

# 博士論文

論文題目      レスベラトロールによる早産予防とその炎症制御  
メカニズムに関する研究

氏名            古屋 仁美

## 要旨

早産は世界で毎年 1500 万件近く発生しており、全世界的に増加している。早産は新生児の死因の最大原因であり、また多くの後遺症の原因となりうる。自然早産のメカニズムにおいて、炎症性サイトカインの上昇は重要な要因であり、炎症性サイトカインを制御する治療法が期待されている。レスベラトロールは植物由来の生理活性物質であり、抗炎症作用を有することが知られているが、早産に対する生体内での影響はいまだ知られていない。我々は大腸菌由来のポリ多糖体(LPS)を用いた、炎症誘発性のマウス早産モデルにおいて、レスベラトロールの内服が早産率の減少をもたらすことを証明した。早産率(胎嚢数に対する早産した児の割合)は、レスベラトロール 20mg/kg, 40mg/kg 内服群で有意にコントロール群より少なかった(それぞれ 51.3% vs.97.6%、51.7% vs.85.7%,  $p<0.001$ )。妊娠マウスの腹腔内洗浄液、子宮組織を採取し検討したところ、レスベラトロール内服により腹水中の TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 濃度上昇が有意に抑制されること、子宮頸部 TNF- $\alpha$ の mRNA 産生が有意に抑制されることが判明した。レスベラトロールによる早産予防のメカニズムとしてマクロファージに注目し、マウス腹腔内マクロファージを用いた検討を行った。レスベラトロール添加により、マクロファージにおける LPS に反応した TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、COX-2 mRNA

産生は濃度依存的に低下した。ヒト胎盤脱落膜のマクロファージを回収し検討したところ、レスベラトロール添加により LPS に反応した TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$  の mRNA 産生は濃度依存的に低下した。レスベラトロールは妊娠組織局所及び全身の炎症性サイトカインをコントロールする、新たな早産予防の選択肢となり得ることが示唆された。

## 目次

要旨 .....	2
目次 .....	4
序文 .....	5
早産と炎症の関連性 .....	5
レスベラトロール .....	10
研究目的 .....	14
実験方法 .....	15
結果 .....	25
考察 .....	37
謝辞 .....	45
引用文献 .....	46

## 序文

### 早産と炎症の関連性

早産は世界保健機関においては妊娠 37 週未満に分娩することと定義されている[1]。早産の頻度は世界的に発展途上国、先進国いずれも上昇を続けている。2005 年には 1287 万人の報告であったが、2010 年世界で 1490 万人の早産児が出生している[2]。日本の場合には妊娠 22 週以降 37 週未満と定義されている。日本でも早産率は上昇しており、1985 年には 4.17%の早産率が 2007 年には 5.79%まで上昇している[3]。早産は児の未熟性により胎児の生命的、発達的な予後に大きな影響を及ぼす[1,4]。早産は 5 歳未満の小児死亡の直接原因として感染症に次いで 2 番目に多く、14.1%を占める[5]。早産児の生存率は近年改善傾向にあるとはいえ、これらの児は神経発達の障害や呼吸器、消化器の合併症のリスクが高い[6,7]。早産の予防・治療は、現代の周産期医療にとって重要な課題である。

早産の原因は以下の表に示すように多種多様である[3,8]。母体救命のために人為的に早産させる人工早産が約 25%であるものの、それ以外となる自然早産のうち、最も多く見られる原因は細菌感染である[3]。感染性(炎症性)早産の契機の中でもよく知られるものとしては、膣内の病原微生物が上行性に子宮頸管に

及び、子宮内に波及し、絨毛膜羊膜炎を引き起こすメカニズムがある。絨毛膜羊膜炎などにより炎症が惹起されると、Tumor Necrosis Factor(TNF)- $\alpha$ 、Interleukin(IL)-1 $\beta$ 、IL-8[9-13]をはじめとする炎症性サイトカインを産生させ、prostaglandin(PG)[13]、マトリックスメタプロテアーゼ[14]などの物質の産生を高める。PGの産生は子宮収縮や子宮頸管熟化をもたらすことで早産の要因となりえる。また、IL-8の産生は好中球や単球の遊走を促し、この好中球から産生されるエラスターゼが卵膜を脆弱化させ、前期破水の要因となり、早産に繋がること示唆されている[13]。

自然早産：37週以前に陣痛が自然発来し早産に至る。(約75%)

(1) 感染・炎症性要因：

多くは細菌性膣症から感染・炎症が上行性に波及し、絨毛膜羊膜炎となり、破水や陣痛が発来する。その他、歯周病や泌尿生殖器の感染やインフルエンザなどの感染も早産の要因となる。

(2) 頸管因子：頸管無力症により、無症候性に子宮頸管が開大し、早産となる。

(3) 子宮内容積の増大：多胎妊娠や羊水過多。

(4) ストレス因子：やせ、喫煙など。

人工早産：母児救命のため人為的に早産させる。(約25%)

(1) 母体要因：妊娠高血圧症候群、常位胎盤早期剥離、前置胎盤の出血、重篤な内科合併症増悪。

(2) 胎児要因：子宮内胎児発育遅延児の発育停止、胎児機能不全

表1 早産の種類とその要因[3より改変]

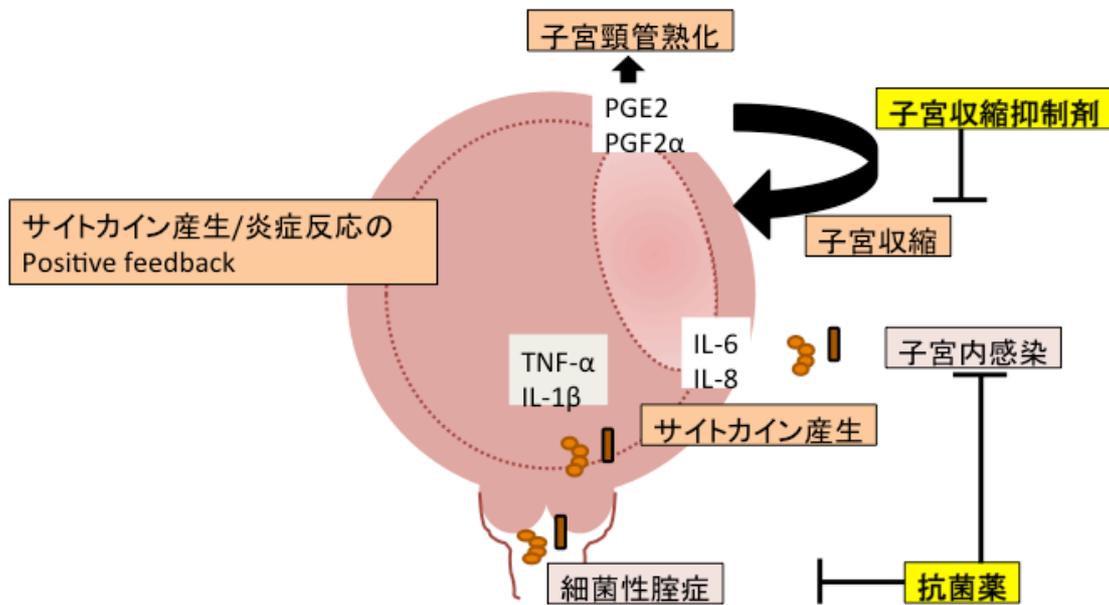


図 1 炎症性早産のメカニズム[15]

炎症性早産のうち最も多いものは細菌性膣炎から上行性に炎症が波及して子宮内感染に及ぶものである。炎症性サイトカインの産生により、PG などの炎症性物質が誘導され、子宮収縮や子宮頸管熟化をもたらす。またサイトカイン産生と炎症反応には positive feedback がかかり、炎症の拡大を生む。抗菌剤や収縮抑制剤は、感染や症状には効果的だが、炎症反応の抑制には直接作用しない。

早産治療薬としては、出生前プロゲステロン投与、子宮収縮抑制を目的としたニフェジピン投与、β作動薬、非ステロイド抗炎症薬、PG 拮抗薬、硫酸マグネシウム製剤などがあるが、上記の機序に一元的に作用する薬剤はまだ認められていない。

出生前プロゲステロン投与は、ギャップ・ジャンクション形成の抑制、オキシトシン拮抗作用、頸管完全性の維持(頸管軟化抑制)、抗炎症作用などの機序により早産予防効果があり[16]、早産既往のある妊婦では出生前プロゲステロン投与により 37 週未満、34 週未満、双方の早産のリスクを減少させたが[17-18]、妊娠予後改善についてはまだ十分に示されていない[17]。

