

報道関係者各位

北里大学
株式会社ハナミスイ

健康な日本人女性の腔内細菌叢は個人間で大きく異なる -日本人女性の腔内マイクロバイオーームは BMI や年齢の影響も受ける-

北里大学薬学部の伊藤雅洋助教、株式会社ハナミスイの名知英樹研究員らの研究グループは、代官山ウィメンズクリニックの佐藤陽一医師と共同で、腔内最優勢細菌種に基づき、健康な成人日本人女性の腔内細菌叢は4つのタイプに分類できること、さらに腔内細菌叢構成細菌の定性分析だけでなく定量分析も組み合わせた解析結果から、腔内生菌数は個人間で大きく異なり、これまで考えられていたよりも腔内細菌叢の多様性が高いことを明らかにしました。また、腔内生菌数は腔内 pH と負の相関があること、さらに BMI ^{【※1】} や年齢などの因子が腔内マイクロバイオーーム ^{【※2】} に影響を及ぼすことが明らかになり、個人間の腔内マイクロバイオーームの多様性が顕著であることが示されました。この研究成果は、2025年2月4日付で、国際科学誌『*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*』にオンライン掲載されました。

研究成果のポイント

- ◆ 健康な日本人女性の腔内細菌叢は、最優勢細菌種に基づき乳酸桿菌 *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* および偏性嫌気性細菌グループの4つのグループに大別されました。
- ◆ 同一のグループに大別されていても、腔内生菌数は個人間で大きく異なり、これまで考えられていたよりも腔内細菌叢の多様性は高いことが明らかになりました。
- ◆ BMI は腔内生菌数と正の相関を、腔内 pH とは負の相関を示すこと、また BMI が 18.5 未満の痩せぎみと定義される女性では、18.5 以上の普通体重と定義される女性と比べて乳酸桿菌の割合が有意に低く、BMI は腔内生菌数や腔内 pH に影響を及ぼすことが明らかになりました。
- ◆ 40-50 歳の女性では、40 歳以下の女性と比較し腔内 pH が有意に高く、年齢は腔内 pH に影響を及ぼすことが明らかになりました。

研究の背景

ヒト成年期の女性生殖器、特に腔には、乳酸桿菌属に属する *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* または *L. jensenii* のいずれか1菌種が主に常在していると報告されています。乳酸桿菌は代謝産物として乳酸を産生し、腔内 pH を低下させることで細菌性陰症 (Bacterial vaginosis: BV) や HIV の感染リスク、早産の発症リスクを低下させるほか、体外受精後の出生率を上昇させるなど女性生殖器の健康に寄与すると考えられています。中でも、*L. crispatus* が腔内最優勢細菌である女性では、*L. iners* が腔内最優勢細菌である女性と比較して早産や子宮頸がん罹患率、不妊率も有意に低いと報告されています。一方、偏性嫌気性細菌が主に常在している腔内細菌叢では、BV に関連する細菌 (*Gardnerella vaginalis* など) が高頻度で検出される特徴を有しています。BV はしばしば無症候性ですが、早産や性感染症、HIV の発症または感染リスクを顕著に上昇させるなど、産婦人科領域における深刻な合併症に関連することが知られています。

これまで腔内細菌叢は主に 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) を指標とした微生物叢解析が行わ

れてきました。しかしながら、この手法では細菌の割合（組成比）の変動等は効果的に検出できますが、細菌叢全体の存在量（生菌数）の変動はほとんど見落とされてきました。ヒトと常在細菌との相互作用を正しく理解するためには、細菌叢の組成比のみに頼るのではなく、生菌数に基づく研究を実施することが不可欠であると考えました。

研究内容と成果

本研究参加者 24 名はすべて閉経前の女性でした。12 名の参加者はピルを服用中であり、2 人 (ID 116, 126) は月経周期中、2 人 (ID 112, 113) は妊娠中でした。クリニックにて腔粘液を採取後、DNA を抽出し、得られた DNA についてアンプリコンシーケエンシング解析【※3】を行った。その結果、24 検体中 9 検体において *L. crispatus* (community state type 1: CST1【※4】と分類される) が腔内最優勢細菌種でした (37.5%、図 1)。*L. iners* (CST III) は 8 検体 (33.3%)、*L. gasseri* (CST II) は 1 検体のみ検出された (4.2%、図 1)。乳酸桿菌の次に多かった腔内細菌は *Gardnerella* で 3 検体、次いで *Fannyhessea*, *Anaerococcus*, *Streptococcus* が各 1 検体でした (CST IV : 25.0%、図 1)。本研究と同様に日本人女性の腔内細菌叢をアンプリコンシーケエンシングを用いて解析したこれまでの報告では、最も多く存在する腔内細菌叢は *L. crispatus* (40.2%-50.0%)、次いで *L. iners* (25.0-27.8%) であり、これらの報告と本研究結果はほぼ同一でした。

