

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09525

研究課題名（和文）周産期予後不良因子であるGBS感染症の迅速検出を目的とした等温核酸増幅技術の開発

研究課題名（英文）The exploration of late-onset disease infection route of Group B Streptococcus by PCR

研究代表者

牧野 真太郎 (Makino, Shintaro)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70570894

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）：GBS遅発型発症に対する予防策として、第一に偽陰性評価の回避のため、高精度核酸検出法を開発した。第二に妊産婦および児の保菌率の変動を検証した。530組の妊婦およびその児を対象とし、産前、分娩時、産後の膣直腸擦過検体を採取した。児の口腔/直腸擦過検体は、出生時、日齢3、日齢30に採取した。この結果、母体産前保菌率は核酸検出で18.6%、培養で16.1%であった。全症例の9.6%は、産前と分娩時の検出結果が不一致となった。陰性母体の児の4.6%でGBSは検出され、水平感染の可能性を示唆した。本新規核酸検出法は濃縮培養なく直接検出可能であり、分娩時のポイントオブケア検査として有効といえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のガイドラインで予防し得る早発型GBSとは異なり、遅発型GBSは水平感染による出生後感染の可能性が示唆された。したがって本研究で確立した新規核酸検出法は、濃縮培養工程を伴わず直接検出可能であり、分娩時のポイントオブケア検査としてのみならず、発症を疑う新生児の早期診断ツールとしても有効といえ、周産期医療への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to reveal the clinical features to explore transmission route of LOD. Vaginal-and-anorectal specimens were collected from 530 pregnant women at the time of antepartum, delivery or postpartum. Oral/anorectal specimens were collected from their newborns at the time of birth, day3, or day30. Each sample was tested by PCR and/or culture for GBS detection. The DNA for PCR was purified directly from the buffer that the swab specimens were suspended without enrichment cultivation. The antepartum prevalence of maternal GBS was 18.6% according to PCR, and 16.1% according to cultures. In 9.6% of cases, GBS results on PCR were inconsistent with antepartum and delivery. GBS was detected in 4.6% of neonate even from GBS negative mother. GBS positive neonate with negative mother suggests horizontal infection after birth. Our method is a direct detection without an enrichment cultivation, suggesting the possibility of point of care testing.

研究分野：周産期

キーワード：GBS感染症 周産期死亡 新生児B群溶血性レンサ球菌感染症 等温核酸増幅法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

GBS は常在菌でありながら感染で後遺症を残しやすいため、周産期領域では最も注意すべき感染症である。米国のユニバーサルスクリーニングに倣い、2008 年より実施された全妊婦に対する GBS 培養検査および陽性妊婦に対する分娩時予防的抗生剤投与 (administration of intrapartum antibiotic prophylaxis, 以下 IAP) は早発型 GBS の死亡率を改善した。しかしながら、産科医療補償制度原因分析委員会の報告では、妊娠中の GBS 検査陰性症例でも早発型、遅発型ともに脳性麻痺の発症があるだけでなく、遅発型発症は帝王切開症例でも認められる。これらの事実から、現行ガイドラインの問題点として以下の 3 項目が挙げられる。

(1) GBS 検出の偽陰性診断：GBS 感染症児の母体の約 6 割は GBS スクリーニング陰性であり、検査時期、検体採取部位、検出法が GBS 診断精度に寄与するといえる。現行の確定診断は培養検査に基づく。しかし妊娠中の GBS 保菌状態は一定せず、検査から 5 週間以内の陰性的中率は 95~98% であるのに対し、6 週間以上経過した場合は 81% に著しく低下する。理想的には分娩時の GBS 判定であるが、培養同定は数日以上時間を要し、実際には妊娠後期 35~37 週で培養検査が実施される。しかし、早産や同定結果確定前の分娩では GBS 保菌の有無が不明のまま予防的に IAP が実施される。また、検体採取は産道である膣内だけでなく、GBS の常在部位である腸管 (肛門) 内採取を併用することで検出率は 1.7 倍に上昇する。しかし肛門内採取は共存菌体が多く、GBS 選択培地を用いない通常培養では検出率は反対に低下する。また、培養に変わる方法として PCR 法が厚労省による新興・再興感染症研究事業 (砂川ら) によって確立された。しかし、1.5 時間程度を要するため、発症予防に有効とされる分娩 4 時間以上前からの IAP 開始においては迅速性に乏しい可能性もあり、実用化には課題点も多い。

