

EVOLIS によるセルフリー N IL-2 R 測定試薬の検討

宮野 章¹⁾ 江口 政志¹⁾ 中山 雅弘¹⁾

Evaluation of the “CELLFREE N IL-2 R” reagent for measurement of soluble Interleukin-2 receptor, using EVOLIS

Akira MIYANO¹⁾ Masashi EGUCHI¹⁾ Masahiro NAKAYAMA¹⁾

¹⁾ Department of Laboratory Medicine, Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health (840, Murodo-cho, Izumi-shi, Osaka, 〒594-1101, Japan)

Summary

We evaluated the improved ‘CELLFREE N IL-2 R’ kit by which we measure a soluble Interleukin-2 receptor (sIL-2 R). This reagent was used with automatic microplate analyzer, EVOLIS. The absorbance data of sIL-2 R was significantly lower in first- and second-row in a microplate than in other rows when we studied the between-row value of sIL-2 R. The between-run reproducibility was also poor. We supposed that the reason for these difference in measurement might be likely to depend on measured temperature because higher temperature in EVOLIS was lower optical density value of observed data. When we performed improved temperature control, this reagent showed coefficient of variations of less than 6.0% in inter- and intra-run assays. And good linearity was obtained in dilution tests with clinical samples. A good correlation between ‘CELLFREE N IL-2 R’ and an old kit, ‘CELLFREE IL-2 R’ was also observed. These results suggest that this measurement method could be an useful laboratory procedure in clinical practice.

キーワード

可溶性インターロイキン2受容体 腫瘍マーカー 酵素免疫測定法

血清中の sIL-2 R 濃度の変動は、非ホジキンリンパ腫および成人 T 細胞白血病の進行と良く相関する。本測定試薬が改良されたのを機に、外注検査から院内検査に変更するための検討を行い、若干の知見を得たので報告する。セルフリー N IL-2 R 測定試薬の改良点は、次の5点である。すなわち、①測定レンジ拡大(6,400 から 10,800 U/ml)、②発色剤の液状化(OPD から TMB)、③標準試薬・校正試薬の液状化、④プレートウエルの総分割、⑤検体量の微量化(50 から 30 μ l)である。

I 材料と方法

装置：全自動マイクロプレート分析装置 EVOLIS (バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社)。

試薬：改良後の「セルフリー N IL-2 R」キット(協和メデックス株式会社：以下、改良試薬)を使用。相関は外注検査である改良前の「セルフリー IL-2 R メデックス」(以下、旧試薬)を AP-X(協和メデックス株式会社)で測定した結果を対照とした。

統計解析：ノンパラメトリック法である Mann-Whitney’s U Test を用い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

II 検討内容

1. 測定値のウェル間差

同一プール血清を用いてプレートのすべてのウェルの OD 値を比較した。

この検討の結果および外側のウェルが乾燥しやすい

¹⁾ 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター検査科 (〒594-1101 大阪府和泉市室堂町 840) (平成 22 年 9 月 10 日受付・平成 23 年 1 月 14 日受理)

表 1 測定上の改良点

段 \ 列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			S 1	CL 1	5	11	17	23	29	35	41	
C			S 2	CL 2	6	12	18	24	30	36	42	
D			S 3	1	7	13	19	25	31	37	43	
E			S 4	2	8	14	20	26	32	38	44	
F			S 5	3	9	15	21	27	33	39	45	
G			S 6	4	10	16	22	28	34	40	46	
H												

い「エッジ効果」を避けるため、以下の測定は表 1 のような配置で行った。つまり、1, 2, 12 列と A, H 段は測定に使用せず、これらのウェルにはインキュベート中の乾燥を防ぐために精製水 100 μ l を加えた。

2. 連続測定の影響

患者血清 17 検体について、1 回目測定終了後にただちに再検査を行い、1 回目と 2 回目の測定値を比較検討した。

3. 庫内温度と測定値の関係

EVOLIS には庫内の温度記録機能があり、結果に報告された最低、平均、最高温度を用いた。有意差検定には、平均温度において 27℃ 未満と以上での第 6 標準試薬の OD 値を比較した。

4. プレートシールの影響

庫内の温度が上昇した状態での乾燥を確認するために、ルーチン終了後、ただちに標準試薬と同一プール血清の測定を行い、反応中のプレートシールの有無の影響を確認した。具体的には検体と標識抗体の反応前後に、プレートを取り出し、①上段半分(A 1 から D 12)のみプレートシールを貼った場合(上下)と、②横半分(A 1 から H 6)にプレートシールを貼った場合(左右)で、プレートシールを貼られていないウェルと吸光度を比較した。

5. 再現性

プール血清を用い、同時再現性(n=10)と日差再現性(n=8)を検討した。

6. 希釈直線性

sIL-2 R 濃度 10.580 U/ml を示す血清検体を検体希釈液にて 7 段階希釈して試料を調製し、各 3 回測定した。

7. 相関性試験

患者血清 144 検体を用い、改良試薬と旧試薬の相関について検討した。

8. 採血後の血清分離時間の影響

健常ボランティア 2 名から採血した検体(検体 A, B)を用いて、採血から血清分離までの時間の影響を検討した。検体は冷蔵(4℃)と室温で最長 7 日まで保存し、その後遠心分離した。また、1 本は -20℃ で保存し、全血凍結融解後の値を調べた。

III 結 果

1. 測定値のウェル間差

各列 8 ウェルの測定結果を箱ひげ図で図 1 に示す。1~2 列目の 16 件と 3~12 列の 79 件の吸光度を比較した結果、3 列目を基準とすると 1~2 列目で有意に低値であった($p < 0.001$)。

2. 連続測定の影響

1 回目と 2 回目の sIL-2 R 濃度を比較すると、 $y =$

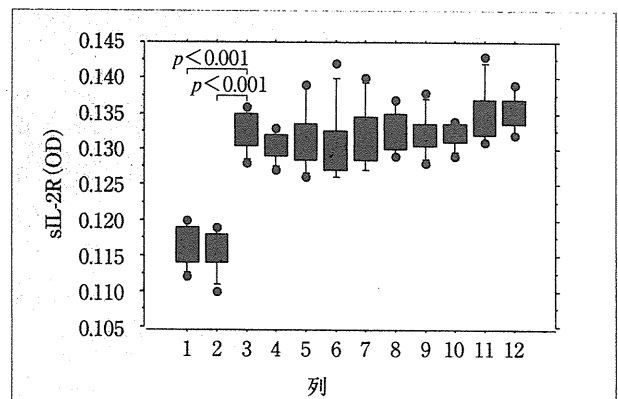


図 1 測定値のウェル間差

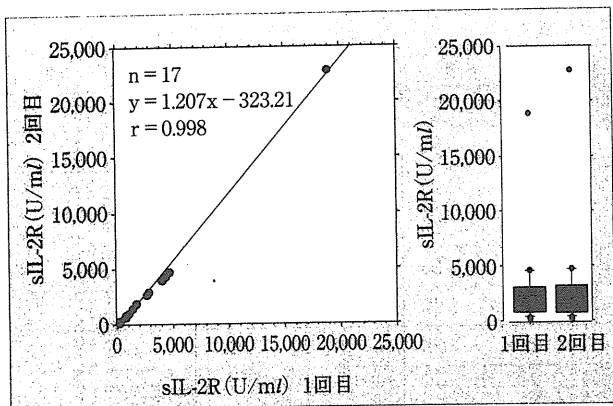


図2 連続測定の影響

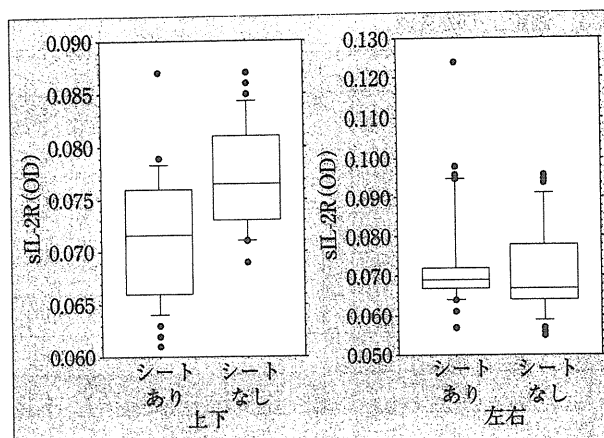


図4 プレートシールの影響

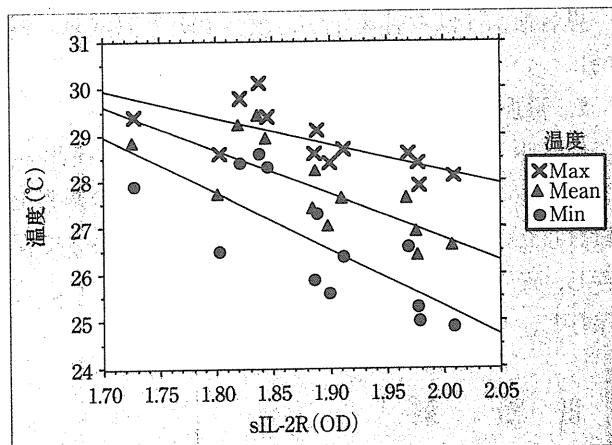


図3 庫内温度と測定値の関係

1.207 x - 323.21, r=0.998 と 2 回目の測定結果は高値傾向を示した。異常高値の 1 検体を除いても同様の傾向を示した ($y=1.012x+12.43$, $r=0.999$)。この時の最高濃度の標準試薬の OD は、1 回目 1.977 に対して、2 回目 1.727 と再検のほうが低かった (図 2)。

