

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05296

研究課題名(和文) バングラデシュの妊婦へのプロバイオティクス経口投与による出生体重と乳児成長の効果

研究課題名(英文) Promoting healthy fetal and post natal growth by modulating vaginal or gut microbiota with supplementation of prebiotic agent in pregnant women

研究代表者

我妻 ゆき子 (Wagatsuma, Yukiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40400676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000 円

研究成果の概要(和文)：低出生体重は重要な公衆衛生的問題である。低出生体重の影響は生涯に渡り、生活習慣病発生に関連する。泌尿生殖器感染症が低出生体重の要因として知られている。正常細菌叢の維持が種々の感染症予防に有用なことは知られているが、胎児成長や出生体重への影響については報告がない。そこで本研究では、妊婦にプロバイオティクス補填することが、泌尿生殖器感染症を予防し胎児成長を促して、出生体重や乳児の成長に効果があるか、明らかにすることを目的とした。試験薬群とプラセボ群で低出生体重児の割合には統計学的に有意な差はみられなかった。しかし、妊娠期の体重増加は9.9kgと推奨されるレベルに増加していた。

研究成果の概要(英文)：Low birth weight (LBW) is one of the most important public health issues. LBW affects throughout life-span relating to chronic diseases. Genitourinary infections are known to cause LBW. The maintenance of normal microbiota prevents various infections in human. However, it is unknown that it also affects fetal growth restriction. Therefore, this study aimed to examine the effect of daily supplementation of prebiotics during pregnancy and assess birth outcomes in Bangladesh. There was no observed difference in birth weight between intervention and placebo groups. However, notable improvement in weight gain during pregnancy was observed.

研究分野：臨床疫学、小児科学

キーワード：医療・福祉 小児科 社会医学 栄養学 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

胎児期の発達成長は、その後の人のライフサイクルに影響を及ぼす最も重要なものである。出生体重は乳幼児生存の予測因子である。低出生体重とは WHO の定義で 2500 g 以下であり、早産 (37 週未満) と胎児発育不全が原因である。低出生体重は、母親の年齢、感染、喫煙、早産歴、低所得など、さまざまな危険因子との関連が明らかになっている。

世界のすべての出産の 15%、2,000 万人以上が低出生体重児であり、そのうち 95% は途上国の子供たちである。途上国の低出生体重児の割合は 16% と、先進国の 7% の 2 倍以上である。またその半数以上がインドやバングラデシュなどの南アジア諸国からであり、4 人に 1 人は低出生体重児である。世界保健機関 (WHO) は、低出生体重児が 15% 以上、また胎児発育不全が 20% 以上は、公衆衛生学的危険度が高く、緊急に何らかの改善のためのアクションを求めるレベルとしている。また、胎児疾病起源説によると、胎児期の栄養不全が成人後の循環器疾患や糖尿病などの慢性疾患の発生や重症度に影響を及ぼすとしている。この説は、特に途上国で胎児期の栄養不全が蔓延する国々にとって、重要な意味を持っており、早期に何らかの改善に向けた介入が必要である。本研究の申請者らは、バングラデシュにある国際医学研究機関 (国際下痢症研究センター; ICDDR,B) とともに、小児の感染症や栄養問題に対する介入研究を実施してきた。また、ユニセフとともに妊婦に対して栄養補填プログラムを実施し、どのような補填が有効であるか乳幼児アウトカムにて発表してきた (Persson et al, 2012)。

低出生体重児予防の介入としては様々なものが施行されている。一般的には、妊婦健診を充実させ、またハイリスクグループへのソーシャルサポートを向上させてゆこうというものである。しかし、このようなマルチコンポーネントアプローチだけでは、なかなか大きなインパクトとなっていないのが現状である。また、妊婦の栄養補填介入試験にしても、結論が出ていないのが現状である。ビタミンなどマイクロニュートリエント補填については、13~15 種類を含む補填による介入が行われたが、介入群で出生体重の減少が見られたなど難しい問題があり、さらなる研究が必要とされている。

