

シンポジウム 2 早産の予防

子宮頸管熟化制御機構からみた早産の予防

浜松医科大学周産母子センター

杉 村 基

Inhibition of Cervical Ripening Prevents Spontaneous Preterm Birth

Motoi SUGIMURA

Maternal-Fetal and Neonatal Care Center, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu

Key words : Preterm birth · Cervical ripening · Urinary trypsin inhibitor · Prostaglandin E2 receptor · EP4 antagonist · IL-8

緒 言

早産は児の生命ならびに脳性麻痺などの神経学的後遺症を引き起こし、産科臨床において未だ完全に防止することのできないきわめて重要な疾患である。切迫早産は子宮収縮に伴う子宮頸管の短縮開大ならびに頸管熟化現象を主体としており、その機序解明と抑制が早産の防止に必須である。

子宮頸管熟化現象は分娩の中心をなす生理的炎症とも捉えることができるきわめて興味深い現象であり、近年の研究により陣痛発来とも密接に関連していることが徐々に明らかにされつつある。頸管熟化の最初の生理的過程には胎児因子としての DHA-S、胎盤因子としての CRT、羊水因子、機械的刺激因子など複数の誘因となる刺激が考えられおり、病的過程としては頸管炎、絨毛膜羊膜炎といった細菌感染に起因する機序が考えられている。生理的環境ではプロゲステロンによる抑制を受けながら、こうした刺激がケモカインである IL-8 や単球遊走ペプチドとともにマクロファージ遊走阻止因子¹⁾²⁾によって炎症性細胞遊走のプロセスを引き起こし、IL-1 や TNF- α を誘導、さらに IL-8, NO 誘導体を介して、COX II, プロスタグランジン(PG)E2 の増加, PGDH の減少, コラーゲン分解が行われ、子宮頸管熟化を誘導する。つまり、IL-8 といった炎症性サイトカイン系とプロスタノイドのひとつである PGE2 といった PG 系の密接な相互作用により子宮頸管熟化の過程が形成されていくと考えられる。

最近では PGE2 受容体サブタイプ(EP1, EP2,

EP3, EP4)³⁾についてその受容体塩基配列が同定され、受容体欠損マウスモデルを用いて炎症疾患における機能解析が急速に進みつつある⁴⁾。特に子宮筋ならびに子宮頸管組織における発現とその生理的機能が検討され⁵⁾、EP4 は子宮頸管熟化の制御⁶⁾に深く関わると示唆されている。

また、炎症系サイトカインによる COX II の誘導と同時に PGE2 が EP4 を介して IL-8 を誘導することが報告され⁷⁾⁸⁾、炎症性サイトカイン系と PG 系の直接的作用が示されつつある。

しかしながら、早産予防の観点からは実際の臨床において表裏の関係である子宮頸管熟化促進、抑制をどのように行うかが一番重要と考えられる。本研究では、基礎的検討から熟化促進物質として IL-8 誘導作用のあるヒアルロン酸(HA)に注目⁹⁾、また熟化抑制は IL-8 抑制作用のあるヒト尿中トリプシンインヒビター(UTI)¹⁰⁾¹¹⁾に注目し臨床的検討を行った。さらに、将来の新規治療を探る目的で EP4 に対する刺激ならびに阻害合成化合物¹²⁾に注目し子宮頸管熟化制御の基礎的検討を行った。

方 法

I) ヒアルロン酸による子宮頸管熟化促進の基礎的臨床的検討

A) 家兎におけるヒアルロン酸による子宮頸管熟化作用の基礎的検討

家兎に 3 日間連続でヒアルロン酸, DHA-S 含有腔坐剤を A 群: ヒアルロン酸(1mg)単独, B 群: DHA-S(30

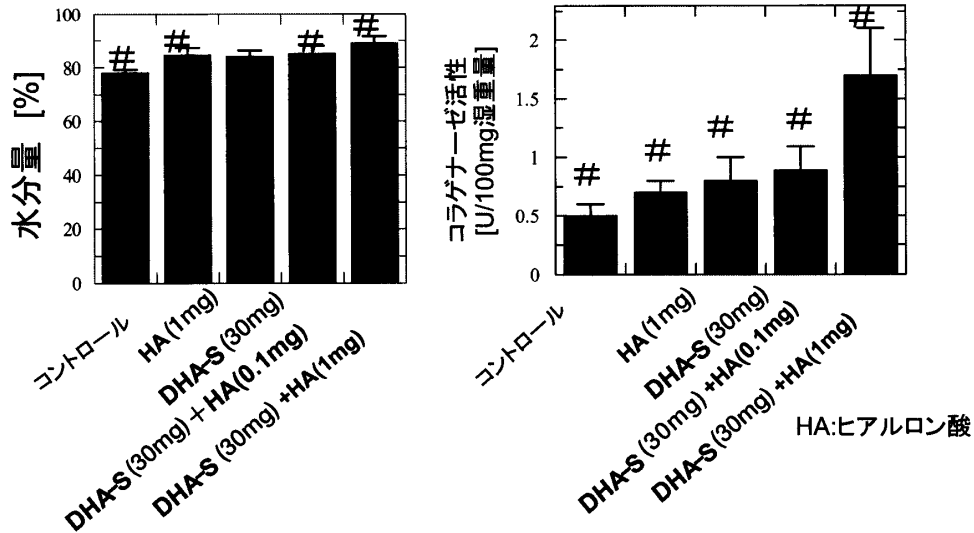


図1 ヒアルロン酸腔坐剤の家兎子宮頸管に対する作用
[平均±標準偏差] # : p<0.05

表1 ヒアルロン酸腔坐剤のヒト頸管熟化作用の臨床的検討

	身長 [cm]	分娩週数 [週]	出血量 [ml]	児体重 [g]
H 群 :	158.0 ± 6.9	39.4 ± 0.9	500 ± 310	3,097 ± 310
D 群 :	157.0 ± 5.3	39.4 ± 0.8	395 ± 279	3,114 ± 352
C 群 :	159.0 ± 4.0	39.6 ± 1.1	362 ± 237	3,204 ± 250

