

腔内細菌 (*Lactobacillus crispatus* と
Gardnerella vaginalis) による子宮頸部上皮細胞の
抗菌ペプチド (SLPI・Elafin) 産生への影響

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系産婦人科学専攻

松田恵里那

修了年 2021 年

指導教員 川名 敬

目次

概要	・ ・ ・ 1
緒言	・ ・ ・ 4
対象と方法	・ ・ ・ 12
結果	・ ・ ・ 19
考察	・ ・ ・ 24
まとめと今後の展望	・ ・ ・ 29
謝辞	・ ・ ・ 30
表	・ ・ ・ 31
図	・ ・ ・ 35
図説	・ ・ ・ 53
引用文献	・ ・ ・ 60
研究業績	・ ・ ・ 64

略語一覽

AMPs : antimicrobial peptides

BCL2A1 : BCL2 related protein A1

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CAM : chorioamnionitis

CMA1 : chymase 1

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EctoCx : Ect-1/E6E7、子宮腔部重層扁平上皮細胞株

ELISA : enzyme-linked immuno-sorbent assay

EndoCx : End-1/E6E7、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞株(子宮頸管腺上皮細胞)

GV : *Gardnerella vaginalis* (*G.vaginalis*)

IL-1 : Interleukin-1

IL-8 : Interleukin-8

ITIH5 : inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5

LC : *Lactobacillus crispatus* (*L.crispatus*)

LIF : leukemia inhibitory factor

LPS : lipopolysaccharide

MMP : Matrix metalloproteinase

pPROM : preterm Premature rupture of the membranes

PCR : polymerase chain reaction

S-C junction : Squamocolumnar Junction

SLPI : Secretory leukocyte peptidase inhibitor

TNF- α : tumor necrosis factor- α

WAP : Whey acid protein

WFDC : WAP-four disulfide core

概要

【背景】

早産児は出生後に深刻な後遺症を発生する可能性があるため、早産の予防が周産期において重要である。膣内細菌叢の *dysbiosis* である細菌性膣症は早産の原因の一つである。妊娠した女性は胎児を感染から守るために、膣から子宮に至るさまざまなバリア機能がはたらく。膣内では常在細菌優位種である *Lactobacillus crispatus* (*L.crispatus*) (以下 LC と略す) が主体となり酸性を保つことで病原菌の繁殖を防いでいる。また子宮頸管は抗菌ペプチドや抗体を含む粘液栓を形成し、一定の頸管長を保つことで化学的・物理的に上行性感染を防いでいる。これまで、乳酸桿菌やグラム陰性細菌の細胞壁である LPS を用いて、膣や子宮頸部におけるバリア機能を検討する研究がなされてきた。しかし、細菌性膣症の原因菌である *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) (以下 GV と略す) を用いた研究は少なく、抗菌ペプチドの産生への影響も不明である。また抗菌ペプチドには様々な作用があると言われていたが産科領域においてはまだ不明な点が多い。

【目的】

今回私は早産の危険因子の一つである細菌性膣症の原因菌である GV が、子宮頸部の炎症を促進させ、感染に対する防御反応としての抗菌ペプチドの産生に影響するという仮説を立てた。

上記仮説を検証するため本研究では、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞株を用い、GV による、Elafin 産生に対する影響を調べた。また、子宮頸部から分泌される Elafin の作用を検討することを目的とした。

【方法】

当院で切迫早産の診断で入院管理となった妊婦の、入院時における頸膣分泌物の Nugent score と好中球エラスターゼ（プロテアーゼ）の相関を調べた。また頸膣分泌物の GV 陽性群と陰性群の好中球エラスターゼを比較した。

次に、膣常在菌の一つである LC と細菌性膣症の原因菌の一つである GV の培養上清を作成し、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞（子宮頸管腺上皮細胞：End-1/E6E7（EndoCx）および子宮膣部重層扁平上皮細胞：Ect-1/E6E7（EctoCx））とヒト不死化膣上皮細胞株（MS74）に添加した。抗菌ペプチドである Secretory leukocyte peptidase inhibitor（SLPI）と Elafin の産生への影響を、リアルタイム PCR による mRNA 発現量および ELISA によるタンパク発

現量で評価した。マイクロアレイ解析により mRNA 発現を網羅的に解析した。

また、LC と GV に対する Elafin の抗菌活性を検討した。

【結果】

切迫早産妊婦の、入院時における頸膣分泌物を Nugent score にそって正常・中間・細菌性膣症の 3 群に分け、好中球エラスターゼを比較したところ、細菌性膣症と診断された群では好中球エラスターゼ濃度が有意に高かった。また、GV 陽性群の妊婦は、膣分泌物の好中球エラスターゼ濃度が陰性群と比較して有意に高かった。

リアルタイム PCR 解析では、GV 培養上清の添加により膣上皮細胞は、SLPI も Elafin も mRNA 発現に変化は認めなかった。子宮頸部上皮細胞においてはどちらも発現が上昇した。ELISA による蛋白レベルの検討では、子宮頸部上皮細胞において GV 培養上清の添加により Elafin のみ産生が促進され、SLPI は変化を認めなかった。また GV 培養上清の添加により蛋白レベルにおいて IL-8 の産生が促進されたが、LC 培養上清の添加により IL-8 の産生に変化はみられなかった。さらに IL-8 の刺激による EndoCx からの Elafin の産生促進は認めなかった。

マイクロアレイ解析では、炎症性サイトカインである IL-8 の発現が約 5 倍に

増強した。Elafin も 1.3 倍発現が増加していた。

子宮頸部上皮細胞から分泌される Elafin の生理学的濃度内では、GV および LC への有意な抗菌活性は認めなかった。

【結論】

EndoCx は、GV の可溶性成分により抗菌ペプチドである Elafin と炎症性サイトカインである IL-8 の産生を促進した。IL-8 は好中球を活性化しエラスターゼの分泌を促進することが知られている。そのため EndoCx は Elafin を分泌し、抗菌作用ではなく抗プロテアーゼ作用により子宮頸部を保護している可能性が示唆された。

他の菌に対する抗菌作用や、抗プロテアーゼ作用、別の免疫調整機序については未だ不明であり今後検討していく必要がある。Elafin は抗菌ペプチドの中でも好中球エラスターゼに特異的な抗プロテアーゼ作用を持つことが知られており、両者の関連性を今後さらに検討していく必要がある。

緒言

早産とは、妊娠 22 週 0 日以降 37 週 0 日未満までの期間に生じる分娩である。本邦における早産の割合は、2014 年に妊娠全体の約 5.7%を占めており、年次推移で見ると増加傾向にある。早産の危険因子は、早産・死産や後期流産の既

往歴が挙げられる。また生殖補助治療の普及により、糖尿病や甲状腺疾患合併の妊娠が増え、子宮筋腫や卵巣腫瘍の合併、多胎妊娠が増えたことが挙げられる(1, 2)。その他に、晩婚化による高齢妊娠が増加し、妊娠合併症が増加したことも原因となる。近年では、子宮頸癌の検診が普及し、子宮頸部上皮内癌や子宮頸部高度異形成の診断による子宮頸部円錐切除術が増加した。子宮頸部円錐切除術後妊娠は、物理的な子宮頸部の短縮と頸管粘液の減少を引き起こすことから、早産の危険因子となる。

早産児の予後は、2014年の人口動態調査における早期新生児死亡率でみると妊娠22～23週で21.4%、24～27週で4.7%、28～31週で1.6%である。長期間の新生児集中療養が必要となる可能性も高い。呼吸器障害や神経障害など深刻な後遺症を発生することもある。そのため、医療資源による経済的負担や精神的な家族への負担が大きくなる。

妊娠時の異常として、細菌性膣症が早産の危険因子の一つである(3)。細菌性膣症は上行性に感染し、絨毛膜羊膜炎（CAM：chorioamnionitis）に至る。顕性の絨毛膜羊膜炎を経て早産に至った場合は、新生児の呼吸窮迫症候群が約3倍、周産期死亡率が約4倍に増加すると報告されている(4)。したがって、早産を防ぐためには、細菌性膣症を予防することが重要である。

細菌性膣症と *Gardnerella vaginalis* (GV)

正常の膣内は *Lactobacillus* 属による細菌叢が乳酸や H_2O_2 を産生することにより膣内 pH の低下をさせ膣内を酸性に保つことで、病原菌の侵入を防いでいる(5-7)。これを自浄作用とよぶ。膣内細菌叢がバランスを崩すと細菌性膣症を発症する。細菌性膣症は、*Lactobacillus* 属が減少し、*Gardnerella* 属や *Mobiluncus* 属などが過剰増殖した複合感染の状態である。

GV は、嫌気性のグラム陰性あるいはグラム染色不定の 2~3 μ m の小さな短桿菌で、多形性・非運動性である。膣内で混合感染を起こし、アミン臭や灰白色の帯下を引き起こす。

細菌性膣症の WHO 診断基準を表 1 に示した(3, 8, 9)。現在臨床では Nugent score を用いて細菌性膣症の評価を行うことが一般的である。Nugent score は膣分泌物に存在する菌種や菌量によって点数化しており、*Lactobacillus* 属が少ないほど、また GV や *Mobiluncus* が多く存在するほど点数が高くなり、7-10 点を細菌性膣症としている(表 2)(10)。

細菌性膣症のリスク因子としては、性的パートナーが多いことや、子宮内避妊具(IUD)・タンポンなどの使用、また身体的・精神的ストレスが挙げられる。

細菌性膣症から切迫早産への機序

細菌性膣症を発症すると、子宮頸管炎を経て、絨毛膜羊膜炎 (CAM)、子宮内感染に至るという上行性感染を起こす。胎児と羊水を包む卵膜は羊膜・絨毛膜・脱落膜の3層から成り、CAMは胎児付属物である絨毛膜あるいは羊膜に感染が及んだ状態である(図1)(11, 12)。子宮内感染の診断には羊水穿刺を施行し、グラム染色にて菌を同定することや、羊水中の白血球数やグルコース値、IL-6の測定をすることが有用とされている(3)。しかし、臨床的には、羊水穿刺は破水の誘因となり、早産となるリスクが高いため行われず、臨床的CAMの診断基準を元に診断する(表3)。CAMから早産に至る機序は図2に示した(11)。具体的には、CAMに至るとIL-1 β 、TNF- α 、IL-8といったサイトカインにより炎症が進行し、好中球が活性化されセリンプロテアーゼの一種である好中球エラスターゼが分泌される。好中球エラスターゼは微生物、異物を分解し生体を防御する。また、過剰になると好中球やマクロファージからMatrix metalloproteinase (MMP) (マトリックス・メタプロテアーゼ)の産生を増強することでコラーゲンを分解し子宮頸管熟化や破水を引き起こすと考えられている(11, 13-15)。これらのサイトカインはプロスタグランジンを増強することで子宮収縮が促進し早産を引き起こすことも指摘されている(11)。切迫早産は、規

則的な子宮収縮が認められ、かつ子宮頸管の開大度・展退度に進行が認められる場合、あるいは初診時の内診で子宮頸管の開大が 2cm 以上となっている場合、早産となる危険性が高いと考えられる状態のことである(16)。頸管の変化がみられなくても内子宮口の楔状開大や頸管長が 25mm 以下に短縮している場合には、切迫早産の初期と考える。頸管長 25mm 未満の場合には 41.7%、さらに 20mm 未満では 75.0%が、早産に至ることが報告されている(17)。

病原体から守るための妊娠における女性生殖器のバリア機能

外部の病原菌から守るためには、下部生殖器の腔が第一のバリア機能として存在する。腔内は *Lactobacillus* 属による自浄作用により、病原体の侵入・増殖を防いでいる(5-7)。また、腔上皮や子宮頸部上皮などの粘膜上皮は、生体バリアとして機能しており、化学的バリア（抗菌ペプチド、ムチンなど）、物理的バリア（tight junction 形成など）、生物学的バリア（自然免疫、獲得免疫など）が相互に影響しあっている(5, 18-24)（図 3）。子宮頸部上皮細胞は 2 種類に分かれており、Squamocolumnar Junction (S-C junction) を境に内子宮口側は一層の腺上皮（円柱上皮）に覆われ、外子宮口側は重層扁平上皮に覆われた構造となっている（図 4）。腺上皮は、頸管粘液を分泌することで化学的バリアを担

っており、重層扁平上皮は、**Tight junction** などにより細胞間の物理的バリアを担っている。妊娠経過に伴い、子宮頸部の **S-C junction** が外反することで子宮頸管腺上皮が露出される。非妊娠時よりも上部生殖器では、子宮頸管が閉鎖し一定の長さを保ち、卵膜が胎児と羊水を包み込むことで病原体の上行感染を防いでいる (図 5)。

このように膣－子宮頸部－卵膜の段階的な防御機構があることで、妊娠中は病原体からの侵入を防ぎ正常な妊娠の維持にはたらく。

抗菌ペプチド (AMPs : antimicrobial peptides) の作用

化学的バリアの一つである抗菌ペプチド (AMPs) は、12~50 ほどのアミノ酸からなる短いペプチドである(25)。常時、外来病原性微生物に対峙する皮膚・消化管・呼吸器・生殖器の粘膜上皮やマクロファージ、好中球は AMPs を産生し、感染から生体を防御している(26, 27)。卵管・子宮・膣などの女性生殖器においても AMPs が産生されていることが知られている(28)。AMPs はプラスの電荷のアミノ酸配列を有する。一方、細菌の細胞膜は酸性のリン脂質を多く含むためマイナスに電荷している。したがって AMPs は細菌の細胞膜に結合することで、膜を貫通させて殺菌すると言われている (図 6) (29)。AMPs の中でも、抗プロテアーゼ作用をもつシステイン残基を有するのは SLPI と Elafin のみで

ある(30)。SLPIは肺の分泌物より、Elafinは乾癬の患者の皮膚より最初に発見された(31, 32)。それらはいずれもWhey acid protein (WAP) という遺伝子配列をもち、WAP-four disulfide core (WFDC) 蛋白ファミリーを構成している(20, 33, 34)。ElafinはSLPIと比べて狭い範囲のプロテアーゼ阻害効果を持ち、好中球エラスターゼに特異的であるといわれている(20, 30)。

上記のように、AMPsの作用は、抗菌作用や抗プロテアーゼ作用などがあり、その他にも組織の恒常性や免疫調節など多岐に渡る(20)。

妊娠と AMPs (SLPI と Elafin)

妊娠とAMPsの相関について、さまざまな研究が報告されている。臨床では、SLPIとElafinは、妊娠経過によって変動すると報告されている。SLPIは妊娠経過が進むにつれ増加し、産後に最大となる。Elafinは妊娠経過中に変化は認めないが、産後に増大する(34, 35)。これは、分娩時に開大した子宮口へ病原菌の侵入を防ぐための反応と考えられる。また、早産に至った妊婦は、正常妊娠経過の妊婦と比較して、子宮頸部のSLPIとElafinの発現が有意に高かったと報告されている(35)。これらはSLPIとElafinが炎症性サイトカインや性ホルモンによって調節されているためだと考えられているが、未だ不明である(36)。

