



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

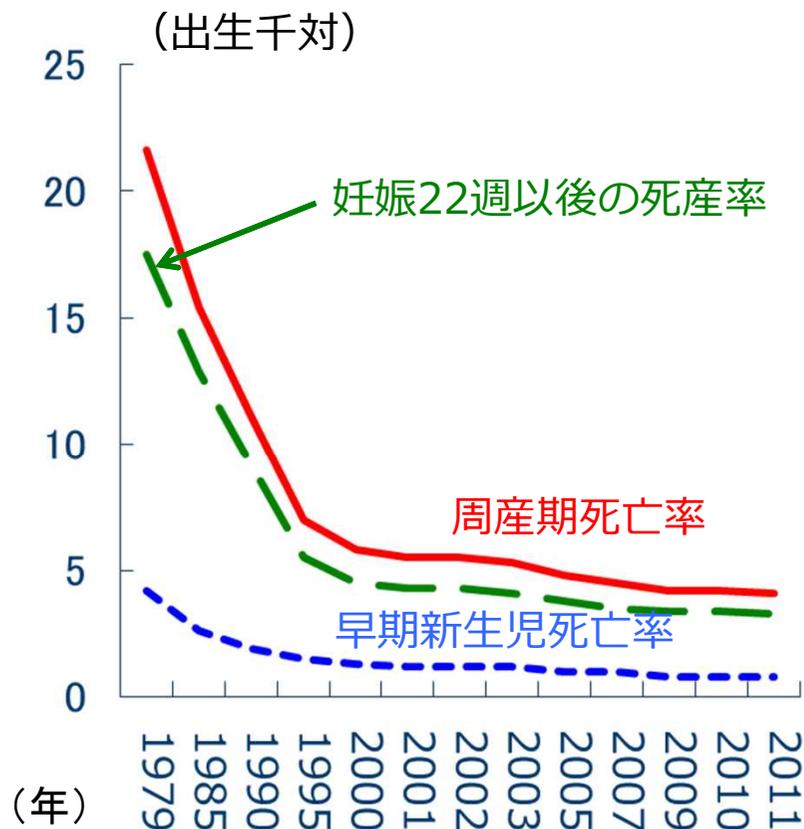
福岡大学 医学部 医学科 産科婦人科学

教授 宮本新吾

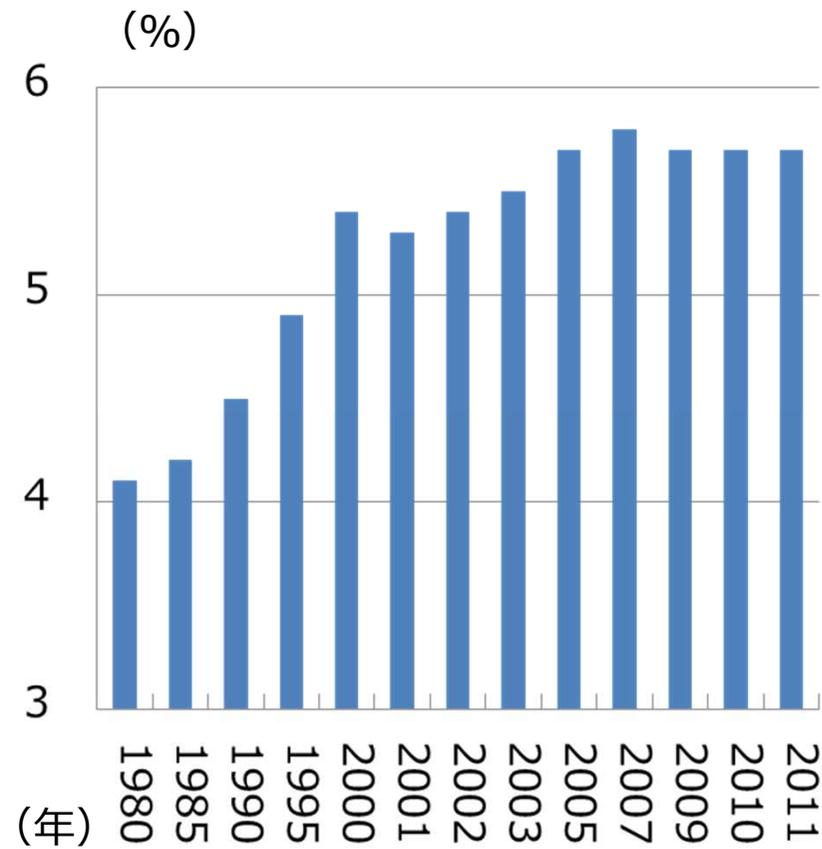
2019年5月21日

本邦における周産期死亡率および早産の背景

周産期死亡率

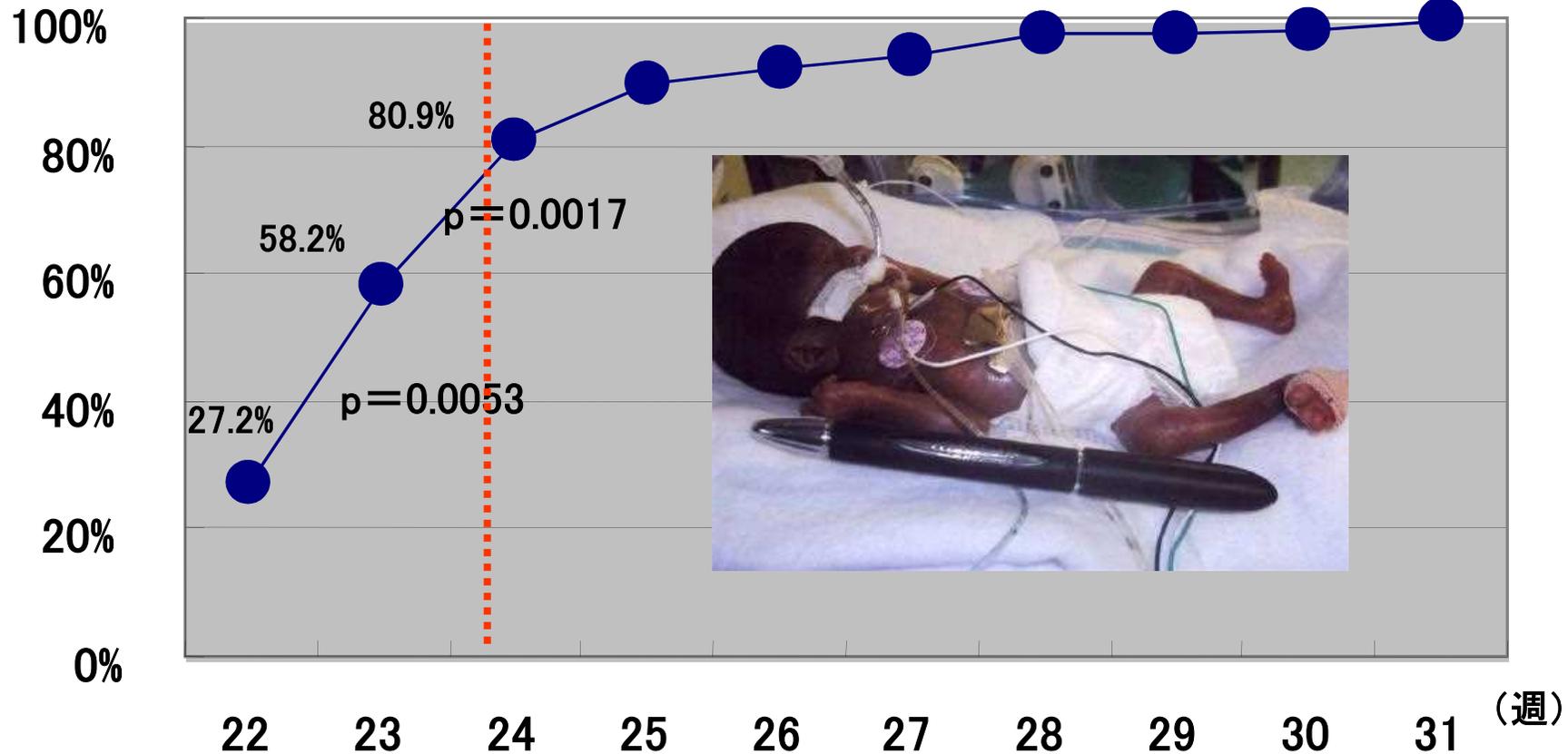


早産率



母子保健の主な統計、2012より

分娩時妊娠週数毎の生存率（死産を含まない）



登録参加116施設における 51,650分娩(周産期死亡数 807)
 2001年における全分娩1,170,662の4.4%
 周産期死亡総数6,333の 12.5% (日産婦誌 2004)

⑥臨床的絨毛膜羊膜炎

