Simple broad-range polymerase-chain reaction detects bacterial-culture negative subclinical intra-amniotic infection in preterm birth

（Broad-range PCR 法は早産での潜在的な子宮内感染を検出する）

千葉大学大学院医学薬学府

先端生命科学専攻

（主任：生水　真紀夫教授）

森本　沙知

＜緒言＞

メタゲノム解析や次世代シークエンサーなどの分子生物学的技術の進歩により、母体細菌叢とそれらと早産との関連性がわかるようになってきた。胎盤は無菌的ではなく、様々な細菌叢で構成されている。このため、羊水腔には高頻度で細菌は存在しており、細菌が炎症の重症度や早産の発症、新生児疾患率と関連している。

分子生物学的手法により、羊水中の培養不可能な菌や培養困難菌の検出が可能となった。その技術は感度が高いため、少量の細菌による不顕性感染も検出できる。しかし、この技術はまだ研究段階であるため、この方法を臨床応用するためには簡便な方法を開発し、既存の培養法より臨床的に有意義であることを示す必要がある。

この研究で、われわれは分子生物学的手法を用いた簡便な方法で早産における子宮内感染起炎菌の検出を試みた。さらに、この方法を既存の培養法と比較し、どちらが不顕性子宮内感染の検出に効率がよいか比較した。

＜対象と方法＞

2011 年 1 月から 2012 年 12 月までに破水、未破水を含む切迫早産の管理目的に経腹的に羊水穿刺をした 64 例を対象とした。今回の 16RDNA 解析ではカンジダは検出不可能であるため、カンジダの単独感染例は除外した。この研究は非介入研究であり、千葉大学の倫理審査の承認を得ている。

細菌培養は 3 種の寒天培地を用いて行い、ウレアプラズマ、マイコプラズマ培養は特殊培養により検出した。胎盤の炎症所見は HE 染色を用い、Blanc 分類で stage1～3 に分類した。サイトカイン計測は免疫測定法(CLEIA、ELISA 法)を用いて測定し、子宮内感染は羊水中の IL-6 値 2.6ng/ml 以上、胎児感染は臍帯血中 IL-6 値 11pg/ml 以上と定義した。

PCR 法はプライマー0.3mM、dNTPs40mM、HotStartTaq0.25 単位、1×PCR buffer mix、抽出した DNA を含む 10ml 系で行った。PE9700 サーマルサイクラーを用い、反応条件は 95℃5 分、94℃30 秒、60℃30 秒、72℃60 秒を 30 サイクル、72℃10 分で設定した。反応液のうち 5ml を 1%アガロースゲル上で泳動後、EtBr 染色し、DNA を検出した。陰性コントロールは ddH_2O を使用した。プライマーは 5’-ACTCCTRCGGGAGGCAGCAG-3 (Bact338F) と 5’-GACGGGCGGTGWGTRCA-3’ (Bact1470R)を使用した。増幅産物はサブクロー

ニング後に BigDye terminator v3.1 sequence kit と ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を使用し配列を決定した。塩基配列を BLAST 検索にかけ、最も相同性が高い菌種を 97-100%の一致率で決定した。

16SrDNA 量は Light cycler を用いた real time PCR 法で定量し、コントロールとのΔCq 値の差で相対定量した。Real time PCR で使用したプライマーはウレアプラズマ、マイコプラズマや他の細菌に共通な配列を含むように作成された 5'-GCTGCATGGCTGTCGTCA-3' (16S_qV7_F) と 5'-TTGACGTCATCCCCACCTTC-3' (16S_qV7_R)を使用した。この反応系では測定間の不一致や環境からのコンタミネーションを最小限にするために手順を簡便にした。master mix はまとめて一括調整し、その後反応チューブに分注して凍結保存した。それぞれの反応では羊水から抽出した DNA(1ml)を分注した 9ml の master mix に加えて行った。コントロール反応(ΔCq 測定の基準)は ddH_2O を使用した。それぞれのサンプルはコントロールも同様に外因性の 50 コピーの DNA を含んでいるので、測定されたΔCq 値は-1 より小さくなった。また測定内や測定間の不一致率はそれぞれ 31%,7%であった。

統計解析は胎盤炎症所見を示す Blanc 分類は陰性と stage1 は 0、stage2,3 は 1 に変換し、二値変数で Wilcoxon 符号順位検定を用いて解析した。他の臨床検査値との比較はフィッシャー直接検定を使用し、−ΔCq 値と臨床検査値との相関関係は線形回帰分析を使用した。

