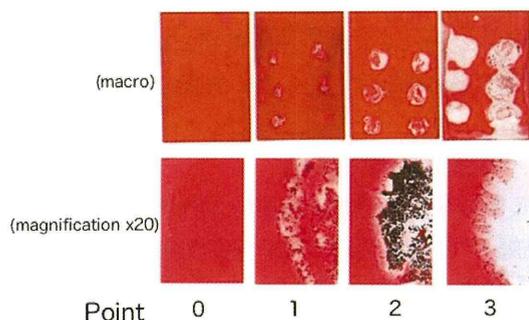


Fig. 3A Diagnostic criteria for FIZ

Gelatinase activity is indicated when film becomes transparent, because gelatin is disintegrated and the stain disappears. The upper part of the figure exhibits macroscopic findings and lower part microscopic findings. When no staining is observed both microscopically and macroscopically gelatinase activity is rated as minus (-). When no staining is observed microscopically but red staining is detected macroscopically, gelatinase activity is rated as plus and minus (±). When red staining is not observed both microscopically and macroscopically in the corresponding sites where the sample was applied, gelatinase activity is rated as single plus (+). When red staining is not observed both microscopically and macroscopically in the corresponding sites and their surrounding area, gelatinase activity is rated as double plus (#). We have graded the ratings as 0. 1. 2. 3. etc for convenience.

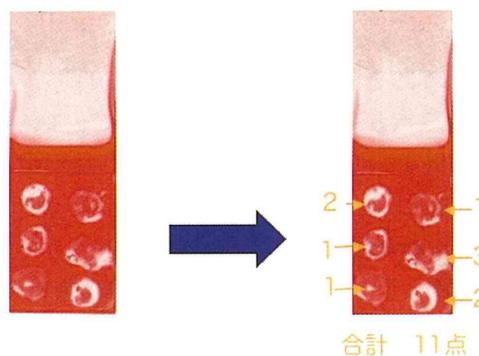


Fig. 3B Diagnostic criteria for FIZ

We put one sample in six places on a film because judgment makes it surely. Positivity for threatened premature delivery was determined when more than 6 points were obtained. We showed it in the right of the figure, for example, it become 11 points in total with this film.

2) 検体採取法

セラミック製綿棒を用い妊婦の子宮頸管内腔に挿入し、綿棒をゆっくりと2回転させ、頸管粘液を採取綿棒にて採取し、これをFIZフィルムに塗布した。その後37°Cにて一定時間インキュベート(24時間)し、終了後30分程度自然乾燥後、染色を行った。

3) 測定方法

FIZフィルムをポンソー3R染色液(和光純薬、Japan)が入った染色瓶に入れ4分間染色後、流水中で10分間水洗いし、マイヤーヘマトキシリン溶液(和光純薬、Japan)で2分間染色した。再度流水中で10分間水洗いし、1時間以上自然乾燥し判定した。なお、コントロールとして、MMP阻害剤である1,10-phenanthroline(和光純薬、Japan)、セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ガベキサート(和光純薬、Japan)を上記フィルムに各々コーティングしたものを、上記と同様の処理を行い判定した。

4) 判定

ゼラチナーゼ活性を認める部分はゼラチンが分解され、染色されないため脱色し白色透明となる。そこで本研究では、肉眼的にも顕微鏡的にも脱色していないものを(-)、肉眼的にわずかに脱色して顕微鏡的に脱色しているものを(±)、肉眼的に塗布した位置を超えずに脱色しているものを(+)、塗布した位置を超えて脱色しているものを(2+)とした。さらに判定を簡便化するためにそれぞれ(-)0点、(±)1点、(+)2点、(2+)3点とそれぞれ点数化した(Fig. 3A)。さらに判定結果を一定化するために6穴の枠を使用し、個々に点数化し合計6点以上を陽性とした(Fig. 3B)。

2. Zymography

基礎実験として、卵膜破綻部および非破綻部におけるMMP-2、MMP-9の存在を確認するためzymographyを行った。なお組織試料はlysis buffer(pH 8.0のTris 10 mM、EDTA 1 mM、NaCl 400 mM、10%glycerol、0.5%NP-40、フッ化ナトリウム 5 mM、フッ化phenylmethylsulfonyl 0.1 mM、DTT 1 mM)を用い、プロテアーゼ阻害剤カクテル一式を加え(Boehringer Mannheim社製、Indianapolis, USA)、氷上で30分間溶解した。ライセートは、毎分14,000回転で15分間遠心分離を行い、可溶分画を採取した。タンパク質濃度は、Bio-Radタンパク質分析キット(Bio-Rad Laboratories社製、Hercules, USA)で測定した。Zymographyは、10% Zymogram Gelatin Gel(Novex Invitrogen)を使用し、各サンプルの電気泳動を行った。泳動したゲル

は2.5% Triton Xに浸け室温で1時間反応した後、さらにincubation bufferに浸け37°Cで6-12時間反応した。その後Coomassie brilliant blue R 250溶液にて染色、メタノール/酢酸溶液で脱色を行った。白く脱色されたバンドの分子量から潜在型(pro MMP)および活性型のMMP-2およびMMP-9の確認を行った。

