

K-ras mutation (3), β -catenin mutation (4), IGF over-expression (8,9), and MSH3 and MSH6 mutations (45). Moreover, it might be that several factors regulate PTEN expression in endometrial carcinoma. It was reported that ribonucleotide reductase M1 is able to up-regulate PTEN expression (46), and progesterone and estrogen were recently shown to be involved in PTEN regulation (47).

From a clinical aspect, it was very important that reduced PTEN staining was significantly related to the advancement of disease staging in the G1 and G2 group. In addition, a p53 abnormality was significantly related to poor prognosis in the G1 and G2 group, despite the fact that frequency was very low (9%). In contrast, in the G3 and others group, cases without p53-positive staining have better prognoses than cases with p53-positive staining. We previously demonstrated that in advanced cancer, tumors with p53 abnormality frequently showed p53-negative staining (48). These tumors always have a homozygous deletion of p53 gene or truncation protein-producing mutation. These tumors sometimes showed aggressive behavior when compared to tumors with missense mutated-p53, which showed p53-positive staining in immunohistochemistry. Thus, in the G3 and others group, p53-negative cases may have included such aggressive tumors, and showed poor prognosis.

In conclusion, both PTEN and p53 staining may be good indicators of clinical stage and probability of tumor recurrence in endometrial carcinoma. For women wishing to preserve their uterus, especially those who have not yet had a baby, it is a very serious decision when gynecological oncologists recommend hysterectomy. As an alternative treatment, curettage of endometrial tissue with or without hormonal therapy may be selected for patients at an earlier clinical stage. We would like to propose that immunohistochemistry for PTEN and p53 in biopsy specimens of endometrial carcinoma can provide supportive information for determining a treatment plan.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan. We would like to thank Ms. Chiaki Matsuyama-Sato, Ms. Ayako Shimizu, Ms. Takako Ohtsuki, and Ms. Midori Matsuura for their excellent technical assistance.

References

1. http://www.cdc.gov/cancer/npctr/uscs/2000/cancer_incidence.htm
2. Matias-Guiu X, Catusas L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Muñoz J, Argüelles R, Machin P and Prat J: Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 32: 569-577, 2001.
3. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL and Shibata DK: Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 54: 1604-1607, 1994.
4. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S and Hirohashi S: Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 58: 3526-3528, 1998.
5. Soyoola EO and Patillo RA: PTEN/MMAC1 mutations correlate inversely with an altered p53 tumor suppressor gene in gynecologic tumors. *Am J Obstet Gynecol* 188: S33-S36, 2003.
6. Maeda K, Tsuda H, Hashiguchi Y, Tamamoto K, Inoue T, Ishiko O and Ogita S: Relationship between p53 pathway and estrogen receptor status in endometrioid-type endometrial cancer. *Hum Pathol* 33: 386-391, 2002.
7. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG and Garrett CT: Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 54: 4667-4670, 1994.
8. Lukanova A, Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Micheli A, Arslan AA, Rinaldi S, Muti P, Lenner P, Koenig KL, Biessy C, Krogh V, Riboli E, Shore RE, Stattin P, Berrino F, Hallmans G, Toniolo P and Kaaks R: Prediagnostic levels of C-peptide, IGF-I, IGFBP -1, -2 and -3 and risk of endometrial cancer. *Int J Cancer* 108: 262-268, 2004.
9. Hale GE, Hughes CI and Cline JM: Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal window of risk, and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3-15, 2002.
10. Silverberg SG: Tumors of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease. In: *Atlas of Tumor Pathology*. Vol. 3. Armed Forces Institutes of Pathology, Washington DC, pp47-89, 1991.
11. Sherman ME: Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 13: 295-308, 2000.
12. Kurman RJ, Kaminski PF and Norris HJ: The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of 'untreated' hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 56: 403-412, 1985.
13. Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15: 10-17, 1983.
14. Deligdisch L and Cohen CJ: Histologic correlates and virulence implications of endometrial carcinoma associated with adenomatous hyperplasia. *Cancer* 56: 1452-1455, 1985.
15. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Hittmann M, Giovanella BC, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH and Parsons R: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947, 1997.
16. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C and Parsons R: Germ-line mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16: 64-67, 1997.
17. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A and Futreal PA: Mutation of the PTEN tumoursuppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res* 58: 2500-2503, 1998.
18. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ and Ellenson LH: PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 58: 3254-3258, 1998.
19. Sun H, Enomoto T, Fujita M, Wada H, Yoshino K, Ozaki K, Nakamura T and Murata Y: Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 115: 32-38, 2001.
20. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A and Barrett JC: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57: 4736-4738, 1997.
21. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akesima R and Terakawa N: Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 7: 892-895, 2001.
22. Terakawa N, Kanamori Y and Yoshida S: Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Related Cancer* 10: 203-208, 2003.
23. Depowski PL, Rosenthal SI and Ross JS: Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 14: 672-676, 2001.
24. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC and Berchuck A: PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 4: 3005-3010, 1998.
25. Maxwell GI, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC and Berchuck A: Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol* 97: 417-422, 2001.
26. Salvesen HB, Stefansson I, Kalvenes MB, Das S and Akslen LA: Loss of PTEN expression is associated with metastatic disease in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 94: 2185-2191, 2002.
27. Amundson SA, Myers TG and Fornace AJ Jr: Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17: 3287-3299, 1998.
28. Evan G and Littlewood T: A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322, 1998.

29. Burton JL and Wells M: Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium (Review). *Histopathology* 33: 297-303, 1998.
30. Terlikowski S, Lenczewski A, Famulski W, Shulkowska M, Dobrzycka B, Stasiuk-Barmuta A and Kulikowski M: Patterns of immunohistochemical staining for p53 expression in hyperplastic endometrium and adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 39: 195-196, 2001.
31. Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, Walsh C, Dao S, Ngai I, Chou TC, O-charoenrat P, Levine AJ, Rao PH and Stoffel A: p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* 16: 984-993, 2002.
32. FIGO Stages-1988 revision. *Gynecol Oncol* 35: 125-127, 1989.
33. Sakurada A, Hamada H, Fukushima S, Yokoyama T, Yoshinaga K, Furukawa T, Sato S, Yajima A, Sato M, Fujimura S and Horii A: Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int J Oncol* 15: 1069-1074, 1999.
34. Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA, Heitz PU and Eng C: Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* 157: 1097-1103, 2000.
35. Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Recht LD, Nabi R, Miller SJ, Ohta S, Neel BG and Ross AH: A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* 20: 1404-1413, 2000.
36. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK and Eng C: Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 99: 63-67, 2002.
37. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H and Eng C: Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 156: 1693-1700, 2000.
38. Fujii S, Fujimori T and Chiba T: Usefulness of analysis of p53 alteration and observation of surface microstructure for diagnosis of ulcerative colitis-associated colorectal neoplasia. *J Exp Clin Cancer Res* 22: 107-115, 2003.
39. Sakai T, Furihata T, Kawamata H, Omotehara F, Shinagawa Y, Imura J, Kubota K, Terano A and Fujimori T: Molecular and genetic characterization of a non-metastatic human esophageal cancer cell line, T.Tn expressing non-functional mutated p53. *Int J Oncol* 21: 547-552, 2002.
40. Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, Asaka K, Fujimori T, Maeda S and Saitoh Y: p53 protein expression and prognosis in gallbladder carcinoma and premalignant lesions. *Hepato-gastroenterology* 43: 521-526, 1996.
41. Shinagawa Y, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Hoque MO, Furihata T, Horiuchi H, Imai Y, Fujimori T and Fujibayashi T: Evaluation of the chemosensitivity of head and neck cancer cells based on the diverse function of mutated-p53. *Int J Oncol* 22: 383-389, 2003.
42. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N and Gotoh Y: Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 277: 21843-21850, 2002.
43. Su JD, Mayo LD, Donner DB and Durden DL: PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment. *Cancer Res* 63: 3585-3592, 2003.
44. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S and Mak TW: Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8: 317-325, 2001.
45. Kuismanen SA, Moisio AL, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Nyström-Lahti M and Peltomäki P: Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol* 160: 1953-1958, 2002.
46. Gautam A, Li ZR and Bepler G: RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* 22: 2135-2142, 2003.
47. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Al-Rejjal R, Zheng W, Luleci G and Arici A: Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5017-5026, 2003.
48. Inaba F, Kawamata H, Fukasawa I, Inaba N and Fujimori T: Chemoresistance of cancer cells: oncogenic mutation of the p53 tumor suppressor gene. *Curr Pharm Design* (In press).

Inhibitory effects of herbal drugs on the growth of human ovarian cancer cell lines through the induction of apoptosis

Kun Zhu^{a,*}, Ichio Fukasawa^a, Makiko Furuno^a, Fujiyuki Inaba^a, Tatsuo Yamazaki^a,
Tetsu Kamemori^a, Nobuaki Kousaka^a, Yoriko Ota^a, Masatoshi Hayashi^b,
Toshiyuki Maehama^c, Noriyuki Inaba^a

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kita-Kobayashi, Mibu, Shimotsuga, 321-0293 Tochigi, Japan

^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, Saitama, Japan

^cDepartment of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

Received 25 August 2004

Available online 24 March 2005

Abstract

Objective. In order to develop and search for more effective and safe treatments for early and advanced stages of ovarian cancer, we examined the direct effects of four extracts of Chinese herbal drugs on ovarian cancer cells in vitro.

Methods. The growth inhibition of four herbal drugs on a total of six cell lines of human ovarian cancer cells was determined by a Cell Counting Kit-8 by counting viable cells. Apoptotic cells induced by herbal drugs were detected by using MEBCYTO Apoptosis Kit. All experiments were performed in triplicate. The significance of the difference was analyzed with a two-sided Student's *t* test. A *P* value less than 0.05 was accepted as statistically significant.