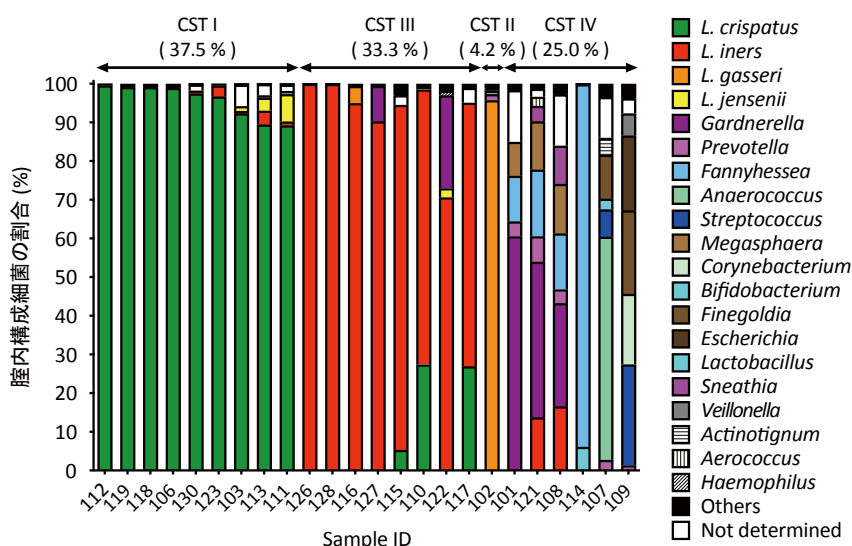


図 1. 健康な日本人女性の腔内細菌叢は *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* および多様性グループの 4 つに大別された
腔粘液のアンプリコンシーケンス解析結果を、縦軸に腔内構成細菌の割合 (%), 横軸に検体 ID にて示し、検出率が 1%以上の細菌を図の右側に、1%以下の細菌は「その他」に分類しました。

各細菌の生菌数の合計として計算された腔液中の生菌数は、平均 1.3×10^8 CFU/mL【※6】でした (図 2)。腔液中の生菌数は最も多かった検体では 1.0×10^9 CFU/mL (ID 121) でした (図 2)。一方、最も少なかった検体では 3.2×10^4 CFU/mL (ID 107) でした (図 2)。それぞれ *Gardnerella*, *Anaerococcus* が最優勢細菌種と同定されました (図 1, 2)。最も生菌数が多い検体と最も少ない検体との生菌数の差は、3 万倍でした (図 2)。乳酸桿菌については、*L. crispatus* が最優勢である検体において生菌数は最も多く、生菌数が最も多かった検体では 4.3×10^8 CFU/mL (ID 111) であったのに対し、最も少なかった検体では 6.3×10^6 CFU/mL (ID 123) であり、70 倍以上の差が認められました (図 2)。健康な人の生菌数には 10 倍の差が認められている腸内細菌叢と比較して、腔内細菌叢における生菌数の個人差は大きかった (図 2)。一般的に生きた細菌だけに存在する rRNA 分子を標的とする定量的 RT-PCR (RT-qPCR) は、qPCR や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) と同等の感度にてヒトの腸内細菌を定量し、腸内細菌叢におけるいくつかの興味深い個人間の生菌数の差を明らかにしています。健康な日本人女性の腔内細菌叢を RT-qPCR で解析した結果では、乳酸桿菌が最優勢の細菌叢では乳酸桿菌の総生菌数が 10^7 個/mL 以上であった一方、*G. vaginalis* の生菌数は $10^{8.8}$ 個/mL と最も多かったことが報告されています。本研究において、培養法を用いて決定された腔内の生菌数が RT-qPCR 解析の結果とほぼ一致することが示され、腔内の生菌数を定量する培養法の正確性が示されました。ただし、培養法およびコロニー PCR による解析結果とアンプリコンシーケンシングによる解析結果を比較し、主に *L. iners* の 検出結果に大きな違いが認められました (図 1, 2)。これは、腔内にて生存はしているが培養不可能な状態 (VBNC: Viable But Not Culturable) の *L. iners* が存在している、あるいは次世代シーケンシング法では死滅した *L. iners* を検出していたことに起因すると考えられました。さらに、培養法およびコロニー PCR による解析では、*Fannyhessea* と *Anaerococcus* はコロニー PCR による解析対象ではなかったため、同定できませんでした (図 2)。培養法によっては最も一般的な細菌を正確に同定することができましたが、より正確な解析のためには、*Fannyhessea*, *Anaerococcus*, *Sneathia*, *Megasphaera* などの BV 関連細菌を含む、追加のプライマーセットを用いた解析が必要であると考えられました。

