

話題の検査：子宮内フローラ検査

子宮内フローラ検査で、不妊から不育の原因を探る

長 井 陽 子

話題の検査：子宮内フローラ検査

子宮内フローラ検査で、不妊から不育の原因を探る

長 井 陽 子*

〔Key Words〕次世代シーケンサー、細菌叢解析、16S rRNA遺伝子、ターゲットシーケンス、女性生殖器、不妊、不育

はじめに

近年、晩婚化などによって不妊に悩むカップルは増加傾向にあり、2015年の体外受精治療件数は過去最多の42万件に到達し、出生児のうち20人に1人は体外受精で誕生した。世界各国の先進国において、不妊は人口減少および少子化の原因の一つとして社会問題となっている。体外受精において良好胚を3回移植しても妊娠が成立しない、あるいは、化学流産を呈する反

復着床不全は、不妊治療の大きな課題であり、受精胚あるいは子宮内膜の環境に異常があると考えられている。これまで子宮内膜はほとんど無菌的であると考えられていたが、次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析技術の進展によって、子宮内にも微量の菌が存在し、複数の菌による子宮内細菌叢を構成していることが明らかとなってきた(図1)。

膣・子宮内細菌叢は、不妊の原因となる反復着床不全、子宮内膜症、子宮内膜炎のマーカーと

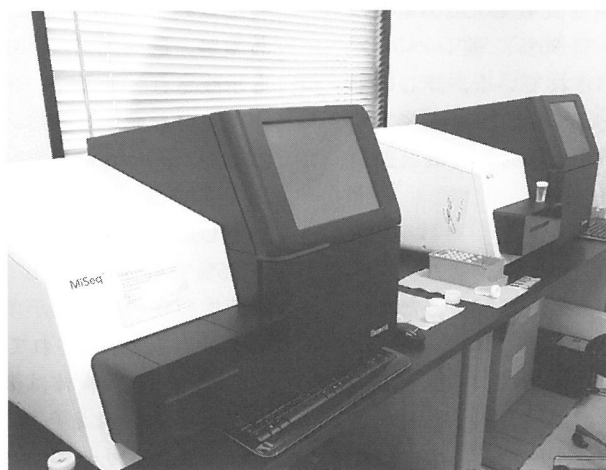


図1 Varinos社の次世代シーケンサー MiSeq

* Yoko NAGAI, PhD

Varinos 株式会社(〒141-0022 東京都品川区東五反田 5-23-1 第2五反田不二越ビル 6階)

なる可能性のみならず、早産、流産、細菌性膣症、子宮頸がん、子宮体がんにも関わることを示唆されている¹⁾。本稿では、NGSを用いた細菌叢解析の手法から、生殖菌叢解析の最新の知見を紹介し、最後に、弊社が開発した「子宮内フローラ検査」について紹介する。

I. NGSを用いた菌叢解析の手法とその精度

NGSによる細菌叢解析は、試料中に含まれる複数の細菌DNAの配列を一度に決定するため、培養が困難な細菌や存在量が少ない微量な細菌など、試料に含まれるすべての細菌を一度に検出できる利点がある。細菌叢解析にはショットガンシーケンス法と16S rRNAターゲットシーケンス法の2種類の手法が確立されている。16S rRNA遺伝子には、菌種間での進化的多様性が高い「可変領域」と多様性が低い「保存領域」が存在しているため、可変領域を挟む形で保存領域にプライマーを設計し、可変領域のDNA配列から菌の種類や存在量を推定することができる。また、サンプルごとにユニークなバーコード配列を付与することにより、NGSで数百検体を一度に処理することが可能である。

従来の培養による検査法と16S rRNAターゲットシーケンス法の精度を比較した2015年の論文²⁾では、属レベルで96%、種レベルで87.45%の高い一致性が示されている。詳しい細菌叢解析手法については、「次世代シーケンサーを用いたマイクロバイオーム研究の最前線」³⁾を参照してほしい。

II. 膣内細菌叢と早流産

健康な人と共存する細菌叢を理解するため、2008年、米国で大規模な国家プロジェクトHuman Microbiome Project (HMP)が立ち上がった。本プロジェクトでは、健康者242人の鼻腔、口腔、皮膚、糞便、膣内3か所から集められた4,788サンプルの菌叢解析が行われた⁴⁾。約100名の女性健康者の膣内細菌叢は、他の部位と比べ菌の多様性が低く、*Lactobacillus*の1種類が支配的である特徴を持っていた。これは古来よ