⑤組織学的絨毛膜羊膜炎

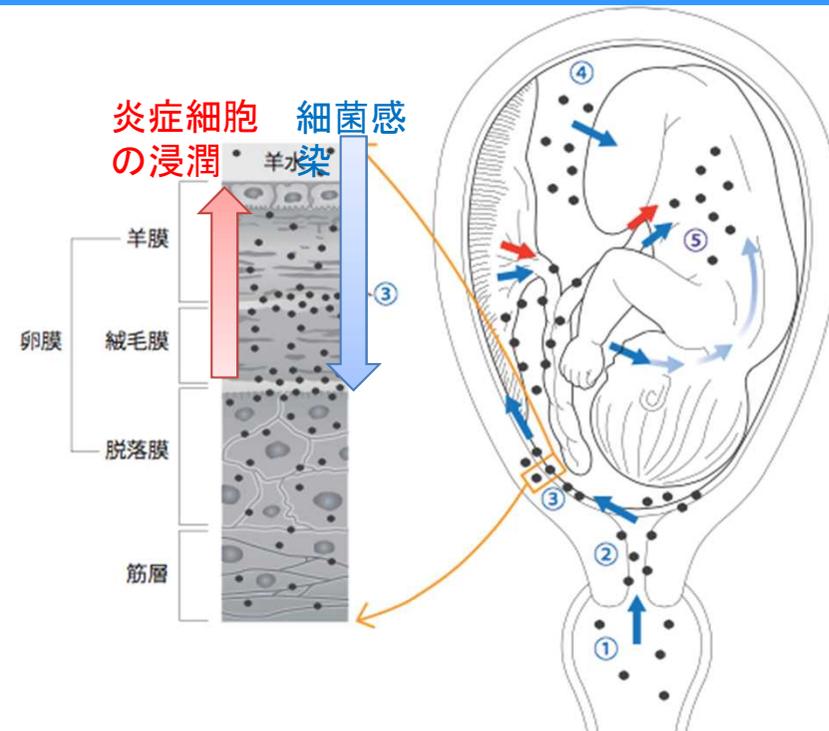
④胎児感染

③羊水感染

②子宮頸管炎

①細菌性膣症など

子宮内感染



産科医療保障制度報告書より引用，一部改変

- 子宮内感染は前期破水・早産など、妊娠経過に重大な影響を及ぼす
- 妊娠中の診断が困難（**羊水培養検査と臨床的CAMは低感度・高特異度**）
- 診断の遅れは児に重大な影響を及ぼすこともあるため、的確な診断が求められる

本技術に関する知的財産

発明の名称：「絨毛膜羊膜炎関連微生物同定ならびに検出方法、絨毛膜羊膜炎関連微生物検出用プライマーセットならびにアッセイキット、および絨毛膜羊膜炎検出方法」

出願番号： 特願2016-105177

出願人： 学校法人 福岡大学

発明者： 宮本 新吾(福岡大学)・秦 健一郎(国立研究開発法人国立成育医療研究センター)

