

博士論文

流産の病理学的因子としての精神的ストレスの検討

長坂 貴顕

目次

目次	1
略語表	2
要旨	4
序文	5
目的	13
課題1の方法	14
課題1の結果	18
課題2の方法	31
課題2の結果	40
考察	49
結語	58
謝辞	59
引用文献	60

略語表

ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BLC	=Scyb13 Small Inducible Cytokine B13
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
C5	Complement 5
Eotaxin	Eosinophil chemotactic protein
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
G-CSF	Granulocyte-colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
IFN	Interferon
IP-10	Inositol Phosphate-10
I-TAC	=IP-9, Interferon-inducible T-cell alpha
I-309	=SCYA1 Small inducible Cytokine A1 precursor
JE	=Mcp-1 Monocyte chemotactic protein 1
KC	=CXCL 1, Secretory Protein N51
MCP-5	Monocyte Chemoattractant Protein 5
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor

MIG =Scyb9 Small Inducible Cytokine B9

MIP-1 α , 1 β , 2 Macrophage Inflammatory Protein

NK Natural Killer

RANTES Regulated on activation normal T cell expressed and secreted

RCOG Royal College of Obstetricians and Gynaecologists

SDF-1 Stromal cell derived factor

SP Substance P

sFlt-1 FMS-like tyrosine kinase 1

sICAM-1 soluble Intercellular Adhesion Molecule 1

sVEGFR-1 soluble vascular endothelial growth factor receptor 1

TARC Thymus and Activation-regulated Chemokine

TIMP-1 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

TNF Tumor Necrosis Factor

TREM-1 Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1

VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule 1

流産の病理学的因子としての精神的ストレスの検討

所属：東京大学大学院 博士課程 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：藤井知行

申請者：長坂貴顕

要旨

不育症女性が有する精神的ストレスが流産発症に与える影響の検討を行った。まず、不育症外来受診女性を対象に K6 スコア評価、ストレスマーカーの血清コルチゾールと次回妊娠帰結との関連を検討した。初診時に K6 スコア評価で強い精神的ストレス状態を示し、外来受診後も改善が乏しい女性ではコルチゾール値が高く、次回妊娠での流産頻度が高いことが示唆された。次に流産マウスモデルを用い、身体拘束ストレス負荷後の流産率と精神的ストレスマーカーの血清コルチコステロンを解析した。身体拘束でコルチコステロンが高値を示し、流産率が有意に増加した。本研究の結果は、精神的ストレスが流産発症の誘因となりうることを示唆している。

序文

流産および不育症について

我が国での報告では臨床的に確認された妊娠の 15%が流産となり、妊娠歴のある女性の 38% が流産を経験している(1)。2 回以上流産が連続する場合を反復流産、3 回以上流産が連続する場合を習慣流産と定義している。反復流産は 2-5%，習慣流産は 1%程度の頻度と報告されている(2)。また、流産のみならず早産、死産などを含めてカップルが希望しているにも関わらず妊娠はできるが健児を得られない状態を包括的に不育症と呼んでいる。

流産の主要な原因は、胚の染色体異常とされ、自然流産の胎児染色体異常の頻度は 70%程度であることが知られている(3)。20 代では流産率が 10%程度であるのに対して 40 代では 40%以上に増加するが(4)、これは胚の染色体異常の頻度は母体の年齢に依存しており、卵子の老化に起因していると考えられている(5)。一方で母体側（もしくは父側）に流産を生じやすい何らかの要因が存在することで、正常な染色体の胚であるにも関わらず、健児を得られない場合もある。そうした、流産リスクの上昇する要因として、抗リン脂質抗体（症候群）、先天性血栓性素因（プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビンなどの欠乏症）、配偶者自身の染色体異常、子宮奇形、糖尿病や甲状腺機能異常などの内分泌疾患が知られている(6)。反復流産・習慣流産を含めた不育症カップルに対してはそれらの原因因子の検索のためのスクリーニング検査を行い、抽出さ

れた原因因子に応じて次回妊娠に向けた治療的介入の必要性の有無について説明を行う(2)。一方でスクリーニング検査を行っても原因が特定できない場合も多いが、その場合は既往の流産の原因が胚の染色体異常であった可能性も高く、必ずしも原因不明の流産リスク因子が存在するということを意味しない(7)。

流産と精神的ストレス

不育症患者は繰り返す流産によって強い精神的ストレス状態にあり、抑うつや不安障害が重度なレベルに達している女性も多く、平成 22 年度厚労省班研究班の報告(8)によると、不育症患者の 15.4%に臨床的に問題となる抑うつ、不安障害が生じており、一般人口のそれに該当する確率 1.9%よりも高率となっている。また、2010 年の日本カウンセリング学会誌の報告によれば、流産回数と抑うつスコアの関連性は低く、生児がいる場合においても抑うつ状態が強い場合もあると報告されている(9-11)。そうしたことを踏まえて、日本及び諸外国の不育症の診療に関するガイドラインでは、不育症カップルの原因検索、結果の説明における精神的支援 (supportive care) によりカップルの不安をできるだけ取り除くこと、さらに原因特定の有無にかかわらず、その後の妊娠では不安を緩和する精神的支援を行うことが推奨されている(6)。一方で、抑うつ・不安の精神的ストレスが妊娠にどのような影響を与えるのか、精神的支援の次回妊娠の予後にどのような効果をもたらすのかということについては知見が乏しい。少数の症例数による報告では、原因が特定できない習慣流産女性に対して、出生前カウンセリングや精神

的ケアを行った場合の次回妊娠の流産率は 14%で、行わなかった女性の流産率 67%より低かった(1)。また、同じく原因が特定できない習慣流産女性では、次回妊娠の初期に医師の精神的ケアを受けた場合の流産率 26%に対して、初期に医師のそうした精神的ケアを受けなかった女性の流産率は 51%であったとされている(2)。但し、それらの研究における対象女性の精神的ストレスの評価は行われておらず、精神的支援の方法、内容について報告間での違いがある(3, 4)。

精神的ストレスの評価

抑うつ・不安の精神的ストレスの評価法の代表的なアプローチとして、質問紙表による精神的状態の把握とバイオマーカーの測定がある。質問紙表には、心理的ストレス反応測定尺度 (Stress Response Scale-18 ;SRS-18)、ツァン自己評価式抑うつ尺度(SDS) (Zung's Self-Rating Depression Scale)、顕在性不安尺度(MAS : Manifest Anxiety Scale)、Psychological Stress Scale(PSRS)などがある(12, 13)。中でも K6 スコアリングシステム (以下、K6 スコア) は、気分障害のスクリーニングとして一般的に広く使用されてきた(14)。6 つの項目について過去 30 日間にどのように感じていたかに関する質問への回答をスコア化するものである (表 1)。日本国内の過去の報告では 15 点以上/30 点では約半数が何らかの気分障害や不安障害を有するとされ、災害等の事象後の住民の抑うつ・不安を評価する代表的ツールとしても用いられてきた。但し、本研究では使用した各質問の項目得点は 1-5 点として 30 点を最大点としたのに対して、

古川らの報告では(15)、各項目得点を 0-4 点として最大点数を 24 点として評価しているため、古川らの報告で示されている 9 点のカットオフは本研究の 15 点に相当する。また日本において不育症女性に対する抑うつ・不安の評価法として使用された報告もある(9)。

表 1 K6 質問紙表

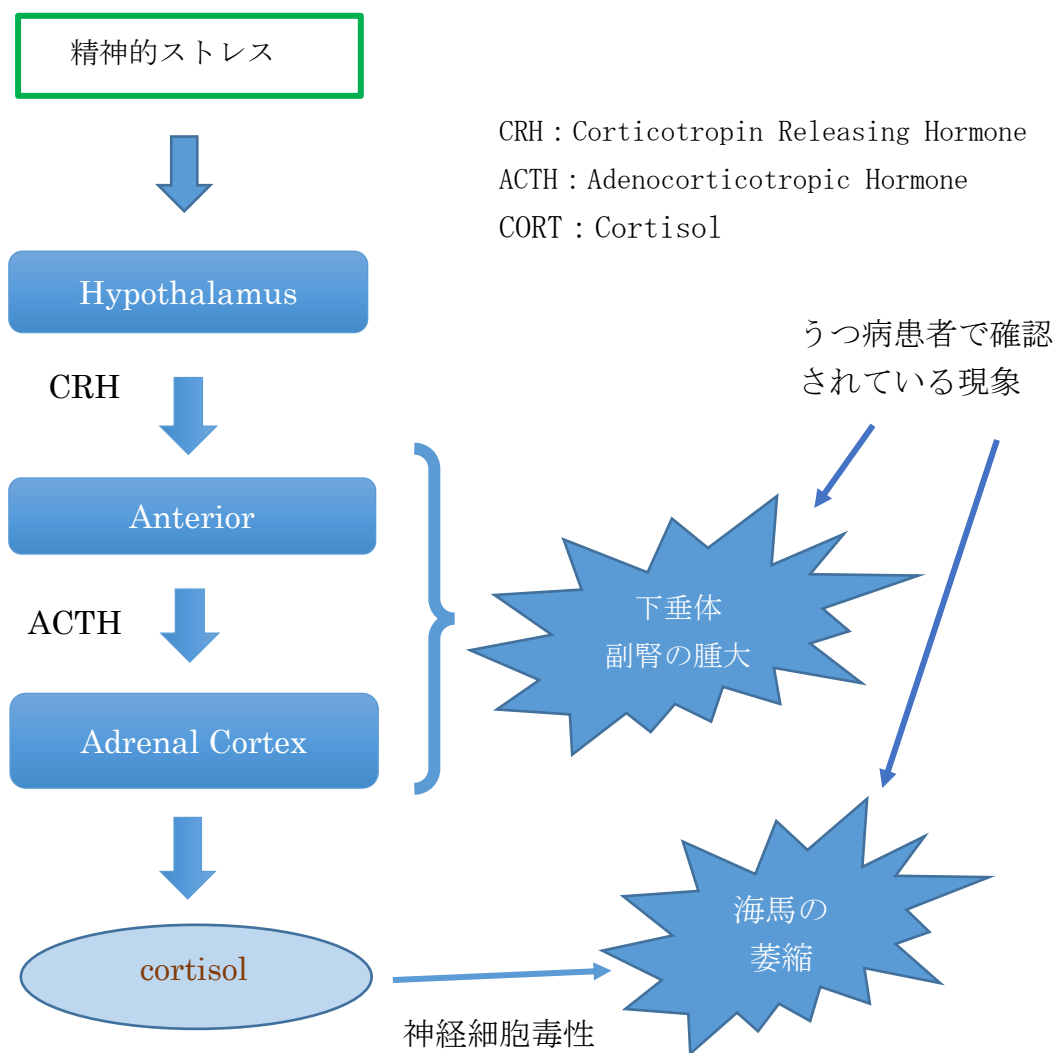
以下の質問に対して過去 30 日間の間どのように感じていたか教えてください。

	いつも	たいてい	時々	少しだけ	全くない
a. 神経過敏に感じましたか	5	4	3	2	1
b. 絶望的だと感じましたか	5	4	3	2	1
c. そわそわしたり、落ち着きなく感じましたか	5	4	3	2	1
d. 気分が沈み込んで、何が起ころうとも気が晴れないように感じましたか	5	4	3	2	1
e. 何をやるのも骨折れだと感じましたか	5	4	3	2	1
f. 自分は価値のない人間だと感じましたか	5	4	3	2	1

K6 scales は、2003 年 Kessler らによって表され、米国 NHIS (National Health Interview Survey) などで使われ始めた。災害等の事象後の住民の抑うつ・不安を評価する代表的ツールとしても用いられてきた。

