

氏名	うるしやま だいち 漆山 大知		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1723 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome （周産期の転帰を予測するバイオマーカーとしての羊水のマイクロバイオームプロファイル）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	宮本 新吾
	（副査） 福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	教授	廣瀬 伸一
	福岡大学	教授	高田 徹

内 容 の 要 旨

【目的】子宮内感染は、流産や早産などの妊娠の異常を引き起こし、特に診断が遅れた場合は、胎児や新生児、出生後の発育に長期にわたって悪影響を及ぼす。子宮内感染の診断は、羊水の培養検査や、胎盤の病理組織学的検査による絨毛膜羊膜炎（CAM: chorioamnionitis）の診断によって確定する。しかし、一般培養検査は感度が低く、病理組織学的検査は分娩前に施行不可能であるため、分娩前に子宮内感染を正確に診断することは困難である。これまでの羊水を対象とした早産研究の多くは定性的であり、細菌の存在量や存在比が正確でなく、また実験過程で生じたわずかな細菌の混入の可能性が否定できない報告も少なくない。今回我々は、羊水に含まれる細菌組成を解析するために次世代シーケンサーとデジタル PCR を用いて定量的かつ網羅的な解析を行い、羊水のマイクロバイオームプロファイルに基づいて、絨毛膜羊膜炎を予測する方法について検討した。

【対象と方法】2009 年 8 月から 2017 年 4 月の間に、福岡大学病院と国立病院機構佐賀病院の 2 施設で、胎盤組織学的検査と羊水検査を施行された 79 症例を対象とした。胎盤の炎症所見の重症度（Blanc 分類）に従って 3 群に分けた（Stage III : n = 32, Stage II : n = 27, Stage 0-I : n = 20）。妊娠初期の羊水（Normal AF : n = 18）と実験で

使用した精製水 (Blank : n=24) とともに、羊水穿刺術または帝王切開術で無菌的に採取した羊水試料を、無菌的に溶菌・DNA抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1V2 領域をターゲットとするユニバーサルプライマーを用いて、デジタルPCRで16S rDNA コピー数を絶対定量し、MiSeqで16S rDNA アンプリコンシークエンスを行った。シークエンスデータから Operational taxonomic units データを作製し、 α 多様性指数として Chao1 を算出し、UniFrac 距離に基づいて主座標分析を行い、門・属・種レベルの細菌組成解析を行った。

【結果】 Stage III 群の 16S rDNA コピー数は、他のいずれの群よりも有意に大きかった (いずれも $P < 0.001$)。Stage III 群の Chao 1 は、他のいずれの群よりも有意に低かった (それぞれ $P = 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。UniFrac 距離に基づいた主座標分析では、Stage III 群と Stage 0-I 群・Normal AF 群・Blank 群が異なって集簇し、Stage II 群はその両群に散らばった。属レベルの細菌組成解析では、Stage III 群といくつかの Stage II 群の細菌組成は顕著にシンプルであった。絨毛膜羊膜炎に関連する細菌種を調べるために、各試料で最上位であった 28 菌種のみを細菌組成比を用いて再度クラスター解析を行ったところ、これまで同様に Stage III 群と Stage 0-I 群・Normal AF 群・Blank 群は概ね異なって集簇し、Stage II 群は両群に散らばった。Stage III 群でドミナントに検出された 11 菌種 (*Ureaplasma parvum*, *Streptococcus agalactiae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus anginosus*, *Sneathia sanguinogens*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella bivia*, *Lactobacillus jensenii*, *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Mycoplasma hominis*) のいずれかが組成の最上位であった場合を miCAM (microbiomic chorioamnionitis) の陽性と定義したところ、Stage III 群では 32 例中 39 例 (94 %)、Stage II 群では 8 例中 27 例 (30 %)、Stage 0-I 群では 2 例中 20 例 (10 %) が miCAM 陽性であった。miCAM に基づく絨毛膜羊膜炎 (Stage III) の診断精度は、感度 93.8 %, 特異度 78.7 %, 陽性的中率 75.0 %, 陰性的中率 94.9 % であった。miCAM 群と non-miCAM 群における母児の周産期転帰を比較したところ、miCAM 群では、母体の入院から退院までの妊娠延長期間が有意に短く、出生直後の児の血中白血球数・CRP 値・IgM 値が有意に高かった。体温、心拍数、母体血中白血球数・CRP 値、DNA 抽出量、16S rDNA コピー数のデータから診断精度を算出したところ、16S rDNA コピー数による診断精度が最も高く、絨毛膜羊膜炎 (Stage III) の診断精度は感度 93.5 %, 特異度 87.0 % であった。

