

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10675

研究課題名(和文) 子宮内膜症の病態に潜在性子宮内感染と子宮内膜炎が及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Study of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis

研究代表者

カーン カレク (Khan, Khaleque)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60336162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GnRHaによる治療は、子宮内膜症罹患女性における子宮内膜炎を引き起こし、子宮内細菌の定着をさらに悪化させる。子宮内膜症性卵巣胞の内容液は非子宮内膜症性卵巣胞に比べStreptococcaceaeとStaphylococcaceaeが有意に増加していた( $p<0.05$ )。子宮内腔ではGnRHa投与群では非投与群に比べLactobacillaceaeが有意に減少し( $p<0.01$ )、Streptococcaceae、Staphylococcaceae、Enterobacteriaceaeが有意に増加していた( $p>0.05$ )。我々は、子宮内膜症における新しい概念「細菌汚染仮説」を初めて提案した。

研究成果の概要(英文)：We investigated microbial colonization in intrauterine environment and cystic fluid of women with and without endometriosis. 16S rDNA metagenome sequence analysis was done by Illumina Miseq system. 16S metagenome assay in endometrial swabs indicated that proportion of Lactobacillaceae was significantly decreased ( $P<0.01$ ) and of Streptococcaceae, Staphylococaceae, Enterobacteriaceae was significantly increased ( $P<0.05$  for each) in GnRHa-treated women with endometriosis than in GnRHa-untreated women. A significantly higher percentage of Streptococcaceae ( $P<0.01$ ) and Staphylococaceae ( $P<0.05$ ) were found in the cystic fluid derived from women with ovarian endometrioma comparing to that in cystic fluid collected from non-endometrioma cysts. These findings indicate the occurrence of sub-clinical infection in intrauterine environment and in the cystic fluid of ovarian endometrioma.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 月経血 腹水 Toll様受容体4 細菌汚染仮説 GnRHa

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖年齢の女性に多いエストロゲン依存性の慢性炎症性疾患である。このエニグマティックな疾患の病因あるいは病態は未だはっきりしていない。月経困難症、慢性骨盤痛、不妊症は本疾患の主要徴候であり、薬物療法や外科療法後の再発の多さは本疾患の大きな問題点である。

これまでに私どもあるいは他施設での検討から、子宮内膜症の発症および増殖・進展には、免疫担当細胞、1次性および2次性炎症調節因子が関与していることが示されている。内膜症では月経血中の細菌性エンドトキシン(LPS)濃度が非内膜症コントロールに比して有意に上昇している。子宮内膜症女性から採取した月経血での大腸菌(*Escherichia coli*, *E coli*)コロニー形成能は、非子宮内膜症のそれらと比して有意に亢進しており、子宮内膜症女性の骨盤内で亢進しているエンドトキシンの由来と考えられる。この*E coli*由来のLPSはToll-like receptor (TLR) 4を介した子宮内膜症の増殖に関与している。*E coli*を含む腔内に存在する多くの病原性微生物による潜在性感感染が上行性に子宮腔内に到達し、月経血中にコンタミネーションすることが推測される。

細菌性膣症(bacterial vaginosis, BV)は、生殖年齢の女性での膣の症候の原因としてもっとも多い疾患の1つで、各種の関連合併症の原因ともなる。BVは腔内酸性度の低下(pHの上昇)と正常腔内細菌叢を形成する*Lactobacillus spp.*が*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Mobiluncus spp.*, *E.coli*あるいは嫌気性菌に置き換わることを特徴とする。腔内pH(3.8-4.5)の上昇には、性交渉の際の精液(pH 7.0-8.5)や腔内分泌物が関与している可能性がある。健康女性の50%に非症候性BVが認められるとされ、子宮内膜症の有無により潜在性のBVの頻度が異なる可能性がある。

前述の知見を参考にして、子宮内膜症の有無あるいはGnRHa療法の有無によりBVの頻度や子宮内膜の細菌培養あるいは子宮内膜炎の存在について検討した。GnRHa療法を受けた患者では腔内pHがアルカリ傾向になり、腔内細菌叢の性状が感染との境界領域と判断される例が増加する傾向が認められた。また、GnRHa療法を受けていた例では、子宮腔内分泌物から細菌が検出される率が増加し、また、子宮内膜炎が増加していた。これらの結果は、一定の卵巣ステロイドホルモン分泌が維持されることにより腔内細菌叢の恒常性が保持され、結果として子宮腔内への細菌のコンタミネーションのリスクが低下することが推察される。これらの結果は2014年5月にブラジル・サンパウロで開催された世界子宮内膜症学会で発表した。

