

学位論文

「B群溶血性連鎖球菌検出免疫クロマト法の確立と臨床応用」

指導教授名 北里 英郎

申請者氏名 松井 秀仁

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

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 53 kDa 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 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 の検出限界を、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)で膣スワブを 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、3 種すべての mAb は、Ia, Ib, II~VIII の血清型を有するすべての GBS で約 53 kDa 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 Peptide313-336 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、検出限界は rSip で 0.5 ng/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、膣スワブ 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 が検出限界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。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. Recombinant Sip 発現系の構築 -----	5
2-2. Recombinant Sip の精製と確認 -----	6
2-3. 合成ペプチドの設計と免疫抗原の作製 -----	7
2-4. モノクローナル抗体の作製 -----	7
2-5. モノクローナル抗体の評価	
2-5-1. Enzyme-linked immunosorbent assay による評価 -----	8
2-5-2. Western blot による評価 -----	9
2-6. イムノクロマトの構築 -----	10
2-7. イムノクロマトの性能評価	
2-7-1. 検出限界試験 -----	11
2-7-2. 他菌種に対する交差反応性試験 -----	12
2-7-3. 臨床分離株に対する反応性の評価 -----	13
2-8. <i>sip</i> 遺伝子のシーケンス解析 -----	13
2-9. 膿スワブ検体を用いたイムノクロマトの評価 -----	14
3. 結果	
3-1. Recombinant Sip の作製 -----	15
3-2. 合成ペプチド抗原の設計 -----	16
3-3. 抗 Sip モノクローナル抗体の作製 -----	17
3-4. 抗 Sip モノクローナル抗体の評価 -----	17
3-5. イムノクロマトの構築 -----	18
3-6. イムノクロマトの基礎的性能の評価 -----	19
3-7. 既同定済み臨床分離 GBS に対するイムノクロマトの反応性の評価 ----	20
3-8. 臨床検体を用いたイムノクロマトの評価 -----	21
4. 考察 -----	23
5. 総括 -----	29
6. 今後の課題 -----	30

7. 謝辞	-----	31
8. 引用文献	-----	32
9. 業績目録	-----	37
10. 図表	-----	41

1. 序論

ベータ(β)溶血性を示すグラム陽性レンサ球菌 *Streptococcus agalactiae* は Lancefield による細胞壁 C 多糖体の抗原性に基づく分類から、B 群溶血性連鎖球菌(Group B *Streptococcus*; GBS)とされている¹⁾。この GBS は、健常女性の膣や腸管に生息する常在菌の一種であるが、新生児や乳児の敗血症あるいは化膿性髄膜炎など重症感染症の主要な原因菌としても知られている。さらに、高齢者など免疫力の低下した易感染者に対しても、肺炎や侵襲性感染症を引き起こすことから問題視されている。

健常妊婦の 10～30%は膣内に GBS を保菌しているが、多くの場合 GBS 保菌妊婦は無症候で経過している²⁻⁴⁾。しかし、そのような保菌妊婦では絨毛膜羊膜炎による前期破水や早産の危険性もあり、また、上行性に子宮内感染を引き起こす例もある。さらに、分娩後は子宮内膜炎や子宮筋層炎の原因となることが報告されている。このような保菌妊婦から新生児への GBS 感染は約 50%の分娩例で見出され、そのうち 1～3%の症例で肺炎、敗血症、髄膜炎など重症感染症に発展するとされている^{5,6)}。これら新生児 GBS 感染症は、生後 6 日以内に発症する早発型と、7 日以降に発症する遅発型に分類され、早発型は産道感染、遅発型は水平感染による伝播が主な原因となっている。新生児 GBS 感染症の発症率は高いとは言えないが、死亡に至る例や精神発達遅延、痙性四肢麻痺、盲目、難聴など重症な神経学的後遺症が残り予後不良となるケースが多い⁷⁻⁹⁾。特に早産児での GBS 感染症発症例における死亡率は約 20%、さらに妊娠 33 週以下の出産では 30%と正期産での 2～3%と比較して著しく高い¹⁰⁻¹³⁾。

このように GBS 感染児は死亡率や後遺症率が高いことから、新生児 GBS 感

感染症発症の予防対策が重要である。アメリカでは新生児 GBS 感染症に対するガイドラインが、1996 年に Centers for Disease Control and Prevention (CDC) より発表され¹⁴⁾、その後 2002 年と 2010 年に改訂された^{15, 16)}。ガイドラインでは妊娠 35～37 週の全妊婦を対象として膣及び直腸の GBS スクリーニング検査を実施するよう奨めている(Fig. 1)¹⁶⁾。スクリーニング検査により、GBS 陽性と判定された妊婦に対しては、分娩時に抗菌薬の予防投与(Intrapartum Antibiotic Prophylaxis : IAP)が行われる。また、陰性であっても前回出生児が GBS 感染症を発症した妊婦の場合や、妊娠時 GBS 細菌尿が陽性の妊婦にも予防投与の対象となる。さらに、GBS の保菌状態が不明で、かつ妊娠 37 週未満の早産、破水後 18 時間以上経過しても分娩が完了しない場合、分娩時 38°C 以上の発熱がある場合のいずれかの症状がある場合にも予防投与が行われる。投与する抗菌薬の第一選択剤はペニシリンあるいはアンピシリンであるが、ペニシリンアレルギーを有する妊婦の場合、アナフィラキシーに対するリスクが低ければセファゾリンを、リスクが高ければクリンダマイシンを投与するとしている。しかし、分離された GBS がエリスロマイシンやクリンダマイシンに耐性、あるいは感受性測定結果不明の場合は、バンコマイシンを投与する。これらガイドラインによる GBS スクリーニング検査と抗菌薬の予防投与が行われるようになり、米国では早発型 GBS 感染症の発症率は、1990 年代には出生 1000 例あたり 1.7 であったが、2000 年代に入ると 0.34～0.37 に減少した¹⁶⁾。また、日本においても、産婦人科診療ガイドライン—産科編 2011 で、GBS 保菌診断は推奨レベル B として記載されており、妊娠 33～37 週の培養検査結果に基づき、ペニシリン系薬剤静注による母子感染予防が実施されている。

CDC ガイドラインによると GBS スクリーニング検査は、増菌培養法で実施するよう示されている(Fig. 1)。この方法では、膣および肛門周囲より採取した検体をコリスチンとナリジクス酸を含有した Lim broth などの選択液体培地で一夜培養後、血液寒天培地で分離培養を行う。分離されたコロニーはさらに、β溶血性やカタラーゼ試験、Christie, Atkins and Munch-Petersen (CAMP) test、ラテックス凝集試験など常法に従い GBS の同定試験を実施する。また、増菌培養で、溶血性 GBS による特異的な色素産生を検出する Granada broth を用いることで、色素産生が認められた場合 GBS 陽性と報告することも可能である(Fig. 2)。しかし、GBS と同定された臨床分離株の中には色素産生能を有さない非溶血株が 1~5%存在することから¹⁶⁻¹⁸⁾、色素産生陰性の検体についても、同様に分離培養による確認が必須となる(Fig.2)。このように培養法による GBS の同定には、結果が得られるのに最低数日は必要であること、また熟練した技術や知識を有する臨床検査技師などの専門家も必要である。さらに、培養法による同定では非溶血株を見逃す危険性もあることから、PCR 法^{19, 20)}や DNA プローブ²¹⁾を用いた方法が報告されているが、これらの方法を実施するには特定の機器が必要でありまた熟練した技術者も必要である。その為、迅速で簡便に GBS 検出を可能とする方法の確立が望まれている。

感染症の迅速診断方法として、近年、イムノクロマト法を用いた検査キットの開発が進められている。従来から用いられてきた抗原抗体反応に基づく免疫学的手法による検査方法としては、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法やラテックス凝集法などが挙げられる。ELISA 法は、検出感度が高く有用であるが、結果が得られるまで最低でも数時間を必要とする。また、ラ

ラテックス凝集法は、操作の簡便性や迅速性は優れているものの、検出感度が低いという欠点がある。イムノクロマト法は、ラテックス凝集法に比べ優れた感度を示し、操作の簡便性と 10～20 分の短時間に結果が得られる迅速性を有している為、Point of care testing(POCT)の一つとして用いられている。イムノクロマト法の原理を Fig.3 に示すが、抗原抗体反応の高い特異性や親和性と、クロマトグラフィーの分離原理を融合させた方法である。

そこで、本研究では、様々な感染症の迅速診断方法として広く用いられているイムノクロマト法に着目し、GBS 菌体表層に普遍的に発現している Surface immunogenic protein (Sip)²²⁾を標的抗原とした GBS 検出イムノクロマトを確立することを目的とした。

2. 方法

2-1. Recombinant Sip 発現系の構築

S. agalactiae KUB791 株より DNeasy Blood & Tissue kit(QIAGEN, Duesseldorf, Germany)を用いて、添付文書に従って DNA を抽出した。抽出された DNA 溶液 5 μ l(90 ng)をテンプレートとして、Prime Star HS DNA polymerase(タカラバイオ, 滋賀, 日本)を用いて *sip* 遺伝子を標的とした PCR 反応を行った。使用したプライマーの配列は Table 1 に示した。反応条件は、98°C で 30 秒間の初期変性ステップに続き、変性、アニーリング及び伸長反応を各々に 98°C で 10 秒, 55°C で 5 秒, 72°C で 120 秒間行い、これを 26 サイクル繰り返した。最後に 72°C で 5 分間の最終伸長反応を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲルを用いて、100 V, 30 分間電気泳動後、Gel Red 染色液(Biotim Hayward, CA, USA)で 30 分間染色し、紫外線照射下に確認した。

得られたPCR産物と pETBlue2 (Novagen, MA, USA)を制限酵素NcoI及び XhoIで処理した。続いて、DNA Ligation kit <Mighty Mix>(タカラバイオ)を用いてライゲーション反応を行い、得られたベクターを熱ショック法で *E. coli* strain NovaBlue(DE3) (Novagen)に導入し、50 μ g/ml カルベニシリン, 12.5 μ g/ml テトラサイクリン, 80 μ M IPTG, 70 μ g/ml x-Gal含有LB寒天培地を用いてブルーホワイトセレクションにより形質転換体を選択した。得られた形質転換体より、Miniprep kit (QIAGEN)を用いてpETBlue2-sipベクターを精製し、タンパク発現用の宿主である *E. coli* strain Tuner(DE3)/pLacI (Novagen)へ同様の方法で導入した。形質転換体の選択は、50 μ g/ml カルベニシリン, 34 μ g/ml クロラムフェニコール含有LB寒天培地を用いて実施した。

2-2. Recombinant Sip の精製と確認

2-1 で構築した pETBlue2-sip ベクター保有 Tuner(DE3)/pLacI を 50 µg/ml カルベニシリン, 34 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB broth に移植し、37°C で震盪培養した。578 nm における吸光度が 0.5 に達した時点で 0.5 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、さらに Recombinant Sip (rSip) 発現を誘導する目的で 37°C 2 時間震盪培養を続けた。培養液を 4°C で 5000×g, 20 分間遠心することにより集菌した。沈査を 0.3 M NaCl, 10 mM イミダゾール含有 50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH8.0) に懸濁し、超音波破処理(20 秒照射, 30 秒冷却で合計 10 分間照射)を行った。この試料を 4°C で 8000×g, 20 分間遠心し、得られた可溶性画分を Ni-IMAC Profinity (Bio-rad, CA, USA) カラムに掛け添付文章に従い、0.3 M NaCl, 500 mM イミダゾール含有 50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH8.0) で溶出した。カラム溶出液は 0.3 M NaCl 含有 50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH8.0) に対して 4°C で一夜透析を行った。タンパク濃度は、Bovine serum albumin (BSA) を標準とし、Modified Lowry protein Assay kit (PIERCE, IL, USA) を用いて定量した。

rSip の確認は、12% アクリルアミドゲルを用いた電気泳動(SDS-PAGE)を行い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色による検出と抗 Penta-Histidine antibody (QIAGEN) を用いた Western blot で行った。Western blot による rSip の検出はカラム溶出液を SDS-PAGE 電気泳動を行った後、タンパクを Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロッティングし、4% block ace, 0.1% Tween20 含有 PBS を用いて 1 時間ブロッキング処理を行った。続いて 100 ng/ml Penta Histidine antibody で 1 時間処理した後、さらに 1000 倍希釈 Horse

radish peroxidase (HRP)標識抗マウス Ig(ダコ・ジャパン株式会社, 東京, 日本)で1時間処理した。発色反応は、TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD, USA)を用いて行った。

2-3.合成ペプチドの設計と免疫抗原の作製

Streptococcus agalactiae 2603V/R 株の Sip アミノ酸配列(ACCESSION NP_687068)をもとに、Kyte & Doolittle の疎水性指標²³⁾と Welling の抗原性指標²⁴⁾の解析を Swiss Institute of Bioinformatics(SIB)の Web サイト (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)で行った。得られたデータより抗原部位の予測を行い、ペプチドを合成した(合成は株式会社バイオロジカ〈名古屋, 日本〉に依頼)。合成ペプチドの末端に付加したシステインのチオール基とキャリアタンパクである Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (SIGMA-ALDRICH Japan, 東京, 日本)のアミノ基を *N*-(6-Maleimido-caproyloxy)-succinimide (EMCS) (同仁化学, 熊本, 日本)を用いて結合させ、合成ペプチド-KLH 結合体を調製した。

2-4. モノクローナル抗体の作製

最初に 50 µg の rSip あるいは合成ペプチド-KLH 結合体(合成ペプチド含量で 50 µg 相当)をフロイント完全アジュバント(Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)と等量混合し、エマルジョン化した抗原 0.5ml を 8 週齢の Balb/c Cr Slc 雌マウス(日本エスエルシー株式会社, 静岡, 日本)の腹腔内に接種した。その後、第 14 日目にフロイント不完全アジュバント(Becton, Dickinson and Company)を用いて同様に調製した追加免疫抗原 50 µg を腹腔内に接種した。第

28 日目に 0.5 mg/ml の rSip あるいは合成ペプチド-KLH 結合体 0.1ml を尾静脈から接種し最終免疫とした。

ハイブリドーマは常法に従って作製した^{25, 26}。最終免疫より 3 日後にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を調製した。ミエローマ細胞 P3X64-Ag8.653 と得られた脾細胞をポリエチレングリコール 1500 (Roche Diagnostics Japan, 東京, 日本)を用いて融合させ、HAT 培地でハイブリドーマの選択培養を行った。培養上清中の抗 Sip モノクローナル抗体は、後述する ELISA 法を用いてスクリーニングを行った。抗 Sip モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、限界希釈法を 3 回繰り返すことにより、細胞のクローン化を行った。

