

妊娠女性の膣細菌叢における乳酸桿菌菌種および 細菌性膣症関連細菌の検出と細菌性膣症の関連について

学位論文内容の要旨

はじめに

細菌性膣症 (BV) は、正常な膣細菌叢において最優勢である乳酸桿菌 (LB) が減少し、多様な嫌気性菌が増殖した膣細菌叢の病的状態である。妊娠女性において BV の病態を解析することは、早産や絨毛膜羊膜炎の病因解明の有用な手がかりとなる可能性がある。BV の膣細菌叢には、*Gardnerella*、*Atopobium*、*Mobiluncus* や多種の嫌気性菌が検出される。さらに最近の分子生物学的分析により、BV の細菌叢に他の細菌とは独立した細菌群が同定され、BV-associated bacteria (BVAB) 1、2 および 3 と名付けられた。BVAB は、*Megasphaera*、*Leptotrichia*、*Eggerthella* 様細菌とともに、*Gardnerella* や *Atopobium* よりも BV に対する特異性が高いことが報告されている。本稿で使用する「BV 関連細菌」は、これらの *Megasphaera*、*Leptotrichia*、*Eggerthella* 様細菌、および BVAB1~3 のことである。現在までに、妊娠女性の膣細菌叢において BV 関連細菌および LB 菌種の検出と BV との関連について示した報告はない。本研究では、妊娠女性における正常および BV の膣細菌叢を細菌の 16S rDNA 領域の特異的 PCR 法を用いて解析し、各細菌叢での BV 関連細菌および LB 菌種の検出率を比較して、その関連について明らかにした。

対象と方法

インフォームドコンセントの得られた妊娠女性 163 名から、膣分泌物検体を採取した。検体の一部は塗抹標本とし、グラム染色を行い、Nugent スコアによって評価した。Nugent スコアは、グラム染色上の LB 数、グラム陰性短桿菌数、グラム染色不定湾曲桿菌の菌数をスコア化して膣細菌叢を評価する方法であり、LB 数の減少、グラム陰性短桿菌数やグラム染色不定湾曲桿菌の増加により高スコアとなる。採取した検体を、Nugent スコア値により、正常 (0-3 点)、中間群 (4-6 点)、BV (7-10 点) の 3 群に分類した。細菌培養は、血液寒天培地を用い、好気条件および嫌気条件下で行った。LB については、コロニー形態と染色性により菌属レベルまでの同定を行った。また、膣分泌物検体から DNA を抽出し、特異的 PCR をおこなった。LB 菌属の PCR プライマーの菌種特異性については、腸内細菌叢に検出される 14 種類の LB 菌種を用いて検討し確認した。統計学的解析には、Fisher の直接確率検定法、多因子ロジスティック解析を用い、いずれも $P < 0.05$ を有意水準とした。

成績

(1) 研究期間中に妊娠女性 163 名から 163 検体を得た。十分な情報を得られなかった 31 名については解析から除外し、残り 132 名の検体を、Nugent スコアにより 3 群に分類した。98 名 (74.2%) が正常群、21 名 (15.9%) が中間群、13 名 (9.8%) が BV 群に分類された。平均年齢、初産婦の割合、検体採取の妊娠週数、分娩週数、児の出生体重には、3 群間に有意差はなかった。

(2) LB は、Nugent スコア値に関わらず、PCR 法によりほとんどすべての検体から検出された。*L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* の 3 菌種の検出率は、BV 群に比して正常群で有意に高かった。*L. iners* の検出率は、3 群間で有意差はなかった。BV 関連細菌については、正常群に比して BV 群で有意に検出率が高かった。

(3) 多因子ロジスティック回帰解析により、各細菌検出と異常細菌叢との関連について検討した。*L. crispatus* が検出されないこと、および *Megasphaera* が検出されることが Nugent スコアが 4 以上であることに関する独立した危険因子であった。各細菌検出のオッズ比は 0.2、13.3 であった。同様に *Eggerthella* 様細菌が検出されることは BV の独立した危険因子であり、オッズ比は 6.2 であった。

(4) *L. iners* は、PCR 法により 132 検体中 55 検体 (41.7%) から検出された。その検出率は 3 群間で有意差がなかった。*L. iners* が検出された検体では、BV 関連細菌の検出率が有意に高かった。

(5) LB は、正常群では 98 検体中 91 検体 (92.9%) から、中間群では 21 検体中 11 検体 (52.4%) から、BV 群では 13 検体中 2 検体 (15.4%) から培養された。PCR 法による 3 群での LB の検出率は、99.0%、100%、92.3% であり、細菌叢が異常であるほど PCR 法と培養法での LB 検出の不一致が多かった。

(6) PCR 法で *L. crispatus* のみが検出された 24 検体では、22 検体 (91.7%) が、*L. gasseri* のみが検出された 14 検体では 13 検体 (92.9%) が、培養法でも LB が検出されたが、*L. iners* のみが検出された検体では、47.6% のみが培養法で LB が検出され、*L. iners* が培養されにくい可能性が示された。

考察

本研究の菌種特異的 PCR 法を用いた解析により、*L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri*、*L. iners* の LB4 菌種は、我が国の妊娠女性において、よくみられる菌種であることが示された。このなかで *L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* の 3 菌種の検出率は正常群に比して BV 群では低かった。これに対して BV 関連細菌 4 菌種は、BV 群からより高率に検出された。*L. iners* は、BV の有無によらず、約半数の妊娠女性から検出された。

