

## 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 6月 13日現在

機関番号： 32202  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2009 ～ 2011  
 課題番号： 21592107  
 研究課題名（和文） クラミジア熱ショックタンパク質の卵管炎病態形成への関与  
 研究課題名（英文） The relationships of Chlamydia Trachomatis heat shock protein 60 resulting in tubal damage  
 研究代表者  
 平野 由紀（HIRANO YUKI）  
 自治医科大学・医学部・助教  
 研究者番号： 10398521

## 研究成果の概要（和文）：

クラミジア・トラコマティス性卵管性不妊症モデルマウスを樹立し、抗 Ct 抗体価の上昇と共に抗 cHSP60 抗体価の上昇も確認した。またより高度な卵管性不妊症モデルマウスを作製する目的で、遅延型過敏反応を想定した二次感染を試みた。その結果二次感染モデルでは、より重症な卵管傷害を認め、抗 Ct 抗体価、抗 cHSP60 抗体価に関しても初回接種のみの群と比較して著明に上昇したことから、遅延型過敏反応と密接に関与することが知られる cHSP60 の役割を明らかにした。つまり重傷な卵管病変形成への cHSP60 の関与を証明した。

## 研究成果の概要（英文）：

We established tubal factor infertility model mouse by chlamydia trachomatis infection, and recognized with the rise of anti-chlamydial heat shock protein 60 (cHSP60) antibody titer and also with the rise of anti-Ct antibody titer.

Moreover, we tried the secondary infection supposing a delayed type hypersensitivity reaction in order to produce a more advanced damage infertility model mouse.

As a result, by the secondary infection model, since more advanced tubal damage was accepted and it went up to also about anti-Ct antibody titer and anti-cHSP60 antibody titer as compared with the group of only initial infection.

Thus, cHSP60 may be mainly involved in the delayed hypersensitive response resulting in tubal damage,

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学・生殖医学

キーワード：クラミジア・トラコマティス、卵管性不妊症、クラミジア HSP60

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

国内・外において、生殖世代を含む若年齢層を中心として、クラミジア・トラコマティス（以下クラミジア）感染症の罹患率は著しく増加している。クラミジア感染は上行性に広がり、付属器炎、骨盤腹膜炎や肝周囲炎を発生する。引き続き卵管や骨盤内に癒着性病変を形成し、卵管性不妊症を発症する最も頻度が高い原因となる。クラミジア駆除を目的とする治療法として抗生剤あるいは抗菌剤があり、有効性は高い。しかしながらクラミジア性卵管炎による不可逆的変化の結果生じる卵管性不妊症、すなわち卵管狭窄や閉塞、あるいは卵管周囲癒着に対して上記の薬物治療は無効である。

従ってクラミジア性卵管炎の病態を解明し、確実性と安全性の高い新たな治療法開発の可能性を探ることは、たいへん意義深いことである。

2. 研究の目的

クラミジア性卵管性不妊症モデルマウスの作製し、クラミジア HSP60 の病態成立への関与を確認する

3. 研究の方法

- (1) モデルマウスの抗 Ct 抗体価、抗クラミジア HSP60 抗体価の血中動態を検討した。
- (2) モデルマウス卵管組織より mRNA を抽出し、RT-PCR により CC ケモカイン、CXC ケモカイン、あるいは TLR の病態形成への関与を分子生物学的に検討した。
- (3) 遅延型過敏反応を想定した二次感染モデルマウスの作製しクラミジア HSP60 の関与を確認する。

4. 研究成果

卵管性不妊モデルマウスの血清学的検討により、抗 Ct 抗体価の上昇と共に抗 cHSP60 抗体価の上昇も確認したことから、卵管病変形成への cHSP60 の関与を示した。

またクラミジア感染卵管においてケモカイン RANTES, MIP-1 $\alpha$  および CXCR3 は既報の如く発現を認めた。IL-8 様リガンドである Cxc12 およびそのレセプターである IL-8R の発現を今回初めて確認した。Ct 感染の場合 RANTES, MIP-1 $\alpha$ , IL-8 および CXCR3 が卵管傷害の病態に関与することが示唆された。また TLR を介した免疫反応に関しては、TLR2 が関与していることを確認した。細菌感染に主として TLR4 が関与する点と比して興味深い知見を得た。

