

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592113

研究課題名（和文） プレバイオティックスを用いた早産ならびに胎児脳障害抑止機序の基礎的・臨床的検討

研究課題名（英文） Study of mechanisms of preventive effects on preterm delivery using prebiotics

研究代表者

大槻 克文 (OTSUKI KATSUFUMI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90276527

研究成果の概要（和文）：

Lactoferrin (LF) などの Prebiotics などを用いて産婦人科学的観点から早産の予防を目的とした系統的な研究は過去において国内外において全く見られない。本研究により、新たな視点から子宮内感染・早産・preterm PROM の発来機序や防御機構の一端が明らかになり、早産予防という目標を達成することにより脳障害などの心身障害を減少させることが可能となる。更には周産期医療水準の向上・周産期医療費（特に新生児・未熟児医療費）上昇の抑制に貢献し得ることと考えられる。今後、周産期領域において、LF 投与による早産防止・治療への臨床応用への道が開かれることが大いに期待されると考えられる。今年度は昨年度に引き続き、(1) Rabbit 切迫早産動物モデル（継続）早産予防効果として臨床応用の可能性についての作用機序の検討として、得られているデータの解析を行い、その有効性の確認および評価を行った。(2) ヒトへの投与（医の倫理委員会承認済み）：産婦人科領域において難治性膣炎、頸管炎と診断され、従来の治法で症状の顕著な改善が認められない症例に対して、ラクトフェリン錠腔内投与を行うことによりそれら症状に改善効果が認められるか否かを検討。さらに、ラクトフェリン錠腔内投与による副作用等安全性についても有効性と同様に比較した。

研究成果の概要（英文）：

Lactoferrin (LF) is a glycoprotein contained in large amounts in human milk and neutrophils, and is one of the probiotics present in the human body. We believed that there was a high possibility that LF could be an effective drug for preventing preterm delivery and preventing intrauterine infections. In order to study that possibility, we performed the following: I. a study of the behavior of LF in human cervical mucus and in amniotic fluid; II. a study of the antibacterial and anti-cytokine actions of LF and the mechanisms of those actions in human cervical gland cells and amnion cell culture systems; and III. a study of the inhibitory effects of LF against preterm delivery in animal experiments. We treated one case in which the administration of LF to a refractory bacterial vaginosis patient with recurrent preterm delivery was effective, and we hereby report this case. Before the administration of LF to this patient, oral and written informed consent was obtained after obtaining approval from the ethics committee of our school of medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：FIRS, 早産予防, Prebiotics, Lactoferrin

1. 研究開始当初の背景

子宮内感染による胎児への影響として、細菌などの侵襲などによる子宮内の炎症に反応した胎児の高サイトカイン血症が児の多臓器不全を引き起こすという考え方 (Fetal Inflammatory response syndrome: FIRS) がされるようになってきている。特に子宮内感染と脳障害 (脳性麻痺) との関連について数多くの報告がされており、その予防の方策を講じることは急務である。また、子宮内感染が早産の誘引と成り得るとの観点から、早産の予後についてみると、先天奇形を除く周産期死亡の約 75% は早産児であり、1,000g 未満の超低出生体重児は生存しても、その約 20% 以上が精神発達上の問題を残している。仮に、人工早産以外の 75% の早産と preterm PROM を予防できれば、低出生体重児を半数以下に減少させることが可能となるはずである。したがって、この解決は急務であり、早産を減少させることこそが心身障害 (脳障害など) を予防するための最善の方策である。近年、早産の原因として、細菌性膣症や頸管炎からの上行性感染である絨毛膜羊膜炎 (CAM) が重要であるとされ、そのことは疑う余地がない。CAM は細菌感染あるいは一部その他の原因により高サイトカイン状態を引き起こし、それが頸管熟化と子宮収縮発来へとつながることから、早産防止のためには CAM の治療が重要とされて来た。一方、近年、高サイトカイン状態の成立後からの抗菌・抗サイトカイン療法の限界も指摘され、CAM に至る前段階での対策として細菌性膣症の治療による早産予防の試みがなされ始めた。しかし、抗生物質投与による早産予防の有効性に関しては否定的な報告が多い。その理由の一つとして膣内常在菌である *Lactobacillus* 自体の発育抑制が問題となっている。以上のことから、CAM を介した早産を予防するためには、宿主の免疫力を低下させることなく膣内細菌叢を正常化し、早い段階で、炎症性サイトカインの活動を抑制することが必要であると考えられる。

1) Lactoferrin (LF) はヒト乳汁中や好中球に多量に含有される糖蛋白で、人体内に存在する Prebiotics の一つである。LF は、抗菌・抗炎症性サイトカイン作用を有するが、*Lactobacillus* の発育を抑制しない特性が報告されている。また、LF は Urinary Trypsin

