報　告

妊娠経過中・分娩後の母体における微生物叢の推移と出生児における微生物叢の発達

三　好　　潤

杏林大学医学部消化器内科学

背景

ヒト微生物叢はさまざまな環境因子から影響を受けながらヒトと共生している。近年，新生児・小児期における微生物叢が後年の健康・疾病に関わることが注目されている[1,2]。また動物実験では，早い段階に生着した細菌叢が，その後の細菌叢の発達の方向性に影響することが示されている[3]。これらの知見は，出生後早期の微生物叢が，児と微生物叢の双方の発達に重要な役割を果たし，同時期において健常な宿主および腸管微生物群の発達のために必要な微生物への曝露タイミング，獲得すべき微生物群が存在すること，それらの機会を逸することが宿主の生涯にわたっての疾病リスクにつながることを示唆している。出生児の微生物叢は，母体から獲得する微生物叢から始まり，さまざま環境因子の影響を受けて成立していく。一方，母体の微生物叢は妊娠中にダイナミックに変化するとともに妊娠経過自体にも関与すると考えられている。たとえば膣内微生物叢は，宿主にとっての感染防御機構として機能している。そして，妊娠早期の膣内細菌叢の多様性の減少や構成の変化が早産と関連するとの報告がある[4]。妊娠中・周産期の母子微生物叢を理解することは，健康な妊娠・出産，健常な発達を実現するための微生物叢を介した新たな予防医学的アプローチにつながることが期待される。

目的

本邦における腸管微生物叢は他の国や地域とは異なることが報告されている[5]。したがって，本研究において，本邦での妊娠・周産期および新生児・乳児期の母子におけるヒト微生物叢を理解するとともに，臨床経過，環境因子との関連性を探求することの意義は大きいと考えられる。そこで本研究では，母体の妊娠経過中･分娩時の膣内細菌叢･腸管細菌叢の経時的変化の解析，出生児の腸管細菌叢の経時的変化の解析を行い，それらの結果と母子の臨床情報から，（1）妊娠経過における細菌叢の推移と妊娠予後に関わる細菌叢変化，（2）母子間の微生物叢の相関性，（3）児の腸管微生物叢の発達とそれに影響する環境・生活因子を検討することを目的とした。

方法

本研究は杏林大学医学部倫理委員会の承認を得て実施中である（承認番号789）。本研究における対象選択基準は，（1）杏林大学医学部付属病院産科婦人科に通院，入院し，分娩予定である日本人妊婦，（2）杏林大学医学部付属病院産科婦人科で分娩した日本人正期産児，（3）杏林大学医学部付属病院新生児集中治療室（NICU）に出生時より入室，管理となった在胎週数24週から36週の日本人早産児である。対象除外基準は，（1）本研究への参加の同意が本人，代諾者または保護者より得られない妊婦，新生児，（2）染色体異常もしくは重篤な先天異常を有する新生児である。参加人数は，（1）妊婦60名，（2）上記（1）の出生児，（3）出生体重1000 g未満の超低出生体重児（ELBW）10名，（4）出生体重1000 gから1500g未満の極低出生体重児（VLBW）20名，（5）出生体重1500 g以上の早産児20名の予定とした。母体から妊娠経過中（12, 20, 30, 36週），出産時，出産後1ヶ月の時点で膣ぬぐい液，直腸スワブを採取している。また出産時には羊水検体を採取し，帝王切開の場合には皮膚擦過検体を採取する。出生児からは出生直後，出生後1日，4日および1ヶ月の時点で直腸スワブ検体を採取している。NICUへの入院が必要となった場合は，出生直後，出生後1日，4日，7日，1ヶ月後，3ヶ月後，6ヶ月後，12ヶ月後の直腸スワブ検体を採取する研究計画となっている。

得られた検体からDNAを抽出し，16S rRNA遺伝子V4領域のアンプリコンシーケンシング結果をQIIME2[6]を用いて解析することにより細菌叢構成を検討している。

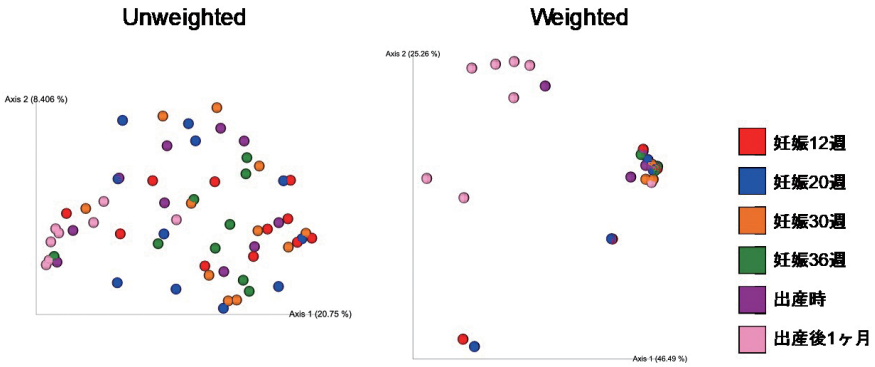

図1　母体の腟細菌叢の経時的変化

妊娠12週から出産後1ヶ月までの腟内細菌叢構成のβ多様性（unweighted UniFrac distancesおよびweighted UniFrac distances）をPCoAプロットで提示する。特にweighted UniFrac distancesのPCoAプロットにおいて出産後1ヶ月で他の時点とはクラスターを形成している。