H 群 : N = 14 D 群 : N = 14 C 群 : N = 17

C vs D : 有意差なし

C vs H : 有意差なし

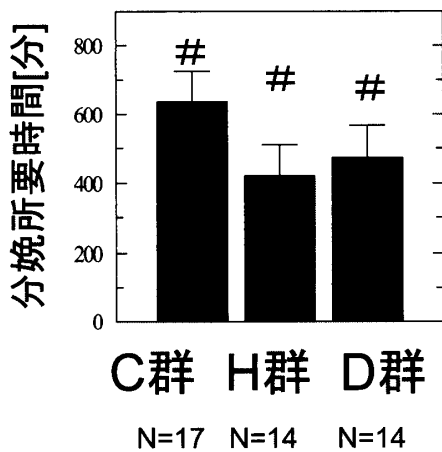


図2 各群の分娩所要時間の比較
C vs H : p<0.05 C vs D : p<0.05
[平均±標準偏差] # : p<0.05

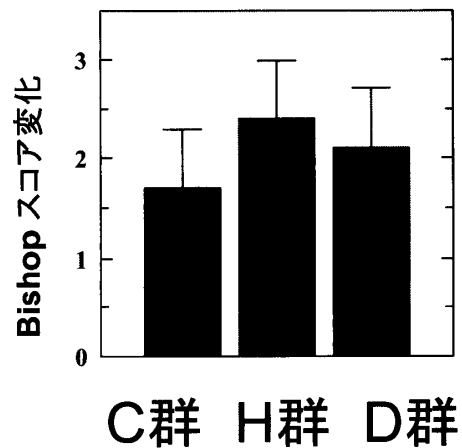


図3 各群の Bishop スコア変化の比較
C vs H : 有意差なし C vs D : 有意差なし
[平均±標準偏差]

mg) 単独, C 群 : DHA-S (30mg) + ヒアルロン酸 (0.1 mg), D 群 : DHA-S (30mg) + ヒアルロン酸 (1mg), E

