

## LAMP 法を用いた細菌性膣症起因菌の特異的な迅速核酸検出

### Specific and Rapid Nucleic Acid Detection of Bacterial Vaginosis-associated Bacteria Using Loop-mediated Isothermal Amplification Method

平成 27 年度入学 東出 誠司 (Higashide, Satoshi)

指導教員 杉田 隆

ヒトの身体には多種多様な微生物が常在し微生物叢（マイクロバイオーーム）が形成される。その中でも膣では、健常女性ではグラム陽性真正細菌である *Lactobacillus spp.* が大部分を占める特徴のある環境である。*Lactobacillus spp.* は膣上皮のグリコーゲンを分解し乳酸を産生することにより、膣内 pH を酸性環境に保持することで外来病原菌の侵入を阻止する。一方で、膣内の *Lactobacillus spp.* の相対的占有率が低下し *Gardnerella vaginalis* が異常増殖した環境では細菌性膣症に進展することがある。*G. vaginalis* は細菌性膣症のほとんどの膣から検出されることから、主要な起因菌であると考えられている。特に、妊娠中の細菌性膣症は、流産や早産との関連性が示唆されているため積極的な診断と治療が必要である。例えば、膣マイクロバイオーームの構成比率の解析により膣内環境を把握できる。

細菌性膣症の診断には、膣分泌物をグラム染色した所見に加えて、膣粘膜の炎症所見、アミン臭の有無や膣分泌物の pH などが考慮される。このため、より客観性と迅速性に優れた検査法を開発するために申請者は LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification、ループ介在性等温核酸増幅) 法に着目した。この方法は PCR とは異なる特徴を持ち、4 種の Primer を用

いて 6 領域を認識するため特異性が高い。また、鎖置換 DNA 合成酵素を使用することにより一温度で増幅反応が進む（図 1）。合成される DNA 鎖は両端に相補的な配列を持つため自己アニールし、ループを形成して LAMP 法における増幅サイクルの起点となるダンベル型の構造となる。起点構造からは 3'末端の F1 領域を起点として自己を鋳型とした DNA 合成、または Inner Primer を起点とした DNA 伸長反応が起こり、加速度的に標的核酸の増幅が進む。原理的には設定した 6 領域を認識しないと増幅反応は起こらないため、増幅産物は全て標的遺伝子である。LAMP 法は、これまでに感染症の起因菌を対象として多くの臨床検査試薬が開発されている。例えば、結核菌群を検出する TB-LAMP はその利便性により、多くの結核蔓延国で顕微鏡検査に代わる使用が WHO により推奨されている。LAMP 法の特性を活用することで、サーマルサイクラーなどの PCR 装置がない医療機関でも目的遺伝子の核酸増幅が可能である。

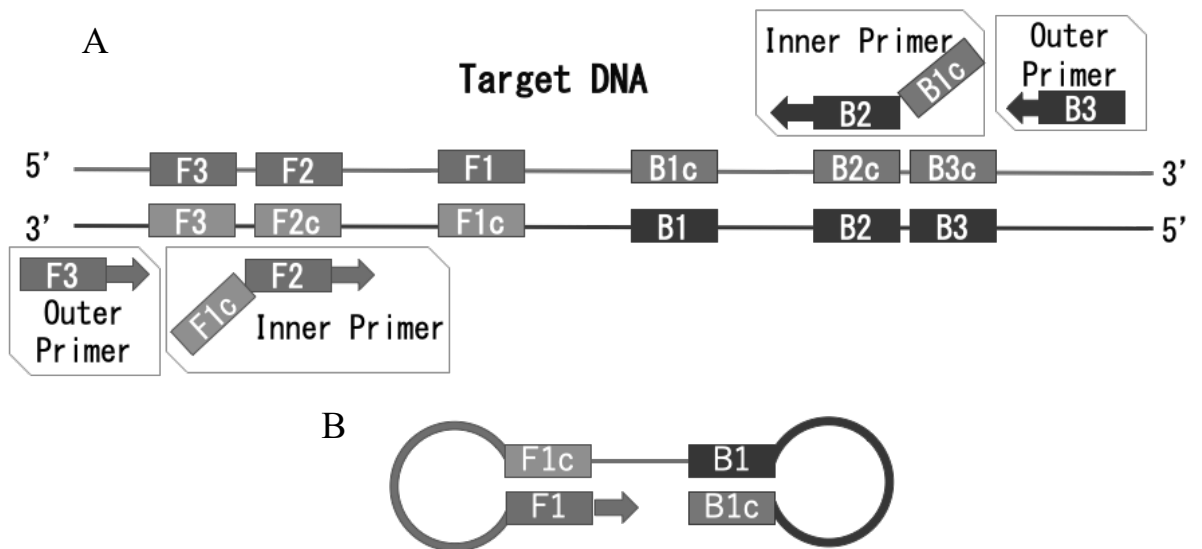


図 1. LAMP法の検出原理

LAMPで認識する 4 種のプライマー (Inner Primer、OuterPrimer) とその認識部位 (F1,F2,F3,B1,B2,B3) (A) 増幅の起点となるダンベル構造 (B)

