

シンポジウム2 母子感染の診断と対応

Preterm labor, preterm PROM における病原微生物, 特に嫌気性菌の意義に関する研究

岐阜大学医学部産科婦人科 (主任: 玉舎輝彦教授)

三 鴨 廣 繁

Studies on Clinical Implication of Pathogenic Microorganisms, Especially Anaerobes in Preterm Labor/PROM

Hiroshige MIKAMO

Department of Obstetrics and Gynecology, Gifu University School of Medicine, Gifu

(Director : Prof. Teruhiko Tamaya)

Key words: Anaerobes • Preterm labor/PROM • Endotoxin • Interleukin-8 • Clindamycin

緒 言

preterm labor/preterm PROM (premature rupture of membrane) の原因に、病原微生物である、とりわけ細菌である好気性菌のみならず嫌気性菌の胎内感染が重要であることが強調されている¹⁾。周産期死亡の原因として、早産による低出生体重児の占める割合は依然として大きい。その原因として、preterm labor/PROM は重要なもので、胎内細菌感染はその重要な地位を占めていると考えられる²⁾³⁾。その細菌感染は図1に示したように、妊娠中の腔内細菌の過増殖(第Ⅰ期)により、炎症が子宮頸部、脱落膜へ及び(第Ⅱ期)、さらに絨毛膜・羊膜に及び(第Ⅲ期)、羊水感染が惹起され、胎内感染、胎児障害へと進行(第Ⅳ期)となっていくものと考えられる。そのため、その適切な早期診断、早期治療による予防が臨床上的重要な課題である。本研究では、preterm labor とは、22週から36週までに起こった陣痛、preterm PROM とは、36週までに起こった破水、羊水感染症とは、白血球数15,000/ μ l 以上、CRP 値0.4mg/dl 以上、病理組織所見は問わない、母体発熱37°C以上、胎児心拍数180bpm/分以上をすべて満たした症例とした。

細菌感染のうち、酸素を必要とする好気性菌に

ついてはこれまでも多くの研究がされてきたが、性器感染症において優位を占めている、酸素を嫌う嫌気性菌についての研究は遅れているのが実状であった。地球が誕生した時は、嫌気状態であり、最初に誕生した生命体は嫌気性菌であるといわれている。その後、酸素の発現により、好気性菌が出現し、表面上は、病原性を発揮するようになったが、嫌気性菌は、依然として存続し病原性を発揮し続けてきた。すなわち、嫌気性菌とは、大気中の遊離酸素が菌の生存あるいは発育に有害に作用するので、発育させるためには遊離酸素の除去が必要な細菌をいう。嫌気性菌は、酸素に弱いのが最大の特徴である。産婦人科領域細菌感染症では、好気性菌では、グラム陽性球菌とグラム陰性桿菌が主体である。嫌気性菌も、好気性菌と同様に、グラム陽性球菌とグラム陰性桿菌が主体になっている。稀に、*Clostridium* のように芽胞を有する菌が問題となることもある⁴⁾。

ヒトの腔には、1ml 中に $10^8 \sim 10^9$ 個の細菌が常在しており、好気性菌と嫌気性菌の比率は1:5で、嫌気性菌優位になっている⁵⁾⁶⁾。このことから生体では嫌気性菌の重要性が窺える。また、これらの微生物は、検出こそされるが、腔内で異常増殖しているわけではない。菌の検出率には、幅があ

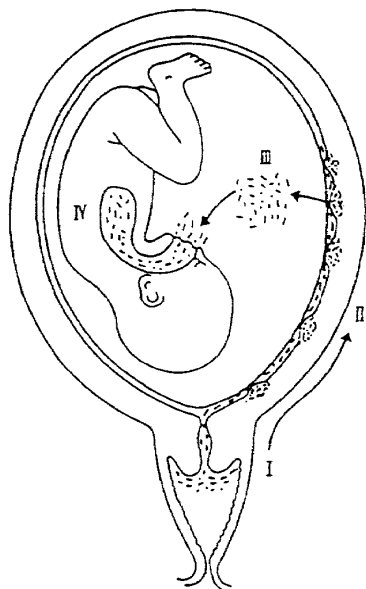


図1 上行性胎内感染の進行例

第Ⅰ期：腔/頸管の病原性微生物の過増殖，第Ⅱ期：脱落膜に限局感染，第Ⅲ期：絨毛膜炎，絨毛血管炎，羊膜炎，羊水感染症±PROM，第Ⅳ期：胎児感染(胎児障害)

るが，このことは，月経周期によって，菌の検出率が異なることから生じるものと考えられる¹⁾。また，嫌気性菌の分離・同定は困難であるうえに，酸素に対して弱いことがあり，このことが，一般検査室で，嫌気性菌の分離率を低くしてきた原因である。

膿瘍形成を認めたような症例では，嫌気性菌単独で検出されることもあるが，一般産婦人科細菌感染症の原因は，約3/4が，好気性菌と嫌気性菌の混合感染を呈している⁴⁾。好気性菌の感染が起こると，感染局所の酸化還元電位が低下し，それまで生存していた酸素を嫌う嫌気性菌が続いて増殖し，嫌気性菌感染症が起こるという2相性感染が特徴である。したがって，産婦人科で臨床的に気づかれる多くの感染症は，病態が進行し，2相性感染の中間点あたりで好気性菌と嫌気性菌の感染症が成り立っているものと考えられる(図2)。

以上のことを前提として，以下の検討を行った。嫌気性菌に注目しながら，preterm labor/PROMの予防の試みとして，妊娠中期に腔分泌物および頸管粘液中の細菌，エンドトキシン値，サイトカイン値を測定しリスク因子を探し出し，スクリー

ニングの時期，カットオフ値，抗菌薬による治療方法を設定することを目的として本研究を施行した。また，羊水の細菌発育阻止作用力を検討した。一方で，嫌気性菌の病原性について，実験感染モデルを用いて検討し，さらに，嫌気性菌について，実際の臨床との関連性を検討した。

方 法

1. 嫌気性菌の耐酸素感受性に関する検討

Prevotella bivia が検出された子宮留膿症患者の子宮内に貯留した膿を手術時に無菌的に，1スワブ0.05mlの滅菌綿棒にて14本ずつ採取し，即座に，1本ずつ検体を嫌気ポーターに入れ，4℃および25℃の2条件下で保存し，経時的な菌数の変動を検討した。なお，経時的な変化を知るための定量培養は，好気培養としては，Mueller Hinton寒天培地(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)を用いて37℃で2日間，嫌気培養としてはBrucella HK(hemin, vitamin K1) RS(rabbit, sheep)血液寒天培地(極東製薬，東京)を用いて，嫌気条件下で5日間施行した。

2. preterm labor/PROMと関連した細菌感染の病原因子

(1) 嫌気性菌のエラスターゼ活性の検討

preterm labor/PROMと関連した細菌感染の病原因子のひとつに頸管拡張と関係するコラーゲン組織を分解するエラスターゼの産生能がある⁷⁾。preterm labor/PROM/羊水感染症例から分離された教室保存の臨床分離菌株131株のうち，