＜結果＞

研究対象である 64 症例の背景を Table1 に示した。初産、１経産がそれぞれ 25 例であり最も多かった。羊水穿刺時の平均妊娠週数は 31 週(23-35 週)であり、1/4(16 例)は羊水穿刺前に破水していた。1/3(21 例)は羊水中のサイトカインが上昇しており、子宮内感染と診断された。

顕性感染は 8 例の新生児に認めたが死亡例はなく、2 例の新生児死亡例があったが感染以外の原因であった。

子宮内感染症例 21 例のうち 12 例で PCR 陽性、7 例で培養陽性であり、定性 PCR は培養法より多くの子宮内感染症例を検出することがわかった(Fig1)。

次に、培養陽性例での PCR 法の正確性を確認した(Table2)。培養陽性例 9 例はすべてで PCR 法陽性であった。一方で PCR 法陽性の 13 例で培養陰性であった。これらの結果、PCR 法は培養困難な細菌や培養不可能な細菌による不顕性

感染を検出することがわかった。

細菌 rDNA の検出が臨床的に有意義か否かを検討する目的で、今回の分析では培養陰性症例の臨床的特徴を比較検討した(Table3)。培養陽性症例を除いた55 例について解析したところ、PCR 陽性例では PCR 陰性例に比し、羊水中 IL-6 値の上昇、糖濃度の低下を認めた〔$p<0.05$〕。胎盤の炎症所見(Blanc stage2 以上)も PCR 陰性症例より、陽性症例の方が顕著であった。CRP 値は、新生児血・臍帯血で PCR 陽性症例が高値を示した。培養法による陽性陰性の判定でも炎症反応との相関がみられたものの、PCR 法では培養では陰性と判定された 3 症例で高度の子宮内感染(羊水中 IL-6 値が 40ng/ml 以上)を検出した。これらの結果、PCR 法では重度の胎児感染に加え、不顕性の子宮内感染を検出することが明らかとなった(Table3)。

PCR 法で検出された細菌種を Table4 に示した。シークエンスで 97%以上の相同性を示す 24 種の遺伝子配列が検出された。PCR 法では培養法より 4 倍多くの種類の菌を検出し、複数菌種の混合感染を検出することがわかった。ウレアプラズマの検出効率は同じであった（Table5)。

羊水中の細菌の rDNA 量が胎児感染の重症度の点で有用かどうか調べるために、定量 PCR 法を行い、臨床検査値と比較した。$-\Delta$Cq 値は羊水中の糖濃度で負の関連性があり、羊水中、臍帯血中の IL-6,IL-8 と正の関連性を認めた(Table6, Fig2)。細菌量と臨床検査値との相関は培養陽性例においても有意であった。

＜考察＞

この研究でわれわれは broad-range PCR 法が培養法よりより多くの子宮内感染と複数菌種の感染を検出することを示した。培養陰性、PCR 法陽性症例は有意に子宮内感染が多かった。定量 PCR 法による分析では細菌量が子宮内感染や胎児炎症性症候群の重症度と関連していることが示された。これらの成績から、broad-range PCR 法は、切迫早産症の管理において、重症感染例ではターミネーションの上新生児治療に移行し、軽症不顕性感染では抗生剤治療や子宮収縮抑制剤により妊娠継続をはかるといった個別化治療のための意思決定に寄与する可能性が示された。すなわち、分子学的手法の導入が切迫早産管理に有益であることが示唆された。

ほとんどの子宮内感染は病原性の低い菌による慢性感染によって起こり、症状の有無は細菌の量や多菌種の混合感染に依存していると一般的に考えられて

いる。今回の成績は羊水中の細菌 DNA 量と糖濃度、臍帯血の IL-6 が子宮内感染、胎児炎症性症候群と関連を確認するものであった。細菌の rDNA 量と羊水中の IL-6 値の関連性はこれまでに指摘されていたが、羊水中の rDNA 量が臍帯血中の炎症反応の重症度と関連していることはわれわれの研究で初めて示された。これは real time PCR による定量が胎児感染の重症度の検出に利用できることを示唆している。16SrDNA のオペロンコピー数は細菌の種類によって異なるため、必ずしも細菌の量と直線状に比例しているとはいえないことが指摘されている。しかし、感染による DNA の増加は 10～100,000 と大きく、DNA コピー数の差を遥かに上回るため、重症感染症の有無の判定にオペロンコピー数の違いは大きく関与しないと考えられた。この相関性を確かめるに、より多くの症例による検討が必要である。

