

令和 4 年 2 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16822

研究課題名(和文) 膣マイクロバイオームプロファイリングによる早産予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of preventive and therapeutic methods for preterm birth by vaginal microbiome profiling

研究代表者

漆山 大知 (Urushiyama, Daichi)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：50790028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膣の中に存在する細菌叢(フローラ)を解析することで、新たな早産の予防・治療戦略におけるターゲットを同定し、抗菌薬を用いた新規治療法を提唱する段階まで至ることができました。

具体的には、膣内細菌叢解析と機械学習を組み合わせ、早産の原因となる絨毛膜羊膜炎(CAM)に関連する細菌20種を同定し、新しいスコアリング法を作成しました。ハイリスク(PCAM)と判定された群は、有意に妊娠延長期間が短く(中央値の差：13日)、3歳時の発達障害の頻度は有意に高い(PCAM：28%、non-PCAM：4%)という結果を得ました。CAMを予防・治療可能と推定される抗菌薬の組み合わせも同定しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠婦人の子宮内感染は早産や胎児感染を引き起こします。感染を伴う早産例では、中・長期的な臓器障害を受けやすくなります。本邦では、晩産化に伴うハイリスク妊娠率の増加や出生数の減少が深刻化するなかで、子宮内感染を予測し、適切に治療・管理し、一人でも多く健康な児を出生させることが強く求められています。

本研究では膣内フローラを解析することで子宮内感染のリスクを診断できることを明らかにしました。ターゲットとなる細菌群を同定でき、治療薬の候補も見つけることができました。本手法でCAMを予測し、治療することができれば、早産リスクを低減できるだけでなく、発達障害等のリスクも減らせる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：By analyzing the vaginal bacterial flora, we were able to identify targets in new preventive and therapeutic strategies for preterm birth and reach the stage of advocating new therapeutic methods using antibiotics.

Specifically, by combining vaginal metagenomic analysis and machine learning, we identified 20 species of bacteria associated with chorioamnionitis (CAM) that cause preterm birth and created a new scoring method. The high-risk (PCAM) group had a significantly shorter duration of pregnancy (median difference, 13 days) and a significantly higher frequency of developmental disorders in 3-year-old infants (PCAM, 28%; non-PCAM, 4%). We also identified a combination of antibacterial agents that are presumed to be able to prevent and treat CAM.

研究分野：産婦人科

キーワード：膣内細菌叢 16S rRNA遺伝子 絨毛膜羊膜炎 切迫早産 早産 機械学習 妊娠延長期間 発達障害

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究成果によって、早産には様々な交絡因子が存在するものの、子宮内感染による炎症の関与が最も大きいことが報告されました(Romero, *Science*, 2014 review)。特に、胎児を包む卵膜の絨毛膜と羊膜に細菌感染が及び絨毛膜羊膜炎は、子宮内感染の組織学的確定診断法の一つですが、早産の約 70%を占めています。これまで、不顕性絨毛膜羊膜炎の存在や妊娠中の羊水採取の侵襲性などの様々な理由で分娩前に子宮内感染を診断することは困難とされてきました。申請者らはこの状況を打開するべく、子宮内ではなく腔内に絨毛膜羊膜炎などの周産期転帰を予測可能なバイオマーカーとなる腔マイクロバイオームプロファイルが存在するかという学術的「問い」に答えたいと考え、本研究をスタートしました。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期の転帰を予測可能なバイオマーカーとなる腔マイクロバイオームプロファイルを決定し、早産の予防と治療における「真のターゲット」を同定して、さらに予防法と治療法の開発を行うことです。

## 3. 研究の方法

2014年5月～2016年4月の2年間に切迫早産の診断で入院し、本研究に同意した未破水の日本人妊婦 83 例を対象として、入院時の腔分泌物を採取しました。分娩時の CAM の Blanc 分類に基づいて、CAM 群 (Stage II 度以上) 46 例と non-CAM 群 (Stage I 度以下) 37 例の 2 群でケースコントロール研究を行いました (図 1)。