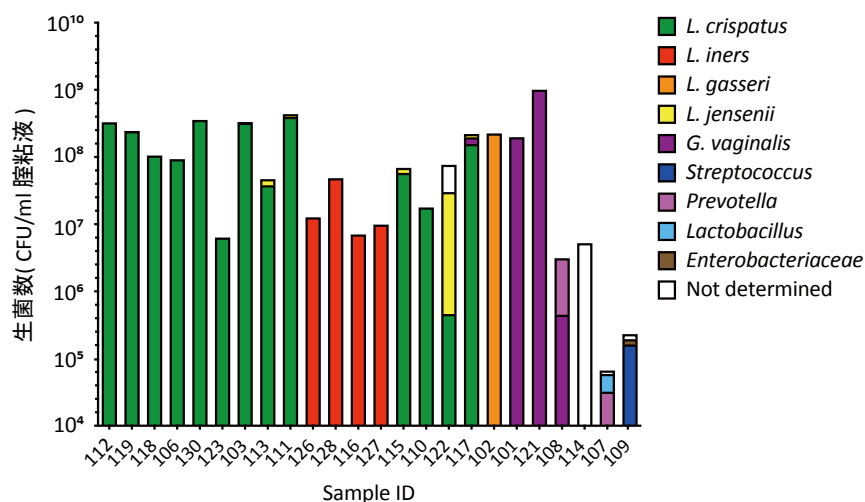


図 2. 腔内生菌数は個人間で大きく異なった

腔粘液を 4 種類の寒天平板培地に塗抹し一定期間培養後、得られたコロニーについて 16S または 23S rDNA を標的とした colony PCR を行い、腔内細菌叢の構成細菌種を同定しました。縦軸に腔内総菌数、横軸に検体 ID を示しました。

本研究では、50 μ l の膣粘液にて小数点以下 2 桁までの測定が可能であるサンプリングペーパー付きの pH メーターを用いて膣内 pH を測定しました。膣粘液中の最優勢細菌種が乳酸桿菌である細菌叢の膣内 pH は 4.5 以下であることが報告されています。一方、乳酸桿菌の割合が低下することは、嫌気性細菌の増殖と膣内 pH が 4.5 を超えることを特徴とする BV と関連することが知られています。本研究において、 $\text{pH} \leq 4.5$ グループの最優勢細菌種はすべて乳酸桿菌でしたが、最優勢細菌種として BV 関連細菌が検出された検体ではすべて $\text{pH} > 4.5$ でした (図 3A)。 $\text{pH} \leq 4.5$ であった検体では、乳酸桿菌が占める割合は 90% 以上であり、pH が最も低い 5 検体の最優勢細菌種はすべて *L. crispatus* でした (図 3A)。膣内 pH は、膣粘液中の生菌数と統計学的に有意な負の相関関係があることが示唆されました (* $P < 0.05$, 図 3B)。