In vitro では、乳酸桿菌やグラム陰性細菌の細胞壁である LPS を用いて、膣や子宮頸部におけるバリア機能を検討する研究がなされてきた。

これまで、本学微生物学分野の先行研究では、膣常在菌の一つである LC が膣上皮細胞の再上皮化を促進すると報告している(5)。他の研究では、細菌性膣症の原因菌のひとつである GV の培養上清を子宮頸部上皮細胞に添加すると細胞モノレイヤーの透過性が亢進するという報告がされている(37)。

しかし、GV を用いた研究は少なく、AMPs へ産生への影響は不明である。

本研究の目的

今回私は早産の危険因子の一つである細菌性膣症の原因菌である GV が、子宮頸部の炎症を促進させ、感染に対する防御反応としての抗菌ペプチドの産生に影響するという仮説を立てた。

上記仮説を検証するため本研究では、ヒト不死化子宮頸部上皮細胞株を用い、GV による、Elafin 産生に対する影響を調べた。また、子宮頸部から分泌される Elafin の作用を検討することを目的とした。

対象と方法

本研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号：RK-190312-02）。

Nugent score と好中球エラスターゼの相関

病原菌が感染し、炎症が進行すると、好中球が活性化されセリンプロテアーゼの一種である好中球エラスターゼが分泌される。好中球エラスターゼは微生物を防御するが、過剰になることで子宮頸管熟化や破水を引き起こすと考えられている。

そこで、探索的観察研究として、日本大学医学部附属板橋病院産婦人科で 2018 年 4 月から 2020 年 7 月まで切迫早産の診断で入院した妊婦の入院時の頸腔培養検査による Nugent score と好中球エラスターゼの相関を調べた。

切迫早産の診断は、経膈超音波にて頸管長が 25 mm 以下となった場合、または子宮収縮を伴い子宮頸管の開大所見を認める場合とした。

GV と好中球エラスターゼの相関

探索的観察研究として、日本大学医学部附属板橋病院産婦人科で 2018 年 4 月から 2020 年 7 月まで切迫早産の診断で入院した妊婦の入院時の頸腔培養検査（GV の有無）と好中球エラスターゼの相関を調べた。

ヒト子宮頸管細胞由来株とヒト膣細胞由来株の培養

ヒト子宮頸管細胞由来株

子宮頸管腺上皮細胞（内子宮口細胞株）：End-1/E6E7（EndoCx）、子宮膣部扁平上皮細胞（外子宮口細胞株）：Ect-1/E6E7（EctoCx）は SPI 社より購入したものを凍結し、必要に応じて溶解・培養した（図 4）。細胞の安定性を担保するために実験ごとの継代回数は 10 回を超えないようにした。培養液は Keratinocyte-Serum Free Medium（Gibco, Carlsbad, CA, USA）に 0.1 ng/ml human recombinant EGF（Gibco）、0.05 mg/ml bovine pituitary extract（Gibco）、Calcium chloride 44.1 mg/L（0.4 mM）、100 U/mL penicillin（Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan）、0.1 mg/mL streptomycin（Meiji Seika ファルマ株式会社）を用いて 37 °C の 5 %CO₂ インキュベーターにて培養した。

膣上皮細胞由来株：MS74 は Prof. John F. Alderete（Texas University, USA）より分与された。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）（Gibco）、10% fetal bovine serum（Gibco）、100 U/mL penicillin（Meiji Seika ファルマ株式会社）、0.1 mg/mL streptomycin（Meiji Seika ファルマ株式会社）を用いて 37 °C の 5 %CO₂ インキュベーターにて培養した。

細菌培養上清の調製

本研究は、バイオリスク管理・運営委員会の承認を得て行った。

(承認番号 29-8-0)

腔常在菌の一つである *L. crispatus* (JCM 7696) と細菌性陰症の原因菌の一つである *G.vaginalis* (JCM 11026) は理研バイオリソース研究センターから分与された。LC の培養液は、MRS broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を用いた。GV の培養液は Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Becton, Dickinson and Company) に Glucose (0.1%) (Becton, Dickinson and Company)、Maltose (0.1%) (Becton, Dickinson and Company)、Horse serum (10%) (Gibco)を加えて用いた。菌数は培養液の 600 nm における混濁度を、吸光度計 (Amersham Pharmacia Biotech, Cardiff, United Kingdom) で計測し、あらかじめ平板培地でカウントしたコロニー数から求めた検量線を用いて調整した。1.0 x 10⁵ CFU/ml の菌をそれぞれの培養液で 37 °C で 24 時間培養した。GV は 24 時間嫌気培養した。3500 rpm で 10 分間遠心分離した上清を 0.22 um のフィルターでろ過したものを培養上清とした。

(図 7)

それぞれの菌培養上清を 1 ml ずつ分注して -80 °C に保存した。また培養上清は複数回作製した。

細菌培養上清添加後の上皮細胞上清の調製

各上皮細胞を 1.0×10^5 cells/well の細胞濃度で 24 well プレート上で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の環境で 96 時間培養した。LC の培養上清 (LC sup) と GV の培養上清 (GV sup) とそれぞれの培地 (LC media、GV media) を加え ($10\%\text{v/v}$)、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の環境でさらに 24 時間培養した。培養液を回収し、 4°C 、3500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。サンプルは使用するまで -80°C に保存した。

細胞傷害性の検討

LC sup と GV sup が viability に与える影響を Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて評価した。上皮細胞を 1.0×10^4 cells/well の細胞濃度で 96 well プレート上で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の環境で 96 時間培養した。LC sup と GV sup とそれぞれの培地 (LC media、GV media) を加え ($10\%\text{v/v}$)、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の環境でさらに 24 時間培養した。Cell Count Kit-8 溶液を各 well に $10\ \mu\text{l}$ ずつ加え 1 時間培養し、マイクロプレートリーダー (Bio-rad Laboratories Inc, Hercules, CA) を用いて、 $450\ \text{nm}$ で吸光度を測定した ($n=3$)。細胞の viability は無刺激の対照細胞と比較し、パーセンテージで表した。

RNA の抽出と complementary DNA への逆転写

1.0 x 10⁵ cells/well の細胞濃度で 24 well プレート上で 37 °C、5 %CO₂ の環境で 96 時間培養した。その後、LC sup、GV sup、LC media、GV media を 10%v/v で添加し、4 時間後に RNA 抽出を行った。(図 8) RNA の抽出は、RNeasy® Mini Kit (50) (QIAGEN, Hilden, Germany) のマニュアル通りに行った。RNA から cDNA への逆転は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) をマニュアル通りに用いた。具体的には反応液を、10x RT Buffer 2.0 µl、25x dNTP Mix (100 mM) 0.8 µl、10x RT Random Primers 2.0 µl、Nuclease-free H₂O 4.2 µl、MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1.0 µl、サンプル RNA 10 µl の総量 20 µl とした。サーマルサイクラー (GeneAmp®PCR System 9700) の設定は、25°C10 分→37°C120 分→85°C5 分とした。

Real time polymerase chain reaction (real time PCR)法

培養細胞内の SLPI と Elafin の発現を real time PCR にて比較検討した。測定には iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) をマニュアル通りに使用した。具体的には PCR 反応液は、cDNA 1 µl、iTaq Universal SYBR Green

Supermix (BIORAD) 5 μ l、Forward primer 0.25 μ l (10 μ M)、Reverse primer 0.25 μ l (10 μ M)、Nuclease-free water 3.5 μ l とし、総量 10 μ l とした。PCR のプロトコールは 95 $^{\circ}$ C 3 分間の denature に続いて、95 $^{\circ}$ C 15 秒→annealing 10 秒→60 $^{\circ}$ C 1 分の PCR サイクルを 40 サイクル行った。(Applied BiosystemsTM QuantStudioTM 3)

SLPI と Elafin の mRNA 特異的 primer の配列を表 4 に示す。

また β -actin mRNA を内部コントロールとした。(n=3~5)

マイクロアレイ解析

上清添加による mRNA 遺伝子発現の変化を解析するためにマイクロアレイ解析を行った。1.0 x 10⁵ cells/well の EndoCx を 37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ の環境で 96 時間培養後、GV sup を 10 %v/v で添加し、4 時間後に RNA 抽出を行った。抽出方法は、RNeasy[®] Mini Kit (50) (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、タカラバイオ株式会社に Agilent Expression Array 解析を外注した。Agilent Expression Array 解析は Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color マニュアル(Agilent)に準じて行った。200 ng の total RNA から Cyanine3 標識 cRNA を断片化し、Agilent Expression Array にハイブリダイゼーションした。その後、Agilent SureScan Microarray Scanner(G2600D)で画像を取得した。専用

解析ソフト (Feature Extraction) で QC Report、数値化データを算出した。(n=1)

Enzyme-linked immune-sorbent assay(ELISA)法

LC sup もしくは GV sup 添加後の細胞培養上清中の SLPI と Elafin と IL-8 のタンパク濃度は ELISA 法を用いて測定した (図 8)。SLPI の測定には Quantikine ELISA kit(R&D, Minneapolis, MN, USA)を、Elafin の測定には CircuLex Human Elafin/SKALP ELISA Kit(MBL, Woburn, MA, USA)を使用した。IL-8 の測定には Quantikine ELISA kit(R&D)を使用した。

次に、IL-8 による刺激が Elafin の産生に影響しているかを検討するために 1×10^5 cells/well の EndoCx を $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の環境で 96 時間培養後、リコンビナント IL-8 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) を各濃度 (10 ng/ml、100 ng/ml、1000 ng/ml) 加えた。24 時間後、培養上清中の Elafin のタンパク濃度を、それぞれのキットのマニュアル通りに測定した。(n=3) 基礎曲線は、スタンダードサンプルを使用して吸光度計による 450 nm 波長の測定値を用いて作成した。

Elafin の抗菌活性

LC を MRS agar (Becton, Dickinson and Company) で作成した寒天培地に 100CFU /プレートの濃度で、リコンビナント Elafin (PeproTech) を 5000 pg/ml(0.46 μM)、20000 pg/ml (1.82 μM) ずつ添加し、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ の $5\% \text{CO}_2$ の環境

で 24 時間培養した。培養後、コロニー数をカウントした。

GV は、Brain Heart Infusion Agar (BHIB) (Becton, Dickinson and Company) に Vitamin K1 2.0 μ l、Haemin 10 mg、sheep blood (5%) を加えた寒天培地で培養した。同様に 100CFU/プレートずつまき、リコンビナント Elafin を 5000 pg/ml、20000 pg/ml ずつ添加し、37 °C の 5 %CO₂ の環境で 24 時間嫌気培養した。培養後、コロニー数をカウントした。(n=3)

統計学的処理

臨床統計の結果は、Statcel3 (OMS publishing Inc, Saitama, Japan) を用いて行った。ノンパラメトリックな 2 群の比較は Mann-Whitney U 検定、ノンパラメトリックな 3 群の比較は Kruskal-Wallis 検定を用いた後 Steel-Dwass 検定による多重比較を用いて行った。

実験の結果は、パラメトリック検定にて比較を行った。有意差検定は Statcel3 を用いて Turkey-Kramer 検定を行った。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

結果

Nugent score と好中球エラスターゼの相関

切迫早産の診断で2018年4月から2020年7月までに入院となった患者232人を対象とした。患者背景として年齢、経産婦、生殖補助医療のほかに既往歴（早産既往、切迫早産既往、後期流産または中絶、死産、円錐切除術）、産科的異常（子宮筋腫、子宮腺筋症、卵巣腫瘍、子宮奇形、双胎妊娠）、全身疾患（糖代謝異常、妊娠高血圧症候群、甲状腺疾患）、喫煙歴、細菌性膣症を表6にまとめた。

Nugent scoreによる評価を行った患者は全部で210人であった。頸膣分泌物培養検査において *Candida* 属を認めた患者22人は、真菌感染症と診断し Nugent score による評価を行わなかった。入院時に採取した膣分泌物培養検査の Nugent score より 0-3点を正常、4-6点を中間、7-10点を細菌性膣症の3群に分類した。それぞれ152人、45人、13人であった（図9）。Kruskal-Wallis 検定により有意差が認められた（ p 値 <0.01 ）。個別2群比較のため Steel-Dwass 検定を行ったところ、細菌性膣症を認めた患者はその他の2群より有意に好中球エラスターゼが高かった（ p 値 <0.01 ）。一方、正常群と中間群に有意差は認めなかった。中央値はそれぞれ、正常群が 1.155 $\mu\text{g/ml}$ 、中間群が 0.86 $\mu\text{g/ml}$ 、細菌性膣症群が 5.88 $\mu\text{g/ml}$ であった（図10）。

それぞれの群にGV陽性患者は、0人、5人、13人であった。

***G.vaginalis* と好中球エラスターゼの相関**

切迫早産の診断で入院時に膣分泌物培養検査を施行した患者は、全部で232人

であった。そのうち、*Candida* 属を認めた患者 22 人は、真菌感染症と診断し除外した。入院時に採取した頸腔分泌物培養検査より GV を認めた妊婦が 18 人、認めなかった妊婦が 192 人であった。両群を比較したところ、GV を認めた妊婦の好中球エラスターゼが有意に高かった (p 値<0.01)。

両群の中央値はそれぞれ、陽性群が 5.525 µg/ml、陰性群が 1.085 µg/ml であった (図 11)。

細菌培養上清の細胞毒性の検討

LC sup と GV sup とそれぞれの培地 (LC media、GV media) が、MS74、EndoCx、EctoCx の viability に影響を与えるかを Cell Counting Kit-8 を用いて検討した。それぞれを 10 %v/v で添加し上皮細胞を 24 時間培養し、吸光度を測定した。いずれも viability に有意な変化は認めなかった (図 12)。

腔および子宮頸部における抗菌ペプチド産生に対する腔内細菌の影響

LC sup と GV sup の刺激に対する、各上皮細胞内の SLPI と Elafin の mRNA 発現量を real-time PCR 法、分泌蛋白量を ELISA 法によりそれぞれ測定した。GV sup 刺激は MS74 における SLPI と Elafin の mRNA 発現に影響を与えなかった (図 13)。一方、EndoCx と EctoCx では GV sup 刺激によって、SLPI と

Elafin の mRNA 発現が上昇した (図 14)。蛋白レベルでは、GV sup の刺激により EndoCx と EctoCx で、Elafin のみ産生が促進され、SLPI は変化を認めなかった (図 15-A、図 15-B)。

一方で、LC sup 刺激においては MS74、EndoCx、EctoCx では、mRNA レベル・蛋白レベルで、SLPI と Elafin の発現と産生に有意な変化は認めなかった (図 14、図 15-A、図 15-B)。

