



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월22일
(11) 등록번호 10-1831416
(24) 등록일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0112693
(22) 출원일자 2017년09월04일
심사청구일자 2017년09월04일
(56) 선행기술조사문헌
US20150259728 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김영주
서울특별시 양천구 목동서로 38, 120동 902호(목동, 목동신시가지아파트1단지)
유영아
경기도 용인시 기흥구 동백8로 103, 2704동 205호(동백동, 백현마을주공7단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

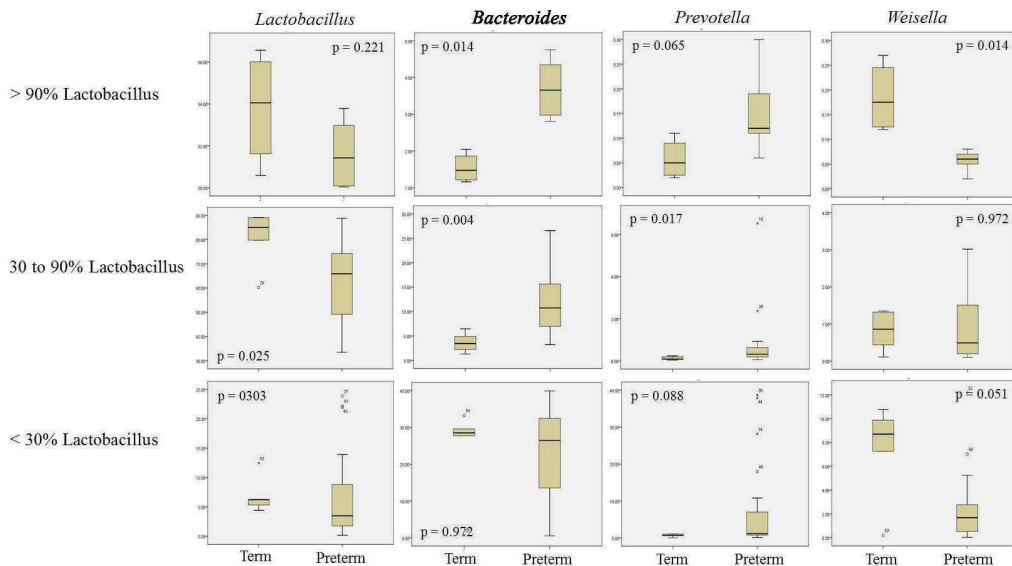
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 시료 내 미생물 군집의 변화를 이용한 조산 위험성 예측

(57) 요약

본 발명은 산모의 시료로부터 미생물 커뮤니티의 변화를 검출함으로써, 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 산모의 시료로부터 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출함으로써 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/205 (2013.01)
G01N 2333/195 (2013.01)
G01N 2800/368 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

두지은

경기도 용인시 수지구 정평로 63, 504동 1102호(풍
덕천동)

권은진

서울특별시 양천구 목동중앙로13길 37-7, 장완나라
303호(목동)

박미혜

서울특별시 양천구 안양천로 1071, 이대목동병원
산부인과(목동)

(56) 선행기술조사문헌

ALINE C. FREITAS ET AL. SCIENTIFIC REPORTS 7:
9212 (16 PAGES)

GEORGE L. MENDZ ET AL. AIMS MICROBIOLOGY,
2(1): 55_68

LJUBOMIR PETRICEVIC ET AL. SCIENTIFIC REPORTS
4: 5136 (6 PAGES)

W02016000539 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0306010016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-질환극복기술개발

연구과제명 조산과 태아손상 조기 진단용 바이오마커 및 맞춤형 조산방지 약물 치료법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

질 시료로부터 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 산모의 조산 위험성 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 락토바실러스(Lactobacillus), 박테로이데스(Bacteroides) 및 프레보텔라(Prevotella)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물을 검출할 수 있는 제제는 미생물에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 항체인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머는 미생물의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 조산 위험성 진단용 키트.

청구항 6

산모의 질 시료로부터 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

- (a) 산모의 질 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계,
- (b) 상기 추출된 게놈 DNA 에 바이셀라 미생물에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계, 및
- (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단계(c)는 중합효소반응을 통해 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 단계(c)의 증폭산물의 양을 정상 산모의 질 시료의 증폭산물과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산모의 시료로부터 미생물 커뮤니티의 변화를 검출함으로써, 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 산모의 시료로부터 바이셀라 (Weissella) 미생물을 검출함으로써 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조산 (preterm birth, PTB; 임신 37 주 이전에 출산)은 일반적으로 20주를 지나 37주 이전에 분만하는 것을 의미한다. 조산으로 태어난 신생아는 전체 영아 사망자의 약 60%를 차지할 정도로 사망의 위험이 높고, 생존아의 경우에도 신경계 발달장애, 호흡기계 합병증, 출생 후 성장 지연 등으로 신생아 집중치료가 필요하며, 더 나아가 심각한 장기적 또는 단기적 질환에 이환율이 높다. 조산의 약 70 %는 자궁 내 감염 및 염증과 같은 다양한 병리학적 과정으로 인한 조기 진통 (preterm labor, PTL) 및 조기 양막 파열 (preterm premature rupture of membrane, PPROM)로 인해 발생한다. 하지만 조산과 관련된 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 자연적 진통과 흔히 연관된 위험인자는 생식기계감염, 다태 임신, 2,3 삼분기 출혈 및 이전의 조산기왕력 등이 있다.

[0003] 조산아의 생존율을 향상시키기 위한 최소한의 임신 주수는 27주 및 출생체중은 0.9 kg이고, 출생 신생아의 이환과 사망은 출생체중보다는 일차적으로 임신 주수, 즉 성숙도에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 이른 주수에 조산의 징후가 왔을 때, 적절한 치료를 통하여 분만 주수를 지연시켜 신생아를 성숙도를 높이는 것은 산모와 신생아의 건강과 삶의 질과 비용에 중대한 관건이 된다.

[0004] 현재까지 조산의 치료를 위하여 조기진통의 산모에게 자궁수축 억제제 투여, 항생제 치료, 스테로이드제 및 프로게스테론 투여를 통해 진통을 억제하고 분만을 지연시켜왔다. 그러나, 이미 조기진통 및 조기 양막 파열이 발생한 경우에는 자궁 내 감염 및 염증에 대한 항생제의 치료 효과는 매우 제한적이며 조산을 막을 수는 없는 것으로 알려져 있다. 또한 자궁경관 무력증의 산모인 경우 감염과 유산에 대한 상당한 위험이 있기 때문에 조기분만의 치료와 예방으로서 자궁경부봉쇄술을 시행하여 왔으나, 이것이 근본적인 치료는 될 수 없으며 단기간의 임신 연장에 도움이 되는 정도로 알려져 있다.