そのような状況下で、近年、泌尿生殖器感染症 (genitourinary infection; GU 感染症) が途上国ばかりでなく、先進国でも低出生体重に影響を及ぼしていることが明らかとなった。メタ解析で、無症状の細菌尿 (尿路感染症) の治療は早産や低体重を予防することが示され、膣内から子宮へ生殖器を上向する感染症の存在に注目が集まっている。このような感染の早期治療が低出生体重予防に効

果を示すことは大いに考えられるが、一度治療しても、何回も再感染を繰り返すこともあり、その治療効果には限界がある (Bradshaw et al, 2006)。また、臨床試験でも妊娠早期 (12 週未満) でなければ効果がないことが示された。GU 感染者は世界で 10 億人おり、内因性または性感染症によるもので、15-45 歳の 40% が感染しており、先進国を含め広く地理的に分布している。途上国では 70% が無症状と報告されている。GU 感染の多くは尿路系病原性の大腸菌によるものと、真菌 (*Candida albicans*) によるものが多い。細菌性膣炎 (Bacterial vaginosis; BV) は、不特定の細菌による疾病で、常在の乳酸菌 (*Lactobacilli*) の減少とその他の感染菌の増加が特徴である。バングラデシュの先行研究では、有病率が 28% と報告された。注目すべきなのは、早産であった妊婦では BV が 73% と大変高かったということである。尿路感染症もまた妊婦に高頻度に発生するものである。バングラデシュの先行研究では、有病率は 44% と報告され、特に妊娠後期では 78% と高くなっていた。

近年、偏利共生生物的な微生物相 (microbiota) の感染防御的役割が注目されている。乳酸桿菌はいまでは健康促進させるものとして高く評価されている。正常では酸性の膣内では乳酸桿菌が優勢で、 $10^8 \sim 10^9$  個存在し、過酸化水素を産生し病原性細菌を抑制している。臨床研究にて、BV の妊婦では劇的に乳酸桿菌が減少していることが報告されている。いくつかの因子が乳酸桿菌数に影響を及ぼすが、抗生物質は大きく減少させることが知られている。

胎児は正常の子宮内では無菌状態である。新生児は、分娩時に膣内液を飲み込む際に、自身の細菌叢を初めて獲得することになる。膣内細菌叢と腸内細菌叢はほぼ同様であり、乳児の腸内細菌叢はその母親の腸内細菌叢を模倣することになる。近年、この早期腸内細菌叢の異常が、その後の疾病発生に関与しているというエビデンスが多く報告されている。妊婦への補填により腸内細菌叢を調整し、新生児の獲得細菌叢を調整できれば、胎児や乳児の成長を改善することができるかもしれない。近年、プロバイオティクスによる腸内細菌叢改善効果は世界の注目となっている。本研究では、受精から乳児期までという発達成長にとってクリティカルな時期に、母親の腸内細菌叢の改善方法を明らかにし、胎児成長を促し低出生体重児を減らすことに焦点あてている。すでに先行研究で、膣内環境の改善が経口投与にて明らかになっている fructooligosaccharide を使用するが、胎児成長や出生体重といった公衆衛生的アウトカムに関するエビデンスを示すことができれば、適応拡大も視野に入れることができると思われ、多くの製品や健康プロモーションにつなげて行くことができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、fructooligosaccharide をバングラデシュの妊婦に毎日投与し、腸内及び膣内の細菌叢が乳酸桿菌とともに改善し、細菌性膣炎 (BV) や尿路感染症 (UTI) などの泌尿生殖器感染症を抑制し、早産や低出生体重を減少させるかどうかを明らかにすることを目的とする。さらに生後 6 か月までフォローアップし、乳児の正常細菌叢獲得や成長発達に影響を及ぼすかどうか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 調査国と地域

調査実施国は、低出生体重児の割合が世界で最も高い国の一つであるバングラデシュである。本研究は、バングラデシュの首都ダッカにある国際医学研究機関である国際下痢症研究センター (ICDDR,B) との共同研究にて実施された。ダッカ近郊の Nandipara が調査地域であった。人口は約 65,000 人であり、予備調査では、年間約 1,600 の出生があった。ICDDR,B は、そこでコミュニティクリニックを運営し、ヘルスワーカーが家庭訪問活動を含め、プライマリヘルスケアを地域住民に提供している。