群 : コントロールの各群に分け投与した後, 剖検し腔部を摘出, コラーゲン含有量, 含水量, コラーゲナーゼ

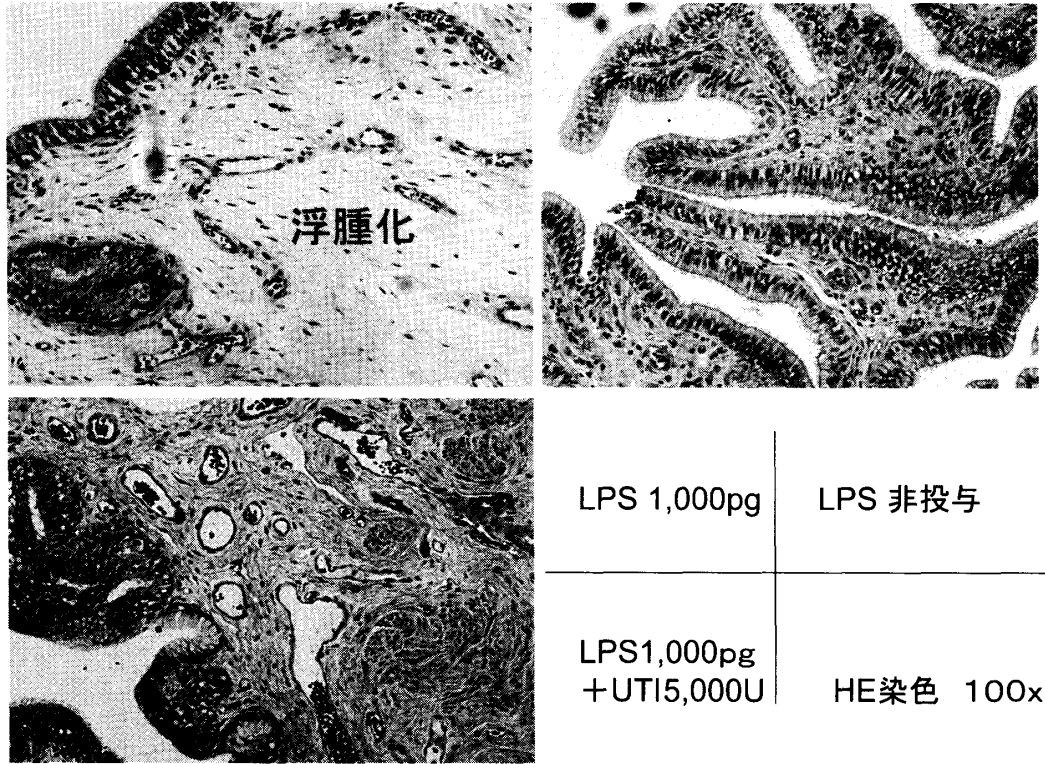


図4(a) UTIのLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用

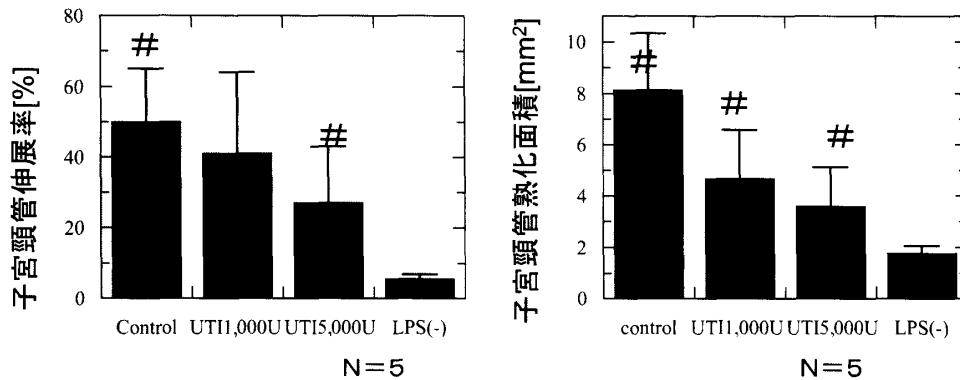


図4(b) UTIのLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用
[平均±標準偏差]

活性, エラスターゼ活性, 好中球浸潤ならびに組織学的検討を行った。

B) ヒトにおけるヒアルロン酸による子宮頸管熟化作用の臨床的検討

妊娠37週時の Bishop スコアが3点以下の妊婦を対象とし, インフォームドコンセントを得た後, 無作為に C 群: 非投与 (N=17), H 群: ヒアルロン酸腔坐剤 (50mg) 投与 (N=14), D 群: DHA-S 腔坐剤 (600mg) 投与 (N=14) の3群に分け, 1週ごと坐剤の投与を行い, 各群における投与開始時と陣痛発来時の Bishop スコア差, 分娩歴, 分娩様式, 分娩週数, 分娩所要時

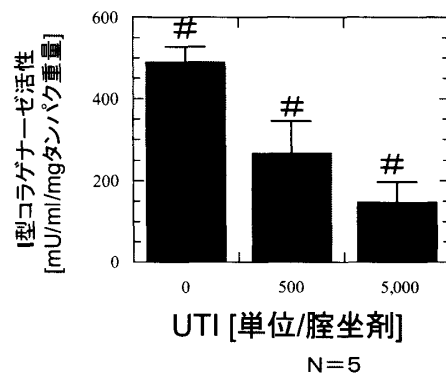


図4(c) UTIのLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用
[平均±標準偏差]

表2 2群間での背景因子の検討

	院内管理症例 (N = 17)	院外管理症例 (N = 12)	
年齢 (歳)	29.6 ± 4.9	30.4 ± 4.2	P = 0.6
入院時週数 (週)	27.9 ± 3.2	29.6 ± 2.9	P = 0.15
入院時頸管所見			
開大度 (cm)	0.79 ± 0.77	1.2 ± 1.2	P = 0.31
頸管長 (mm)	20.4 ± 8.5	18.2 ± 10.6	P = 0.56
Bishop スコア	3.8 ± 1.4	5.5 ± 2.0	P = 0.007
入院時			
子宮頸管エラストラーゼ	1.5 ± 1.5	1.7 ± 2.7	P = 0.54
細菌性膣症の有無	27% (3/11)	55% (5/7)	
頸管縫縮術の有無	6% (1/17)	17% (2/12)	
分娩時 PROM の有無	47% (8/17)	33% (4/12)	
UTI 膣坐剤の投与有無	88% (15/17)	8% (1/12)	

表3 2群間での産科的予後および新生児予後の検討

	院内管理症例 (N = 17)	院外管理症例 (N = 12)	
在胎週数 (週)	35.6 ± 2.3	32.8 ± 3.2	P = 0.01
延長期間 (週)	7.3 ± 4.9	3.4 ± 3.3	P = 0.02
前期破水の有無	47% (8/17)	33% (4/12)	
出生体重 (g)	2,466 ± 542	1,996 ± 576	P = 0.03
Apgar スコア (1分)	7.9	7.1	
NICU 入院の有無	53% (9/17)	58% (7/12)	
CAM の有無	43% (6/14)	73% (8/11)	

間(分), 児体重, 分娩時出血量を検討した。

II) ヒト尿トリプシン阻害剤による子宮頸管熟化抑制機序の基礎的臨床的検討

A) 子宮頸管熟化抑制の基礎的検討

a) UTI による家兎子宮頸管熟化抑制

LPS 膣坐剤 24 時間ごと 3 回連続経膣投与による家兎子宮頸管熟化モデルを用いて, UTI の熟化抑制作用を検討した。LPS 誘導家兎子宮頸管熟化モデルにおいて非妊娠家兎を UTI 膣坐剤 3 日間投与群と非投与群の各群 (N=5) に分けて投与の後, 剖検し膣部を摘出, 子宮頸管伸展率 (%), 子宮頸管熟化面積 (mm²), I 型コラゲナーゼ活性 (mU/ml/mg タンパク量) ならびに組織学的検討を行った。なお, 子宮頸管伸展率 (%) は摘出子宮頸管部を垂直に牽引し (5.9g 加重) 伸展率 (%) を測定した。HE 染色標本を作製, 任意の 3 視野において浮腫化した領域の面積を顕微鏡下 (Axio Photo) で測定, その平均を子宮頸管熟化面積とした。摘出子宮頸管組織を超音波破碎し遠心, 上清を FITC 蛍光標識した I 型コラーゲンに添加, 分解された I 型