(2) 予防的投与抗生剤に対する耐性の影響：GBS は遺伝子の変異の蓄積により薬剤耐性を獲得するとされる。現在 IAP の第一選択は Penicillin 系薬剤である。しかしアレルギー母体には第 2 選択として erythromycin や clindamycin が投与されるが、それぞれ 25%、15% に耐性を認めており、IAP 効果不十分により感染症を惹起している可能性も考えられる。

(3) 垂直感染以外の出生後の GBS 水平感染の可能性：遅発型の原因として母乳を介した水平伝播の可能性 (Asmaa ら、Clin Infect Dis. 2019) が示唆されるが、網羅的サーベイランスデータは少ない。発症数は出生当日と日齢 14~21 日目の 2 峰性のピークを呈し、それぞれ早発型、遅発型となる。現行の予防策は分娩時の垂直感染を予防し早発型に予防効果を呈したが、遅発型発症数は改善なく、分娩時の菌体移行は防いでもその後の水平感染の可能性が残る。この遅発型の感染経路は未だ明確に同定されておらず、医療従事者からの接触感染経路も含めて感染経路を同定することは、遅発型の発症予防、早期診断において重要となる。

以上の 3 項目に関して横断的に周産期サーベイランスを実施し、本邦における GBS 感染症の実態を解明することは、日本の GBS 保菌状況の特性に適合した予防法の確立において有益となる。また、未解明である母乳を介した水平伝播と遅発型発症の関連性を明らかとすることは、日本のみならず遅発型 GBS 感染症予防として世界的にも非常に重要な情報となりうる。

### 2. 研究の目的

2010 年の米国疾病管理予防センター (CDC) および 2015 年のヨーロッパコンセンサス会議において妊娠中の培養判定に代わり分娩時の GBS 判定が望ましいと提言された。迅速高精度かつ薬剤耐性評価も可能な GBS 検出法の確立を目指す本研究は、発症予防に寄与するだけでなく、不適切な IAP 実施を回避し、新生児の正常細菌叢への影響や抗菌剤耐性化のリスクを減少させる独

自性と創造性の高い研究である。PCR 法などの核酸増幅技術 (Nucleic acid amplification technology; NAAT)は、検体の単離から数時間以内で、検出遺伝子の特異性から高い感度・特異度で標的を検出し得る。申請者らは現在までに、研究協力施設である理化学研究所との共同研究において SmartAmp 法を用いた高感度検出系の開発を行ってきた。SmartAmp 法は 65°C の一定温度の加温によって増幅反応が進行する等温核酸増幅法であり、数時間を要する従来の PCR 法と比較すると検出までの時間が 15-30 分程度と非常に迅速である。スワブ検体であれば前処理過程も 5 分程度で可能であり迅速性が高い。本法は分娩直前の的確なタイミングで短時間に GBS を検出し得る迅速性も有する。

### 3. 研究の方法

(1) 培養法における GBS 検出率の評価：ガイドライン通りに採取した膣肛門採取スワブを用いて、培養同定と PCR 法による核酸増幅検出による検出率を比較する。検体採取時期は、妊娠 35～37 週時と分娩時（診療行為内での実施）、産褥 3 日目の時点における GBS の保有率の経時的な変動を明らかにする。

(2) GBS 水平感染経路の同定：出生した児より、咽頭、肛門内からスワブ検体を採取する。垂直感染後の GBS 定着時期、水平感染による感染成立時期を明らかにするため、出生直後、日齢 3 日目、日齢 30 日目で採取を行う。GBS の検出は NAAT とする。さらに、産褥婦から母乳を採取し母乳中菌体の有無、また新生児と接触のある医療スタッフの咽頭、皮膚スワブを採取し、出生後の水平感染の有無と感染時期を明らかにする。

(3) GBS 検出用 SmartAmp 法 primer の設計：GBS 検出には GBS 由来のヒスチジンキナーゼをコードする *dhps* 遺伝子を標的として primer を設計する。また同時に、莢膜を構成する多糖リピートユニット (PRUs) の相違で 10 種に分類される莢膜型を判別しえるプライマー設計を実施する。また、これらの基盤技術を Point of care testing に応用するため、培養による増菌工程なしで検出し得る、高精度な検出系を確立する。

### 4. 研究成果

倫理承認のもと同意取得した 530 組の妊婦 およびその児を対象とし、産前 36 週、分娩時、産後の母体膣直腸擦過検体を採取した。児の口腔/直腸擦過検体は、出生時、日齢 3 日目、日齢 30 日目に採取した (Figure.1)。各検体は、核酸検出および/または培養によって評価した。核酸増幅法に用いる核酸は、濃縮培養を実施することなく検体懸濁液から直接精製した。

母体の産前 GBS 保菌率は核酸検出で 18.6%、培養法による検出 16.1%であった。分娩時の培養法を Golden standard とした場合、産前の培養法による検出精度は、感度 45.5%、特異度 95.9%であった。これに対し、分娩時の核酸増幅による検出精度は、感度 90.9%、特異度 98.6%であり、分娩時の核酸検出法は産前の培養法よりも高い検出精度を示した (Figure.1)。

全症例の 10.7%は、産前と分娩時の GBS 検出結果が不一致となった。内訳として 7.6%は産前スクリーニング陰性で分娩時に陽性化しており、ガイドラインで推奨される予防的抗生剤投与が実施されない可能性が示唆された (Figure.1)。さらに GBS 陰性母体であっても、その新生児の 5.5%で GBS は検出され、GBS 陰性母体の新生児からの GBS の分離は、出生後の水平感染の可能性を示唆するといえる (Figure.1)。また GBS 陽性母体の 11.8%から、母乳から GBS が検出されており、経母乳感染の可能性も示唆される (Figure.1)。

さらに分離 GBS の莢膜型分布は母体と新生児で異なり、母体は V 型が最多、新生児は Ia 型が最多であった。したがって、母体からの GBS の移行性には、莢膜型ごとに異なることが示唆され

た。本研究で確立した新規核酸検出法は、濃縮培養工程を伴わず直接検出可能であり、GBS の正確な保菌評価としての分娩時のポイントオブケア検査として応用できる可能性がある。

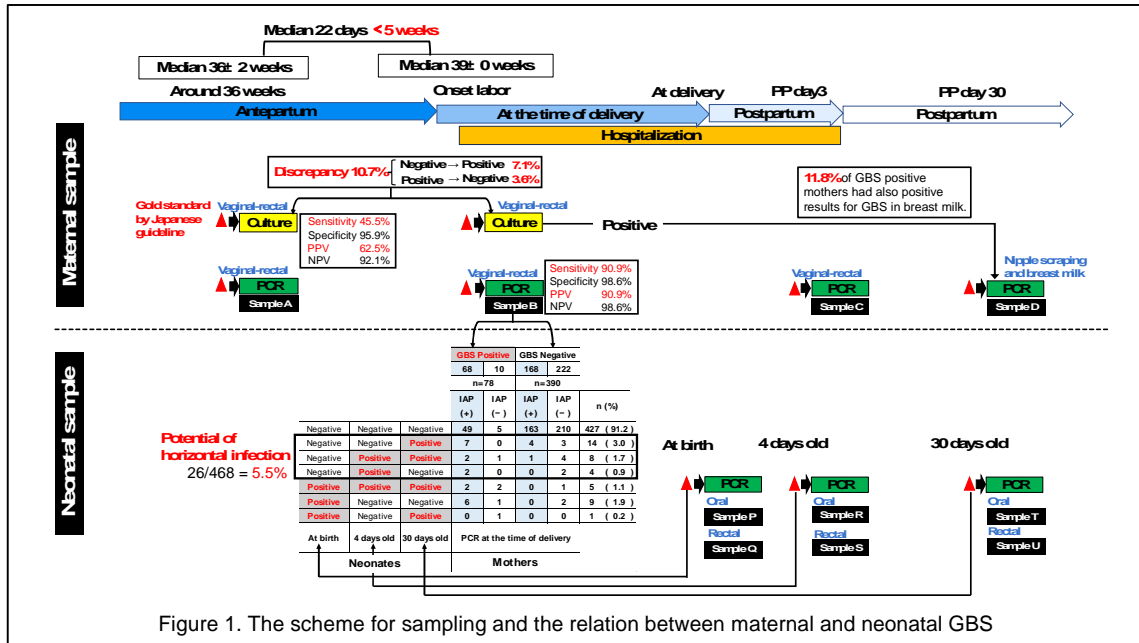


Figure 1. The scheme for sampling and the relation between maternal and neonatal GBS

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Emiko Yoshida, Jun Takeda, Yojiro Maruyama, Naoko Suga, Shintaro Makino, Atsuo Itakura
2. 発表標題 The exploration of late-onset disease infection route of Group B Streptococcus by polymerase chain reaction (PCR)
3. 学会等名 第76回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 吉田恵美子 板倉敦夫	4. 発行年 2024年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 120
3. 書名 周産期医学54巻5号（5月号）	

1. 著者名 牧野真太郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 439
3. 書名 産科と婦人科	

〔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	竹田 純  (Takeda Jun)  (60813459)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	吉田 恵美子  (Yoshida Emiko)  (90825788)	順天堂大学・産婦人科・特任准教授    (32620)	

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