他に、精神的ストレスレベルの評価に用いられるバイオマーカーとして、血清中に検出される物質では糖質コルチコイド（マウスのコルチコステロン、ヒトのコルチゾール）、BDNF、NK 活性、TNF- α 、IFN- γ 、Substance P、VCAM-1、ICAM-1 などがあり、唾液中に検出される物質ではアミラーゼが知られている(5)。中でも、測定の簡便さや精神的ストレスに対する反応の鋭敏さの点で糖質コルチコイドは利点が多いバイオマーカーである(16-18)。マウスに対する精神的ストレスの負荷の影響を見る研究ではコルチコステロンはストレス負荷の程度の指標として利用され、後述するような精神的負荷を与えることで、マウスに抑うつ状態を引き起こす実験モデルにおいても精神的ストレスを評価するバイオマーカーとして利用されてきた(19, 20)。精神的ストレスの中でも特に抑うつ状態とステロイドホルモンの関係については、解明が進んでいる。通常の生理的反応として、内的、外的ストレスに対して視床下部-下垂体-副腎（HPA 系）の連携した作用により、糖質コルチコイドを中心としたステロイドホルモン産生が増加する。産生されたステロイドホルモンは抗炎症作用、抗ショック作用を発揮することでストレスへの生体防御働きを行う。一方でうつ病患者ではこのストレス防御機構の過剰反応が HPA 系のネガティブフィードバック機構を障害して過剰なコルチゾール産生を生じ、コルチゾールによる海馬領域を中心とした神経細胞機能障害が発症の一因となっているという仮説（HPA 仮説）がある(6, 21, 22)（図 1）。この裏付けとして、うつ病患者では副腎重量の増加、血清コルチゾール値の上昇、海馬の萎縮などが示されている(7-9, 11)。

図1 HPA 仮説の概略図



HPA 仮説：うつ病患者ではストレス防御機構の過剰反応が HPA 系のネガティブフィードバック機構を障害して過剰なコルチゾール産生を生じ、コルチゾールによる海馬領域を中心とした神経細胞機能障害が発症の一因となっているという仮説。

マウスに精神的負荷を与える実験的手法

精神的負荷を与えることでマウスに抑うつ状態を引き起こす実験モデルについて精神科領域の研究において複数の方法が確立されている。精神的ストレスの負荷を与えて抑うつ状態にする方法として、採血用の器具などを利用して閉所に身体を固定する身体拘束ストレス、水または温水で床を浸したケージによる wet floor ストレス(12)、マウスが忌避する周波数の超音波の暴露による音響ストレス、複数のマウスを入れて極端に混雑したケージによる閉所ストレス、床に通電して刺激を与える電気刺激ストレス、長時間明るい照明下での飼育による明暗ストレスなどがある(13, 14)。これらの方法の中で、身体拘束ストレス負荷による抑うつ誘発モデル(15)は、物理的侵襲が少ないため純粋な精神的ストレスへの反応をとらえやすい。また、手技が簡便であり、ストレス負荷の時間や日数の調整が可能であり、同一の拘束器具を用いることで個々のマウス間の負荷レベルが均一になるなどのメリットがある。

研究の目的

現在の不育症の臨床において行われている既知の原因因子をターゲットとしたスクリーニング検査では約 60%程度で原因が特定できない(8)。そして、原因不明の不育症女性に対しては有効な治療的アプローチがない状況にある。そのため、流産を引き起こす新たな原因因子を見つけ出すことは重要である。そこで本研究では不育症女性において過去の流産体験に伴う精神的ストレスがさらなる流産を引き起こす原因因子になっている可能性について着目した。前述のように不育症女性に対する supportive care がその後の流産率低減に寄与したとする、少数例のケースコントロール研究が過去に報告されている(14)。このことは、不育症女性では抑うつ状態が改善しない場合には次回妊娠においてさらなる流産発生の要因となっている可能性を支持するがそれを検証した研究は乏しい。また、分子生物学的な観点から精神的ストレスと流産発生との関係については未解明の部分が多い。そこで、本研究では抑うつ状態（精神的ストレス）が流産の発生に与える影響について解明することを目的として以下の課題について検討を行った。

課題 1：不育症患者における抑うつと次回妊娠帰結の関係

課題 2：流産マウスモデルにおける精神的ストレスの影響

課題 1 の方法

課題 1：不育症患者における抑うつと次回妊娠帰結の関係

不育症女性の臨床情報の収集

本研究における臨床データの収集、解析については東京大学医学部倫理委員会の承認（承認番号 3053）のもと行われた。東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科において 2010 年 6 月から 2015 年 12 月の 5 年 7 か月の期間に不育症専門外来を初診した 896 名の臨床情報を診療録より後方視的に収集した。臨床情報は、初診時の年齢、妊娠既往歴、不育症原因精査のための血液検査結果、内診・超音波所見を収集した。原因検索のための検査としては、凝固系検査、抗リン脂質抗体症候群関連因子、甲状腺機能関連検査、内分泌学的検査（甲状腺機能検査、随時血糖、コルチゾール）、カップルの末梢血染色体検査、子宮奇形の有無の確認が行われた。原因検索のための採血検査は不育症外来受診時の 13-15 時に行われ、コルチゾールの日内変動において基礎値となる時間帯である。有効な治療法が存在する原因因子が特定された女性については、妊娠前もしくは妊娠後に原因に応じた治療を実施した。さらに、初診以降 2016 年 8 月までの期間における初回の妊娠に関する情報として、妊娠時の年齢、妊娠中の治療内容、初期流産（妊娠 12 週未満での流産）発生の有無を収集した。不育症の原因精査により流産発生に関連する原因因子が確認された女性を「原因確認群」と、特に原因が特定されない「原因不明群」として、初診後の最初の妊娠帰結（初期流産発生の有無）との関連について解析を進めた。

K6 スコアによる患者の抑うつ・不安の評価

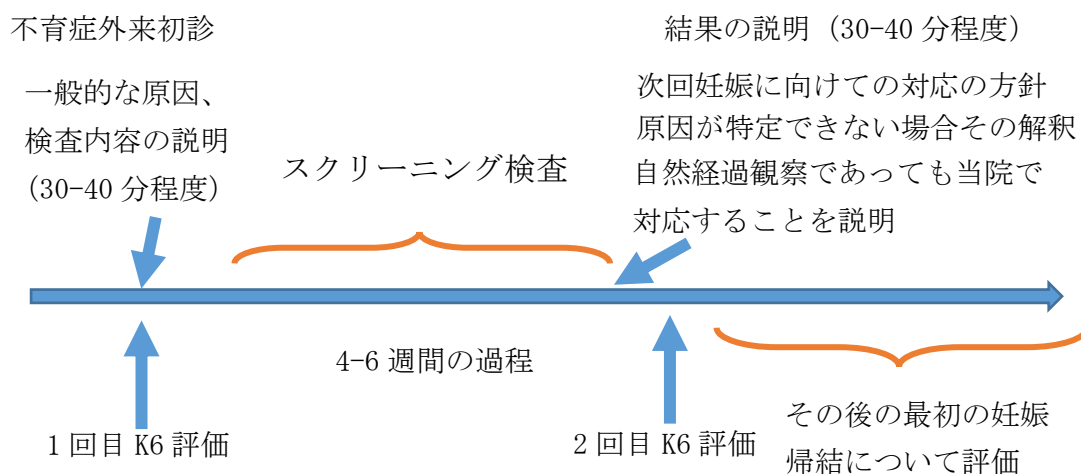
上記の不妊症女性を対象に、K6 スコア質問紙表による抑うつ・不安状態の評価を行った。今回の研究を実施した東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科の不妊症専門外来における診療の流れと K6 スコア評価について図 2 に示す。不妊症外来では初診時およびスクリーニングの結果説明において、患者に対する支持的態度で診療を行い、supportive care の実践を心掛けた対応が診察担当医により行われた。また、受診した不妊症患者の精神的ストレス状態についての評価を K6 スコアにより行った。K6 スコアによる評価は 2 回行い、1 回目は初診時、2 回目は不妊症原因検索のためのスクリーニング検査後にその後の妊娠に向けての対応説明を行った後、4 週経過後に行った。1 回目と 2 回目のスコアの変化により不妊症外来の受診に伴う精神的ストレス状態の改善について評価した。初診時（1 回目）の点数が 15 点（最高点 30 点）以上の群を「高ストレス群」、15 点未満を「低ストレス群」として定義した。1 回目の点数から 2 回目の点数を引いたものを K6 スコアの改善とした。

統計解析

収集した臨床情報はデータベース化して JMP pro9.0 (SAS institute, Tokyo, Japan) を用いて統計解析を行った。コルチゾール値と K6 スコアの相関について Spearman の相関係数により相関係数を決定して相関係数の有意性を検定した。「低ストレス群」と「高ストレス群」の間の背景因子の比較について年齢 : t 検定、既往流産回数 : Mann-Whitney

U 検定、生児の有無、原因因子の有無： χ^2 検定でそれぞれ行った。K6 スコアの改善と妊娠帰結の関連についてはロジスティック回帰分析を行った。p 値<0.05 の場合を統計学的有意差ありとした。

図2 K6スコアを用いた患者の抑うつ状態の確認とその後の妊娠予評価



不妊症外来受診女性を対象に K6 スコアを用いて 2 回の評価 (点数化) を行い、1 回目は初診時、2 回目は不妊症原因検索のためのスクリーニング検査後に、その後の妊娠に向けての対応説明を行った後で 4 週経過後に行った。

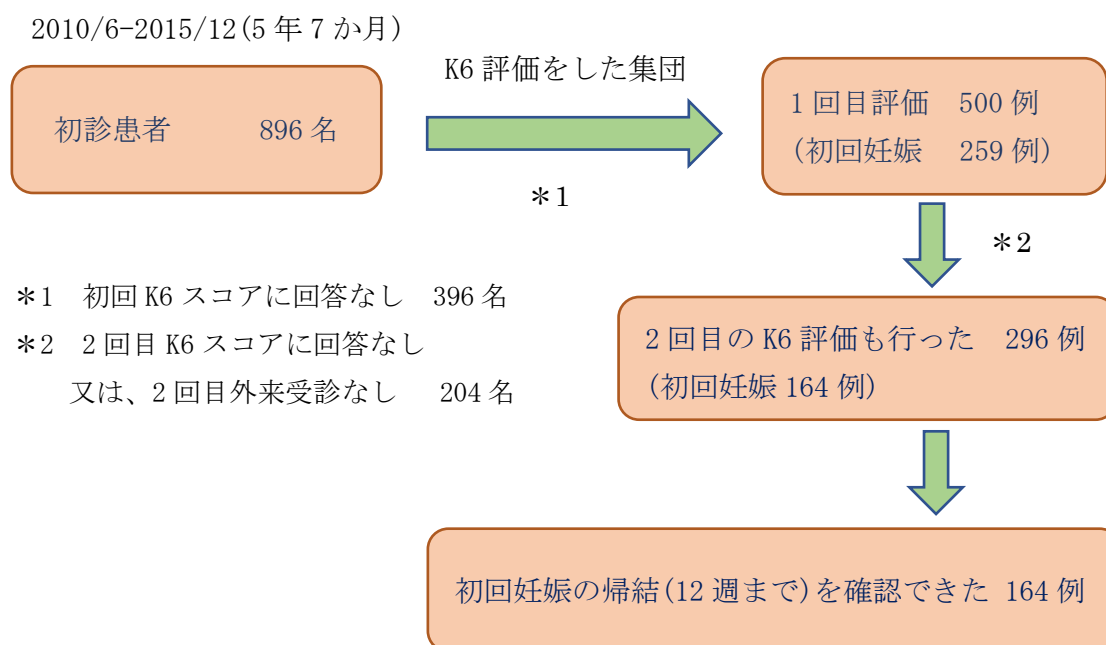
課題 1 の結果

結果 1：不育症患者における抑うつと次回妊娠帰結の関係

研究対象者の概要

今回研究対象とした不育症女性の概要は、2010年6月から2015年12月の5年7か月間の期間の896名の初診患者の平均年齢は 35.9 ± 4.4 歳、既往の流産回数は0回2%、1回11%、2回51%、3回25%、4回以上が11%であった。その中でK6スコアの回答は初診時（1回目）の評価を行ったものが500例、それに加えて原因検索および次回妊娠での対応決定後（2回目）の評価も行ったものが296例であった。脱落例は初めからK6スコアに回答しなかった患者（396名）、2回目のK6スコアには回答しなかった患者あるいは2回目の外来受診がなかった患者（204名）であった。2回のK6のスコアが確認できた296例の中で2016年8月までの経過観察期間中に初診後の初回妊娠の帰結（妊娠12週までの妊娠継続の有無）を確認できたものは164例であった（図3）。以下の検討において、K6スコアの解析では2回のK6スコアの評価ができた296例を対象として行い、K6スコアと妊娠帰結の関係の解析ではその後の妊娠帰結が確認できた164例を対象とした。

