

羊水中病原微生物の迅速同定と迅速薬剤感受性試験を用いた 産科診療システムの構築

The rapid identification method of pathogenic microorganisms
and the rapid antimicrobial susceptibility test in the amniotic
fluid of preterm labor cases

——— 仁井見英樹¹⁾・上野智浩¹⁾・森正之²⁾・多葉田誉³⁾・南洋³⁾・齋藤滋⁴⁾・北島勲¹⁾

早産でも特に予後不良の在胎 28 週以前の早産の主因は子宮内感染に基づく絨毛膜羊膜炎 (CAM) であるが、菌の同定や薬剤感受性検査に数日要するため、結果が判明した時には既に大半が早産に至っている。

我々は羊水採取後 3 時間以内に不特定の起炎菌同定を可能とする Tm mapping 法、および迅速感受性試験法である液相 Cell-Counting 法を開発した。本検査は CAM 早期に適切な抗菌薬選択を可能とし、胎児の救命につながる。

Tm mapping 法の評価のため、107 菌種のバクテリア DNA を用いて blind test を行った結果、107 菌全てが match した。次に 150 の培養コロニーを用いて同定を試みた結果、正答率は 97% であった。更に羊水 11 検体を用いて迅速同定を試みた結果、判定基準外の 3 検体を除いた 8 検体中、7 検体が match した。

液相 Cell-Counting 法の評価のため、9 菌種 94 菌株を用いて液相 Cell-Counting 法で blind test を行った。その結果、正答率は 2 時間値が 74.5%、3 時間値が 84.6%、4 時間値が 90.7% であった。即ち、羊水検体採取後、予備増殖を含め、4～6 時間後には高い正確性で薬剤感受性結果を提示できることを示した。

The percentage of premature delivery before 28 weeks of pregnancy is increasing, which is a serious issue in the obstetric field. The primary cause is the chorioamnionitis based on the intrauterine infection. Using the culture-based identification, it usually takes one week, so it is difficult to treat patients with optimal antibiotics. As a result, not a few patients with chorioamnionitis often results in the premature delivery.

To solve the problems above, we developed the Tm mapping method that is the rapid identification method of pathogenic microorganisms in amniotic fluid, and the liquid cell-counting method that is the rapid antimicrobial susceptibility test.

To estimate the Tm mapping method, we first performed blind tests using the 107 kinds of bacterial DNA registered in the database, and all results matched the pre-sequenced bacterial DNA. Next, using 130 bacterial colonies suitable for Tm mapping method, 97% (126/130) of the results matched the sequencing results. Finally, using eight amniotic fluids suitable for Tm mapping method, seven of the results matched the sequencing results.

To estimate the liquid cell-counting method, we performed blind tests using the 94 bacterial colonies already identified the antimicrobial susceptibility, and results were 74.5% (2 hours incubation), 84.6% (3 hours incubation), and 90.7% (4 hours incubation) matched the

pre-identified antimicrobial susceptibility.

The Tm mapping method and the liquid cell-counting method would be especially useful for infectious diseases that require prompt treatment, and so would contribute to the treatment of preterm labor cases.

Key words: preterm labor, chorioamnionitis, infectious disease

Hideki Niimi ¹⁾, Tomohiro Ueno ¹⁾, Masashi Mori ²⁾, Homare Tabata ³⁾, Hiroshi Minami ³⁾, Shigeru Saito ⁴⁾, Isao Kitajima ¹⁾

1) 富山大学附属病院 検査部 2) 石川県立大学 生物資源工学研究所 3) 北海道三井化学株式会社 植物機能センター 4) 富山大学附属病院 産科婦人科

1) Clinical Laboratory Center, Toyama University Hospital, 2) Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, 3) Phytochemical Research Center, Hokkaido Mitsui Chemicals Corporation

4) Department of Obstetrics & Gynecology, Toyama University Hospital

はじめに

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。これは菌の培養に約1週間、薬剤感受性検査にさらに数日要するため、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り、結果が判明した時には既に大半が早産に至っている¹⁾⁻⁴⁾。