[0005] 따라서, 조기 양막 파열이나 조산의 증상이 나타난 이후에 치료를 수행하는 것보다는, 조산의 위험성을 미리 예측함으로써 조산 위험 산모군을 선별하고, 이들에 대한 적절한 관리를 통하여 조산을 방지하거나 효과적인 치료 방법을 개발하는 것이 필요하다. 또한, 조산의 시기가 빠를수록 신생아에게 후유증을 남길 가능성이 높고 후유증의 정도도 심하기 때문에 조산을 예측할 수 있다면 미숙아와 그로 인한 장애아의 발생률을 현저하게 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

[0006] 조산을 예측하기 위한 일반적인 접근 방법은, 산부인과학적으로, 인구통계학적으로 및 여러 가지 증후군에 따라 특별한 주의를 기울여야 하는 여성군을 확인하는 것이었으나, 이러한 접근 방법은 그 방식이 민감하거나 특이적이지 않다는 문제가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 갑작스런 조산이나 양막 파열을 예견하기 위한 생화학적인 표지자를 발견하기 위하여 많은 연구가 시행되어 왔고, 플라즈마 에스트라디올-17 베타(plasma estradiol-17 beta), 프로게스테론(progesterone), C-반응성 단백질(C-reactive protein)과 같은 물질들이 후보로 지명되었으나, 이 역시 그 정확도가 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서, 보다 검출이 용이하고 민감도와 특이도가 높은 표지자의 개발이 필요하다.

[0007] 여성의 질내 미생물 군집(microbiota)은 박테리아와 병원균에 대한 장벽 역할을 하며, 여성의 건강에 중요한 역할을 하고, 미생물 군집의 생화학적 및 면역학적 프로파일은 질내 환경의 건강 지표가 될 수 있다. 정상적인 미생물 군집은 효모 감염, 성 매개 감염증, 요로 감염증 및 인체 면역 결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV) 감염과 같은 비노 생식기 질환으로부터 여성을 보호할 수 있다. 세균성 질염(bacterial vaginosis, BV)으로 진단받은 여성의 경우 조산과 후기 유산의 위험이 각각 2 배 및 6 배 증가한다고 보고되기도 하였다.

[0008] 최근 유전자 서열분석 기술이 발달하면서, 인체 내 다양한 부위에서 인간 마이크로바이옴(microbiome)의 조사가 가능해졌으나, 지금까지 질내 미생물 군집에 관한 대부분의 연구는 건강한 여성 또는 세균성 질염인 여성에 대한 질내 미생물 군집의 구성에 초점을 맞추고 있었으며, 질내 미생물 군집과 조산 위험성 간의 관련성을 규명하고 이를 조산 위험성 진단에 활용하고자 하는 목적의 연구는 거의 전무한 실정이다. 더욱이, 조기 진통 산모와 조기 양막 파열을 경험한 한국인 산모에서 질 미생물 특성화에 대한 비교연구는 수행된 적이 없다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 조산의 주요 원인인 조기 진통 또는 조기 양막 파열이 나타난 산모에서 질 미생물을 특성화하고 고 처리량 유전자 시퀀싱을 사용하여 조산을 예측하는 질 미생물 파라미터를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국내특허등록 10-1559975 (2015. 10. 14. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명에서는 산모의 질내 미생물 군집을 분석하여 조산 위험성을 시사하는 조산의 예측 표지자를 발굴함으로써 조산의 예방에 기여하고자 한다.

[0012] 이를 위하여, 일 예는 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 산모의 조산 위험성 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 다른 예는, 상기 조성물을 포함하는, 산모의 조산 위험성 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 다른 예는, 산모의 시료로부터 바이셀라 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 양태로, 본 발명은 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 산모의 조산 위험성 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 바람직하게, 본 발명의 진단용 조성물은 상기에 락토바실러스(Lactobacillus), 박테로이데스(Bacteroides) 및 프레보텔라(Prevotella) 로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 바람직하게, 본 발명에서 상기 미생물을 검출할 수 있는 제제는 미생물에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 항체일 수 있다.

[0018] 보다 바람직하게, 상기 프라이머는 미생물의 16S rRNA (16S rDNA)를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있다.

[0019] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 산모의 조산 위험성 진단용 키트에 관한 것이다.

[0020] 또 다른 양태로서, 본 발명은 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 산모의 시료로부터 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 또는, 본 발명은 산모의 시료로부터 바이셀라(Weissella) 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 바람직하게, 상기 방법은 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 또한 바람직하게, 상기 방법은

[0024] (a) 산모의 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계,

[0025] (b) 상기 추출된 게놈 DNA 에 바이셀라 미생물에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계, 및

[0026] (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 또한 바람직하게, 상기 단계(c)는 중합효소반응을 통해 수행되는 것일 수 있다.

[0028] 또한 바람직하게, 상기 단계(c)는 증폭산물의 양을 정상 산모 시료의 증폭산물 또는 임계값(cut-off) 과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [0029] 또한 바람직하게, 상기 시료는 산모의 자궁경부 질에서 유래한 시료, 예를 들어 질 시료, 구체적으로는 질액 시료 일 수 있다.
- [0030] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0031] 본 발명에서는 조기진통과 조기 양막 파열로 입원한 산모의 질 시료에서 미생물 커뮤니티의 구성이 조산에 미치는 영향을 분석한 결과, 락토바실러스(Lactobacillus)의 감소, 박테로이데스(Bacteroides) 및 프레보텔라(Prevotella)의 증가, 그리고 바이셀라(Weissella)의 감소가 조산에 영향을 주는 것으로 확인하였다. 특히, 락토바실러스의 감소와 박테로이데스의 증가는 본 발명자들에 의하여 조산 예측 마커로 밝혀진 바 있는 IL-7 (국내특허등록 10-1559975호 참조)과 관련성을 나타내었다. 따라서, 이러한 미생물들의 분포 변화를 조산을 예측하기 위한 바이오마커로 제공함을 특징으로 한다.
- [0032] 따라서, 본 발명에서는 산모의 시료로부터 바이셀라 미생물을 검출함으로써, 산모의 조산 위험성을 진단할 수 있으며, 이를 위하여 바이셀라 미생물을 검출하기 위한 조성물, 키트 및 방법을 제공한다. 바람직하게, 본 발명은 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라 미생물을 추가로 검출함으로써 산모의 조산 위험성을 진단할 수 있으며, 이를 위한 조성물, 키트 및 방법을 또한 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "위험성 진단" 또는 "위험성 예측"이란, 산모에 대하여 임신주수 37주 미만에서 조산을 할 가능성이 있는지, 37주 미만에서 조산의 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 37주 미만에서 조산의 징후를 나타낼 가능성이 있는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명은 산모들에 대하여 37주 미만의 조산 위험성이 높은 산모들을 특별하고 적절한 관리를 통하여 조산을 지연시키거나 방지하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 37주 미만의 조산을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)" 또는 "표지자"란 조산 산모(예를 들어, 37주 미만의 조산 산모)와 정상 분만 산모(예를 들어, 37주 이상에서 분만하는 산모)를 미리 예측하여 구분하는 기준이 되는 물질로, 정상 분만 산모의 시료에 비하여 조산으로 예측되는 산모의 시료에서 유의적인 차이를 나타내는 생체 유기 분자들을 의미한다. 본 발명의 목적상, 조산으로 예측되는 산모의 시료에서 특이적으로 분포 변화를 나타내는 바이셀라 미생물 또는 군집을 말하며, 추가적으로, 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 미생물 또는 군집을 말한다.
- [0035] 본원에서 "바이셀라"란, 분류학적으로 바이셀라 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 바이셀라는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 바이셀라와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0036] 본원에서 "락토바실러스"란, 분류학적으로 락토바실러스 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 락토바실러스는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 락토바실러스와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0037] 본원에서 "박테로이데스"란, 분류학적으로 박테로이데스 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 박테로이데스는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 박테로이데스와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0038] 본원에서 "프레보텔라"란, 분류학적으로 프레보텔라 속에 속하는 종(Species)들로 구성된 미생물 또는 그 군집을 말한다. 본 발명에서 프레보텔라는, 종래에 보고된 균주들 뿐 아니라, 종래에 보고된 프레보텔라와 16S rRNA 서열 비교시 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 미생물들이 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0039] 본원에서 용어, "검출할 수 있는 제제"란, 시료 내에서 조산 위험성 진단 마커인 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 예를 들어, 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라에 특이적으로 존재하는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머, 또는 항체 등이 될 수 있다.