り*Lactobacillus*が膣内常在菌であるという知見と一致している。膣内常在菌である*Lactobacillus*は、女性ホルモンによって促進され膣上皮細胞より分泌されるグリコーゲン由来の物質を代謝して酪酸を生成し、この酪酸が膣内pHを下げることにより、他の細菌が増殖しにくい環境をつくっていると考えられている。膣内の*Lactobacillus*が減少し、他の菌が増殖した状態を細菌性膣症という。雑菌が膣から子宮頸管を通過して子宮に到着すると、子宮内膜炎などの炎症が引き起こされる可能性があり、細菌性膣症の妊婦では、自然流産のリスクが9.91倍、早産のリスクが2.19倍に増加する⁵⁾。このような背景により、2013年より開始された第二期のHMPでは、女性の膣内の細菌が胎児の早産と関わる可能性を検証するため、2,000人の妊婦を対象とした前向きコホートを開始した⁶⁾。同様に、Mayo Clinic Centerも膣内の細菌叢のバランスが崩れることによって細菌性膣症や酵母感染症(カンジダ膣炎)の発症リスクが高くなることを明らかにし、早産の診断検査法の開発にあたっている⁷⁾。

III. 膣内・子宮内細菌叢と妊娠成績

定量的PCR法を用いた膣内細菌の研究ではあるが、膣内細菌が不妊治療に関与する可能性も示唆されている⁸⁾。不妊治療患者130名の後膣円蓋から検体を採取、細菌性膣症の原因菌である*Gardnerella*および*Atopobium*を定量的PCR法で検出し、この二つの菌が豊富な場合を異常群とした。正常群では胚移植後の臨床妊娠成績が35%であるのに対し、異常群では9%であり、細菌性膣症の原因菌が多いほど妊娠成績が有意に下がることが示されている。

一方、子宮内検体は細菌培養ができず、ほとんど無菌的と考えられていた。2015年に初めて、米国ラドガース大学の研究者らが、NGSを用いた16S rRNAターゲットシーケンス法によって子宮内にも*Lactobacillus*が存在することを発見し、*Lactobacillus*が着床時の免疫に影響を与える可能性を指摘した⁹⁾。ついで、スペイン

および米国の研究者らが、妊娠成功群と妊娠不成功群で *Lactobacillus* の量を調べたところ、妊娠不成功群では *Lactobacillus* が少ない傾向にあることを発見した¹⁰⁾。*Lactobacillus* が 90%以上を *Lactobacillus* 支配的菌叢、90%未満を *Lactobacillus* 非支配的菌叢とし、各群の体外受精後の臨床妊娠成績を調べたところ、*Lactobacillus* 支配群では、妊娠成功率が 70.6%、生児獲得率は 58.8%であったのに対し、*Lactobacillus* 非支配群では、妊娠成功率が 33.3%、生児獲得率は 6.7%と低く、子宮内細菌叢が、着床のみならず妊娠継続にも寄与する可能性が指摘されている。

IV. 日本における子宮内菌叢研究の幕開け

日本においても、本邦初の体外受精患者およびボランティアを対象とした子宮内細菌叢解析の研究成果が Reproductive Medicine and Biology に発表された¹¹⁾。健常者ボランティアを対象に、同一周期内および異なる周期の間で子宮および膣内の菌叢に変化があるかどうかを調べたところ、菌叢に大きな変化はなく、介入をしない限り、同一個体において膣・子宮の菌叢は安定的であることが明らかとなった。子宮内および膣内の *Lactobacillus* の割合は、IVF 患者では $63.90 \pm 41.43\%$ と $65.21 \pm 43.70\%$ 、非 IFV 患者にて $96.20 \pm 34.61\%$ と $99.40 \pm 36.32\%$ 、健常者ボランティアにて $99.50 \pm 15.85\%$ と $99.80 \pm 16.82\%$ であった。IVF 患者では、子宮および膣に存在する *Lactobacillus* の割合が低く、非 IVF 患者や健常者ボランティアでは *Lactobacillus* の割合が高い傾向にあることが明らかとなった。*Lactobacillus* 支配的菌叢を有しているかどうか

で比較したところ、IVF 患者と非 IVF 患者、健常者ボランティアの間で有意な差が認められた ($p=0.001$)。また、不妊治療を行っていた 18 患者において妊娠が成功し、妊娠した患者の子宮内 *Lactobacillus* の割合は 96.45%、膣内細菌叢は 97.80% であった。以上の結果から、日本人においても、子宮内に *Lactobacillus* が存在すること、妊娠成功群の子宮内には *Lactobacillus* が多いことが示された。今後さらに詳細な追跡が必要なものの、*Lactobacillus* が多い子宮内に受精卵を戻した方がより良い可能性が指摘されている。