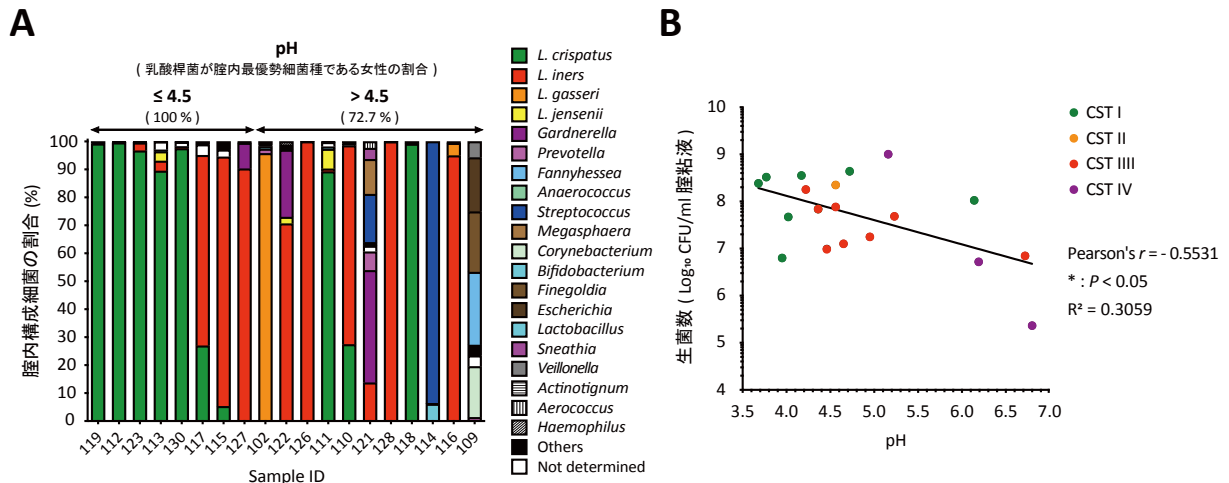


図 3. 膣内 pH と膣粘液中の生菌数には負の相関があった

膣粘液を 4 種類の寒天平板培地に塗抹し一定期間培養後、得られたコロニーについて 16S または 23S rDNA を標的としたコロニー PCR を行い、膣内細菌叢の構成細菌種を同定しました。縦軸に膣内総菌数、横軸に検体 ID を示しました。

世界保健機関 (WHO) により過体重に分類される $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$ の女性や、低体重に分類される $\text{BMI} < 18.5 \text{ kg/m}^2$ の女性では、*Gardnerella* や *Prevotella* などの BV 関連菌の検出率が高いことが報告されています。そこで、BMI が膣内細菌叢に影響を及ぼす影響を解析したところ、正常体重の女性 ($\text{BMI} 18.5\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$) における膣内細菌叢に占める乳酸桿菌の割合は、低体重の女性 ($\text{BMI} 18.5 \text{ kg/m}^2$ 未満) と比較し統計的に有意に高いことが示されました (図 4A)。さらに、BMI と膣内の生菌数には統計学的に有意な正の相関があること (図 4B)、BMI と膣内 pH には統計学的に有意な負の相関があることが明らかになりました (図 4C, D)。本研究における BMI はすべて 22 kg/m^2 以下でしたが、これらの結果は BMI が膣内生菌数や膣内 pH と関連していることを示しています。低体重であると、乳酸桿菌の膣内生菌数を減少するとともに、膣内 pH を上昇させることにより膣内細菌叢の安定性を低下させる可能性が考えられました。