3. Western blotting

zymographyと同じサンプルを用いてMMP-2、MMP-9の検出をWestern blotting法を用いて行った。簡単には、各サンプルに同体積のsample bufferと混合した50 μgのタンパク質を4~12%ポリアクリルアミドゲルに加え、200ボルトで50分間、電気泳動を行った。タンパク質は、blottingによってPVDF膜(Invitrogen社製、Carlsbad, USA)へ転写し、非特異的染色は転写物の5%脱脂粉乳を含むPBS(0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4)中における1時間の培養によって遮断した。転写物はその後1,000分の1に希釈し、blocking buffer中でanti-MMP-2、anti-MMP-9あるいはanti-actin抗体(Boehringer Mannheim社製)と共に一晩培養した。膜を取り除いた後、同じプロットは異なる抗体を用いて試験した。それぞれのタンパク質は、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識し、enhanced chemiluminescence(ECL)用western blotting試薬(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて2次抗体で検出した。それぞれのバンドでのintensityは、アクチン由来のバンドで標準化した。

4. 免疫組織化学的染色

卵膜破綻部、卵膜非破綻部のMMP-2、MMP-9の局在を確認するため免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学標本は、検体採取後ただちにOCT compoundにて包埋し、クライオンガススプレー(日酸商事、Japan)にて凍結し、使用まで-80°Cにて保存した。免疫染色は、保存標本をcryostatにて5 μmの連続凍結切片を作成し、冷アセトンにて5分間固定後、染色はヒストファインSABキット(ニチレイ、Japan)にて行った。なお、一次抗体には抗ヒトMMP-2山羊抗体(第一ケミカル、Japan)、抗ヒトMMP-9山羊抗体(第一ケミカル、Japan)を使用した。

5. ELISA

卵膜および頸管粘液を用いELISA法にて、total MMP-2、total MMP-9、active MMP-2、active MMP-9の定量を行った。卵膜検体は用い卵膜破綻部、卵膜非破綻部のそれぞれのタンパクを抽出後、ELISA法に

より測定した。頸管粘液検体は、セラミック製綿棒を子宮頸管内腔に挿入し、綿棒をゆっくりと2回転させ、頸管粘液を採取後、リン酸バッファー 300 μ l に綿棒を浸けて、2-3分間放置し抽出した。採取した検体は、MMP-2 Biotrak Activity Assay System (Amersham Biosciences USA)、MMP-9 Biotrak Activity Assay System (Amersham Biosciences USA) を使用し測定を行った。

結 果

1. FIZ

1) 非妊娠および正常妊娠症例における頸管擦過細胞のゼラチナーゼ活性

非妊時婦人 15 症例における頸管擦過細胞のゼラチナーゼ活性は、すべて陰性であった。一方、妊娠各期

の妊婦におけるゼラチナーゼ活性陽性率は、初期 (-16 週) 45% (60 例中 27 例)、中期 (17 週-28 週) 39% (26 例中 10 例)、後期 (29 週-36 週) 41% (34 例中 14 例)、満期 (37 週-分娩) 77% (47 例中 36 例) であり、妊娠初期高値、中期・後期低値、妊娠満期高値と妊娠経過とともに推移した。

2) 正常妊娠症例における FIZ score

正常妊娠症例 81 例における FIZ score 測定値 2 点および 12 点において 2 つのピークを示し、64% は 6 点未満を示した (Fig. 4A)。妊娠週数別の FIZ score 平均値を検討すると妊娠初期-16 週までは 6 点以上の高値が目立ち、妊娠 17-34 週までは 6 点未満で推移し、35 週以降は FIZ score が再度上昇する結果が得られた (Fig. 4B)。また、切迫早産の時期である妊娠 22-35 週では、35 週を除きすべて 6 点未満を示した。この結果を

