

学 位 論 文 題 名

羊膜腔内色素注入法による前期破水の確定診断ならびに
新しい破水診断キット（AFP-test kit）の開発

学位論文内容の要旨

緒言

流・早産の管理に際し、前期破水の正確な診断は日常の臨床の場において従来のpH法などではしばしば困難なことがある。

羊膜腔内色素注入法（PSP法）は破水の確定的な診断法として有用であるが、対象とされる症例は限られており、かねてより、ベッドサイドで簡便に繰り返して行うことができ、しかも非侵襲的で、信頼性が高く、迅速にできる検査法の開発が望まれていた。

羊水中には高濃度の α -fetoprotein(AFP)が存在し、尿、腔分泌液、精液には微量のAFPが存在することが知られている。

前期破水の診断法として、PSP法の臨床的有用性について再度検討するとともに、独自に開発した抗AFPモノクローナル抗体を用いたAFP検出キット（以下、AFPキット）の基本的性能および前期破水の診断における臨床的有用性について検討することを本研究の目的とした。

方法と対象および結果

I. PSP法の検査対象とその実施方法について

1981年10月から1993年10月までの期間に、羊水様分泌物の流出ないしは破水感を訴えて来院し、肉眼的な羊水・羊水様分泌物の流出が少量ながらも観察されるか、または後腔円蓋・頸管内の貯留液のpHが7.2以上（BTB法、ニトラジン法）、コリンエステラーゼ活性判定法（アコレスト法）陽性、シダ状結晶証明法（FLP法）陽性のいずれかの所見がある、妊娠14週から33週の64症例を対象とした。

超音波断層診断装置を用いて経腹的に羊水穿刺を施行し、羊水を数ml採取ののち、妊娠週数・羊水量を考慮の上、PSP色素液（Phenol-sulfonphthalein, 第一製薬）を1ml～3ml羊膜腔内に注入し、滅菌乾燥ガーゼを子宮腔部全体を覆うように腔内に数枚挿入する。

腔内にガーゼを挿入後6～12時間で一度抜去して、PSPの淡紅色に染色されているか否かを観察し、染色された場合を陽性とする。

II. PSP法の検査結果について

破水の最終診断は、従来の方法（pH法、アコレスト法、FLP法）、臨床経過および妊娠の転帰などから判断した。

PSP法は正診率、感度、特異度ともに100%であり、 χ^2 検定で有意性 ($P<0.001$)が認められた。しかし、pH法は正診率70.5%、感度87.5%、特異度68.1%であり、シダ状結晶証明法はそれぞれ63.9%、55.6%、88.9%、アコレスト法はそれぞれ66.7%、75.0%、50.0%であった。PSP法は、他の3法に比べ正診率、感度、特異度いずれも最も高い値が得られ、その臨床的有用性が確認された。早期産・正期産の47症例では、全例生児を得られたが、母体ならびに新生児にはPSPによると思われる副作用は観察されなかった。

III. AFPキットの概要

本キットの検体添加部の左側にはニトロセルロースメンブレン上に青色染料を結合した抗AFPモノクローナル抗体が溶化可能な状態で塗布されている。その左の判定部には縦線状に青色染料に結合した抗体とは抗原認識部位の異なる抗AFPモノクローナル抗体が固相化され、さらに終了サイン部には縦線状に抗マウスIgG抗体が固相化されている。検体を検体添加部に添加すると、検体溶液はメンブレン上を左側に毛管現象により移動し、青色染料結合抗AFPモノクローナル抗体塗布部に至り、これを溶化し、検体中のAFPと反応する。AFPを結合した免疫複合体はさらに左側に移動し、判定部の固相化抗体にトラップされ、その部に青色の縦線を形成する。過剰の免疫複合体および未反応の青色染料結合抗AFPモノクローナル抗体はさらに移動し、終了サイン部の固相化抗体と反応し、青色の縦線を形成する（反応終了サイン）。反応終了時間は検体添加後約3分間である。

検体中に感度以上 ($\geq 2.5\text{ng/ml}$) の濃度のAFPが含まれる場合は判定部に、“固相化抗AFPモノクローナル抗体-AFP-青色染料結合抗AFPモノクローナル抗体”のサンドイッチ型の免疫複合物が形成されるため青色の縦線が出現する。検体中に感度以上のAFPが含まれない場合には、判定部の反応が起こらないため判定部に縦線は出現せず、終了サインのみが出現する。

