

不育症患者

1割気分障害疑い

岡山大学院 グループ調査 「精神的ケア必要」



江見弥生助教

流産や死産を繰り返す「不育症」の患者のうち1割余りがうつ状態など気分・不安障害の疑いがあることが岡山大学院保健学研究科の江見弥生助教らのグループの調査で分

かった。第1子出産後、不育症になった人がより不安傾向が強いかも判明、精神的ケアの必要性をあらためて浮き彫りにした。

厚生労働省の不育症に関する研究の分担研究の一つ。2008年5月～10年1月に岡山大病院産科婦人科の不育症外来を初めて受診した女性91人(21～43歳、流産2～7回)に調査した。気分不安障害患者のスクリーニング(ふるい分け)に使う「K6」と、不安の強さを測定する「潜在性不安尺度(MAS)」という質問回答を点数化する二つの調査法を使用した。

MASでは、軽いうつ状態やパニック障害など含む不安障害領域と判断する22点以上が10人(11・0%)、うつ病領域とされる27点以上は3人(3・3%)いた。

一方、K6では、50%以上が気分・不安障害に該当するとされる9点以上が22人(24・2%)。両調査で点数の高い人は共通し、相関関係が認められた。流産回数が増えるほど不安が強まる傾向もみられる。特に第1子を産んだ後に4回以上流産した人(4人)

結果について江見助教は「以前は無事産めただけにギャップが大きく、自分の体の変化などに大きな不安を抱いているのではないかと、子どもがいることが必ずしも不安の緩和にはつながっていない」と指摘する。同病院では「岡山県不妊専門相談センター」が不育症の相談に乗るほか、流産した女性に対して、子どもとお別れする時間や場を設けるなど悲しみを緩和するグループケアを実施しているが、医療機関での取り組みはまだ少ないという。

江見助教は「多くの人は話を聞いてあげるなどのケアをすれば心の回復はみられる。医療者が関心を持ち、患者が安心して悲しみを打ち明けられる環境をつくるのが大切」と話している。(阿部光希)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
品川克至 中塚幹也 谷本光音	不妊について	特定非営利活動法人 全国骨髄バンク推進連絡協議会 冊子編集委員会	全国協議会ニュース臨時増刊号「改訂版」白血病と言われたら —発症間もない患者さんにご家族のために— 疾患・治療編	特定非営利活動法人 全国骨髄バンク推進連絡協議会	東京	2008	147-155
中塚幹也	卵巣凍結保存の境界線	篠原駿一郎 石橋孝明	よく生き、よく死ぬ、ための生命倫理学	ナカニシヤ出版	京都	2009	68-90
中塚幹也	妊産褥婦の診察と検査／妊娠の診断と妊婦管理	石原理, 柴原浩章, 三上幹男, 板倉敦夫	講義録 産科婦人科学	メジカルビュー社	東京	2010	
中塚幹也	ジェンダーとセクシュアリティ	石原理, 柴原浩章, 三上幹男, 板倉敦夫	講義録 産科婦人科学	メジカルビュー社	東京	2010	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lin Hao, Soichi Noguchi, Yasuhiko Kamada, Aiko Sasaki, Miwa Adachi, Keiko Shimizu, Yuji Hiramatsua, and Mikiya Nakatsuka	Adverse Effects of Advanced Glycation End Products on Embryonal Development	Acta Medica Okayama	62(2)	93-99	2008
Emi Y, Adachi M, Sasaki A, Nakamura Y, Nakatsuka M.	Increased arterial stiffness in female-to-male transsexuals treated with androgen.	J Obstet Gynaecol Res.	34(5)	890-7	2008
Ueda N., Kushi N, Nakatsuka M., Ogawa T., Nakanishi Y., Shishido K., Awaya T.	Study of Views on Posthumous Reproduction, Focusing on its Relation with Views on Family and Religion in Modern Japan.	Acta Medica Okayama	62(5)	285-296	2008

