

羊水中の16S rDNAコピー数測定による 子宮内感染状態の評価法

福岡大学 福岡大学病院 産婦人科
講師 漆山 大知

2022年12月8日

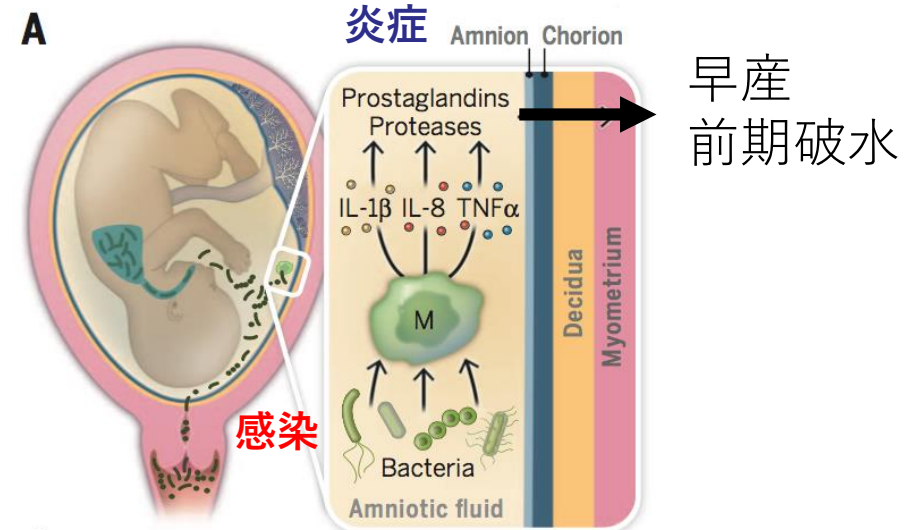
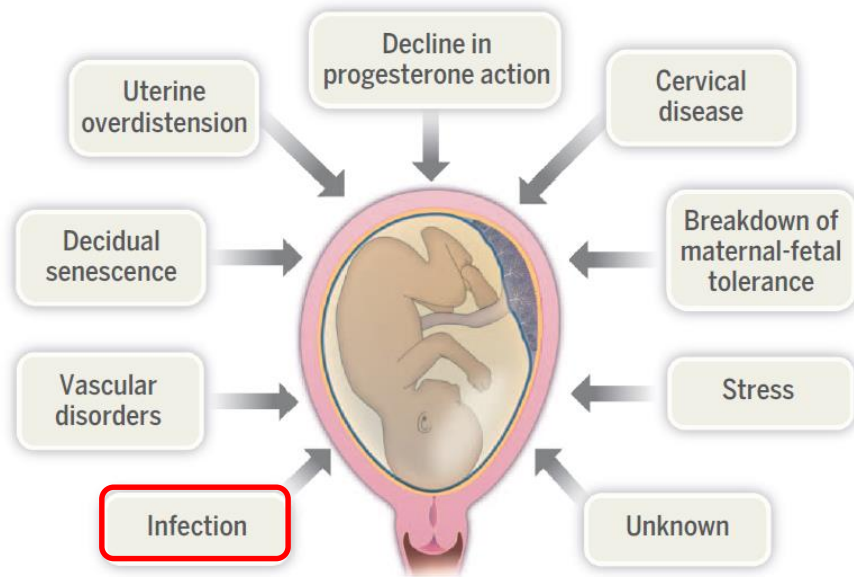
新技術説明会

COI開示

発表者 漆山 大知

本発表に関連し、筆頭発表者ならびに筆頭発表者の配偶者、一親等の親族及び生計を共にする者に、開示すべき利益相反（COI）関係にある企業などはありません。

早産と子宮内感染と子宮内炎症



Romero R, et al. *Science*. 2014 review より, 一部改変

感染

炎症

胎児感染
Fetal infection

胎児炎症
FIRS

羊膜内（羊水）感染
Intra-amniotic infection

羊膜内炎症
Intra-amniotic inflammation

子宮内感染
Intrauterine infection

子宮内炎症・絨毛膜羊膜炎
Intrauterine inflammation

細菌性膣症
Bacteria vaginosis

細菌性膣炎
Bacterial vaginitis



< 子宮内感染・炎症と関連する新生児疾患 >

- 胎児炎症反応症候群
- 新生児髄膜炎
- 新生児慢性肺疾患
- 脳室周囲白質軟化症
- 脳性麻痺など

中枢神経系
呼吸器系

- 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
- 妊娠中の診断は困難（羊水培養検査と臨床的CAMは低感度）
- 診断・治療の遅れは児に重大な影響を及ぼすため、的確な診断が求められる

Urushiyama D et al. *J Infect Dis Ther* 2022 review (in Press) より, 一部改変

- **週数の早い早産例**ほど、羊水中の細菌検出率は高い
[培養法：28w未満は20-60%、28-32wは10-25%]
- **正常胎盤や胎便も無菌とは限らない**
- 正常産の5%で羊水からウレアプラズマが検出された

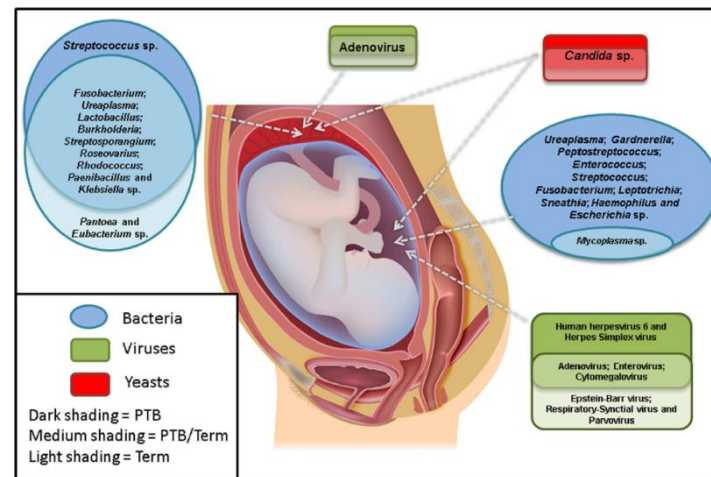


表. 主な4つの羊水研究報告から算出した羊水中の細菌検出率

文献	Combsら 2014	DiGiulioら 2010	Hanら 2009	DiGiulioら 2008
対象	早産 (305)	前期破水 (204)	早産・前期破水 (46)	早産 (113)
培養法またはc16S解析法で検出した割合	10% (31)	50% (101)	46% (21)	22% (25)
培養法で検出した割合	8% (25)	34% (70)	35% (16)	14% (16)
c16S解析法で検出した割合	9% (26)	45% (92)	46% (21)	17% (19)
培養法でのみ検出した割合	2% (5)	4% (9)	0% (0)	5% (6)
c16S解析法でのみ検出した割合	2% (6)	15% (31)	11% (5)	8% (9)

c16S解析：クローニング法を用いた16S rRNA遺伝子解析、括弧内は症例数

< 既報告のまとめ >

- 検出率は**未破水で10-22 %、破水例で50 %程度**
- **属レベルで40種類**に及ぶ多彩な菌種が検出
- 検出法の違いによる不一致が**2-15 %**
- **正常産時の正常羊水も無菌とは限らない**

既報告は、いずれも特有のバイアスがあり、定性的



網羅的かつ定量的解析が必要



羊水中の細菌由来DNAを網羅的かつ定量的に調べて 絨毛膜羊膜炎を診断する方法 (先行研究)

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome

Daichi Urushiyama^{1,2}, Wataru Suda^{1,3}, Eriko Ohnishi⁷, Ryota Araki⁷, Chihiro Kiyoshima², Masamitsu Kurakazu², Ayako Sanui⁸, Fusanori Yotsumoto², Masaharu Murata², Kazuki Nabeshima⁹, Shin'ichiro Yasunaga⁷, Shigeru Saito⁹, Makoto Nomiyama⁹, Masahira Hattori^{1,10}, Shingo Miyamoto⁹ & Kenichiro Hata²