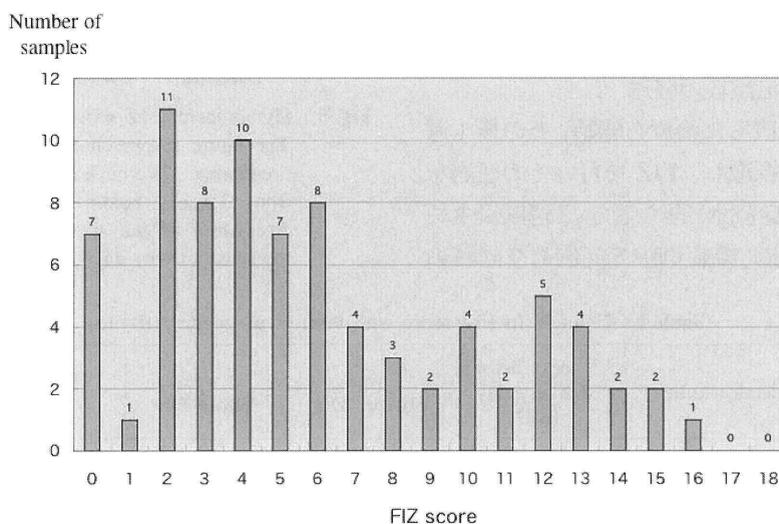


Fig. 4A Distribution of FIZ score in normal pregnancies

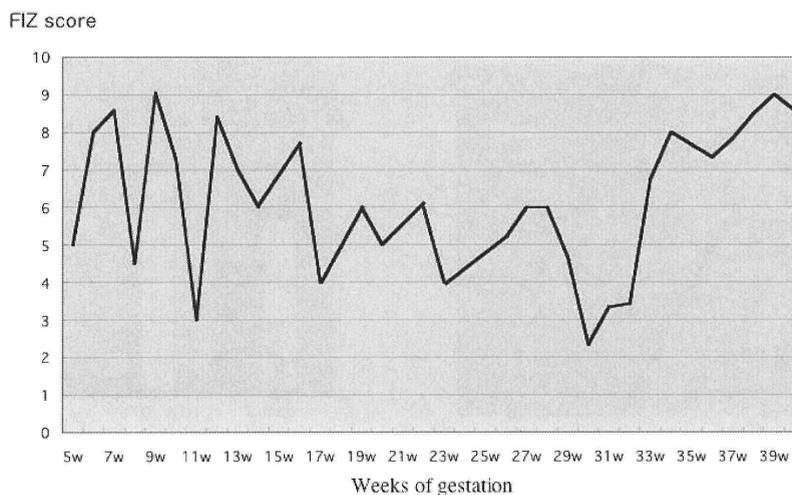


Fig. 4B Distribution of weeks of gestation on mean FIZ score in normal pregnancies

元に陽性点数の設定を行った。

3) 分娩前3週間の頸管擦過細胞のゼラチナーゼ活性の推移

分娩日を0日とし、分娩前3週間の頸管擦過細胞のゼラチナーゼ活性の推移について後方視的に検討した。対象は、正常経膈分娩に至った満期症例(37週〜)とした。平均 FIZ score および陽性率は、分娩日に近づくにつれ上昇した (Fig. 5) (Table 1)。症例間における FIZ score はバラツキを認めたが、症例毎に検討すると、分娩日に近づくにつれて FIZ score が上昇する傾向を認めた。

4) 切迫早産症例のゼラチナーゼ活性

切迫早産 43 例 (妊娠 17〜36 週) に対して、FIZ を用いゼラチナーゼ活性を検討した。切迫早産未治療群は 92% (14 例中 13 例) と高率に陽性 (FIZ score 6 点以上を陽性) を示した。一方治療群では 36% (30 例中 11 例) と未治療群に比べ低値を示した。治療を行った 30 症例中 5 症例が早産した。

5) 切迫早産症例の治療後の経過

切迫早産診断時より直ちに治療を開始、その後1週間毎に頸管擦過細胞を採取し、FIZ を行いその経過を追った。治療により切迫症状が落ち着き、2週間以上妊娠延長をはかれた症例は 10 症例中 8 症例あり同時に

FIZ score の下降が見られた (Fig. 6)。各群の FIZ score 平均値をとると、正常群 6.31 点、Term (37 週〜) 群 7.96 点、頸管炎・膣炎群 8.00 点であったが、切迫早産の時期に相当する正常群の 22〜36 週では 4.42 点であり、これに比べると切迫早産群 (未治療群 10.12 点、切迫早産治療群 6.60 点) は、いずれも正常群に比べて有意に高い値を示した (Fig. 7)。また、切迫早産群は治療により FIZ score の低下を認めた。

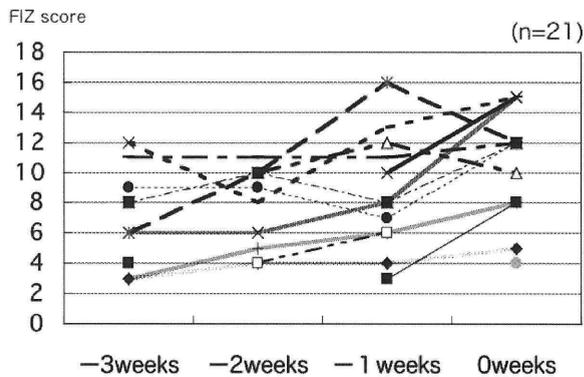


Fig. 5 Dynamics of FIZ score in term pregnancies
The figure shows changes in FIZ score with term of pregnancy. We have illustrated FIZ score positive rate from 3 weeks before delivery day to delivery day. According to our speculation, positive rate increased towards delivery day.