Results. The MN, A2780, and KF cell lines exhibited significant growth inhibition in the presence of Sho-saiko-to concentrations of 150 µg/ml, 300 µg/ml, and 500 µg/ml, respectively, and at the concentration of 1000 µg/ml, Sho-saiko-to demonstrated a significant apoptotic induction effect on all six kinds of ovarian cancer cell lines. This concentration is the same as the blood concentration attained when 7.5 g of Sho-saiko-to per day is orally administered and all absorbed.

Conclusions. Sho-saiko-to exhibited significant growth inhibition of ovarian cancer cell lines, and the mechanisms of the inhibitory effects can be attributed, in part, to apoptosis induced by Sho-saiko-to.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Herbal medicine; Sho-saiko-to; Human ovarian cancer cell lines; Inhibitory effects; Apoptosis; Necrosis

Introduction

Ovarian cancer causes more deaths per year than any other cancer of the female reproductive system. In Japan, there has been a steady increase in newly diagnosed patients with ovarian cancer and patients dying from this disease in recent years. The currently used chemotherapy is relatively effective against ovarian cancer, but because of side effects or resistance to chemotherapeutic agents, the 5-year survival

rate has not been dramatically improved. Consequently, the development and search for more effective and safe treatment modalities and/or adjuvant therapies for early and advanced stages of the disease have now become important research targets.

The use of Chinese herbal drugs, which have been used in China for thousands of years, has now been increasing in recent years [1] because of their safety and few side effects. Some herbal drugs have been reported to possess chemotherapeutic effects. For example, *Scutellaria baicalensis* exhibits effective anticancer activity on head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo [2], and *Euphorbia fischeriana* has inhibitory effects on the human prostate LNCaP cancer cell line [3].

* Corresponding author. Fax: +81 282 86 6856.

E-mail addresses: k-zhu@dokkyomed.ac.jp, i-fuka@dokkyomed.ac.jp (K. Zhu).

However, there are few reports published on potential effects of herbal drugs on ovarian cancer. In this study, we examined the direct effects of four Chinese herbal drugs on ovarian cancer cells *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the effects of herbal drugs on the proliferation of cultured ovarian cancer cells *in vitro* and investigate their mechanism of action.

Materials and methods

Chemicals and drugs

The powder forms of four kinds of herbal medicine (Sho-saiko-to, Hochu-ekki-to, Juzen-taiho-to, and Ninjin-yoei-to) were obtained from Tsumura Co. (Tokyo, Japan) and were dissolved in RPMI 1640 medium up to 5000 µg/ml, vortexed at room temperature for 1 min, and incubated under rotation at 37°C for 1 h. These solutions were centrifuged at 5000 rpm for 5 min to remove any insoluble ingredients. The supernatants were passed through a 0.22-µm filter for sterilization.

Cell lines and tissue culture

A total of six cell lines of human ovarian cancer were used in the present study. KF-1, MN-1, A2780 and their respective cisplatin-resistant sublines KF-r, MN-r, A2780cp cell lines were provided by Dr. Y. Kiyozuka (Department of Pathology II, Kansai Medical University, Osaka, Japan). These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical corporation, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma Chemical corporation, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Corporation, USA). All cell lines were cultured at 37°C in 5% CO₂/95% air.

Cell viability assay

The growth inhibition of the four herbal drugs on ovarian cancer cells was determined by counting viable cells with a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan). An equal number of cells of the six cell lines (1×10^4 cells/well) in 100 µl of conditioned medium were seeded into a 96-well microplate and incubated overnight at 37°C in 5%CO₂/95% air. Then, the cells were treated with various concentrations of Sho-saiko-to, Ninjin-yoei-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to diluted in 100 µl of conditioned medium (the final concentrations of the four herbal drugs were 25, 50, 100, 200, 500, 1000, and 5000 µg/ml). After incubation for 48 h, 10 µl of Cell Counting Kit-8 solution were added to each well, and the plates were further incubated for 4 h at 37°C. The absorbance at 460 nm was measured with an ImmunoReader NJ-2000. Dose-response curves were plotted on a semi-log scale as the percentage of the control cell

number, which was obtained from the sample with no drug exposure.

Cell apoptosis assay

Cell apoptosis induced by herbal drugs was detected by using MEBCYTO Apoptosis Kit (MBL CO., LTD. Nagoya, Japan). A total of 2×10^5 cells/well of the six cell lines were seeded into 12-well microplates for 24 h incubation at 37°C. Various concentrations of the four drugs, diluted in 100 µl of conditioned medium, were added to the wells and incubated for an additional 48 h (the final concentrations of each of the herbal drugs were 200, 1000, and 5000 µg/ml). After trypsinizing and gently washing cells once with medium, the cells were washed with PBS, and then resuspended in 85 µl of binding buffer. Ten microliters of Annexin V-FITC and 5 µl of propidium iodide were added to the resuspended cells. After incubation at room temperature for 15 min in the dark, 400 µl of binding buffer was added to the resuspended cells, and then the stained cells were analyzed by flow cytometry using a single laser emitting excitation light at 488 nm.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results of a representative experiment are presented. The significance of the difference was analyzed with a two-sided Student's *t* test. A *P* value less than 0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Growth inhibition of herbal drugs on ovarian cancer cell lines

We first examined the direct effects of four kinds of herbal medicine on the growth of six ovarian cancer cell lines *in vitro*. The viability of the treated cell lines was determined as the ratio between viable treated cells and viable untreated control cells. As shown in Fig. 1A, Sho-saiko-to displayed direct anti-tumor effects on all six cell lines but at different concentrations. The MN, A2740, and KF cell lines exhibited significant growth inhibition at Sho-saiko-to concentrations of about 150 µg/ml, 300 µg/ml and 500 µg/ml, respectively. There was no significant difference in the degree of growth inhibition between parent and resistant CDDP sublines. The IC₅₀ of the three cell lines were 189 µg/ml (95%CI 149–229), 513 µg/ml (95%CI 303–723), and 733 µg/ml (95%CI 503–963), respectively. On the other hand, Ninjin-yoei-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to did not inhibit the growth of any of the six cell lines even at concentrations of 1000 µg/ml (Figs. 1B–D), but when the concentration reached 5000 µg/ml, all three kinds of herbal medicine showed inhibitory effect on all six cell lines.

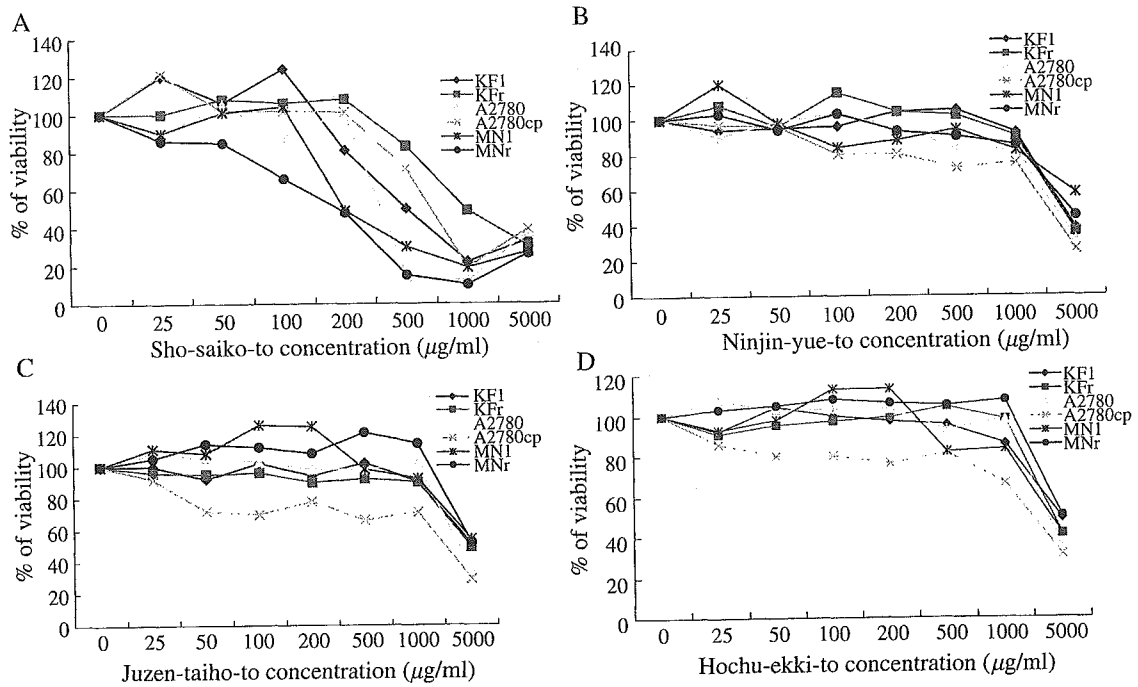


Fig. 1. Inhibitory effects of four kinds of medicine on the growth of human ovarian cancer cell lines. (A) Sho-saiko-to. (B) Ninjin-yue-to. (C) Juzen-taiho-to. (D) Hochu-ekki-to. Cells were treated with various concentrations (0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, and 5000 µg/ml) of four herbal drugs for 48 h. The cell viability was determined by the Cell Counting kit as described in the text. Each data point represents the mean ± SD of results from four individual measurements.

Cell apoptosis assay

The MEBCYTO Apoptosis Kit is intended for the detection of early stages of apoptosis. The difference between apoptosis and necrosis is that, during the initial stages of apoptosis, the cell membrane remains intact, while at the very moment that necrosis occurs, the cell membrane loses its integrity and becomes leaky. Therefore, necrotic cells are easily stained with propidium iodide (PI) as well as Annexin V, whereas apoptotic cells are stained only with Annexin V. As shown in Fig. 2, cells in the lower right area

(LR) indicate apoptotic cells, and the cells in the upper right area (UR) are necrotic cells induced by herbal medicine. In order to determine the mechanism of inhibition of herbal medicine on the ovarian cancer cell lines, the apoptotic effects of concentrations of 0, 200, 1000, and 5000 µg/ml were examined. From Fig. 3 and Fig. 4 (Fig. 4, only Juzen-taiho-to was given), it is apparent that, at 1000 µg/ml, Sho-saiko-to demonstrated a significant apoptotic effect on all six cell lines, whereas the other three kinds of herbal medicine did not exhibit any apoptotic effect. At a concentration of 5000 µg/ml, all four kinds of herbal medicine produced necrosis in all six cell lines. These results suggest that Sho-saiko-to suppresses the growth of the ovarian cancer cell lines through the induction of apoptosis.

