

氏名（本籍）	松宮良子（滋賀県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	乙第 1311 号
学位授与日付	平成 14 年 6 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal <i>Lactobacillus</i> species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction
審査委員	（主査）教授 渡邊邦友 （副査）教授 江崎孝行 教授 玉舎輝彦

### 論文内容の要旨

*Lactobacillus*は、ヒトの腸管内で恒常性維持に深く関係しているとされる重要な菌群である。乳幼児が腸管内に最初に獲得する*Lactobacillus*は母親の膣由来とする記載が多いが、それらは十分な科学的データに基づいたものとはいえない。この種の研究には、対象となる*Lactobacillus*の正確な同定法と再現性のある菌株のタイピング法が必要であるが、表現型を使用する従来法による菌種同定は、信頼性に乏しく、また*Lactobacillus*菌株のタイピング法は確立されていなかった。そこで、申請者は*Lactobacillus*菌株のタイピング法について基礎的研究を行い、arbitrarily primed PCR (AP-PCR)によるタイピング法が*Lactobacillus*のタイピングに有用であることを確認し、すでに教室で開発されていた*Lactobacillus*のPCRによる分子生物学的な菌種同定法を合わせ用いることにより、母児間における*Lactobacillus*の伝播経路について詳細な検討を行った。

#### 材料と方法

##### 1. AP-PCRによるタイピング法の有用性の検討

*Lactobacillus*参考菌株27株と岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設に保存されていた膣と糞便由来の*Lactobacillus* 60株を使用した。AP-PCRタイピングは、プライマーとして大腸菌のDNAに見られる繰り返し塩基配列から作成されたERICプライマーセット（ERIC1RとERIC2）を使用した。

##### 2. 母児伝播の検討

###### 1) 対象

*Lactobacillus*の母児伝播の検討には、岐阜市内の産婦人科クリニック2施設の妊婦86人とその母親から生まれた新生児86人を対象とした。なお、分娩はすべて経陰分娩で行われた。妊婦、新生児とも全員健康で、新生児の栄養は基本的に母乳で、不足のみ人工栄養であった。

###### 2) 検体採取、培養、分離同定

妊婦（妊娠37.0±1.2週）においては膣スワブを、新生児では生後5日目と1ヶ月目に糞便を検体として採取した。膣スワブは採取後直ちに、糞便は自然排泄後できるだけ早期に、0.13%に酢酸を添加したLBS選択培地（BBL）に塗布し、嫌気バッグに入れて搬送し、3～5日間嫌気培養後、菌の発育が見られれば、最大5コロニーを*Lactobacilli* MRS ager（Difco）に継代培養後、純培養菌を得た。純培養菌は、カタラーゼ陰性の分岐のないグラム陽性無芽胞桿菌であることを確認後、ガスクロマトグラフィーにて終末代謝産物が乳酸のみであることを確認し、*Lactobacillus*と同定した。次に、16S rRNAと23S rRNAのintergenic spacer regionおよび23S rRNAの菌種特異的塩基配列を利用したtwo-step multiplex PCR分析で菌種同定を行い、さらに申請者が開発した前述のAP-PCRによるタイピング法により、タイピングを行った。

#### 結果

##### 1. ERICプライマーセットを使ったタイピング法の有用性

大腸菌のDNAに見られる繰り返し塩基配列から作られたERICプライマーセットを使ったタイピング法により、*Lactobacillus*参考菌株の27菌種27株は24タイプに分類できた。また、保存菌株*Lactobacillus* 60株のAP-PCRタイピングでは、*Lactobacillus crispatus* 15株は6タイプ、*Lactobacillus fermentum* 10株は7タイプ、*Lactobacillus gasseri* 13株は11タイプに識別できた。本法は結果の解析が容易で、再現性があり、迅速・簡便