子宮収縮抑制を目的としたニフェジピン投与は、7 日間以内の分娩と 34 週未満の分娩の可能性を減少させ、胎児の予後が改善されるとするが、母体への副作用としては、血圧低下、それに伴う胎児胎盤の血流低下がある[19-20]。

$\beta$ 作動薬は、無作為試験のメタアナリシスでは分娩を 48 時間遅らせることに有効であることを示したが、胎児の予後は改善されなかった。母体の副作用は明らかであり、頻脈、耐糖能障害、横紋筋融解症や顆粒球減少症が一般的に観察されている[21]。2011 年に、FDA は切迫早産の治療としてのテルブタリンの 48 から 72 時間を超える使用と切迫早産予防のためのテルブタリン内服について使用しないように警告した[22]。

非ステロイド抗炎症薬(Non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs)は 37 週以降の分娩可能性と平均分娩週数を、母体の副作用を低く抑えた状態で増加させる傾向にある[23]。潜在的副作用として、新生児に対する動脈管閉鎖がある[24]。

PG拮抗薬は、その他羊水過多が存在するかもしれないことを考慮した場合では、羊水量を減少させることが期待された。但し、NSAIDsと同様、新生児に対する動脈管閉鎖が副作用として存在する[25]。

硫酸マグネシウムの使用はより広く一般的だが [26]、子宮収縮抑制に関する研究では 48 時間の妊娠期間の延長や胎児予後の改善について証明できていない[27,28]。母体の副作用としては、のぼせ、嗜眠、頭痛、筋力低下、複視、口腔乾燥、肺水腫、心停止、新生児への副作用としても活動性低下、筋緊張低下、呼吸抑制、長期使用での電解質異常が観察されている[27-30]。

以上のように、早産治療薬は現在複数存在するものの、分娩週数を正期産まで延長させるという意味での早産予防に対する効果は限定的であり、副作用もあるため、欧米では明らかに児の予後改善の利益が上回る時のみの short-term tocolysis としてしか用いられない[31]。

また、児の予後に対して明確なエビデンスを有するのは肺成熟目的のコルチコステロイド投与、高度な NICU 施設での分娩、新生児感染予防の抗菌薬投与のみであり [32]、根本的な治療となり得ていないのが現状である。

Yamashita は体内に $\omega$ 脂肪酸を多量に含む *Fat-1* マウスにおいて、炎症性早産のモデルによる早産率が低下した事、子宮頸部のマクロファージ浸潤、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現量が低下したことを報告し、さらに $\omega$ 3 の代謝物投与が早産

に予防的効果を認めることを示した[33]。炎症性サイトカイン産生のコントロールにより早産予防を可能とした報告であり、炎症の抑制は早産予防の戦略として重要になると考えられる。

### レスベラトロール

レスベラトロールはブドウ、イタドリなどの植物由来の生理活性物質で、細菌や真菌に対する感染予防の作用を有すると言われている[34,35]。この物質は、元々は「フレンチパラドックス」という、フランス人が高脂肪食摂取にも関わらず比較的虚血性心疾患の発症率が低い現象を説明するポリフェノールの一種として知られていた。酵母などでカロリー制限により発現され、寿命延長効果を有する *sir2* 遺伝子をカロリー制限なしで活性化させることが知られていたが、マウスでも寿命延長効果があると知られてから一気に注目が集まった[36]。その機序としては、耐糖能異常の改善、ミトコンドリア機能改善による運動能上昇などが考えられている[36]。更には抗腫瘍効果も見られており、その機序としては、レスベラトロールが細胞周期を G1 で停止させたり、Akt シグナルや ERK シグナルを低下させたりすることで腫瘍の増殖を抑制することが報告されている[37,38]。その他には、スーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼに作用し、

抗酸化作用を示す報告もあり[39]、近年は抗炎症作用が着目されている[40-43]。

一般的に、レスベラトロールはホスホジエステラーゼ(PDE)4 の阻害を通じ、sir2 のヒトホモログである sirtuin 1(SIRT1)遺伝子の活性化を通じて作用を発揮すると言われている[35]。SIRT1 は NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、Nuclear Factor(NF)-κB 系を阻害する事により、その下流で TNF-α、IL-1β等の炎症性サイトカイン産生を阻害する[41]。レスベラトロールの抗炎症作用は慢性炎症性疾患のモデルで報告される事が多く、炎症性腸疾患、急性肺障害、歯周病[44-46]などにおいて in vivo モデルでの効果が示されている。産婦人科領域では、Taguchi らによると、レスベラトロールは子宮内膜症患者の子宮内膜間質細胞における炎症反応を抑制することが示されている[47]。

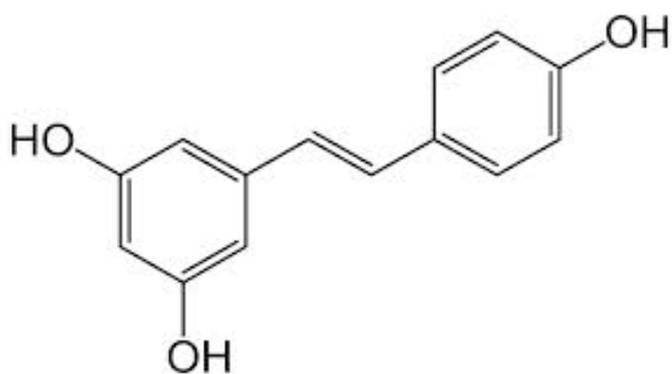


図 2 レスベラトロールの構造式

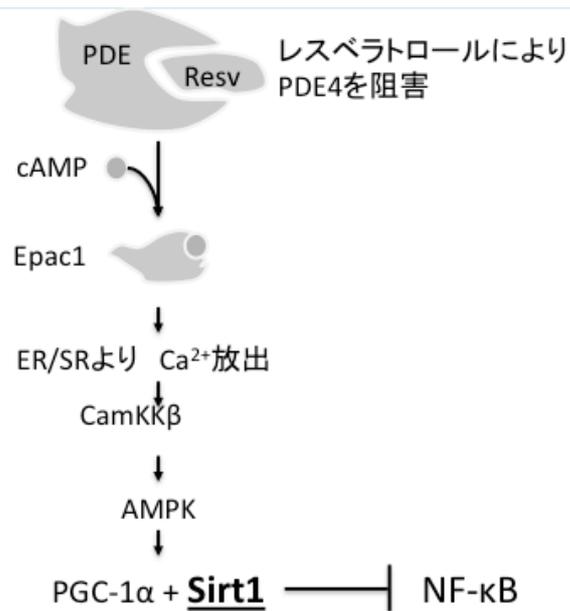


図 3 レスベラトロールの抗炎症作用の機序[41 より改変]

レスベラトロールは細胞内のホスホジエステラーゼ(PDE)4 に結合しこれを阻害する。その結果、Ca イオン依存性に Camkkβ、AMP リン酸化酵素(AMPK)を通じて Sirt1 遺伝子が活性化し、sirt1 は NF-κB 系の活性化を阻害する結果炎症反応が抑制される。

妊娠の成立、維持とレスベラトロールとの関連については、レスベラトロールが E-cadherin 発現の制御を通じて、内膜の妊孕性に影響する事が報告されている[48]。また、非妊娠ラットの子宮筋にレスベラトロールを添加すると、細胞内 Ca チャネルを制御して収縮を抑制するという報告があり[49]、早産における子宮収縮も抑える事が期待される。さらに胎盤、卵膜における SIRT1 の発現は

正期産の分娩前後で減少することが知られており[50]、trophoblast 上での SIRT1 遺伝子発現も分娩前後で減少する事から[51]、SIRT1 遺伝子を活性化するレスベラトロールが分娩を抑制する可能性はあると考えられる。しかし生体で、レスベラトロールが早産を予防する効果を立証した研究は、我々の知る限り未だ見られていない。

## 研究目的

前述のように、早産のメカニズムにおいて、炎症性サイトカインのコントロールは重要な要因であり、早産予防における大きな課題である。一方レスベラトロールは SIRT1 遺伝子発現をコントロールすることで抗炎症効果を発揮することが多数の炎症性の疾患モデルで認められている。レスベラトロールと早産の関連については、*in vitro* 研究で報告があるものの、実際に早産予防への効果があることを証明した研究は未だ見られない。

