

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16188

研究課題名（和文）腔内マイクロビオータ解析に基づく女性生殖器感染症に対するテーラーメイド治療法の開発

研究課題名（英文）Development of tailor-made treatments for female genital tract infections based on vaginal microbiota analysis.

研究代表者

山岸 由佳（Yamagishi, Yuka）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：60512241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：不妊・不育治療は発展しているが腔内細菌叢に着目した治療法は未確立で、日本人の不妊及び不育治療中患者の腔内細菌叢を網羅的に解析した報告はほとんどない。そこで、本研究では、日本人女性を対象に不妊及び不育治療中患者の腔内細菌叢を解析した結果、妊娠群では流産群と出産群において菌叢に有意な差は認められなかった。妊娠群と非妊娠群においてはLactobacillusの占有率、卵管や精子機能に異常がないことが必ずしも妊娠に寄与しない一方で、妊娠の有無により菌叢が有意に異なり、さらに複数の代謝経路における機能遺伝子数が有意に異なった。以上より菌叢の差異による代謝の変化が妊娠に影響を与うる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊とは、妊娠を望む健康な男女が避妊をしないで性交をしているにもかかわらず一定期間妊娠しないものを、不育とは流産あるいは死産が2回以上ある状態を指す。不妊症と不育症は原因やリスク要因の違いはあっても、生殖や周産期分野で重要な課題の一つであり、安価で質の高い治療法を確立することは急務である。本研究では日本人の腔内細菌叢を対象に解析した結果、流産や出産に関連する菌叢の差異は認められなかったものの、妊娠の有無による菌叢の差異及びそれに付随した代謝の変化が妊娠に影響を与うる可能性を示したことで、未だ確立されていない腔内細菌叢に焦点を当てた治療法確立のための足掛かりとなるデータを取得したと考える。

研究成果の概要（英文）：Infertility and recurrent pregnancy loss (RPL) treatments have been developed to date. However, treatment methods targeting the vaginal microbiota (VM) have not yet been established. Furthermore, there have been few reports of comprehensive analysis of VM of Japanese patients with infertility and RPL treatment. In this study, we analyzed VM of Japanese women with infertility and RPL treatment. The results showed no significant difference in VM between the miscarriage and delivery groups in the pregnancy group. In the pregnant and non-pregnant groups, Lactobacillus occupancy and the absence of abnormalities in the fallopian tubes and sperm function did not necessarily contribute to pregnancy. However, VM differed significantly between pregnant and non-pregnant groups, and the number of functional genes in multiple metabolic pathways also differed significantly, suggesting that changes in metabolic pathways due to differences in VM may influence pregnancy.

研究分野：感染症学

キーワード：不妊 腔内細菌叢 16s rRNAメタゲノム解析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腔内細菌叢は、その大部分を *Lactobacillus* が占める多様性の低い菌叢であることが知られている¹。*Lactobacillus*は腔内で乳酸や過酸化水素を産生し、腔内の pH を 4 から 5 に保つことで、病原菌の侵入や増殖を防いでいると考えられており²⁻⁵、この菌叢は健康状態や性交渉、妊娠の有無で変化することが知られている⁶。日本産婦人科学会は、不妊とは、妊娠を望む健康な男女が避妊をしないで性交をしているにもかかわらず、一年間妊娠しないものと定義している。女性の妊孕性は 30 代後半から低下することが知られているにもかかわらず⁷、日本における不妊治療の開始年齢は諸外国に比べて高いのが現状である⁸。不妊治療の種類は、タイミング法、人工授精、体外受精と複数種類があるが、そのステップが上がるほど治療費は高額となり、また治療を施される女性に対する負担も増加するため、早い段階及び少ない治療回数で妊娠および出産に至ることが望ましい。不妊治療は、経腔超音波の登場、ゴナドトロピン製剤をはじめとする薬剤の開発、胚の凍結技術の向上等進化の一途をたどってはいるが、腔内や子宮内細菌叢に着目した治療法は未だ確立されていない。また、日本において不妊治療中患者の腔内細菌叢を網羅的に解析し、早流産、妊娠率及び出生率との関連性を検討した報告はほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、日本人女性を対象に不妊又は不育治療中患者の腔内細菌叢を解析することで、その後の妊娠および出生率や疾病の発症リスクと腔内細菌叢との関連性を解明する足掛かりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

2019 年 2 月から 2021 年 12 月までに高橋産婦人科に来院した不妊又は不育治療中患者 84 名の腔分泌液を滅菌スワブ (ESwab, Copan Diagnostics) にて採取し、実験に供した。