- [0040] 바람직하게, 본 발명에서 검출할 수 있는 제제는 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라를 검출할 수 있는 프라이머 일 수 있다. 상기 프라이머는 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라의 게놈 서열을 특이적으로 검출하고 다른 미생물의 게놈 서열에는 특이적 결합을 하지 않는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게, 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 미생물의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있다.
- [0041] 본원에서 용어, "프라이머"란, 주형 가닥에 상보적인 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 7개 내지 50개의 핵산서열을 의미한다. 프라이머는 보통 합성하지만 자연적으로 생성된 핵산에서 이용할 수도 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 혼입할 수 있는 추가의 특징의 예로 메틸화, 캡화, 하나 이상의 핵산을 동족체로의 치환 및 핵산간의 변형 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 본 발명의 프라이머는 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라 미생물의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.
- [0042] 본원에서 용어, "16S rRNA"란, 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 모든 종에 공통적인 보존 영역(conserved region)과 특정 종을 분류할 수 있는 초가변 영역(hypervariable region)이 존재하므로 염기서열분석을 통하여 미생물을 동정할 수 있다. 특히 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종 간에는 다양성이 나타나므로 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 유용하게 동정할 수 있다. 또한 16S rDNA 는 16S rRNA 를 코딩하는 유전자이므로, 16S rDNA 를 활용하여 미생물을 동정할 수도 있다.
- [0043] 바람직한 일구현예로, 본 발명에서 상기 프라이머는 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라에 특이적인 16S rRNA (또는 16S rDNA) 서열을 증폭시키는 데 사용될 수 있으며, 서열 증폭 결과 원하는 생성물의 생성 여부를 통하여 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라의 존재를 검출할 수 있다. 프라이머를 이용한 서열 증폭 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스 PCR, 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR, 부스터(booster) PCR, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스(inverse) 중합효소 연쇄반응, 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR), 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 또는 타겟 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.
- [0044] 또한, 본 발명에서 미생물 검출 제제는, 항체일 수 있으며, 항원-항체 반응을 기반으로 한 면역학적 방법을 사용하여 해당 미생물을 검출할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter), 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 그 외, 당업계에 널리 사용되는 분자 및 면역학적 방법이 본 발명의 미생물을 검출하는 데 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 상기 미생물 검출 제제를 포함하는 진단용 조성물은, 진단 키트 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 본 발명의 키트는 해당 미생물을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머, 또는 항체 등의 검출 제제를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0047] 구체적인 일예로, 본 발명에서 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라에 특이적인 프라이머를 포함하는 키트는, PCR 등의 증폭 반응을 수행하기 위한 필수 요소들을 포함하는 키트 일 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 용 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 또는 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 산모의 시료로부터 바이셀라 미생물을 검출함으로써, 산모의 조산 위험성을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0049] 달리 말하면, 본 발명은 산모의 조산 위험성의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 산모의 시료로부터 바이셀라 미생물을 검출하는 방법을 제공한다. 또는, 산모의 시료로부터 바이셀라 미생물을 검출하는 단계를 포함하

는, 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [0050] 바람직하게, 상기 방법은 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 바람직한 일례로, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하여 구현될 수 있다:
- [0052] (a) 산모의 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계,
- [0053] (b) 상기 추출된 게놈 DNA 에 바이셀라 미생물에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계, 및
- [0054] (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계.
- [0055] 상기 단계 (a) 에서, "산모의 시료"란, 조산 위험성 여부를 진단하고자 하는 여성의 몸에서 채취 된 것으로, 바람직하게는, 산모의 질에서 채취된 세포 시료, 조직 시료 또는 체액 시료일 수 있으며, 예컨대 질 시료, 질액 시료일 수 있다.
- [0056] 상기 단계 (b) 에서 산모의 시료로부터 게놈 DNA의 추출은 당업계에 알려진 일반적인 기술을 적용하여 수행할 수 있으며, 바이셀라, 락토바실러스, 박테로이데스 및/또는 프레보텔라 미생물에 특이적인 프라이머는 위에서 설명한 바와 같다.
- [0057] 상기 단계 (c)에서 반응물을 증폭시키는 방법은 당업계에 알려진 일반적인 증폭 기술들, 예를 들어 중합효소 연쇄반응, 역전사-중합효소 연쇄반응, 멀티플렉스 PCR, 터치다운 PCR, 핫 스타트 PCR, 네스티드 PCR, 부스터 PCR, 실시간 PCR, 분별 디스플레이 PCR, cDNA 말단의 신속 증폭, 인버스 PCR, 벡토레트 PCR, TAIL-PCR, 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 타겟 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.
- [0058] 상기 단계 (c)에서, 반응물의 증폭 산물의 양을 정상 산모 시료의 증폭산물 또는 임계값(cut-off) 과 비교하는 단계를 추가로 수행할 수 있으며, 산모 시료에서 바이셀라의 증폭 산물이 정상 산모 시료의 증폭산물 또는 임계값(cut-off) 과 비교하여 유의적으로 감소되었다고 판단될 경우, 해당 산모는 조산 위험성이 높은 것으로 판단할 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 방법은 락토바실러스, 박테로이데스 및 프레보텔라 미생물을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 정상 산모 시료의 증폭산물 또는 임계값(cut-off) 과 비교하여 산모 시료에서 락토바실러스의 증폭 산물이 유의적으로 감소하거나, 박테로이데스 또는 프레보텔라의 증폭 산물이 유의적으로 증가 되었다고 판단될 경우, 해당 산모는 조산 위험성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