腔分泌物中の DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1V2 領域をターゲットとして MiSeq で 16S rDNA amplicon sequencing を行い、多様性解析、UniFrac 距離を用いた多様性解析、細菌組成解析を行いました。Random Forest を用いて CAM 群と関連の強い菌種を同定し、それらの検出パターンに基づくスコアリング法 “PCAM score” を作製し、ROC 曲線を用いて診断精度を評価しました。

臨床的意義を検討するために行ったサブ解析では、妊娠高血圧腎症や切迫子宮破裂・子宮奇形のない 36 週未満の切迫早産例 47 例において、PCAM 陽性群 (n=22) と PCAM 陰性群 (n=25) で比較検討し、PCAM score の臨床的意義を検討しました。

$P < 0.05$  を統計学的有意差としました。

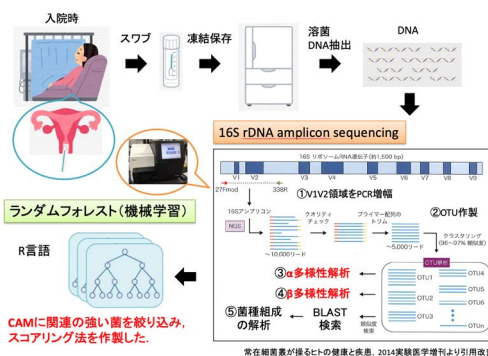
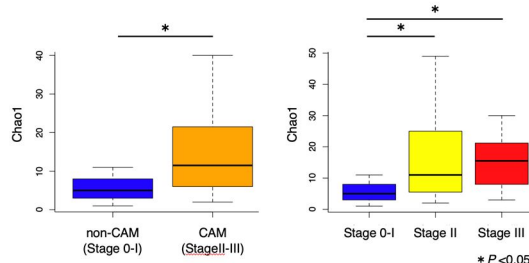


図1. 機械学習を用いた腔内細菌叢解析の方法

## 4. 研究成果

CAM 群の 多様性指数 chao1 は、non-CAM 群のそれよりも有意に高値でした ( $P < 0.001$ ) (図 2)。主座標分析では、各群がクラスターを形成しませんでした。Weighted UniFrac 距離の PERMANOVA 検定では有意差がありませんでしたが ( $P=0.116$ )、Un-weighted UniFrac 距離のそれでは有意差がありました ( $P < 0.001$ ) (図 3)。

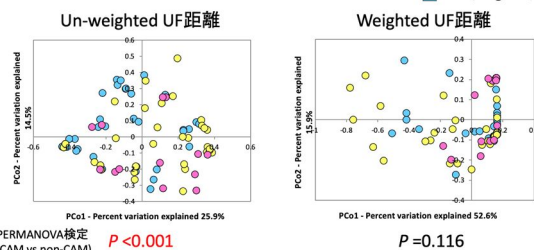
【方法】各試料のChao1(細菌の種類数に相当)を算出し、群間比較した。



【結果】CAM例ではα多様性が有意に高く、Stagingにも相関した。  
【考察】CAMのリスク評価に有用な可能性あり

図2. Chao1の比較(α多様性解析)

【方法】UniFrac距離(UF距離)の主座標分析を行い、PERMANOVA検定を用いて分散の程度を比較した。

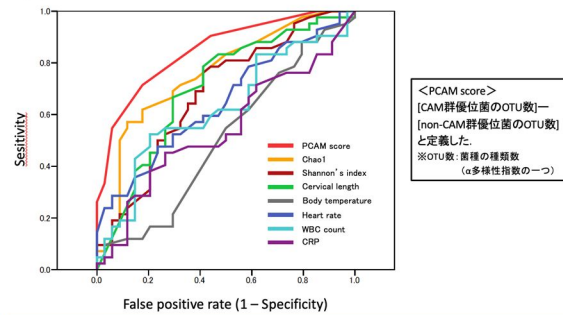


【結果】Un-weighted UF距離でのみ、分散の程度が有意に異なった。  
【考察】組成比の低い菌で差があることが示唆された。

図3. 各試料の細菌組成の比較(β多様性解析)

