

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870706

研究課題名(和文) 妊婦を対象としたGBSスクリーニング検査に用いる簡易迅速診断方法の確立

研究課題名(英文) Development of GBS rapid detection method for pregnant woman

研究代表者

松井 秀仁 (Matsui, Hidehito)

北里大学・生命科学研究所・研究員

研究者番号：80503797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Group B Streptococcus (GBS) は、重篤な新生児感染症を引き起こす原因菌である。妊婦に対して実施されるGBSスクリーニング検査は、主に培養法で行われるが、結果が得られるまで数日の時間を必要とする。そこで、本研究では、GBS迅速診断方法の確立を目的とした。本法は簡便な操作で、結果の判定も15分で可能となり、最小検出感度は、rSipで0.5 ng/ml、GBS菌体で 10^6 CFU/mlであった。他菌種に対する交差反応性も認められなかった。膣スワブ増菌培養サンプルからのGBS検出について、本法と培養法で比較した結果、感度、特異度はそれぞれ93.1%、99.6%であった。

研究成果の概要(英文)：Group B Streptococcus (GBS) is a leading cause of serious neonatal infections. CDC recommends GBS screening for all pregnant women. Although GBS screening has been performed mainly by the culture-based method, it takes several days to obtain a reliable result. In this study, we developed an immunochromatographic test (ICT) for the detection of GBS-specific surface immunogenic protein in 15 min from an overnight enrichment culture. This ICT was able to detect recombinant Sip levels 0.5 ng/ml, or about 10^6 CFU/ml of GBS cells. The cross reactivity test using 26 species of microorganism showed no detectable false positive result. The accuracy of the ICT for GBS detection from enrichment cultures of vaginal swabs was compared with culture-based method. From the results using 260 specimens, the sensitivity and specificity of the ICT appeared 93.1% and 99.6%, respectively. The newly developed ICT is readily applicable to clinical use in the detection of GBS.

研究分野：感染症学

キーワード：GBS 妊婦 迅速診断 抗体 B群溶血性連鎖球菌

1. 研究開始当初の背景

新生児の敗血症、髄膜炎などの重症感染症の原因菌として、*Streptococcus agalactiae* が挙げられる。*S. agalactiae* は、 β 溶血を示すグラム陽性レンサ球菌で、細胞壁多糖体の抗原性に基づく Lancefield の分類では B 群に分類されることから、Group B streptococcus (GBS, B 群レンサ球菌) とも呼ばれている。GBS はヒトの腔、腸管内に常在しているため、GBS 保菌の妊婦より、新生児に垂直感染を引き起こす場合がある。正常妊婦における腔・直腸の GBS 保菌率は 10~30% であり、保菌妊婦の 50% において新生児へ垂直感染することが知られている。さらにその内 1~2% が GBS 感染症を発症する。周産期及び新生児医療の進歩に伴い GBS 感染による死亡率は低下しているが、依然として早期産児においては高い死亡率を示しており、さらに回復した症例においても、知能発達障害や痙性四肢麻痺、難聴などの重篤な後遺症が残るケースが多い。

1996 年にアメリカ疾病予防管理センター (CDC) は、GBS スクリーニング検査に関するガイドラインを発表し、妊娠 35~37 週にスクリーニング検査を実施することを推奨している。GBS 検査陽性の場合には出産時にペニシリンなどの抗菌剤の予防投与を行うことにより感染発症を防ぐことが示され、その後の疫学調査によれば、アメリカにおける早発型 GBS 感染症の発症率は、1990 年代には出産 1000 件あたり 1.7 件発症していたが、近年では 0.34-0.37 件と劇的に発症件数が低下した。また、日本においても、2008 年出された産婦人科診療ガイドライン(日本産科婦人科学会、日本産婦人科医会)において、妊娠 33~37 週における GBS 検査の推奨が明記されている。

