

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20133

研究課題名(和文) 早産の病態解明—羊水中病原微生物の迅速高感度検出システムの利用—

研究課題名(英文) Breakthrough of the management of preterm labor -Usage of highly sensitive PCR system for detecting microorganism in Amniotic fluid-

研究代表者

米田 徳子 (Yoneda, Noriko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：80377283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本における出生体重1000g未満の超低出生体重児の予後は、新生児死亡率約20%とされ、早産の予防と治療が大切である。我々が独自に開発した迅速高感度PCR法を用いて羊水中病原微生物の検出と治療を行った。

未破水切迫早産例において、ウレアプラズマ、マイコプラズマと細菌重複陽性例では、病原微生物陰性例に比し有意に子宮内炎症が高度で、早期に早産に至っていた。また、病原微生物陰性例に抗菌薬投与を行うと有意に妊娠期間が短縮し、陽性例に適切な抗菌薬投与を行うと有意に妊娠期間が延長した。切迫早産の子宮内感染を迅速高感度PCR法により検出し、適切な抗菌薬治療を行うことが新たな治療戦略になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Intra-amniotic(IA) infection is one of the important risk factors for preterm birth.

1. We have established newly rapid and bacteria-free polymerase chain reaction (PCR) method. It was useful for detecting IA microorganisms. Polymicrobial infection with Mycoplasma/Ureaplasma and other bacteria induces severe IA inflammation associated with poor perinatal prognosis in preterm labor (PTL).

2. We examined the efficacy of the use of antibiotics in PTL with intact membranes, after evaluating intra-amniotic microbes by our PCR system. In the amniotic fluid (AF) microbe-negative PTL patients, antibiotic therapy significantly shortened the gestation period, whereas in the microbe-positive patients, appropriate antibiotic therapy (proper antibiotic selection against identified AF microbes) was significantly associated with an increase in gestation period. Appropriate antibiotic therapy in PTL with intact membranes prolonged the gestation period.

研究分野：周産期

キーワード：早産 子宮内感染 迅速高感度病原微生物検出法

1. 研究開始当初の背景

日本における出生体重 1000g 未満の超低出生体重児の予後は、新生児死亡率約 20%、神経学的後遺症など何らかの障害をもつ割合は約 40%とされ、また重い障害をもった場合、十分にケアできる施設が極めて限られているという問題もある。超低出生体重児は全分娩の約 0.2~0.3%で起こり、切迫早産、前期破水、頸管無力症が主たる母体の基礎疾患である。早産、特に在胎週数が短い超早産では絨毛膜羊膜炎が多く、分娩時に採取した胎盤組織培養で在胎 30 週以下の早産で約 70%、在胎 31-32 週で約 40%の病原微生物が検出される (N. Engl J Med:342:1500-1507,2000)。また、早産児での障害を減少させる方策として、呼吸器疾患などに関連が深い子宮内の *Ureaplasma*, *Mycoplasma* 感染 (Pediatr Infect Dis J 24:1033-1039, 2005) などの出生前迅速診断と、適切な治療法の確立が挙げられる。子宮内感染は、従来の培養法では数日から数週間、起炎菌の同定に時間を要していたため、抗菌薬の有効性は証明されていないが、これら *Ureaplasma*, *Mycoplasma* 属感染および細菌・真菌感染の迅速検査が可能であれば慢性肺疾患をはじめとした早産予後、新生児予後の改善が期待できる。また、最近の研究により腸内細菌の 1 つであるクロストリジウム属細菌が制御性 T 細胞 (Treg) を誘導し、腸炎やアレルギーを抑制していることが判明した (Science 331:337-341, 2011)。制御性 T 細胞は妊娠維持に必須の免疫担当細胞であり、早産例では減少する。そのため早産例の腸内細菌叢は変化しているとも考えられる。

2. 研究の目的

(1) 我々が独自に開発した 16srRNA の共通領域を primer とし、細菌の検出には酵母由来の Taq polymerase, 真菌の検出には細菌由来の Taq polymerase を使用する PCR 法を用いて羊水中の感染微生物の迅速検出を