従って、臨床の現場からはCAM早期に起炎菌を迅速同定する検査方法の確立が求められている。羊水採取からスタートして2～3時間で起炎菌を同定するシステムの構築が可能ならば、CAM早期に同定結果に基づいた適切な抗菌薬選択が可能となり、胎児の救命につながる。

そこで、我々は羊水採取後3時間以内に不特定の起炎菌同定を可能とする新たな方法(Tm mapping法)を開発し、検査システムとして構築した。更に、液相による増菌とCell Counterとを併用する新規方法(液相Cell-Counting法と命名)

を考案し、検査室で羊水検体受取りから4～6時間で判定できる迅速な薬剤感受性試験の構築を試みた。これらの迅速検査法により、CAMに対して迅速な抗菌薬治療が行える産科診療システムを構築することが本研究の目的である。

1. 新たな起炎菌迅速同定方法:Tm mapping法

感染症起炎菌迅速同定システムの概要を図1に示す。本システムでは患者検体から直接抽出した微生物DNAを鋳型とし、複数のuniversal primerを用いてnested PCRを行い、melting解析で得られた複数のmelting temperature (Tm) 値を二次元にmappingして、その“形(Tm mapping shape)”を菌種特異的な形としてデータベースと照らし合わせることで迅速に同定する。この新たな方法を、我々はTm mapping法と命名した。データベースとの照合・同定には、起炎菌同定ソフトウェアをWeb上で使用する。データベースは現在、富山大学附属病院で過去5年間に検出された107菌種をsequencingで確認した後に登録している。また、bacterial universal primerを用いた起炎菌のPCR検出には、北海道三井化学(株)と共同開発したeukaryote-made Taq polymerase⁵⁾(真核生物を宿主細胞として作成したTaq

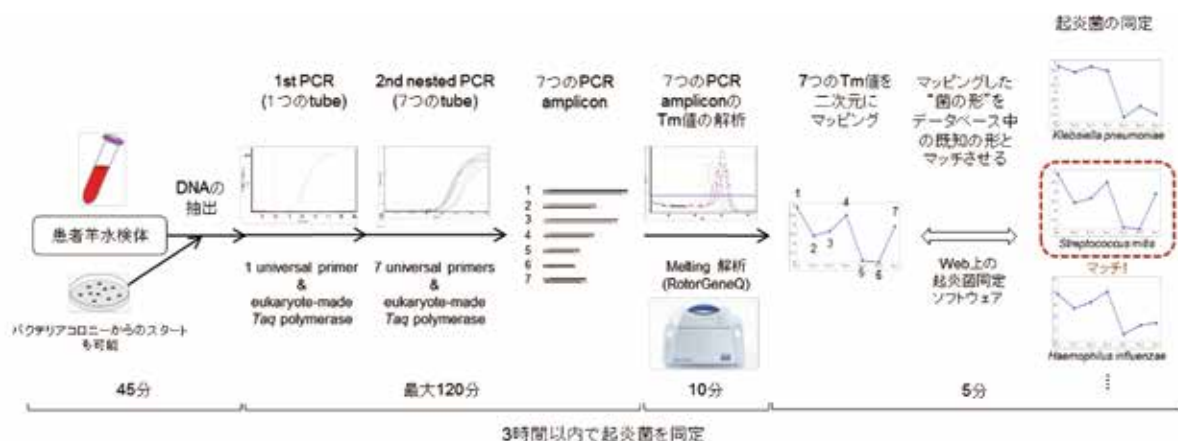


図1 起炎菌迅速同定システムの概要

polymerase) を用いる。これは bacterial DNA contamination-free を初めて実現した Taq polymerase であり、患者検体より直接、高感度で正確なバクテリア DNA の検出を可能とする。また、感度・特異度を更に高め、夾雑物による Tm 値への影響を排除するために、本システムでは nested PCR を採用した。