マイクロアレイ解析

GV sup 添加による mRNA 遺伝子発現の変化を解析するためにマイクロアレイ解析を行った。EndoCx に GV sup を添加し 4 時間後の mRNA 発現を解析した。対照 (GV media) と比較し 619 遺伝子の発現に 2 倍以上の増減がみられた。このうち、415 遺伝子 (67%) の発現が増強し、204 (33%) 遺伝子の発現が減弱していた。具体的には炎症性サイトカインである IL-8、leukemia inhibitory factor (LIF) などが増強した。さらにプロテアーゼ阻害効果のある inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5 (ITIH5) や、アポトーシスを抑制に関与する BCL2 related protein A1 (BCL2A1)が増強していた。一方で、肥満細胞等から分泌されるセリンプロテアーゼファミリーである chymase 1 (CMA1)などが減弱していた。(表 5-A、5-B)

EndoCx の IL-8 産生への腔内細菌の影響

LC sup と GV sup の刺激に対する、EndoCx の IL-8 の分泌蛋白量を ELISA 法により測定した。GV sup の添加により蛋白レベルにおいて IL-8 の産生が促進された。LC sup の添加により IL-8 の産生に変化はみられなかった (図 16)。

IL-8 の刺激による Elafin の産生への影響

マイクロアレイ解析の結果によると、GV sup 添加によって、EndoCx の IL-8mRNA の発現が最も増加した。そこで、IL-8 は EndoCx の Elafin 産生を誘導するのではないかと考え、以下の実験を行った。EndoCx に IL-8 を各濃度 (10 ng/ml、100 ng/ml、1000 ng/ml) 加え、Elafin の誘導を ELISA にて測定した。いずれの濃度においても IL-8 の刺激による Elafin の誘導は認めなかった (図 17)。

Elafin の抗菌活性

L.crispatus と *G.vaginalis* に Elafin を各濃度 (5000 pg/ml (0.46 mM)、20000 pg/ml (1.82 mM)) 添加後、寒天培地にまいた。24 時間後にコロニー数を計測した。In vitro における子宮頸部上皮細胞から分泌される Elafin の濃度内では、GV および LC への有意な抗菌活性は認めなかった (図 18)。

考察

早産児は、出生後に呼吸器障害や神経障害など深刻な後遺症を発生することが多く、早産を防ぐことは重要である。細菌性膣症は早産の原因のひとつであり、乳酸桿菌やグラム陰性細菌の細胞壁である LPS を用いて、膣や子宮頸部におけるバリア機能を検討する研究が多くなされてきた(5, 38)。しかし、細菌性膣症の主要な原因菌である GV と、子宮頸部や膣における抗菌ペプチドの産生についてはまだ不明な点が多い。

臨床的な検討として今回まず子宮頸管熟化や破水の原因の一つとされる子宮頸部での好中球エラスターゼと GV の関係を検討したところ、切迫早産の診断で入院となった患者のうち、Nugent score より細菌性膣症と診断された患者の好中球エラスターゼが有意に高値であった。また、GV 陽性患者の好中球エラスターゼが有意に高値であった。好中球エラスターゼは切迫早産発症の 2 週間前頃より上昇し始めるため、早産の予知マーカーになり得ると言われている(3)。今回の結果から膣における GV 感染が好中球エラスターゼ産生を増加させ、早産に繋がる可能性が示唆された。

In vitro ではヒト子宮頸管細胞由来株を用い、膣から子宮への上行感染を防ぐ AMPs である SLPI と Elafin の産生に GV が与える影響を検討した。その結果 GV sup の刺激により Elafin のみ産生が促進された。AMPs の産生には、IL-1

や TNF- α などのサイトカインの他に、ホルモンの影響も指摘されている。SLPI はプロゲステロンの刺激により発現が上昇するが、Elafin はホルモンによる影響はなかったと報告されている(34)。そのため妊娠経過においては、SLPI はプロゲステロンの上昇に合わせて、初期と比べて中期、後期と増加する。Elafin は妊娠経過で変化は認めなかったと報告がある。産褥期はいずれの抗菌ペプチドも妊娠期と比較し増加する(35)。これは、子宮口の開大による病原菌の侵入を防ぐためや、MMP による子宮頸部のコラーゲンの分解を防ぎ修復を促進すると考えられる。つまり、妊娠経過における Elafin の上昇は、早期の細菌感染を示唆していると考えられ、今回の結果と矛盾しない。In vitro では、子宮頸部上皮細胞に LPS を添加すると Elafin の発現が上昇したとの報告がある(26)。しかし同じ細菌性膣症関連菌である *Prevotella bivia* や *Escherichia coli* と比べ GV は殆ど LPS を産生しない(39)。そのため、今回の GV sup 中のどの成分が Elafin 産生を誘導したかは、更なる検討が必要である。

次に Elafin 産生誘導の経路を検討するために GV sup 添加による mRNA 遺伝子発現の変化を解析するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、IL-8 の顕著な発現増強を認めた。また ELISA を用い同様に蛋白レベルでも発現増加を確認した。炎症性サイトカインである IL-1 や TNF- α が、Elafin 上流の転写活性因子として報告されており、同じく炎症性サイトカインである IL-8 も Elafin を

誘導すると考えられた(40-42)。しかし予想に反しリコンビナント IL-8 はいずれの濃度においても Elafin 産生の促進をしなかった。これらの結果から子宮頸部上皮細胞は、Elafin と IL-8 をそれぞれ別の経路で誘導していることが示唆された。IL-8 については、子宮頸管粘液における IL-8 が高値の妊婦を、膣洗浄と抗菌薬の膣錠を挿入して加療することで、早産や preterm Premature rupture of the membranes (pPROM) (37 週未満の破水) を防ぐことが可能と報告されている(43)。GV 可溶性成分により上昇した Elafin についても、早産のマーカーとなりうる可能性がある(36)。

絨毛膜羊膜炎から早産に至る機序(図 2)において、IL-8 以外に TNF- α や IL-6 といったサイトカインが上昇することは既に報告されている(11)。今回の GV sup 添加による EndoCx のマイクロアレイ解析においても同様に、TNF- α は 2.7 倍の増加を認めた。また、IL-6 のファミリーサイトカインである leukemia inhibitory factor (LIF)も顕著に増加を認めた。これらのことから、TNF- α や IL-6 が Elafin 誘導の上流因子となりうる可能性がある。また本研究における IL-8 の結果のように Elafin とは別の経路で産生され、炎症作用を促進している可能性もある。Elafin と炎症性サイトカインの関連は不明な点が多く、今後検討が必要である。

本研究では GV は Elafin と IL-8 を同時に産生誘導した。IL-8 は好中球遊走

を引き起こし、エラスターゼの分泌を上昇させうる。AMPs の中でも、**Elafin** は好中球エラスターゼに特異的に働く **Elastase-specific inhibitor** とも言われており(41, 44)、エラスターゼによる頸管熟化の過剰亢進に拮抗している可能性がある。実際、子宮頸管長が短縮していた妊婦は、**Elafin** が高値であり(36, 45)、また妊娠 24 週までに頸管長が 25mm 以下となった妊婦では有意に **Elafin** の濃度が高かったとの報告がある(17)。過剰なエラスターゼの存在下では、**Elafin** は切断されるとの報告もあるため、子宮頸部におけるエラスターゼと **Elafin**、および腔内細菌叢の関係については今後さらなる検討が必要である(46)。

本研究では、GV が嫌気性菌のため上皮細胞と共培養をすることが困難であるため、生菌ではなく菌培養上清を用いて実験を行った。*In vivo* では GV や LC は生菌として存在するため、本実験の **limitation** の一つとなる。また、菌培養上清を数回に分けて採取したことから、材料の一定性を評価するためさらなる **biological replication** を今後行っていく必要がある。また、菌培養上清を添加し 48 時間後には上皮細胞が変異を認めたため、本研究では添加後 24 時間までの評価を行った。*In vivo* では腔内に 24 時間以上菌が存在するため、臨床では異なる結果となる可能性が考えられる。また本研究の結果とは矛盾するが、細菌性膣症の妊婦は、**Elafin** と **SLPI** が減少していたという報告がある(47)。このことから、感染初期には上皮細胞が防御反応として AMPs を産生し、感染が成立

すると AMPs が減少することが考えられる。逆に、AMPs の減少が誘因となり細菌性膣症を発症しているとも考えられる。

最後に、子宮頸管粘液における Elafin の生理学的濃度(48)で LC と GV への抗菌活性を評価したところ、いずれに対しても抗菌活性を認めなかった。Elafin の抗菌活性は、5~20 μ M の濃度で、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、*Aspergillus fumigatus*、*Candida albicans* に対して有効な抗菌活性を有すると報告されている(49)。子宮頸管粘液においては、Elafin の濃度は 0.5~2.0 μ M であるため、抗菌活性を認めなかったのは濃度が低いためと考えられた。最近では、SLPI と Elafin の生理的機能は、カチオン電荷による抗菌作用よりも抗プロテアーゼ作用に依存しているとの報告もある(50)。Elafin の抗プロテアーゼ作用が好中球エラスターゼの作用を減弱することが可能であるならば、子宮頸管熟化や破水を防ぎ、早産の予防につながると考えられる。子宮頸部高度異形成や子宮頸部上皮内癌の診断で、円錐切除術の既往がある妊婦は、子宮頸管長が正常妊婦よりも短縮するため切迫早産のリスクが高くなる。また、子宮頸部を円錐切除することにより、本来抗菌ペプチドを産生する部位が減少する。AMPs の抗プロテアーゼ効果を期待すると、円錐切除後の患者の子宮頸部に AMPs を添加することで早産を防げる可能性も考えら

れる。また Elafin は、菌をオプソニン化し、好中球や樹状細胞による貪食を促進する pro adjuvant 効果についても指摘されている(41, 51)。Elafin が子宮頸部における抗菌作用機序については、より詳細な検証が必要である。

まとめと今後の展望

EndoCx は、GV の可溶性成分により抗菌ペプチドである Elafin と炎症性サイトカインである IL-8 の産生を促進した (図 19)。IL-8 による Elafin の誘導は認めず、別の経路で誘導されていると考えられた。IL-8 は好中球を誘導し、好中球はエラスターゼを分泌する。一方、産生が促進された Elafin は *in vitro* では GV に対して抗菌活性は認めず、抗エラスターゼ作用により子宮頸部を保護している可能性が示唆された。今回は Elafin による抗菌作用は認めなかったが、Elafin の作用については未だ不明であり今後検討する必要がある。

今後は Elafin を誘導する因子の同定を行っていき、IL-8 以外の炎症性サイトカインによる Elafin の誘導についても検討する。また、Elafin がエラスターゼを抑制する抗プロテアーゼ効果についても検討する。

また、円錐切除術により子宮頸部における抗菌ペプチド産生の低下した妊婦において、Elafin をはじめとした抗菌ペプチド投与による早産の防止など、臨床的応用に向けたトランスレーショナルリサーチも行っていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導賜りました川名 敬先生（日本大学医学部産婦人科学系産婦人科分野教授）、早川 智先生（日本大学医学部病態病理学系微生物学分野教授）、相澤志保子先生（病態病理学系微生物学分野准教授）に深謝します。また共同で実験を行った小松 篤史先生（産婦人科分野准教授）、川上香織先生（産婦人科分野助教）、高田 和秀先生（微生物学分野助教）に厚く御礼申し上げます。

表・図

表 1 WHO の細菌性膣症の診断基準

1. 灰色帯下 2. 膣内 pH の上昇 (>4.5) 3. アミン臭の検出 4. 顕鏡での clue cell (周囲に多数の細菌が存在しているために輪郭が不鮮明に見える膣上皮細胞) の証明 のうち 3 つ以上が陽性であった場合に細菌性膣症と診断する。

産婦人科研修の必修知識 2016-2018 日本産科婦人科学会

表 2 Nugent score

スコア	<i>Lactobacillus</i> <i>Morphotypes</i>	<i>Gardnerella</i> and <i>Bacteroides</i> spp. morphotypes	Curved gram-variable rods
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ or 2+
2	2+	2+	3+ or 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

R P Nugent et al. J Clin Microbiol. 1991 Feb; 29(2): 297-301.を一部改変

膣分泌物に存在する菌種や菌量によって点数化されている。

合計点数が 0-3 点は正常、4-6 点は中間、7-10 点は細菌性膣症としている

表 3 臨床的 CAM の診断基準 (Lenki et al)

<p>1. 母体の発熱 (38.0℃以上) がある場合、 以下のうちの一項目以上あること</p> <ul style="list-style-type: none"> ・母体の頻脈 (100bpm 以上) ・子宮の圧痛 ・膣分泌物・羊水の悪臭 ・白血球増多 (15000/μl 以上)
<p>2. 母体の発熱がない場合、上記 4 項目すべてを満たすこと</p>

表 4 real time PCR で使用した Elafin と SLPI のプライマー配列

Elafin	
forward primer	CGTGGTGGTGTTCCTCATC
reverse primer	GACCTTTGACTGGCTCTTGC
SLPI	
forward primer	GGATGGCCAGTGCAAGCGTGA
reverse primer	GCCTGCTGTGTGCCAAGCCT

表 5-A 子宮頸部腺上皮細胞 (EndoCx) における遺伝子発現の網羅的解析
(BHIB に対する 10 % GV sup の影響)

BHIB vs 10 % GV sup (up regulation)

gene name	10 % G.vaginalis sup compared to BHIB
C-X-C motif chemokine ligand 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6025] [ENST00000401931]	5.22
Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8), transcript variant 1, mRNA [NM_000584]	5.13
Homo sapiens LIF, interleukin 6 family cytokine (LIF), transcript variant 1, mRNA [NM_002309]	4.66
Homo sapiens inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 5 (ITIH5), transcript variant 1, mRNA [NM_030569]	4.39
Homo sapiens BCL2 related protein A1 (BCL2A1), transcript variant 1, mRNA [NM_004049]	4.37
Homo sapiens PR/SET domain 1 (PRDM1), transcript variant 1, mRNA [NM_001198]	4.28
Homo sapiens olfactory receptor family 7 subfamily C member 2 (OR7C2), mRNA [NM_012377]	4.28
PT1.3_03_G05.r tumor1 Homo sapiens cDNA 5', mRNA sequence [AI525606]	4.24

