

妊娠および分娩時における Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 動態の研究

富山医科薬科大学医学部産婦人科教室 (主任：泉 陸一教授)

副 田 善 勝

A Study on Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) during Pregnancy and at Delivery

Yoshikatsu SOEDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

(Director : Prof. Rikuichi Izumi)

概要 前期破水の機序の一つとして、卵膜を構成するコラーゲンの変化が考えられている。matrix metalloproteinases (MMPs) の inhibitor としてコラーゲン代謝に深く関与している tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 (以下 TIMP と略す) が、妊娠時どのような動態を示し、また、前期破水の機序にどう関わっているかを検討した。

1. 妊娠14・15週 (I 群, n=122), 妊娠25・26週 (II 群, n=186), 妊娠30・31週 (III 群, n=196), 妊娠35・36週 (IV 群, n=214) の血清 TIMP 濃度は、それぞれ、 150 ± 32 , 139 ± 30 , 145 ± 26 , 149 ± 33 ng/ml (Mean $\pm$ SD 以下同じ) であった。I 群, III 群, IV 群では、健常非妊婦 (155 ± 31 ng/ml, n=112) と有意差を認めなかった。II 群の血清 TIMP 濃度は、I 群および IV 群との間に有意 ($p < 0.05$) な低下を認めた。早産例 (n=4) および前期破水例 (n=9) では、いずれの症例においても、血清 TIMP 濃度の推移に異常を認めなかった。

2. 羊水中 TIMP 濃度は 754 ± 325 ng/ml (n=26) と、母体血清と比して著しい高値を示した。なお、妊娠週数との間に相関を認めなかった。

3. 分娩時において、羊水中 TIMP 濃度 (775 ± 312 ng/ml, n=20) は、母体血清 (155 ± 21 ng/ml, n=25) や臍帯静脈血清 (160 ± 38 ng/ml, n=18) に比して有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。しかし新生児の初回尿中には TIMP は検出されなかった。

4. 14例の卵膜において、羊膜および絨毛膜組織中 TIMP 濃度は、それぞれ、 84 ± 53 , 48 ± 22 ng/mg protein であった。在胎15週と21週の胎児皮膚と肺の組織中には TIMP は検出されなかった。

5. 免疫組織化学的検討では、羊膜上皮細胞、羊膜線維芽細胞、絨毛膜細胞および脱落膜層内の細胞に TIMP の局在を認めた。

以上の成績より、羊水中 TIMP は卵膜由来と考えられ、卵膜組織に存在する TIMP が MMPs 活性の調節を介して、卵膜の脆弱化・破綻の防止に働いていることが示唆された。

Synopsis Metabolism of collagen in the fetal membrane has been proposed as one of causes of premature rupture of the membrane (PROM). It mainly depends on the activities of MMPs and their inhibitor, TIMP. The concentration and localization of TIMP in various body fluids and the tissue of perinatal patients was explored.

1. The TIMP concentration in maternal serum did not show any significant changes during pregnancy, and it was not significantly different from that in non-pregnant serum. In cases of PROM (n=9) and premature labor (n=4), there were no differences in the serum levels of TIMP.

2. The mean TIMP value in amniotic fluid was 754 ± 325 ng/ml. There was no correlation between TIMP and gestational weeks.

3. The level of TIMP at delivery in amniotic fluid was significantly ($p < 0.01$) higher than that in maternal serum and umbilical serum, but it was not detected in neonatal first voided urine.

4. The mean TIMP values in amnion and chorion were 84 ± 53 and 48 ± 22 ng/mg protein respectively, but

it was not detected in fetal lung or skin.

5. TIMP was clearly localized in fetal membrane, amniotic epithelium, amniotic fibroblast, chorionic epithelium and decidua, as detected by the immunohistochemical method.

These results indicate that the higher level of TIMP in amniotic fluid originates in the fetal membrane.

