

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07472

研究課題名(和文) 妊婦からのB群溶血性レンサ球菌(GBS)の検出 - 全自動遺伝子解析装置への応用 -

研究課題名(英文) Detection of Group B Streptococcus (GBS) in pregnant women-Application to Fully Automated Genetic Analyzer-

研究代表者

三浦 里織 (Miura, Saori)

福島県立医科大学・保健科学部・助教

研究者番号：00803660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B群レンサ球菌(GBS)は、女性の10～30%が膣や直腸内に保菌し新生児GBS感染症の原因となる。これらを予防するためアメリカ疾病予防センター(CDC)は、全妊婦へのGBSユニバーサルスクリーニングと抗菌薬予防投与をガイドライン化している。現在、GBSスクリーニングは、培養法で実施しているが検出感度が低く、検出まで2日間を要する。本研究では、これらを高感度化、迅速化を目的として全自動遺伝子解析装置の検討を行った。その結果、検討した遺伝子解析装置は、便検体などの遺伝子検出の阻害物質を多く含む検体で従来の遺伝子検出法より有用であることが示唆された。これは、GBS遺伝子検出でも応用可能な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊婦GBSユニバーサルスクリーニングの検出感度が現法(培養法)より向上し、検出時間の短縮が可能となれば、新生児GBS感染症のリスクを軽減にすることにつながり、より安全な周産期医療へ寄与することができる。本研究では、全自動遺伝子解析装置の性能評価を行った。この全自動遺伝子解析装置を妊婦から採取した膣および直腸拭いスワブ検体からの直接GBS遺伝子の検出する方法に応用することが出来れば、ユニバーサルスクリーニングにおけるGBS検出感度向上と検出時間短縮が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus agalactiae (GBS:Group B Streptococcus) is carried in the vagina and rectum by 10-30% of women. If a pregnant woman is a GBS carrier, this can cause neonatal GBS infection. To prevent these infections, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) has established guidelines for universal screening of all pregnant women for GBS and prophylactic administration of antimicrobials to pregnant women carrying GBS. Currently, GBS universal screening is performed by culture method, but the detection sensitivity is low and it takes two days to detect. In this study, we examined a fully automated genetic analysis system that enables high-sensitivity and rapid measurement, with the aim of improving the aforementioned. As a result, it is considered that the studied gene analyzer is more useful than conventional gene detection methods for samples that contain many inhibitors of gene detection, such as stool samples. This finding was applicable in GBS gene detection.

研究分野：clinical laboratory science

キーワード：GBS 遺伝子検出法

1. 研究開始当初の背景

早発型 GBS 感染症は、新生児に敗血症、重症肺炎、化膿性髄膜炎等の重篤な病態を引き起こす。その死亡率は 25～50%に至るとの報告がある（JAMA .230:1158-60,1974）。例年、日本医療機能評価機構産科補償制度へ新生児 GBS 感染症による重症脳性麻痺の報告があり、補償の対象となっている。新生児 GBS 感染症の原因は、出産時における GBS 保菌妊婦から児へ産道を介した垂直感染である。1996 年、CDC は周産期 B 群溶血性レンサ球菌感染症予防のためのガイドライン（CDC. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease*. MMWR.45,1996）を公表し、妊婦への GBS スクリーニング実施が明記され、2010 年さらなる改訂を行った（*Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC,2010*. MWR.59,2010）。ここでは、膣および直腸スワブからの直接培養法による GBS スクリーニングは偽陰性が多いため、改良法として選択増菌培地でスワブから GBS を増菌させ検出する方法が推奨された。また将来的には、より高感度で迅速かつ簡便な検出法への発展が望まれている。本邦でも日本産婦人科学会「産婦人科診療ガイドライン」により、全妊婦に対して妊娠 35～37 週に GBS スクリーニングを実施し、GBS 保菌妊婦は分娩時にペニシリン系薬剤の予防投与を行うとされている。現在の GBS ユニバーサルスクリーニングではペニシリン低感受性 GBS (GBS with reduced penicillin susceptibility : PRGBS) を検出できず、妊婦からの PRGBS に関する検討はほとんど行われていない。一方で、他の臨床検体からは PRGBS が確認されており、ほとんどの PRGBS はペニシリン結合タンパク群（Penicillin-binding proteins : PBPs）である PBP2X にアミノ酸置換が認められ、ペニシリンに低感受性を示す。妊婦が PRGBS を保菌する場合、ペニシリン系薬剤の予防投与の効果が得られず、臨床的に重要な問題となる。臨床検体からの PRGBS 分離率は年々増加しており、今後、妊婦に対しても PRGBS のスクリーニングをしていく必要がある。

