

未固定組織凍結法による妊娠中毒症胎盤絨毛の 毛細血管内皮細胞の超微形態学的研究

埼玉医科大学産婦人科学教室（主任：畑 俊夫教授）

田 中 敏 幸

An Ultrastructural Study of Capillary Endothelial Cells in Toxemic Placental Villi Using a Quick Quenching Method

Toshiyuki TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical School, Saitama

(Director : Prof. Toshio Hata)

概要 妊娠中毒症胎盤の胎児毛細血管内皮細胞の病態生理を検討する目的で、正常妊娠5例と重症妊娠中毒症（H型）10例の娩出胎盤を使用し、未固定組織凍結法・凍結置換法にて処理した絨毛の胎盤関門部を透過型電子顕微鏡を使つて検索した。また、カテコールアミン溶液に incubate した正常妊娠絨毛組織の毛細血管内皮細胞の運動性を観察し、比較検討した。

1) 正常妊娠胎盤では、毛細血管内皮細胞はほぼ一様の厚さを有し、小器官は細胞質内に均等に分布していた。また、カテコールアミン溶液に incubate すると、6nm の直径を有するアクチンと思われる filament が細胞質内に多量に析出し、その部の細胞質がこぶ状に血管内腔に向かつて突出していた。

2) 妊娠中毒症胎盤では、毛細血管内皮細胞の厚さは一様でなく、同一血管内の隣合わせの内皮細胞でも同じ内皮細胞でも部位によつては凹凸不整で、その細胞質の突出は不規則であつた。また内皮細胞内の小器官の分布は均等ではなく、10nm の直径を有する microfilament が密な束状に増生していた。その増生部はまず血管内腔側に発生し、増加するとその部の小器官が消失し結合繊側にまで細胞質全体にわたり占拠するようになっていた。とくに子宮内胎児発育遅延（以下 IUGR）を伴つた妊娠中毒症症例の胎盤では、その増生部が広範におよんだ内皮細胞を有する毛細血管が増加し、その毛細血管はあたかも動きのない鑄型となつている感を呈するほどであつた。

3) 物質の生物学的輸送能力を表現する pinocytosis は、小器官の発達している部の細胞膜に、小器官の発達の度合と平行して認められた。したがつて、正常妊娠胎盤の毛細血管内皮細胞膜には pinocytotic vesicle が多量に存在していた。妊娠中毒症胎盤の毛細血管内皮細胞では、microfilament が増生し、小器官が消失している部があり、その部の細胞膜には pinocytotic vesicle はほとんどみられず、増生部が拡大するにしたがつて絨毛全体の物質輸送能力が多量の影響を受けている可能性が示唆された。

Synopsis The pathophysiological phenomena of placental microcirculation in cases of toxemia of pregnancy were studied. Fetal capillary endothelial cells, which were constituents of placental barrier, in chorionic villi from 5 normal and 10 toxemic pregnancies were ultrastructurally observed. The small pieces of tissue were prepared by a quick quenching & freeze substitution method, immediately after removal or after incubation in cathecolamine solution.

1) In normal placentae, the thickness of the endothelial cells was uniform, and so was the distribution of cytoplasmic organelles. After incubation in cathecolamine solution, endothelial cytoplasm partly protruded towards the capillary lumen, forming humps, which contained plenty of 6nm diameter filaments which were thought to be actin filaments.

2) In toxemic placentae, 10nm diameter filaments increase to form bundles in endothelial cytoplasm. No cytoplasmic organelles were found here. Especially in placentae from severe toxemic pregnancies with IUGR, the augmentation of these filaments was so pronounced that the capillaries seemed as if they were solid molds, and it is possible that the blood flow is disturbed in these capillaries.

3) The endothelial cells occupied by bundles of filaments contained almost no organelles or pinocytotic vesicles. This fact suggests that the quantity of filaments affects the ability to actively transport the substances of mother and fetus.