Yuka Goto, Mikiya Nakatsuka, Hiroyuki Okuda	Effects of aging on heart rate variability and its relationship to psychosomatic complaints in women.	Journal of the Japan Society of Neurovegetative Research	45(6)	1-9	2008
大谷友夏, 因來実里, 秦久美子, 佐藤久恵, 永井真寿美, <u>中塚幹也</u>	流産・死産のグリーフケア: 母親と医療スタッフの捉え方	日本不妊カウンセリング学会誌	7(1)	57-58	2008
江見弥生, 藤原順子, 相澤亜紀, <u>中塚幹也</u>	生殖医療を専門としたカウンセリングに対する認知度と要望	日本不妊カウンセリング学会誌	7(1)	68-69	2008
川上舞子, 藤井友紀, 田上志保, 溝口祥代, 吉田真奈美, 山下真由, <u>中塚幹也</u>	凝固障害を伴う不育症患者のヘパリン注射に対する希望調査	岡山県母性衛生	24(1)	42-43	2008
後藤由佳, 山中祥栄, 莎如拉, <u>中塚幹也</u> , 奥田博之	自律神経機能と卵巣機能との関連—心拍変動解析を用いて—	岡山県母性衛生	24(1)	48-49	2008
江見弥生, 中間みちよ, 藤原順子, 秦久美子, 佐藤久恵, 江國一二美, <u>中塚幹也</u>	不妊症・不育症治療におけるカウンセリングへの認知度と要望	岡山県母性衛生	24(1)	61-62	2008
因來実里, <u>中塚幹也</u> , 秦久美子, 佐藤久恵, 大谷友夏, 永井真寿美, 佐々木真美, 松井たみこ	死産後のグリーフケアの有用性	岡山県母性衛生	24(1)	69-70	2008
Yuka Goto, Hiroyuki Okuda, Mikiya Nakatsuka	Autonomic response in women with psychosomatic symptoms: short-term frequency, domain analysis of heart rate variability in ergometer loading	Journal of the Japan Society of Neurovegetative Research	46(4)	341-348	2009
矢富茜, 久下さくら, 三谷久美子, 奥村永里子, 難波沙由里, 米藤由貴, 江見弥生, <u>中塚幹也</u>	流産・死産後の環境と不育症女性の心理	岡山県母性衛生	25	50-51	2009
Mikiya Nakatsuka	Endocrine treatment of transsexuals: assessment of cardiovascular risk factors. Expert Rev.	Endocrinol. Metab.	5(3)	319-322	2010
中村恵子 小野晴美 芳賀真子 <u>中塚幹也</u>	岡大式の教育資料を用いた不育症患者に対するヘパリン自己注射指導の有用性の検討	看護研究集録平成 21 年度		69-74	2010
吉田真奈美, 溝口祥代, 山下真由, <u>中塚幹也</u>	妊婦における食の安全性, 葉酸, 水銀の摂取に関する認識	母性衛生	50(4)	568-574	2010

小寺菜見子, 大田有貴子, 塩田萌, <u>中塚幹也</u>	不妊症に対する高校生と大学生の意識調査	岡山県母性衛生	第 26 号	43-44	2010
江見弥生, 莎如拉, 松田美和, 清水恵子, 小谷早葉子, 菊池由加子, 鎌田泰彦, 平松祐司, <u>中塚幹也</u>	不育症症例における初診時の顕在性不安の検討	岡山県母性衛生	第 26 号	45-46	2010
<u>中塚幹也</u>	LPS, AGEs 刺激による一酸化窒素 (NO) 産生酵素誘導とプロテアーゼインヒビター	Surgery Frontier	17(3)	111-116	2010
江見弥生, 藤原順子, <u>中塚幹也</u>	不育症女性の抑うつ傾向と顕在性不安の検討: K6, MAS を使用して	日本不妊カウンセリング学会誌	9(1)	43-44	2010
石丸文穂, 藤原順子, 江見弥生, <u>中塚幹也</u>	不妊専門相談センターによる遠隔地の出張相談	日本不妊カウンセリング学会誌	9(1)	77-78	2010
杉 俊隆, <u>中塚幹也</u> (ライター 狩生聖子)	知って得する! 新「名医の最新治療」Vol.156 不育症	週刊朝日	115(51) 通巻 5037号	104-106	2010

総合分担研究報告 17

分担課題: 妊娠中の母体ストレスおよび着床との関連に関する検討

研究分担者 下屋 浩一郎 川崎医科大学産科婦人科学教授
勝山 博信 川崎医科大学公衆衛生学教授

研究要旨

母体のストレスによって妊娠中の様々な合併症のリスクが増加することが報告されている。妊娠中の唾液中のコルチゾールおよびクロモグラニンA/蛋白は妊娠期間を通じて2相性に変化し、抑うつ状態にある症例でむしろ唾液中ストレスマーカーは抑制されていた。自然流産あるいは不育症においても着床時期の母体のストレス量が流産すなわち着床障害と関連する可能性が考えられる。体外受精・胚移植治療中の不妊症患者においては多数が抑うつ傾向にある。しかしながら SDS、GHQ28 の質問票の結果と着床との間には相関は見られなかった。唾液中コルチゾール値は着床成功群で有意に低値を示し、アミラーゼは有意に高値を示した。クロモグラニンA/蛋白比には有意差は認められなかった。着床前および着床期では、着床成功群で唾液中コルチゾール値が低かったが、アミラーゼは有意に高値を示した。クロモグラニンA/蛋白には有意差は認められなかった。一方、黄体後期にはいずれのマーカーにおいても差は認められなかった。唾液中のストレスマーカーの測定は不育症・不妊症症例においても有効なツールとなる可能性がある。