Key words: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 • Amniotic fluid •

Premature rupture of membrane (PROM) • Fetal membrane

緒 言

新生児医療の著しい進歩にもかかわらず、低出生体重児の管理とその予後は、現在もなお重要な問題である。低出生体重児の多くは早産によるものであり、その原因として preterm の前期破水によるものが最も多い¹⁾。前期破水の機序については不明な点が多いが、卵膜のコラーゲン線維がプロテアーゼによつて分解され、組織の軟化や脆弱化が起こることが、その一因として推測されている²⁾。Vadillo-Ortega et al.³⁾は、前期破水卵膜において collagenase 活性の上昇を報告している。一方、その inhibitor として、コラーゲン代謝に深く関与している tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 (以下 TIMP と略す) の動態については、Welgus and Stricklin⁴⁾が、羊水中の TIMP 濃度が血清に比較して有意に高値を示すことを報告したが、妊娠時における TIMP 動態の検討や、前期破水や早産に関連しての報告はほとんどない。そこで著者は TIMP に着目し、妊娠および分娩時においてどのような動態を示すか、また前期破水の機序にどのように関わっているのかを基礎的に検討した。

研究対象および方法

1. 妊娠時の母体血清中 TIMP 濃度についての検討

妊娠14週0日から15週6日の122例 (I群)、妊娠25週0日から26週6日の186例 (II群)、妊娠30週0日から31週6日の196例 (III群)、および妊娠35週0日から36週6日の214例 (IV群) から採血し、遠心分離後測定まで -40℃ に保存した血清716検体の TIMP 濃度を測定した。なお、これらはすべて、正期産となつた症例であつた。また、経時的に採血し得た前期破水例9例、早産4例と、コントロールとして20歳から57歳までの健常非妊婦112名について TIMP 濃度を測定した。

TIMP 濃度の測定は、Kodama et al. が開発し

た2種類の抗 TIMP モノクローナル抗体を用いた sandwich-EIA 法によつた⁵⁾。本測定法の感度は5ng/ml, interassay の C.V. は4.6%, intraassay の C.V. は5.1%であつた。

2. 羊水中 TIMP 濃度についての検討

染色体検査や前期破水疑いなどの産科的適応に基づく羊水穿刺あるいは選択的帝切の際に採取した妊娠18週から妊娠38週、26症例の羊水を遠心分離し、本人の同意を得て、1.と同様に TIMP 濃度を測定した。なお、この中には陣痛発来、多胎、羊水過多、IUFD、胎児奇形の症例を含んでいない。

3. 正期産における分娩時母体血清、臍帯静脈血清、羊水、および新生児初回尿と気道吸引液の TIMP 濃度の検討

妊娠37週3日より40週5日の経腔分娩21例および陣痛発来前の選択的帝切4例において母体血清 (n=25)、臍帯静脈血清 (n=18)、羊水 (n=20)、新生児尿 (n=15)、気道吸引液 (n=2) を採取後、1.と同様に TIMP 濃度を測定した。なお、経腔分娩例の羊水は胎胞形成時に経腔的に採取した。選択的帝切例では血液の混入を避け採取した。また、新生児尿はすべて初回尿を用いた。気道吸引液は、児娩出直後、第一呼吸前に気道より吸引したものをを用いた。

4. 卵膜および胎児の皮膚、肺と成人の皮膚、腹膜における組織中 TIMP 濃度の検討

妊娠36週4日より41週2日の経腔分娩14例の分娩時に得られた卵膜を、ただちに用手的に羊膜と絨毛膜に分離し、-40℃ に保存した。なお、このうち2例の前期破水を含む。また、在胎15週および21週齢の胎児皮膚と肺組織を同意を得て採取し同様に保存した。コントロールとして成人2例の皮膚と腹膜組織を患者の同意を得て、手術時に採取し同様に保存した。

次に、0.1M NaCl, 5mM CaCl₂を含む30mM

Tris-HCl buffer (pH 8.0) を、各組織1g に対し5ml の割合で加え、ホモジネート後、遠心分離(10,000g, 60分)し、その上清のTIMP濃度を測定した。すべての操作は4℃にて行い、タンパク濃度はBradford法(Coomassie Brilliant Blue G-250, BIO-RAD)により測定した。

