

氏 名 うえ の とも ひろ
上 野 智 浩

学位の種類 博士（医学）

学位記番号 富医薬博甲第 115 号

学位授与年月日 平成 25 年 9 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程

生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Eukaryote-made thermostable DNA polymerase enables highly sensitive and reliable PCR-based detection of bacteria, mycoplasma, ureaplasma and fungi in the amniotic fluid of preterm labor cases**

（真核生物をホストとして作成した耐熱性 DNA 合成酵素を用いることにより、切迫早産患者の羊水中における、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマの高感度かつ正確な PCR 検出が可能となる）

論文審査委員

（主査） 教授 林 篤 志

（副査） 教授 山 本 善 裕

（副査） 教授 白 木 公 康

（副査） 教授 清 水 忠 道

（指導教員） 教授 北 島 勲

論文内容の要旨

目的

早産でも特に予後不良の在胎 28 週以前の早産率は 1980 年の 0.12% から 2007 年では 0.26% と 2 倍以上に増加しており、大きな問題となっている。早産の主因は子宮内感染に基づく絨毛膜羊膜炎 (CAM) であることは知られているが、これまでの研究で切迫早産例に抗生物質を投与しても早産予防効果は得られていない。これは菌の培養・同定に約 1 週間を要するため、治療対象の選別を正しく行うことが困難で、適切な抗菌薬の選択も不可能であるからであり、結果が判明した時には既に大半が早産に至っている。

本研究では、(株)北海道三井化学および石川県立大学(森正之先生)との共同開発による eukaryote-made Taq polymerase を用いて高感度、正確、そして迅速(3 時間以内)に羊水中の感染微生物の有無を判定し、複数菌感染では更に量的比較を行い、絨毛膜羊膜炎に対して早期の抗菌薬治療に役立つ実践的な検査系を構築することを計画した。その結果、早産の予防、そして胎児の救命に役立てることが本研究の目標である。

方法ならびに成績

本研究では以下の方法を用い、高感度かつ正確な起炎微生物の PCR 検出系を構築した。

- 1, 細菌の検出においては、真核生物である酵母および植物細胞をホストとして、バクテリア DNA のコンタミが皆無である eukaryote-made Taq Polymerase をリコンビナントに作成し、bacterial universal primer を用いた高感度な PCR 検出を行った。更に、細菌は検出するがマイコプラズマ・ウレアプラズマは検出しない独自のプライマーを alignment software (ClustalX) を用いて設計し、nested PCR の系を構築することで、マイコプラズマ・ウレアプラズマとの混合感染を識別できるようにした。
- 2, 真菌の検出においては、細菌の場合とは逆に従来 of Taq Polymerase と fungal universal primer

を組み合わせ、高感度な PCR 検出を行った。3, マイコプラズマ・ウレアプラズマの検出においては、上記の eukaryote-made Taq Polymerase の使用に加え、bacterial universal primer (細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマの全てを検出) とマイコプラズマ・ウレアプラズマ特異的な primer を組み合わせた nested PCR の検出系を構築した。4, 上記の細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマの検出においては、それぞれ同じプライマーで 1st PCR を行い、次に同じ amplicon から nested PCR を行うことで、混合感染時の量的比較を可能とし、抗菌薬治療に役立つ実践的な検査系を目指した。

5, 実際に 305 症例の羊水検体を用いて、1ml のサンプルを超遠心後にペレット化し DNA の抽出を行い、検査を実施した。6, 培養法を用いた検出結果と我々の構築した PCR 法による検出結果との一致率を調べたところ、細菌: 87.9%, 真菌: 99.7%, マイコプラズマ: 93.1%, ウレアプラズマ: 94.4%であった。具体的な検出数は、細菌検出: 培養 (-) PCR (-) 224, 培養 (+) PCR (+) 44, 培養 (+) PCR(-) 9, 培養 (-) PCR (+) 28, 真菌検出: 培養 (-) PCR (-) 302, 培養 (+) PCR (+) 2, 培養 (+) PCR(-) 0, 培養 (-) PCR (+) 1, マイコプラズマ検出: 培養 (-) PCR (-) 278, 培養 (+) PCR (+) 6, 培養 (+) PCR(-) 1, 培養 (-) PCR (+) 20, ウレアプラズマ検出: 培養 (-) PCR (-) 269, 培養 (+) PCR (+) 19, 培養 (+) PCR(-) 2, 培養 (-) PCR (+) 15 であり、いずれも PCR 法の方が、高い感度を示す結果が得られた。