Key words: Toxemic pregnancy・Placenta・Capillary・Quick quenching method・Ultrastructure

緒 言

胎児の発育につれて、子宮動脈から絨毛間腔への血液の流入量は増し、胎盤絨毛は量的・機能的に変化する。それらの変化は胎児の発育度合とほぼ一致して起こっている。

妊娠中毒症では、母体の血行動態異常の一環として起こる絨毛間腔への血流障害と、胎盤の量的・機能的障害が起こることは想像にかたくない。その内、胎盤は肉眼的に梗塞や石灰沈着の増加を起こしており、光学顕微鏡的にフィブリン沈着や絨毛壊死が少なからず認められる。これらの所見は、胎盤内血流障害を強く示唆する所見を多く含んでいるが、その血流に着目した研究は主に臍帯動脈や分枝した太い動脈の変化についてであり¹⁴⁾、胎盤関門を構成する毛細血管の変化に関しては、単に毛細血管の形にとらわれた研究がなされているのみで、その血流障害を起こす機序に着目した形態学的研究はほとんどみられない。形態学的に検索した報告の内、胎盤関門を構成している毛細血管が拡張しているとするものや収縮しているとするものがあり、一致した見解が得られていない。一般に、形態学的方法で胎盤を検索する時、ホルマリンやグルタルアルデハイドで固定をするが、その固定操作によつて絨毛組織が強く収縮をきたし、生体内の像とかけ離れた像を示すことは肉眼的にも常に経験するところであり³⁾、妊娠中毒症における絨毛毛細血管の真の異常変化をみることは困難である。

また、胎児の発育に関係する毛細血管内皮細胞の生物学的輸送手段を表現する pinocytotic vesicle についての詳細な報告は少ない。

以上の観点より、今回、胎盤関門部の毛細血管血流と生物学的輸送に着目し、一般固定液を使わず、組織を生体内の姿により近い像にとどめるため、凍結固定によつて組織を処理した。そして、主として毛細血管内皮細胞の動きと pinocytotic vesicle の出現状態につき超微形態学的に観察した。

材料および方法

正常妊娠正期産胎盤5例、重症高血圧を伴った妊娠中毒症(H型)症例10例(その内7例にIUGRを伴っている)の胎盤につき以下のごとく検討した。娩出された胎盤の中央部に近い、肉眼的に最も異常の少ない部から小片を採取し、実体顕微鏡下で胎盤基底板に近い末梢の絨毛を取りだし検索材料とした。

① 新鮮な絨毛片の一部を、Hata et al.⁹⁾の開発した未固定組織凍結機によりただちに急速凍結固定した。凍結組織をあらかじめ -80°C に冷却された4%オスミウム酸含有アセトン液に入れ、 -80°C 3日間、 -20°C 2時間、 4°C 2時間、常温1時間静置して凍結置換し、エポンに包埋した。準超薄切片をトリイジンブルーにて染色し、光学顕微鏡で凍結効果のよい胎盤関門部を確認してトリミングを行い超薄切片を作成した。その超薄切片をウラン・鉛二重染色し、日本電子100C電子顕微鏡にて観察した。

② 正常妊娠正期産胎盤の絨毛の一部を、血管収縮時の微細変化を観察する目的で、Lederman et al.¹³⁾が測定した子宮口全開大時の血中アドレナリン72pg/ml、ノルアドレナリン510pg/mlの濃度のカテコールアミンを含有するリンゲル液に15分間 incubate し、①と同様の組織処理を行い電子顕微鏡観察を行つた。また、試みにその10倍濃度のカテコールアミン溶液に incubate し、観察検討した。

結 果

①毛細血管内皮細胞の形について

正常妊娠胎盤では、血管内腔は円形からほぼ橢円形でその細胞膜はわずかに凹凸不整を有するが丸みをもっている。また、内皮細胞の厚さはほぼ均等である(写真1)。しかし、カテコールアミンによる収縮実験においては血管内腔は狭小化しこぶ状に突出した収縮像を示すことがある。一方、妊娠中毒症胎盤では、毛細血管内皮細胞は菲薄化し一般に拡張しているが、血管によつては細胞質の厚いところや薄いところが不規則に混じり合