3. 庫内温度と測定値の関係

検討結果を図 3 に示す。その結果、温度が高いほど低い OD を示した ($p=0.011$)。

4. プレートシールの影響

プレートシールの有無の影響について検討した結果、上下・左右のいずれにおいても有意差は認められなかった (図 4)。

5. 再現性

本改良試薬における同時再現性は、 $n=10$ 、平均値=560.0、 $SD=33.51$ 、 $CV=6.0\%$ 、日差再現性は $n=8$ 、平均値=589.8、 $SD=20.55$ 、 $CV=3.5\%$ であった (表 2)。

表 2 再現性試験

sIL-2R	同時再現性 (n=10)	日差再現性 (n=8)
平均値 (U/ml)	560.0	589.8
SD (U/ml)	33.51	20.55
CV (%)	6.0	3.5

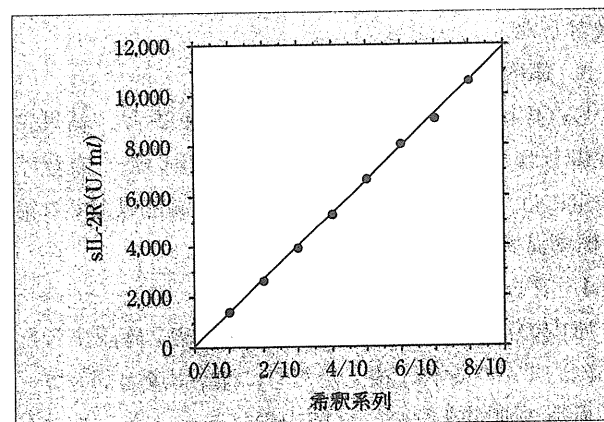


図5 希釈直線性試験

6. 希釈直線性

sIL-2R 濃度 10,580 U/ml まで良好な希釈直線性が得られた (図 5)。

7. 相関性試験

外注検査である AP-X を用いた旧試薬との相関を検討した結果 $n=144$, $y=1.104x-8.79$, $r=0.997$ であり、EVOLIS を用いた本改良試薬のほうが若干高値傾向であった (図 6)。異常高値の 3 検体を除いても同様の傾向であった ($y=1.007x+104.19$, $r=0.986$)。

8. 採血後の血清分離時間の影響

保存条件の違いによる測定値に与える影響を A, B の 2 検体について図 7 に示した。7 日まで室温、4℃

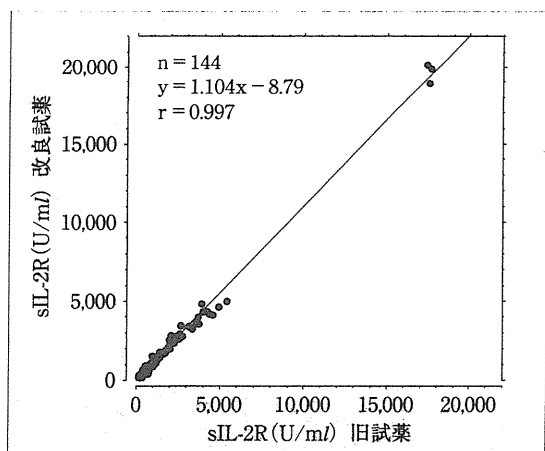


図6 相関性試験

ともに極端な変動は認められなかった。また、全血凍結融解後の値は、Aは281 U/ml、Bは151 U/mlであり、凍結融解前の値と比較して少し低値を示した。

IV 考 察

われわれは以前、sIL-2R測定の有用性を報告した。妊娠12週以降に子宮内胎児死亡(IUFD)の頻度が増えるほど、sIL-2Rの値は増加傾向を示し、逆に12週未満の初期流産の頻度が増えるほど、sIL-2Rの値は減少することを示した¹⁾。また、高ガンマグロブリンM蛋白血症と関節痛を伴う不育症1例について、4回目のIUFDの時sIL-2R値は高かったが、正常児が

得られた時のsIL-2Rの値は低かった¹⁾。この当時のキットの最高濃度の標準試薬の濃度は3,200 U/mlであったが、現在は10,800 U/mlとなり、異常高値による再検査がほとんどなくなった。

EVOLISによるsIL-2Rの測定を平成21年9月より院内で行っているが、臨床サイドからのクレーム等は発生していない。当日2回目以降の測定については、連続測定の結果で標準試薬吸光度が低下していた(図2)ことと庫内温度と測定値の関係(図3)から、機器内の温度が上昇している可能性があるため、基本的には実施しないこととした。もし2回目以降の測定が必要な場合は、EVOLISの電源を一度オフにした後2時間以上放置して、機器内の温度が低下した後に測定することとしている。さらに、機器内の温度は測定に関わらず上昇する可能性があるため、検体や試薬の準備が終わってから機器を立ち上げるようにしている。また、他の項目との同時測定は行わないようにしている。

今回は示していないが旧試薬を用いプレートのすべてのウェルに同じプール血清をおいて測定した場合のODが1列目と2列目で低めの傾向を示すことを経験していた。今回の改良試薬を用いて行った検討においても同じ結果であった。この原因はプレート1, 2列目付近の温度が他の部分に比べて上昇しているためと考えられる。プレートホルダーは外枠の下面が縦約12 mm、横約8 mmの金属製であり、その部分が熱を伝えやすい可能性がある。しかし、11,

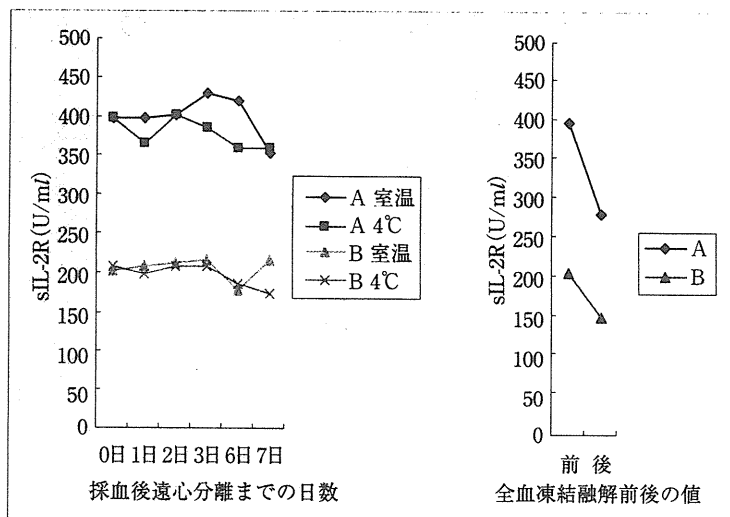


図7 保存条件の違いによる測定値に与える影響

12列には影響がない。この原因の1つに、1列目から12列目に向けてプレートが挿入され、1列目は突き当たりの壁であるため熱が逃げにくく12列目は可動性の薄い蓋であるため熱が逃げやすいことが考えられる。冷却機能がない機器でも、EVOLIS以外の装置では顕著な列間差が認められるという傾向はない²⁾。それらの装置の多くはインキュベーション中の振盪機能を搭載していない装置であるため、検体や試薬のプレート分注後の振盪を利用して、長時間振盪反応を行う。しかしながら、EVOLISの場合は試薬や検体をプレートに分注した後の振盪は、プレート分注エリアで行うが、長時間の振盪はインキュベーターユニット内で行うこととなる。インキュベーターユニットはプレート分注エリアの下部にあるため、熱が逃げる場所がなく、熱がこもりやすくなってしまわないかと思われる。本改良試薬で冷却機能を持つ機器や、マニュアルで測定する限り問題はない。しかし、本改良試薬と同様に振盪反応を行い、温度の影響を受けやすい試薬をEVOLISにて測定する場合は、今回のような方法を用いたほうが望ましいと考える。

測定温度の上昇による測定値に与える影響は、図3で示したように最高濃度の第6標準試薬のOD値が低くなることにより、図2のようにEVOLISで測定する場合、患者測定値は高値を示すことがあると思われる。しかし、温度上昇により測定感度が低下すると考えられるので、むしろ、各濃度でばらつくと考えたほうが良いと思われる。