【結論】 本研究により、世界で初めて、羊水のマイクロバイオーームプロファイルに基づいて、分娩前に絨毛膜羊膜炎を高い精度で予測できる可能性が示された。

審査の結果の要旨

本論文は、子宮内感染例における羊水中の細菌組成を網羅的かつ定量的に同定し、子宮内感染に複数の病原菌が関与している可能性を示した。さらに、羊水中の細菌組成によって、分娩前に高い精度で絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性を示した。

周産期死亡の約7割が早産児であり、早産予防は周産期医療の重要課題である。子宮内感染は早産の最も関連する因子であるが、妊娠管理中に子宮内感染を診断することは難しく、診断の遅れは母児に悪影響を与える。これまでの羊水を対象とした早産研究は、マイクロバイオーム研究の観点から見ると、いずれも定性的な解析であったため、不明な点が多かった。そこで本研究は、マイクロバイオーム研究の手法を活用して、子宮内感染例の羊水細菌組成を網羅的かつ定量的に同定し、その細菌組成で絨毛膜羊膜炎を診断可能か否か検証することを目的とした。

福岡大学病院と国立病院機構佐賀病院で約8年間に、羊水検査と胎盤病理検査を施行された79例を対象とした。胎盤の炎症の程度(Blanc分類)に従って3群に分け(Stage III:n=32, Stage II:n=27, Stage 0-I:n=20)、妊娠初期の正常羊水(Normal AF:n=18)と水(Blank:n=24)を陰性コントロールとした。無菌的に抽出したDNA中の16S rRNA遺伝子(V1V2領域)をターゲットとして、デジタルPCRで16S rDNAコピー数(細菌量に相当)を定量し、次世代シーケンサー(MiSeq)で16S rDNAアンプリコンシーケンスし、網羅的かつ定量的に細菌組成解析を行なった。

Stage III(絨毛膜羊膜炎)群では、他のいずれの群よりも、羊水中の細菌量が有意に多く、 α 多様性が有意に低下していた。ほとんどのStage III群と一部のStage II(絨毛膜炎)群の細菌組成は、コントロール(Stage 0-I/Normal AF/Blank)群と明らかに異なっていた。Stage III群で検出された11菌種(*Ureaplasma parvum*, *Streptococcus agalactiae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus anginosus*, *Sneathia sanguinogens*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella bivia*, *Lactobacillus jensenii*, *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Mycoplasma hominis*)のいずれかが組成の最上位であった40症例をmiCAM(microbiomic chorioamnionitis)と定義したところ、miCAM群は高い精度(感度約94%, 特異度79-87%)で絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性が示され、さらに母子の不良な周産期転帰と関連した。また、miCAM群の約半数で、この11菌種のうち複数の菌種が検出されたことから、混合感染の可能性が示された。

1. 斬新さ

- ・ 世界で初めて、羊水中の細菌組成を解析するために次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いて定量的かつ網羅的な解析を行った。
- ・ 子宮内感染に複数の病原菌が関与している可能性を定量的に示した。
- ・ 世界で初めて、羊水中の細菌組成によって分娩前に絨毛膜羊膜炎を高い精度で診断できる可能性を示した。

2. 重要性

正期産時の正常羊水も無菌とは限らないことは知られていたが、妊娠経過において、その種類・量・病的意義が不明であった。本研究では、絨毛膜羊膜炎と関連した羊水中細菌の種類と量をとともに同定し、さらに周産期転帰と関連したことを示した。近い将来、本研究手法は臨床応用可能と考えられ、羊水中の細菌組成を的確に診断可能となることで、周産期医療の飛躍的な発展が期待できる。

3. 研究方法の正確性

本研究では、最先端のマイクロバイーム研究の手法を用いて、可能な限り正確に、再現性を確認しながら解析を進めた。特に、環境中に存在する細菌由来の DNA 混入を可能な限り防ぎ、さらに各段階で適切に陰性コントロールを置いてシークエンスし、コンタミネーションの可能性を的確に考察しながら解析を完遂した。

4. 表現の明確さ

本論文は 2017 年 9 月 22 日付で Scientific Reports からオンライン出版されている。明確な表現による質の高い論文である。

5. 主な質疑応答

質問 1：菌株の違いは評価できるか？メタゲノム解析を行わなかった理由は何か？

回答 1：本解析法では菌株の違いは評価できない。ホールゲノムショットガン法によるメタゲノム解析を行えば理論上菌株の違いまで評価できる。予備実験で同解析を試みたが、多くの試料でヒト由来の DNA が 99.9%程度を占めており、本解析と同じレベルの解析を目指すと膨大な量の次世代シークエンスを必要とするため、菌株の違いまで評価可能なメタゲノム解析法の実施は極めて困難と判断した。