5. 卵膜におけるTIMPの組織局在性についての検討

適時破水卵膜31例、前期破水卵膜9例の卵膜について検討した。これらの症例から得られた卵膜はただちに、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋後、連続切片(5 μ m)を作製し、脱パラフィン後、HE染色、および抗TIMP抗体(7-6C1, 富士薬品工業)を一次抗体として、ストレプトアビジン-ビオチン法(HISTOFINE, 生化学工業)にて免疫組織化学的に検討した。なお、用いた抗体の特異性はWestern blotting法にて確認した。

推計学的有意差の検定はStudent's t-testを用いて行つた。

研究成績

1. 妊娠時の母体血清TIMP濃度についての検討

コントロールとしての健常非妊婦の血清TIMP濃度は 155 ± 31 ng/mlであり、年齢による変動はなかつた(表1)。妊娠14・15週(I群)、妊娠25・26週(II群)、妊娠30・31週(III群)、妊娠35・36週(IV群)の血清TIMP濃度は、それぞれ、 150 ± 32 ng/ml(Mean $\pm$ SD, 以下同じ)、 139 ± 30 ng/ml、 145 ± 26 ng/ml、 149 ± 33 ng/mlであつた。I群、III群、IV群の血清TIMP濃度は、非妊婦と有意差を認めなかつたが、II群に有意($p < 0.01$)な低下を認めた。また、妊娠経過において、

表1 健常非妊婦の各年代における血清TIMP濃度

年 齢	症例数	TIMP (ng/ml)
20～29	58	154 ± 28
30～39	32	156 ± 31
40～49	17	152 ± 29
50～59	5	160 ± 45
計	112	155 ± 31

(Mean $\pm$ SD)

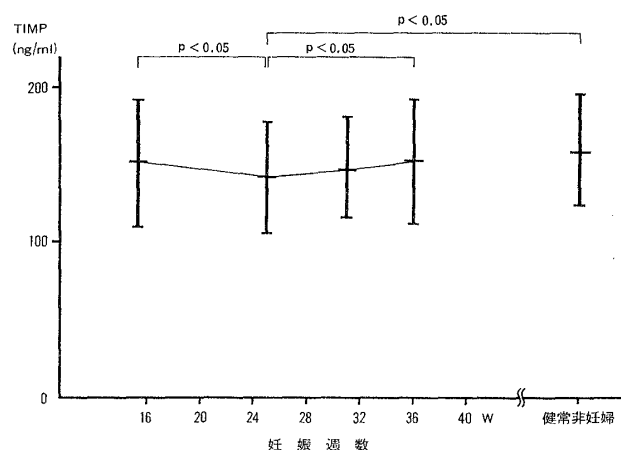


図1 母体血清TIMP濃度の推移

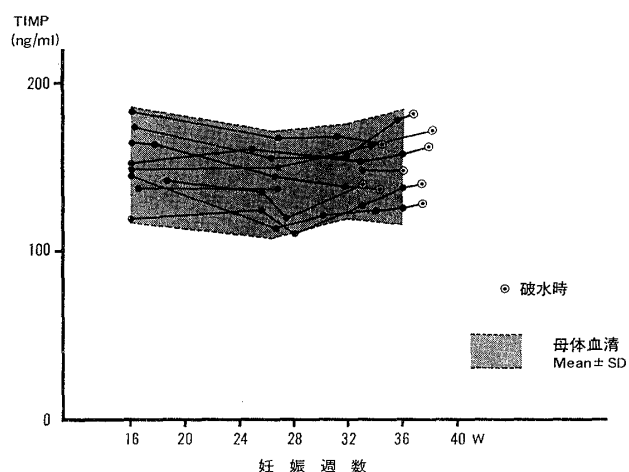


図2 前期破水例における血清TIMP濃度の推移 (n=9)

II群の血清TIMP濃度は、I群およびIV群に比して有意($p < 0.05$)に低値を認めた(図1)。初産婦と経産婦との比較検討では、各妊娠時期の測定値に差異を認めなかつた。