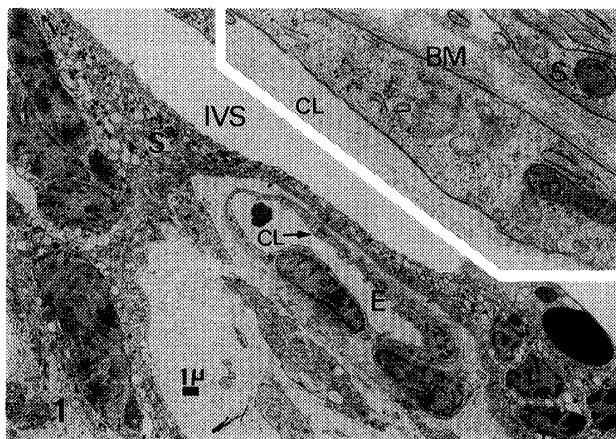


写真1 正常妊娠胎盤絨毛の胎盤関門を示す。その毛細血管内皮細胞は、核を有する部以外の厚さはほぼ均等であり、ミトコンドリアや粗面小胞体やfree ribosomeなどの小器官が細胞質内に均等に分布している。矢印の部を拡大するとinsetのごとく多量のpinocytotic vesicleが認められ、細胞内microfilamentは極少量認められるにすぎない。

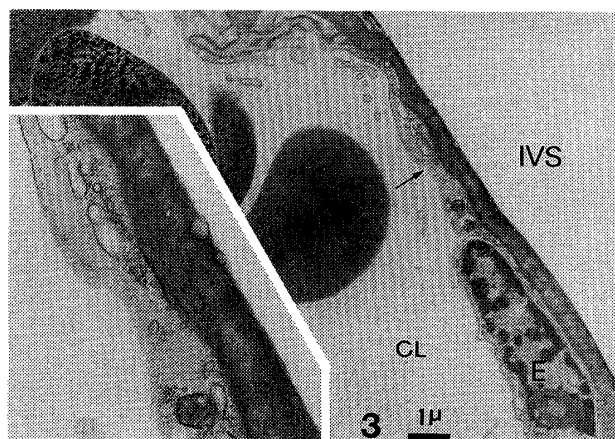


写真3 重症妊娠中毒症(H型)の胎盤。胎盤関門を構成する毛細血管内皮細胞は絨毛細胞側ならびに血管内腔に向かってwavingを示しており、細胞内小器官は減少している。矢印の部を拡大するとinsetのごとく小器官にかわって10nmの直径を有するmicrofilamentが多量に増生し、一部では束状になって細胞膜に平行して走り、一部では細胞膜に直角に走っていた。pinocytotic vesicleは存在するが、血管内腔側のfilamentが増生した部ではその数は正常胎盤に比し少ない。

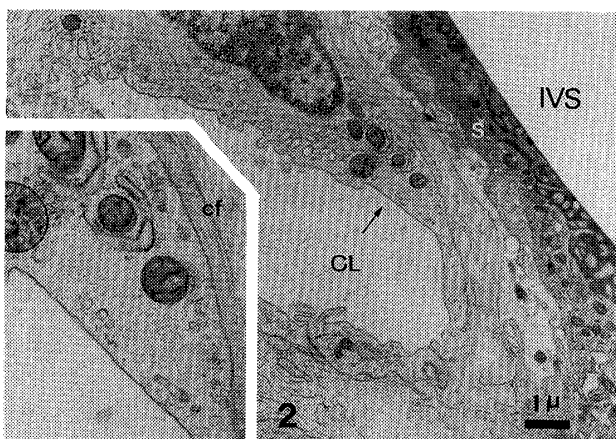


写真2 重症妊娠中毒症(H型)の胎盤。胎盤関門を構成する毛細血管を示す。内皮細胞の厚さは部位により異なり、細胞膜はふくらみをもつたり直線であつたりしており一定ではない。また、小器官の分布も均等でなく、10nmのmicrofilamentが増生している部には小器官は認められない。また、矢印で示すごとく細胞膜が直線的になつている部では、filamentの増生は強くそのfilamentの走行は一致して細胞膜にほぼ直角であつた(inset)。