(2) 患者情報の調査

検体採取時の年齢、身長、体重、初潮年齢、結婚年齢、妊娠回数、出産回数、流産回数、中絶回数、各患者のクラミジア抗体、プロラクチン、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、フォスファチジルエタノールアミン抗体、第 XII 凝固因子活性、ループス抗凝血素、プロテイン S 抗原量、プロテイン C 活性、ループスアンチコアグラントの値、卵管の状態、精子の質及びサンプル採取後 6 ヶ月と 12 ヶ月以内の妊娠、出産、流産の有無を調査した。

(3) 16S rRNA メタゲノム解析法による菌叢解析

腔分泌物からガラスビーズ法により DNA を抽出し⁹、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を含む領域 (341F-785R) を、バーコード配列を含むプライマーを用い増幅した¹⁰。増幅後、精製を行い、ライブラリーを作製し、MiSeq (Illumina, Inc USA) によりシーケンスを取得した。得られたシーケンス情報を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索を行い、分類階級ごとにその菌種構成比を算出した。さらに、科レベル及び属レベルでの菌種構成比の結果を元に多様性解析を行った。

(4) 群間比較解析

細菌の存在量の差異により生物学有意性を示す細菌を探索するため、細菌の相対的存在量に基づく群間比較法である Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) 解析 (LDA スコア > 2.0 、 $p < 0.05$) を行った。

(5) 機能遺伝子量の予測

16S rRNA メタゲノム解析データから機能遺伝子量を予測するため、Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) を用いて、16S rRNA メタゲノム解析データに由来する相対的な Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ機能組成の情報を得た。

(6) 細菌の分離及び同定

腔分泌液から非選択培地及び選択培地を用いて細菌の分離培養を行い、得られた分離株はスキムミルク中に懸濁し、 -80°C にて保存した。菌株は MALDI-TOF MS (Bruker) にて菌種同定を行った。

4. 研究成果

患者の 6 ヶ月及び 12 ヶ月以内の妊娠率を調査した結果、それぞれ 27.4% (23/84 名)、40.5% (34/84 名) であった。妊娠の有無により、患者の年齢、身長、体重、初潮年齢、結婚年齢、妊娠回数、出産回数、流産回数、中絶回数、クラミジア抗体、プロラクチン、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、フォスファチジルエタノールアミン抗体、第 XII 凝固因子活性、ループス抗凝血素、プロテイン S 抗原量、プロテイン C 活性、ループスアンチコアグラントを比較した結果、6 ヶ月以内の妊娠群の体重及び 12 ヶ月以内の妊娠群の身長が非妊娠群に比べ有意に高く、その他の項目については有意な差は認められなかった。

84名の菌叢を16S rRNAメタゲノム解析により比較した結果、科レベルにおいては、77.4% (65/84名)はFirmicutesを、17.9% (15/84名)はActinobacteriotaを、2.4% (2/84)はProteobacteriaを50%以上保有する菌叢であった。

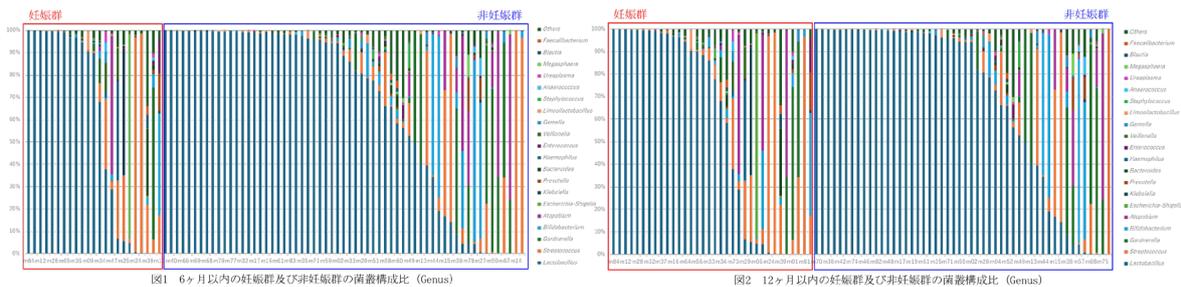


図1 6ヶ月以内の妊娠群及び非妊娠群の菌叢構成比 (Genus)

図2 12ヶ月以内の妊娠群及び非妊娠群の菌叢構成比 (Genus)