表 5-B

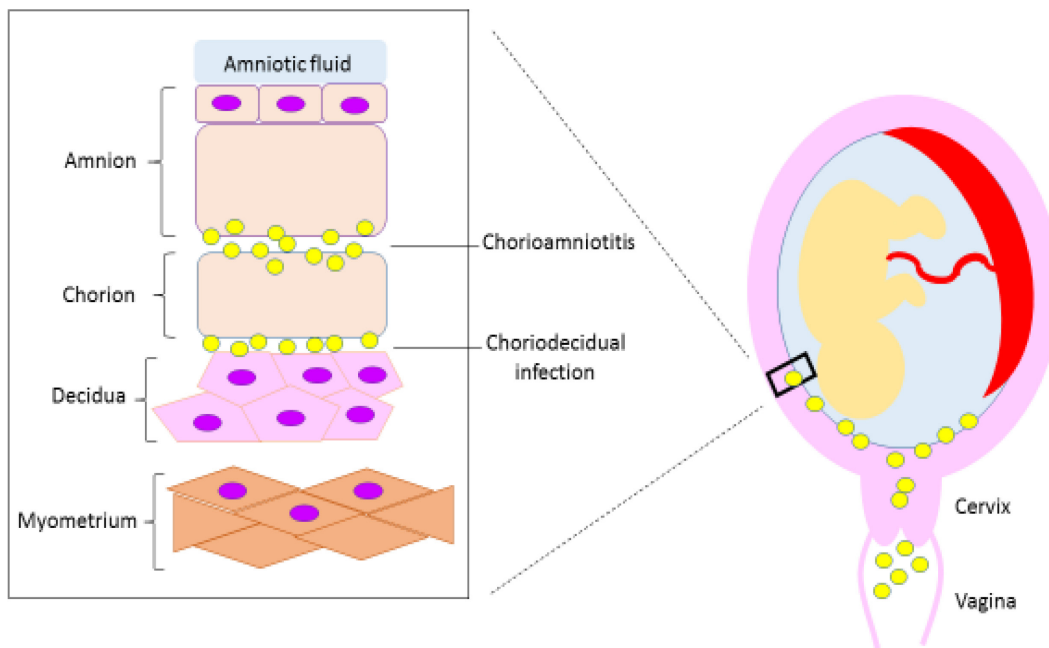
BHIB vs 10 % GV sup (down regulation)

gene name	10 % G.vaginalis sup compared to BHIB
Homo sapiens ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting family member beta 4 (ATP1B4), transcript variant 2, mRNA [NM_012069]	-6.49
Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 2311 (LINC02311), long non-coding RNA [NR_146498]	-6.05
Homo sapiens chymase 1 (CMA1), transcript variant 1, mRNA [NM_001836]	-5.91
Homo sapiens lncRNA upregulator of antiviral response interferon signaling (LUARIS), long non-coding RNA [NR_038276]	-4.70
Homo sapiens dehydrogenase/reductase 9 (DHRS9), transcript variant 3, mRNA [NM_001142270]	-4.66

表 6 切迫早産の診断で入院となった患者の背景

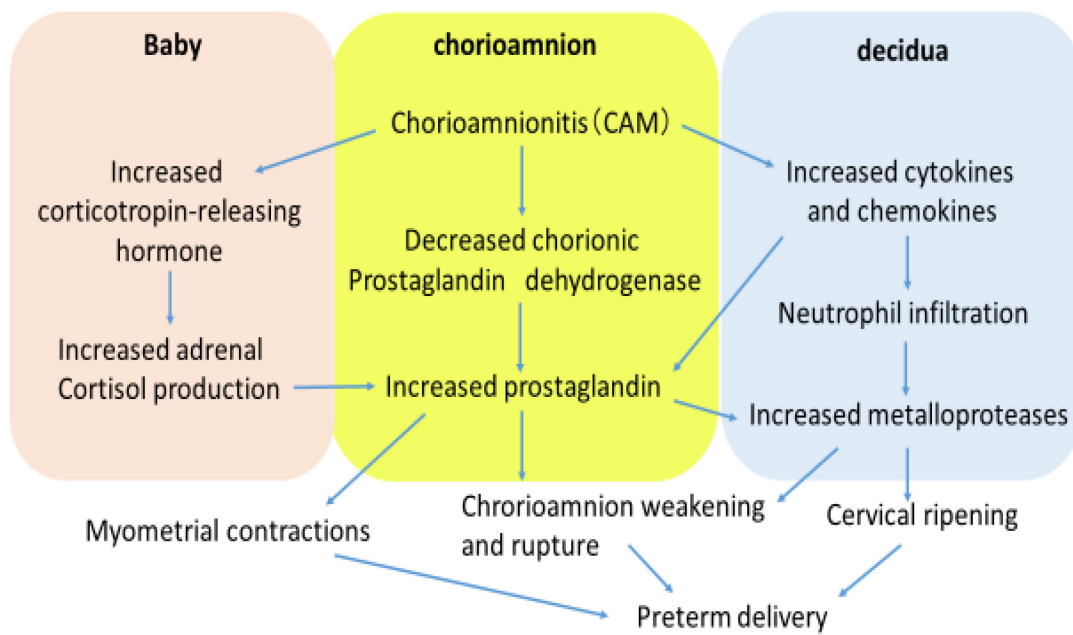
早産危険因子		症例数 (人)	確率 (%)
年齢	<35	154	66.3
	≥35	78	33.7
経産	初産婦	131	56.5
	経産婦	101	43.5
生殖補助治療	あり	42	18.1
	なし	190	81.9
既往	早産既往	24	10.3
	切迫早産既往	19	8.2
	後期流産または中絶	8	3.4
	死産	3	1.2
産科的異常	円錐切除術	9	3.9
	子宮筋腫合併	14	6
	子宮腺筋症合併	2	0.8
	卵巣腫瘍合併	2	0.8
	子宮奇形	1	0.4
全身疾患	双胎妊娠	10	4.3
	糖代謝異常	41	17.7
	妊娠高血圧症候群	10	4.3
喫煙歴	甲状腺疾患	16	6.9
	あり	50	21.5
細菌性膣症 (Nugent score)	なし	182	78.5
	細菌性膣症	13	5.6
	中間群	45	19.3
	正常	152	65.6

図1 卵膜の構造



産婦人科研修の必修知識 2016-2018 日本産科婦人科学会を一部改変
Goldenberg RL et al. N Engl J Med.2000 May 18;342(20):1500-7 を一部改変

図2 CAMから早産に至る機序



Goldenberg RL et al. N Engl J Med.2000 May 18;342(20):1500-7 を一部改変

図3 生体バリアの構成

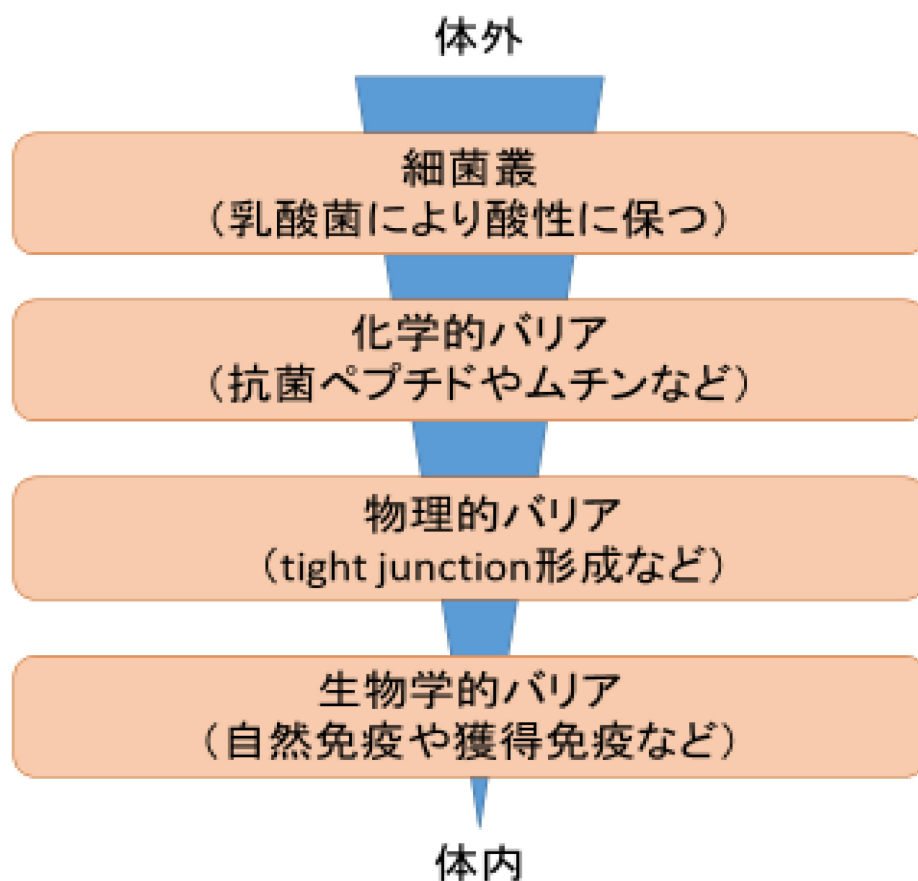


図 4 子宮頸部の構造

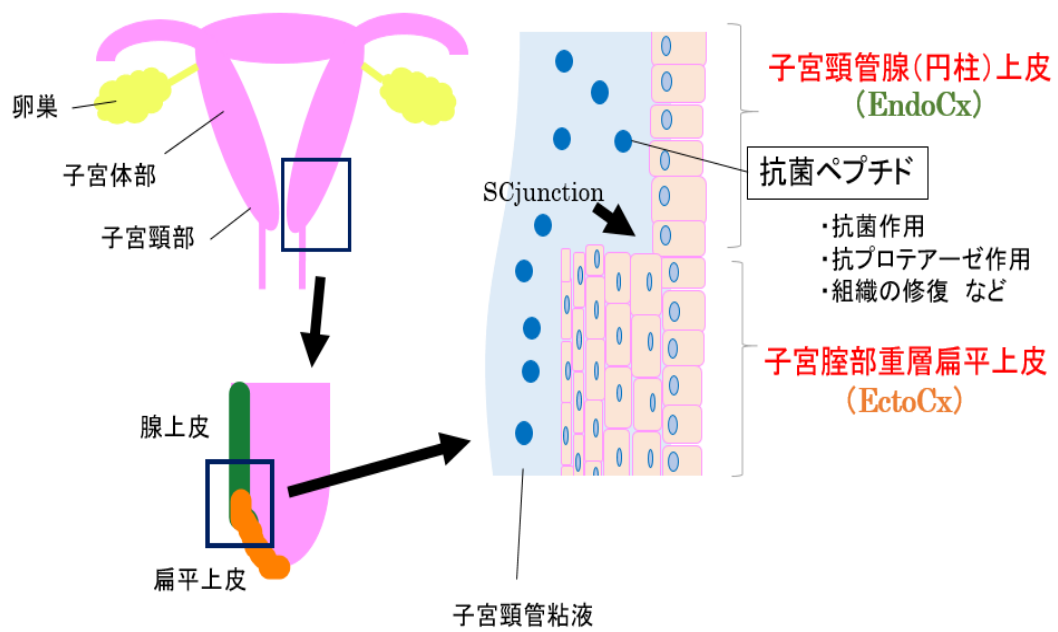


図 5 正常妊娠子宮の構造

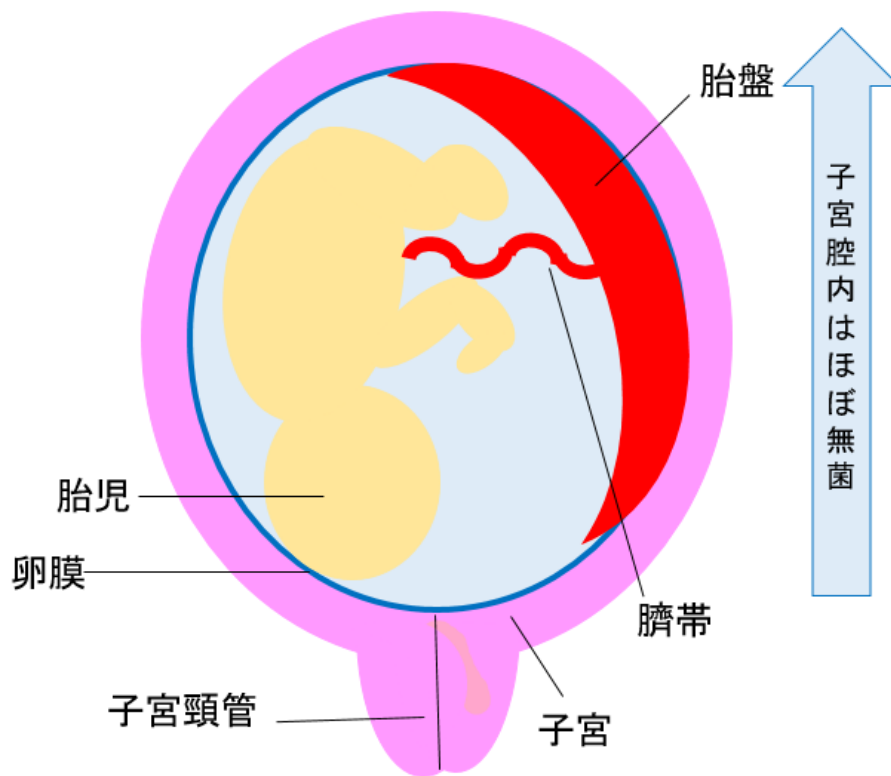
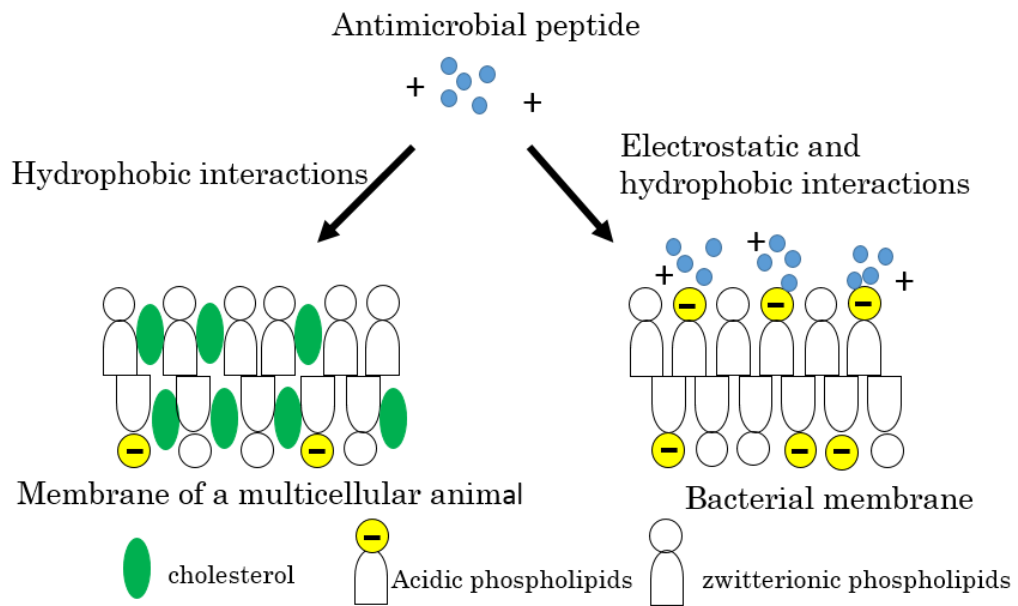