行い、切迫早産、頸管無力症の病態を明らかにすること。(2) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) を用いた方法で腸内細菌叢、腔内細菌叢を検出しエコバイオシステムの面から早産の病態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 羊水ならびに胎盤、臍帯血の病原微生物の高感度遺伝子検査と現行の細菌検査法との比較評価(迅速性・感度・特異度・正確性)。(2) 羊水中サイトカインと羊水中病原微生物との関連性、子宮内炎症の程度と羊水中の病原微生物の種類、菌体量との相関を検討する。(3) 切迫早産例, 早産例, 正常妊婦より便 腔分泌物を採取し DNA を抽出後、T-RFLP 法を行うとともに、末梢血の制御性 T 細胞をフローサイトメトリーで検索する。(4) 頸管無力症の病原微生物の検討と予後不良症例のリスク因子の検討。(5) Amniotic fluid sludge 例での羊水中病原微生物の検討。(6) 羊水感染例と非感染例の早産予後(入院から分娩までの期間)を Kaplan-Meier 法で検討。(7) 病原体(-)では抗菌薬を使用せず、細菌, *Ureaplasma*, *Mycoplasma* 陽性では適切な抗菌薬投与により周産期予後が改善するかを検討。(8) 早産例で、整腸剤投与による介入を従来のトコリーシスに加えて行い、妊娠延長期間を検討。(9) 腸内細菌叢の変化と全身の免疫能を比較検討し、Probiotic からみた新たな早産治療法を開発する。(10) 臨床検体の集積。

4. 研究成果

(1) 羊水ならびに胎盤、臍帯血の病原微生物の高感度遺伝子検査と現行の細菌検査法との比較評価: 現行の細菌検査法の約 4 倍の検出率だった。なお、検出感度は 100%であった。(2) 羊水中サイトカインと羊水中病原微生物との関連性、子宮内炎症の程度と羊水中の病原微生物の種類、菌体量との相関: 子宮内

炎症を示す羊水中 IL-8 値(ng/mL)は、ウレアプラズマ、マイコプラズマと細菌の重複陽性例(n=17)では、全て陰性例(n=79)より有意に高値(95.2 vs 4.5, $p<0.01$)で、2度以上の絨毛膜羊膜炎も有意に高率(58.8% vs 21.3%, $p<0.01$)であることがわかった。菌体量との相関は今後検討する。

(3)切迫早産例, 早産例, 正常妊婦より便, 腔分泌物を採取し DNA を抽出後、T-RFLP 法を行うとともに、末梢血の制御性 T 細胞をフローサイトメトリーで検索：早産例では正常妊婦より腸内細菌叢のクリストリジウム属が減少していることが明らかになった。

(4)頸管無力症の病原微生物の検討と予後不良症例のリスク因子の検討：頸管無力症(胎胞形成)例では、羊水中 *Ureaplasma*, *Mycoplasma* と細菌重複感染が多く, 周産期予後不良であった。

(5)Amniotic fluid sludge(AFS)例での羊水中病原微生物の検討：AFS の有無と病原微生物の検出率に差を認めなかったが(AFS 有 6/19(31.6%), AFS 無 33/86(38.4%), $P=0.579$)、AFS では有意に子宮内炎症が高度で周産期予後不良だった(論文投稿中)。

(6)羊水感染例と非感染例の早産予後(入院から分娩までの期間)を Kaplan-Meier 法で検討：ウレアプラズマ、マイコプラズマと細菌重複陽性例(n=17)では、感染微生物陰性例(n=79)に比し有意に妊娠延長期間が短く(7日 vs 46日, $p<0.001$)、早期に早産に至っていた(25週 vs 36週, $p<0.001$)。

(7)病原体(-)では抗菌薬を使用せず、細菌, *Ureaplasma*, *Mycoplasma* 陽性では適切な抗菌薬投与により周産期予後が改善するかを検討：妊娠 32 週までに入院管理した過去の未破水切迫早産 104 例を検討した。病原微生物陰性例に抗菌薬投与を行うと有意に妊娠期間が短縮し($p<0.001$)、陽性例に適切な抗菌薬投与を行うと有意に妊娠期間が延長した($p=0.001$)。