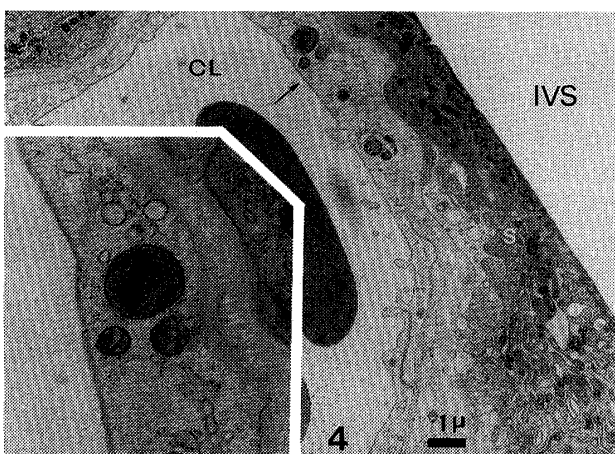


写真4 重症妊娠中毒症(H型)の胎盤。胎盤関門を形成し中等度拡張した毛細血管内皮細胞は、絨毛細胞に向かって凹凸不整であり、その凹凸不整とあいまって絨毛細胞も凹凸不整となつている。しかしながら、血管内腔側の細胞膜はほぼ平坦である。矢印の部を拡大するとinsetのごとく血管内腔に面する平坦な細胞膜の直上に走行が乱れた直径10nmのmicrofilamentが増生して認められる。その部のpinocytotic vesicleはきわめて減少している。しかしながら、圧排されつつも小器官が多量に存在する絨毛細胞側の細胞膜には、pinocytotic vesicleが多量に存在する。

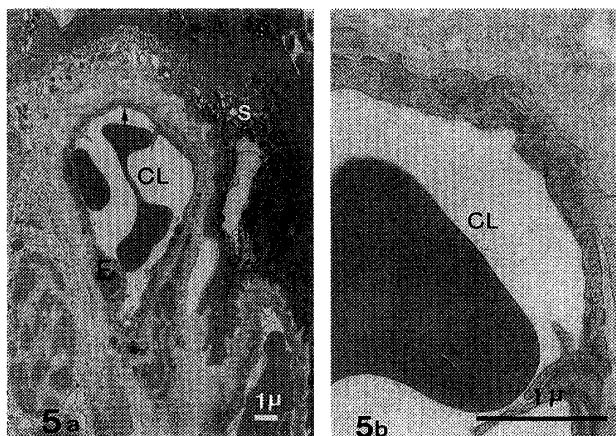


写真5 5aは妊娠中毒症(H型)のIUGRを伴った症例の絨毛を示す。胎盤関門を形成する毛細血管はやや拡張しており、内皮細胞は全体に薄い細胞膜は不規則な凹凸不整を示している。矢印で示した部分を拡大すると、5bのごとくわずかに free ribosome が認められるのみで小器官はほとんどなく、そのかわりに細胞質は直径10nmのmicrofilamentで占められている。同部では pinocytotic vesicle は、絨毛細胞側・血管内腔側ともにほとんど認められない。

