

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09663

研究課題名（和文）「羊水中菌数」を新たなバイオマーカーとして早産児の後遺症なき生存を目指す治療戦略

研究課題名（英文）Development of a novel quantitative biomarker for intrauterine microorganisms and treatment flowchart to prevent severe complication in preterm infants.

研究代表者

米田 徳子（YONEDA, NORIKO）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：80377283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：切迫早産の子宮内病原微生物の迅速高感度PCR法を開発し、重複感染が予後不良であること、適切な抗菌薬治療の有効性を報告してきた。今回新たに、高度の絨毛膜羊膜炎に関連する菌種の同定と菌量評価するシステムを確立した。切迫早産の羊水中菌量が多い症例では、重複感染・新生児感染症が高率で、周産期予後不良であることがわかった。早産児の長期神経発達予後をBayley乳幼児発達尺度を用いて評価し、神経発達予後不良因子が在胎30週未満の早産、母体の腎機能低下を伴う妊娠高血圧腎症であることを報告した。また、カナダのMcMaster大学との共同研究により、日本とカナダの早産管理の国際比較を行い、両国の強みを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の超低出生体重児（出生体重1000g未満）の予後は、3歳までの死亡率約15%、神経学的後遺症、視力障害、呼吸器疾患などの重篤な障害をもつ割合は約30%とされ、長期間のNICU入院が必要であり、退院後も重い障害をもった児を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。本研究の成果により、切迫早産の子宮内病原微生物を迅速高感度に検出定量することができ、適切な抗菌薬投与が可能となるため、学術的意義がある。また、菌量をバイオマーカーとした治療効果判定、より適切な治療薬の選択による早産児の重症化予防が期待される。ひいては、早産児の予後改善につながり社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a rapid, highly sensitive PCR for intrauterine microorganisms in preterm labor patient and have reported the poor prognosis of superinfection and the effectiveness of appropriate antimicrobial therapy. In this study, we established a new system to identify and evaluate bacterial species. We found that cases with high amniotic fluid bacteria levels in cases of preterm labor had a high rate of superinfection and neonatal infections, and had a poor perinatal prognosis.

The long-term neurodevelopmental prognosis of preterm infants was evaluated using the Bayley Infant Development Scale, and we reported that the poor neurodevelopmental prognostic factors were preterm delivery at less than 30 weeks' gestation and preeclampsia with decreased maternal renal function. In collaboration with McMaster University in Canada, we also conducted an international comparison of preterm birth management in Japan and Canada and reported the strengths of the two countries.

研究分野：産婦人科

キーワード：早産 子宮内感染・炎症 起炎菌同定・定量検査法 早産児の長期神経発達 国際比較

1. 研究開始当初の背景

日本の超低出生体重児(出生体重 1000g 未満)の予後は、暦年齢 3 歳までの死亡率約 15%、神経学的後遺症、視力障害、呼吸器疾患などの重篤な障害をもつ割合は約 30%とされ、長期間の NICU 入院が必要であり、退院後も重い障害をもった児を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。絨毛膜羊膜炎は、早産、特に在胎週数が短い超早産で高率に認められ、分娩時の胎盤組織培養では、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)。子宮内感染や絨毛膜羊膜炎(CAM)は、早産の中でもより重症な、在胎 28 週未満の早産で高率に認められる。しかし、未破水切迫早産に対する抗菌薬治療は無効とされていた。我々は独自に開発した細菌 DNA 汚染のない迅速高感度 PCR 法を用いて、未破水切迫早産の羊水感染例に適切な抗菌薬治療を行うと早産予後が改善し、羊水非感染例では抗菌薬使用により逆に早産予後が悪くなることを報告した(*Am J Reprod Immunol* 2016)。この結果は起因菌が存在しない場合、腸内細菌叢を抗菌薬が乱し、早産になったと推察させる。また、早産児の長期神経学的予後の改善のためには、在胎 30 週未満の早産を防ぐことが重要である。

2. 研究の目的

本研究は当院で開発した**細菌 DNA 汚染のない迅速高感度 PCR 法に加え、菌数を新たなバイオマーカー**として、治療効果のモニタリングに使用する。未破水切迫早産の羊水感染例の抗菌薬治療後の根絶率と周産期予後を明らかにし、羊水感染例や前期破水(pPROM)例に抗菌薬投与を行った際、腸内細菌叢が乱れるが、これを防ぐためにプロバイオティクス製剤を併用することで、さらに早産予後を改善できるかを前方視的に検討し、これらの新たな診断・治療戦略をもとに切迫早産を管理し、早産児の短期予後のみならず、**長期神経発達予後**を改善できるかを検討することにより、超早産と重篤な後遺症を持つ児の減少をめざす研究である。

