

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21592114

研究課題名（和文） 寄生虫由来免疫制御物質による不育症治療の実験的研究

研究課題名（英文） Therapeutic potentials of parasitic antigens on a murine recurrent spontaneous abortion

研究代表者

早川 智 (HAYAKAWA SATOSHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30238084

研究成果の概要（和文）：

免疫学寛容の破綻は流産の原因の一つである。従来行われてきた夫リンパ球による免疫療法は感染の問題に加えて治療効果が一定せず、免疫グロブリン大量療法も高価であり新たな治療法が希求される。我々は、膠原病や炎症性腸疾患など免疫疾患に有効な寄生虫由来物質 *Dirofilaria immitis*(rDiAg) をマウス習慣流産モデル CBA/J×DBA/2J に皮下投与し、流産率を未治療群の四分の一に改善した。その機序は IL-23 による Th17 誘導の抑制の可能性が示唆された。経口投与による漢方薬 柴苓湯にも同様の効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：

The mammalian fetuses are semi-allograft for mothers. Therefore the failure of immunological tolerance often causes pregnancy loss. We revealed therapeutic potential of the recombinant antigen from a nematoda parasite, *Dirofilaria immitis* rDiAg with a murine recurrent spontaneous abortion model. (CBA/J×DBA/2J) The rDiAg treatment significantly reduced the resorption rates of mouse model, which mimic human pregnancy failures with allo-immune backgrounds.

Serum IL-4, IL-23 and TNF- α concentrations were significantly lower in rDiAg-treated mice than mock-treated mice. The serum IL-17 level was also reduced in rDiAg-treated mice but the difference was not significant. Our observations suggest as the first time of therapeutic potentials of parasites for pregnancy loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000 円	390,000 円	1690,000 円
2010 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
2011 年度	100,000 円	30,000 円	130,000 円
総計	2,730,000 円		

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：習慣流産、免疫機序、寄生虫抗原、Th17

1. 研究開始当初の背景
妊娠が成立しても健康な児を出産できず、流産や死産を繰り返す不育症は母体の肉体的

精神的ストレスが極めて大きいのみならず、出生数の減少により高齢化社会を迎えるわが国の未来にゆゆしき問題となる。従ってそ

の病態解析と治療の確立は、患者夫婦，生まれてくる児の幸福のみならずわが国の国益にもかかわる生殖医療上の大きな課題である。免疫学的には妊娠の成立と維持には T helper (Th) 2 優位の環境が重要であり、母体と胎児の接点にある脱落膜リンパ球が Th2 型の応答をすることが大きな役割を果たすと考えられている。逆に Th1 型の免疫応答は、母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し局所的には、胎児胎盤を傷害して、切迫流産や胎児発育遅延の原因となり全体的には妊娠高血圧症候群や HELLP 症候群といった生命に関わる異常妊娠の原因になる。さらに両者の関係に、もうひとつ重要な因子として細菌やウイルス寄生虫感染が影響する可能性がある。

2. 研究の目的

我々は HIV 母子感染のフィールド調査を行っているラオス山村では他の妊娠合併症に比較し同種免疫異常による不育症が少ないことから、衛生環境によるアレルギー疾患の頻度変化という hygiene hypothesis が習慣流産にも適応できるのではないかと考えた。これを実験的に検証するため、寄生虫抗原として *Dirofilaria immitis*(rDiAg)の妊娠動物への影響について基礎的検討を行った。さらに、わが国や中国・台湾など中華文化圏で不育症患者に広く投与されている漢方薬(中薬)の効果について検討した。

3. 研究の方法

Clark らによって免疫機序による不育症モデルとして開発された DBA/2J オス×CBA/J メスを交配し、以下の方法で rDiAg の免疫調節作用と流産予防効果の有無を判定した。