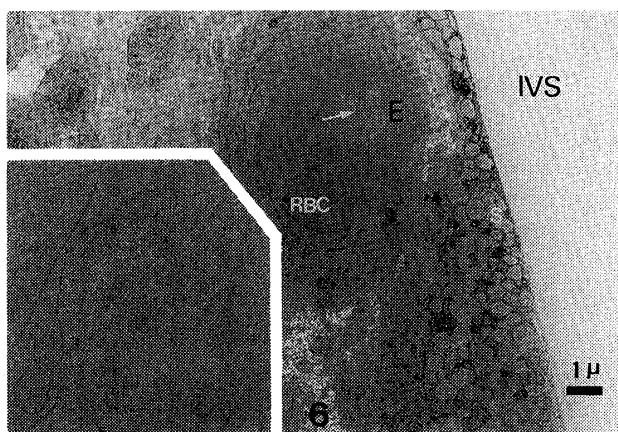


写真6 子宮口10cm開大時の平均的血中カテコールアミン濃度を有する溶液に15分間 incubate した正常妊娠胎盤。胎盤関門を形成する毛細血管の内腔はやや狭小化しており内皮細胞の厚さは不整である。小器官の分布は均等であり、絨毛細胞側・血管内腔側ともに pinocytotic vesicle は中等量認められる。しかしながら、一部にこぶ状に腫大した部を認め、その部を拡大すると inset のごとく6nmの直径を有する filament が多量に出現していた。その部の細胞膜にも pinocytotic vesicle が中等量認められた。

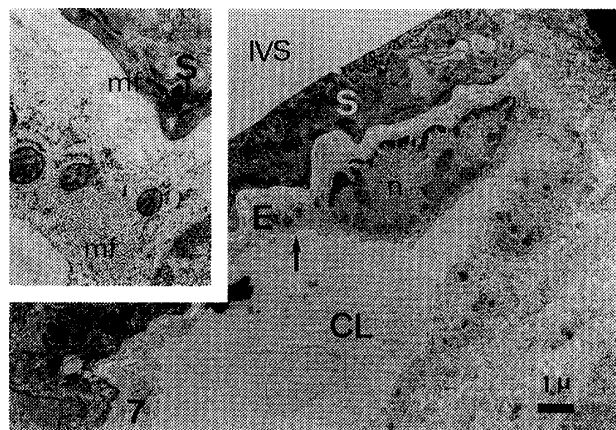


写真7 子宮口全開大時の平均的血中カテコールアミン濃度の10倍の濃度を有する液に15分間 incubate した正常胎盤。胎盤関門を形成する毛細血管内皮細胞の細胞膜は、絨毛細胞側に向かつて大きく waving をおこし、それに伴い絨毛細胞も waving を形成している。血管内腔側の細胞膜は細かく不規則に血管内腔に向かつて突出している部分が多く存在していた。細胞質全体に小器官はほぼ一様に分布していたが、絨毛細胞側・血管内腔側ともに細胞膜には pinocytotic vesicle がほとんど認められなかった。絨毛細胞とともに waving を形成している部(矢印)を拡大すると inset のごとくミトコンドリアや rER などの小器官の間に多量の microfilament が出現していた。その microfilament は主に10nmの直径を有する中間大 filament であるが、その filament に混じって少なからず6nmの直径を有する filament も認めることができた。

Abbreviation

- IVS : inter villous space
- CL : capillary lumen
- S : syncytial cell
- E : endothelial cell
- BM : basement membrane
- RBC : red blood cell
- cf : collagen fiber
- n : nucleus
- m : mitochondria
- mf : microfilament

い、血管内腔が拡張していないものもあつて一定していない。IUGRを伴わない妊娠中毒症症例の毛細血管内皮細胞の多くは、一部の細胞膜が不自然に直線状に変化している部や(写真2), ゆるやかに waving する部や強く waving を示す部を有している。その waving に伴つて絨毛細胞も waving を起こしているところもあつた(写真3, 4)。興味ある所見として、子宮口全開大時のカテコールアミンの10倍濃度の溶液に15分間 incubate すると、毛細血管内皮細胞と絨毛細胞は強く waving を示し、妊娠中毒症胎盤の上記所見にきわめて類似した像を認めることができた。IUGRを伴つた症例では、不規則に鋭角に細胞質が血管内腔側や結合織側に突出している部が多く、その部では絨毛細胞が waving を形成していても、毛細血管内皮細胞はそれに伴つた waving を形成していることは少なかつた(写真5a, 5b)。