従来技術とその問題点

高齢妊婦の増加により早産の頻度が増加の一途をたどっている。
早産の主な原因は、子宮内感染でその診断が困難なために、新生児感染を引き起こし致命的となる疾患である。

- 子宮内感染の診断は、羊水の細菌培養や羊水の細菌のPCR法による検出が行われるが不正確で起炎菌が同定できず、治療方針が決定できない。
- 子宮内感染の診断は、宿主反応として羊水中の炎症性サイトカインなどの定量により予測するが不正確で時間がかかる。

目的

1. 羊水の網羅的かつ定量的な細菌組成解析を行い、子宮内感染例の羊水細菌組成を同定すること。
2. 羊水の細菌組成で絨毛膜羊膜炎を診断可能か否かを検証すること。

対象

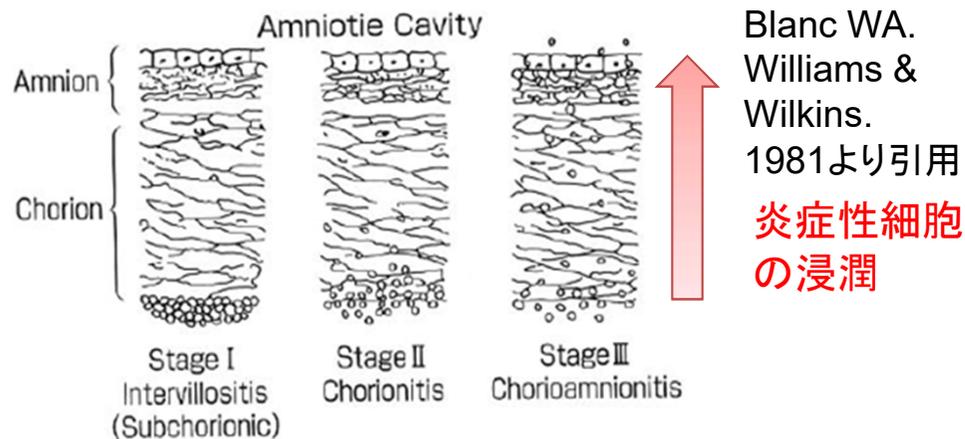
- 福岡大学病院で2009年12月からの5年間に、羊水検査と胎盤病理検査を施行した41例(早産38例, 正常産3例)を対象とした
- 絨毛膜羊膜炎の重症度分類(Blanc分類)に基づいて各群に分け、コントロール羊水として妊娠初期に得られた羊水19検体, 実験ネガティブコントロールとしてDNA抽出時とライブラリー作製時にBlank(精製水)を置いた

<絨毛膜羊膜炎の重症度分類(Blanc分類)>

Stage III (Chorioamnionitis) : 羊膜まで炎症が波及

Stage II (Chorionitis) : 絨毛膜まで波及

Stage I (Subchorionitis) : 絨毛膜下にとどまる



各群における胎盤の組織学的分類とコントロールの内訳

グループ名	サンプル名	胎盤の組織学的診断
Chorioamnionitis (CA)	1-12	Stage III
Chorionitis (C)	13-29	Stage II
Non-Chorionitis (Non-CA)	30-41	Stage <II
1 st Trimester AF (1st-AF)	42-60	
Blank Control (Blank)	N1-11	

福岡大学病院総合周産期センターでサンプル採取

凍結保存, 国立成育医療研究センター(東京)に凍結状態で輸送

溶菌(ビーズ破碎)
DNA抽出: 羊水検体約1mlからDNAを抽出

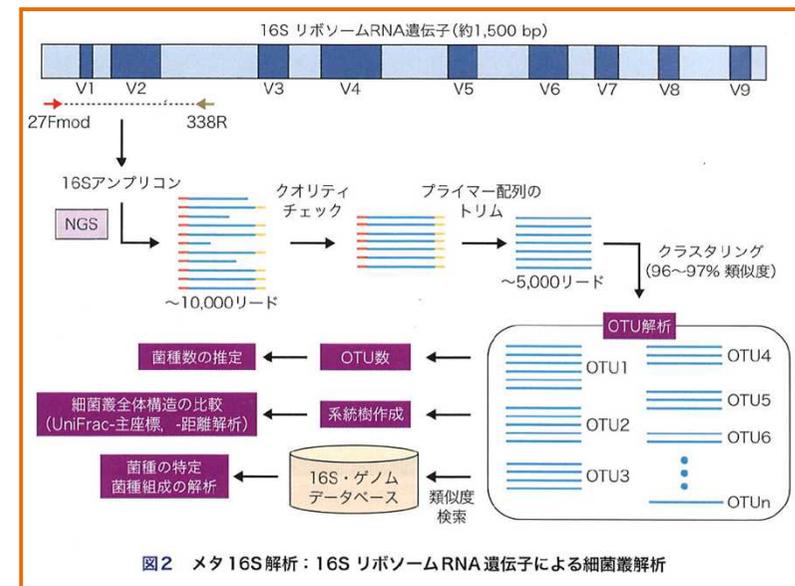
次世代シーケンサー(MiSeq®)のライブラリー作製
: Illumina社推奨プロトコルに従い96サンプル同時に
(16Sユニバーサルプライマーを使用)