図7の結果より、血清での保存の場合、室温、4℃ともに7日まで測定値に変化は認められなかった。細胞表面のIL-2Rが血清中に遊離したものがsIL-2Rであるため、完全溶血では、sIL-2Rが上昇すると思われたが、むしろ7割程度低濃度となった。溶血の測定値に与える影響は少ないものと思われる。

本改良試薬とEVOLIS以外の機器での検討では良

い成績を取めている^{3,4)}。BML社の試薬「IL-2Rテスト・BML」と「セルフフリーIL-2Rメデックス」による相関性試験では0.7%において測定値が2倍以上異なる乖離が認められ⁵⁾、異好性抗体⁶⁾による干渉の除去剤の違いによると推測している。今回の検討において、2倍以上異なる乖離が認められる例はなかった。

V 結 論

EVOLISによるsIL-2Rの測定では、EVOLISに冷却機能がないため、機器内の温度が上昇する。そのため温度が上昇しやすいプレートの1、2列目は測定に使用しない、当日2回目以降の測定を実施しない等の工夫が必要であるが、EVOLISによるsIL-2R測定は十分臨床に使用できるものである。

セルフフリーN IL-2R試薬以外にも、振盪反応が必要で温度の影響を受けやすい試薬については同様の工夫が必要になるとと思われる。

なお本文の要旨は、第59回医学検査学会にて発表した。

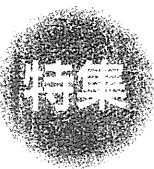
文献

- 1) 宮野 章ほか：血清中の可溶性膜成分(インターロイキン-2レセプター、CD4、CD8)と不育症との関連について、医学検査 1997; 46: 126-129.
- 2) 木田沙緒里ほか：改良血清中インターロイキン2受容体測定試薬「セルフフリーN IL-2R」の評価、日本臨床検査自動化学会会誌 2009; 34: 629.
- 3) 鶴澤耕治ほか：可溶性インターロイキン-2受容体測定試薬「セルフフリーN IL-2R」開発と性能評価、機器・試薬 2009; 32: 551-558.
- 4) 宮永雅代ほか：セルフフリーN IL-2Rキットによる可溶性インターロイキン2受容体測定の基礎的検討、医学と薬学 2010; 63: 905-912.
- 5) 飯沼克弘ほか：可溶性インターロイキン2受容体測定試薬「IL-2Rテスト・BML」の基礎的検討、医学検査 2010; 59: 141-145.
- 6) 大竹皓子、加野象二郎：免疫学的測定法における干渉、検査と技術 1997; 25: 207-213.

産科と婦人科 別刷

Vol. 78 No. 2 (2011年2月1日発行)

発 行 所 株式会社 診 断 と 治 療 社



胎児死亡と胎盤病理

3. 胎盤病理からみた FGR, IUFD

中山雅弘*・桑江優子*・松岡圭子*
大阪府立母子保健総合医療センター検査科*

FGRの原因をできるだけ一元的に解釈しうる総合的な分類を試みた。その分類案を提示し、主たる疾患を解説した。従来から知られている母体・胎盤系の異常や胎盤・臍帯固有の異常とともに、新しい概念として胎児および胎盤循環系の異常を解説した。また、IUFDの胎盤・臍帯所見について示した。剖検とともに、胎盤の病理学的検査が不可欠であり、凍結標本の保存や遺伝子の検索を行えるような対応をすべきである。

Key Words FGR, IUFD, 胎盤病理

FGR (fetal growth restriction) は、母児の異常の発現形と考えられ、その成因を知ることは妊娠中の母児管理に重要である。児の娩出時期、娩出方法を考慮するうえでも必要となる。病態を知ることにより、今後の治療への手がかりとなることも多い。これまでよく知られているFGRの原因を表1に示す。これらは原因というよりリスク因子と解すべきものであり、たとえば、母体に妊娠高血圧症や膠原病あるいは胎児に感染症があってもFGRを伴う時と伴わない症例が存在する。結局、個々の妊娠において、それぞれの因子がFGRに影響を与えたかどうかを判定できるものは胎盤の病理所見である。このような観点で、今回、FGRの原因をできるだけ一元的に解釈しうる総合的な分類を試みた。その分類案を提示し、主たる疾患を解説する。

表1 FGRの原因

母体因子	胎児因子	胎盤臍帯因子
・妊娠高血圧症	・染色体異常	・梗塞
・膠原病	・先天奇形	・血腫
・糖尿病	・胎内感染	・胎盤付着異常
・腎疾患	・多胎	・胎盤剝離
・心疾患		・腫瘍
・高度貧血		・絨毛炎
・子宮筋腫		・臍帯過捻転
・高度栄養失調		・臍帯卵膜付着
・飲酒		・臍帯真結節
・喫煙		
・薬物		

後半では、IUFD (intrauterine fetal death) の胎盤・臍帯所見について示す。通常の剖検とともに、胎盤の病理学的検査が不可欠である。胎盤は胎児の異常を検索するにも重要であり、代謝性疾患などが疑われる時には、胎盤の凍結材

表2 胎盤病理を中心とした IUGR の分類

1. Ischemia and materno-placental disturbance, i. e. infarct
2. Maternal collagen disease and/or coagulation disorder, i. e. fibrin deposition, maternal surface infarct.
3. Placental macroscopic abnormality, i. e. Breus' mole, thrombus, retroplacental hematoma, circumvallate
4. Placental tumor, i. e. chorioangioma, mesenchymal dysplasia
5. Umbilical cord factor, i. e. abnormal insertion, SUA
6. Maternofetal infection, i. e. cytomegalovirus infection
7. Villitis (of unknown origin) or other villous abnormalities including fetal artery thrombosis
8. Immature and/or dysmature villi consistent with fetal anomalies
9. No abnormal placental pathology

料, 先天異常の疾患が疑われる時は, 染色体や遺伝子の検索を行えるような対応をすべきである。

FGR の新たな分類

これまで集積された FGR の検討を行い, FGR と関連する新たな胎盤病変や, FGR 関連病変を整理し, 再分類した¹⁾。表 2 に示す。母体-胎盤系の異常を 1 と 2 に分類した。虚血型とフィブリン型と考えてもよい。肉眼的形態異常として, 胎盤の形態異常・腫瘍・臍帯異常に分類した(分類 3, 4, 5)。子宮内感染症では, CAM は FGR に関与しないと考え, 分類に反映していない。血行性感染症は, サイトメガロ症など, 時に強い FGR を伴うので分類に入れた(分類 6)。胎児側の要因として, 7 と 8 に分類した。絨毛の血管障害型の FGR の存在を認識することは重要である。その病因や予後および次回の繰り返しについて今後検討の必要性がある(分類 7)。染色体異常や多発奇形症候群に伴う絨毛異常は分類 8 とした。胎盤病理で異常が見出せない症例も分類に含めている(分類 9)。

以下に, その亜分類に従って解説する。

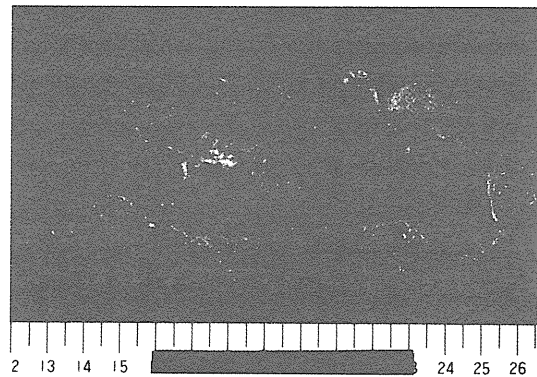


図1 断面で新旧の梗塞を認める虚血型胎盤

母体・胎盤系の異常と FGR

1. 胎盤虚血性病変の肉眼所見

胎盤の虚血性病変では, 胎児も胎盤もともに小さくなる。胎盤の虚血性変化による病変は最も高率である。虚血性病変は, 母体面ではコチルドンの中心に硬化病巣が認められる。断面では, 多発性の梗塞あるいは巨大梗塞を示し, その梗塞の形を断面像で見ると, 母体面を底辺とする 2 等辺 3 角形の形をとる。古い梗塞は白色で, 新しい梗塞は赤黒い(図 1)。胎盤の病変の大きさと FGR との関係について, たとえば血栓や, フィブリンのような基礎に虚血性の変化のない例では, これらの病変が胎盤全体の 1/3 以上を占拠してはじめて胎児に発育遅延が起こるが, 梗塞の場合は, 基礎に虚血性の病変があ