② 毛細血管内皮細胞の細胞内小器官の分布について

正常妊娠胎盤ではミトコンドリア、粗面小胞体(以下 rER と略), pinocytotic vesicle, free ribosome, ゴルジ装置等の細胞内小器官は核周囲に多いものの、核周囲以外の部でも一様に分布しておりとくに前三者は比較的多く認められる。

一方、妊娠中毒症胎盤では核周囲にはミトコンドリア、rER 等が中等量存在するが、核から離れた細胞質ではわずかな free ribosome 以外まったく認められない部分もある。IUGRを伴つた症例では小器官の消失している部分はきわめて広範囲に達している傾向がみられた。

特徴的な所見として pinocytotic vesicle は、正常妊娠胎盤では絨毛細胞側・血管内腔側ともに多数認められるのに反し、妊娠中毒症胎盤では減少していた。しかしながら妊娠中毒症胎盤でも細胞内小器官(とくにミトコンドリア、rER)の存在する部では中等量認めることができた。とくに IUGR を伴つた胎盤絨毛の細胞内小器官が広範囲にわたつて消失している部分ではまったくといっていいほど pinocytotic vesicle は認められなかつた。

また、正常妊娠胎盤を子宮口全開大時の平均的

カテコールアミン濃度の溶液に15分間 incubate した時に認められた毛細血管内皮細胞のこぶ状の突出部では、細胞内小器官は消失することなく存在し pinocytotic vesicle も中等量認められた(写真6)。そのカテコールアミンの10倍濃度の溶液に15分間 incubate した正常絨毛では細胞内小器官の分布はほぼ一様であるが、pinocytotic vesicle はほとんど認められなかつた(写真7)。

③ microfilament の種類とその増生について

正常妊娠胎盤では直径10nm の中間大 filament はわずかに細胞質のところどころに認められるにすぎなかつた。また直径6nm の microfilament もほとんど認めることはできなかつた。しかしながら、カテコールアミン溶液に incubate された絨毛の細胞質のこぶ状突出部に直径6nm の microfilament が多量に出現し、そのほとんどの filament の方向は血管内腔に向かつてほぼ直角に互いに平行して走行していた(写真6)。その10倍濃度のカテコールアミン溶液に15分間 incubate すると、絨毛細胞とともに強い waving を形成した毛細血管内皮細胞に多量の microfilament が増生していた。その microfilament は主に10nm の直径を有する中間大 filament であるが、その filament に混じつて直径6nm の filament も少なからず認めることができた(写真7)。

一方、妊娠中毒症胎盤では、正常妊娠胎盤の毛細血管内皮細胞にみられるゆるやかな凹凸不整を示す部ではあまり出現しない直径10nm の filament が、細胞膜が直線的であつたり不規則に凹凸不整であつたり鋭角に突出していたりする部では、集団をなして出現していた。たとえば、細胞膜が直線的になつている部では、細胞膜に直角に集団をなして走行しており(写真2), ゆるやかな waving を示す部では、集団をなして細胞膜に直角または平行して走行していた(写真3)。絨毛細胞とともに強い waving を起こしている部ではその走行は乱れていた(写真4)。