私はレスベラトロールがその抗炎症作用により、予防効果を発揮するのではないかという仮説をたて、その仮説を実証するため、

1. レスベラトロールが早産予防に効果を発揮するかどうかを、炎症誘導性のマウス早産モデルを用いて検討する。
2. レスベラトロールによる早産予防機序を検討する。

以上 2 点を目的として、研究を行った。

## 実験方法

### 実験動物

動物の管理は、東京大学の定める施設管理基準を遵守した。非妊娠マウスは、8-10 週齢 C57BL/6J マウス(日本クレア)を購入した。妊娠マウスは、妊娠 7-10 日目の C57BL/6J(日本クレア)マウスを購入した。連日体重を測定し、体重増加のないものは非妊娠マウスとして除外した。マウスの食餌には、CLEA Rodent Diet CA-1(日本クレア)を使用した。また、明・暗時間はそれぞれ 12/12 時間の状態を設定した。実験にあたり、条件統一性を保つために、研究室にて交配させた妊娠マウスは使わず、上記の市販マウスを使用した。

### マウスへのレスベラトロール投与

Taguchi らの方法により [47]、レスベラトロール (purity > 99%, Sigma Chemical) は溶媒であるエタノールに 50mg/mL の濃度で溶解した。

妊娠 12 日目から 14 日目にかけて、レスベラトロール内服群のマウスには 1 日 1 回、体重あたり 20mg または 40mg/kg に調整したレスベラトロールをコーンオイルに懸濁して 200 $\mu$ L となるように調整し、マウス用経口チューブを用いて内服させた。妊娠 15 日目には、LPS 投与直前と投与 6 時間後の計 2 回、同

量を内服させた。コントロール群に対しては、レスベラトロール群と同量の溶媒エタノールをコーンオイルに懸濁し 200 $\mu$ L になるよう調整し、同様に内服させた。

### マウスの早産モデル

これまでマウスを用いた早産モデルは数多く報告されており、炎症性早産のモデルとしては、妊娠 15 日目にリポ多糖体 (LPS) を投与する方法が最も普及している。投与経路については、①腹腔内へ注射[52]、②小開腹後子宮体部に直接注射[53]、③経膈的に子宮頸部へ注射する方法[54]が報告されており、いずれも安定した高い早産率を示す。注射部位が固定され手技が安定すること、細菌性膣症から上行性感染し、子宮内に炎症が波及するという絨毛膜羊膜炎の病態を最も反映していることを考慮し、経膈的に子宮頸部へ LPS を局注する方法を採用した。

Yamashita らが報告した方法により[33]、あらかじめ長さを調整したガイド用の先丸チューブをマウス膣内に挿入し、その先を子宮頸部へ接触させた上で、23G カテラン針をガイド下に挿入し、生理食塩水 0.2 ml に溶解した大腸菌由来の LPS 10 $\mu$ g(Sigma Chemical)を、1 ml シリンジにて子宮頸部へ注射した[33]。針先が子宮頸部に刺入される(2mm 程度)長さ以上は進めることができないよう

にチューブの長さを調整した。妊娠 15 日目のマウスに、LPS をエーテル麻酔下に子宮頸部へ注射し、早産を誘発した。

### マウスの早産判定の方法と、検体の回収

妊娠 15 日目に LPS 局注されたマウスは個別のケージに分離し、十分な餌と水を補充し 48 時間後まで観察した。胎仔を 1 匹でも娩出した場合を早産と定義した。早産率の判定は、48 時間後にマウスを解剖し、胎囊数に対する早産した児の数の割合で定義した。

次に妊娠 15 日目、LPS 投与 0,4,12,24 時間後のマウス(各群 3 匹ずつ)をエーテル麻酔下で安楽死させ、以下の方法で腹腔内洗浄液と子宮頸部組織を回収した。腹腔内洗浄液については、マウス腹腔内に 5.0mL の生理食塩水を注入して腹腔内を洗浄し回収した。1500rpm で 4 分間遠心分離し、その上清を-80°C保存した。同時にマウスを解剖して子宮頸部組織を回収し、RNA later(Life technologies, Japan)に浸透させ、4°Cに一晩静置後、-80°Cにて保存した。

### 定量的 **real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction** (以下 **RT-qPCR**) [33,47]

マウス子宮頸部から全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。

分光光度計を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定し、抽出された RNA を定量した。RNA の持ち込み量は、1 g 以下とし、逆転写反応を行い(TOYOBO, Osaka, Japan)、相補的 DNA(以下 cDNA)を生成した。Light Cycler R 480(Roche Applied Science, Tokyo, Japan)、Universal Probe Master (Roche Applied Science)、及び下記のプライマー(Sigma-Aldrich Japan)とプローブ(Roche Applied Science)を用いて cDNA を 45 サイクル増幅した。

Mouse  $\beta$ -actin, probe88,

5'- ATTGAAACATCAGCCAAGACC-3',

5'-CCGAATCTCACGGACTAGTGT-3',

Mouse TNF- $\alpha$ , probe 49,

5'- GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'

5'- TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3'

Mouse IL-1 $\beta$ , probe 26,

5'- AGTTGACGGACCCCAAAG-3'

5'- TTTGAAGCTGGATGCTCTCAT-3'

Mouse IL-6, probe6,

5'- GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3',

5'- CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2 の発現レベルを $\beta$ -actin を内部基準として $\Delta$ CT法により解析した。

### 腹腔洗浄液中のサイトカインの測定

凍結保存していたマウス腹腔内洗浄液の上清を氷上で融解し、Quantikine ELISA kit(R&D Systems 社)を用いて TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ および IL-6 のサイトカインを測定した。LPS 投与 0,4,12,24 時間後の 4 群と、レスベラトロール内服群、コントロール群の間で比較を行った。

### 腹腔内マクロファージの分離回収、培養

非妊娠マウスの腹腔内を 7.0 ml の PBS で洗浄後回収し、70  $\mu$ m セルストレーナー(Becton Dickinson and Co)を通した後、1500 rpm、10 分間、遠心分離し、腹腔内細胞を沈殿させた。磁器細胞分離キット(MACS、Miltenyi Biotec)を用いて、マクロファージ(CD11b 陽性細胞)を分離回収した。回収したマクロファージを  $0.5 \times 10^6$  /ml の細胞密度で、10 % FBS・抗生剤(ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml, アンフォテリシン B 0.25 g/ml)を含んだ RPMI に懸濁し、24 穴プレート(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)上に撒いた後、5% CO<sub>2</sub>・37 °C の状態で一晩培養を行った。

### マウス培養マクロファージの刺激

上記の方法で回収したマウスマクロファージをレスベラトロール(0, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M)(Sigma)、10% FBS、抗生剤入り RPMI で 12 時間前処置を行い、LPS 100ng/ml で刺激した。刺激 4 時間後のマクロファージを回収し、全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。前述の RT-qPCR 法を用いて、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX-2 の発現レベルを測定した。COX-2 の発現レベルの測定には、

Mouse COX-2, primer (Sigma Aldrich Japan)

5'- GATGCTCTTCCGAGCTGTG-3',

5'- GGATTGGAACAGCAAGGATTT-3'

probe 45 (Roche Applied Science)

を使用した。

### ヒト胎盤脱落膜のサンプル採取

合併症のない選択的帝王切開時患者の胎盤よりサンプルを得た。検体採取に関して東京大学倫理委員会の承認に基づき、手術前に患者より書面によりインフォームド・コンセントを得た。無菌下に採取した胎盤の一部及び卵膜を、研究に使用した。

## ヒト胎盤脱落膜マクロファージの回収・培養

ヒト胎盤及び卵膜より、鑷子にて脱落膜を羊膜、絨毛膜から分離した。脱落膜をメスにて細切し、1mg/ml collagenase と 300IU/L DNase を添加し、37°C、20 分間反応させた。遊離細胞を 70 µm セルストレーナー(Becton Dickinson and Co)にて濾過し、1500 rpm、10 分間、遠心分離を行い、上清を破棄して、沈殿したペレットを回収した。Ficoll の上に PBS に溶解した 35% Percoll を重層させた上に、ペレットを PBS に懸濁したものを重層させ、400×G、40 分間遠心分離し、中間層と最下層の間に浮遊する decidual monolayer cell をスポイトにて回収した。decidual monolayer cell の中から、磁器細胞分離キット(MACS、Miltenyi Biotec)を用いて、ヒトマクロファージ(CD14 陽性細胞)を分離回収した。回収したヒト胎盤脱落膜マクロファージは、マウスマクロファージと同様に、10 % FBS・抗生剤(ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml, アンフォテリシン B 0.25 g/ml)を含んだ RPMI に懸濁し、24 穴プレート(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)上に撒いた後、5% CO<sub>2</sub>・37 °C の状態で一晩培養を行った。