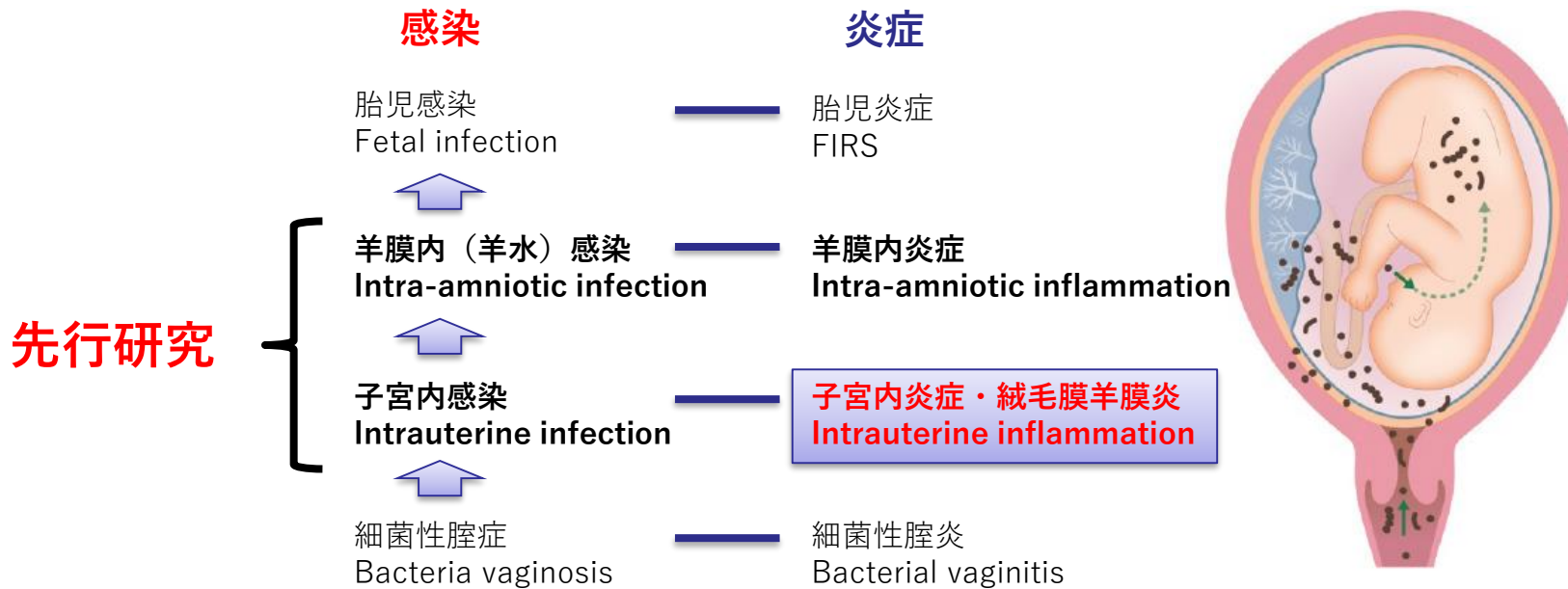
Received: 11 May 2017
Accepted: 29 August 2017
Published online: 22 September 2017

漆山大知^{1,2}, 須田亙³, 大西英理子¹, 清島千尋², 倉員正光², 讃井絢子², 四元房典², 鍋島一樹², 安永晋一郎², 齋藤滋⁴, 野見山亮⁵, 服部正平^{3,6}, 宮本新吾², 秦健一郎¹

- 1) 国立成育医療研究センター研究所
- 2) 福岡大学
- 3) 東京大学
- 4) 富山大学
- 5) 国立病院機構佐賀病院
- 6) 早稲田大学

目的

1. 羊水の網羅的かつ定量的な細菌組成解析を行い、**絨毛膜羊膜炎例の羊水中の細菌組成を同定**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**検証すること

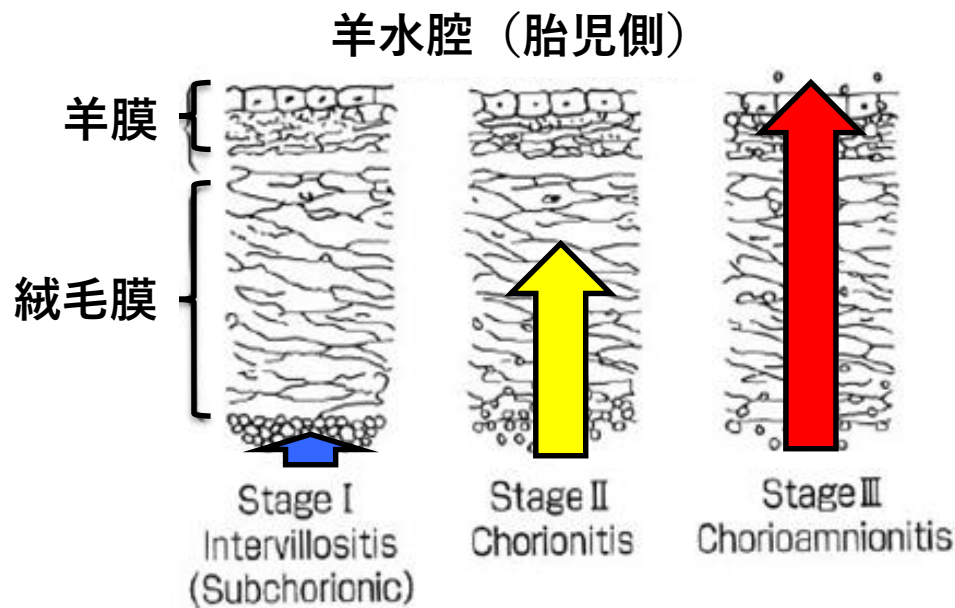


Urushiyama D et al. *J Infect Dis Ther* 2022 review (in Press) より, 一部改変

- 福岡大学と佐賀病院の**79症例**（羊水検査と胎盤病理）
- 絨毛膜羊膜炎の重症度分類（Blanc分類）で3群に分けた
- コントロール羊水として**妊娠初期の羊水**、実験ネガティブコントロールとして**精製水を置いた**
- 統計学的検定では、連続変数にはMann-WhitneyのU検定、質的変数にはFisherの正確検定、細菌組成の群間比較にはPERMANOVAを用い、*P*値（両側正確有意確率） <0.05 を有意差ありとした

各群の数と胎盤の組織学的分類

グループ名	定義(Blanc分類)	試料数
Stage III	絨毛膜羊膜炎(Stage III)	32
Stage II	絨毛膜炎(Stage II)	27
Stage 0-I	絨毛膜下炎(Stage I) 炎症細胞浸潤なし	20
Normal AF	正常妊娠の羊水 (16.1±0.6週)	18
Blank	実験で使う精製水	24