早産4例および前期破水9例の血清TIMP濃度を検討したが、いずれの症例においても、妊娠各期における母体血清TIMP濃度のMean $\pm$ SDの範囲を逸脱するものは認められなかつた。加えて、前期破水入院時に得られた検体においても、また早産陣痛発来後のものにも、母体血清TIMP濃度のMean $\pm$ SDの範囲を越えるものはなかつた(図2, 3)。

2. 羊水中TIMP濃度についての検討

陣痛発来前の羊水中TIMP値は 754 ± 325 ng/ml (315～1,850ng/ml)であり、母体血清と比較

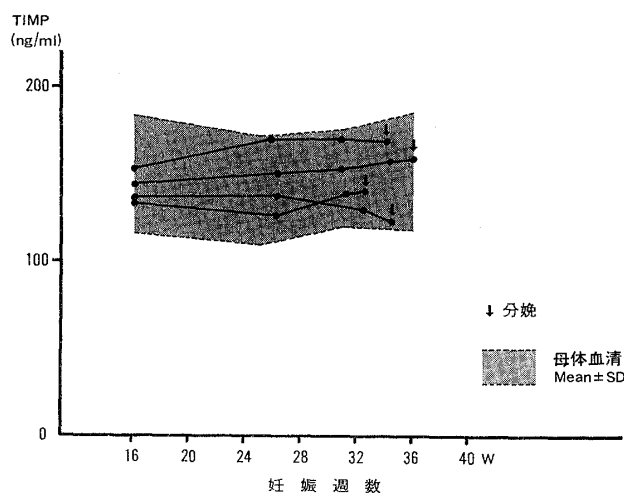


図3 早産例における血清 TIMP 濃度の推移 (n=4)

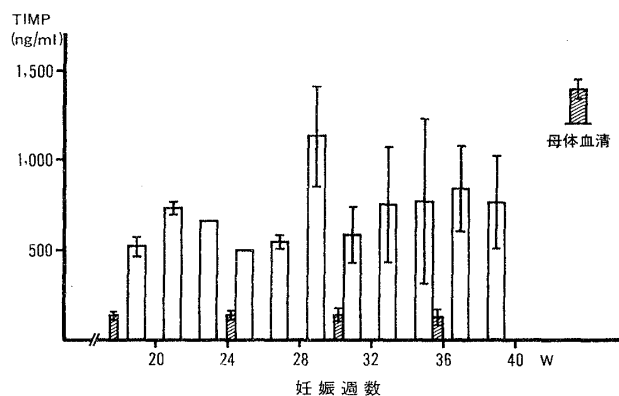


図4 羊水中 TIMP 濃度の推移 (n=26): 妊娠週数 (2週ごと) と羊水中 TIMP 濃度 (Mean±SD) の相関

して著しい高値を示した。なお、妊娠28週以降に増加する傾向がみられたが、妊娠週数と羊水中 TIMP 濃度との間には相関は認められなかった (図4)。

3. 正常産における分娩時母体血清、臍帯静脈血清、羊水、および新生児初回尿と気道吸引液の TIMP 濃度の検討

正常産分娩時における母体血清 TIMP 濃度は $155 \pm 21 \text{ ng/ml}$ 、臍帯静脈血清は $160 \pm 38 \text{ ng/ml}$ であり、両者間には有意差を認めなかった。羊水中 TIMP 濃度は $775 \pm 312 \text{ ng/ml}$ であり、母体血清および臍帯静脈血清に対して有意 ($p < 0.01$) に高値を認めた。一方、新生児初回尿ではすべて感度以下であつた (図5)。気道吸引液中の TIMP 濃度は