Table 1 Changes in FIZ score with term of pregnancy (n=15)

Collection time	3 weeks before delivery day (DD)	2 weeks before DD	1 week before DD	On delivery day
No. of cases	7/10	7/11	10/13	11/14
Positive (%)	70.0	63.6	76.9	79
Score (average)	6.9	7.2	8.2	10.1

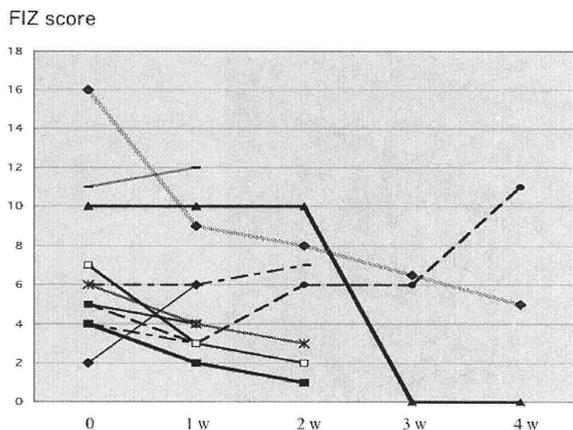


Fig. 6 Dynamics of FIZ score in premature labor
The graph made from FIZ score of each case. The scores increased towards delivery day.

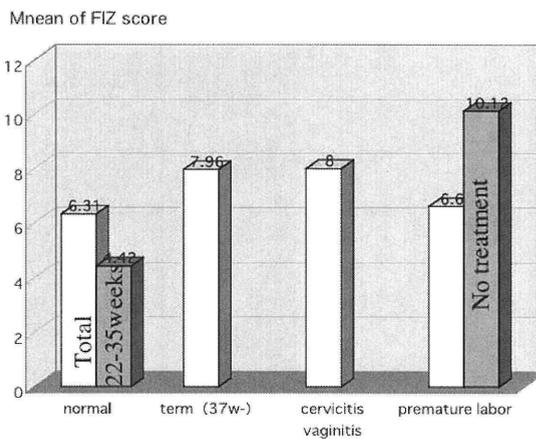


Fig. 7 Comparison of mean FIZ score between normal cases and other groups

6) FIZ score とエラストラーゼ値との比較

頸管局所の炎症マーカーであるエラストラーゼ値との比較を切迫早産 18 症例頸管粘液について行った。この結果、エラストラーゼ値と FIZ score との間には $r=0.7166$ と相関を認めた。

7) FIZ score と血清 CRP 値の比較

切迫早産 18 症例における FIZ score 値と同時に測定された血清 CRP 値との間に相関は認められなかった。

2. 基礎実験

今回の結果をふまえ、頸管におけるゼラチナーゼ活性の由来の一つとして考えられる卵膜及び頸管粘液を用いてゼラチナーゼ活性の有無を検討した。

1) 卵膜組織における免疫染色およびゼラチナーゼ活性

卵膜組織の MMP-2 の免疫染色を Fig. 8A に示す。羊膜上皮細胞、絨毛膜細胞ともに MMP-2 の局在が確認でき、また MMP-9 の免疫染色も同様な所見を確認した (Fig. 8B)。

2) 卵膜組織のゼラチナーゼ活性

局所のゼラチナーゼ活性を把握するために、卵膜の連続切片を用い免疫染色の染色部位と FIZ の脱色部位を比較した。FIZ による卵膜組織のゼラチナーゼ活性を Fig. 8C に示す。卵膜組織周囲にゼラチナーゼによる脱色部を認め、これは免疫染色による MMP-2 の局在部と一致した。

3) 卵膜組織におけるゼラチナーゼ (MMP-2、9) の蛋白発現と酵素活性

① zymography

破水症例および未破水症例の卵膜破綻部および非破綻部のいずれにおいても MMP-2、MMP-9 の酵素活性を認めた (Fig. 9A)。破水症例においては、卵膜破綻部は非破綻部に比べ MMP-2 の強い酵素活性を認めた。

② Western blot

破水症例および未破水症例の卵膜破綻部および非破綻部のいずれにおいても MMP-2、MMP-9 のタンパク発現を認めた (Fig. 9B)。破水症例においては、zymography の結果と同様に卵膜破綻部は非破綻部に比べ強くタンパク発現を認めた。

③ ELISA

ELISA 法を用いた破水症例における定量結果では、active MMP-2、active MMP-9 の平均値は、いずれも卵膜破綻部の方が卵膜非破綻部に比べて高い値を

示した (Table 2)。また、total MMP-2 および total MMP-9 についても同様の結果を得た。

4) 頸管粘液の検討

① 切迫早産症例における頸管粘液のゼラチナーゼ活性

zymography により、MMP-2 および MMP-9 それぞれ酵素活性を認めたが (Fig. 10A)、Western blot では

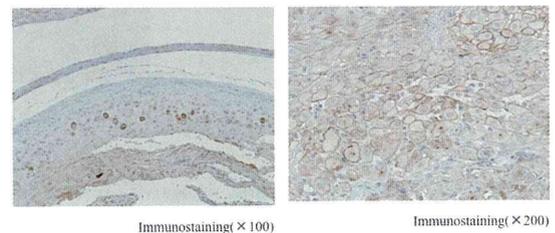


Fig. 8A Immunostaining of MMP-2 on fetal membranes

We confirmed localization of MMP-2 in amniotic epithelial and chorionic cells of the fetal membrane.

