

学位申請論文

## Th1 サイトカインと LPS 刺激による 脱落膜からの IFN- $\gamma$ の産生

—異常妊娠におけるグラム陰性菌への感受性亢進の機構解明に向けて—

獨協医科大学 産科婦人科学

根岸 正実

**要 旨** 妊娠の成立と維持には Th2 優位の免疫環境が重要であり, Th1 型の応答は, 母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し, 胎児胎盤を傷害する. さらに両者の関係に, 第三の因子として細菌やウイルス感染が影響する可能性がある. 本研究ではグラム陰性菌の内毒素である LPS が Toll 様受容体 (TLR) 4 を介して脱落膜リンパ球を活性化する過程に, Th1 誘導サイトカインがどのように作用するのかを検討することを目的とした. 妊娠初期に, 社会経済的理由にて人工妊娠中絶を受けた妊婦より, 脱落膜単核球を採取して IL-2, IL-12, および LPS を添加して培養し, 上清中の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を ELISA にて測定した. フローサイトメトリーで CD3, CD56, TLR4 発現を解析した. その結果, 脱落膜単核球のほとんどは CD56 陽性 CD3 陰性細胞であり, TLR4 は CD56 陽性, CD56 陰性細胞両者に発現していた. IL-2, IL-12 は TLR4 発現には影響はなかった. 脱落膜単核球は, LPS 単独で IFN- $\gamma$  を産生するが, IL-2, IL-12 存在下ではその産生が著しく増強する. 脱落膜単核球は LPS 刺激により TNF- $\alpha$  を産生するが, IL-2, IL-12 は, その産生に影響しない. そのメカニズムとして IL-2, IL-12 と LPS は相互に感受性を高めて IFN- $\gamma$  産生を増強するが, TNF- $\alpha$  の産生は異なった調節を受けている可能性が示唆された.

**Key Words** : 脱落膜単核球, LPS, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12

### 緒 言

グラム陰性菌はヒトの消化管や女性生殖器の常在菌の一部として生理的に共生している. しかし, その細胞壁の構成成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) には強い生物活性がある. LPS は, マクロファージや樹状細胞のみならず, 上皮や間質細胞に発現する TLR4 によって認識され, 炎症性サイトカインの誘導を介した自然免疫応答が生じる<sup>1)</sup>. LPS のレセプターとしての TLR4 の役割は TLR の中でも特に重点的に研究され, 宿主の防御反応のみならず様々な炎症性疾患との関連が報告されている. 生殖医学領域では 1960 年代から, 齧歯類において, LPS 投与によって流産が誘発

されることが多くの研究者により報告されてきた<sup>2~5)</sup>. その機序は, 全身性のショックに付随するものと考えられてきたが, 近年, Clark らにより新たなメカニズムが発表された. 彼らによれば, CBA  $\times$  DBA/2 のマウスにおける自然流産は Th1 の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  によって引き起こされるが, 第 3 の刺激として, TLR danger signal に依存する, すなわち LPS が IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  産生を増強することが流産に必須の過程であるとするものである<sup>6)</sup>. ヒトの臨床例においても, 自然流産や切迫流産と LPS の関係を示唆する多くの研究がある<sup>7~9)</sup>. また, LPS の初期胎盤や栄養膜細胞に及ぼす影響についての研究は多いが, ヒトの脱落膜免疫細胞に対する研究は少ない. 本研究では, LPS が脱落膜単核球 (Decidual mononuclear cells, DMNC) に対してどのように作用するのか, 特に, LPS に誘導される IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  に及ぼす IL-2, IL-12 の影響について検討した.

平成 21 年 9 月 28 日受付, 平成 21 年 12 月 14 日受理  
別刷請求先: 根岸正実

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学 産科婦人科学

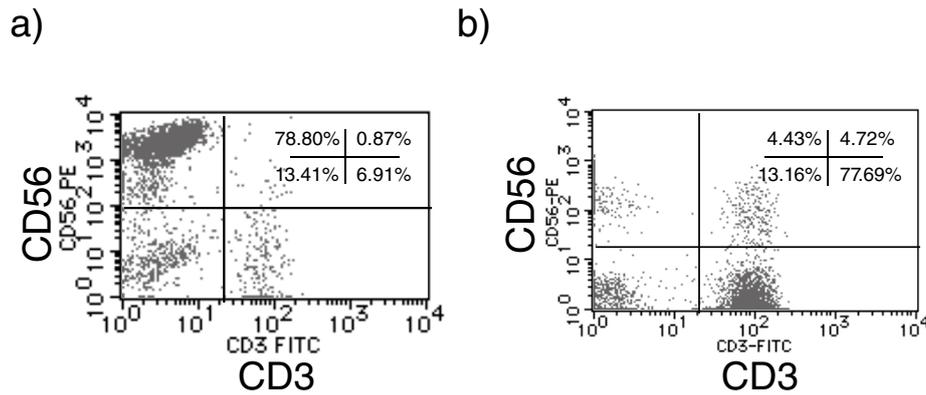


図1 CD3抗体, CD56抗体で染色したDMNC (妊娠7週) (a) とPBMC (b) のフローサイトメトリーの結果を示す。

## 方 法

### 1. 脱落膜免疫細胞の採取

脱落膜組織は, 社会経済的な理由で人工妊娠中絶を受けた初期妊婦10名より採取した。事前に, 本人・パートナーより文書による承諾を得た。また, 以下のすべての実験は, 獨協医科大学および日本大学医学部の倫理委員会の承認を得て行われた。