樹立したハイブリドーマをプリスタン処理されたマウスに投与し、モノクローナル抗体含有腹水を得た。12 週齢の BALB/c Cr Slc 雄マウス(日本エスエルシー株式会社)に、0.5 ml のプリスタンを第 1 日目及び 7 日目に腹腔内接種した。第 10 日目に 1.0×10^7 cell/ml のハイブリドーマ懸濁液を腹腔内に 0.5 ml 接種し、第 20~30 日目の間に腹水の貯留が確認された時点で腹水を回収した。得られた腹水を Hitrap ProteinA HP カラム(GE Healthcare Japan, 東京, 日本)にかけ添付文書に従って溶出して IgG を精製した。また、IgM は、KAPTIVE-M (Tecnogen S.p.A., Piana di Monte Verna, Italy)を用いて添付文書に従って精製した。

2-5. モノクローナル抗体の評価

2-5-1. Enzyme-linked immunosorbent assay による評価

rSip を 10 mM 炭酸ナトリウム buffer (pH9.3)で 0.5 µg/ml に調整し、これをマイクロタイタープレート(Corning, NY, USA)に 4°C で一夜固相化し、翌日

0.5% BSA 含有 10 mM 炭酸ナトリウム buffer (pH9.3)中で室温 1 時間ブロッキング処理を行った。抗 Sip モノクローナル抗体を 1.4 ng/ml~1000 ng/ml になるよう 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% TritonX-100, 1% BSA (pH7.0)溶液を用いて 3 倍連続希釈系列を調製した。これを上記マイクロタ イタープレートに添加し室温で 1 時間反応させた。続いて、5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス Ig(ダコ・ジャパン株式会社)を添加して室温で 1 時間反応させた後、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories)添加して 10 分間発色反応を行った。1.0 M リン酸で反応停止後、プレートリーダー-EL808 (Biotek Instruments, VT, USA)で 450 nm における吸光度を測定した。

2-5-2. Western blot による評価

S. agalactiae で血清型の異なる KUB159(血清型 Ia), KUB174(血清型 Ib), KUB161(血清型 II), ATCC12403(血清型 III), ATCC49446(血清型 IV), ATCC BAA-611(血清型 V), KUB171(血清型 VI), KUB166(血清型 VII), KUB178(血清型 VIII)の 9 株を試験菌株として用いた。その他の *Streptococcus* 属の菌株として、*Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *Streptococcus pyogenes* (Group A streptococcus) ATCC12344, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Group C streptococcus) KUB794, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Group G streptococcus) ATCC12394 を試験菌株として用いた。試験菌株を、5%ヒツジ血液寒天培地に塗布し、35°C で一夜培養した。得られた湿菌体 40 mg を 1 ml の 0.125 M Tris-HCl (pH6.8), 5% 2-メルカプトエタノール, 2% SDS, 5% グリセロール, 0.02% ブロモフェノールブルー溶液に懸濁し、

100°C で 5 分間加熱処理した。その後、4°C で 12,000 rpm, 10 分間遠心し、得られた上清を泳動用サンプルとした。12%アクリルアミドゲルを用いて、泳動用サンプル 2 μ l/lane を電気泳動した後、PVDF 膜にタンパクをブロッティングした。続いて、2% BSA, 0.1% Tween20 含有 PBS で 4°C, 一夜ブロッキング処理を行った。翌日、100 ng/ml 抗 Sip モノクローナル抗体で 1 時間、室温で反応させた後、10,000 倍希釈した HRP 標識抗マウス Ig で 1 時間、室温で反応させた。発色反応は、TMB Membrane Peroxidase Substrate System を用いて行った。

2-6. イムノクロマトの構築

HiFlow180 のニトロセルロースメンブレン (ミリポア) 25 mm×190 mm を横長に置き、1 mg/ml の抗 Sip モノクローナル抗体を下端より 10 mm の位置に 2 μ l/10 mm の条件で定量塗布装置 Linomat5 (CAMAG, Muttenz, Switzerland) を用いて直線状に塗布し、これをテストラインとした。また、下端より 15 mm の位置に 2 μ l/10 mm の条件で 0.05 mg/ml の抗マウス IgG 抗体(VECTOR Laboratories, CA, USA)を同様に直線状に塗布し、これをコントロールラインとした。メンブレンを室温で 1 時間乾燥後、0.5%カゼイン含有 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH7.8)に浸し、室温で 20 分間穏やかに振とうすることでブロッキング処理を行った。精製水で洗浄後、3% スクロース水溶液に浸し、室温で 20 分間穏やかに振とうした。室温で、一夜乾燥し、抗体固相化メンブレンとした。

粒径 40 nm の金コロイド溶液(田中貴金属工業, 東京, 日本) 1800 μ l に 200 μ l の 0.2 M MOPS buffer (pH8.0)を添加した後、200 μ l の 60 μ g/ml 抗 Sip モノク

ローナル抗体を混合し、室温で 20 分間反応させた。続いて 550 μ l の 5%カゼインナトリウム含有 20 mM MOPS (pH8.0)を添加し、室温で 20 分間ブロッキング処理を行った。これを 4°C で 12,000 rpm, 10 分間, 4 回遠心分離洗浄した後、沈査を 2 ml の 0.1%カゼインナトリウム, 10%トレハロース二水和物含有 10 mM Tris-HCl (pH8.2)に再浮遊させて金コロイド標識抗体を回収した。530 nm の吸光度が 2.5 となるように金コロイド標識抗体を調整し、その溶液 1.2ml を 10 mm \times 190 mm のグラスファイバー(ミリポア)に均一に染み込ませて、室温減圧下で一夜乾燥することでコンジュゲートパッドとした。

吸収パッド(ミリポア), サンプルパッド(ミリポア)及び作製した抗体固相化メンブレン, コンジュゲートパッドをバックグシート(Adhesives Research, Inc., PA, USA)上で Fig.4 に示した様に重ね合わせた後、クリアフィルム(Adhesives Research, Inc.)を上面に張り合わせた。作製したシート状のメンブレンを、5 mm 幅に切断し、テストストリップとした。

2-7. イムノクロマトの性能評価

2-7-1.検出限界試験

イムノクロマトの検出限界試験は、rSip と GBS 全菌体を用いて行った。まず、rSip の検出感度の評価では、タンパク濃度が明らかな rSip 溶液を希釈液(0.02% TritonX-100 含有 0.5 M NaOH と 0.02% TritonX-100, 0.15 M HCl 含有 0.6 M TES の等量混合溶液)を用いて、1~50 ng/ml になるよう調製した。それら各 rSip 希釈液 500 μ l にテストストリップを立て、イムノクロマトを 10 分間展開した。結果は目視にて判定し、コントロールライン及びテストライン上に赤い発色ラインが認められた場合を陽性とした(Fig. 5a)。また、コントロールライン上への

み赤い発色ラインが認められ、テストライン上に発色が認められない場合を陰性とした(Fig. 5b)。テストライン上にのみ赤色ラインが認められ、コントロールライン上に赤色ラインが認められない場合は判定保留として、再度試験することとした。テストライン及びコントロールライン上に赤色ラインが認められない場合も同様に判定保留とし再試験に供した。

菌体を用いた評価では、Table 3 に示した血清型の異なる 9 株の GBS を 5% ヒツジ血液寒天培地で一夜培養後、菌体を生理食塩水に懸濁し、約 10^9 CFU/ml に調製した。調製した菌液は、コロニーカウントにより生菌数の計測を行った。菌液の 2 倍希釈系列を作製し、菌液 25 μ l を 250 μ l の 0.02% TritonX-100 含有 0.5 M NaOH に混合し、室温で 3 分間抗原抽出処理を行った。続いて、250 μ l の 0.02% TritonX-100, 0.15 M HCl 含有 0.6 M TES を加えることで中和を行った。得られた菌体抽出サンプルにテストストリップを挿入し、10 分間展開後、前述と同様の要領で結果の判定を行った。

2-7-2. 他菌種に対する交差反応性試験

Table 4 に示したグラム陽性菌 18 菌種、グラム陰性菌 6 菌種、真菌 2 菌種の合計 26 菌種を用いて交差反応性試験を行った。試験菌株を 5% ヒツジ血液寒天培地で一夜培養後、細菌細胞は約 10^{10} CFU/ml に、真菌細胞は約 10^9 CFU/ml になるよう菌液を調製し、検出感度試験と同様の方法で評価を行った。試験菌株の菌体抽出サンプルの最終菌体濃度は、細菌を 10^9 CFU/ml、真菌を 10^8 CFU/ml とした。

2-7-3. 臨床分離株に対する反応性の評価

研究室に保存されていた GBS と同定ずみの臨床分離株 226 株を試験菌株とした。試験菌株を Todd-Hewitt broth(Becton, Dickinson and Company)で 35°C, 一夜培養した培養液 100 µl をサンプルとして、250 µl の 0.02% TritonX-100 含有 0.5 M NaOH に混合し、室温で 3 分間抗原抽出処理を行った。以降の処理は検出感度試験と同様の方法で行った。

2-8. *sip* 遺伝子のシーケンス解析

臨床分離 GBS 株 KUB968 を 5%ヒツジ血液寒天培地で 35°C, 一夜培養して得られたコロニーを 100 µl の 1×TE buffer に懸濁した。100°C で 5 分間加熱後、100 µl のフェノール/クロロホルム溶液を添加して混合後、4°C で 12,000 rpm, 5 分間遠心、得られた上清を鋳型 DNA 溶液とした。鋳型 DNA 溶液 2 µl を Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて PCR 反応を行った。使用したプライマーの配列は Table 1 に示した。反応条件は、98°C で 30 秒間の初期変性ステップに続き、98°C で 5 秒, 63°C で 10 秒, 72°C で 30 秒間のプログラムを 30 サイクル繰り返した後、72°C で 5 分間の最終伸長反応を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲルを用い 100V, 30 分間電気泳動後、Gel Red 染色液で 30 分間染色し、紫外線照射下で確認した。得られた PCR 産物は、ExoSAP-IT(Affymetrix, Inc., CA, USA)を用いて 37°C で 20 分の酵素処理に続き、80°C で 20 分の不活化処理を行い、プライマー除去と dNTP を不活性化した。これをシーケンス用鋳型とし、Table 1 に示したプライマーを用いてシーケンス解析を行った(解析はオペロンバイオテクノロジー 株式会社〈東京, 日本〉に依頼)。

2-9. 臍スワブ検体を用いたイムノクロマトの評価

臍スワブ 260 検体を、GBS 増菌培地 F(富士製薬工業株式会社, 東京, 日本) で 35°C, 24 時間増菌培養した。菌の増殖が認められない検体については、さらに一夜培養を続行した。48 時間培養後、目視で菌の増殖が確認されなかった検体は、増菌培養陰性と判断した。増菌培養陽性検体の中でオレンジ~赤色の色素を産生する株を溶血性 GBS と判定した。色素産生の有無にかかわらず全ての増菌培養陽性検体は分離培養法とイムノクロマト法で GBS の検出を行った。分離培養法では、GBS の酵素基質培地である Chrom-ID StreptoB(シスメックス・バイオメリュー株式会社, 東京, 日本)に増菌培地より白金耳でサンプリングして画線培養した。35°C で 24~48 時間培養後、分離されたコロニーは常法に従って菌種の同定を行った(参考文献)。GBS が疑われるコロニーについては、セロアイデンストレプトキット'栄研'(栄研化学株式会社, 東京, 日本)を用いたラテックス凝集検査法で同定した。またこれらの菌株は GBS 特異的な *dltS* 遺伝子を標的とした PCR 法で同定を行った。イムノクロマト法では、増菌培養を行った臍スワブを回収し、これを 250 µl の 0.02% TritonX-100 含有 0.5 M NaOH に懸濁して室温で 3 分間抗原抽出を行った。続いて 250 µl の 0.02% TritonX-100, 0.15 M HCl 含有 0.6 M TES を添加後スワブは除去した。得られた検体抽出サンプルにテストストリップ挿入し、10 分間イムノクロマトを展開し、結果は目視で判定した。イムノクロマト法で偽陰性を示した検体については、検体輸送容器よりサンプリングを行い、DNA 抽出後、*dltS* 遺伝子を標的とした PCR による GBS 検出を行った²⁷⁾。

3. 結果

3-1. Recombinant Sip の作製

GBS の Sip 抗原を検出するイムノクロマトの構築には、異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクローナル抗体が必要である。その一つは高度に精製された全 Sip タンパクを抗原としてモノクローナル抗体を作製するよう計画した。そのためには *sip* 遺伝子を高発現ベクターに組み込んだタンパク発現系を構築しなければならない。本実験では Sip タンパクをコードする *sip* 遺伝子を PCR 反応で増幅し、得られる *sip* DNA をラクトースプロモーター及び 6×ヒスチジンをコードするベクターに連結する必要がある。云うまでもないことであるがラクトースオペロンは Sip タンパクの高発現調節因子として、また 6×ヒスチジンは後の Sip タンパク質精製を容易にするための標識タグである。またもう一つの抗体は Sip タンパクのアミノ酸配列を基に合成ペプチドを調製し、これを抗原とすることにした(後述)。

S. agalactiae KUB791 株より全 DNA を抽出しこれをテンプレートとし、Table 1 に示すプライマーを用いて PCR 法により DNA の増幅を行った。増幅産物を 1%アガロースゲルでに掛け解析を行ったところ、約 1300 bp に相当する位置に単一バンドが確認された(Fig.6, lane 2)。このバンドのサイズは予想される PCR 増幅産物 1316 bp とほぼ一致していた。従ってこの産物は目的の *sip* 遺伝子の増幅産物であると推定した。得られた *sip* 遺伝子増幅産物を制限酵素 NcoI 及び XhoI で処理し、同様に処理された pETBlue2 ベクターとライゲーション反応を行った。この反応産物を大腸菌 Tuner(DE3)pLacI 細胞に熱ショック法により形質転換し、rSip 発現系を構築した。