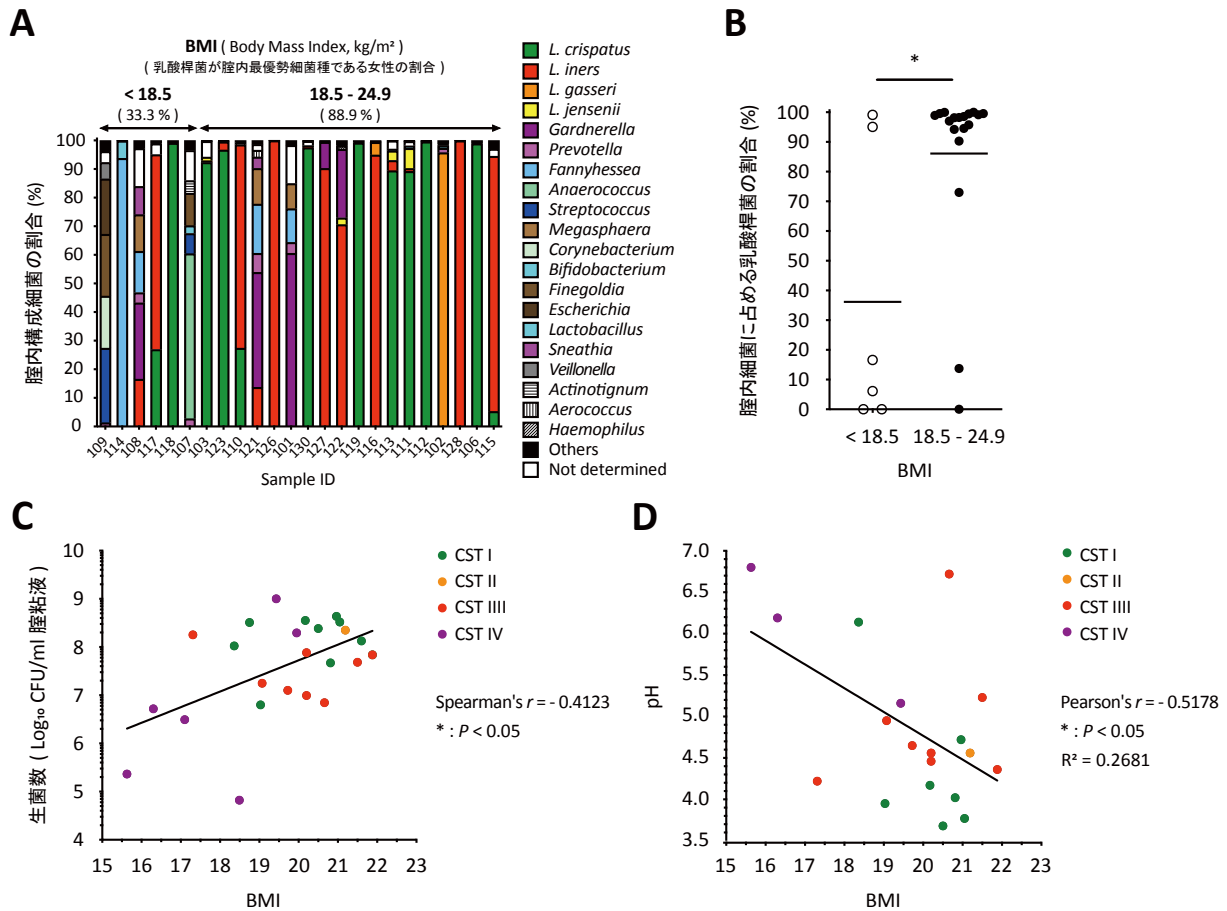


図 4. 腔内 pH と腔中の生菌数には負の相関がある腔スワブ中の腔内細菌叢、生菌数、および腔内 pH に有意な影響を与えた

(A) アンプリコンシーケンシングを用いて解析した腔内細菌叢組成の結果を BMI 別に左から低い順に並べた。(B) BMI が 18.5kg/m² 未満 (低体重) または 18.5-24.9kg/m² (標準体重) の各検体における乳酸桿菌の割合をプロットした。統計解析は Mann-Whitney U 検定を用いて行い、* $P < 0.05$ は統計的に有意な差を示しています。(C) 腔粘液中の生菌数、(D) 腔内 pH と BMI との関連を示しています。相関は、D'Agostino-Pearson 正規性検定を行った後、(C) スピアマンの相関係数または (D) ピアソンの相関係数を計算することによって評価され、* $P < 0.05$ は統計的に有意な差を示しています。

これまでに 40 歳未満の女性では腔内細菌の構成は比較的一定であった一方、40 歳以上の女性では安定していないことが報告されています。このことは、40~50 歳は腔内マイクロバイームがより脆弱になる重要な時期である可能性を示唆しています。乳酸桿菌が最優勢細菌である検体の割合および各検体中における乳酸桿菌の占める割合は、40 歳未満群と 40~50 歳グループとの間に有意差は認められませんでした (図 5A, B)。また生菌数についても有意差は認められませんでした (図 5C)。一方、40 歳未満の女性の腔内 pH は、40~50 歳群の女性のもよりも統計学的に有意に低い結果が得られました (図 5D)。これらの結果から、40~50 歳の女性は、閉経期を反映して、腔内細菌の総数に顕著な変化を受けることなく、腔内 pH に大きな影響を及ぼすことが示唆されました。40 歳以上で pH が平均を上回った検体はすべて、45 歳以上の参加者から採取されたものでした (図 5D)。40~50 歳の女性の一部は更年期に分類され、この時期性ホルモンであるエストロゲンレベルは周期的に閉経後レベルまで低下することが知られています。また、更年期におけるエストロゲンの減少により腔内 pH が上昇することも指摘されています。一方、更年期