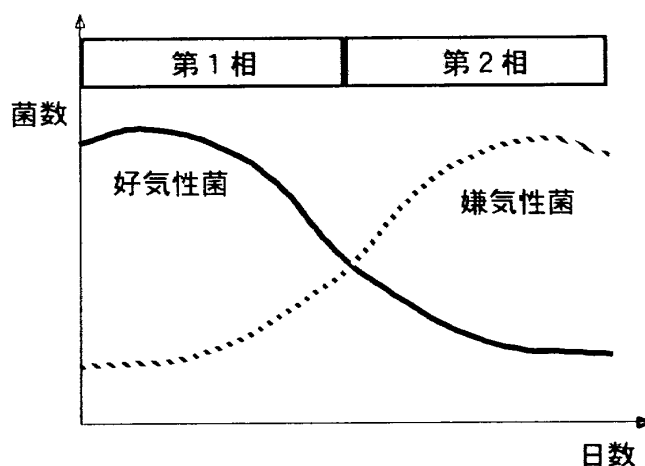


図2 2相性感染の原理

Peptostreptococcus magnus 20株, *Peptostreptococcus micros* 18株, *Fusobacterium nucleatum* 12株, *Bacteroides fragilis* 28株, *Bacteroides thetaiotaomicron* 15株, *P. bivia* 38株を用いた。これらの被検菌株は、すべて15%スキムミルクに懸濁し、 -80°C で凍結保存されていたものを、使用直前に Brucella HK RS 血液寒天培地で3代継代して用いた。

Elastin 検出用培地の調製は、Williams et al.の方法に準じて行った⁸⁾。すなわち、培地はコロンビア血液寒天基礎培地(OXOID, Unipath Ltd., Basingstroke, Hampshire, England)を用い、これに1%(W/V)になるように可溶性Elastin (Elastin-Soluble No. ES12, Elastin Products Co., Inc.)を添加した。直径90mmの丸シャーレに10mlのElastin添加培地を流し込んで固めた。この培地は均一に不透明である。培地は使用時まで嫌気状態にした後、 4°C で保存した。使用直前には、 37°C の恒温室で10分間、培地表面を乾燥させた。各被検菌株は白金耳で掻き取り、Elastin添加培地に盛り上げるようにSpot inoculationし、嫌気状態で、 37°C で4～5日間、嫌気的に培養した。培養後のElastinの検出は30%Trichloroacetic acid(TCA)(関東化学、東京)水溶液を用いた。TCAは、菌によって分解されなかったElastinを培地中に沈澱させ、発育菌株の周囲に透明帯を形成した場合、エラスターゼ陽性と判定した。これらの試験をすべて2回繰り返して行い、再現性を確認した。

(2) *F. nucleatum* のホスホリパーゼ A_2 によるアラキドン酸の遊離に関する検討

嫌気性菌の病原性について、*F. nucleatum* を選び、陣痛を起こすプロスタグランジンの合成系のひとつであるホスホリパーゼ A_2 とプロスタグランジンの代謝経路にあるアラキドン酸の遊離を検討した。

①子宮内膜細胞の調製

内膜細胞は摘出された子宮内膜の初代培養によって調製した^{9)~11)}。無菌的に採取した内膜を、ただちに HANKS 液中で細切し、コラゲナーゼ(タイプ I)を0.25%になるように加えた。 37°C 、2時

間インキュベートし、細胞を遊離した後、これをナイロンメッシュで濾過し、細胞塊と繊維を除去した。次いで、 $200\times g$ 、10分の遠心によって細胞を回収した。細胞を HANKS 液で十分に洗浄し、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むハム F-12液中で培養した。内膜細胞は単層細胞層として得られるが、継代することによって線維芽細胞が出現するため、内膜細胞は5日以内に実験に供した。

②細菌抽出物の調製

F. nucleatum の菌株を液体培地中で、 10^8 個/ml となるまで培養した。菌体を遠心で回収し、リン酸緩衝液で遠心・浮遊を繰り返して洗浄した。沈渣として得られた細菌に5倍量のホモジネート緩衝液(100mM Tris, 1mM エチレンジグリコール四酢酸(EGTA), pH 7.4)を加え、超音波破碎によってホモジネートを調製した。これを $100,000\times g$ (1時間)で超遠心し、得られた上清を抽出物として -80°C で冷凍・保存した。

③内膜細胞からのアラキドン酸遊離の測定

アラキドン酸の遊離は $[^3\text{H}]$ アラキドン酸[[5,6,8,9,11,12,14,15- ^3H]アラキドン酸(8.5TBq/mmol), New England Nuclear 社]であらかじめ標識した内膜細胞を用いて観察した。細胞の標識は初代培養フラスコに $[^3\text{H}]$ アラキドン酸(37MBq/ml 培地)を添加し、6～10時間インキュベートすることによって行った。この時、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸は窒素気流で溶媒を乾固した後、少量の培養液に懸濁して加えた。なお、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸の取り込みは6時間でほぼ最大レベルに達した。内膜細胞をハム F-12液で十分に洗浄後、 1×10^7 個/ml になるように balanced salt solution (BSS, 135mM 塩化ナトリウム, 4.5mM 塩化カリウム, 0.5mM 塩化マグネシウム, 5.6mM ブドウ糖, 10mM HEPES, 1.5mM 塩化カルシウム, pH 7.4)に浮遊した。反応は各種刺激物を加えることによって 37°C で開始し、4倍量のクロロホルム/メタノール(1:2, v/v)を加えることによって停止した。反応を停止した後、1倍量の水とクロロホルムを加え十分に混和させた。次いで、遠心を行い上(水)層と下(クロロホルム)層とに分離した。クロロホルム層に飽和させた等量の冷却水を

加えた後、2時間氷冷し混入水溶成分を洗浄した。下層(抽出脂質)を窒素気流で乾固し、少量のクロロホルムに溶解した。遊離脂肪酸は薄層クロマトグラフィーにより分離した^{12)~14)}。つまり、適量のサンプルを内部標品(標準脂肪酸)とともにシリカゲル薄層にスポットし、クロロホルム/アセトン(96:4, v/v)の溶媒系で展開した。ヨード蒸気発色後、遊離脂肪酸に相当する部位を掻き取り、放射活性を測定した。

3. preterm labor/PROM/羊水感染症の細菌学的検討

これまでは好気性菌が主に研究されてきたが、臨床的には混合感染として、嫌気性菌の存在が多いため、嫌気性菌を中心にして、preterm labor/PROM/羊水感染症における細菌について検討した。妊婦の腔分泌物および頸管粘液を臨床検体として、妊娠20週310例、妊娠30週320例、妊娠34週310例、妊娠36週210例の合計1,150例の検討を行った。

このうち、preterm labor/PROM/羊水感染症などを来した症例は、妊娠20週では36例(11.6%)、妊娠30週では34例(10.6%)、妊娠34週では30例(9.7%)、妊娠36週では20例(9.5%)で、妊娠週数の進行に応じての変化がなく、合計120例(10.4%)であった。

検体採取後即座に、0.05mlの滅菌綿棒によるスワブ検体を、GAM ブイヨン(極東製薬)5mlを用いて懸濁した。定量培養の際にはGAM ブイヨンを用いて連続希釈系列を作成した。また、検体採取から、検体材料の定量培養に至るまでの処理終了までの時間は、1時間以内になるようにした。好気培養には、ブドウ球菌寒天培地(日水製薬、東京)、マッコンキー寒天培地(Becton Dickinson)、炭酸ガス培養には、羊血液寒天培地(Becton Dickinson)、チョコレート寒天培地(Becton Dickinson)、嫌気培養には、非選択培地としてBrucella HK RS血液寒天培地(極東)、選択培地としてPEA(β -phenylethylalcohol)Brucella HK血液寒天培地(極東)、PV(paromomycin, vancomycin)Brucella HK血液寒天培地(極東)、BBE(Bacteroides bile esculin)寒天培地(極東)に、それぞれ