得られた形質転換体は IPTG の存在下に培養することによって Sip タンパクを誘導発現した。得られた菌体を破砕し粗可溶性画分を得た。これをニッケルレジン・アフィニティークロマトで精製し、溶出画分を得た。溶出画分を SDS-PAGE で分析した結果、約 53 kDa の位置に CBB で染色された単一のバンドが確認された(Fig.7a, lane 3)。さらにこのバンドが rSip であるかどうかを確認するため C 末端に付加した 6×ヒスチジンタグに対する特異抗体を用いて Western blot を行った。その結果、IPTG 誘導可溶性画分及びアフィニティー精製画分で各々に約 53 kDa の単一バンドを検出した(Fig. 7b, lanes 2, 3)。

3-2. 合成ペプチドの設計

Sip タンパクのアミノ酸配列を基にモノクローナル抗体作製の為のペプチドを以下のように選択して合成した。*S. agalactiae* 2603V/R 株の Sip アミノ酸配列を基に、Kyte & Doolittle プログラムを用いて疎水性指標と Welling の抗原性指標の解析を行った。得られたパラメーターの中で、疎水性指標が低く、抗原性指標が高い部分のアミノ酸配列が抗原として適していると考え、アミノ酸配列 200~217 番及び 313~336 番の 2 か所を合成ペプチド候補シーケンスとして選択した(Fig.8、編掛け部分)。また、合成ペプチドを抗原キャリアータンパクである KLH のアミノ基と架橋結合させる為に、N 末端にシステインを付加した。各々のアミノ酸配列は以下の通りである。Peptide 200 - 217, NH₂ - CEVPAAKEEVKPTQTSVSQ - OH 及び Peptide 313 - 336, NH₂ - CNAVAAHPENAGLQPHVAAYKEKVA - OH。この設計に従ってペプチドを外注により合成した。

3-3. 抗 Sip モノクローナル抗体の作製

大腸菌発現系から得られた rSip 及び合成ペプチド Peptide 200–217 と Peptide 313–336 の 3 種の抗原をマウスに接種した。マウス脾臓細胞とミエローマ細胞をポリエチレングリコール法で融合させることによってハイブリドーマを作製し、限界希釈法によってモノクローン細胞を確立した。モノクローナル抗体は、クローン化されたハイブリドーマをマウス腹腔に接種することにより回収し、これらを IgG 及び IgM 精製カラムに掛けることにより IgG 及び IgM を精製した。得られたモノクローナル抗体は、rSip を抗原としたクローンを R6E8、Peptide200-217 のそれを S4H5 及び Peptide313-336 のそれを S6H8 と命名した。ハイブリドーマが産生する抗体のクラスを ELISA 法により同定した結果、R6E8 と S6H8 は IgG₁、S4H5 は IgM であった。得られたモノクローナル抗体の rSip 抗原に対する親和性を ELISA で評価した結果、450 nm における吸光度が 1.0 を示す抗体タンパク濃度は、R6E8、S4H5 及び S6H8 でそれぞれ 6.1、18.4 及び 5.1 ng/ml であった。従って S6H8 が最も抗原に対する親和性が高く、続いて R6E8 及び R4H5 の順であった(Fig.9)。

3-4. 抗 Sip モノクローナル抗体の評価

得られたモノクローナル抗体はいずれも rSip と反応することは確認されたが、これらが真に GBS 菌体から抽出された native Sip と反応するという確認はまだ得られていない。そこで血清型が異なる GBS 抽出物に対する、これらモノクローナル抗体の反応性を Western blot で評価した。その結果、いずれのモノクローナル抗体も血清型の異なる 9 種の GBS すべてに対して反応性を示し、約 53 kDa の位置に単一バンドを検出した(Fig. 10, lanes 1-9)。各々の菌株に対する抗

体の反応の強さに有意差は認められなかった。

さらに得られた抗体が GBS 以外の連鎖球菌に対すると交差反応性を有するか評価する必要がある。本試験はこれら抗体が診断試薬として使用可能であるかどうかを判断する重要ステップである。そこで得られた抗体の異菌種連鎖球菌に対する交差反応性を検定するため、*S. pneumoniae*, Group A streptococcus, Group C streptococcus, Group G streptococcus 各 1 株ずつから菌体タンパクを抽出し、3 種のモノクローナル抗体の反応性を Western blot で評価した。その結果、何れのモノクローナル抗体もこれらの Streptococcus 抽出物に対する反応は示さなかった(Fig.10, lanes 10-13)。従っていずれの抗体も調べられた範囲では交差反応性を有さないことが明らかとなった。

3-5. イムノクロマトの構築

Sandwich 系のイムノクロマトを構築するには、メンブレンに固相化されるモノクローナル抗体と標識物質である金コロイドに結合されるモノクローナル抗体の 2 種類が必要である。そこで得られた 3 種のモノクローナル抗体のどの組み合わせが最適であるかを決定する実験を行った。3 種類の抗体それぞれを別々のメンブレンに固相化したストリップを調製し、また 3 種類の抗体を金コロイドに結合させた標識抗体を調製した。これらのストリップと金コロイド標識抗体の 9 通りの組み合わせを用いて、まず 10^8 CFU/ml に調製した GBS 菌体抽出液をクロマト展開させた。その結果、固相化抗体及び金コロイド標識抗体の組み合わせで各々に R6E8 と S6H8, S4H5 と R6E8, S4H5 と S6H8 及び S6H8 と R6E8 の 4 通りの組み合わせでテストライン上に陽性反応が確認された(Table 2)。続いて、 10^7 CFU/ml に調製した GBS 菌体からの抽出液を展開して検出感

度の比較を行った結果、R6E8 と S6H8 の組み合わせでのみ陽性反応が認められた。次にコントロールとして、菌体抽出液を含まない緩衝液のみを展開して抗原陰性標品が陰性の結果を示すかどうかを検定したところ、いずれの組み合わせでもバンドは検出されなかった(Table 2, blank)。これらの試験結果より、抗体固相化メンブレンには R6E8、金コロイド標識抗体には S6H8 を用いた組み合わせが、検出感度が最も高く非特異反応も認められなかったことから、イムノクロマトに最適な抗体の組み合わせであると考えられた。従って以後の実験ではこの組み合わせの抗体を使って実験を遂行した。

3-6. イムノクロマトの基礎的性能の評価

構築した GBS 検出イムノクロマトの検出限界及び他菌種との交差反応性など基礎的性能を評価する為、(i)精製 rSip タンパクの検出限界試験、(ii)GBS 菌体の検出限界試験および(iii)他菌種との交差反応性試験を実施した。まずアフィニティクロマトで精製された rSip タンパクを段階的に希釈した標品を用いた検出限界試験では、0.5 ng/ml 以上の濃度において目視で陽性と判定することが可能であった(Fig. 11)。また、抗原濃度依存的にテストラインの発色の増強が確認された。次に GBS 菌体抽出抗原を用いた検出限界試験では、血清型の異なる 9 種の GBS 菌体を段階的に希釈し、それらの菌液から抽出した抗原を用いて同様の試験を行った。最も感度よく検出されたのは血清型 VI の株で 9.5×10^5 CFU/ml を検出することが出来た(Table 3)。最も感度が低かったのは血清型 III の菌体で 3.7×10^6 CFU/ml から Sip 抗原を検出した。最も検出限界が高かった血清型と最も検出限界が低かった血清型の差は約 4 倍であった。このことから血清型の違いによる検出限界の差は、それほど問題とならないことが明らかとなった。

交差反応性試験では、 10^9 CFU/ml に調製したグラム陽性菌 18 菌種、グラム陰性菌 6 菌種、及び 10^8 CFU/ml に調製した真菌 2 菌種を用いて試験した結果、全ての菌種で陰性を示し、試験した範囲の菌株中では偽陽性を示した菌種は認められなかった(Table 3)。

3-7. 既同定済み臨床分離 GBS に対するイムノクロマトの反応性の評価

今回作成したイムノクロマトの臨床分離 GBS に対する反応性を研究室に保存されていた既同定済み臨床分離 GBS 229 株を対象として評価した。GBS 菌株を Todd-Hewitt broth で一晩培養し、これを抗原抽出操作に供し、抽出物をサンプルとしてイムノクロマトを実施した。その結果、229 株中 228 株で陽性反応を示したが、1 株のみ陰性を示した(Fig.12, lane 19)。偽陰性となった可能性として、(i) *sip* 遺伝子は存在するが Sip タンパクは発現されていないか、或は(ii) *sip* 遺伝子そのものに欠失や変異がある場合が考えられる。この点を明らかにするため偽陰性を示した KUB 968 株について、*sip* 遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、KUB 968 株の *sip* 遺伝子塩基配列は *S. agalactiae* ATCC BAA-611 の配列と比較して、651 番目から 654 番目の 4 塩基が欠失していることが明らかとなった(Fig.13)。この 4 塩基欠失の結果、フレームシフト変異となり塩基配列 697~699 で終止コドンとなることが明らかとなった。このシーケンス解析より得られた塩基配列から予想される変異 Sip タンパクのアミノ酸数は 232 残基であり、その分子量は 24.8 kDa であることが予想される(Fig.14)。そのようなタンパクが KUB 968 株で発現されているかどうかを確認する為、上述の 3 種のモノクローン抗体を用いて Western blot による試験を行った。KUB 968 株及び標準株 ATCC BAA-611 の全菌体抽出試料を調製し評価した結果、モ

ノクローン抗体 S6H8 及び R6E8 では ATCC BAA-611 及び精製 rSip において、約 53 kDa の位置にバンドを検出した (Fig. 15, lanes 2,3)。しかしながら S6H8 と R6E8 は KUB 968 株に対して反応が確認されなかった (Fig. 15, lane 1)。一方、モノクローナル抗体 S4H5 を用いた結果では、KUB 968 株に対して約 25 kDa の位置にバンドを検出した (Fig.15, S4H5 lane 1)。従って KUB 968 株では約 25 kDa の truncated Sip が発現しており、イムノクロマトに使用した S6H8 と R6E8 のモノクローナル抗体は、この truncated Sip を認識出来なかったために偽陰性となったと結論づけた。

3-8. 臨床検体を用いたイムノクロマトの評価

GBS スクリーニング検査に用いられる臨床材料である膣スワブ検体を用いて、調製されたイムノクロマトによる GBS 検出を評価した。膣スワブ 260 検体を一旦増菌培地で培養し、この材料からの GBS 検出を (i)イムノクロマト法と (ii)GBS の酵素基質培地を用いた分離培養法で比較検討した。実験のフローチャートとその結果を Fig.16 に示す。膣スワブを増菌培地で 24~48 時間培養した結果、236 検体で菌の増殖が確認され、24 検体は目視的に菌の増殖が認められなかった。菌の増殖が確認された 236 検体の内、溶血性 GBS の増殖を示す赤~オレンジ色の色素産生が認められた検体は 17 検体あり、色素産生が確認されなかったものは 219 検体であった。これら菌の増殖が確認された 236 検体について、GBS の分離培養を実施し、GBS が疑われるコロニーについては、さらにラテックス凝集試験と PCR による同定試験を実施した。増菌培地で色素産生陽性を示した 17 検体については、全検体より GBS コロニーが分離された。一方、増菌培地で色素産生陰性であった 219 検体では、その内 12 検体より GBS が分離同定さ

れた。菌の増殖が確認された 236 検体より分離同定された GBS 以外の菌種は、*Enterococcus faecalis* 149 株、*Candida albicans* 54 株、Coagulase-negative staphylococcus 11 株、*Enterococcus faecium* 7 株、*Candida glabrata* 5 株、*Lactobacillus acidophilus* 5 株、*Escherichia coli* 4 株、*Pseudomonas aeruginosa* 2 株、*Enterococcus gallinarum* 2 株、Group A streptococcus、Group G streptococcus、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus bovis*、*Candida parapsilosis* が各 1 株であった。

イムノクロマトを用いて、菌の増殖が確認された 236 検体を対象として Sip (GBS)検出実験を実施した。その結果、増菌培地で色素産生陽性を示した 17 検体はすべてイムノクロマトによる Sip 陽性反応を示した。一方、色素産生陰性の 219 検体では、分離培養により GBS が検出された 12 検体の内 10 検体はイムノクロマトで Sip 陽性、2 検体は陰性であった(後述)。また、分離培養で GBS 陰性を示した 207 検体において、1 検体はイムノクロマトで Sip 陽性を示し、残り 206 検体は陰性であった。分離培養法で GBS 陰性、イムノクロマトで Sip 陽性を示した 1 検体について、PCR 法でさらに精査を行った結果、GBS に普遍的に存在する *dltS* 遺伝子陽性であることが確認された(Fig.17)。従ってこの検体には GBS が存在した可能性が高いが、生菌は分離できなかつたものと判定した。以上の結果より、分離培養法と比較したイムノクロマトの感度は 93.1%(27/29)、特異度は 99.5%(206/207)、全体一致率は 98.7%(233/236)であった。

4. 考察

GBS は健常人の膣及び直腸にも常在する連鎖球菌であるが、GBS 保菌妊婦から新生児への垂直感染により、肺炎や髄膜炎、敗血症など重篤な新生児 GBS 感染症を引き起こす原因となる。これら感染症の発症を抑制するために、米国 CDC は妊娠 35～37 週における GBS スクリーニング検査を実施することを推奨している。GBS の検査方法としては、培養法が一般的であり、従来では膣スワブ検体を直接血液寒天培地に塗抹し、分離培養する方法が用いられてきた。この方法は検体中に他菌種が多数混在する場合や、GBS の菌数が比較的少ない場合には検出率が低下することが指摘されてきた。その為、CDC ガイドラインでは一旦増菌培地を用いて培養後、これから分離培養することを奨めており、この方法によって検出率の改善が図られた^{28, 29)}。しかし、この増菌培養による検査方法は、2 段階の培養操作が必要であり、菌の分離・同定までの数日の期間が必要である。代替え法としては PCR 法や DNA probe ハイブリダイゼーションによる GBS 遺伝子検出方法が報告されているが、これらの方法では特殊な検査機器や熟練した技術が要求される為、より迅速で簡便な診断法の開発が望まれている。

本研究では、GBS 抗原に対するモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法による GBS 迅速診断法の開発を目的とした。そのため、標的抗原はすべての GBS 株において普遍的且つ恒常的に存在するものを選定することが重要となる。さらに、標的抗原の抽出操作を簡易化するため、菌体内部に存在する抗原より表層部に存在する抗原の方が、目的に適っていると考えられる。GBS 抗原の候補としては(i)菌体表層の莢膜多糖抗原があげられるが、これは Ia, Ib, II～IX の

