

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460226

研究課題名(和文) 流産早産の予防治療を可能とする破綻した膣内細菌叢の再構築に向けた情報取得

研究課題名(英文) Reconstruction of vaginal microbiota to prevent and treat miscarriage and premature birth

研究代表者

杉田 隆 (SUGITA, Takashi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10312076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：流産早産の多くは膣内の細菌叢の破綻により発症する非特異的病原体による細菌性の膣症が原因となる。従って、破綻した細菌叢を再構築することで新規な予防法あるいは治療法を開発できる可能性がある。以下の点を明らかにした。1) 妊婦の膣内細菌叢中に妊婦に優位なLactobacillus sp.1を同定した。2) Lactobacillus sp.1はGardnerella sp.の細胞傷害性と炎症サイトカイン産生を減弱させた。3) Gardnerella sp.に対するLAMP法を開発した。以上、Lactobacillus sp.1は細菌性膣症のプロバイオティクス療法の候補株となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Miscarriage and premature birth occur due to an unbalance in the vaginal microbiota. Therefore, novel prevention and therapeutic method should be able to reconstruct the unbalance in vaginal microbiota. During the last three years, we elucidated the following three issues; 1) Predominant Lactobacillus sp. 1 in pregnant women was identified by comprehensively analyzing vaginal microbiota using pyrosequencing method. 2) Cytotoxicity due to Gardnerella sp. was reduced in the presence of Lactobacillus sp. 1 on HeLa cell and also Lactobacillus sp. 1 inhibited the production of inflammatory cytokine. 3) LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) method was developed in order to detect Gardnerella sp. with high sensitivity and rapidly. These findings suggested that Lactobacillus sp. 1 has become a candidate of probiotics to prevent or treat bacterial vaginosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膣内細菌叢 妊婦 Lactobacillus

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の統計によれば流産・死産を2回以上経験する不育症患者は140万人にも達し、年々増加傾向にある。流産・早産の原因の多くは正常細菌叢の破綻による細菌性膣症である。本症の治療にはクロラムフェニコール膣錠やクリンダマイシン(保険適用外)が使用されているが、これらの抗菌薬の投与によっても有意な予防効果を示さないことがメタアナリシスで明らかにされている。抗菌薬による治療は、疾患誘発膣内細菌(悪玉)の除菌が主眼であるため正常細菌叢(善玉)が攪乱され再発率が高い。加えて、近年では耐性菌の出現率も上昇している。本研究の最終目的は破綻した膣内細菌叢の再構築に基づく流産・早産の予防・治療である。正常膣内細菌を外的に膣内に補充することにより、正常細菌叢が再構築されることが期待される。

## 2. 研究の目的

流産・早産の多くは、膣内の細菌叢の破綻によって発症する非特異的病原体による細菌性膣症が原因となる。本研究は、破綻した細菌叢を再構築することにより新規な予防・治療法の開発を目的とする。具体的には、1) 妊娠群および非妊娠群の膣内細菌叢を、細菌ゲノム情報をフル活用して大規模解析し、2) 両群に優位な膣内細菌の膣上皮細胞に対する免疫応答から炎症性能力を理解する。3) ベッドサイドで利用できる、膣内細菌の高感度および迅速検出法を開発する。

## 3. 研究の方法

1) 妊婦の膣内細菌叢の解析  
経時的に採取した妊婦の膣内細菌叢を次世代シーケンサー (FLX454) を用いて網羅的に解析した。菌叢解析は、UnfFrac 距離分析、主成分分析法等を用いた。  
2) 膣内細菌の膣上皮細胞に対する免疫応答  
上記1) で検出された優位菌 *Lactobacillus* sp.1 が *Gardnerella* sp. (悪玉) の細胞傷害性を抑制するかを HeLa 細胞を用いて検討した。また、炎症性サイトカイン応答への影響についても検討した。  
3) 膣内細菌の迅速・高感度検出法  
*Lactobacillus* sp.1 および *Gardnerella* sp. に対する迅速かつ高感度検出が臨床現場 (ベッドサイド) で使用可能となれば妊婦にとって福音である。当該菌種のゲノム情報をもとに LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法用のプローブを作製し、臨床検体を用いて感度および特異性を調べた。

