

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 3 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462504

研究課題名(和文) ミクロビオータ解析に基づいた感染症新規治療法開発の試み

研究課題名(英文) Investigation on development of therapeutic method for infectious diseases based on microbiome analysis

研究代表者

三嶋 廣繁 (MIKAMO, Hiroshige)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00262775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膣内細菌叢ではLactobacillus属が病原菌の侵入や増殖を防いでいるが、健康状態、性交渉、妊娠でその構成が変化する。非妊婦、妊婦およびcommercial sex worker (CSW)の女性の膣分泌物を採取し、T-RFLP法及び16Sメタゲノム解析法により膣内ミクロビオータを解析し、得られた膣内ミクロビオータ構成比の結果を元にクラスター解析及び多様性解析を実施した。また、膣分泌物を培養しLactobacillus属の分離率を算出した。女性生殖器感染症や早産防止のためにプロバイオティクス等を用いて女性の膣内細菌叢を制御することは新たな感染症治療法になり得ることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The genus Lactobacillus species prevent invasion and proliferation of pathogenic bacteria in the vaginal flora, while its composition changes with health condition, sexual intercourse and pregnancy. We collected vaginal secretions of non-pregnant women, pregnant women and commercial sex worker (CSW). Vaginal microbiota was analyzed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) method and 16S metagenomic analysis method, and based on the results of vaginal microbiota composition ratios, cluster analysis and diversity analysis was carried out. In addition, vaginal secretions were cultured and the isolation rate of Lactobacillus species was calculated. It has become clear that controlling female vaginal flora by using probiotics and so on for prevention of female genital infections and premature birth could be a new treatment method for infectious diseases.

研究分野：感染症学、化学療法学、感染制御学、臨床微生物学、産婦人科感染症学、周産期医学、性感染症学

キーワード：網羅的細菌叢解析 16Sメタゲノム解析法 次世代シーケンサー 膣内細菌叢 細菌性膣症 早産 Lactobacillus

## 1. 研究開始当初の背景

女性の膣内細菌叢は、腸内細菌叢等とは異なり、通常その大部分を *Lactobacillus species* が占める多様性の低い菌叢であることが知られている。*Lactobacillus spp.*は膣内で乳酸や過酸化水素を産生し、膣内の 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、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。一方、何らかの原因により膣内の *Lactobacillus spp.*が減少すると、好気性菌や嫌気性菌が異常増殖することで、細菌性膣症のリスクが高まり、妊婦では早産や流産が引き起こされることが報告されている。さらに、Commercial Sex Worker (CSW)では、細菌性膣症の罹患率が高く、細菌性膣症に罹患することで HIV 等の性感染症のリスクが高まることが報告されている。

## 2. 研究の目的

海外において膣内細菌叢を網羅的に解析し、HIV 等の性感染症、あるいは早流産との関連性を検討した報告は複数存在するが、日本においての報告はほとんどない。また、CSW は細菌性膣症の罹患率が高いことから、通常とは異なる菌叢を保有する可能性がある。そこで本研究では、日本人の非妊婦、妊婦、CSW を対象に、膣内細菌叢を解析し、その差異を明らかにすることで、その後の疾病の発症リスクと膣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

### < 材料 >

2014 年 1 月から 2015 年 2 月までの期間に岐阜市内にある産科・婦人科いずみレディースクリニックに来院した非妊婦 22 名、妊婦 24 名、CSW 8 名の膣分泌液を滅菌スワブ (ESwab, Copan Diagnostics) にて計 54 検体採取し、実験に供した。

< Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法による菌叢解析 >

膣分泌物からガラスビーズ法により DNA を抽出し、5'末端を 6-FAM で蛍光標識したユニバーサルプライマー-27F と未標識の 926R を用い、16S rRNA 遺伝子を増幅した。増幅後、PCR 産物を制限酵素 (*Msp I*、*Hha I* 及び *Hae I*) により消化し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて蛍光標識されたフラグメントサイズを測定した。T-RFLP のフラグメントパターンに基づき、Operational taxonomic unit (OTU) に分類した後、得られた OTU 構成比についてワード法にて個体間のクラスター解析を行った。