A. 研究目的

母体のストレスによって妊娠中の様々な合併症のリスクが増加することが報告されている。妊娠中のストレス指標を客観的に評価するものとして唾液中のストレスマーカーに注目して妊娠中の定量化をまず行った。自然流産あるいは不育症においても着床時期の母体のストレス量が流産すなわち着床障害と関連する可能性が考えられる。しかしながら、これを検討することは現実的には困難である。不妊治療とりわけ体外受精・胚移植においては着床時期が明確であることからこの検討が容易である。さらに不妊治療においても母体のストレスと治療成績との関連は重要な情報となり得る。しかしながら妊娠初期の流産と母体ストレスの関連や体外受精・胚移植の際の母体ストレスと着床率に関する検討は少ない。本研究では体外受精・胚移植における着床率と妊娠早期の母体ストレスとの関連について質問票や唾液中ストレスマーカーによって明らかにし、着床率改善のための情報を得ることを目的とし、さらにその成果から流産と妊娠初期の母体ストレスとの

関連について検討することを目指した。

B. 研究方法

妊娠中のストレス量を評価する目的にて妊娠初期・中期・後期・分娩前・産褥にサリベットを用いて唾液を採取し、遠心分離にて唾液を回収後、スピッツに移して凍結保存し、ストレスマーカー(コルチゾール、クロモグラニンA)の測定を行った。また、質問表によるストレス解析を同時に行った。

不妊専門クリニックにおいて体外受精・胚移植(顕微授精、凍結卵移植を含む)を受ける患者を対象に質問表によるストレス解析および唾液中のストレス量の定量化を行い、妊娠の帰結との関連について検討した。唾液中のストレス定量として唾液採取は採卵日より1日おきにサリベットを用いて唾液を採取し、次回月経開始または妊娠反応確認時点までとした。採取した検体は次回外来受診まで冷所にて保存し、質問表は自宅にて記入し、外来受診時に回収した。検体は、遠心分離にて唾液を回収後、スピッツに移して凍結保存

し、ストレスマーカー(コルチゾール、クロモグラニン A、アミラーゼ)の測定を行った。妊娠成立群と不成立群の患者背景を比較し、質問表によるストレス度評価との比較検討を行った。また、両群におけるストレスマーカー測定値の違いを経時的変化とともに比較検討した。

(倫理面への配慮)

(1) 被験者に理解を求め同意を得る方法

本人の署名入りのインフォームドコンセントの文書を保存する。研究者の連絡先を書いた文書を調査対象者に渡す。説明文書と同意書は別に添付した。

(2) 被験者の受ける利益と損失

本研究では介入試験を行わず、被験者の利益および損失ともに生じる可能性はない。

(3) 人権及びプライバシーへの配慮

本試験にかかわる者は、参加する全ての被験者のプライバシーを保護するため、以下の事項に配慮する。また、業務上被験者のプライバシーを知り得る者はその秘匿を保持する。

(4) 倫理委員会の承認

本研究にあたって川崎医科大学・川崎医科大学附属病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

妊娠症例 69 例に対し、ストレス量を経時的に測定した。妊娠中の唾液中のコルチゾールおよびクロモグラニンA/蛋白は妊娠期間を通じて2相性に変化し、質問表による解析で抑うつ状態にある症例でむしろ唾液中ストレスマーカーは抑制されていた。

体外受精・胚移植症例に関する検討では患者年齢、治療内容、労働時間、ストレス自覚の有無、喫煙、飲酒などには着床成功群と非成功群との間で差は認められなかった。また、質問票によるストレス度および健康指標度については SDS の平均スコアが着床成功群で 39.5、非成功群で 39.2 と有意差は認められず、GHQ の平均スコアも着床成功群で 5.6、非成功群で 5.1 と有意差は認められなかった。また、抑うつ傾向にある症例が 52% と高頻度に認められた。抑うつ群と正常群の2群で検討しても着床率に有意差は認められなかった。また、包括的健康度評価法 GHQ-28 で健康不良群と正常群の2群で検討しても着床率に有意差は認められなかった。一方、唾液中のストレスマーカーについてはコルチゾールが着床成功群で有意に低値であった。また、アミラーゼは