### (2) 初回クリニック訪問

問診票により、妊娠歴と経過、喫煙歴、食習慣、社会経済指標など、低出生体重のリスク要因についてデータ収集した。妊婦の身長と体重を計測した。3ml の末梢血を採取し、ヘモグロビン、血液型、VDRL テストを行った。中間尿を採取し、ルーチンの尿顕微鏡検査と培養を行った。血液、尿検体は ICDDR,B の検査室に搬送され検査が行われた。膣内検査棒 (COPAN Innovation, Italy) による検査はすべて女性の医師によって実施され、Nugent スコアにより細菌性膣炎 (BV) の診断がなされた。Nugent スコアは菌の形状と数によって、10 段階にスコアリングするもので、7 以上は BV とされた。クリニック担当医師は選択基準と除外基準を確認した。選択基準としては、1) 18-35 歳で、2) 無月経期間 6-12 週、3) 早朝尿妊娠検査陽性とした。除外基準としては、重度の貧血、ハイリスク分娩歴、不正出血、生殖器外科手術を受けた人、尿路感染症が初回クリニック訪問時に診断された者及び Nugent スコア 7 以上で細菌性膣炎と診断された人とした。ICDDR,B の独立統計家によりランダム割り付けコードが発行され、封筒セットにて保管され、試験薬とプラセボに割り付けられた。試験薬とプラセボは色、形状やにおいなどなるべく同等に調整され、バイアルについているランダム番号のみが認識番号となった。本研究は、Good Clinical Practice (ICH-GCP) 基準 (欧州共同体、1991) に準拠して実施された。

### (3) 妊娠 12 週クリニック訪問

医師が身体所見、身長、体重、血圧測定、問診を行った。参加者は医師からの説明の後、割り付けコードに従い、試験薬 6g/日もしくはプラセボ薬を受け取った。1 日 1 回、摂取することを依頼した。毎日、ヘルスワーカーが家庭訪問して摂取を確認した。

### (4) 妊娠 18 週クリニック訪問

妊婦健診、体重測定、膣内棒検査 (Nugent スコア) を実施する。早朝中間尿を採取、ICDDR,B のラボにて顕鏡、培養検査を実施した。試験薬摂取コンプライアンスを記録した。バングラデシュのガイドラインで妊婦への補填が推奨されている鉄と葉酸剤の配布を開始した。BV と診断された妊婦に対して clindamycin の 2% 膣用クリームを 3 日間処方し、コンプライアンスを確認した。

### (5) 妊娠 30 週クリニック訪問

妊婦健診、体重測定を実施した。膣内棒検査 (Nugent スコア) と早朝中間尿による顕鏡、培養検査を実施した。試験薬摂取コンプライアンスを記録した。指採血 (0.5ml) にてヘモグロビン値を検査 (HemoCue Inc, Sweden) した。新鮮便を採取しすぐに ICDDR,B のラボに搬送し、乳酸桿菌とビフィズス菌の培養を行った。また便の細菌数カウントを FISH 法 (Fluorescent in situ hybridization method) にて実施した。

妊娠経過はすべての妊婦健診時に記録する。BV 以外の疾患で病院での治療が必要な際には、病院にての治療につなげ、治療経過をフォローした。予定日の 2-3 日前、もしくは破水した際には、病院もしくは近隣のマタニティクリニックでの分娩につなげ、ヘルスワーカーが分娩施設を訪問し、経過をフォローした。

### (6) 出生後 1-2 日クリニック訪問

出産が報告されると、研究チームが分娩施設にて、出生記録と体重計測 (新生児用計測機器、精度 50g) を行った。72 時間以内の計測にて 2500g 以下を低出生体重とした。胎児発育不全は、WHO の定義に従い、在胎週数と性別ごとの値で 10 パーセンタイルより小さいものとした。出生時の関連イベントを記録した。鼻孔部と会陰部より検査棒で検体採取し、また新生児初回便を採取し、それらから乳酸桿菌とビフィズス菌量を検査した。