## 2. 研究の目的

今回、子宮内膜症に対するGnRHa療法の際に広域抗生剤の内服の併用することにより、腔内あるいは子宮内への細菌コンタミネーションのリスクを低下させ、子宮内膜症の発生あるいは再発を低減させうるのではないかと仮説をたてて本研究を立案した。子宮内膜症女性に対して、GnRHa療法にレボフロキサシンの内服を併用することにより、子宮内への細菌コンタミネーションや子宮内膜炎の発生が変化するか検討したい。

## 3. 研究の方法

(a) 腔内pH: pH紙(11mm×100mm, GF Health care, Life Sciences, Tokyo)による腔内分泌物の腔内pHを測定し、<4.5あるいは≥4.5いずれか判定する。

(b) 腔分泌物スミアのグラム染色標本におけるBVスコア: 腔内分泌物スミアのグラム染色をNugentのクライテリアの変法(17)を用いて細菌性膣症の有無を判定する。染色所見中の形態的な*Lactobacillus spp.*, *Gardnerella vaginalis* および *Mobiluncus*

spp.の出現率(0, <1, 1-4, 5-30, >30)によりスコア化(0, 1, 2, 3, 4)して評価する。Lactobacillus spp.の減少によりスコアが高くなる(例:0=4)。一方, Gardnerella および Mibiluncus spp.の増加によりスコアが高くなる(例: Gardnerella が >30=4, Mobiluncus が >30=2)(17)。これらのスコア法により最高点は10点(4+4+2)になる(1) 7-10点をBV, (2) 4-6点の場合, intermediate, (3) 0-3点の場合, 正常腔細菌叢と判定される。

(c) 腔内および子宮腔内分泌部の細菌培養: 無菌的操作でシードスワブ(No. 3, E-MS64, 栄研化学, 栃木)を用いて腔内あるいは子宮腔内分泌物を採取する。この際腔内にスワブを付着させないように留意する。採取した分泌物は以下の方法により培養する。

(d) 上記検体より抽出したRNAからPCR法で16S rDNAを作成し、Illumina社製MiSeq®を用いて塩基配列を網羅的に解析し各群の細菌叢を比較した。

(e) 子宮内膜組織の免疫組織化学的評価による子宮内膜炎の検出: 子宮内膜を腹腔鏡手術時に採取する。子宮内膜組織中の形質細胞と好中球の出現率を免疫組織化学的手法を用いて評価する。形質細胞に対してマウスモノクローナル抗Syndecan-1(CD138)抗体(1:200, B-A38, ab34164, abcam, Tokyo)および好中球に対してウサギポリクローナル抗myeloperoxidase(MPO)抗体(1:50, ab9535, abcam, Tokyo)を用いて免疫染色を行い, Kiviatらのクライテリアにより子宮内膜炎の有無を診断する。(1) 100倍視野で子宮内膜間質中に形質細胞 $\geq 1$ 存在し,かつ400倍視野で好中球が腺細胞周囲少なくとも5コ存在する,あるいは400倍視野で好中球のみが5コ以上存在する場合に急性子宮内膜炎と診断する。(2) 100倍視野で子宮内膜間質中に形質細胞 $\geq 1$ 存在するのみで好中球が存在しない場合に慢性子宮内膜炎(形質細胞内膜

炎)と診断する。

#### 4. 研究成果

(a) 子宮内膜症では腔内pHが上昇しており, pH4.5以上の例がコントロールに比して有意に増加し(79.3% vs. 58.4%,  $p=0.03$ ), GnRHaの使用は両群でpHを有意に上昇させる要素であった。子宮内膜症ではGnRHaの使用によりBVスコアが高くなる傾向が認められた。

(b) Gardnerella, -streptococcus, Enterococci およびE.coliのコロニー形成能は子宮内膜症由来の子宮腔内分泌物で有意に亢進しており, GnRHaの使用はコロニー形成能を有意に上昇させた。

(c) 子宮内膜症の有無によらずGnRHa療法施行例では, 子宮内膜炎を呈する頻度が有意に上昇していた。

(d) 子宮内腔および卵巣嚢胞内容液から多種類の細菌のゲノムが幅広い割合(0.01~97.8%)で検出された。子宮内膜症性卵巣嚢胞の内容液は非子宮内膜症性卵巣嚢胞に比べStreptococcaceaeとStaphylococcaceaeが有意に増加していた( $p<0.05$ )。子宮内腔ではGnRHa投与群では非投与群に比べLactobacillaceaeが有意に減少し( $p<0.01$ )、Streptococcaceae、Staphylococcaceae、Enterobacteriaceaeが有意に増加していた( $p>0.05$ )。

#### 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10件)

1. Khan KN, Fujishita A, Hiraki K, Kitajima M, Nakashima M, Fushiki S, Kitawaki J. Bacterial contamination hypothesis: a new concept in endometriosis (review). Reprod Med Biol. 17(2):125-133,2018.
2. Kitajima M, Khan KN, Harada A, Taniguchi K, Inoue T, Kaneuchi M, Miura K, Masuzaki H. Association between ovarian endometrioma

and ovarian reserve (review). *Front Biosci (Elite Ed)*. 10:92-102,2018.

