

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861478

研究課題名(和文) 早産の原因解明-羊水中感染微生物の迅速高感度検出システムの構築-

研究課題名(英文) Establishment of Highly sensitive PCR method for detection of microorganisms in amniotic fluid.

研究代表者

米田 徳子 (YONEDA, NORIKO)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：80377283

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)：早産の主要因に子宮内感染に基づく絨毛膜羊膜炎があるが、従来の細菌培養法は、検査に時間を要するという問題があった。また種々の炎症性疾患で腸内細菌叢の変化が指摘されているが、早産については検討されていない。

独自開発したTaq polymeraseを用い、子宮内病原微生物の迅速高感度検出法を構築した。従来法の約4倍の検出率で、検出時間は6日間から平均6時間に大幅に短縮した。切迫早産でウレプラズマ、マイコプラズマ、細菌混合陽性例では、陰性例に比し有意に分娩週数が早く、子宮内炎症が高度で周産期予後不良だった。また、腸内細菌叢のクリストリウム属が早産例で正常例より減少することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The cause of preterm birth before 28 weeks of gestation seems to be multifactorial but many studies indicate that microbial invasion into pregnant uterus is one of the important risk factors for preterm birth. To study the relationship between microorganisms in amniotic fluid (AF) and intra-amniotic (IA) inflammation and or preterm labor (PTL) using highly sensitive and reliable PCR-based method for detection. To detect prokaryotes by using a nested-PCR-based method, eukaryote-made thermostable DNA polymerase, which is free from bacterial DNA contamination, is used in combination with bacterial universal primers. AF IL-8 levels in PTL with positive Mycoplasma/Ureaplasma and/or other bacteria were significantly higher than the cases without infection. Our newly established PCR method is useful to for detecting IA microorganisms. Polymicrobial infection with Mycoplasma/Ureaplasma and other bacteria is associated with severe IA inflammation.

研究分野：産婦人科

キーワード：切迫早産 高感度病原微生物同定検査 子宮内感染 絨毛膜羊膜炎 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

予後不良の在胎 28 週以前の早産率は約 30 年で 2 倍以上に増加し、大きな社会問題となっている。早産の主要因として **子宮内感染** に基づく **絨毛膜羊膜炎 (CAM)** が知られている。腸内細菌叢、腔内細菌叢のアンバランスが CAM の一因と考えられているが、直接的な証明は未だなされていない。子宮内感染は従来の方法では、菌体培養、薬剤感受性検査に 1 週間以上要するため、切迫早産の際に抗菌薬治療の対象となるのかを知ることや、適切な抗菌薬選択も不可能であった。これまでの培養検査は培養後に増殖する菌種と減少する菌種が混在するため、本来の細菌叢を反映していないという問題点が提起されている。この問題点を解決するために、**分子生物学的に DNA 配列から病原体を検出する方法を開発した。**

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、早産の治療に応用すること。(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原因を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)**羊水の感染微生物の高感度遺伝子検査の構築と現行の細菌検査法との比較評価**: 独自開発した Taq DNA Polymerase、masked Primer Dimer 法、One Step nested PCR 法を組合せ、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマそれぞれのユニバーサル・プライマーを設計して、感染微生物それぞれを検出する高感度・高特異度な遺伝子検査法を構築する。感度と特異度の評価は、細菌検査室に保存して

ある各種菌株の DNA を用いる。患者検体の検査結果について、現行法と本研究法との迅速性・感度・特異度・一致率を比較検討する。

(2)**現行法と併用する形で子宮内感染症の迅速な検査・診療システムの運用**: 実際に現行の細菌検査法と併用する形で、子宮内感染症における迅速な検査・診療システムの試験運用を開始する。実際に運用しながら評価・改善を繰り返し、実用的な運用を目指す。

(3)**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**: 羊水中の IL-8、TNF、IL-17 は CAM になると急速に増加することがこれまでの我々の研究で明らかとなっているが、羊水中の病原微生物の種類や菌体量と相関するかは知られていないので検討する。

(4)**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**: 切迫早産例、早産例、正常妊婦より妊娠中に便および腔分泌物を採取し、DNA を抽出後に T-RFLP 法を行う。

(5)**羊水感染例と非感染例の予後 Kaplan-Meier 法で検討**

(6)**早産例で腸内細菌叢の異常が認められれば、整腸剤投与による介入を従来のトコリシスに加えて行う。**

4. 研究成果

(1)**羊水の感染微生物の高感度遺伝子検査の構築と現行の細菌検査法との比較評価**: 羊水検体採取から結果判明まで平均 6 時間で検査可能となり、現行の細菌検査法(結果判明まで平均 6 日間)に比し、迅速になった。切迫早産例(n=118)の感染微生物の検出率は、現行の細菌培養検査 7.6%(9/118)に比し、高感度遺伝子検査は 33.1%(39/118)で約 4 倍の検出率だった。なお、検出感度は 100%であった。