塗抹し培養を開始した。真菌培養は、サプローデキストロース寒天培地(Becton Dickinson)を用いた。好気培養は、37°Cで2日間、炭酸ガス培養は、5%炭酸ガス下、37°Cで3日間、嫌気培養は、嫌気的条件下、37°C下で、7日間、真菌培養は、37°C下で7日間とした。同定は、各平板上の集落形状の異なるすべての集落を注意深く釣菌し、非選択培地を用いて、3回継代培養し、純培養菌とした後に実施した。好気性菌のうち、グラム陽性球菌で、カタラーゼ反応陽性の菌には、Api STAPH(API System S.A., Montalieu vercieu, France)を、グラム陽性球菌で、カタラーゼ反応陰性の菌には、Api STREP(API System S.A.)を用いて同定した。好気性グラム陰性桿菌の同定には、Enterotube II(Becton Dickinson)およびOxi-Ferm Tube II(Becton Dickinson)を用いた。嫌気性菌の同定にはRap ID ANA System II(Innovative Diagnostic System, Inc., Atlanta, GA)を用いた。特に、*Mobiluncus* 属の同定には、集落の特徴を観察し、グラム染色をして、陰性あるいはグラム染色不定の彎曲した菌体を確認した後、Rap ID ANA System IIを用いた。さらに、亜種の同定のために硝酸塩還元試験、馬尿酸加水分解試験を追加した。真菌の同定には、Api 20C AUX-ANOGGRAMM(Bio Merieux S.A., Marcy-l'Etoile, France)を用いた。

4. 妊婦におけるGBSおよびGBS抗原の存在とGBS血清型別抗体保有状況の検討

母子感染という観点からは、細菌感染症のなかでは、GBSは重要な問題のひとつである¹⁵⁾。保科ら¹⁶⁾によれば、GBS感染症の母子感染は、早発型では、肺炎、敗血症が多く、遅発型では、髄膜炎、敗血症が多くなっていた。また、早発型では、母体の70%以上が、遅発型でも、母体の50%近くが、GBSを保菌していた。GBS感染症の発症予防には、妊婦の保菌状態の検討が必要であると考えられる。そこで、妊婦の腔におけるGBS分離とGBS血清型別抗体保有状況を検討した。

1991年7月から1997年6月までに受診した妊婦1,150例を対象にした。検体は腔前庭部より綿棒にて採取し、Todd-Hewitt ブイヨン(THB)(Difco

Laboratories), gentamicin・nalidixic acid 添加 THB(Difco Laboratories), 羊血液寒天培地(Becton Dickinson)の3種類の培地を用いて培養した。同時に妊婦の同意が得られた症例では静脈採血をし, 3,000回転10分間, 遠心分離して血清を得た。GBSを, Api STREPにて同定した。血清型別は, 溶血連鎖球菌群別および型別用免疫血清(デンカ生研, 東京)を用いて判定した¹⁷⁾¹⁸⁾。また, 血清抗体価の測定を, 以下の方法で施行した。THB5mlに, あらかじめ血清型の判明しているB群連鎖球菌(Ia, Ib, II, III, IV, V, VI(NT6), VIII(JM9))接種し, 30°Cで24時間培養した。培養液を3,000回転20分間, 遠心分離し, 上清を捨て, 新たに THB0.5ml および豚脾臓エキス(デンカ生研)を80 μ l(4滴)加え, pHを8.0~8.5になるように調整し, 37°Cで1時間消化した。消化した菌液を3,000回転20分間, 遠心分離し, 上清を捨て, 0.1M phosphate buffered salts, modified Dulbecco's formula without magnesium and calcium(PBS)(宝酒造, 大津)0.5mlを加えて均一な液として, これを抗原抽出液とした。妊婦血清とこの抗原抽出液を載せ, ガラス上で凝集反応を行った。凝集の判定は, 約1分後に行い, 肉眼的に, 高抗体価, 中抗体価, 低抗体価, 抗体価なしと判定した。

5. 感染局所におけるエンドトキシン値

preterm laborを起こす原因となる物質のひとつに, エンドトキシンがあるが, 腔分泌物および頸管粘液中のエンドトキシン値について検討した³⁾¹⁹⁾。腔分泌物および頸管粘液をあらかじめ重量を測定した滅菌綿棒を使用して採取し, 滅菌綿棒自身から検出されるエンドトキシン値を補正した後, 腔分泌物および頸管粘液中のエンドトキシン値を決定した。エンドトキシン値の測定には, エンドトキシニンシングテストワコー(和光純薬, 大阪)を使用した。

6. 感染局所におけるサイトカイン値

エンドトキシンなどによってマクロファージが刺激されると, 炎症の進行につれて炎症性サイトカインIL-1, TNF, IL-6, IL-8などが出現してくる。IL-1, TNFは, プロスタグランジンの生成に

関与し, 早産を引き起こす^{20)~22)}。また, IL-6, IL-8は, 局所における感染の指標ともいわれているため, 腔分泌物中および頸管粘液中の炎症性サイトカインIL-6とIL-8について検討した。腔分泌物および頸管粘液をあらかじめ重量を測定した滅菌綿棒を使用して採取し, 滅菌綿棒自身から検出されるIL-6値, IL-8値を補正した後, 腔分泌物および頸管粘液中のIL-6値, IL-8値を決定した。IL-6値, IL-8値の測定には, それぞれヒトIL-6 ELISAキット(TFB, 東京), ヒトIL-8 ELISAキット(TFB, 東京)を使用した²³⁾²⁴⁾。

7. 羊水の細菌発育阻止作用の検討

羊水には, 元来, 細菌発育阻止作用があるといわれている²⁵⁾²⁶⁾が, これを嫌気性菌を中心にして検討した。実験に用いた羊水は, 妊娠16週, 21週, 28週, 32週, 36週の合併症をもたない正常妊婦から, 患者の同意を得て, 羊水穿刺施行時又は帝王切開術施行時に採取した。なお, これらの手技施行前には, 抗菌化学療法が行われていないことを前提とした。血液や胎便の污染がないように採取した羊水を, 2,500 $\times$ gで15分間遠心分離した後, 0.45 μ のフィルター(Millipore Products Division, Bedford, MA, USA)で濾過した。採取した羊水は前述の処置の後, 即座に使用した。臨床分離菌株は, preterm labor/PROM/羊水感染症例から検出頻度の高い臨床分離菌である好気性菌ではGBS, 大腸菌, 嫌気性菌では*P. magnus*, *B. fragilis*, *P. bivia*, *F. nucleatum*を選択した。各細菌を, 処理した羊水5mlと, コントロールとして, 好気性菌ではTrypticase Soy Broth(Becton Dickinson)5mlに, 嫌気性菌ではEnriched Thioglycollate Medium(Becton Dickinson)5mlに接種し, 37°Cおよび40°Cで培養した。細菌の発育は, プレートカウント法で経時的に定量した。