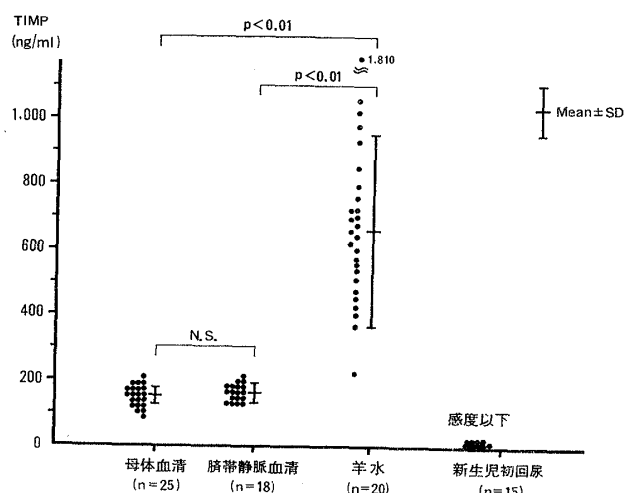


図5 正常産における分娩時母体血清、臍帯静脈血清、羊水および新生児初回尿の TIMP 濃度

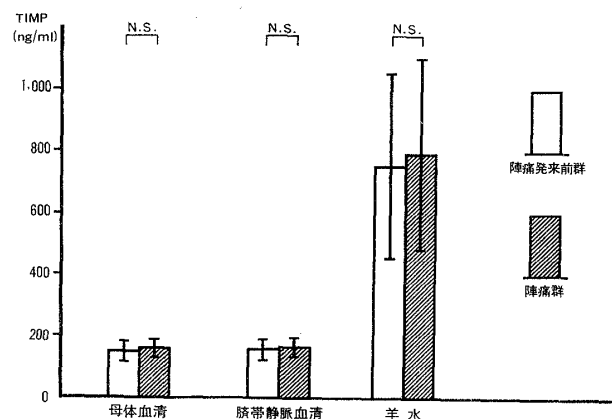


図6 陣痛群 (n=14) と陣痛発来前群 (n=4) における母体血清、臍帯静脈血清および羊水中 TIMP 濃度の比較

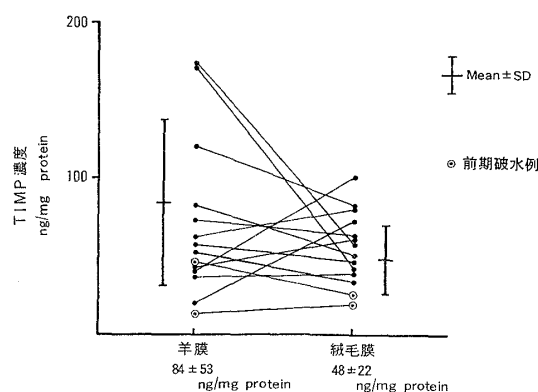


図7 羊膜、絨毛膜における組織中 TIMP 濃度 (n=14)

$1,124 \text{ ng/ml}$, 875 ng/ml であり、それに対応する羊水中の TIMP 濃度は $1,078 \text{ ng/ml}$, 956 ng/ml であ