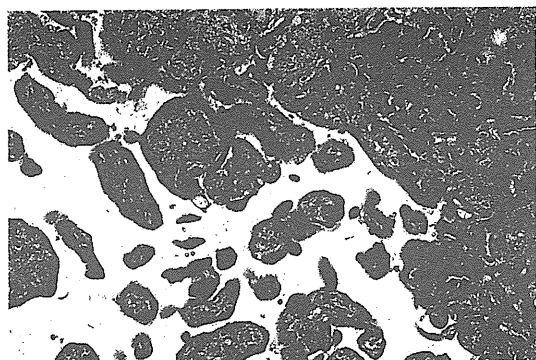


図2 虚血の組織像

小さな合体体結節，中間型トロフォプラストがフィブリン内にみられる。

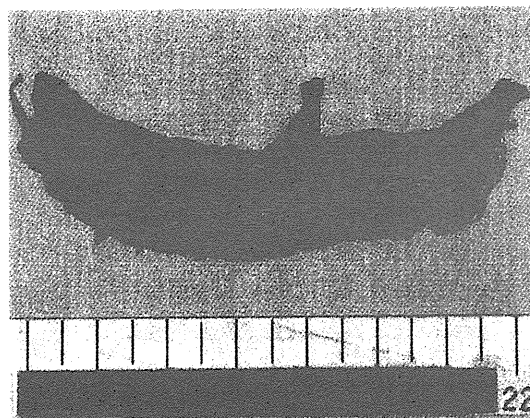


図3 母体面梗塞の肉眼像

厚いフィブリンが瀰漫性に脱着膜側を覆う。

るので，肉眼的な梗塞が約10%を超えると胎児に影響がみられる。

2. 胎盤虚血性病変の組織所見²⁾

組織的には絨毛の壊死とその周辺に合体体結節 (syncytial knots) の増加がみられ (図2)，絨毛周囲にはフィブリンの沈着が強くみられ，その中に intermediate trophoblast の集団がみられる。これらの所見は梗塞が肉眼的に捉えられない部分においても認めうる。重症の妊娠高血圧症候群やその他の虚血性病変を生じる母体合併症 (殊に FGR を伴う時) で確認される⁵⁾。さらに高度になると，絨毛の異形成と顕著な合体体結節 (絨毛の全面から未熟な合体体芽が出芽しているかのような現象) がみられる。強い FGR を伴っている。

3. フィブリン沈着，母体面梗塞³⁾⁴⁾

胎盤内のフィブリンの沈着はその部位により最初の報告者の名が付けられている。たとえば，絨毛膜下のフィブリンは Langhans' striae といい，母体面近くのフィブリンは Nitabuch's fibrin と命名されている。母体面のフィブリンが梗塞を伴う場合に，母体面梗塞 (maternal floor infarction) とよばれ，母体の膠原病や凝固異常症を示唆する所見とされている (図3)。Rohr's fibrin は，胎盤実質内の絨毛間フィブリ

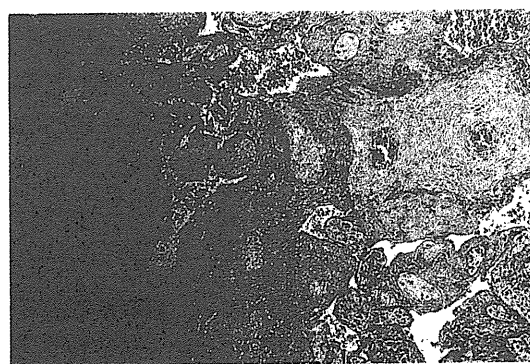


図4 絨毛間にフィブリンが充満して認められる (Rohr's fibrin)

ンの別名であるが，まれにこのフィブリンが広範囲に，時には胎盤の全面に沈着する場合がある (図4)。診断的には，胎盤の剖面が，弥漫性に粗くかつ硬くなっており，2カ所以上とられた切片において前述した Rohr's fibrin がほぼ全面に認められるものとする。母体の膠原病等の関与がみられることもあり，母体血の過凝固状態とも関連しているのではないかと推測している。前期流産症例では，次回も流産が繰り返すかが重要課題である。繰り返す IUFD の例に抗カルジオリピン抗体が高値を示す症例があるが，これらの胎盤では，絨毛の周囲の合体体性栄養膜細胞にフィブリンが沈着し，その部位に

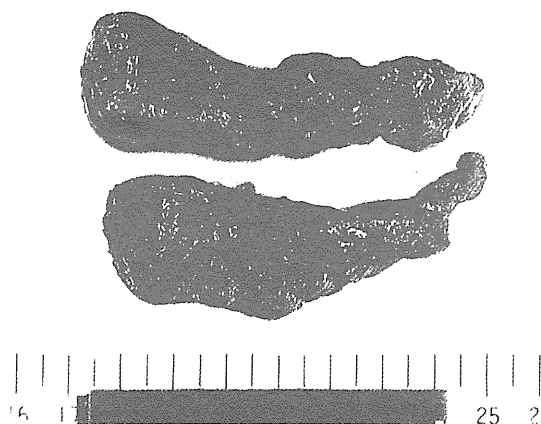


図5 絨毛膜下に巨大血腫があり，胎児面は変形 (Breus' mole)

免疫グロブリンの沈着がみられることが多い。われわれはこれを perivillous fibrinoid change (PVFC) と名付けている。ACA が高値になるほどこの PVFC が頻回に認められる。この像は、いわゆる妊娠高血圧症候群に伴う虚血性病変とは病因論的に違うと考えられる。これらを伴った FGR を分類 2 とした。

胎盤・臍帯固有の異常と FGR³⁾⁴⁾

絨毛膜下血腫には Breus' mole という別名があり、血腫の厚さは通常 2 cm 以上あり、胎児面から見ると凹凸が必ず見える。胎盤全体の厚さもこの Breus' mole の時には非常に厚くなっていることが多い。胎盤早期剥離や辺縁出血などが合併することもあるが、典型例は早剥の時の所見と止血・凝固の検査所見は異なっているようである。子宮内胎児死亡や強い発育遅延をきたす (図 5)。

卵の付着異常と考えられている疾患に有郭胎盤 (circumvallata) と画縁胎盤 (circummarginata) がある。画縁胎盤はよくみかけるものである。剖面の模式図で説明すると胎児血管をもつ絨毛板よりも胎盤実質のほうが長い時にこのような

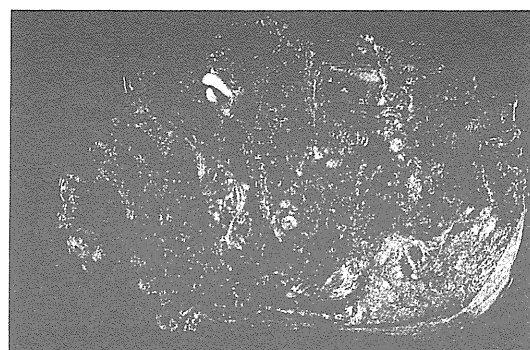


図6 間葉性異形成胎盤の母体面像
多数の囊腫形成あり。

ことが起こる。その時に襞が形成されるものが circumvallata で、襞がないのが circummarginata である。外側の部分には絨毛膜を有さないの、造影剤を注入すると中心部のみに胎児血管が認められる。臨床的に意味のあるのは circumvallata であり FGR および早産の原因となる。

胎盤の腫瘍として最もよくみられるのは血管腫である。小さなものまで取りあげると、500 例に 1 例ぐらいの割合でみつかると、FGR を起こすほどの巨大血管腫はかなりまれである。

部分胞状奇胎と類似する間葉性異形成胎盤 (mesenchymal dysplasia) は、絨毛性疾患の定義に従うと胞状奇胎に分類されるが、ほとんどすべての絨毛内に胎児の血管がみられ、かつトロフォブラストの増殖はないなど、腫瘍性変化の像は乏しく、循環障害を基盤に発生した病変が存在する (図 6)。本例の特徴は以下のごとくである。

1. 一個の胎盤としての形態を備えている。
2. 肉眼的には部分胞状奇胎に類似する。
3. 血管の走行は蛇行し異形成の概観を呈する。
4. 水腫様変化の絨毛には血管がある。トロフォブラストの増殖はない。
5. 絨毛血管内に間葉系の細胞の増生があり、血管内には多発性の血栓がみられる。

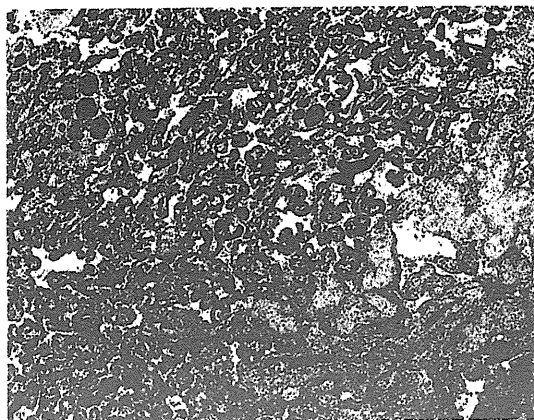


図7 右下に胎児血栓性血管病変, 左上は血管腫症 (chorangiosis) が認められる

6. 胎児はFGRであることが多いが, 奇形はない。

臍帯の付着異常に膜付着と辺縁付着と側方付着があるが, 膜付着は1番影響が強く, 次いで辺縁付着で, 側方付着は臨床的な意義はほとんどない。恐らく膜部・辺縁部で胎児血流が障害されて胎児発育が障害されるものと推測される。