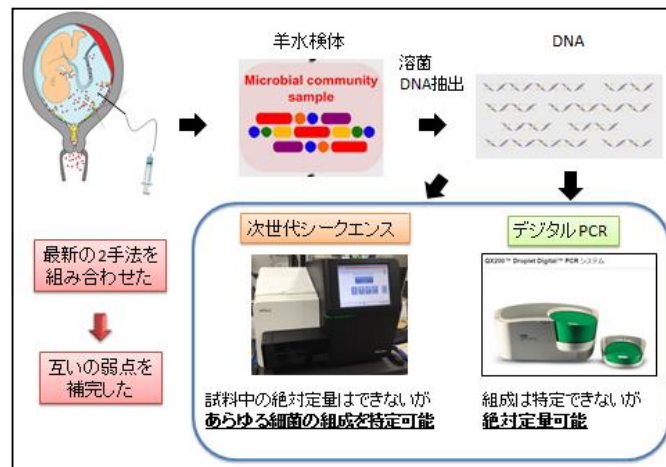
炎症性細胞の浸潤

Blanc WA. *Williams & Wilkins*. 1981より引用改変

無菌的に羊水を採取（羊水検査の残余・帝王切開時）

24時間以内に急速冷凍、-80°Cで凍結保存

溶菌（ビーズ破碎法）：羊水試料1 mLを溶菌
DNA抽出：QIAamp® UCP Pathogen mini Kitで無菌的にDNA抽出



NGSのライブラリー作製

- Illumina社推奨プロトコールに従って16S rRNA遺伝子のV1V2領域をターゲットとした

Droplet Digital PCR™による絶対定量

- 16S解析と同じプライマーを使用、EvaGreen法
- 付属のソフトで解析

Fastqファイルのマージ
クオリティチェック
プライマー配列の除去

ランダムに1300リードを選出

16S rRNA遺伝子解析（網羅的・半定量的）

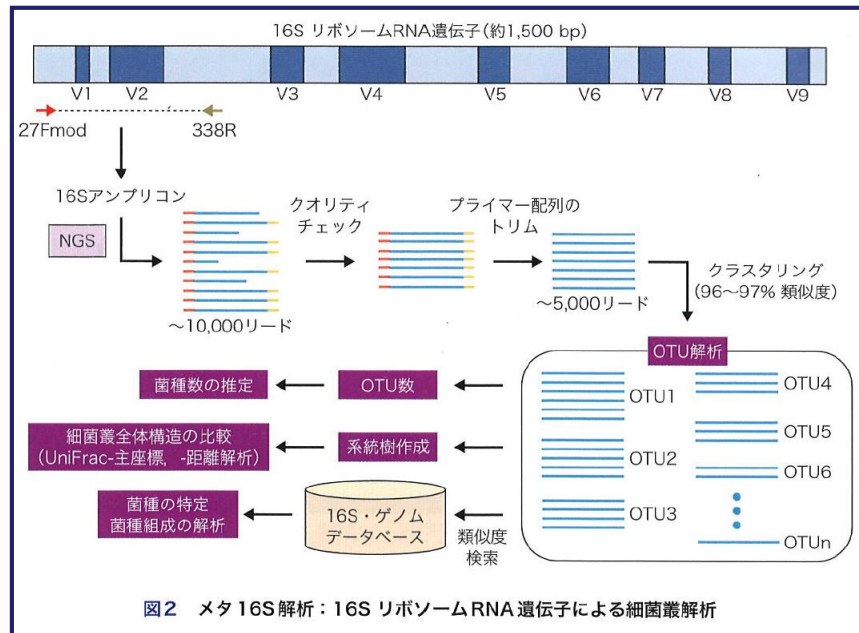
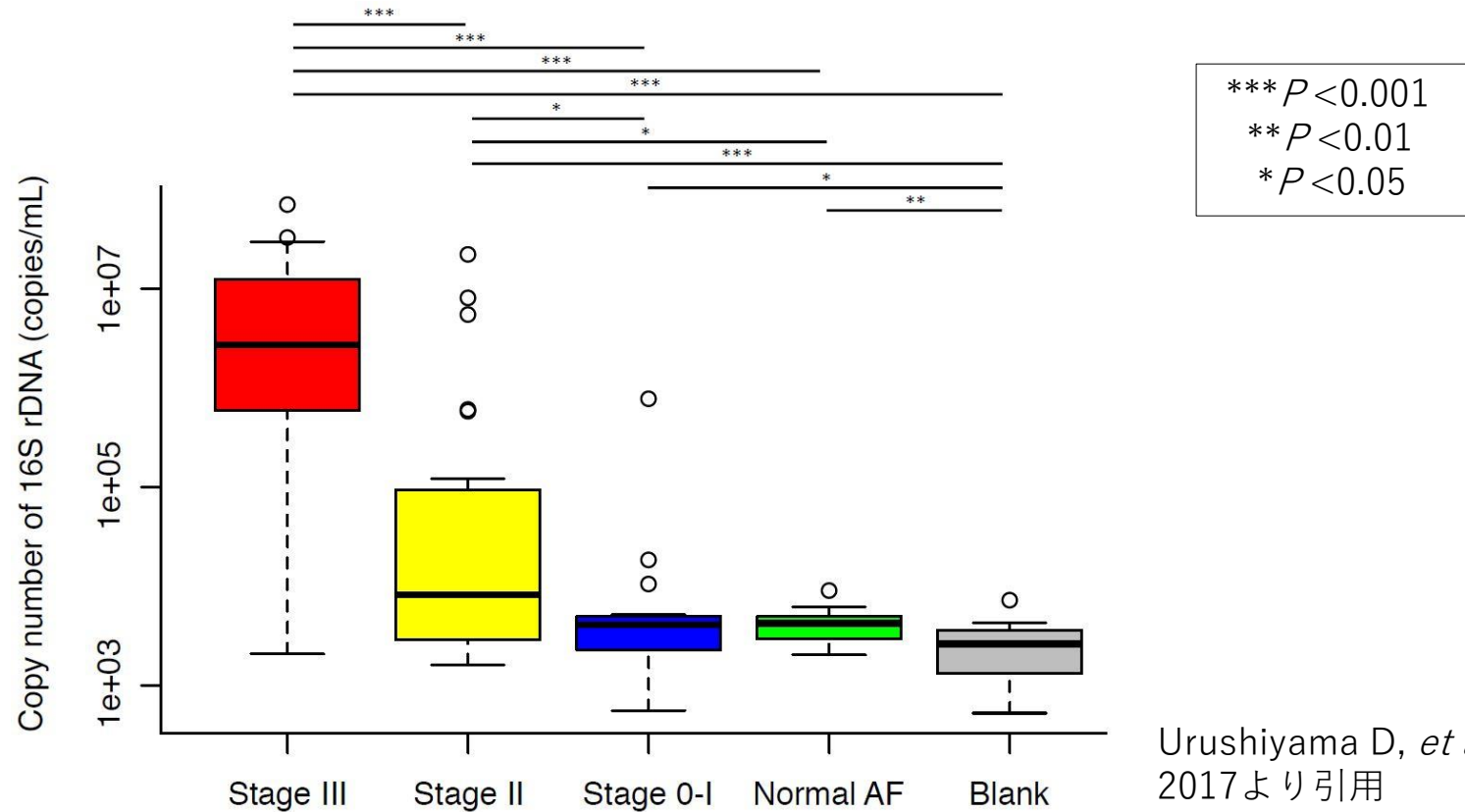


図2 メタ16S解析：16S リボソームRNA 遺伝子による細菌叢解析

※NGS：次世代シーケンサー

各試料中の細菌量

【方法】 16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマーを使ってデジタルPCRで、各試料1 mL中の16S rDNAコピー数を絶対定量した



【結果】

- Stage III群とStage II群はStage 0-I/Normal AF/Blank群より有意に高く、Normal AF群はBlankよりも有意に高かった

【考察】

- 胎盤の炎症と羊水中細菌量は相関する

“miCAM” (microbiomic chorioamnionitis)

右の**11菌種**のいずれかが組成の最上位だった場合を「**miCAM**」と定義した

Ureaplasma parvum
Streptococcus agalactiae
Gardnerella vaginalis
Streptococcus anginosus
Sneathia sanguinegens
Eikenella corrodens
Prevotella bivia
Lactobacillus jensenii
Bacteroides fragilis
Porphyromonas endodontalis
Mycoplasma hominis

グループ名	miCAM (n=40)	Non-miCAM (n=39)
Stage III	30	2
Stage II	8	19
Stage 0-I	2	18
Normal AF	0	28
Blank	0	33

これまでの羊水検査との比較

	感度	特異度
白血球数	57 %	78 %
糖	57 %	74 %
IL-6	81 %	75 %

Romero R, et al. *AJOG* 1993;169(4):839-51.