図3 研究対象とした不育症女性の概要



本研究で対象とした不育症女性の概要は、2010年6月から2015年12月の5年7か月間の期間の896名の初診患者の平均年齢は 35.9 ± 4.4 歳、既往の流産回数は0回2%、1回11%、2回51%、3回25%、4回以上が11%。ここで0回妊娠とは流産（妊娠22週未満）でなく死産（妊娠22週以降）となった患者であり、化学的流産は流産には含まれない。

その中でK6スコアリングの回答は初診時（1回目）の評価を行ったものが500例、それに加えて原因検索および次回妊娠での対応決定後（2回目）の評価も行ったものが296例。この296例の中で2016年8月までの経過観察期間中に初診後の初回妊娠の帰結（妊娠12週までの妊娠継続の有無）を確認できたものは164例であった。

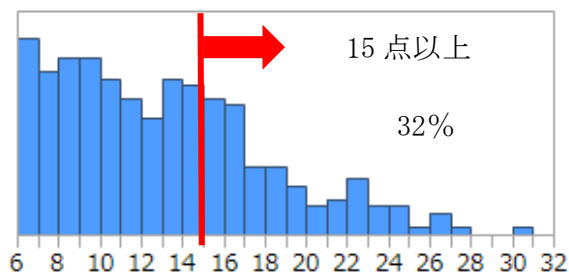
K6 スコアによる不育症女性の不安・抑うつの評価

1 回目、2 回目の K6 スコアの両方が評価できた 296 例を対象として解析を行った。1 回目の K6 の中央値 12 点（10 パーセンタイル値 7 点－90 パーセンタイル値 19 点）、2 回目の K6 の中央値 9 点（10 パーセンタイル値 6 点－90 パーセンタイル値 16 点）であった（図 4）。1 回目と 2 回目の両方の評価が可能であった症例において 1 回目に比較して 2 回目の点数が低下した症例は 64%であった。本研究における K6 スコアでは 15 点以上が何らかの気分障害や不安障害を有する比率が半分を超えるとされ、しばしば精神疾患のスクリーニングにおけるカットオフポイントとしてしばしば用いられる(9)。15 点以上を示した症例数は 1 回目の評価では 32%に対して、2 回目の評価では 15%と減少していた（図 4）。

初診時の年齢および初診時までの流産と死産の合計回数（流死産回数）と K6 スコアの間の相関関係を見た。年齢と 1 回目の K6 スコア（相関係数 -0.07 $p=0.11$ ）、年齢と 2 回目の K6 スコア（相関係数 -0.10 $p=0.08$ ）、および流死産回数と 1 回目の K6 スコア（相関係数 -0.09 $p=0.06$ ）、流死産回数と 2 回目の K6 スコア（相関係数 -0.01 $p=0.82$ ）といずれに対しても明らかな相関は認めなかった（表 2）。

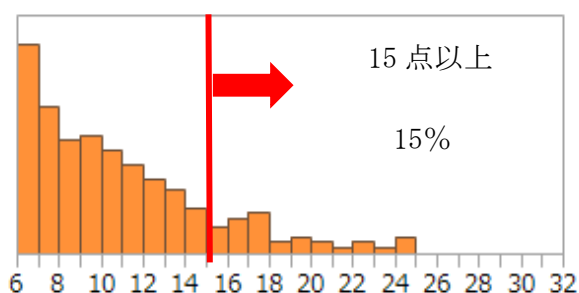
図4 K6 スコアの1回目と2回目の評価

1回目 初診時



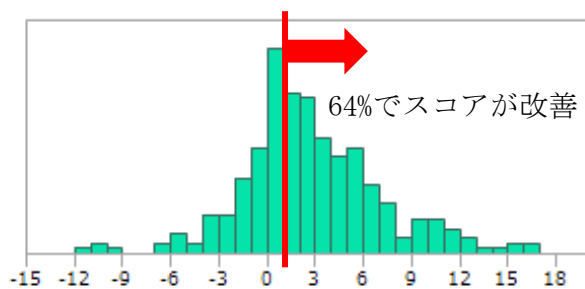
平均±SD 12.5±5.0
中央値 (最小-最大) 12(6-30)

2回目 説明後



平均±SD 10.3±4.1
中央値 (最小-最大) 9(6-24)

スコアの改善



1回目と2回目のK6のスコアデータがある集団における、スコアの変化を示した。気分障害・不安障害の可能性が高いとされる15点以上の割合を、初診時1回目のK6スコアと、不育症外来での原因検査、次回妊娠への方針決定後の2回目のK6スコアの変化をグラフ化した。1回目の点数から2回目の点数を引いたもので正となったものをK6スコアの改善とした。

表2 K6 スコアと初診時年齢、流死産回数との相関

Spearman の順位相関係数

変数 — 変数	相関係数	P値
K6 1回目—K6 2回目	0.57	<0.001
K6 1回目—年齢	-0.07	0.11
K6 2回目—年齢	-0.10	0.08
K6 1回目—流死産回数	-0.09	0.06
K6 2回目—流死産回数	-0.01	0.82
年齢—流死産回数	0.05	0.16

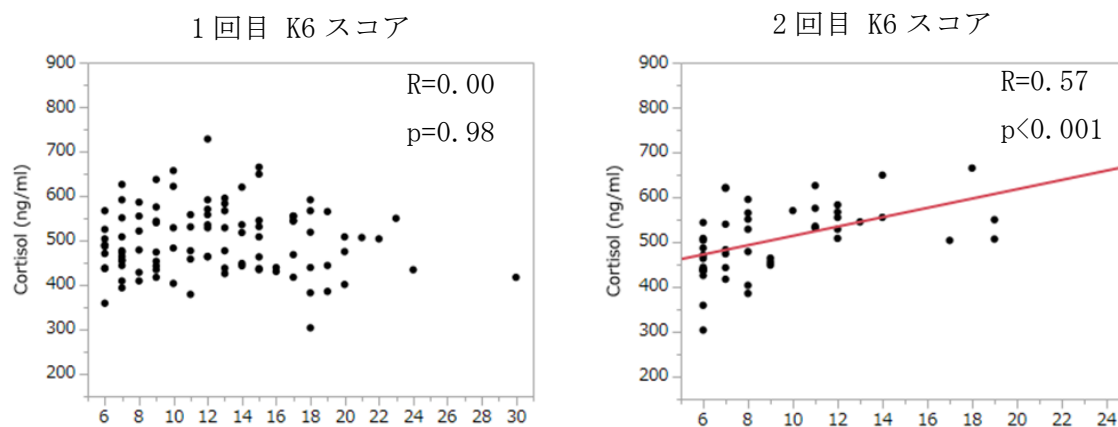
初診時の年齢および初診時までの流産と死産の合計回数（流死産回数）と K6 スコアの間の相関関係について Spearman の順位相関係数により相関係数を決定し、相関係数の有意性を検定した。

K6 スコアリングと血清コルチゾール値の関係

コルチゾールは精神的ストレスの状態を反映することが知られている。そこで不育症スクリーニング検査の項目に含まれている血清コルチゾールに着目して、2 回の K6 スコア評価と血清コルチゾール値の関連について検討した。血清コルチゾールの測定は 2 回の K6 評価の間に 1 回行われた。2 回の K6 の評価が行われ、かつ血清コルチゾール測定が行われた 50 例について検討した。1 回目の K6 評価と血清コルチゾール値について相関は明らかではなかった ($R=0.00$ 、 $p=0.98$)。一方で 2 回目の K6 評価と血清コルチゾール値には正の相関を認め相関係数は統計学的に有意であった ($R=0.57$ 、 $p<0.001$) (図 5)。

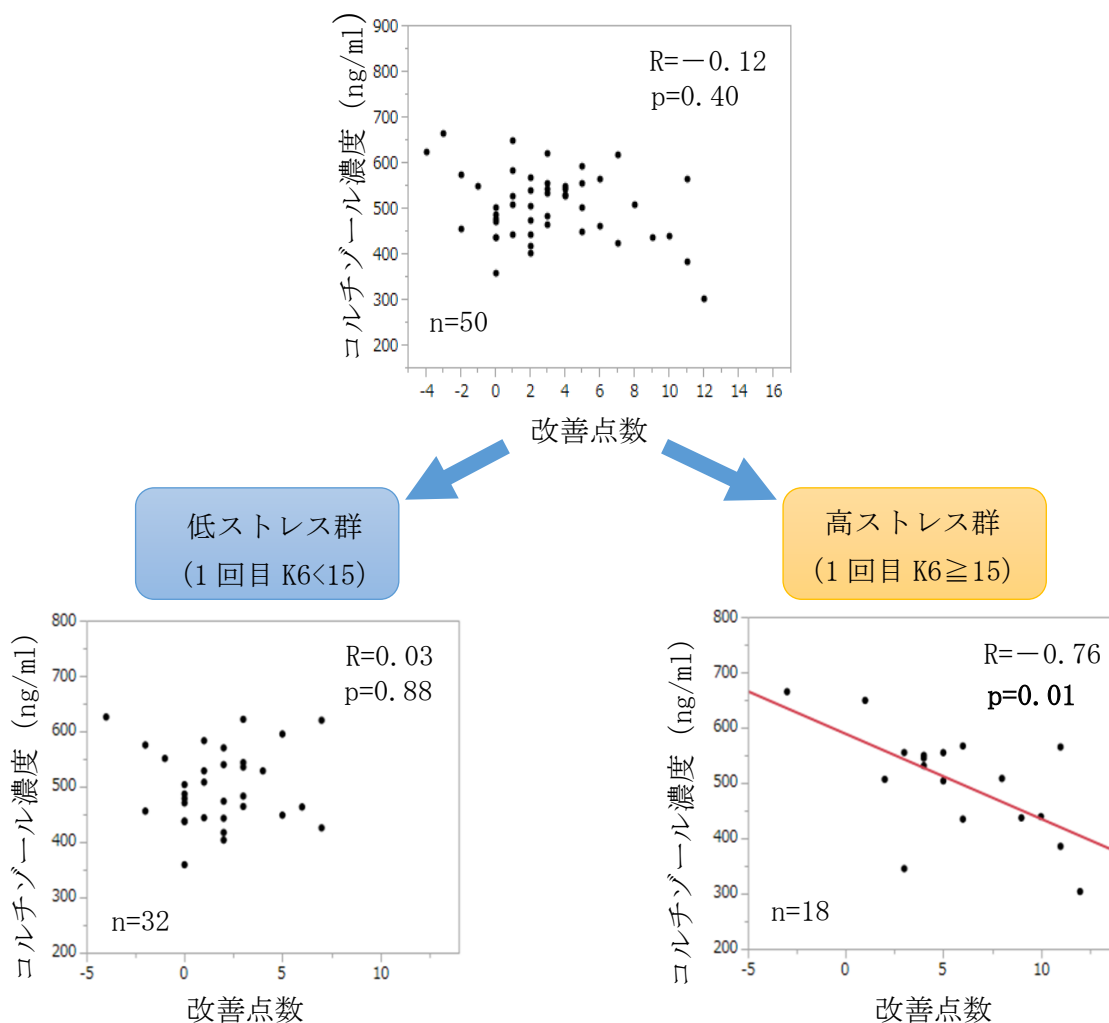
さらに、1 回目から 2 回目の点数の改善と血清コルチゾール値の間には全体としては相関が明らかではなかった。しかし、1 回目に 15 点以上を示した「高ストレス群」においては、改善点数と血清コルチゾール値の間に負の相関を認め、相関係数は有意であった ($R=0.76$ 、 $p=-0.01$) (図 6)。