RDiaG は共同研究者である Imai らがクローニングしたものを分与されて実験に供した。

1) 予め、8-10 週の CBA/J メス背部皮下に無菌的にオスモティックポンプ植え込み手術を行い、rDiAg を投与した。

2) DBA/2J オスと mating を行い、膣栓確認で交尾を判定した

3) 妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸

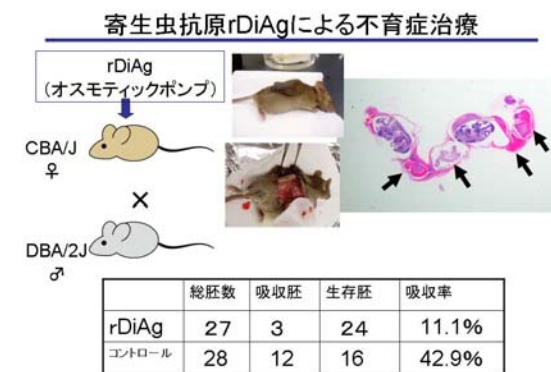
収胎仔数を判定した

4) 胎盤・脱落膜の組織学的検討と,suspension array による血中サイトカインの定量を行った。

5) 寄生虫の代替薬として 飼料に当帰芍薬散 0.5% , 柴苓湯 0.7%重量比で配合し、自由摂取させた。

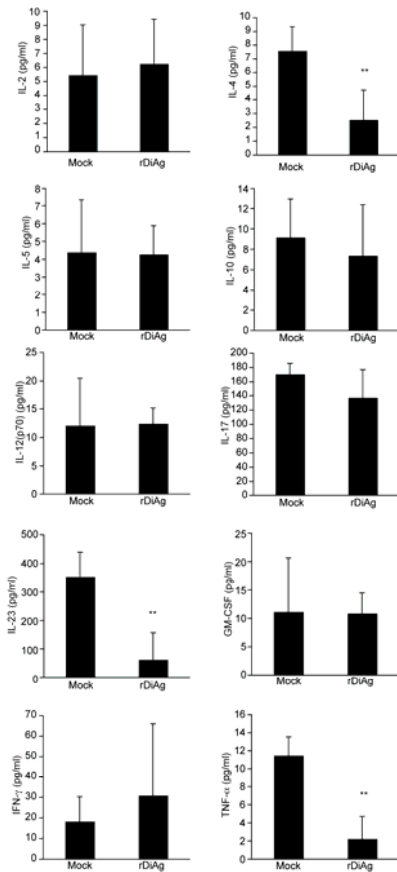
4. 研究の成果

非投与群の DBA/2J オス X CBA/J メスの胎児吸収は、42.9%であったが、rDiAg 投与により 11.1%まで減少した。

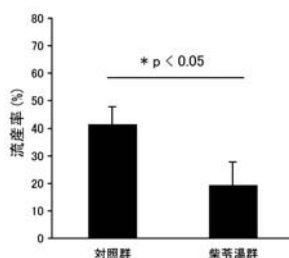
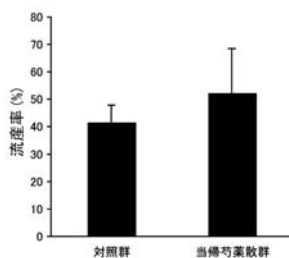


血中サイトカインの解析では IL-4, IL-23, TNF- α が有意に減少し、IL-17 は減少傾向を見たが有意差はなかった。

他の type 1 (IL-2, IFN- γ) type2 (IL-5, IL-10) サイトカインは変動しなかった。興味深いことに rDiAg 投与動物では TGF- β が有意に上昇した。



漢方薬投与では対照群の流産率 43.4%に対して当帰芍薬散群は 52.3%、柴苓湯群は 14.6%と後者のみ統計的に有意に流産率の低下がみられた。漢方薬投与群と非投与群のサイトカイン解析では、当帰芍薬散群、柴苓湯群いずれも IL-4, IL-23, TNF- α , IL-17, TGF- β の変動は見られず、異なった機序が作用していると考えられた。



結論

寄生虫由来抗原 rDiAg は習慣流産モデルマウスで統計的に有意に妊娠予後を改善した、その機序は従来知られていた Th2 の誘導ではなく、Th1, Th2 ともに抑制する新たな機構があると考えられた。特に TGF- β が有意に上昇する点より、制御性 T 細胞の関与が強く疑われた。しかし、臨床的応用性を考えた場合、妊婦や妊娠を希望する女性に寄生虫あるいはその抽出物を投与することには安全面での障壁があり、今後十分な検討を要すると思われる。我々は原因不明の不妊/不育症に広く投与されている漢方薬、当帰芍薬散ならびに柴苓湯を用いて同様の検討を行い、柴苓湯において寄生虫療法に匹敵する治療効果を得た。しかし、サイトカインプロファイルは全く異なった結果であった。柴苓湯の主要構成生薬柴胡の構成成分サイコサポニンにはプロスタグランジン合成阻害や内因性ステロイドの調節、活性酸素消去酵素 (SOD) の活性調節などの作用が報告され、免疫調節以外の機序が推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1 Komine-Aizawa S, Izumi Y, Imai S, Fujita K, Hayakawa S.

The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. *cJ Reprod Immunol*. 2011 Dec;92(1-2):21-6

2 Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S Influence of advanced age on *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in guinea pigs

aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1500-6.

3 Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S. Lipo-polysaccharide (LPS)-induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. Am J Reprod Immunol. 2011 Jan;65(1):20-7.

4相澤 (小峯) 志保子 早川 智
CBA/J×DBA/2J流産マウスモデルにおける
“当帰芍薬散”“柴苓湯”の効果 産婦人科漢方
研究の歩み 29 2012

5 早川智【母体と児の感染免疫-最新の知見】
母体と児の免疫 妊婦における免疫の変化(
臨床と微生物 38 巻 6号 P631-636 2011

6 相澤志保子, 早川智【不育症 最前線】感
染症と不育症 産婦人科の実際 60 巻 10号
P1497-1501 2011.10

[学会発表] (計4件)

1 Shihoko Komine-Aizawa, Yasuyuki
Izumi, and Satoshi Hayakawa The
therapeutic potential of the
recombinant antigen from *Dirofilaria*
immitis (rDiAg) for immune mediated
pregnancy loss *14th International*
Congress of Immunology. Workshop 26
Aug 2010 Kobe

2相澤 (小峯) 志保子 早川 智
CBA/J×DBA/2J流産マウスモデルにおける
“当帰芍薬散” “柴苓湯” の効果 第29回
産婦人科漢方研究会 2011年 9月 徳島

3 相澤 (小峯) 志保子 早川 智 流
産マウスモデルにおける新しい流産予防
治療の開発 第26回日本生殖免疫学会
名古屋 2011年 11月

4 相澤 (小峯) 志保子 早川 智
CBA/J×DBA/2J反復流産マウスモデルに対
する新たな治療戦略と免疫学的解析 第
64回日本産科婦人科学会 神戸 2012年

月13日

[図書] (計2件)

1) 清野 宏 編著 「臨床粘膜免疫」
早川 智 産婦人科領域 シナジー2010
2) 山口 徹 編著 「今日の治療指針」
早川 智 妊婦の感染症 2011年版
2011 医学書院

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 智 (日本大学・医学部・教授)
研究者番号: 30238084

(2) 研究分担者

相澤 志保子 (日本大学・医学部・助手)
研究者番号: 30513858
泉 泰之 (日本大学・医学部・研究員)
研究者番号: 50459872