本研究では、細菌性膣症の主要な起因菌である *G. vaginalis* および適正な膣内環境を与える *Lactobacillus spp.*の迅速検出を目的とした LAMP 検出系を開発した。

## I. LAMP 法による *Gardnerella vaginalis* 検出系の構築

*G. vaginalis* の検出のために、*G. vaginalis* 23S rRNA 遺伝子上に特異的な LAMPPrimer を設計した。*G. vaginalis* ATCC 14018 株と 409-05 株は種内多様性を示すが、両株由来の配列を同時に検出できるような Primer を設定し、さらにシーケンス解析を行った際には多様性の違いが識別できる検出配列とした。Primer の追加条件設定には、熱力学的パラメータ予測（LAMP 反応条件下）、 $\Delta G_{min}$  ギブスの最小自由エネルギーの評価、mfold を用いた 2 次構造予測を用いた（図 2）。

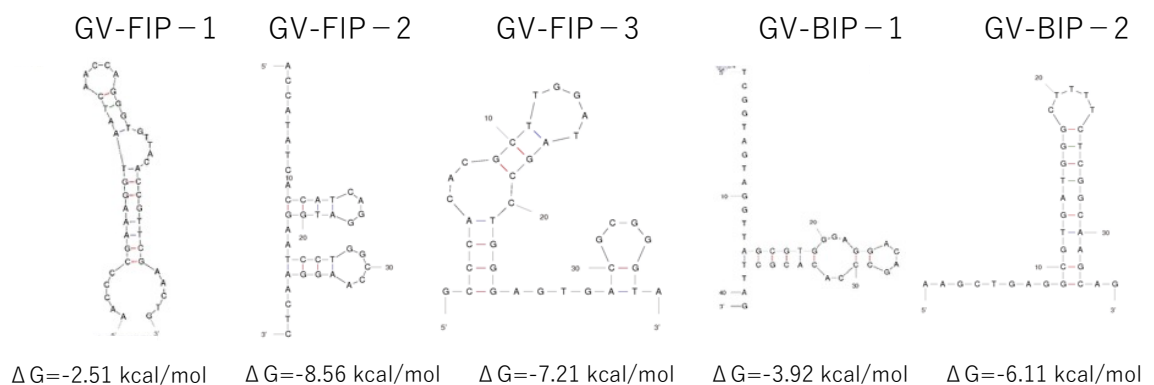


図 2. mfold による Inner Primer  $\Delta G$  の算出

*Gardnerella vaginalis* 検出での LAMP Primer 設計における、Inner Primer 候補毎の 2 次構造と  $\Delta G$  値算出

設定した反応系を用いて 65°C で 45 分間反応後、DNA 電気泳動でのバンドパターン、チューブ内液の蛍光を確認した。2 次構造予測での  $\Delta G$  が小さければ、非特異的な反応が起きやすいと考えられ、 $\Delta G$  を考慮した Primer を設計した。LAMP 産物の電気泳動像からは特徴的なラダーパターンが得られたが陰性コントロールからは検出されず、検出限界は 10 fg であった

(図 3)。さらに、DNA インターカラーを添加してリアルタイム LAMP を試みた結果、定量も可能であった。

膣マイクロバイオーーム中の *G. vaginalis* は相対的占有率が極めて低いものの、健常女性あるいは正常妊婦の膣内にも存在する。60 例の妊娠可能な健常成人女性から採取した膣検体を LAMP と既報告の定量 PCR 検出系（標的遺伝子は *cpn60*）で比較したところ、LAMP と定量 PCR での陽性数はそれぞれ 43、40 であり

LAMP と定量 PCR と検出感度

は同等であることが示された。また、LAMP による標的核酸の検出時間はわずか 45 分であったことから迅速性にも優れていた。なお、目的とする領域が正しく増幅されていることは LAMP 増幅産物のシーケンス解析から確認した。