(8)早産例で、整腸剤投与による介入を従来のトコリーシスに加えて行い、妊娠延長期間を検討：切迫早産例では整腸剤投与により妊娠延長期間に差を認めなかった。

(9)腸内細菌叢の変化と全身の免疫能を比較検討し、Probiotic からみた新たな早産治療法を開発する：検討中である。

(10)臨床検体の集積：集積中である。

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 9 件)

1. Yoneda N, Yoneda S, Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Ito M, Shiozaki A, Urushiyama D, Hata K, Suda W, Hattori M, Kigawa M, Kitajima I, Saito S. Polymicrobial Amniotic Fluid Infection with Mycoplasma/Ureaplasma and Other Bacteria Induces Severe Intra-Amniotic Inflammation Associated with Poor Perinatal Prognosis in Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol*. 2016 ;75(2):112-25. doi: 10.1111/aji.12456. 査読有
2. 米田徳子 母児の予後からみた娩出のタイミングと方法 子宮内炎症および病原微生物の的確な評価と新たな周産期管理法. 周産期学シンポジウム抄録集. 2016; 34: 35-39. 査読なし
3. Yoneda S, Shiozaki A, Yoneda N, Ito M, Shima T, Fukuda K, Ueno T, Niimi H, Kitajima I, Kigawa M, Saito S. Antibiotic Therapy Increases the Risk of Preterm Birth in Preterm Labor without Intra-Amniotic Microbes, but may Prolong the Gestation Period in Preterm Labor with Microbes, Evaluated by Rapid and High-Sensitive PCR System. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(4):440-50. doi: 10.1111/aji.12484. 査読有

4. 米田 徳子, 米田 哲, 福田 香織, 吉江正紀, 塩崎 有宏, 齋藤 滋. 早産の現状と新たな予防治療への期待 新たな予防治療への期待 抗菌薬の適正利用日本周産期・新生児医学会雑誌 .52 巻 2 号 : 417.2016 査読なし
 5. 米田徳子, 仁井見英樹, 米田 哲, 齋藤 滋.【周産期領域の新しい検査法】母体・胎児編 子宮内感染 分子生物学的診断による原因細菌検索(解説/特集) 周産期医学 . 2016 ; 46(6) : 743-744. 査読なし
 6. 米田徳子, 米田 哲, 仁井見英樹, 上野智浩, 小林 睦, 安田一平, 津田さやか, 福田香織, 稲坂 淳, 伊藤実香, 塩崎有宏, 川崎裕香子, 田村賢太郎, 牧本優美, 吉田丈俊, 北島 勲, 齋藤 滋 : 子宮内炎症および病原微生物の的確な評価と新たな周産期管理法 . 日本周産期・新生児医学会雑誌 51 巻別冊 : 14-15 . 2016 査読なし
 7. 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋 : 周産期医学必修知識第 8 版 , 224-225, 2016 査読なし
 8. 仁井見英樹 : 敗血症起炎菌の新たな迅速同定法, バイオサイエンスとインダストリー , 74 巻 5 号 , 422-424 , 2016 査読なし
 9. 仁井見英樹 : 敗血症の起炎菌の迅速検出・同定, 検査と技術 , 44 巻 5 号 , 366-369, 2016 査読なし
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. 仁井見英樹 検体採取後3時間以内での敗血症起炎菌迅速同定法(Melting Temperature mapping 法)の開発 . 第 56 回日本臨床化学会 ; 2016, Dec, 2-4; 熊本 **学術賞受賞** (口演)
 2. 米田徳子, 米田 哲, 新居絵理, 太知さやか, 福田香織, 吉江正紀, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 抗菌薬治療により子宮内病原微生物は消失するのか? - 迅速高感度 PCR 法を用いた検討 - 第 24 回日本胎盤学会学術集会 ; 2016, Nov, 25 ; 和歌山 (口演)
 3. 米田徳子 迅速高感度 PCR 法による子宮内病原微生物の的確な評価と切迫早産の新たな周産期管理法 . Toyama Science GALA 2016 若手部門 **学長特別賞受賞** ; 2016, Sep, 30; 富山 (ポスター)
 4. 米田徳子 富山大学女性研究者支援の試み 各部署の現状と挑戦 「男女共同参画 各部署の現状と挑戦 」ダイバーシティ研究環境実現シンポジウム ; 2016, Sep, 21; 富山 (口演)
 5. 米田徳子, 米田 哲, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . シンポジウム 羊膜バンク～設立から応用へ～羊膜バンクの設立 産婦人科医の立場から . 第 15 回日本組織移植学会学術集会 ; 2016, Aug, 28; 富山 (口演)
 6. 米田徳子, 米田 哲, 福田香織, 吉江正紀, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 第 52 回日本周産期・新生児医学会 シンポジウム 3 「早産の現状と新たな予防治療への期待」抗菌薬の適正利用 ; 2016, Jul, 16-18; 富山 (口演)
 7. 米田 哲, 米田徳子, 伊東雅美, 田中智子, 福田香織, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 第 52 回日本周産期・新生児医学会 子宮内病原微生物陰性例の未破水切迫早産に対する黄体ホルモン(17-OHPC 筋注)の治療効果に関する検討 ; 2016, Jul, 16-18; 富山 (口演)
 8. 吉江正紀, 米田徳子, 新居絵理, 太知さやか, 草開 妙, 福田香織, 米田 哲, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 当院で管理した preterm PROM の臨床検討 . 北陸産婦人科学会 ; 2016, May, 22 ; 金沢 **優秀演題賞受賞** (口演)
 9. 米田徳子, 米田 哲, 塩崎有宏, 才津義亮, 津田 桂, 青木藍子, 福田香織,