2. 研究の目的

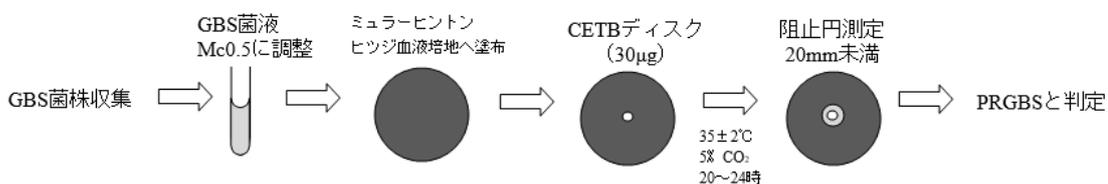
B 群溶血性レンサ球菌（GBS）は女性の 10～30%が膣や直腸内に保菌し、新生児 GBS 感染症の原因となることがあり、これは児に重大な影響を与える。例年、日本医療機能評価機構産科補償制度にも新生児 GBS 感染症による重症脳性麻痺の報告があり、問題視されている。これらを予防するため、アメリカ疾病予防センター（CDC）は全妊婦への GBS ユニバーサルスクリーニングと GBS 保菌妊婦への抗菌薬予防投与をガイドライン化している。現在ユニバーサルスクリーニングは培養法で実施しているが検出感度が低く、GBS 偽陰性となる場合があり、また多くは GBS 薬剤感受性検査を実施していない。新生児 GBS 感染症を防止するには前述の課題を改善する必要がある。

本研究では現在のユニバーサルスクリーニングに対し、①高感度化、②迅速化、③ペニシリン低感受性 GBS の有無を同時検出が可能な検査法を確立し、さらに、全自動遺伝子解析装置へ応用し、周産期医療へ寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

① 妊婦由来 GBS 菌株への PRGBS スクリーニング

妊婦から分離された GBS 菌株を収集し、それらの菌株に対してセフトチブテン (ceftibuten : CETB) ディスク (30 μ g 含有) 拡散法 (Kimura K, et al. *J Clin Microbiol.* 2009 ;47(12):4154-7.) によって、PRGBS 検出を試みた。



② MALDI-TOFMS による GBS 菌種同定

菌種の同定時間を短縮する方法として候補として考えられる質量分析法 (MALDI-TOFMS) を用いて、①で使用した GBS 菌株の菌種同定を確認した。

③ 全自動遺伝子解析装置 μ TAS WAKO の性能評価

GBS 遺伝子を検体スワブから直接検出できる全自動遺伝子解析装置の候補機器として、 μ TAS WAKO (富士フイルム和光純薬株式会社) の性能評価を実施した。この機器は、結核菌群および非結核菌群遺伝子を喀痰検体から全自動で核酸抽出し、遺伝子を核酸増幅させ、短時間で検出する機器である。しかしこの機器は、喀痰検体以外の検体に対する性能評価はされていない。また、結核菌群および非結核菌群遺伝子の検出試薬のみ入手可能であったため、今回は、当院に抗酸菌検査のために提出された喀痰以外の検体 96 件について、塗抹鏡検検査、培養検査、対照となる他の遺伝子検査 (コバス TaqMan48 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)) と比較した。

4. 研究成果

① 妊婦から分離された GBS 菌株に PRGBS スクリーニングについて

当院で収集できた妊婦 GBS 菌株数は 64 株 (ダブリ削除済み) であり、これらの菌株に対し、セフトチブテン (ceftibuten : CETB) ディスク (30 μ g 含有) 拡散法を実施した結果、13 株から下記 (写真 1、写真 2、写真 3) のような阻止円の中にコロニーを形成する菌株があった。これらは、PRGBS である可能性がある。これらの菌株は純培養を実施し、質量分析法にて GBS であることは確認しており、DNA 抽出を行った。耐性遺伝子検出による確定はできていない。

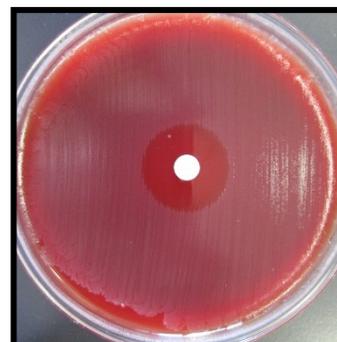
写真 1



写真 2



写真 3



② MALDI-TOFMS による GBS 菌種同定について

培養法によって GBS と同定済み GBS 菌株 64 件について、MALDI-TOFMS を用いた菌種同定を実施した。結果は 35 件 (54.7%) で GBS と同定された。