- (2) **現行法と併用する形での子宮内感染症の迅速な検査・診療システムの運用**：羊水検体採取から、検査および結果連絡のシステムを構築し実臨床で運用している。
- (3) **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**：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。
- (4) **切迫早産例、早産例、正常妊婦より便、膣分泌物を採取し DNA を抽出後、T-RFLP 法を行う**：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。
- (5) **羊水感染例と非感染例の予後を 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, $p < 0.001$)。細菌のみ陽性例 (n=15) と陰性例では差を認めず、重複感染が予後不良であることがわかった。
- (6) **早産例で腸内細菌叢の異常が認められれば、整腸剤投与による介入を従来のトコリスに加えで行う**：現在症例を蓄積中である。

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 8 件)

- (1) Ueno T, Niimi H, Yoneda N, et al. Eukaryote-Made Thermostable DNA Polymerase Enables Rapid PCR-Based Detection of Mycoplasma, Ureaplasma and Other Bacteria in the Amniotic Fluid of Preterm Labor Cases. PLoS One. 2015 Jun 4;10(6):e0129032.
- (2) Yoneda S, Shiozaki A, Ito M, Yoneda N, et al. Accurate Prediction of the Stage of Histological Chorioamnionitis before Delivery by Amniotic Fluid IL-8 Level. Am J Reprod Immunol. 2015 Jun;73(6):568-76.
- (3) 米田徳子, 米田 哲, 齋藤 滋. 切迫早産 (前期破水は除く) ペリネイタルケア 2015 新春増刊号:32-37, 2015
- (4) 米田徳子. 若手の最新研究コーナー 「早産の原因解明-羊水中感染微生物の迅速高感度検出システムの構築-」産科と婦人科, 82(5):554-557, 2015
- (5) 米田徳子, 塩崎有宏, 齋藤 滋. よくわかる検査と診断 女性医学分野 13. 細菌性膣症. 産科と婦人科 増刊 82;413-416, 2015.
- (6) Shiozaki A, Yoneda S, Yoneda N, et al. Intestinal microbiota is different in women with preterm birth: Results from terminal restriction fragment length polymorphism analysis. PLOS ONE 2014 Nov 5;9(11):e111374.
- (7) 米田徳子, 米田 哲, 齋藤 滋. 特集 最新版 新生児慢性肺疾患 病態-出生前因子とその対応. CAM, 高サイトカイン血症. 周産期医学 44(8);1029-1032, 2014.
- (8) 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋: 頸管炎・絨毛膜羊膜炎と早産. 産科と婦人科. 81(1): 33-37, 2014
[学会発表] (計 8 件)
- (1) 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 .
- (2) 米田徳子, 米田 哲, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . シンポジウム 仮説 “胎盤が考える” を検証する . 絨毛膜羊膜炎を引き起こす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 22 回日本胎盤学会 ; 2014 Oct 3-4 ; 京都 . (シンポジウム口演)
- (3) Noriko Yoneda, Satoshi Yoneda, Masami Ito, Kaori Fukuta, Rika Yonezawa, Mika Ito, Arihiro Shiozaki, Shigeru Saito. Is Amniotic fluid ‘sludge’ a predictive value of preterm delivery in patient with preterm labor? The 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy 2014 Sep 18-20 ; Tokyo .
- (4) 米田徳子, 米田 哲, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 出生体重 1500g 未満の自然早産児では、*Ureaplasma/Mycoplasma* 属の子宮内感染が高率である . 第 50 回日本産科・新生児医学会学術集会 ; 2014 Jul 15 ; 千葉 . (口演)
- (5) 米田徳子, 米田 哲, 伊東雅美, 福田香織, 米澤理可, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 切迫早産における Amniotic fluid sludge の臨床的意義 . 第 87 回日本超音波医学会学術集会 ; 2014 May 10 ; 横浜 . (口演)
- (6) 米田徳子, 米田 哲, 伊東雅美, 福田香織, 米澤理可, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 切迫早産における Amniotic fluid sludge は子宮内感染, 早産予知マーカーになり得るか? 第 66 回日本産科婦人科学会学術集会 . 優秀演題賞受賞 ; 2014 Apr 18-20 ; 東京 . (口演)
- (7) 米田徳子, 米田 哲, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋, 上野智浩, 仁井見英樹, 北島 勲 . 羊水中病原微生物の迅速同定法をもちいた産科診療システム構築と臨

床応用 . 富山大学学際交流会学長奨励賞受賞 ; 2014 Mar 10 ; 富山 . (ポスター発表)

- (8) 米田徳子, 米田 哲, 草開 妙, 森尻昌人, 津田さやか, 鮫島 梓, 米澤理可, 伊藤実香, 塩崎有宏, 齋藤 滋 . 迅速・高感度な遺伝子検査システムによる切迫早産の羊水中感染微生物の検出と子宮内炎症の評価 . 第 65 回日本産婦人科学会総会 ; 2013 May 13-15 ; 札幌 .

〔図書〕(計 1 件)

米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋 : 妊娠中期に胎胞形成や頸管長短縮を認めたら、どのような管理を行うべきでしょうか? 産科診療 Q&A 一つ上に行く診療の実践 , 78-82 , 2015

〔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 :
出願年月日 :
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

米田 徳子 (YONEDA, Noriko)
富山大学・産科婦人科・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

()

研究者番号 :

