

LAMP 法によるウレアプラズマの
迅速な検出法の開発

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系小児科学専攻

不破 一将

修了年 2018 年

指導教員 細野 茂春

目次

1.	概要	・ ・ ・ ・ 1
2.	緒言	・ ・ ・ ・ 4
3.	対象と方法	・ ・ ・ ・ 15
4.	結果	・ ・ ・ ・ 21
5.	考察	・ ・ ・ ・ 24
6.	まとめ	・ ・ ・ ・ 27
7.	謝辞	・ ・ ・ ・ 28
8.	表	・ ・ ・ ・ 29
9.	図	・ ・ ・ ・ 36
10.	図説	・ ・ ・ ・ 43
11.	引用文献	・ ・ ・ ・ 45
12.	研究業績目録	・ ・ ・ ・ 56

1. 概要

背景と目的

早産の原因は様々であるが、特に在胎 32 週未満の早産児の約 50%に絨毛膜羊膜炎が存在する。従ってそのコントロールは早産の予防に重要と考えられている。絨毛膜羊膜炎の起因菌のひとつであるウレアプラズマは、炎症性サイトカインの産生を介して母体の破水、流早産、新生児の慢性肺疾患、脳室内出血、壊死性腸炎の原因となる。ウレアプラズマはβラクタム系抗菌薬に耐性であり、適切な抗菌薬の投与には正確な診断法が重要である。現在、ウレアプラズマの検出には、培養法と PCR 法が一般的である。しかし、培養法は、操作が煩雑で判断に熟練を要し、また迅速性に乏しい。したがって、ウレアプラズマの検出法は PCR 法が一般的である。しかし、Universal primer を用い 16SrRNA を増幅後にシーケンス解析で同定する方法は高価である。一方、ウレアプラズマに特異的なプライマーを用いる方法は、迅速だが操作が煩雑で、臨床医が実務と並行して行うのは困難である。我々は、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いてウレアプラズマを検出する方法を開発した。

方法

Ureaplasma. parvum (*U. parvum*) と *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) にそれぞれ特異的な *ureaseB* 遺伝子を増幅する LAMP 法の 6つのプライマ

ーを作製した. *U. parvum* の 4 つの株, *U. urealyticum* の 5 つの株, ウレアーゼを有するまたは腔の常在する 14 の細菌でそれらのプライマーを評価した. 46 人の妊娠経過に特に異常のない妊婦の腔スワブサンプルを用いて LAMP 法, 培養法および PCR 法を比較した.

結果

U. parvum に対する LAMP 法のプライマーは, 4 つの *U. parvum* の株すべてを検出可能であった. *U. urealyticum* に対する LAMP 法のプライマーは, 5 つの *U. urealyticum* の株すべてを検出可能であった. それらのプライマーは, 14 の細菌に対し交差反応を認めず, 検出感度は 100 copies/reaction で PCR 法と比べ 100 倍優れた感度であった. 46 人の妊婦における培養法, PCR 法および LAMP 法によるウレアプラズマの検出頻度は, それぞれ 26.1% (12/46), 17.4% (8/46), and 26.1% (12/46)であった. 培養法を対照とし LAMP 法の感度, 特異度, 陽性的中率および陰性的中率は, 100% (12/12); 100% (34/34); 100% (12/12) および 100% (34/34)であった. 一方, PCR 法の感度, 特異度, 陽性的中率および陰性的中率は, 66.7% (8/12); 100% (34/34); 100% (8/8)および 89.5% (34/38)であった.

結論

LAMP 法によるウレアプラズマの検出法は, 培養法および PCR 法より優れ

ていた. LAMP 法によるウレアプラズマの迅速な検出により正確な診断し適切な抗菌薬が可能となる. ウレアプラズマによる絨毛膜羊膜炎に対する適切な介入が周産期予後の改善につながる可能性がある.

2. 緒言

近年、周産期領域における医療技術の進歩は目覚ましく、特に我が国における妊産婦死亡率、新生児死亡率は世界的にもっとも低値となっている。一方、我が国を含む先進国では出生数が減少傾向すると同時に、女性の高等教育と社会進出による結婚年齢の上昇、ひいては高齢出産の増加、さらに生殖補助医療の進歩による多胎妊娠の増加やいわゆるモデル体型を理想とする痩せブームなどにより早産児、低出生体重児の出生率が増加している。早産の原因は、様々であるが、前置胎盤からの出血、常位胎盤早期剥離、胎児機能不全、子宮内胎児発育遅延、母体疾患（妊娠高血圧症候群、HELLP 症候群、局所あるいは全身感染症など）などが重要である。特に、32 週未満の早産児の約 50%において絨毛膜羊膜炎（Chorioamnionitis: CAM）が存在するとされ、¹ CAM のコントロールが早産予防に重要である可能性が高い。しかし、CAM の原因は多岐にわたり、出生前の起因菌の同定や有効な抗菌薬の決定が難しいことから、明らかな感染徴候のない切迫早産に対する予防的抗菌薬投与は推奨されない。

CAM の起因菌のひとつであるウレアプラズマは、他にも流早産・破水・死産・新生児の種々の合併症との関連が示唆されるが、感染者が非常に多く、無害な常在菌の一つとする考え方もある。

<ウレアプラズマの分類>

ウレアプラズマ属細菌 (*Ureaplasma species*, 以下 *U. spp.*と訳す) はマイコプラズマ科に属し最も小さな自己複製能を持つ微生物である。細胞壁がないのでβ-ラクタム系抗菌薬に自然耐性を示す。以前は *Ureaplasma urealyticum* の1種1属で、表現型や遺伝子型の違いにより14の血清型に分けられていたが、2002年以降遺伝子型の違いにより *Ureaplasma urealyticum* (血清型 2, 4, 5, 7-13) *Ureaplasma parvum* (血清型 1, 3, 6, 14) の2種に再分類された。²

<ウレアプラズマの疫学>

ヒトにおいて *U. spp.* は性交渉により感染し、無症状のまま泌尿生殖器に常在する細菌であるが、男性の非淋菌性尿道炎の起因菌となることが少なくない。女性では尿、膣から検出される。子宮頸管と膣分泌物の培養から妊娠可能な女性では72.1%、妊婦では72.3-82%で *U. spp.* が検出されるという報告がある。³⁻⁷

<ウレアプラズマの母体への影響>

膣や胎盤からの *U. spp.* の検出はCAM、流早産、前前期破水 (Preterm Premature Rupture of Membrans: pPROM) に関連があるとされる。難波らは、32週未満の流早産児の胎盤では約42%で *U. spp.* を検出し、*U. spp.* 陽性胎盤

の 83%で CAM を認めた。一方 *U. spp* 陰性胎盤では CAM は 30%と有意に低く、*U. spp* は CAM の危険因子の 1 つであった。⁸ また、妊婦の腔での多数のコロニー形成は CAM、早産の独立した危険因子であったとの報告もある。⁹ 前向き研究では、子宮頸管での *U. spp* の陽性母体は切迫早産だけでなく早産自体とも関連が報告された。¹⁰ *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) と *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) の違いに関しては、妊娠初期の腔において、*U. parvum* のみが後期流産と早産に関連していたとする報告がある。¹¹ 前向きの観察研究では、pPROM の腔において 72.41%が *U. spp* 陽性と最も頻度が高かった。¹² さらに、pPROM 母体の帝王切開または羊水穿刺の際に得られた羊水を検討では、*U. spp* 陽性はその他の微生物陽性と比べ、有意に羊水中の炎症反応の上昇を認めたという。¹³

<母体への治療>

U. spp は細胞壁を有さず、βラクタム系抗菌薬に耐性で、エリスロマイシンやアジスロマイシンなどのマクロライド系またはクリンダマイシンなどのリンコサミド系が有効である。

症例報告では、羊水中に *U. spp* 陽性母体に対しエリスロマイシンの投与により妊娠期間の延長が可能であったとの報告がある。^{14, 15} 小規模の検討では、未破水の妊娠 26-34 週の腔で *U. spp* 陽性母体にエリスロマイシンを投与し

た 18 例と同様の条件で抗菌薬を投与しなかった 17 例の比較では、エリスロマイシン投与群は有意に妊娠期間の延長が可能であった。¹⁶

1990 年台に入ると消化器症状の合併症が軽減されたアジスロマイシンが登場した。*U. spp* を腹腔内に注射したアカゲザルの切迫早産モデルでは、静脈注射によるアジスロマイシン投与で羊水中に十分移行し、*U. spp* は除菌可能であった。¹⁷

以上のように、起因菌が *U. spp* であることが強く示唆された場合、羊水や胎盤への薬剤移行性が十分であれば、抗菌薬の投与による予後の改善効果が得られる可能性はある。一方、妊娠初期のマクロライド系抗菌薬の投与は流産と関連するとの報告もあり、¹⁸ 今後も慎重に検討していく必要がある。

<ウレアプラズマの検出法>

U. spp は乾燥や温度変化に弱い。細胞壁をもたないためグラム染色で染色されず、また通常の培地で増殖しないため通常の培地では分離培養が難しい。同定過程では *U. spp* がウレアーゼ活性を持ち尿素を栄養素として必要とする性状を利用する。すなわち尿素とフェノールレッドを含む液体培地で 24~72 時間培養し *U. spp* 陽性であればウレアーゼが尿素を分解しアルカリ性となるため培地が赤変する。培地になんらかの色調の変化があった場合、培養液を硫酸マンガ入り寒天培地に塗布し 72-96 時間培養する。*U.*

spp であれば濃茶色に変色したコロニーとなり, *Mycoplasma hominis* であれば大きい目玉焼き状の白色コロニーとなる. コロニーの確認は目視では不可能で光学顕微鏡で行う. *U. spp* と *Mycoplasma hominis* を区別する必要がある判断には熟練を要する. 培養法は, 陽性の場合には生菌の存在を示唆し, 感受性試験を行える点は利点である. 近年, マクロライド耐性ウレアプラズマの報告もあり, 感受性試験の重要性は高まっている. よって培養法は, いまだウレアプラズマの検出の **gold standard** である.