一方より高度な卵管性不妊症モデルマウスを作製する目的で、遅延型過敏反応を想定した二次感染を試みた。二次感染モデルでは、より重症な卵管傷害を認め、抗クラミジア抗体価、抗クラミジア HSP60 抗体価に関しても初回接種のみの群と比較して著明に上昇したことから、遅延型過敏反応と密接に関与することが知られる HSP60 の役割を明らかにした。

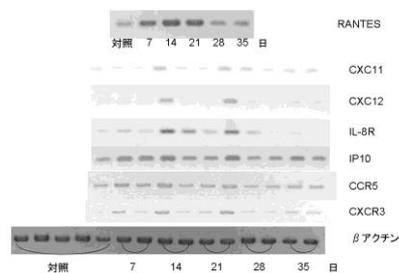


図16 Ct感染マウスの卵管におけるケモカインのmRNAの発現。上段よりRANTES, CXCR11, CXCR12, IL-8R, IP10, CCR5, CXCR3, β-Actinの発現を示す。

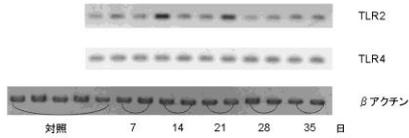


図17 Ct感染マウスの卵管におけるTLRのmRNAの発現  
上段よりTLR2, TLR4,  $\beta$ アクトンの発現を示す。

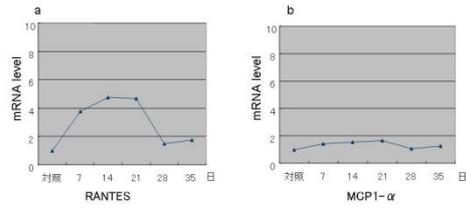


図18 Ct感染卵管におけるRANTES, MCP-1 $\alpha$ のmRNAの発現  
(a)RANTESは接種直後の7日目より誘導され初回接種より21日まで、発現し続けた。  
(b)MCP-1 $\alpha$ の発現は認めなかった。

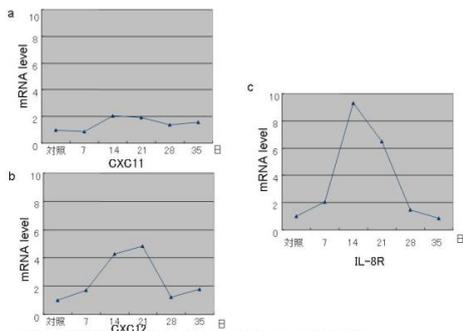


図19 Ct感染卵管におけるCxc11, Cxc12, IL-8RのmRNAの発現  
(a)Cxc11に比し(b)Cxc12と(c)IL-8RのmRNAが急発現した。これらは接種後14日目に急激に上昇し、以後漸減した。

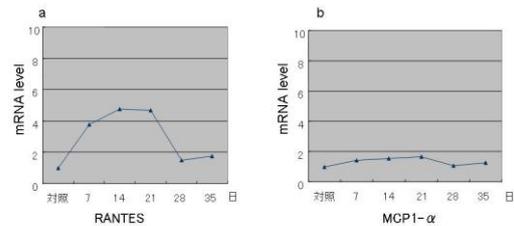


図18 Ct感染卵管におけるRANTES, MCP-1 $\alpha$ のmRNAの発現  
(a)RANTESは接種直後の7日目より誘導され初回接種より21日まで、発現し続けた。  
(b)MCP-1 $\alpha$ の発現は認めなかった。

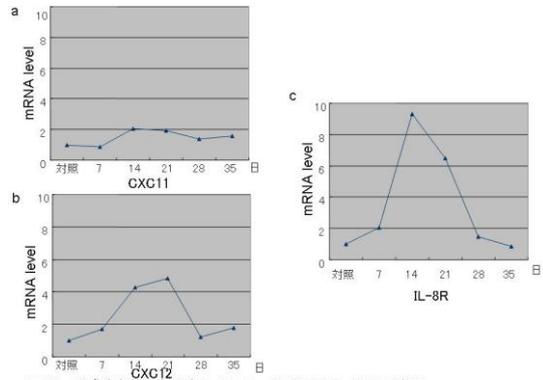


図19 Ct感染卵管におけるCxc11, Cxc12, IL-8RのmRNAの発現  
(a)Cxc11に比し(b)Cxc12と(c)IL-8RのmRNAが急発現した。これらは接種後14日目に急激に上昇し、以後漸減した。