着床成功群で有意に高値であった。クロモグラニンA/蛋白比は着床成功群で低い傾向にあったが有意差は認められなかった。着床成功群においてコルチゾール値が低値となるのは着床前、および着床期においては有意差をもって認められたが、黄体期後期には有意差は認められなかった。アミラーゼの高値も2群で検討しても着床率に有意差は認められなかった。

D. 考察

妊娠中のストレス定量に唾液中ストレスマーカーの測定は有用な手法であった。また、抑うつ状態にある症例でむしろ唾液中ストレスマーカーは抑制されており視床下部-下垂体-副腎系が疲弊している可能性が示唆された。不妊症患者において唾液中ストレスマーカーを測定することにより、医師-患者関係や質問票からはとらえきれないストレスを客観的に評価し、早期からストレスに対する対応が可能となる可能性が考えられる。測定するストレスマーカーとしてはコルチゾールが有用と考えられる。妊娠初期(着床期)流産と母体ストレスが深く関連する可能性を示唆している。流産・習慣流産に対する予防・治療に母体ストレス評価と対応が重要である可能性を示唆している。

E. 結論

妊娠中のストレス指標として唾液中のストレスマーカーの測定は有効な手法である。また、着床時期のストレス量が着床の成功と関連する可能性がある。唾液中のストレスマーカーの測定は不育症・不妊症症例において有効なツールとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Temporal and Spatial Expression of Tumor-Associated Antigen RCAS1 in Pregnant Mouse Uterus. Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Am J Reprod Immunol. 2010 Feb;63(2):137-43.
- 2) Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells. Tskitishvili E,

- Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Mol Hum Reprod. 2010 Mar;16(3):188-99.
- 3) Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study. Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T. Reprod Sci. 2010 May;17(5):419-25.
- 4) Maternal blood serum and plasma human tumor-associated antigen RCAS1 during the course of uncomplicated pregnancies: a prospective study. Tskitishvili E, Sharentuya N, Tsubouchi H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T. Am J Reprod Immunol. 2010 Sep;64(3):218-24.
- 5) The effect of tumor-associated protein RCAS1 gene silencing on blood pressure and urinary protein excretion in pregnant mouse: a pilot study. Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T. Am J Obstet Gynecol. 2010 Oct;203(4):364.e6-364.e12.
- 6) The change of the salivary stress marker concentrations during pregnancy -Maternal depressive status suppress the changes of those levels. Hiroaki Tsubouchi, Yuichiro Nakai, Masahiro Toda, Kanehisa Morimoto, Yang Sil Chang, Norichika Ushioda, Shoji Kaku, Takafumi Nakamura, Tadashi Kimura, Koichiro Shimoya. J Obstet Gynaecol Res. 2010 in press
- 7) Effects of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a major lipid peroxidation-derived aldehyde, and N-acetyl-cysteine(NAC) on the cyclooxygenase (COX)-2 expression in human uterine myometrium Kumiko Temma-Asano, Ekaterine Tskitishvili, Takeshi Kanagawa, Takuji Tomimatsu, Tateki Tsutsui, Tadashi Kimura, Yang Sil Chang, Takafumi Nakamura, Yuichiro Nakai, Koichiro Shimoya Obstet Gynecol Invest 2010 in press
- 8) 外来診療マニュアル 周産期 流産・習慣流産 下屋浩一郎, 石田剛, 張良実, 潮田至央, 郭翔志, 中村隆文, 中井祐一郎 産婦人科の実際 59 巻 11 号 Page1775-1780(2010.10)
- 9) これだけは知っておきたい胎児の診断と治療 胎児 well-being 下屋浩一郎, 石田剛, 張良実, 潮田至央, 郭翔志, 中村隆文, 中井祐一郎 産婦人科治療 101 巻 5 号 Page526-532(2010.11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K.	Temporal and Spatial Expression of Tumor-Associated Antigen RCAS1 in Pregnant Mouse Uterus.	Am J Reprod Immunol.	63(2)	137-43	2010
Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K.	Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells.	Mol Hum Reprod.	16(3)	188-99	2010
Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T.	Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study	Reprod Sci.	17(5)	419-25	2010
Tskitishvili E, Sharentuya N, Tsubouchi H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T.	Maternal blood serum and plasma human tumor-associated antigen RCAS1 during the course of uncomplicated pregnancies: a prospective study.	Am J Reprod Immunol.	64(3)	218-24	2010
Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T.	The effect of tumor-associated protein RCAS1 gene silencing on blood pressure and urinary protein excretion in pregnant mouse: a pilot study.	Am J Obstet Gynecol.	203(4)	364.e6-364.e12	2010
下屋浩一郎, 石田剛, 張良実, 潮田至央, 郭翔志, 中村隆文, 中井祐一郎	外来診療マニュアル 周産期 流産・習慣流産	産婦人科の実際	59 巻 11 号	1775-1780	2010
下屋浩一郎, 石田剛, 張良実, 潮田至央, 郭翔志, 中村隆文, 中井祐一郎	これだけは知っておきたい胎児の診断と治療 胎児 well-being	産婦人科治療	101 巻 5 号	526-532	2010