属レベルにおいては、65.5% (55/84名)の患者は*Lactobacillus*を50%以上保有する多様性の低い菌叢 (*Lactobacillus*-dominated microbiota: LDM)であった。一方残りの患者は、*Lactobacillus*の保有率が50%以下で、*Streptococcus*、*Gardnerella*、*Bifidobacterium*、*Atopobium*等を含む多様性に富む菌叢 (*Lactobacillus*-non dominated microbiota: LNDM)であった。6ヶ月以内の妊娠群は、LDMが56.5% (13/23名)であったのに対し、非妊娠群はLDMが68.9% (42/61名)であった (図1)。12ヶ月以内の妊娠群は、LDMが58.8% (20/34名)であったのに対し、非妊娠群はLDMが70.0% (35/50名)であり (図2)、両期間において妊娠率に有意な差は認められなかった。

また、6ヶ月及び12ヶ月以内の妊娠群においてそれぞれ21.7% (5/23名)、20.0% (6/34名)が出産に、30.4% (7/23名)、35.3% (12/34名)が流産に至った。残りの患者においては出産又は流産に関する情報は未取得であった。

両期間における妊娠群対非妊娠群、出産群対流産群の多様性解析を実施した結果、どちらにおいても α 及び β 多様性に有意な差は認められなかった。

次に、卵管因子及び男性因子を除外するため、卵管狭窄5名、乏精子症1名、精子無力症1名、データ未取得6名の計13名を除外し、71名の6ヶ月及び12ヶ月以内の妊娠率を集計した結果、それぞれ28.2% (20/71名)、43.7% (31/71名)であった。

また、6ヶ月及び12ヶ月以内の妊娠群においてそれぞれ20.0% (4/20名)、16.1% (5/31名)が出産に、30.0% (6/20名)、35.5% (11/31名)が流産に至った。残りの患者においては出産又は流産に関する情報は未取得であった。

71名の両期間における妊娠群対非妊娠群、出産群対流産群の多様性解析を実施した結果、どちらにおいても α 及び β 多様性に有意な差は認められなかった。

さらに、卵管及び精子の状態を回顧的に調査し、それぞれまたは共に異常が認められない患者を選抜した。卵管に異常が認められない患者は52名で、6ヶ月以内の妊娠率は28.8% (15名/52名)、12ヶ月以内の妊娠率は44.2% (24/52名)であった。卵管に異常が認められない患者の6ヶ月及び12ヶ月以内の妊娠群においてそれぞれ20.0% (3/15名)、16.7% (4/24名)が出産に、40.0% (6/15名)、35.5% (9/24名)が流産に至った。残りの患者においては出産又は流産に関する情報は未取得であった。

また、精子に異常が認められない患者は35名で、6ヶ月以内の妊娠率は25.7% (9/35名)、12ヶ月以内の妊娠率は37.1% (13/35名)であった。精子に異常が認められない患者の6ヶ月及び12ヶ月以内の妊娠群においてそれぞれ11.1% (1/9名)、7.7% (1/13名)が出産に、22.2% (2/9名)、38.5% (5/13名)が流産に至った。残りの患者においては出産又は流産に関する情報は未取得であった。

卵管又は精子に異常が認められない患者の両期間における妊娠群対非妊娠群の多様性解析を実施した結果、 α 及び β 多様性に有意な差は認められなかった。また、卵管に異常が認められない患者の両期間における出産群対流産群の多様性解析においても同様に、 α 及び β 多様性に有意な差は認められなかった。

さらに、卵管と精子共に異常が認められなかった患者は23名で、6ヶ月以内の妊娠率は30.4% (7/23名)、12ヶ月以内の妊娠率は39.1% (9/23名)であった。卵管及び精子共に異常が認められない患者の菌叢を12ヶ月以内の妊娠の有無により比較した結果、 α 及び β 多様性に有意な差