Discussion

The Chinese herbal medicine Sho-saiko-to is a drug extract preparation comprising of seven herbal components (Bupleurum root, Pinellia tuber, Scutellaria root, Jujube fruit, Gingseng root, Glycyrrhiza root, and Ginger rhizome), and it is one of the most commonly used types of “Kampo” medicine that is being prescribed mainly for chronic liver disease in Japan. Sho-saiko-to is indicated for improvement of liver dysfunction due to chronic hepatitis [4–7]. Recently, cancer-preventive [8] and anti-tumor effects of Sho-saiko-to on human hepatoma cell lines [9–13] and tumor trans-

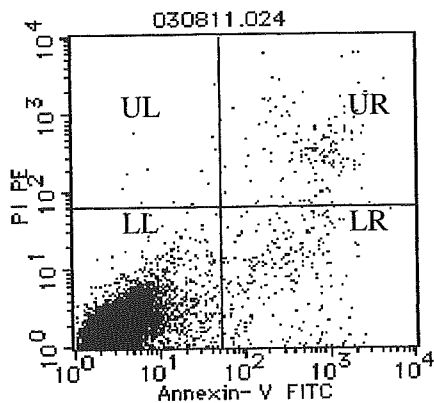


Fig. 2. Flow cytometry analysis of the cells treated with herbal drugs. LL: live cells; LR: apoptotic cells; UR: necrotic cells; UL: necrotic cells and debris; PI: propidium iodide.

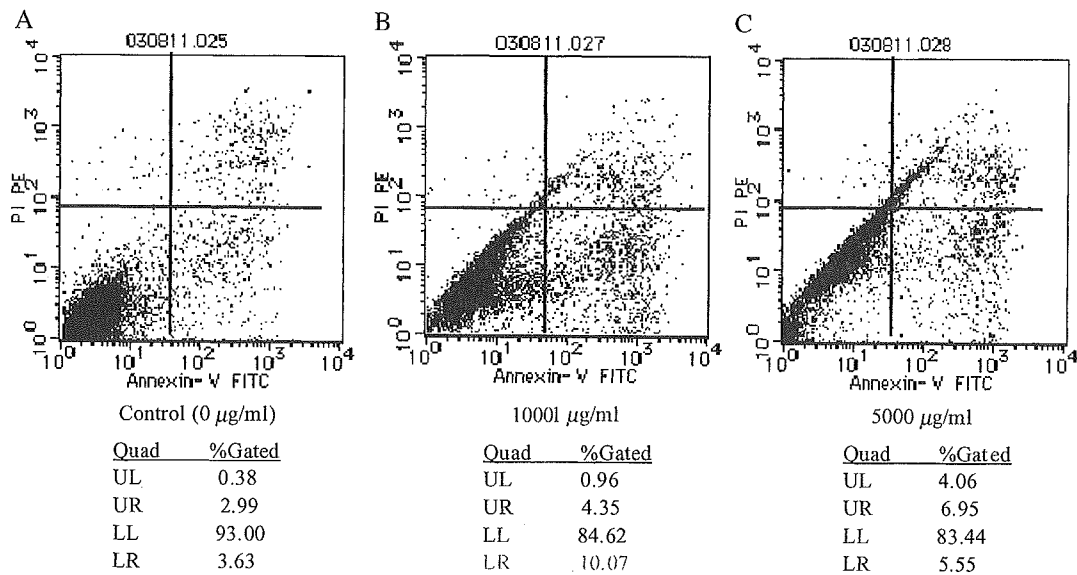


Fig. 3. Flow cytometry analysis of MN cell line treated with Sho-saiko-to. (A) Untreated control. (B) At the concentration of 1000 µg/ml, Sho-saiko-to demonstrated a significant effect on the induction of apoptosis in the MN cell line compared with control cells. (C) At the concentration of 5000 µg/ml, Sho-saiko-to displayed a necrotic effect on the MN cell line compared with control cells. The necrotic effects of Sho-saiko-to on the other five cell lines were similar.

planted animals [14,15] have been reported. However, it remained unknown whether Sho-saiko-to affected ovarian cancer cell lines. In the present study, our results showed that Sho-saiko-to displayed anti-tumor effects on all six kinds of ovarian cancer cell lines at a concentration of 1000 µg/ml. Among the components of Sho-saiko-to, Glycyrrhizin, Baicalin, and Baicalein were reported to suppress the proliferation of carcinoma cell lines in vitro [10–13]. It is therefore reasonable to assume that the direct inhibitory effect of Sho-saiko-to on the ovarian cancer cell lines shown

in our study may be caused by those active ingredients and perhaps additional as yet unknown ingredients. At the concentration of 1000 µg/ml, the inhibitory effect of Sho-saiko-to appears to involve apoptosis. This concentration (1000 µg/ml) is the same as the blood concentration attained when 7.5 g of Sho-saiko-to per day is orally administered and all absorbed. At the high concentration of 5000 µg/ml, Sho-saiko-to produced cell death via necrosis.

The mechanism of the apoptosis induced by Sho-saiko-to in the ovarian cancer cell lines remains unclear. In the

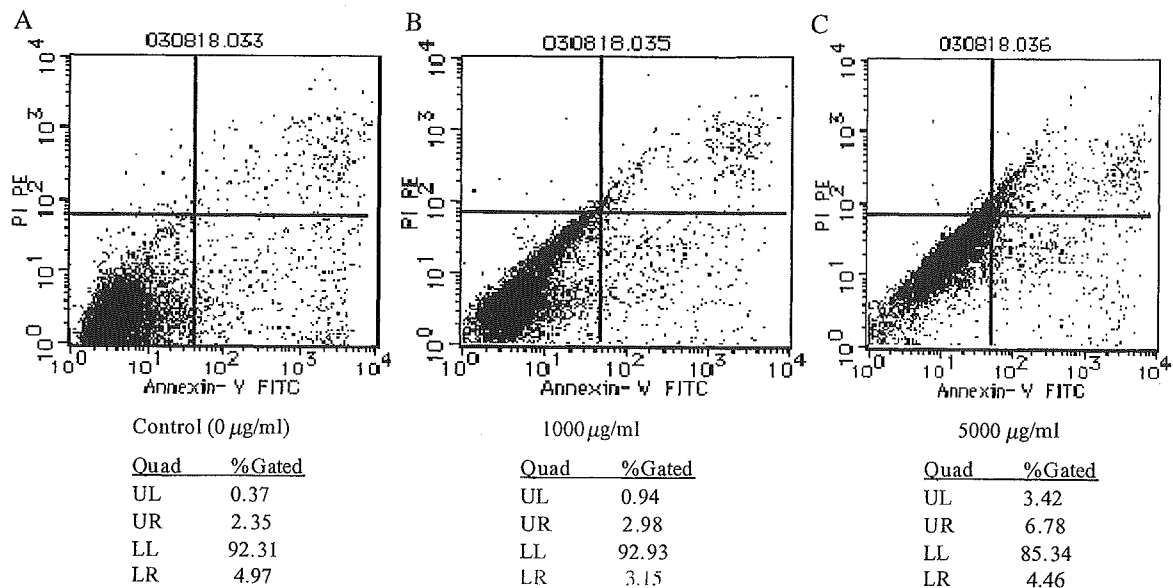


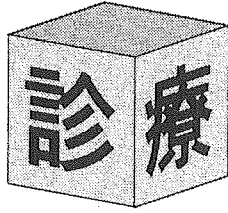
Fig. 4. Flow cytometry analysis of MN cell line treated with Juzen-taiho-to. (A) Untreated control. (B) At the concentration of 1000 µg/ml, Juzen-taiho-to did not demonstrate a significant apoptotic effect on the MN cell line compared with control cells. (C) At the concentration of 5000 µg/ml, Juzen-taiho-to displayed a necrotic effect on the MN cell line compared with control cells. The necrotic effects of Juzen-taiho-to on the other five cell lines and those of Ninjin-yoei-to and Hochu-ekki-to on the six cell lines were similar.

hepatocellular carcinoma cell line, Sho-saiko-to acts as a biological response modifier and suppresses the proliferation of hepatoma cells in vitro by inducing apoptosis and arresting the cell cycle. It induces apoptosis in the early period of exposure and induces arrest at the G0/G1 phase in the late period of exposure [16]. The active ingredient, Baicalein inhibited the activity of topoisomerase II and induced apoptosis [17]. But in a murine malignant melanoma cell line (Mel-ret), Sho-saiko-to induced apoptotic cell death of Mel-ret cells with a definite increase of cell surface Fas antigen and Fas ligand [18]. Recently, Baicalin has been reported to act as a pro-oxidant and to induce caspase-3 activation and apoptosis via a mitochondrial pathway in a leukemia-derived T cell line [19]. These results indicate that several mechanisms may be involved in apoptosis induced by Sho-saiko-to in different kinds of malignant cell lines.

In conclusion, we have demonstrated, for the first time, that Sho-saiko-to exhibits a direct inhibitory effect on human ovarian cancer cell lines. The inhibitory effect can be attributed, in part, to apoptosis induced by Sho-saiko-to. These results may suggest potential therapeutic applications. Further investigations on its possible clinical applications in ovarian cancer therapy should be carried out.