静麻下に清潔操作にて子宮内容物を採取し, 胎盤絨毛より6時間以内に脱落膜を分離細切し, メッシュを通し, リンホセパール I (IBL, Gunma, Japan) を用い, 比重遠心法にてDMNCを分離した。

### 2. フローサイトメトリー

本研究では, 以下のFITCおよびRPE標識モノクローナル抗体を用いた。使用した抗体は, 抗CD3抗体 (clone HIT3a) (BD バイオサイエンス, San Jose, CA, USA), 抗CD56抗体 (clone B159) (BD バイオサイエンス), 抗TLR4抗体 (clone HTA125) (IMGENEX, San Diego, CA, USA), 抗CD25抗体 (clone B1.49.9) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), 抗CD212抗体 (clone 114) (BD バイオサイエンス)。フローサイトメーターは488 nmのアルゴンレーザー搭載のFACSCalibur (BD バイオサイエンス) を用いた。データの解析ソフトは, CellQuest (BD バイオサイエンス) を使用した。

### 3. RT-PCR

Fast Pure RNA kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用い, 添付の実験プロトコールによりDMNCからRNAを抽出した。DMNCにおけるTLR4の発現をRNAレベルで確認するため, RT-PCRを行った。コンタミネーションを避けるため逆転写とPCRはPrimeScript One

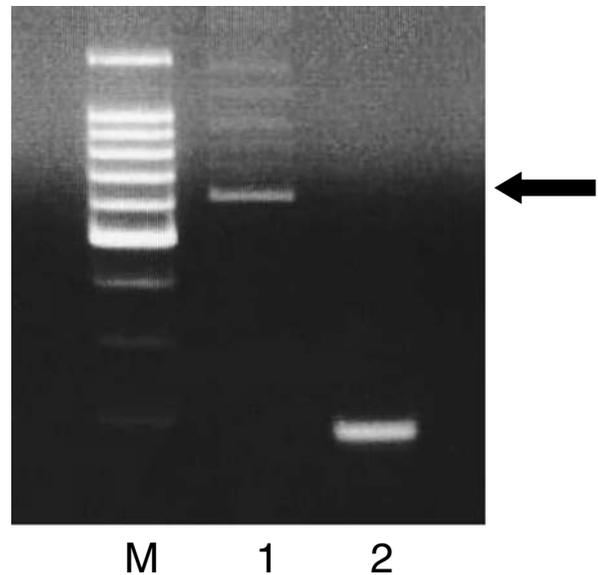


図2 RT-PCRによるDMNCのTLR4のmRNAの発現を示す。Lane 1にDMNCのTLR4が発現している。Lane Mは分子量サイズマーカーであり, Lane 2はβアクチンである。

Step RT-PCR Kit Ver.2.0 (Takara Bio) を用いて, single tubeで行った。プライマーはLauzonらにより報告されたものを用いた<sup>10)</sup>。forward ; 5'-CTGGACCTCTCTCAGTGTC-3', reverse ; 5'-GGCAGAGCTGAAATGGAGG-3'。βアクチンをスタンダードとして用いた。forward ; 5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3', reverse ; 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTA-GAAGCA-3'。以下の条件で反応を行った。変性94°C 30秒, アニーリング 56°C 30秒, 延長反応72°C 1分, この反応を30サイクル行った。増幅産物は2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