コラゲナーゼの蛍光強度により I 型コラゲナーゼ活性を測定した。

B) 子宮頸管熟化抑制の臨床的検討

妊娠 33 週未満切迫早産例における UTI 膣坐剤の有効性

妊娠 22 週から 33 週未満で切迫早産と診断され管理入院となった症例 (N=29) を対象に 25 週以前から当科で管理した院内症例 (N=17) と 25 週以降当科紹介となった院外症例 (N=12) の 2 群に分け後方視的にその産科予後, 新生児予後について検討した。院内症例では腹緊, 子宮頸管短縮傾向など出現した時点で UTI 膣坐剤の投与を開始した。多胎, 母体適応による人工早産, 胎児奇形, 胎児染色体異常例を除外した。統計的検討は student-t, Welch-t 検定を用いた。

III) 新規子宮頸管熟化促進, 抑制剤の基礎的検討

A) EP4 刺激剤による家兎子宮頸管熟化の基礎的検討

非妊娠家兎 (N=5) に各種濃度の EP4 刺激剤 (APS-999) を 24 時間ごと 3 回連続経膣投与の後屠殺し, 子

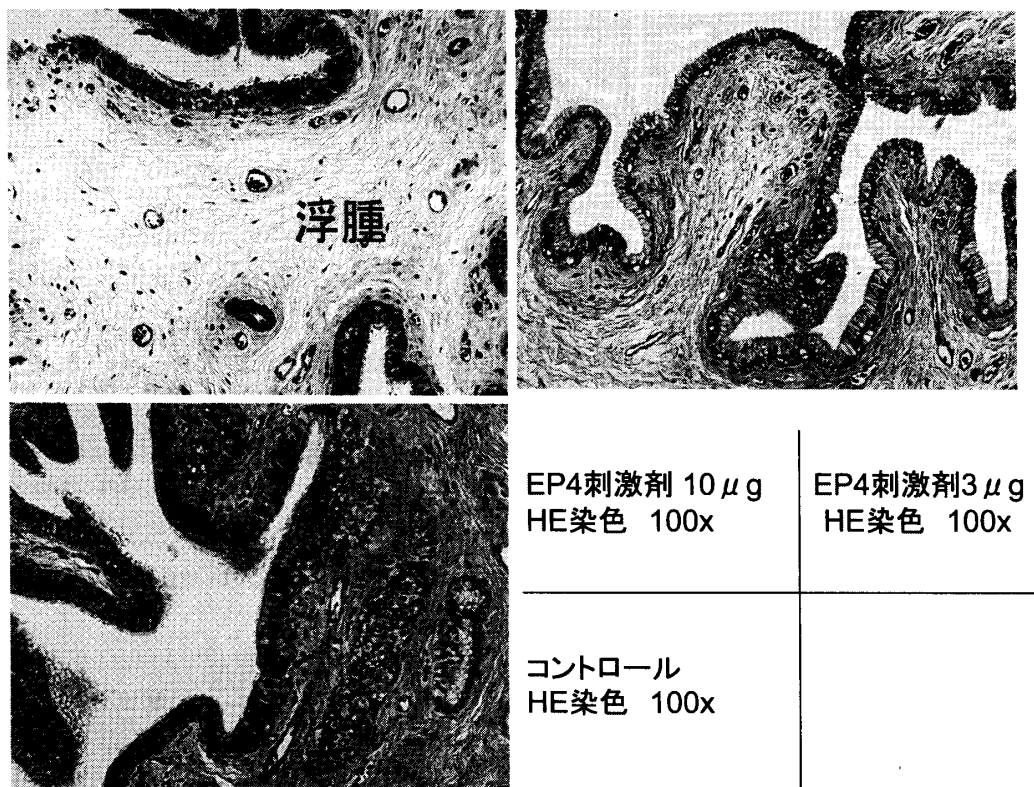


図 5(a) EP4 刺激剤の家兎子宮頸管熟化に対する作用

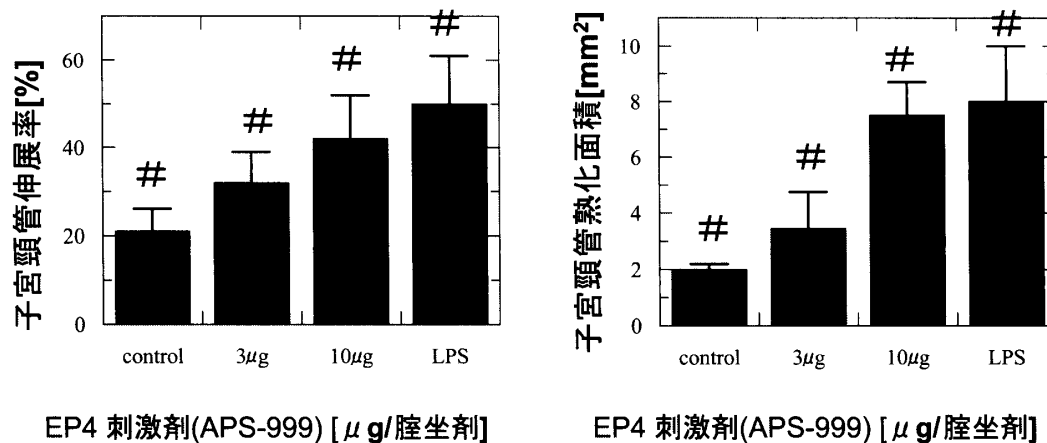


図 5(b) EP4 刺激剤の家兎子宮頸管熟化に対する作用
[平均 ± 標準偏差]