この研究ではコントロール(50 コピーの rDNA を含む)と比較して相対的に定量する簡便な PCR 法を用いた。この方法を用いたのにはいくつかの理由がある。まず第１にこの方法は便利で時間が節約でき、臨床に利用するのに都合がよい。第２に子宮内感染はいったん起こると細菌 rDNA 量は制御できるレベルを超えているほど増加する。また、DNA 抽出キットや他の研究室の試薬によるコンタミネーションがあるため、少数の rDNA 量を検出するのは困難である。外因性のコンタミネーションに加え、市販の DNA ポリメラーゼは細菌由来のかなりの量の DNA が内因性に存在している。この研究では培養陽性の ΔCq 値の最低値は-3.06(417 コピーと同量)でこの測定系の感度より 8 倍大きいことから、本測定系ではバックグラウンドと感染による上昇とが区別できているものと思われた。

この研究の最大の問題点は症例数が少ないことである。このため破水例、未破水例で分けて解析していない。さらに、今回の PCR 法ではカンジダなどの真菌類は検出しておらず除外した。症例数が少ないのと短い観察期間、予後不良例が少なかったため児の神経学的予後は解析していない。

われわれは broad-range PCR 法が培養法では見落とされていた少数の培養不可能な細菌により引き起こされる軽度～重症な子宮内感染の検出に有用であることを示した。さらに 16SrDNA 量と子宮内感染の重症度に関連があることを見いだした。定量 PCR 法を用いて炎症の重症度評価をし、早産の管理や新生児予後を改善するかどうかを明らかにするためにはさらに症例数を増やした研究が必要である。