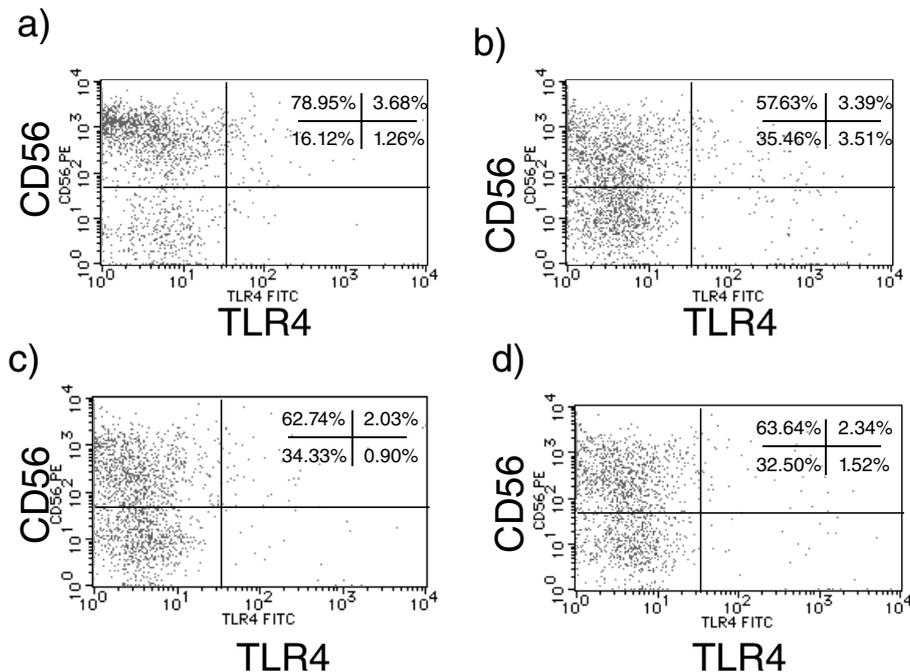


図3 DMNCにおけるTLR4の発現を検討したフローサイトメトリーの結果を示す。  
 a) 採取直後のDMNC. b) 無添加で48時間培養後のDMNC. c) IL-2, IL-12を加え48時間培養したDMNC. d) IL-2, IL-12, LPSを加え48時間培養したDMNC.

#### 4. DMNCのIL-12, IL-12, LPSによる刺激培養

DMNCは24-wellプレートで、1 wellあたり、 $1.0 \times 10^5$ 個/mlの濃度、全量500  $\mu$ lで培養した。そこにIL-2 (100 U/ml) (BDバイオサイエンス) とIL-12 (10 U/ml) (BDバイオサイエンス) を加えて、*E. coli* (K12株) 由来のLPS 1  $\mu$ g/ml (Invivogen, San Diego, CA, USA) を加えたものと、加えないものを48時間培養した。培養液は、10%のFBS (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) 加RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で、防腐のためペニシリン (100 U/ml) とストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml) を加えた。37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>の状態では培養し、一定時間後上清を回収して4 $^{\circ}$ C, 3000 gで5分間遠心し-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

#### 5. ELISA

培養上清中のIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ をHuman IFN- $\gamma$  ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC, Rockford, IL, USA) とHuman TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC) にて測定した。方法は添付された実験プロトコールにしたがい、各々2回行った。

#### 6. 検定

測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。各データの解析はMann-Whitney検定にて行い、危険率5%で有意差

ありとした。

## 結果

#### DMNC中のCD56陽性細胞の存在

はじめに、DMNCのCD56陽性とCD3陽性の細胞数を測定した。図1にDMNCと末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) の典型的な測定結果を示す。以前より報告されているように、DMNCの大部分はCD56強陽性の細胞であった ( $80.16 \pm 7.59\%$ ) (図1a)。一方、CD3陽性細胞の測定値は  $6.86 \pm 3.71\%$  であった。これに対し、PBMCのCD56陽性細胞は4.43%で、わずかに認めるのみであった (図1b)。

#### DMNCにおけるTLR4の発現

TLR4はグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるLPSのレセプターである。RT-PCRによって、DMNCにおけるTLR4 mRNAの発現を確認した (図2)。ついで、フローサイトメトリーでTLR4の発現を確認した。DMNCの採取直後のTLR4の発現率は、 $3.87 \pm 1.49\%$  であった (図3a)。CD56陽性細胞も、CD56陰性細胞もどちらもTLR4を発現していた。TLR4の発現はIL-2, IL-12の刺激および、IL-2, IL-12とLPSの刺激で若干の減少傾向を認めた (図3c, d)。グラム陰性菌が母児間の免疫寛容に影響を及ぼす可能性があるかどうかについて

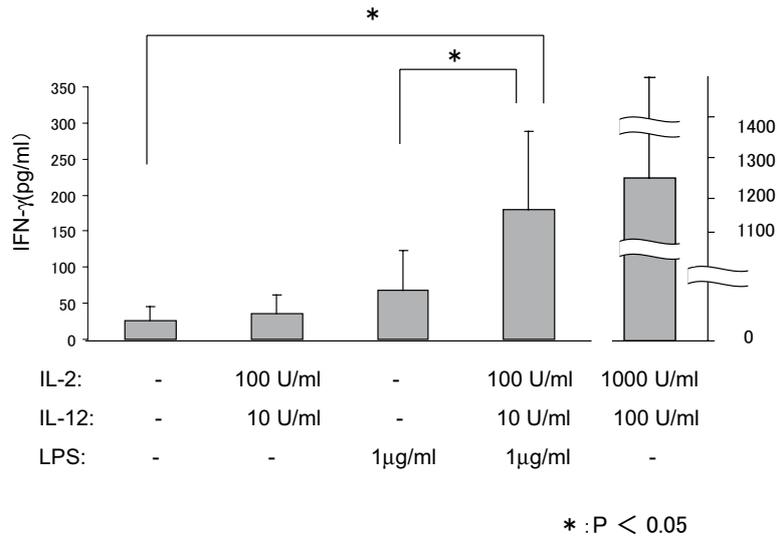


図4 DMNCのLPS刺激によるIFN- $\gamma$ の産生  
臨床検体 (n=8) から得られたDMNCをLPS添加・無添加, IL-2, IL-12添加・無添加条件で48時間培養し, ELISAにてIFN- $\gamma$ を測定した。