宮頸管伸展率, 子宮頸管熟化面積, I型コラゲナーゼ活性, ならびに組織学的に検討した。

B) EP4 阻害剤による家兎子宮頸管熟化抑制の基礎的検討

非妊娠家兎 (N=5) に LPS 腔坐剤を 24 時間ごと 3 回連続経腔投与の後屠殺し, 子宮頸管部を摘出し検討

を行った。各種濃度の EP4 阻害剤 (Ono-AE3-208) 含有腔坐剤を LPS 腔坐剤投与とともに投与し子宮頸管伸展率, 子宮頸管熟化面積, I型コラゲナーゼ活性 ml/, ならびに組織学的に検討した。

成績

I) A) コントロールと比較して HA 単独投与群は

好中球浸潤数, コラゲナーゼ活性, エラスターゼ活性, 含水量いずれも有意に増加していた。また, 反対にコラーゲン含有量は有意に低下し組織学的検討では著明な血管の拡張を認めた。なかでも, D群が各検討項目ともコントロールと比較して最も有意な増加を示した(図1)。

B) 各群における身長体重, 分娩週数, 児体重, 分娩時出血量に有意な差はなかった(表1)。

分娩所要時間は有意にH群で短縮した(図2)。

Bishop スコア差はH群で大きい傾向を認めた(図3)。

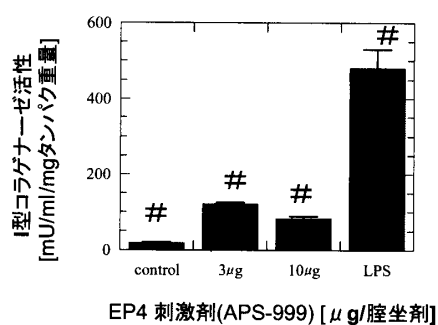


図5(c) EP4 刺激剤の家兎子宮頸管熟化に対する作用
[平均±標準偏差]

II) A) 組織学的検討では UTI 投与群においてコントロールと比較して浮腫ならびに血管の拡張が抑制されていた(図4a)。

UTI 投与群においてコントロールと比較して子宮頸管伸展度, 子宮頸管熟化面積, I型コラゲナーゼ活性はいずれも有意に抑制された。また, (図4b, 図4c)。

B) 2群間の背景について年齢, 入院時妊娠週数, 開大度などに有意差はなかったが, 院内症例群では子宮頸管熟化度の指標である Bishop スコアが有意に低く UTI 投与が頸管熟化を抑制する可能性が示唆された。また, 在胎週数, 妊娠延長期間も院内症例群では有意に延長しており妊娠早期からの早産対策とともに, UTI 投与による子宮頸管熟化抑制が切迫早産例での妊娠期間延長に有用であることが示唆された(表2, 表3)。

III) A) 組織学的検討では EP4 刺激剤投与によりコントロールと比較して浮腫状変化が著明であった(図5a)。コントロールと比較して子宮頸管伸展度, 子宮頸管熟化面積, I型コラゲナーゼ活性 ml/はいずれも有意に EP4 刺激剤により濃度依存性に促進された(図5b, 図5c)。