### ヒト胎盤脱落膜マクロファージの刺激

上記の方法で回収したマウスマクロファージをレスベラトロール(0, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M)(Sigma)、10% FBS、抗生剤入り RPMI で 12 時間前処置を行い、LPS 100ng/ml にて刺激した。4 時間後にマクロファージを回収し、全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。

### ヒト胎盤組織の RT-qPCR[33,47]

全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。分光光度計を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定し、抽出された RNA を定量した。RNA の持ち込み量は、1 g 以下とし、逆転写反応を行い(TOYOBO, Osaka, Japan)、相補的 DNA(以下 cDNA)を生成した。Light Cycler R 480(Roche Applied Science, Tokyo, Japan)、Universal SYBR Master (Roche Applied Science)、及び下記のプライマー(Sigma-Aldrich Japan)を用いて cDNA を増幅した。

TNF- $\alpha$  5'-TGCCTGCTGCACTTTGGAGTGAT -3',

5'-TGGTTATCTCTCAGCTCCACGCCAT -3'

IL-1 $\beta$  5'-CAGCCAATCTTCATTGCTCA -3',

5'-GCATCTTCCTCAGCTTGTCC -3'

IL-6 5'-GAACTCCTTCTCCACAAGCG -3',

5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT -3'

GAPDH 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3',

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

TNF- $\alpha$ の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 58°C, 9 秒、extension 72 °C, 10 秒とし、40 サイクルとした。IL-1 $\beta$ の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 59°C, 11 秒、extension 72 °C, 11 秒とし、40 サイクルとした。IL-6 の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 59 °C, 10 秒、extension 72 °C, 12 秒とし、40 サイクルとした。GAPDH の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 64 °C, 8 秒、extension 72 °C, 10 秒とし、35 サイクルとした。

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA の発現レベルを、GADPH を内部基準として $\Delta$ CT 法により解析した。

## 統計解析

早産頻度の比較は、Fisher の直接確率検定および Cochran-Armitage の傾向検定を用いて解析した。レスベラトロール内服によるマウス検体サイトカイン量、mRNA の発現量比較は、Student's *t* 検定を用いて解析した。マクロファージの実験は、レスベラトロール添加量との関連を一元配置分散分析および

Bonferroni 法による多重比較を用いて解析した。データは平均±標準誤差で表現した。P<0.05 を有意差ありと判定した。

## 結果

### レスベラトロールは LPS によるマウス早産を予防する

LPS によりマウス子宮内の局所炎症を誘発するマウス早産モデルは、当研究室で以前に報告されたものを用いた[33]。レスベラトロール内服そのものが早産率に影響しない事を確認するため、LPS を投与しない場合のレスベラトロール内服群とコントロール群で早産率を比較したが、両者に有意な差を認めなかった。妊娠 15 日目のマウスに 10 $\mu$ g の LPS を経膈的に局所注射した結果、早産を起こした母体はいずれも 48 時間以内に早産に至った。早産を起こした母体の割合は、20mg/kg, 40mg/kg 内服群とも対応するコントロール群に比べ有意な低下は認めなかったが、内服量に応じて、低下する傾向を示した(Cochran-Armitage の傾向検定、 $p < 0.01$ 、図 2)。早産率(胎囊数に対する早産した児の割合)は、レスベラトロール 20mg/kg, 40mg/kg 内服群で有意にコントロール群より少なかった(それぞれ 51.3% vs.97.6%、51.7% vs.85.7%、Fisher の正確確率検定、 $p < 0.001$ 、表 3)。

40mg/kg/回までの用量では母体合併症は認められなかった。早産せず出生した仔体は、レスベラトロール群と比して明らかな体格の違いを認められず、1 週間以内の児死亡も認められなかった。

レスベラトロール 20mg/kg 内服群はコントロール群に比べ LPS によるマウス早産率が減少することが示された。

**表 2 早産を起こした妊娠マウスの割合の比較**

レスベラトロール投与量*	コントロール**	レスベラトロール内服群	p 値
20 mg / kg(n=5)	5/5 (100 %)	2/5 (40 %)	p=0.08
40 mg / kg(n=7)	6/7 (86%)	4/7 (57%)	p=0.13

\*体重1kgあたりのレスベラトロール投与量

\*\*コントロール群：レスベラトロール内服群と同量のエタノールを内服

対応するコントロール群とレスベラトロール群の間には早産の割合に有意差は認められなかった(Fisherの正確確率検定,それぞれP=0.08,0.13)。コントロール群と比較し、レスベラトロール内服群で早産母体の数が減少する傾向が認められた。

(Cochran-Armitageの傾向検定、 $p < 0.01$ )

表 3 マウス早産率の比較

レスベラトロール投 与量*	コントロール**	レスベラトロー ル内服群	p 値
20 mg / kg(n=5)	41/42 (97.6%)	20/39 (51.3%)	P<0.00001
40 mg / kg(n=7)	42/49 (85.7%)	29/55(52.7%)	p=0.00016

\*体重1kgあたりのレスベラトロール投与量

\*\*コントロール群：レスベラトロール内服群と同量のエタノールを内服

早産率は早産した胎囊の、全体の胎囊に対する割合で定義した。レスベラトロール内服群ではコントロール群に比べ、有意に早産率が低値となった。(Fisher の正確確率検定、 $p<0.001$ )

### LPS による腹腔内洗浄液中炎症性サイトカインの産生は、レスベラトロール内服によって抑制される

次に、LPS を子宮頸部に局所注射した後、炎症性サイトカインの経時的変化を調べた(図 4)。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 濃度は、いずれも LPS 投与後上昇し、LPS 投与後 4 時間でピークに達した。特に IL-1 $\beta$ は LPS 投与前の 480 倍まで上昇した。サイトカインの濃度は 24 時間以内に LPS 投与前の濃度まで減少した。よって、LPS の子宮頸部局所注射は 4 時間以内の急速なサイトカイン誘導を引

き起こす事が分かった。我々は絨毛膜羊膜炎などの子宮内炎症の際も、感染後数時間以内でのサイトカイン変化により早産が誘発されると考え、以降は LPS 投与 4 時間後の局所的な免疫反応を調べる事とした。

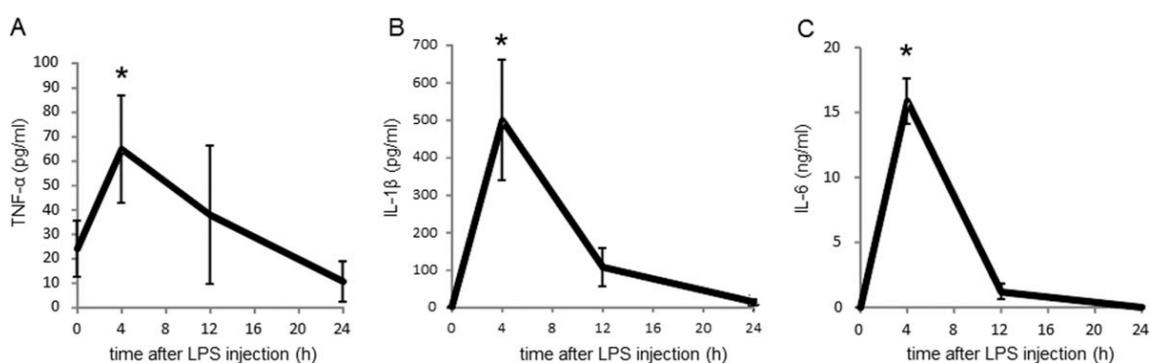


図 4 LPS 経膈投与後の腹腔内洗浄液の LPS 投与後の炎症性サイトカイン濃度の変化

妊娠 15 日目のマウスにおいて、LPS 投与後 0,4,12,24 時間後に腹腔内洗浄液を採取した。(n=3)遠心分離にて上清を回収し TNF-α(A)、IL-1β(B)、IL-6(C)の濃度を ELISA 法にて測定した。いずれも LPS 投与 4 時間後に有意な濃度上昇を認めた(Student's *t* 検定、 $p < 0.05$ )エラーバーは標準誤差を示す。

LPS に対する母体の反応をレスベラトロール 20mg/kg 内服群とコントロール群で比較するため、腹腔内洗浄液の免疫反応を調べた。レスベラトロール内服群ではコントロール群に比べて腹腔内洗浄液中の TNF-α、IL-1β濃度が統計学的