齋藤 滋. 自然後期流産, 早産の胎盤では有意に *Ureaplasma, Mycoplasma* と細菌混合感染が高率で, 適切な抗菌薬治療により妊娠延長が期待できる. 第 68 回日本産婦人科学会学術集会; 2016, Apr, 21-24; 東京.(ポスター)

10. 米田徳子, 米田 哲, 福田香織, 生水貫人, 伊東雅美, 田中智子, 吉江正紀, 塩崎有宏, 齋藤 滋. 当院で管理した preterm PROM の過去 10 年間の臨床的検討. 富山県母子医療検討会; 2016, Mar, 16; 富山(口演)
11. 米田徳子, 米田 哲, 仁井見英樹, 上野智浩, 小林 睦, 安田一平, 津田さやか, 福田香織, 稲坂 淳, 伊藤実香, 塩崎有宏, 川崎裕香子, 田村賢太郎, 牧本優美, 吉田丈俊, 北島 勲, 足立雄一, 齋藤 滋. 子宮内炎症および病原微生物の的確な評価と新たな周産期管理法. 第 34 回周産期学シンポジウム; 2016, Feb, 5-6; 神戸(口演)
12. 上野智浩, 仁井見英樹, 米田徳子, 米田哲, 森 正之, 多葉田 誉, 南洋, 齋藤 滋, 北島 勲. 第 62 回日本臨床検査医学会; 2015, Nov, 19-22; 岐阜(口演)
13. 米田徳子, 米田 哲, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋. 子宮内病原微生物の迅速高感度検出システムと早産の治療戦略. 第 42 回日本産婦人科医会学術集会 Young Power Session; 2015 Oct 18; 新潟(口演)
14. 米田徳子, 米田 哲, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋. 切迫早産の抗菌薬治療は有効か? ~ 子宮内(羊水中)病原微生物の迅速高感度検出システムを用いた検討 ~. 第 51 回日本周産期・新生児医学会 ワークショップ「早産の予防戦略」; 2015 Jul; 福岡(口演)
15. 米田徳子, 米田 哲, 小林 睦, 安田

一平, 稲坂 淳, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋. 胎胞形成例では羊水中 *Ureaplasma, Mycoplasma* と細菌重複感染が多く, 周産期予後不良である. 第 67 回日本産婦人科学会総会; 2015 Apr 10-12; 横浜.(ポスター)

〔図書〕(計 1 件)

1. 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋. 中外医学社, 産科診療 Q&A 一つ上を行く診療の実践, 2015, 263

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 徳子 (YONEDA, Noriko)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 80377283

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

仁井見 英樹 (NIIMI, Hideki)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・

准教授

研究者番号: 50401865

(4) 研究協力者