次世代シーケンサー(MiSeq®)でシーケンス

Fastqファイルのマージ
クオリティコントロール
アダプター配列の除去

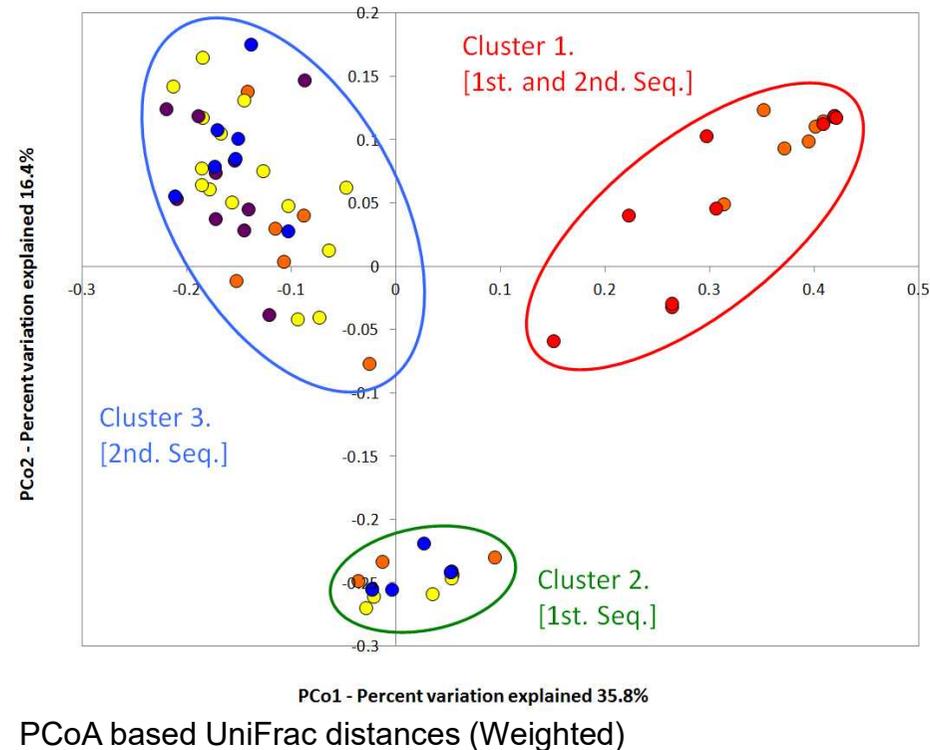
ランダムに3000リードを選出

16S rRNA遺伝子解析(網羅的かつ定量的)
: UniFrac距離に基づく主座標分析(PCoA)や
OTU(Operational Taxonomic Units)解析など



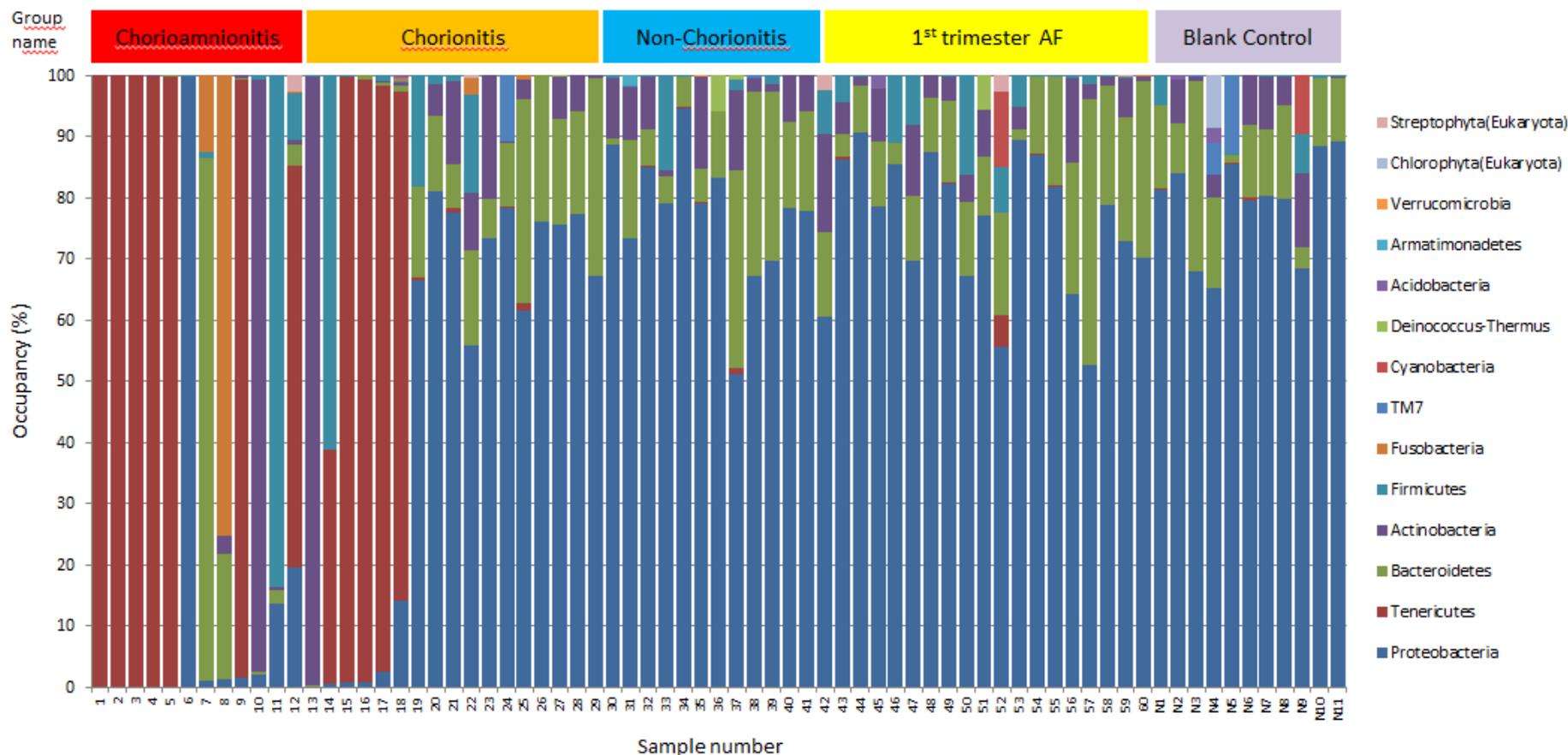
菌叢の類似性を検証

- 定量性を考慮したWeighted UniFrac距離に基づいて、主座標分析(PCoA)を行った
- 各点が各検体(赤:CA群, オレンジ:C群, 青:Non-C群, 黄:1st.AF群, 紫:Blank群)を示し、点の近さは菌叢組成が類似していることを示す



