

A. 周産期感染症に関する研究

一條元彦
川名尚
萩田幸雄
松田静治

1) 胎児、新生児の免疫系の発達過程ならびに感染防御機構に関する検討

新生児特に早産児では未熟な免疫能のため易感染性を示し、また感染も重篤化する。従って流早産児の免疫能を十分に知ることは、新生児の管理・治療に直結すると考える。

new NBT test により好中球機能を検討すると、27週以前では貧食能・殺菌能ともほとんど認められず、30週に至りわずかながら貧食能・殺菌能が認められるようになり、33週以降で貧食能は完成するものの殺菌能は正期産児に至っても成人に比べ劣っていることが判明した(図1)。

血清補体値を検討すると図2に示すごとく古典経路に属するClq, C4値は正期産児においても成人値の約半分と低下しており、32週未満ではさらに低値となった。またPROM症例においても補体量は増加しなかった。一方、別経路に属するFactor B, C3, Factor Hは正期産児において成人値の1/2-2/3であるものの、PROM症例では24週児においても高値を示し、新生児では外的刺激に主に補体系の別経路(主にC3)が反応することが明らかとなった。

ウイルス感染細胞を破壊し、ウイルス感染の際重要な役割を果たすNK活性は、正期産児でも成人に比べ有意に低下していたが、32週未満ではさらに有意な低下が認められた(図3)。IL-2添加によるAugmented NK活性は32週以降では成人と同様の増強が見られたが、32週未満では増強は見られるものの成人と比べると有意に低下しており、NK活性のturning pointは32週にあるものと考えられた。

mitogen刺激による抗体産生細胞の誘導は正期産児・早産児とも成人に比し有意に低値を示した(図4)。Staphylococcus Aureus Cowan I (SAC)刺激ではPWM刺激に比べIgM産生細胞の増加を認めたが、成人と比べると低値を示すにとどまった。

抗体産生をはじめ各種の細胞間の情報伝達を制御するサイトカイン産生能は図5に示すごとく、IL-1産生能は正期産児で成人と比べ有意に低下し、早産児ではさらに有意に低値を示した。IL-2産生能は正期産児で成人と有意な差を認めず、早産児では有意な増加を示し、BCGF産生能は正期産児で増加の傾向を、早産児では有意な増加を認めた。つまり、抗原刺激があったときに、まずinitiatorとして働くIL-1産生能が新生児では低い、主に細胞増殖に作用するIL-2、BCGFは新生児で亢進していることが判明した。

新生児の感染防御機構を考えるに、正期産児においても好中球機能、補体量、NK活性、抗体産生能とも成人に比べ低下しており、細菌感染、ウイルス感染いずれの防御機構も十分ではないといえる。さらに32週以前の早産児では正期産児と比べ、好中球機能やNK活性も低下し、また補体量や母体からのtransportによるIgG量も減少しており、感染防御機構が非常に低下していると考えられ、嚴重な感染予防処置が必要であると考えられた。

2) 単純ヘルペスウイルスに対するIgM分画抗体の測定

周産期の単純ヘルペスウイルス感染における感

染時期や感染経路を明らかにすることは新生児ヘルペス症の予防に必須である。このためには、母体の感染がいつおきたかを決定する必要がある。

一般に感染時期の決定は、不顕性感染の場合は至難であるが、一つの方法として、抗体の推移から逆算する方法が用いられている。風疹ウイルスの感染では、IgM分画の抗体を測定することによりこのことを可能にした。そこで、単純ヘルペスウイルスの感染でもこの方法が用いられるか否かを検討してみることにした。

IgM分画の抗体の測定は更に胎内感染の指標にもなり得るので本法の開発は周産期感染の解明に有力な方法となろう。

IgM分画の抗体の測定は種々行われているが、抗体測定法の感度がよいことが必要である。今回、Passive hemagglutination (PHA) 法を用いたキットが開発されたのでこれを用いてIgM抗体を測定を試みた。