図 6 抗菌ペプチドの抗菌機序



Michael Zasloff. Nature2002 Jan 24;415(6870):389-95 を一部改変

図7 菌培養上清生成法

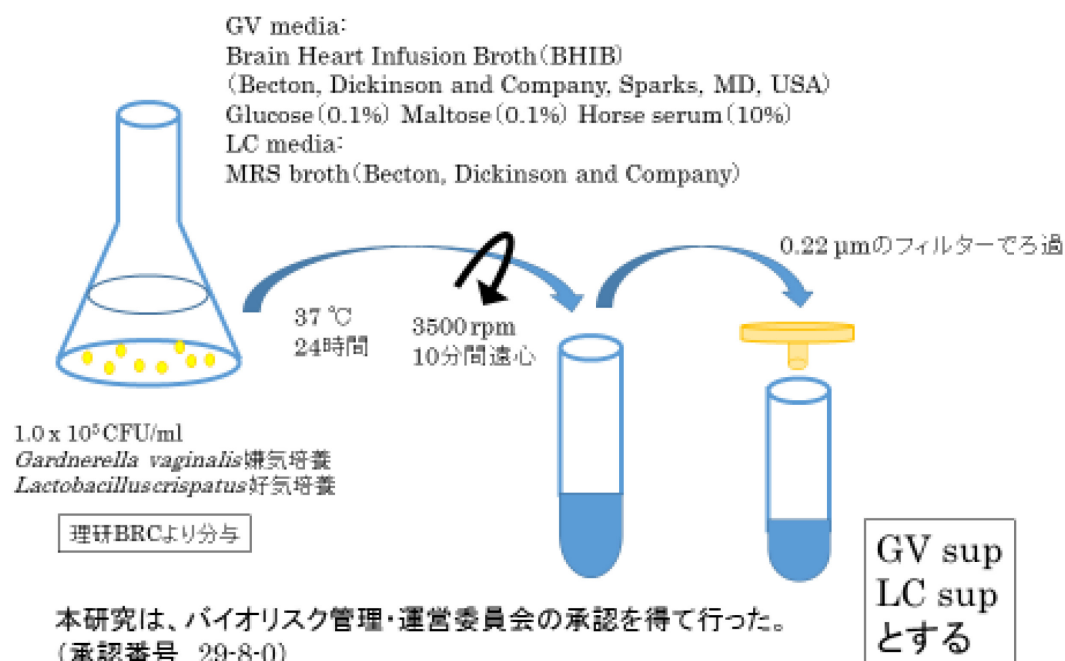


図 8 実験方法

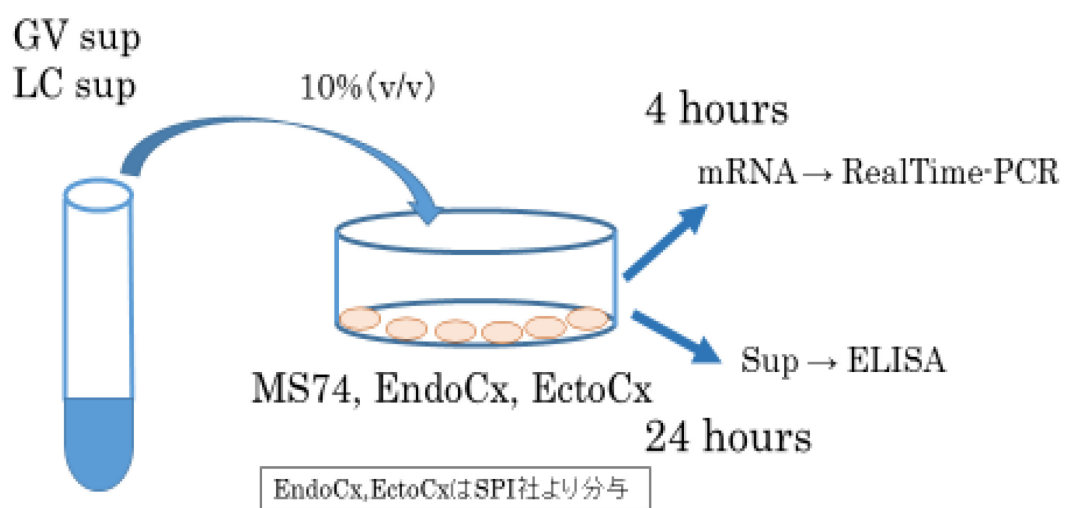


図 9 切迫早産の診断で入院した患者の振り分け

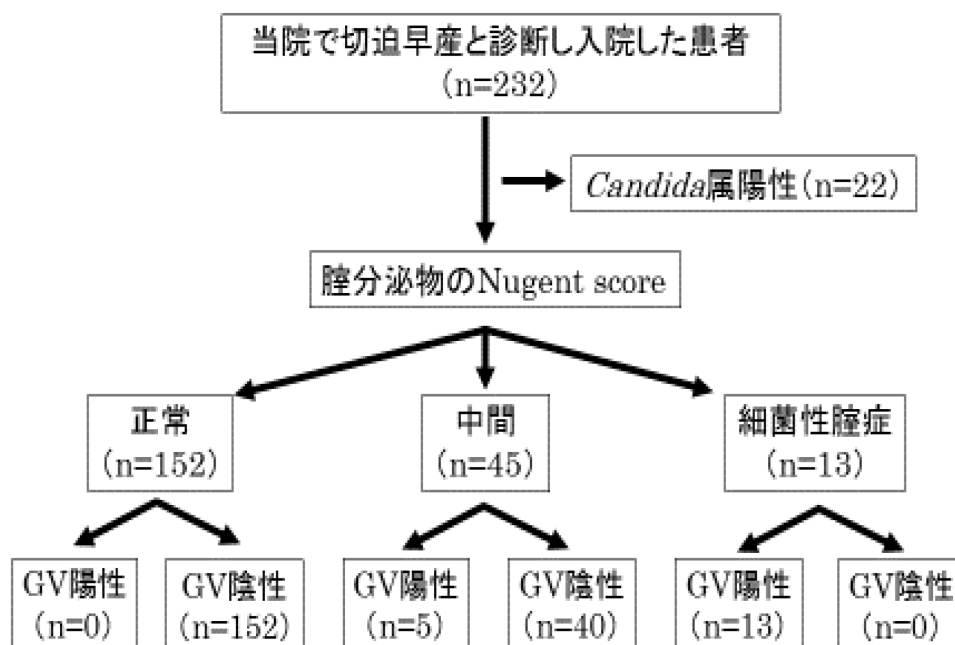


図 10 Nugent score と好中球エラスターゼ

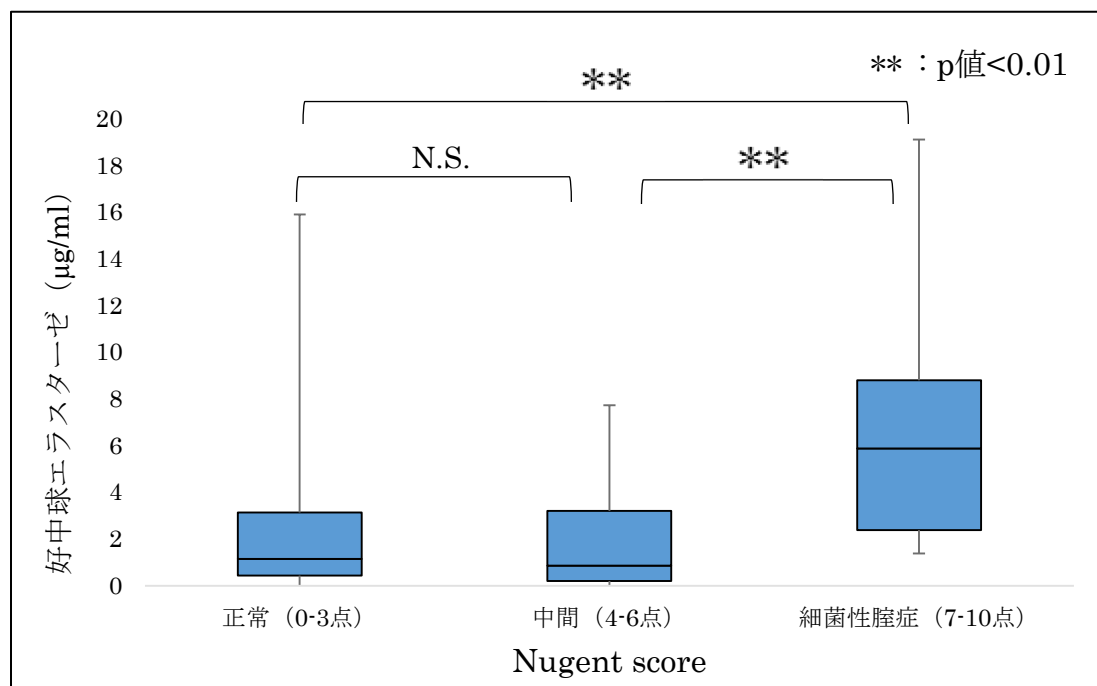


図 11 GV 陽性群と陰性群の好中球エラスターゼの比較

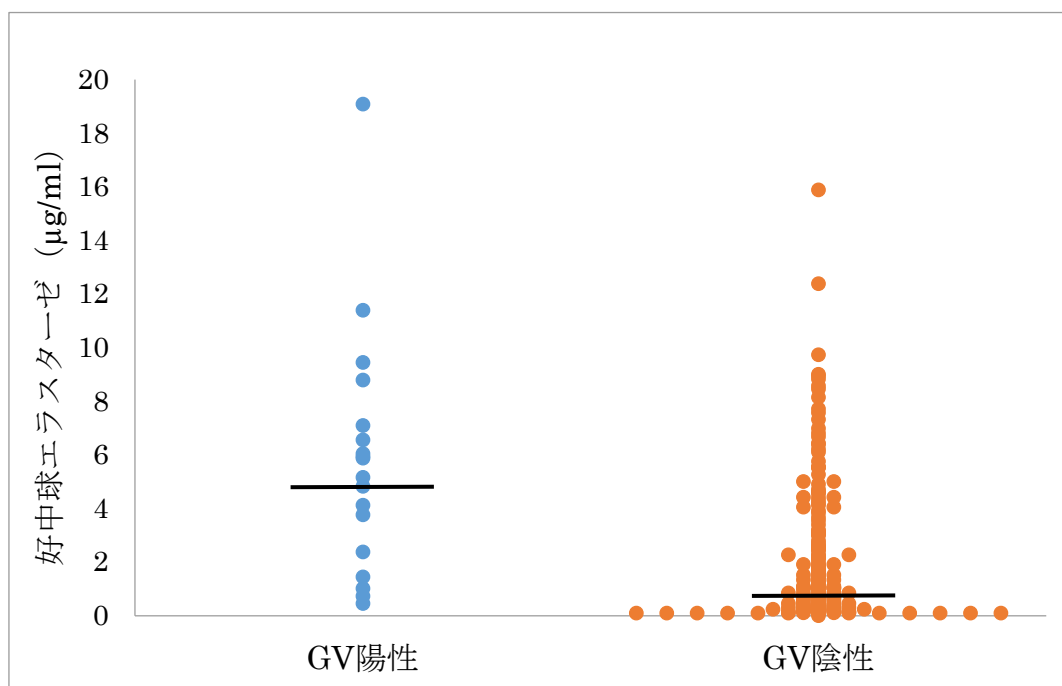


図 12 各上皮細胞の viability

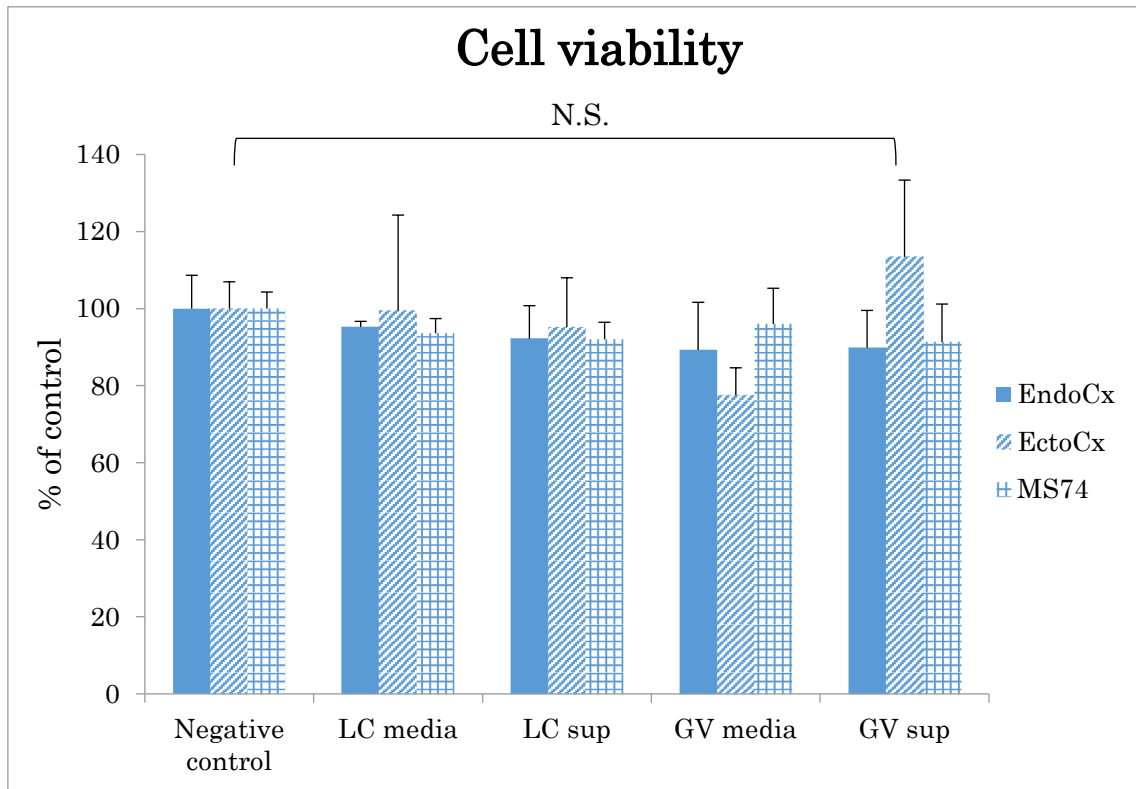


図 13 菌培養上清添加による MS74 の AMPs 産生の変化

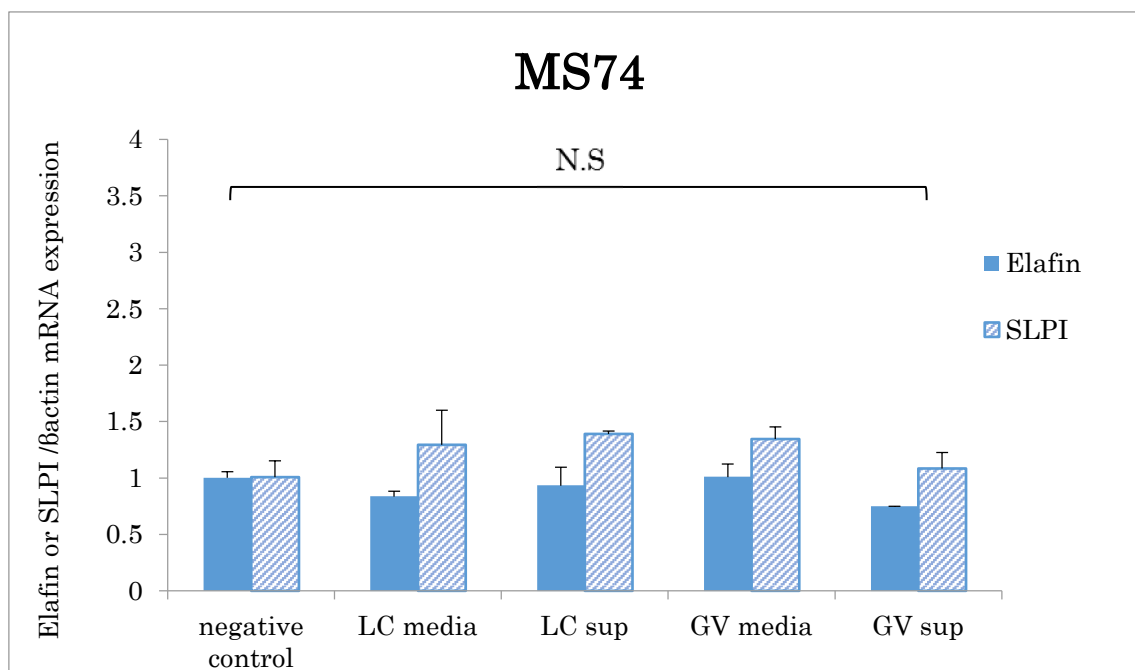


図 14 菌培養上清添加による EndoCx と EctoCx の AMPs 産生の変化

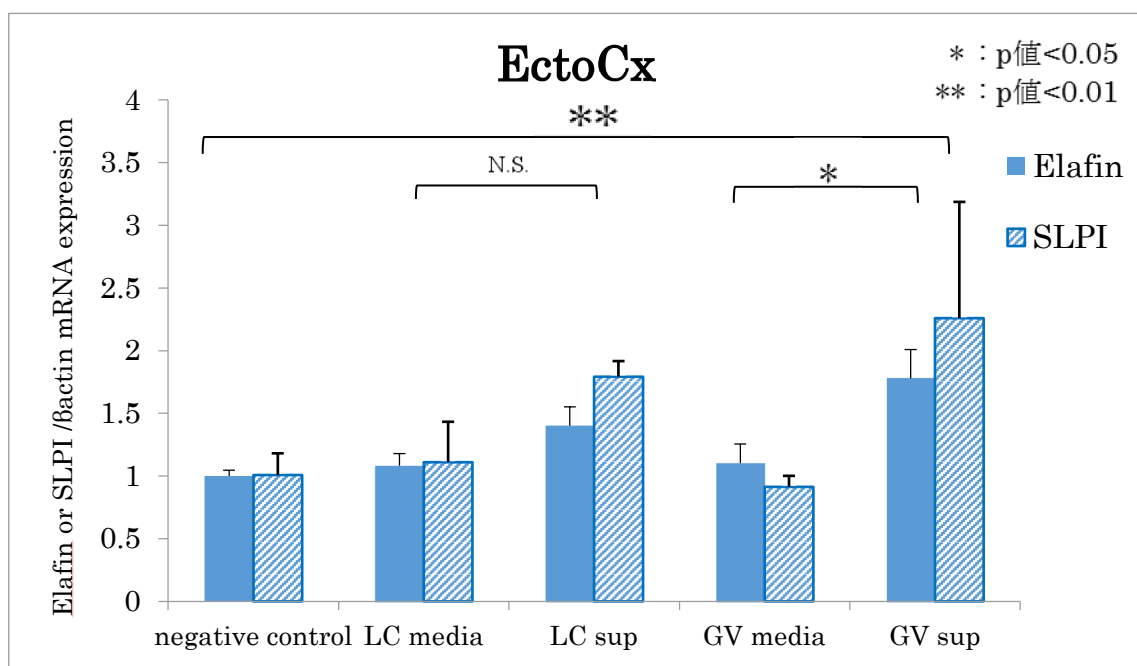
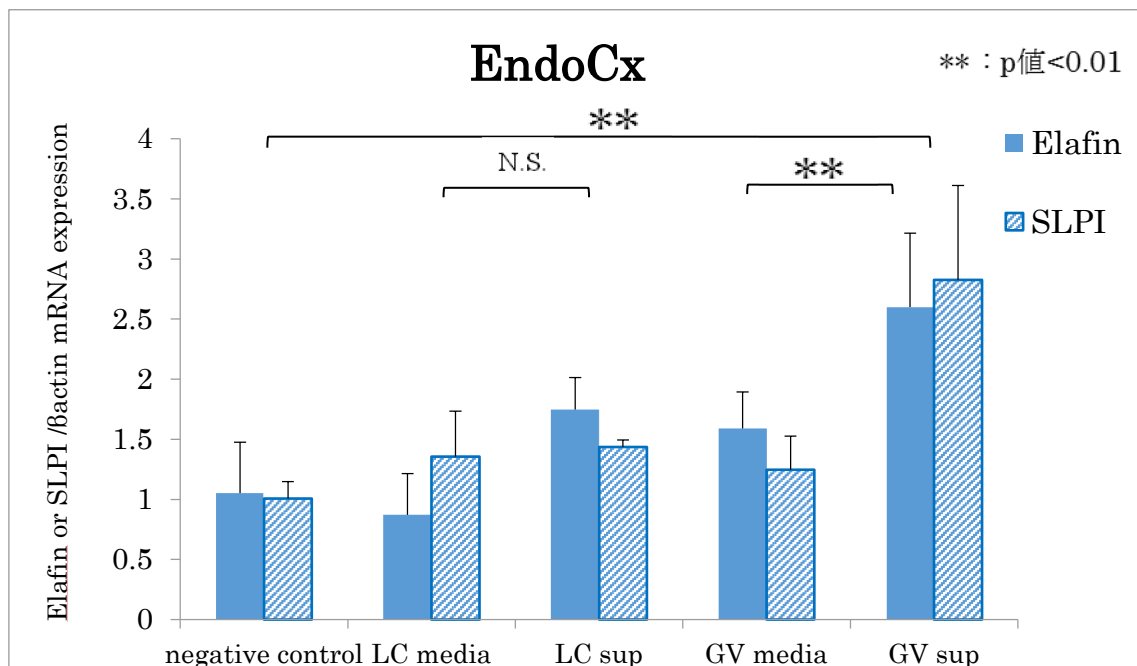