## 4. 研究成果

1) 妊婦の膣内細菌叢の解析  
経時的に菌叢が安定している妊婦も存在し

たが、菌交代が生じた妊婦も存在した。最も優位な細菌として、*Lactobacillus* sp.1 が同定された。これは多くの妊婦検体から検出された。Non-*Lactobacillus* spp. として、*Gardnerella* sp. が優位な妊婦も存在した。これらの菌種に対して特異プローブを作製し、qPCR でも検出することにより結果を再確認した。

2) 膣内細菌の膣上皮細胞に対する免疫応答

HeLa 細胞に *Lactobacillus* sp.1 と *Gardnerella* sp. を同時添加すると *Gardnerella* sp. の増殖が抑制されたが、*Gardnerella* sp. 定着後に *Lactobacillus* sp.1 を加えても有意な抑制作用は認められなかった。*Lactobacillus* sp.1 の培養上清も *Gardnerella* sp. の増殖を抑制した。さらに、炎症性サイトカイン産生も抑制した。以上のことから、*Lactobacillus* sp.1 は、細菌性膣症の予防・治療を目的としたプロバイオティクスの候補となりうると思えられた。

3) 膣内細菌の迅速・高感度検出法

*Gardnerella* sp. に対しては、検出感度は >10fg であり、また検出用に要した時間はわずか30分であった。実際のヒト膣細菌検体を用いたところ、一般的なPCRよりも検出感度および検出時間の点で優れていた。*Lactobacillus* sp.1 については、特異性の再確認中である。

## 5. 主な発表論文

(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 6 件)

1. Cho O, Saito M, Tsuboi R, Kato H, Nishikawa A, Nakajima S, Sugita T. Relationships among the Genotypes of *Malassezia globosa* colonizing patients with atopic dermatitis, the clinical severity of the disease, and the level of specific IgE antibodies. *J Clin Exp Dermatol Res* 4, 5, 2013. 査読あり
2. Li C, Ran Y, Sugita T, Zhang E, Xie Z, Cao L. *Malassezia* associated hyperkeratosis of the nipple in young females: report of three cases. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 80, 79-81, 2014. 査読あり
3. Hiruma M, Cho O, Hiruma M, Kurakado S, Sugita T, Ikeda S. Genotype analyses of human commensal scalp fungi, *Malassezia globosa*, and *Malassezia restricta* on the scalps of patients with dandruff and healthy subjects. *Mycopathologia*. 2014 177; 263-9. 査読あり
4. Tanaka A, Cho O, Saito M, Tsuboi R,