8. 実験感染モデルを用いた検討

実験感染モデルは, 人体では得られない情報が得られるという点で, 非常に重要である。そこで, ラット早産モデルを作成し, 嫌気性菌の病原性について検討した。

交配日を指定して妊娠ラットを作成し, 妊娠12日目に, ラットをペントバルビタール麻酔下に,

腹部に小切開を入れて開腹し、卵膜を傷つけないように左右の子宮腔内に0.025ml ずつの菌液(菌量 10^3 c.f.u./ml)を接種し、2-0絹糸を用いて閉腹した²⁷⁾。

9. preterm labor を来した症例に対する抗菌薬の治療効果

これまで嫌気性菌や好気性菌との混合感染の重要性について述べてきたが、このことと関連して、実際に preterm labor を来した症例に対して抗菌薬を投与して治療効果について検討した。preterm labor を来した症例に対して、塩酸リトドリン投与によるトコライシスに加えて、患者の同意が得られた120症例を、GBS を含む好気性菌に強く嫌気性菌には弱いアモキシシリン750mg 経口投与30例、分3/日、又は、嫌気性菌に強いクリンダマイシン450mg、分3/日経口投与30例、又は、その併用経口投与30例、又は抗菌薬無治療30例に分けて子宮収縮抑制効果を妊娠期間の延長期間で検討した。

結果と考察

1. 嫌気性菌の酸素耐性に関する検討

図3は、産婦人科領域細菌感染症から分離頻度が高い嫌気性菌である *P. bivia* 生存の酸素抵抗性を調べた結果である。大腸菌の生菌数の時間的変化は緩徐であったが、嫌気性菌の *P. bivia* では、培養開始までの時間が経過するにつれて生菌数の減少が著明であった。また、温度が高いと生菌数の減少は著明であった。このように、嫌気性菌の検出が困難であることが明らかである。

2. preterm labor/PROM と関連した細菌感染の病原因子

(1) 嫌気性菌のエラスターゼ活性の検討

表1に示したように、嫌気性菌のうち、産婦人科で分離頻度が高い *P. bivia* では、100%が陽性、羊水感染症に比較的特異的な *F. nucleatum* では、100%が陽性を示した。その他の嫌気性菌でも50%前後が陽性を示した。細菌そのものが産生するエラスターゼの組織に与える影響を否定はできないものと考えられる。

(2) *F. nucleatum* のホスホリパーゼ A₂ によるアラキドン酸の遊離に関する検討

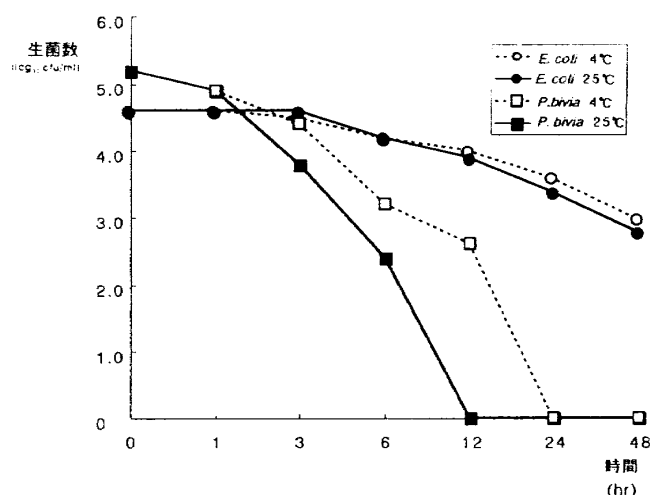


図3 嫌気性輸送培地を用いてスワブ検体を保存した場合の臨床検体から検出された細菌の菌数変化

表1 嫌気性菌131株のエラスターゼ活性

菌種	菌株数	陽性菌株数	陽性率(%)
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	20	11	55.0
<i>Peptostreptococcus micros</i>	18	9	50.0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	12	12	100.0
<i>Bacteroides fragilis</i>	28	15	53.6
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	15	8	53.3
<i>Prevotella bivia</i>	38	38	100.0
合計	131	93	71.0

図4に示したように、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸で標識した子宮内膜細胞を *F. nucleatum* の抽出物や *F. nucleatum* を培養した培養液とインキュベートすると、アラキドン酸の遊離が亢進した。このことは *F. nucleatum* がアラキドン酸遊離の促進因子を産生し分泌することを示している。

3. preterm labor/PROM/羊水感染症の細菌学的検討

図5に示したように、腔分泌物からの平均検出菌株数は、いずれの妊娠週数においても、preterm labor/PROM/羊水感染症例では、正常例に比較して、好気性菌の検出率は2~2.5倍、嫌気性菌の検出率は3~4倍に増加しており、特に嫌気性菌の検出菌株数の増加が明らかに認められた。頸管粘液からの平均検出菌株数は、腔分泌物と比較すると減少していたが、腔分泌物と同様の傾向を示した。また、頸管粘液から検出された細菌は、いずれも腔分泌物からも検出され、上行性感染を支

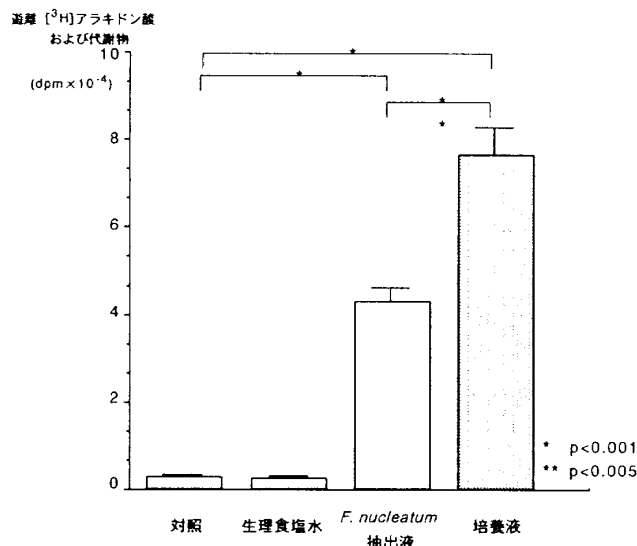


図4 *Fusobacterium nucleatum* のホスホリパーゼ A₂による子宮内膜細胞からのアラキドン酸の遊離

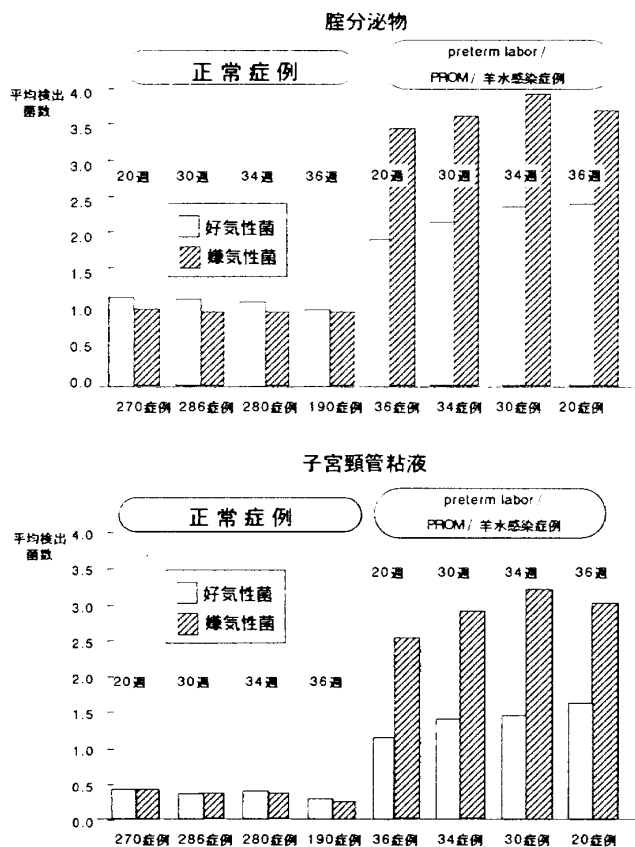


図5 妊婦腔分泌物・子宮頸管からの平均検出菌株数

持する成績であった。

表2に示したように、正常妊婦の腔分泌物よりの検出菌は、好気性菌では、GBS (Group B *Streptococcus*, B群溶連菌)、大腸菌が、嫌気性菌では、*Prevotella* 属、*Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属