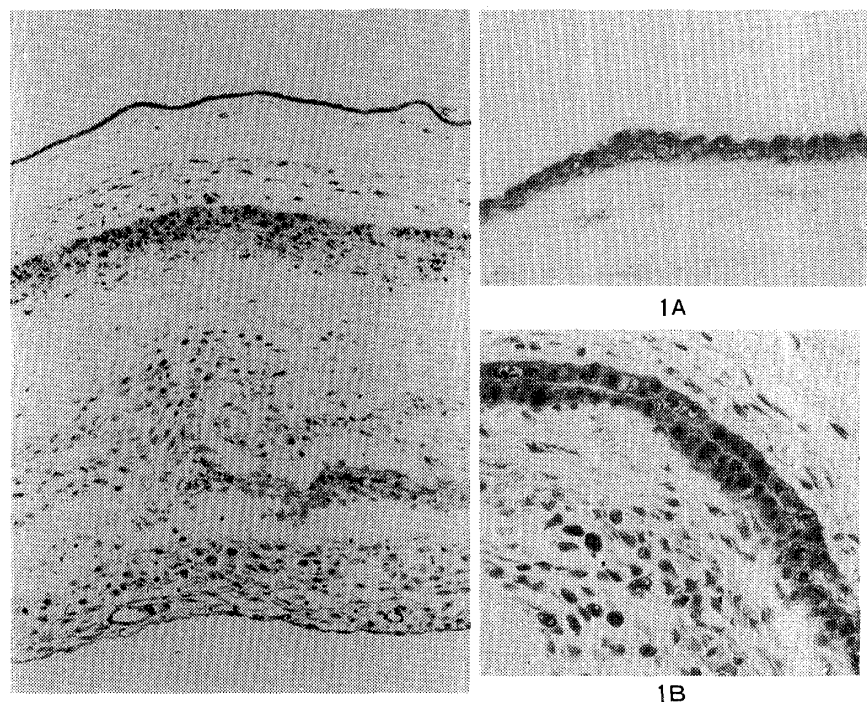


写真1 妊娠38週適時破水卵膜。羊膜上皮細胞，羊膜線維芽細胞，絨毛膜細胞および脱落膜層内の細胞にTIMPの局在を認める(×40)。

1A. 羊膜上皮細胞の拡大像(×200)。1B. 絨毛膜細胞および脱落膜細胞層の拡大像(×200)。

つた。母体血清，臍帯静脈血清および羊水中のTIMP濃度を陣痛の有無について，それぞれの群に分けて比較検討した。母体血清では，陣痛群 $155 \pm 21 \text{ ng/ml}$ ，陣痛発来前群 $148 \pm 36 \text{ ng/ml}$ ，臍帯静脈血清では， 160 ± 38 対 $155 \pm 32 \text{ ng/ml}$ ，羊水中では， 781 ± 318 対 $758 \pm 293 \text{ ng/ml}$ と2群間に有意差を認めなかつた(図6)。

4. 卵膜および胎児の皮膚，肺と成人の皮膚，腹膜における組織中TIMP濃度の検討

正期産の羊膜ならびに絨毛膜の組織中TIMP濃度は，それぞれ， $84 \pm 53 \text{ ng/mg protein}$ ， $48 \pm 22 \text{ ng/mg protein}$ であつた。そのうち前期破水例2例における羊膜の組織中TIMP濃度は14および 41 ng/mg protein ，絨毛膜の組織中TIMP濃度は，19および 17 ng/mg protein と比較的低値を示した(図7)。なお，前期破水2例は病理組織学的に絨毛羊膜炎を認めたが，他の卵膜には認めなかつた。次に，胎児皮膚と肺組織においてはTIMPは検出されなかつた。また，成人皮膚および腹膜組織中のTIMPを測定したが，胎児皮膚および肺

と同様に検出されなかつた。

5. 卵膜におけるTIMPの組織局在性についての検討

羊膜上皮細胞，羊膜線維芽細胞，絨毛膜細胞および脱落膜層内の一部の細胞にTIMPの局在性が認められた(写真1)。なお，前期破水症例9例の卵膜において，7例に絨毛羊膜炎を認めたが，適時破水の卵膜と比較して，TIMPの染色性に明らかな差を認めなかつた。

考 案

卵膜の細胞外マトリックスは主にI型およびIII型コラーゲンやfibronectin⁶⁾，proteoglycans⁷⁾などで構成されている。コラーゲンの分解調節機構において，matrix metalloproteinases (MMPs)と総称されるcollagenase (MMP-1)，72kDa gelatinase (MMP-2)，stromelysin-1 (MMP-3)が，分解の主体をなしている⁸⁾⁹⁾。一方，TIMPは，それらMMPsを阻害する働きをもつ分子量28kDaの糖タンパクである¹⁰⁾。産科領域においては，1981年にMurphy et al.¹¹⁾が羊水中に高濃度の

collagenase inhibitor が存在することをはじめて報告し、その後、Welgus and Stricklin⁴⁾はヒト線維芽細胞 TIMP に対して作製したポリクローナル抗体を用いた ELISA 法によつて、定量的に測定し、同様の結果を得ている。しかし、妊娠時における TIMP の動態や、前期破水との関わりを検討した報告はみられない。