PCR 法は 3-5 日間を要する培養法よりも迅速に同定が可能で, 菌が少量であっても死滅していても検出できる. さらに細菌に共通な 16SrRNA を増幅し特定の領域の塩基配列を同定し, その塩基配列をデータベースと比較し菌種を特定できる. 生物型や血清型に特異的なプライマーを用いる方法もある. この方法は, 16SrRNA を用いる **broad range PCR** より安価で検体採取から 24-48 時間, 検査室によってはより迅速に同定が可能である.¹⁹ PCR は **thermal cycler** を必要とし, 反応の確認のための電気泳動も必要である. これらは試験全体の煩雑性を高めている.

<LAMP 法とは>

ループ介在等温増幅 (**Loop-Mediated Isothermal Amplification: LAMP**) 法は, 栄研化学の納富らが開発した核酸増幅法である.²⁰ 6 領域を認識するプライ

マーを用いるため増幅効率および特異度が高い。よって迅速、安価かつ簡易であり現在多くの細菌やウイルスの検出法として用いられている。²¹⁻²³

LAMP法は標的遺伝子の6領域に対して4種類のプライマーを設計する。標的遺伝子の3'末端からF3c, F2c, F1c, B3, B2, B1という領域を設定し、図1に示すようなFIP, F3, BIP, F3という4種類のプライマーを設定する。LAMP法の最も特徴的なプライマーは、インナープライマーと呼ばれるFIPとBIPの1組のプライマーである。FIPは標的遺伝子のF2cに相補的なF2とその5'末端にF1cを持つように設計されたプライマーである。さらにF1-F2間とB1-B2間にFL, BLという1組のループプライマーを設定することにより増幅効率を大幅に短縮することができる。

具体的には、FIPのF2領域の3'末端を起点として鋳型DNAと相補的なDNA鎖が合成される。次にFIPの外側に設計したF3プライマーからの伸張反応によって、先に合成されているFIPからのDNA鎖が剥がされ1本鎖となる。そのDNA鎖に対してBIPからのDNA合成が起こり、同様にB3プライマーからの伸長により剥がされた結果、両端にループを持ったダンベル様構造をした1本鎖DNAが生成される。このダンベル用構造が、LAMP法による増幅反応の起点となる。ダンベル様構造で、3'末端のF1領域を起点として自己を鋳型としたDNA合成が伸長する。更に、3'末端側のループのF2c領域は1本鎖であるためFIPがアニールすることがで

き、そのF2領域の3'末端を起点として、F1領域から先にDNA合成が伸長する.BIPも同様の反応を起こす。つまりダンベル様構造となることとFIP, BIPが鍵となり自己を鋳型にした反応が可能となり高い増幅効率を実現している。

また DNA 伸長に鎖置換型 DNA polymerase を使用する点も LAMP 法の特徴である。鎖置換型 DNA polymerase は鋳型 DNA に相補的な DNA 鎖を合成する際に、伸長方向の 2 本鎖を解離しながら相補鎖合成を継続できる。これにより等温で核酸合成を継続することが可能で thermal cyclers を必要としない。LAMP 法は 15～60 分で $10^9 \sim 10^{10}$ まで増幅可能で、その増幅の副産物としてピロリン酸イオンも大量に生成される。結果的にマグネシウムイオンと結合したピロリン酸マグネシウムが白濁を形成し、電気泳動などの追加の工程を要せず目視でも結果を確認できる。それ以外にはリアルタイムに濁度を測定する方法や蛍光色素による検出方法もある。

また、高い増幅率が故に、核酸増幅阻害物質である biological substances の影響を受けにくい。つまり biological substances を多く含む簡易の DNA 抽出法でも検出可能である。このように LAMP 法は、高い増幅効率により迅速に検出でき、DNA 抽出、核酸増幅及び結果判定に関して簡便性が高い方法である。

日本では 2005 年には在胎 26 週以上であれば 95%以上の児が、在胎 24, 25

週でも 85%以上の児が救命されている。しかし、在胎 22, 23 週の児では、なお 40%以上の児が新生児期に死亡している。在胎 22, 23 週の切迫早産の妊娠期間を数週間でも延長し、出生後速やかに的確な集中治療をすることが生存率を上げ合併症なき生存を増やすと考えられる。つまり、切迫早産患者に簡便な方法で迅速に *U. spp* を検出し適切な抗菌薬を投与することで絨毛膜羊膜炎をコントロールし妊娠期間の延長を図る。たとえ数週間の妊娠期間の延長であっても周産期予後の改善につながる可能性がある。このように簡便かつ迅速な *U. spp* の検出法は現在の周産期医療の課題である在胎 22, 23 週の予後の改善に寄与する可能性がある。

以上の如くウレアプラズマは母体または新生児の様々な合併症と関連するにも関わらずウレアプラズマへの介入が周産期予後を改善するかは議論が続いている。それは、ウレアプラズマの理想的な検出法はないことも一因となっていると考えられる。そこで著者はウレアプラズマの迅速かつ簡便な検出法として LAMP 法に着目し、プライマーを設計した。さらに LAMP 法と PCR 法および培養法を比較し LAMP 法の有効性を検討した。

3. 対象と方法

<細菌株>

LAMP 法の感度と特異度を評価するために 4 つの *U. parvum* の株, 5 つの *U. urealyticum* の株, 8 つの腔粘膜から検出される頻度の高い細菌および 6 つの *urease* 遺伝子を有する細菌を使用した. それらの遺伝子の提供元は, 表 I に示す.

<遺伝子のテンプレートの作成>

上記に示した 23 の細菌の DNA の抽出には, QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) または Maxwell RSC (Promega Corporation, WI, USA) を使用した.

感度を調べるためにクローニングした *U. parvum* (SV3F4) と *U. urealyticum* (F24) の *ureaseB* 遺伝子断片をテンプレートとした. クローニングは以下のように行った. 2 セットのプライマー (U. p F, 5'-

ATGGAAGGGGCAAGAGATGGTAAG -3'; U. p B, 5'-

CATTCCCATACCTTCACGTAGGGT -3'; U. u F, 5'-

AGTGAAGGGGCAAGAGATG -3' および U. u B, 5'-

CATCCCCATACCTTCACGTAGA -3') を用い, *U. parvum* と *U. urealyticum* の *ureaseB* 遺伝子を含む領域を増幅した. それらの増幅した断片を Wizard®

SV Gel and a PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI)で精製し, pCR-TOPO pUC57 cloning vector from the TOPO[®] TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いクローニングした. DNA のコピー数を計算するために, まず Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) でクローニングした遺伝子断片の濃度を測定した. つづいて PCR により増幅した断片の塩基数とベクターの塩基数からクローニングした遺伝子断片の塩基数を求めた. (*U. parvum* の遺伝子断片は 4691 bp, *U. urealyticum* の遺伝子断片は 4692 bp.)これより DNA のコピー数を計算した.

<*U. parvum* と *U. urealyticum* のプライマーの作成>

National Center for Biotechnology Information の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を使用し, 相同性検索を行った. *ureaseB* from *U. parvum* (GenBank accession no. AF085732.1)を BLAST し, *U. parvum* のすべての serovar で完全に一致した. *ureaseB* from *U. urealyticum* (GenBank accession no. AF085726.2)を BLAST し, *U. urealyticum* のすべての serovar で完全に一致した. さらに *U. parvum* と *U. urealyticum* の *ureaseB* の配列は 92%一致し, 8%は異なる配列で, 他に高い一致率の菌は認めなかった. *U. spp* に特異的で *U. parvum* と *U. urealyticum* を判別可能な *ureaseB* を標的遺伝子とした. Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) を使用しルー

プライマー (LF, LB) を含む LAMP 法のプライマーの候補を作製した.
(表 II, III, IV, V) PCR 法のプライマーは過去の報告から採用した. (表 VI)
すべてのプライマーは Hokkaido System Science (札幌, 北海道, 日本) に合
成を依頼した.

<*U. parvum* と *U. urealyticum* の LAMP 法の反応>

LAMP 法の反応は合成 25 μ l で以下の組成で行った. (5 μ l template, 8 U of
Bst DNA polymerase, 25 mM deoxynucleoside triphosphates, 4 M betaine, 1.5 M
Tris-HCl (pH 8.8), 2.5 M KCL, 1 M (NH₄)₂SO₄, 1 M MgSO₄, and 20% Tween
20.) また, プライマーは以下の濃度で使用した.: 1.6 μ M (each) FIP and BIP,
0.2 μ M (each) F3 and B3, 0.4 μ M (each) LF and LB. 作製した混合液を 63 °C
で 1 時間培養し, その後酵素反応を終了するために 80 °C で 2 分間加熱し
た. 結果は Loopamp EXIA (Eiken Chemical, 東京, 日本) を使用しリアルタ
イムに濁度を測定した. 吸光度を移動平均微分法で演算した値の最大値で
ある Differential calculation (Df 値)が 1 時間以内に 0.1 以上となったものを
陽性と判定した. または目視により確認した.

<*U. parvum* と *U. urealyticum* の PCR 反応>

PCR 法の反応は合成 25 μ l で以下の組成で行った. (5 μ l template, 0.5 U of
TaKaRa Ex Taq, 0.2 mM deoxynucleotide mixture and 10 \times TaKaRa Ex Taq
Buffer.) *U. parvum* PCR には, プライマーの UPF と UPR をそれぞれ 0.8 μ M

に調整し使用した. *U. urealyticum* PCR にも, 同様に UUF と UUR をそれぞれ 0.8 μ M に調整し使用した.²⁴ 反応条件は以下通りとした: はじめの熱変性 94 °C 1分, 30 サイクル (94 °C 30 秒, 55 °C 30 秒, 72 °C 1 分), 伸展反応を 72 °C で 1 分とした. 陽性コントロールには *U. parvum* DNA または *U. urealyticum* DNA を使用し, 陰性コントロールには nuclease-free water を使用した. PCR 後, 電気泳動の代わりに microchip electrophoresis system (MCE-202 MultiNA, SHIMADZU, 京都, 日本) を使用し分析した.

<LAMP products の解析>

U. parvum と *U. urealyticum* LAMP products は, BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) と 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用しダイレクトシーケンシングを行い確認した. ダイレクトシーケンシングのためには以下のプライマーを使用した. *U. parvum* F2; 5'- GCAATTAATTTTCGCTAGTGGTG-3', *U. parvum* B2; 5'- GCGTTCTTTATCTTCATTTTCCTT-3', *U. urealyticum* F2; 5'- ATTA ACTTCGCTGAAGGCG-3' および *U. urealyticum* B2; 5'- CGTTCTTTGTCTTCGTTTCC-3'.