10 種類の血清型が存在することから診断用抗原としては適当とは考え難い。その他の表層多糖抗原としては、(ii)Lancefield の分類に使用されるグループ特異的 C 多糖体が存在することが知られている。C 多糖体を標的抗原としたラテックス凝集試薬は GBS の同定方法として広く用いられている。しかしながら、この方法は膿スワブ検体から分離される頻度の高い *E. faecalis* や *C. albicans* に対して交差反応を示したことが報告されていることから³⁰⁻³²⁾、精度が高い方法を確立することは難しい。(iii) その他表層タンパク抗原としては、 α -protein や β -protein、Rib、C5a peptidase、FbsA protein などが知られている³³⁾。しかしながら、これまで報告のある表層タンパク抗原は、血清型の違いにより分布に偏りがあることが知られており、GBS 検出方法の開発を行う標的抗原としては適していない。そこで今回我々は、2000 年に Brodeur ら²²⁾により発見された Sip タンパクをイムノクロマト開発の標的抗原として選択した。Sip は GBS の遺伝子ライブラリーから免疫学的スクリーニングによって発見された約 53 kDa のタンパク質であり、ペプチドグリカン結合アンカーの LysM ドメインを有している³⁴⁾。しかしながら Sip の生理的機能は今のところ明らかでない。Sip は全ての血清型の GBS 細胞に発現しており、それは菌体表層に存在していることが確認されている。また *sip* 遺伝子も高度に保存されている点においても、GBS 検査の標的抗原として適していると考えた。

このような設計に基づいて Sip に対するモノクローナル抗体を 3 種確立し、その内の 2 種を使ってイムノクロマト法による検出系を確立した。Sip を標的としたイムノクロマトは、血清型の異なる 9 株の GBS において、その検出限界が $9.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^6$ CFU/ml であり血清型間で大きな差は認められなかった。従

ってこのイムノクロマトは GBS 検出に使用可能であることが確認された。また、他菌種に対する交差反応性を膣や直腸検体からの分離頻度が高い菌種と、さらに同属の *Streptococcus* を 8 菌種用いて実施した。菌体浮遊液を $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml と、検査検体として想定している増菌培地検体に含まれる濃度より高濃度で試験したにもかかわらず、いずれの菌種でも偽陽性反応は認められなかった。これまでに、GBS 同定試験に用いられる市販のラテックス凝集試薬は、今回試験を行った *Streptococcus porcinus* や *Streptococcus pseudoporcinus* において交差反応性を有し、偽陽性の結果を示すことが報告されている^{35, 36)}。*S. porcinus* は、主にブタの頸部リンパ節感染症に関与しているが、*S. pseudoporcinus* は、女性生殖器より 5.4%の頻度で分離される³⁷⁻³⁹⁾。その為、ラテックス凝集試薬では、*S. pseudoporcinus* は GBS と誤って検出される可能性がある。しかし、本法はこの菌種に対して交差反応を示さない為、GBS の特異的検出方法としての性能が高いものと判定出来た。

次に、すでに同定済みの臨床分離 GBS 229 株を用いて本法による GBS 検出を評価したところ、KUB968 株のみが陰性の結果を示した。偽陰性となった原因としては、この菌株では Sip が発現されていないか或は *sip* 遺伝子に何らかの変異が入っているかの可能性が考えられた。そこで *sip* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、651~654 番目の 4 塩基が欠失しており、697~699 番の塩基が終止コドンとなっていることが明らかとなった。この様な truncated Sip 産生 GBS の存在を検索したところ、既に pseudo *sip* gene として Gene Bank に登録されていた (accession number DQ914266)。イムノクロマトに使用した S6H8 と R6E8 の 2 種のモノクローナル抗体は、この truncated Sip に対して反応性を有

さないことが Western blot の結果から示された。Peptide 313-336 を抗原として作製したモノクローナル抗体 S6H8 は、抗原部位がタンパクの欠損部位内に位置している為、KUB968 の Sip に反応しなかったものと考えられる。また、rSip を抗原として作製したモノクローナル抗体 R6E8 については、認識するエピトープの決定は行っていないが反応性を有さないことから、この抗体も欠損部分である Sip のアミノ酸配列 218 番目以降の後半部分にエピトープが存在することが考えられる。一方、Peptide 200-217 を抗原として作製したモノクローナル抗体 S4H5 は、約 26 kDa の位置にバンドを検出したことから KUB968 は truncated Sip を発現していることが確認された。

この様に *sip* 遺伝子に欠失もしくは挿入変異が導入された場合に読み枠がずれてフレームシフト変異となる。結果として終止コドンが発生し truncated Sip が作り出される可能性は上記の例以外にも予想される。また、Gene Bank に登録されている *sip* 遺伝子の配列を検索すると、Sip タンパクの内部部分に欠失を伴う塩基配列も確認された。今回試験を行った臨床分離株においては、229 株中 228 株(99.6%)で陽性反応は確認できたが、臨床から分離される様々な GBS 株に対応して検査精度を高める為にも、異なるエピトープを認識する抗 Sip モノクローナル抗体を混合し、イムノクロマトを改良することも必要であると考えられる。

膣スワブ 260 検体を用いて、増菌培地からの GBS 検出をイムノクロマト法と分離培養法で試験した。その内 1 検体が分離培養法で陰性、イムノクロマト法で陽性の偽陽性反応を示した。この結果の乖離原因を追及する為に、検体輸送容器に残存していた試料から DNA を抽出し、GBS 特異的遺伝子である *dltS* を

標的とした PCR を試みた。その結果、偽陽性反応検体から *dltS* 遺伝子の増幅産物が得られた。この結果は次の様に解釈することが出来る。(i)この検体中には GBS が存在したが、その菌数が少なすぎたため培養法では検出できなかった。その場合イムノクロマト法は、培養法で検出できなかった GBS を検出できた事になる。或は別の解釈としては、(ii)この検体を採取した患者はすでに抗生物質の投与を受けていた為に生菌 GBS は存在しないが、死菌もしくは菌の残骸が残っていた可能性がある。何れにしてもこの患者の膿には GBS が生息していたことは間違いないと考えられた。

分離培養法で GBS 陽性を示し、イムノクロマトで陰性を示した検体が 2 件認められた。この結果が乖離した原因としては、次の様なことが考えられる。(i)イムノクロマトに用いたモノクローナル抗体が分離された GBS に対して反応性を有さない。(ii)これらの検体の分離培養結果から、GBS のコロニー数に比べ *E. faecalis* の菌数は極めて優位であった為(Fig.18)、*E. faecalis* からの抽出物によってイムノクロマトにおける GBS 検出の抗原抗体反応が阻害された。(iii)分離培養により両検体から分離された GBS コロニーが共に少数であったことから(Fig.18)、増菌培地中の GBS 菌数がイムノクロマトの検出感度以下であった。これらの疑問を明らかとするために先ず、分離培養で得られた GBS 株を用いて再度イムノクロマトを行った結果、明確な陽性反応を示した。従って上記可能性(i)は否定でき、イムノクロマトの反応性に問題は無いことが確認された。また、多数の *E. faecalis* 存在下で、イムノクロマトの GBS 検出限界に影響が認められるか否かを確認する為、 10^8 CFU/ml に調製した *E. faecalis* 懸濁液で、GBS 懸濁液を 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/ml として希釈し、検出限界試験を実施した。その

結果 GBS の検出限界は、*E. faecalis* 存在下もしくは非存在下で差が認められなかった。従って上記可能性(ii)は否定された。残る可能性は上記(iii)であり、これら 2 検体に於いては増菌培養後も、GBS の菌数が不十分であり、イムノクロマト法の検出限界以下の菌数しか存在しなかったことが偽陰性の原因と結論付けられた。GBS の増殖は優勢的な *E. faecalis* の混在によって抑制されることが報告されていることから^{40, 41)}、本検体も同様の現象が原因と推測できた。この、*E. faecalis* による GBS の増殖抑制に対しては、*Enterococcus* の増殖のみを抑制するサプリメントを含有した増菌培地が新たに開発されていることから⁴²⁾、培地性能の改善が本法の GBS 検出率の改善に繋がることが期待される。

本研究から得られた結果より、確立した GBS 簡易迅速診断方法は、感度や特異度からも臨床応用可能な診断方法であることが示された。今後は妊婦を対象とした GBS スクリーニング検査の新たな選択肢として、本法が臨床の現場で活用されることを期待したい。

5. 総括

本研究は、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法の確立を目的とした。GBS 菌体表層抗原である Sip に対するモノクローナル抗体を作製し、イムノクロマト法による検出方法を樹立した。rSip に対する本法の検出限界は 0.5 ng/ml であり、血清型の異なる 9 株の GBS 菌体に対する検出限界は、 $9.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^6$ CFU/ml であった。さらに、臨床材料からの混入が危惧される他菌種に対する交差反応性も認められず、特異性の高い検査方法であることが示された。さらに、膣スワブ検体を用いた増菌培地からの GBS 検出について、分離培養法と本法の比較から、感度及び特異度はそれぞれ 93.1%、及び 99.5%であることが示され、GBS 検出検査方法として臨床応用可能な十分な性能を有していることが示された。本研究結果から、特別な機器を必要とせず、簡便な操作方法により、すべての検査時間を含めて 15 分以内という短時間で GBS の検出を可能とする新規迅速診断法を確立できたと考える。

6. 今後の課題

本研究で確立した GBS 検出イムノクロマトは、分離培養法との比較結果から、93.1%と高い感度を示したが、培養法での GBS 陽性を示したにもかかわらず、イムノクロマト法で陰性を示した 2 検体については、培養液中の菌数がイムノクロマトの検出限界以下であった為に陰性を示した。その為、更なる検査の精度向上を図るには、検出限界の改善が望まれる。近年では、蛍光粒子を用いたイムノクロマト法や、銀イオンによる増感方法によるイムノクロマトの高感度化が検討されている。今後、イムノクロマト法自体の高感度化を検討するとともに、検査検体からの効率的な標的抗原の収集と抽出による検出限界の改善を検討する必要がある。また、GBS 臨床分離株を用いた検討結果より、1 株で陰性となった。この株の Sip タンパクは完全長の Sip アミノ酸配列を有しておらず truncated Sip であった。その為、さらに異なる Sip 抗原のエピトープを認識する抗体を作製し、本法に追加することで幅広い GBS 菌株に対して反応性を有する検査方法として改善を行う必要がある。今後の、さらなる検査精度の向上が、新生児 GBS 感染症の発症抑制に繋がっていくことを期待したい。

7. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多大なる御教授を賜りました北里大学大学院 医療系研究科の北里英郎教授と北里大学 北里生命科学研究所 抗感染症薬研究センター及び感染防御学講座の花木秀明教授に謹んで深謝申し上げます。

貴重なご助言と御指導を賜りました、北里大学 感染制御研究機構の砂川慶介教授、北里大学 北里生命科学研究所 抗感染症薬研究センターの中江太治顧問並びに崔龍洙副センター長に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたりましてご協力賜りました、江東微生物研究所の東出正人氏に感謝申し上げます。

さらに、日々の研究活動を支え励まして下さいました、抗感染症薬研究センターの鈴木由美子研究員、遠藤晴美研究員、山口幸恵研究員、岩本美和研究員、鷺見克恵研究員、財部祐季子研究員、藤上理奈研究員、河喜多智美講座研究員に感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Spellerberg B, Brandt C: *Streptococcus*, Manual of Clinical Microbiology. 9th ed, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. ASM Press, Washington, D.C., 2007, 412-29.
2. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Obstet. Gynecol.* 1991;77:604-10.
3. Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet. Gynecol.* 2000;96:498-503.
4. Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet. Gynecol.* 1996;88:811-5.
5. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. *Pediatrics* 1997;99:489-96.
6. ACOG Committee Opinion: number 279, December 2002. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Obstet. Gynecol.* 2002;100:1405-12.
7. de Louvois J, Halket S, Harvey D. Neonatal meningitis in England and Wales: sequelae at 5 years of age. *Eur. J. Pediatr.* 2005;164:730-4.
8. Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moennig MJ, Bartels DB, et al. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 2006;117:e1139-45.
9. Libster R, Edwards KM, Levent F, Edwards MS, Rench MA, Castagnini LA, et al. Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis. *Pediatrics* 2012;130:e8-15.

10. Baker CJ, Barrett FF. Group B streptococcal infections in infants. The importance of the various serotypes. *JAMA* 1974;230:1158-60.
11. Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J. Pediatr. Nurs.* 2004;19:357-63.
12. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008;299:2056-65.
13. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:15-20.
14. CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1996;45:1-24.
15. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002;51:1-22.
16. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-36.
17. Miranda C, Gamez MI, Navarro JM, Rosa-Fraile M. Endocarditis caused by nonhemolytic group B *streptococcus*. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:1616-7.
18. Nickmans S, Verhoye E, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. Possible solution to the problem of nonhemolytic group B *streptococcus* on granada medium. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:1132-3.
19. Riedlinger J, Beqaj SH, Milish MA, Young S, Smith R, Dodd M, et al. Multicenter evaluation of the BD Max GBS assay for detection of group B streptococci in prenatal vaginal and rectal screening swab specimens from pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:4239-41.