References

- [1] Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. [see comment] *JAMA* 1998;280:1569–75.
- [2] Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, et al. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res* 2003;63:4037–43.
- [3] Liu WK, Ho JC, Qin G, Che CT. Jolkinolide B induces neuroendocrine differentiation of human prostate LNCaP cancer cell line. *Biochem Pharmacol* 2002;63:951–7.
- [4] Hirayama C, Okumura M, Tanikawa K, Yano M, Mizuta M, Ogawa N. A multicenter randomized controlled clinical trial of Sho-saiko-to in chronic active hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1989;24:715–9.
- [5] Yamashiki M, Nishimura A, Suzuki H, Sakaguchi S, Kosaka Y. Effects of the Japanese herbal medicine “Sho-saiko-to” (TJ-9) on in vitro interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1390–7.
- [6] Tajiri H, Kozaiwa K, Ozaki Y, Miki K, Shimizu K, Okada S. Effect of Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) on HBeAg clearance in children with chronic hepatitis B virus infection and with sustained liver disease. *Am J Chin Med* 1991;19:121–9.
- [7] Coon JT, Ernst E. Complementary and alternative therapies in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review. *J Hepatol* 2004;40:491–500.
- [8] Oka H, Yamamoto S, Kuroki T, Harihara S, Marumo T, Kim SR, et al. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-9). *Cancer* 1995;76:743–9.
- [9] Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:D84–90 [Suppl].
- [10] Okita K, Li Q, Murakami T, Takahashi M. Anti-growth effects with components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cell. *Eur J Cancer Prev* 1993;2:169–75.
- [11] Chang WH, Chen CH, Lu FJ. Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Medica* 2002;68:128–32.
- [12] Chang WH, Chen CH, Gau RJ, Lin CC, Tsai CL, Tsai K, et al. Effect of baicalein on apoptosis of the human Hep G2 cell line was induced by mitochondrial dysfunction. *Planta Med* 2002;68:302–6.
- [13] Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Lett* 1994;86:91–5.
- [14] Shiota G, Maeta Y, Mukoyama T, Yanagidani A, Udagawa A, Oyama K, et al. Effects of Sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation. *Hepatology* 2002;35:1125–33.
- [15] Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Uehara H. Inhibition by xiao-chai-hu-tang (TJ-9) of development of hepatic foci induced by *N*-nitrosomorpholine in Sprague–Dawley rats. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:987–92.
- [16] Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, et al. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res* 1994;54:448–54.
- [17] Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S, Matsumura Y, Kobayashi N, Okita K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:170–7.
- [18] Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Takemura M, Yoshida S, et al. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by upregulating Fas-mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulation of cyclin dependent kinases. *Int J Oncol* 1998;12:1321–6.
- [19] Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, et al. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 2002;38:781–91.



サイトメガロウイルス (CMV) 感染胎児 に対する胎内治療と治療効果判定

松田 秀雄* 川上 裕一*
古谷 健一* 菊池 義公*

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症症候性胎児の確定診断は、羊水もしくは胎児体液中の CMV DNA を同定することが必要とされるが、便宜的に母体血清 IgM の上昇がスクリーニングに使用されている。しかし、母体血清 IgM 値はかならずしも胎内環境を反映するとは限らないことが臨床上問題となっている。今回、リアルタイム PCR 法を用い、胎児体液中 CMV DNA を同定、定量し、CMV 抗体高力価 γ グロブリンによる胎内治療を施行、あわせて治療効果を判定し、良好な予後を得た症例を経験したので若干の文献的考察を加え報告する。

はじめに

Cytomegalovirus (CMV) による先天性 CMV 感染症は、TORCH 症候群のひとつで、低出生体重児、肝脾腫、黄疸、脈絡網膜炎、脳内石灰化、側脳室石灰化、難聴などの重篤な症状を引き起こすことが知られている。新生児期に先天性サイトメガロウイルス感染症と診断された児では、症候性感染児では約 80% で予後重篤であり¹⁾無症候性感染児でも約 10~15% に重篤な神経学的障害をもたらす²⁾³⁾とされ、胎児期における確定診断と胎内治療が模索されている。

胎内における確定診断の正確さについては議論があったが、近年開発されたリアルタイム PCR 法を用いた CMV DNA 定量法は定性法に比べ格段に精度が高く、現在ではもっともすぐれた診断法と考えられる。母体 CMV IgM

によるスクリーニングはかならずしも胎内環境を反映するとは限らず、時間的にペア血清検査を施行できない場合やウイルスの再活性化によって引き起こされたと考えられる病態には対応できない可能性がある⁴⁾。

一方、妊婦における CMV 抗体保有率の調査では、近年わが国においても若年者ほど抗体保有率は低下しており⁵⁾⁶⁾、ワクチンが実用化されていない現状では、今後、欧米諸国なみに先天性 CMV 感染症の問題は注目されうると考えられる。

今回、胎児水腫にて紹介受診し、リアルタイム PCR 法で胎児体液中 CMV DNA を同定、定量し、CMV 抗体高力価 γ グロブリンによる胎内治療を施行、あわせて治療効果を判定し、健常児を得た症例を経験した。胎内診断、胎内治療において有用と思われる知見を得たので若干の文献的考察を加え報告する。

*Hideo MATSUDA, Yuichi KAWAKAMI,
Kenichi FURUYA, Yoshihiro KIKUCHI
防衛医科大学校産婦人科
〒359-8513 所沢市並木 3-2

I. 症 例

26 歳, 0 経妊 0 経産。家族歴, 既往歴に特記事項なし。妊娠 27 週時に風邪症状を自覚。近

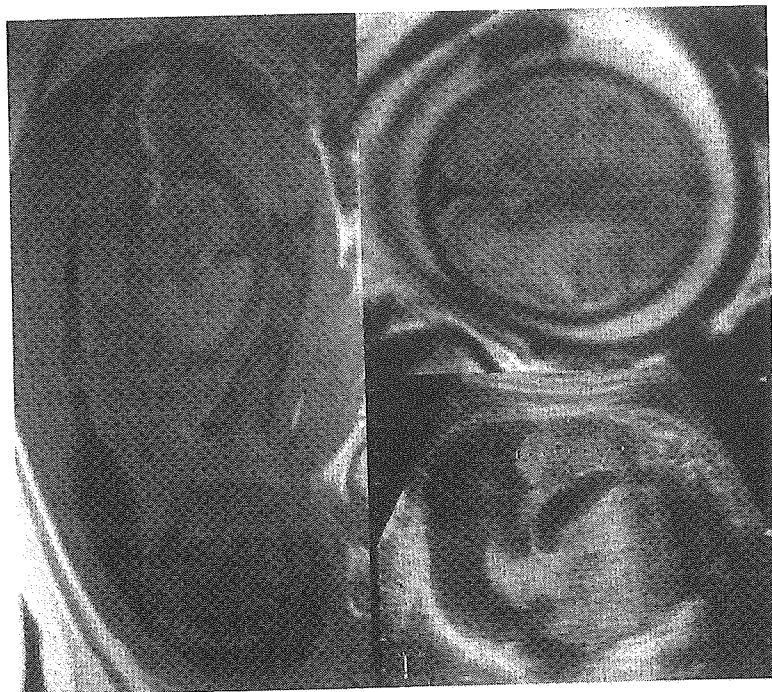


図 1 MRI 検査 (左, 右上) と超音波検査 (右下)

医にて胎児腹水を指摘され、2001年7月、妊娠29週3日に紹介入院となる。

1. 入院時検査

ノンストレステスト：Reassuring。

血液型：O型Rh(+), 不規則抗体検査陰性。

感染症検査：CMV IgG 16.0 (EIA cut off： <2.0), CMV IgM 1.84 (EIA cut off： <0.8), CMV DNA 1.8×10^2 copy/ml。パルボウイルス、風疹、梅毒、トキソプラズマは陰性。

超音波検査：単胎妊娠であり、胎盤、羊水量に異常なし。胎児腹水、肝脾腫を認める。脳内石灰化は認めず。その他の胎児奇形を認めず。推定体重1520g(腹水込)。ドップラー血流検査上UmArPI/RI, MCAPI/RI, PLIなど異常を認めず。

胎児MRI：脳内に異常所見なし。胎児腹水、肝脾腫を認めるが、胎児奇形を認めず(図1)。

羊水：淡黄色、清明。CMV DNA 7.2×10^6 copy/ml。

胎児腹水：淡黄色、清明。CMV DNA 2.3×10^4 copy/ml。

臍帯静脈血：pH 7.326, BE 0.4 mmol/l, Hb 10.5 g/dl, CMV IgG 陽性 (定性法)。

2. 確定診断

サイトメガロウイルスによる症候性胎内感染(ウイルスの再活性化による)と随伴する胎児水腫, 胎児貧血。

3. 方針と治療

産婦人科, 小児科, 麻酔科との協議のうえで, ご夫婦, ご家族に数次にわたり治療方針を説明し, 選択, 同意を得たうえで, 胎内治療を試みる方針となった。

妊娠30週, 32週, 34週でCMV高力価(平均167.0 EIA価, $\times 199$ NT倍) γ グロブリンを胎児腹腔内に投与した。投与量は2g/推定体重kgとした。胎盤循環系の血流は計算に加えないこととした。

セボフルレンによる全身麻酔下に胎児腹腔内を穿刺, 2台の超音波装置を用いて胎児循環機能をモニターしながら, 腹水を約50ml緩徐に吸引した後に, CMV高力価 γ グロブリンを投与した。投与5分後に毎回臍帯静脈血を穿刺し, アシドーシスの有無, 胎児血算, 生化学検査を施行した。治療後は, 胎児心拍モニターを