で、成績は菌株の継代によっても安定であった。

## 2. 母児伝播の解析

### 1) 属レベルでの解析

妊婦86人中71人が膣*lactobacilli*陽性であった。膣*lactobacilli*陽性であった母親の児24児 (33.8%, 24/71) が、生後5日目採取の便で*lactobacilli*陽性であった。また、膣*lactobacilli*陰性であった15人の母親の児1児 (6.7%, 1/15) が、5日目採取の便で*lactobacilli*陽性であった ( $p < 0.01$ )。生後5日目採取の便で*lactobacilli*が陽性であった24児のうち、1ヶ月後採取の便でも*lactobacilli*が陽性であったのは13児 (54.2%, 13/24) であった。また、生後5日目採取の便で、*lactobacilli*陰性であった47児中19児 (40.4%) が、1ヶ月後採取の便では*lactobacilli*陽性となった。

一方、膣*lactobacilli*が陰性であった母親をもつ児の5日目採取の便で*lactobacilli*陰性の14児中6児 (42.9%) が1ヶ月後採取の便で、*lactobacilli*陽性となった。

### 2) 菌種/菌株レベルでの解析

膣*lactobacilli*陽性の母親の児で、生後5日目採取の便で*lactobacilli*陽性であった24児中19児 (79.2%) から、母親の膣*lactobacilli*と同菌種の*lactobacilli*が検出されていた。母親の膣由来の株とタイプまで同一であったのは19児中15児 (78.9%) であった。5日目採取の便で*lactobacilli*陽性、そして1ヶ月後採取の便でも*lactobacilli*陽性であった13児中2児 (15.4%) が、母親の膣から同一タイプが分離された。膣*lactobacilli*陽性の母親の児で、生後5日目には陰性であったが、1ヶ月後採取の便で、*lactobacilli*陽性となった19児では、5児から母親の膣由来株と同一タイプが分離された。全体では、86組の母児のうち20児 (23.3%) に*lactobacilli*の明らかな母児伝播が認められた。

## 考察

今回の属レベルでの調査では、妊婦の82.6%が膣*lactobacilli*陽性であり、生後5日目では、全新生児の29.1%が、1ヶ月後では、45.3%が、糞便中*lactobacilli*陽性であった。属レベルで見ると、児は母親の膣に常在する*lactobacilli*を獲得したように見える。しかし、菌種同定とそれに引き続き行った菌株のタイピングの結果により、母児間のタイプレベルでの一致率は、生後5日で17.4% (15/86)、生後5日と1ヶ月を合わせた場合は23.3% (20/86) で、低率であった。また、生後1ヶ月目では、母親の膣由来ではない*lactobacilli*が多くの児から検出され、膣以外からの*lactobacilli*を獲得する頻度が高いことが示唆された。膣以外の由来として、母親の口腔、糞便由来、病院環境、人工乳などが考えられる。申請者は、分娩後1ヶ月目の母親8人のうち3人の母乳から*Lactobacillus gasseri*を検出した。母乳由来の*lactobacilli*を児は獲得した可能性があることを示す結果であるが、今後のさらなる研究が必要である。

以上、今回の検討で、母親から児への膣*Lactobacillus*の伝播は、23.3%に認められた。すなわち児による膣由来*Lactobacillus*の獲得はあまり高率ではない事実が明らかになった。また、プライマーERIC1RとERIC2を使用したAP-PCRタイピング法は、*Lactobacillus*のタイピング法として有用性が高いことが確認された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 松宮良子は、プライマーERIC1RとERIC2を使用した*Lactobacillus* 菌株のAP-PCRタイピング法を開発し、two-step multiplex PCRによる*Lactobacillus*の菌種同定法を合わせ用いることにより、膣に常在する*Lactobacillus*の母児間伝播を検討した。その結果、母親の膣*Lactobacillus*の母児伝播は全体の23.3%にとどまっており、生後1ヶ月目の時点で、*Lactobacillus*陽性であった児の82.1% (32/39) は、母親の膣に由来しない*Lactobacillus*を獲得しているとの成績を得た。本研究は、ヒトの腸内フローラの重要な一員である*lactobacilli*の定着に関する貴重な成績を含んでおり、細菌フローラ研究の発展に少なからず寄与するものと考えられる。

---

### [主論文公表誌]

Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction

2002年 Journal of Infection and Chemotherapy 8: 43~49