著者は、Kodama et al.⁵⁾が開発したヒト TIMP に対するより高感度な sandwich-EIA 法を用いて、TIMP を測定し、妊娠の維持における TIMP の意義について検討した。

妊娠初期および妊娠末期の母体血清 TIMP 濃度は、健常非妊婦の血清 TIMP 濃度と有意差を認めなかつたが、妊娠中期のそれは、妊娠初期および妊娠末期に比して有意に低値であつた。この低下は、TIMP の絶対量の減少でなく、妊娠中期における体液循環量の増加によるものと考えた。これらの成績により、母体血清 TIMP 濃度は、妊娠経過を通じて、ほとんど変化しないことが明らかとなつた。

一方、collagenase 活性から検討した Rajabi et al.¹²⁾は、妊婦血中 collagenase 活性が早産予知の指標となりうる可能性を指摘した。そこで、その予知の可能性を、TIMP について検討したが、前期破水症例および早産症例の血清 TIMP 濃度の推移は、正期産症例と比して差異を認めなかつた。すなわち、血清 TIMP 濃度測定では、前期破水や早産は予知しえないと考えられる。また、前期破水の直後や早産の陣痛発来直後にも、血清 TIMP 濃度の変化を認めなかつた。したがつて、これらのことより、前期破水や早産の病態は、母体血清 TIMP 濃度に変動を与えないことが示唆された。

羊水中 TIMP 濃度は、血中と比較して著しい高値を示した。Stricklin et al.¹³⁾は、妊娠末期において、その有意な増加を報告しているが、著者の検討では有意差を認めなかつた。また、羊水中 TIMP は、陣痛発来後にも上昇を認めなかつた。次に、羊水中 TIMP の由来について検討した。羊水は、胎児尿によるもののほか、羊膜、胎児の肺胞¹⁴⁾、口腔などに由来するものより構成されていると考えられている¹⁵⁾。そこで、新生児初回尿中の

TIMP を測定したが、15検体すべて、測定感度以下であつた。次に、卵膜を採取後、羊膜と絨毛膜に分け、その組織中 TIMP 濃度を測定した。羊膜および絨毛膜に、それぞれ、 84 ± 53 , 48 ± 22 ng/mg protein の TIMP 濃度を確認した。一方、胎児皮膚と肺組織および成人皮膚と腹膜組織には、同様の測定法で検出できなかつた。また分娩時における新生児気道よりの吸引液中 TIMP 濃度を測定したが、それぞれに対応する羊水中の TIMP 濃度とほとんど差を認めなかつた。Stricklin et al.¹³⁾は、羊水中の TIMP は胎児肺線維芽細胞由来としたが、これらのことより、羊水中の TIMP は、胎児尿、胎児肺、胎児皮膚から産生されているとは考えにくく、卵膜が産生・分泌しているものと推論された。

卵膜組織中における TIMP の産生部位をみるために、免疫組織学的手法を用いて検討した。正期産適時破水卵膜において、羊膜上皮細胞、羊膜線維芽細胞、絨毛膜細胞および脱落膜層内の細胞に TIMP が局在していることを確認した。これらの結果より、羊水中の TIMP は卵膜由来であることが強く示唆された。

種々の病的状態において、MMPs と TIMP の不均衡がコラーゲンの破壊につながっているとの報告がある¹⁶⁾。また、前期破水の病態には絨毛羊膜炎が関与すると推測されている¹⁷⁾。Romero et al.¹⁸⁾は、絨毛羊膜炎が認められた症例の羊水中に、IL-1の増加を報告し、Katsura et al.¹⁹⁾は、IL-1の添加により絨毛膜細胞の collagenase 産生が高まることを報告している。著者も抗 collagenase モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検討で、絨毛羊膜炎症例の卵膜に染色性の亢進を認めている²⁰⁾。これらは、いずれも、絨毛羊膜炎という病的状態で、卵膜中の collagenase 活性が上昇しそれが卵膜の破綻につながっていることを示唆している。一方、その inhibitor である TIMP は、絨毛羊膜炎を認めた前期破水卵膜において、その組織濃度の減少が窺われ、また、TIMP の免疫組織学的検討では、絨毛羊膜炎症例におけるその染色性に明らかな変化を認めなかつた。これらの成績は、絨毛羊膜炎症例の卵膜において、

collagenase と TIMP の均衡が失われていることを示唆するものであり、TIMP の相対的減少が組織の脆弱化につながっていると推測された。すなわち、羊水中や卵膜組織に、生理的に高濃度に存在する TIMP が、MMPs 活性を阻害して、妊娠末期まで卵膜の脆弱化・破綻の防止に働いているという合目的性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御校閲を賜った泉 陸一教授に深甚の謝辞を捧げます。また、直接御指導頂きました本学産婦人科教室、新居 隆講師、ならびに TIMP 測定や抗体の提供に御協力下さいました富士薬品工業株式会社、岩田和士博士、藤本 昇氏に心から感謝いたします。なお、本論文の要旨の一部は第43回日本産科婦人科学会学術講演会（1991年、京都）にて発表した。

文 献

1. *Arias F, Tomich P.* Etiology and outcome of low birth weight and preterm infants. *Obstet Gynecol* 1982; 60: 277—281
2. *Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D.* Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 899—903
3. *Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NH, Ayala-Ruiz A, Lama MS.* Collagen metabolism in premature of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 84—88
4. *Welgus HG, Stricklin GP.* Human skin fibroblast collagenase inhibitor. *J Biol Chem* 1983; 258: 12259—12264
5. *Kodama S, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T.* Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol Meth* 1990; 127: 103—108
6. *Aplin JD, Campbell S, Allen TD.* The extracellular matrix of human amniotic epithelium: Ultrastructure, composition and deposition. *J Cell Sci* 1985; 79: 119—136
7. *Skinner SJM, Liggins GC.* Glycosaminoglycans and collagen in human amnion from pregnancies with and without premature rupture of the membranes. *J Devel Phys* 1981; 3: 111—121
8. *Murphy G, Nagase H, Brinckerhoff CE.* Relationship of procollagenase activator, stromelysin and matrix metalloproteinase 3. *Collagen Rel Res* 1988; 81: 389—391
9. *Okada Y, Nagase H, Harris ED.* A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digest connective tissue matrix components. *J Biol Chem* 1986; 261: 14245—14251
10. *Johnson WH, Roberts NA, Borkakoti N.* Collagenase inhibitors: Their design and potential therapeutic use. *J Emzy Inhib* 1987; 2: 1—22
11. *Murphy G, Cawston TE, Reynolds JJ.* An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. *Bioch J* 1981; 195: 167—170
12. *Rajabi M, Dean DD, Woessner JF.* High levels of serum collagenase in premature labor: A potential biochemical marker. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 179—186
13. *Stricklin PG, Michael MJ, Gast MJ, Welgus HG.* Amniotic fluid collagenase inhibitor; correlation with gestational age and fetal lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 134—139
14. *Ross MG, Ervin G, Leake RD, Fu P, Fisher DA.* Fetal lung liquid regulation by neuropeptides. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150: 421—425
15. *Seeds AE.* Current concepts of amniotic fluid dynamics. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 138: 575—586
16. 神谷政男. 血管内皮細胞のTIMP. 炎症 1991; 11: 529—537
17. *Guzick DS, Wind K.* The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 11—16
18. *Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK.* III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 1117—1123
19. *Katsura M, Ito A, Hirakawa S, Mori Y.* Human recombinant interleukin-1 α increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells. *FEB Lett* 1989; 244: 315—318
20. 副田善勝, 梅沢 聡, 新居 隆, 泉 陸一, 藤本 昇. 前期破水卵膜における細胞外マトリックス分解酵素の免疫組織学的検討. 日産婦北日本連合抄録 1991; 39: 77

(No. 7322 平4・12・18受付)