<臨床サンプル>

2016 年 10 月から 2017 年 5 月の期間に A 病院で妊娠経過に異常のない妊婦

46人の膣スワブを採取した。なお本研究の開始にあたり日本大学医学部の倫理委員会（承認番号: 28-5-0）およびA病院の倫理委員会（承認番号: 2016-001）の承認を受けた。本人から文書による同意を受けて、妊婦1人から2本の膣スワブを採取し、universal viral transport (UVT) media (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) に入れウレアプラズマは温度変化に弱いため日本大学医学部へ常温で輸送した。UVTはアンホテリシンBとバンコマイシンを含み、真菌およびグラム陽性菌の発育を抑制するため、ウイルス、クラミジア、マイコプラズマおよびウレアプラズマの輸送に適していると考えた。UVTは室温(20-25°C)と冷蔵(2-8°C)の両方で少なくとも48時間は生存率が保たれる。よって48時間以内に輸送した。

2本の膣スワブのうち1本は、PCR法およびLAMP法の反応に使用した。まずUVTのメディウムの1mlを1.5mlのチューブに移し、20,000gで20分遠心した。上清をデカンテーションした。ペレットを含む50 μ lを

Loopamp SR DNA extraction kit (Eiken Chemical, 東京, 日本) を使用しDNAを抽出した。その抽出したDNAをPCR法またはLAMP法に用いた。

残りの1本の膣スワブは、BML (川越, 埼玉, 日本) に直ちに輸送し *U. spp* の培養を行った。培養法のプロトコールを以下に示す: *Ureaplasma agar* medium (Apple Kagaku Company, 東京, 日本) をメディウムとし、35°Cかつ

5% CO₂ で4日間培養した。培養後に顕微鏡下で発育した濃茶色のコロニーを確認し *U. spp* を同定した。培養陽性の検体は三重包装し日本大学医学部に輸送した。培養法は *U. parvum* と *U. urealyticum* を区別できないため LAMP 法または PCR 法を行い2種を区別した。

ウレアプラズマのコロニーを白金耳で掻き、1.5 ml チューブ内の 1 ml の phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁した。遠心後、上清をデカンテーションした。ペレットを含む 50 μl を Loopamp SR DNA extraction kit (Eiken Chemical) を用い DNA を抽出した。抽出した DNA を PCR 法または LAMP 法に用いた。臨床検体の検討は duplicate で行った。その他の実験は duplicate で異なる日に複数回行った。

< 周産期予後の検討 >

46 人の妊婦のうち、3 人は臨床経過を追跡不可能であったため除外した。臨床経過を追跡可能であった 43 人をウレアプラズマ陽性群とウレアプラズマ陰性群に分けた。まず、2 群間の年齢、妊娠回数、出産回数、検体採取時期に関して検討した。さらに、周産期予後に関して在胎週数、中絶の有無について検討した。それ以外には、腔培養で *Lactobacillus species*, *Candida species*, *Streptococcus agalactiae* 陽性, *Chlamydia trachomatis* 陽性、子宮頸部細胞診との関連について検討した。

<統計>

培養法と比較し PCR 法および LAMP 法の臨床感度，臨床特異度，陽性的中率および陰性的中率を求めた．95 %信頼区間は，検体数が少ないため Wilson interval または Jeffreys 事前分布により求めた．²⁵ 周産期予後の検討には，JMP[®] 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用し，Mann-Whitney U test または Chi-squared test で解析した．なお p 値 < 0.05 を有意差ありとした．

4. 結果

<感度と特異度>

前述の如くクローニングした *U. parvum* と *U. urealyticum* の *ureaseB* 遺伝子断片を使用し 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 , 1 copies/ μ l の希釈段階を作製した。その希釈段階を使用した *U. parvum* LAMP の候補の感度は, *U.p* 6 は 10^2 copies/reaction, *U. p* 2 と *U. p* 7 は 10^6 copies/reaction であった。それ以外の候補は 10^6 copies/ μ l 以下をすべて検出できなかった。(表 II) *U. urealyticum* LAMP の候補の感度は, *U. u* 4 は 10^2 copies/reaction, *U. p* 2 は 10^5 copies/reaction であった。それ以外の候補は 10^6 copies/ μ l 以下すべて検出できなかった。(表 IV) *U. p* 6 と *U. u* 4 が 10^2 copies/reaction ともっとも優れた感度を有しそれぞれのプライマーに決定した (表 VII, 図 2 (A), (B))。 *U. parvum* と *U. urealyticum* LAMP の実際を図 3 と図 4 に示した。一方, *U. parvum* と *U. urealyticum* PCR の感度は, 10^4 copies/reaction であった (図 5, 6)。 LAMP 法 は, PCR 法と比べ 100 倍優れた感度を有していた。 LAMP 法の結果は, Loopamp EXIA と目視で完全に一致していた。

U. parvum と *U. urealyticum* LAMP プライマーの特異度を評価するため, 9 つの *U. spp* の株と 8 つの腔粘膜から検出される細菌と 6 つのウレアーゼを持つ細菌 (*Haemophilus influenza*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* および *Streptococcus salivarius*)を使用した。それぞれ DNA の濃度は、 10^6 copies/ μ l に調整した。*U. parvum* strains (SV3F4, B7, S55 および OMC-P162) のうち 4 つすべて *U. parvum* LAMP プライマーで 30 分以内に陽性となった。一方, non-*U. parvum* は、60 分以内ですべて陰性であった。*U. urealyticum* LAMP も同様の結果であった。*U. urealyticum* strains (F24, F7, S18, S59 および S100) のうち 5 つすべてで陽性で, non-*U. urealyticum* はすべて陰性であった。

LAMP products はダイレクトシーケンスを行い、結果は予想された配列と完全に一致していた。(data not shown) 配列は標的遺伝子と比較した。標的遺伝子は下記に示す。*U. parvum* の *ureaseB* 遺伝子配列の 540 から 713 塩基と *U. urealyticum* の *ureaseB* 遺伝子配列の 546 から 715 塩基。LAMP プライマーの F2 から B2 の間)

<臨床検体での検討>

培養法では、12/46 samples (26.1%)で *U. spp.*が陽性であった。培養陽性の検体の *U. parvum* と *U. urealyticum* を区別するために、PCR 法と LAMP 法を行った。

U. parvum は 10/46 culture samples (21.7%), *U. urealyticum* は 2/46 samples (4.3%) であった。LAMP 法の結果は培養法の結果と完全に一致していた。

一方、培養陽性の7サンプルは、*U. parvum* PCR-陽性 (7/12, 58.3%) であった。培養陽性の1サンプルは、*U. urealyticum* PCR-陽性 (1/12, 8.3%) であった。残りのすべてのサンプルはPCR陰性であった。

すべてのLAMP法、PCR法、培養法の結果を表VIIIに示した。LAMP法の感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率は、培養法を対照としそれぞれ100% (12/12 specimens; 95% CI, 81.5–100%), 100% (34/34; 95% CI, 92.9–100%), 100% (12/12; 95% CI, 81.5–100%) および 100% (34/34; 95% CI, 92.9–100%)であった。一方、PCR法の感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率は、培養法を対照とし、66.7% (8/12; 95% CI, 38.8–87.5%), 100% (34/34; 95% CI, 92.9–100%), 100% (8/8; 95% CI, 73.8–100%) および 89.5% (34/38; 95% CI, 79.7–99.2%)であった。

<周産期予後の検討>

ウレアプラズマ陽性群と陰性群の2群間で背景(年齢、妊娠回数、出産回数、検体採取週数)には有意差を認めなかった。(表IX) また、周産期予後(在胎週数、中絶の有無)にも有意差を認めなかった。さらにそれ以外のすべての因子に関しても2群間で有意差を認めなかった。(表X)

5. 考察

ウレアプラズマ感染は、母体および新生児の合併症を引き起こし周産期予後に大きな影響を及ぼす重大な問題である。ウレアプラズマの迅速な検出は、適切な抗菌薬投与を可能にする。しかし、培養法や PCR 法は時間がかかり操作も煩雑で臨床医が実務と並行して行うには困難がある。

ウレアプラズマの LAMP 法による検出の報告は、本研究が初めてであり、著者は感度、特異度および腔スワブサンプルを用いて臨床検体での有用性について検討した。

母体または新生児の検体で、ウレアプラズマ検出の gold standard は培養法である。^{26,27} 培養法の利点としては、抗菌薬の感受性を知ることができ費用が最も少ない。しかし、培養結果の判明までに 3-5 日間を要し抗菌薬感受性の結果にはさらなる日数を要する。また、培養法は *U. parvum* と *U. urealyticum* を区別することができない。一方、PCR 法は、*U. parvum* と *U. urealyticum* を区別できる。²⁴ PCR 法は培養法と比べ優れた感度と特異度を持ち、迅速である。PCR 法の臨床感度は 94-95 %、臨床特異度は 91-98 % と報告されている。^{28,29} Liquid PCR や nested PCR はさらに感度および特異度を改善する可能性がある。²⁸⁻³⁰ PCR 法は培養法の代替となりえるが、thermal cycler や電気泳動装置を必要としその工程も臨床医にとっては煩雑である。

LAMP 法は、PCR 法とは異なった拡散増幅法で、簡便で biological substance による影響を受けにくい。^{20,31} コスト面では培養法より高いが PCR 法と LAMP 法はほぼ同額である。本研究では、より簡便な工程となるように Loopamp SR DNA extraction kit を使用した。この方法は簡便に DNA を抽出できるが biological substance を従来の方法より多く含む。LAMP 法は、これらの物質に阻害されることなく増幅可能である。これら利点により LAMP 法は臨床医がベットサイドで検査を行うのに適していると考えられた。

LAMP 法は、すでに *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae* および *Streptococcus pneumoniae* などの様々な細菌の検出に応用されている。

²¹⁻²³ 研究室の Pham らは、便検体から *Campylobacter* spp. の検出において LAMP 法の感度は PCR 法より優れ、特異度は同等であることを報告している。³²