図 5



不育症専門外来において初診時（1回目）、原因精査・次回妊娠における治療介入の必要性について支持的対応による supportive care を受けた後（2回目）の2回の K6 スコア評価を行った。初診後の不育症原因精査のためのスクリーニング検査で測定した血清コルチゾール値と K6 スコアの相関を検討した。

図6 血清コルチゾールと K6 スコア改善の関係



精神ストレスマーカーの血清コルチゾールと K6 スコア改善の関係を「コルチゾール濃度」と、1回目と2回目の K6 スコアの点数の差を「改善点数」として、二者の相関を検討した。さらに、これを初診時のスコアが 15 点未満の「低ストレス群」と 15 点以上の「高ストレス群」に分けて検討した。

K6 スコアと原因因子検索後の妊娠帰結との関連について検討

1 回目、2 回目の K6 スコアの評価が行われ、かつその後の妊娠で少なくとも 12 週までの帰結が確認できた 164 例を対象に検討を行った。1 回目の K6 スコアとその後の妊娠帰結の関連について、スコアとその後の妊娠における流産発生の有無との間に有意な関連は認めなかった。さらに、不育症の原因因子の検索によって何らかの流産に関連する因子が特定できた群（因子あり群：63 例）と因子が特定できなかった群（因子不明群：101 例）に分けて検討したが、いずれの群でも 1 回目の K6 スコアと流産発生の有無との関連は認めなかった（表 3）。2 回目の K6 スコアとその後の流産発生の有無の関連について同様に検討を行った。2 回目の K6 スコアと流産発生の有無の間に明らかな関連は認めず、原因因子特定の有無による群分けを行った解析でも K6 スコアと流産発生の有無の間の有意な関連は認めなかった（表 3）。

次に、不育症外来での原因検索および次回妊娠への対応に関する説明の前後の K6 スコアの変化と流産発生の有無との関連について検討を行った。1 回目のスコアから 2 回目のスコアを引いたものを改善点数として、1 回目の K6 スコアの点数が 15 点以上の「高ストレス群」と 15 点未満の「低ストレス群」に分けて検討を行った。「低ストレス群」と「高ストレス群」の不育症背景因子の比較を表 4 に示した。「低ストレス群(114 例)」と「高ストレス群(50 例)」の間に K6 スコア以外の不育症背景因子(初診時年齢、既往流産回数、初診時の生児の有無、スクリーニング検査の結果における不

育症原因因子の有無)について有意な違いは認めなかった(表4)。「高ストレス群」では改善点数が高いと流産発生率が低下する傾向($p=0.05$)を認めた(表5)。さらに不育症原因因子の有無で分けて解析した結果では、「因子あり群」では改善点数と流産発生の間に関連を認めない($p=0.42$)のに対して、「因子不明群」では改善点数が高いと有意に流産率が低下していた($p=0.02$)(表5)。「低ストレス群」では「高ストレス群」と対照的に改善点数と流産発生の間に関連を認めず($p=0.97$)、原因因子の有無に分けて検討しても関連は認められなかった(表5)。

表3 不育症原因因子の有無に応じた K6 スコアと妊娠 12 週までの流産発生の有無
(妊娠継続) との関連

変数	全体(n=164)		原因因子*あり(n=63)		原因因子*なし(n=101)	
	単位 OR (95% CI)	P	単位 OR (95% CI)	P	単位 OR (95% CI)	P
1 回目	1.00 (0.94-1.06)	0.98	0.97(0.88-1.06)	0.48	1.02(0.95-1.10)	0.55
K6 スコア**						
2 回目	1.01 (0.92-1.10)	0.90	0.85(0.68-1.01)	0.06	1.08(0.97-1.21)	0.15
K6 スコア**						

*原因因子は抗リン脂質抗体症候群、先天性血栓性素因（プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビンなどの欠乏症）、カップルの染色体転座保因、子宮奇形、糖尿病や甲状腺機能異常などの内分泌疾患

** 1 点刻みの変数（6-30 点）としてモデルに投入

OR: Odds Ratio, CI: Confidence Interval

表4 K6 スコア改善点数と妊娠帰結との関連

「低ストレス群」と「高ストレス群」の不育症背景因子の比較

	全体	低ストレス群 (1回目のK6<15点) 114例	高ストレス群 (1回目のK6≥15点) 50例	P値
年齢 Mean±SD	35.1±4.1歳	35.1±4.1歳	35.0±4.0歳	0.86
既往流産回数 Median (min-max)	2回 (1-6回)	2回 (1-4回)	2回 (1-6回)	0.96
生児の有無 有/無(有の比率)	44/120 (26.7%)	35/79 (30.7%)	9/41(18.0%)	0.12
原因因子 有/不明(有の比率)	63/101(38.4%)	40/74(35.1%)	23/27(46.0%)	0.19

「低ストレス群」と「高ストレス群」の間の背景因子の比較について年齢：t検定、既往流産回数：Mann-Whitney U検定、生児の有無、原因因子の有無： χ^2 検定でそれぞれ行った。

表 5 不育症原因因子の有無と初診時のストレスの状況に応じた K6 スコアの改善と妊娠 12 週以降までの流産発生の有無（妊娠継続）との関連

変数	全体		原因因子*あり		原因因子*なし	
	単位 OR (95% CI)	P	単位 OR (95% CI)	P	単位 OR (95% CI)	P
低ストレス群 ** (n=114)	1.00 (0.85-1.16)	0.97	1.11(0.89-1.46)	0.41	0.93(0.78-1.36)	0.48
高ストレス群 ** (n=50)	0.85 (0.71-0.99)	0.05	0.91(0.73-1.12)	0.42	0.75(0.53-0.96)	0.02

*原因因子は抗リン脂質抗体症候群、先天性血栓性素因（プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビンなどの欠乏症）、カップルの染色体転座保因、子宮奇形、糖尿病や甲状腺機能異常などの内分泌疾患

**初診時の K6 スコア（30 点中）15 点未満を「低ストレス群」、15 点以上を「高ストレス群」と定義した。

OR: Odds Ratio, CI: Confidence Interval

課題 2 の方法

課題 2：流産マウスモデルにおける精神的ストレスの影響

実験動物および飼育環境：

動物実験は、東京大学の定める動物実験実施規則を遵守して、動物実験専門委員会の承認のもと行われた。実験に使用するマウスは 10–12 週齢の DBA/2J 系統のオス、CBA/J 系統のメス、ICR 系統のメスを Charles River Japan より購入した。自由摂餌として、飼育環境条件は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40–60%、明暗周期は 9 時、21 時の切り替えで 12 時間毎とした。

流産マウスモデルに対する身体拘束ストレスの負荷

DBA/2J オスと CBA/J メスの交配 (図 7) は、通常の飼育環境下において他の系統の交配と比較して高い流産率 (20–40%程度) を示すことが知られ、免疫学的研究、神経内分泌学的研究において外的刺激に対する流産の発生への影響を見るマウスモデルとして利用されてきた(23)。本研究ではこの流産マウスモデルを使用して、身体拘束ストレス負荷が流産率に与える影響を検討した。身体的拘束ストレスの負荷は、尾静脈に注射するために一般的に用いられる身体固定具 (図 8) にマウスを入れて、体動を制限することで行った。

図7 流産マウスモデル交配

左 ; DBA/2J マウス (雄)



右 ; CBA/J マウス (雌)



DBA/2J 雄、CBA/J 雌共にそれぞれ 8-12 週齢の交配・妊娠可能マウスを使用。
この組み合わせの交配では、他の組み合わせの交配に比べて流産率が高く (20-40%)、妊娠中の外的、内的ストレスによりさらに流産率が上昇する。

図8 身体拘束ストレス負荷に用いた器具



夏目製作所製 注射用マウス固定器具を使用。

身体拘束ストレス法は、マウス・ラットに精神的ストレスを負荷する方法の一つとして用いられており、毎日一定時間マウスの身体を拘束する処置を、数日間連続することで慢性的に精神的ストレスを負荷している。拘束中は飲水・摂食は不可能とした。但し、室温・湿度・明暗時間等の他の飼育環境はストレス非負荷マウスと同一条件とした。

身体拘束ストレス負荷に伴う血清中コルチコステロン濃度変化の測定

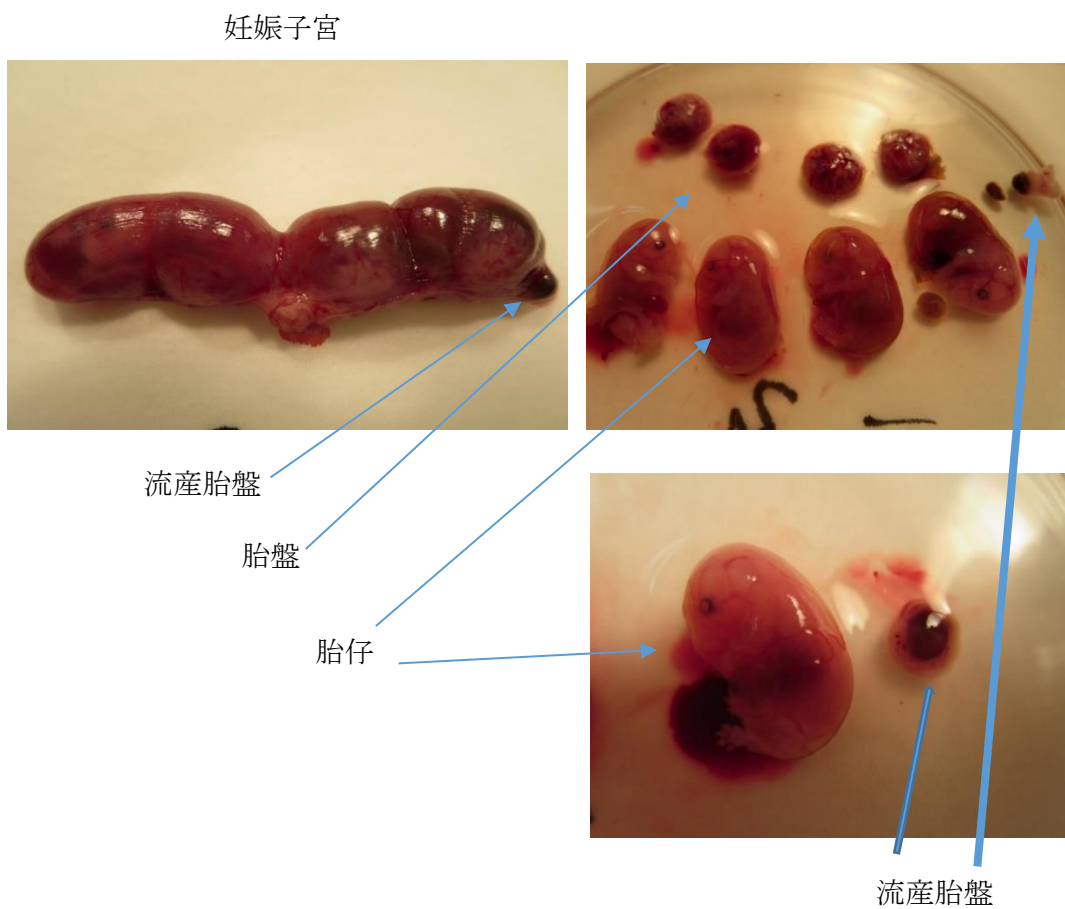
グルココルチコイド値には日内変動があり、マウスにおいては明周期から暗周期に変化する4時間前の前後で血清中濃度がピークに達することが知られている。以下の実験ではグルココルチコイド値がピークとなることが推定される18時に採血のタイミングとなるように、個々のマウスの身体拘束の開始時間を設定した。本実験にはICR系統の非妊娠のメスマウス(10-12週齢)を用いて行った。上記の方法により身体固定を行い、4時間の身体拘束に伴い血清中コルチコステロン値の変化を検討した。血清採取実施のタイミングによって身体拘束ストレス直前、1時間負荷後、2時間負荷後、3時間負荷後、4時間負荷後の5つの群と、4時間負荷後1時間経過後、同2時間経過後の2つの群を加えて7つの群(各群n=4)を設定した。血清の採取は、頸椎脱臼による安楽死の直後に心臓採血で行った。採取した血液は、30分以上常温のまま放置して沈殿させ、1700rpm 20分間遠心分離して上清を採取。回収した血清は-80℃以下で測定まで冷凍庫で保存した。Corticosterone ELISA kit (ENZO Biochem. Inc., New York, U.S.A.)を用いてコルチコステロン濃度を測定した。