図 15-A 菌培養上清添加による EndoCx の AMPs 産生の変化

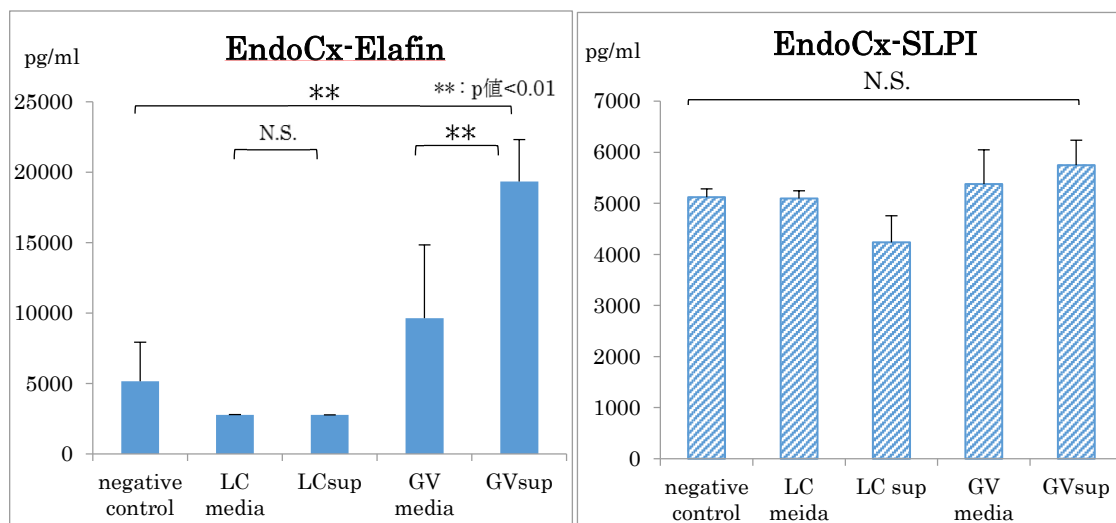


図 15-B 菌培養上清添加による EctoCx の AMPs 産生の変化

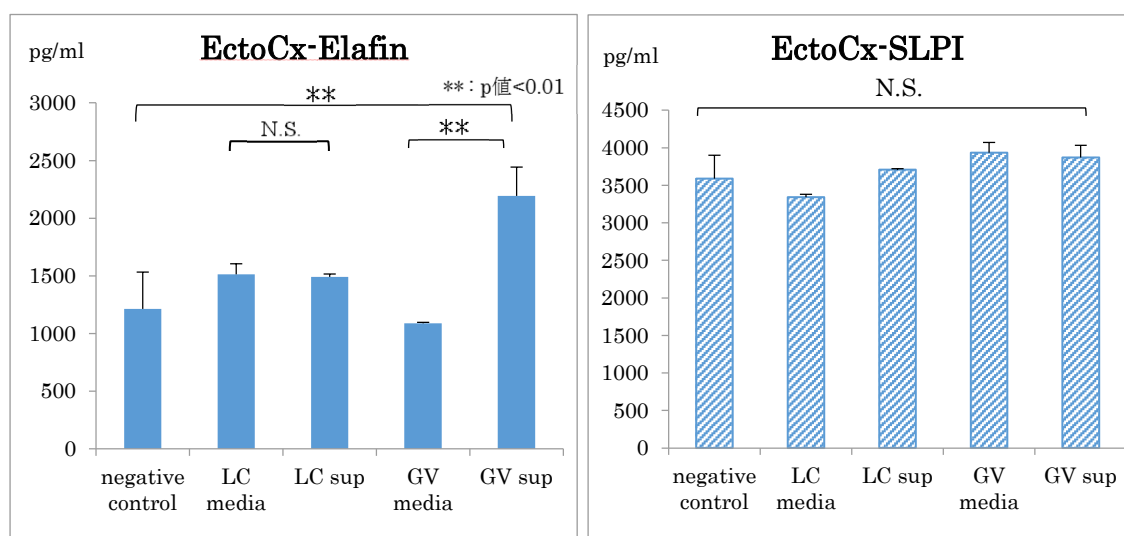


図 16 EndoCx における GV sup による IL-8 産生への影響

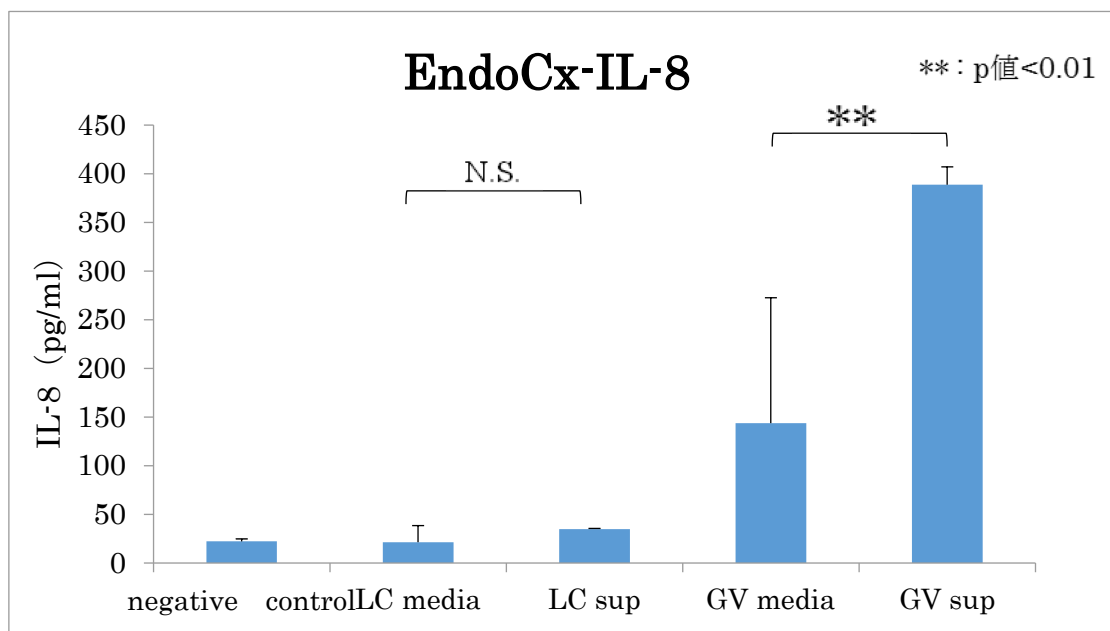


図 17 EndoCx における各濃度の IL-8 による Elafin 産生への影響

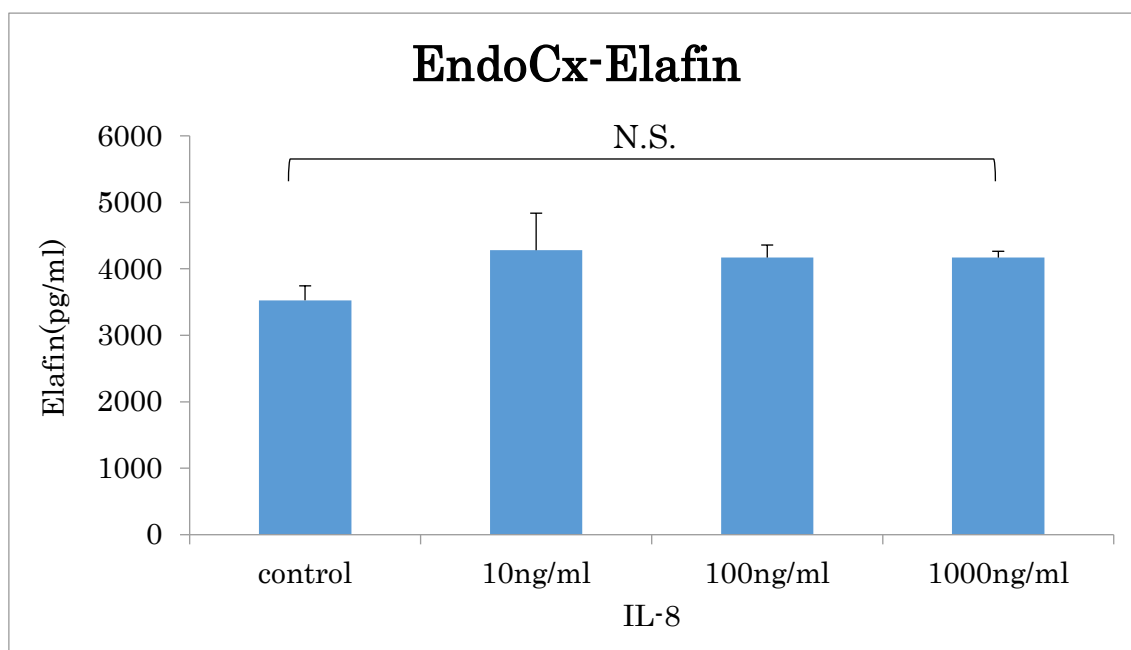


図 18 Elafin の LC と GV への抗菌活性

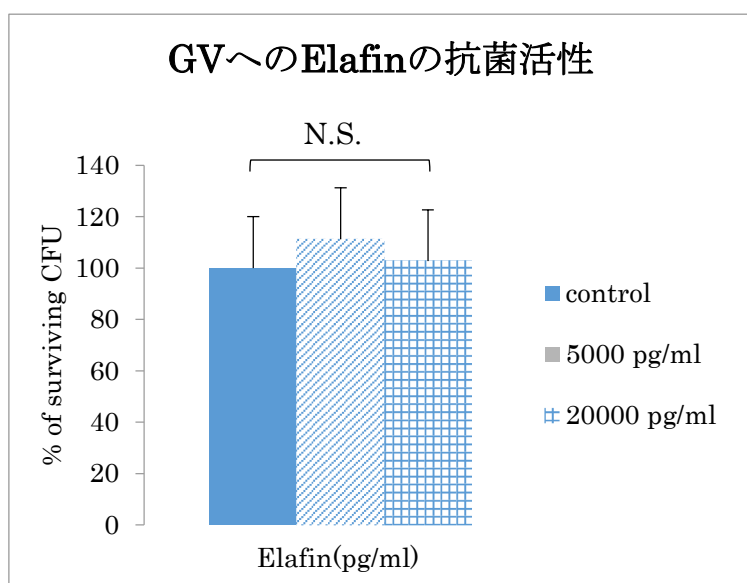
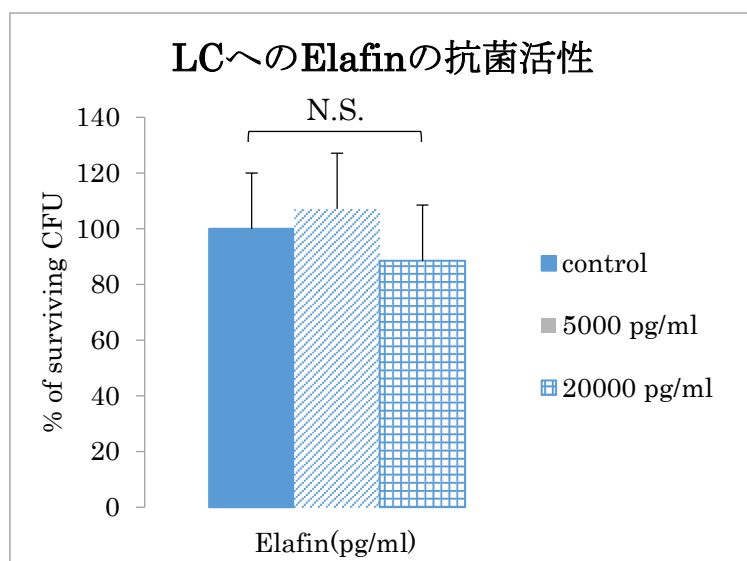
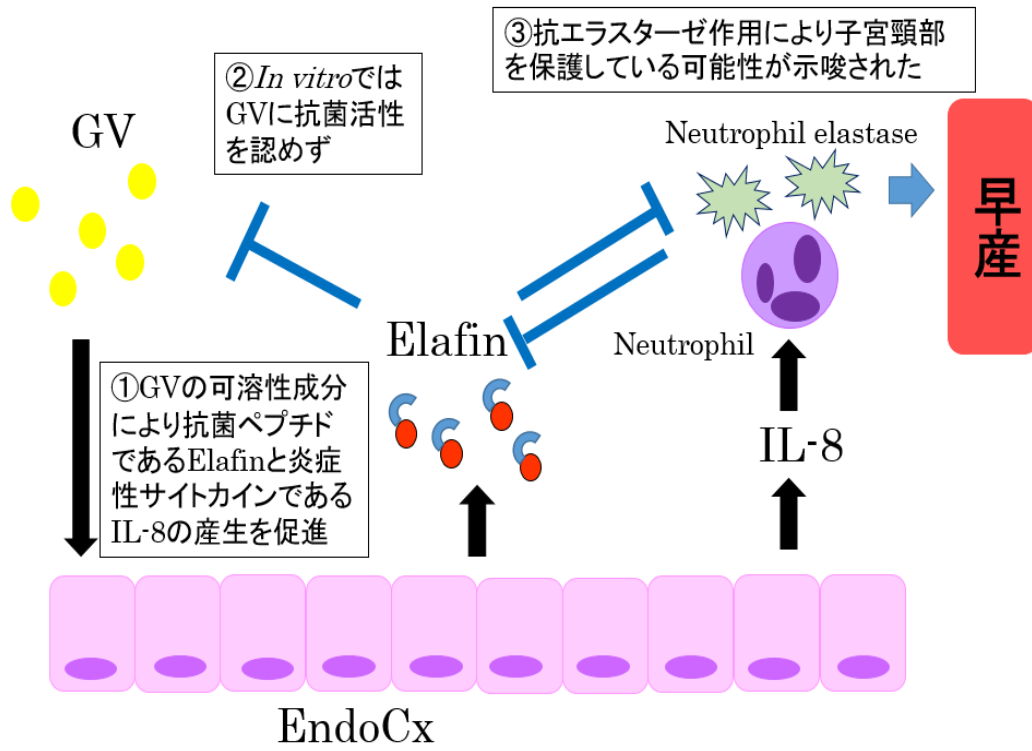


図 19



図説

図 1

細菌性膣症を発症すると、上行性感染をし、子宮頸管炎を経て絨毛膜羊膜炎に至る。

胎児と羊水を包む卵膜は、内側から羊膜・絨毛膜・脱落膜の 3 層からなっている。絨毛膜羊膜炎は胎児付属物である絨毛膜あるいは羊膜に感染が及んだ状態である。

図 2

CAM に至ると IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 といったサイトカインにより炎症が進行し、好中球が活性化されセリンプロテアーゼの一種である好中球エラスターゼが分泌される。好中球エラスターゼは微生物、異物を分解し生体を防御する。また、過剰になると好中球やマクロファージから MMP の産生を増強することでコラーゲンを分解し子宮頸管熟化や破水を引き起こすと考えられている(11, 13-15)(11, 13-15)。これらのサイトカインはプロスタグランジンを増強することで子宮収縮が促進し早産を引き起こすことも指摘されている。

図 3

膣内は *Lactobacillus* 属による細菌叢が乳酸や H₂O₂ を産生することにより膣内

pH の低下をさせ腔内を酸性に保つことで、病原体の侵入・増殖を防いでいる。

また、膣上皮や子宮頸部上皮などの粘膜上皮は、生体バリアとして機能しており、化学的バリア（抗菌ペプチド、ムチンなど）、物理的バリア（タイトジャンクション形成など）、生物学的バリア（自然免疫、獲得免疫など）が相互に影響しあっている。

図 4

子宮頸部上皮細胞は 2 種類に分かれており、Squamocolumnar Junction (S-C junction) を境に内子宮口側は一層の腺上皮（円柱上皮）に覆われ、外子宮口側は重層扁平上皮に覆われた構造となっている。腺上皮は、頸管粘液を分泌することで化学的バリアを担っており、重層扁平上皮は、tight junction により細胞間の物理的バリアを担っている。妊娠経過に伴い、子宮頸部の S-C junction が外反することで子宮頸管腺上皮が露出される。

前者の腺上皮が EndoCx、後者の重層扁平上皮が EctoCx に相当する。

図 5

子宮頸管は閉鎖し一定の長さを保ち、卵膜は胎児と羊水を包み込むことで腔側からの病原体の侵入を防いでいる。

膣－子宮頸部－卵膜の段階的な防御機構があることで、妊娠中は病原体からの侵入を防ぎ正常な妊娠の維持にはたらいっている。

図 6

AMPs はプラスの電荷のアミノ酸配列を有する。一方、細菌の細胞膜は酸性のリン脂質を多く含むためマイナスに電荷している。したがって AMPs は細菌の細胞膜に結合することで、膜を貫通させて殺菌すると言われている。

図 7

膣常在菌の一つである *L. crispatus* (JCM 7696) と細菌性膣症の原因菌の一つである *G.vaginalis* (JCM 11026) は理研バイオリソース研究センターから分与された。LC の培養液は、MRS broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を用いた。GV の培養液は Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Becton, Dickinson and Company) に Glucose (0.1%) (Becton, Dickinson and Company)、 Maltose (0.1%) (Becton, Dickinson and Company)、 Horse serum (10%) (Gibco)を加えて用いた。1.0 x 10⁵ CFU/ml の菌をそれぞれの培養液で 37 °Cで 24 時間培養した。GV は 24 時間嫌気培養した。3500 rpm で 10 分間遠心分離した上清を 0.22 um のフィルターでろ過したものを培養上清と

した。それぞれを GV sup、LC sup とした。

図 8

各上皮細胞を 1.0×10^5 cells/well の細胞密度で 24 well プレートにまき、37 °C、5%CO₂ の環境で 96 時間培養した。LC の培養上清 (LC sup) と GV の培養上清 (GV sup) とそれぞれの培地 (LC media、GV media) を加え (10 %v/v)、37°C、5%CO₂ の環境で培養し、4 時間後に RNA 抽出を行った。24 時間後に蛋白濃度を ELISA にて測定した。

図 9

切迫早産の診断で 2018 年 4 月から 2020 年 7 月までに入院となった患者 232 人のうち、Nugent score による評価を行った患者は全部で 210 人であった。膣分泌物培養検査において *Candida* 属を認めた患者 22 人は、真菌感染症と診断し Nugent score による評価を行わなかった。入院時に採取した膣分泌物培養検査の Nugent score より 0-3 点を正常、4-6 点を中間、7-10 点を細菌性膣症の 3 群に分類した。それぞれ 152 人、45 人、13 人であった。GV を認めた妊婦が 18 人、認めなかった妊婦が 192 人であった。

図 10

Kruskal-Wallis 検定により有意差が認められた (p 値<0.01)。

個別 2 群比較のため Steel-Dwass 検定を行ったところ、細菌性陰症を認めた患者はその他の 2 群より有意に好中球エラスターゼが高かった (P 値<0.01)。

中央値はそれぞれ、正常群が 1.155 $\mu\text{g/ml}$ 、中間群が 0.86 $\mu\text{g/ml}$ 、細菌性陰症群が 5.88 $\mu\text{g/ml}$ であった。

図 11

切迫早産の診断で入院となった妊婦のうち、GV 陽性群は陰性群と比べて、エラスターゼが有意に高値であった (p 値<0.01)。

両群の中央値はそれぞれ、陽性群が 5.525 $\mu\text{g/ml}$ 、陰性群が 1.085 $\mu\text{g/ml}$ であった。

図 12

MS74、EndoCx、EctoCx のいずれの上皮細胞 GV sup と LC sup の添加による viability に有意な変化は認めなかった。

図 13

MS74 は、GV sup 添加による SLPI や Elafin の発現への影響は認めなかった。

図 14

mRNA レベルでは、EndoCx と EctoCx は GV sup 添加により、SLPI も Elafin も発現が上昇した。一方で、LC sup 添加により、SLPI と Elafin の発現に有意な変化は認めなかった。

図 15-A、図 15-B

蛋白レベルでは、EndoCx と EctoCx は GV sup 添加により、Elafin のみ産生が促進された。SLPI は変化を認めなかった。

図 16

EndoCx は、GV sup の添加により蛋白レベルにおいて IL-8 の産生が促進された。LC sup の添加により IL-8 の産生に変化はみられなかった。

図 17

EndoCx は、IL-8 の刺激による Elafin の誘導は認めなかった。