- 胎盤に重度の炎症を伴う症例の多く(CA群全12例とC群の6/17例, Sample 1-18)は、再現性よく同一クラスター(クラスター1)を形成した
- 一方、その他の検体はシーケンスごとにクラスター形成し、コンタミネーションによるアーチファクトが考えられた(1回目:クラスター2, 2回目:クラスター3)

羊水60検体と実験ネガコン11検体で、OTU(Operational Taxonomic Units)解析した



細菌組成 (門レベル)

- OTU解析では、PCoAでクラスター1を形成した18検体(CA群全12例とC群の6/17例, Sample1-18)は、明らかに他と異なった細菌組成が観察された
- 同18検体を、羊水感染群と命名した

羊水感染群と非羊水感染群の比較

	羊水感染 (18)	非羊水感染 (23)	P-value
前期破水 (n, %)	8 (44 %)	7 (30%)	0.515
臨床的絨毛膜羊膜炎 (n, %)	4(22 %)	1 (4 %)	0.150
羊水培養検査 (n/N, %)	2/12 (17 %)	0/5 (0 %)	1.000
Blanc's stage (Mean±SD)	2.7±0.5	1.3±0.7	0.000
羊水検体1 μLあたりの16S rDNAコピー数 (copy/ μl, Median)	1.2x10 ³	4.1	0.000
分娩までの入院日数 (日, Mean±SD)	4.3±3.5	18.4±15.8	0.005
新生児感染症治療 (n/N, %)	13/17 (76 %)	2/18 (11 %)	0.000

※有意差検定にはMan-Witney U testとFisher's exact testを使用

- 羊水感染群は、羊水培養や臨床的絨毛膜羊膜炎では有意差がなかったが、胎盤の炎症度と羊水中の細菌量では有意差を認めた
- 羊水感染群は、母児ともに比較的予後不良である可能性も示唆された

絨毛膜羊膜炎(Stage III)の予測精度

	羊水感染 (+)	羊水感染 (-)	計
Stage III	12	0	12
Stage ≤II	6	23	29
計	18	23	41

感度 : **100% (12/12)**

特異度 : **79% (23/29)**

陽性的中率 : 67% (12/18)

陰性的中率 : **100% (23/23)**

従来法※との比較

	感度	特異度
グラム染色	24 %	99 %
羊水中白血球数	57 %	78 %
羊水中糖	57 %	74 %
IL-6	81 %	75 %
本研究のメタ16S解析	100 %	79 %

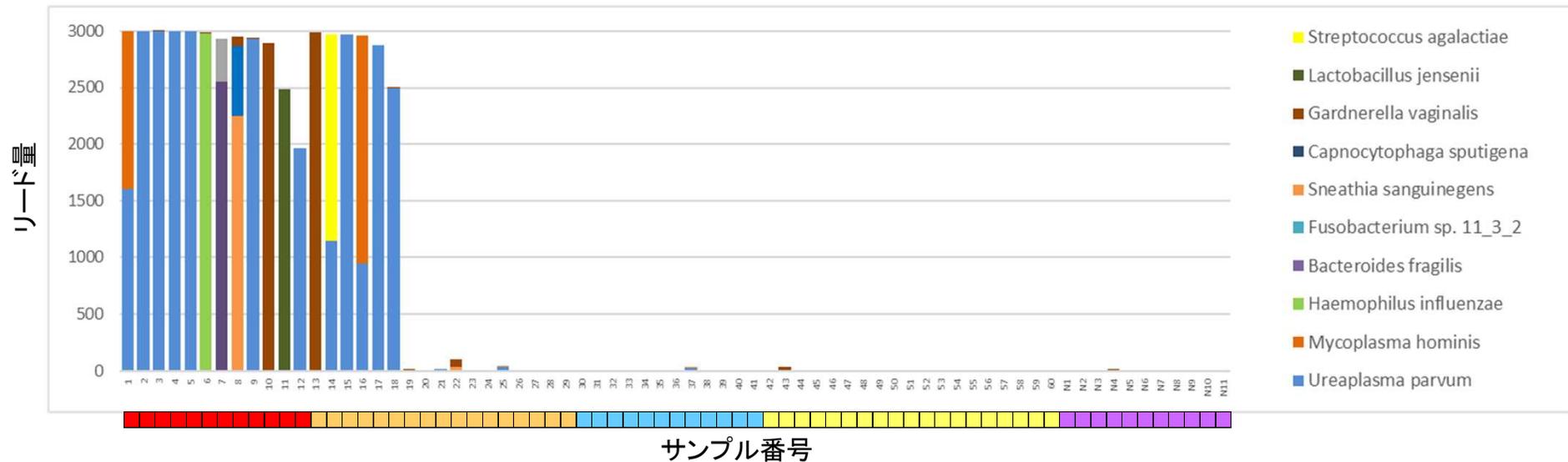
※Romero R, et al.
Am J Obstet Gynecol
1993;169(4):839-51.