- [0060] 본 발명은 조성물은 조산 위험성의 진단을 위한 미생물 바이오마커를 제공하며, 이를 이용하면 간단한 시료 채취를 통하여 조산 위험성의 신속 검출이 가능하고, 이를 위한 신속 진단 키트의 개발이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 임신부의 처음 입원시 진단에 따른 PCoA 그래프이다. (A) 및 (B)는 주요 좌표 분석을 나타내고 (PCoA, $n = 65$) (C)는 진단에 대한 Chao 1을 나타낸다 ($n = 65$).
- 도 2는 56명 임신부의 질 시료에서 락토바실러스 종 기반의 마이크로비옴 프로파일에 대한 계층적 클러스터링 (Hierarchical clustering)을 나타낸다. CST (Community state types) I, II, III 및 IV 는 락토바실러스-우점 군집으로서, 각각 락토바실러스 크리스파투스 (*L. crispatus*), 락토바실러스 가세리 (*L. gasseri*), 락토바실러스 이너스 (*L. iners*) 또는 락토바실러스 젠сени (*L. jensenii*)로 구성되었다. CST I의 하위 그룹 CST IA은 10% 초과 박테로이데스 및 10% 초과 *L. crispatus*를 포함한다. CST IV 는 비-락토바실러스의 이종 그룹으로 설명된다. CST IV 의 하위 그룹 CST IVA 는 락토바실러스 종과 관계없이 10% 초과 박테로이데스를 포함한다.
- 도 3은 한국인에서 질 CST 및 진단을 나타낸다. 시료들을 미생물 종 데이터의 ward linkage clustering에 기반한 CST 로 분류하였다 (CST I, 주황색; CST II, 붉은색; CST III, 파란색; CST IV, 보라색; CST IA, 하늘색; CST IVA, 초록색; 조기 진통, 회색; 조기 양막 파열, 검은색; 기타, 하얀색).
- 도 4는 PTL ($n=36$) 또는 PPROM ($n=21$) 임신부에서 채집한 질액 샘플 ($n=57$)의 질내 미생물들에 대한 upgma cluster 의 막대 그래프를 나타낸다: 정상 (>90% 락토바실러스), 중급 (30 - 90% 락토바실러스) 또는

dysbiotic (<30% 락토바실러스).

도 5는 질내 미생물 군집과 조산 간의 관련성을 나타낸다. 락토바실러스 비율에 따라 분류한 정상, 중급 및 dysbiotic 군에서, 락토바실러스, 박테로이데스, 프레보텔라 및 바이셀라의 비율을 비교한 결과를 나타낸다. Mann Whitney U test, $p < 0.05$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 하기의 실시예를 본 발명을 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것일 뿐이며, 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실시예 1. 재료 및 방법

[0065] 본 연구는 이화 여자 대학교 목동 병원 (인증서 번호 ECT 06-127-7), 삼성 의료원 (SMC 2014-06-094-003), 건국 대학교 의료원 (KUHI040034), 서울 성모 병원 (KC14TIMI0591), 및 SMG-SNU 보라매 메디컬 센터 (16 2014 94)의 임상시험윤리위원회에서 실험의 모든 절차와 과정을 승인을 받았고, 임상시험윤리위원회의 가이드라인을 따라 실험을 수행하였다. 모든 참가자는 서면 동의를 제공했다.

[0067] 실시예 2. 연구 설계

[0068] 서울 지역 5 개 대학병원 (이화 여자 대학교 목동 병원, 삼성 의료원, 건국 대학교 의료원, 서울 성모 병원, 및 SMG-SNU 보라매 메디컬 센터)에서 임신 22주 + 0일 내지 36주 + 6일에 조기진통 (PTL) 및/또는 조기 양막 파열 (PPROM)의 증상으로 입원한 65명의 단태 임신부를 대상으로 질액 시료를 수집하였다. 조기진통은 임신 20-37 주 사이에 자궁 경부의 progressive effacement 및 팽창에 영향을 미칠 수 있는 자궁 수축 빈도와 강도의 정도에 따라 진단하였다. 조기 양막 파열은 vaginal fluid pooling, 양성 니트라진 검사 (양성 pH) 및 fern test에 의해 확인하였다. 질액 시료는 면봉을 이용하여 후부 fornix에서 수집하고 ELISA 및 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 위하여 2 개의 튜브에 나누어 보관했다. 수집된 시료는 30 분 이내에 -80°C 에서 보관했다. 다태 출생, 신생아의 선천적 기형 및 임신 합병증이 있는 여성은 제외하였다. 재태주령은 마지막 생리 첫날과 초음파 검사에 따라 결정하였다. 경부 길이는 내부 자궁 경관 os와 외부 경부 os 사이의 길이로 정의하였다. 출산 후 조직 병리학적 용모양막염은 태반 병리학에 근거하여 진단하였다. 인구 통계 및 임상 특성은 환자의 차트에서 수집하였고, 신생아 출생 데이터에는 Apgar 점수, 출생 체중, 성별 및 신생아 집중 치료실 입원이 포함되었다.

[0070] 실시예 3. 태아 피브로넥틴 및 사이토카인 분석

[0071] 질액 시료를 얼음 위에서 해동시키고 3000xg에서 2 분 동안 원심 분리하고, 상등액을 새로운 미세 원심 분리 튜브에 수집하여 세포 파편을 제거하였다. 무세포 상층액에서 인간 태아 피브로넥틴 키트 (Cusabio, Wuhan, Hubei, China)를 사용하여 인간 태아 피브로넥틴 농도를 측정하였다. 모델 680 마이크로 플레이트 리더 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 무세포 상층액의 사이토카인 수준은 Human Magnetic Luminex Screening Assay (Luminex Co., Austin, TX, USA)와 Bio-Plex 200 시스템 (Bio-Rad Laboratories Inc.)을 사용하여 측정하였다. Interleukin (IL) -1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17 α , G-CSF, TNF- α , MIP-1 α 및 MIP-1 β 의 13 가지 분석에 Luminex 스크리닝 검정을 수행하였다. Luminex Human Premixed Analyte Kit에 명시된 표준 범위 내에서 분석물 검출을 위해 최적화된 2 가지 희석액 (1 : 1 및 1:50)에서 96-웰 플레이트로 시료를 분석했다.

[0073] 실시예 4. 16S rRNA 시퀀싱 및 분류군 할당(Taxonomy Assignment)

[0074] 박테리아 DNA는 제조자의 프로토콜에 따라 PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 시료에서 추출했다. 박테리아 게놈 DNA에서 16S rRNA 유전자 V3-V4 초가변 영역 (519F-816R)은 Illumina 16S 메타 게놈 시퀀싱 라이브러리 프로토콜 (Illumina, San Diego, CA, USA)에 따라 증폭하였다. 증폭에 사용된 바코드 융합 프라이머 서열은 519F (5 'CCTACGGGNGGCWGCAG 3') 및 806R (5 'GACTACHVGGTATCTAATCC 3')이었다. 최종 정제된 제품을 qPCR 정량화 프로토콜 가이드 (Illumina 시퀀싱 플랫폼 용 KAPA 라이브러리 정량 키트)에 따라 qPCR 증폭하고 LabChip GX HT DNA 고감도 키트 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 검증했다. MiSeq TM 플랫폼 (Illumina)을 사용하여 Macrogen이 Paired-end (2 $\times$ 300 bp) 시퀀싱을 수행했다. OTU (Open-Reference Operation Taxonomic Unit) 피킹은 97 % 서열 유사성 수준에서 수행되었고, OUT 서열은 StrainInfo의 유형 - 변형 데이터베이스를 사용하여 분류군에 할당되었다. QIIME 소프트웨어 패키지 (1.8 절)를 사용하여 알파 및 베타 다양성을 계산하여 서열 데이터를 분석했다.