IV. AFPキットの検査対象と検査方法について

1992年2月から1993年9月までの期間に、妊娠11週から40週までの破水または破水の疑いのあつた71症例を対象とし、検体は腔分泌物もしくは頸管分泌物とした。

破水の最終臨床診断は、問診、腔鏡診、羊水鏡、内診、超音波断層法、PSP法とその後の臨床経過および妊娠の転帰により判断された。AFPキット検査時にpH法（ニトラジン法・BTB法）を同時に施行した。また、採取された検体をAFPキットの結果と比較するために一旦-80℃に凍結保存し、ラジオイムノアッセイ（RIA）によりその濃度を測定した。

検査法の手順の概略は以下のごとくである。すなわち検体10 μl を0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝化生理食塩液490 μl に加え50倍に希釈溶解する。希釈した検体の250 μl を検体添加部に添加し、室温で水平にして静置する。終了サインが出現した時点（通常、添加後約3分間）で判定部の青色染料の出現を肉眼で観察し判定する。判定部に縦線が出現した場合、陽性と判定し、この時希釈検体には2.5ng/ml以上のAFPが含まれており、腔腔内液、頸管分泌物には125ng/ml以上のAFPが含まれていることになる。

V. AFPキットの検査結果について

破水疑い16症例、その他13症例の最終的に破水が認められなかった29症例では、AFPキットは全例陰性であり、RIAによる測定でも、AFP濃度は125ng/ml（カットオフ値）未満の値を示した。

これに対して、従来の方と羊水鏡検査、PSP法（羊膜腔内色素注入法）を組み合わせで確定診断された高位破水16症例および低位破水26症例においてはAFPキットはすべて陽性を示し、

RIAによるAFP値はすべてカットオフ値を越えた濃度であった。

以上の結果をまとめると、AFPキットは破水全症例に陽性で、非破水全症例に陰性であり、正診率、感度、特異度はすべて100%で、 χ^2 検定で有意性 ($p < 0.001$) が認められた。

考察

本研究のPSP法に関する検討では、臨床的に繁用されているpH法、アコレスト法、FLP法には偽陽性・偽陰性が存在し、正診率が63.9%~70.5%で妊娠中期の破水が疑わしい症例の診断法としては限界があるように思える。これに対して1981年以来、教室で独自に用いてきたPSP法では、従来の他の3法に比べ正診率、感度、特異度のいずれにおいても有意 ($p < 0.001$) の診断精度であり、その臨床的有用性がはじめて推計学的に確認された。

pH測定法であるニトラジン法では、腔内のアルカリ化によって偽陽性がしばしば観察され、破水から時間が経過した症例では偽陰性を示すこともある。またFLP法では、全妊娠期間を通じて子宮頸管粘液によって30%の偽陽性が生じ、羊水の結晶化が血液の混入により阻害される。しかしながら、PSP法は従来の方法で偽陽性・偽陰性を示すこれらの因子が存在する場合においても有用であったことが臨床経過からも本研究において改めて認識された。

Evans blue, Methylene blue,そしてFluoresceinなどの色素注入法が報告され、それぞれ確診率の高い方法とされてきた。しかし、それらの色素の胎児・新生児ならびに母体に対する副作用・影響などについては、報告された検討症例数も少なく十分には把握されていない。また、新生児の長期予後についての報告も非常に少ない。

従来から一般的に用いられている破水の診断法 (conventional methods) を数種類組み合わせても妊娠後期においてさえ正診率は93%と報告されている。早産期の破水診断におけるニトラジン法・FLP法の感度はそれぞれ77%, 62%と報告され、破水の診断法としてことに流・早産期においては、限界があると思われる。