表 1 胎内治療と検査値の推移

	29w4d	30w3d	31w4d	32w3d	33w4d	34w3d	35w4d
母体 CMV IgG (EIA cut off: <2.0)	16.0	15.0	17.0	18.0	23.0	15.0	17.0
母体 CMV IgM (EIA cut off: <0.8)	1.84	1.80	1.58	1.72	1.77	1.44	1.55
治療 (γ-globulin)		2.5 g		2.5 g		2.5 g	
母体 CMV DNA (copy/ml)	180	54	<20	33	<20	<20	<20
羊水 CMV DNA (copy/ml)	7.6 × 10 ⁶		6.0 × 10 ⁷	2.7 × 10 ⁷	8.0 × 10 ⁷	9.3 × 10 ⁷	5.3 × 10 ⁷
胎児腹水 CMV DNA (copy/ml)	23,000		2,000	150	120	<100	<100
臍帯静脈血							
pH		7.33		7.38		7.44	
Hematocrit (%)		32		36		38	
Hemoglobin (g/dl)		10.5		12		12.6	
Base Excess (mmol/l)		0.4		0		-0.6	
Total Protein (g/dl)		3.8		4.3		4.6	
AST (IU/l)		20		26		29	
ALT (IU/l)		2		4		5	
LDH (IU/l)		341		366		422	
γ-GTP (IU/l)				1,458		1,164	
CMV IgG (EIA cut off: <2.0)		(+)		8.37		36.0	
CMV IgM (EIA cut off: <0.8)		(-)		0.11		0.16	
CMV DNA							(-)



図 2 33週における胎児腹部エコー

頻回に施行し、子宮収縮抑制剤と抗生物質を2日間投与した。

4. 治療経過

主な検査項目を表1に示した。

妊娠33週で超音波検査上、胎児腹水は著明に減少し(図2)、妊娠34週で胎児腹水中のCMV DNAは測定感度以下となった。胎児血においてγGTPが高値であったが、胎児貧血は改善した。羊水中のCMV DNAは高値のまま推移した。

推定体重は増加傾向にあったが、子宮内胎児発育遅延(IUGR)が顕性化した。治療前に比べ、腹水の減少とともに腹囲も減少したので、マスクされていたIUGRが顕在化したものと思われた。

5. 転 帰

骨盤位、IUGRにて妊娠36週3日に選択的帝王切開術を施行した(全身麻酔)。2084g、女児、Apgar score 3/9(1/5 min.) (図3)。

6. 胎盤病理所見

Mild villitis with CMV inclusion bodies (図4)。

7. 新生児予後

出生直後の新生児血清CMV DNAは測定感度以下であった。

主な血液検査所見を表2に示す。血小板減少症と胆管系酵素の上昇を認めるが経過観察のみ

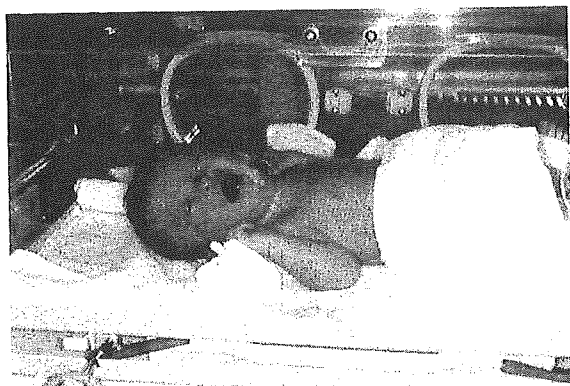


図3 出生児

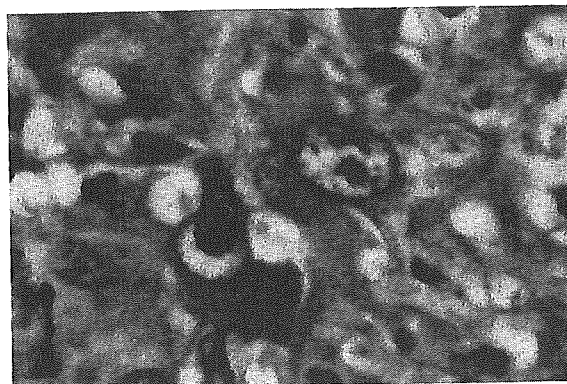


図4 胎盤, CMV 封入体

表2 新生児血液所見の推移

	日齢1	日齢10	日齢20
RBC ($\times 10^4/\mu l$)	404	387	360
Hb (g/dl)	16.5	15.1	11.9
Hct (%)	49.3	42.2	32.9
WBC ($\times 10^3/\mu l$)	11.5	11.9	10.6
Lymph (%)	58.3	66.3	73.4
Plt ($\times 10^4/\mu l$)	6.9	11.3	24.9
T-bil (mg/dl)	4.2	9.6	3.3
TP (g/dl)	6.1	6.7	6.6
Alb (g/dl)	3.4	3.8	4.0
AST (IU/l)	47	38	35
ALT (IU/l)	12	10	24
LDH (IU/l)	631	450	445
LAP (IU/l)	592	497	310
γ -GTP (IU/l)	1,061	685	340
BUN (mg/dl)	6	4	9
Crea (mg/dl)	0.43	0.33	0.28
CRP (mg/dl)	0.6	0.3	0.3

で良好な状態となった。

新生児脳MRIでは、頭頂葉の一部に極軽度の血管性浮腫像を認めるものの石灰化などの異常所見はなく、1カ月後のMRIで所見は消失した。

4日齢におけるABRにて軽度の反応低下をみた。精査により片側の聴力障害と診断され、現在リハビリを施行している。観察期間1年を通じて、知能発達をふくめおおむね健全な発達をとげている。

II. 考 察

先天性CMV感染症のスクリーニングと出生前診断法についてはLazzarotto⁷⁾より提唱された方法が受け入れられている(図5)。また、Guerraら⁸⁾は、羊水定量PCR法にて $\geq 10^3$ genome equivalentで先天性CMV感染症の発症(感度75.0%, 特異度100%)を、 $\geq 10^5$ genome equivalentで症候性CMV感染症の発症(感度81.3%, 特異度100%)を予知できたとしている(図6)。

これらの報告をふまえて本症例を考えることとする。

妊娠後期の超音波検査にて初めて認知され精密検査を受けているので、妊娠初期のスクリーニングはなされていない。しかし、母体のCMV IgG, CMV IgMの動きが表1のごとく変化に乏しいことから、再活性化が強く疑われた。

羊水、胎児腹水中のCMV DNAが定量できたこと、および、経皮的臍帯血採血(PUBS)による胎児血液、生化学所見より、病勢が活動期にあることが推察された。症候性先天性CMV感染新生児の予後の重篤さを考慮にいれると、29週といえども早期娩出は最前の処置とは考えにくいと思われた。

山田ら⁹⁾の報告にみられるように胎児に直接 γ グロブリンを注入する方法が検討されたが、その際に論点となったのは、①治療効果判定の方法をどうするか、②胎児への投与方法を

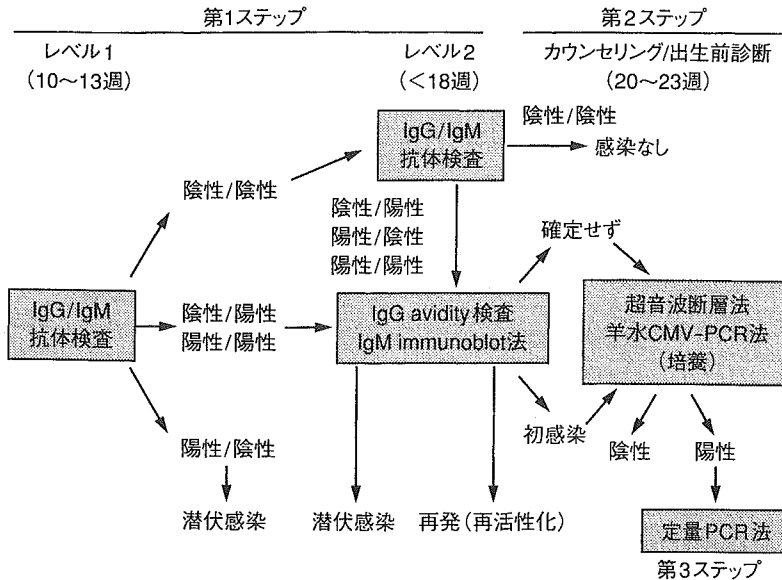


図 5 先天性 CMV 感染症のスクリーニングと出生前診断法 (Lazzarotto T, et al, Intervirology 42, 1999)

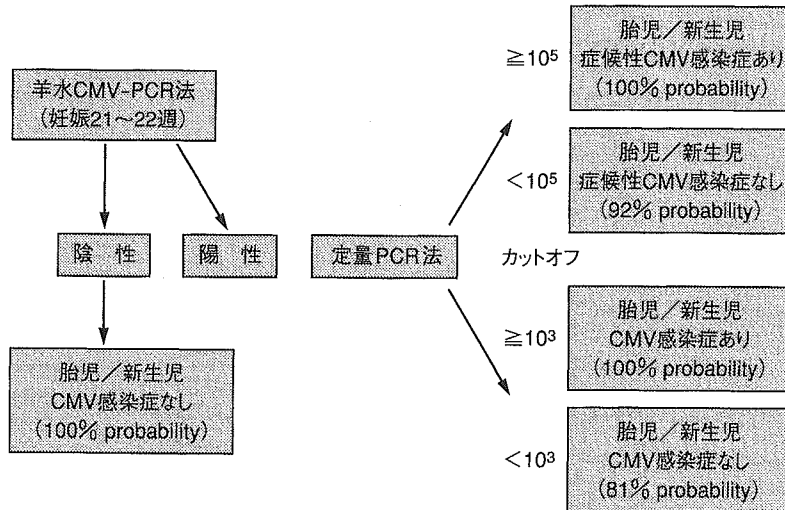


図 6 定量 PCR 法による先天性 CMV 感染症の出生前診断法 (Guerra B, et al, Am J Obstet Gynecol, 183, 2000)

どうするか、③胎児への血液製剤使用歴の保存をどうするかであった。

①については根岸、山田ら⁹⁾が述べているように、 γ グロブリンを注入した後で臍帯静脈血中の CMV IgG を測定しても、CMV IgG の上昇がすなわち CMV の活動性の低下と直接結びつくか否かは不明である。そこで、胎内治療の効果を判定するには CMV DNA を定量することが必要と考え、リアルタイム PCR 法を利用することとした。ただし、リアルタイム