考 案

正常妊娠胎盤の毛細血管内皮細胞は、血管によつてほぼ一定の厚さで存在している。一般に、生体内の毛細血管内皮細胞にアクチンが存在するこ

とはよく知られているが、絨毛の毛細血管内皮細胞に、アクチンによる収縮性が存在するか否かは不明である。そこで試みに正常絨毛をカテコールアミン溶液に incubate してみると直径6nmの filament を多数析出し、細胞質がこぶ状に血管内腔に向かつて突出してきた。この filament の直径は6nm であるので、その filament はアクチンであると考えられる。細胞質がこぶ状に突出したことはアクチンの作用により収縮したものと思われる。すなわち、正常妊娠胎盤の毛細血管内皮細胞は、体内で収縮物質の影響により収縮・弛緩を繰り返していることが強く示唆される。もし、この収縮・弛緩が生理的になされているとしたら、この内皮細胞の運動は毛細血管内の血流を、より smooth にするように働いているのであろう。近年、超音波断層法の進歩によつて、胎盤に血液を送る臍帯血管の血管内抵抗が増加している可能性が強く示唆される結果を得るに至っている¹⁴⁾。しかし、胎盤内末梢絨毛の毛細血管における血管内抵抗についての報告はほとんどない。そこで、従来からその毛細血管の血流障害の間接的な証明法の一つとして、形態学的変化を観察した発表がなされている。しかし、その発表の内でも内皮細胞の腫大と血管内腔の狭小化が顕著であるとする発表や^{1)2)5)6)10)~12)}、肥厚はしてなく血管内腔が拡張しているとする発表⁴⁾⁸⁾¹⁵⁾とがあり、まったく相反する所見が発表されているのが現状で、その毛細血管の血流の障害について言及することはできない。われわれの検索では、従来の固定・脱水の組織処理をした組織では、光顕的にみても電顕的にみても絨毛によつては毛細血管内皮細胞が肥厚している部と菲薄化している部とがみられ、どちらが主であるとも言いがたい。そこで、生体内の像により近い像をとらえるために行つた本研究から毛細血管内皮細胞は、妊娠中毒症胎盤では同じ血管の隣り合わせの内皮細胞でも同一の内皮細胞でも菲薄化したり肥厚している部分があり、正常妊娠胎盤にみられるほぼ一様の厚さで存在する内皮細胞とでは趣を異にしている。内皮細胞の肥厚は、microfilament が局部的に増生し周囲に小器官が追いやられている部や小器官が集合している部で

よく認められた。また内皮細胞の菲薄化は、microfilament で完全に占められ小器官が消滅してしまつている部であるとか、わずかな小器官が存在している部によく認められた。これらのことから、一概に肥厚しているから血流が障害されるであろうとか、菲薄化しているから血管は拡張し、血流が順調になされているとか、またうづ血しているとか言うことはできない。この microfilament は直径10nm で、中間大 filament であり、渡辺ら⁷⁾は免疫組織化学的にこの内皮細胞には中間大 filament としてビメンチンのみが存在することを証明していることから、ビメンチンである可能性が強く、直接的に収縮・弛緩を招来させるとは考えられない。むしろ細胞の形態を一定化させる方向に働いていると思われる。とくに、妊娠中毒症胎盤でこの filament が増加することは、正常妊娠でみられるような制御された収縮・弛緩は起こりがたいと考えられる。著者が認めた毛細血管内皮細胞の広範囲にわたる microfilament の増生した部では、まったく小器官は存在せず菲薄化しており、あたかも鋳型になつたような感を呈し、その部での収縮・弛緩は不可能に近いと考える。以上のことから、妊娠中毒症胎盤の多くの絨毛毛細血管は、調和がとれた収縮・弛緩が強く障害されて血管内抵抗は上昇し、そのような血管が増加すればする程、胎盤内の血流が障害される程度も強くなる可能性が示唆された。

正常妊娠胎盤の毛細血管内皮細胞では絨毛細胞側と血管内腔側に多量の pinocytotic vesicle が認められることはすでに報告されている¹⁾が、妊娠中毒症胎盤の内皮細胞における出現状況についてはほとんど報告がない。著者の検索結果では、妊娠中毒症胎盤の内皮細胞には、正常妊娠胎盤の量と同様の量を認める部とほとんど認めない部とがある。その認める部では細胞膜直下の細胞質にミトコンドリアや rER や free ribosome が常に存在していた。一方、認めない部では、10nm の直径を有する microfilament が増加し、小器官を消失させてしまつているという超微形態学的特徴を持つていた。この microfilament は毛細血管内皮