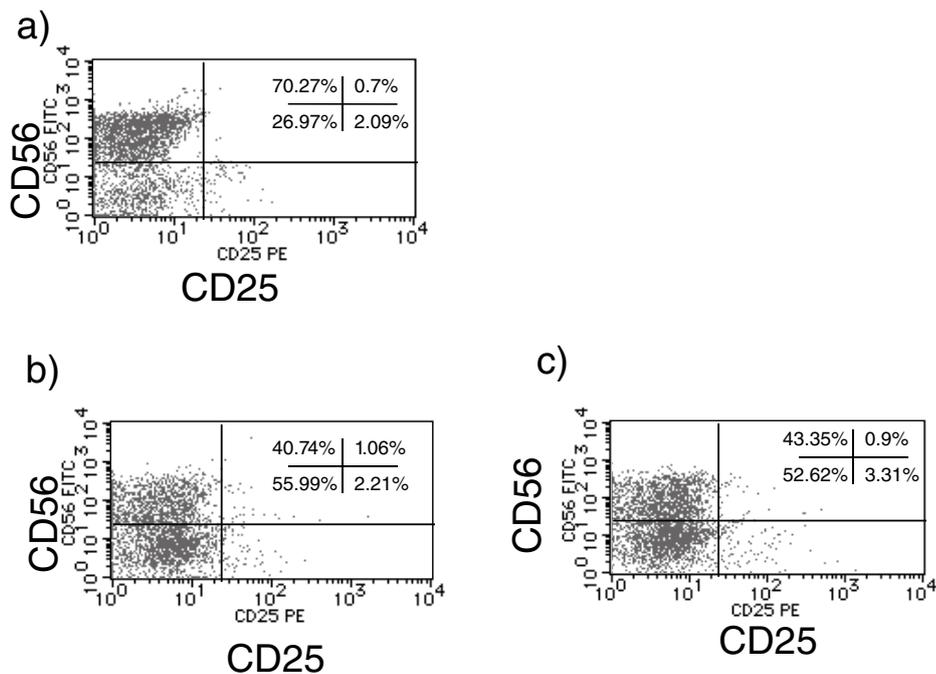


図5 DMNCにおけるCD25の発現量を検討したフローサイトメトリーの結果を示す。  
a) 採取直後のDMNC. b) 無添加で48時間培養後のDMNC. c) IL-2, IL-12, LPSを加え48時間培養したDMNC.

て, 以下の検討を行った。

#### IL-2, IL-12存在下でのDMNCのIFN- $\gamma$ 産生はLPSにより増強される

IL-2は抗原やマイトジェンに活性化されたTリンパ球により産生され, 活性化型Tリンパ球とNK細胞の増殖

に必要なサイトカインである。IL-12は主に抗原提示細胞より産生され, Th1免疫応答を亢進する重要なサイトカインのひとつと考えられている。Hayakawaらを含め多くの研究者が先に報告したように, IL-2とIL-12は相乗的にLymphokine activated killer (LAK) 活動性を増強する<sup>11~14)</sup>。その事実を踏まえて, 本実験ではDMNC