- 網羅的かつ定量的解析により、高い精度で重度の絨毛膜羊膜炎(Blanc III)を予測できる可能性が示唆された
- 羊水感染群でdominantに検出される菌種をマーカーとして、簡便に検出することの有益性が示唆された

【目的】 羊水感染群で特徴的な細菌組成を引き起こした菌種の同定

【方法】 羊水感染群で10%(300リード)以上, コントロール群(Non-C群, 1st.AF群, Blank群)で0.5%(15リード)未満のOTU(菌種に相当)を同定した

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>Ureaplasma parvum</i>	1608	2997	2997	2994	2992	0	0	1	2929	1	0	1967	2	1144	2970	946	2873	2499
<i>Mycoplasma hominis</i>	1390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2010	0	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	0	0	0	2980	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	2555	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium sp. 11_3_2</i>	0	0	0	0	0	0	372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	0	0	0	2250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0	0	0	0	0	0	0	614	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	0	1	0	0	1	0	85	1	2894	0	0	2987	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2487	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1828	0	0	0	0



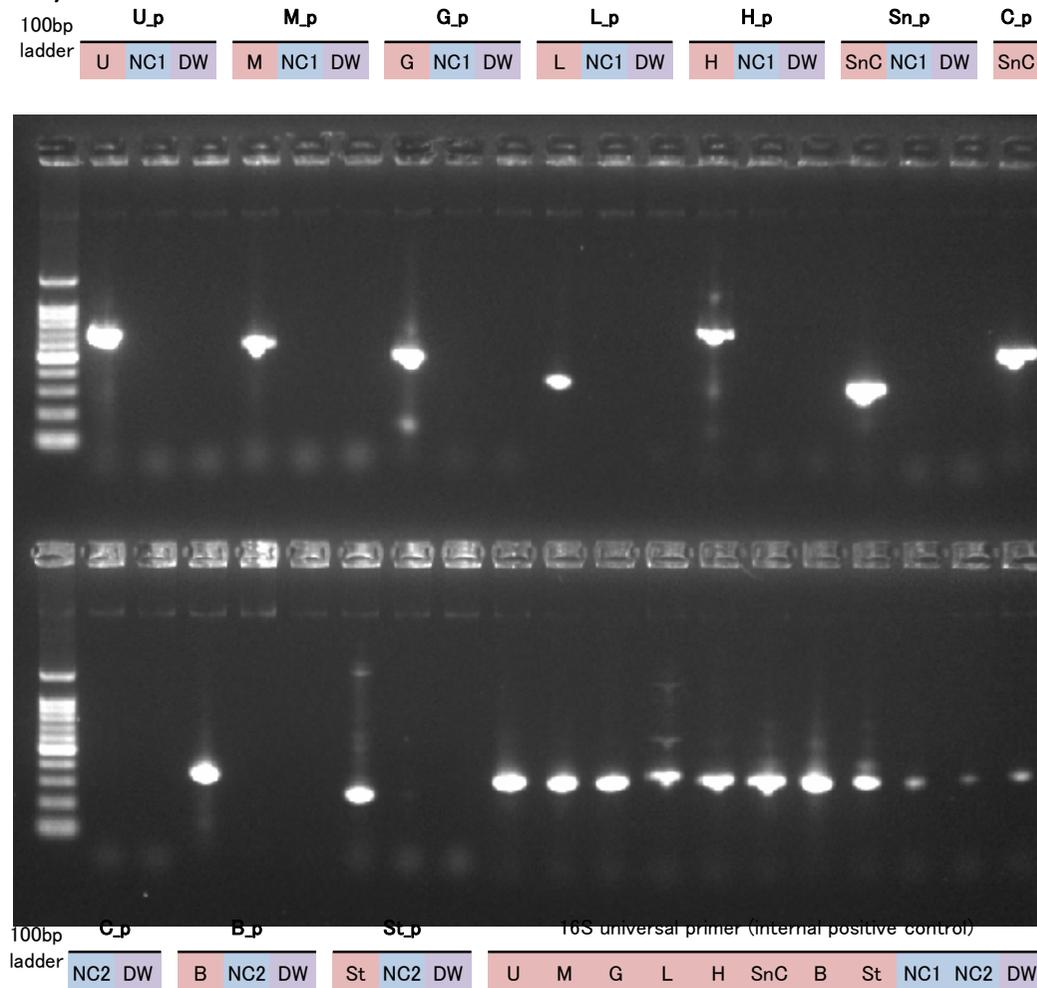
羊水感染群でdominantだった10 OTUのリード量

羊水感染群でdominant(優勢)であった10 OTUを特定し, 9菌種を同定した 13

【目的】 羊水感染群を簡便に検出する

【方法】 16S全長配列と同属の配列, 20-30配列をダウンロードし, 各菌種に特異的なプライマーを作製し, PCR実験(*in-silico* & *in-vivo*)で確認した

Target species	Primer name	Amplicon size(bp)	In-silico PCR
Ureaplasma parvum	U_p	652	(+)
Mycoplasma hominis	M_p	543	(+)
Gardnerella vaginalis	G_p	464	(+)
Lactobacillus jensenii	L_p	331	ND
Haemophilus influenzae	H_p	662	(+)
Sneathia sanguinegens	Sn_p	308	ND
Capnocytophaga sputigena	C_p	441	ND
Bacteroides fragilis	B_p	382	(+)
Streptococcus agalactiae	St_p	275	(+)



PCR実験検体名	Sample number
U	3
M	16
G	13
L	11
H	6
SnC	8
B	7
St	14
NC1	41
NC2	40
DW	精製水