質問 2：組織学的検索で胎盤に炎症がなかった症例で見つかる菌には、どのようなものがあったか？無菌であったか？

回答 2：菌の種類としてはコンタミネーションと考えられる菌種が大半を占めており、胎盤に炎症がない症例で特異的に見つかる菌は見いだせなかった。菌の量は、胎盤に炎症がある症例よりも大差を持って有意に少なかった。一方で、実験で使用した水（無菌とされる精製水）と比較すると、差は小さかったが有意に多かった。つまり、胎盤に炎症がない症例の羊水は、ほぼ無菌的であるが必ずしも無菌とは限らないと考えられた。

質問 3：Stage 0 をどのように定義したのか？

回答 3：絨毛膜羊膜炎は炎症細胞の浸潤度によってステージングされており、絨毛膜下にとどまっている場合を Stage I と診断されるが、この絨毛膜下においても炎症細胞の浸潤

が見られない場合に「炎症細胞の浸潤なし」と診断される。本来 Stage 0 という表現は一般的でないが、本研究ではその状態を便宜的に Stage 0 と定義し、絨毛膜に炎症細胞の浸潤が観察されなかった群を Stage 0-I 群と定義した。

質問 4: 11 菌種のうち複数の菌が検出された時、その菌種の組み合わせに関して何か気づいたことはあるか？

回答 4: 11 菌種のうち複数検出された症例では、ウレアプラズマと他の菌という組み合わせが多くを占めていた。その中で特に目立ったのはマイコプラズマであり、マイコプラズマが検出された 3 例はいずれもウレアプラズマとの共存関係にあった。泌尿生殖系でマイコプラズマはウレアプラズマと共存しやすく、エネルギー産生の過程でウレアプラズマから補助的な作用を受けているようだという報告があったが、この報告と矛盾しない結果であった。現段階でその他の特徴は見いだせておらず、今後の研究課題の一つと考える。

質問 5: 定性ではなく定量的に調べる意義は何か？簡単な PCR でも分かるのでないか？

回答 5: 定性的に見ると、正常でも陽性になることがしばしばあるが、定量的に見ることで違いがはっきりするという点がある。また、今回 miCAM を定義した菌にも地域差があると考えられる。本研究でも佐賀病院と当院で 30% 程違いが見られた。また、富山大学が定性的に行った研究結果と比較しても、同様に 30% 程度違いがあると推察された。したがって、網羅的かつ定量的な解析を継続して、症例数を積み重ねていく過程で徐々に診断精度も上がるだろうと考える。

質問 6: 絨毛膜羊膜炎に関連した菌のうち、好気性菌と嫌気性菌の分布はどうであったか？

回答 6: 絨毛膜羊膜炎群でドミナントに検出された 12 菌種のうちほとんどが嫌気性菌であった。インフルエンザ桿菌は好気性菌であったが、これはブランク群でもドミナントに検出されたため、コンタミネーションの可能性が否定できず、今回の miCAM の定義からは除外した。それ以外は嫌気性菌であったが、その中で通性嫌気性菌であることが明らかとなっている菌は、*Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus* であった。今回 miCAM を定義した 11 菌種には広く知られていない菌も含まれており、それぞれの菌の特性に関しては今後の研究課題の一つと考えている。

質問 7: この結果から、ウレアプラズマはパソジェニックな菌の一つと思われるが、正常の正期産時にも数%程度検出されることについてはどう考えるか？

回答 7: これまでの報告が定性的であったため菌量が異なっていた可能性、株の違いが関連した可能性を推測する。さらにもう一つ重要な点として、子宮内感染が陣痛発来に関与した可能性をあげられると考える。正期産時の胎盤には 1-2 割の頻度で、絨毛膜に炎症が及んでいたという報告がある。正期産時になると子宮内に上行感染しやすい状態が存在し、子宮内感染が陣痛発来のきっかけになっている可能性も指摘できると考える。

質問 8：早産は感染症と考えるとよいのだろうか？

回答 8：早産には、感染の他に奇形・高齢・産科疾患・ストレスなど様々な交絡因子が指摘されているため、感染症と言い切ることはできない。しかし、これまでの研究報告と併せて考えると、妊娠 28 週未満の早産(Extremely preterm birth)例の多くは、miCAM のような子宮内感染がベースに存在すると推測できる。

本論文は、発表と質疑応答の結果をふまえて主査および副査の審議の結果、学位論文に値すると評価された。