身体拘束ストレス負荷と流産発生の評価

CBA/Jメスを10-12週齢(体重18-23g)の時点で、10-12週齢のDBA/2Jオスと交配した。膣栓を確認した時点の日齢0.5として、妊娠5.5-7.5日の3日間にわたり、1日4時間(12時-16時)の身体拘束を行った。その後、妊娠13.5日に頸椎脱臼による安楽

死の後に、子宮内の胎仔数、流産となった胎盤・胎仔の痕跡数をそれぞれ算定して流産の発生状態を確認した(図9)。身体拘束を行わない Control 群を設定し、身体拘束によるストレス負荷以外は同一条件下で飼育した後、同様に妊娠 13.5 日目に流産の発生状態を確認した。

図9 妊娠・流産の評価



妊娠マウスは暗明周期切り替え時の午前9時に膣栓チェックし、陽性と確認した日を妊娠0.5日とした。ストレス負荷した妊娠マウス、ストレス非負荷妊娠マウスともに妊娠13.5日目に頸椎脱臼により安楽死させた。子宮内の胎仔数、流産となった胎盤・胎仔の痕跡数をそれぞれ算定して流産の発生状態を確認した

サイトカインアレイによる血清サイトカイン量の評価

身体拘束ストレス後の血清中サイトカイン濃度を以下の方法で測定した。上記の身体拘束ストレス負荷のプロトコールと同様に妊娠 5.5-7.5 日の 3 日間（1 日 4 時間）の身体拘束を行い、妊娠 7.5 日のストレス負荷直後に安楽死させて、心臓採血を行い血清を回収した（n=3）。ストレス負荷を行わなかったコントロール群（n=3）も妊娠 7.5 日の同じ時間に血清を回収した。ストレス負荷群とコントロール群のそれぞれの 3 匹のマウスの血清を混合してストレス負荷群 1 検体、コントロール群 1 検体とした上で、下記のサイトカインアレイを行った。これを 2 回実施した（ストレス負荷マウス合計 n=6、コントロールマウス合計 n=6）。40 種類の液性因子の測定がニトロセルローズ膜上で抗原抗体反応により同時に検出できるサイトカインアレイシステムを用いた（Mouse cytokine Array Panel A, R&D system, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.）。このアレイにより検出可能な液性因子の一覧を図 10 に示す。アレイ上の反応スポットは感光フィルム上に転写した（使用機器；image quant LAS4000mini）。転写されたスポットの信号強度を計測し、negative control として準備したスポットで検出された信号強度 1 としてそれに対する比率を、color density index (CDI) としてそれぞれのサイトカイン、ケモカインの CDI をストレス負荷群、コントロール群で計測した。それぞれの液性因子は duplicate で検出され、平均化した信号強度をサンプルの測定値として統計解析を行った。

統計解析

身体拘束群、コントロール群間の流産胎仔合計数の比較は χ^2 検定で、個体ごとの流産率の比較はMann-Whitney U検定により行った。サイトカインアレイにおける検出スポットの反応強度の比較はMann-Whitney U検定にて行った。統計解析はJMP pro9.0 (SAS)を用いて行い、p値<0.05の場合に有意な違いがあるとした。

図 10

サイトカインアレイ参照表

	E	D	C	B	
PosRef	TARC	IP-10	IL-3	BLC	PosRef
	TIMP-1	I-TAC	IL-4	C5/C5a	
	TNF- α	KC	IL-5	G-CSF	
	TREM-1	M-CSF	IL-6	GM-CSF	
		JE	IL-7	I-309	
		MCP-5	IL-10	Eotaxin	
		MIG	IL-13	sICAM-1	
		MIP-1 α	IL-12p70	IFN- γ	
		MIP-1 β	IL-16	IL-1 α	
		MIP-2	IL-17	IL-1 β	
		RANTES	IL-23	IL-1ra	
Neg		SDF-1	IL-27	IL-2	PosRef

抗体アレイを用いてサイトカイン、ケモカイン、補体を含めた 40 種類の液性因子 (図 10) について血清中の検出を行い、ストレス負荷直後と負荷のないコントロールとの間で比較を行った。

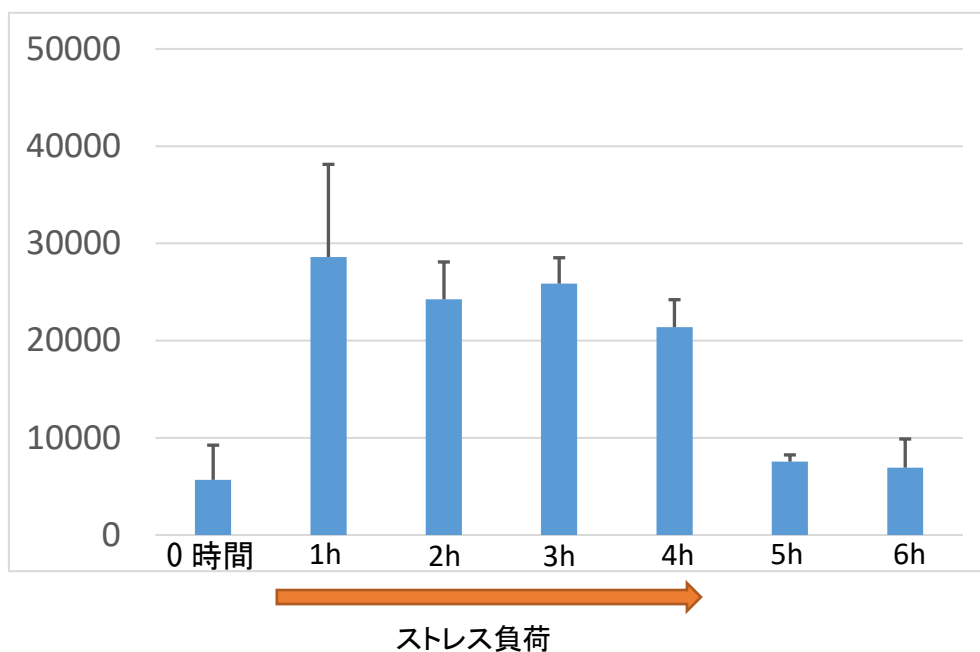
課題 2 の結果

課題 2 : 流産マウスモデルにおける精神的ストレスの影響

身体拘束ストレス負荷による血清中コルチコステロン値の変化

身体拘束ストレス負荷に伴う、ストレスバイオマーカーである血清中コルチコステロン値の変化について検討した。身体的拘束器具に非妊娠メスマウスを固定しストレス負荷前、ストレス負荷中、ストレス負荷後の血清中コルチコステロン値を経時的変化を測定した。負荷直前には平均 5677 ± 6175 pg/ml、負荷開始後は速やかに上昇して負荷開始後 1 時間の時点で平均 28597 ± 4636 pg/ml であった。その後、ストレス負荷中 4 時間までは高値を維持した。ストレス解除後には速やかに低下し、ストレス負荷前とほぼ同値まで下がった。このように血清中コルチコステロン値が上昇したことから本研究における身体拘束方法がマウスに対する精神的ストレス負荷法として有効であり (24, 25)、コルチコステロンがストレス負荷直後、あるいはストレス負荷解除直後には急速に分泌量が増減するなどストレスに敏感に反応するバイオマーカーであることが確認された (図 11)。

図 11 血清コルチコステロンレベル
(pg/ml)

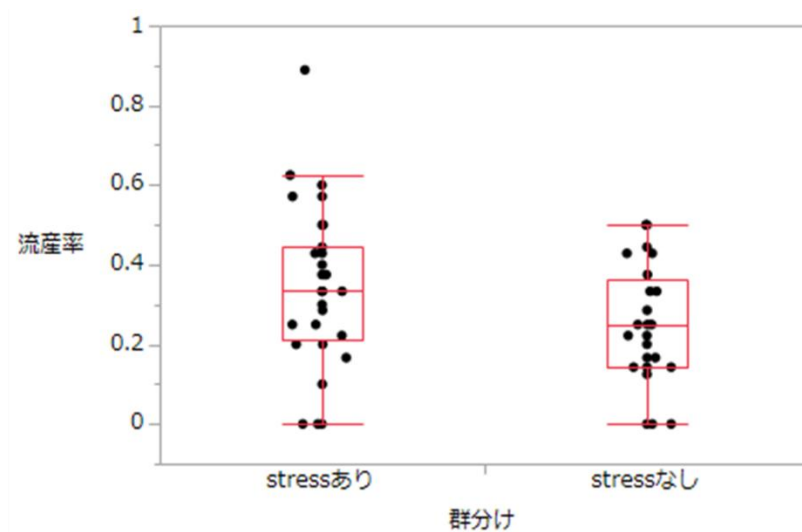


ストレス負荷のために用いたマウス用固定器具に非妊娠雌マウス（ICR10-12 週齢）を固定し、ストレス負荷させて血清中のコルチコステロン値を経時的に測定した。ストレス負荷（固定）開始時を0時間、ストレス負荷終了直時を4時間として計測した。使用した個体数は、0時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間（解放後1時間）、6時間（解放後2時間）いずれも各群 n=4 とした。棒グラフは各時間における mean を示し、エラーバーは SD 値を示す。

精神的ストレス負荷と流産率の関係

DBA/2J オスと交配した CBA/J メス妊娠マウスに対して身体的拘束ストレス負荷を妊娠 5.5 日から妊娠 7.5 日までの 3 日間、1 日 4 時間与え、その後妊娠 13.5 日に子宮内の流産発生を確認した。個々の妊娠マウスの子宮内の流産胎仔数/全妊娠胎仔数を個別流産率とした比較を行い、コントロール群の流産率 $25.0 \pm 14.2\%$ に対して、ストレス負荷群の流産率は $34.1 \pm 20.1\%$ と有意に ($p=0.042$) 高いことが確認された。各マウスの妊娠胎仔数には有意な差はなかった (図 12)。本研究を行った東京大学の動物実験施設の飼育環境下では CBA/J メスと DBA/2J オスの交配による流産率は本研究期間中に年間を通じて大きな変動はなく約 25% で一定していた。また、CBA/J メスと DBA/2J オス以外の交配における拘束ストレスによる影響を評価するため DBA/2J オス (10-12 週齢) と BL6 メス (10-12 週齢) 交配での妊娠マウス (雄マウスの種は流産マウスモデルと同じ) に同一のストレス負荷を与えて ($n=4$) 流産発生を確認した。その結果、合計流産率は 5.6% であり (表 6)、その流産率は一般的なマウス妊娠において 5% 程度の流産が発生するという既知の事実と一致した結果であり、ストレス負荷に伴う流産率への影響は否定的であった。

図 12 精神的ストレス負荷と個別流産率の比較



	stressあり	stressなし	P 値
個別流産率(%) 平均±SD	34.1±20.1%	25.0±14.2%	0.042
妊娠胎仔数 平均±SD	8.2±1.1	7.5±1.0	0.24