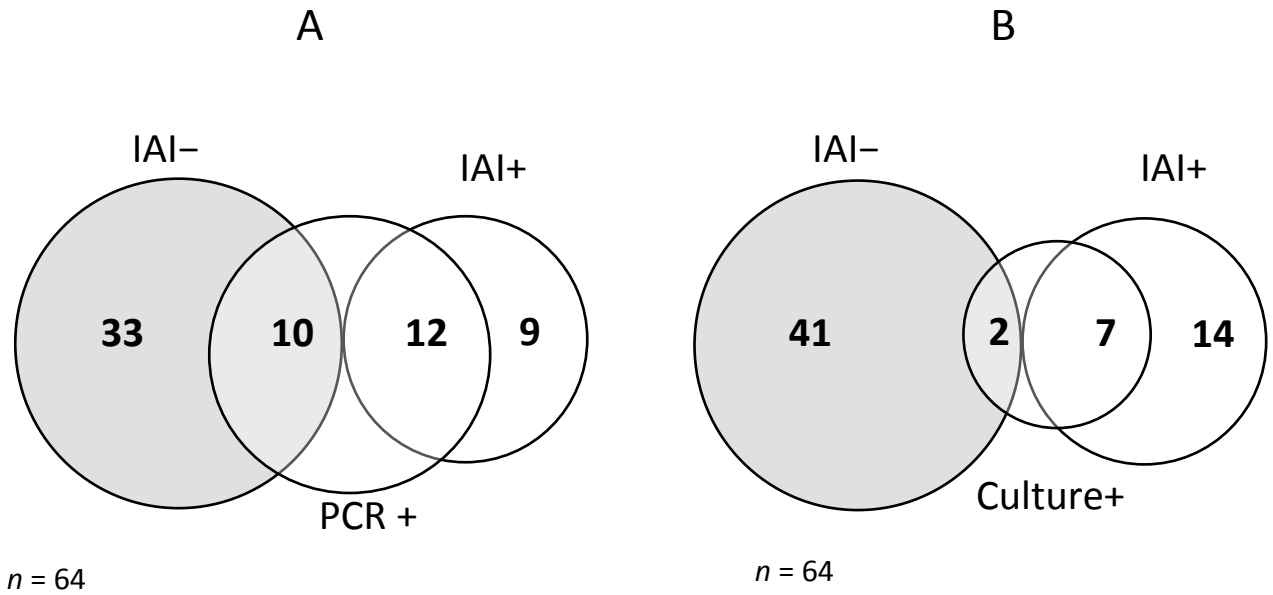

Fig. 1

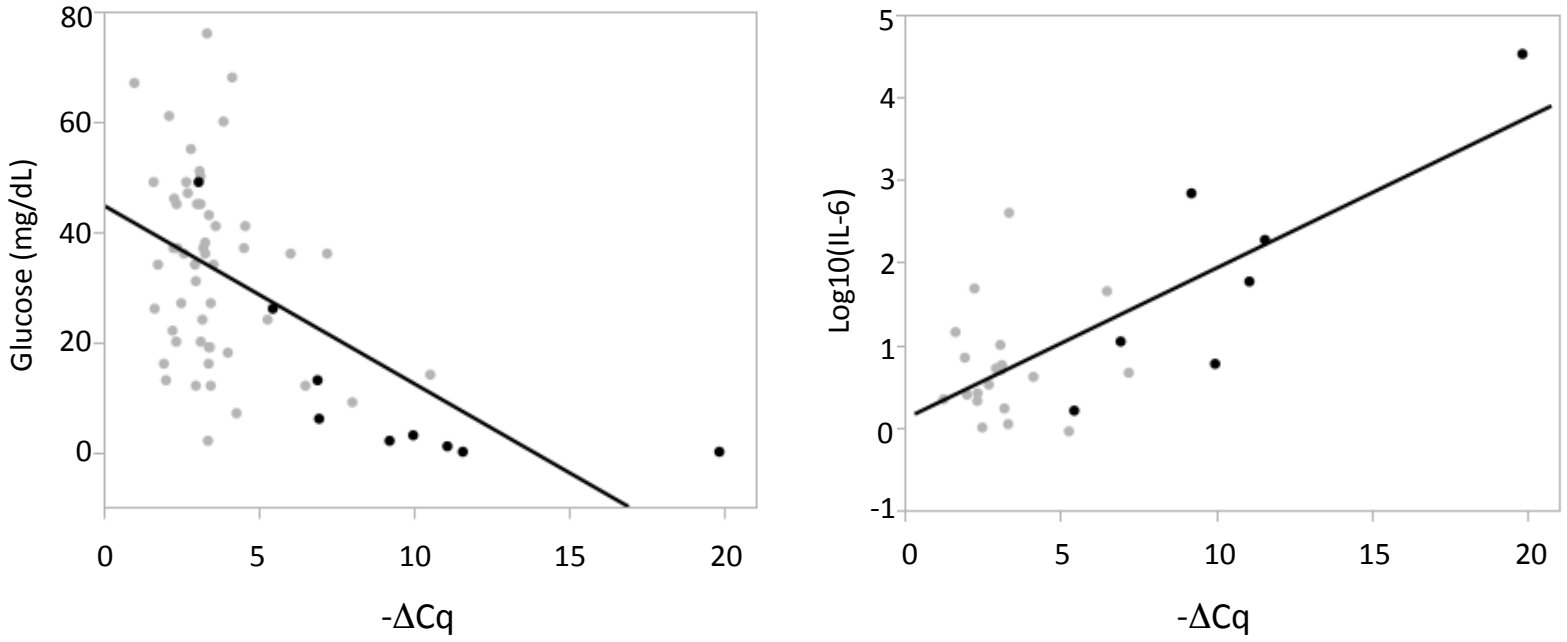
80
60
40
20
0
Glucose (mg/dL)
0
5
10
15
20
-ΔCq
5
4
3
2
1
0
-1
Log10(IL-6)
0
5
10
15
20
-ΔCq

Fig. 2

Table 1 Baseline characteristics of patients

Characteristics	Measures				
	No. of mothers or neonates (%)		Median [range]		
No. of patients	64	(100%)			
Maternal age (median, range)			31	[18–44]	years
Gravidity (median, range)			1	[0–6]	
Parity (median, range)			1	[0–3]	
Gestational week on admission (median, range)			31	[23–35]	weeks
pPROM before amniocentesis (No. of patients)	16	(25%)			
Intra-amniotic infection (No. of patients)	21	(33%)			
Pregnancy week on termination (median, range)			33	[24–40]	weeks
Symptomatic infection of neonates (No. of neonates)	8	(12%)			
RDS (No. of neonates)	21	(32%)			
Neurological disturbance (No. of neonates)	5	(8%)			
Neonatal death (No. of neonates)	2	(3%)			

pPROM: preterm premature rupture of membranes.

Table 2 Relationship between bacterial culture and polymerase chain reaction detection

		Culture			Fisher's exact probability	Sensitivity	Specificity
		Positive†	Negative	Total			
PCR	Positive	9	13	22	<0.0001	100%	76%
	Negative	0	42	42			
	Total	9	55	64			

†: Positive for *Ureaplasma*, *Mycoplasma* or other bacteria.
PCR: polymerase chain reaction.