期の生物学的メカニズムは複雑であるとも指摘されています。生存可能な腔内細菌の総数に大きな変化がないにも関わらず腔内 pH が上昇する正確な生物学的メカニズムは依然として不明ですが、この年齢層の女性の腔内 pH 値は、腔内マイクロバイオームの状況を判断する良い指標のひとつになりうると考えられました。

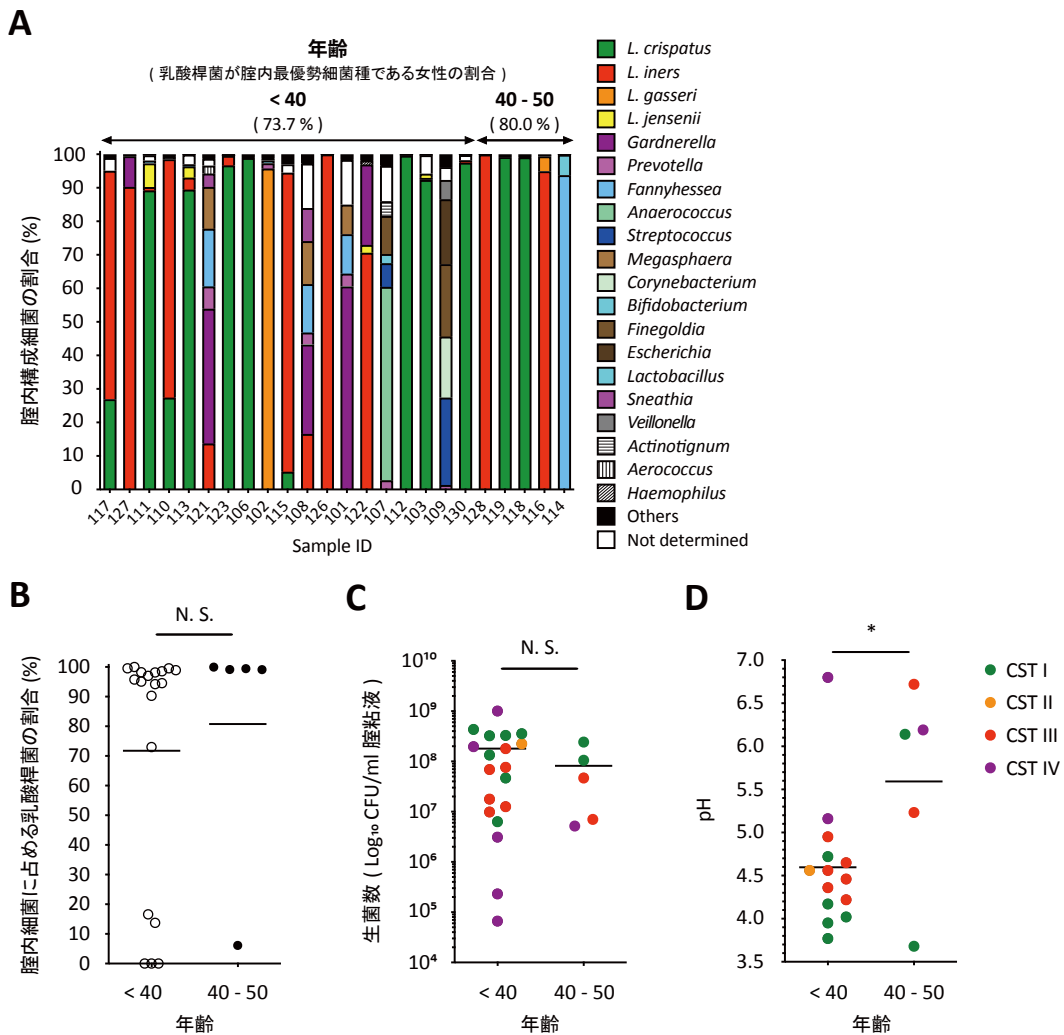


図 5. 40 歳から 50 歳の女性の腔内 pH は、40 歳未満の女性よりも有意に高かった。

(A) アンプリコンシークエンシング解析による腔内細菌叢組成の結果を年齢別に左から若い順に並べた。(B) 40 歳未満または 40~50 歳の女性の各検体における乳酸桿菌の割合をプロットした。(C) 腔粘液中の生菌数、(D) 腔内 pH と年齢 (40 歳未満または 40~50 歳の女性) との関連を強調した。統計的に有意な差 $*P < 0.05$ は、対応のない *t* 検定の結果に基づいて示されています。

今後の展開

腔内最優勢細菌種に基づき、健康な成人日本人女性の腔内細菌叢は 4 つのタイプに分類できました。また、相対分析と定量分析を組み合わせることで、腔粘液中の生菌総数には個人差があり、腔内生菌数は腔内 pH と負の相関があることも明らかになりました。さらに、BMI や年齢などの因子が腔内マイクロバイオームに影響を与えることも明らかになり、個人間の腔内は多様であると示されました。腔内マイクロバイオームは腔内環境の恒常性維持に重要な役割を果たし、女性生殖器疾患と密接に関連していると考えられていることから、その構成や存在量を明らかにすることは重要と考えられています。今後は DNA の存在量に基づき検出される細菌の種類やその割

合だけでなく、生菌数をも考慮した膣内マイクロバイオーーム研究がヒトと膣内細菌との相互作用を正しく理解するために必要と考えられました。

論文情報

掲載誌：*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

論文名：Diverse vaginal microbiota in healthy Japanese women: a combined relative and quantitative analyses

著者：伊藤 雅洋*、片岡 実咲、佐藤 陽一、名知 英樹、野本 康二、岡田 信彦 (*責任著者)

DOI：10.3389/fcimb.2024.1487990

用語解説