有意に低かった。TNF- $\alpha$ 濃度はレスベラトロール内服群でコントロール群の約1/3(16.7 対 53.9 pg/mL、図 5A)、IL-1 $\beta$ 濃度はレスベラトロール内服群でコントロール群の約 1/4 であった(88.4 対 403 pg/mL、図 5B)。一方、IL-6 濃度はレスベラトロール内服群とコントロール群の間に有意差を認めなかった(図 5C)。

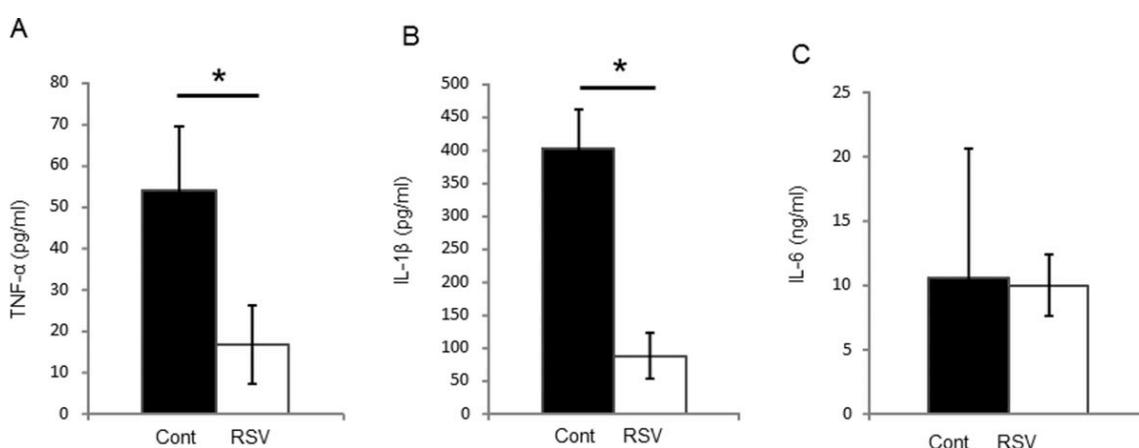


図 5 レスベラトロール投与群とコントロール群における、LPS 投与後炎症性サイトカイン濃度の比較

レスベラトロール投与群(RSV)あるいはコントロール群(Cont)に分けた妊娠 15 日目マウス(n=6)に、LPS を経膈的に投与し、4 時間後に腹腔内洗浄液を回収した。腹腔内洗浄液は遠心分離し上清を回収し、TNF- $\alpha$ (A)、IL-1 $\beta$ (B)、IL-6(C)の濃度を ELISA 法にて測定した。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 濃度はレスベラトロール内服群で有意に低値であった(Student's *t* 検定、 $p < 0.05$ )エラーバーは標準誤差を示す。Cont:コントロール、RSV:レスベラトロール、\*: $p < 0.05$ 。

## LPS による子宮頸部の炎症性サイトカイン誘導は、レスベラトロール内服によって抑制される

早産のメカニズムとして最も多いものは、細菌感染によって子宮局所の炎症性サイトカインが産生され、それらのサイトカインを介してプロスタグランジンが上昇する事により子宮収縮や子宮頸部熟化を来すものである[3]。従って子宮頸部は病原菌の初期の感染部位の一つであり、炎症性サイトカイン産生が引き起こされる場となっている。そこで、LPS を経膣投与したマウスの子宮膣部組織を回収し、レスベラトロール 20mg/kg 内服群とコントロール群において炎症性サイトカインの mRNA レベルを比較した。LPS 局所注射により、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA は上昇し、LPS 投与 4 時間後にピークを迎えた。4 時間後における TNF- $\alpha$  の mRNA レベルは有意に減少した(0.54 $\pm$ 0.09 対 2.45 $\pm$ 0.93, 図 6A)。IL-1 $\beta$  の mRNA レベルは減少する傾向を示したが、有意ではなかった( $p=0.43$ )。IL-6 の mRNA レベルはレスベラトロール内服群とコントロール群で差を認めなかった(図 6C)。

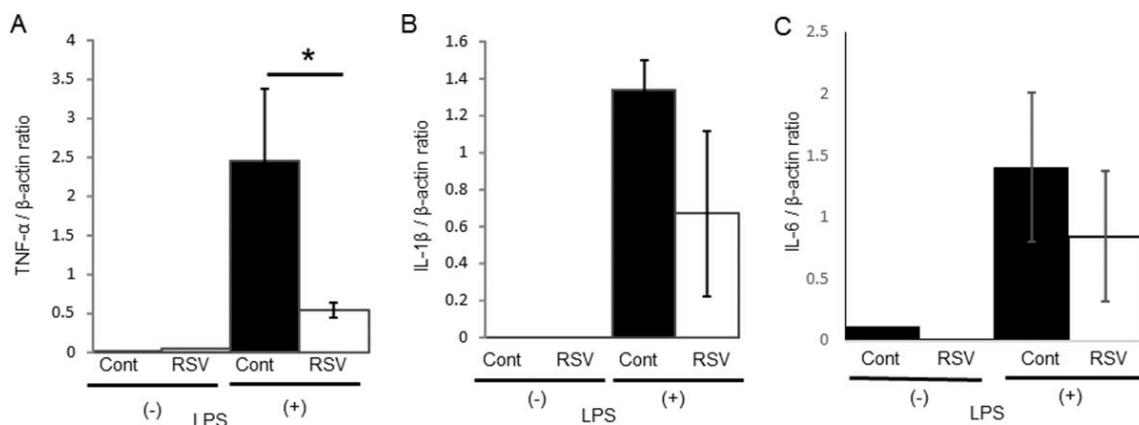


図6 子宮頸部における、LPS投与後の炎症性サイトカインのmRNA発現量の比較

レスベラトロール投与群(RSV)、コントロール群(Cont)に分けた妊娠15日目マウスに対し(n=7)、生理食塩水(LPS-)またはLPS(LPS+)を経膈的に投与した。LPS投与後4時間で子宮頸部を採取し、total RNAを回収、TNF-α(A)、IL-1β(B)、IL-6(C)のmRNA発現量を、RT-qPCR法にて測定した。TNF-αの発現量はレスベラトロール群で有意に低値であった(Student's *t*検定、 $p < 0.05$ )エラーバーは標準誤差を示す。Cont:コントロール、RSV:レスベラトロール、\*: $p < 0.05$ 。

レスベラトロールは、腹腔内マクロファージにおいて、LPSによる炎症性サイトカイン誘導とCOX-2産生の反応を低下させる

cyclooxygenase 2(COX-2)は早産メカニズムに関するPGE2やPGF2αを含むPG生成に関わっていることが良く知られている。TNF-α、IL-1βはCOX-2

を産生する主要なサイトカインである。COX-2 はマクロファージや好中球といった炎症細胞において、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などの刺激によって過剰発現する。マクロファージはTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を産生する重要な細胞であることから[55]、早産の炎症メカニズムにマクロファージが関連しているという仮説をたてた。C57BL6 マウスより腹腔内マクロファージを回収し、レスベラトロール(0, 50, 100 $\mu$ mol/L)を添加した培地内で培養した上で、LPS による刺激を行った。LPS 刺激により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ は有意に上昇し(図 7A、7B)、妊娠マウスへの LPS 投与における腹腔内洗浄液(図 4)や子宮頸部(図 6)と同様の変化を見せた。LPS 刺激後のマクロファージにおける TNF- $\alpha$ (図 7A)、IL-1 $\beta$ (図 7B)mRNA レベルは、レスベラトロール投与群でコントロール群に比べ濃度依存性に低かった。

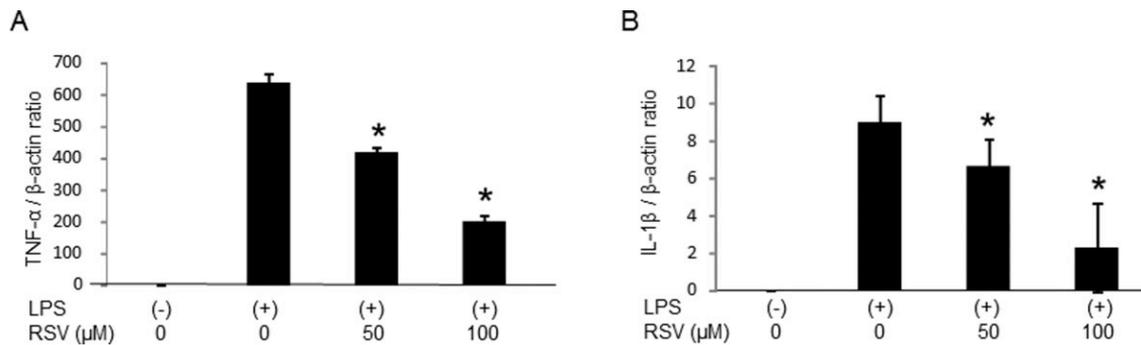


図7 レスベラトロールによるLPS刺激したマクロファージによる炎症性サイトカイン発現量への影響

レスベラトロールを添加した培地にてマウス腹腔内マクロファージを 12 時間培養し (0,50,100μmol/L) (各群 n=3) 、LPS にて 4 時間刺激を行った。マクロファージの total RNA を回収し、TNF-α(A)、IL-1β(B)の mRNA 量を RT-qPCR 法にて測定した。エラーバーは標準誤差を示す。TNF-α、IL-1βの発現はレスベラトロール濃度依存性に低値を示した(一元配置分散分析、それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。RSV:レスベラトロール、\* : 多重比較にて LPS(+)RSV(-)と比して  $p < 0.05$