図 18

Elafin の抗菌作用を評価するために LC と GV に Elafin を各濃度（5000 pg/ml

(0.46 mM)、20000 pg/ml (1.82 mM)) 添加後、寒天培地にまき、24 時間後にコロニー数を計測した。実験条件では、Elafin の LC と GV への抗菌活性は認めなかった。

図 19

EndoCx は、GV の可溶性成分により抗菌ペプチドである Elafin と炎症性サイトカインである IL-8 の産生を促進した。IL-8 は好中球を誘導し、好中球はエラスターゼを分泌する。一方、産生が促進された Elafin は *in vitro* では GV に対して抗菌活性は認めず、抗エラスターゼ作用により子宮頸部を保護している可能性が示唆された。

引用文献

1. Gatta LA, Kuller JA, Rhee EHJ. Pregnancy Outcomes Following Cervical Conization or Loop Electrosurgical Excision Procedures. *Obstet Gynecol Surv.* 2017;72(8):494-9.
2. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaidler A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(1):139-47.
3. 日本産科婦人科学会. 産婦人科研修の必修知識 2016-20182016.
4. Morales WJ. The effect of chorioamnionitis on the developmental outcome of preterm infants at one year. *Obstet Gynecol.* 1987;70(2):183-6.
5. Takada K, Komine-Aizawa S, Kuramochi T, Ito S, Trinh QD, Pham NTK, et al. *Lactobacillus crispatus* accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS74. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(3):e13027.
6. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One.* 2013;8(11):e80074.
7. Spurbeck RR, Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.* 2011;6(5):567-82.
8. Lencki SG, Maciulla MB, Eglinton GS. Maternal and umbilical cord serum interleukin levels in preterm labor with clinical chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(5 Pt 1):1345-51.
9. Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):339-54.
10. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301.
11. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000;342(20):1500-7.
12. Randis TM, Polin RA, Saade G. Chorioamnionitis: time for a new approach. *Curr Opin Pediatr.* 2017;29(2):159-64.
13. Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol.* 1988;31(3):553-84.
14. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, Gomez R, Romero R, Cassell GH. Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(2):606-12.

15. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin-1beta and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(3 Pt 1):644-9.
16. 産婦人科診療ガイドライン 産科編 2020. 日本産科婦人科学会/日本産婦人科医会 ed. 136-41 p.
17. Shiozaki A, Yoneda S, Nakabayashi M, Takeda Y, Takeda S, Sugimura M, et al. Multiple pregnancy, short cervix, part-time worker, steroid use, low educational level and male fetus are risk factors for preterm birth in Japan: a multicenter, prospective study. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(1):53-61.
18. Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15064-9.
19. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(4):285-93.
20. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2015;21(3):353-77.
21. Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:119-47.
22. Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol Rev.* 2016;270(1):20-31.
23. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol.* 2005;6(6):551-7.
24. Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG, Philpott DJ. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends Immunol.* 2008;29(1):41-9.
25. 熊ノ郷 淳. 免疫ペプチド: 羊土社; 2017. 86-7,125 p.
26. 板岡奈央. <妊娠における elafin 及び SLPI の生理的、病理的役割に関する検討>. 東京大学大学院医学系研究科修士論文. 2015.
27. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001067.
28. Horne AW, Stock SJ, King AE. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction.* 2008;135(6):739-49.
29. Zasloff M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1117:3-6.
30. Bingle CD, Vyakarnam A. Novel innate immune functions of the whey acidic

protein family. *Trends Immunol.* 2008;29(9):444-53.