CAM (Stage III) の診断精度

感度 : **94%** (30/32)
特異度 : **79%** (37/47)
陽性的中率 : 75% (30/40)
陰性的中率 : **95%** (37/39)

Urushiyama D, et al. *Sci Rep*, 2017より引用改変

分娩前に高い精度で子宮内感染を診断できる可能性が示された

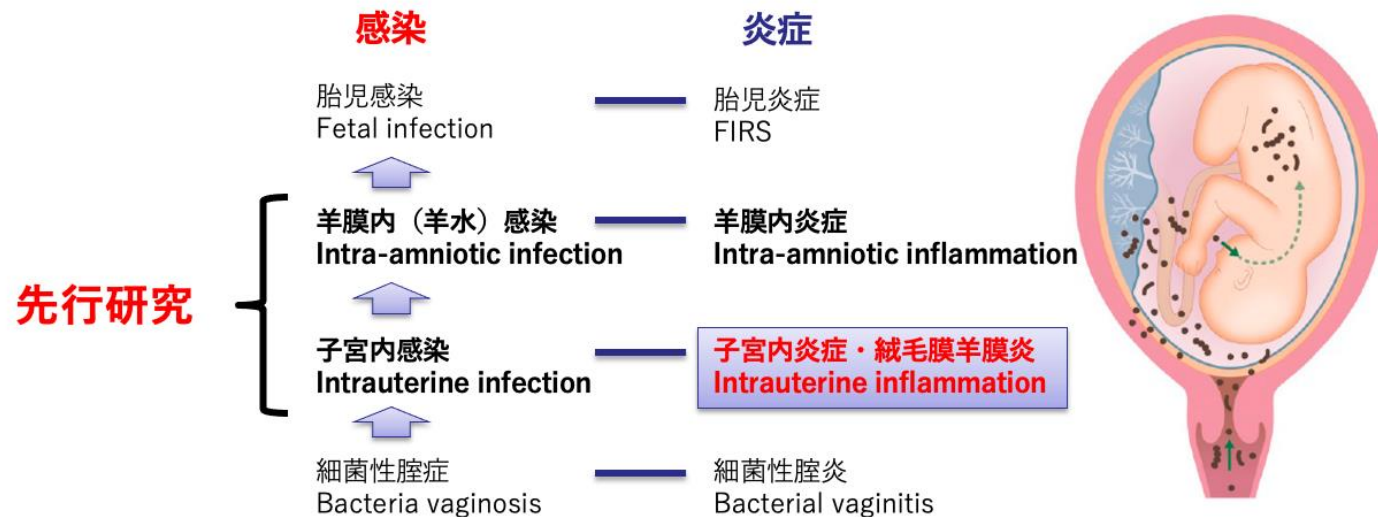
先行研究のまとめ

【総括】

- 羊水で網羅的かつ定量的な細菌組成解析を行った
- 絨毛膜羊膜炎（Stage III）による早産の多くは**複合感染**である可能性が示された
- 羊水の細菌組成解析によって高い精度で絨毛膜羊膜炎（Stage III）を予測できる可能性が示され、母子の不良なアウトカムとも関連した

【結論】

- 子宮内感染による早産例の羊水細菌組成を網羅的・定量的に同定し、分娩前に高い精度で絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性が示された



Urushiyama D et al. *J Infect Dis Ther* 2022 review (in Press) より、一部改変

【先行研究の問題点】

- 羊膜内（羊水）感染の評価法がない
- 臨床の現場では**迅速な診断**が求められる
- 羊膜内（羊水）感染と**妊娠転帰との関連が不明**であり、**妊娠終結に関するエビデンスがない**



QX200™ Droplet Digital™ PCR システム



【目的】

- 羊膜内（羊水）感染と妊娠転機との関連を明らかにすること
- 臨床の現場で有用な羊膜内（羊水）感染の評価法を提唱すること

妊娠24週以降34週未満に切迫早産で入院管理中に、子宮内感染を疑って羊水穿刺を行い、胎盤・臍帯の組織学的検索を行った69症例を対象とした。

- 先行研究より79例（ネガコン32検体）のデータあり
- その後、57例追加データあり



136例



105例



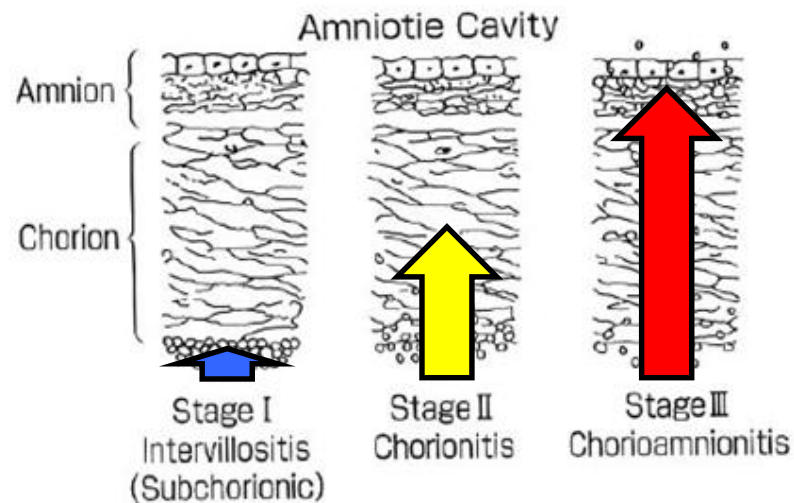
69例

子宮内感染疑いの羊水穿刺でない：25例
(羊水除去術、染色体検査、分娩時採取など)

羊水穿刺時に妊娠24～34週でない：36例

Table 1. 対象の内訳

CAM(Blanc分類)	Total (69例)	未破水 (43例)	破水 (26例)
Stage 3(絨毛膜羊膜炎)	31	16	15
Stage 2(絨毛膜炎)	25	19	6
Stage 1(絨毛膜下炎)	8	5	3
Stage 0(炎症所見なし)	5	3	2



Blanc WA. Williams & Wilkins. 1981より引用改変

羊水中細菌定量解析の方法

無菌的に羊水を採取（生化学検査や培養検査に提出）

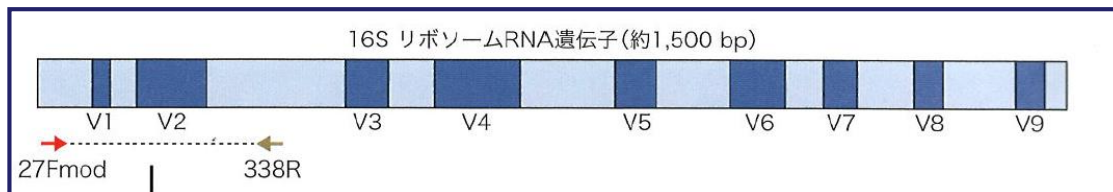
1mLの羊水試料を実験室へ移動（氷冷）

低速遠心分離：大きな細胞や胎脂を除去
溶菌（ビーズ破砕法）：羊水試料1mlを溶菌
DNA抽出：QIAamp® UCP Pathogenmini Kitで無菌的にDNA抽出

DNA試料を段階希釈する（原液、20倍、400倍、8000倍など）
DNA抽出時とdPCR実験時にネガティブコントロールを置く
（ネガティブコントロール：DNA抽出溶液）
複数回計測すみのDNA試料をポジティブコントロールとする