著者の開発したウレアプラズマの LAMP 法による検出法は、簡便性、迅速性、感度および特異度を考慮すると、培養法や PCR 法より優れた方法となる可能性が高い。

しかし、このシステムでは、*U. spp* だけしか検出できず、*Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis* および *Streptococcus agalactiae* など CAM の原因となる他の細菌を同時に検出することはできない。細菌性膣症の患者では、*U.*

spp だけでなくしばしばその他の細菌も同時に検出される。従って, *U. spp* だけでなく他の細菌も検出でき, 薬剤感受性も行える培養法は, いまだ重要な検査である。

本研究は LAMP 法が優れた感度, 特異度, 陽性的中率及び陰性的中率を示したが, 検体数が少なく単一施設での検討である点が影響した可能性がある。それ以外に生菌率を保つため著者は常温で UVT を使用し輸送したため対象とした培養が PCR を上回る検出率であったことも一因と考えられる。

また, LAMP 法で陽性, 培養法で陰性の場合には死菌を検出している可能性がある。ウレアプラズマの標準化 DNA の希釈段階を LAMP 法で検討し, 結果をリアルタイム濁度測定装置で評価する。Df 値が 0.1 以上となり陽性と判定された時間とウレアプラズマの濃度を検量線で作成する。その近似式からウレアプラズマの濃度の推定は可能かもしれない。しかし, 生菌か否かは現時点では培養法の結果を待つ必要がある。切迫症状があり LAMP 法陽性の場合には暫定的にマクロライド系抗菌薬を投与し, 培養法の結果が陰性の場合には抗菌薬の中止を検討するのが現実的である。

本研究でウレアプラズマが周産期予後に与える影響について検討したが, 治療によるウレアプラズマの除菌率に関しては検討していない。今後, 本

方法は多施設共同で十分な検体数を用いて LAMP 法の有効性およびウレア
プラズマの除菌が周産期予後の改善につながるのかを検討する必要がある。
著者は、迅速、簡便で感度および特異度に優れたウレアプラズマの検出法
を開発した。これにより迅速な診断と適切な抗菌薬の選択による周産期予
後の改善が期待される。

6. まとめ

LAMP 法によるウレアプラズマの検出法を開発した。本方法は、迅速性に優れ、臨床検体でも優れた感度を有する。本方法を用いることでウレアプラズマの迅速かつ正確な診断でき、周産期予後の改善につながる可能性がある。今後は、多施設での検討および新生児検体での検討を計画している。

7. 謝辞

基礎研究を行うチャンスを与えてくださった日本大学医学部小児科学系小児科学分野 細野茂春准教授に深謝致します。論文の読み方から始まり、研究計画の立て方、実験手技、論文の書き方、英語の書き方に至るまで研究に必要なことを懇切丁寧に御指導いただいた日本大学医学部病態病理学系微生物学分野 早川智教授に深謝致します。その他本研究にご協力いただいた日本大学医学部病態病理学系微生物学分野 関みつ子先生、平田クリニック 院長 平田善康先生、大阪母子医療センター研究所 免疫部門 柳原格先生、大阪母子医療センター研究所 免疫部門 名倉 由紀子、日本大学小児科学系小児科学分野 高野智圭先生、日本大学医学部病態病理学系微生物学分野 黒田和道准教授に深謝いたします。

8. 表

表 I. Reference samples.

Species	Strain
<i>Ureaplasma parvum</i> ^a	SV3F4 B7 S55 OM-P162
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ^a	F7 F24 S18 S59 S100
<i>Enterobacter cloacae</i> ^b	JCM 1669T
<i>Escherichia coli</i> ^c	DH5α
<i>Gardnerella vaginalis</i> ^b	JCM 11026T
<i>Haemophilus influenzae</i> ^d	RD
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ^e	IID991
<i>Helicobacter pylori</i> ^b	JCM 12093T
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical isolate
<i>Mycoplasma hominis</i> ^a	N59S1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ^f	NIID9
<i>Proteus mirabilis</i> ^b	JCM 1669T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^g	ATCC7700
<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	JCM 20624T
<i>Streptococcus agalactiae</i> ^h	IID1625
<i>Streptococcus salivarius</i> ^g	ATCC 7073

^a 大阪母子医療センター(大阪, 日本)から譲渡を受けた.

^b 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室(茨城, 日本)から購入した.

^c Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)から購入した.

^d American Type Culture Collection から購入した.

^e 東京大学医科学研究所(東京, 日本)らから譲渡を受けた.

^f 国立感染症研究所(東京, 日本)から譲渡を受けた.

^g 日本大学歯学部細菌学教室(東京, 日本)から譲渡を受けた.

^h 九州大学歯学部(福岡, 日本)から譲渡を受けた.

表 II. *Ureaplasma parvum* に対する LAMP 法の候補 primer

The *ureaseB* gene from *Ureaplasma parvum*. (GenBank accession no. AF085732.1)

<i>U. p</i> primer	FIP		BIP				LF	LB	Sensitivity
	F2	F1	B1	B2	F3	B3			
<i>U. p</i> 1	599-622	646-670	698-721	741-761	572-590	762-782			-
<i>U. p</i> 2	599-622	646-670	698-721	741-761	572-590	762-782	623-643		10 ⁶
<i>U. p</i> 3	562-584	602-625	630-654	691-713	540-561	717-734			-
<i>U. p</i> 4	562-584	602-625	630-654	691-713	540-561	717-734		656-674	-
<i>U. p</i> 5	562-584	602-625	630-654	691-713	540-561	717-734		656-676	-
<i>U. p</i> 6	540-561	600-625	630-654	691-713	504-525	726-745	574-599	656-675	10 ²
<i>U. p</i> 7	552-543	601-625	648-672	691-713	525-543	717-734	574-590		10 ⁶

表 III. *Ureaplasma parvum* に対する LAMP 法の候補 primer sequences

<i>U. p</i> 1, 2 共通 primer (Sequence 5'-3')		塩基数
F3	GAATGAAGGTAGAGAGGCA	19
B3	TTTATCTCCTGGTTCAAAACG	21
FIP	GCACTATTCACCTCAAACAAGTGAATAGTATTAATAACTGGGGACCG	49
BIP	TGAAGATAAAGAACGCAAAGTTGCAATAGCAGTACCTGATGGAAT	45
<i>U. p</i> 2 Loop primer (Sequence 5'-3')		
LF	TGTGATCCAACCTGTATAGGA	21
<i>U. p</i> 3, 4, 5 共通 primer (Sequence 5'-3')		
F3	GCAATTAATTCGCTAGTGGTG	22
B3	ACGTCGTCCATAAGCAAC	18
FIP	GGACGGTCCCCAGTATTTTAATAAAAATTGTGATGAATGAAGGTAGA	47
BIP	TGAAGATAAAGAACGCAAAGTTGCAATAGCAGTACCTGATGGAAT	45
<i>U. p</i> 4 Loop primer (Sequence 5'-3')		
BF	TGAAGTGAATAGTGCATTA	19
<i>U. p</i> 5 Loop primer (Sequence 5'-3')		
BF	GAAGTGAATAGTGCATTAGT	20
<i>U. p</i> 7 primer		
F3	AAATTAGTACCAGGGGCAA	19
B3	ACGTCGTCCATAAGCAAC	18
FIP	GGACGGTCCCCAGTATTTTAATACGCTAGTGGTGAAATTGTGATG	46
BIP	CACTTGTTTGAAGTGAATAGTGCATGCGTTCCTTATCTTCATTCCTT	48
LF	TGCTCTCTACCTTCAT	17

表 IV. *Ureaplasma urealyticum* に対する LAMP 法の候補 primer

The <i>ureaseB</i> gene from <i>Ureaplasma urealyticum</i> . (GenBank accession no. AF085726.2)									
<i>U. u</i> primer	FIP		BIP				LF	LB	Sensitivity
	F2	F1	B1	B2	F3	B3			
<i>U. u</i> 1	683-706	723-743	744-767	808-826	650-673	827-844			-
<i>U. u</i> 2	683-706	723-743	744-767	808-826	650-673	827-844		770-844	10 ⁵
<i>U. u</i> 3	683-706	723-743	744-767	808-826	650-673	827-844		771-791	-
<i>U. u</i> 4	546-606	606-629	632-655	696-715	525-545	721-738	573-592	669-691	10 ²

表 V. *Ureaplasma urealyticum* に対する LAMP 法の候補 primer sequences

<i>U. u</i> 1, 2, 3 共通primer (Sequence 5'-3')		
F3	CCACTTATTTGAAACAAATAGTGC	24
B3	AAGCCGTTTACACCTCAA	18
FIP	ATCGAAACGACGTCCATAAGCCTTTGATGAAAAAGGAAACGAAGA	45
BIP	ATTCCATCAGGTACTGCTATTCGTA CTTACGTGTTCCGACTA	43
<i>U. u</i> 2 Loop primer (Sequence 5'-3')		
BF	TGAACCAGGAGACAAAAAAG	20
<i>U. u</i> 3 Loop primer (Sequence 5'-3')		
BF	GAACCAGGAGACAAAAAAGAA	21

表 VI. 本研究の PCR primer sequences.

<i>U. parvum</i> PCR primer (Sequence 5'-3')		塩基数
UPS	CAG GAT CAT CAA GTC AAT TTA G	22
UPA	AAC ATA ATG TTC CCC TTT TTA TC	23
<i>U. urealyticum</i> PCR primer (Sequence 5'-3')		
UUS	CAG GAT CAT CAA ATC AAT TCA C	22
UUA	CAT AAT GTT CCC CTT CGT CTA	21

表 VII. 本研究の LAMP primer sequences.