PCR 法にはある程度の量が必要であり、一度に少量の採血しかできない PUBS では、血ガス、血算、生化学的検査を犠牲にしないと施行困難である。本症例では胎児腹水を採取でき、これを利用することとした。

②については胎児輸血のごとく経臍帯静脈的に投与するか、もしくは直接腹腔内に投与するかの問題である。どちらの方法でも 23G の PTC 針を用いて超音波ガイドで施行すれば手技的には安全に施行可能である。胎内における

薬剤の代謝速度を考え、直接腹腔内投与とした。

③胎内における輸血、および血液製剤投与の記録保存については母体のカルテに添付保存する方法、胎児カルテを作成し保存する方法などが考えられるが、本症例では母体カルテに記録を添付することとした。当院では現在は胎児カルテを作成し記録を保存している。

胎内治療を試みて得た新しい知見として、

① 母体血中 CMV IgG, IgM の定量は胎内環境を直接反映しているとはいえない。

② 羊水中の CMV DNA は妊娠期間を通じて高値を持続し、感染の診断には有用だが治療効果をみるうえでは信頼できない。

③ 胎児腹水中の CMV DNA 定量は感染診断、治療効果判定に有用である。

④ γ グロブリンの胎児腹腔内投与は胎児水腫に著効し、胎児貧血も改善した。

⑤ 今回は聴力低下の発生を阻止し得なかった。また、 γ GTP の上昇がみられた。などがあげられる。

ところで、文献的には、母体の初感染による先天性 CMV 感染症であっても、続発症は後障害を呈するものは約 10% であり、残りは正常に出生し経過する¹⁰⁾といわれ、初感染の場合のほうがより症候性 CMV 感染症の頻度が高く、より重症であるとされる¹¹⁾一方、再感染または潜伏感染の再活性化でも初感染と同頻度の重症例がみられるとの報告¹²⁾もある。最近の本邦の報告では、症候性感染児数は年間 50~100 例と推定されている¹⁾。また、本邦では潜伏感染の再活性化の方が頻度的に高いとの報告もある¹³⁾。潜伏感染の再活性化をスクリーニングすることは非常にむずかしいと考えられ、実際の診療場面では胎児の異常がみつかって初めて治療を考慮することが多いと考えられる。よって、現時点では、症候性 CMV 胎内感染を疑った場合、ただちに羊水中の CMV DNA 定量を行うのがよいと考える。

全国サイトメガロ母子感染全国調査¹⁾の結果では、症候性 CMV 感染症の続発症発現は全体

の 78% にみられている。中絶か、早期娩出か、という選択をせざるを得ない現状を考えると、胎内治療の開発が大いに期待される。しかし、先天性 CMV 感染症に対する妊娠中の治療法はまだ確立しているとはいえず、ガンシクロビル¹⁴⁾、 γ グロブリンがわずかに試みられているのみである。

今回の経験から、 γ グロブリンを胎児に注入する方法は比較的安全であり画期的な胎内治療法として検討に値する方法と考える。

文 献

- 1) 森田 誠, 森島恒夫, 山崎俊夫, 他: サイトメガロウイルス母子感染全国調査. 日児誌, **101**: 769-775, 1997.
- 2) Stagno S, Pass RF, et al: Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. Clin Obstet Gynecol, **25**: 571, 1982.
- 3) Pass RF, Stagno S, et al: Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow up. Pediatrics, **66**: 758, 1980.
- 4) 山田秀人, 根岸宏明, 藤本征一郎: サイトメガロウイルス母子感染の問題. 周産期医学, **31**(5): 585-591, 2001.
- 5) 黒田浩一: サイトメガロウイルス感染—感染の時期と児の予後—. 産婦の世界, **50**: 107-113, 1998.
- 6) 干場 勉, 朝本明弘, 矢吹朗彦: 妊婦のサイトメガロウイルス抗体保有率の低下. 日本臨床, **56**: 193-196, 1998.
- 7) Lazzarotto T, Varani S, et al: New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. Intervirology, **42**(5-6): 390-397, 1999.
- 8) Guerra B, Lazzarotto T, et al: Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Am J Obstet Gynecol, **183**(2): 476-482, 2000.
- 9) Negishi H, Yamada H, et al: Intraperitoneal administration of cytomegalovirus hyperim-

- munoglobulin to the cytomegalovirus-infected fetus. J Perinatol, 18: 466-469, 1998.
- 10) 千葉峻三: サイトメガロウイルスと母子感染。産婦治療, 57: 650-653, 1988.
- 11) Fowler KB, Stagno S, Pass RF, et al: The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med, 326: 663-667, 1992.
- 12) Griffiths PD, Baboonian C, Rutter D, et al: Congenital and maternal cytomegalovirus infections in a London population. Br J Obstet Gynaecol, 98: 135-140, 1991.
- 13) Hirota K, Muraguchi K, Watanabe N, et al: Prospective study on maternal, intrauterine and perinatal infections with cytomegalovirus in Japan during 1976-1990. J Med Virol, 37: 303-306, 1992.
- 14) Revello MG, Percivall E, Baldanti F, et al: Prenatal treatment of congenital human cytomegalovirus infection by intravascular administration of ganciclovir. Clin Diag Virol, 1: 61-67, 1993.

* * * *

学会案内

卵巣に関する国際カンファレンス 2004 開催のお知らせ

代表世話人: 石塚文平 (聖マリアンナ医科大学)

日時: 平成 15 年 5 月 29 日 (土) AM 9:00~PM 17:30

会場: 都市センターホテル

〒102-0093 東京都千代田区平河町 2-4-1 TEL: 03-3265-8211

セッションテーマ: I Recent Advances in Basic Ovarian Physiology

II Recent Advances in Fertility Conservation

III Recent Advances in PCOS

ランチョンセミナー (日本語講演): ヒト卵と胚におけるガラス化保存法

一般演題募集: 「Ovarian Physiology, Pathophysiology および Fertility Conservation」のテーマで一般演題 (ポスター) を募集致します。演題申込ご希望の方は下記事務局宛にご連絡下さい。

演題申込締切: 平成 15 年 3 月 17 日 (水)

参加費: 医師 15,000 円, エンブリオロジスト・学生等 10,000 円

事前申込締切: 平成 15 年 5 月 22 日 (土)

※締切日以降の参加申込は当日会場にて受付致します。

定員: 250 名 (定員になり次第締め切らせて頂きます)

申込先及び問合せ先: 卵巣に関する国際カンファレンス事務局

(聖マリアンナ医科大学産婦人科学教室内)

〒261-8511 神奈川県川崎市宮前区管生 2-16-1

TEL: 044-977-8111 (内線 3327), FAX: 044-977-2944

E-mail: ransoconf@convex.co.jp

免疫低下(HIV 感染症)と食事

谷口晴記
Haruki Taniguchi

Key words : HIV 感染妊婦, 食事, 微量栄養素

はじめに

国連合同エイズ計画(UNAIDS)と世界保健機関(WHO)が、昨年末に発表した報告書「AIDS Epidemic Update 2004」によると、2004 年末推計で、世界の成人の HIV(ヒト免疫不全ウイルス)感染者は 3,720 万人に上り、そのうち女性が半数近くの 1,760 万人に達した。特にサハラ砂漠以南のアフリカでは、女性が成人の感染者の 60% 近くに上った。2004 年に新たに確認された感染者数は 490 万人で、エイズによる死者は 310 万人と推定されている。アフリカ以外の地域では、中国、インドネシアおよびベトナム、東欧および中央アジアではウクライナとロシア連邦での増加が確認されている。一方、厚生労働省の発表によると 2004 年日本国内の 1 年間の HIV 感染・エイズ患者数が初めて 1,000 人を突破し、累計で 1 万人を超えた。先進国の中で、唯一エイズ患者数が増加傾向にあることが指摘されている。

我が国における HIV 感染妊婦数は 2004 年度までに、総数で 423 例が報告された。1997 年以降毎年 30 例を超す HIV 感染妊婦が発生し、さらに 2004 年度の HIV 抗体検査 10 万当たりの症例数は 10.1 人であり、この値は増加傾向にある¹⁾。このような中で、HIV 感染妊婦の診療に携わる機会も増すとおもわれる。診療に関して、HIV 母子感染予防対策マニュアル第 3 版(<http://api-net.jfap.or.jp/siryou/>

siryou_Frame.htm)²⁾を参照されたい。本編では、HIV 感染妊婦と食事・水・栄養について紹介したい。

HIV 感染と妊娠の相互作用

HIV 感染と妊娠の相互作用について、アメリカやヨーロッパの研究では、妊娠は HIV 感染症の経過には何の影響も与えないことが示されている。HIV 感染によって妊娠の結果に影響が及ぶか否かについて、抗ウイルス薬が治療に用いられるようになる以前に先進国で行われた研究では、未熟児、低出生体重児および子宮内胎児発育遅延(IUGR)の割合は HIV 感染群、非感染群ともに同頻度であった³⁾。しかし、開発途上国での研究によれば、HIV 感染女性から生まれた新生児では、未熟児や低出生体重児、IUGR、死産などの頻度が HIV 非感染者の類似群よりも高いことが示され、また、HIV 感染が重度である群ほど、児に好ましくない結果が生じる率が高いことも示されている。開発途上国において、HIV 感染女性から生まれた新生児の HIV 感染に直接関係した死亡率も上昇することが報告されている。おそらく開発途上国にみられる貧困、低栄養、差別などが複雑に絡み合っていると思われる⁴⁾。未熟児や低出生体重児に関係する因子の頻度は、HIV 感染者と非感染者とで同様であり、これらの因子は異常妊娠の既往歴や、高血圧、多胎妊娠、喫煙、妊娠経過中の出血、脛トリコモナス感染などを含んでいる。抗ウイルス治療がなされていない場合、CD4⁺リンパ球数が低いことも不利な転帰のリスクファクターの一