### (7) 乳児フォローアップ

バングラデシュのガイドラインに従い、出生時、3 日、7 日、30 日後に乳児健診を実施し、その後は 90 日と 180 日後にフォローアップを行った。数は少ないが家庭分娩も存在するため、その際には医師が 3 日後と 7 日後に特に感染症や敗血症の兆候について確認し、必要であれば病院に搬送し治療経過をフ

フォローした。フォローアップ時に、新鮮便と会陰部の検査棒検体を採取し、乳酸桿菌とビフィズス菌量を検査した。母乳栄養、離乳食栄養の時期と質について問診を行い記録した。乳児用体重計 (Tanita Co, Japan)、身長計 (Stadiometer, Chasmores, UK) にて計測し、WHO 標準値にて z-score を算出した。

#### (8) 評価項目

主要評価項目は、低出生体重の減少で、二次評価項目は、1) 膣・腸内細菌相での LAB (妊娠 12, 18, 30 週)、2) 尿生殖器感染症 (妊娠 12, 18, 30 週) と 3) 乳児成長であった。

#### 4. 研究成果

妊娠 12 週までの妊婦 300 人が候補者としてリストされた。そのうち 66 人は参加不同意にて、234 人がスクリーニングされた。さらに 24 人は Nugent スコア陽性、尿路感染症などにより除外された。最終的に、210 人の妊婦が登録され、試験薬群とプラセボ群にランダム割り付けられ、6 カ月間の投与が行われた。研究参加後、7 人が流産、29 人が調査地外に移住、5 人が同意撤回となった。よって、出生後 180 日までフォローアップを終了したのは 169 人であった。本報告書では、介入試験グループコードを開示せずに実施した解析の結果について報告する。

妊婦の平均年齢は 25.0 歳 (SD 4.0)、Body Mass Index は 21.1 (SD 3.3) であった。試験薬群とプラセボ群にて、妊婦の年齢、Body Mass Index (BMI)、教育歴、世帯収入に有意な差はなかった。妊娠経過中の体重増加について、2 群間に比較したところ、妊娠 13 - 18 週、18 - 24 週、24 - 30 週、30 - 36 週にて有意な差はなく、妊娠期の全体重増加についても有意な差はなかった。72% が経膣分娩、28% が帝王切開であった。

介入試験グループコードを開示せずに、プライマリアウトカム (出生体重) について解析を行ったところ、2 群間には統計学的に有意な差はなかった (2790g vs 2800g)。ほとんどすべての乳児 (99%) は母乳栄養であり、71% が 6 か月まで母乳栄養を継続していた。6 か月乳児の平均体重は、7.1 kg (SD 0.86) であり、この値は WHO の標準値 (7.93 kg) に近いものであった。出生後から 6 か月間の乳児体重増加でも有意な差はなかった (4.36 vs 4.18 kg)。

本研究は、妊娠初期における経口投与の、妊娠アウトカムと乳児成長への影響を評価する community-based randomized controlled trial である。試験薬群とプラセボ群で低体重児の割合は 15% と 18% と統計学的な有意差はみられなかった。しかし、妊婦の体重増加が正常なものに改善したことは

注目に値する。本研究で示された 9.9 kg の体重増加は推奨される値に近く、バングラデシュで報告されている 6.0 kg (Islam et al, 2006) よりもかなり改善している。これが試験薬とプラセボを融解するのに使用した isotonic solution 摂取の影響を受けたかについては不明であるが、下痢症の罹患率が高いこの地域において、検証する意義がある。試験薬に対するコンプライアンスが非常に高かったことも注目に値する。

結論として、バングラデシュの妊婦での出生アウトカムには影響を及ぼさなかった。セカンダリアウトカム (尿生殖器感染症 / 便検体中の乳酸桿菌・ビフィズス菌) についての解析を進めているところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文] (計 1 件)

1. Ferdous F, Rashid MH, Ma E, Raqib R, Hamada H, Wagatsuma Y. Fetal growth restriction in rural Bangladesh: a prospective study. Trop Med Health. 2018 Feb 6;46:3. doi: 10.1186/s41182-018-0083-z. 査読有.

