

審査論文の結果の要旨

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

論文提出者 東出 誠司 (Higashide, Satoshi)

ヒトの身体には多種多様な微生物（細菌、真菌、ウイルス）が常在し相互作用しながら生存している。従って、この常在バランスが破綻すると疾患へと進展することがある。膣マイクロバイオーームは、グラム陽性真正細菌である *Lactobacillus* spp.（善玉菌）が大部分を占める。本菌は膣内グリコーゲンを乳酸に代謝し、膣内 pH を 4.5 の酸性状態にすることで環境中の微生物の侵入を防ぐことで健康を維持する役割がある。しかしながら、何らかの原因で膣内環境が変化し、*Gardnerella vaginalis*（悪玉菌）等の細菌が異常増殖すると、相対的に *Lactobacillus* spp.（善玉菌）の菌量が低下する。その結果、膣内 pH は中性へと傾き細菌性膣症へと進展する。妊婦が細菌性膣症を発症すると、流産や早産のリスクが著しく高まるため、早期に診断し、積極的な治療を早く開始する必要がある。現在の細菌性膣症の診断は、膣分泌物のグラム染色、炎症部位の臨床的所見、膣分泌物の pH 等に基づいて行われるため、客観性と迅速性に優れた検査法の開発が求められている。学位申請者は、これを解決する手段として LAMP

（Loop-Mediated Isothermal Amplification、Loop 介在性等温核酸増幅）法に着目した。LAMP 法は、4 種のプライマーを用いて 6 領域を認識するた

め従来の PCR よりも特異性が極めて高く、かつ一定温度で増幅反応させることができる。LAMP 法は臨床の場で実践使用されており、例えば、結核、百日咳やノロウイルスの検出の診断キットが発売されている。

学位申請者は、細菌性膣症の主要な起因菌である *Gardnerella 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。

LAMP による *Gardnerella vaginalis* の検出

細菌性膣症の主要な起因菌である *Gardnerella vaginalis* 検出のための LAMP プライマーを 23S rRNA 遺伝子上に設計し、LAMP を施行した。その結果、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。また、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。

LAMP による *Lactobacillus spp.* 検出系の構築

日本人妊婦に優位な 4 種の膣マイクロバイオーームである、*L. crispatus*、*L. jensenii*、*L. gasseri* および *L. iners*、の迅速検出系を構築した。23S rRNA 遺伝子上に設計したプライマーを用いた LAMP 法での検出感度は 10 fg であり、膣検体を用いた定量 PCR と LAMP 法での陽性一致率は 88.6 ~95.4% であった。*L. iners* は優位な菌種であるが、他の 3 菌種とは占有率が逆相関することから、4 種を同時に検出することは臨床上、意義のあることである。

以上、本論文で得られた研究成果は、細菌性膣症および健常膣内のマイクロバイオーームを簡便かつ迅速に診断する可能性を提供するものであり、博士（薬科学）の学位にふさわしいものと認める。

主査 明治薬科大学 教授

杉田 隆 印

副査 明治薬科大学 教授

松井 勝彦 印

副査 明治薬科大学 教授

森田 雄二 印