細胞の内腔側に発生し始め、増加すると細胞質全体を占領するようになる。一般に pinocytosis は、IgG などの大分子を輸送する生物学的輸送機能を表しているとされ、細胞のエネルギーを充分必要としている。すなわち、microfilament が増生した部では、pinocytosis は極端に減少し、生物学的輸送能力がきわめて低下していることは容易に理解できる。さらにまた、小器官が増生した microfilament によつて消失させられてしまったような毛細血管では、エネルギーを必要とする他の輸送方法（とくに能動輸送）も障害されていることが考えられる。すなわち、IUGR の発生に胎盤因子が加わっているものとすれば、この microfilament の増生の度合は重要な意味を持つものと言わざるを得ない。

また、正常妊娠胎盤の絨毛でも、高濃度のカテコールアミン溶液に incubate されると、pinocytotic vesicle が減少したが、カテコールアミンの物質輸送に対する影響については今後さらに検討したい。

稿を終えるにあたり、終始ご指導を賜りました畑 俊夫教授に衷心より感謝いたします。

本論文の要旨は、The 17th Meeting of Organization Gestosis. International Symposium on Perinatal Care and Gestosis: Sendai (1985) と、第38回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

1. 足高善雄, 奥平美奈子, 早川謙一, 橋本隆史, 奥平吉雄: 人胎盤の電子顕微鏡による微細構造. 臨産, 20: 951, 1966.
2. 福田 透, 平林稔之, 塚原嘉治, 横西清次, 中村正雄: 中毒症胎盤の超微細構造. 産と婦, 50: 595, 1983.
3. 畑 俊夫: 超微形態学的研究への急速凍結法の応用. 埼玉医大誌, 15: 199, 1988.
4. 広沢豊彦: 人胎盤絨毛の電顕像. 山口医学, 24: 95, 1975.
5. 相馬廣明, 吉田啓治, 田淵保己, 鈴木康伸, 矢口誠一: 胎盤. 産と婦, 50: 1074, 1983.
6. 田淵保己: 重症妊娠中毒症胎盤の病理学的観察—特に胎盤床血管の変化を中心として—. 東医大誌, 41: 681, 1983.
7. 渡辺芳明, 平野正子, 飯田幸雄, 近藤俊吾, 疋田美直, 畑 俊夫, 川田 晃: 絨毛内胎児毛細血管内皮細胞のマイクロフィラメントの存在意義について. 日産婦誌, 40: S-276, 1988.
8. 渡辺行正: 胎盤と胎児発育の関連性について. 産婦の世界, 12: 1120, 1960.
9. Hata, T., Yajima, G., Suzuki, K., Sato, S. and Shirai, F.: Application of a new quick quenching of unfixed tissue and freeze substitution for clinical morphology. J. Clin. Electron Microscopy, 15: 53, 1982.
10. Jiang, L.L., Luo, Y.Y., Xia, Y.Y. and Yan, Y. B.: Ultrastructure findings in pre-eclamptic placentas. Chinese Medical J., 97: 825, 1984.
11. Jones, C.J.P. and Fox, H.: An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. Placenta, 1: 61, 1980.
12. Jones, C.J.P. and Fox, H.: An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal essential hypertension. Placenta, 2: 193, 1981.
13. Lederman, R.P., McCann, D.S., Work, B. and Huber, M.J.: Endogenous plasma epinephrine and norepinephrine in last-trimester pregnancy and labor. Am. J. Obstet. Gynecol., 129: 5, 1977.
14. McCowan, L.M., Mullen, B.M. and Ritchie, K.: Umbilical artery flow velocity waveforms and the placental vascular bed. Am. J. Obstet. Gynecol., 157: 900, 1987.
15. Risteli, J., Foidart, J.M., Risteli, L., Boniver, J. and Goffinet, G.: The basement membrane proteins laminin and type IV collagen in isolated villi in pre-eclampsia. Placenta, 5: 541, 1984.

(No. 6397 昭63・7・5受付)