20. Rallu F, Barriga P, Scrivo C, Martel-Laferrriere V, Laferrriere C. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B *streptococcus* carriage in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:725-8.
21. Bourbeau PP, Heiter BJ, Figdore M. Use of Gen-Probe AccuProbe Group B streptococcus test to detect group B streptococci in broth cultures of vaginal-anorectal specimens from pregnant women: comparison with traditional culture method. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:144-7.
22. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect. Immun.* 2000;68:5610-8.
23. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982;157:105-32.
24. Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 1985;188:215-8.
25. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.
26. Matsui H, Hanaki H, Inoue M, Akama H, Nakae T, Sunakawa K, et al. Development of an immunochromatographic strip for simple detection of penicillin-binding protein 2'. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18:248-53.
27. Poyart C, Tazi A, Reglier-Poupet H, Billoet A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1985-8.
28. Craven RR, Weber CJ, Jennemann RA, Dunne WM, Jr. Evaluation of a chromogenic agar for detection of group B *streptococcus* in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:3370-1.
29. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, Cools P, Verstraelen H, et al. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B *streptococcus* carriage in pregnant

- women. BMC Infect. Dis. 2010;10:285.
30. Hoppe JE, Lindenau C, Hofler W. Rapid detection of group B streptococci in vaginal swabs of parturients by latex particle agglutination. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 1989;270:379-84.
 31. Kontnick CM, Edberg SC. Direct detection of group B streptococci from vaginal specimens compared with quantitative culture. J. Clin. Microbiol. 1990;28:336-9.
 32. Wald ER, Dashefsky B, Green M, Harger J, Parise M, Korey C, et al. Rapid detection of group B streptococci directly from vaginal swabs. J. Clin. Microbiol. 1987;25:573-4.
 33. Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 2005;18:102-27.
 34. Vidova B, Chotar M, Godany A. N-terminal anchor in surface immunogenic protein of *Streptococcus agalactiae* and its influence on immunity elicitation. Folia Microbiol. (Praha). 2009;54:161-6.
 35. Gaudreau C, Simoneau E, Labrecque O, Laurence RA, Laferriere C, Miller M, et al. Epidemiological, biochemical and antimicrobial susceptibility characteristics of *Streptococcus pseudoporcinus* isolated in Quebec, Canada, from 1997 to 2006. J. Med. Microbiol. 2007;56:1620-4.
 36. Thompson T, Facklam R. Cross-reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus*. J. Clin. Microbiol. 1997;35:1885-6.
 37. Bekal S, Gaudreau C, Laurence RA, Simoneau E, Raynal L. *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a novel species isolated from the genitourinary tract of women. J. Clin. Microbiol. 2006;44:2584-6.
 38. Facklam R, Elliott J, Pigott N, Franklin AR. Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. J. Clin. Microbiol. 1995;33:385-8.
 39. Stoner KA, Rabe LK, Austin MN, Meyn LA, Hillier SL. Incidence and

- epidemiology of *Streptococcus pseudoporcinus* in the genital tract. J. Clin. Microbiol. 2011;49:883-6.
40. Dunne WM, Jr., Holland-Staley CA. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. J. Clin. Microbiol. 1998;36:2298-300.
41. Park CJ, Vandell NM, Ruprai DK, Martin EA, Gates KM, Coker D. Detection of group B streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth. J. Clin. Microbiol. 2001;39:408-9.
42. Poisson DM, Evrard ML. Prepartum vaginal/anorectal Group B *Streptococcus* screening: improvement of the enrichment step by the broth additive RambaQUICK StrepB. J. Microbiol. Methods 2012;89:107-9.

9. 業績目録

【原著論文】

1. Matsui, H., J. Kimura, M. Higashide, Y. Takeuchi, K. Okue, L. Cui, T. Nakae, K. Sunakawa, and H. Hanaki, Immunochromatographic detection of the group B streptococcus antigen from enrichment cultures. Clin. Vaccine Immunol., 2013. 20(9): 1381-1387.
2. 安達 譲, 二本柳 伸, 棟方 伸一, 狩野 有作, 松井 秀仁, 崔 龍洙, 花木 秀明, 砂川 慶介, KBMイムノクロマト検出キットMRSAの評価と応用検討について. 医学検査, 2013. 62(3): 264-267.
3. Tsutsui, A., T. Hirose, A. Ishiyama, M. Iwatsuki, A. Yokota, H. Maruyama, H. Matsui, K. Otoguro, H. Hanaki, S. Omura, and T. Sunazuka, Antimalarial C-9 oxime derivatives from desmycosin, produced by click chemistry. J. Antibiot. (Tokyo). 2013. 66(3): 191-194.
4. Suga, T., T. Ishii, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, K. Nonaka, R. Masuma, H. Matsui, H. Hanaki, S. Omura, and K. Shiomi, Aranorosin circumvents arbekacin-resistance in MRSA by inhibiting the bifunctional enzyme AAC(6')/APH(2"). J. Antibiot. (Tokyo). 2012. 65(10): 527-529.
5. Hirao, Y., Y. Ikeda-Dantsuji, H. Matsui, M. Yoshida, S. Hori, K. Sunakawa, T. Nakae, and H. Hanaki, Low level β -lactamase production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with β -lactam antibiotics-induced vancomycin resistance. BMC Microbiol, 2012. 12: 69.
6. 壇辻 百合香, 山口 幸恵, 遠藤 晴美, 鈴木 由美子, 松井 秀仁, 砂川 慶介, 花木 秀明, ペニシリナーゼ産生菌存在下での *Streptococcus pneumoniae* に対する clavulanic acid 配合アモキシシリンの抗菌効果. 化学療法の領域, 2012. 28(5): 833-838.
7. Matsui, H., H. Hanaki, M. Inoue, H. Akama, T. Nakae, K. Sunakawa, and S. Omura, Development of an immunochromatographic strip for

- simple detection of penicillin-binding protein 2'. Clin. Vaccine Immunol., 2011. 18(2): 248-253.
8. 松井 秀仁, 壇辻 百合香, 花木 秀明, 薬剤の臨床 クラミジア検出イムノクロマトの基礎的性能評価. 産科と婦人科, 2011. 78(6): 759-763.
 9. Kobayashi, Y., M. Ichioka, T. Hirose, K. Nagai, A. Matsumoto, H. Matsui, H. Hanaki, R. Masuma, Y. Takahashi, S. Omura, and T. Sunazuka, Botromycin derivatives: efficient chemical modifications of the ester moiety and evaluation of anti-MRSA and anti-VRE activities. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. 20(20): 6116-6120.
 10. Ikeda, S., H. Hanaki, C. Yanagisawa, Y. Ikeda-Dantsuji, H. Matsui, M. Iwatsuki, K. Shiomi, T. Nakae, K. Sunakawa, and S. Omura, Identification of the active component that induces vancomycin resistance in MRSA. J. Antibiot. (Tokyo). 2010. 63(9): 533-538.
 11. Yanagisawa, C., H. Hanaki, H. Matsui, S. Ikeda, T. Nakae, and K. Sunakawa, Rapid depletion of free vancomycin in medium in the presence of beta-lactam antibiotics and growth restoration in *Staphylococcus aureus* strains with beta-lactam-induced vancomycin resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 2009. 53(1): 63-68.
 12. Matsui, H., H. Hanaki, K. Takahashi, A. Yokoyama, T. Nakae, K. Sunakawa, and S. Omura, Rapid detection of vaginal *Candida* species by newly developed immunochromatography. Clin. Vaccine Immunol., 2009. 16(9): 1366-1368.
 13. Hososaka, Y., H. Hanaki, C. Yanagisawa, Y. Yamaguchi, H. Matsui, T. Nakae, S. Iwata, I. Hayashi, and K. Sunakawa, Nosocomial infection of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (BIVR). J Infect Chemother, 2006. 12(4): 181-184.
 14. Fujinami, A., K. Ohta, H. Matsui, N. Kitada, Y. Kitaura, Y. Kawahara, H. Obayashi, S. Kuno, N. Nakamura, and M. Ohta, Resistin concentrations

- in murine adipose tissue and serum measured by a new enzyme immunoassay. *Obesity* (Silver Spring), 2006. 14(2): 199-205.
15. Hanaki, H., Y. Yamaguchi, C. Yanagisawa, K. Uehara, H. Matsui, Y. Hososaka, K. Barada, F. Sakai, Y. Itabashi, S. Ikeda, K. Atsuda, H. Tanaka, T. Inamatsu, A. Nagayama, and K. Sunakawa, Investigation of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR). *J Infect Chemother*, 2005. 11(2): 104-106.
16. 柳沢 千恵, 花木 秀明, 大石 智洋, 上原 一晃, 山口 幸恵, 松井 秀仁, 砂川 慶介, β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA(BIVR)に対する pazufloxacin と抗 MRSA 薬の併用効果. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 2005. 58(1): 11-16.
17. Ohta, K., A. Fujinami, S. Kuno, A. Sakakimoto, H. Matsui, Y. Kawahara, and M. Ohta, Cabergoline stimulates synthesis and secretion of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor by mouse astrocytes in primary culture. *Pharmacology*, 2004. 71(3): 162-168.
18. Fujinami, A., H. Obayashi, K. Ohta, T. Ichimura, M. Nishimura, H. Matsui, Y. Kawahara, M. Yamazaki, M. Ogata, G. Hasegawa, N. Nakamura, T. Yoshikawa, K. Nakano, and M. Ohta, Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta*, 2004. 339(1-2): 57-63.
19. Ohta, K., S. Kuno, I. Mizuta, A. Fujinami, H. Matsui, and M. Ohta, Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF-38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.*, 2003. 73(5): 617-626.

【総説】

1. 松井 秀仁, 花木 秀明, CA-MRSA, HA-MRSA, OS-MRSA. 臨床と微生物, 2013. 40 巻増刊号: 503-508.
2. 松井 秀仁, 花木 秀明, インフルエンザウイルスの迅速診断方法(ヘッドライン:インフルエンザと化学). 化学と教育, 2010. 58(11): 506-509.
3. 松井 秀仁, 花木 秀明, 【医療・福祉施設における感染制御と臨床検査】 各論 感染制御に役立つ迅速診断検査. 臨床検査, 2009. 53(11): 1473-1481.

10. 図表

Table 1. プライマーの塩基配列

用途	標的 遺伝子	PCR産物 サイズ	塩基配列 (5'-3')
rSipの作製	<i>sip</i>	1316 bp	F : CATCCATGGAAATGAATAAAAAGGTACTATTG R : CATCTCGAGTTTGTAAATGATACGTGAACATC
GBSの 同定・検出	<i>dltS</i>	952 bp	F : AGGAATACCAGGCGATGAACCGAT R : TGCTCTAATTCTCCCCTTATGGC
<i>sip</i> 遺伝子の シーケンス解析	<i>sip</i>	1617 bp	F : CGTTGACAACAGTCAAGAAC R : AGTCACGGTTAACGTGAAAG
			F : CAATCAAGTTTCTGTTGCAG R : CTCTTAACTTCAGTCGCTTG
		—	F : GTAGCACAAAAGCTCCAAC R : AGTAGCTGTTGTTTGACCAG
		—	

Table 2. イムノクロマト法に用いる抗体の組み合わせ

抗体固相化 メンブレン	金コロイド 標識抗体	GBS菌体抽出サンプル		Buffer blank
		10 ⁸ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	
R6E8	R6E8	—	N.D.	N.D.
	S4H5	—	N.D.	N.D.
	S6H8	+	+	—
S4H5	R6E8	+	—	—
	S4H5	—	N.D.	N.D.
	S6H8	+	—	—
S6H8	R6E8	+	—	—
	S4H5	—	N.D.	N.D.
	S6H8	—	N.D.	N.D.

抗体固相化メンブレンにはR6E8、金コロイド標識抗体にはS6H8の組み合わせが最も検出感度が高く、イムノクロマトに適したものと判定した。

+, 陽性; -, 陰性; N.D., 未実施

Table 3. 血清型の異なるGBS菌株の検出限界

GBS菌株	血清型	検出限界 (CFU/ml)
IID 1621	Ia	2.0×10^6
IID 1622	Ib	3.2×10^6
IID 1624	II	3.4×10^6
IID 1625	III	3.7×10^6
ATCC 49446	IV	3.0×10^6
ATCC BAA-611	V	1.7×10^6
KUB 171	VI	9.5×10^5
KUB 953	VII	1.6×10^6
KUB 987	VIII	2.7×10^6

血清型の異なるGBS 9株を用いて、検出感度試験を行った結果、検出限界は $9.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^6$ CFU/mlであった。

Table 4. 交差反応性試験実施菌株

菌株名		菌株名	
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P	<i>Enterococcus faecium</i>	NCTC 12204
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KUB 795	<i>Corynebacterium sp</i>	KUB 793
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29970	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43809	<i>Lactobacillus crispatus</i>	ATCC 33820
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344	<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 19992
<i>Group C streptococcus</i>	KUB 794	<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>subsp. equisimilis</i>	ATCC 12394	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 9632
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073	<i>Enterobacter cloacae</i>	IFO 13535
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NCTC 10006
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556	<i>Proteus vulgaris</i>	OX-19
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	ATCC BAA-1381	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	E-2
<i>Streptococcus porcinus</i>	ATCC 43138	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001

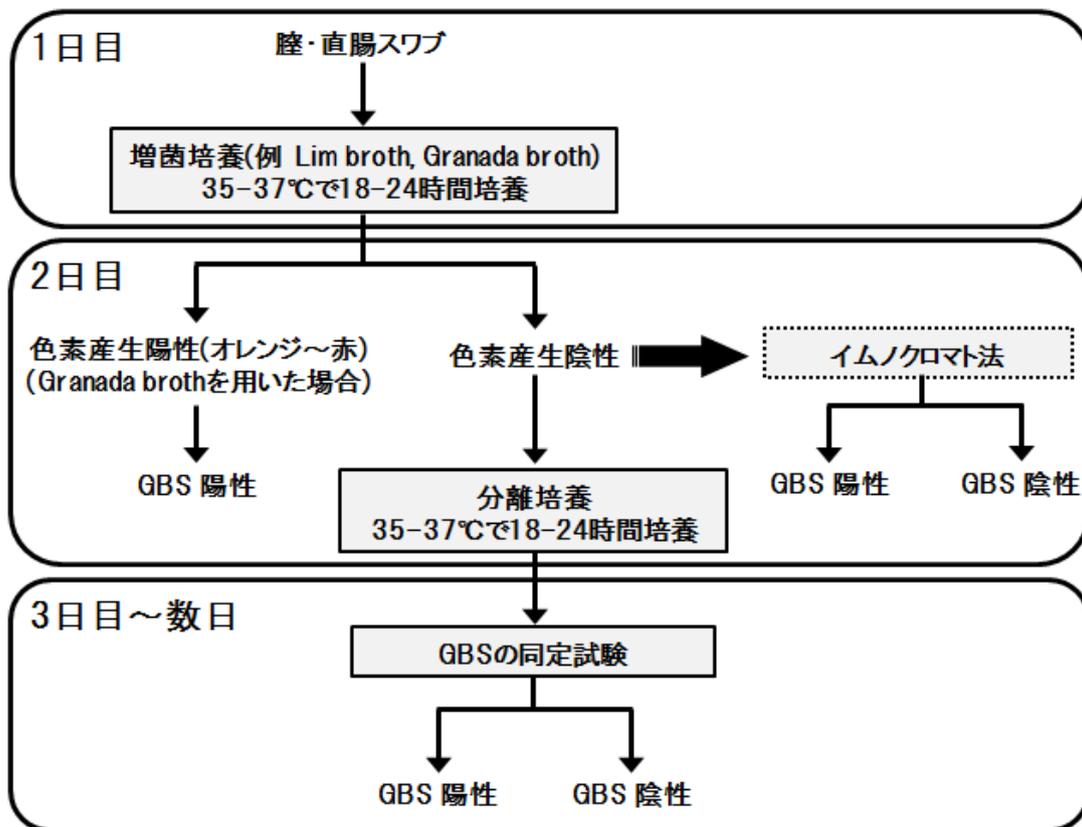


Fig.1. GBSスクリーニング検査の方法

腔・直腸スワブを増菌培地で一晚培養する。Granada brothで色素産生陽性の場合には溶血性GBS陽性と報告する。色素産生陰性の場合もしくはLim broth培養では、さらに分離培養、同定試験へと進む。イムノクロマト法では増菌培地から抗原抽出操作を行い直ちに試験可能であることから、検査2日目で結果の判定ができる。