GBS 検査の方法としては、主に増菌培養法による検査が推奨されている。GBS 選択増菌培地を用いて、採取した腔スワブ検体を一晚培養後、血液寒天培地に分離し、さらに一晚培養する。 β 溶血を示す GBS 疑いのコロニーを分離し、生化学的性状検査、CAMP テスト、ラテックス凝集試験などにより GBS と同定する。しかし、GBS の指標となる β 溶血を示さない、非溶血性 GBS 株が 5% 前後存在することが知られており、通常の血液寒天培地による分離培養では、*Enterococcus* 属などの常在菌の混入によりこれらの株を見逃してしまう危険性も存在する。また、菌種同定までの数日の時間を必要とすることも欠点である。その為、分子生物学的手法を用いた検出系も開発されており、PCR 法や DNA プローブ法などは高い検出感度を有するが、コストの問題や操作の煩雑性から臨床現場での使用に適さない場合が多く、より迅速簡便な検査方法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、新生児に肺炎、敗血症や髄膜炎などの重篤な感染症を惹起する病原菌である GBS に対する簡易迅速診断方法を新たに確立し、妊婦を対象とした GBS スクリーニング検査への応用の可能性を評価、検討する。

3. 研究の方法

(1) GBS 特異抗原の調製

GBS 標的抗原として、菌体表層に発現が確認されている Surface immunogenic protein (Sip) を選択し、遺伝子をクローニング後、大腸菌による組み換えタンパク発現系を構築した。IPTG による発現誘導後、Ni イオンカラムで recombinant Sip (rSip) の精製を行った。また、Sip のアミノ酸配列より、抗原部位の予測を行い、合成ペプチドを作製した。合成ペプチドは、KLH と結合させ、免疫源とした。

(2) モノクローナル抗体の作製と評価

rSip 及び合成ペプチドコンジュゲートをマウスに免疫し、脾細胞とミエロマ細胞を融合させ、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。ハイブリドーマ投与マウスの腹水中より、Protein A カラムを用いて抗体の精製を行った。また、抗体のアイソタイプ及びサブクラスの設定は ELISA 法で実施した。精製したモノクローナル抗体の、GBS に対する特異性及び他菌種に対する交差反応性は Western blot 法で評価した。

(3) イムノクロマトの作製

精製した抗 Sip モノクローナル抗体をニトロセルロースメンブレン上に固相化し、テストラインとした。また、コントロールラインには、抗マウス IgG 抗体を固相化した。検出粒子として金コロイドを用いて、金コロイド標識抗 Sip モノクローナル抗体を作製した。吸収パッド、抗体固相化メンブレン、コンジュゲートパッドなどの部材を用いて、イムノクロマトのテストストリップを作製した。また、菌体からの標的抗原の簡易抽出方法について検討を行った。

(4) イムノクロマトの性能評価

作製したイムノクロマトの性能評価として、検出感度試験を rSip 及び血清型のことなる GBS 株を用いて実施した。交差反応性試験は、グラム陽性菌 18 菌種、グラム陰性菌 6 菌種、真菌 2 菌種を用いて実施した。また、*Streptococcus* 属の臨床分離株を用いて、イムノクロマト法の特異性の評価を行った。

(5) 臨床検体を用いた評価試験

腔スワブ検体を増菌培地で一晚培養後、酵素基質培地を用いた分離培養法と確立したイムノクロマト法による GBS の検出を比較検討した。分離菌株については、常法により菌種の同定を行った。

4. 研究成果

(1) rSip 及び合成ペプチド抗原の調製

構築した大腸菌発現系を用いて、IPTG による rSip のタンパク発現を誘導した。カラム

精製後の精製 rSip の SDS-PAGE 泳動結果を Fig.1(a)に、抗 His-tag 抗体を用いた Western blot による検出結果を Fig.1(b)に示す。IPTG 誘導により約 53kDa の位置にタンパクの発現が確認され(lane2)、精製画分では単一バンドが認められた(lane3)。また、抗 His-tag 抗体による検出結果においても、同じ位置にバンドが検出され、rSip が確認できた。

合成ペプチドは、アミノ酸配列解析の結果、N 末端にシステインを付加した CEVPAAKE EVKPTQTSVSQ(200-217)及び CNAVAAHPE NAGLQPHVAAAYKEKVA(313-336)を選択し、キャリアタンパクへ結合させた。

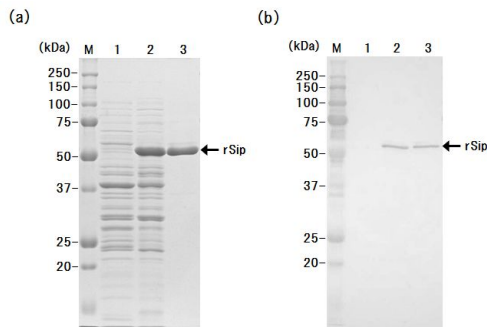


Fig.1 rSip の調製

(a) CBB 染色, (b)抗 His-tag 抗体検出
lane1 : 未誘導, lane : 誘導後, lane3 : 精製画分

(2)モノクローナル抗体の作製

rSip 及び 2 種の合成ペプチド抗原を用いて、モノクローナル抗体の作製を行った。それぞれの抗原に対するハイブリドマクローンを複数樹立し、多種のモノクローナル抗体を得た。rSip 抗原由来クローンの R6E8、ペプチド 200-217 抗原由来クローンの S4H5、ペプチド 313-336 抗原由来クローンの S6H8 について GBS に対する特異性及び他菌種に対する交差反応性を Western blot で評価した結果を Fig.2 に示す。3 種の抗体で、血清型が異なる

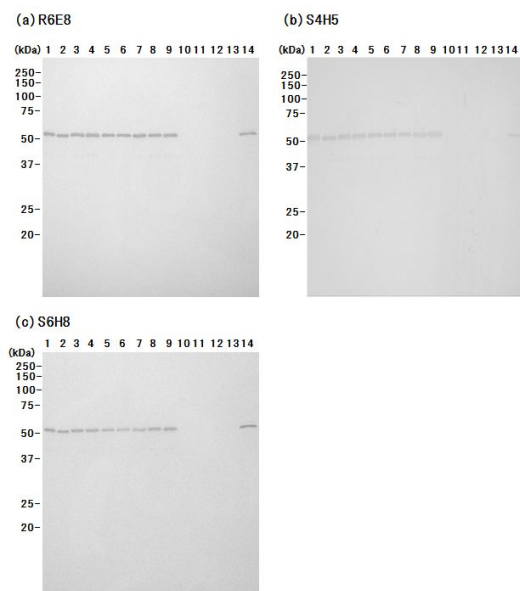


Fig.2 モノクローナル抗体の評価

lane1-9 : GBS, lane10-13 : 他菌種, lane14 : rSip

GBS 株すべてにおいて、53kDa の位置にバンドを検出した。他菌種に対して反応は認められず、イムノクロマト系確立に応用可能な特異性を有していることが確認された。

(3)イムノクロマトの確立と基礎的性能評価

作製したモノクローナル抗体を用いて、イムノクロマト法に最適な抗体の組み合わせを検討した結果、ニトロセルロースメンブレン上の固相化抗体には R6E8、金コロイド標識抗体には S6H8 を用いた系が最も感度、特異性に優れていた。確立したイムノクロマトの最小検出感度を評価した結果、rSip では 0.5 ng/ml であった(Fig.3)。また、血清型の異なる

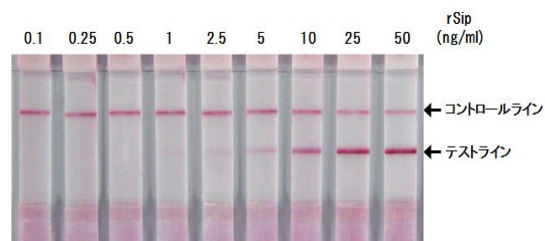


Fig.3. rSip による最小検出感度試験

9 株の GBS を用いて評価した結果、最小検出感度は $9.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^6$ CFU/ml であり、血清型間で有意な差は認められなかった。他菌種に対する交差反応性を評価した結果、26 菌種すべてに対し偽陽性反応は認められなかった。臨床分離株の GBS 229 株を用いて試験した結果、228 株はイムノクロマトで陽性を示したが、1 株(KUB968)のみ陰性を示した。この株の sip 遺伝子の塩基配列を解析した結果、651-654 番目の 4 塩基が欠損しており、フレームシフト変異を有していることが確認できた。そのため、232 残基で翻訳が終了し、C 末端側の約 200 残基が欠損していることが western blot の結果からも示された(Fig.4)。その他、Group A streptococcus, Group C streptococcus, Group G streptococcus を計 43 株用いて試験した結果、すべて陰性を示し、GBS 特異的な検出が可能であることが示された。