B) LPS 投与子宮頸管は著明な浮腫状変化を示し,

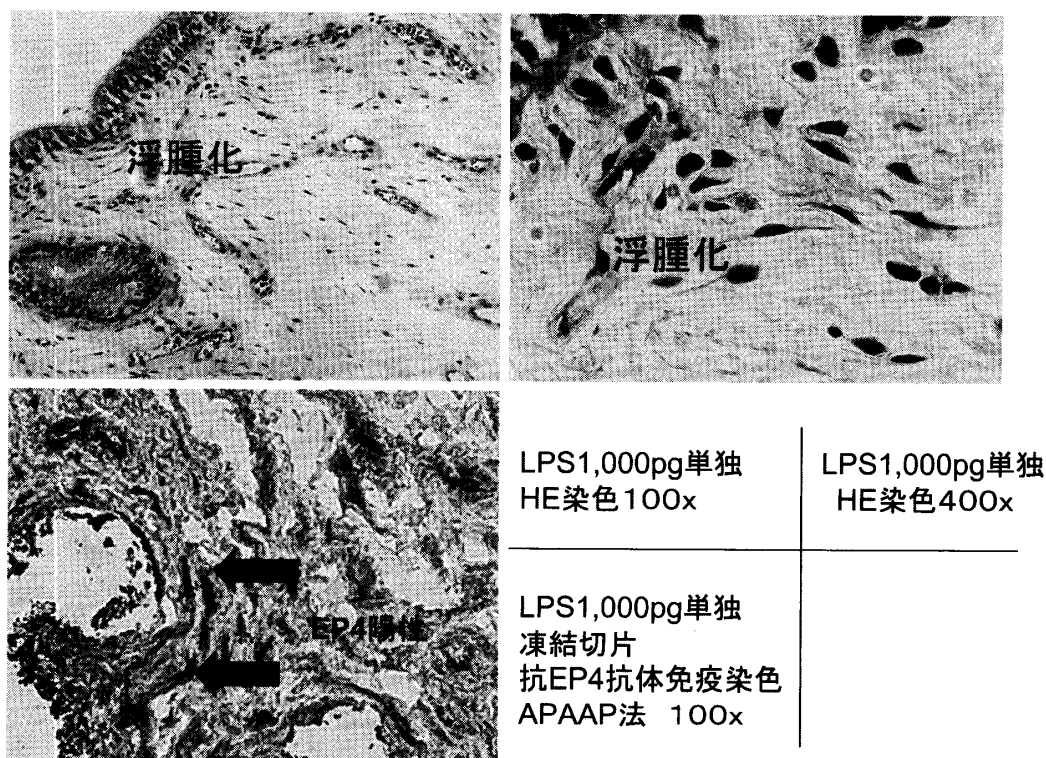


図6 LPS 誘導家兎子宮頸管熟化の組織学的検討

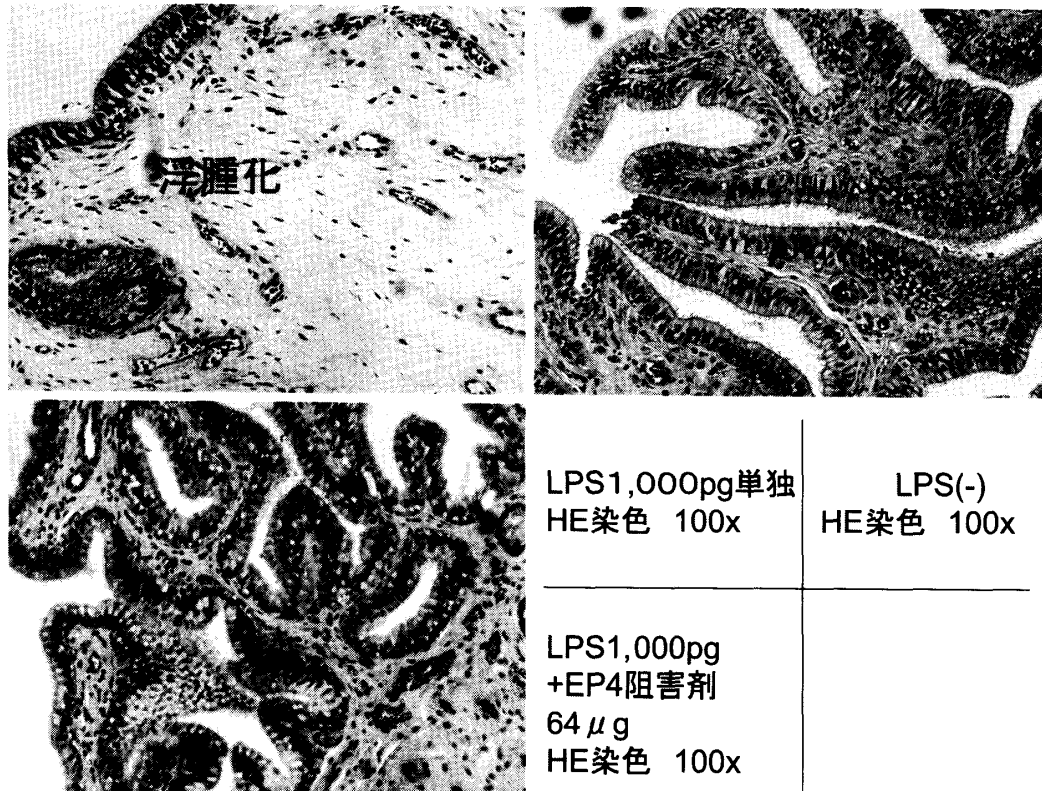


図7(a) EP4阻害剤のLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用

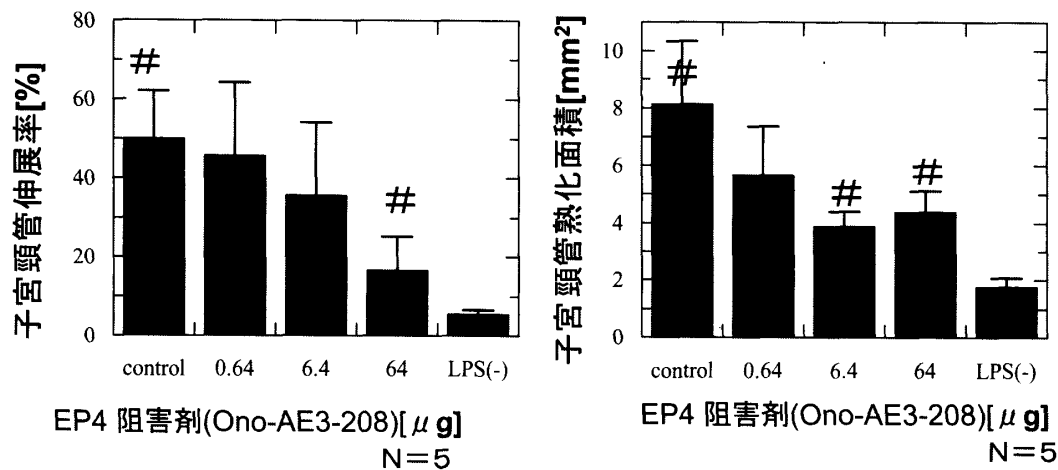


図7(b) EP4阻害剤のLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用
[平均±標準偏差] # : p<0.05