COX-2 mRNA 発現量も測定したところ、COX-2 の mRNA レベルも LPS 刺激によって増加したが、レスベラトロール投与によって濃度依存的な低下を示した。

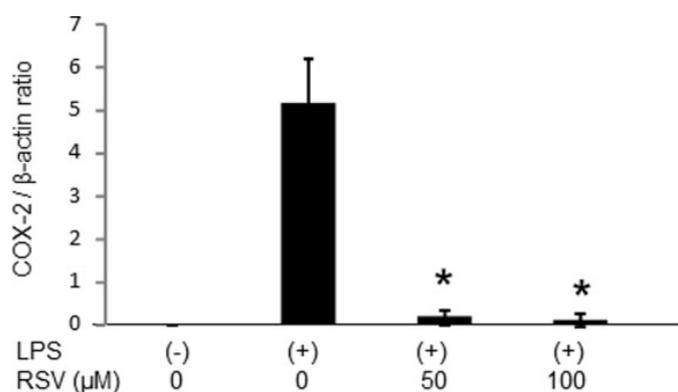


図 8 レスベラトロールによる LPS 刺激したマクロファージによる COX-2 発現への影響

レスベラトロールを添加した培地にてマウス腹腔内マクロファージを 12 時間培養し (0,50,100μmol/L) (各群 n=3) 、LPS にて 4 時間刺激を行った。マクロファージの total RNA を回収し、COX-2 の mRNA 量を RT-qPCR 法にて測定した。レスベラトロール濃度依存性に発現は低値となった(一元配置分散分析、 $p<0.01$ )エラーバーは標準誤差を示す。RSV:レスベラトロール、\*: 多重比較にてレスベラトロール 0μmol/L と比較して  $p<0.05$

ヒト胎盤脱落膜マクロファージにおいて、レスベラトロール投与は LPS に対する炎症性サイトカイン誘導の反応を低下させる

脱落膜マクロファージは妊娠の成立において胎児母体間の免疫反応を調整する重要な役割を担っていることが知られている[56]。レスベラトロールが脱落膜マクロファージに及ぼす影響について調べた。十分な検体量を確保するため、

研究の同意を得てヒト脱落膜を回収し、マクロファージを抽出した。マクロファージはレスベラトロール(0, 50, 100 $\mu$ mol/L)を添加した培地内で培養した上で、LPS による刺激を行った。LPS 刺激によって TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の mRNA レベルは著明に上昇し、レスベラトロールの投与群においてコントロール群に比べ濃度依存性に低値であった。(図 9)。

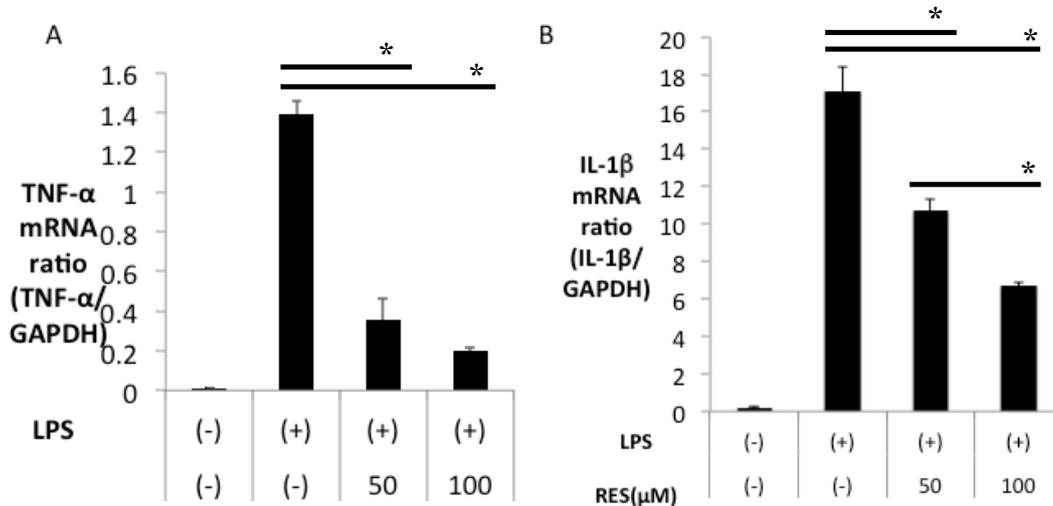


図 9 レスベラトロールによる、ヒト脱落膜マクロファージの LPS 刺激に対する炎症反応への影響

レスベラトロール(0,50,100μmol/L)を添加した培地でヒト脱落膜マクロファージを 12 時間培養した後(各群 n=3)、LPS にて 4 時間刺激を行った。Total RNA を回収し、TNF-α(A)、IL-1β(B)の mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて測定した。TNF-α、IL-1βの発現はレスベラトロール濃度依存性に低値を示した(一元配置分散分析、 $p<0.01$ )、RSV: レスベラトロール、\* : 多重比較にて  $p<0.05$

## 考察

本研究により、レスベラトロール内服により、LPS を用いたマウス炎症性早産モデルにおいて、早産予防の効果が認められた。

マウス早産モデルは Yamashita の方法を用い[33]、コントロールマウスでも、約 98%の高い早産率を示した。レスベラトロール内服の期間は、他の疾患モデルにおいては、数週間から数ヶ月の内服が一般的である。本研究では排卵、受精、着床への影響を避けるために、マウスの妊娠 12 日目からの投与を選択した。

レスベラトロールは非常に代謝が早いことが知られており、レスベラトロールの抗腫瘍効果を検証した研究においては内服 10 分後には血中でピークに達するとの既報がある[57]。当研究室における  $\omega 3$  不飽和脂肪酸代謝産物レゾルビン E3 を用いた早産予防の研究の中[33]では、LPS 投与前後にレゾルビン E3 を投与したことから、本研究でも LPS 投与後にも内服を行った。レスベラトロールの投与方法としては、当研究室で用いられた方法で試みており、投与量として体重あたり 20mg/kg、40mg/kg での検証を行ったが、それ以上の投与は溶媒として使用したエタノールの毒性のため不可能であった。そのため以降の実験はエタノールの毒性を勘案し、20mg/kg/日で検証を行った。前述の研究では[57]、240mg/kg の量を単回で内服したところ最高血中濃度は 32 $\mu$ mol/L に達したとい

う。血中濃度が内服量に比例すると仮定すれば、本研究においては(体内のレスベラトロール濃度は計測できなかったが)40mg/kg 内服の場合で血中濃度は5 $\mu$ mol/L 程度と推測される。後述の *in vitro* 研究で使用したレスベラトロール濃度より、*in vivo* におけるレスベラトロール濃度は低値だった可能性があるが、これはマクロファージに加え、生体内では他の免疫系細胞が協調した働きをすることによるものと考えている。

今後至適投与量、投与期間を検討していくにあたって、レスベラトロールをコーンオイルに懸濁して内服させることにより、エタノールの毒性に制限されることなく、より高用量の内服が可能であると考えられる。より短期間での投与や、炎症発生後の治療効果として LPS 投与後にレスベラトロールを内服した場合の効果を検証することも可能だと考えられる。

マウスの腹腔洗浄液、子宮組織の検討により、本研究の測定結果においては、LPS 投与後の炎症性サイトカインの反応は 4 時間後をピークにしている事が判明した。実際の早産は 12~48 時間後に発生していたが、この時間の差は、炎症性サイトカインの上昇に COX-2 の産生が加わり、プロスタグランジン産生やマトリックスメタロプロテアーゼ産生が増加した結果として、子宮収縮や子宮頸管熟化が起こり最終的に早産に至るためと考えられる。従ってこの一時的な炎症性サイトカイン産生を抑制することが早産予防において不可欠であると考え