3. 研究の方法

臨床検体より DNA を抽出し、細菌由来 DNA を PCR 法で同定することは広く行われているが、高感度にすると、偽陽性になるという問題がある。これは遺伝子増幅に用いる recombinant Taq DNA Polymerase が大腸菌由来のため、微量細菌由来 DNA が混入するからである。1)これを克服するため酵母を用いたりコンビナント Taq DNA Polymerase を独自に精製し、細菌の遺伝子検査で高感度の検出を可能とした(細菌検出専用として開発した Taq DNA Polymerase:特願 2009-40052, Niimi H et al, *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3316-20.)。2)高感度 PCR を行うと、しばしば Primer dimer を形成し偽バンドが形成される。PCR 増幅産物の Tm 値を primer dimer のそれより 10 以上高温に設定し、Extension 後に短時間高温にし、Primer dimer を形成しない masked Primer Dimer 法(特願 2009-023707)を開発した。3)1 回の PCR 法により semi-nested PCR を行い、迅速高感度の細菌遺伝子検査を実現させた(one step nested PCR 法:特願 2009-023707)。4)生成 PCR product の Tm 値が菌の種類毎で異なることを利用して超因菌同定を可能にした。更にデータベース型起因菌同定ソフトウェアを Web 上で利用できるように開発した。本方法はシーケンスを省略できるので短時間で菌種を同定するのに役立つ(迅速な感染症起因同定 IT システム:PCT/JP 2007/053078)。**平均 5 時間で病原微生物の検出が可能**になり、さらに高度の絨毛膜羊膜炎に関連する**菌種の同定(Probe 法)と、菌量を評価するシステム(大腸菌の換算値を用いて定量)も新たに確立**した。偽陽性のない本 PCR 法ならびに菌種同定・定量は新規性があり、本検査法を用いて、切迫早産ならびに pPROM 症例の子宮内感染の評価を迅速に行い、感染例に適切な抗菌薬治療を行い、**菌数を新たなバイオマーカーとして重症度と治療効果判定に利用する Bayley 乳幼児発達尺度(Bayley-)を用いた早産児の長期神経発達予後評価**。Bayley 乳幼児発達尺度(Bayley-)は、米国で開発された乳幼児発達検査法であり、世界 20 か国以上で広く使用されており、生後 1 か月から 42 か月の乳幼児への直接検査により認知・言語・運動の指標得点から、発達をアセスメントする。本邦では独自の検査法である津守式や新版 K 式が頻用されているが、当院では世界的に使用されている Bayley- で早産児の神経発達を検査しており、国際的な評価が期待される。

早産の予防、管理法の国際比較。日本の早産率は、欧米の半数以下であり、早産児の予後は世界でもトップレベルであり、国外からも注目されている。カナダ McMaster 大学の Sarah D McDonald 教授と、富山大学ならびに共同研究者とともに、早産の予防についての国際交流をしている。切迫早産の予防、治療、早産児の管理法、予後について、意見交換し文献的考察を加え国際比較を行う。

4. 研究成果

研究成果を 3 論文に報告(~)した。

当院で出生した在胎 34 週未満の早産児の長期神経学的予後を Bayley 乳幼児発達尺度

(Bayley-3)で評価し、予後不良に関係する周産期因子を検討した。長期神経発達予後不良の独立因子は、在胎 30 週未満の早産と、母体腎機能低下を伴う妊娠高血圧腎症であることがわかり、論文報告した。

Yoneda N et al, Preeclampsia complicated with maternal renal dysfunction is associated with poor neurological development at 3 years old in children born before 34 weeks of gestation. *Frontiers in Pediatrics*. 2021

日本の早産率は 5%であり、欧米の 10%より低く、早産児の予後も日本は世界の中でもトップクラスで良好である。カナダの McMaster 大学と共同研究し、早産の予防・治療、早産児の管理を国際比較し、論文報告した。母体、新生児、社会的因子における、研究の優先課題を抽出した。

Yoneda N et al, Learning From Strengths: Improving Care by Comparing Perinatal Approaches Between Japan and Canada and Identifying Future Research Priorities. *J Obstet Gynaecol Can*. 2021

自然早産歴のある妊婦にプロバイオティクス製剤を内服した場合の、早産率について論文報告した。繰り返す早産率はプロバイオティクス製剤内服群では 9.8% で、過去の報告の非内服群 31%より有意に低かった。

Arai EN, Yoneda S, Yoneda N et al, Probiotics including *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium*, and *Bacillus subtilis* may prevent recurrent spontaneous preterm delivery. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022