<i>U. parvum</i> LAMP primer (<i>U. p</i> 6) (Sequence 5'-3')		塩基数
F3	TCAAGTCAATTTAGTCCAGGTA	22
B3	GGAATATCGAAACGTCGTCC	20
FIP	GACGGTCCCCAGTATTTTTAATACTGCAATTAATTCGCTAGTGGTG	47
BIP	CAAGTTGGATCACATTTTCACTTGTGCGTTCTTTATCTTCATTTTCCTT	48
LF	AATACTTTTGCCTCTCTACC	21
LB	TGAAGTGAATAGTGCATTAG	20
<i>U. urealyticum</i> LAMP primer (<i>U. u</i> 4) (Sequence 5'-3')		
F3	GGTAAATTAGTACCAGGAGCA	21
B3	AACGACGTCCATAAGCAA	18
FIP	AGGACGGTCACCAGTATTTTTAAT-ATTA ACTTCGCTGAAGGCG	43
BIP	CCAAGTTGGATCACATTTCCACTT-CGTTCTTTGTCTTCGTTTCC	44
LF	GCTTCTCTACCTTCGTTTCAT	20
LB	AGTGCATTAGTATTCTTTGATGA	23

表 VIII. 膣スワブサンプルにおける LAMP 法, PCR 法および培養法の比較.

Detection of <i>U. parvum</i> or <i>U. urealyticum</i>	Culture ^a			Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV ^b (95% CI)	NPV ^c (95% CI)
	Pos	Neg	Total				
LAMP ^d	Pos	12 (2) ^e	0 (2)	100% (81.5–100)	100% (92.9–100)	100% (81.5–100)	100% (92.9–100)
	Neg	0	34	12/12	34/34	12/12	34/34
	Pos	8 (1)	0 (1)	8 (1)	66.7% (38.8–87.6)	100% (92.9–100)	100% (73.8–100)
PCR ^f	Neg	4 (1)	34 (1)	8/12	34/34	8/8	34/38
	Total	12	34	46			

^a Pos は, *Ureaplasma species* が検出されたことを示す. また Neg は,

Ureaplasma species が検出されなかったことを示す.

^b PPV, positive predictive value, 陽性的中率

^c NPV, negative predictive value, 陰性的中率

^dPos は, *U. parvum* LAMP または *U. urealyticum* LAMP で増幅が確認されたことを示す. Neg は, *U. parvum* LAMP と *U. urealyticum* LAMP でともに増幅が確認されなかったことを示す.

^e 培養陽性の検体のうち LAMP 法または PCR 法で *U. urealyticum* と確認できた検体数を示す.

^fPos は, *U. parvum* PCR または *U. urealyticum* PCR で増幅が確認できたことを示す. Neg は, *U. parvum* PCR と *U. urealyticum* PCR でともに増幅が確認できなかったことを示す.

表 IX. ウレアプラズマ陽性群と陰性群の臨床背景

	ウレアプラズマ陽性群	ウレアプラズマ陰性群	p 値
	(n=11)	(n=32)	
	Mean±SD		
年齢 (歳)	30.0±4.4	31.0±5.3	0.53
妊娠回数	1.7±1.5	1.1±0.9	0.22
出産回数	1.5±1.4	0.7±0.8	0.11
検体採取週数	25.0±11.8	23.1±9.0	0.42

表 X. ウレアプラズマ陽性群と陰性群の周産期予後

	ウレアプラズマ陽性 群 (n=10)	ウレアプラズマ陰性 群 (n=31)	p 値
	Mean±SD		
在胎週数	38.8±1.4	39.2±1.2	0.28

	ウレアプラズマ陽性 群 (n=11)	ウレアプラズマ陰性 群 (n=32)	p 値
	中絶	1 (1/11, 9.1 %)	
<i>Lactobacillus</i> species 陽性	7 (7/11, 63.4 %)	20 (20/32, 62.5 %)	0.95
<i>Candida</i> species 陽性	3 (3/11, 27.3 %)	5 (5/32, 15.6 %)	0.39
<i>Streptococcus agalactiae</i> 陽性	0 (0/11, 0 %)	5 (5/32, 15.6 %)	0.16
<i>Chlamydia trachomatis</i> 陽性	0 (0/11, 0 %)	1 (1/32, 3.1 %)	0.55
子宮膣部細胞診陽性	0 (0/11, 0 %)	0 (0/32, 0 %)	-

9. 図

図 1

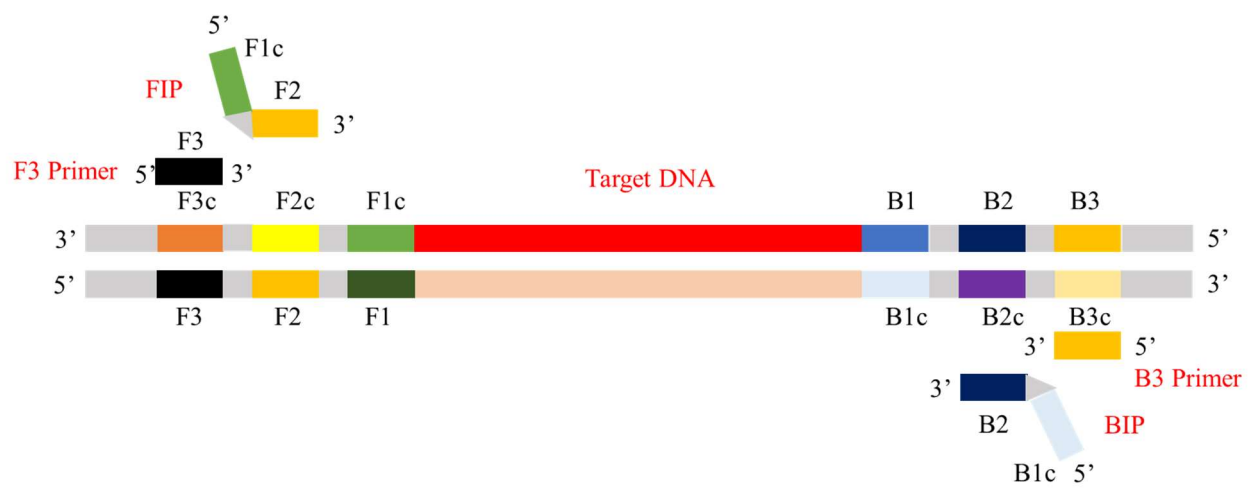
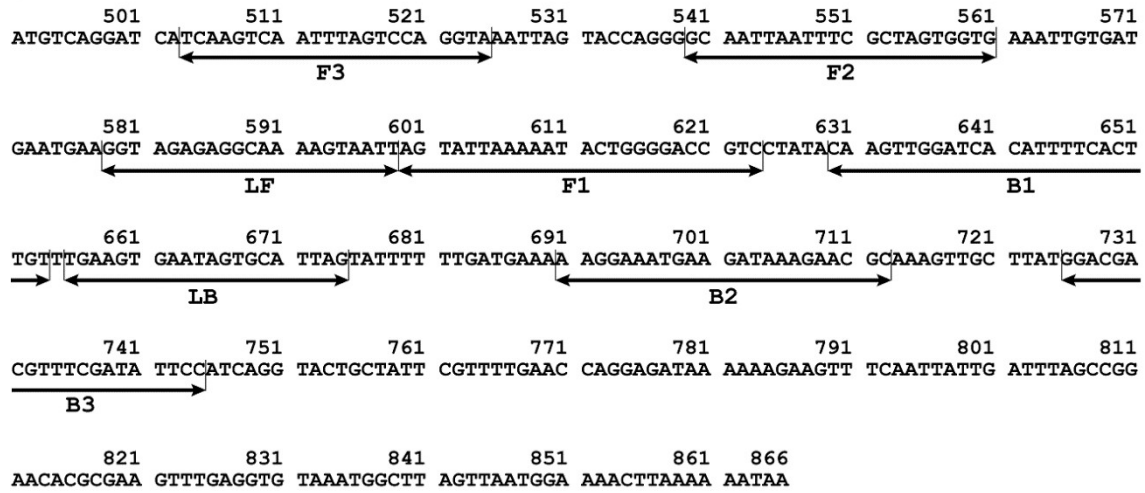


図 2

(A)



☒ 2

(B)