2. 迅速な薬剤感受性試験法（液相 Cell-Counting 法）開発の試み

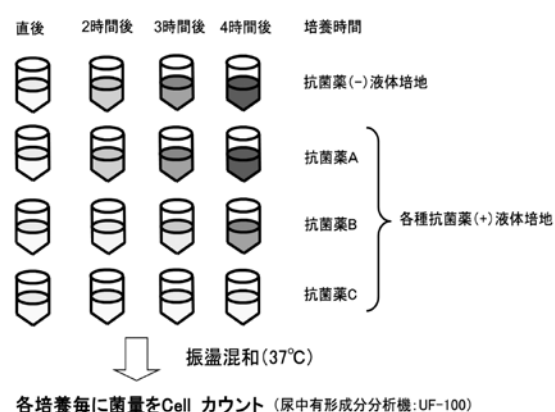


図2a 液相 Cell-Counting 法での培養

我々は迅速な薬剤感受性試験を行うため、①液相での菌増殖を行う、②Cell Counter で細菌数を数える、③菌増殖率を比較する、との方法を考案した。すなわち、先ず臨床検体から細菌を集菌して菌液を作成し、その菌液を液体培地（±抗菌薬）

にそれぞれ等分して2～4時間、37℃で振盪培養した（図2a）。次にCell Counter（尿中有形成成分分析機 UF-100:Sysmex）にて抗菌薬毎に菌数をCell カウントし、抗菌薬なしの液体培地との増殖比率（菌増殖抑制率）を算出した（図2b）。そして、

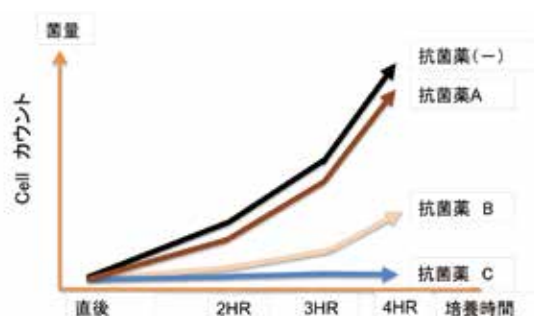


図2b 抗菌薬による菌の増殖率の違いを Cell カウントで測定

その結果から抗菌薬に対する感受性 (S)、耐性 (R)、中間 (I) の判定を行なった。我々はこの方法を“液相 Cell-Counting 法”と命名した。

3. Tm mapping法の判定基準と正確性の評価

我々は Tm mapping 法による起炎菌同定を正確に行うために、Tm mapping shape の相似の程度を数値化した Difference Value を基にして、判定基準を作成した。機器の測定誤差を考慮すると、Difference Value 0.3 未満の同定結果が2菌種得られた場合、どちらも共に起炎菌の可能性がある。

表 1 Tm mapping 法を用いた起炎菌迅速同定システムの正確性の評価

Difference Value (D)	サンプル数	vs. Sequencing method			
		No. of matches	No. of broad matches	No. of mismatches	解析不能
バクテリアDNA(107菌種)を用いたブラインド・テスト					
0.0 ≤ D < 0.3	107	106	1	0	0
0.3 ≤ D < 0.4	0	0	0	0	0
0.4 ≤ D < 0.5	0	0	0	0	0
0.5 ≤ D	0	0	0	0	0
バクテリア・コロニー(140コロニー:51菌種)を用いた迅速同定					
0.0 ≤ D < 0.3	110	98	10	2	0
0.3 ≤ D < 0.4	17	15	1	1	0
0.4 ≤ D < 0.5	3	2	0	1	0
0.5 ≤ D	10	5	0	5	0
臨床羊水検体11検体を用いた迅速同定					
0.0 ≤ D < 0.3	5	5	0	0	0
0.3 ≤ D < 0.4	2	2	0	0	0
0.4 ≤ D < 0.5	1	0	0	1	0
0.5 ≤ D	3	1	0	0	2