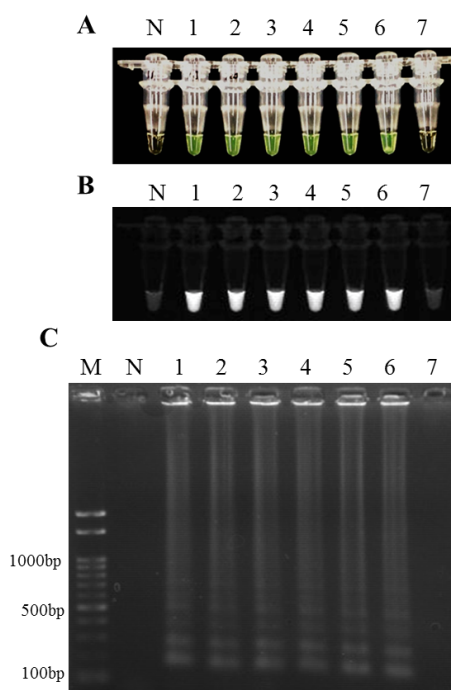


図 3. 可視光とUV条件下でのLAMP増幅チューブでの検出とLAMP増幅産物のアガロース電気泳動 10倍ずつ段階希釈した*G. vaginalis* DNA (N, no DNA template; No. 1, 1 ng; 2, 100 pg; 3, 10 pg; 4, 1 pg; 5, 100 fg; 6, 10 fg; 7, 1 fg) でのLAMP反応後、可視光 (A)、UV条件 (B)、アガロース電気泳動 (C)

## II. LAMP 法による *Lactobacillus spp.* 検出系の構築

当研究室の先行研究から日本人妊婦に優位な膣マイクロバイオーームは *L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* および *L. iners* の 4 菌種であることを明らかにしている。前 3 種は過酸化水素産生あるいは大量の乳酸を産生する菌として知られている。近年の報告では、*L. iners* は細菌性膣症を起こすリス

クのある *Lactobacillus spp.* としても捉えられている。また、*L. iners* の相対的占有率は、*L. crispatus* のそれと負の相関性を示すことから、これらの 4 菌種を特異的に検出することは、妊婦の膣マイクロバイオーーム環境を理解する上で重要である。

これらの 4 菌種を特異的に検出できる Primer を *G. vaginalis* と同様に 23S rRNA 遺伝子上に設計した。検出感度は全ての対象菌種で 10 fg であった。また、それぞれの LAMP Primer 反応系セットを用いて反応特異性を評価した結果、目的の Primer セットのみに陽性反応がみられたことから高い特異性を示すと考えられた (表 1)。 *G. vaginalis* の検出と同じ膣検体を用いて *L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* および *L. iners* の検出を試みたところ、それぞれ、42、21、40、38 検体が陽性を示した。また、定量 PCR と LAMP 法での陽性一致率は 88.6~95.4 % であった。

表 1. 設定した LAMP 検出系と特異性試験で供試した菌株

Species	Strain	LAMP Primer				
		<i>G. vaginalis</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jensenii</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC14018	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	ATCC33820	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus iners</i>	DSM13335	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC33323	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	ATCC25258	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC1235	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	DSM15996	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ATCC33200	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus nagelii</i>	ATCC700692	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	ATCC49540	-	-	-	-	-

+: 陽性、-: 陰性

### Ⅲ. 総括

本研究では、細菌性膣症に関連する *G. vaginalis* を含めた 5 菌種に特異的な核酸増幅法である LAMP 法により検出する技術を開発した。本法における検出感度は全て 10 fg であり、45 分以内の迅速検出を 64°C で可能とした。現時点でそれぞれの LAMP 検出系の検出感度は非常に高いため、今後は定量的なカットオフを決めて臨床的な評価を行う予定である。また、核酸抽出を組み合わせたキット化により検査法をより簡便化し、従来の細菌学的形態観察法の代替となることを期待したい。

#### 《 参考文献 》

- 1) Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Gardnerella vaginalis*.

Higashide S., Cho O., Matsuda Y., Ogishima D., Kurakado S., Sugita T., *Microbiol. Immunol.*, **62**, 607-611 (2018).

- 2) Rapid detection of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* in vaginal specimens by loop-mediated isothermal amplification.

Higashide S., Cho O., Matsuda Y., Ogishima D., Kurakado S., Sugita T., *J. Microbiol. Methods.*, **158**, 18-20 (2019).