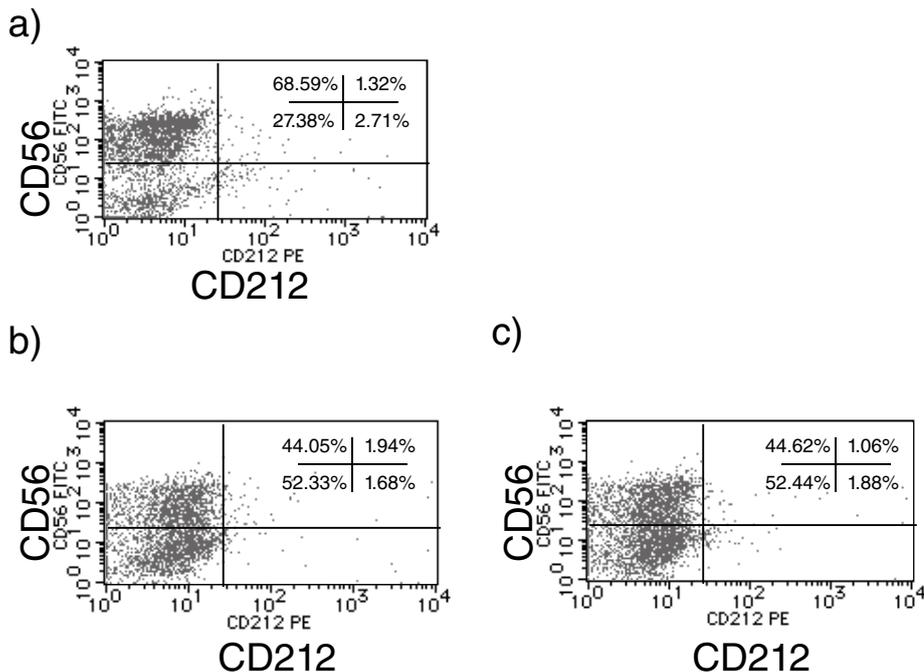


図6 DMNCにおけるCD212の発現量を検討したフローサイトメトリーの結果を示す。  
a) 採取直後のDMNC. b) 無添加で48時間培養後のDMNC. c) IL-2, IL-12, LPSを加え48時間培養したDMNC.

をIL-2, IL-12存在下で, LPS添加, 無添加でIFN- $\gamma$ の産生を検討した. 高濃度のIL-2 (1000 U/ml) とIL-12 (100 U/ml) の添加による48時間培養でDMNCはIFN- $\gamma$ を産生した. しかし, それより低い濃度であるIL-2 (100 U/ml) とIL-12 (10 U/ml) の添加では, IFN- $\gamma$ は産生しないか, しても少量であった. 加えて, LPS単独でもIFN- $\gamma$ の産生はわずかであった. しかし, LPSおよびIL-2, IL-12の刺激でIFN- $\gamma$ の産生は著しく増強した(図4).

LPSがIL-2, IL-12の反応性を高める機序として, IL-2, IL-12の受容体の発現を高める可能性を検討するために, IL-2, IL-12の受容体発現を検討した. IL-2の受容体としてCD25の発現量, IL-12の受容体としてCD212の発現量を検討した(図5, 6). 無添加培養後にくらべ刺激培養後の発現量は陽性細胞比率, MFIともに増加傾向が認められた. TLR4シグナルがCD25, CD212の発現を亢進させTh1サイトカインの感受性を亢進する可能性が示唆された.

#### IL-2, IL-12存在下ではDMNCのTNF- $\alpha$ 産生はLPS刺激による影響を受けない

TNF- $\alpha$ は炎症を引き起こす重要な物質であり, 流産に関連するとする報告が多い<sup>15)</sup>. 一般にLPSによるTNF- $\alpha$ の産生はIFN- $\gamma$ の産生と同様にJNKや

p38MAPKを介するとされている<sup>16,17)</sup>. 従って私は, TNF- $\alpha$ もIFN- $\gamma$ 同様に, IL-2, IL-12刺激で産生増強すると仮定した. しかしながら, 実験結果は予想に反し, DMNCによるTNF- $\alpha$ 産生は, LPS単独で誘導されるが, IL-2, IL-12を添加してもその産生に影響はなかった. また, LPSの添加濃度を0.5  $\mu$ g/ml, 0.1  $\mu$ g/mlと変えて実験したが, TNF- $\alpha$ の産生量に変化なかった(図7).

## 考 察

細菌は皮膚や粘膜表面に常在菌叢として共存しているが, 外傷や変性による組織損傷あるいは加齢や妊娠による宿主の免疫応答低下時には病原体となる<sup>18,19)</sup>. 一般に知られる多くの急性や慢性の感染症以外でも, 自己免疫疾患やメタボリックシンドローム, そして悪性腫瘍も多かれ少なかれ細菌感染と関連がある. 特にグラム陰性菌が異常妊娠を引き起こす可能性は緒家により報告されているが, その機序は不明な点が多い<sup>20-22)</sup>.

本研究では, DMNCのIFN- $\gamma$ 産生に対するタイプ1サイトカイン(IL-2, IL-12)とLPSの相乗効果を明らかにした. サイトカインは初期流産や, 切迫早産, 妊娠高血圧症候群, 子宮内胎児発育遅延といった妊娠後期の合併症を含む, さまざまな生殖過程に影響する. 過去10年間, Th1/Th2パラダイムが哺乳類の妊娠を説明するために多く引用されてきた. この理論の骨子はタイプ

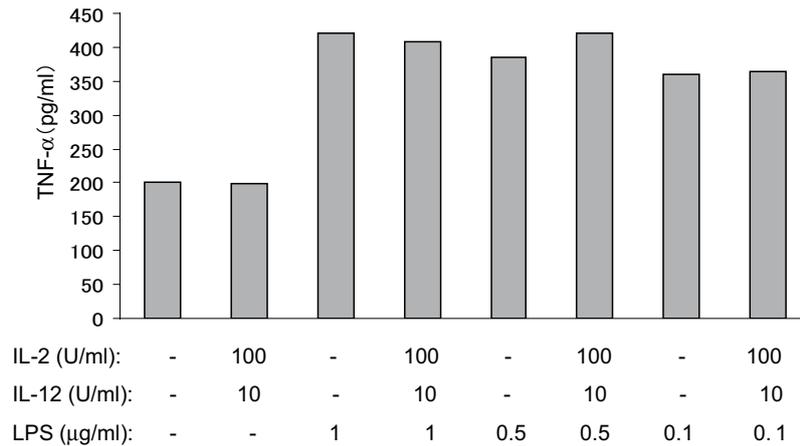


図7 DMNCのLPS刺激によるTNF- $\alpha$ の産生

臨床検体 (n=2) から得たDMNCをLPS添加・無添加, IL-2, IL-12添加・無添加条件で48時間培養し, ELISAにてTNF- $\alpha$ を測定した.

