

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10684

研究課題名(和文) B群溶血性連鎖球菌新規検出方法の確立と妊婦検診への実用化に向けた症例集積研究

研究課題名(英文) Immunochromatography for rapid detection of Streptococcus agalactiae in pregnant women

研究代表者

高山 陽子 (Takayama, Yoko)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80286278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の妊婦 Streptococcus agalactiae (Group B streptococcus:GBS) 検査は、欧米に比べて検出率が低い。本研究では、臨床検体を用いて GBS 特異 Sip 抗原を用いたイムノクロマト(IC)による新規検出方法の検出率や有用性を検討した。頸管・膣内容377検体を用いて、GBS 選択培地+ IC 法および GBS 選択培地+分離培養法を比較したところ、GBS は前者で54株、後者で58株が検出された。また、感度93.1%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率98.8%であった。以上より、IC 法は培養法と比較して遜色のない結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の産婦人科は個人病院が多く、そのほとんどが GBS 選択培地を用いて GBS を検出しており、GBS 保菌妊婦の見逃しが問題となっている。簡便で費用対効果の面でも優れた新規 GBS 検出方法の確立は、GBS スクリーニング検査の更なる普及と検査精度の上昇につながり、GBS 感染症の発症率低下が期待できる。また、適切な抗菌薬による治療へと結びつき、近年報告されているペニシリン低感受性溶連菌などの薬剤耐性菌への抑制効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated an immunochromatography method for rapid detection of GBS-specific surface immunogenic protein (Sip) using anti-Sip monoclonal antibodies. A total of 377 cervical and vaginal swabs collected during weeks 35 to 37 of gestation were inoculated into GBS medium F and incubated. Growth of microorganisms and production of red/orange pigment were assessed by observation. Then culture extracts were subjected to immunochromatography and were also inoculated onto chromID Strepto B (STRB) medium. Of the 377 samples, 54 (14.3%) were positive for GBS by immunochromatography after incubation in GBS medium F. On the other hand, GBS was isolated from 58 (15.4%) of the 377 samples by culture with GBS medium F and STRB medium. Immunochromatography was comparable to culture on STRB medium for detecting GBS, indicating that this method could be used clinically for GBS screening in pregnant women even at small institutions.

研究分野：感染対策、感染症

キーワード：Streptococcus agalactiae GBS特異 Sip 抗原 イムノクロマト法 迅速診断 診療所

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus agalactiae (Group B streptococcus : GBS) は健常女性の膣や腸管内の常在菌であり、多くの場合は無症候で経過する。しかし、保菌妊婦が新生児 GBS 垂直感染を起こす確率は約 50%と高率であり、そのうち 1-3%に髄膜炎、肺炎、敗血症などの致死感染を併発する (*Pediatrics International* 2002;44:641-6)。特に死亡率において、早産児における GBS 感染事例は約 20%、妊娠 33 週以下の分娩例は約 30%であり、正常産の 2-3%と比較して著しく高い (*J Pediatr Nurs* 2004;19:357-63, *JAMA* 2008;299: 2056-65)。

新生児 GBS 感染を予防するために米疾病対策予防センター (CDC) ガイドラインでは妊娠 35-37 週の全妊婦を対象にした膣と直腸内の GBS スクリーニング検査を実施し、GBS 陽性であれば抗菌薬による除菌を行うことにより垂直感染の予防を推奨している。この GBS の検出方法は LIM Broth 等で増菌後に血液寒天培地か選択培地に分離培養し、最終的な同定方法としてラテックス凝集反応 (LA 法) や核酸増幅法で同定する。もしくは GBS 増殖培地 (色素産生 GBS はオレンジに着色で同定) で着色しない菌については血液寒天培地にて分離培養し、生育したコロニーを用いて先と同じように LA 法や核酸増幅法により同定する厳密な検出方法が推奨されている。CDC ガイドライン導入前は、米国における早発性 GBS 感染症の発症率が 1000 件の出産例に対して 1.7 件であったが、導入後は 0.34-0.37 件と、劇的に減少している (*MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-36)。