[0076] 실시예 5. 통계 분석

[0077] PTL, PPROM, 및 의학적 적응증 (medical indication, MI) 군의 임신부의 임상적 특성과 결과는 Fisher's exact test for categorical variables와 Kruskal-Wallis test for continuous variables에 의해 분석하였다. QIIME 을 사용하여 질 샘플에서 종과 번식의 양을 비교하기 위해 Mann-Whitney U 테스트를 수행했다. 락토바실러스 풍 부도(Lactobacillus abundance)가 박테리아 속에 미치는 영향과 종의 수와 다양성은 Kruskal-Wallis test와 Spearman의 상관 관계에 의해 평가하였다. 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA) 을 사용하여 수행하였다. 모든 분석은 양측이었고, $p < 0.05$ 의 값은 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0079] 실험결과

[0080] 1. 피험자의 일반적인 특성

[0081] 표 1은 65 명의 단태 임신산모의 임상적 특징을 나타낸다. 임신 22주 + 0일 내지 36주 + 6일 사이에 PTL ($n = 36$), PPROM ($n = 21$) 또는 MI ($n = 8$)로 진단받은 산모가 입원했다. MI 군은 전자간증 (preeclampsia) (3 명), 자궁 경부의 무력증 (2 명), 짧은 자궁 경부 (2 명) 또는 HELLP 증후군 (1 명)이 포함되었다. PTL, PPROM 및 MI 군의 평균 연령은 각각 31.7 세, 33.6 세 및 30.6 세였다. 입원시 재태 연령은 세 군 간의 유의한 차이가 없 었으나, 출생시 재태 연령, 입원에서 출산까지의 간격 및 신생아의 체중은 세 군간에 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$). 융모양막염의 유병률은 세 군간에 유의 한 차이가 없었다.

표 1

[0082] 연구대상의 임상적 특징

	총($n=65$)		PTL ($n=36$)		PPROM ($n=21$)		MI ($n=8$)		P 값
	Mean	SD	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
입원시 재태연령	30.2	4.2	32.2	8.2	30.3	7.3	27.3	3.6	0.27
산모연령	32.1	4.6	33.0	7.0	33.0	3.5	30.0	5.0	0.18
태아 피브로넥틴	78.6	125.8	26.8	52.3	42.4	36.5	33.1	58.3	0.67
경부 길이(mm)	21.8	14.8	17.7	25.0	22.3	19.3	26.5	35.5	0.34
출산시 재태연령(주)	33.2	4.5	35.5	5.1	32.2	6.6	31.6	5.3	< 0.01
입원에서 출산까지의 간격									0.03*
< 7일(n)	36		18 (27.7)		15 (23.1)		3 (4.6)		
7일- 28일 (n)	9		3 (4.6)		5 (7.7)		1 (1.6)		
> 28 일 (n)	20		15 (23.1)		1 (1.5)		4 (6.2)		
융모양막염									0.16*
양성	23		9 (17.3)		12 (23.1)		2 (3.9)		
음성	29		15 (28.9)		8 (15.4)		6 (11.5)		
출생 체중(g)	2082.1	865.4	2525.0	1100.0	1640.00	1345.0	1800.0	1677.5	< 0.01
Apgar 점수, 1분	7.3	2.6	8.0	2.5	7.00	4.0	8.5	2.5	0.04
Apgar 점수, 5분	8.5	2.0	9.0	1.5	9.00	2.5	9.5	1.0	0.26
성별									0.13*
남	34		15 (23.1)		13 (20.0)		6 (9.2)		
여	31		21 (32.3)		8 (12.3)		2 (3.1)		

[0083] 상기 표 1에서, 총 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타내었고, 그 외 데이터는 중앙값 및 사분범위(IQR), 범주 형 자료는 n , (%) 로 나타내었다. 데이터 간 유의적 차이는 χ^2 test 에 의한 Kruskal-Wallis test 및 명명척도 로 분석하였다 ($p < 0.05$). PTL 은 조기진통, PPROM 은 조기 양막 파열을 나타낸다.

[0085] 2. 조산 위험성이 있는 임신부의 질내 미생물 군집 다양성

[0086] 임신부의 조산 발병 위험성을 평가하기 위한 질 미생물 조성을 특성화하기 위해 합병증을 가진 산모를 제외한 57 명에게서 질 시료를 분석하였다. 본 연구의 데이터 세트는 질액 시료에서 유전자 서열 1,055,829 개로 구성 되어 있으며 샘플 당 평균 16,243 개의 판독 수 (범위, 3,216-28,407)를 포함한다.

[0087] 질 샘플의 서열 데이터는 진단 (PTL, PPROM 및 MI)에 따라 Chao 1의 주요 좌표 분석 및 측정을 하였다 (도 1).

PTL과 PPROM 샘플의 세균 다양성을 조사하기 위해 평균 Shannon 및 Simpson 지수 값을 계산하였다. PPROM을 가진 여성의 질 샘플은 Shannon 지수 (미생물 군집 풍부함의 지표)와 Simpson 지수 (미생물 다양성 지표)는 PTL의 지수들보다 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.05$, 표 2). 락토바실러스의 우점도는 PTL을 겪은 산모가 PPROM 산모에서 유의하게 증가하였으며, 박테로이데스, 프레보텔라 (Prevotella), 스펅고모나스 (Sphingomonas), 바이셀라 (Weissella), 스트렙토코쿠스 (Streptococcus), 리조비움 (Rhizobium), 우레아플라스마 (Ureaplasma), 프로피오니박테리움 (Propionibacterium) 및 푸소박테리움 (Fusobacterium) 는 PPROM 산모가 PTL 산모보다 유의하게 더 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나 아토포비움 (Atopobium), 가드네렐라 (Gardnerella), 마이코플라스마 (Mycoplasma) 및 스니치아 (Sneathia)의 양은 PTL 산모와 PPROM 산모 사이에 차이가 없었다.

표 2

[0088]

처음 입원시 임신부의 질내 미생물 군집의 비교

	총 (=57)		PTL (n =36)		PPROM (n = 21)		P 값
	Means	SD	Median	IQR	Median	IQR	
알파 다양성							
Shannon 지수	3.136	1.726	2.171	2.031	4.324	3.113	0.008
Simpson 지수	0.630	0.267	0.573	0.458	0.865	0.346	0.010
분류군							
Lactobacillus	45.526	36.370	67.130	81.995	21.940	40.390	0.004
Atopobium	2.458	10.189	0.010	0.040	0.000	0.040	0.772
Gardnerella	4.488	11.384	0.040	2.290	0.020	0.550	0.784
Bacteroides	14.702	12.146	5.005	11.480	23.190	24.315	< 0.001
Prevotella	2.967	8.179	0.260	0.543	0.840	1.530	0.011
Sphingomonas	2.626	2.388	0.930	2.330	4.180	4.805	0.002
Bifidobacterium	2.491	10.172	0.000	0.020	0.000	0.065	0.842
Sneathia	0.333	2.359	0.000	0.000	0.000	0.010	0.106
Weissella	1.830	2.856	0.315	1.220	1.530	2.400	0.030
Megasphaera	1.032	4.792	0.000	0.010	0.000	0.020	0.495
Ureaplasma	1.075	4.192	0.010	0.148	0.200	1.805	0.014
Rhizobium	1.108	1.182	0.345	0.890	1.390	1.985	0.009
Streptococcus	1.261	4.979	0.120	0.295	0.440	0.575	0.010
Propionibacterium	0.835	1.450	0.235	0.753	0.880	1.090	0.029
Mycoplasma	0.236	1.085	0.000	0.008	0.000	0.000	0.014
Dialister	0.268	0.746	0.000	0.048	0.010	0.160	0.299
Fusobacterium	0.242	0.580	0.060	0.195	0.240	0.325	0.008