いずれも週齢 10-12 の DBA/2J 雄と交配した CBA/J 雌妊娠マウスを用いて身体拘束ストレス負荷を妊娠 5.5 日から妊娠 7.5 日までの 3 日間、午後 12 時から午後 4 時までの間の 1 日 4 時間与えたストレス負荷マウス群、ストレス非負荷マウス群に分け、ストレス負荷時以外は同一条件で飼育した。その後妊娠 13.5 日に子宮内の流産発生を確認した。上記は個々の妊娠マウスの子宮内の流産胎仔数/全妊娠胎仔数を個別流産率とし、Mann-Whitney U 検定により比較した。箱ひげ図で示された各分位点はひげ下端:10%、箱下端:25%、箱内の線:中央値、箱上端:75%、ひげ上端:90%である。

表 6 DBA/2J オスと交配した BL6 メス妊娠マウスにおける
 身体拘束後の流産率 (すべてのマウスの胎仔数から算定した流産率)

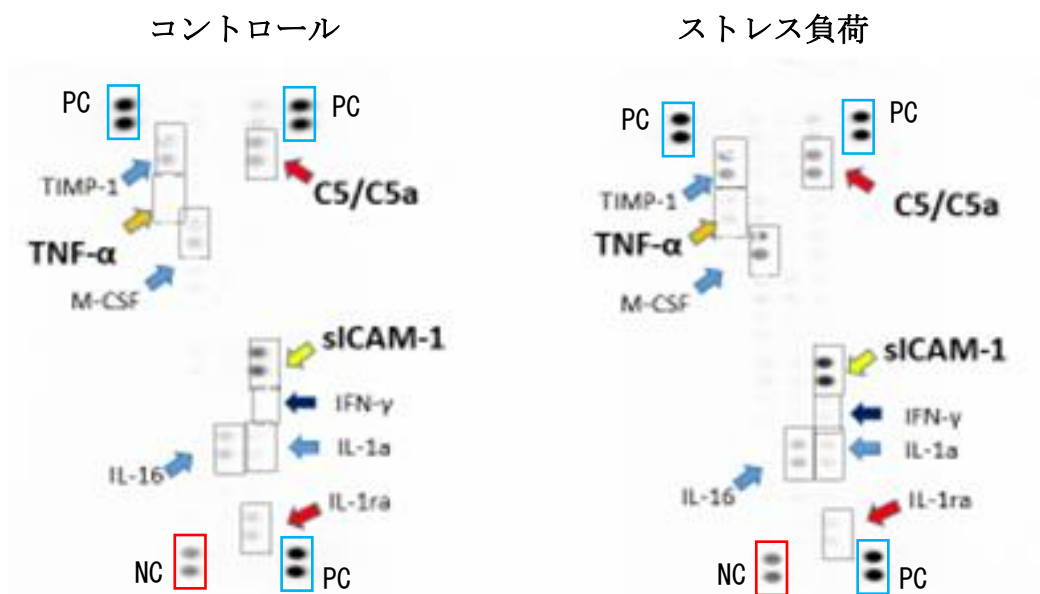
n=4	妊娠胎仔数	流産数	流産率(%)
マウス 1	10	1	10
マウス 2	8	0	0
マウス 3	9	1	11
マウス 4	9	0	0
(合計)	36	2	5.6

今回の実験のコントロールとして、10-12 週齢 DBA/2J 雄と 10-12 週齢 BL6 雌の交配妊娠マウスに流産モデルマウスの交配後 CBA/J 雌マウスと同じ条件で日齢 5.5 から 3 日間、1 日 4 時間の身体拘束ストレスを負荷し、日齢 13.5 に流産評価した結果を示す。

身体拘束ストレスに対する血清中ケモカイン・サイトカインの変化

本研究で使用した流産マウスモデルにおける流産発生機序として、サイトカインや補体を介した免疫学的な機序が報告されている。そこで、身体拘束ストレス負荷に伴う流産増加の機序について検討するため、抗体アレイを用いてサイトカイン、ケモカイン、補体を含めた40種類の液性因子(図10)について血清中の検出を行い、3日間のストレス負荷直後と負荷のないコントロールとの間での比較を行った。1回の実験で負荷群とコントロール群を3匹ずつとして、その3匹から得た血清を混合して1検体としたものをアレイ上で検出を行った。そしてこの実験を2回繰り返し行った。1回目の実験の結果を図13に示す。2回の実験でいずれもスポットが検出された液性因子はTIMP-1、TNF- α 、M-CSF、C5/C5a、IL-16、sICAM-1、IFN- γ 、IL-1a、IL-1raであった。そのうち2回の実験で一致してコントロール群とストレス負荷群でスポット濃度の差を認めた3種類の液性因子(TNF- α 、C5/C5a、sICAM-1)についてスポットの濃度をnegative controlとの比較で数値化してColor density index (CDI)として検討した結果を図14に示す。TNF- α 、C5/C5a、sICAM-1はいずれも2回の実験で一致してストレス負荷群の方がコントロール群よりも高値であった。(図14)

図 13 サイトカインアレイ結果



10-12 週齢の雌マウスに、身体拘束ストレス負荷を 1 日間のみ、午後 12 時から午後 4 時までの間の 4 時間与えたストレス負荷マウス群 (n=3) と、ストレス非負荷マウス群 (n=3) に分け、同じ時間に血清を採取した。それぞれの群の 3 匹のマウスから得た血清を混合して、抗体アレイによる血清中の 40 種類の液性因子 (図 16 参照) の検出を行った。同様の実験を 2 回行ったそのうちの 1 回の結果を示す。

PC(positive control) NC(negative control)

図 14-a 抗体アレイ上でのスポット濃度の定量的評価 (1 回目)

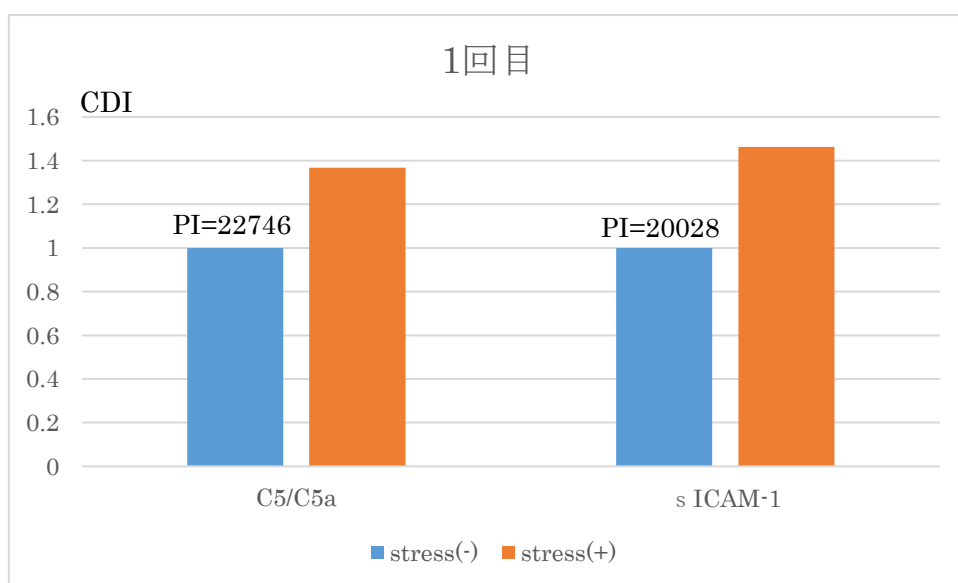
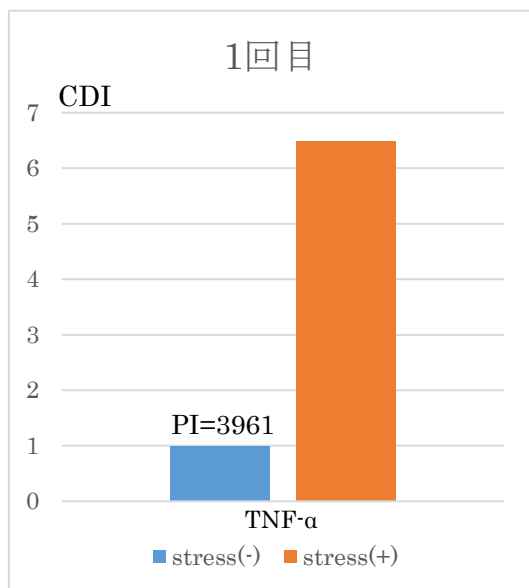


図 10、13 に示した実験においてサイトカインアレイで検出した 40 種類の液性因子についてスポットの濃度 (画素密度; pixel index (PI)) を、常に存在するストレス (-) を 1 とし て数値化して比較した。信号強度はストレス (-) に対する比率を Color Density Index (CDI) として検討した。スポットの濃度の差が肉眼的にも確認でき、2 回行った実験の結果が一致 していた 3 つの液性因子、TNF- α 、C5/C5a、s ICAM-1 について結果を示した。

図 14-b 抗体アレイ上でのスポット濃度の定量的評価 (2 回目)

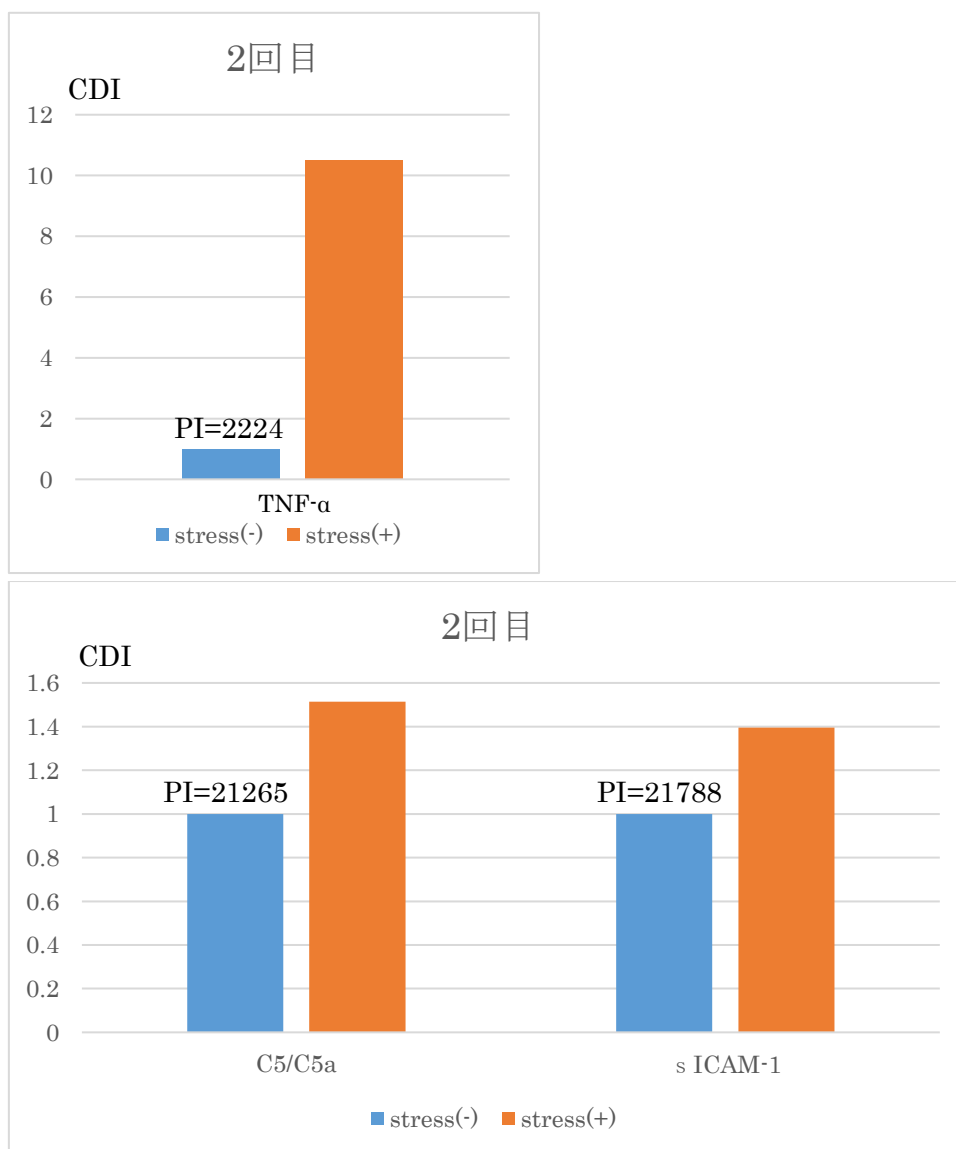


図 10、13 に示した実験においてサイトカインアレイで検出した 40 種類の液性因子についてスポットの濃度 (画素密度; pixel index(PI)) を、常に存在するストレス (-) を 1 とし て数値化して比較した。信号強度はストレス (-) に対する比率を Color Density Index (CDI) とし て検討した。スポットの濃度の差が肉眼的にも確認でき、2 回行った実験の結果が一致 していた 3 つの液性因子について結果を示した。