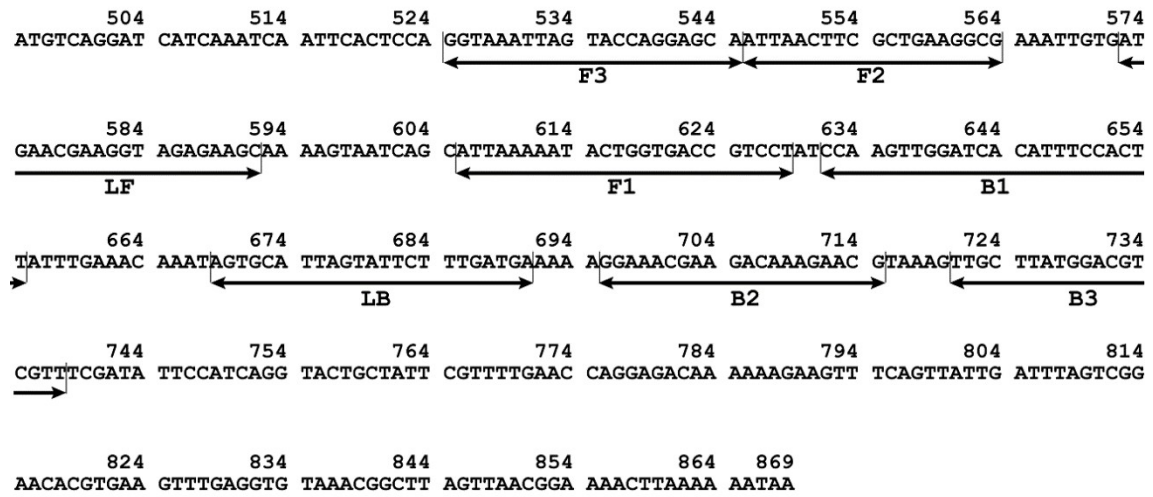


图 3

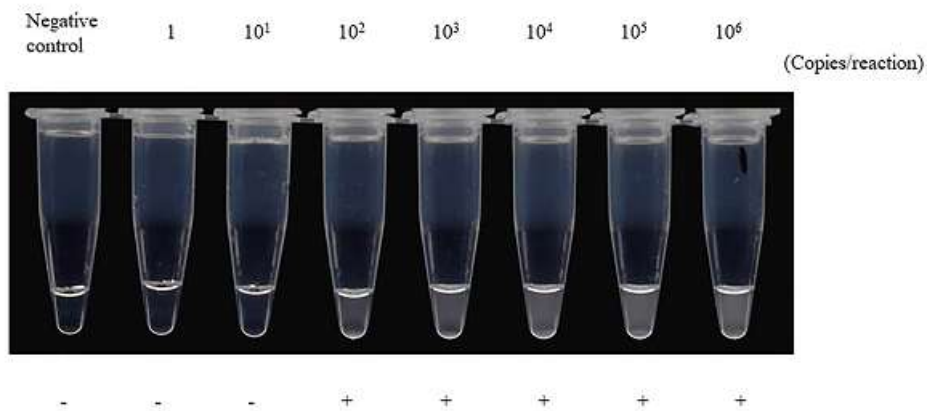


图 5

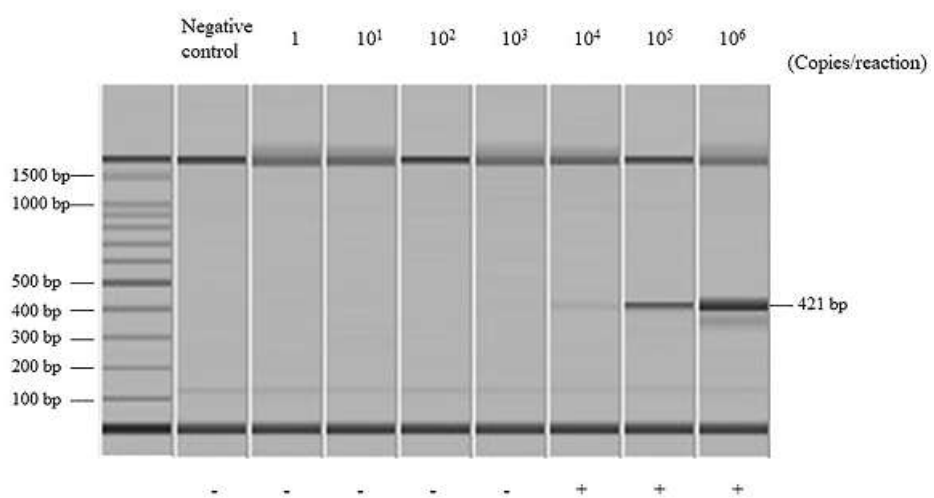
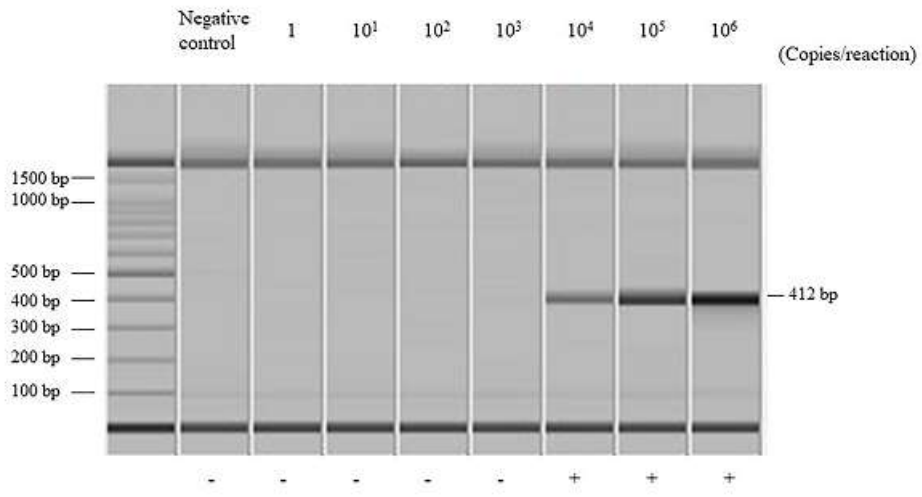


图 6



10. 図説

図 1. LAMP 法の標的遺伝子とプライマーセット

標的遺伝子の 3' 末端から F3c, F2c, F1c, B3, B2, B1 という領域を設定し FIP, F3, BIP, F3 という 4 種類のプライマーを設定する.

図 2. *U. parvum* の *ureaseB* 遺伝子配列における LAMP 法のプライマー

(A) *U. urealyticum* の *ureaseB* 遺伝子配列における LAMP 法のプライマー

(B)

U. parvum (GenBank accession no. AF085732.1) と *U. urealyticum* (GenBank accession no. AF085726.2)の配列を使用しプライマーの配列は矢印で示めす.

図 3. *U. parvum* LAMP の感度

クローニングした DNA を使用し希釈段階を作製した. 結果は, 目視または Loopamp EXIA (Eiken Chemical, 東京, 日本)を使用し確認した. *U. parvum* LAMP の感度は 10^2 copies/reaction であった.

図 4. *U. urealyticum* LAMP の感度

クローニングした DNA を使用し希釈段階を作製した. 結果は, 目視または Loopamp EXIA (Eiken Chemical, 東京, 日本)を使用し確認した. *U. urealyticum* LAMP の感度は 10^2 copies/reaction であった.

図 5. *U. parvum* PCR の感度

LAMP 法を行った検体を同時に PCR 法でも検討した。最も左の Lane が size marker で、左から 2 番目の Lane が陰性コントロールとした。LAMP 法で使
用した DNA の希釈段階を使用した。増幅産物は、421 bp で、感度は、 10^4
copies/reaction であった。

図 6. *U. urealyticum* PCR の感度

LAMP 法を行った検体を同時に PCR 法でも検討した。最も左の Lane が size
marker で、左から 2 番目の Lane が陰性コントロールとした。LAMP 法で使
用した DNA の希釈段階を使用した。増幅産物は、412 bp で、感度は、 10^4
copies/reaction であった。

11. 引用文献

- 1 Rovira N, Alarcon A, Iriondo M, Ibanez M, Poo P, Cusi V, Agut T, Pertierra A, Krauel X: Impact of histological chorioamnionitis, funisitis and clinical chorioamnionitis on neurodevelopmental outcome of preterm infants. *Early human development* 2011;**87**:253-257.
- 2 Robertson JA, Stemke GW, Davis JW, Jr., Harasawa R, Thirkell D, Kong F, Shepard MC, Ford DK: Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2002;**52**:587-597.
- 3 Luton D, Ville Y, Luton-Sigy A, Cousin C, Narraido B, Fassasi-Jarretou A, Escarguel C: Prevalence and influence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in 218 African pregnant women and their infants. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1994;**56**:95-101.
- 4 Embil JA, Pereira LH: Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and genital *mycoplasmas* in asymptomatic women. *Canadian Medical Association journal* 1985;**133**:34-35.
- 5 Harrison HR, Boyce WT, Haffner WH, Crowley B, Weinstein L, Lewis M, Alexander ER: The prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* and *mycoplasmal* infections during pregnancy in an American Indian population. *Sexually transmitted diseases* 1983;**10**:184-186.
- 6 Harrison HR, Alexander ER, Weinstein L, Lewis M, Nash M, Sim DA: Cervical *Chlamydia trachomatis* and *mycoplasmal* infections in pregnancy. Epidemiology and outcomes. *Jama* 1983;**250**:1721-1727.
- 7 Iwasaka T, Wada T, Kidera Y, Sugimori H: Hormonal status and *mycoplasma* colonization in the female genital tract. *Obstetrics and gynecology* 1986;**68**:263-266.
- 8 Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I: Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatric research* 2010;**67**:166-172.
- 9 Abele-Horn M, Scholz M, Wolff C, Kolben M: High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis

- and preterm delivery. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2000;**79**:973-978.
- 10 Gonzalez Bosquet E, Gene A, Ferrer I, Borrás M, Laila JM: Value of endocervical *ureaplasma* species colonization as a marker of preterm delivery. *Gynecologic and obstetric investigation* 2006;**61**:119-123.
- 11 Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H: Association between preterm birth and vaginal colonization by *mycoplasmas* in early pregnancy. *Journal of clinical microbiology* 2006;**44**:51-55.
- 12 Calleri LF, Taccani C, Porcelli A: [*Ureaplasma urealyticum* vaginosis and premature rupture of membranes. What is its role?]. *Minerva ginecologica* 2000;**52**:49-58.
- 13 Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, Park CW, Hong JS, Romero R, Yoon BH: Intraamniotic infection with genital *mycoplasmas* exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* 2010;**203**:211.e211-218.
- 14 Romero R, Hagay Z, Norez J, Sepulveda W, Mazor M: Eradication of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic fluid with transplacental antibiotic treatment. *American journal of obstetrics and gynecology* 1992;**166**:618-620.
- 15 Mazor M, Chaim W, Horowitz S, Leiberman JR, Glezerman M: Successful treatment of preterm labour by eradication of *Ureaplasma urealyticum* with erythromycin. *Archives of gynecology and obstetrics* 1993;**253**:215-218.
- 16 Antsaklis A, Daskalakis G, Michalas S, Aravantinos D: Erythromycin treatment for subclinical *Ureaplasma urealyticum* infection in preterm labor. *Fetal diagnosis and therapy* 1997;**12**:89-92.
- 17 Grigsby PL, Novy MJ, Sadowsky DW, Morgan TK, Long M, Acosta E, Duffy LB, Waites KB: Maternal azithromycin therapy for *Ureaplasma* intraamniotic infection delays preterm delivery and reduces fetal lung injury in a primate model. *American journal of obstetrics and gynecology* 2012;**207**:475.e471-475.e414.
- 18 Muanda FT, Sheehy O, Berard A: Use of antibiotics during pregnancy and risk of spontaneous abortion. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2017;**189**:E625-e633.