当院で 2017~2022 年に切迫早産管理した症例で、経腹的に羊水穿刺もしくは帝王切開で採取した羊水を用いて、迅速高感度 PCR 法、Probe 法により羊水中病原微生物を同定、定量した。菌量が多い(1 万個/mL 以上)症例では、重複感染ならびに新生児感染症が高率で、周産期予後不良であった。

以上の成果を、2020~2023 年の日本産科婦人科学会、日本周産期・新生児学会(教育講演含む)、2021 年北日本産科婦人科学会の特別講演、日本妊娠高血圧学会のシンポジウムで、研究結果を報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoneda N, Yoneda S, Tsuda S, Ito M, Shiozaki A, Niimi H, Yoshida T, Nakashima A, Saito S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pre-eclampsia Complicated With Maternal Renal Dysfunction Is Associated With Poor Neurological Development at 3 Years Old in Children Born Before 34 Weeks of Gestation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Pediatr.	6. 最初と最後の頁 1 - 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2021.624323	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 -
1. 著者名 Yoneda N, Isayama T, Saito S, Shah P, Santaguida P, Nakamura T, McDonald SD.	4. 巻 43 (12)
2. 論文標題 Learning From Strengths: Improving Care by Comparing Perinatal Approaches Between Japan and Canada and Identifying Future Research Priorities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Can.	6. 最初と最後の頁 1388-1394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jogc.2021.04.018.	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 -
1. 著者名 Arai EN, Yoneda S, Yoneda N, Ito M, Tsuda S, Shiozaki A, Nohira T, Hyodo H, Kumazawa K, Suzuki T, Nagasaki S, Makino S, Saito S.	4. 巻 48(3)
2. 論文標題 Probiotics including Clostridium butyricum, Enterococcus faecium, and Bacillus subtilis may prevent recurrent spontaneous preterm delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 688-693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15166.	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 -
1. 著者名 米田徳子	4. 巻 57(4)
2. 論文標題 早産児の後遺症なき生存を目指して	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本周産期・新生児学会雑誌 学術集会記録号	6. 最初と最後の頁 581-585
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中井章人、米田徳子	4. 巻 57(4)
2. 論文標題 シンポジウム3「早産予防～第三世代へ～」座長のまとめ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本周産期・新生児学会雑誌 学術集会記録号	6. 最初と最後の頁 629
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 米田 哲、米田徳子	4. 巻 1
2. 論文標題 携]専攻医と指導医のための産科診療到達目標】病態・疾患編【妊娠中】絨毛膜羊膜炎	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1332-1334
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoneda N, Yoneda S, Tsuda S, Ito M, Shiozaki A, Nakashima A, Saito S
2. 発表標題 Preeclampsia complicated with maternal renal dysfunction is associated with poor neurological development at 3 years old children born before 34 weeks of gestation.
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田徳子
2. 発表標題 教育講演3 早産児の後遺症なき生存を目指して
3. 学会等名 第57回日本周産期・新生児医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田徳子
2. 発表標題 特別講演 早産児の長期予後不良因子から見えてきた新たな治療および予防戦略について
3. 学会等名 第68回北日本産科婦人科学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田徳子
2. 発表標題 シンポジウム3「妊娠高血圧症候群・胎児発育不全の予知・予防」妊娠高血圧腎症の胎児発育不全に対するアンチトロンビンの予防効果の期待
3. 学会等名 第41回日本妊娠高血圧学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriko Yoneda, Satoshi Yoneda, Sayaka Tsuda, Mika Ito, Arihiro Shiozaki, Shigeru Saito
2. 発表標題 Appropriate antibiotic administration can eradicate intra-amniotic infection in patients with preterm labor and intact membranes
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 米田徳子, 齋藤滋.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 350
3. 書名 特集/腎と妊娠update	

1. 著者名 米田徳子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 263
3. 書名 くすこれ 助産師のための薬 これだけ～秒でひけてケアにつながる 第1章妊娠期 9 切迫早産、早産 予防 黄体ホルモン ヒドロキシプロゲステロンカブロン酸エステル	

1. 著者名 米田徳子、齋藤 滋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 289
3. 書名 早産のすべて - 基礎から臨床・DOHaDまで - 腸内細菌叢と早産	

1. 著者名 米田徳子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 263
3. 書名 くすこれ 助産師のための薬 これだけ～秒でひけてケアにつながる 第1章妊娠期 9 切迫早産、早産 予防 黄体ホルモン ヒドロキシプロゲステロンカブロン酸エステル	

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	仁井見 英樹	富山大学・学術研究部医学系・准教授	
	(NIIMI HIDEKI)		
	(50401865)	(13201)	

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
---------	---------