[0089]

상기 표 2에서, 총 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타내었고, 그 외 데이터는 중앙값 및 사분범위(IQR)로 나타내었다. 데이터 간 유의적 차이는 Mann-Whitney U test로 분석하였다 ($p < 0.05$).

[0091]

3. 조산 위험성이 있는 임신부의 질내 미생물 프로파일

[0092]

질 미생물 프로파일은 유산균 종(Lactobacillus spp.)에 따라 CST (community state types) I, II 및 III에 각각 해당하는 락토바실러스 크리스파투스 (L. crispatus, n = 12), 락토바실러스 가세리 (L. gasseri, n = 2) 및 락토바실러스 이너스 (L. iners, n = 13)로 분류하였다 (도 2). CST IV의 하위 그룹 IVA는 주로 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 다이아리스터 (Dialister), 스트렙토코쿠스 (Streptococcus) 및 박테로이데스 (Bacteroides) (n = 21)로 구성되었다. CST I의 하위 유형 IA는 L. crispatus와 함께 Bacteroides (n = 9)가 우점하였다. 흥미롭게도 CST I 미생물을 가진 임신부는 임신 28 주 전에 출산하지 않았고 CST IVA에 속한 임신부 중 질 미생물군에 9.4 %의 바이셀라를 함유한 산모 5 명은 정상 분만을 하였고, CST IA에 속한 임신부는 모두 조산으로 분만하였다 (도 3).

[0093]

락토바실러스의 우점도를 전체 박테리아 대비 퍼센트로 나타냈을 때, 정상 (> 90 % 락토바실러스, n = 10), 중급 (30-90 % 락토바실러스, n = 23), 또는 dysbiotic (30 % 락토바실러스, n = 24)으로 샘플을 분류했다. 도 4는 입원 당시의 주요 미생물 군집 (microbiota)의 풍부함을 보여준다. PTL을 가진 10명의 산모는 정상 미생물 군집이 나타났다 (표 3). PTL 또는 PPROM으로 진단받은 23명의 산모는 중급 또는 dysbiotic 미생물 군집이 나타났다. 박테로이데스 (Bacteroides), 가드네렐라 (Gardnerella), 프레보텔라 (Prevotella), 스펅고모나스

(Sphingomonas), 바이셀라 (Weissella), 스트렙토코쿠스 (Streptococcus), 리조비움 (Rhizobium), 프로피오니 박테리움 (Propionibacterium), 스니치아 (Sneathia) 및 푸소박테리움 (Fusobacterium)은 락토바실러스의 농도가 감소함에 따라 유의적으로 증가 하였다 ($p < 0.01$) (도 4). 홍미롭게도, 융모양막염의 발병은 dysbiotic 질 미생물 군집을 가진 산모가 정상 또는 중급 질 미생물 군집을 가진 산모에서 보다 더 많이 나타났다 (표 3).

표 3

[0094]

락토바실러스 비율에 의한 분류에 따른 연구대상의 임상적 특징

	전체 (n = 57)		> 90% (n = 10)		30 to 60% (n = 23)		<30% (n = 24)		P 값
	Mean	SD	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
입원시 재태연령	30.5	4.2	32.0	4.4	32.7	8.8	29.6	6.0	0.840
산모연령	32.4	4.8	34.0	4.0	33.0	6.0	33.0	7.5	0.207
태아 피프로렉틴	81.4	129.7	41.3	155.5	40.2	58.8	32.5	39.6	0.665
경부 길이(mm)	21.4	14.2	16.6	22.7	22.3	17.0	20.0	27.6	0.668
진단									0.014
PTL	36	(63.2)	9	(15.8)	16	(28.1)	11	(19.3)	
PPROM	21	(36.8)	0	(0.0)	8	(14.0)	13	(22.8)	
출산시 재태연령	33.3	(4.7)	35.2	1.9	34.5	3.1	33.8	7.7	0.642
입원에서 출산까지의 간격									0.266
< 7일 (n)	33	(57.9)	4	(7.0)	14.0	(24.6)	15	(26.3)	
7 -28일 (n)	8	(14.0)	2	(3.5)	1.0	(1.8)	5	(8.8)	
> 28일 (n)	16	(28.1)	3	(5.3)	9.0	(15.8)	4	(7.0)	
융모양막염									0.039
양성	21	(47.7)	1	(2.3)	7	(15.9)	13	(29.5)	
음성	23	(52.3)	5	(11.4)	12	(27.3)	6	(13.6)	0.115
출생 체중	2097.3	875.9	3020.0	1400.0	2315.0	1040.0	1880.0	1635.0	0.264
Apgar 점수, 1분	7.2	2.6	9.0	8.0	1.0	5.5	7.0	1.8	0.462
Apgar 점수, 5분	8.4	2.1	9.0	9.0	1.0	2.0	9.0	2.3	0.867
성별									0.954
남	28	(49.1)	4	(7.0)	12	(21.1)	12	(21.1)	
여	29	(50.9)	5	(8.8)	12	(21.1)	12	(21.1)	

[0095]

상기 표 3은 락토바실러스 비율에 따라 세 개의 그룹으로 나눈 것이다. 총 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타내었고, 그 외 데이터는 중앙값 및 사분범위(IQR), 범주형 자료는 n, (%) 로 나타내었다. 데이터 간 유의적 차이는 χ^2 test 에 의한 Kruskal-Wallis test 및 명명척도로 분석하였다 ($p < 0.05$).

[0097]

4. 질 미생물과 사이토카인 농도와 의 연관성

[0098]

입원 당시의 질 세균 군과 출산시의 임신 주수와의 연관성을 분석하였다. 락토바실러스가 정상인 그룹에서 조산 산모의 질액은 박테로이데스와 프레보텔라는 정상 분만 산모보다 더 풍부했으며, 바이셀라는 낮게 나타났다 (도 5). 락토바실러스가 중급인 그룹에서 박테로이데스 및 프레보텔라는 조산 산모의 질액에서 더 풍부했으며, 락토바실러스는 조기 분만 산모에서 더 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 락토바실러스가 dysbiotic 그룹에서 프레보텔라는 조산 산모의 질액에서 더 풍부했으며, 바이셀라는 더 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한 프레보텔라의 높은 비율 ($r^2 = 0.331$, $p < 0.05$)과 락토바실러스의 낮은 비율 ($r^2 = -0.503$, $p < 0.05$)의 융모양막염과 발병과 관련이 있었다.