- ※1 BMI：ボディマス指数 (Body Mass Index, kg/m^2)。ヒトの肥満度を表す体格指数であり、「体重 (kg) ÷ 身長 (m) ÷ 身長(m)」で算出されます。BMI < 18.5 未満：痩せぎみ、 $18.5 \leq \text{BMI} < 25.0$ ：普通体重、 $\text{BMI} \leq 25.0$ ：過体重と定義されています。
- ※2 マイクロバイオーーム：一定の区域に生息する細菌叢、微生物叢全体を意味しそこに含まれる遺伝子物質やその機能も含めた概念。
- ※3 アンプリコンシークエンシング解析：腸内、口腔内や膣内などの環境サンプルから抽出した DNA から、細菌特有の 16S rDNA を増幅し塩基配列を解読することで、細菌叢を解析する手法です。この手法ではサンプルに含まれる細菌の種類や構成比率を解析できることから、多様な生物種が混在する検体中の生物群集を解析する優れた方法のひとつです。ただし、DNA を用いることから死菌も検出してしまう欠点もあります。
- ※4 CST：群集状態タイプ (Community State Type)。膣内細菌叢は一般的に最優勢細菌種が *L. crispatus* (community state type 1: CST1 と分類される), *L. gasseri* (CST2), *L. iners* (CST3), *Gardnerella vaginalis* など細菌性膣症 (bacterial vaginosis: BV) 起因細菌を含む Diversity group (CST4), *L. jensenii* (CST5) の 5 グループに大別されます。
- ※5 CFU：コロニー形成単位 (Colony Forming Unit)。

問い合わせ先

＜＜研究に関すること＞＞

北里大学薬学部微生物学教室

助教 伊藤 雅洋

e-mail：itom@pharm.kitasato-u.ac.jp

＜＜取材に関すること＞＞

学校法人北里研究所 広報室

〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1

TEL：03-5791-6422

e-mail：kohoh@kitasato-u.ac.jp

株式会社 ハナミスイ 営業部

〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-15-1

セントラルパークタワー・ラ・トゥール新宿 609 号室

TEL：03-6304-5797

e-mail：planning@hanamisui.jp

北里大学の伊藤雅洋助教が、6月1日(日)に、第41回日本産婦人科感染症学会学術集会(於：宮崎市民プラザ)で、本研究内容に関する発表(登壇セッション：14:55~15:45)をおこないます。