免疫組織学的検討では凍結切片においてEP4発現が子宮頸管間質細胞に局在していた(図6)。組織学的検討ではEP4阻害剤投与により子宮頸管の熟化が抑制されていた(図7a)。コントロールと比較して子宮頸管伸展率、子宮頸管熟化面積、I型コラゲナーゼ活性 ml/はEP4阻害剤によりいずれも有意に抑制された(図7

b, 図7c)。

考 察

本研究では炎症性サイトカインであるIL-8による白血球遊走を開始点とする子宮頸管熟化の機序とPGE2に基づく子宮頸管熟化の機序に注目し検討を行った。ヒアルロン酸はIL-8誘導作用があるが、家兎

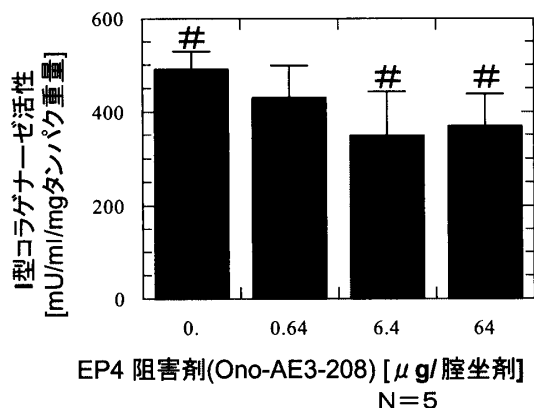


図7(c) EP4 阻害剤のLPS誘導家兎子宮頸管熟化に対する作用

[平均±標準偏差]

動物モデルでの頸管熟化作用に基づき、ヒトにおいても頸管熟化作用を示したことはIL-8が中心的役割を担っていることを示すものである。こうした検討に基づき、子宮頸管熟化抑制の観点からIL-8抑制作用を有するUTIを用いることで、LPS誘導家兎子宮頸管熟化が抑制されたことはUTIの頸管熟化作用の基礎的裏づけといえる。また、臨床的検討においてもUTIがヒト子宮頸管熟化を遅延し、切迫早産例において妊娠期間の延長をなす可能性が示唆されたことは、子宮頸管熟化抑制による早産防止は重要な治療戦略と考えられる。

ただ、これら生物製剤は未知なウイルス感染を含め基本的には臨床の場での使用には限界があることから、子宮頸管熟化促進、抑制の活性を有する新規合成化合物を探索が必要である。子宮頸管において重要な役割を演じるPGE2系において、そのサブタイプ受容体であるEP4に対する刺激剤が子宮収縮を惹起せず子宮頸管熟化を家兎動物モデルにおいてはじめて示したことは子宮頸管熟化による分娩の調節の可能性を示している。またEP4阻害剤によるLPS誘導家兎子宮頸管の熟化抑制を子宮頸管組織の伸展率、組織学的変化、コラーゲンゼ活性の変化からはじめて示したことは熟化抑制による早産防止の重要な手段のひとつと考えられる。確かにEP4欠損マウスではその胎仔が動脈管の異常を示すことから阻害剤による影響の検討が必要と思われるが、EP4は子宮頸管熟化の鍵となる新たなタンパクであり将来の臨床応用の可能性を示している。今後は、IL-8系とPGE2系の相互作用

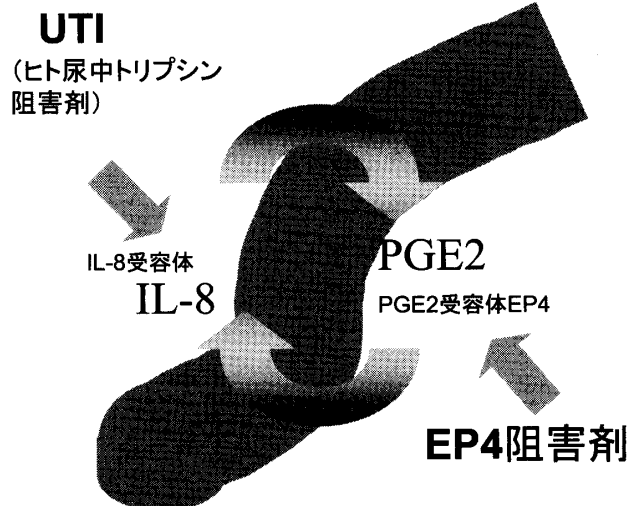


図8 子宮頸管熟化抑制の原理

用に関する知見を増やすことで子宮頸管熟化の観点からの早産防止の臨床的検討が必要と考える(図8)。

総括

家兎動物モデルならびにヒトを対象とし、子宮頸管熟化を局所的に直接制御する基礎的臨床的検討を行った。特に子宮収縮の抑制のみの早産防止から子宮頸管熟化の抑制による早産防止という考えに基づき検討を行い以下の点を明らかとした。

第一に炎症性サイトカインであるIL-8誘導物質であるヒアルロン酸が家兎子宮頸管熟化を惹起することを示した。ヒアルロン酸がヒト子宮頸管熟化を促進することが示されたことからIL-8が頸管熟化に関与することが示唆された。

第二にLPSによるIL-8誘導抑制作用のあるUTIがLPS誘導家兎子宮頸管熟化を抑制することを示した。また、切迫早産例において妊娠早期からのUTI局所投与により子宮頸管熟化の抑制と妊娠維持の延長が示唆された。

第三にPGE2の選択的受容体EP4刺激剤が家兎子宮頸管熟化を促進したこと、またその阻害剤がLPS誘導家兎子宮頸管熟化を抑制したことから、頸管熟化に選択的に関与するEP4によるヒト熟化制御の可能性が示された。