③ 全自動遺伝子解析装置 μ TAS WAKO の性能評価について

今回、収集できた喀痰以外の検体総数は96件であり、検体種別の内訳は気管支肺胞洗浄液26件、糞便および胸水14件ずつ、髄液8件、創部滲出5件、尿および胃液4件ずつ、その他の検体は19件でこの中には腫瘍、膿瘍、生検材料などが含まれていた(図1)。抗酸菌培養検査結果内訳と塗抹検査結果内訳は図2で示す。遺伝子検出法間での性能評価として、 μ TAS WAKO とコバス TaqMan48 の比較結果を図3に示す。2法の一一致率は93.8%で、不一致だったのは6件だった。この6件の培養結果は、3件が結核菌陽性で、検体種別は糞便2件と尿1件だった。これらの結果から μ TAS WAKO は糞便などのPCR阻害物質を多く含む検体において、従来の遺伝子検出法より有用であることが示唆された。GBS 遺伝子を直接、膣および直腸拭いスワブ検体から検出する場合も、PCR阻害物質の影響を受けやすいことが推察されるため、この知見は重要である。また、 μ TAS WAKO は核酸抽出からPCR解析まで全自動の工程で進められ、約45分程度で結果が得られる。この方法を妊婦GBSユニバーサルスクリーニング法に応用できれば、現在の培養法に比較し、PCRを用いることで検出感度の向上と検査結果が得られるまでの時間短縮につながると考察した。

図1

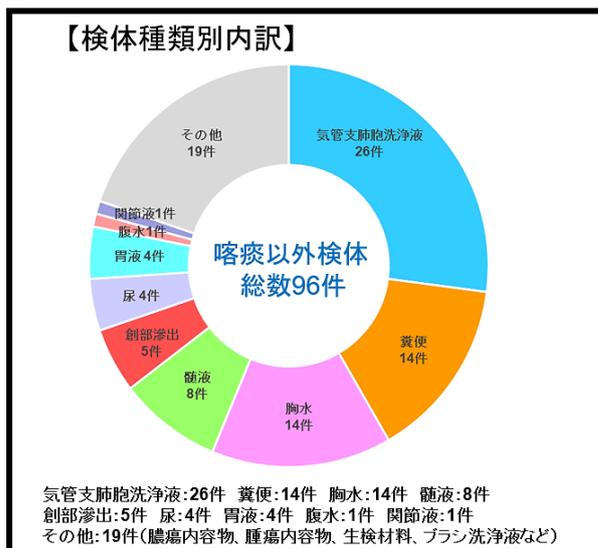


図2

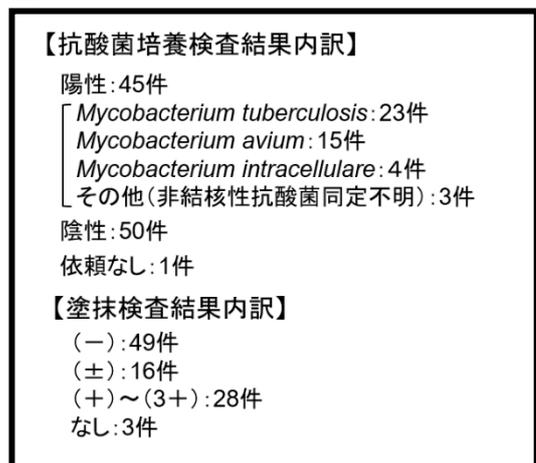
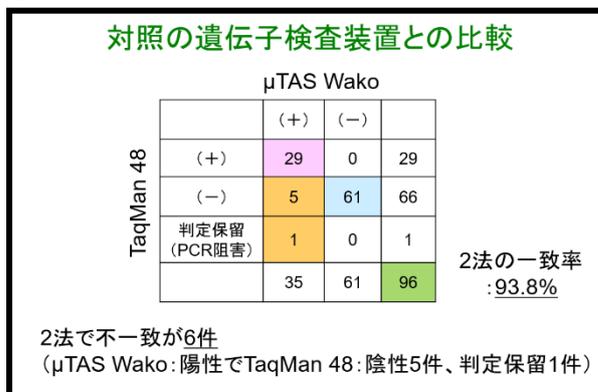


図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saori Miura et.al	4. 巻 295
2. 論文標題 Amyloid precursor protein 770 is specifically expressed and released from platelets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13194-13201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.012904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦里織 他
2. 発表標題 抗酸菌検査における遺伝子検査装置μTAS WAKO g1の性能評価
3. 学会等名 第69回日本医学検査学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	豊川 真弘 (Toyokawa Masahiro) (10645443)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	志村 浩己 (Shimura Hiroki) (40303416)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------