胎児および胎盤循環系の異常とFGR

絨毛炎は, 以前より原因不明と冠されて用いられてきた—villitis of unknown etiology (VUE)。リンパ球や組織球様の細胞の浸潤があり, 絨毛の変性・破壊がみられる。このVUEはFGRと非常に密に相関する。VUEの症例は34週以降のFGR児が特に多い。母体には感染症の所見はみられず, 絨毛膜羊膜炎とも関係しない。最近の見解では免疫反応の結果であるといわれている。VUEで絨毛に浸潤している細胞は, XあるいはY染色体に対するin situ hybridizationの結果から見て母親由来であり, 表面抗原からはCD3, CD4陽性のT細胞であり, B細胞は存在しない⁵⁾⁶⁾。その他に活性化マクロファージが認められる。しかし, これまでの検討から, 絨毛炎は種々の現象の結果を示してい

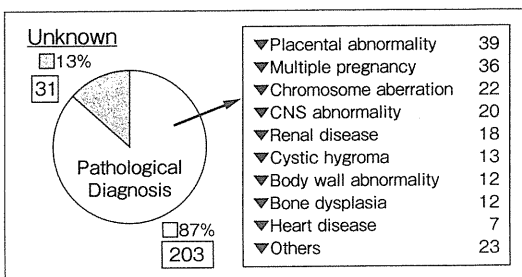


図8 当科の死産の原因別分類

るにすぎないような印象がある。重要な点は, 胎児の絨毛に起因するFGR症例が少なからず存在し, 現在のところ原因不明のことが多い症例を胎盤病理所見で確認し多数の例を検討することにより原因究明に努めることであると考え

る。

このタイプを胎児循環障害型FGRと名付けるが, 以下のような似通った特徴を示す(図7)。

1. 高度のFGRを伴うことが多い。
2. 妊娠高血圧症候群は通常伴わない。
3. 肉眼所見は, 小さいだけのことが多いが, 時には梗塞がみられる。
4. 無血管絨毛が多発性に存在し, この部分で絨毛炎を伴うことが多い。
5. 周辺では, 逆に血管腫症 (chorangiosis), あるいは高度の鬱血がある。
6. 虚血性の変化がない。

IUFDの主たる胎盤・臍帯異常

当科における最近の死産剖検例の結果を示す(図8)⁷⁾。胎盤異常と多胎で全体の約4割を占める。胎盤異常の内訳を示す(表3)。羊膜索症候群と臍帯異常が約半数を占める。以下に頻度の高い疾患につき, 簡単に解説する³⁾⁴⁾⁸⁾

1. 羊水異常とIUFD

羊水過少と関係する例を述べる。羊膜結節は胎児面に認められる小結節であり, 胎盤全体に分布する。非常に強くこすればはがれる。組織

表3 胎盤異常の内訳

Placental abnormality (39 cases)	
Amniotic band syndrome	10
Umbilical cord abnormality	9
Placental inflammation (Chorioamnionitis)	5 (4)
Abruptio placentae	5
Ischemia/Thrombosis	5
Others	5

学的には羊水中の浮遊物が羊膜に埋没しているものであり、炎症細胞はまったく関与していない。破水後の期間と羊膜結節の出現を見てみると1週間まではほとんどみられない。破水後、1週間を超えると約20~30%の例に羊膜結節の出現を見る。

妊娠前期の羊水過少が関連すると考えられているものに羊膜索症候群がある。このような例の胎盤では多数の強靱な索状物が胎盤表面から出ているのが認められる。索状物のみられる所は卵膜が重複し、襞状になっていることもあり、妊娠前期の羊水の急激な減少が関係しているのかもしれない。

2. 子宮内感染症とIUFD

子宮内感染症は血行性と上行性(経膈性)感染症に大きく分けられる。血行性感染症は母体から胎盤の実質部を経由して胎児へ感染するので胎盤の実質がその検索の中心になる。サイトメガロ症や梅毒、結核などがその代表例である。一方、上行性感染症は羊水中の感染症であるので、胎盤表面の絨毛膜・羊膜や臍帯が主たる炎症の場となる。胎盤の表面は最表層が羊膜でその下の血管が通っている層が絨毛膜である。したがって、上行性感染症はCAMとよばれる。血行性感染症では、しばしばIUFDも起こりうる。CAMではIUFDは珍しいが、まれには起こりうる。このような時には、母体の糖尿病やその他の合併症の有無を検索する必要もある。

3. IUFDと胎盤の形態異常

胎盤早期剥離は妊娠末期のみならず、中期にはしばしば、時には前期においても認められるものである。胎盤後血腫を注意深く観察することにより、大部分の早剥は胎盤からの診断が可能である。剖面では脱落膜に変形がみられることもあり、また、貧血と鬱血がコチルドンごとに交互にみられるのも特徴的である。胎盤後血腫を診断する時にガーゼなどで丁寧に血腫の部分を拭き取ることが必要で、意味のある胎盤後血腫ならば必ず脱落膜内の出血と連続している部分がみられる。

Breus' moleは、IUFD、FGR、早産と関連する。剖面では巨大な絨毛膜下出血が認められる。

4. IUFDと臍帯異常

臍帯の血栓症は、これまであまり認識されていないが、まれなものでなく当科の統計においても重要な原因となっている。母体糖尿尿は時に胎児の突然死をきたすことがあるが、血栓症が関係していると考えられる。胎盤実質内でも血栓症の頻度が高いが、胎児にも血栓形成があり重篤な結果をきたす。

臍帯過捻転では、局所的にWharton膠質が欠乏し、過捻転と絞扼が認められる。絞扼かどうかわかりにくい時には造影剤を臍帯の血管から注入して観察すれば、静脈でブロックされているのが認められる。

5. 双胎とIUFD

多胎死亡の内訳を示す(表4)。双胎間輸血がその多くを占める。胎盤の病理所見と臨床経過の相関関係を示す(表5)。双胎の一児が子宮内で死亡する時に、一絨毛性の胎盤であると他児にも多臓器不全をきたすことが知られてきた。この症例も最近では、急性の双胎間輸血症候群であろうと考えられている。

6. 繰り返す流早産

前期流産症例では、次回も流産が繰り返すかの問題が重要課題である。繰り返すIUFDの例

表4 双胎における胎盤異常の内訳

Multiple pregnancy (36 cases)	
TTS	19
TTS in triplet	3
MM twin	4
Conjoined twin	4
Triplet	3
MD twin, acardius	3

に抗カルジオリピン抗体が高値を示す症例があるが、これらの胎盤では、絨毛の周囲の合体体性栄養膜細胞にフィブリンが沈着し、その部位に免疫グロブリンの沈着がみられることが多い。われわれはこれを perivillous fibrinoid change (PVFC) と名付けている。ACA が高値になるほどこの PVFC が頻回に認められる。この像は、いわゆる妊娠高血圧症に伴う虚血性病変とは病因論的に違うと考えられる。

胎盤から習慣性流産が窺われる所見として、Rohr's fibrin がある。これは絨毛間のフィブリンが、広範囲に、時には胎盤の全面に沈着する。胎盤は全体に固く、貧血状で、実質臓器の様相を呈する。数カ所から標本を作成し、絨毛間にフィブリンが瀰漫性に沈着しているのを確認する。

おわりに

FGR と関連する胎盤の血管病変は、種々の問題を含んでいる。栄養膜細胞の浸潤と血管病変の成り立ちは極めて興味深い。まだまだ不明な点が多い。将来、栄養膜細胞の浸潤等に関する知見から、妊娠高血圧症や FGR の予防へと研究が進むことを期待したい。新たに提唱した胎児血管障害型 FGR に関しては、その病因や予後に関して知見も乏しく、また近年増加している印象もある。

IUFD の研究においても FGR の合併の有無、その病態など胎盤病理を含めて検討することに

表5 MD 双胎の吻合型と臨床診断

1. 胎盤内動脈	動脈吻合は正常である
2. 双胎間輸血症候群	動脈—動脈吻合以外のどの形もあり 胎児面の太い血管吻合の欠如例が多い 共有するコチルドン内に太い動脈静脈吻合
3. 胎内一児死亡	静脈—静脈吻合のことが多い 急性の TTS であった可能性
4. 無心体の胎盤	一絨毛—羊膜と一絨毛二羊膜の場合 両児の臍帯は非常に近接、起始部で合流
5. 結合体児の胎盤	一絨毛—羊膜、臍帯は1本または2本