31. Schalkwijk J, Chang A, Janssen P, De Jongh GJ, Mier PD. Skin-derived antileucoproteases (SKALPs): characterization of two new elastase inhibitors from psoriatic epidermis. *Br J Dermatol.* 1990;122(5):631-41.
32. Sallenave JM, Ryle AP. Purification and characterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1991;372(1):13-21.
33. Ranganathan S, Simpson KJ, Shaw DC, Nicholas KR. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J Mol Graph Model.* 1999;17(2):106-13, 34-6.
34. King AE, Morgan K, Sallenave JM, Kelly RW. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(2):594-9.
35. Itaoka N, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, et al. Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(6):536-44.
36. Tribe RM. Small Peptides with a Big Role: Antimicrobial Peptides in the Pregnant Female Reproductive Tract. *Am J Reprod Immunol.* 2015;74(2):123-5.
37. Anton L, Sierra LJ, DeVine A, Barila G, Heiser L, Brown AG, et al. Common Cervicovaginal Microbial Supernatants Alter Cervical Epithelial Function: Mechanisms by Which *Lactobacillus crispatus* Contributes to Cervical Health. *Front Microbiol.* 2018;9:2181.
38. Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis.* 2014;209(12):1989-99.
39. Aroutcheva A, Ling Z, Faro S. *Prevotella bivia* as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe.* 2008;14(5):256-60.
40. Bingle L, Tetley TD, Bingle CD. Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(1):84-91.
41. Sallenave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(6):635-43.
42. Pfundt R, Wiggins M, Bergers M, Zweers M, Frenken M, Schalkwijk J. TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(4):180-7.
43. Sakai M, Sasaki Y, Yoneda S, Kasahara T, Arai T, Okada M, et al. Elevated

interleukin-8 in cervical mucus as an indicator for treatment to prevent premature birth and preterm, pre-labor rupture of membranes: a prospective study. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51(3):220-5.

44. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(1):21-35.

45. Abbott DS, Chin-Smith EC, Seed PT, Chandiramani M, Shennan AH, Tribe RM. Raised trappin2/elafin protein in cervico-vaginal fluid is a potential predictor of cervical shortening and spontaneous preterm birth. *PLoS One.* 2014;9(7):e100771.

46. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32377-85.

47. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci.* 2009;16(12):1125-34.

48. Hughes BL, Dutt R, Raker C, Barthelemy M, Rossoll RM, Ramratnam B, et al. The impact of pregnancy on anti-HIV activity of cervicovaginal secretions. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(6):748.e1-.e12.

49. Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *Febs j.* 2008;275(9):2008-20.

50. Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y. Human pre-elafin inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):483-90.

51. Wilkinson TS, Dhaliwal K, Hamilton TW, Lipka AF, Farrell L, Davidson DJ, et al. Trappin-2 promotes early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* through CD14-dependent macrophage activation and neutrophil recruitment. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1338-46.

研究業績

松田 恵里那

- I 発表
 - ①一般発表 23
 - ②特別発表 なし
- II 論文
 - ①原著論文 0
 - ②症例報告 6 (単 1 共 5)
 - ③総説 0
- III 著書 なし

I 発表

① 一般発表

1. 橋本 恵里那, 市川 剛, 河野 愛, 中山 琢生, 仲尾 岳大, 東 裕福, 林 忠佑, 小松 篤史, 千島 史尚, 高田 眞一, 宮川 康司, 川名 敬 : 心臓、肝臓、胆嚢を共有している胸腹部結合双胎の 1 例

第 383 回 東京産科婦人科学会例会, 東京, 2017 年 9 月

2. 長谷川 怜美, 新屋 芳里, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 小林 理, 仲尾 岳大, 春日 晃子, 林 忠佑, 東 裕福, 市川 剛, 小松 篤史, 千島 史尚, 高田 眞一, 川名 敬 : クロウン病合併妊娠の経膣分娩後に長期間持続する外陰部膿瘍を伴った潜在的な直腸腔瘻の 1 例

第 383 回 東京産科婦人科学会例会, 東京, 2017 年 9 月

3. 橋本 恵里那, 市川 剛, 河野 愛, 中山 琢生, 仲尾 岳大, 東 裕福, 林 忠佑, 千島 史尚, 高田 眞一, 宮川 康司, 小松 篤史, 川名 敬 : 重症妊娠高血圧症候群合併妊娠の産褥期に発症した周産期心筋症の 2 例

第 134 回 関東連合産科婦人科学会, 栃木, 2017 年 12 月

4. 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 長谷川 怜美, 小林 理, 新屋 芳里, 仲尾 岳大, 春日 晃子, 小松 篤史, 千島 史尚, 宮川 康司, 高田 眞一, 川名 敬 : 虫垂に波及した骨盤腔を占拠する付属器膿瘍に対して子宮内避妊具抜去と抗菌剤投与で寛解を得た 1 例

第 134 回 関東連合産科婦人科学会, 栃木, 2017 年 12 月

5. 小林 理, 長谷川 怜美, 橋本 恵里那, 大熊 勇氣, 仲尾 岳大, 春日 晃子, 宮川 康司, 小松 篤史, 林 忠佑, 高田 眞一, 千島 史尚, 川名 敬 : SGLT2 阻害薬服用に関連しバルトリン腺膿瘍からフルニエ壊疽へと重症な転機を辿った一例

第 35 回 日本産婦人科感染症学会学術集会, 岐阜, 2018 年 5 月

6. Erina Hashimoto, Go Ichikawa, Ai Kono, Takuo Nakayama, Takehiro Nakao, Hiromitsu Azuma, Chuyu Hayashi, Atsushi Komatsu, Fumihisa Chishima, Shinichi Takada, Yasuji Miyakawa, Kei Kawana : Risk factors for preterm birth in ureaplasma-infected pregnant women with preterm labor

第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2018 年 5 月

7. Okuma Yuki, Nakao Takehiro, Hashimoto Erina, Hasegawa Remi, Kasuga Akiko, Azuma Hiromitsu, Hayashi Chuyu, Komatsu Atsushi, Miyagawa Yasuji, Takada Shinichi, Chishima Fumihisa, Kawana Kei : Limitation of postoperative adjuvant chemotherapy(paclitaxel and carboplatin) for treatment of cervical cancer stage I/II patients at high risk of recurrence
第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2018 年 5 月

8. Kobayashi Osamu, Nakao Takehiro, Kasuga Akiko, Okuma Yuki, Hasegawa Remi, Hashimoto Erina, Shinya Kaori, Hayashi Chuyu, Komatsu Atsushi, Takada Shinichi, Chishima Fumihisa, Kawana Kei : Para-aortic lymphadenectomy at primary surgery is critical for treatment of endometrial cancer
第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2018 年 5 月

9. Hasegawa Remi, Hayashi Chuyu, Okuma Yuki, Hashimoto Erina, Kobayashi Osamu, Shinya Kaori, Kasuga Akiko, Nakao Takehiro, Komatsu Atsushi, Takada Shinichi, Chishima Fumihisa, Kawana Kei : Treatment-free interval(TFI) is useful not only for choice of second-line agents but for prognostic factor in ovarian high-grade serous carcinoma cases stage III/IV
第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2018 年 5 月

10. Kaori Shinya, Chuyu Hayashi, Erina Kato, Remi Hasegawa, Yuki Okuma, Erina Hashimoto, Akiko Kasuga, Atsushi Komatsu, Yasuji Miyagawa, Shinichi Takada, Fumihisa Chishima, Kei Kawana : Retrospective study on the clinical efficacy of single embryo transfer(SET) for IVF-adverse cases; a single IVF center
第 70 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2018 年 5 月

11. 橋本 恵里那, 市川 剛, 河野 愛, 中山 琢生, 東 裕福, 林 忠佑, 千島 史尚, 高田 眞一, 宮川 康司, 小松 篤史, 川名 敬 : 早産リスク因子の多変量解析とウレアプラズマ感染の意義に関する検討
第 135 回 関東連合産科婦人科学会, 東京, 2018 年 6 月

12. 橋本 恵里那, 小松 篤史, 谷口 彩, 米倉 星七, 河野 愛, 小林 理, 松野 孝幸, 東 裕福, 高田 眞一, 川名 敬 : Mirror 症候群及び hCG 高値による甲状腺機能亢進症を呈した胎児水腫の 1 例

第 136 回 関東連合産科婦人科学会, 東京, 2018 年 11 月

13. 河野 愛, 東 裕福, 米倉 星七, 橋本 恵里那, 小林 理, 松野 孝幸, 小松 篤史, 高田 眞一, 川名 敬: 分娩第 2 期に胎児機能不全を認め急速遂娩をすることで救命しえた臍帯動脈断裂の一例

第 136 回 関東連合産科婦人科学会, 東京, 2018 年 11 月

14. Erina Hashimoto, Atsushi Komatsu, Ai Kono, Takehiro Nakao, Akiko Kasuga, Hiromitsu Azuma, Chuyu Hayashi, Yuji Ikeda, Chiaki Takeya, Mikiko Asai-Sato, Fumihisa Chishima, Kei Kawana: Validation of a new criteria of hypertensive disorders of pregnancy (HDP) in term of gestational proteinuria

第 71 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2019 年 4 月

15. 米倉 星七, 小松 篤史, 河野 愛, 橋本 恵里那, 大熊 勇氣, 東 裕福, 林 忠佑, 池田 悠至, 武谷 千晶, 佐藤 美紀子, 千島 史尚, 川名 敬
子宮頸部円錐切除術は腔内フローラ異常の修復機構を破綻させる 円錐切除術後妊娠の早産機序に関する研究

第 71 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2019 年 4 月

16. 新屋 芳里, 林 忠佑, 東 裕福, 河野 愛, 橋本 恵里那, 米倉 星七, 池田 悠至, 小松 篤史, 武谷 千晶, 佐藤 美紀子, 千島 史尚, 川名 敬
妊娠の既往の有無と生殖補助医療成績の関連性に関する検討

第 71 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 宮城, 2019 年 4 月

17. 林 伸樹, 小松 篤史, 橋本 恵里那, 星 絵璃子, 河野 愛, 東 裕福, 池田 悠至, 武谷 千晶, 佐藤 美紀子, 千島 史尚, 川名 敬: 妊娠中に再建子宮頸部 (Neocervix) の静脈瘤から頻回の出血を認めた広汎性子宮頸部摘出術 (トラケレクトミー) 後妊娠の 1 例

第 390 回 東京産科婦人科学会例会, 東京, 2019 年 5 月

18. 林 伸樹, 佐藤 美紀子, 橋本 恵里那, 星 絵璃子, 小林 理, 中島 隆広, 池田 悠至, 武谷 千晶, 小松 篤史, 千島 史尚, 川名 敬: オラパリブによる維持療法中に遷延する難治性貧血を生じた、プラチナ感受性再発卵巣癌の一例

第 137 回 関東連合産科婦人科学会, 東京, 2019 年 6 月

19. 橋本 恵里那, 池田 悠至, 林 伸樹, 星 絵璃子, 小林 理, 中島 隆広, 東裕福, 小松 篤史, 武谷 千晶, 佐藤 美紀子, 千島 史尚, 川名 敬: イホスファミド脳症が強く疑われた子宮腺肉腫の一例

第 137 回 関東連合産科婦人科学会, 東京, 2019 年 6 月

20. 橋本 恵里那, 池田 悠至, 中島 隆広, 東 裕福, 武谷 千晶, 千島 史尚, 佐藤 美紀子, 川名 敬: イホスファミド投与が著効した腹膜播種を伴う子宮腺肉腫の一例

第 61 回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 新潟, 2019 年 6 月

21. 前林 亜紀, 永石 匡司, 加藤 果野子, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 宮川 康司, 川名 敬: 子宮鏡手術における TCRis (Trans Cervical Resection in saline) の有用性の検討

第 59 回 日本産科婦人科内視鏡学会, 東京, 2019 年 9 月

22. 加藤 果野子, 永石 匡司, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 前林 亜紀, 宮川 康司, 川名 敬: 腹腔鏡下子宮筋腫摘出術から 12 年経過して発見されたポート部位 parasitic myoma の 1 例

第 392 回 東京産科婦人科学会例会, 東京, 2019 年 12 月

23. Erina Hashimoto, Shihoko Komine-Aizawa, Satoshi Hayakawa, Kei Kawana : Secretion of antimicrobial peptides, SLPI and elafin, from endocervical cells are influenced by vaginal flora; Gardnerella vs. Lactobacillus

第 72 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2020 年 4 月

II 論文

②症例報告

1. 長谷川 怜美, 新屋 芳里, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 小林 理, 仲尾 岳大, 春日 晃子, 林 忠佑, 東 裕福, 市川 剛, 小松 篤史, 千島 史尚, 高田 眞一, 川名 敬: クロウン病合併妊娠の経膈分娩後に長期間持続する外陰部膿瘍を伴った潜在的な直腸腔瘻の 1 例, 東京産科婦人科学会会誌, 67-1:36-41, 2018.

2. 橋本恵里那, 市川 剛, 河野 愛, 中山 琢生, 仲尾 岳大, 東 裕福, 林 忠佑, 小松 篤史, 千島 史尚, 高田 眞一, 宮川 康司, 川名 敬: 心臓、肝臓、胆

嚢を共有している胸腹部結合双胎の 1 例, 東京産科婦人科学会会誌, 67-3:520-524, 2018.

3. 大熊 勇氣, 佐藤 美紀子, 橋本 恵里那, 長谷川 怜美, 小林 理, 春日 晃子, 仲尾 岳大, 林 忠佑, 小松 篤史, 千島 史尚, 高田 眞一, 川名 敬: バルトリン腺膿瘍から進展した SGLT2 阻害薬カナグリフロジン服用中の糖尿病合併フルニエ壊疽の 1 例, 東京産科婦人科学会会誌, 68-1:42-47, 2019.
4. 林 伸樹, 小松 篤史, 橋本 恵里那, 星 絵璃子, 河野 愛, 東 裕福, 池田 悠至, 武谷 千晶, 佐藤 美紀子, 千島 史尚, 川名 敬: 妊娠中に再建子宮頸部 (Neocervix) の静脈瘤から頻回の出血を認めた広汎性子宮頸部摘出術 (トラケクトミー) 後妊娠の 1 例, 東京産科婦人科学会会誌, 69-1:66-70, 2020.
5. 加藤 果野子, 永石 匡司, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 前林 亜紀, 宮川 康司, 川名 敬: 腹腔鏡下子宮筋腫摘出術から 12 年経過して発見されたポート部位 parasitic myoma の 1 例, 東京産科婦人科学会会誌, 69-2:325-330, 2020.
6. 前林 亜紀, 永石 匡司, 加藤 果野子, 大熊 勇氣, 橋本 恵里那, 宮川 康司, 川名 敬: 子宮鏡手術における TCRis (Trans Cervical Resection in saline) の有用性の検討, 日本産科婦人科内視鏡学会雑誌, 35Suppl.I P:320, 2019.

Ⅲ 著書 なし.