が主な検出菌であった。一方、preterm labor/PROM/羊水感染症例と正常例を比較すると、好気性菌のGBS、大腸菌の検出頻度は変化なかったが、細菌性陰症と関連ある *Gardnerella vaginalis* の検出頻度は高くなっていた。このことは *G. vaginalis* と嫌気性菌による複数菌感染症である細菌性陰症に起因する preterm labor/PROM との関連性が示唆された。嫌気性菌では、*Prevotella* 属、*Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属は、正常細菌叢の延長上として検出されていたが、これらは菌数の増加が著明になっていた。そこで、これらの菌の産生する病原因子が問題となることが考えられる。また、正常腔フローラに必要な *Lactobacillus* 属の検出頻度が減少し、正常フローラの破壊が窺われた。

4. 妊婦における GBS および GBS 抗原の存在と GBS 血清型別抗体保有状況の検討

preterm labor/PROM/羊水感染症例における好気性菌の代表である GBS について調べた。対象妊婦1,150例中、GBS は、腔分泌物からは、250例、21.7%に検出され、頸管粘液からは、183例、15.9%に検出された。また、GBS の抗原を検出したところ、腔分泌物からは、230例、20.0%から検出され、頸管粘液からは、195例、17.0%に検出されたが、これらは培養法と大差なく、GBS 簡易培地等が市販されている現在では、GBS のスクリーニングは、培養法でも十分な結果が得られると考えられた。図6に示したように、正常例においては、GBS は、腔分泌物の20.4%に、頸管粘液の13.9%に検出された。一方、羊水感染症例においては、GBS は、腔分泌物、頸管粘液、いずれも33.3%に検出された。すなわち、羊水感染症例においては、GBS は、腔分泌物でも増加していたが、頸管粘液では大幅に増加しており、上行性感染が示唆された。また、妊娠週数の進行に応じての変化は認められなかった。

図7上に示したように、検出菌250株のGBSの血清型別は、VIII (JM9) 型25.2%、VI (NT6) 型27.2%が多く、次いでIII 型11.2%、Ia 型8.8%の順になっていた。欧米とは異なり、日本では、VIII (JM9) 型、VI (NT6) 型が50%以上を占めていた。

保科ら¹⁶⁾によれば, GBS 感染症発症例の血清型は, 早発型では, III 型, Ia 型が多く, 遅発型では,

表 2 妊婦腔分泌物よりの検出菌種

好気性菌	正常例 (1,030例) (%)	preterm labor/PROM/ 羊水感染症例 (120例) (%)
グラム陽性球菌		
<i>Staphylococcus</i> 属	174 (14.6)	40 (14.5)
GBS (B 群溶連菌)	210 (17.6)	53 (19.3)
他の <i>Streptococcus</i> 属	60 (5.0)	10 (3.6)
<i>Enterococcus</i> 属	135 (11.3)	24 (8.7)
その他	36 (3.0)	3 (1.1)
グラム陽性桿菌		
<i>Lactobacillus</i> 属	160 (13.4)	2 (0.7)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	12 (1.0)	35 (12.7)
その他	65 (5.5)	10 (3.6)
グラム陰性桿菌		
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	180 (15.1)	40 (14.5)
その他	158 (13.3)	58 (21.1)
合 計	1,190 (100.0)	275 (100.0)
嫌気性菌	正常例 (1,030例) (%)	preterm labor/PROM/ 羊水感染症例 (120例) (%)
グラム陽性球菌		
<i>Peptostreptococcus</i> 属	440 (48.9)	182 (40.9)
その他	10 (1.1)	2 (0.4)
グラム陽性桿菌		
その他	10 (1.1)	3 (0.7)
グラム陰性桿菌		
<i>Prevotella</i> 属	265 (29.5)	145 (32.6)
<i>Bacteroides</i> 属	136 (15.1)	82 (18.4)
<i>Fusobacterium</i> 属	24 (2.7)	25 (5.6)
その他	14 (1.6)	6 (1.3)
合 計	899 (100.0)	445 (100.0)

	陽性	陰性
腔分泌物 GBS菌検出	250例 21.7%	900例 78.3%
腔分泌物 GBS抗原検出	230例 20.0%	920例 80.0%
子宮頸管粘液 GBS菌検出	183例 15.9%	967例 84.1%
子宮頸管粘液 GBS抗原検出	195例 17.0%	955例 83.0%

図 6 対象妊婦1,150症例での GBS 菌・抗原検出結果

III 型が圧倒的に多くなっており, III 型, Ia 型の病原性が高いことが推察される。

図 7 下に示したように, 検出された GBS の血清型別から妊婦の GBS 抗体価をみると, 日本で半数を占める VIII (JM9) 型, VI (NT6) 型検出例の, 約 2/3 が中抗体価以上を示したのに対し, III 型検出例では, 15% 前後しか中抗体価以上を示さなかった。日本で多くを占めている VIII (JM9) 型, VI (NT6) 型の GBS については, この型に対する抗体保有率が日本人女性では高いため, 問題になることが少ないと考えられたが, III 型の GBS については, 抗体保有率が低く, 臨床上問題となることが多いのではないかと考えられた。コストベネフィットを考慮した場合, GBS が検出され, GBS の抗体価が低い抗体がなければ予防的に抗菌薬を投与した方がよいと考えられた。また, GBS の抗体価の測定キットの開発が必要であると考えられた。

5. 感染局所におけるエンドトキシン値

図 8 に示したように, 腔分泌物中のエンドトキシンは, いずれの妊娠週数においても preterm labor/PROM/羊水感染を来した症例で高値より正常範囲までと幅があった。このことは, 細菌のエンドトキシン産生能を反映していると考えられた。頸管粘液中のエンドトキシンは, 腔分泌物中のエンドトキシンと同様の傾向を示したが, 腔分泌物中のエンドトキシンより低い値であった。このことは, 腔内では, より多くのエンドトキシンが産生されていることを示していた。

エンドトキシンは, グラム陰性桿菌に含まれるリポポリサッカライドであるため, 羊水感染症例を, グラム陰性桿菌検出症例と未検出症例に分けて検討した。その結果, 図 9 に示したように, 羊水感染症例における頸管粘液中のエンドトキシンは, グラム陰性桿菌検出例では, 高値を示した。グラム陰性桿菌検出例では, 頸管粘液中のエンドトキシンのカットオフ値は, 100pg/ml に設定することで preterm labor/PROM/羊水感染症の予測が可能になるものと考えられた。また, いずれの妊娠週数によっても違いは認められなかった。