CAM 群と関連の強い上位 20 菌種を絞り込み、それらの検出パターンに基づくスコアリング法”PCAM score”による CAM 群の予測精度は AUC 0.849 (95%信頼区間 0.765-0.934)、感度 71.4%、特異度 82.4% でした(図 4, 表 1)。

【方法】 作製したスコアリング法が臨床的な指標である体温・心拍数・白血球数・CRP値・子宮頸管長と一般的な16S rRNA遺伝子解析結果であるα多様性指数(chao1・Shannon's index)と比較して優れているかを検討するために、ROC曲線を描き、CAMの診断精度を比較した



【結果】 PCAMが最もAUCが大きかった。  
【考察】 機械学習を取り入れてOTU数をカウントする手法はCAMの予測に有用であると推察される

図4. PCAM scoreと臨床データ・16S解析データによるCAMの診断予測精度

表 1. ROC 曲線の結果

	AUC (95%CI)	Cut-off value	Sensitivity	Specificity	Youden Index
PCAM score	0.849 (0.765 - 0.934)	1.5	0.714	0.824	0.538
chao1	0.760 (0.650 - 0.870)	9.8	0.571	0.882	0.453
shannon's index	0.683 (0.562 - 0.805)	0.26	0.762	0.588	0.350
Cervical length at sampling (mm)	0.702 (0.582 - 0.823)	21.5	0.786	0.588	0.374
Body temperature at sampling (° C)	0.506 (0.373 - 0.639)	36.5	0.881	0.206	0.087
Heart rate at sampling (/min)	0.648 (0.526 - 0.771)	96.5	0.476	0.765	0.241
WBC count in maternal peripheral blood at sampling (cells/μL)	0.625 (0.498 - 0.752)	12150	0.524	0.794	0.318
CRP in maternal peripheral blood at sampling (mg/dL)	0.546 (0.415 - 0.676)	0.75	0.452	0.735	0.187

”PCAM score”で Youden index が最大となったカットオフ値が1.5であったため、2 以上を PCAM 陽性、1 以下を PCAM 陰性と定義しました。サブ解析における患者背景を比較した結果は、全体の患者背景を比較した結果と大差なく、CAM 群は早産傾向があるとともに周産期アウトカムが不良でした。予測精度の検証においても、これまでの解析と矛盾なく、PCAM score が最も精度が高く、AUC, Youden index, カットオフ値などもこれまでの解析結果と概ね一致しました。

PCAM 群と non-PCAM 群の比較では、出生時の妊娠年齢や出生体重で有意差はなかったが、妊娠延長期間で有意差があり、中央値の比較では non-PCAM は PCAM より約 2 週間長かった(中央値:PCAM 群 4 日, non-PCAM 群 17 日,  $P=0.022$ )。つまり、PCAM が診断予測に最も有用なだけでなく、CAM 関連菌を治療のターゲットとして PCAM 群を non-PCAM 群に誘導できれば、約 2 週間の妊娠期間の延長が見込めることが示唆されました。

3 歳時の発達障害の頻度は PCAM 群で 28% (5/18 例)、non-PCAM 群で 4%(1/23 例)であり、24% の差を認めました。また興味深いことに、サブ解析において 3 歳時に発達障害を認めた 6 例の内訳を見ると、non-PCAM 群の 1 例は SGA 例でしたが、PCAM 群の 5 例は全て SGA ではありませんでした。そこで、多変量解析としてロジスティック回帰分析を行ったところ、SGA で補正した 3 歳時の発達障害では有意差を認めました ( $P=0.022$ , オッズ比 10.93, 95%信頼区間 1.37-288.33)。したがって、本手法によって CAM を予測してターゲットとなる細菌群を治療することで、約 2 週間の妊娠期間の延長を見込めるだけでなく、発達障害の頻度を減らせる可能性が示唆される結果でした。