材料と方法

a) 対象検体

22名の単純ヘルペスウイルスを分離して性器ヘルペスと診断した患者より計50検体の血清を採取した。ウイルスの分離は培養細胞株 Vero, R-66 のいずれかを用いた。採取した検体をこれらの培養細胞に接種し、CPE の出現をもって判定した。CPE の出現したものについては、ウイルスを採取し、または、ウイルス感染細胞を採取し中和法またはマウスモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法 (Micro-Trak Herpes, ダイシバ) により同定と型の決定を行った。

これらの患者より採血し、血清に分離した後、 -40°C に保存した。

b) 抗体測定法

① 間接赤血球凝集反応 (PHA)

Phassay-HSV (化血研製) を用いた。本キットは HSV 糖蛋白感作羊赤血球を用いた凝集反応で、反応時間が短く、感度のよいことが特徴とされている。稀釈した血清一滴を ($25\mu\text{l}$) と本血球けん濁液一滴をマイクロプレートの穴で混合し3時

間後に凝集像の有無で判定するという簡単な方法である。

② 微量中和反応 (MNT)

従来より簡便で特異性の高い方法として、我々が用いてきた方法で、100 TCD₅₀ の HSV 液、稀釈した血清、新鮮モルモット補体をそれぞれ一滴ずつ混合し一時間放置後 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した R-66 細胞一滴を加えた後に更に培養を続け4日後に染色して判定するものである。

結果

a) PHA の感度と MNT との相関

PHA の感度は大変良く、抗体価の高いものでは5万-10万倍に稀釈したのもでも陽性パターンが得られている。一方、MNT で5倍以下の陰性としていた10検体で、10-80倍の稀釈で陽性となったものが6検体あった。MNT との相関は0.778 の相関係数であった (図6)。

b) IgM 分画測定への応用

1:10に稀釈した血清を10%の黄色ブドウ球菌液 (アブソープ G, 化血研) と混合して、IgG を吸収し、残る抗体活性を測定した。

初感染と考えられる9例のうち6例は吸収前の値の4分の1以内でつまり IgM 分画の抗体の存在が示唆された。これに対し、再発を繰り返す例では、全例が吸収前に比べ16分の1以下に減少し、これらの抗体が IgG による可能性が示唆された (表1)。

考察

PHA は感度が良く短時間に結果が得られる優れた方法である。感度が良い点を利用することによってアブソープ G による吸収後の比較的低い抗体価である IgM 分画の抗体を検出することが可能となった。

本法の今後の検討課題としてアブソープ G により完全に IgG が吸収されているかどうか、IgM 以外の例えば IgA 分画の抗体の関与はないかなどが挙げられる。

この方法を胎内感染の指標に用いられるかどうかの検討も必要である。

これらについては次年度以降に行いたい。

3) 前期破水管理における上行感染予防法確立に関する研究

前期破水、特に pre-term に発症する前期破水は早産の主要な原因の一つであり、結果として呼吸促進症候群、脳内出血、動脈管開存など児未熟性に基づく疾患、あるいは肺炎、髄膜炎、敗血症など重篤な感染を招来する周産期における重要な疾患である。

児の未熟性を改善する唯一の方法は、可能な限り児の在胎期間を延長させることにあるが、発症後、時間の経過とともに感染の頻度が上昇する危険があり、未熟性と感染のリスクのはざままで本症の管理/治療方針に関して娩出策、待機策の相反するところで、今日にいたるもなお一定の基準はない。

最近、早産、前期破水の原因として絨毛羊膜炎、つまり感染が注目されている。したがって、前期破水は発症後はもちろんのこと、発症以前においても感染と深く関わっていることが示唆され、前期破水の管理の根幹は感染対策に尽きると云える。

この観点から、これまでに頸管留置カテーテルを創案、膣、頸管の持続消毒、羊膜腔内抗生物質投与方法などを試みてきたが、本研究では特に感染症の基本となる細菌学的検索法に関して検討を加えてみた。