られた。そのため、以降は LPS 投与 4 時間後における炎症反応の効果を比較する事とした。

レスベラトロール内服は LPS に誘導される腹腔洗浄液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 濃度上昇を有意に抑制することが示された。また子宮頸部における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現を有意に抑制することが示された。レスベラトロールの抗炎症作用が今回のモデルにおいて早産率低下に貢献したことが示された。

LPS によって刺激を受けて免疫細胞で産生されるサイトカインには TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の他 IL-8、IL-10 family、IL-12 family、IL-15、TGF- $\beta$ などがあるが[58]、特に IL-8 は早産との関連性が指摘されている。レスベラトロール内服により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ に変化は見られたものの、IL-6 についてはコントロール群と差が認められなかった。この原因として、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ は主にマクロファージなどの免疫細胞で産生されるが、IL-6 は繊維芽細胞や脱落膜の間質細胞、脂肪細胞、子宮内膜などの様々な組織で産生することから[59-62]、LPS 刺激の他、他の炎症性サイトカインの影響をうけて変化するため[63]、LPS 投与後明らかな変化を認めなかったと考える。

IL-8 は早産メカニズムにおいて重要であると考えられているが、今回の研究では検討を行わなかった。IL-8 はマウスに存在しないためマウスモデルでの検証が難しい点、LPS のリガンドである toll-like-receptor 4 の刺激により反応す

る可能性が高いと考えたことから今回は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 について検討を行った。

レスベラトロールが NF- $\kappa$ B 活性を抑制することは様々な疾患モデルにおいて報告されている[64-66]。NF- $\kappa$ B 活性は古典的な免疫細胞のみならず子宮内膜、脱落膜組織、羊膜といった妊娠組織でも認められている[67]。NF- $\kappa$ B は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 といった炎症性サイトカインの発現を促進するが、これらのサイトカインは分娩の際に中心的な役割をとることが知られている[64-66]。逆に NF- $\kappa$ B は、LPS や TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  にとって活性化されるため、LPS 投与後の妊娠組織では炎症性サイトカインと NF- $\kappa$ B による positive feedback がかかっている可能性がある。レスベラトロールはこのモデルにおいてそのフィードバックを阻害している可能性がある。

レスベラトロールの内服により LPS 反応性の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  に変化が見られたところから、本研究ではマクロファージに注目した。早産においては好中球の妊娠組織への流入が知られており LPS により誘導する早産モデルでも同様の現象が報告されている[13]。しかし、LPS による早産モデルで好中球を抗体により枯渇させても早産への影響が無かったとする報告[68]があり、早産に必ずしも必須で無い事が示されている。

マウス腹腔内マクロファージの *in vitro* の実験において、レスベラトロール添

加により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 産生の抑制が示された。これによりレスベラトロールがマクロファージに作用し炎症性サイトカイン抑制を起こしている可能性が示唆された。

COX-2は炎症性刺激によって誘導される酵素であり[69]、羊水、脱落膜、子宮内膜では産生亢進している事が知られている[70]。COX2は子宮収縮や子宮経管熟化を引き起こすPGE2、PGF2 $\alpha$ を誘導するが[71]、分娩時には妊娠組織でCOX-1発現は亢進せずCOX-2の発現のみが亢進することが知られており[72]COX2の産生亢進によるPG誘導が、マウスだけでなくヒトでも早産に関連すると考えられている。過去にもレスベラトロールが妊娠組織におけるCOX-2発現を抑制しているという報告はあったが[34]、マクロファージに着目してはいなかった。今回マウス腹腔内マクロファージを用いた実験で、LPSによるCOX-2 mRNA産生の抑制が示され、マクロファージにおけるCOX-2 mRNAの抑制によるプロスタグランジン誘導の抑制というメカニズムの可能性が示唆された。

レスベラトロールの作用する点はマクロファージのみではなく、他の免疫細胞や妊娠組織の細胞における反応の可能性もある。

マクロファージは生体内でその局在により性質を変化させることが知られている。特に脱落膜マクロファージは、妊娠初期に抗原提示細胞として働き、母体胎児接触面において恒常性維持と免疫寛容の機能を担っているとされる[57]。

そのため妊娠組織の中で脱落膜マクロファージに着目し、レスベラトロール添加による影響を検討した。十分な細胞量を確保するため、ヒト胎盤から抽出した脱落膜マクロファージを使用した。その結果、脱落膜マクロファージにおいてもレスベラトロールは炎症性サイトカインの発現を抑制することが示された。

レスベラトロールは卵母細胞の機能を高めることが知られている[73]。早産予防効果には抗炎症効果の他、卵巣機能に影響している可能性も否定できない。炎症反応とともに、LPS投与後の卵巣機能についても病理学的、内分泌学的に検証していく必要があると考えられる。

近年ではレスベラトロール代謝物であるresveratril-3-O-sulfateなどの生理活性も報告されてきている[74]。前述の通り、レスベラトロールは非常に早く代謝されるにも関わらず、数時間後の炎症反応に影響する原因として、代謝産物自体に生理活性がある可能性も考えられる。レスベラトロールの代謝産物の生理活性について検討する事で、新たな創薬の契機となる可能性もあると考えられる。

レスベラトロールの妊婦における安全性については今後の課題である。ヒト以外の霊長類を用いた全妊娠期間中レスベラトロール投与の研究において、母体の過体重抑制、子宮血流増加、胎盤炎症と肝臓の脂肪減少などとともに、児の膵臓の腫大という予期しない合併症を認めたと報告されている[75]。今回の研

究では体表面積あたりの投与量、投与期間ともに障害が出た報告よりは少なかった。早産とならなかった児については1週間程度経過観察を行ったが体格の違いや早期の死亡はなく、明らかな児への影響は認めなかったが、慎重に投与量は調整すべきで有ると考える。

本研究では、レスベラトロール内服が炎症性早産のマウスモデルにおいて早産予防作用を発揮することを示した。妊娠マウスにおいて、レスベラトロール内服が組織中の炎症性サイトカイン産生を抑制することを示し、レスベラトロールの抗炎症作用が早産予防に寄与していることが示唆された。さらに子宮脱落膜や腹腔内マクロファージにおいて、レスベラトロールの添加は炎症反応の誘導を抑制することが示され、早産におけるマクロファージの関与が示唆された。またマクロファージにおけるCOX-2誘導が抑制されることを示し、抗炎症作用に加えCOX-2誘導抑制によるPG産生抑制によっても、早産予防に寄与している可能性が示唆された。

本研究の限界として、サンプル数が少なかった事、レスベラトロールを40mg/kgに増量しても早産率の更なる低下につながらなかった事が挙げられる。早産率が高用量で更なる低下にならなかった理由として、さらに高用量の使用の際に母体死亡があったことから、溶媒として添加したエタノールの量が増加したため、早産に影響したのではないかと考えている。

妊娠中の薬剤投与の影響は不明な点が数多くあり、妊婦への安全性、妊娠成立や催奇形性などの影響を含め、課題はまだ数多い。しかし、レスベラトロールは食品由来の物質であり、内服可能であり、早産治療薬として大変有益な選択肢となり得る。今後の展望として、至適投与量と投与方法、投与期間を検討していくことにより有効性を高めていくことを目標としたい。さらに妊娠組織において他の免疫細胞に対するレスベラトロールの影響を免疫学的、組織学的に検討すること、炎症反応の抑制の機序を探ることで、早産及びその予防のメカニズムについて解明をしていきたい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案から、実験手技、論文執筆まで、様々な面においてご指導、ご鞭撻いただきました東京大学医学部産婦人科の川名敬先生に、感謝申し上げます。山下重紀先生、田口歩先生には、実験手技、論文執筆などにおいてご指導いただきました。また東京大学医学部産婦人科の藤井知行先生、大須賀穰先生には、当教室の教授として、研究にご理解、ご支援いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

研究室でともに仕事をしてまいりました東京大学医学部産婦人科の井上知子先生、西田晴香先生、井上恵莉先生には、カンファレンスや実際の実験において様々なアドバイスやご協力をいただきました。あらためて感謝の意を表したいと思います。

## 引用文献

1. Beck S, Wojdyla D, Say L et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. Bull World Health Organ. 2010;88(1):31-38.
2. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. Lancet. 2012;379(9832):2162–2172
3. 斎藤滋 早産の予防(2)細菌性膣症：わが国の現状と対策 母子保健情報 2010;(61):13-16
4. Blencowe H, Cousens S, Chou D et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. Reprod Health. 2013;10(suppl 1):S2.
5. Liu, L, Johnson, H, Cousens S et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Lancet. 2012;380(9850):1308.

