

## 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 アンプリコンシーケンスを行った。シーケンスデータから Operational taxonomic units データを作製し、 $\alpha$  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 sanguinegens*, *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。