材料と方法

大阪市立母子保健センターの外来を訪れた患者および入院中の妊婦計 108 人より得られた羊水、膣プール液など計 108 試料を無菌綿棒にて UT 培地^B(明治乳業)の両面に塗布する一方、同一検体を臨床検査所に菌種の同定を依頼した。

UT 培地は元来尿路細菌の診断用に開発されたものであり、slide dip 方式でスライド一面に総菌数判定用の CLED 培地、他面にはグラム陰性菌判定用の DC 培地を塗布され、3 × 7 cm の筒状容器に収納されている。

なお、比較検討のため培養された培地は、BTB

乳糖加血液寒天培地であった。

成績

UT 培地に試料を塗布した後、37℃の小型インキュベーターで培養し、18時間-24時間後、形成されたコロニーの数、形態、色調からチャートと比較し、菌種を判定した。

その結果、108 試料中 82 例 (76%) にコロニーが形成され、残り 26 例 (24%) は培養陰性であった (表 2)。

一方、乳糖寒天培地、血液寒天培地で培養された検体は 108 例中 33 例 (31%) が陽性で、残り 75 検体 (69%) は陰性であった。

UT 培地と血液寒天、乳糖寒天培地との細菌検出率の比較では、UT 培地陽性 82 検体中、後者の寒天培地でも陽性となったのは 30 検体 (37%) にすぎず、逆に UT 培地陰性 26 例中、後者の培地で陽性となったのは 3 検体 (12%) のみで、感度を計算すると血液、乳糖培地での 33/85 : 38% に対して、UT 培地では 82/85 : 96% となった。

検出菌株の比較では、血液、乳糖培地では細菌陽性例中、*Lactobacillus*, *Streptococcus facialis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* などが同定されたのに対して UT 培地では *Staphylococcus aureus* が 24 例と最も多く、次いで *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* が多く判定された (表 3)。

なお、UT 培地での判定と血液、乳糖培地との細菌の一致率は 17% (5/30) であった。

考察

産婦人科領域において感染症は諸疾患の病因として大きな意義を有するが、就中、前期破水の管理に際し、感染の有無、起炎菌、抗生物質の感受性の把握は児の予後を決定する重要な因子となる。

しかしながら、抗生物質投与の基礎となる細菌学的検索法に関しては採取より結果を得るまでの一定の期間を要し、抗生物質の選択に苦慮することが少なくない。

今回検討を加えた UT 培地は少なくとも 24 時間以内に細菌の有無、菌種の推定を行うことが可能

であることが明かとなり、前期破水時の細菌スクリーニング法としてその価値が認められた。

本法の利点は検体中の細菌を従来の方法より高率に検出し得る点にあり、この原因は検体採取より培養が著しく短縮されたことにあると云える。即ち、従来法では検体移送中に検体中の細菌活性が低下し、結果として陰性と報告される場合が少なくないことを意味する。加えて、血液寒天培地、BTB乳糖培地では *Lactobacillus* を少なからず検出したが、UT 培地では一例も判定されていない。乳酸菌は生理的陰常在菌であり、当初 UT 培地で多数育成するものと予測されたが、これは多分、培地条件がこれらの菌の増殖を抑制したものであり、UT 培地が非病原菌の選択培地として作動することが明らかとなった。したがって従来法の乳糖寒天培地では病原的意義の少ない乳酸菌をも生育させるので、今回の成績からこれらを除外すればさらに UT 培地の有用性が明確となる。

いずれにしても、UT 培地では短時間に、迅速に細菌の有無を判定し得るのみならず、菌種のおおよその判定も可能となるので、今後産科臨床、特に前期破水の管理に際し細菌のスクリーニング法としての価値があると認められた。

現在、本方式をさらに発展させ、周産期臨床で最も問題である B 群溶連菌 (GBS) の簡易スクリーニング法を開発中であり、これらの細菌学的検索手法を基にはじめに述べた羊膜腔内抗生物質投与方法を充実させ、頸管留置カテーテルを用いた前期破水の積極的管理法を確立したいと考える次第である。