3. [Khan KN](#), Fujishita A, Kitajima M, Masuzaki H, Nakashima M, Kitawaki J. Biological differences between functionalis and basalis endometria in women with and without adenomyosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 203:49-55,2016.

4. [Khan KN](#), Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, Kitawaki J. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 199:69-75,2016.

5. [Khan KN](#), Kitajima M, Fujishita A, Nakashima M, Kitawaki J. Role of bacterial contamination in endometriosis (review). *J Endometriosis*. 8(1):2-7,2016.

6. [Khan KN](#) and Iwasa K. Immuno-endocrine crosstalk in women with reproductive disorders (review). *Clin Gynecol Obstet* 70(9):801-808,2016.

7. [Khan KN](#), Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Decreased expression of human heat shock protein 70 in the endometria and pathological lesions of women with adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 187C:6-13,2015.

8. [Khan KN](#), Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Involvement of hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human adenomyosis. *Biol Reprod* 92(2):35,1-11,2015.

9. Fujishita A, Araki H, Yoshida S, Hamaguchi D, Nakayama D, Tsuda N, [Khan KN](#). Outcome of conservative laparoscopic surgery for adnexal torsion through 1-stage or 2-stage operation. *J Obstet Gynecol Res*, 41(3):411-417,2015.

10. [Khan KN](#), Kitajima M, Inoue T, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H.  $17\beta$ -estradiol and lipopolysaccharide additively promote pelvic inflammation and growth of endometriosis. *Reprod Sci* 22(5):585-594,2015.

[学会発表](計32件)

**Congress Presentation from April 2017 to March 2018 (Khan Khaleque)**

**(A) Domestic congress:**

1. [Khan KN](#), Okimura H, Fujishita A, Kitawaki J. The 39th Japan Endometriosis Congress. Molecular detection of IUMC in endometriosis. Kyoto, Japan, January 27-28, 2018 (Oral).
2. [Khan KN](#), Fujishita A, Kitawaki J. The 9th Annual Meeting of Japan Endometriosis Forum (JEF). Molecular detection of IUMC in endometriosis. Tokyo, October 14, 2017 (invited speaker).
3. [Khan KN](#), Fujishita A, Kitawaki J. The 18th Annual Meeting of APAGE2017. Occult microscopic endometriosis. Okayama, Japan, September 6-8, 2017 (invited lecture for luncheon seminar).
4. [Khan KN](#), Fujishita A, Kitawaki J. The 8th Annual Research Meeting on Gynecological Hormone-Dependent Diseases, Adenomyosis: its pathogenesis and association with infertility. Tokyo, Japan, May 7-28, 2017 (invited lecture).
5. [Khan KN](#), Fujishita A, Kitawaki J. The 69th Annual Meeting of Japan Society of Obstetrics and Gynecology, Molecular detection of IUMC in endometriosis. Hiroshima, Japan, April 13-16, 2017 (Oral).

**(B) International congress:**

1. [Khan KN](#). Seminar on Reproductive Medicine and discussion on mutual research collaboration. Visible and invisible endometriosis. Vajira Hospital, Navamindradhiraj University, Bangkok,

Thailand. December 24-27, 2017 (invited lecture).

2. Khan KN. The 3rd Annual International Conference of of the Egyptian Fertility and Sterility Society (EFSS) and discussion on mutual research collaboration. Bacterial contamination hypophthesis: a new concept in endometriosis. Cairo, Egypt, November 30-December 3, 2017 (invited speaker).

3. Khan KN. The 3rd Annual International Conference of of the Egyptian Fertility and Sterility Society (EFSS) and discussion on mutual research collaboration. Adolescent endometriosis: current status and its problems in Asia. Cairo, Egypt, November 30-December 3, 2017 (invited speaker and chairperson).

4. Khan KN. Attend 19th World Congress of IVF. Association between endometriosis and reproductive outcome. Antalya/Istambul, Turkey, October 3-12, 2017 (Oral).

5. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 6th Asian Congress of Endometriosis (ACE), Adenomyosis: current understanding from bench to clinic. Shiraj, Iran, November 24-26, 2017 (invited speaker).

6. Khan KN. The 6th Asian Congress of Endometriosis (ACE), Myoma and infertility: role of tissue inflammation in endometrium and myometrium. Shiraj, Iran, November 24-26, 2017 (invited speaker and chairperson).

7. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 18th Annual Meeting of APAGE2017. Occult microscopic endometriosis. Okayama, Japan, September 6-8, 2017 (invited lecture for luncheon seminar).

8. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki A. The 18th Royan International Congress on Reproductive Biomedicine and Stem cells, Molecular detection of IUMC in endometriosis. Tehran, Iran, August 30-September 1, 2017 (The 18th Royan

International Research Award Winner and gave award winning lecture)

9. Khan KN. The Annual Meeting of the Philippine Obstretical and Gynecological Society, Endometriosis and Infertility. Cebu, Philippines, July 22-27, 2017 (invited lecture).

10. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 13th World Congress on Endometriosis (WCE). Role of bacterial contamination in endometriosis. Vancouver, Canada, May 17-20, 2017 (speaker/board meeting/chairperson).

11. Khan KN, Fujishita A. The 3rd Annual Meeting of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders (SEUD). Role of EMT in adenomyosis. Singapore, April 5-7, 2017 (invited speaker/chairperson).

#### **Congress Presentation from April 2016 to March 2017 (Khan Khaleque)**

##### **(A) Domestic congress:**

1. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 38th Japan Endometriosis Congress. Adolescent endometriosis: current status and its problems in Japan, Tokyo, Japan, January 21-22, 2017 (speaker of panel discussion)

2. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 21st Annual Meeting of Japan Society of Reproductive Endocrinology. Epithelial-mesenchymal transition in human adenomyosis: role of hepatocyte growth factor and estrogen, Osaka, Japan, January 14, 2017 (Oral).

3. Khan KN, Fujishita A, Kitawaki J. The 31st Annual Meeting of the Japan Society of Reproductive Immunology. Role of Treg cells in endometriosis. Kobe, Japan, December 2-3, 2016 (Oral)

4. Khan KN. The 7th Meeting on Gynecological Hormone-Depended Diseases. Multi-functional

role of GnRHa in reproductive diseases. Tokyo, May 28, 2016 (invited speaker).

5. Khan KN. The 68th Annual meeting of Japan Society of Obstetrics and Gynecology, Role of EMT in adenomyosis. Tokyo, April 21-24, 2016 (Oral).

**(B) International congress:**

1. Khan KN. The 3rd AMISU International Conference in Prachinburi, Thailand. Endometriosis: current and future treatment. Chaophya Abhaibhubejhr Hospital. March 28-29, 2017 (invited speaker).

2. Khan KN, Kitawaki J. Endometriosis Seminar at Mahidol University, Bangkok, Thailand. Adolescent Endometriosis: a collaborative study between KPUM and Mahidol University. March 26-27, 2017 (educational lecture).

3. Khan KN. Educational lecture at Zhejiang University. Endometriosis and adenomyosis: two enigmatic diseases still need to chase. Hangzhou, PR China, November 15, 2016 (invited lecture).

4. Khan KN. The Annual Meeting of Reproductive Medicine in China, Visible and Invisible endometriosis. Wenzhou Medical University, Wenzhou, PR China, October 26, 2016 (invited speaker).

5. Khan KN. The Annual Meeting of Reproductive Medicine in China, Simple to talk and Simple to write. Wenzhou Medical University, Wenzhou, PR China, October 25, 2016 (invited speaker).

6. Khan KN. China-Japan Exchange Summit of Medical Frontiers, Subsequent treatment for the patients with endometriosis recurrence. Beijing, PR China, October 22-23, 2016 (invited speaker).

7. Khan KN. The 5th Asian Conference on Endometriosis, Role of EMT in human adenomyosis. Osaka, September 22-24, 2016 (symposium speaker).

8. Khan KN. The 5th Asian Conference on Endometriosis, Role of bacterial contamination in endometriosis. Osaka, Sept 22-24, 2016 (Luncheon seminar).

9. Khan KN. The 3rd China-Japan Exchange Forum. Multi-functional role of GnRHa in endometriosis. Osaka, September 21, 2016 (invited speaker).

10. Khan KN. Seminar at the Prince of Songkhla University. Endometriosis and its treatment. Hat Yai, Thailand, August 24-25, 2016 (invited speaker).

11. Khan KN. The Golden Jubilee OBGY Congress of Mahidol University. Adolescent endometriosis (invited lecture). Bangkok, August 9-11, 2016.

12. Khan KN, Kitawaki J. The Golden Jubilee OBGY Congress of Mahidol University. Hormonal treatment of endometriosis (workshop), Bangkok, August 9-11, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

カーン カレク (Khan, Khaleque)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・准教授  
研究者番号: 60336162

(2) 研究分担者(

北島 道夫 (Kitajima, Michio)  
長崎大学・病院(医学系)・講師  
研究者番号: 50380845

(3) 連携研究者(なし)

研究者番号: なし

(4) 研究協力者

藤下 晃 (Fujishita, Akira)  
済生会長崎院婦人科・部長  
研究者番号: 70190030