Droplet Digital PCR™による絶対定量

：16S解析と同じプライマーを使用，EvaGreen法
：付属のソフトで解析



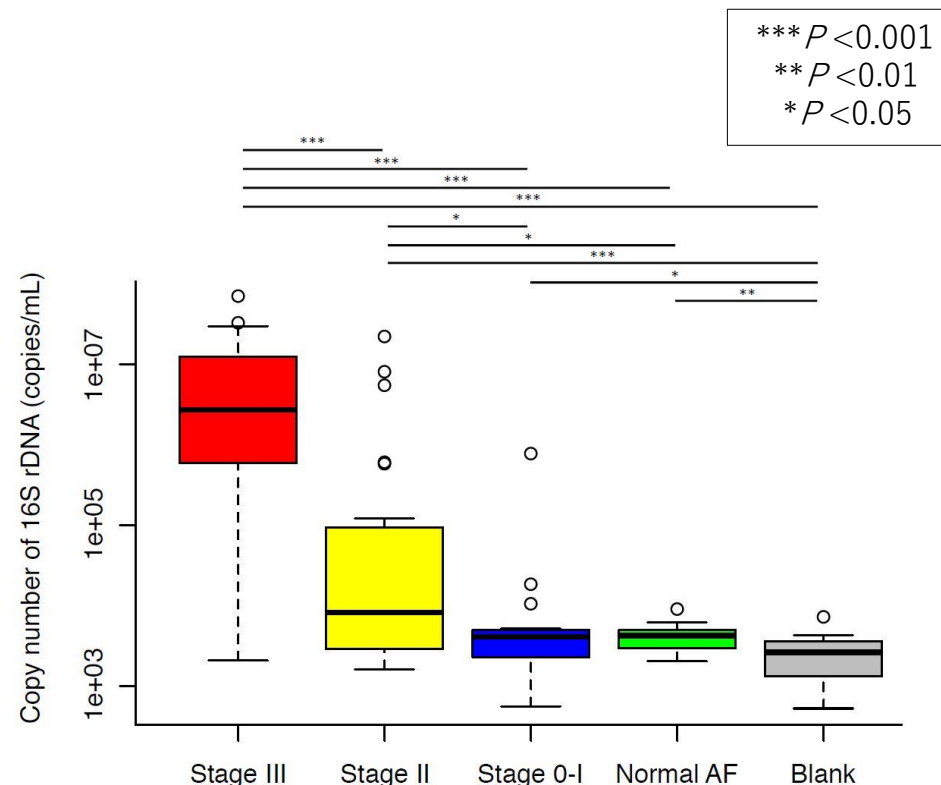
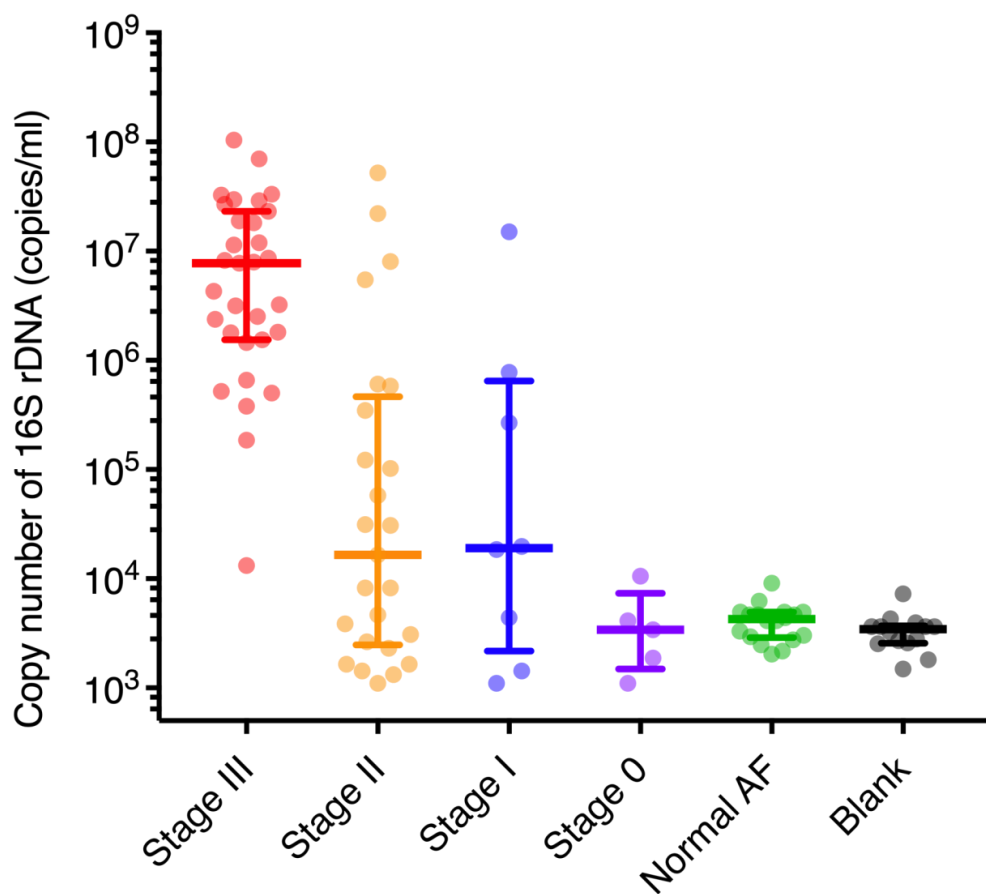
検体採取から
判定まで4-5時間

50 μ Lで抽出する

1 μ Lをインプットしドロップレット作製時に22 μ Lに希釈する

測定結果を1100倍(22x50倍)すると羊水1mLあたりのコピー数を算出できる

各試料中の細菌量



Urushiyama D, et al. *Sci Rep*, 2017より引用改変

【結果】

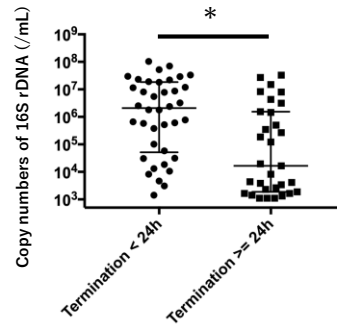
- Stage III群とStage II群はStage 0-I/Normal AF/Blank群より有意に高く
Normal AF群はBlankよりも有意に高かった