6. 感染局所におけるサイトカイン値

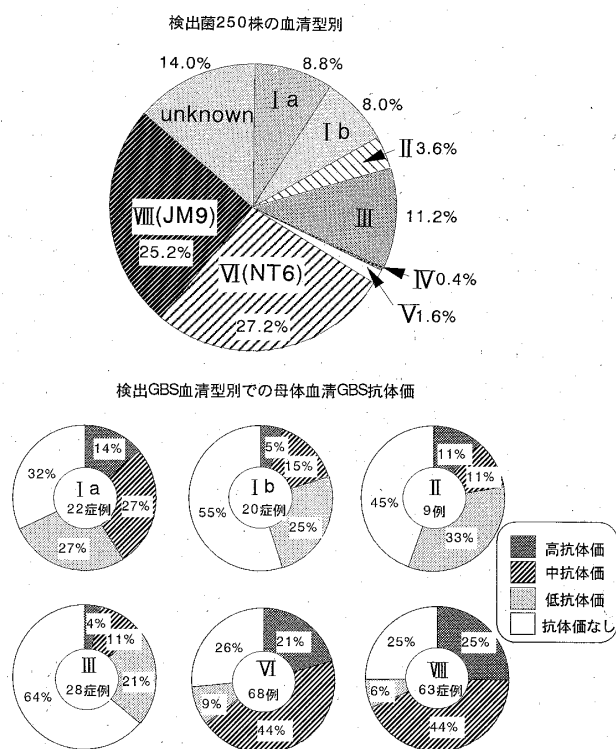


図7 GBS血清型別と妊婦の血清抗体価

図10に示したように、主にマクロファージや子宮内膜が産生する、頸管粘液中のIL-6を測定したところ、preterm labor/PROM/羊水感染を来した症例では、炎症が進行すると段階的に出てくるため、IL-6は高い値から低い値まで観察された。同様に、腔分泌物中のIL-6は、頸管粘液中のIL-6と同様の傾向を示した。

図11に、頸管粘液中のIL-8値を示したが、preterm labor/PROM/羊水感染を来した症例では、正常例と比較して有意にIL-8が高くなっており、カットオフ値を、5,000pg/mlに設定することでpreterm labor/PROM/羊水感染の予測が可能になるものと考えられた。また、腔分泌物中のIL-8でも同様の結果が得られた。IL-8の方が、IL-6に比較して感染局所では感度の優れたサイトカインであると考えられた。

7. 羊水の細菌発育阻止作用の検討

図12に示したように、好気性菌GBSでは、いずれの妊娠週数の羊水も細菌発育阻止作用を示さなかった。好気性菌大腸菌では、妊娠16週、21週の羊水では細菌発育阻止作用は認められなかったが、28週の羊水から次第に細菌発育阻止作用は増

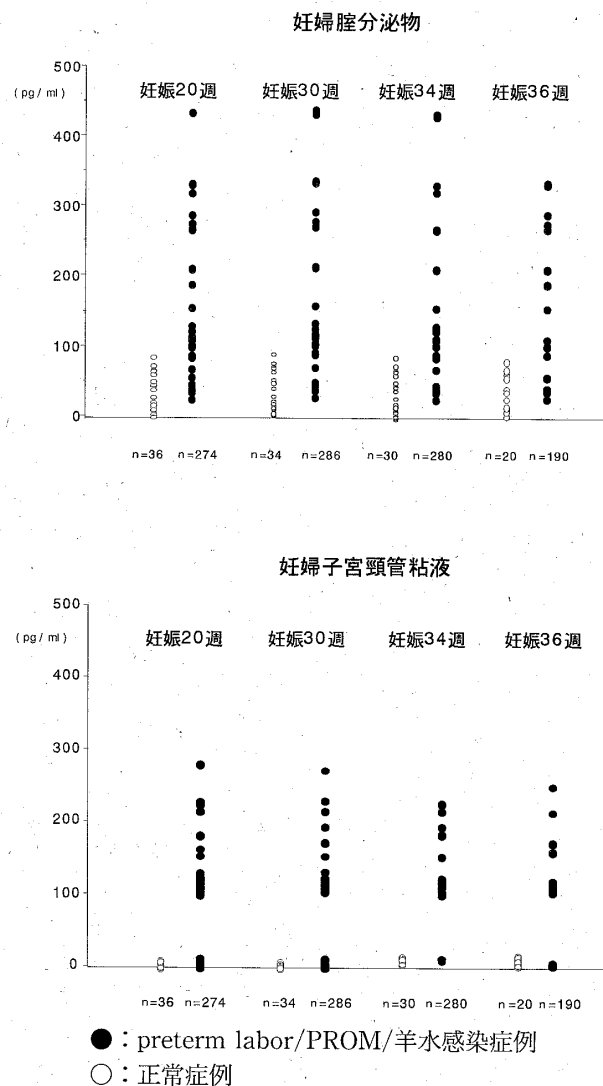


図8 妊婦腔分泌物・頸管粘液中のエンドトキシン濃度

強していた。嫌気性菌では、妊娠末期にしか羊水の細菌発育阻止作用は認められなかった。なお、加温すると、羊水の細菌発育阻止作用は増強される傾向にあった。

8. 実験感染モデルを用いた検討

図13に示したように、*P. bivia*などの嫌気性菌単独では、対照群に比較して、生存出生児数および妊娠期間に変化が認められなかったが、好気性菌の大腸菌や細菌性陰症の*G. vaginalis*と嫌気性菌との複数菌感染を惹起すると、生存出生児数の減少および妊娠期間の短縮が認められた。好気性菌単独、嫌気性菌単独の場合に比較して、嫌気性菌と好気性菌の複数菌感染によって早産率および死産率が上昇した、すなわち、病原性が高まった。

9. preterm labor を来した症例に対する抗菌薬の治療効果

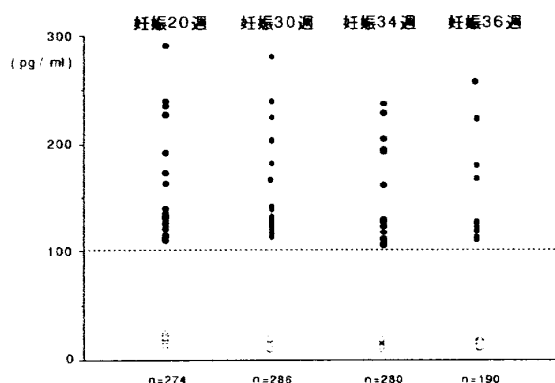
抗菌薬投与期間は、preterm labor を来してから塩酸リトドリンの投与を終了するまでで、9日から77日間、妊娠期間が延長されていた。今回の成績を一概に評価することは難しいかもしれないが、表3に示したように、嫌気性菌に抗菌力の弱