なお、次年度に関しては Columbia CNA 培地、ならびに全色反応による GBS スクリーニング法、羊膜腔抗生物質投与方法とその臨床成績について検討を進める所存である。

4) 周産期感染症起炎菌に関する検討

周産期感染症の原因微生物は細菌、クラミジア、

ウイルス、カンジダなど各種のものがあり、妊産婦および胎児、新生児感染症に対する診断、予防を含めた治療対策の確立は重要である。

①妊婦の尿路感染症、産褥子宮内感染の起炎菌を過去 2 年間検討し、以前の成績と比較したが、好気性のグラム陰性桿菌、グラム陽性球菌、嫌気性菌 (球菌、桿菌) の分離頻度には明らかな差は認められなかった。

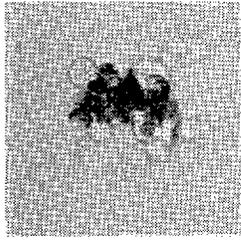
②胎児、新生児感染症の主役である羊水感染に果たす PROM (前期破水) の役割は大きい。破水後の羊水中細胞を 52 例で検討すると、大腸菌などグラム桿菌が約 60% の分離率であった。羊水中への細菌出現と腔内常在菌との関係については現在検討中である。

③羊水感染の予防、治療の基礎的実験として抗生物質の母児間移行を検討すると、羊水中への抗生物質の出現は母体血の抗生物質濃度のピークより遅延した。セフエム系 (7 種) において、臍帯血中移行濃度と羊水中移行濃度に関して薬剤別の特徴を明示しえないが、胎盤移行率と羊水中濃度の高いものが認められた。また羊水中濃度と羊水中細菌の最小発育阻止濃度 (MIC) との関係は大腸菌を対象に各種セフエム剤で調べると羊水中濃度は MIC を上回るという結果が得られた。

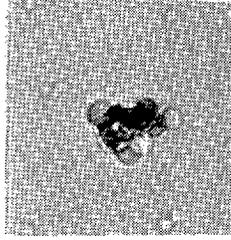
④近年、STD (性交による感染症) の増加が指摘され、*C. trachomatis* による新生児の結膜炎、肺炎など母児間の垂直感染が知られるようになったが、いまだにその実態に関しては不明な点が多い。

今回、妊婦の子宮頸管と児の結膜嚢を中心に *chlamydiazyme* を用いて *C. trachomatis* の検出を試みた。妊婦 183 例中 4.4% が C.T 抗原陽性のうち 2 例に結膜炎が発見されたほか、分娩時の検査で新生児結膜嚢内から 95 例中 4 例 (うち 1 例が結膜炎) であった。