<p>Hiroaki Tsubouchi, Yuichiro Nakai, Masahiro Toda, Kanehisa Morimoto, Yang Sil Chang, Norichika Ushioda, Shoji Kaku, Takafumi Nakamura, Tadashi Kimura, Koichiro Shimoya.</p>	<p>The change of the salivary stress marker concentrations during pregnancy –Maternal depressive status suppress the changes of those levels.</p>	<p>J Obstet Gynaecol Res.</p>			<p>in press</p>
<p>Kumiko Temma-Asano, Ekaterine Tskitishvili, Takeshi Kanagawa, Takuji Tomimatsu, Tateki Tsutsui, Tadashi Kimura, Yang Sil Chang, Takafumi Nakamura, Yuichiro Nakai, Koichiro Shimoya</p>	<p>Effects of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a major lipid peroxidation-derived aldehyde, and N-acetyl-cysteine(NAC) on the cyclooxygenase (COX)-2 expression in human uterine myometrium</p>	<p>Obstet Gynecol Invest</p>			<p>in press</p>

総合分担研究報告 18

分担課題:制御性 T 細胞の着床、妊娠維持に関する役割についての研究

研究代表者 齋藤 滋 富山大学産科婦人科学教授
研究協力者 島 友子 富山大学産科婦人科学助教
中島彰俊 富山大学産科婦人科学助教
伊藤実香 富山大学産科婦人科学研究生

研究要旨

父親抗原特異的 Treg 細胞の有無を確認するために、BALB/c マウス(♀)×DBA/2 マウス(♂)のアロ交配を用いて、妊娠マウスにおける父親抗原特異的 T 細胞の推移をフローサイトメトリーにて確認した。父親抗原特異制御性 T 細胞は同系妊娠では変動を認めなかったが、アロ妊娠では着床前(妊娠 3.5 日)、着床直後(妊娠 5.5 日)に所属リンパ節で上昇し、子宮では着床直後(妊娠 5.5 日)以降に上昇を認めた。アロ妊娠では父親抗原特異的制御性 T 細胞が着床前より子宮の所属リンパ節で増殖を開始しており、着床以降はさらに胎児母体局面である子宮で増殖していることがわかった。以上よりアロ妊娠において制御性 T 細胞は父親抗原特異的に妊娠の成立維持に関与ことが明らかとなった。

A. 研究目的

アロ妊娠の際、胎児(仔)は父親抗原を有するが、母体免疫系の変化により胎児は拒絶されずに妊娠は継続される。胎児許容機構の中で CD4+CD25+制御性 T 細胞の果たす役割は大きく、妊娠時に制御性 T 細胞が増加すること、流産例では制御性 T 細胞が減少することがこれまで知られていた。平成 21 年度の報告で、抗 CD25 抗体投与により制御性 T 細胞を減少させる方法を用いた実験系で、妊娠 2.5 日目のマウスに投与するとアロ妊娠では妊娠せず(着床障害)、同系妊娠では妊娠が確認されること、また、妊娠 4.5 日目および 7.5 日目の抗 CD25 抗体投与でアロ妊娠では高率に流産を生じるが同系妊娠では流産を生じないことより、アロ妊娠では制御性 T 細胞は着床と妊娠初期の妊娠維持に重要な役割を果たすことを明らかにしたと報告した。

アロ妊娠でのみ着床障害、流産が誘導されることから、父方抗原特異的制御性 T 細胞が存在する可能性に注目し、マウス妊娠時の父親抗原特異的制御性 T 細胞の同定とその変動を検討した。