三重県立総合医療センター産婦人科
〒510-8561 四日市市大字日永 5450-132

つとなるが、抗ウイルス薬の治療が行われている場合、母体の HIV ウイルス量および CD4⁺リンパ球数は異常妊娠との直接関連はないとされている³⁾。

HIV 感染患者と食事・水・栄養

レトロウイルスの一種である HIV の感染である HIV 感染症は、無治療で約 10 年の無症候期を経て CD4⁺リンパ球数が減少する。高度の免疫不全を生じ、エイズを発症し、日和見感染症や悪性腫瘍が生じてくる。エイズ発症の比較的初期から HIV 消耗性症候群がみられ、通常の体重の 10%を超える不自然な体重減少に加え、慢性的な下痢(1日2回以上、30日以上の継続)や慢性的な発熱があることがある。下痢については、サイトメガロウイルス、サルモネラ菌、赤痢菌、赤痢アメーバや、クリプトスポリジウムなどの感染によることが多いとされている(サーベイランスのためのエイズ診断基準：厚生省エイズサーベイランス委員会、1994)。

通常に免疫能が保たれていれば重篤化しないですむものが、HIV 感染患者では食事あるいは飲料水から容易に感染し重篤化するため、その安全性に留意する必要がある。HIV 感染患者では通常作られている食事でも重要な問題になることがある。サルモネラ菌による食中毒は、一般人に比べ約 20 倍罹患しやすく、さらに重症化しやすい。キャンピロバクターも同様である。生や十分火が通っていない魚を食べることによって起こることが多い。リステリア、細菌性赤痢、コレラおよび腸炎ビブリオも、汚染された牛乳、アイスクリーム、レタス、生牡蠣、十分加熱されなかった七面鳥やホットドッグなどによって媒介される⁵⁾。

またクリプトスポリジウム症は原虫による感染で、ひどい下痢を引き起こし、エイズ患者ではより重症化する。生水を飲むことが問題で、人間や動物のし尿で汚染されるかもしれない川や湖で泳ぐのは避けるべきである⁵⁾。欧米でも水道水を通じての集団感染があるが、日本でも報告例があるため、水は煮沸してから飲む習慣が大事である。

栄養状態は感染症に対して影響を及ぼす。鉄欠乏

は開発途上国の豆を主食とする人々に多く、亜鉛摂取不良であると体調不良になる。亜鉛欠乏は HIV 感染に合併しやすく、血中の T リンパ球数の減少をもたらす⁶⁾。複数の微量栄養素欠乏は HIV 感染の早いうちから始まるので、HIV 感染した個体にとって微量栄養素の必要性が増大する。HIV に感染している個体は、組織の中の鉄を、特に骨髄、脳、筋肉、肝臓、および脾臓に蓄積する傾向がある。この鉄の蓄積あるいは付加は鉄の保有にかかわる慢性炎症反応に関連されるようだ⁷⁾。ビタミン B₁₂の血中濃度はエイズの進行に伴い低下する。いくつかのビタミン B 群の高い血中濃度は長期生存例と関連している。

不十分な栄養摂取あるいは栄養物を体内で利用することができない状態となったようなとき、体形変化やウェイスティングと呼ばれる激やせのような状態になる。体重がどんな理由であれ、標準体重の 60%を切ると死にいたることがある⁸⁾。以前から、複数のビタミンを組み合わせる HIV 感染者に投与すると、HIV の進展を遅らせることができるという観察結果を背景として、タンザニアのダルエスサラームで、HIV に感染した妊婦 1,078 例を二重盲検プラセボ対照試験に組み入れ、ビタミン A(ビタミン A の前駆体とβ-カロテン)、総合ビタミン剤(ビタミン B, C, E)、またはその両方を毎日補給することが HIV 疾患の進行に及ぼす影響が検討された。2003 年 8 月まで追跡がなされた(平均追跡期間：71 カ月)。

その結果 AIDS の進行および死亡にいたったハイリスク症例の割合は、プラセボ群(31.1%)、ビタミン A 群(29.0%)、併用群(26.1%)、総合ビタミン群(24.7%)の順であった。血液検査を行ったところ、プラセボ群と比べて、総合ビタミン群では、CD4⁺リンパ球数および CD8⁺リンパ球数が増えるいっぽう、HIV ウイルスの数は減少していた。ビタミン A 群と、併用群では、この効果ははっきりせず、妊婦が出産した場合に、HIV の母子感染率は、かえって高くなる結果だった。そこで抗 HIV 薬が適応とならない比較的初期の段階で、ビタミン A を含まない総合ビタミン剤が低コストの治療薬として推奨される

とした⁹⁾。ところで、この研究に対するニューイングランド誌のエディトリアルは、およそ以下のようなコメントをしている。今回の研究は、先行してタイで行われた小規模な臨床試験の結果ともあわせて、エイズの進行と死亡に対するビタミン補給剤の効果の可能性を示す結果として重要である。ただし、先進国の HIV 感染者にも、今回の結果があてはまるかどうかかわからない¹⁰⁾。

「2005 年までに世界で 300 万人の HIV 感染者に抗ウイルス療法を行う」ことを目標に掲げて 2003 年に始められた WHO の「3 by 5」政策などの影響で、アフリカでも抗ウイルス剤を受ける層が増えてきたことも事実である。HIV 感染・エイズ発症による体重減少や、栄養障害の問題から栄養支援が必要であることは言うまでもないが、経済的に貧しい国々での栄養の問題は、まず食糧調達を指す。いかに継続的に食糧を供給するか、またどのように患者に配分するかが重要な課題となっている¹¹⁾。

HIV 感染妊婦と栄養

微量栄養素のうちビタミン A は妊娠にとって必須である。ビタミン A 欠乏のオス動物は精子を作ることができない。ビタミン A の血中濃度の低下は、女性の妊孕能に否定的に働くとされている。ビタミン A 欠乏症は胎盤感染に関係がある。妊娠は母体と胎児の双方にビタミン A 欠乏症のリスクを増加させる。最近の研究では、妊娠中のビタミン A を含む補助食品投与は、HIV 母子感染リスクの低下や幼児死亡率に対しベネフィットがない^{10,12)}。しかしながら、カロテンの母体投与は母体死亡率を 50% 低下させる。カロテンの血中濃度は米国とナイジェリアにおいて子癇前症の際低下している。また前期破水の際にも低下する⁷⁾。そのためユニセフでは発展途上国の妊産婦に、出産前後 6 週間ビタミン A カプセルを定期的に投与するプロジェクトを行っている。

HIV/エイズが妊娠中の鉄や葉酸に及ぼす影響についてのデータはほとんどないが、Friis らは、ジンバブエでの研究で、HIV 感染妊婦の微量栄養素に変化を与えることを報告している¹³⁾。HIV 非感染の

妊婦に比べ HIV 感染妊婦では血中の葉酸、フェリチンおよびレチノール酸(ビタミン A)が低下し、これらは HIV 感染に伴う貧血と関係していた¹³⁾。米国では、ほとんどの妊婦が、鉄欠乏の事実がなくても鉄を含む補助食品をとるように勧められている。

HIV 感染妊婦は、バランスのとれた食事から必要な栄養をとるべきである。適切に蛋白質を摂取することは、細胞性免疫能、補体や食能を正常に保つ。HIV 感染妊婦のための特別な栄養推奨はない。総合ビタミンや微量栄養素を含む補助食品の摂取は、母体や新生児の健康を増進させる目的で有益であり、簡便かつ対費用効果がよい。ビタミン補助食品は妊娠中から産褥 3 カ月まで摂取するとよい⁷⁾。

食物取り扱いおよび抗ウイルス薬服用時の留意事項

HIV 感染妊婦は食べ物からの感染にかかりやすい。感染妊婦自身が HIV 感染症の病態を理解したうえで、食物の取り扱い方や貯蔵法や料理法について情報提供を受けなければならない。特に生ものである魚介類の摂取には慎重であるべきである。

また、つわり症状など妊婦は消化器症状を訴えることが多いが、抗ウイルス薬を投与されている場合は増悪する場合がある。消化器のカンジダ症、肝機能異常や乳酸アシドーシスの有無をチェックする。抗ウイルス薬が原因であれば、慣れて症状が改善する場合もある。もし重い場合には制吐剤を併用しながら内服を継続する。また、食事は少量ずつ頻回に摂取し、スープなどの液体は食事と一緒にではなく食事と食事の間にとるのもよい²⁾。

まとめ

現在、日本を含む先進国では適切に HIV 感染妊婦の管理を行えば、HIV 母子感染の成立は極めて低くなることが判明している。また、妊娠女性に対する治療が適切であれば、分娩が終わっても慢性疾患なみに延命が可能となり、子育ておよび子どもの成長を見守ることが可能となってきた。そのため、妊娠初期に HIV 抗体スクリーニング検査が全妊婦の全

妊娠に行われる必要がある。不幸にして HIV 感染が判明した妊婦に対しては、妊娠期間を通じて継続的な観察やカウンセリングが行われ、通常の周産期教育以外に特別な栄養に関する情報提供が行われるべきである。