上段: プライマー名
下段: サンプル名

全種類のプライマーで, 感染羊水でのみ, 想定されるサイズの増幅産物が確認された 14



発明品の内容

表1. 9菌種, 18種類のPCRプライマーセット

Target Species	Primer Name	Forward Primer	Size (mer)	Reverse Primer	Size (mer)	Amplicon Size(bp)
<i>Ureaplasma parvum</i>	U_p	ATGTAGAAAGTCGCTCTTTGTG	22	GGCCGACATTTAATGATGATCG	22	652
<i>Mycoplasma hominis</i>	M_p	TTGGAATACCCATTGGAAACAA	22	CTCTATCTAACTCTAGTTTGCT	22	543
<i>Gardnerella vaginalis</i>	G_p	CTTGGAACGGGTGGTAATGCT	22	AGACGCGACGAACCGCCTACAA	22	464
<i>Lactobacillus jensenii</i>	L_p	TAATACCGGATAAAAGCTACTT	22	GTCAAATAAAGGCCAGTTACTA	22	331
<i>Haemophilus influenzae</i>	H_p	GCATTTTCAGACTGGGTAACTA	21	TGAGATTCGCTCCACCTCGCA	21	662
<i>Sneathia sanguinegens</i>	Sn_p	AGGGGACTGAGATACGGCCCTT	22	GAGCCACAGGTTTTTCACCTTC	21	308
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	C_p	GAGCGGCATCGTTTTTATATT	20	AGGCAGTTGCTTAGTTGAGCTA	22	441
<i>Bacteroides fragilis</i>	B_p	TATCCAACCTGCCCTTTACTCG	22	AATACATACAAAACAGTATACA	22	382
<i>Streptococcus agalactiae</i>	St_p	AGAAGTGACAGGTGGTGCATGG	22	AATCCGAACTGAGATTGGCTTTA	23	275

新技術の特徴・従来技術との比較

- 細菌混合感染である子宮内感染の起炎菌を全て同定できる。
- 子宮内感染の程度を推測でき、分娩帰結を含めた臨床的診断を正確にできる。
- 診断までの時間が、短時間で臨床的に有用である。

まとめ

- 羊水で、網羅的かつ定量的に細菌叢解析を行った
- 絨毛膜羊膜炎群全例と絨毛膜炎群の一部(羊水感染群: 18検体)で特徴的なOTUのpopulationが観察され、主座標分析でもコントロール群と明らかに異なって集簇した
- 羊水感染群では、妊娠延長期間が有意に短く、新生児感染症の罹患率が有意に高かった
- 羊水感染群を検査陽性とした場合、高い精度(感度100%, 特異度79%)で絨毛膜羊膜炎を予測可能であることが示唆された
- 羊水感染群の検体で高頻度に検出された9菌種を、羊水感染群のマーカ一として絞り込んだ
- これらの菌種に特異的プライマーを作製し、PCR実験(*in-silico* & *in-vivo*)で検出した
- 絨毛膜羊膜炎を、羊水で出生前に予測可能であることが示唆された

⑥臨床的絨毛膜羊膜炎

⑤組織学的絨毛膜羊膜炎

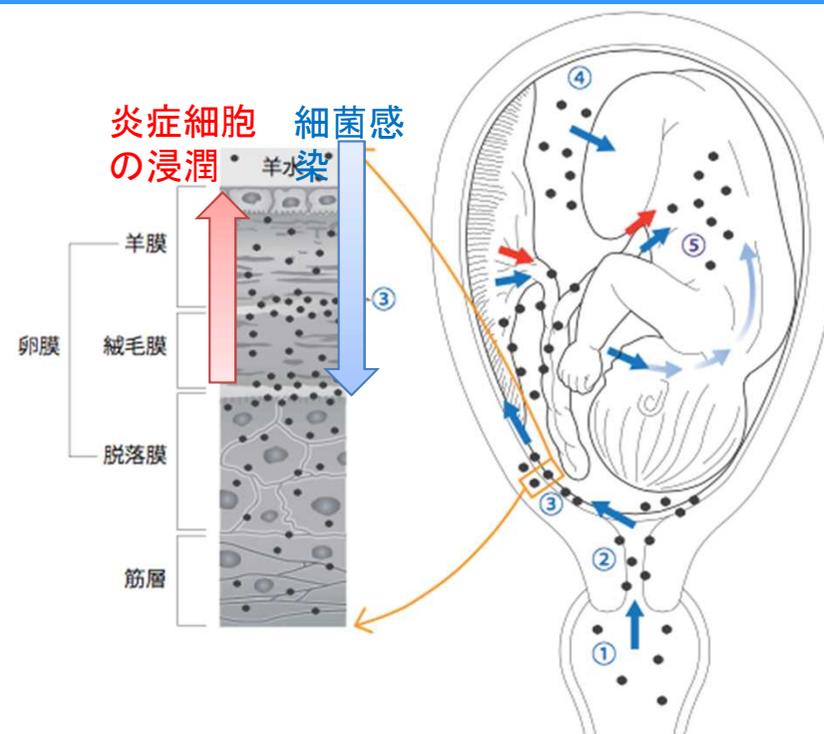
④胎児感染

③羊水感染

②子宮頸管炎

①細菌性膣症など

子宮内感染



産科医療保障制度報告書より引用，一部改変

- 子宮内感染は前期破水・早産など、妊娠経過に重大な影響を及ぼす
- 妊娠中の診断が困難（**羊水培養検査と臨床的CAMは低感度・高特異度**）
- 診断の遅れは児に重大な影響を及ぼすこともあるため、的確な診断が求められる

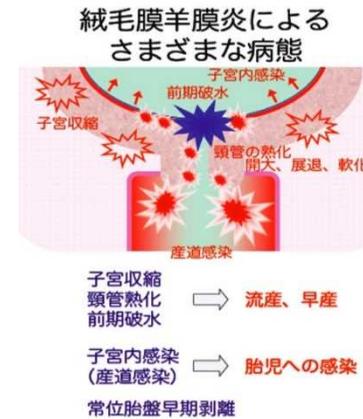
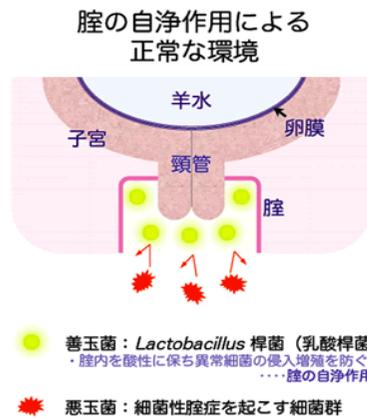
本技術に関する知的財産