B. 研究方法

父親抗原特異的 Treg 細胞の有無を確認するた

めに、アロ妊娠マウス群として、BALB/c マウス(♀)×DBA/2 マウス(♂)のアロ交配を用いた。DBA/2 マウスの保持している MIs I a 抗原に対して反応性 T 細胞受容体(TCR)である Vβ6 に注目した。同時に細胞増殖の有無を確認するため、Ki-67 抗原を染色し、妊娠 BALB/c マウスにおいて Ki67⁺Vβ6⁺Foxp3⁺T 細胞(父親抗原特異的制御性 T 細胞)の変動を解析した。妊娠 3.5(着床前)、5.5(着床後)、11.5(中期)、18.5(後期)日の妊娠各時期に、子宮局所、子宮所属リンパ節、全身表在リンパ節、脾臓の各臓器より単核球を分離し、フローサイトメトリーを用いて解析した。コントロール群として BALB/c マウス(♀)×BALB/c マウス(♂)の同系交配、および非妊娠 BALB/c マウス(♀)を用いた。

C. 研究結果

マウスは交配後 4.5 日に着床する。アロ妊娠では着床前(妊娠 3.5 日)、着床直後(妊娠 5.5 日)に子宮所属リンパ節で父親抗原特異的制御性 T 細胞率が有意に増加し、子宮では着床直後(妊娠 5.5 日)以降に有意に増加した。一方、アロ妊娠の脾臓、全身表在リンパ節、および同系妊娠では父親抗原特異的制御性 T 細胞の有意な変動は認めなかった。すなわち、アロ妊娠では胎児抗原特異的 Treg 細胞

が着床前より子宮の所属リンパ節で増殖を開始しており、着床以降はさらに胎児母体局面である子宮で増殖していることがわかった。

D. 考察・E. 結論

アロ妊娠において着床直前から母子接点の場においてのみ父親抗原特異的制御性 T 細胞が増殖していることから、性交渉後、腔内では樹状細胞が父親抗原を認識し、着床前日には所属リンパ節内で樹状細胞により父親抗原が制御性 T 細胞に抗原提示され、活性化された父親抗原特異的制御性 T 細胞が増殖し、着床後にはこれらの父親抗原特異的制御性 T 細胞が子宮に動員されて妊娠成立に関与するものと考えられた。

アロ妊娠の妊娠成立、妊娠維持に制御性 T 細胞は必須であり、さらに父親抗原特異的制御性 T 細胞の重要性が明らかとなった。

今後はヒトの原因不明不育症や着床障害の原因究明のために、ヒトにおける父親抗原特異的制御性 T 細胞の検索が必要となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shima T, Sasaki Y, Ito M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, Saito S. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. *J.Reprod.Immunol.* 85(2):121-129, 2010.
- 2) Saito S, Shima T, Nakashima A, Lin Y. Immune surveillance during pregnancy. *Indian J.Physiol Pharmacol.* 54(5):60-63,2010
- 3) 齋藤 滋, 島 友子, 中島彰俊: 着床、妊娠維持における制御性(regulatory)T 細胞の重要性. *医学のあゆみ*, 233:129-134,2010.

2. 学会発表

- 1) 島友子: 妊娠子宮には胎児抗原特異的制御性 T 細胞が増加する。第 24 回日本生殖免疫学会 ワークショップ 2009 年 11 月 27-28 日 東京 (学会賞受賞)
- 2) Tomoko Shima: 「Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining

lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation」the XI International Congress of Reproductive Immunology. Travelers award 受賞 2010.8

- 3) Tomoko Shima: 「Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation, and are necessary for maintenance of allogeneic pregnancy 」The 30th American society reproductive immunology annual meeting. Travelers award 受賞 2010.5

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Shima T</u> , <u>Sasaki Y</u> , <u>Ito M</u> , <u>Nakashima A</u> , <u>Ishii N</u> , <u>Sugamura K</u> , <u>Saito S</u>	Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice.	J. Reprod. Immunol	85(2)	121-129	2010
<u>Saito S</u> , <u>Shima T</u> , <u>Nakashima A</u> , <u>Lin Y</u> .	Immune surveillance during pregnancy.	Indian J.Physiol Pharmacol	54(5)	60-63	2010
<u>齋藤 滋</u> , <u>島 友子</u> , <u>中島彰俊</u>	着床、妊娠維持における制御性(regulatory)T細胞の重要性.	医学のあゆみ	233	129-134	2010

総合分担研究報告 19

分担課題：正常妊娠と流産における Th17 細胞に関する検討

研究代表者 齋藤 滋 富山大学産科婦人科学教授
研究協力者 中島彰俊 富山大学産科婦人科学助教
島 友子 富山大学産科婦人科学助教
伊藤実香 富山大学産科婦人科学研究生