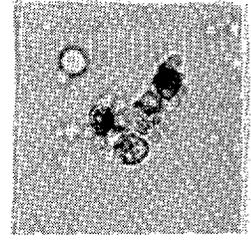
さらに、症例を追加し、血清抗体価なども測定する予定である。



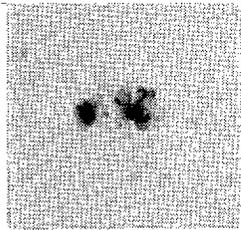
adult



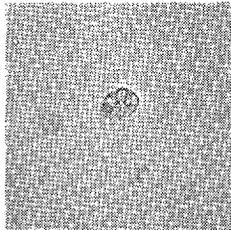
term



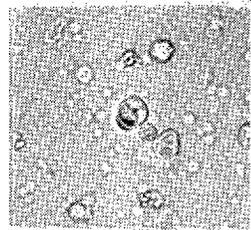
33rd 児



30GW 児



27GW 児



19GW 児

図1. 胎児新生児における好中球機能

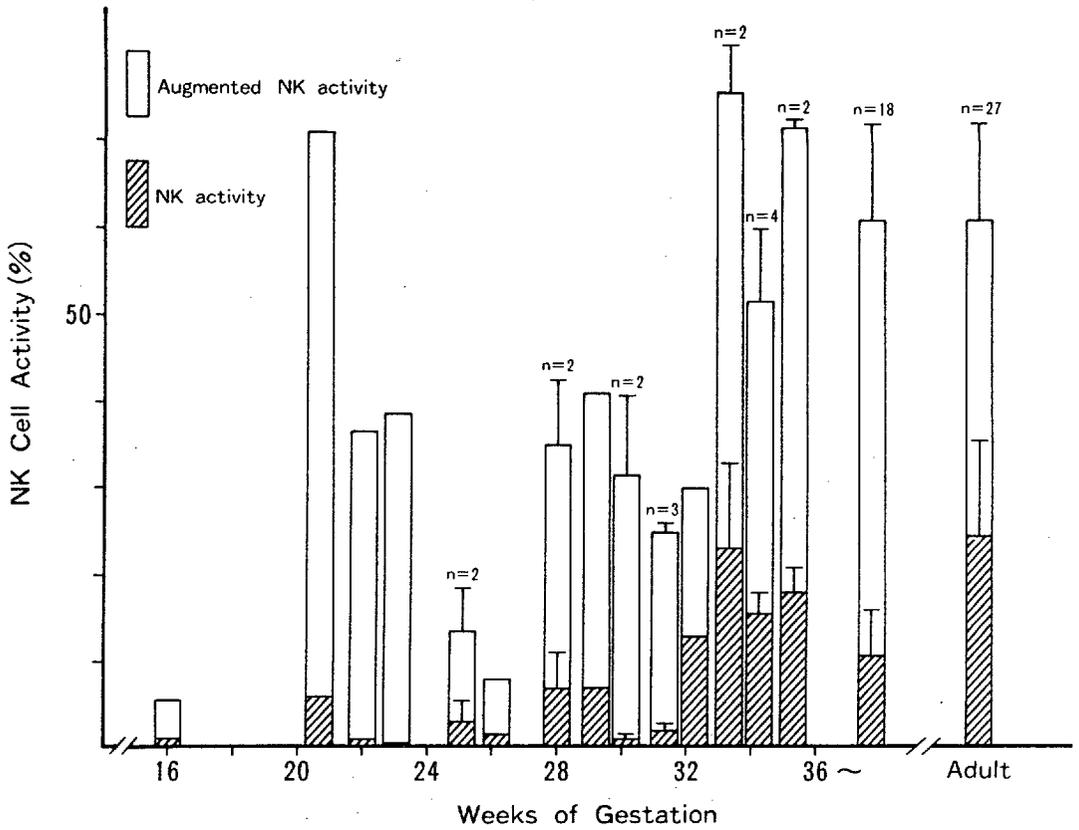


図3. 胎児新生児におけるNK活性およびIL-2によるAugmented NK活性

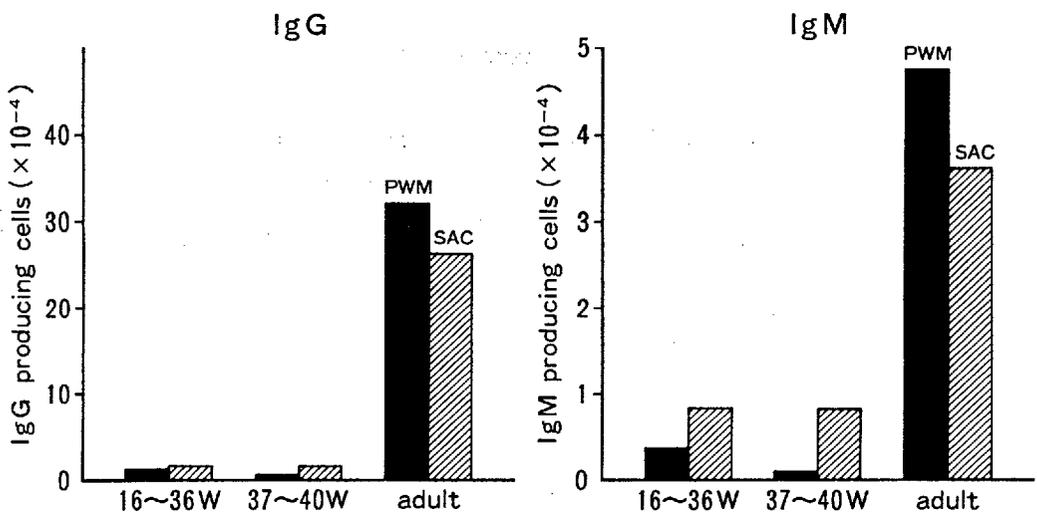
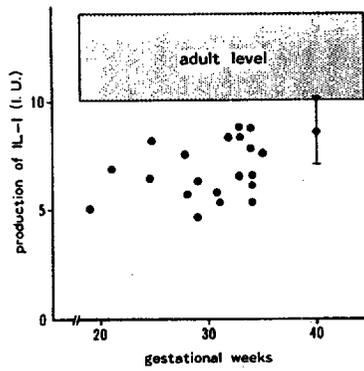
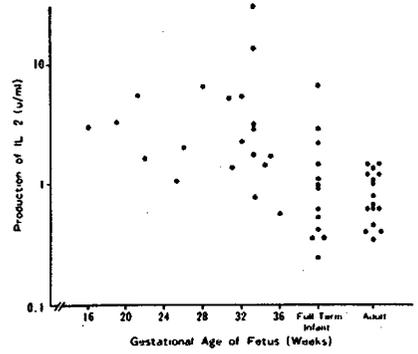


