

論文内容の要旨

論文提出者氏名 秋山 鹿子

論文題目

Molecular detection of microbial colonization in cervical mucus of women with and without endometriosis

論文内容の要旨

子宮内膜症は、子宮内腔以外の部位で子宮内膜様組織が存在、増殖することを特徴とする慢性炎症性疾患である。性成熟期女性の 6~10%が罹患し、月経痛、慢性骨盤痛、排便痛、不妊など多岐にわたる症状を呈し、**quality of life** の著しい低下を招く。発生原因は諸説報告されているが、未だ明らかにされていない。

近年、子宮内膜症が子宮内腔の細菌感染と関連があるとの報告がある。培養の手法によって子宮内膜症患者の月経血中に大腸菌が有意に高く検出され、その外毒素である lipopolysaccharide (LPS)が月経血中にも腹水中にも内膜症で高濃度に検出されることから、LPS が toll like receptor 4 を介して自然免疫を惹起させ、炎症反応を起こすことが子宮内膜症の発症原因の引き金である、という“bacterial contamination hypothesis”である。この細菌の流入経路として、子宮頸管を通じた腔内細菌の逆行性感染が重要と考えられるが、子宮頸管内の細菌叢についての報告は少なく、子宮内膜症患者の子宮頸管内細菌についての報告は未だない。

そこで、われわれは次世代シーケンサー(NGS)を用いて、子宮頸管粘液中の細菌叢を網羅的に解析し、子宮内膜症患者と対照群を比較することで、子宮内膜症の病態生理に関わる可能性がある細菌を同定することを目的とした。

子宮内膜症群 30 例、対照群 39 例の子宮頸管粘液を産婦人科外来受診者から採取した。対照群は子宮内膜症、悪性腫瘍を除く良性疾患患者で子宮筋腫や良性卵巣腫瘍などが含まれる。内分泌疾患や感染性疾患を合併している症例は除外した。それぞれの検体から細菌 DNA を抽出し、NGS 解析を行い、その抽出した結果を確認する目的で特異的 primer を用いた real time PCR 解析を行った。また、視覚的に細菌の存在を確認する目的でグラム染色も併せて行った。

患者背景に月経痛の有無の他は両群間に差は認めなかった。子宮頸管粘液のグラム染色では両群とも多彩な細菌が視覚的に確認でき、子宮頸管粘液細菌叢は腔内細菌叢のように一定のものではなく、個人差を認めた。

次に、属レベルでの NGS 解析では、グラム染色の結果と同様に、子宮頸管粘液の細菌叢で個人差を多く認めた。また、いずれの群においても、*Lactobacillus* が最も多く検出されるものの、多彩な細菌を認めた。β 多様性解析で細菌叢の特徴を比較したところ、両群間に特有な細菌叢は認めなかった。対照群、子宮内膜症群をそれぞれ月経周期ごとに分けて同様に比較したが、両群とも月経周期による特徴的な細菌叢の変化は認めなかった。

α 多様性解析では子宮内膜症群では対照群よりも α 多様性指数が有意に高かった。ここでわれわれは子宮頸管粘液中の細菌叢で最多の割合を占めす *Lactobacillus* が、子宮内膜症群では減少し、他の細菌の割合が増加したのではないかと考えた。そこで、個々の細菌属の存在率を比較した。*Lactobacillus* は子宮内膜症群で低い傾向にあるものの、両群で有意差はなく、細菌性膣炎の起因菌としてよく検出される *Prevotella* と *Gardnerella* にも有意差は認めなかった。次に、子宮内膜症群で 1%以上存在し、対照群よりも有意に多く検出される細菌属を抽出すると、*Corynebacterium*、*Enterobacteriaceae*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas* の 4 種類が該当し、これらをさらなる解析の候補とした。また、計算上は有意差はないものの、対照群で検出しなかった割合が多数をしめた *Streptococcus* も候補に含めた。これらの 5 細菌属を属特異的 primer を用いて real time PCR による定量的解析を行ったところ、*Enterobacteriaceae* と *Streptococcus* は子宮内膜症群に有意に高く検出されることが確認された。なお、検体中に含まれる全細菌数の指標として、16S rRNA を標的とした real time PCR 解析では両群間に有意差は認めなかった。

これらの所見より、子宮内膜症患者の子宮頸管粘液中では対照群と比較して、*Enterobacteriaceae* と *Streptococcus* が増加しており、これらの細菌属が子宮内膜症の病態生理に関与する可能性が示唆された。また、既報と比較して属レベルまで細菌の特定範囲を狭めることができた。今後、細菌種の絞り込みを含め、さらなる検証が必要と考える。