文献

1. 喜多恒和(分担研究者) : HIV 感染妊婦の実態調査とその解析および HIV 感染妊婦とその出生児に関するデータベースの構築. 平成 16 年度厚生労働省科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)「HIV 感染妊婦の早期診断と治療および母子感染予防に関する臨床的・疫学的研究」班, 平成 16 年度総括・分担研究報告書(主任研究者 稲葉憲之), pp13-53, 2005
2. 塚原優巳, 谷口晴記, 源河いくみ, 他 : 「HIV 母子感染予防対策マニュアル」改訂第 3 版, 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金事業(エイズ予防対策研究事業), 2004,3,31 発行
3. Watts DH : Management of human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *N Engl J Med* 346 : 1879-1891, 2002
4. Brocklehurst P, French R : The association between maternal HIV infection and perinatal outcome : A systematic review of the literature and meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 105 : 836-848, 1998
5. Hayes C, Elisa E, Edwin K, et al : Food and water safety for persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 36 (Supple2) : s106-s109, 2003
6. Kupka R, Fawzi W : Zinc nutrition and HIV infection. *Nutrition Rev* 60 : 69-79, 2002
7. Kristen SM : Nutrition and HIV-Positive Pregnancy. *J Perinatal Educ* 12 : 42-47, 2003
8. Fawzi W, Msamanga G, Spiegelman D, et al : Studies of vitamins and minerals and HIV transmission and disease progression. *J Nutr* 135 : 938-944, 2005
9. Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, et al : A randomized trial of multivitamin supplements and HIV disease progression and mortality. *N Engl J Med* 351 : 23-32, 2004
10. Marston B, DeCock KM : Multivitamins, nutrition, and antiretroviral therapy for HIV disease in Africa. *N Engl J Med* 351 : 78-80, 2004
11. 4th global report : 2004 Report on the global AIDS epidemic. UNAIDS. 2004
12. Villamor E, Saathoff E, Bosch RJ, et al : Vitamin supplementation of HIV-infected women improves postnatal child growth. *Am J Clin Nutr* 81 : 880-888, 2005
13. Friis H, Gomo E, Koestel P, et al : HIV and other predictors of serum folate, serum ferritin, and hemoglobin in pregnancy : A cross-sectional study in Zimbabwe. *Am J Clin Nutr* 73 : 1066-1073, 2001

* * *

診断に苦慮し治療抵抗性であった HIV 合併明細胞腺癌の1例

Diagnostic Complication and Treatment Resistance in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection : and Clear Cell Adenocarcinoma of Ovary ; A Case Report

国立国際医療センター産科婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, International Medical Center of Japan

小早川 あかり	長 坂 康 子	濱 田 亜衣子
Akari KOBAYAKAWA	Yasuko NAGASAKA	Aiko HAMADA
梶 谷 法 生	古 澤 裕 紀	定 月 みゆき
Norio MASUYA	Yuki FURUSAWA	Miyuki SADATSUKI
五味淵 秀 人	箕 浦 茂 樹	
Hideto GOMIBUCHI	Shigeki MINOURA	

概要 人免疫不全ウイルス (HIV) 感染者における卵巣癌についての報告は複数あり, HIV 感染を基礎疾患として有している場合卵巣癌の進行を促進させる可能性が指摘されている。

症例は 34 歳女性, 03 年 9 月より左下腹部痛が出現, 10 月に当科外来受診したが, 外来初診時は経膈超音波でも卵巣, 子宮などに異常所見は認めなかった。腹痛発症の半年前に帝王切開にて児を出産しているが, 術中所見でも卵巣に異常は認めなかった。2 ヶ月後腹痛が持続するために精査し, CT 上 6×4cm 大の腫瘤が認められ卵巣癌が疑われた。最終診断は明細胞腺癌 IIc であった。卵巣癌根治術, 化学療法 (CPT-11/CDDP) に放射線療法を追加するなど集学的治療を行っていたが何れにも抵抗性を示し, 発病後 1 年 4 ヶ月で死亡した。

本症例ではウイルス量は常に検出感度以下であり, HIV 感染後の病勢としてはコントロールされていたと考えられる。このような状況下でも HIV 感染が腫瘍の急速な進展および治療に対する抵抗性に寄与していたかは明らかではないが, その可能性は否定できない。

Key words : 人免疫不全ウイルス (HIV) 感染, 卵巣癌

緒 言

我々は診断に苦慮し治療抵抗性であった HIV 合併明細胞腺癌の 1 例を経験した。我々の知る限り本邦において, このような報告例はない。HIV 感染者の長期生存が可能となってきた今日, HIV 感染者における卵巣癌が治療抵抗性を有する可能性を考慮することは今後の臨床において重要と考えられるため, 若干の文献的考察も含めて報告する。

症 例

患 者 : 35 歳 2 経妊 1 経産

主 訴 : 左下腹部痛

現病歴 : 2003 年 3 月に帝王切開にて第 1 子出産, その 6 ヶ月後 (2003 年 9 月) より左下腹部痛が出現した。発熱や明らかな増悪傾向は認められなかった。2003 年 10 月 9 日, 当科外来受診となった。外来初診時の超音波検査で異常所見は認められなかったが, その後も腹痛が持続するために 2003 年 12 月 10 日に当センター外科を受診した。CT 上卵管留膿腫が疑われたため当科紹介となり, 12 月 17 日より MINO100mg/day による治療を外来にて施行したものの改善せず, 精査加療目的にて 2003 年 12 月 28 日に入院となった。

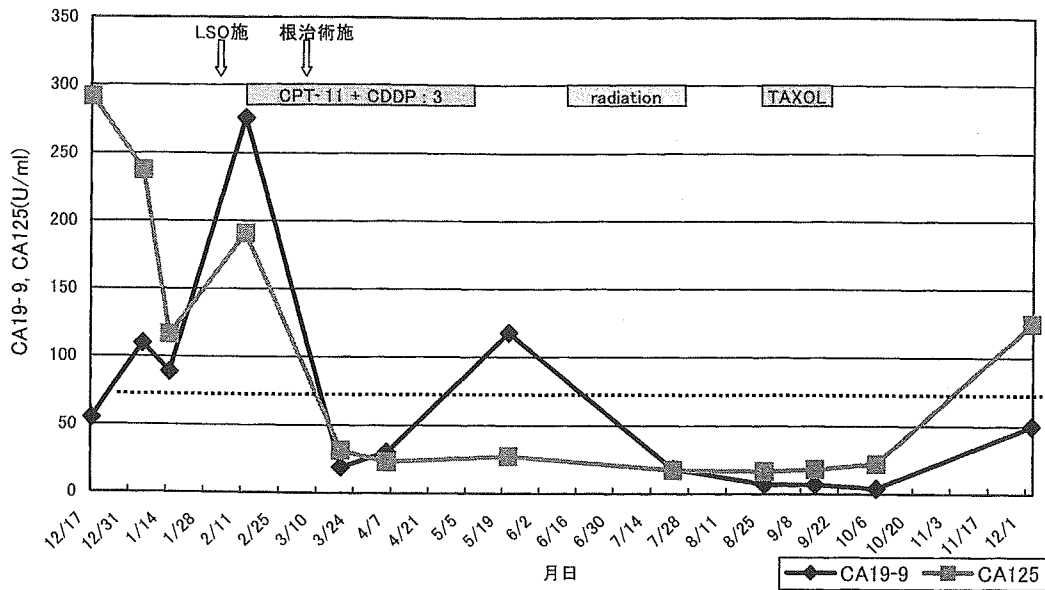


図1 卵巣癌経過

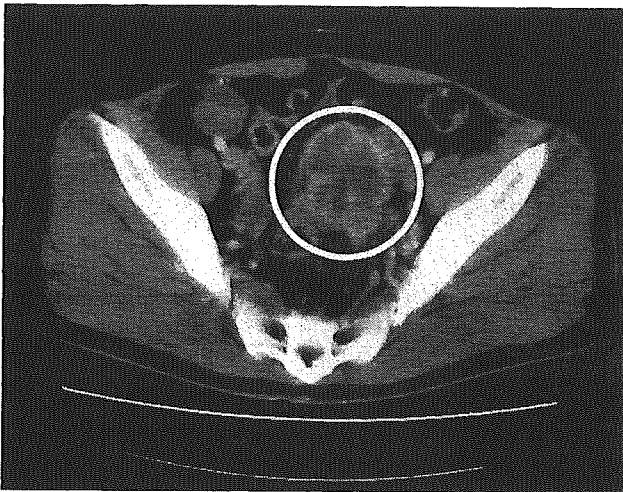


図2 12月10日 初診時CT

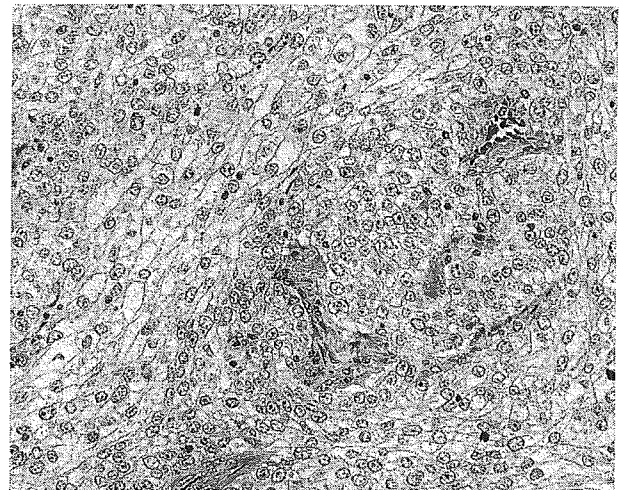


図3 試験開腹時病理所見

既往歴：22歳，痔核にて手術 27歳，HIV感染が判明，d4T/3TC/EFV内服中

家族歴・入院時現症：特記すべき事項なし

入院時検査所見：

血算（12/28）；WBC 12220/ μ l，Hb 11.9g/dl，Ht 36.0%（MCV 95.5fl，MCH 31.6pg，MCHC 33.1%），Plt 30.0×10^4 / μ l

生化（12/28）；Alb 4.1g/dl，AST 27IU/l，ALT 53

IU/l，LDH 210IU/l，ALP 565IU/l， γ -GTP 197IU/l，BUN 7.3mg/dl，Cre 0.61mg/dl，UA 3.9mg/dl，Na 138mEq/l，K 3.9mEq/l，Cl 104mEq/l，CRP 6.00mg/dl

腫瘍マーカー（12/17）；CA19-9 55U/ml，CA125 291.5U/ml

入院後経過：

1. 卵巣癌の経過（図1）