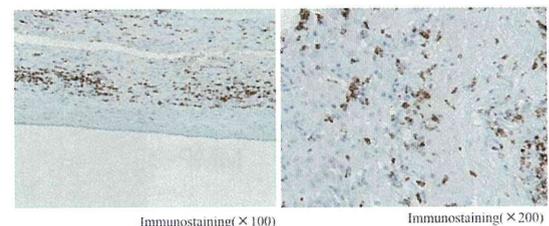


Fig. 8B Immunostaining of MMP-9 on fetal membranes

We confirmed localization of MMP-9 in amniotic epithelial and chorionic cells of the fetal membrane same as MMP-2.

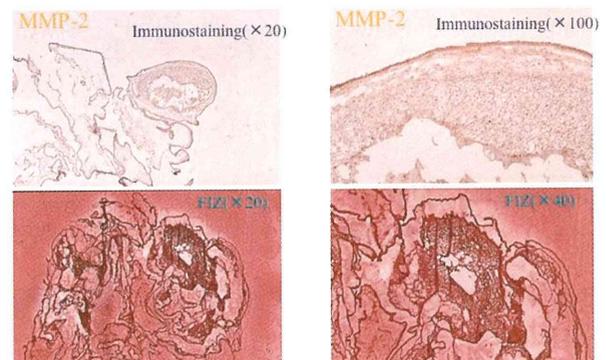


Fig. 8C Immunostaining and gelatinase activity in fetal membranes

The upper part of this figure shows MMP-2 in fetal membrane tissue by immunostaining. We confirmed MMP-2 localization in amniotic epithelial and chorionic cells of the fetal membrane. We obtained similar results for MMP-9. The lower part of the figure shows gelatinase activity in fetal membrane tissue by FIZ.

However this site was not stained therefore we confirmed gelatinase activity at this site.

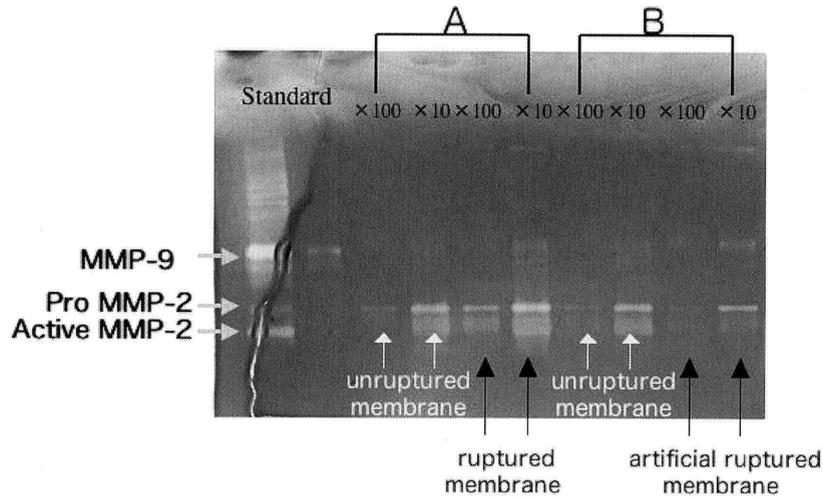


Fig. 9A Gelatinase (MMP-2 and -9) activity in fetal membrane on zymography
 A : ruptured cases, B : unruptured cases
 We obtained random of the fetal membrane samples from pregnant women who underwent elective Caesarean section.
 The samples were obtained from ruptured and unruptured parts of fetal membrane.
 We confirmed gelatinase (MMP-2 and -9) activity by zymography.
 Ruptured part exhibited enzyme activity more strongly than unruptured part.

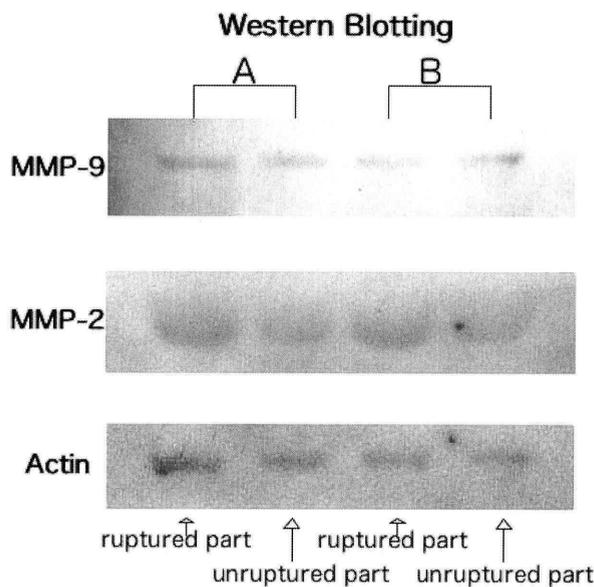


Fig. 9B Presence of gelatinase (MMP-2 and -9) in fetal membrane
 There were increased levels of both MMP-2 and MMP-9 and their activity at ruptured part of fetal membrane.