[0099]

조산과 관련한 미생물 지표를 확인하기 위해, 13가지 염증성 사이토카인의 농도와 락토바실러스, 박테로이데스, 프레보텔라 및 바이셀라의 우점도 간에 상관 관계를 평가했다. IL-1 β 수준 (n = 55, 평균 816.7 ± 1483.4 pg / ml)은 바이셀라 비율과 유의한 음의 상관 관계를 보였다 ($r^2 = -0.388$, $p < 0.05$). IL-7의 수준 (n = 55, 평균 7.7 ± 5.6 pg / ml)은 락토바실러스의 우점도 ($r^2 = -0.404$, $p < 0.01$) 및 재태 연령 ($r^2 = -0.318$, $p < 0.05$)과 음의 상관관계가 나타났고, 박테로이데스의 우점도와는 양의 상관 관계를 보였다 ($r^2 = 0.307$, $p < 0.05$). 질 마이크로비움과 다른 사이토카인의 수준 사이에는 상관 관계가 없었다.

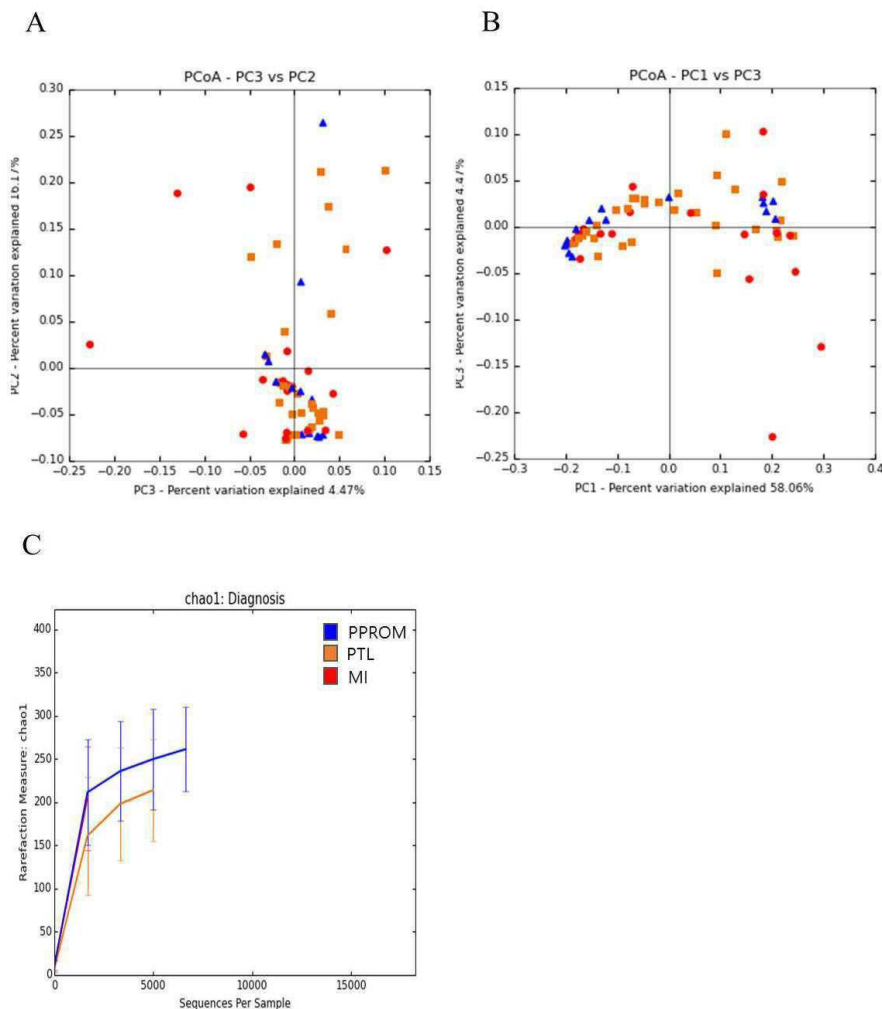
[0101] 5. 결론

[0102] 본 발명에서는 조기진통이나 조기 양막 파열로 입원한 한국인 산모를 대상으로 질액내 마이크로비움을 비교하였다. 조기 양막 파열을 진단받은 산모의 질 미생물 조성은 조기진통을 진단받은 산모보다 더 많은 다양성이 나타났다. 또한 조산 위험이 있는 산모의 질액은 락토바실러스의 우점도에 따라 박테로이데스, 프레보텔라 및 바이셀라의 비율이 크게 변했다. 특히, 락토바실러스의 우점도에 따라 분류한 세 그룹 모두에서, 상위 20종의 주요 미생물군 중에서 박테로이데스, 프레보텔라 및 바이셀라는 조산과 강한 관련성을 나타내었다.

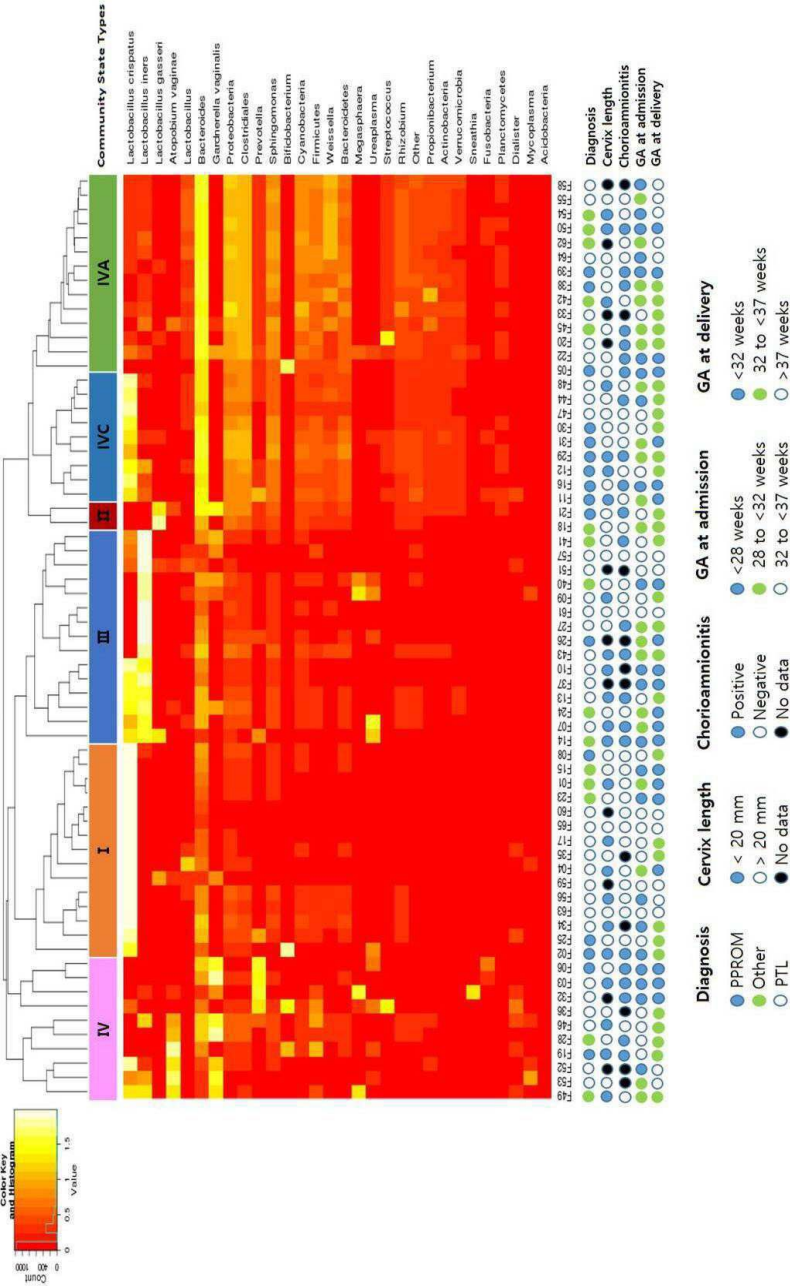
[0103] 락토바실러스와 바이셀라의 우점도가 증가할수록 정상 분만과 관련이 있었고, 박테로이데스와 프레보텔라의 우점도가 증가할수록 조산 분만과 관련이 있었다. 특히, 락토바실러스의 고갈은 병원균의 존재, 융모양막염 발병 및 분만 주수가 낮은 것과 관련이 있었고, 질내 균총 이상(dysbiosis) 산모에서 높은 비율의 바이셀라는 분만 지연과 관련이 있었다. 더욱이 IL-7 농도는 락토바실러스의 낮은 비율과 박테로이데스의 높은 비율과 관련이 있다. 본 연구는 나아가 조산과 관련이 있는 표지자인 IL-7 과 상관관계를 보인 락토바실러스의 감소 및 박테로이데스의 증가, 그리고 IL-1 β 와 상관관계를 보인 바이셀라의 감소를 조산의 마커로 사용할 수 있음을 시사한다.