研究要旨

Th17 細胞は炎症を惹起し、拒絶反応にも関わる。Th17 細胞が妊娠中どのような変化をするかは明らかでない。そこで flow cytometry を用いて CD4⁺IL-17⁺細胞を Th17 細胞として同定し、免疫組織染色にて IL-17⁺細胞を同定した。正常妊娠では妊娠初期、中期、後期とも末梢血中の Th17 細胞は変動せず、流産例でも末梢血中の Th17 細胞は変化しなかった。Th17 細胞は正常妊娠において末梢血よりも脱落膜で増加していた。また流産例で進行流産となると脱落膜中の Th17 細胞は増加し、好中球数と Th17 細胞は正の相関を示した。なお稽留流産では Th17 細胞は増加せず Th17 細胞の増加は流産の原因ではなく結果と考えられた。

A. 研究目的

新たに同定された Th17 細胞は IL-17 を産生し炎症を引きおこし種々の病態を引きおこすことが判ってきている。妊娠時には全身ならびに子宮局所の免疫系は変化するが妊娠時に Th17 細胞がどのように変化し、流産の際に Th17 細胞が変化するか否かは明らかでない。そこで検討を行った。

B. 研究方法

本研究は富山大学倫理委員会の承認を得て行っている。患者の同意を得た上で、末梢血ならびに人工妊娠中絶時の子宮内膜の一部から単核球を分離し、PMA、イオノマイシンとプレフェルジン A を添加し 4 時間培養後、ホルムアルデヒド同定、細胞膜透過性バッファー処理後、細胞表面マーカー CD4、CD8、CD14、CD56、と細胞内サイトカイン IL-17 を染色し flow cytometer にて解析し CD4⁺IL-17⁺細胞を Th17 細胞とした。また免疫組織染色にて脱落膜中の IL-17 陽性細胞を同定した。

C. 研究結果

末梢血、脱落膜とも IL-17 陽性細胞の大部分は CD4⁺T 細胞でありごく少数の CD8⁺T 細胞にも IL-17 は認められたが、NK 細胞、単球成分には

IL-17 産生は認められなかった。妊娠初期、中期、後期とも末梢血の Th17 細胞は不変で非妊婦人と差を認めなかった。一方、脱落膜中の Th17/CD4⁺率は 3.2% (0.4-9.1%) と末梢血の値 1.1% (0.4-2.9%) に比し有意に低値であった。次に、IL-17 陽性細胞数について、正常妊娠群と流産群について免疫組織染色で検討したが、2 群間に有意な差を認めなかった。しかしながら、流産例を稽留流産群と進行流産群に分けて検討したところ、進行流産と正常妊娠群の間に有意差を認め (P<0.05)、それらの IL-17 陽性細胞は、脱落膜全体に分布しており、周囲の好中球浸潤細胞数と有意な正相関を示した (R=0.86)。

D. 考察

Th17 細胞は慢性関節リウマチなど、炎症を引き起こすことが知られている。一方、妊娠中は胎児への免疫寛容が誘導され、免疫抑制的状態にあることが知られており、Th17 細胞は減少するであろうとする予想されたが、実際には妊娠中の Th17 細胞は正常妊娠では変化しなかった。しかしながら、局所では Th17 と流産との強い相関を示唆する結果が得られた。出血等の臨床症状を伴わない稽留流産（比較的初期段階の流産）では Th17 細胞の増加は認めず、進行流産で Th17 細胞が増加すること、さらに、Th17 細胞の周囲

に好中球浸潤を伴うことは、胎児拒絶の実行段階にTh17細胞が関与していることを示す結果であった。

E. 結論

Th17細胞は流産進行に伴う炎症誘導に関わり、炎症の増強を促すことで流産を引き起こしていることが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, Saito S. Circulating and decidual Th17 cell level in healthy pregnancy. *Am. J Reprod. Immunol* 63:104-109, 2010.
- 2) Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am. J Reprod. Immunol.* 64:4-11, 2010.