考察

本研究では、DBA/2J 雄と CBA/J 雌の交配による流産モデルにおいて、身体拘束ストレスによる精神的ストレスが流産率の上昇を生じることを確認した。その背景機序として、ストレス負荷に伴い免疫学的内部環境の変化が存在することが示唆された。不育症女性における臨床データの解析では、抑うつ・不安の指標である K6 のスコアに関して、受診後の K6 スコアおよび受診前後のスコアの改善は精神的ストレスマーカーであるコルチゾールの値と相関を認めた。さらに、不育症の原因因子が不明な群においては受診後も K6 スコアの改善が乏しい場合にはその後の妊娠における流産率が高くなっていた。

本研究では不育症専門外来を受診した女性患者の抑うつ・不安状態を K6 スコアにより評価し、初診時には 32%の患者が 15 点以上の値を示していた。15 点以上では精神科診察において気分障害・不安障害として診断される比率が半数程度であるという過去の報告(9)があることを考慮すると、繰り返す流死産の経験は不育症女性において強い精神的ストレスとなり、一部の患者では重度な抑うつ状態となっていることが示唆された。一方で、不育症専門外来において原因因子の精査、次回妊娠に対する対応説明を行った後の 2 回目の K6 の評価では 15 点以上を示す比率は 15%まで低下していた。これは時間的経過に伴う抑うつ・不安の自然軽快の影響も否定できないが、不育症外来の受診による疾患の理解や受容によりスコアの変化を生じたことが考えられる。一方で、スコアの改善が乏しく 2 回目の K6 スコアにおいてもスコア値が高かった

患者ではコルチゾールの値が高いことから、精神的ストレスによる影響が通常の不育症専門外来における対応では改善困難な状態に至った状態がコルチゾール高値として示されているのかもしれない。本研究において、K6 スコアは既往の流死産回数との相関を認めなかった。これは流死産の経験が抑うつ・不安を引き起こす程度にはその経験回数の多寡よりも個人差が大きい可能性を示している。また年齢と K6 スコアの相関がなかったことは、若年齢で次回妊娠の機会が多く残されていたとしても、抑うつ・不安を生じる程度には関連しないことを示している。

不育症患者における K6 スコアとその後の妊娠帰結の関連において、1 回目の K6 スコアが 15 点以上の高ストレス群では 2 回目の K6 スコアの改善が不良である場合にはその後の流産率が高いことを本研究にて確認した。一方で、1 回目 K6 スコアが低く過去の流死産による抑うつ・不安の発生の程度が弱いと考えられる患者では妊娠帰結と K6 スコアの間の関連は明らかではなかった。不育症外来初診時に抑うつ・不安の状態が高度で supportive care による対応によっても改善が認められない患者では重度で回復が困難な精神的ストレス状態となっており、そのような持続的で強い精神的ストレス状態は流産発症要因となっている可能性がある。さらに本研究において確認した流産マウスモデルにおける精神的ストレスが流産率の増加を生じるという現象は、不育症患者の解析結果を支持している。さらに、高ストレス群の中でなんらかの不育症の原因因子が特定された患者では K6 スコアの改善と流産率に関連を認めなかったこと

は、原因因子による流産発生に与える影響が、精神的ストレスに伴う影響よりも強いことを示している可能性がある。対照的に、原因因子不明群の患者では K6 スコアの改善と流産率の低下の関係が高ストレス群全体よりもより顕著な所見であったことから、抑うつ・不安という精神的ストレスが流産原因を特定できない不育症女性において従来のスクリーニング検査では確認できない隠された流産発症要因となっていることが示唆された。過去の疫学研究(26)では、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)の服用に関わらず、うつ病を合併する妊婦の流産率はうつ病のない妊婦よりも有意に高いと報告されている。本研究では SSRI を含む抗うつ薬を内服している対象者はいなかったが、こうしたうつ病に伴う流産率上昇に関する過去の報告は、本研究の結果を支持しており、うつ病自体に起因した何らかの要因によって一般女性よりも流産率が高くなっていることを示唆している。

不育症診療では、不育症患者の精神的支援の重要性が認識されており、日本を含め諸外国のガイドラインでも指摘されている(10, 11, 27)。これはあくまでも患者の精神的状態の改善を目的とした推奨に留まるものであり、精神的支援による精神的ストレスの解消が不育症患者の妊娠予後の改善に寄与するかどうかについてエビデンスは確立していない。本研究の不育症女性の臨床データの解析については、対象女性は全員が不育症外来における精神的支援を受けた状態においてその後の流産率を見ている。そのため、本研究の結果からは精神的支援の有効性についての証明はできない。ただし、低ストレ

ス群における次回妊娠での流産率が 20%程度であるのに対して、高ストレス群ではそうした精神的支援を行っても抑うつ・不安の改善が見られない女性ではそれを上回る流産率となっていることが示された。そうした集団における流産率を低下するためには、精神的支援の強化や精神科的治療の介入といったさらなる対応が必要であるのかもしれない。原因不明の不育症患者カップルの中で特別な出産前カウンセリングや精神的サポートを受けた女性での妊娠成功率は 86%、対して特別な出産前のケアを受けずに経過観察していた女性の妊娠成功率は 33%という報告がある(28, 29)。

また、マウスモデルの結果が示すように炎症性免疫学的機序がうつと流産の双方に介在するという観点から炎症の制御という新たな視点からの治療も考えられる。体内のオメガ 3 脂肪酸とオメガ 6 脂肪酸のバランスがうつ病の発生に関係し、オメガ 3 脂肪酸の摂取がうつ病の予防・改善に寄与するということが知られている(30)。オメガ 6 脂肪酸代謝経路であるアラキドン酸カスケードから生じる炎症性エイコサノイドの作用に対して、オメガ 3 脂肪酸の代謝産物は拮抗的に働くことが近年の研究により示されている(31)。そのためうつ病発症の背景にある炎症性メディエーターの作用をオメガ 3 脂肪酸代謝産物が抑制するということが推測されている。炎症性反応がうつ病のみならず流産発生にも関わる機序であることを前提とすると、オメガ 3 脂肪酸の摂取は原因不明の不育症女性に対する新たな治療アプローチとなる可能性がある。

本研究では、マウスモデルおよび不育症女性の臨床データから精神的ストレスが流産を誘発する因子となるという仮説を支持する結果を得た。その背景機序として精神的ストレスが補体やサイトカインの作用に伴う炎症性反応を惹起している可能性が示された。本研究の内容は流産の原因因子として精神的ストレスをとらえるという不育症の病態理解、治療戦略に対して新たな視点をもたらすものである。

マウスモデル実験ではコルチコステロン、不育症女性ではコルチゾールをそれぞれ精神的ストレスマーカーとして解析した。副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドには、コルチゾール、コルチコステロン、アルドステロンの3種類がある。これらのグルココルチコイドの中で、ヒトでは生体内の存在量としてコルチゾールが最も多く（1日約20 mg分泌）、グルココルチコイド活性の約95%を占める(32)。一方でマウスではコルチコステロンが生体内量、活性ともに最も高く代表的グルココルチコイドとなっている。ヒトのコルチゾール、マウスのコルチコステロンの生体作用として炭水化物、脂肪、タンパクの代謝制御、血圧や血糖値の上昇効果が知られている(25)。一方でグルココルチコイドの慢性的増加あるいは過剰状態による負の作用として、免疫機能の低下や性周期の異常、神経細胞機能の障害が知られている(33)。様々な外的・内的ストレスに対する反応としてグルココルチコイドが産生されることが知られている。本研究において確認された身体拘束ストレスに対するCBA/J妊娠マウス血清中のコルチコステロンの濃度上昇、K6スコアと不育症女性におけるコルチゾール濃度

の相関性については精神的ストレスに対する反応として理解できる。不育症女性を対象としたコルチゾールと精神的ストレスの関係についてこれまで報告はないが、今回の結果はコルチゾールが不育症女性の抑うつ・不安の程度を推測するバイオマーカーとなっている可能性を示している。

本研究では通常の飼育環境下でも高い流産発生率を示す(23)、DBA/2J 雄 x CBA/J 雌の交配モデルを行い精神的ストレスと流産率の関係を検討した。本研究で採用した方法での身体拘束ストレスは、マウスに対する抑うつ状態を起こす確立された方法として知られている(34)が、このストレス負荷による流産率の上昇は本研究により初めて確認された。この流産マウスモデルに関しては音響ストレスによる影響を調べた過去の報告がある(35-37)。その中ではネズミの撃退を目的として商業的に販売されている超音波発生装置を用いて、DBA/2J 雄と交配した CBA/J 雌マウスに妊娠 5 日目に 24 時間の超音波ストレスを与えると流産率が上昇したとされている(35, 36)。音響ストレスもマウスに対して抑うつを生じる手法の一つとして知られており、本研究の結果を支持している。つまり、抑うつを生じる精神的ストレス刺激はこの流産マウスモデルにおいて流産増加を生じる要因となると考えられる。

本研究では身体拘束ストレス後に血清中の TNF- α 、C5/C5a、sICAM-1 などの炎症性メディエーターの濃度が増加していることを確認した。DBA/2J 雄 x CBA/J 雌交配において流産が誘発される機序に関する過去の報告では、外的・内的ストレスに対して、

サブスタンス P の作用を介した CD8 陽性 T 細胞が産生する TNF の産生が一般的な交配と比較して生じやすいことが指摘されている (38)。TNF- α に誘導される炎症状態はサイトカイン環境を Th1 方向へ誘導し、妊娠維持に重要な Th2 優位なサイトカインバランスを環境に対して負の影響を与え、また TNF- α 自体が直接的に絨毛細胞障害を生じることが知られている (39-41)。また、不育症女性において TNF-a は血清中濃度が上昇しており、胎盤・脱落膜での発現が亢進していることも報告されてきた (42, 43)。補体経路の活性化が、このマウスモデルにおける流産発生の鍵となっていることが知られている (44)。DBA/2J 雄との交配では CBA/J 妊娠マウスの着床部位に C3、C4 の集積が認められ、さらに C5 の中和抗体の投与がこのモデルの流産率を低下させたと報告されている (45, 46)。こうしたことから、本研究における身体拘束ストレス後の TNF- α 、C5/C5a の血清濃度の上昇は流産率の増加の機序に関わっている可能性がある。ICAM-1 は血管内皮細胞を含めた種々の細胞に発現する接着分子の一つで、リガンドでありリンパ球上に発現する LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) との相互作用により、リンパ球の血管内皮細胞への接着に関与していることが知られている (47)。ICAM-1 は IL-1、IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカインによりその発現が増強され、その細胞外断片である sICAM-1 は、敗血症、癌などの疾患において血清濃度が上昇すると報告されてきた (48, 49)。不育症女性や流産発生机序と sICAM-1 との関連について明確に解明した過去の研究はなく (50, 51)、本研究において身体拘束ストレス