도면

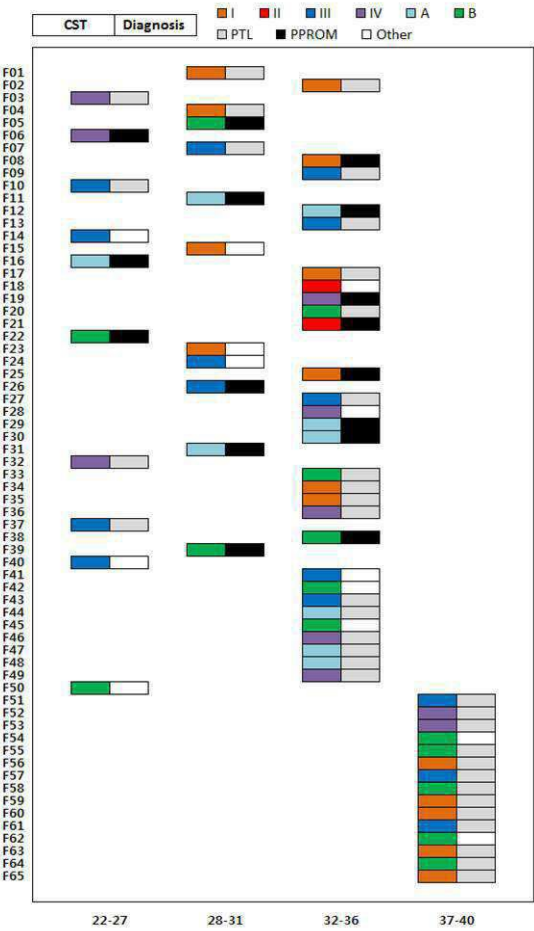
도면1



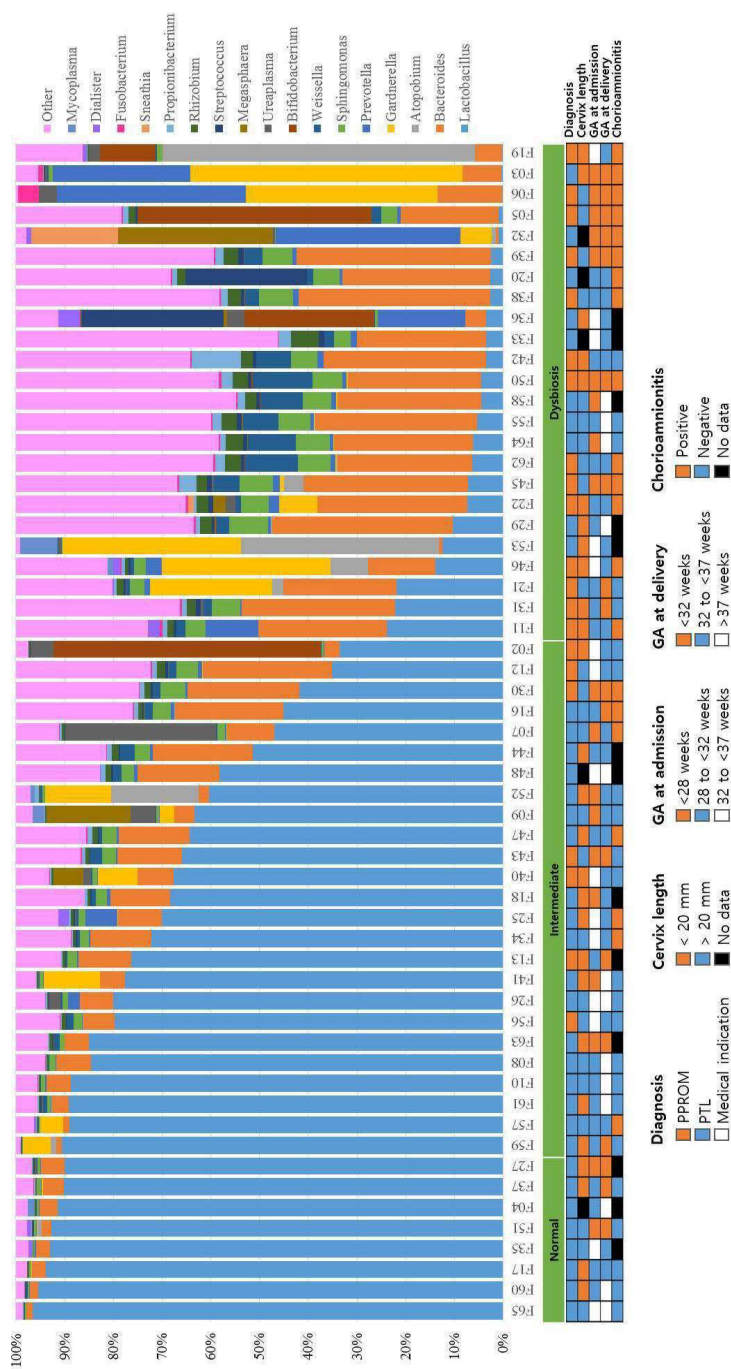
도면2



도면3



도면4



도면5