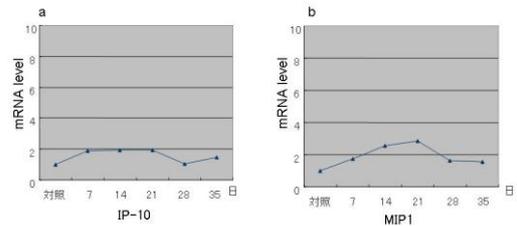


図20 Ct感染卵管におけるIP-10, MIP-1 $\alpha$ のmRNA  
(a) IP-10は発現しなかった。  
(b) MIP-1 $\alpha$ は接種後7日目より軽度発現し、21日目まで持続して発現した。

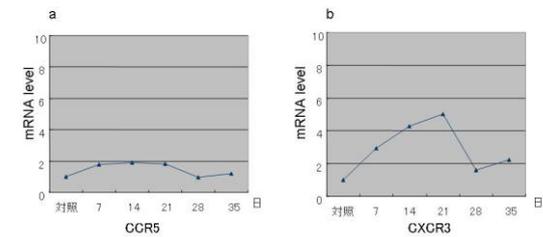


図21 Ct感染卵管におけるCCR5, CXCR3 $\alpha$ のmRNA  
(a)CCR5は発現しなかった。(b)CXCR3は接種後7日目より上昇し、接種後21日目まで上昇が継続し、以後漸減した。

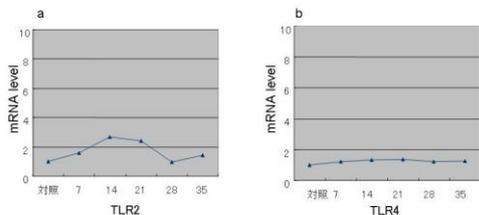


図22 Ct感染卵管におけるTLRのmRNAの発現  
(a)TLR2は接種後7日目より軽度発現し、14日目で最高値となり以後漸減した。  
(b)TLR4は発現しなかった。

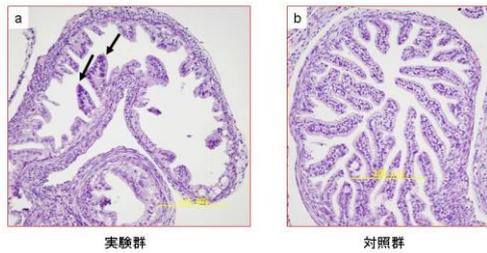


図26 二次感染モデル Ct接種後70日目の卵管 (HE×200)  
(a)実験群で(b)対照群と比較しより高度な線毛構造の破壊像と、内腔により多量の分泌物を認めた(図 26)。一部には好中球の浸潤を示唆する核の凝集している部位を認めた(1)。

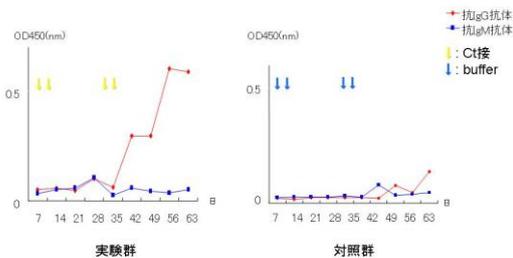


図28 二次感染モデルの血中抗Ct抗体価の推移  
再接種後実験群において血中抗 IgG抗体価は有意に増加した。

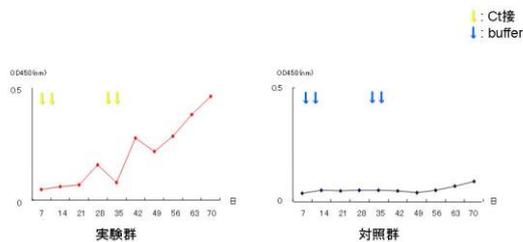


図29 二次感染モデルの血中抗cHSP60抗体価の推移  
再接種後実験群においてcHSP60抗体価は有意に増加した。

## 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 1 件)

Hirano Y, Shibahara H, Koriyama J, Tokunaga M, Shimada K, Suzuki M :

Incidence of sperm immobilizing antibodies in infertile women with past Chlamydia trachomatis infection.

