

技術概要

- 妊娠婦人の子宮内感染は、早産や新生児感染を引き起こし致命的となる
- 晩婚化・晩産化により早産が増加しており、少子化社会は国家存亡の危機となる課題の一つである
- 残念ながら、早産の主因である子宮内感染を正確に診断する方法は存在しなかった
- 今回、我々は子宮内感染を正確に診断する新規方法の開発に成功した
- このことで、早産やその関連疾患(胎盤早期剥離など)を予測する診断方法の開発が可能となった

想定される活用例

- 子宮内感染が疑われる妊婦の診断により、正確に、分娩期や抗生物質投与など、治療選択が可能となる
- 子宮内感染を引き起こす妊娠症例を予測し、治療することで、早産・胎盤早期剥離を回避できる

展示のまどろこ

少子・高齢化するなかで、我が国の働き方改革が浸透しても、晩婚化・晩産化への社会現象は、これまで同様に進行することは欧米諸国からも十分に予測できる。我々が開発する診断法は、国家存亡の危機から国民を救うことに寄与する、社会的意義の高いものである。そのため、開発そのものの重要性だけでなく企業イメージを大きく向上させることができる。

子宮内感染(絨毛膜羊膜炎)と早産



子宮内感染 → 前期破水 → 早産 → 新生児疾患

① 胎児感染
② 羊水感染
③ 絨毛膜羊膜炎(CAM)
④ 子宮頸管炎
⑤ 細菌性陰症など

産科医療保障制度報告書より引用、一部改変

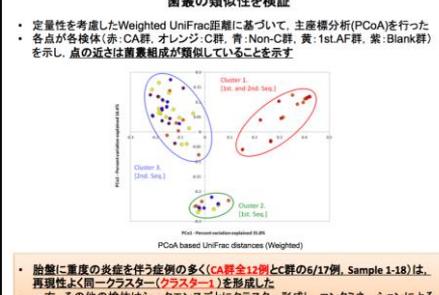
<子宮内感染と関連する新生児疾患>

- 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

- 子宮内感染の出生前診断は困難
- 予測はさらに困難
- 早産率は低下していない

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、主成分分析(PCA)を行った
• 各点が各検体(赤:CA群、オレンジ:C群、青:Non-C群、黄:1stLAF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



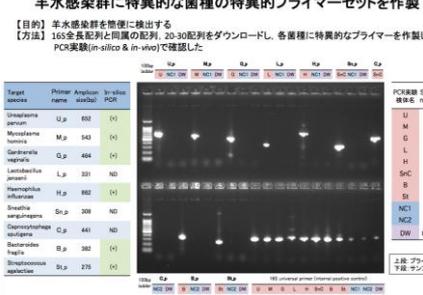
Cluster 1 (Red and Orange)
Cluster 2 (Blue and Yellow)
Cluster 3 (Purple)

PCA based UniFrac distances (Weighted)

- 胎盤に重度の炎症を伴う症例の多く(CA群全12例と群の6/17例、Sample 1-18)は、再現性よく同一クラスター(クラスター)を形成した
- 一方、その他の検体はスーパークラスターごとクラスター形成し、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回目:クラスター)

羊水感染群に特異的な菌種の特異的プライマーセットを作製

【目的】 羊水感染群を簡便に検出する
【方法】 16S全長配列と菌叢の配列、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)で検証した



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

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、正産期3例)を対象とした
- 絨毛膜羊膜炎の重症度分類(Bainc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、実験用ゲナタイプ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(Bainc分類)>

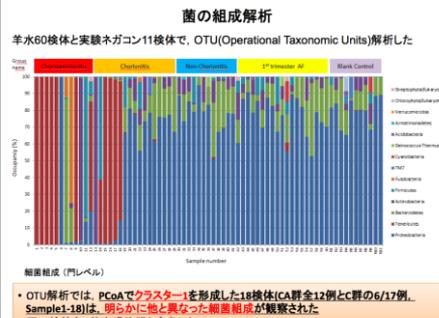
Stage III (Chorioamnionitis): 羊膜まで炎症が波及
Stage II (Chorionitis): 絨毛膜まで波及
Stage I (Subchorionitis): 絨毛膜下にとどまる

各群における細菌の胎盤学的分類とコントロールの内訳

グループ名	サンプル数	菌種の胎盤学的分類
Amnion Cavity	1-12	Stage III
Blank WA, Williams & Wilkins, 1984より引用	13-29	Stage II
Non-Chorionitis (Non-CA)	30-41	Stage I
1st Transmembrane AF (1st-AT)	42-60	Blank Control (0.0%)
Blank Control (0.0%)	N1-11	Blank Control (0.0%)

菌の組成解析

羊水60検体と実験用ゲナタイプ11検体、OTU(Operational Taxonomic Units)解析した



OTU解析では、PCAでクラスターを形成した18検体(CA群全12例と群の6/17例、Sample 1-18)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
Blanco's stage (Mean±SD)	2.7±0.5	1.3±0.7	0.000
羊水検体1μL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
新生児感染症発症 (n/N, %)	13/17 (76%)	2/18 (11%)	0.000

※有意差検定にはMann-Whitney 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、産児ともに比較的良好である可能性も示唆された

方法

福岡大学病院総合周産期センターで羊水サンプルを採取

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(ビーズ破砕)
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 454 技術を用いた150bpサンプル同時(150bpシーケンシングプライマーを使用)

次世代シーケンサー(MiSeq)でシーケンス

Fastqファイルのマーキング
クオリティコントロール
アダプター配列の除去

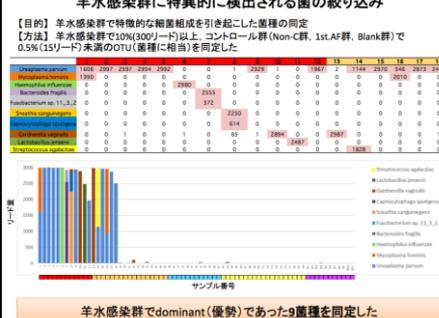
ランダムに3000リードを抽出

16S rRNA遺伝子解析(厳密かつ定量的)
UniFrac距離に基づく主成分分析(PCA)や OTU(Operational Taxonomic Units)解析など

藤原正平, 実験疫学 vol. 32 (2014) より引用

羊水感染群に特異的に検出される菌の絞り込み

【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-AT群, Blank群)で0.5%(15リード)未満のOTU(菌種に相当)を同定した



羊水感染群でdominant(優勢)であった9菌種を同定した

絨毛膜羊膜炎(Stage III)の予測精度

	羊水感染 (+)	羊水感染 (-)	計	感度
Stage III	12	0	12	100% (12/12)
Stage ≤II	6	23	29	79% (23/29)
計	18	23	41	

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、高い精度で子宮内感染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

共同研究者

国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 部長 秦 健一郎

利益相反状態の開示

開示すべき利益相反状態なし

特許情報

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、秦 健一郎

出願番号 特願2016-105177