- 19 Colaizy TT, Kuforiji T, Sklar RS, Pillers DA: PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview. *Molecular genetics and metabolism* 2003;**80**:389-397.
- 20 Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 2015;**53**:1-5.
- 21 Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Dong BQ, Kim JS, Seki M: The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one* 2012;**7**:e42954.
- 22 Kakuya F, Kinebuchi T, Fujiyasu H, Tanaka R, Kano H: Genetic point-of-care diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection using LAMP assay. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 2014;**56**:547-552.
- 23 Moon SH, Kim EJ, Tomono J, Miyamoto S, Mitarai S, Kim DW, Seki M: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens using a loop-mediated isothermal amplification assay in Korea. *Journal of medical microbiology* 2015;**64**:1335-1340.
- 24 Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL: Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *Journal of clinical microbiology* 2000;**38**:1175-1179.
- 25 Brown LD, Cai TT, DasGupta A: Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statistical Science* 2001;**16**:101-117.
- 26 Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI: Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2012;**14**:437-450.
- 27 Viscardi RM, Kallapur SG: Role of *Ureaplasma* Respiratory Tract Colonization in Bronchopulmonary Dysplasia Pathogenesis: Current Concepts and Update. *Clinics in perinatology* 2015;**42**:719-738.
- 28 Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Zimmermann A, Vahlensieck W, Pfaff F, Ruckdeschel G: Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the*

- European Society of Clinical Microbiology* 1996;**15**:595-598.
- 29 Povlsen K, Jensen JS, Lind I: Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and biovar determination by liquid hybridization. *Journal of clinical microbiology* 1998;**36**:3211-3216.
- 30 Ueno T, Niimi H, Yoneda N, Yoneda S, Mori M, Tabata H, Minami H, Saito S, Kitajima I: Eukaryote-Made Thermostable DNA Polymerase Enables Rapid PCR-Based Detection of *Mycoplasma*, *Ureaplasma* and Other Bacteria in the Amniotic Fluid of Preterm Labor Cases. *PloS one* 2015;**10**:e0129032.
- 31 Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T: Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2007;**70**:499-501.
- 32 Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Yamazaki W, Komine-Aizawa S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Thai Children with Diarrhea. *Japanese journal of infectious diseases* 2015;**68**:432-433.

研究業績目録

不破 一将

I 発表	①一般発表	45
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	3 (単 0/共 3)
	②症例報告	5 (単 0/共 5)
	③総説	2 (単 0/共 2)
III 著書		2 (単 0/共 2)

以上

I 発表

1. 不破一将，長野伸彦，宗像俊，深町律子，臼倉幸宏，牧本優美，細野茂春，前田知雄，高橋滋，麦島秀雄，大橋研介，井上幹也，池田太郎，越永従道，山本樹生：出生前に鎖肛が疑われ、出生後先天性クロール下痢症と診断した1例，第588回日本小児科学会東京都地方会，東京，2012年1月。
2. 加藤理佐，福原淳示，不破一将，大熊洋美，阿部百合子，中村隆広，市川理恵，松村昌治，宮下理夫，神山浩，鮎沢衛，住友直方，岡田知雄，麦島秀雄：川崎病の γ グロブリン療法2週間後に心膜液貯留を認めた1例，第594回日本小児科学会東京都地方会，東京，2012年9月。
3. 不破一将，茨聡，石原千詠，中目和彦，前出善信，桑原貴子，高尾大士，佐藤恭子，内藤善樹，平川英司，樺山知佳，山本将功：低酸素性虚血性脳症(HIE)における逸脱酵素と神経学的予後、CKと障害発生起点の関連性についての検討，第49回日本周産期・新生児医学会，神奈川，2013年7月。
5. 不破一将，清水正樹，菅野啓一，宮林寛，川畑建，菅野雅美，櫻井裕子，林至恩，今西利之：内臓逆位を認めた3例，第26回新生児慢性肺疾患研究会，東京，2013年10月。

5. 宮林寛, 清水正樹, 菅野啓一, 川畑建, 菅野雅美, 林至恩, 不破一将, 溜雅人, 杉山洋平: 持続濾過透析療法施行中に腹部大動脈血栓、壊死性腸炎を発症したオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の1剖検例, 第58回日本未熟児新生児学会, 石川, 2013年11月.
6. 杉山洋平, 溜雅人, 不破一将, 林至恩, 菅野雅美, 川畑建, 宮林寛, 菅野啓一, 清水正樹: 高アンモニア血症の治療効果指標にaEEG(Amplitude-integrated EEG)が有用であった2症例, 第58回日本未熟児新生児学会, 石川, 2013年11月.
7. 菅野雅美, 溜雅人, 杉山洋平, 不破一将, 林至恩, 川畑建, 宮林寛, 菅野啓一, 清水正樹: 当センターにおける新生児脳低温療法の変遷と予後, 第58回日本未熟児新生児学会, 石川, 2013年11月.
8. 菅野啓一, 溜雅人, 杉山洋平, 不破一将, 林至恩, 川畑建, 宮林寛, 清水正樹: ダブルルーメン細径カテーテル(DPICC)におけるメインルートからの one shot IV がサブルーメンの定量輸液に与える影響の検討, 第58回日本未熟児新生児学会, 石川, 2013年11月.
9. 池田憲二, 井石倫弘, 釘持孝博, 清水未希, 高橋俊恵, 立川雅美子, 田中麻希子, 額田貴之, 不破一将, 森崎菜穂: キャリーオーバーについて 小児期を過ぎた患者を誰が、どのように診ていくのがよいか?, 第58

回日本未熟児新生児学会，石川，2013 年 11 月．

10. 溜雅人，杉山洋平，不破一将，林至恩，菅野雅美，川畑建，宮林寛，菅野啓一，清水正樹：Amplitude integrated EEG(aEEG)を用いた脳低温療法を施行した新生児仮死症例の予後予測についての検討，第 58 回日本未熟児新生児学会，石川，2013 年 11 月．

11. 林至恩，清水正樹，菅野啓一，宮林寛，川畑建，菅野雅美，不破一将，溜雅人，杉山洋平：新生児低酸素性虚血性脳症における aEEG と近赤外分光法について，第 58 回日本未熟児新生児学会，石川，2013 年 11 月．

12. Fuwa Kazumasa, Kanno Masami, Miyabayashi Hiroshi, Kawabata Ken, Kanno Keiichi, Shimizu Masaki : Cooling methods involving brain hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy, Hot Topics in neonatology, Washington, America, 2013 Dec.

13. 青木亮二，不破一将，榛沢文恵，桑原怜未，羽生政子，奥野美佐子，吉田彩子，鈴木潤一，石毛美夏，齋藤宏，森本哲司，浦上達彦，高橋昌里：低 K 血症が進行した糖尿病性ケトアシドーシスの 1 例，東京都地方会，東京，2014 年 5 月．

14. 宮林寛，菅野啓一，川畑建，菅野雅美，林至恩，桜井裕子，不破一将，今西利之，鈴木亮平，清水正樹：トイレで分娩後に心肺停止で入院し

た3症例の検討, 第50回日本周産期・新生児医学会, 千葉, 2014年7月.

15. 今西利之, 矢澤里絵子, 鈴木亮平, 不破一将, 菅野雅美, 桜井裕子, 川畑建, 宮林寛, 菅野啓一, 清水正樹: HFO管理中のSI(sustained inflation)が脳血流に及ぼす影響についての検討, 第50回日本周産期・新生児医学会, 千葉, 2014年7月.

16. 菅野雅美, 清水正樹, 菅野啓一, 宮林寛, 川畑建, 桜井裕子, 林至恩, 今西利之, 不破一将, 鈴木亮平, 矢澤里絵子: 新生児虚血性低酸素性脳症に脳低温療法を行った児の頭部MRI所見と長期予後, 第50回日本周産期・新生児医学会, 千葉, 2014年7月.

17. 川畑建, 矢澤里絵子, 鈴木亮平, 桜井裕子, 今西利之, 不破一将, 林至恩, 菅野雅美, 宮林寛, 菅野啓一, 清水正樹: 脳低温療法中の尿中 β -2-microglobulinと短期予後の関係, 第50回日本周産期・新生児医学会, 千葉, 2014年7月.

18. 田口洋祐, 不破一将, 日根幸太郎, 長野伸彦, 宗像俊, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 岡田知雄, 高橋滋, 高橋昌里: 遺伝子組み換えトロンボモジュリンを投与した新生児播種性血管内凝固症例における予後因子の検討, 第50回日本周産期・新生児医学会, 千葉, 2014年7月.

19. 不破一将, 清水正樹, 菅野啓一, 宮林寛, 川畑建, 菅野雅美, 桜井

裕子，林至恩，今西利之，矢澤里絵子：ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症に血球貪食症候群を合併した早産児の1例，第50回日本周産期・新生児医学会，千葉，2014年7月．

20. 矢澤里絵子，清水正樹，菅野啓一，宮林寛，川畑建，菅野雅美，林至恩，今西利之，不破一将，鈴木亮平：妊娠初期の風疹感染により先天性風疹症候群を発症した一剖検例，第50回日本周産期・新生児医学会，千葉，2014年7月．

21. 鈴木亮平，清水正樹，菅野啓一，宮林寛，川畑建，菅野雅美，櫻井裕子，林至恩，今西利之，不破一将，矢澤里絵子：ムコール症を発症したオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の1剖検例，第50回日本周産期・新生児医学会，千葉，2014年7月．

22. 櫻井裕子，清水正樹，菅野啓一，宮林寛，川畑健，菅野雅美，林至恩，今西利之，不破一将，鈴木亮平，矢澤里絵子：当院の黄疸治療における総ビリルビン値とアンバウンドビリルビン値の比較，第50回日本周産期・新生児医学会，千葉，2014年7月．

23. 今泉隆行，長野伸彦，不破一将，日根幸太郎，田口洋祐，吉川香代，臼倉幸宏，細野茂春，高橋滋，高橋昌里：色素血管母斑症 IIb 型に乳び胸腹水による胎児水腫を合併した1例，第59回日本未熟児新生児学会，

愛媛, 2014 年 11 月.

24. 伊東正剛, 日根幸太郎, 木村久美子, 不破一将, 長野伸彦, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: 出生時臍帯血異性間 FISH 法が悪性黒色腫の母児間転移の評価に有効であった新生児例, 第 25 回日本産婦人科・新生児血液学会, 東京, 2015 年 6 月.

25. 儀保翼, 田口洋祐, 不破一将, 香山一憲, 加藤亮太, 日根幸太郎, 長野伸彦, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: 急速復温により合併症無く軽快した新生児低体温症の 1 例, 第 619 回日本小児科学会東京都地方会, 東京, 2015 年 6 月.

26. 伊東正剛, 日根幸太郎, 不破一将, 香山一憲, 加藤亮太, 長野伸彦, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: 出生時臍帯血異性間 FISH 法が悪性黒色腫の母児間転移の評価に有効であった新生児例, 第 51 回日本周産期・新生児医学会, 福岡, 2015 年 7 月.