MMP-2 および MMP-9 のいずれもタンパク発現を認めなかった。

② ELISA 法による頸管粘液の定量

切迫早産症例の頸管粘液を用いた MMP-2 および MMP-9 定量では、ELISA 法を用い測定を行った。total MMP-2 および MMP-9、active MMP-2 および MMP-9 はすべて測定可能であった (Fig. 10B)。しかし、FIZ Score、エラストラーゼ値、CRP 値との相関は認めなかった (data not shown)。

Table 2 Measurement of gelatinases in fetal membranes in cases of Caesarian section

	Rupture part	Unrupture part
Total MMP-2	10.07	5.048
Active MMP-2	5.67	2.871
Total MMP-9	6.34	4.469
Active MMP-9	2.29	1.249

ng/ml/1 g wet tissue

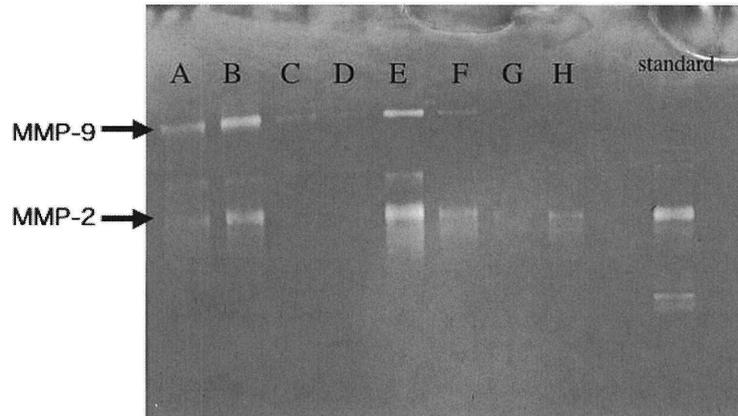


Fig. 10A Gelatinase activity of cervical mucous fluid in premature labor cases
We confirmed gelatinase (MMP-2 and -9) activity of cervical mucous fluid in premature labor cases by zymography.

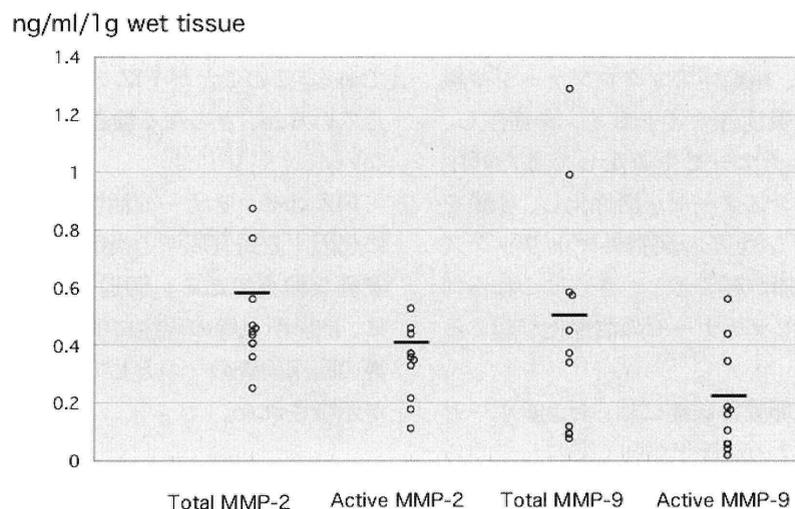


Fig. 10B Measurement of gelatinases activity of cervical mucous fluid in premature labor cases
We reviewed the correlation of Total MMP-2, Total MMP-9, Active MMP-2 and Active MMP-9. However, there was no correlation in FIZ Score, elastase in cervical mucus and CRP.

考 察

妊婦頸管粘液における MMP および TIMP の存在に関する報告¹⁵⁾ はすでにあるが、本研究では新たに妊婦の頸管擦過細胞および粘液よりゼラチナーゼの活性を FIZ により簡便に検出する方法を開発した。本法は、実際の活性を検出することができる点で、TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) などの影響を考慮しなければならない従来の測定法に比べ局所でのゼラチナーゼ活性を正確に把握できるため有用性が高いと考える。

臨床的な検討では、切迫早産群は、正常妊娠群と比して高率にゼラチナーゼ活性陽性を認め、また破水症例における卵膜組織のゼラチナーゼは、破綻部位において高い蛋白量およびその活性の発現を認めた。このことより、破水の原因のひとつとして卵膜に対するゼ