これらの細菌群は新たな早産予防・治療戦略の標的となると考えられます。近い将来、迅速型の次世代シーケンサー等が臨床応用可能となれば、分娩前に感染性早産を予測・治療できるようになり、機械学習や人工知能によって診断精度の向上も期待できるという結果でした。適切な抗菌薬治療やプロ/プロバイオテックスや腔内細菌叢移植などの方法が確立すれば、感染性早産そのものを減らせる可能性が十分にあり、これらの実現による社会的意義は大きいと考えられます(図 5)。

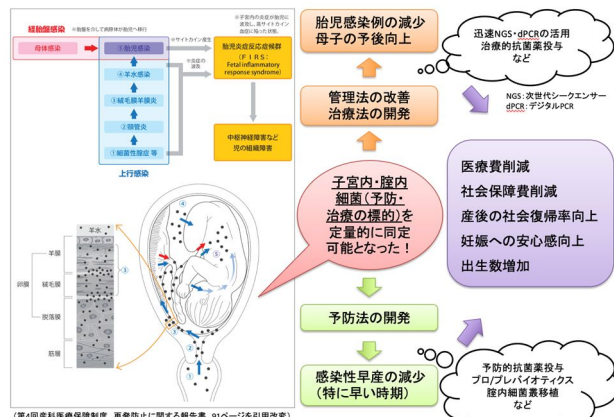


図5. マイクロバイオーム研究に基づく新たな早産予防・治療戦略の可能性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Urushiyama Daichi, Ohnishi Eriko, Suda Wataru, Kurakazu Masamitsu, Kiyoshima Chihiro, Hirakawa Toyofumi, Miyata Kohei, Yotsumoto Fusanori, Nabeshima Kazuki, Setoue Takashi, Nagamitsu Shinichiro, Hattori Masahira, Hata Kenichiro, Miyamoto Shingo	4. 巻 11
2. 論文標題 Vaginal microbiome as a tool for prediction of chorioamnionitis in preterm labor: a pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98587-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiyoshima C, Shirasu N, Urushiyama D, Fukagawa S, Hirakawa T, Yoshikawa K, Izuchi D, Miyata K, Kurakazu M, Yotsumoto F, Hiromatsu K, Nomiya M, Ohta E, Hirose S, Ogura Y, Hayashi T, Hata K, Nabeshima K, Yasunaga S, Miyamoto S	4. 巻 Published online
2. 論文標題 MicroRNAs miR-4535 and miR-1915-5p in amniotic fluid as predictive biomarkers for chorioamnionitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Future Science OA	6. 最初と最後の頁 FS0686 ~ FS0686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/fsoa-2021-0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichiyama Takuhiko, Kuroda Keiji, Nagai Yoko, Urushiyama Daichi, Ono Motoharu, Yamaguchi Takashi, Nagayoshi Motoi, Sakuraba Yoshiyuki, Yamasaki Fumio, Hata Kenichiro, Miyamoto Shingo, Itakura Atsuo, Takeda Satoru, Tanaka Atsushi	4. 巻 Published online
2. 論文標題 Analysis of Vaginal and Endometrial Microbiota Communities in Infertile Women With a History of Repeated Implantation Failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-73125/v1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Masamitsu Kurakazu, Fusanori Yotsumoto, Hisatomi Arima, Daisuke Izuchi, Daichi Urushiyama, Kohei Miyata, Chihiro Kiyoshima, Satoshi Fukagawa, Kenichi Yoshikawa, Mariko Kurakazu, Toyofumi Hirakawa, Koichi Shigekawa, Ryota Araki, Ayako Sanui, Msaharu Murata, Kazuki Nabeshima, Shingo Miyamoto	4. 巻 80
2. 論文標題 The combination of maternal blood and amniotic fluid biomarkers improves the predictive accuracy of histologic chorioamnionitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 漆山大知、秦健一郎、宮本新吾
2. 発表標題 周産期領域のマイクロバイオーーム研究
3. 学会等名 日本性感染症学会第34回学術大会、シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Urushiyama, Chihiro Kiyoshima, Satoshi Fukagawa, Masamitsu Kurakazu, Fusanori Yotsumoto, Kenichiro Hata, Shingo Miyamoto
2. 発表標題 Perinatal outcomes in patients with preterm labor diagnosed as a high-risk of chorioamnionitis by vaginal microbiome analysis
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会、インターナショナルセッション
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daichi Urushiyama, Chihiro Kiyoshima, Toyofumi Hirakawa, Daisuke Izuchi, Satoshi Fukagawa, Ayako Sanui, Kohei Miyata, Masamitsu Kurakazu, Fusanori Yotsumoto, Kenichiro Hata, Shingo Miyamoto
2. 発表標題 Predictive diagnosis of chorioamnionitis by quantification of specific vaginal bacteria using droplet digital PCR
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会、インターナショナルセッション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 漆山大知、清島千尋、深川怜史、倉員正光、四元房典、秦健一郎、宮本新吾
2. 発表標題 Perinatal outcomes in patients with preterm labor diagnosed as a high-risk of chorioamnionitis by vaginal microbiome analysis
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 漆山大知、平川豊文、清島千尋、井槌大介、深川怜史、倉員正光、荒木陵多、讃井絢子、四元房典、村田将春、秦健一郎、宮本新吾
2. 発表標題 膣内細菌叢解析による絨毛膜羊膜炎の予測
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 漆山大知、秦健一郎、宮本新吾	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 199
3. 書名 産科と婦人科 特集 早産と妊娠高血圧腎症：病因・病態生理 - 私はこうみる、細菌叢の観点から	