2のサイトカイン (IL-4, IL-10, IL-13など) は妊娠維持に働き, 反対にタイプ1のサイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ など) は妊娠に不利に働き, 妊娠合併症にかかわるというものである<sup>23~26</sup>). しかしながら, 最近では, この理論は事実を簡略化しすぎており, 説明できない現象も多いと考えられている. 実際, 母体にとって胎児は遺伝的に半分は非自己であり, 各々の“利己的遺伝子”にしたがって最適の行動をとり, さらにここに病原微生物の遺伝子が干渉する余地がある. Clarkらは胎児の生存における環境因子の重要性を指摘し, 最も重要な第三 (母体, 胎児の次) の因子はTh1/Th2の支配ではなく病原微生物, 特にグラム陰性菌に由来するLPSの存在であるとされている<sup>6</sup>).

本研究における, 臨床検体での結果は彼らの仮説を支持するものである. なぜならば, IL-2, IL-12のみではほとんど誘導されないIFN- $\gamma$ の産生がLPSの存在下で著しく増強されたからである. 言いかえると, Th1に偏った免疫状態では, LPSに対する感受性が高まるとなる. 臨床的に*E.coli*をはじめとするグラム陰性菌はDMNCに上行感染したり, 血液を介したり, 消化管からの血中移行で胎盤や脱落膜に達する可能性がある.

一方, TNF- $\alpha$ の産生はIL-2, IL-12の存在で変化が見られなかった. 現時点で, この相違を完全に説明することは難しいが, 考えられる理由のひとつはTNF- $\alpha$ が進化の上でより起源が古いという事である. すなわち, 遺伝子のレベルではIFN- $\gamma$ は脊椎動物においてはじめて出現するが, TNF- $\alpha$ およびそのホモログは無脊椎動物にも存在する. また, IFN- $\gamma$ はNK細胞, NKT細胞, T細胞から産生されるが, TNF- $\alpha$ はマクロファージや間質細胞を含むさまざまな細胞から産生される. DMNC

において, NK細胞がTNF- $\alpha$ を産生するとしても, その産生がTh1サイトカインでは調節できない. というのも, LPSによるTNF- $\alpha$ 誘導が免疫系の成立よりも古くから存在するシステムであること, あるいはあるいはTNF- $\alpha$ を産生しているのが, NK細胞やNKT細胞以外の細胞である可能性がある<sup>27,28</sup>).

本研究で, 私はDMNCのIFN- $\gamma$ 産生に対するタイプ1サイトカイン (IL-2, IL-12) とLPSの相乗効果を明らかにした. この結果は, グラム陰性菌によって引き起こされる尿路感染症や子宮内感染が, 切迫早産や子宮内胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群などの頻度を増やすという臨床データに一致する<sup>29</sup>). 尿路感染症が問題となるのは主に途上国であるが, 先進国でも早産になった妊婦の少なくとも40%で子宮内感染を起こしているとの報告がある<sup>30</sup>). この意味で, 本研究は妊娠合併症の予防および治療のために適切な抗菌薬使用の根拠となるであろう.

IFN- $\gamma$ は自然免疫も獲得免疫も活性化するため<sup>31</sup>), 妊娠の維持には有害に働く. 臨床的にそれを裏付ける所見として, 初期に流産を繰り返す女性から得られた血漿中に高濃度のIFN- $\gamma$ を認めたという報告や, これらの患者末梢血で正常妊娠に比べIFN- $\gamma$ の産生が増強しているという報告がある<sup>32,33</sup>). 一方, 多くのTNF- $\alpha$ はLPSや他の細菌成分, IL-1に誘導される. LPSはTNF- $\alpha$ を強く誘導することで, 妊娠維持に有害であると考えられる. 実験的に, 抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体がマウスのLPSによって引き起こされる流産を抑制したという報告<sup>34</sup>) や, 臨床的にも抗TNF- $\alpha$ 抗体が習慣流産の治療に有用であるとする報告があるからである<sup>35,36</sup>). しかし, TNF- $\alpha$ はヒトの生体防御に重要な機能を有しており,