ラチナーゼ活性の作用が関与していることを示し¹⁶⁾¹⁷⁾、その検出、測定は今後新たな早産予知マーカー、破水の予測マーカーに成り得ることが示唆された。

FIZ score の点数化の試みについては、正常妊娠例において、分娩直前 1 週間前の満期症例では、21 検体中 19 検体が 6 点以上を示したが、全体では 64% が FIZ score 6 点以下を示し、特に妊娠 22-35 週の切迫早産の時期では、その平均値が全週数で 6 点以下を示した。以上より本研究では FIZ score 6 点以上を陽性として検討を行った。また、FIZ score 測定値群間の比較において、切迫早産治療群の平均値 6.60 および未治療群の平均値 10.12 は、妊娠 22-35 週の正常群の平均値 4.42 に比べ明らかに高値を示すことから、やはりその境界は 6 点から 10 点の間に設定することが妥当であると思われた。しかし、現在のところは切迫早産

群の症例が43症例と少ないため、今後さらに症例数を増やし FIZ score の陽性とする最適な score 値を検討する余地があると思われる。さらに FIZ をもちいて MMP 活性を画像解析により定量的に取り扱った報告もあり¹⁸⁾、今後この方法も検討の余地があると考えている。

正常妊娠経過の妊娠初期および妊娠満期の症例において FIZ score が高値を示すことに関しては、以下のことが考えられた。まず妊娠初期には子宮筋層に syncytiotrophoblast が浸潤し、胎盤を形成するが、この際ゼラチナーゼが著明に産生されることが報告¹⁹⁾されており、これがゼラチナーゼ活性上昇の一因と考えられる²⁰⁾。一方妊娠満期のゼラチナーゼ活性の上昇は子宮頸管の物理的開大による炎症が原因と考えられる。炎症が発生すると、組織中のマクロファージや線維芽細胞がさまざまな炎症性サイトカインを産生し、その刺激によってゼラチナーゼや遊走してきた好中球が放出する顆粒球エラスターゼが活性化し、卵膜を構成しているコラーゲンなどの細胞外マトリックスが分解される⁵⁾⁶⁾¹³⁾。陣痛が起こると、さらにこれらに拍車がかかり、著明なゼラチナーゼの活性化が起こるものと推測される。

今回の実験結果から卵膜の破綻には、ゼラチナーゼの活性化、特に MMP-2 の活性化が強く関与してることが示唆された。文献的にもゼラチナーゼが破水の原因として関与するとの報告²¹⁻²⁴⁾ も多いが、これまでの方法では実際の活性を捉えることが難しいため、その主導権を MMP-2、MMP-9 のいずれかが握っているかは意見の分かれるところであった。この点で FIZ は、実際の活性を正確に捉えることが可能であるため有効な手法と考える。しかし、今回は、標本作製の関係上その検索が行えなかったため、今後是非検討すべき課題と考えている。

FIZ 施行時における false positive の要因として、出血や膣部の感染によるものが挙げられる。これらについては切迫流早産の兆候および原因のひとつであるため、たとえ false positive であったとしても、臨床症状を優先して直ちに切迫流早産の治療を行ってよいと考える。一方、切迫早産群に安静、tocolysis、抗生剤などの治療を行うと、一度上昇した FIZ score の低下、すなわちゼラチナーゼ活性の低下を認めた。これにより FIZ は切迫早産の治療効果の判定に使用できる可能性²⁵⁾ が示唆された。

FIZ score とエラスターゼ値との比較において $r =$

0.7166 と相関を認めた。このことは前述した切迫早産の原因、危険因子の第一とされている絨毛膜羊膜炎などによる炎症により種々の炎症性サイトカインネットワークがで上がり、エラスターゼ、ゼラチナーゼ (MMP-2、MMP-9) などが産生、活性化する機序¹⁾⁵⁾⁶⁾²⁶⁾²⁷⁾ を考えると当然のことかもしれない。

今後の課題として、切迫早産症例をさらに増やすとともに、症例確保に困難であるが、切迫早産の未治療群のゼラチナーゼ活性の推移を経時的に測定し、tocolysis 施行群との比較を行うことができれば、さらに FIZ によるゼラチナーゼ活性の測定の有用性が向上すると考えている。これに加えて切迫流早産によく見られる、出血している条件下や膣内細菌が増殖している場合は、理論上ゼラチナーゼ活性が上昇するはずである。このことが FIZ の結果にどのように影響を与えているか、さらなる検討を加えていかなければならない。

FIZ はゼラチナーゼ活性を半定量し、絨毛膜羊膜炎に起因する頸管局所の炎症を評価できる、簡便でかつ安価な検査である。切迫早産の状態を把握するために、内診所見等の現症に加えて頸管粘液エラスターゼ等の臨床検査の一つとして、FIZ は有用性があることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、FIZ の作成に携わり、本研究に多大なる助言をいただいた富士写真フィルム株式会社足柄研究所主任研究員、根守良一氏ならびに当教室研究室実験助手、樋熊千夏氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 平野秀人：前期破水と早産。佐藤 章、中野 仁雄編、メジカルビュー社、p 36-43, 1996
- 2) Ekwo EE, Gosselink CA, Woolson R, Moawad A : Risks for premature rupture of amniotic membranes. *International Journal of Epidemiology* **22** : 495-503, 1993
- 3) Gosselink CA, Ekwo EE, Woolson RF, Moawad A, Long CR : A dequacy of prenatal care and risk of preterm rupture of amniotic sac membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* **72** : 443-449, 1993
- 4) Ekwo EE : Previous pregnancy outcomes and subsequent risk of preterm rupture of amniotic sac membranes. *Br J Obstet Gynecol* **100** : 536-541, 1993
- 5) 金山尚裕：preterm PROM の病因とその機序。産科