【考察】

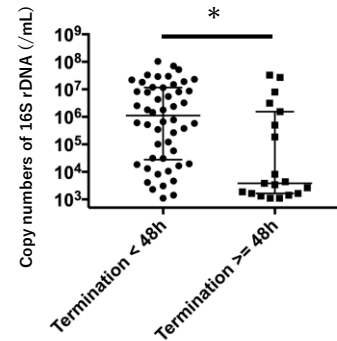
- 先行研究の結果と矛盾なし

妊娠転帰と羊水中16S rDNAコピー数の関連

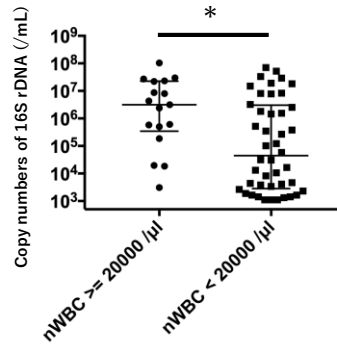
24時間以内の分娩



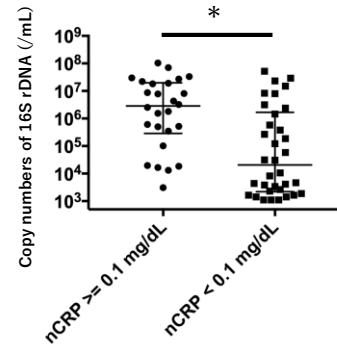
48時間以内の分娩



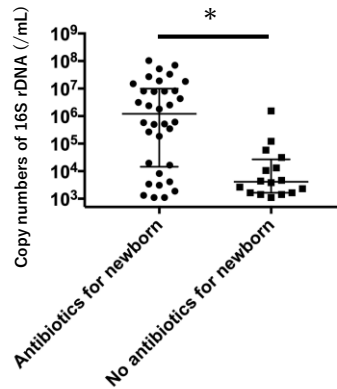
出生直後の新生児の
白血球数が2万 / μ L以上



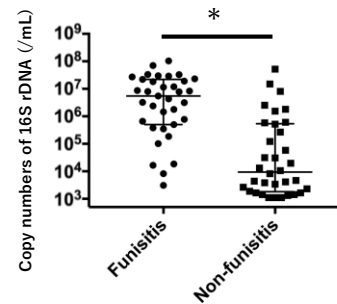
出生直後の新生児の
CRP値が0.1 mg/dL以上



出生直後の新生児で抗菌
薬投与された症例



臍帯炎と組織学的に診断
された症例



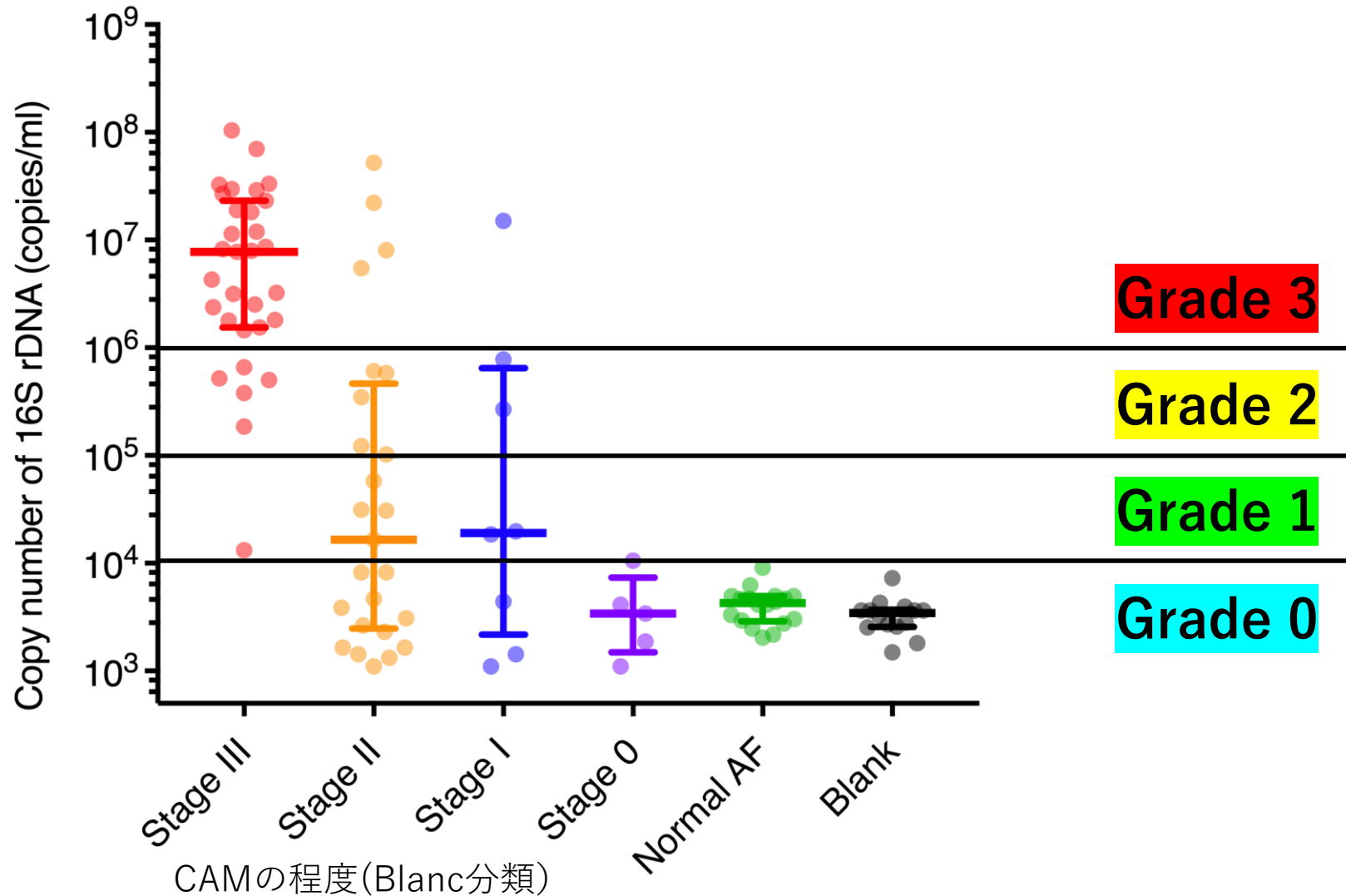
【結果】

- いずれの項目でも有意差あり

【考察】

- 羊水中16S rDNAコピー数は妊娠転帰と関連する

各試料中の細菌量に基づく Grading



デジタルPCRで16S-rDNAコピー数を定量し
Gradingする



羊水感染の程度を診断

16S rDNAコピー数に基づくGradingと転機の関係

	Grade3 (N=30)	Grade1-2 (N=22)	Grade0 (N=17)	adjusted <i>P</i> -value G3 vs G1-2	adjusted <i>P</i> -value G3 vs G0	adjusted <i>P</i> -value G1-2 vs G0
CAM (Stage III)	25 (83%)	6 (27%)	0 (0%)	<0.001	<0.001	0.027
CAM (Stage ≥ II)	29 (97%)	17 (77%)	10 (59%)	0.108	0.006	0.299
Termination < 24h	21 (70%)	14 (64%)	3 (18%)	0.767	0.003	0.012
Termination < 48h	25 (83%)	19 (86%)	6 (35%)	1.000	0.003	0.003
nWBC ≥ 20000 / μL	10/25 (40%)	6/19 (32%)	1 (6%)	0.753	0.048	0.138
nCRP ≥ 0.1 mg/dL	16/25 (64%)	9/19 (47%)	1/16 (6%)	0.361	<0.001	0.015
Antibiotics for newborn	17/18 (94%)	10/15 (67%)	7 (41%)	0.105	0.003	0.178
Funisitis	24 (80%)	10 (45%)	1 (6%)	0.017	<0.001	0.017

	Grade2 (N=12)	Grade1 (N=10)	<i>P</i> -value G2 vs G1
CAM (Stage III)	5 (42%)	1 (10%)	0.162
CAM (Stage ≥ II)	10 (83%)	7 (70%)	0.624
Termination < 24h	7 (58%)	7 (70%)	0.675
Termination < 48h	10 (83%)	9 (90%)	1.000
nWBC ≥ 20000 / μL	4/10 (40%)	2/9 (22%)	0.628
nCRP ≥ 0.1 mg/dL	5/10 (50%)	4/9 (44%)	1.000
Antibiotics for newborn	7/8 (88%)	3/7 (43%)	0.119
Funisitis	7 (58%)	3 (30%)	0.231

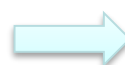
Funisitis (臍帯炎) は胎児感染を示唆する病理学的所見

G2 vs G1はNが少ない

Adjusted *P*-value were calculated using Fisher's exact test and the Benjamin-Hochberg procedure.

- Grade3は高い確率で、短期間で分娩となり、重度の絨毛膜羊膜炎や臍帯炎をきたしていた
- Grade1は高い確率で、重度の絨毛膜羊膜炎を来した症例はなく、臍帯炎例も6%と低かった
- Grade 1-2は高い確率で48時間以内に分娩となり、臍帯炎例は約半数
- Grade 1よりもGrade 2の方が、重度の絨毛膜羊膜炎の頻度は32%、臍帯炎の頻度は24%上昇したが有意差なし

デジタルPCRで16S-rDNAコピー数を定量しGradingする



羊水感染の程度を診断



胎児感染のリスクを評価

まとめ

- ドロップレットデジタルPCRを用いて、羊水中細菌定量解析を行った
- 羊水中の細菌量（16S rDNAコピー数）が多いほど、絨毛膜羊膜炎や臍帯炎や胎児の炎症所見が見られる頻度が上昇した
- 特に、Grade 3の羊水感染は、妊娠延長の見込みが非常に乏しく、高頻度で胎児感染を来たしているため、早期の妊娠終結が望ましい状態と考えられた

(1) 原因菌に対する抗菌薬は何がよいか？

羊水感染例の細菌組成解析で起炎菌の同定に成功、理想的な抗菌薬を同定

特許出願済、漆山ら *Sci Rep* 2017



(2) 治療効果はどのように判定すべきか？妊娠終結の基準は？

羊水中16S rDNAコピー数解析で羊水感染状態の評価に成功 (本開発)