モノクローナル抗体でこれを抑制する事によって悪性腫瘍や結核の増加といった重篤な副作用を来す可能性がある<sup>37,38)</sup>。薬剤の選択性という意味では、細菌のみを標的とする適切な抗菌薬で、子宮胎盤にまでに到達するLPSの量を減らすことがより適切であろうと私は考える。

最後に問題となるのは、ヒト脱落膜のどの細胞がLPSに反応し、どのように調節されているかという点である。一般的には、抗原提示細胞がTLRでLPSを認識し、IL-12産生が誘導された後、脱落膜のNK細胞、T細胞、NKT細胞が活性化すると考えられている<sup>39)</sup>。一方では、近年種々のTLRリガンドによって、NK細胞が直接活性化するという報告もある<sup>40,41)</sup>。真島らは、炎症性サイトカインの存在下で脱落膜NK細胞とNK細胞株がTLRリガンドによって、直接活性化されるという研究結果を得た<sup>42)</sup>。しかし、臨床例における解析は必ずしも培養細胞とは一致せず、NK細胞や抗原提示細胞の分化が重要と考えられる。臨床的には、ヒトの脱落膜全体としての細菌感染に関する免疫反応を検討した場合、個々の要素を分けるよりも全体としてTh1サイトカイン環境であることが、IFN- $\gamma$ 産生増強に働くという点が重要であろう。これは皮膚や脾細胞、リンパ節でもTLR4シグナルはTh1への免疫反応を増強するという報告<sup>43)</sup>とも一致する。私は、LPS刺激によりIL-2、IL-12受容体が増加することを示唆する実験結果を得た。これによりTLR4シグナルがCD25、CD212の発現を亢進させTh1サイトカインの感受性を亢進する可能性が示唆された。この可能性とその機序を明らかにするには、今後さらに詳細な検討が必要である。細菌性陰症が流早産の原因となるという事実<sup>44,45)</sup>からも、局所の感染をコントロールすることが母体の免疫応答を調節する上で重要であろう。

## 結 論

私はLPSがDMNCのIFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ の産生を誘導することを明らかにした。しかし、IFN- $\gamma$ の産生はIL-2、IL-12に依存しているが、TNF- $\alpha$ の産生はIL-2、IL-12の影響を受けないという異なった病態が存在することが示唆された。

謝 辞 稿を終るにあたり、本研究の御指導賜りました獨協医科大学産科婦人科学教室教授、稲葉憲之先生、また、直接の御指導を賜りました日本大学医学部病態病理学系微生物学分野教授、早川智先生に深甚なる謝意を表します。そして、実験にご協力いただいた共同研究者の泉泰之先生と検体採取にご協力いただいた秋葉和敬先生(秋葉産婦人科病院)に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS : LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42** : 145-151, 2008.
- 2) Parant M and Chedid L : Protective effect of chlorpromazine against endotoxin-induced abortion. *Proc Soc Exp Biol Med* **116** : 906-909, 1964.
- 3) Skarnes RC and Harper MJ : Relationship between endotoxin-induced abortion and the synthesis of prostaglandin F. *Prostaglandins* **1** : 191-203, 1972.
- 4) Gasic GJ, Gasic TB, Strauss JF : Abortifacient effects of *Vibrio cholerae* exo-enterotoxin and endotoxin in mice. *J Reprod Fertil* **45** : 315-322, 1975.
- 5) Coid CR : *Escherichia coli* and group B streptococcal infections in experimental animals. *Ciba Found Symp* **77** : 103-118, 1979.
- 6) Clark DA, Manuel J, Lee L, et al : Ecology of danger-dependent cytokine-boosted abortion in the CBA  $\times$  DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and (TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$ ) on pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* **52** : 370-378, 2004.
- 7) Clark DA, Chaouat G, Gorczyński RM : Thinking outside the box : mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* **47** : 275-282, 2002.
- 8) Karhukorpi J, Laitinen T, Karttunen R : Searching for links between endotoxin exposure and pregnancy loss : CD14 polymorphism in idiopathic recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* **50** : 346-350, 2003.
- 9) Li W, Unlugedik E, Bocking AD, et al : The role of prostaglandins in the mechanism of lipopolysaccharide-induced proMMP9 secretion from human placenta and fetal membrane cells. *Biol Reprod* **76** : 654-659, 2007.
- 10) Komine-Aizawa S, Majima H, Yoshida-Noro C, et al : Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line. *J Obstet Gynaecol Res* **34** : 144-151, 2008.
- 11) Kikuchi T, Joki T, Abe T, et al : Antitumor activity of killer cells stimulated with both interleukin-2 and interleukin-12 on mouse glioma cells. *J Immunother* **22** : 245-250, 1999.
- 12) Ohta Y, Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, et al : Granulocyte colony-stimulating factor suppresses autologous tumor killing activity of the peripheral blood