いアモキシシリン投与群では、無治療群にくらべて、妊娠期間の約1.5倍の延長という治療効果が認められた。嫌気性菌に強いクリンダマイシン投与群では、無治療群やアモキシシリン群よりも、妊娠期間の延長が認められた。併用投与群では、さらなる妊娠期間の延長が認められた。preterm labor では、嫌気性菌をターゲットにした抗菌薬で、妊娠期間の延長という高い治療効果が認められた。今回の結果から、preterm labor では、嫌気性菌をターゲットにしたものがよいが、好気性菌との混合感染の頻度も高く、単剤で治療するならば、第3世代セフェム薬、カルバペネム薬がよいと推察された²⁸⁾。

結 語

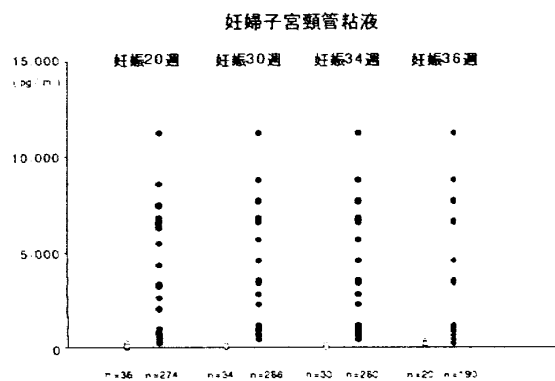
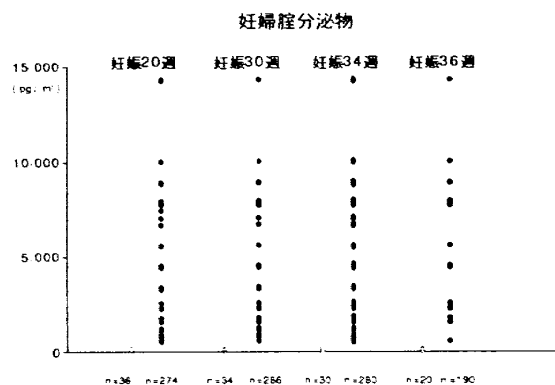
1. preterm labor/PROM の原因に嫌気性菌ならびに嫌気性菌と好気性菌との混合感染が重要な意味をもつ。

2. GBS は、簡易培地を用いて頸管粘液でスクリーニングするのがよい。コストベネフィットを



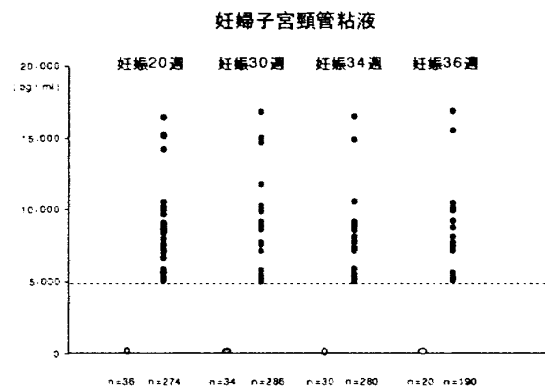
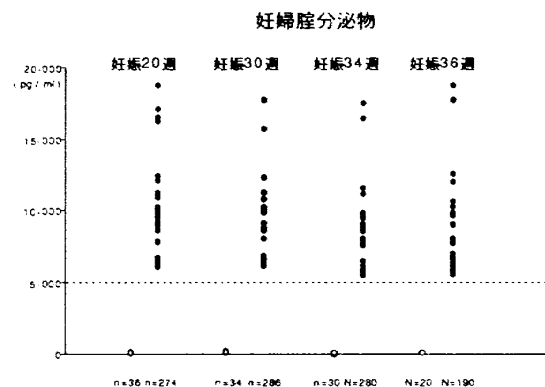
- : グラム陰性桿菌検出症例
○ : グラム陰性桿菌未検出症例

図9 preterm labor/PROM/羊水感染症例の子宮頸管粘液中エンドトキシン濃度



- : preterm labor/PROM/羊水感染症例
○ : 正常症例

図10 妊婦腔分泌物・頸管粘液中の IL-6濃度



- : preterm labor/PROM/羊水感染症例
○ : 正常症例

図11 妊婦腔分泌物・頸管粘液中の IL-8濃度

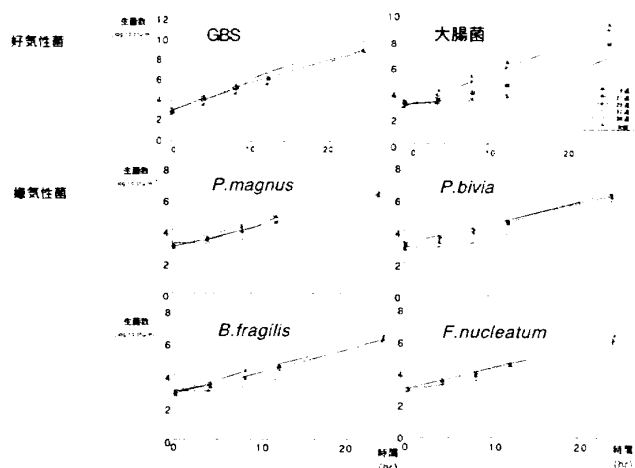


図12 羊水の細菌発育阻止作用

考慮した場合、GBS が検出され、GBS の抗体価が低い抗体がなければ、予防的に抗菌薬を投与した方がよい。また、GBS の抗体価の測定キットの開発が必要である。

3. preterm labor/PROM の細菌による病原性を知るのに頸管粘液中のエンドトキシン、IL-8 の測定が有用である。

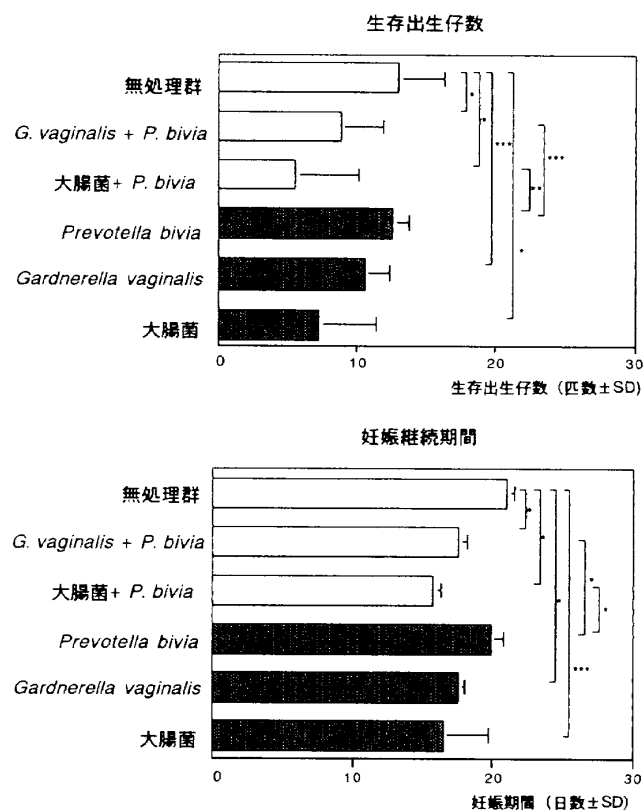
4. 羊水の細菌発育阻止作用は、菌種によって異なるが、嫌気性菌では preterm の後期の羊水においてのみ認められ、臨床的には、preterm における嫌気性菌には、十分留意する必要がある。