共同研究者(敬称略)

浜松医科大学 福田有佳, 竹内康高, 田村正顕, 尾松公平
村上裕介, 河村隆一, 大橋涼太
西口富三, El Maradny E, Belayet H Md,

Khatun S, 金山尚裕

久留米大学 前原佳代子

研究協力者

静岡県産婦人科医会

伊東市民病院 北村公也 ★内田季之 大久保大考

富士宮市立病院 ★徳永直樹 土井貴之 原 信
小菅陽子

共立蒲原病院 ★川島正久 高橋伸卓

掛川市立病院 ★鈴木一有 加藤 誠

袋井市立病院 ★井嶋真理 加賀俊章

社会保険浜松病院 ★木村 聡 田村直顕

竹内病院 ★竹内康高 ★代表研究者

文 献

1. *Iwaki T, Sugimura M, Nishihira J, Matsuura T, Kobayashi T, Kanayama N.* Recombinant adenovirus vector bearing antisense macrophage migration inhibitory factor cDNA prevents acute lipopolysaccharide-induced liver failure in mice. *Lab Invest* 2002; 83: 561—570
2. *Matsuura T, Sugimura M, Iwaki T, Ohashi R, Kanayama N, Nishihira J.* Anti-macrophage inhibitory factor antibody inhibits PMSG-hCG-induced follicular growth and ovulation in mice. *Am J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 591—595
3. *Ichikawa A, Sugimoto Y, Negishi M.* Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1996; 14: 83—87
4. *Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Ushukubi F, Fukumoto M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A.* Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 7—12
5. *Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Hackenberg R, Nusing RM.* Expression of prostanoid receptors in human lower segment pregnant myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 307—313
6. *Chien EK, Macgregor C.* Expression and regulation of the rat prostaglandin E2 receptor type 4 (EP4) in pregnant cervical tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1501—1510
7. *Yu Y, Chadee K.* Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 1998; 161: 3746—3752
8. *Caristi S, Piraino G, Cucinotta M, Valenti A, Loddo S, Teti D.* PGE2 induces IL-8 gene transcription by activation C/EBP homologous protein in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2005
9. *Belayet HM, Kanayama N, Khatun S, Tokunaga N, Sugimura M, Yamashita M, Kobayashi T, Terao T.* Dehydroepiandrosterone sulphate promotes hyaluronic acid-induced cervical ripening in rabbits. *Hum Reprod* 1999; 14: 1361—1367
10. *Kanayama N, Maradny EE, Halim A, Maehara K, Kajiwara Y, Terao T.* Urinary trypsin inhibitor suppresses premature cervical ripening. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol* 1995; 60: 181—186
11. *Kanayama N, Khatun S, Terao T.* The effect of urinary trypsin inhibitor on uterine muscle contraction and cervical maturation. *Trophoblast Res* 1999; 13: 415—425
12. *Nakabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A, Narumiya S.* The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* 2002; 109: 883—893

Abstract

Background

The preterm birth remains one of the important factors and causes that may influence the neonatal morbidity and mortality. Recent research has shown the significant roles of the inflammatory cytokine systems as IL-8 and PGE2 receptors (EP1, EP2, EP3, EP4) in the uterine contractions and cervical ripening in the patients with preterm labor. In the present study, we studied the enhancing effects of hyaluronan, potential inducer of IL-8, and EP4 agonist and inhibitory effects of urinary trypsin inhibitor (UTI), IL-8 inhibitor, and EP4 antagonist on cervical maturations in animal models to investigate the future prevention of preterm delivery in clinical practice.

Methods

The percent tensile strength with perpendicular stretching, the edematous areas in the unselected microscopic fields and type I collagenase activity in the uterine cervical tissues in the non-pregnant rabbits were examined to evaluate the local effects of vaginal suppository including hyaluronan and synthetic EP4 agonist on the uterine cervix.

The effects of vaginal suppository including hyaluronan on the changes of the cervix were also examined in the unselected pregnant women with unripe cervix (Bishop score less than 3) at 34 weeks gestation just prior to the onset of labor prospectively.

The inhibitory effects of vaginal suppositories including UTI and synthetic EP4 antagonist in cervical ripening were examined in non-pregnant rabbit's model with LPS-induced cervical ripening.

The efficacy of the early treatment with UTI suppository for the maintenance of pregnancy periods and cervical ripening were also evaluated in the pregnant women who were diagnosed as preterm labor with regular uterine contractions and cervical shortening before 25 weeks gestation at our care center retrospectively.

Results

The vaginal suppositories with Hyaluronan and EP4 agonist showed the increased percent tensile strength, enhanced edematous areas and elevated type I activities in cervix in rabbits significantly compared with controls. Hyaluronan suppositories also showed the significant shortening of duration of labor to delivery compared with control.

The vaginal suppositories with UTI and EP4 antagonist revealed the significant inhibitory effects in the LPS-induced cervical ripening model in rabbits.

The duration of maintenance of pregnancy was significantly extended in the patients in preterm labor treated with UTI vaginal suppository and tocolytic agents compared with that in patients treated with tocolytic agents alone before 25 weeks of gestation.

Conclusions

The present study demonstrates the enhancement of cervical ripening by Hyaluronan and EP4 agonist and inhibition of it by UTI and EP4 antagonist in animal models. The successful clinical manipulations of cervical ripening by Hyaluronan and UTI suggest the future treatment of preterm labor by the inhibition of cervical maturation by EP4 antagonist.