より新たな展望がみられることを期待する。生後のキャッチアップは今回触れなかったが、胎盤未熟・異形成型や虚血型が悪く、このような点でも今後総合的な解析が望まれる。

● 文 献

- 1) 中山雅弘：胎盤からみた子宮内胎児発育遅延 (FGR) — FGR 胎盤の新しい組織学的分類の試み—産婦治療 2005；90：263-268.
- 2) 中山雅弘：子宮内胎児発育遅延 (FGR) の胎盤病理 産婦の実際 1997；46：1987-1994.
- 3) Benirschke K, Kaufmann P：The pathology of the human placenta., Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2000.
- 4) 中山雅弘：目で見える胎盤病理学。医学書院 2002.
- 5) Redline RW, Patterson P：Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissue by maternal inflammatory cells. Am J Pathology 1993；143：473-479.
- 6) Altshuler G：placental pathology clues for interdisciplinary clarification of fetal disease. Trophoblastic research 1999；13：511-525.
- 7) 竹内 真, 中山雅弘：周産期死亡の原因—死産の原因はどこまで明らかにできるのか—。Neonatal Care 2002；15：119-125.
- 8) 中山雅弘：胎児・新生児疾患と胎盤。日本新生児学会雑誌 1992；28：7-12.

著者連絡先

〒594-1101
大阪府和泉市室堂町 840
大阪府立母子保健総合医療センター 検査科
中山雅弘

第3世代のwaveletと独立成分分析による
心電図・心磁図の解析

石川康宏 堀畑 聡 堀米仁志
戸田 浩 章 忠

● シンポジウム

第3世代のwaveletと独立成分分析による心電図・心磁図の解析

石川康宏¹⁾ 堀畑 聡²⁾ 堀米仁志³⁾
戸田 浩⁴⁾ 章 忠⁴⁾

- ¹⁾ 石川医院(さいたま市)
(〒338-0004 さいたま市中央区本町西 1-3-16)
²⁾ 日本大学歯学部数理学教室
³⁾ 筑波大学人間総合科学研究科・小児内科学
⁴⁾ 豊橋科学技術大学機械工学系

Analysis of ECG and MCG by ICA and the third generation wavelet transform

Yasuhiro Ishikawa¹⁾, Satoshi Horihata²⁾,
Hitoshi Horigome³⁾, Hiroshi Toda⁴⁾,
Zhong Zhang⁴⁾

- ¹⁾ Ishikawa Medical Clinic (Saitama-City)
²⁾ Department of Dentistry, Nihon University
³⁾ Department of Child Health, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba
⁴⁾ Department of Production System Engineering, Toyohashi University of Technology

Key words

the third generation wavelet transform
independent component analysis
fetal magnetocardiogram
fetal electrocardiogram
late potential

§ 抄録

離散ウェーブレット変換(DWT)は, Daubechiesの第1世代のDWTに始まり, Sweldensによるリフティング理論による第2世代のDWTを経て, 現在, 戸田, 章の考案した時間周波数密度を可変可能にする完全シフト不変・複素数離散ウェーブレット(第3世代)と進化している. 従来のDWTの致命的な欠陥に, シフト不変性の欠如がある. われわれは, この問題を解決した完全シフト不変性(PTI)を基礎に, 時間周波数密度を可変可能にする新しい離散ウェーブレット(VD-PTI)を提案している. 心臓のリズムの特性である心拍変動は, シフトそのものと考えられるので, 心電図・心磁図にVD-PTIの応用を試みた. 独立成分分析(ICA)により抽出した胎児心磁図, 胎児心電図のノイズ除去にPTIを応用した例, Brugada症候群の心電図や心筋梗塞後VTがみられた症例や, 催不整脈性右室形成不全の加算平均心電図の心室遅延電位をVD-PTIで解析したパイロット・スタディーから, 不整脈などの心電図の解析にVD-PTIは有望であると考えられる.

§ はじめに

心拍にはある範囲で揺らぎ(心拍変動)がみられる. また, 不整脈においてもP波, QRS, T波とも揺らぎを認める. これらはシフトそのものと考えられる. さて, Daubechiesの第1世代および, Sweldensによる第2世代の離散ウェーブレット変換(DWT)での致命的な欠陥であるシフト不変性の欠如によって, 心電図・心磁図のノイズ除去の際に, 振幅の小さなP波は, ある箇所では削り取られ, ある箇所では温存されるという現象や同じ形態のR波, T波などでも場所によって変形するという現象が起こる. 戸田, 章の考案した時間周波数密度を可変可能にする完全シフト不変・複素数離散ウェーブレット(第3世代)¹⁾は, これらの問題を解消できる可能性があると考えられる.

§ 方法と結果

第3世代のウェーブレットについて

図1は, 従来のウェーブレットの致命的な欠陥であるシフト不変性の欠如についての例示である. インパルスの位置を1データずつ右にずらした時のDaubechies 6(古典的なウェーブレット)の多重解像度解析(MRA)のレベル-3の逆変換(インパルス応答)が図1Aのグラフである. 同じ入力インパルスであっても1データずつずらしたことで, 位置が異なると各々は, まったく異なる形態を示している. 図1Bは, 各レベルでのインパルス応答のエネルギーの変化を示している. レベル-3では, 最大で70%にも及ぶ. 図1Bの左下に同じエネルギーレベルで黒い星印と白い

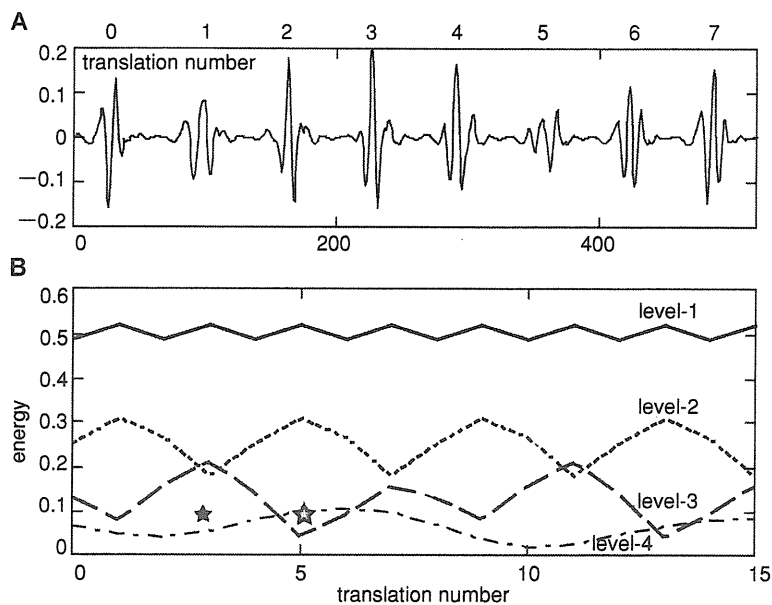


図1 古典的なウェーブレットでのシフト不変性の欠如
 A : Daubechies 6のMRAのレベル-3でのインパルス応答. 同じインパルスでも, 1データ分ずつ位置をずらしただけで, まったく形態が異なる.
 B : インパルス応答のエネルギーの変動を示す. レベル-3では最大で70%に及ぶ. もし, 左下の2つの星印がP波であるとする, ノイズ除去で一方は残存し他方は失われる可能性がある.

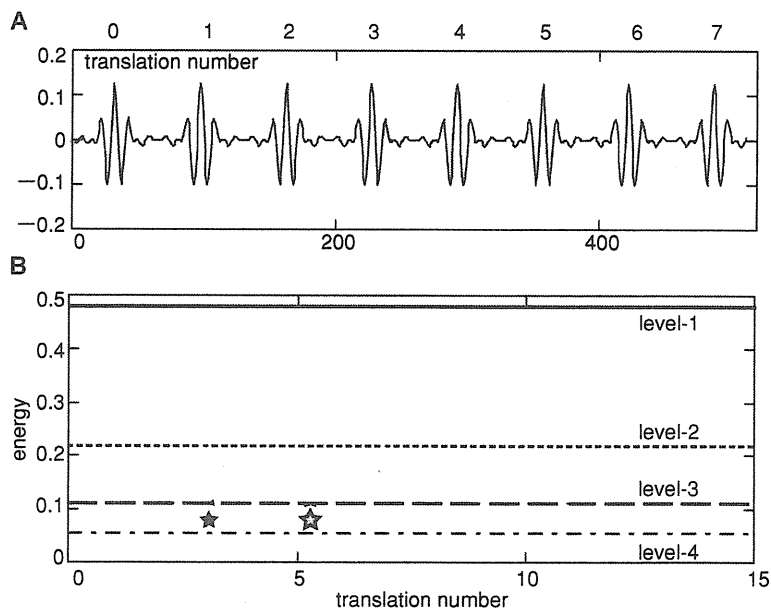


図2 完全シフト不変・複素数離散ウェーブレット(PTI)ではシフト不変性を有する
 A : PTIのMRAのレベル-3でのインパルス応答. 同じインパルスを1データ分ずつ位置をずらしても形態は不変.
 B : インパルス応答のエネルギーは位置により変動を認めない. もし, 左下の2つの星印がP波であるとする, 位置の違いでノイズ除去により一方だけが失われる可能性はない.