Inhibitor (UTI) とは異なり安全性が極めて高い。上記の観点に立ち、我々は LF が早産予防に効果的な薬剤となる可能性が高いと考え、現在までに、生体に通常存在する Prebioti 感染羊水と比較し有意に高値であること。

2) 羊膜細胞を用いた子宮内感染モデルの培養系で、LF 添加により、炎症性サイトカインの産生を著しく抑制すること。

3) affinity column を用いたヒト羊膜より human LF receptor の分離・同定。

4) LF のグラム陰性菌に対するオプソニン効果の検討。

5) ヒト頸管細胞株を用いた LF および Lysozyme の *E. coli* に対する殺菌・制菌作用の検討。

6) 妊娠ラットを用いて、lipopolysaccharide (LPS) によって早産を誘導したマウスで、LF を腹腔内投与することにより、早産を有意に抑制できること。

7) ラビット切迫早産動物モデル (子宮頸管内に直径約 5 mm の子宮内視鏡を用いて LPS ないしは細菌を直接投与)、を使用し、LF を同様の方法で頸管内に投与することで LF 非投与群と比較し、妊娠期間を有意に延長させ、児の生存率を有意に上昇させた。更に母体血、羊水、胎児血中の炎症性サイトカインの産生を抑制したこと (早産を有意に抑制)。

8) ラビット早産動物モデルと同様に、LPS を腔錠として投与して作成した子宮頸管熟化モデルを使用し、LF が Urinary trypsin inhibitor (UTI) と同様な頸管熟化抑制効果を有すること。

9) 上記の頸管熟化抑制効果は matrix metalloproteinase (MMP) の発現抑制を介していること。

(以上、学会発表および学術誌投稿済)

さらに、preliminary なデータとして、これら動物モデルで出生ないし死産した動物の胎仔の脳切片を病理学的に検討し、LF 群では感染 cs (Natural Antibiotics) のひとつである LF が周産期領域において早産予防薬としての有用性を有する可能性について、以下の様に検討し学会及び論文発表を数多く行ってきた。(学会発表および学術誌投稿済)。

10) 子宮内感染環境下で出生した児は、非感染環境下で出生した児に比し唾液中 LF の産生量が、有意に高値であること。

11) 絨毛膜羊膜炎陽性羊水中の LF 濃度は非群と比較し脳内の炎症細胞浸潤が抑制されていたことが明らかとなっている。

産婦人科領域以外では LF を用いたヒトに対する臨床応用としては C 型肝炎の治療、hericobacter piroli の発育抑制による十二指腸潰瘍治療、シェーグレン症候群に対して診断及び治療薬としての可能性が報告されている。しかしながら、我々の今回の研究の様に、LF などの Prebiotics などを用いて産婦人科学的観点から早産の予防を目的とした系統的な研究は過去において国内外において全く見られない。

本研究により、新たな視点から子宮内感染・早産・preterm PROM の発来機序や防御機構の一端が明らかになり、早産予防という目標を達成することにより脳障害などの心身障害を減少させることが可能となる。更には周産期医療水準の向上・周産期医療費（特に新生児・未熟児医療費）上昇の抑制に貢献し得ることと考えられる。今後、周産期領域において、LF 投与による早産防止・治療への臨床応用への道が開かれることが大いに期待されると考えられた。以上のような背景と我々の今までの研究結果から、LF の子宮頸管内への投与が膣炎や頸管炎の治療・に有効である可能性が十分に示唆されている。

2. 研究の目的

これらをふまえて、今回、以下の二点につき研究を実施する。

1) LF 錠を動物モデルに用いて、子宮内感染抑制ならびに胎児脳障害抑制効果の検討。

2) ヒトへの投与を併行して行い、早産予防薬としてのヒトへの臨床応用の可能性を更に具体的に検討。

また、これらの作用機序、有用性および安全性を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) Rabbit 切迫早産動物モデル：

早産予防効果として臨床応用の可能性についての作用機序の解明を中心に検討を行う。実際には妊娠 Rabbit に対し LPS ないしは細菌を用いて頸管炎及び絨毛膜羊膜炎を生じさせ、そこへ LF などの Prebiotics (Natural antibiotics) を錠として各種条件のもとで投与（投与量も検討）し、その有効性の確認および評価を行う。評価方法としては①薬剤の吸収程度、②妊娠継続期間の比較、③母獣の全身状態、④投与された細菌の Colony 数の推移と子宮内感染の程度、⑤血中、羊水および頸管粘液中のサイトカインを含めた早産マ

ーカーの比較、特に、⑥頸管熟化や絨毛膜羊膜炎（子宮内感染）の程度に応じた胎児脳や臍帯・臍帯血等の炎症性物質（サイトカインなど）の発現と局在などを病理学的・分子生物学的に検討、を行う。さらに分子生物学的には検体を凍結保存し、細胞レベルでの炎症・早産関連遺伝子発現も検討する。