この場合、同定結果は「共に起炎菌の可能性あり」と判定するに留まる。正確性のテストにおいて、Difference Value 0.3 未満に 2 菌種が同定され、そのうち 1 菌種が sequencing の同定結果と一致した場合、我々は“broad match”という表現で定義した。また、Difference Value が最小でも 0.5 以上の場合、Tm mapping shape はデータベースと明らかに異なる（データベースに存在しない）ため、起炎菌を同定しないことにした。この場合、「臨床検体中にバクテリアが存在する」と判定するのみである。

本システムにおける起炎菌同定の正確性を評価するために、以下の 3 つのテストを行った (Table 1)。先ずデータベース登録に用いた 107 菌種のバクテリア DNA を用いて、ブラインド・テストでの同定を試みた。その結果、match が 106 菌、broad match が 1 菌であった。

次に、150 の培養コロニー (51 菌種) からそれ

ぞれ DNA を抽出し、Tm mapping 法を用いて菌の同定を試みた。そして、sequencing との一致率、すなわち正答率を算出した。その結果、Difference Value 0.5 以上の 10 コロニーを除いた 140 コロニー中、match が 115 コロニー、broad match が 11 コロニー、mismatch が 4 コロニーであり、match と broad match を合わせた正答率は 97% であった。

最後に、11 症例の臨床羊水検体からそれぞれ DNA を抽出し、Tm mapping 法を用いて 3 時間以内での菌の迅速同定を試みた。そして、sequencing との一致率、すなわち正答率を算出した。その結果、Difference Value 0.5 以上の 3 検体を除いた 8 検体中、match が 7 検体、mismatch が 1 検体であった。尚、mismatch の 1 菌はデータベース中に登録されていなかった。

4. Blind Test による液相 Cell-Counting 法の正確性の評価

液相 Cell-Counting 法による薬剤感受性試験の正確性を評価するため、Walk Away で既に結果の出ている9菌種94菌株を用いて疑似血液検体を作り、Walk Away の結果 (R, I, S) を隠して液相 Cell-Counting 法での Blind Test を行った。用いた抗菌薬は15薬剤である。培養2時間、3時間、4時間での Walk Away との結果 (R, I, S) 比較、および一致率 (正解率) を示す (図3)。結果は2時間値

液相Cell-Counting法				
	R	I	S	計
WalkAway				
R	22	0	6	28
I	0	0	3	3
S	13	2	48	63
計	35	2	57	94
				2時間値:74.5%
	R	I	S	計
R	20	0	7	27
I	0	0	3	3
S	4	0	57	61
計	24	0	67	91
				3時間値:84.6%
	R	I	S	計
R	22	0	6 ¹⁾	28
I	0	0	3 ²⁾	3
S	0	0	66	66
計	22	0	75	97
				4時間値:90.7%

図3 Walk Away と液相 Cell-Counting 法との一致率

が74.5%、3時間値が84.6%、4時間値が90.7%であり、4時間値の一致率が最も高かった。すなわち、羊水検体採取後、予備増殖 (2時間) を含め、4～6時間後には高い正確性で薬剤感受性結果を提示できることを示した。

おわりに

以上、Tm mapping 法、および液相 Cell-Counting 法のCAM 早期の迅速検査への応用について、方法論とその正確性を評価した。子宮内感染症迅速検査の有用性が確認されれば超早産の減少、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。これら感染

症迅速検査を実用化することで、子宮内感染症の早期治療に役立てたいと考えている。

[文献]

- 1) Berger A, Witt A, Haiden N, Kretzer V, Heinze GY, Kohlhauser C. Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short term outcome of preterm infants. J Perinat Med 2003; 31:115-121 .
- 2) Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med 2000; 342:1500-1507.
- 3) Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Boksrom H, Holst RM, Wennerholm UB, Hagberg H. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a swedish population of women in preterm labor. Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82:120-128.
- 4) Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002; 8:3-13.
- 5) Niimi, H, Mori M, Tabata H, et al. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination, J Clin Microbiol 2011; 49:3316-3320.