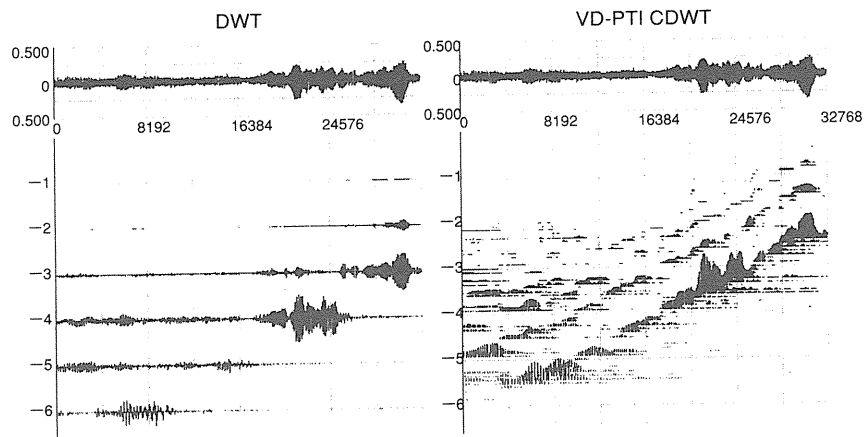


図3 従来の離散ウェーブレット変換(DWT)と第3世代のウェーブレット(VD-PTI CDWT)のMRAでの比較
「チゴインルワイゼン」の一部を解析. VD-PTIはシフト不変性を有し, かつ, 時間・周波数密度が可変可能である.

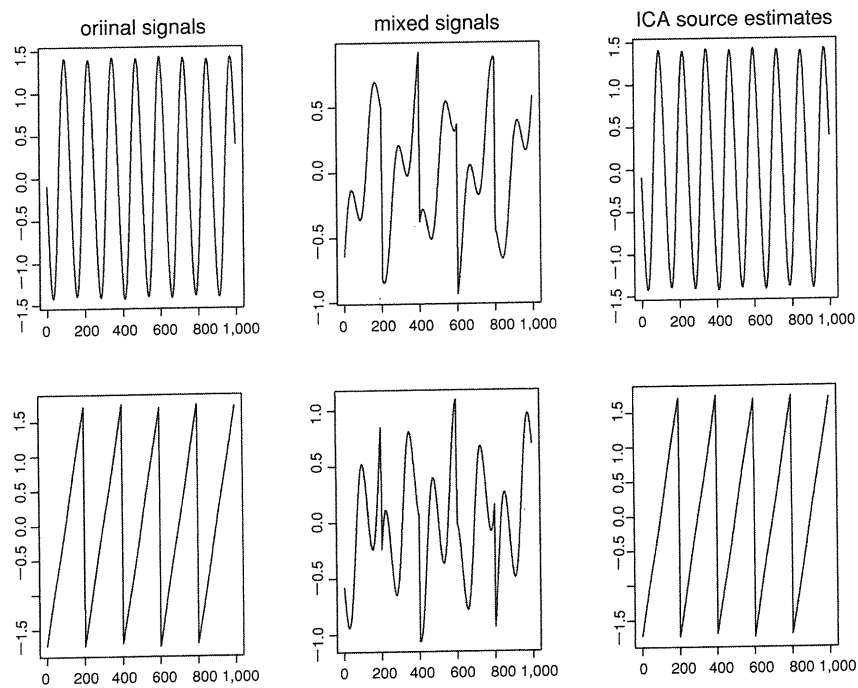


図4 ICAのサンプル
左の2つのグラフは元の信号源(original signals)S. 中央は元の信号源を混合した2つの観察データ(mixed signals)X. 右の2つのグラフはICAによる元の信号源の推定値(ICA source estimates).

星印を置いた. もし, これがP波であるとすればウェーブレットによる閾値法でノイズ処理を施せば, 片方は温存され, 片方は消去される可能性が生ずる.

図2 Aは, 完全シフト不変・複素数離散ウェーブレット(PTI)のMRAである. 図1と同様にインパルス

の位置を1データずつ右にずらしても, レベル-3のインパルス応答が同じ形態であることを示している.

図2 Bではインパルス応答のエネルギーに変動がないので, 図2 Bの左下の黒い星印と白い星印はノイズ処理で一方だけ失われる可能性はない.

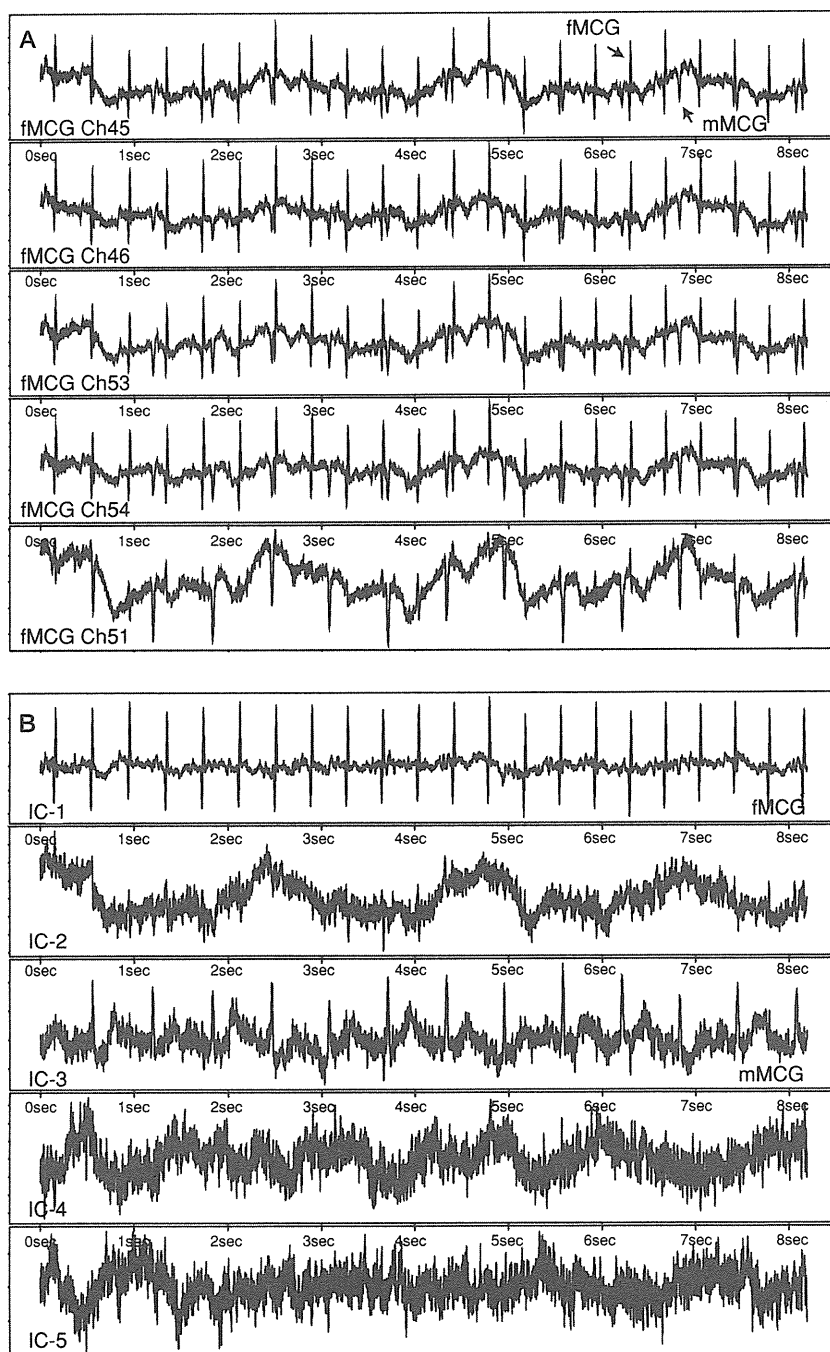


図5 母体心磁図を混入したfMCGのJADEによる分離
 A : ICA前のfMCGで、母体心磁図の混入がみられる。
 B : ICA後のグラフ。下から5段目にfMCGが分離され、母体心磁図は下から3段目に認める。