27. 加藤理佐, 長野伸彦, 不破一将, 香山一憲, 加藤亮太, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: 腸球菌による新生児早発型敗血症の 2 例, 第 51 回日本周産期・新生児医学会, 福岡, 2015 年 7 月.

28. 香山一憲, 長野伸彦, 河村研吾, 日根幸太郎, 不破一将, 加藤亮

太, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : エンドトキシン吸着療法(PMX-DHP)が奏効した早発型 A 群溶血性連鎖球菌敗血症の 1 例, 第 51 回日本周産期・新生児医学会, 福岡, 2015 年 7 月.

29. 日根幸太郎, 不破一将, 長野伸彦, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里, 古谷武史, 大橋研介, 越永従道 : 先天性横隔膜ヘルニアを合併し、左肺の気腫状変化を来した 4p-症候群の 1 例, 第 51 回日本周産期・新生児医学会, 福岡, 2015 年 7 月.

30. Fuwa Kazumasa, Kanno Masami, Miyabayashi Hiroshi, Kawabata Ken, Kanno Keiichi, Kubota Mitsuru, Shimizu Masaki : A preterm infant who had hemophagocytic lymphohistocytosis caused by mitochondrial respiratory chain disorders, Society for the study of inborn errors in metabolism 2015, Lyon, France, 2015 Sep.

31. 不破一将, 長野伸彦, 香山一憲, 加藤亮太, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : 重症新生児遷延性肺高血圧症に対し sildenafil を投与後 stage3 の未熟児網膜症を発症した早産低出生体重児の 1 例, 第 60 回日本新生児成育医学会雑誌, 岩手, 2015 年 10 月.

32. 安藤正恵, 加藤亮太, 不破一将, 香山一憲, 長野伸彦, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : 性別判定に苦慮した

人魚体シーケンスの 1 例, 第 60 回日本新生児成育医学会雑誌, 岩手,
2015 年 10 月.

33. 香山一憲, 長野伸彦, 加藤理佐, 不破一将, 河村研吾, 加藤亮太,
田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: エンドト
キシン吸着療法を施行したグラム陽性菌敗血症 3 例の IL-1 β 、IL-6、TNF-
 α 、HMGB-1 の推移, 第 60 回日本新生児成育医学会雑誌, 岩手, 2015 年 10
月.

34. 香山一憲, 長野伸彦, 加藤理佐, 不破一将, 河村研吾, 加藤亮太,
田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里: エンドト
キシン吸着療法を施行した新生児早発型グラム陽性菌敗血症 3 例における
炎症性サイトカインの推移, エンドトキシン血症救命治療研究会, 東京,
2016 年 1 月.

35. 並木秀匡, 田口洋祐, 安藤正恵, 不破一将, 香山一憲, 鈴木琢磨,
加藤亮太, 岡橋彩, 吉川香代, 細野茂春, 越永従道, 高橋滋, 高橋昌里:
臍帯潰瘍による出血性ショックから高度の腎障害を来し、腹膜透析を施行
した 1 例, 第 625 回日本小児科学会東京都地方会, 2016 年 2 月.

36. Fuwa Kazumasa, Hosono Shigeharu, Kayama Kazunori, Nagano
Nobuhiko, Taguchi Yosuke, Yoshikawa Kayo, Takahashi Shigeru, Takahashi

Shori : A preterm infant who had severe retinopathy of prematurity after sildenafil administration for persistent pulmonary hypertension of the newborn, The neonate, Shanghai, China, 2016 Mar.

37. 不破一将, 長野伸彦, 香山一憲, 加藤亮太, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : 性分化疾患を疑った 10 番染色体長腕部分欠損の 1 例, 第 119 回日本小児科学会, 北海道, 2016 年 5 月.

38. 安藤正恵, 長野伸彦, 不破一将, 香山一憲, 鈴木琢真, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : 妊婦健診で 3 回の細菌検査で陰性であった遅発型 B 群溶血性連鎖球菌敗血症の乳児例, 第 52 回日本周産期・新生児医学会, 富山, 2016 年 7 月.

39. 並木秀匡, 田口洋祐, 安藤正恵, 不破一将, 香山一憲, 鈴木琢真, 加藤亮太, 岡橋彩, 吉川香代, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里, 越永従道 : 臍帯潰瘍による出血性ショックから高度の腎障害を来し、腹膜透析を施行した 1 例, 第 61 回日本新生児成育医学会, 大阪, 2016 年 12 月.

40. 関みつ子, 不破一将, 大西真, 早川智, Kim D.W., Kilgore P.E., Kilian M. : Pneumococcal serotyping using the Loop-mediated isothermal amplification method, 第 91 回感染症学会総会, 東京, 2017 年 4 月.

41. 不破一将, 高野智圭, 黒田和道, 関みつ子, 早川智 : LAMP 法によ

るウレアプラズマの迅速な検出法の開発，第 91 回感染症学会総会，東京，
2017 年 4 月．

42. Fuwa Kazumasa, Takano Chika, Seki Mitsuko, Kuroda Kazumichi, Hirata
Yoshiyasu, Yanagihara Itaru, Hayakawa Satoshi : Rapid and simple detection of
Ureaplasma species from vaginal swab samples using Loop-Mediated Isothermal
Amplification method, Pediatric academic societies meeting 2017, San Francisco, USA,
2017 May.

43. 岡橋彩，安藤正恵，不破一将，香山一憲，鈴木琢真，加藤亮太，田
口洋祐，吉川香代，細野茂春，高橋滋，高橋昌里：Pena-Shokeir 症候群 1
型の在宅療養にむけて，第 53 回日本周産期・新生児医学会，神奈川，2017
年 7 月．

44. 加藤亮太，不破一将，安藤正恵，香山一憲，岡橋彩，田口洋祐，吉
川香代，細野茂春，高橋滋，高橋昌里：出生後の脳の組織酸素飽和度
(rSO₂)と経皮的動脈血酸素飽和度(SpO₂)について，第 53 回日本周産期・新
生児医学会，神奈川，2017 年 7 月．

45. 不破一将，長野伸彦，日根幸太郎，細野茂春，高橋昌里：日本大学
医学部板橋病院での NCPR 講習会の開催の状況と今後の課題，第 10 回日本
蘇生科学シンポジウム，神奈川，2017 年 7 月．

II 論文

① 原著論文

1. Kayama Kazunori, Okada Tomoo, Fuwa Kazumasa, Nagano Nobuhiko, Hosono Shigeharu, Takahashi Shigeru, Takahashi Shori : Apolipoprotein A-V concentration in preterm infants, *Journal of Clinical Lipidology*, 9(5), 647-51, 2015.
2. Quang D. Trinh, Ngan Thi Kim Pham, Fuwa Kazumasa, Takada Kazuhide, Komine-Aizawa Shihoko, Honda Mitsuo, Ushijima Hiroshi, Hayakawa Satoshi : High Mobility Group Box 1 Protein Enhances HIV Replication in Newly Infected Primary T Cells, *Clinical Laboratory*, 62(12), 2305-2311, 2016.
3. Fuwa Kazumasa, Seki Mitsuko, Hirata Yoshiyasu, Yanagihara Itaru, Nakura Yukiko, Takano Chika, Kuroda Kazumichi, Hayakawa Satoshi : Rapid and Simple Detection of *Ureaplasma* Species from Vaginal Swab Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method, *American Journal of reproductive immunology*, In press.

② 症例報告

1. 今西利之, 不破一将, 林至恩, 菅野雅美, 川畑建, 宮林寛, 菅野啓一, 清水正樹, 川嶋寛, 中村譲 : 先天性乳び胸に対する胸膜癒着術(抗悪性

腫瘍薬 OK-432)の治療効果, 埼玉県医学会雑誌 49 : 316-321, 2014.

2. Fuwa Kazumasa, Hosono Shigeharu, Nagano Nobuhiko, Munakata Shun, Fukamachi Ritsuko, Okada Tomoo, Takahashi Shigeru, Takahashi Shori, Sato Naoyuki, Nakayama Tomohiro : Japanese neonate with congenital chloride diarrhea caused by SLC26A3 mutation, Pediatrics International, 57(1), e11-3, 2015.

3. Fuwa Kazumasa, Kubota Mitsuru, Kanno Masami, Miyabayashi Hiroshi, Kawabata Ken, Kanno Keiichi, Shimizu Masaki : Mitochondrial Disease as a Cause of Neonatal Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, Case Reports in Pediatrics, 3932646 2016.

4. 今泉隆行, 長野伸彦, 不破一将, 日根幸太郎, 田口洋祐, 吉川香代, 臼倉幸宏, 細野茂春, 高橋滋, 高橋昌里 : 乳び胸腹水による胎児水腫を来した色素血管母斑症 IIb 型の 1 例, 小児科臨床 70 : 1271-1275, 2017.

5. Fuwa Kazumasa, Hosono Shigeharu, Nagano Nobuhiko, Takahashi Shori, Nakashima Motohiro : Retinopathy of prematurity after administrating sildenafil, Pediatrics International, 59(3):360-361, 2017.

③ 総説

1. 不破一将, 早川智 : 周産期領域におけるウレアプラズマ, 臨床と微

生物, 43(4):367-373, 2016.

2. Fuwa Kazumasa, Hayakawa Satoshi : Mechanisms and possible controls of the in utero Zika virus infection: Where is the Holy Grail?, American Journal of Reproductive Immunology, 77(2): e12605, 2016.

III 著書

1. 不破一将, 細野茂春 : 炭酸水素ナトリウムの希釈をグルコースでするべからず 周産期診療べからず集 周産期医学, 671-672, 東京医学社, 東京, 2015.
2. 不破一将, 細野茂春 : 感染性羊水混濁と胎便性羊水混濁を同一と思うべからず 周産期診療べからず集 周産期医学, 719-720, 東京医学社, 東京, 2015.
3. 不破一将, 細野茂春 : 白血球増多で白血球分画の確認を忘れるべからず 周産期診療べからず集 周産期医学, 721-723, 東京医学社, 東京, 2015.
4. 不破一将 : 新生児編 風疹感染症 周産期医学必修知識第 8 版, 653-655, 東京医学社, 東京, 2016.