2. 学会発表

- 1) 中島彰俊, 伊藤実香, 米田哲, 塩崎有宏, 齋藤滋:「T細胞・NK細胞と妊娠維持」シンポジウム. Trophoblastに関わる免疫と臨床病態. 第17回日本胎盤学会学術集会, 2009, 10, 16-17, 東京.
- 2) Akitoshi Nakashima, Mika Ito, Tomoko Shima, Satoshi Yoneda, Shigeru Saito:「The role of IL-17 in the pathogenesis of preterm labor」International symposium for immunology of reproduction, symposium “Infectious immunity“ Osaka Aug 28th-29th 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Nakashima A.</u> Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, <u>Saito S.</u>	Circulating and decidual Th17 cell level in healthy pregnancy.	Am. J Reprod. Immunol	63	104-109	2010
<u>Nakashima A.</u> Ito M, <u>Shima T.</u> Bac ND, Hidaka T, <u>Saito S.</u>	Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases.	Am. J Reprod. Immunol	64	4-11	2010

総合分担研究報告 20

分担課題: 習慣流産に対する免疫療法ならびに抗凝固療法症例の臨床的検討

研究分担者 田中 忠夫 (東京慈恵会医科大学・産婦人科・教授)
研究協力者 川口 里恵, 梅原 永能, 高橋 絵理, 土橋 麻美子, 齋藤 幸代,
仲田 由紀, 和田 誠司 (東京慈恵会医科大学・産婦人科・助教)
大浦 訓章 (東京慈恵会医科大学・産婦人科・准教授)

研究要旨

反復あるいは習慣流産の原因として, 原発性あるいは続発性流産にかかわらず, 抗リン脂質抗体(aPL)陽性の頻度が約 70%であり, 最も多かった。aPL 陽性症例に対する抗凝固療法は, 全体として 90%を超える症例で妊娠維持に成功した。aPL の種類, 抗体価の多寡, あるいはアイソタイプ別の治療成績は, 各層別間での差はなく同等に良好であった。しかし, aPL の陽性判定基準の再検討が必要である。同種免疫異常に対する夫リンパ球用いた免疫療法は 70%を超える成功率であったが, 同種免疫異常と診断する検査方法・基準をさらに検討する必要がある。

A. 研究目的

妊娠初期の流産を繰り返す不育症(反復あるいは習慣流産:RSA)の原因は多岐に渡っているが, 特に血液凝固因子あるいは免疫学的因子が関与する病態は未だ完全には解明されておらず, 実際の臨床に際して, その管理指針が定まっていないのが現状である。

そこで本研究では, RSA における血液凝固異常, あるいは自己免疫ならびに同種免疫異常の存在を明らかにし, それらを検出する適切な検査法, および効果的かつ個別的な治療法の確立を目指す。

B. 研究対象と方法

妊娠 12 週までの妊娠初期自然流産を 2 回以上繰り返しているために, 原因精査・加療を目的として慈恵医大病院・不育症外来を受診した症例を対象とし, 同意を得たうえで, 以下に示す検査・治療を施行した。

なお, 本研究の施行に際しては事前に東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得た。

1. 検査項目

1) スクリーニング検査: 子宮形態・染色体・内分泌・凝固因子などの一般的検査に加え, 以下の検査を行った。抗 DNA 抗体, 抗核抗体, 抗 cardiolipin-IgG および IgM 抗体(aCL-IgG, -IgM), 抗 cardiolipin β 2-GP1 抗体(β

2-GP1), 抗 phosphatidylserine-IgG, -IgM 抗体(aPS-IgG, -IgM), 抗 phosphatidylethanolamine-IgG, -IgM 抗体(aPE-IgG, -IgM), lupus anticoagulant(LA), protein-C および-S 活性(抗原量), および血液凝固第 XII 因子。なお, aPL 抗体価の判定基準は, 実測値 95～99 パーセントイルを弱陽性, 99 パーセントイル以上を強陽性とした。

2) 特殊検査: 上記スクリーニング検査で異常を認めない場合, 以下の検査を行った。natural killer(NK)細胞活性, 抗 HLA 抗体, 夫婦間混合リンパ球反応(MLR), および Th1/Th2 細胞比。

2. 治療方法の選択基準

1) 抗凝固療法: 一般的検査では異常を認めない症例について, 自己抗体ならびに aPL の検査結果により, 原則的に以下の基準にしたがって治療した: (A) β 2-GP1 を除いた一つの項目のみ陽性を示す症例で, かつ LA 弱陽性, aCL-IgM あるいは aPS-IgM のみ陽性の症例に対しては, アスピリンを単独投与した。 (B) LA 強陽性, β 2-GP1 陽性, aCL-IgG 陽性, aPS-IgG 陽性, aPE-IgG あるいは IgM 陽性, あるいは二つ以上の項目が陽性の症例に対しては, アスピリン+柴苓湯+ヘパリンの併用を行った。なお, アスピリン(100mg/日)は妊娠前から服用し, 妊娠 32 週まで投与した。柴苓湯(9g/日)は