##### [学会発表] (計 12 件)

1. Ferdous F, Raqib R, Wagatsuma Y. Early pregnancy nutritional status and estimated fetal weight: observation from a Bangladesh cohort. Global Health 2017, Hongo Campus, University of Tokyo, Tokyo, Japan, November 24-26, 2017.
2. Ferdous F, Ahmed S, Das SK, Chisti MJ, Nasrin D, Kotloff KL, Levine MM, Nataro JP, Ma E, Muhsen K, Wagatsuma Y, Ahmed T, Faruque ASG. Pneumonia deaths in young children. Tsukuba Global Science Week 2017, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, September 25-27, 2017.
3. Ferdous F, Ma E, Ahmed S, Raqib R, Wagatsuma Y. Small size of kidney and blood pressure of Bangladeshi children. The World Congress of Epidemiology 2017(WCE2017), Sonic City Convention Center, Saitama, Japan, August 19-22, 2017.
4. Ferdous F, Rashid H, Ma E, Ahmed S, Raqib R, Wagatsuma Y. Respiratory function in children relates to chronic malnutrition trajectory: birth cohort study in Bangladesh. The

27th Annual Scientific Meeting of the Japan Epidemiological Association, Bell Classic Kofu, Kofu, Yamanashi, Japan, January 25-27, 2017.

5. Ferdous F, Rashid H, Ma E, Ahmed S, Raqib R, Wagatsuma Y. Lung function at preadolescence in low birthweight children in Bangladesh. The 31st Annual Meeting of the Japan Association for International Health, Kurume City Plaza, Kurume, Fukuoka, Japan, December 3-4, 2016.
6. Ferdous F, Rashid H, Ma E, Raqib R, Wagatsuma Y. Maternal malnutrition, prenatal growth, and renal size of Bangladeshi children. Presented at the International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2016, Brisbane, Australia, September 18-22, 2016.
7. Wagatsuma Y, Ferdous Y, Rashid H, Arifeen SE. Fetal Growth in Bangladesh. The International Congress of Tropical Medicine and Malaria 2016, Brisbane, Australia, September 18-22, 2016.
8. Ferdousi F, Sultana S, Ma E, Sarker SA, Wagatsuma Y. Maternal supplementation of prebiotics to promote healthy fetal and post-natal growth. Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology. Tsukuba, Japan, February 23-24, 2016.
9. Ferdousi F, Sultana S, Ma E, Sarker SA, Wagatsuma Y. Promoting healthy fetal and post-natal growth with supplementation of prebiotics in pregnant women. The 26th Japan Epidemiological Association Meeting, Yonago, Japan, January 22, 2016.
10. Sarker SA and Wagatsuma Y. The role of Pro- and Prebiotic agents in the treatment and prevention of infectious diarrhoea in children. Mini-symposium of Challenges against poverty, malnutrition and infectious diseases. The 30th Japan Association for International Health Congress 2015, Kanazawa, Japan, November 22, 2015.
11. Faruque ASG and Wagatsuma Y. Changing childhood malnutrition in Bangladesh. Mini-symposium of Challenges against

poverty, malnutrition and infectious diseases. The 30th Japan Association for International Health Congress 2015, Kanazawa, Japan, November 22, 2015.

12. Wagatsuma Y. Poverty, climate change and fetal growth. Mini-symposium of Challenges against poverty, malnutrition and infectious diseases. The 30th Japan Association for International Health Congress 2015, Kanazawa, Japan, November 22, 2015.

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

我妻 ゆき子 (WAGATSUMA, Yukiko)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40400676

##### (2) 研究分担者

馬 恩博 (MA, Enbo)  
福島県立医科大学・健康増進センター・准教授  
研究者番号：00590770

##### (3) 研究分担者

福島 敬 (FUKUSHIMA, Takashi)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：30323299

##### (4) 研究分担者

須磨崎 亮 (SUMAZAKI, Ryo)  
筑波大学・医学医療系・客員教授  
研究者番号：40163050