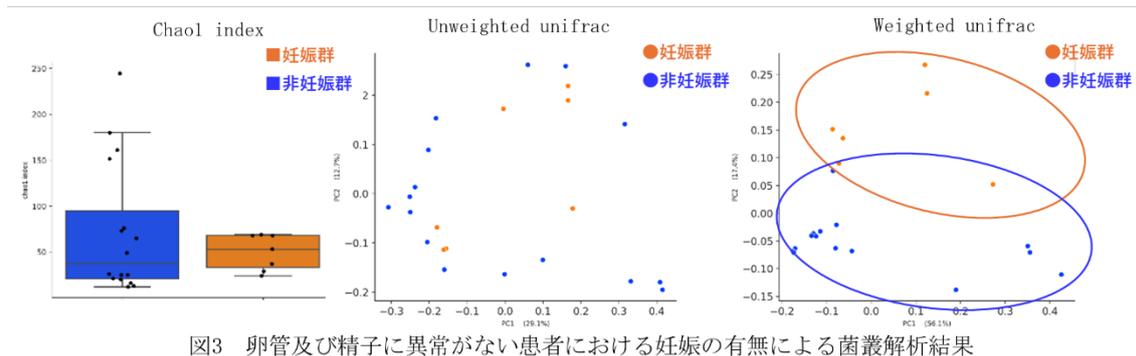


図3 卵管及び精子に異常がない患者における妊娠の有無による菌叢解析結果

は認められなかった。一方で、6ヶ月以内の妊娠の有無により比較した結果、 α 多様性には有意な差は認められなかったものの、 β 多様性において菌叢に有意な差が認められた(図3)。

23名を対象としたLEfSe解析による群間比較の結果、6ヶ月以内の妊娠群では*Streptococcus*及び*Prevotellaceae_UCG_001*が、非妊娠群では*Lactobacillus*及び*Gardnerella*が特徴的な細菌として検出された(図4)。

次に、23名より分離された計205株の菌種同定の結果、妊娠群のみから検出された菌種は10菌種、非妊娠群のみから検出されたのは22菌種、共通で検出されたのは9菌種であった。妊娠群においては、*Anaerococcus tetradius* (28.6%、2/7名)、*Klebsiella pneumoniae* (42.9%、3/7名)、*Streptococcus anginosus* (71.4%、5/7名)の検出率が非妊娠群に比べ有意に高かった。*Streptococcus agalactiae*は両群から検出されたが、検出率に有意な差は認められなかった。*L. jensenii*及び*L. plantarum*及び*Lactobacillaceae*である*Limosilactobacillus vaginalis*は非妊娠群からのみ検出された。*L. crispatus*と*L. gasseri*は両群から検出されたが、検出率に有意な差は認められなかった。また、*Gardnerella vaginalis*は非妊娠群からのみ検出された。

さらに、16S rRNAメタゲノム解析データを基に機能遺伝子量の予測を行った結果、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー生合成、シトクロムP450による生体異物代謝、グリセロ脂質代謝、脂肪酸分解の経路において、妊娠群で有意に増加した機能遺伝子が存在した。グリセロリン脂質代謝経路においては、妊娠群又は非妊娠群において異なる機能遺伝子がそれぞれ有意に増加した。