1. 著者名 漆山大知、秦健一郎、宮本新吾	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学工業社	5. 総ページ数 528
3. 書名 化学工業 2020年8月号、特集 次世代健康・医療・福祉の科学、絨毛膜羊膜炎関連微生物の同定ならびに検出方法の開発	

1. 著者名 漆山大知	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 80
3. 書名 周産期領域における細菌叢解析で期待されることは？, No.5057	

1. 著者名 漆山大知, 秦健一郎, 宮本新吾	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社メディカルドゥ	5. 総ページ数 154
3. 書名 遺伝子医学 第11巻第2号(通巻36号)、メタゲノム解析・メタ16S解析	

1. 著者名 漆山大知, 秦健一郎, 宮本新吾	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 120
3. 書名 「周産期医学」特集 周産期医療と細菌叢 妊婦編、早産と羊水細菌叢	

1. 著者名 漆山大知, 秦健一郎, 宮本新吾	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 623
3. 書名 ヒトマイクロバイオーーム Vol.2 ~ 解析技術の進展とデータ駆動型・ターゲット機能型研究最前線 ~ (監修/服部正平) 第5編第3章、生殖器系マイクロバイオーームと疾患 女性生殖器系のマイクロバイオーームと早産予防・治療を中心に	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 絨毛膜羊膜炎の発症予測方法	発明者 宮本新吾, 漆山大知, 四元房典, 秦健一郎	権利者 福岡大学, 国立成育医療研究センター
産業財産権の種類、番号 特許、2019-221539	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 絨毛膜羊膜炎の発症予測方法	発明者 宮本新吾、漆山大 知、四元房典、秦健 一郎	権利者 福岡大学、国立 成育医療研究セ ンター
産業財産権の種類、番号 特許、2019-221543	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 子宮内感染の検出法	発明者 宮本新吾、漆山大 知、四元房典、秦健 一郎	権利者 福岡大学、国立 成育医療研究セ ンター
産業財産権の種類、番号 特許、2020-013930	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------