

# 研究経過報告書

1. 研究課題名 次世代シーケンサーを用いた、新生児敗血症の病原菌及び薬剤耐性遺伝子の迅速な同定の試み

2. 研究代表者氏名 屋宮 清仁

3. 研究発表

・当施設で過去 8 年間にコッホ現象の非特異的反応と診断された症例についての調査

屋宮清仁、三宅淳、後藤憲志 日本小児感染症学会 2022.11.5

・ Analysis of the Bacille Calmette-Guérin (BCG) lymphadenitis cases

(当施設における BCG リンパ節炎の臨床経過についての検討)

Kiyohito Okumiya, Atsushi Miyake, Kenji Gotoh. 欧州小児感染症学会 2023.5.28

・当院 NICU における Group B *Streptococcus* の水平伝播の検証

屋宮清仁、長井孝太、後藤憲志 日本小児感染症学会 2023. 11.25

4. 研究実績

当院の NICU において新生児敗血症を起こした症例の血液培養から *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus* : GBS) が分離された。妊娠中の母体の膣培養からは GBS は検出されていなかった。周囲に GBS の保菌者がいなかったかどうか調査したところ、この症例と同時期に入院していた新生児の鼻腔の監視培養から、3 人において GBS が検出されていた。敗血症を起こした症例の GBS 株と、この周囲の患者の 3 株の GBS が同一株なのかどうか遺伝子解析を行い、NICU 内で水平伝播を起こしたのかどうかを検証した。

【血清型の判定】

まずは免疫血清「生検」を用いて、GBS 4 株の血清型の判別を行なった。凍結保存していた 4 株の GBS を Todd-Hewitt Broth 培地を用いて一晩かけて増菌後、遠心分離を行なった。上清を捨てブタ臍臓エキスとフェノールレッドを加え、pH を調整しながら 37℃で 1 時間消化した。再度遠心し上清を捨て PBS で浮遊させ、120℃の温浴槽で 30 分加熱処理を行い、遠心後に上清を破棄し再度 PBS で浮遊させた。この菌浮遊液と GBS の免疫血清 (Ia、Ib、II、III、IV、V) をスライド凝集法により判定した。結果、4 株ともに血清型 V であった。本邦で小児の GBS 侵襲感染症から分離された GBS のうち、最も多いのは III 型 (54.8%)であり、V 型は 3.6%にすぎない比較的稀な血清型である。この時点で、同時期に検出された 4 株は全て同一株の可能性が高かった。

【MLST 解析】

次に、遺伝子解析の手法の一つである multilocus sequence typing : MLST 法を用いて菌の相同性の証明を試みた。ハウスキーピング遺伝子と呼ばれる、細菌の生存の根幹に関わる遺伝子で細菌毎に特異的な領域の塩基配列の差異を比較することで菌の相同性を検証する手法であり、GBS で使用される 7 つの領域について、それぞれの配列を解析し alleles を決定、7 つの alleles の組み合わせにより GBS のシーケンスタイプを確認した。GBS 4 株をそれぞれ増菌し、96℃で 10 分間加熱処理後にビーズカラムで破碎し、Qiagen DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。7 つの遺伝子領域である adhP、pheS、atr、glnA、sdhA、glcK、tkf のプライマーを作成し PCR を行なった。それぞれの PCR 産から、Qiagen PCR Purification kit を用いて不純物を除去し、遺伝子配列を決定した。インターネット上の公式データベースである pub MLST にて alleles を解析した結果、4 株とも全て adhP : 1、pheS :

1、Atr : 3、glnA : 2、sdhA : 2、glcK : 2、tkf : 2 であり、シーケンス type : ST-19 と決定した。

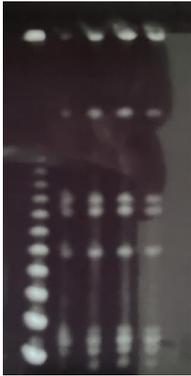
【PFGE 解析】

MLST 法はゲノム中の特定領域 (ハウスキーピング遺伝子) のみの比較であり、MLST のシーケンスタイプが同一だからといって同一株とは完全には言い切れない。そのため、制限酵素を用いて細菌の全ゲノムを切断し、DNA 断片の長さのパターンにより比較するパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) も併用した。

4 株を Todd-Hewitt Broth 培地で増菌。Salin EDTA を加え洗浄、Pett IV buffer を加え vortex 後に low melt agarose と混ぜて冷却しプラグを作成した。固まったプラグを Lysis solution と Lysozyme の混合液に浸し 37℃で一晩静置し、翌日に Lysis solution を除去後に ES solution と Proteinase K を混合し 50℃で 24 時間静置した。その後 PMSF 溶液に浸し、4 時間後に TE buffer で洗浄し溶菌とタンパク除去を完了した。制限酵素 Sma I を用い

て処理後に、電気泳動を行なった。結果、4 株とも同じパターンを認めた。

1 2 3 4



【結論】

新生児敗血症を起こした GBS 株と、その周囲の新生児の鼻腔から検出された GBS の 3 株は血清型 V、シークエンス type : ST-19、制限酵素処理を行なったバンドパターンも一致し、同一株と確定した。NICU 内で医療従事者を介して水平伝播したと考えられた。

【今後】

新生児にとって GBS は細菌性髄膜炎を起こす最も頻度の高い起因菌であるが、ワクチンは存在しないため予防が困難な感染症である。これまでに、NICU 内で保菌された状態としての GBS のアウトブレイクの報告は散見されるが、アウトブレイクから実際に侵襲性感染を起こした報告はないため、今回得られた成果を小児感染症学会で発表しつつ、論文投稿を進める予定としている。

また本年度の後半からは GBS 以外にも、NICU で敗血症を起こした症例から血液培養から分離された腸内細菌科細菌属やブドウ球菌属に関しても、遺伝子解析を行い薬剤耐性遺伝子と、実際の薬剤感受性との比較を行う研究を進めていく予定である。