1983年にRochelsonらは抗AFP抗体を用い、ラテックス凝集反応を利用した方法を破水の診断に応用し、感度93%, 特異度94%と報じた。しかしこの方法は採取検体を遠心すること、凝集反応の結果判定が容易ではないこと、従って診断結果の説明の困難な症例がしばしば存在したことなどにより実用化されなかった。さらに1987年にRochelsonらは早産期の新しい破水診断の方法としてマウス抗AFPモノクローナル抗体を用いたcolorimetric monoclonal antibody assay法を導入し、感度98%で、ニトラジン法、FLP法に比べ有意性があると報告した。これに対して、1990年にGariteらが早産期の破水の診断法として同じcolorimetric monoclonal antibody assay法を用いて検討したが、ニトラジン法に比べ特異度のみ有意であったが、感度においては有意性が認められず、またFLP法に比べると、感度・特異度ともに有意性が認められないとしており、この方法の臨床的有用性についての結論は未だ得られていない。また検査の全過程には約15分間を必要とすることも報告されている。

他の抗AFP抗体を用いたこれまでの方法に比べ、新たに開発したAFPキットがより高い正診率を示した理由として、1) ラテックス凝集法のように結果判定が困難ではなく、青色のバンドの有無で明確に判定できる。2) AFPキットは希釈検体を添加するだけの操作で約3分間で結果が得られるため、ベッドサイドでの迅速な判定が可能であった。それに対して、ラテックス凝集法は遠心することが必要であり、またcolorimetric monoclonal antibody assay法は4ステップの操作が必要 (約15分間) であることから、検体採取から判定までの時間、操作過程での何等かの影響

が関与している可能性がある。3) AFPキットのカットオフ値は2.5ng/ml（実際の検体濃度としては125ng/ml）であり、それに対して他の抗AFP抗体を用いた方法はいずれも100IU/mlをカットオフ値としており、その違いが結果判定、正診率に反映したことが推察される。

結語

1. 妊娠中期の破水が疑わしい64症例において、従来の方法の正診率は63.9～70.5%であったのに対し、羊膜腔内色素注入法であるPSP法は100%であり、その臨床的有用性を再確認した。
2. 臨床的にほとんど問題にならない仮羊水破水と治療・管理の必要な高位破水・低位破水との鑑別診断は従来の方法では困難なことが多く、羊膜腔内色素注入法（PSP法）の導入によっては一挙に診断が可能となった。
3. 本研究の対象とした妊娠婦人・新生児の全症例において、PSP法の手技ならびにPSP色素自体による副作用と思われる異常は全く観察されず、本法の安全性が再確認された。
4. 迅速に判定結果が得られ、操作方法も簡便なベッドサイド用の破水診断のための抗AFPモノクローナル抗体を用いたAFP検出キット（AFPキット）を新たに開発した。
5. 妊娠11週から40週の前期破水またはその疑いのある71症例において、従来法であるpH法の正診率が60.0%であったのに対し、AFPキットは100%であり、本キットの診断的卓越性が判明した。
6. AFPキットの反応に要する時間は約3分間であり、迅速・簡便かつ非侵襲的であり、本キットが破水の診断法のひとつとして日常臨床に極めて有用であることが一挙に確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 寺 沢 浩 一

学 位 論 文 題 名

羊膜腔内色素注入法による前期破水の確定診断ならびに 新しい破水診断キット (AFP-test kit) の開発

流・早産の管理に際し、前期破水の正確な診断は日常の臨床の場にあつてpH法などの従来の方法ではしばしば困難なことがある。

教室で試行されてきた羊膜腔内PSP色素注入法（以下、PSP法）は破水の確定診断法として有用であるが、対象とされる症例は限られており、かねてよりベッドサイドで簡便に繰り返して行うことができ、しかも非侵襲的で、信頼性が高く、迅速に判定ができる検査法の開発が望まれていた。

羊水中には高濃度の α -fetoprotein (AFP) が存在し、尿、腔分泌液、精液には微量のAFPが存在することが知られている。

前期破水の診断法として、申請者はPSP法の臨床的有用性について症例を増加して再度検討するとともに、独自に開発した抗AFPモノクローナル抗体を用いたAFP検出キット（以下、AFPキット）の基本的性能および前期破水診断における有用性について検討することを本研究の目的とした。