V. 世界初の子宮内フローラ検査の開発

Varinos 社は 2017 年 2 月に設立したベンチャーで、同年 12 月、世界に先駆けて NGS を用いた「子宮内フローラ検査」を開発し、微生物学的検査の検査業務として品川区に登録を完了した。本検査では、子宮および膣から採取した検体の DNA を用いて 16S rRNA ターゲットシーケンスを行い、*Lactobacillus* が 90%以上か未満であるかの判定結果および、*Lactobacillus* 以外の菌の割合についても参考値として提供している。

検査の流れは、まず医療機関にて、子宮体癌細胞診断用のキットを用いて子宮検体を採取し、スポンジスワブを用いて膣内検体を採取する。採取した検体を専用の保存液に入れ、弊社に保存液を送付する。品川ラボラトリーに届いた検体は、DNA 抽出、16S rRNA 遺伝子の増幅、NGS ライブラリー調製を経て、シーケンシングが行われる(図 2)。MiSeq 1 台のシーケンシングで得られる配列データは約 1,700 万本あり、デ

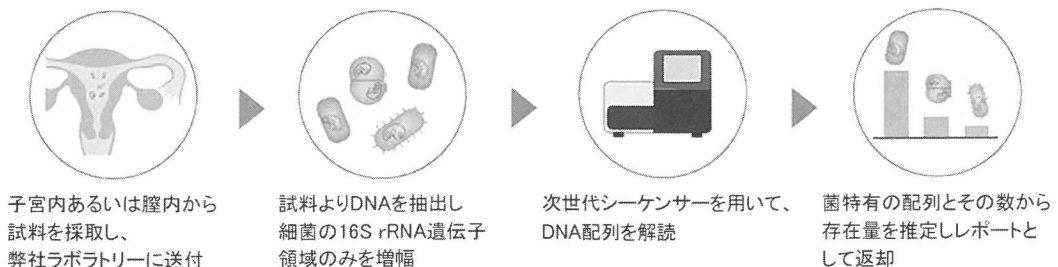


図 2 検査の流れ

ータ解析では、まず配列データをクリーンアップし、97%の配列の類似度でクラスタを形成、クラスタの代表配列がどの菌の配列と似ているかを検索する。そして最後に、検体ごとにどのような菌がどのぐらいの割合で存在するのかを集計し、報告書として返却する。

おわりに

NGS を用いた 16S rRNA ターゲットシーケンスの登場により、従来の細菌検査法ではわからなかった細菌の全体像の俯瞰が可能となった。Varinos 社は、膣・子宮内の菌環境を調べる「子宮内フローラ検査」受託サービスを 2017 年より提供を開始し、研究目的であるものの検査レベルの精度管理を行っている。他に類のない新しい検査に共通の課題として、十分な外部精度管理ができないことが挙げられる。そのため、指標となる標準物質の作成、DNA 抽出・DNA 増幅・シーケンシング・データ解析の各工程でのクオリティチェックが重要となる。

膣内・子宮内の菌叢解析手法が確立され、ここ数年、菌と女性疾患の関連を發表する文献数が増加している。今後、子宮内フローラ検査を用いて、不妊や女性疾患に関与する菌が明らかとなることで、診断と治療に大きく貢献できるものと期待している。

文 献

- 1) Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? *Front Immunol* 2018; Mar 2; 9: 208.
- 2) Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One* 2015; 10(2):Feb 6.
- 3) 長井陽子, 鈴木健介. 次世代シーケンサーを用いたマイクロバイーム研究の最前線. *臨床化学*

2015; 44: 269-75.

- 4) Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486(7402): 207-14.
- 5) Leitch H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, et al. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1): 139-47.
- 6) Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 2014; 16(3): 276-89.
- 7) Sam Smith. Mayo Clinic and Whole Biome Announce Collaboration: Joint Development of Microbiome Diagnostic Testing to Focus on Women's Health and Preterm Labor
<https://newsnetwork.mayoclinic.org/discussion/mayo-clinic-and-whole-biome-announce-collaboration-joint-development-of-microbiome-diagnostic-testing-to-focus-on-womens-health-and-preterm-labor-2/>
- 8) Haahr T, Jensen JS, Thomsen L, et al. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Hum Reprod* 2016; 31(4): 795-803.
- 9) Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(1):129-36.
- 10) Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(6): 684-703.
- 11) Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reprod Med Biol* 2018; 1-10.