後に確認された sICAM-1 の濃度の上昇は同時に検出されている TNF- α の増加に伴う 2 次的な反応である可能性がある。

DBA/2J 雄 x CBA/J 雌の交配モデルではこれまで LPS などの炎症誘発物質の投与 (52) やサイトカイン投与により免疫学的ストレスに対する反応をみる手法による流産発生機序の研究が多く行われてきた (53)。本研究の結果は、この流産モデルにおいて精神的ストレスが免疫学的内部環境の変化を介して流産を誘発する可能性という新たな視点を与えている。うつ患者では末梢血中サイトカイン濃度の研究によると、Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D) により評価した、うつの状態スコアが高いほど末梢血中の IL-6、TNF- α の濃度が高いことが報告されている (54)。さらに臨床的に使用される IFN- γ 、IL-2 の投与の副作用としてうつの発生がある (55)。セロトニンの減弱はうつ発症のトリガーとなるが、IFN- γ 、TNF- α はセロトニンの前駆物質であるトリプトファンの分解酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase の発現を増強して結果としてセロトニン作用を減弱させることが指摘されている (56)。これらのことは、うつの病理機序に炎症性サイトカインの働きが深く関与していることを示唆している。一方で、TNF- α を含めた炎症性サイトカインが妊娠維持において負の影響を与えることは動物モデルやヒトの臨床データからエビデンスが確立している (14)。以上よりうつの発症と流産の間には、炎症性サイトカインの作用が共通した機序として介在していることが考えられる。

本研究の限界として、第一に1回目、2回目のいずれかのK6スコアの回答を得られなかった「脱落例」が多く存在し、脱落例となった理由や脱落例と研究対象例の集団間の属性の差異について検討できなかったため、それが結果に影響している可能性がある点が挙げられる。また、さらに2回のK6のスコアが回収できた研究対象例で妊娠後に不育症外来を受診しなかった女性については妊娠予後との関係の解析からもれてしまうため、その点についても結果の解釈には注意が必要となる。

第二にコルチコステロンと流産の直接的関連については解明できなかったことがあげられる。本研究の課題2. 流産マウスモデルを用いた実験の結果では、精神的ストレス負荷による血清中コルチコステロン値の上昇を確認し、精神的ストレス負荷により流産率が上昇する結果が得られた。しかしながら、精神的ストレス負荷をうけたマウスの血清中コルチコステロン値の上昇は、ストレスのバイオマーカーとして有効であることは確認できたものの、流産にどのように作用しているのか、コルチコステロンの流産の機序への関わり方については解明できていない。本研究の中で、精神的ストレスによるマウス血清中の炎症性サイトカインの上昇を確認したが、これまでの研究ではこれら炎症性サイトカインによる慢性炎症が、流産を引き起こすことが報告されている。すなわち、炎症性サイトカインを介する精神的ストレスと流産との関連が示唆され、流産機序へのコルチコステロンの関わり方の解明が今後の課題である。

結語

本研究における不育症女性の臨床データおよびマウスモデルを用いた検討の結果では精神的ストレスが流産を誘発する因子となることが示唆された。本研究の内容は流産の原因因子として精神的ストレスをとらえるという不育症の病態理解、治療戦略に対して新たな視点をもたらすものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂きました永松健先生、川名敬先生、大須賀穰先生、藤井知行先生に深く御礼申し上げます。

また、研究、実験を通してご協力頂きました共同研究者の先生方、秋葉直也先生、鮫島大輝先生、藤井達也先生、井上恵莉先生、保谷茉莉先生、入山高行先生、佐山晴亮先生、研究開始時よりご指導頂きました山下隆博先生に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. 反復・習慣流産（いわゆる「不育症」）の相談対応マニュアル 2012 年「地域における周産期医療システムの充実と医療資源の適正配置に関する研究」成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業.
2. Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T. Frequency of recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: the Okazaki Cohort Study in Japan. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 39(1):126-31,2013;.
3. Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *European journal of human genetics* : EJHG. 9(7):539-47,2001.
4. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ (Clinical research ed)*. 320(7251):1708-12,2000.
5. Sakakibara Y, Hashimoto S, Nakaoka Y, Kouznetsova A, Hoog C, Kitajima TS. Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nature communications*. 6:7550, 2015.
6. 日本産科婦人科学会、日本産婦人科医会. 産婦人科診療ガイドライン産科編 2014.
7. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Human reproduction*. 27(8):2297-303,2012.
8. 平成 20～22 年度厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）総合研究報告書 分担課題：本邦における不育症のリスク因子とその予後に関する研究.
9. 江見弥生、藤原順子、中塚幹也. 不育症女性の抑うつ傾向と顕在性不安の検討：K6、MAS を使用して. *日本カウンセリング学会誌*. 9(1),2010.
10. Prusova K, Churcher L, Tyler A, Lokugamage AU. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists guidelines: how evidence-based are they? *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 34(8):706-11, 2014.
11. Gameiro S, Boivin J, Dancet E, de Klerk C, Emery M, Lewis-Jones C, et al. ESHRE guideline: routine psychosocial care in infertility and medically assisted reproduction-a guide for fertility staff. *Human reproduction*. 30(11):2476-85, 2015.
12. 新名理恵、坂田成輝、矢富直美、本岡昭. 心理的ストレス反応尺度の開発. *心身医学*. (30):29-30, 1990.
13. 鈴木伸一、嶋田洋徳、三浦正江、片柳弘司、右馬力也、坂野雄二. 新しい心理的ストレス尺度（SRS-18）の開発と信頼性・妥当性の検討. *行動医学研究*. (4):22-9, 1997.

14. Sugiura-Ogasawara M, Furukawa TA, Nakano Y, Hori S, Aoki K, Kitamura T. Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in recurrent spontaneous aborters. *Human reproduction*. 17(10):2580-4, 2002.
15. 古川壽亮ら. 一般住民におけるトラウマ被害の精神影響の調査手法 マニュアル (2015 年 2 月版) 2015.
16. Inoue K, Takahashi K, Takahashi Y. [Influence of change in feeding regime and food deprivation on circadian rhythm of adrenal cortical activity in rats (author's transl)]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 52(9):898-907, 1976.
17. Kurumaji A, Umino M, Nishikawa T. Effects of novelty stress on hippocampal gene expression, corticosterone and motor activity in mice. *Neurosci Res*. 71(2):161-7, 2011.
18. Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Human reproduction*. 30(4):777-82, 2015.
19. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 558(Pt 1):263-75, 2004.
20. Wakizono T, Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, Suzuki G, Toda H, et al. Stress vulnerabilities in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiology & behavior*. 90(4):687-95, 2007.
21. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 34(1):13-25, 2002.
22. Jankord R, Herman JP. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1148:64-73, 2008.
23. Bonney EA, Brown SA. To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction*. 147(5):R153-67, 2014.
24. Giralt M, Armario A. Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiology & behavior*. 45(3):477-81, 1989.
25. Mello AF, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Revista brasileira de psiquiatria*. 25(4):231-8, 2003.
26. Andersen JT, Andersen NL, Horwitz H, Poulsen HE, Jimenez-Solem E. Exposure to selective serotonin reuptake inhibitors in early pregnancy and the risk of miscarriage. *Obstetrics and gynecology*. 124(4):655-61, 2014.
27. Gameiro S, Boivin J, Dancet E, Emery M, Thorn P, Van den Broeck U, et al. Qualitative

research in the ESHRE Guideline 'Routine psychosocial care in infertility and medically assisted reproduction - a guide for staff'. *Human reproduction*. 31(8):1928-9, 2016.

28. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *American journal of obstetrics and gynecology*. 148(2):140-6, 1984.

29. Liddell HS, Pattison NS, Zanderigo A. Recurrent miscarriage--outcome after supportive care in early pregnancy. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 31(4):320-2, 1991.

30. Peet M, Horrobin DF. A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Archives of general psychiatry*. 59(10):913-9, 2002.

31. Anisman H, Hayley S, Turrin N, Merali Z. Cytokines as a stressor: implications for depressive illness. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 5(4):357-73, 2002.

32. Adcock IM, Mumby S. Glucocorticoids. *Handbook of experimental pharmacology*. 2016.

33. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 15(11):7539-47, 1995.

34. Arck PC, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Clark DA. Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice. *American journal of reproductive immunology*. 33(1):74-80, 1995.

35. Blois SM, Joachim R, Kandil J, Margni R, Tometten M, Klapp BF, et al. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *Journal of immunology*. 172(10):5893-9, 2004.

36. Blois S, Alba Soto CD, Olmos S, Chuluyan E, Gentile T, Arck PC, et al. Therapy with dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model. *American journal of reproductive immunology*. 51(1):40-8, 2004.

37. Arck PC. Stress and pregnancy loss: role of immune mediators, hormones and neurotransmitters. *American journal of reproductive immunology*. 46(2):117-23, 2001.

38. Clark DA, Manuel J, Lee L, Chaouat G, Gorczynski RM, Levy GA. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and (TNF-alpha + IFN-gamma) on pregnancy loss. *American journal of reproductive immunology*. 52(6):370-8, 2004.

39. Clark DA, Croitoru K. TH1/TH2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gammadelta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure

- of pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 45(5):257-65, 2001.
40. Girardi G. Complement inhibition keeps mothers calm and avoids fetal rejection. *Immunol Invest*. 37(5):645-59, 2008.
 41. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrüecker HW, Levy GA. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *Journal of immunology*. 160(2):545-9, 1998.
 42. Fest S, Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Demuth HU, Hoffmann T. Stress and substance P but not the substance P-metabolite SP5-11 trigger murine abortion by augmenting TNF- α levels at the feto-maternal interface. *Scand J Immunol*. 63(1):42-9, 2006.
 43. Kamoi M, Fukui A, Kwak-Kim J, Fuchinoue K, Funamizu A, Chiba H, et al. NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *American journal of reproductive immunology*. 73(6):557-67, 2015.
 44. Petitbarat M, Durigutto P. Critical Role and Therapeutic Control of the Lectin Pathway of Complement Activation in an Abortion-Prone Mouse Mating. *Journal of immunology*. 195(12):5602-7, 2015.
 45. Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*. 203(9):2165-75, 2006.
 46. Girardi G. Pravastatin prevents miscarriages in antiphospholipid antibody-treated mice. *J Reprod Immunol*. 82(2):126-31, 2009.
 47. Takeshita T, Satomi M, Akira S, Nakagawa Y, Takahashi H, Araki T. Preventive effect of monoclonal antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associate antigen-1 on murine spontaneous fetal resorption. *American journal of reproductive immunology*. 43(3):180-5, 2000.
 48. Hansen D, Bogatzki S, Syben R, Bechrakis NE, Dopjans D, Spies C, et al. Effect of profound normovolemic hypotension and moderate hypothermia on circulating cytokines and adhesion molecules. *Shock*. 12(5):335-9, 1999.
 49. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, Nowak A, Grodecka-Gazdecka S. The clinical usefulness of assessing the concentration of cell adhesion molecules sVCAM-1 and sICAM-1 in the serum of women with primary breast cancer. *Contemporary oncology*. 18(4):252-9, 2014.
 50. Prados MB, Solano ME, Friebe A, Blois S, Arck P, Miranda S. Stress increases VCAM-1 expression at the fetomaternal interface in an abortion-prone mouse model. *J Reprod Immunol*. 89(2):207-11, 2011.
 51. Comba C, Bastu E, Dural O, Yasa C, Keskin G, Ozsurmeli M, et al. Role of inflammatory

- mediators in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 104(6):1467-74.e1., 2015.
52. Foerster K, He W, Manuel J, Bartczak A, Liu M, Markert UR, et al. LPS-induced occult loss in mice requires FGL2. *American journal of reproductive immunology*. 58(6):524-9, 2007.
53. Tsumuraya T, Okamura K, Uehara S, Hamasaki Y, Takabayashi T, Kurahayashi Y, et al. [Immunological mechanism of pregnancy and miscarriage--a study with a murine spontaneous miscarriage model]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 44(2):195-202, 1992.
54. Christian LM, Franco A, Glaser R, Iams JD. Depressive symptoms are associated with elevated serum proinflammatory cytokines among pregnant women. *Brain, behavior, and immunity*. 23(6):750-4, 2009.
55. Kaster MP, Gadotti VM, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. *Neuropharmacology*. 62(1):419-26, 2012.
56. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 29(2):201-17, 2005.