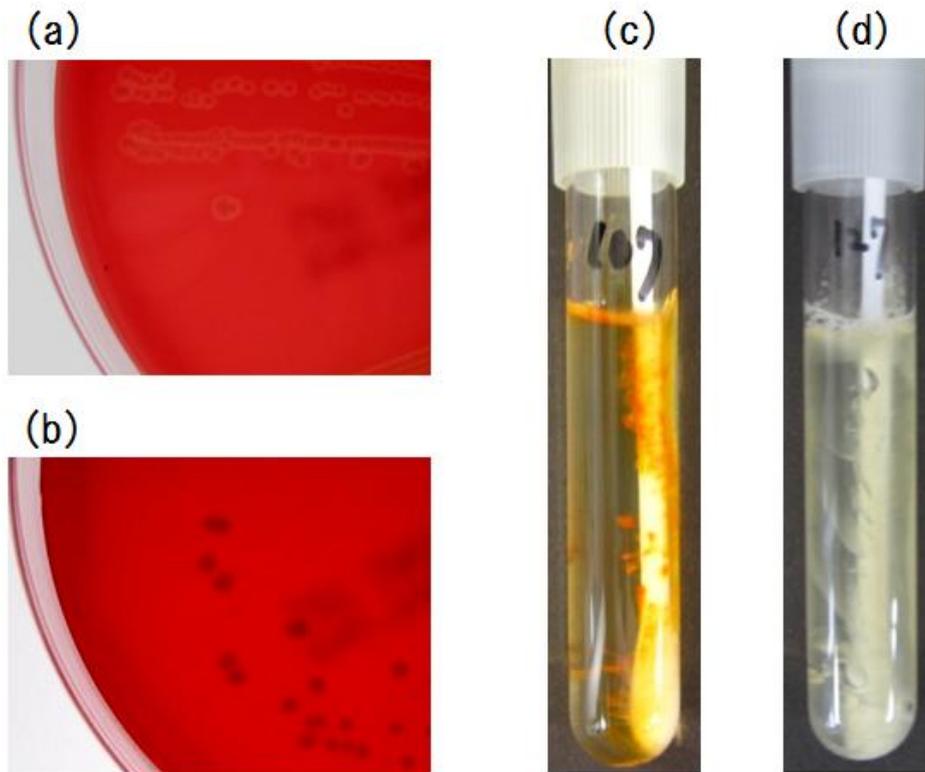


Fig. 2. 溶血性及び非溶血GBSの性状

(a, c), 溶血性GBSは、血液寒天上培地で β 溶血を示し、Granada培地でオレンジ～赤色の色素を産生する。(b, d), 非溶血性GBSは、血液寒天上培地で溶血は示さず色素も産生しない。

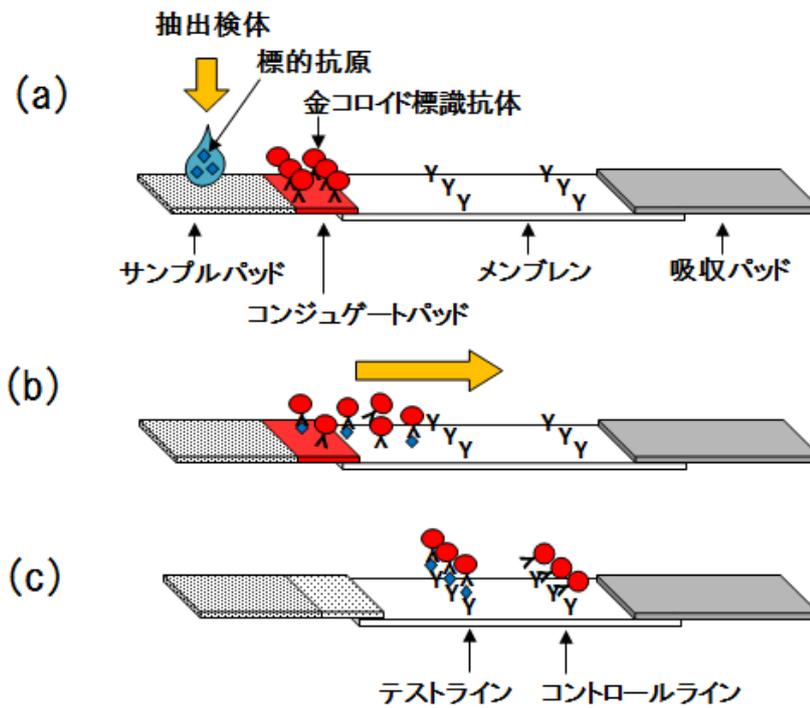


Fig.3. イムノクロマト法の原理

(a), サンプルパッドに抽出抗原を滴下する。(b), 標的抗原はコンジュゲートパッド中の金コロイド標識抗体と反応し複合体を形成する。複合体はメンブレン上を展開しテストライン上に固定化された抗体により捕捉され、赤色のラインを形成する。(c), 余剰の金コロイド標識抗体は、コントロールライン上の抗IgG抗体により捕捉される。

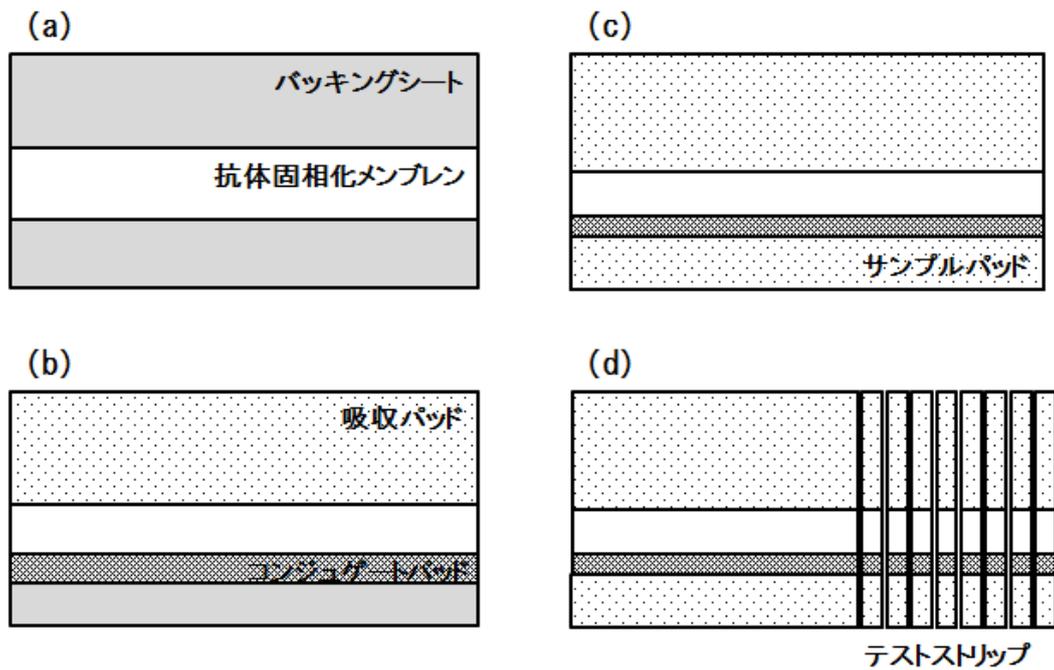


Fig.4. イムノクロマトの組み立て

(a), バックキングシートに抗体固相化メンブレンを張り付ける。(b), 抗体固相化メンブレンの上部に吸収パッドを、下部にコンジュゲートパッドを張り付ける。(c), サンプルパッドをコンジュゲートパッド下部に貼り付ける。(d), クリアフィルムを全面に貼り付けた後、5mm幅に切断し、テストストリップとする。

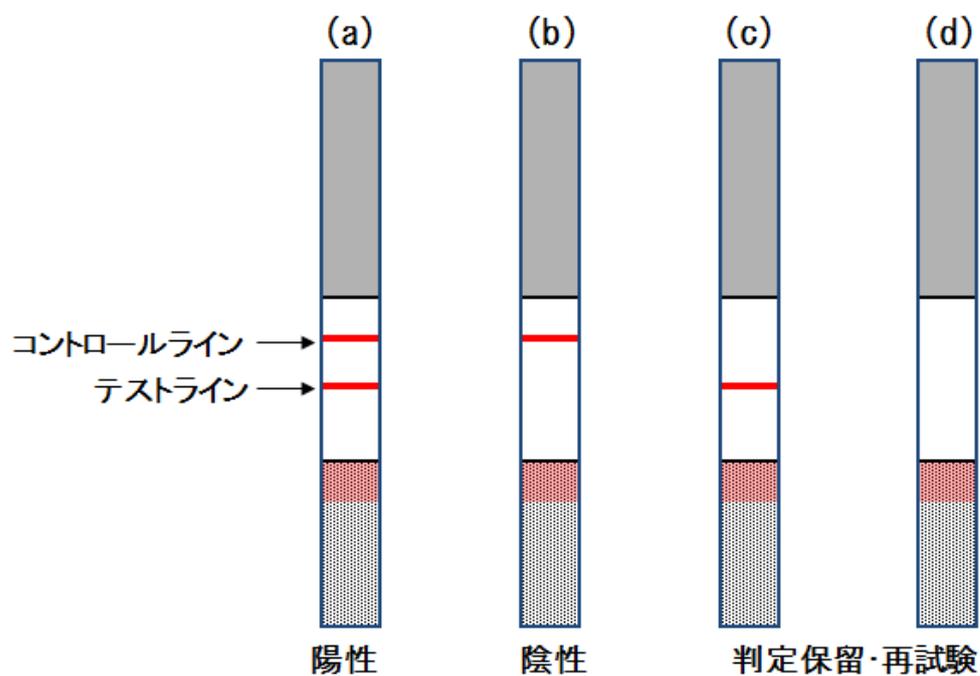


Fig.5. イムノクロマトの結果判定例

- (a), テストライン及びコントロールラインに赤いラインが確認されれば陽性と判定。
- (b), コントロールライン上のみに赤いラインが確認された場合は陰性と判定。
- (c, d), テストラインのみが確認された場合、あるいはラインが認められなかった場合は、判定保留とし、再試験を実施する。

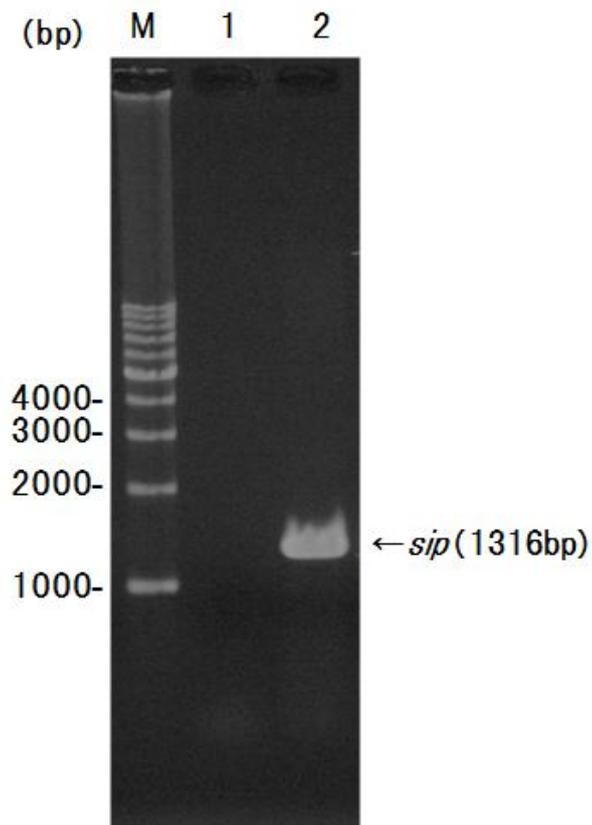


Fig. 6. PCRによる*sip*遺伝子の増幅

S. agalactiae KUB791株のDNAを鋳型としてPCR反応を実施した。得られた産物をアガロース電気泳動に掛けた。*sip*遺伝子のサイズに相当する約1300 bpの位置に単一バンドが確認された。M, DNAラダー; 1, Negative control; 2, KUB791