### < 16S メタゲノム解析法による菌叢解析 >

T-RFLP 法と同一の DNA を鋳型として、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。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、属レベルでの菌種構成比について、ワード法にて個体間のクラスター解析を行い、シャノン指数を用いて多様性解析を行った。

### < *Lactobacillus spp.* の分離 >

膣分泌物を LBS 寒天培地 (LBS, Becton Dickinson) に塗抹し、嫌気条件下において 37 °C で 3 日間培養した。培地に生育したコロニーを観察し、各検体からの *Lactobacillus spp.* の分離率を算出した。

## 4. 研究成果

平均年齢は、非妊婦 33.4 歳 (23-46 歳)、妊婦 30.3 歳 (19-31 歳)、CSW 31.0 歳 (21-41 歳) であり、いずれの群間にも有意差は認められなかった。

T-RFLP フラグメントパターンに基づくクラスター解析の結果、膣内細菌叢は大きく 2 つのクラスター (クラスター T-1 および T-2) に分類された。クラスター T-1 が単一もしくは少数の

OTU(制限酵素毎の平均 OTU 数は *Msp* が 4.3、*Hha* が 5.5、*Hae* が 4.3)で構成される単純な菌叢を示したのに対し、クラスター-T2 は複数の OTU(平均 OTU 数は *Msp* が 7.9、*Hha* が 10.6、*Hae* が 9.1)で構成される複雑な菌叢を示した。また、16S メタゲノム解析法で得られた属レベルでの菌種構成比に基づくクラスター解析においても、T-RFLP 解析法と同様、大きく 2 つのクラスター(クラスター 16S-1 及び 16S-2)に分類された。クラスター 16S-1 は *Lactobacillus* 属優勢の単純な菌叢を示したのに対し、16S-2 は *Gardnerella* 属、*Bifidobacterium* 属、*Clostridium* 属、*Bacteroides* 属、*Adopobium* 属等多数の属種を含む *Lactobacillus* 属非優勢の複雑な菌叢を示した。

シャノン指数を用いた多様性解析の結果、いずれの解析法においても *Lactobacillus* 属優勢のクラスター(T-1 及び 16S-1)に比べて *Lactobacillus* 属非優勢のクラスター(T-2 及び 16S-2)で多様性が有意に高かった(T-1 vs T-2: 2.0±1.3 vs 4.6±2.8,  $p<0.01$ 、16S-1 vs 16S-2: 0.5±0.8 vs 2.4±1.0,  $p<0.01$ 、student-*t* test)。

両解析法において各クラスターに分類された非妊婦、妊婦、CSW の割合を表 1 に示す。非妊婦は *Lactobacillus* 属優勢のクラスターと *Lactobacillus* 属非優勢のクラスターに同程度分類され(T-1 vs T-2: 45.5% vs 54.5%, 16S-1 vs 16S-2: 45.5% vs 54.5%)、妊婦は *Lactobacillus* 属優勢クラスターに多く分類される傾向であった(T-1 vs T-2: 62.5% vs 37.5%, 16S-1 vs 16S-2: 70.8% vs 29.2%)。一方、CSW は両解析法において *Lactobacillus* 属非優勢のクラスターに多く分類され(T-1 vs T-2: 12.5% vs 87.5%, 16S-1 vs 16S-2: 12.5% vs 87.5%)、妊婦と CSW 間で有意差が認められた(表 1)。