腔内に H₂O₂ を産生する LB を有している女性では BV 発症率が低いことや BV 症例では正常細菌叢例に比して腔内 H₂O₂ 濃度が低いことなどから、LB の H₂O₂ 産生能は腔細菌叢を維持するのに重要な役割を担っていると考えられている。本研究により *L. iners* の検出される検体では、BV 関連細菌の検出率が高いことが明らかとなったが、このことは、*L. crispatus* と *L. jensenii* のほぼ全ての菌株が H₂O₂ 産生能を有しているのに比し、*L. iners* では、9% の菌株しか H₂O₂ 産生能を有さないとする報告と一致する。すなわち、*L. iners* が BV 関連細菌の定着や増殖にあまり抑制的でないことが考えられる。

PCR では、BV13 検体のうち、12 検体に LB が検出された。このうち、6 検体からは *L. iners*、2 検体から *L. crispatus* が検出された。また、LB が培養され、塗抹標本でグラム陽性桿菌が同定されたのはわずか 1 検体のみであった。このことは、BV であっても、多くは細菌叢内に LB を保菌しているが、菌数は少なく、LB 菌種構成も正常細菌叢とは異なることを示している。

本研究により、BV 関連細菌は、我が国の妊娠女性においても BV と関連があることが示された。また *L. iners* が、正常細菌叢例だけでなく病的細菌叢でも優勢な LB 菌種であることが明らかとなり、BV 関連細菌の腔内定着に対して防御的ではないことが示唆された。*L. iners* が BV 関連細菌の定着をむしろ促進している可能性については今後の興味ある検討課題と思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学 位 論 文 題 名

妊娠女性の膣細菌叢における乳酸桿菌菌種および 細菌性膣症関連細菌の検出と細菌性膣症の関連について

本研究は、妊娠女性の膣分泌物検体をグラム染色のスコア値により、正常、中間群、細菌性膣症の3群に分類し、各群での細菌性膣症関連細菌および乳酸桿菌菌種の検出率を比較したものである。細菌性膣症関連細菌として、細菌性膣症に対する特異性が高い *Megasphaera*、*Eggerthella* 様細菌、*Leptotrichia*、と BV-associated bacteria-2、乳酸桿菌菌種として、膣細菌叢での検出頻度が高い *L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* と *L. iners* について、16SrDNA 領域の特異的 PCR 法を用いて各群での検出率が調べられた。その結果、細菌性膣症関連細菌は正常細菌叢に比して細菌性膣症で検出率が高く、*L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* は、正常細菌叢での検出率が高かった。一方、*L. iners* の検出率は群間で差がなく、*L. iners* が検出された検体では、むしろ細菌性膣症関連細菌の検出率が有意に高かった。ロジスティック回帰解析では、*L. crispatus* が検出されないこと、*Megasphaera* が検出されることがそれぞれ中間群以上であることに関する、*Eggerthella* 様細菌が検出されることが細菌性膣症に関する独立した危険因子であった。さらに PCR 法と培養法の結果の比較から、*L. iners* が培養されにくい菌であることが示された。

発表終了後有賀教授より、本研究では、細菌性膣症と早産が関連がなかったのは検体数が少ないためであると考察されたが、関連を認めたとする過去の報告ではどのくらいの数の症例を検討しているのかとの質問があり、細菌性膣症が200例以上の報告もあると返答した。早産予防におけるプロバイオティックスの有用性を問う質問には、乳酸桿菌膣錠が早産予防に関して効果があるかどうかは明らかにはなっていないと返答した。さらに、妊娠中の細菌性膣症について妊娠のどの時期から治療すべきかとの質問があり、妊娠20週以降では、早産予防に効果がないとの報告がある一方で、妊娠16週頃では有効とする報告があり、第2三半記前半までには開始するべきであると答えた。細菌性膣症の治療法に関しての問いには、経口抗生剤が適切であるとした。乳酸桿菌のプロバイオティックス膣錠を使用する場合に、どの菌種を勧め

るかとの質問には、*L. crispatus* がよいと考えると返答した。櫻木教授から、本研究から得られた結果は、早産を減少させるためにどのように応用されるか、妊娠女性の膣細菌叢を評価するには、Nugent スコアと細菌性膣症関連細菌のどちらを用いるのが適切かとの質問があった。細菌性膣症と関連のある細菌が同定されたが、早産との関連の評価は今後の課題であること、現時点では、細菌性膣症の評価に関して、PCR 法による細菌性膣症関連細菌の検出は Nugent スコアに代わるものではないことを説明した。玉城教授から、本研究において、申請者は実際に核酸の抽出や PCR による分析にどの程度関与したかとの質問があった。検体採取以外は、ほとんどすべて申請者がおこなったと返答した。さらに、各群の検体数をどのように決めたかとの質問には、検討期間に採取したすべての検体を Nugent スコアにより分類した検体数であると答えた。最後に水上教授より、本研究で解析した細菌性膣症関連細菌と絨毛膜羊膜炎との関連を羊水の解析などで示した報告があるかとの質問があった。現時点では、これらの細菌が切迫早産や絨毛膜羊膜炎と関連があることを示した報告はなく、今後の検討課題であると返答した。また、細菌性膣症は、性感染症のひとつと考えられるかとの質問に対しては、議論のあるところであるとした上で、性産業に従事する女性も、性活動の少ない高校生においても、細菌性膣症の頻度が変わらないとする報告があることを示して、一般的な性感染症の範疇には入らないと考えると返答した。

この論文は、北海道医学雑誌第 8 3 巻第 2 号に掲載される予定であり、今後この知見は、妊娠女性における細菌性膣症の病態解明に応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。