- lymphocytes in the patients with ovarian carcinoma. *Am J Reprod Immunol* **52** : 81-87, 2004.
- 13) Verma V, Sharma V, Shrivastava SK, et al : IL-12 and IL-2 potentiate the in vitro tumor-specific activity of peripheral blood cells from cervical cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* **19** : 367-374, 2000.
  - 14) Hayakawa S, Nagai N, Kanaeda T, et al : Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral and decidual lymphocytes against choriocarcinoma cell lines and primary culture human placental trophoblasts. *Am J Reprod Immunol* **41** : 320-329, 1999.
  - 15) Piccinni MP : Role of T-cell cytokines in decidua and in cumulus oophorus during pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* **64** : 144-148, 2007.
  - 16) D Kontoyiannis, M Pasparakis, TT Pizarro, et al : Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU- rich elements : implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity* **10** : 387-398, 1999.
  - 17) Kotlyarov A, Neininger C, Schubert R, et al : MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis, *Nat. Cell Biol.* **1**, pp. 94-97, 1999.
  - 18) Canny GO and McCormick BA : Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *In/Ofect Immun* **76** : 3360-3373, 2008.
  - 19) Kitano H and Oda K : Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Mol Syst Biol* **2** : 0022, 2006.
  - 20) Giri SN, Emau P, Cullor JS, et al : Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids, progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. *Vet Microbiol* **21** : 211-231, 1990.
  - 21) Schlafer DH, Yuh B, Foley GL, et al : Effect of Salmonella endotoxin administered to the pregnant sheep at 133-142 days gestation on fetal oxygenation, maternal and fetal adrenocorticotrophic hormone and cortisol, and maternal plasma tumor necrosis factor alpha concentrations. *Biol Repro* **50** : 1297-1302, 1994.
  - 22) Baines MG, Duclos AJ, de Fougères AR, et al : Immunological prevention of spontaneous early embryo resorption is mediated by non-specific immunosimulation. *Am J Reprod Immunol* **35** : 34-42, 1996.
  - 23) Hill JA, Polgar K, Anderson DJ : T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* **273** : 1933-1936, 1995.
  - 24) Hayakawa S, Fujikawa T, Fukuoka H, et al : Murine fetal resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *J Reprod Immunol* **47** : 121-138, 2000.
  - 25) Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, et al : Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Hum Reprod* **18** : 1523-1528, 2003.
  - 26) Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, Itoh T, et al : Effects of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th1/Th2 balance and TCR V beta and V gamma repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* **43** : 107-115, 2000.
  - 27) De Zoysa M, Jung S, Lee J : First molluscan TNF-alpha homologue of the TNF superfamily in disk abalone : molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol* **26** : 625-631, 2009.
  - 28) Savan R, Ravichandran S, Collins JR, et al : Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* **20** : 115-124, 2009.
  - 29) Mazor-Dray E, Levy A, Schlaeffer F, et al : Maternal urinary tract infection : is it independently associated with adverse pregnancy outcome? *J Matern Fetal Neonatal Med* **22** : 124-128, 2009.
  - 30) Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, et al : The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol* **79** : 351-357, 1992.
  - 31) Gray PW and Goeddel DV : Structure of the human immune interferon gene. *Nature* **298** : 859-863, 1982.
  - 32) Jenkins C, Roberts J, Wilson R, et al : Evidence of a T (H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* **73** : 1206-1208, 2000.
  - 33) Hanzlikova J, Ulcova-Gallova Z, Malkusova I, et al : TH1-TH2 response and the atopy risk in patients with reproduction failure. *Am J Reprod Immunol* **61** : 213-220, 2009.
  - 34) Holmgren C, Esplin MS, Hamblin S, et al : Evaluation of the use of anti-TNF-alpha in an LPS-induced murine model. *J Reprod Immunol* **78** : 134-139, 2008.
  - 35) Winger EE and Reed JL : Treatment with tumor necrosis factor inhibitors improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* **60** : 8-16, 2008.
  - 36) Winger EE, Reed J, Ashoush S, et al : Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobu-

- lin (IVIG) improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol* **61** : 113-120, 2009.
- 37) Wallis RS : Tumour necrosis factor antagonists : structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis* **8** : 601-611, 2008.
- 38) Clark DA : Should anti-TNF-alpha therapy be offered to patients with infertility and recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol* **61** : 107-112, 2009.
- 39) Eriksson M, Meadows SK, Basu S, et al : TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. *J Immunol* **176** : 6219-6224, 2006.
- 40) Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, et al : The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* **241** : 102-112, 2006.
- 41) Chalifour, P. Jeannin, J.F. Gauchat, et al : Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production *Blood* **104** : 1778-1783, 2004.
- 42) Majima H et al. submitted
- 43) Leitich H : Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **21** : 375-390, 2007.
- 44) Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK : Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis : ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet* **270** : 133-146, 2004.
- 45) Nelson DB, Bellamy S, Nachamkin I, et al : First trimester bacterial vaginosis, individual microorganism levels, and risk of second trimester pregnancy loss among urban women. *Fertil Steril* **88** : 1396-1403, 2007.