我が国においても、産婦人科診療ガイドライン-産科編 2011 において、GBS 保菌診断は推奨レベル B とされ、妊娠 33-37 週の培養結果に基づきペニシリン系薬の静注による母子感染予防が実施されている。しかし、日米の検出方法に大きな隔たりがあり、我が国の検出率は米国に比べて低く見逃されている現状がある。CDC ガイドラインは、GBS 増殖培地 (色素産生 GBS はオレンジに着色) を用いた培養法を推奨している。GBS には色素産生株と色素非産生株があるため (*MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-36, *J Clin Microbiol* 2012;50:1132-3) 培地がオレンジに着色しない全ての菌に対して、さらなる分離培養及び菌種の同定作業が求められている。我が国の細菌検査室における GBS 検出方法は、膣と直腸の拭き綿棒を血液寒天培地に塗抹して培養し、生育したコロニーを LA 法で同定する方法か、個人病院で多く実施されている GBS 選択培地 (抗菌薬含有で色素産生 GBS がオレンジに着色) による同定である。その他に PCR や DNA プローブを用いた遺伝子検出方法が報告されているが、実施には特定の高価な機器が必要であり、熟練した技術者も必要となるため、実際には研究以外では実施されていない。綿棒を増菌培養せずに血液寒天培地に直接塗抹する検出方法では、 10^3 個/スワブ程度の菌の数が必要であり、これが検出感度の低さ、見逃しの原因となっている。また GBS 選択培地を用いる方法は、色素非産生株や色素産生が不十分な株を見逃している。実際に母子垂直感染を予防するためには、色素非産生株や色素産生が不十分な全ての菌に対して、CDC 法と同様に分離培養後の同定が必要となる。

2. 研究の目的

CDC は膣と直腸内の GBS を増菌することによって可能な限り見逃さない方法 (CDC 法) を採用している。

本研究では、我が国の不備な GBS 検出方法を改善するため、CDC 法で実施されている増菌培養 (色素産生 GBS はオレンジに着色) を取り入れる。CDC 法では 2 日間かかる同定 (同定まで全工程で 3 日間) を増菌培養直後に同定可能な花木らが開発した GBS の surface immunogenic protein (Sip) を標的としたイムノクロマト (IC) 法を用いて、15 分という短時間

(同定まで全工程で1日)で簡便かつ安価な検出方法を確立することを目的とする(*Clin Vaccine Immunol* 20;1381-7, 2013) 研究を行う。GBS 特異 Sip 抗原は、血清型の影響を受けずに検出することができる。

膣や直腸の拭い綿棒を GBS 増菌培地で増殖(10 個/スワブが必要)するため、血液寒天培地に直接塗抹(10³ 個/スワブが必要)する従来法よりも 100 倍程度の感度向上が期待できる。さらに、増菌培地中の綿棒から直に IC 法で菌種同定を行うため迅速かつ特異性の高い検出法となる。CDC 法と比べても、同等以上の検出率と短期間で医療コストの低い検出法となる。

3. 研究の方法

(1) GBS の同定

検体を直接血液寒天培地に塗抹して LA 法で同定する方法

妊婦からの GBS 検出は膣や直腸の拭い綿棒を血液寒天培地に塗抹後、培養してコロニーを形成させ、そのコロニーを用いて LA 法での同定を実施した。

検体を GBS 選択培地で培養して着色した菌のみを GBS と同定する方法

溶血性 GBS のみを検出可能な GBS 選択培地での検出を実施した。

GBS 選択培地で着色しない菌を GBS 検出 IC 法で確認する方法

で着色した菌を GBS と同定するが、非着色の菌は看過されるため、この非着色の菌の全てについて GBS 検出 IC で同定検査を実施した。

PCR と MALDI-TOF-MS による GBS の同定

既に確立した方法として PCR 法と MALDI-TOF-MS 法を用いて同定を実施した。

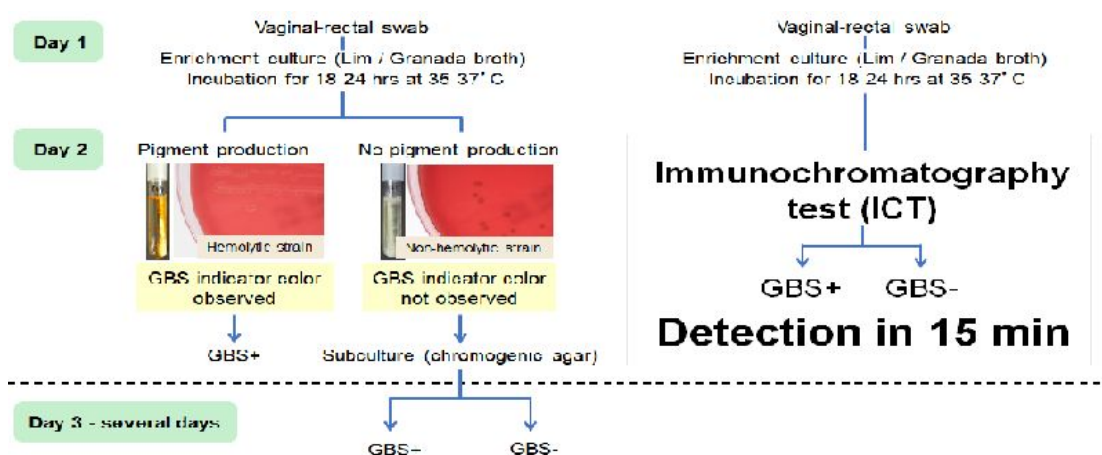
(2) 臨床検体を用いた従来法との比較研究

GBS 選択培地+IC 法

GBS 選択培地+分離培養法 (Chrom-ID Strepto B agar)