6. Howson CP, Kinney MV, McDougall L et al. Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health*. 2013;10(suppl 1):S1.
7. Villar J, Papageorgiou AT, Knight HE et al. The preterm birth syndrome: a prototype phenotypic classification. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(2):119-123.
8. Denison R. Pregnancy & perinatal transmission update. *WORLD*. 1998;9(89):6-7.
9. Kemp MW. Preterm Birth, Intrauterine Infection, and Fetal Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5(574).
10. Osman I, Young A, Ledingham MA et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(1):41-45.
11. Sennström MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(4):375-381.

12. Young A, Thomson AJ, Ledinghm M et al. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod.* 2002;66(2):445-449.
13. Olson DM. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(5):717-730.
14. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1353-1361.
15. Taguchi A, Yamashita A, Kawana K et al. Recent progress in therapeutics for inflammation-associated preterm birth: a review, *Reproductive Science.* 2015; 1933719115618282. Epub ahead of print.
16. Iams JD, Romero R, Culhane JF et al. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet.* 2008;371(9607):164-175.
17. O'Brien JM, Adair CD, Lewis DF et al. Progesterone vaginal gel for the reduction of recurrent preterm birth; primary results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(5):687-696.

18. Dodd JM, Flenady V, Cincotta R et al. Prenatal administration of progesterone for preventing preterm birth in women considered to be at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(7):CD004947.
19. King JF, Flenady V, Papatsonis D et al. Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(1):CD002255.
20. Naik Gaunekar N, Crowther CA. Maintenance therapy with calcium channel blockers for preventing preterm birth after threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3): CD004071.
21. Anotayanonth S, Subhedar NV, Neilson JP et al. Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(4):CD004352.
22. King JF, Flenady V, Cole S et al. Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(2):CD001992.
23. U.S. Food and Drug Administration. Terbutaline: Label Change –Warning Against Use for Treatment of Preterm Labor. 2011. available from <<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm243843.htm>>(accessed 2/11/2016)

24. Loe SM, Sanchez-Ramos L, Kaunitz AM. Assessing the neonatal safety of indomethacin tocolysis. *Obstet Gynecol.* 2005;106(1):173-179.
25. Haas DM, Imperiale TF, Kirkpatrick PR et al. Tocolytic therapy, a meta-analysis and decision analysis. *Obstet Gynecol.* 2009;113(3):585-594.
26. Fox NS, Gelber SE, Kalish R et al. Contemporary practice patterns and beliefs regarding tocolysis among US maternal-fetal medicine specialists. *Obstet Gynecol.* 2008;112(1):42-47.
27. Mercer BM, Merlino AA. Magnesium sulfate for preterm labor and preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2009;114(3):650-668.
28. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW. Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(4):CD001060.
29. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice; Society for Maternal-Fetal Medicine. Magnesium sulfate before anticipated preterm birth for neuroprotection. *Obstet Gynecol.* 2010;115(3):669-671.

30. Doyle LW, Crowther CA, Middleton P et al. Antenatal magnesium sulfate and neurologic outcome in preterm infants, a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2009;113(6):1327-1333.
31. Abramovici A, Cantu J, Jenkins SM. Tocolytic therapy for acute preterm labor. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012;39(1): 77-87.
32. Alfirevic Z. Tocolytics: do they actually work? *BMJ.* 2012;(345): e6531.
33. Yamashita A, Kawana K, Tomio K, et al. Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. *Sci Rep.* 2013;(3):3113.
34. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 2013;19(34):6064-93
35. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem.* 2005;280(17):17187-17195.
36. Baur JA, Pearson KJ, Price NL et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*2006;444(7117): 337-342

37. Vergara, D, Simeone P, Toraldo D et al., Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Mol Biosyst*, 2012;8(4):1078-87.
38. Yang Q, Wang B, Zang W et al. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. *PLoS One*, 2013. 8(11): e70627.
39. Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015;289(3)482-94
40. Zhu X, Liu Q, Wang M, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- $\alpha$  induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One*. 2011;6(11):e27081.
41. Park SJ, Ahmad F, Philp A et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148(3): 421-433
42. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B,

activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000;164(12):6509-6519.

43. Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. *Cancer Res.* 2000;60(13):3477-3483.

44. Farzaei MH, Rahimi R, Abdollahi M. The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015;16(3):196-210.

45. Sadarani BN, Majumdar AS. Resveratrol potentiates the effect of dexamethasone in rat model of acute lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):773-9

46. Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, Lee JC. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomater.* 2015;29:398-408.

47. Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, et al. Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(3):770-778.

48. Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M et al. Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(3):604-10
49. Hsia SM, Wang KL, Wang PS. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on uterine contraction and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rats in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 2011;152(5):2090-99
50. Lappas M, Mitton A, Lim R et al. SIRT1 is a novel regulator of key pathways of human labor. *Biol Reprod.* 2011;84(1):167-178.
51. Kim SH, Shim SH, Sung SR et al. Gene expression analysis of the microdissected trophoblast layer of human placenta after the spontaneous onset of labor. *PLoS One.* 2013;8(10):e77648
52. Samarasinghe TD, Sands SA, Skuza EM et al. The effect of prenatal maternal infection on respiratory function in mouse offspring: evidence for enhanced chemosensitivity. *J Appl Physiol* 2015;119(3):299-307
53. Migale R, Herbert BR, Lee YS et al. Specific Lipopolysaccharide Serotypes Induce Differential Maternal and Neonatal Inflammatory Responses in a Murine Model of Preterm Labor. *Am J Pathol.* 2015;185(9):2390-401

54. Reznikov LL, Fantuzzi G, Selzman CH et al. Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta. *Biol Reprod.* 1999;60(5):1231-8.
55. Taguchi A, Kawana K, Tomio K, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2014;9(2):e89605.
56. Houser BL. Decidual Macrophages and Their Roles at the Maternal-Fetal Interface *Yale J of biology and medicine* 2012 (85), 105-118.
57. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,40-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer.* 2004;90(3):736-744.
58. Vora S, Abbas A, Kim CJ, et al. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:8.
59. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68(69):165-175.

60. Slater D, Dennes W, Sawdy R, et al. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *J Mol Endocrinol.* 1999;22(2):125-130.
61. Crankshaw DJ, Dyal R. Effects of some naturally occurring prostanoids and some cyclooxygenase inhibitors on the contractility of the human lower uterine segment in vitro. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(8):870-874.
62. Lindstrom TM, Bennett PR. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction.* 2005;130(5):569-581.
63. Katoh M, Katoh M. STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer. *Int J Mol Med.* 2007;19(2):273-278.
64. Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J et al. Leukemia inhibitory factor enhances endometrial stromal cell decidualization in humans and mice. *PLoS One.* 2011;6(9): e25288.
65. Taylor CT, Kent BD, Crinion SJ et al. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NFkappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;447(4):660-665.

66. Lim R, Barker G, Lappas M. SLIT3 is increased in supracervical human foetal membranes and in labouring myometrium and regulates pro-inflammatory mediators. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(4):297-311.
67. Klawitter M, Hakozaki M, Kobayashi H, et al. Expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells. *Eur Spine J.* 2014;23(9):1878-1891.
68. Rinaldi SF, Catalano RD, Wade J et al. Decidual neutrophil infiltration is not required for preterm birth in a mouse model of infection-induced preterm labor. *J Immunol.* 2014;192(5):2315-25.
69. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition –a review. *Placenta.* 2003;24(suppl A):S33-S46.
70. Sykes L, MacIntyre DA, Teoh TG, Bennett PR. Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour. *Reproduction.* 2014;148(2):29-40.
71. Poudel R, Stanley JL, Rueda-Clausen CF, et al. Effects of resveratrol in pregnancy using murine models with reduced blood supply to the uterus. *PLoS One.* 2013;8(5):e64401.

72. Slater D, Dennes W, Sawdy R et al. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *Journal of Molecular Endocrinology* 1999;22(2) 125–130.
73. Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T et al. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*. 2015 ;83(8):1360-7.
74. Ruotolo R, Calani L, Fietta E, et al. Anti-estrogenic activity of a human resveratrol metabolite. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23(11):1086-1092.
75. Roberts VH, Pound LD, Thorn SR et al Beneficial and cautionary outcomes of resveratrol supplementation in pregnant nonhuman primates. *FASEB J*. 2014;28(6):2466-77