細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマにおける混合感染について、我々は患者羊水検体 28 検体を用いて量的比較を試みた。その結果、明瞭に量的順位をつけることが可能であった。また、細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマを全て検出するプライマーを基準プライマーとして設定することで、検出結果を二重にチェックできるようにした。

総括

我々は eukaryote-made thermostable DNA polymerase と nested PCR 法とを併用することで、高感度・高特異度で信頼性の高い起炎微生物の検出を行うことを可能とした。また、混合感染には量的比較を行うことで、細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマの量的順位をつけ、抗菌薬選択に役立つ情報を付加できるようにした。

子宮内感染症迅速検査の有用性が確認できれば超早産の減少、ハンディキャップをもつ児の減少につながり社会的にも大きなメリットを有する。今後は菌の有無の検査のみに留まらず、起炎菌の迅速同定検査も組み合わせることで、子宮内感染症の早期治療に役立てたいと考えている。

学位論文審査の要旨

【目的】

早産の原因となる絨毛膜羊膜炎の早期診断を行うため、真核生物を利用して作成したリコンビナント thermostable DNA polymerase を用いて高感度、高特異度かつ迅速（3時間以内）に羊水中の感染微生物の有無の判定と起炎菌を同定し、さらに複数菌感染では量的比較を行うことで、絨毛膜羊膜炎に対して早期の適切な抗菌薬治療に役立つ実践的な検査系を構築することを目的とした。

【方法ならびに成績】

真核生物（酵母および植物細胞）を宿主として、細菌 DNA のコンタミネーションが皆無であるリコンビナント eukaryote-made thermostable DNA Polymerase を作成した。細菌検出においては、本酵素と bacterial universal primer を用いた高感度 PCR を行った。更に、細菌は検出するがマイコプラズマ・ウレアプラズマは検出しない独自のプライマーおよびマイコプラズマ・ウレアプラズマにそれぞれ特異的なプライマーを alignment software (ClustalX) を用いて設計し、nested PCR 法を行い、マイコプラズマ・ウレアプラズマとの混合感染も識別できる検査システムを構築した。また、真菌検出においては、細菌の場合とは逆に従来の thermostable DNA Polymerase と fungal universal primer を組み合わせた PCR 検出を行った。起炎菌の量的比較を行うために同じプライマーで 1st PCR を行い、次に同じ amplicon から nested PCR 法を行うことで、混合感染時の量的比較を可能とした。

次に、305 症例の羊水検体を用いて、1ml のサンプルを超遠心後にペレット化し DNA の抽出を行い、感染微生物の検出を行った。培養法での検出結果と開発した PCR 法による検出結果との一致率を調べたところ、細菌：87.9%，真菌：99.7%，マイコプラズマ：93.1%，

ウレアプラズマ：94.4%であった。検出感度においてはPCR法の方が高感度であった。

混合感染が疑われた羊水検体28検体を用いて量的比較を試みた結果、細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマについて明瞭に量的順位をつけることが可能であった。

【総括】

eukaryote-made thermostable DNA polymerase と nested PCR 法とを併用することで、高感度・高特異度で信頼性の高い起炎微生物の検出が可能であった。また、混合感染には量的比較を行うことで、細菌・マイコプラズマ・ウレアプラズマの量的順位をつけることができた。本研究の成果は、従来培養法と比較して子宮内感染症の迅速診断に有用であり、早期治療に貢献できることで、超早産児の減少につながり社会的にも大きなメリットを有すると考えられる。

以上のことから、羊水中の感染微生物の有無および複数菌感染で起炎菌の量的比較ができることを初めて明らかにした点は新規性があり、絨毛膜羊膜炎に対して早期診断、早期治療に役立つ実践的な検査系を構築したことは医学における学術的重要性も高く、子宮内感染症の迅速診断と適切な抗菌治療により超早産児の減少を可能にする点で、その臨床的発展性を強く期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。