1981年10月から1993年10月までの期間に、羊水様分泌物の流出ないしは破水感を訴えて来院し、肉眼的な羊水・羊水様分泌物の流出が少量ながらも観察されるか、または後腔円蓋・頸管内の貯留液のpHが7.2以上、コリンエステラーゼ活性証明法陽性、シタ状結晶証明法陽性のいずれかの所見がある、妊娠14週から33週の64症例をPSP法の対象とした。

pH法は正診率70.5%、感度87.5%、特異度68.1%であり、シタ状結晶証明法はそれぞれ63.9%、55.6%、88.9%、コリンエステラーゼ活性証明法はそれぞれ66.7%、75.0%、50.0%であったが、PSP法は他の3法に比べ正診率、感度、特異度いずれも100%と満足すべき結果がえられ、その臨床的有意性($P<0.001$)が確認された。

早期産・正期産の47症例では、PSP法施行後に全例生児を得られたが、母体ならびに新生児には本法によるとと思われる副作用は観察されなかった。

さらに申請者は、はじめて独自に開発したAFPキットの臨床応用を試みた。

本キットの検体添加部の左側にはニトロセルロースメンブレン上に青色染料を結合したマウス抗ヒトAFPモノクローナル抗体が溶化可能な状態で塗布され、その左の判定部には縦線状に青色染料に結合した抗体とは抗原認識部位の異なるマウス抗ヒトAFPモノクローナル抗体が固相化され、さらに終了サイン部には縦線状に抗マウスIgG抗体が固相化されている。

反応終了時間は検体添加後約3分間で、感度以上 ($\geq 2.5\text{ng/ml}$) の濃度のAFPが

含まれる場合は判定部に、”固相化抗AFPモノクローナル抗体-AFP-青色染料結合抗AFPモノクローナル抗体”のサンドイッチ型の免疫複合物が形成されるため青色の縦線が出現する。

1992年2月から1993年9月までの期間に、妊娠11週から40週までの破水または破水の疑いのある71症例をAFPキットの検討対象とし、検体は腔分泌物もしくは頸管分泌物とした。

破水の最終臨床診断は、問診、腔鏡診、羊水鏡、内診、超音波断層法、PSP法とその後の臨床経過および妊娠の転帰により判断された。AFPキット検査時にpH法を同時に施行した。また、採取された検体をAFPキットの結果と比較するために一旦-80℃に凍結保存し、ラジオイムノアッセイ(RIA)によりAFP濃度を測定した。

検査法の手順の概略は以下のごとくである。すなわち、検体10 μ lを0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝化生理食塩液490 μ lに加え50倍に希釈溶解する。希釈した検体の250 μ lを検体添加部に添加し、室温で水平にして静置する。終了サインが出現した時点(通常、添加後約3分間)で判定部の青色染料の出現を肉眼で観察し判定する。判定部に縦線が出現した場合、陽性と判定し、この時希釈検体には2.5ng/ml以上のAFPが含まれており、腔腔内液、頸管分泌物には125ng/ml以上のAFPが含まれていることになる。

AFPキットの検査結果についてまとめると、破水疑い16症例、その他13症例の最終的に破水が認められなかった29症例では、AFPキットは全例陰性であり、RIAによる測定でも、AFP濃度は125ng/ml(カットオフ値)未満の値を示した。

これに対して、従来法と羊水鏡検査、PSP法を組み合わせで確定診断された高位破水16症例および低位破水26症例においてはAFPキットはすべて陽性を示し、RIAによるAFP値はすべてカットオフ値を越えた濃度であった。

以上の結果をまとめると、AFPキットは破水全症例に陽性で、非破水全症例に陰性であり、正診率、感度、特異度はすべて100%で、有意性($p<0.001$)が認められた。

発表に際し、西信三教授から妊娠中期の羊水中AFP濃度、AFPキットに用いられた抗体のアフィニティについて、寺沢浩一教授から、PSP法における注入色素量の増加による判定時間の短縮の可能性、PSP色素の副作用、PSP法の感度の算出方法について、さらに阿部和厚教授からは、羊水中AFPの由来について、などの質問があったが、申請者は、概ね適切に解答しえた。

発表後、副査の西教授、寺沢教授には個別に審査を受け合格の判定を下された。

以上、本研究は臨床的に問題の多い妊娠中期の前期破水の診断に羊膜腔内PSP色素注入法と独自に開発した簡便なAFPキット法がきわめて有用であることをはじめに明らかにし、破水診断に画期的な貢献を今後もたらすものと判断され、博士(医学)の授与に値するものと判定された。