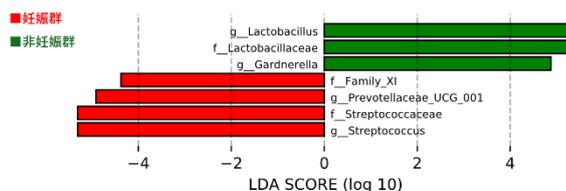


図4 卵管及び精子に異常がない患者における妊娠の有無による群間比較解析結果

本研究では、日本人女性を対象に、不妊又は不育治療中患者の腔内細菌叢を解析した。16S rRNAメタゲノム解析法の結果、不妊又は不育治療中の日本人女性の腔内細菌叢は大きく分けて*Lactobacillus*優勢の菌叢と*Lactobacillus*非優勢の菌叢に分類されることが明らかとなった。*Lactobacillus*非優勢の菌叢は、*Lactobacillus*優勢の菌叢に比べて多様性が高く、*Lactobacillus*に加え多様な種類の細菌で構成されていたが、*Lactobacillus*の優勢、非優勢による妊娠率の差異は認められなかった。また、妊娠した患者の内、流産または出産に至った患者の間にも菌叢の差異は認められなかった。一方で、卵管や精子機能に異常がなくとも妊娠率に大きな変化は認められなかったものの、妊娠の有無により腔内菌叢は有意に異なった。群間比較解析において、非妊娠群で*Lactobacillus*と*Gardnerella*が特徴的な細菌として検出された。これは臨床分離株の同定結果とも一致しており、*L. jensenii*、*L. plantarum*、*Limosilactobacillus vaginalis*、*Gardnerella vaginalis*が非妊娠群でのみ検出された。Ravelらは、4つの民族の腔内細菌叢を、*L. crispatus*、*L. iners*、*L. gasseri*、*L. Jensenii*がそれぞれ優勢なグループ、偏性嫌気性菌が優勢なグループの計5つのグループに分類している¹¹。*L. crispatus*以外が優勢菌種の場合、pHが高値となることを示しており、本研究においても*Lactobacillus*の優勢菌種の違いにより腔内環境が異なることで妊娠に与える影響も変化する可能性が示唆された。また、*Gardnerella*は細菌性陰症関連細菌として知られており、細菌性陰症は不妊と関連する可能性が報告されている¹²。妊娠群においては*Streptococcus*が特徴的な細菌として検出され、臨床分離株の同定結果においても複数の*Streptococcus*が妊娠群からのみ検出された。B群溶血性連鎖球菌である*S. agalactiae*は、新生児敗血症や髄膜炎の起原菌として知られているが¹³、本研究では*S. agalactiae*の検出率は妊娠の有無により有意な差は認められなかった。*Streptococcus*は*Lactobacillus*同様乳酸産生細菌であり、*Lactobacillus*ではなく*Streptococcus*優勢な細菌叢であっても乳酸産生によりpHを低値に保つことで妊娠に寄与する腔内細菌叢として機能する可能性が示唆された。さらに、機能遺伝子量の解析により、妊娠の有無により脂質代謝に差異が生じる可能性が示唆された。Matorrasらは、体外受精周期の子宮内膜液の脂質組成パターンを比較した結果、着床が起こらなかった患者においてグリセロリン脂質が有意に少ないことを報告している¹⁴。また、Fuらは反復性着床不全患者の腔内細菌叢のメタボローム解析により、反復性着床不全患者においてグリセロリン脂質が有意に低値であることを示した¹⁵。本研究では、妊娠の有無によりグリセロリン脂質代謝に関連する機能遺伝子の増減パターンが異なったことから、グリセロリン脂質代謝と妊娠には何らかの関連性があること、さらには妊娠に至らない不妊の患者は、着床不全のリスクも保有する可能性が示唆された。

参考文献

- ① J.H. van de Wijgert, H. Borgdorff, V. Jespers, The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? PLoS One. Aug 22;9(8):e105998, 2014.

- ② B. Ma, L.J. Forney, J. Ravel. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 2012. *Annu Rev Microbiol.* Jun;66: et al.371-89, 2012.
- ③ J. Kaewsrichan, K. Peeyananjarassri, J. Kongprasertkit. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct;48(1):75-83, 2006.
- ④ J.P. Gharthey, B.C. Smith, R.D. Burk, et al. *Lactobacillus crispatus* dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against *Escherichia coli*. *PloS One* 9, 2014. *PLoS One.* May 7;9(5):e96659, 2014.
- ⑤ M. Aldunate, D. Srbinovski, G. Tachedjian, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis, *Front Physiol.* Jun 2;6:164, 2015.
- ⑥ R P Nugent, M A Krohn, S L Hillier. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation, *JClin. Microbiol.* 29, p.297-301, 1991. *J Clin Microbiol.* Feb;29(2):297-301, 1991.
- ⑦ J Menken, J Trussell, U Larsen. *Science.* Sep 26;233(4771):1389-94, 1986.
- ⑧ 石原理. 本邦の ART の成績. *臨床泌尿器科.* 73(13):962-966, 2019.
- ⑨ Kobayashi T, Jin JS, Kibe R, et al. Identification of Human Intestinal Microbiota of 92 Men by Data Mining for 5 Characteristics, i.e., Age, BMI, Smoking Habit, Cessation Period of Previous Smokers and Drinking Habit. *Biosci Microbiota Food Health.* ;32(4):129-137, 2013.
- ⑩ Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* Jan 7;41(1):e1, 2013.
- ⑪ Jacques Ravel, Pawel Gajer, Larry J. Forney, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108(Suppl 1): 4680-4687.
- ⑫ Jacques Ravel, Inmaculada Moreno, Carlos Simón. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2021 Mar;224(3):251-257.
- ⑬ John W Larsen, John L Sever. Group B Streptococcus and pregnancy: a review *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020 Sep;252:526-533.
- ⑭ Roberto Matorras, Ibon Martinez-Arranz, Cristina Alonso, et al. The lipidome of endometrial fluid differs between implantative and non-implantative IVF cycles *J Assist Reprod Genet.* 2020 Feb; 37(2): 385-394.
- ⑮ Min Fu, Xiaowei Zhang, Shangrong Fan, et al. Alterations in Vaginal Microbiota and Associated Metabolome in Women with Recurrent Implantation Failure. *mBio.* 2020 May-Jun; 11(3): e03242-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------