- と婦人科 **7**: 941-946, 1995
- 6) 宗 恒雄: 前期破水におけるマトリックス・メタロプロテアーゼの役割。日本産科婦人科学会雑誌 **45**: 227-233, 1993
 - 7) Denis S, Hong W, Ylva SV, Gunvor HE, Lena S: Increased level of matrix metalloproteinase 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* **67**: 889-894, 2002
 - 8) Neil A, Samuel SE, Roberto R, Ricardo G, Eli M, Percy P, Ramkumar M: A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* **179**: 1248-1253, 1998
 - 9) Kanayama N, Terao T: The relationship between granulocyte elastase-like activity of cervical mucus and cervical maturation. *Acta Obstet Gynecol Scand* **70**: 29-34, 1991
 - 10) Stephen JF, Salvatore JL, Ramkumar M: Racial disparity in membrane response to infectious stimuli: A possible explanation for observed differences in the incidence of prematurity. *Am J Obstet Gynecol* **190**: 1557-63, 2004
 - 11) Stephen JF, Salvatore JL, Ramkumar M: Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* **184**: 1399-1406, 2001
 - 12) Eli M, Roberto R, Percy P, Maria TG, Ricardo G, Samuel S.E, Bo Hyun Yoon: Evidence of *in vivo* differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* **183**: 887-894, 2000
 - 13) Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, Seiki M, Okada Y: Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol* **154**: 417-28, 1999
 - 14) 根守良一、立川哲彦: 組織培養工学 **25**: 29, 1999
 - 15) Naja B, Merete Hein, Carl CD, Niels U: Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **191**: 1232-1239, 2004
 - 16) Stephen JF, Ramkumar M, Salvatore JL: Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* **187**: 1159-1162, 2002
 - 17) Stephen JF, Ramkumar M, Salvatore JL: MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* **27**: 362-368, 1999
 - 18) Minoru I, Ryuji M, Hidekazu T, Mitsunobu M, Yukihiro T, Yutaka T, Ryouichi N, Tkayuki Y: Inhibition of gelatinolytic activity in tumor tissues by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor: application of film *in situ* zymography. *Clin Cancer Res* **6**: 3290-3296, 2000
 - 19) Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M: Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* **24**: 53-64, 2003
 - 20) 伊東宏絵、井坂恵一、臼田三郎、高山雅臣: 子宮筋症における子宮内膜の侵入とゼラチナーゼ(MMP-2、MMP-9)との関連性についての検討日本産科婦人科学会雑誌 **52**: 795-802, 2000
 - 21) Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon BH, Edwin S, Mazor M, Maymon E, Berry S: Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* **187**: 1125-1130, 2002
 - 22) Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim JC, Yoon BH, Menon R, Fortunato S, Berry SM: A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *J Perinat Med* **29**: 308-316, 2001
 - 23) Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon R: A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* **179**: 1248-1253, 1998
 - 24) Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH: Evidence of *in vivo* differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* **183**: 887-894, 2000
 - 25) Ulun U, Shlomit G, Izhar BS, Eliezer S: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP, in human term deciduas and fetal membranes: the effect of prostaglandin F 2α and indomethacin. *Mol Hum Reprod* **12**: 1187-1193, 2001
 - 26) Charles JL, Andrew ES, Renate D, David C, Kumudini DS, Swan NT, Lynn J, Liane D, Thomas JG: Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med* **325**: 669-674, 1991
 - 27) Ping X, Nadia A, John RGC: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 1353-1361, 2002

Detection of gelatinase activity in cervical exfoliated cells from pregnant women using Film *in situ* Zymography (FIZ)

Atsushi NAGAI, Keiichi ISAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical University

Abstract

We attempt to examine gelatinase activity in the cervical exfoliated cells and mucous fluids from pregnant women as a predictable marker for local inflammation.

The samples were collected from 160 normal pregnant women and 43 women who were classified as premature labor in Tokyo Medical University Hospital from May 2001 to February 2005 after obtaining the informed consent. Gelatinase activity was detected by using FIZ. MMP-2 and MMP-9 were measured by ELISA. The preliminary experiments were also done using fetal membranes and cervical mucous fluids.

Our data showed the successful detection of gelatinase activity in fetal membranes and cervical exfoliated cells from pregnant women. Women with premature labor expressed especially higher rates of gelatinase activity than normal pregnant women. It was suggested that gelatinase activity was related to rupture of fetal membranes. Also these results indicate that FIZ may be one of the useful tools to detect premature labor.

〈Key words〉 Gelatinase, MMP-2, MMP-9, Premature labor, Chorioamnionitis