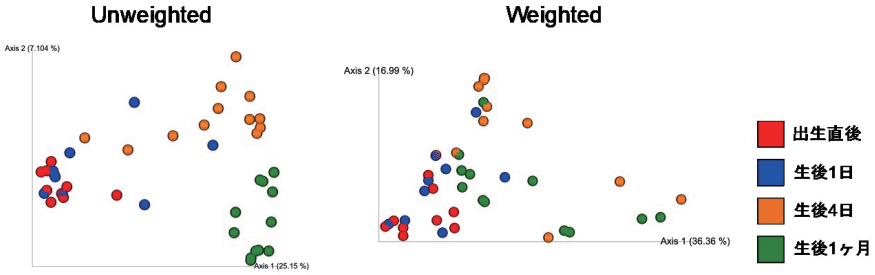

図2　出生児の直腸細菌叢の経時的変化

出生直後から生後1ヶ月までの直腸細菌叢構成のβ多様性（unweighted UniFrac distancesおよびweighted UniFrac distances）をPCoAプロットで提示する。特にunseighted UniFrac distancesのPCoAプロットにおいて生後4日目には大きく変化している。

結果

2022年10月末までに妊婦については予定参加人数に達したため募集を終了とした。NICU入室を要する早産時については体重別の参加募集であり予定人数の6割程度の進捗となっている。途中解析となるこれまでに実施した16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングでは，検体全般において良好なsequencing depthが得られており，DNA検体の質，量は保たれていると考えられた。本稿では現時点までの途中解析結果について報告する。

母体では，腟および直腸検体において，部位ごとに異なる細菌構成で経時的に変化していくことが明らかとなった。特に腟では出産後1ヶ月の細菌構成は妊娠経過中から出産までと比較して，と多様性が増加し，多多様性も大きく異なることが示された。図1にUniFrac distancesに基づくに多様性のPCoAプロットを提示する。概略的ではあるがunweighted UniFrac distancesでは検体中に存在する細菌の種類に着目し，weighted UniFrac distancesは，それぞれの細菌の種類の占有割合も考慮に入れた評価であると言える。したがって，本結果でunweightedよりもweightedにおいて出産後1ヶ月で他の時点と大きく異なったクラスターを形成していることは，腟内に存在する細菌の種類はさほど変わらないものの，その中での占有割合，バランスが大きく変化していることを示唆していると考えられる。また非NICU入室児の経肛門スワブ検体（直腸検体）においては，出生直後から直腸細菌叢の変化が始まり，特に出生4日目には出生後とはすでに大きく変わっていた。UniFrac distancesに基づくに多様性のPCoAプロットを図2に提示する。Unweighted UniFrac distancesの評価でweighted UniFrac distancesよりも経時的変化が明らかであることから，生後の短期間に生着している細菌の種類が変化していることが示唆される。

結論

本研究の経過において予定していた実験計画が実施，継続可能であることを確認できたと考えている。途中解析の結果をふまえ，細菌叢については収集している検体のシーケンシング解析を現在のプロトコルで継続する予定である。特に，周産期の母体の経時的変化を特徴づける細菌の同定，出生後早期の細菌叢の基礎を形成している細菌の同定，出生児における出生後早期の微生物叢獲得の主要な源である母体との類似性などに関心を持っている。そして臨

床情報を組み合わせることによりバイオインフォマティクス的手法により観察された細菌叢の変化の生理学的，臨床的意義を検討していきたいと考えている。

謝辞

本研究をご支援していただいている医学部共同研究プロジェクト研究費および関係各位に厚く御礼申し上げます。

文献

1) Koleva PT, et al. The Infant Gut Microbiome：Evidence for Obesity Risk and Dietary Intervention. Nutrients. 2015；7（4）：2237-2260.
2) Zhuang L, et al. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2019；17（1）：13-25.
3) Martínez I, et al. Experimental evaluation of the importance of colonization history in early-life gut microbiota assembly. Elife. 2018；7：e36521.
4) Haque MM, et al. First-trimester vaginal microbiome diversity：A potential indicator of preterm delivery risk. Sci Rep. 2017；7（1）：16145.
5) Nishijima S, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. DNA Res. 2016；23（2）：125-133.
6) Bolyen E, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol. 2019；37（8）：852-857.