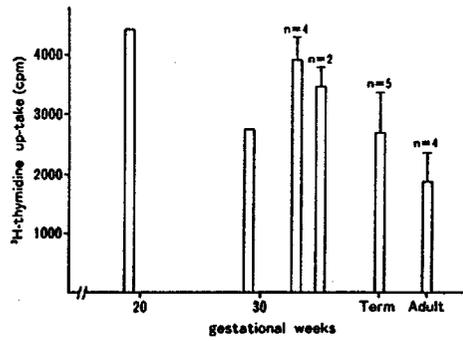
図4. 胎児新生児におけるmitogen刺激による抗体産生細胞の誘導



IL-1産生能



IL-2産生能



BCGF産生能

図5. 胎児新生児におけるサイトカイン産生能

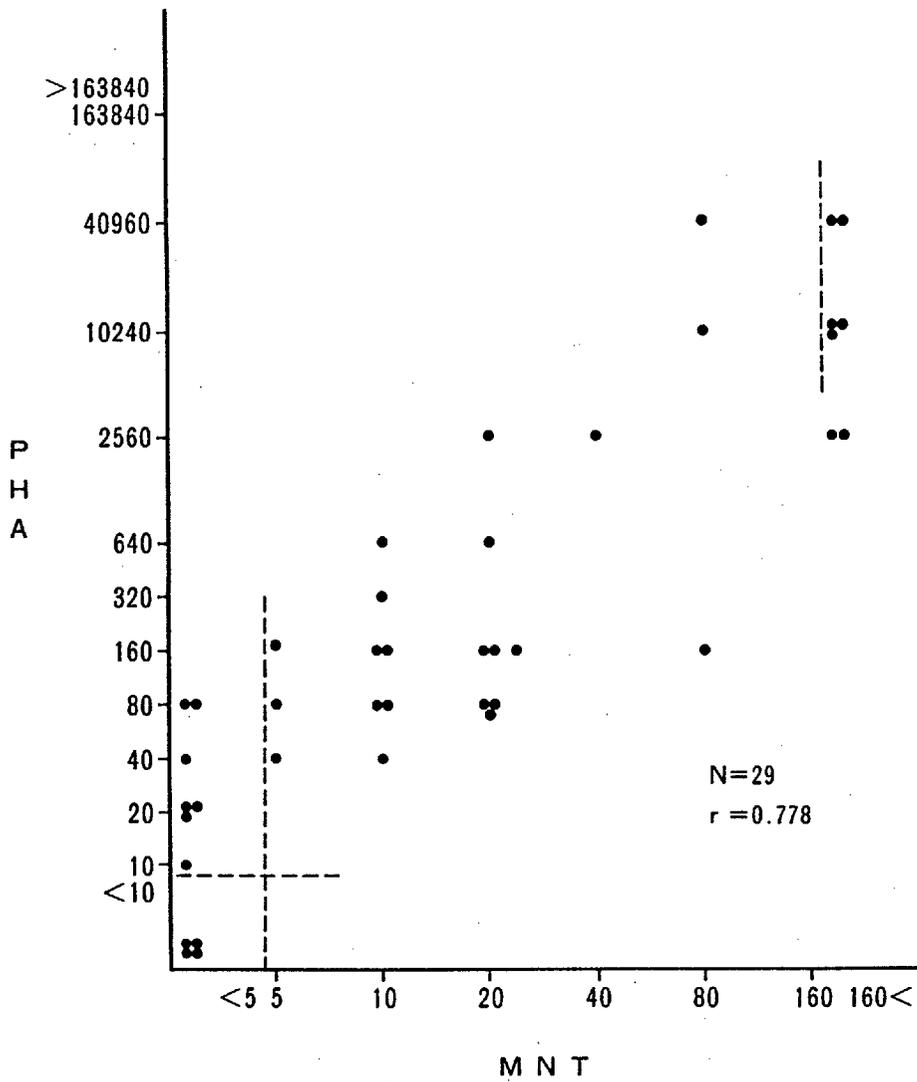


図6. PHAとMNTによる抗体価の相関

表1. Absorb G 吸収による抗体価の変化

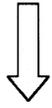
	名前	型	病日	吸収前	吸収後	比
急性	KH	2	19	80	160	2
	US	1	10	80	20	1:4
	KS	1	9	40960	10240	1:4
	TK	2	14	40	80	2
	NK	1	26	320	20	1:16
	TE	1	8	160	80	1:2
	TK	1	19	160	10	1:16
	TY	1	9	80	10	1:8
	UM	2	6	160	160	1
再発	HH	2		10240	640	1:16
	KS	2		163840	2560	1:64
	OY	2		2560	40	1:64
	KY	1		2560	40	1:64
	TY	2		163840	2560	1:64
	MM	2		40960	16	1:128
	SS	2		40960	2560	1:16
	KM	2		163840	2560	1:64
	HM	2		163840	2560	1:64

表2. UT 法ならびに血液寒天培地, BTB乳糖寒天培地における菌検出の比較

UT法	血液寒天	BTB乳糖寒天
陽性 82例	陽性 30 陰性 52	
陰性 26例		陽性 3 陰性 23
計 108例	計 108例	

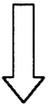
表 3. 検出菌の比較

UT法での判定		血液寒天 BTB乳糖培地での同定	
<i>S. aureus</i>	24	<i>S. faecalis</i>	9
<i>E. coli</i>	13	<i>S. epidermides</i>	5
<i>K. pneumoniae</i>	10	<i>S. aureus</i>	4



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



新生児の感染防御機構を考えるに、正期産児においても好中球機能、補体量、NK 活性、抗体産生能とも成人に比べ低下しており、細菌感染、ウイルス感染いずれの防御機構も十分ではないといえる。さらに 32 週以前の早産児では正期産児と比べ、好中球機能や NK 活性も低下し、また補体量や母体からの transport による IgG 量も減少しており、感染防御機構が非常に低下していると考えられ、嚴重な感染予防処置が必要であると考えられた。