特許出願済、論文投稿準備中

(3) 予防的治療の対象例はどう選別すべきか？

次世代シーケンサーを用いた腔細菌叢解析でハイリスク症例の選別に成功

特許出願済、海外出願中、漆山ら *Sci Rep* 2021

(4) 炎症を抑える治療薬は何がよいか？

治療薬の候補あり (非公開)



絨毛膜羊膜炎発症ハイリスク切迫早産症例を対象とした治療的抗菌剤投与による
第II相臨床研究

(臨床研究責任医師：福岡大学産婦人科 宮本 新吾)

絨毛膜羊膜炎発症ハイリスク切迫早産症例を対象とした 治療的抗菌剤投与による第II相臨床研究

(臨床研究責任医師：福岡大学産婦人科 宮本 新吾)

選択基準

1. 妊娠34週未満の切迫早産例
2. 前期破水の所見なし
3. 主要臓器障害なし（血液検査）
4. 年齢18歳以上
5. 腔細菌叢解析で陽性（PCAMスコアもしくはmodified PCAMスコア）と診断
6. 羊水16S rDNAコピー数が 10^6 copies/mL未満

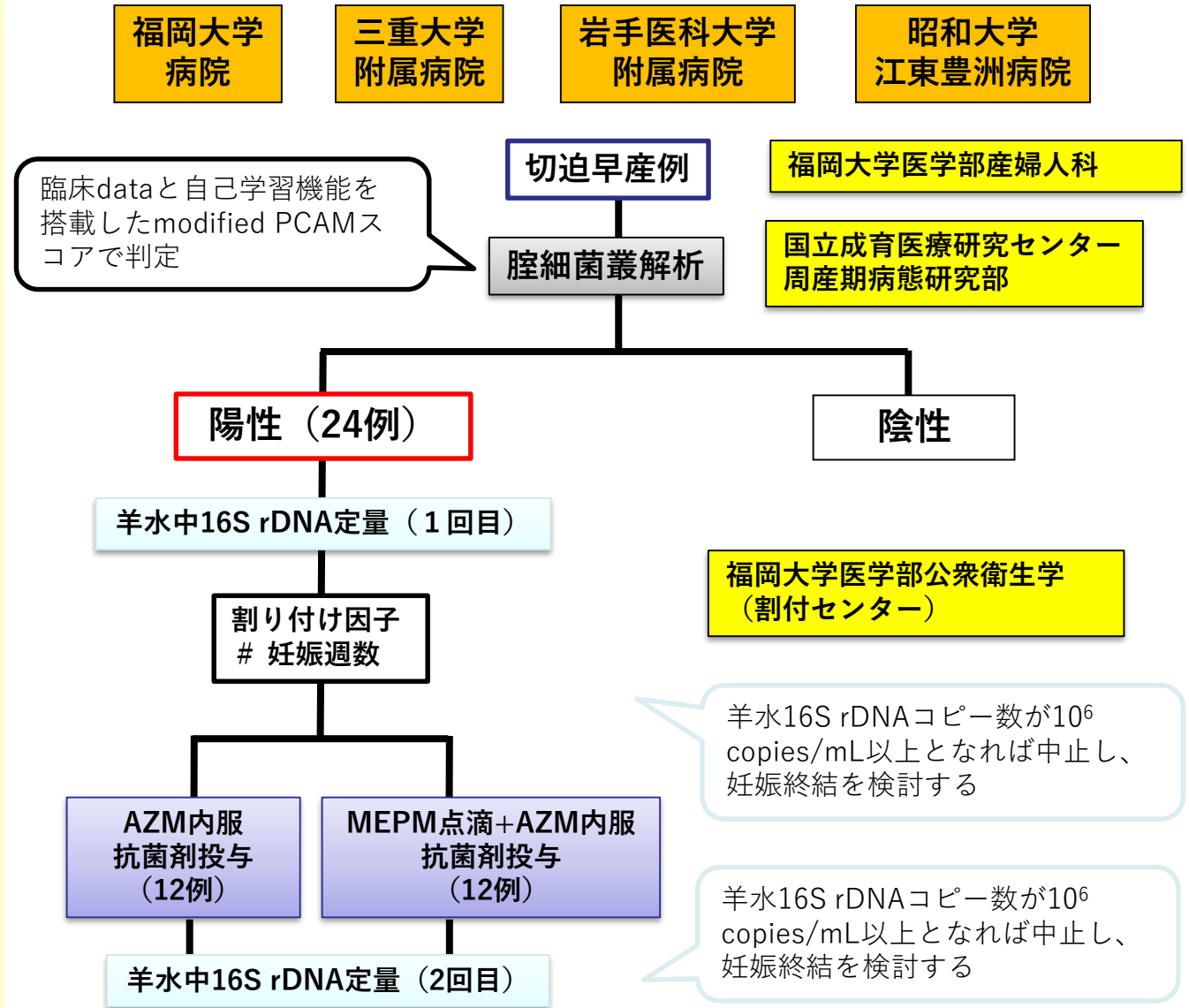
除外基準

1. 体温38度以上
2. HR 120/分かつWBC 20000/ μ L以上
3. 臨床的絨毛膜羊膜炎（Lenckiらの基準）
4. 重篤な合併症（コントロール不良の精神疾患・DM・感染症・悪性腫瘍・妊娠高血圧腎症など）
5. AZMやMEPMに薬剤過敏性の既往
6. NGSやdPCRが稼働しなかった場合
7. 研究責任者や分担者が不適当と判断した場合

羊水検査結果が報告される前に娩出された症例は、登録から除外する。

主要評価項目

2回目の羊水中16S rDNA量



2022年1月に臨床研究審査委員会の承認を受け、jRCT登録済（jRCTs071210114）、2022年4月より登録開始

CAM特定臨床研究の進捗状況 (2022年9月10日時点)

<研究期間>

福岡大：2022年4月から5ヶ月間

昭和大江東豊洲：2022年8月から1ヶ月間

選択除外基準を満たす症例 **21例**
(福大 19例、豊洲 2例)

同意 **12例**
(福大 11例、豊洲 1例)

非同意 **9例**
(福大 8例、豊洲 1例)

陰性 **7例**
(福大 6例、豊洲 1例)

陽性 **5例**
(以下、福大のみ)

正期産 (37週) 1例
早産 (28週) 1例
未分娩 4例
離脱 1例

登録 **5例** <目標24例>

11/5時点
11例
達成率4-5割

MEPM + AZM群 **2例** <目標12例>

AZM群 **3例** <目標12例>

完了 **1例**

離脱 **1例**

完了 **2例**

離脱 **1例**

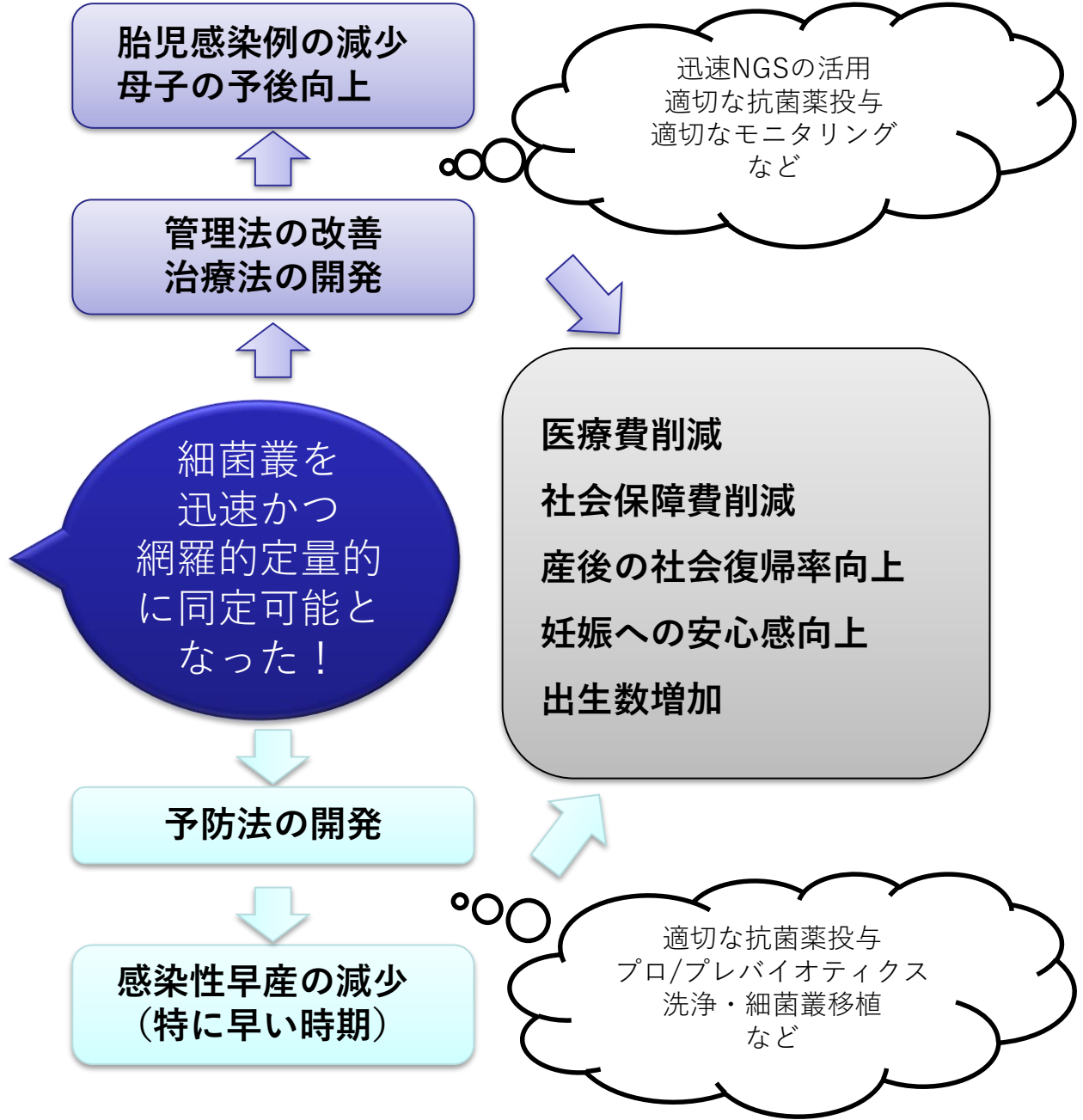
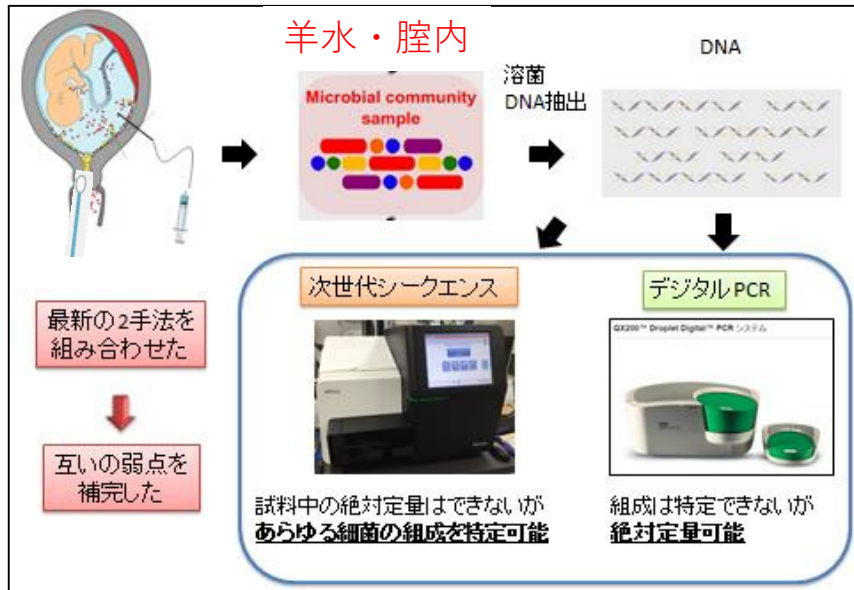
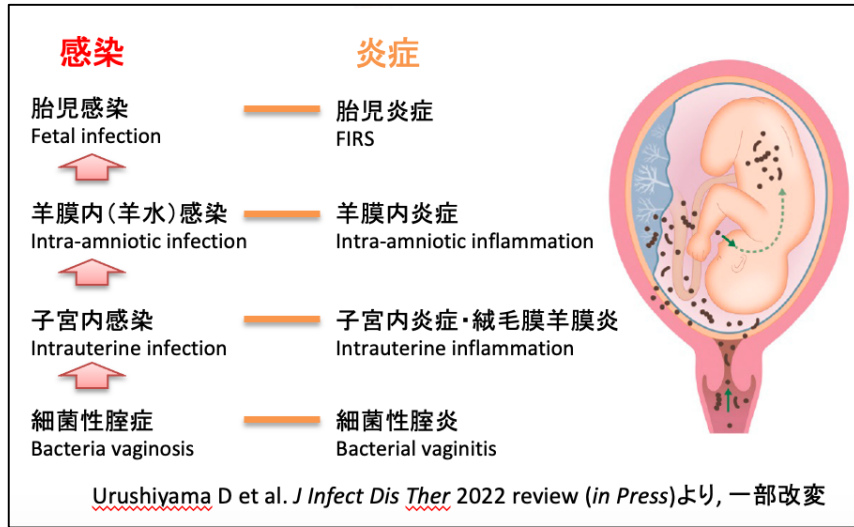
正期産 (37週) 1例

正期産 (37週) 1例

正期産 (37週) 1例
早産 (34週) 1例

早産 (36週) 1例

今後の展望



従来技術とその問題点

既に実用化されている子宮内感染の検出法としては、

グラム染色法、羊水細菌培養検査等があるが、

- 難培養菌（特にマイコプラズマ・ウレアプラズマなど）は検出困難
- 定量性がなく感染の程度が不明
- 検査の実施が予後の改善にはつながらない

等の課題があり、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 本技術の開発によって、従来技術の課題であった低感度・定量性の欠如の解決、迅速性の向上に成功した。
- 一般診療で現在の羊水検査を行う施設は少ないが、本技術は検出感度と迅速性が高く、定量性に基づく評価法であるため、一般臨床での実用が可能となった。
- 本技術の適用により、羊膜内（羊水）感染を定量的に評価でき、早産に関連する予後を改善しうるため、**早産関連コスト（主に新生児治療と社会保障費）を大幅に削減**できることが期待される。

想定される用途

- 本技術を産科の一般診療（主に周産期センター）に適用することで**周産期医療レベルの向上・医療費削減・医療ミス削減**できるメリットは大きい。
- 上記以外に、**新生児予後改善や出生数の増加、女性が望めば産後早期の社会復帰**も期待される。
- また、達成された細菌量を定量化するという点に着目すると、**敗血症や肺炎といった他の感染症**に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、一般診療での実施が可能なところまで開発済みであり、実際に特定臨床研究（前向き介入研究）を実施している。しかし、**子宮内感染症の治療法と予防法の開発**は未解決である。
- 本技術を一般臨床に適用する場合の薬事上の条件設定が必要である。そのために、引き続き特定臨床研究や後方視的症例対照研究などでエビデンスを創出する。
- 実用化に向けて、本技術の臨床的意義をさらに明らかにする必要がある。そのために、症例数を増やし、Gradingのカットオフ値の再検討を重ね、本技術の精度の向上を図る。

企業への期待

- 前述の未解決課題は、特定臨床研究の完遂とその後の研究により克服できると考えている。
- **臨床検査技術**を持つ企業との共同研究を希望している。
- **細菌量定量技術を開発中の企業、医療や環境衛生分野に展開している企業**には、本技術の導入を検討していただきたい。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：胎児感染の検出方法
- 出願番号：特願2022-054362
- 出願人：学校法人福岡大学、
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、漆山 大知、秦 健一郎

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

T E L 092-871-6631

F A X 092-866-2308

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