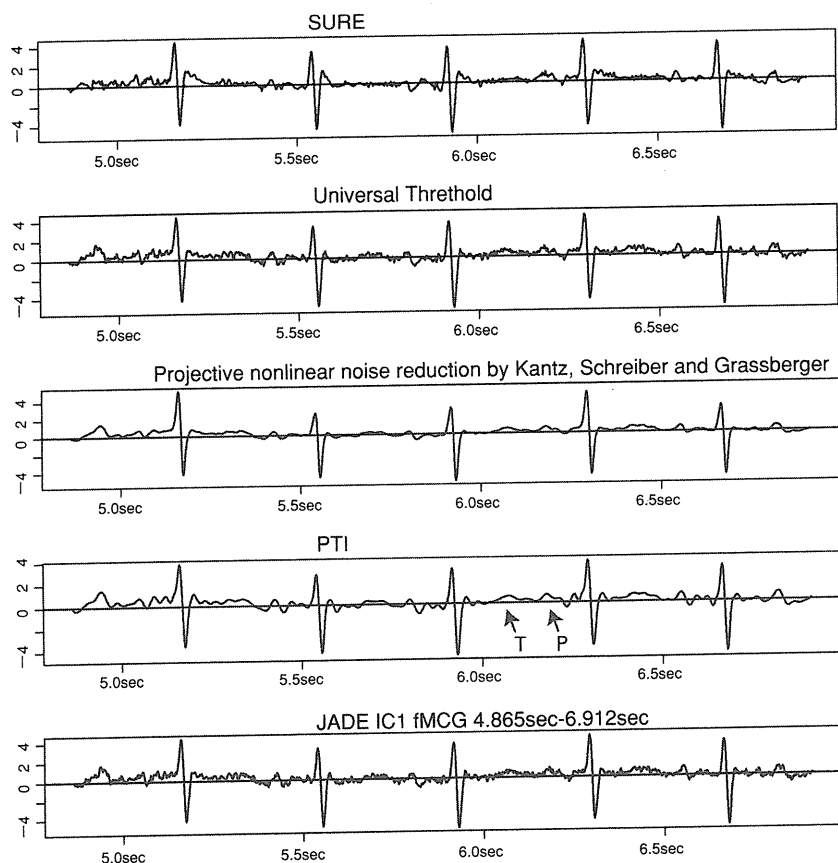


図6 PTIでのノイズ除去と代表的なwaveletによるノイズ除去法, Kantzらの非線形ノイズ除去法のfMCGの波形の比較
 最上段はSURE法. 上から2番目がUniversal Threshold法. 3番目のグラフは, KantzらのProjective nonlinear noise reduction. 最下段の5番目のグラフは図5で分離されたノイズ除去前のfMCG. 4段目のグラフがPTIでノイズ除去後のfMCG. PTIではノイズ除去前のfMCGと比べ, pQRSTの波形が明瞭で矢印で示したごとく, P波やT波も形態の変動が少ない.

図3は, バイオリン音楽「チゴイネルワイゼン」の一部を解析したものである. 左側が従来の離散ウェーブレット変換(DWT), 右側が12分割のVariable Density Perfect Translation Invariance Complex Discrete Wavelet Transform(VD-PTI CDWT)による変換である. 第3世代のウェーブレット(VD-PTI CDWT)では, 時間・周波数密度が可変可能となり, オクターブを整数で分割することが可能である.

独立成分分析について

独立成分分析(ICA)は, 多チャンネルで観察された信号から, 統計学的に独立という性質のみに注目して, 元の信号源を分離する新しい多変量解析の方法である. ICAには多くのアルゴリズムが知られているが, 本研究のノイズ除去では, キュムラントテンソル固有

値分解法に基づくJADE²⁾を使用した. ICAについて図4に示すように, 観察されたデータ(Observed data, Mixed Signals)Xから, 統計的に独立であるという性質を利用して, 元の信号源(original signals)Sを推定(ICA source estimates $Y = AX$)する新しい多変量解析の方法である.

胎児心電図³⁾⁴⁾は, 非侵襲的に母体腹壁より採取した. 胎児心磁図(fMCG)⁵⁾は, 超伝導量子干渉素子(SQUID)を用いた64チャンネルの超高感度センサーを持つ計測機器(日立製作所)にて採取した.

図5Aの5つのグラフは, fMCGの例であるが, とくに母体心磁図の混入することがある. 64チャンネルの内の5チャンネルを提示している. 最上段の右下に上向きの矢印で示したのが母体QRS, 下向きの矢印は胎

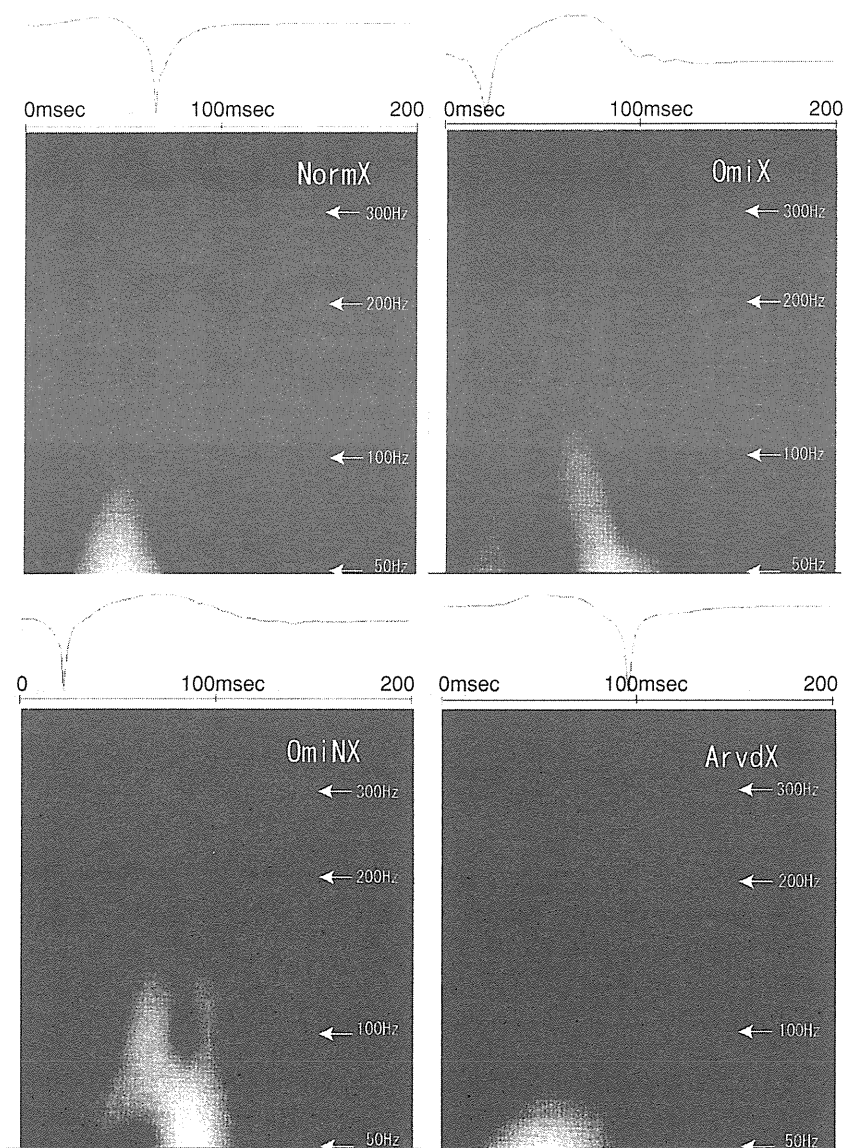


図7 加算平均心電図のX軸方向のQRS波後半のmorlet powerによる連続ウェーブレットの画像(対数表示)
 NormXは正常例. OmiXは心筋梗塞後VTが出現した症例. OmiNXは心筋梗塞後VTを認めない症例. ArvdXは催不整脈性右室形成不全の症例.

児QRSを示している. 図5Bの5つのグラフは, ICAの代表的な方法の1つであるJADEを施行した結果である. 図5Bのグラフの最上段にfMCGが得られ, 下から3段目のグラフには母体心磁図が得られている.

図6は, 代表的なwaveletによるノイズ除去であるSURE法(最上段), Universal Threthold法(上から2段目), KantzらのProjective nonlinear noise reduction(上から3つめのグラフ)とPTIによるノイ

ズ除去後のグラフ(4段目)と図5のノイズの含まれたfMCG(最下段のグラフ)の2.048秒間の比較である. SURE法, Universal Threthold法にはノイズが含まれるのと同時にP波やT波の形態の変動が大きい. KantzらのProjective nonlinear noise reductionでは, ノイズが少なく, P波とT波の形態もかなり類似しているが, 1つのパラメータについて試行錯誤での設定が必要なうえ, 計算に時間がかかる. 上から4番目の