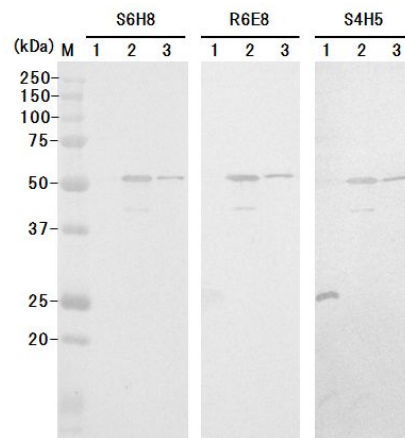


Fig.4. truncated Sip 産生株に対する抗体の反応性
Lane1: GBS KUB968, lane2: GBS ATCC BAA-611, lane3 : rSip

以上の結果より本法は、GBS 検出に使用可能な基礎的性能を有していることが確認された。

(4)スワブ検体増菌培養培地中 GBS 検出

260 検体の膣スワブを用いて、増菌培地からの GBS 検出を分離培養法と確立したイムノクロマト法で比較を行った(Fig.5)。分離培養法で GBS 陽性は 29 検体あり、その内 27 検体はイムノクロマト陽性、2 検体は陰性であった。分離培養法で陰性を示した 207 検体のうち、1 検体はイムノクロマトで陽性を示した。このイムノクロマト陽性検体については、PCR 法で精査を行った結果、GBS 陽性であることが判明した。以上の結果より、イムノクロマト法の感度、特異度、期待陽性率、期待陰性率はそれぞれ、93.1%、99.5%、96.4%、99.0%であった。

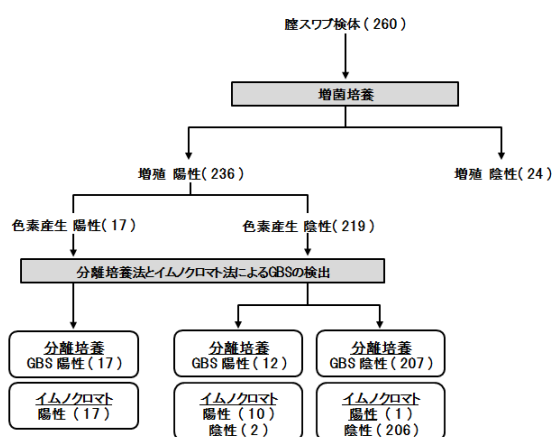


Fig.5. 膣スワブ増菌培養検体からの GBS 検出

(5)まとめ

本研究において、イムノクロマト法による GBS 簡易迅速診断方法を確立した。本法は、特別な機器を必要とせず、約 15 分で結果の判定が可能である。臨床検体を用いた評価試験においても、十分な検査精度有していることが示された。今後のさらなる検討を行い、臨床応用へ繋がるよう進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsui H, Kimura J, Higashide M, Takeuchi Y, Okue K, Cui L, Nakae T, Sunakawa K, Hanaki H. Immunochromatographic Detection of the Group B Streptococcus Antigen from Enrichment Cultures. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 20(9):1381-7. doi: 10.1128/CVI.00171-13. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Matsui H, Takeuchi Y, Okue K, Higashide M, Cui L, Nakae T, Hanaki H. Reliability of Newly Developed Immunochromatographic Test for the Detection of Group B Streptococcus in the Clinical Specimens. The 113th General Meeting American Society of Microbiology(ASM). Denver (USA). 2013/5/21

Matsui H, Takeuchi Y, Okue K, Higashide M, Cui L, Nakae T, Hanaki H. An Immunochromatographic Detection of the Group B Streptococcus Antigen from Enrichment Cultures. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC). パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2013/6/6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松井 秀仁 (MATSUI HIDEHITO)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：80503797