Table 3 Clinical characteristics of bacterial culture-negative, polymerase chain reaction-positive cases compared with bacterial culture-negative, polymerase chain reaction-negative cases

		Bacterial culture negative (n = 55)				P value
		PCR-positive (n = 13)		PCR-negative (n = 42)		
		Median	Range	Median	Range	
Amniotic fluid	IL-6 (pg/ml)	1,900	113 — 216,000 †	523	22 — 79,900	<0.05
	IL-8 (pg/ml)	2,880	237 — 285,000	689	57 — 35,100	<0.1
	Glucose (mg/dl)	22	2 — 45	37	9 — 76	<0.05
Cord blood	IL-6 (pg/ml)	5	2 — 398	4	1 — 48	n.s.
	IL-8 (pg/ml)	24	8 — 79	8	2 — 98	n.s.
	CRP (mg/dl)	0.03	0.00 — 1.56	0.01	0.00 — 0.57	<0.01
	WBC (μl)	7,050	4,300 — 11,100	6,950	3600 — 11,300	n.s.
Neonatal blood	CRP (mg/dl)	0.02	0.00 — 1.30	0.00	0.00 — 0.59	<0.05
	WBC (μl)	14,500	1700 — 23,600	9,450	3500 — 17,100	<0.1
Placental pathology	Blanc stage ≥ 2	58% ‡		5% ‡		<0.001 §
Mother	CRP (mg/dl)	0.40	0.05 — 10.2	0.49	0.00 — 7.58	n.s.
	WBC (μl)	10,300	5,600 — 25,900	9,600	5100 — 21,200	n.s.
	Body tempaerature	37.1	35.9 — 38.0	37.1	35.6 — 38.1	n.s.
Interval between amniocentesis and delivery (days)		10.9	0 — 64d	13.4	0 — 101d	n.s.
Day of amniocentesis (pregnancy weeks and days)		33w2d	25w1d — 35w5d	33w6d	24w2d — 40w2d	n.s.

†: median, range

‡: Ratio within the PCR subgroup.

§: Fisher's exact probability test was used; otherwise the Wilcoxon test was used.

Table 4 Micro-organisms identified by the polymerase chain reaction-based method followed by sequencing

Bacteria	No. of genotypes	No. of patients†
Burkholderia ferrariae	1	1
Campylobacter fetus	1	1
Corynebacterium spp.	1	1
Deinococcus spp.	1	3
Escherichia coli	1	7
Finegoldia magna	1	1
Gardnerella vaginalis	1	2
Geobacillus stearothermophilus	1	1
Haemophilus aegyptius	1	1
Janthinobacterium spp.	1	1
Lactobacillus spp.	2	2
Neisseria subflava	1	1
Phyllobacterium myrsinacearum	1	1
Propionibacterium acnes	1	1
Rhodococcus nanhaiensis	1	1
Sediminibacterium salmoneum	1	1
Sphingomonas kyungheensis	1	1
Staphylococcus spp.	2	2
Stenotrophomonas maltophilia	1	2
Streptococcus agalactiae	1	1
Ureaplasma spp.	2	4
Total	24	36

†: Patients who had multiple organisms were counted multiple times.

Table 5 Comparison of microbial detection results between the culture- and polymerase chain reaction-based methods

	PCR-based method		Culture-based method	
Number of patients who were positive for				
Mycoplasma	0[†]	0% [≠]	0	0%
Ureaplasma	4	6%	4	6%
Other bacteria	19	29%	5	8%
Any bacteria	22	34%	9	14%
Polymicrobial detection				
No. of species detected per positive subject	1.6±0.2[§]	[1–5] [¶]	1.2 ± 0.2	[0–3]
No. of patients positive for two or more microbiota	9	86% [£]	1	11%

†: Number of patients
≠: Percentage of the total number of patients (n = 64)
§: Mean ± standard error of the mean (medial)
¶: Range
£: Percentage of the total number of patients positive for the detection method

Table 6 Correlations between the difference in quantification cycles and clinical measures

		Linear regression analysis			
		Probability	R^2	slope	*y*-intercept
Amniotic fluid	IL-6 (ng/ml)	<0.001	0.24	6537	-9764
	IL-8 (ng/ml)	<0.05	0.08	4244	-2169
	Glucose (mg/dl)	<0.0001	0.29	-3.23	44.77
Cord blood	Log_{10} (IL-6 [ng/ml])†	<0.001	0.54	0.183	0.1017
	Log_{10} (IL-8 [ng/ml])†	<0.001	0.4	0.153	0.616
	CRP (mg/dl)	n.s.	0.02		
	WBC (ml)	n.s.	0.01		
Neonatal blood	CRP (mg/dl)	<0.01	0.13	0.065	-0.104
	WBC (ml)	n.s.	0.01		
Mother	CRP (mg/dl)	n.s.	0.04		
	WBC (ml)	<0.05	0.1	505	8993
	Body temperature	n.s.	0.04		
Interval between amniocentesis and delivery (days)		n.s.	0.02		

†: Log transformation was performed to achieve normal distribution.

Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica

平成２９年４月　投稿中