(3) 感度・特異度の算出

感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を算出した。



4. 研究成果

(1) GBS 選択培地+IC 法および GBS 選択培地+分離培養法の比較

頸管・膣内容 377 検体を、GBS medium F を用いて培養したところ、発育あり 254 株(色素産生あり 48 株、色素産生なし 206 株)、発育なし 123 株であった。また、IC および分離培養を

実施した。色素産生あり 48 株では IC・分離培養いずれも陽性、色素産生なし 206 株では分離培養で陽性 6 株（IC：陽性 4 株、陰性 2 株）陰性 200 株（IC 全て陰性）発育なし 123 株、分離培養陽性 4 株（IC：陽性 2 株、陰性 2 株）陰性 119 株（IC 全て陰性）であった。

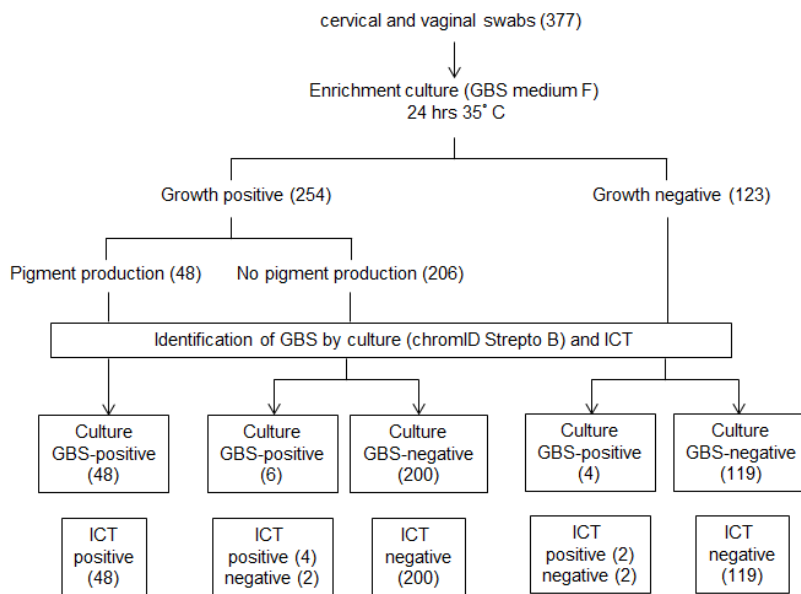
GBS 選択培地+分離培養法で 58 株に対して GBS 選択培地+IC 法は 54 株の検出であり、培養法と比較して遜色のない結果を示した。

(2) 感度、特異度の算出

IC・分離培養陽性 54 株、IC・分離培養陰性 319 株、IC 陽性・分離培養陰性 0 株、IC 陰性・分離培養陽性 4 株であることから、感度 93.1%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 98.8%と算出された。

(3) IC 偽陰性の評価

4 検体の分離培養結果から、GBS のコロニー数に比べて *E. faecalis* 等の菌数が優位であった。この結果から、*E. faecalis* からの抽出物が IC において GBS 検出の抗原抗体反応を阻害する可能性、GBS コロニー数が少数であったため、増菌培地中の GBS 菌数が IC の検出感度以下となった可能性が示唆された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takayama Y, Matsui H, Adachi Y, Nihonyanagi S, Wada T, Mochizuki J, Unno N, Hanaki H.
Detection of *Streptococcus agalactiae* by immunochromatography with group B streptococcus-specific surface immunogenic protein in pregnant women. J Infect Chemother 2017;23:678-82. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Takayama Y, Matsui H, Adachi Y, Nihonyanagi S, Wada T, Mochizuki J, Unno N, Hanaki H.
Immunochromatography for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. World Congress of Gynecology and Obstetrics FIGO XXII 2018

2. 高山陽子、松井秀仁、大川原裕樹、和田達彦、中村正樹、山谷正大、内山勝文、安達 謙、二本柳 伸、花木秀明．イムノクロマト法による GBS 妊婦検診の実用化に向けた評価．第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：花木 秀明

ローマ字氏名：Hanaki Hideaki

所属研究機関名：北里大学

部局名：北里生命科学研究所

職名：研究員(部長、特任教授)

研究者番号(8桁): 60286747

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。