Am J Reprod Immunol 2011; 65: 127-132.

[学会発表] (計 8 件)

平野由紀、柴原浩章、島田和彦、鈴木光明 :  
クラミジア・トラコマティス性卵管性不妊症の病態形成における熱ショック蛋白の役割～クラミジア・トラコマティス二次感染モデルマウスを用いての検討～。

第 9 回自治医科大学シンポジウム、下野、2010 年 9 月 5 日。

Hirano Y, Shibahara H, Shimada K, Suzuki M : Comparison of tubal pathology induced by transvaginal and intraperitoneal inoculation with Chlamydia trachomatis in mice.

IFFS 20<sup>th</sup> World Congress on Fertility & Sterility, Munich, Germany, Sep. 14, 2010.

Hirano Y., Shibahara H., Shimada K., Suzuki M. : Comparison of severity of tubal damage induced by active and inactivated Chlamydia trachomatis infection through delayed-type hypersensitivity reaction in Balb/c mice.

Bio-immunoregulatory Mechanisms Associated with Reproductive Organs: Relevance in Fertility and in Sexually Transmitted Infections.

National Institute of Immunology, New Delhi, India, 2009 年 2 月 13 日

平野由紀、柴原浩章、島田和彦、鈴木光明 :  
不活化クラミジア・トラコマティス (Ct) 菌体でも遅延型過敏反応による卵管傷害の重症化を誘導する。

第 61 回日本産科婦人科学会、京都、2009 年 4 月 5 日。

Hirano Y., Shibahara H., Koriyama J., Shiraishi Y., Shimada K., Suzuki M. : The incidence of anti-sperm antibodies in infertile couples with chlamydia trachomatis infection. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Reproductive Immunology, Orlando, Florida, June 5-9, 2009.

平野由紀、島田和彦、橘 直之、池田伴衣、郡山純子、鈴木達也、高見澤 聡、柴原浩章、鈴木光明：当科における抗クラミジア・トラコマティス抗体保有不妊女性の年次推移。第 27 回日本産婦人科感染症研究会、日宇都宮、2009 年 6 月 20。

平野由紀、柴原浩章、郡山純子、白石康子、島田和彦、鈴木光明：クラミジア・トラコマティス感染既往と抗精子抗体産生との関連。第 28 回日本アンドロロジー学会、富山、2009 年 7 月 3 日。

平野由紀、柴原浩章、郡山純子、白石康子、島田和彦、鈴木光明：クラミジア・トラコマティス感染既往と抗精子抗体産生との関係。第 54 回日本生殖医学会、金沢、2009 年 11 月 22 日。

〔図書〕(計 4 件)  
臨床雑誌内科 日常診療で診る感染症 (Vol.106 No.5)  
《内科で診るか? 専門医からのアドバイス》

性行為感染症—クラミジア・トラコマティス感染症について 平野由紀

平野由紀、柴原浩章、島田和彦、鈴木光明：

STD と不妊 —クラミジア・トラコマティス感染症を中心に—。  
産婦人科治療 98: 173-181, 2009.

平野由紀、柴原浩章、永山志穂、大丸貴子、高見澤 聡、鈴木光明：「ここが聞きたい不妊・不育診療ベストプラクティス」卵管因子を疑う症例には、従来の全身麻酔下に行う診断的腹腔鏡検査より侵襲が低い経膣法が良いと聞いています。その詳細について教えてください。臨床婦人科産科、63 (増大号); 392-395, 2009.

Chlamydia trachomatis による卵管性不妊モデルマウスの作製とその病態解明/平野由紀 /柴原浩章 /島田和彦 /鈴木光明  
HORMONE FRONTIER Vol.16.2009

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
平野 由紀 (HIRANO YUKI)  
自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10398521

(2)研究分担者

柴原 浩章 (SHIBAHARA HIROAKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80206143

島田 和彦 (SHIMADA KAZUHIKO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60424024

(3)連携研究者

( )

研究者番号：