発明の名称：「絨毛膜羊膜炎関連微生物同定ならびに検出方法、絨毛膜羊膜炎関連微生物検出用プライマーセットならびにアッセイキット、および絨毛膜羊膜炎検出方法」

出願番号： 特願2016-105177

出願人： 学校法人 福岡大学

発明者： 宮本 新吾(福岡大学)・秦 健一郎(国立研究開発法人国立成育医療研究センター)

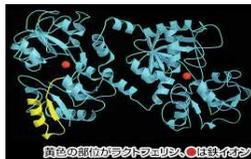


切迫早産例の腔フローラ解析

本技術に関する知的財産

ラクトフェリン

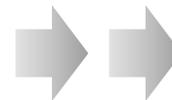
106 A.A. 糖タンパク質



➤ 腸内フローラの改善

➤ 免疫能の亢進

➤ 抗酸化作用



特定臨床研究

Primary Endpoint :

- #1 妊娠期間の延長
- #2 胎盤病理の炎症所見の消失 (Blanc分類)

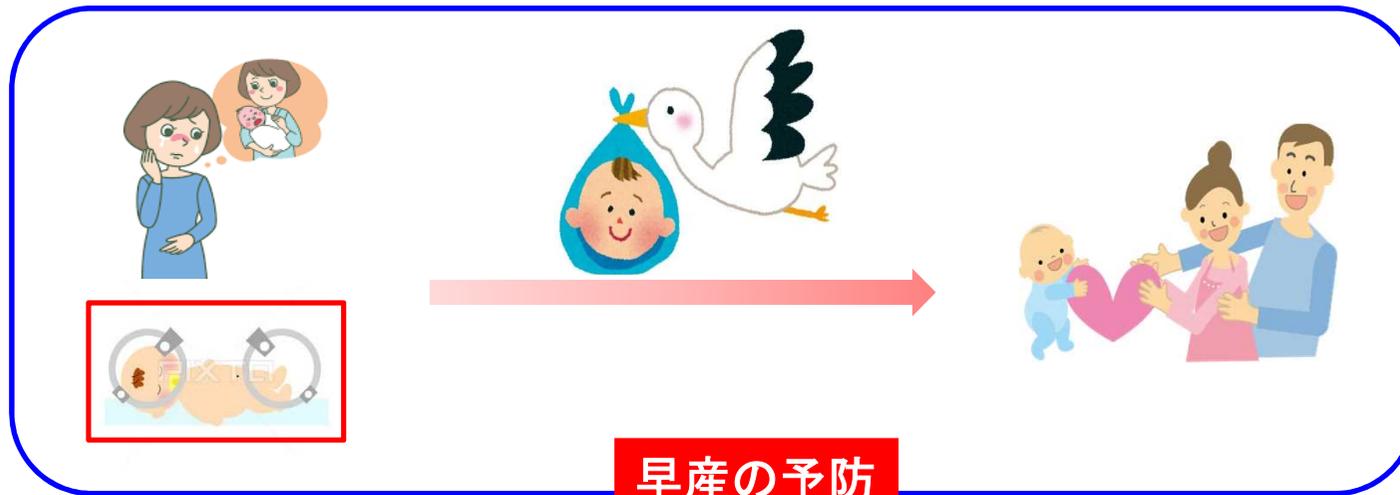
Secondary Endpoint :

- #1 腔細菌叢の変化
- #2 ラクトフェリンの服用による有害事象



診断キットの実用化





少子化対策

社会進出促進

未熟児関連疾患撲滅



想定される用途

診断困難な子宮内感染を迅速に診断すること
ともに、全ての起炎菌の同定が可能となる。

- 起炎菌の定量的な同定から、経母体的な抗
生物質投与の治療選択が可能となる。
- 起炎菌の定量的な同定から、分娩後の新生
児感染に対する抗生物質投与の治療選択が
可能となる。
- 起炎菌の定量的な同定から、分娩時期の決
定が可能となる。

実用化に向けた課題

腸内細菌叢や腔細菌叢の乱れからくる子宮内感染は、早産、切迫早産、常位胎盤早期剥離という事態を誘起する可能性がある。

- 切迫早産例において腔細菌叢を解析することで、子宮内感染を予測できる検査法の確立を目指している(特許申請準備中)。
- 常位胎盤早期剥離を発症した症例の腔細菌叢の乱れについては、現在、解析中である。
- ラクトフェリンあるいはビフィズス菌の投与により腸内細菌叢や腔細菌叢の乱れの改善が、切迫早産、早産、常位胎盤早期剥離症例を減少させるという臨床研究を実施する必要がある。

企業への期待

- ラクトフェリンあるいはビフィズス菌を発売している会社とヒト切迫早産妊婦に対する臨床研究(AMEDなどの公的資金も視野に入れて)を実施して、検査薬の有用性を実証して検査キットとして発売する。
- 次世代シーケンス法やデジタルPCR法による検査キットを保有する会社と共同開発する。
- 少子化対策や女性ヘルスケアに興味を有する企業との共同開発を期待する。

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : 「絨毛膜羊膜炎関連微生物同定ならびに検出方法、絨毛膜羊膜炎関連微生物検出用プライマーセットならびにアッセイキット、および絨毛膜羊膜炎検出方法」

出願番号 : 特願2016-105177

出願人 : ¹学校法人 福岡大学、²国立研究開発法人国立成育医療研究センター

発明者 : 宮本 新吾¹、秦 健一郎²



お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター
担当コーディネーター
芳賀 慶一郎

TEL 092-871 - 6631 (内線2809)

FAX 092-866 - 2308

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp