

学位論文要旨

氏名 松井 秀仁



論文題目

「B群溶血性連鎖球菌検出イムノクロマト法の確立と臨床応用」

指導教授承認印

北里 良郎



学位論文要旨

【背景と目的】 *Streptococcus agalactiae* (Group B streptococcus : GBS)は、膣や直腸内の常在菌であるが、出産時に新生児へ感染することにより髄膜炎や敗血症などの重篤な感染症の原因となる場合がある。その為、アメリカ疾病予防管理センターのガイドラインは、妊娠 35～37 週の妊婦を対象にした膣・直腸内の GBS スクリーニング検査を推奨しており、陽性の場合には出産時にペニシリンなどの予防投与が実施される。1990 年代、アメリカでは早期発症型 GBS 感染症の発症率が、1000 件の出産例に対して 1.7 件であったのに対し、上記ガイドラインが実施された後、その発症率が 0.34～0.37 件に減少した。

このガイドラインは、GBS 増菌培地(溶血性 GBS はオレンジに着色)を用いた培養検査を推奨しているが、非溶血性 GBS は着色を呈さない。その為、非溶血株の存在を確認する為に非着色で菌の増殖が認められる検体の全てに対して、分離培養及び菌種の同定作業が必要となる。

本研究では上記問題点を解決するために、溶血性や血清型の区別なく全ての GBS 株の菌体表層に特異的に発現している surface immunogenic protein (Sip)を標的抗原とし、イムノクロマト (ICT)による迅速診断方法の開発研究を行った。

【方法】sip 遺伝子を PCR 法で増幅し、大腸菌による recombinant Sip (rSip) 発現系を構築した。rSip 発現大腸菌の可溶性画分より約 53kDa の rSip を精製した。また、Sip のアミノ酸配列より抗原部位を予測し、アミノ酸配列 200～217 番目 (peptide200-217)と 313～336 番目 (peptide313-336)の 2 種のペプチドを調製した。上記の rSip と 2 種のペプチドを抗原として、マウスに免疫し、モノクローナル抗体(mAb)を作製した。

得られた mAb の特異性を western blot 法で評価し、特異性の確認された抗体を用いて ICT を構築した。確立した ICT の最小検出感度を、rSip と血清型の異なる 9 株の GBS を用いて評価した。交差反応性については、 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml に調製した他菌種 26 株を用いて評価した。また、臨床分離 GBS 229 株を用いて、本法の GBS に対する反応性を評価し、更に、膣スワブ 260 検体

を用いて、臨床応用への有用性を評価した。

まず、増菌培地(GBS 培地 F)で膿スワブを 35°Cで 24~48 時間の培養を行った。菌の発育が認められた検体については、酵素基質培地(Chrom-ID StreptoB)による分離培養を行うと同時に ICT による検出を行った。偽陽性を示した検体は PCR 法で精査を行った。

【結果】 rSip, peptide200-217, peptide313-336 を抗原として 3 種の mAb を得た。抗体の特異性を western blot で評価した結果、rSip と peptide200-217 の mAb は、Ia, Ib, II~VIII の血清型を有するすべての GBS で約 53kDa の単一バンドを検出し、他菌種に対する反応は認められなかった。ICT に最適な抗体の組み合わせを検討した結果、メンブレン固相化抗体には rSip の抗体、金コロイド標識抗体には peptide200-217 の抗体を用いた測定系の感度が最も優れていた。

確立した ICT を用いた評価では、最小検出感度は rSip で 0.5ng/ml, 血清型の異なる 9 種の GBS 菌体で $9.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^6$ CFU/ml であった。また、26 菌種に対する交差反応性は認められなかった。229 株の臨床分離 GBS を用いて評価した結果、228 株で陽性を示したが 1 株は陰性であった。陰性を示した GBS 株の *sip* 遺伝子をシーケンス解析した結果、4 塩基の欠損が認められ、truncated Sip を産生していることが確認された。さらに、膿スワブ 260 検体を用いて、増菌培地からの GBS 検出率を培養法と ICT で比較した。236 検体が増菌培地で菌の増殖が認められ、そのうち両法で陽性を示した検体は 27 検体、陰性を示した検体は 206 検体であった。乖離した結果は 3 検体で認められ、ICT で偽陰性を示した 2 検体は増菌培地中の GBS が検出感度以下の菌数であった。また、偽陽性を示した 1 検体は、PCR 法で GBS 陽性であることが確認された。

【結論】 本研究で開発した ICT は、操作方法が簡便で増菌培地から 15 分で GBS を検出できる手法であり、培養法と比較した感度及び特異度は 93.1%、99.5%と臨床応用に充分適応できると考えられた。本手法を用いれば、ガイドラインで指定されている増菌培養後の分離培養や同定検査に要する日数を短縮し、かつ、それらにかかる費用を軽減できる有用な検出法であると考えられた。