(2) ヒトへの投与（医の倫理委員会承認済み）：産婦人科領域において難治性膣炎、頸管炎と診断され、従来の治法で症状の顕著な改善が認められない症例に対して、ラクトフェリン錠膣内投与を行うことによりそれら症状に改善効果が認められるか否かを検討する。さらに、ラクトフェリン錠膣内投与による副作用等安全性についても有効性と同様に比較する。

1) 対象・実施場所

対象：当該大学病院産婦人科外来および病棟において、難治性膣炎、頸管炎と診断され、従来の治療法（膣内洗浄、クロラムフェニコール錠、フラジオマイシン錠、抗真菌剤錠など）で症状の顕著な改善が認められない症例。

対象者人数：全体で約 50 名

実施場所：当該大学病院産婦人科外来および病棟

2) 投与方法

実施方法：対象患者に対してラクトフェリン使用期間を最大 4 週間として膣内投与する。

用法：一日一回膣内に投与。

容量：一回あたりラクトフェリン錠を 2 錠から 4 錠 (100mg/錠)

3) 研究・解析方法：

対象とする試料（資料）と入手方法：外来または病棟にて診察時に膣鏡を用いて後膣円蓋部よ

り綿棒を用いて膣分泌物を採取。ラクトフェリン投与前より 1 週間毎に検査目的にて採取。

解析方法：自覚症状、清浄度スコア、Nugent Score、顆粒球 Elastase、膣分泌培養、pH などを 1 週間ごとに評価。妊産婦については分娩予後・新生児予後についても検討を行う。

4. 研究成果

本研究の目的のうち、基礎的な分野に関してはほぼ達成されている。関連学会で発表し、論文投稿も行った。ヒトへの臨床的な分野に関しては対象症例が少なかったためにやや遅れている。現在、症例報告を投稿中である。今まで得られた研究データを基にして、引き続き臨床データを積み重ねていく。学会発表を行った反響はあり、症例報告を行いつつ、対象症例の登録について、他の医師に幅広く

協力を求めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Shinjo A, Otsuki K, Sawada M, Ota H, Tokunaka M, Oba T, Matsuoka R, Okai T. Retrospective cohort study: a comparison of two different management strategies in patients with preterm premature rupture of membranes. Arch Obstet Gynecol, 10.1007/s00404-012-2271-0
- ② Nakayama K, Otsuki K, Yakuwa K, Hasegawa A, Sawada M, Mitsukawa K, Chiba H, Nagatsuka M, Okai T. Recombinant human lactoferrin inhibits matrix metalloproteinase (MMP-2, MMP-3, and MMP-9) activity in a rabbit preterm delivery model. J Obstet Gynaecol Res. 2009 34:931-4.
- ③ 杉山将樹、大槻克文、松浦玲、新城梓、八鍬恭子、中山健、満川香織、千葉博、長塚正晃、岡井崇. Sivelestat Sodium Hydrate (Elaspol) の妊娠子宮頸管熟化抑制作用. 日本周産期・新生児医学会雑誌, 2009. 45(1): p. 67-71.

[学会発表] (計 24 件)

- ① Katsufumi Otsuki, Maki Sawada, Hiroshi Chiba, Mayumi Tokunaka, Hajime Ota, Masaaki Nagatsuka, Takashi Okai. Silvestat sodium hydrate suppresses premature cervical ripening in a rabbit preterm delivery model. ociety for Maternal Fetal medicine, 32nd Annual Meeting-The Pregnancy Meerting, 2012. 2. 11. San Francisco, USA
- ② Katsufumi Otsuki. Should all women be screened and with which test? Prediction of preterm labor. The 4th Asia Pacific Congress on Controversies in Obstetrics Gynecology and Infertility (招待講演). 2011. 11. 25. Bangkok, Thailand
- ③ 大槻克文. 早産を繰り返した難治性膣炎患者に対して Lactoferrin 投与が有効であった 1 症例. 日本ラクトフェリン学会 4 回学術集会. 2011 年 11 月 13 日、長浜、滋賀県
- ④ 杉山将樹、大槻克文、他. ラビット早産

モデルにおける Lactoferrin の早産予防効果とその機序に関する検討 FIRS 予防の観点から。第 61 回日本産科婦人科学会学術集会。2009 年 4 月 3 日、京都、京都府

[図書] (計 4 件)

- ① 大槻克文、「早産を繰り返した難治性膣炎患者に対してラクトフェリン投与が有効であった 1 症例」、『ラクトフェリン 2011』、p162 日本医学館
- ② 大槻克文、「早産と感染症」、『母子感染』、p357 金原出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 克文 (OTSUKI KATSUFUMI)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号：90276527

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：