各検体からの *Lactobacillus* spp. の分離率は、非妊婦では 68.2%(15/22 名)、妊婦では

50%(12/24 名)であったのに対し、CSW は 25%(1/7 名)と、非妊婦、妊婦と比べ低い傾向であった。

本研究では、日本人女性を対象に、非妊婦、妊婦、CSW の腔内細菌叢を T-RFLP 法および 16S メタゲノム解析法を用いて解析した。その結果、日本人女性の腔内細菌叢は大きく分けて *Lactobacillus* 属優勢の菌叢と *Lactobacillus* 属非優勢の菌叢の 2 つに分類されることが明らかとなった。*Lactobacillus* 属非優勢の菌叢は、*Lactobacillus* 属優勢の菌叢に比べて有意に多様性が高く、*Lactobacillus* 属に加え多様な種類の菌で構成されていた。さらに、非妊婦や妊婦に比べ、CSW の多くは *Lactobacillus* 属非優勢の菌叢を保有し、*Lactobacillus* spp. の分離率も低い傾向にあることが示唆された。CSW は、細菌性膣症及び性感染症を発症するリスクが高いことが知られており、本研究の結果から *Lactobacillus* 属非優勢の菌叢が影響している可能性が考えられた。今後は *Lactobacillus* 属非優勢の菌叢を保有する女性の疾病の有無と臨床検査値やその他の臨床的背景を後ろ向き及び前向きに調査し、腔内細菌叢との相関関係を解析することで、疾病の発症リスクやその因子を検討していく必要がある。

## 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 7 件)

Umemura T, Hamada Y, Yamagishi Y, Suematsu H, Mikamo H. Clinical characteristics associated with mortality of patients with anaerobic bacteremia. *Anaerobe*. 2016; 39: 45-50.

Nakai H, Hagihara M, Kato H, Hirai J, Nishiyama N, Koizumi Y, Sakanashi D, Suematsu H, Yamagishi Y, Mikamo H.

Prevalence and risk factors of infections caused by extended-spectrum -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. J Infect Chemother. 2016; 22(5): 319-326.

Mikamo H, Yuasa A, Wada K, Crawford B, Sugimoto N. Optimal treatment for complicated intra-abdominal infections in the era of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of combined therapy with metronidazole. Open Forum Infect Dis. 2016; 3(3): ofw143.

Hirai J, Sakanashi D, Huh JY, Suematsu H, Hagihara M, Kato H, Yamagishi Y, Fujita J, Mikamo H. The first human clinical case of chronic osteomyelitis caused by *Clostridium hydrogeniformans*. Anaerobe. 2017; 45: 138-141.

Yamagishi Y, Mikamo H, Kato H, Nishiyama N, Asai N, Koizumi Y, Sakanashi D, Suematsu H, Matsuura K, Hagihara M. Efficacy of tedizolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Peptostreptococcus anaerobius* in thigh mixed-infection mouse model. J Infect Chemother. 2017; 23(6): 368-373.

Yamagishi Y, Nishiyama N, Koizumi Y, Matsukawa Y, Suematsu H, Hagihara M, Katsumata K, Mikamo H. Antimicrobial activity of fidaxomicin against *Clostridium difficile* clinical isolates in Aichi area in Japan. J Infect Chemother. 2017 May 17. pii: S1341-321X(17)30093-4

山岸由佳、三鴨廣繁：ヒトの常在真菌叢(マイコビオーム)と疾病．化学療法の領域 2016; 32: 1295-1303

〔学会発表〕(計 1 件)  
Matsumoto A, Yamagishi Y, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Mikamo H. Vaginal microbiota of Japanese women. 27 th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 25 April 2017.

〔図書〕(計 1 件)  
三鴨廣繁：(20)バクテロイデス属を含む無芽胞嫌気性菌感染症、内科学第 11 版 (Asakura Internal Medicine) 矢崎義雄 総編集、pp.283-285、朝倉書店、東京、2017.3.15.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
三鴨廣繁 (MIKAMO Hiroshige)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00262775  
(2)研究分担者  
山岸由佳 (YAMAGISHI Yuka)  
愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 6 0 5 1 2 2 4 1

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

松本麻未 ( MATSUMOTO Asami )

和泉孝治 ( IZUMI Koji )