5. preterm labor/PROM の予防・治療に関しては、主に嫌気性菌をターゲットとした抗菌薬が有用である。

謝 辞

シンポジウムに発表の機会を与えて下さった第50回日本産科婦人科学会会長・矢嶋 聡教授、日本産科婦人科学会の諸先生方、ならびに座長の労をおとり頂いた東京大学医学部・川名 尚教授、名古屋大学医学部・森島恒雄教授に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたって、御指導頂きました岐阜大学医学部産科婦人科・玉舎輝彦教授、岐阜大学名誉教授・上野一恵教授、岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設・渡邊邦友教授に深謝致します。また、共同研究者である岐阜大学医学部産科婦人科・川添香子、佐藤泰昌、川端市郎、岐阜市民病院産婦人科・伊藤邦彦、揖斐総合病院産婦人科・和泉孝治、岐阜県産婦人科医会・小川威彦、花林康裕、渡辺 津、山岸敏浩の諸先生方の甚大なる協力に深謝致します。

なお、本研究の一部は、文部省科学研究費およびおぎやー



* $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.005$

図13 妊娠ラット羊水感染モデルを用いた病原性の検討

表3 preterm labor を来した症例に対する抗菌薬治療

	症例数	投与量 (日)	平均妊娠期間 延長日数 ±標準偏差(日)
アモキシシリン 投与群	30	750mg 分3	18.5 ± 4.2
クリンダマイシン 投与群	30	450mg 分3	25.4 ± 7.3
アモキシシリン・ クリンダマイシン 併用投与群	30	750mg 分3 450mg 分3	30.5 ± 5.2
抗菌薬無治療群	30	投与なし	12.0 ± 2.9

献金研究費補助金の援助を受けて実施した。

文 献

1. Mikamo H, Ito K, Tamaya T. Studies on the clinical implication of anaerobes, especially *Prevotella bivia* in obstetrics and gynecology. Acta Sch Med Univ Gifu 1994; 42: 230-248
2. Romero R, Mazon M. Infection and preterm labor. Clin Obstet Gynecol 1988; 31: 553-584
3. Romero R, Avila C, Sepulveda W. The role of systemic and intrauterine infection in preterm labor. In: Fuchs A-R, Fuchs F, Stubblefield PG, eds. Preterm Birth, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1993; 97-136
4. 三鴨廣繁, 川添香子, 佐藤泰昌, 玉舎輝彦. 1996

- 年度の岐阜大学医学部産科婦人科における細菌感染症の原因菌と静注用抗菌薬の使用状況. 新薬と臨床 1998; 47: 146—154
5. Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Ito K, Katoh N, Watanabe K, Ueno K, Tamaya T. Bacterial epidemiology and treatment of bacterial vaginosis. Chemotherapy 1996; 42: 78—84
 6. Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Watanabe K, Ueno K, Tamaya T. Comparative study on vaginal or oral treatment of bacterial vaginosis. Chemotherapy 1997; 43: 60—68
 7. McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK, Makowski EL. Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection. Am J Obstet Gynecol 1986; 154: 109—114
 8. Williams K, Phillips KD, Willis AT. A simple and sensitive method for detecting bacterial elastase production. Letters in Applied Microbiology 1988; 7: 173—176
 9. Takahashi K, Imai A, Tamaya T. Preterm labor and bacterial intraamniotic infection: arachidonic acid liberation by the action of phospholipase A2. Arch Gynecol Obstet 1984; 244: 1—6
 10. Khan AA, Imai A, Tamaya T. Possible mechanism for preterm labor associated with bacterial infection I: stimulation of phosphoinositide metabolism by endotoxin in endometrial fibroblasts. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1990; 69: 119—122
 11. Khan AA, Imai A, Tamaya T. Possible mechanism for preterm labor associated with bacterial infection II: enhancement of endotoxin-stimulated phosphoinositide metabolism by sex steroids in endometrial fibroblasts. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1990; 69: 123—126
 12. Lowry OH, Rosenbrough N, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265—275
 13. Imai A, Gershengorn MC. Measurement of lipid turnover in response to TRH. Method Enzymol 1986; 141: 100—111
 14. Rouser G, Siakotos AN, Fleisher S. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. Lipids 1966; 1: 85—86
 15. 三鴨廣繁, 川添香子, 佐藤泰昌, 玉舎輝彦. Group B *Streptococcus* 選択分離用培地 GBS 培地 F の検討. 産婦人科の世界 1997; 49: 129—132
 16. 保科 清, 門井伸暁, 仁志田博司, 兼子和彦, 松田静治. 新生児 B 群溶連菌 (GBS) 感染症の現状. 日産婦誌 1994; 46: 497—502
 17. 大江幸雄, 西山泰暢, 杉山明子, 清水聖一, 杉山正子. ELISA 法による B 群レンサ球菌型特異抗体の測定と臨床的意義. 感染症誌 1990; 64: 1251—1254
 18. Hoshina K and the GBS infection study group. Minimization of the number of pregnant women to be treated with preventive procedure against GBS infection by means of antibody measurement. Acta Paediatrica Japonica 1997; 39: 546—549
 19. Romero R, Roslansky P, Oyarzun E, Wan M, Emamian M, Novitsky TJ, Gould MJ, Hobbins JC. Labor and infection II: bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 1044—1059
 20. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casal D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 1097—1102
 21. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor: association with infection. J Clin Invest 1990; 85: 1392—1400
 22. Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. Cytokine 1993; 5: 81—88
 23. Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Tamaya T. Effects of long-term administration of roxithromycin on neutrophil count and interleukin-8 level in endometrial cavity subjected to pyometra. Chemotherapy 1997; 43: 148—152
 24. Mikamo H, Kawazoe K, Tamaya T. Effects of long-term/low dose clarithromycin on neutrophil count and interleukin-8 level in pyometra. Chemotherapy 1988; 44: 50—54
 25. Miller J, Michel J, Bercovici B, Argaman M, Sacks T. Studies on the antibacterial activity of amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol 1976; 125: 212—214
 26. Bobitt JR, Ledger WJ. Amniotic fluid analysis. Its role in maternal and neonatal infection. Obstet Gynecol 1978; 51: 56—62
 27. Mikamo H, Kawazoe K, Sato Y, Izumi K, Tamaya T. Therapeutic effects of new quinolone DU-6859a on polymicrobial infections in the newly designed model of rat uterine endometritis. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 131—133
 28. 三鴨廣繁, 川添香子, 佐藤泰昌, 早崎 容, 玉舎輝彦. 岐阜大学医学部産科婦人科におけるカルバペネム薬の使用状況. 新薬と臨床 1998; 47: 334—339

Abstract

It was demonstrated in the clinical and experimental evidence that mixed infections by aerobes and anaerobes, grown in the lower genital tract, play a major role in preterm labor/PROM (premature rupture of membranes). The level of endotoxin and interleukin-8 in the cervical mucus would be indicated for the prevention of preterm labor/PROM. Selective medium would be useful for the screening of Group B *Streptococcus* (GBS) detection. Preventive administration of anti-GBS agents should be limited in the case of the low or no level of antibody against GBS from the point of cost benefit. The development of the convenient measurement kit of antibody against GBS would be needed. The antibacterial activity of amniotic fluid against anaerobes was detected only in the late preterm, suggesting that anaerobes in the preterm amniotic fluid might be virulent. The antimicrobial agents which are mainly targeted to anaerobes are a choice of the prevention and therapy of preterm labor/PROM.