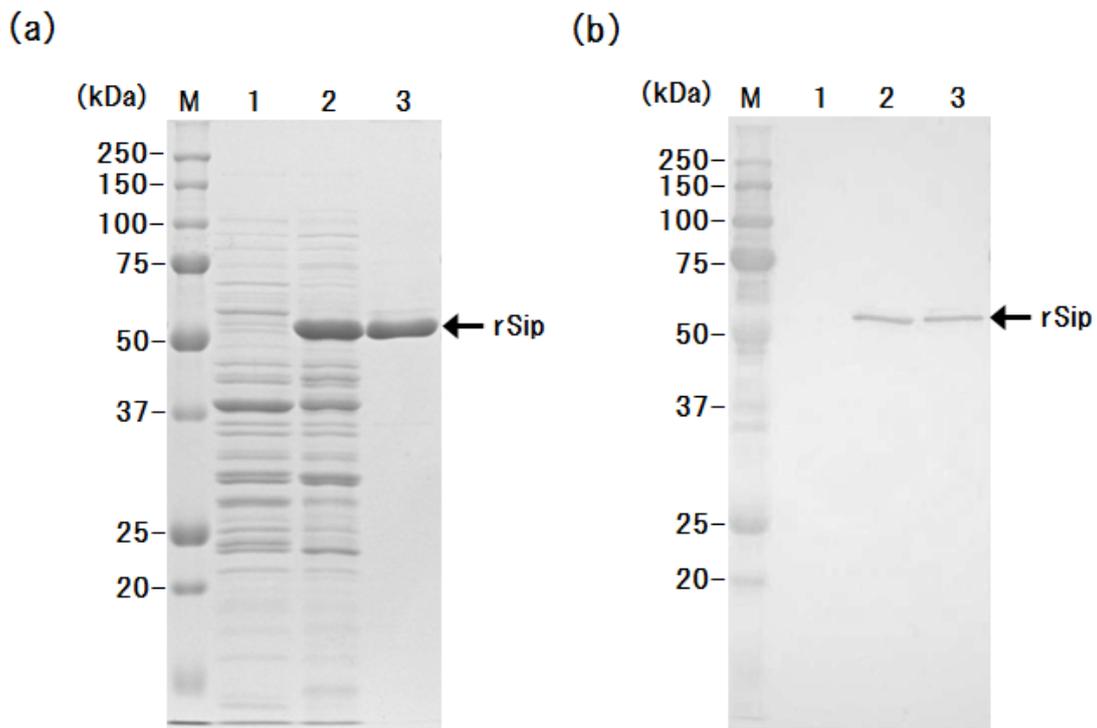


Fig. 7. SDS-PAGE及びWestern blotによる粗抽出画分及び精製画分中のrSip確認

IPTGでタンパク発現を誘導後、得られた可溶性画分とアフィニティー精製したrSipを用いて電気泳動を行った。(a)CBB染色, (b)抗Hisタグ抗体によるWestern blot. M, 分子量マーカー; 1, IPTG誘導前の可溶性画分; 2, IPTG誘導後の可溶性画分; 3,アフィニティー精製rSip

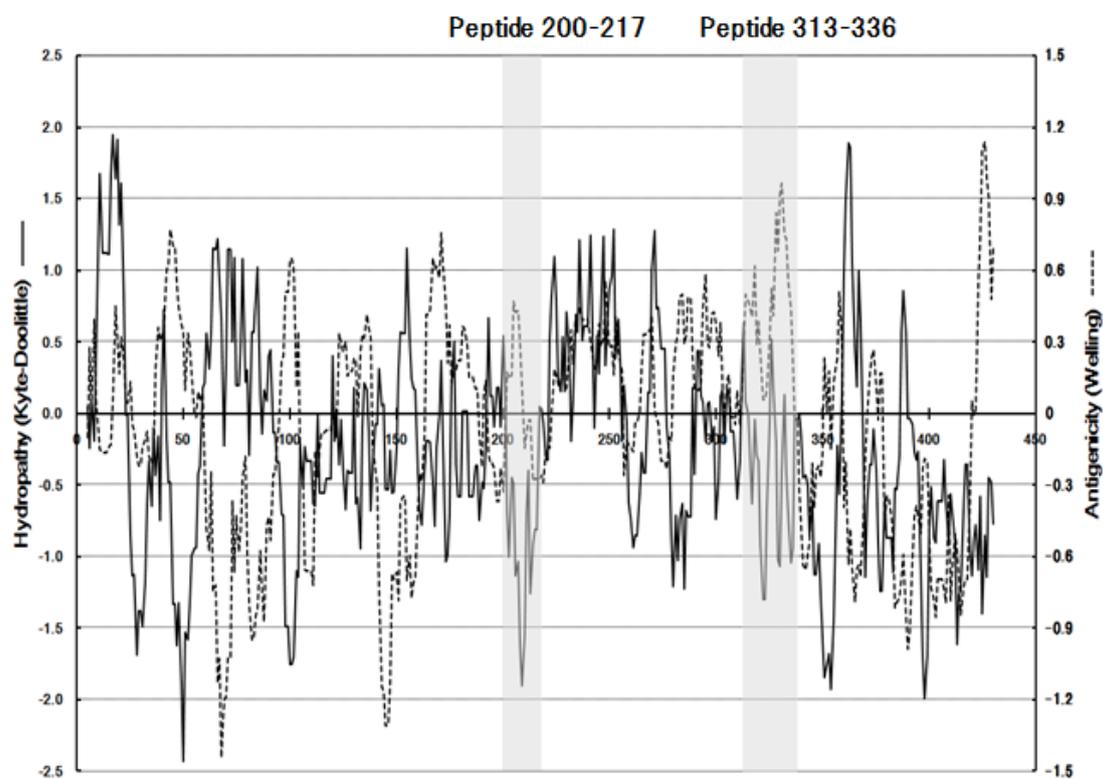


Fig. 8. 合成ペプチド抗原の設計

S. agalactiae 2603V/R株のSipアミノ酸配列をもとに、Kyte & Doolittleの疎水性指標(左軸)とWellingの抗原性指標(右軸)の解析を行った。抗原部位として200~217番目及び313~336番目の2か所を選択した。

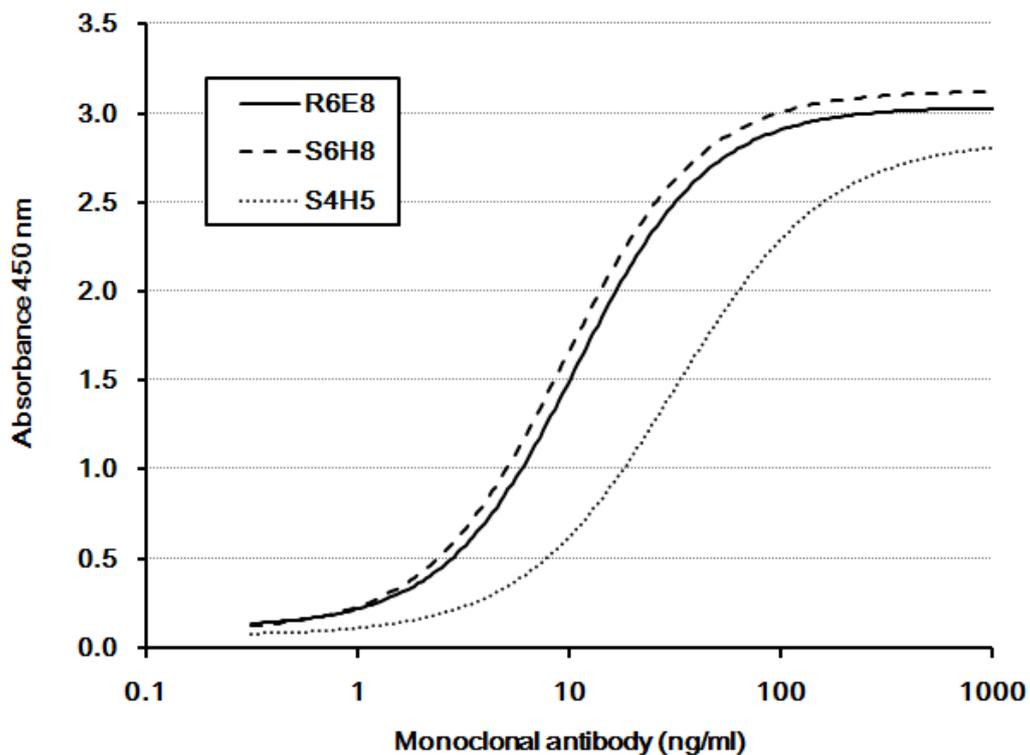


Fig.9. モノクローナル抗体のrSipIに対する親和性の評価

モノクローナル抗体R6E8, S6H8, 及びS4H5のrSipIに対する親和性をELISA法で評価した。450nmにおける吸光度が1.0の時の抗体濃度は、R6E8, S6H8, 及びS4H5で各々に、6.1, 5.1及び18.4 ng/mlであった。

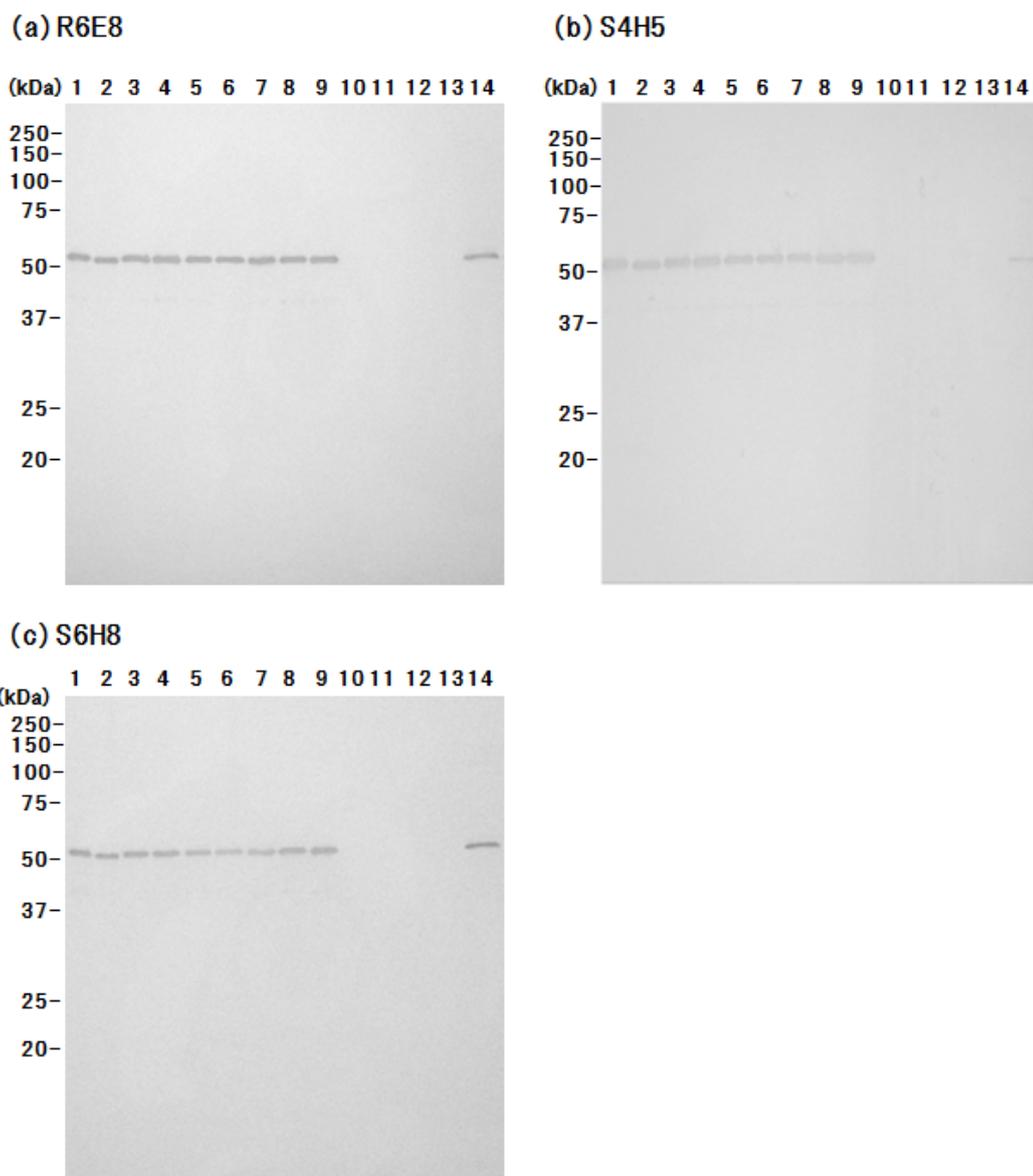


Fig.10. モノクローナル抗体の特異性評価

精製rSip及び粗菌体抽出液を12%SDS-PAGEに掛け、PVDF膜に転写した。これを抗Sipモノクローナル抗体を用いたWestern blotで染色した。1, GBS血清型Ia; 2, GBS血清型Ib; 3, GBS血清型II; 4, GBS血清型III; 5, GBS血清型IV; 6, GBS血清型V; 7, GBS血清型VI; 8, GBS血清型VII; 9, GBS血清型VIII; 10, *S. pneumoniae*; 11, *S. pyogenes*; 12, Group C *Streptococcus*. ; 13, *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*; 14, recombinant Sip.