- Kurakado S, Sugita T. Molecular characterization of the skin fungal microbiota in patients with seborrheic dermatitis, *J. Clin. Exp. Dermatol. Research*, 2014, 5, 239. 査読あり
5. Takemoto A, Cho O, Morohoshi Y, Sugita T, Muto M. Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. *J. Dermatol.* 42, 166-170, 2015. 査読あり
  6. Cho O, Matsukura M, Sugita T, Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping, *Int. J. Infect. Dis.* 39, 87-88, 2015. 査読あり
  7. 杉田 隆, マラセチアの菌学、日本臨床皮膚科医会雑誌、30、516-520、2013 査読なし
  8. 杉田 隆, 興味のないマラセチア研究、*広島医学*、68、226、2015 査読なし
  9. Harada K, Saito M, Sugita T, Tsuboi R, *Malassezia* species and their associated skin diseases, *J Dermatol.* 42:250-7, 2015 査読なし
- [学会発表](計 21件)
1. Sugita T. Comparative genomics of *Malassezia*: A breakthrough in our knowledge. 5th Congress of Asia Pacific Society of Medical Mycology, 2013/06, Chengdu, China,
  2. Watanabe A, Zhang E, Tsuboi R, Nishikawa A, Sugita T. DNA sequence comparison of the *Malassezia restricta* mating type locus (MAT). 5th Congress of Asia Pacific Society of Medical Mycology, 2013/06, Chengdu, China
  3. Zhang E, Watanabe A, Tsuboi R, Sugita T. Comparison of DNA sequences of mating type locus of *Malassezia restricta*. Asian Mycological Congress 2013 and the 13th International Marine and Freshwater Mycology Symposium, 2013/08, Beijing, China
  4. Sugita T. Skin microbiota and related skin diseases. 21th Annual Meeting of Korean Society of Medical Mycology, 2014/05, Seoul, Korea
  5. Cho O, Sugita T, Lipase gene expression by *Malassezia globosa* and *M. restricta* in the human scalp, 19<sup>th</sup> ISHAM Congress, 2015/05, Melbourne, Australia
  6. 杉田 隆, マラセチア2013、第57回日本医真菌学会総会、2013/09、東京
  7. 渡辺愛弓、張 恩実、石橋芳雄、坪井良治、西川朱実、杉田 隆、*Malassezia*に対するヒトケラチノサイトの応答、第57回日本医真菌学会総会、2013/09、東京
  8. 渡辺愛弓、張 音実、中島早苗、坪井良治、杉田 隆、皮膚常在菌 *Malassezia* sppに対するケラチノサイトの応答、第57回日本薬学会関東支部大会、2013/10、東京
  9. 渡辺愛弓、張 音実、中島早苗、杉田 隆、皮膚常在微生物マラセチアとディフェンシン応答、日本薬学会第134年会、2014/03、熊本
  10. 杉田 隆、特別講演 興味のないマラセチア研究-マラセチアと疾患との関わり、広島皮膚科医会4月例会、2014/04、広島
  11. 藤岡志水、荻島大貴、村田佳菜子、佐野靖子、佐藤杏奈、松岡祐子、坂本昇子、田中里美、矢田昌太郎、菅直子、杉田 隆、妊娠中の腔内細菌叢の次世代シーケンサーを用いた解析、第50回日本周産期・新生児医学会総会、2014/6、東京
  12. 杉田 隆、張 音美、倉門早苗、坪井良治、荻島大貴、シンポジウム「ビッグデータ時代に向けた次世代細菌学・真菌学研究」、皮膚および腔微生物叢の解析と疾患制御への応用、第97回日本細菌学会関東支部総会、2014/11、東京
  13. 杉田 隆、ゲノム解析から見えてきたマラセチアの病原因子、第58回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
  14. 谷畑望美、張 音実、杉田 隆、角栓中の微生物叢の網羅的解析と光照射の影響、日本薬学会第135年会、2015/03、神戸
  15. 斉藤知慧、張 音実、杉田 隆、ケラチノサイトに対する皮膚常在微生物 *Malassezia* と *Staphylococcus epidermidis*の作用、日本薬学会第135年会、2015/03、神戸
  16. 杉田 隆、張 音実、倉門早苗、正常妊婦の腔内細菌叢の網羅的解析、日本薬学会第135年会、2015/03、神戸
  17. 杉田 隆、ヒト常在微生物の網羅的解析-疾患と健康増進-、第64回神奈川医真菌研究会、2015/6、横浜
  18. 斉藤知慧、張 音実、杉田 隆、*Staphylococcus aureus* と *Malassezia* による菌叢バランスの理解と制御、第59回日本薬学会関東支部大会、2015/9、千葉

19. 杉田 隆、張 音実、高島 昌子、教育講演：NGS を活用した医真菌研究の実際、第59回日本医真菌学会、2015/10、札幌
20. 齊藤知慧、張音実、杉田 隆、菌叢バランスの制御による皮膚環境の適正化 - StaphylococcusとMalasseziaの相互作用 - 、第59回日本医真菌学会、2015/10、札幌
21. 齊藤知慧、張 音実、杉田 隆、皮膚マイクロバイオーーム環境の適正化：細菌と真菌の相互作用、日本薬学会第136年会、2016/3、横浜
22. 東出 誠司、張 音実、荻島大貴、杉田隆、LAMP 法を用いた膣スメア検体からの *Gardnerella vaginalis* の検出、第89回日本細菌学会総会、2016/3、大阪

〔図書〕(計 2 件)

1. 杉田 隆、微生物の簡易迅速検査法：第5章生体微生物、第2節体表微生物、テクノシステム、編集：五十君静信、江崎孝行、高島浩介、土戸哲明、pp. 317-323, 2013
2. 杉田 隆、倉門早苗、池田玲子、目でみる真菌と真菌症：真菌細胞の構造、pp. 16-22、2014、編集：亀井克彦、医薬ジャーナル社、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田隆 (SUGITA, Takashi)  
明治薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：10312076

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし