

絨毛羊膜炎、常位胎盤早期剥離の胎盤における  
**inducible Nitric Oxide Synthase** の誘導と **Apoptosis** の発生  
**Expression of inducible nitric oxide synthase and  
apoptotic cell death in placentae from patients of  
chorioamnionitis or placental abruption.**

岡山大学医学部産科婦人科学教室

中塚幹也 浅桐和男 木村吉宏 鎌田泰彦 野口聡一 高田雅代 工藤尚文

Mikiya Nakatsuka, Kazuo Asagiri, Yoshihiro Kimura,

Yasuhiko Kamada, Soichi Noguchi, Masayo Takata, Takafumi Kudo

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School

2-5-1 Shikata, Okayama-city, Okayama, 700 Japan

phone : 086-223-7151 fax : 086-225-9570 e-mail : mikiya@cc.okayama-u.ac.jp

**abstract (29th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy)**

Endothelial type nitric oxide synthase (eNOS) is known to exist in blood vessels and also in placentae. Although nitric oxide (NO) produced constitutively by eNOS is suggested to regulate microcirculation and suppress high blood pressure during pregnancy, the role of inducible NOS (iNOS) in placentae is not known. We report here that expression of iNOS and apoptotic cell death were detected in placentae from patients suffering from placental abruption or chorioamnionitis. To elucidate the relation between formation of NO and cell death in trophoblasts, we treated isolated trophoblasts with lipopolysaccharide (LPS) in primary culture. Apoptosis and expression of iNOS were enhanced by LPS and peroxynitrite, a cytotoxic potent oxidant, was also formed in trophoblasts.

**[緒言]**

絨毛羊膜炎は、前期破水の主要な原因であり、早期産に見られる合併症の大きな比率を占める。妊娠の早期の中断により、低出生体重児を発生させ、重症感染症が起これば、母児ともに予後が不良となる。また絨毛羊膜炎は、妊娠中毒症とともに常位胎盤早期剥離の誘因の一つと考えられている。常位胎盤早期剥離の胎盤においてapoptosisが起きていることが報告され、その発生機序に絨毛細胞のapoptosisが関与していることが推測される。

また、絨毛羊膜炎では、羊水中のLipopolysaccharide(LPS)が上昇しており、種々のcytokinesの産生も亢進している。一般に細菌感染では、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現が誘導され、大量のnitric oxide (NO)が産生されており、絨毛羊膜炎においてもこのようなことが起こっている可能性がある。

NOは、superoxide anion と反応し、強力なoxidantであるperoxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)となり、細胞傷害的に働くことが知られている。これらNOやONOO<sup>-</sup>は種々の細胞においてapoptosisを

発生させることも報告されている。

#### [目的]

正常妊婦、絨毛羊膜炎症例、常位胎盤早期剥離症例におけるNO産生について検討し、また、各胎盤におけるiNOSの発現、局所でのONOO<sup>-</sup>発生および、apoptosisの有無を検討する。

さらに、絨毛羊膜炎のモデルとして、絨毛細胞培養にLPSを添加し、そのNO、ONOO<sup>-</sup>産生、apoptosisの発生を観察する。

#### [方法]

##### 1. 血清nitrite/nitrate測定

採血は空腹時に同意のもと施行し、血清分離後、フィルターにて除蛋白後、nitrate reductase処理<sup>1)</sup>により、nitrateをnitriteに還元後、Griess試薬にてnitriteおよびnitrateの総和として測定した<sup>2)</sup>。

##### 2. 免疫組織染色、免疫細胞染色

一次抗体として、抗iNOS抗体、抗nitrotyrosine抗体を使用し、DAKO LSAB kit と DAB色素により施行した。

##### 3. apoptosisの検出

胎盤におけるapoptosisはTUNEL法により検出し、trophoblastsはHoechst 33258蛍光色素で染色し形態学的にapoptosisを証明し、さらにTUNEL法により確認した。

##### 4. trophoblastsの分離培養

trophoblastsは合併症のない正常正期産症例で前回帝王切開術等のため選択的帝王切開術を施行された症例の胎盤より同意のもと分離した<sup>3)</sup>。

#### [成績]

絨毛羊膜炎症例11例(妊娠18-32週)の分娩前の血清nitrite/nitrate値は $87.8 \pm 25.9 \mu\text{M}$  (mean $\pm$ S.D.)であり、正常妊婦6例(妊娠28-32週)の $58.2 \pm 10.9 \mu\text{M}$ に比して有意に高値であった ( $P < 0.01$ , Welch's t-test)。

正常妊婦胎盤ではiNOSの発現は極僅かであっ

たが、絨毛羊膜炎、常位胎盤早期剥離胎盤では、syncytiotrophoblastsや間質Hofbauer細胞に強くiNOSの局在が認められた。またONOO<sup>-</sup>の発生により特異的に産生されるnitrotyrosineは<sup>4)</sup>、やはりiNOS陽性細胞に強く染色され、iNOSがONOO<sup>-</sup>の発生に関与していると考えられた。またapoptosisも同様の細胞に発生していた。

培養trophoblastsでは、LPS添加によりiNOSの発現は亢進し、NO産生も上昇した。nitrotyrosineも強度に染色された。controlではほとんどapoptosisが見られなかったが、LPSを添加した3-5日間の培養で約10%の細胞がapoptosisを起こした。また、このapoptosisはiNOSに比較的選択的な阻害剤であるaminoguanidineの同時添加により抑制された。

#### [考察]

絨毛羊膜炎では、細菌の及んでいない部分の胎盤においてもtrophoblastsでiNOSが誘導され、apoptosisが発生している。trophoblasts培養モデルでの検討により、LPSによるNOまたはONOO<sup>-</sup>産生の亢進がこのapoptosisに関与していることが示唆された。

#### [文献]

- 1) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M., and Currie, M. G. (1993) *Anal. Biochem.* **214**, 11-16.
- 2) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982) *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- 3) Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., and Strauss III, J. F. (1986) *Endocrinol.* **118**, 1567-1582.
- 4) Beckman, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P., Chen, J., Accavetti, M. A., Tarpey, M. M., and White, C. R. (1994) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 81-88.