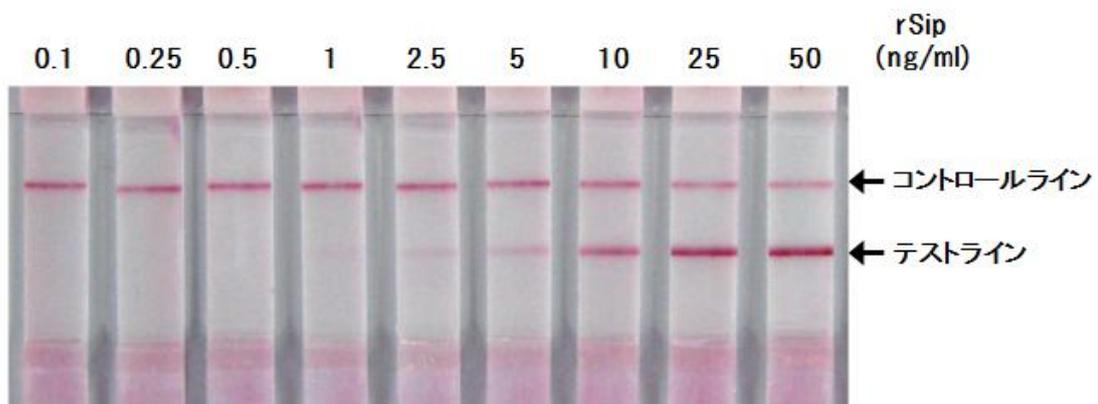


Fig.11. イムノクロマトによるrSipの検出限界

精製rSipを0.1～50 ng/mlに調製し、イムノクロマトを展開した。その結果、目視判定によるrSipの検出限界は0.5 ng/mlであった。

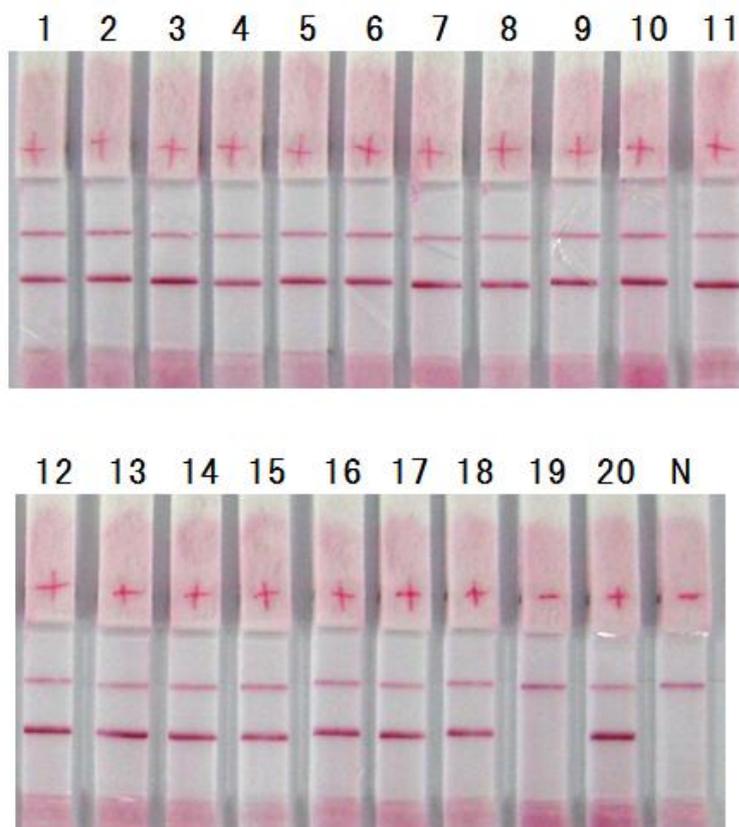


Fig.12. 既同定臨床分離GBSに対する反応性

臨床分離GBS 229株をTodd-Hewitt brothで一晩培養し、抗原抽出操作を行った試料を用いてイムノクロマトを実施した。結果の一部のみを示す。229株中228株はSip陽性を示したが、No.19の1株のみは陰性であった。1-20, 試験菌株番号; N, Negative control

```

1  ATGAAAATGA  ATAAAAAGGT  ACTATTGACA  TCGACAATGG  CAGCTTCGCT  ATTATCAGTC  GCAAAGTGTC  AAGCACAAGA  AACAGATACG
-----
91  ACGTGGACAG  CACGTACTGT  TTCAGAGGTA  AAGGCTGATT  TGGTAAAGCA  AGACAATAAA  TCATCATATA  CTGTGAAATA  TGGTGATACA
-----
181 CTAAGCGTTA  TTTCAGAAGC  AATGTCAATT  GATATGAATG  TCTTAGCAAA  AATAAATAAC  ATTGCAGATA  TCAATCTTAT  TTATCCTGAG
-----
-----T-----
271 ACAACACTGA  CAGTAACTTA  CGATCAGAAG  AGTCATACTG  CCACTTCAAT  GAAAATAGAA  ACACCAGCAA  CAAATGCTGC  TGGTCAAACA
-----
-----T-----
361 ACAGCTACTG  TGGATTTGAA  AACCAATCAA  GTTTCTGTTG  CAGACCAAAA  AGTTTCTCTC  AATACAATTT  CGGAAGGTAT  GACACCAGAA
-----
-----C-----
451 GCAGCAACAA  CGATTGTTTC  GCCAATGAAG  ACATATTCTT  CTGCGCCAGC  TTTGAAATCA  AAAGAAGTAT  TAGCACAAGA  GCAAGCTGTT
-----
-----G-----
541 AGTCAAGCAG  CAGCTAATGA  ACAGGTATCA  CCAGCTCCTG  TGAAGTCGAT  TACTTCAGAA  GTTCAGCAG  CTAAGAGGGA  AGTTAAACCA
-----
-----
631 ACTCAGACGT  CAGTCAGTCA  GTCAACAACA  GTATCACCAG  CTTCTGTTGC  CGCTGAAACA  CCAGCTCCAG  TAGCTAAAGT  AGCACCGGTA
-----
-----****-----
721 AGAACTGTAG  CAGCCCTAG  AGTGGCAAGT  GTTAAAGTAG  TCACTCCTAA  AGTAGAACT  GGTGCATCAC  CAGAGCATGT  ATCAGCTCCA
-----
-----
811 GCAGTTCCTG  TGA CTACGAC  TTCACCAGCT  ACAGACAGTA  AGTTACAAGC  GACTGAAGTT  AAGAGCGTTC  CGGTAGCACA  AAAAGCTCCA
-----
-----A-----
901 ACAGCAACAC  CGGTAGCACA  ACCAGCTTCA  ACAACAAATG  CAGTAGCTGC  ACATCCTGAA  AATGCAGGGC  TCCAACTCTA  TGTTCAGCT
-----
-----A-----
991 TATAAAGAAA  AAGTAGCGTC  AACTTATGGA  GTTAAATGAAT  TCAGTACATA  CCGTGCGGGA  GATCCAGGTG  ATCATGGTAA  AGGTTTAGCA
-----
-----
1081 GTTGACTTTA  TTGTAGGTAC  TAATCAAGCA  CTTGGTAATA  AAGTTGCACA  G TACTCTACA  CAAAATATGG  CAGCAAATAA  CATTTCATAT
-----
-----A A--C-----G-----
1171 GTTATCTGGC  AACAAAAGTT  TTA CTCAAAT  ACA AACAGTA  TTTATGGACC  TGCTAATACT  TGG AATGCAA  TGCCAGATCG  TGGTGGCGTT
-----
-----T-----
1201 ACTGCCAAC  ACTATGACCA  CGTTCACGTA  TCATTTAACA  AATAA
-----
-----

```

Fig.13. GBS KUB968の*sip* 遺伝子塩基配列

イムノクロマトでSip陰性を示したGBS KUB968株の*sip*遺伝子塩基配列を解析した。その結果、651-654番目の4塩基欠失が見出された。上段にATCC BAA-611株、下段にKUB968株の*sip*遺伝子塩基配列を示す。-, 共通塩基; *, 欠失部分

```

1 MKMNKKVLLT STMAASLLSV ASVQAQETDT TWTARTVSEV KADLVKQDNK
-----
51 SSYTVKYGDT LSVISEAMSI DMNVLAKINN IADINLIYPE TTLTVTYDQK
-----
101 SHTATSMKIE TPATNAAGQT TATVDLKTNQ VSVADQKVSL NTISEGMTPE
-----
151 AATTIVSPMK TYSSAPALKS KEVLAQEQAV SQAAANEQVS PAPVKSITSE
-----G-----
201 VPAAKEEVKP TQTSVSQSTT VSPASVAAET PAPVAKVAPV RTVAAPRVAS
-----QY HQLLLPLKHQ LQ*****
251 VKVVT PKVET GASPEHVSAP AVPVTTTSPA TDSKLQATEV KSVVPAQKAP
*****
301 TATPVAQPAS TTNAVA AHPE NAGLQPHVAA YKEKVASTYG VNEFSTYRAG
*****
351 DPGDHGKGLA VDFIVGTNQA LGNKVAQYST QNMAANNISY VIWQQKFYSN
*****
401 TNSIYGPANT WNAMPDRGGV TANHYDHVHV SFNK
*****

```

Fig.14. GBS KUB968のSipアミノ酸配列

イムノクロマトでSip陰性を示したGBS KUB968株におけるSipの全アミノ酸は、4塩基欠損によるフレームシフト変異の結果、終止コドンを生じて232残基であった。上段にATCC BAA-611株、下段にKUB968株のSipタンパクのアミノ酸配列を示す。-, 共通アミノ酸; *, 欠失部分

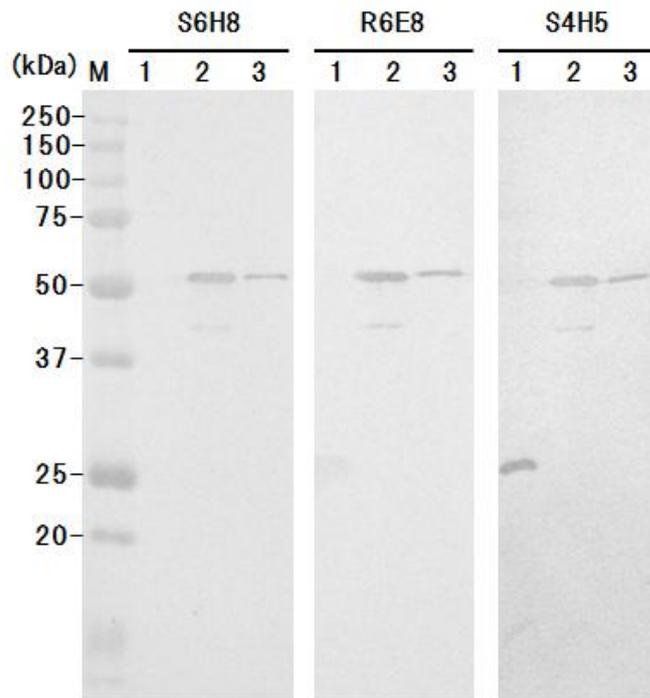


Fig.15. KUB968株が産生するSipの検出

KUB968株が産生するSipを3種モノクローナル抗体を使ったWestern blotによって検出した。Peptide200-217に対するモノクローナル抗体S4H5では約25kDaの位置にSipを検出出来たが、イムノクロマトに使用したS6H8とR6E8ではSipを検出できなかった。1, KUB968; 2, ATCC BAA-611; 3, rSip

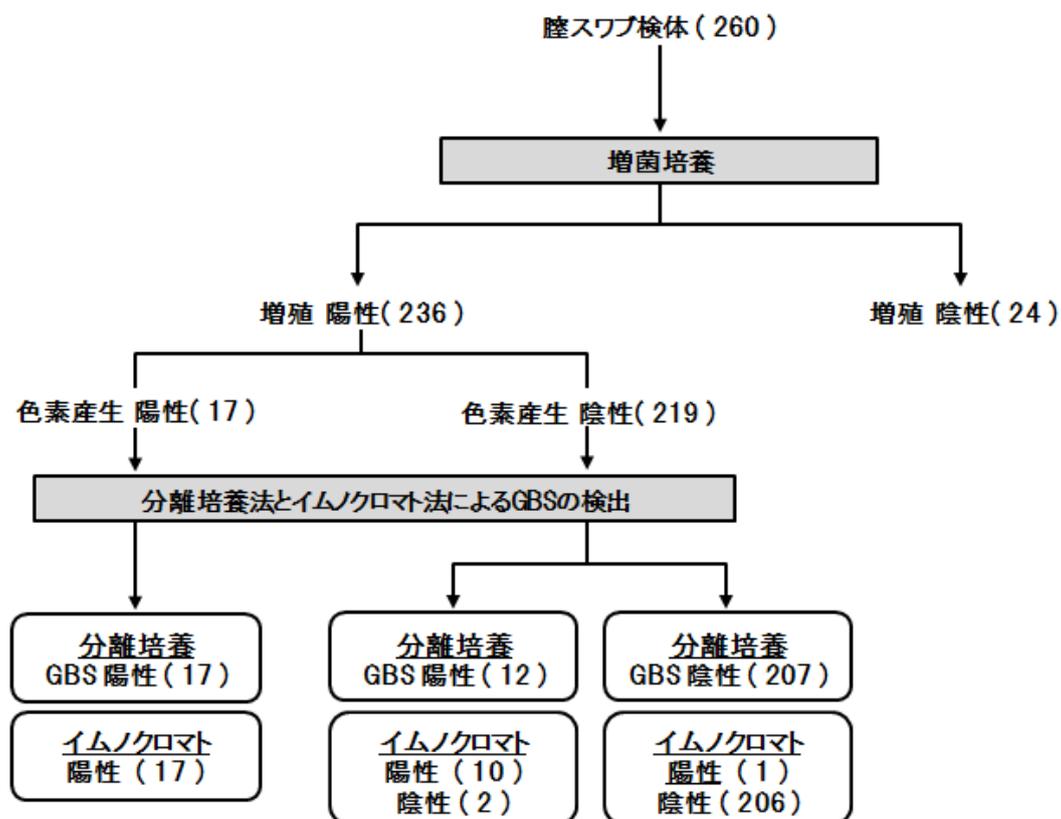


Fig.16. 腔スワブ増菌培養検体からのGBS検出

腔スワブ検体は増菌培養後、菌の増殖が確認された検体について、免疫クロマトとChrom-ID StreptoBを用いた分離培養を実施した。括弧内は検体数を示す。

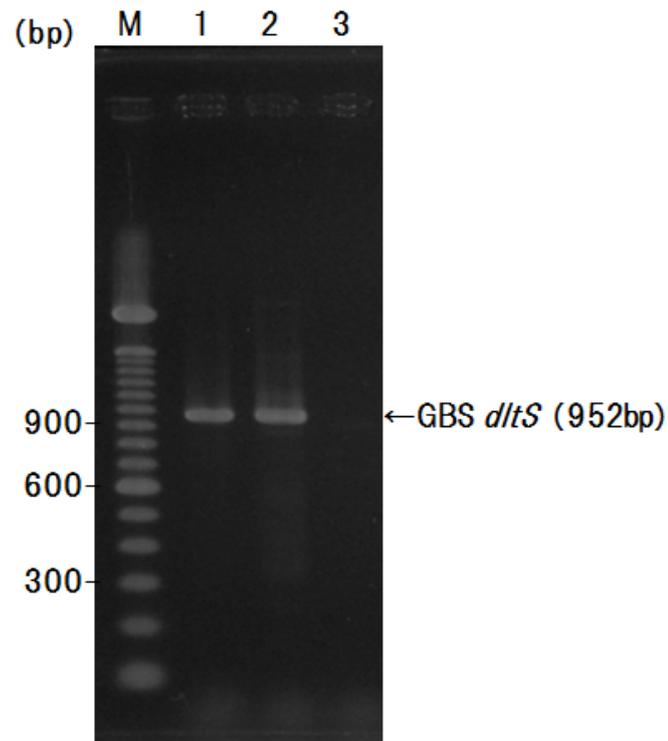


Fig. 17. Sip偽陽性検体からのPCRによるGBS遺伝子の検出

イムノクロマトでSip偽陽性を示した検体の輸送容器よりDNAを抽出後、PCRを実施した。偽陽性を示した検体でGBS特異遺伝子 *dltS* の増幅が確認された。1, 偽陽性検体; 2, 培養及びイムノクロマト陽性検体; 3, 培養及びイムノクロマト陰性検体