

[原 著]

妊婦腔内の GBS スクリーニングにおける増菌培養法の有用性

岩崎瑞穂・小松 方・長坂陽子・福田砂織・阿部教行・中村彰宏
天理よろづ相談所病院臨床病理部

(平成 18 年 4 月 6 日受付, 平成 18 年 8 月 16 日受理)

B 群溶血性連鎖球菌 (Group B Streptococcus; 以下 GBS) は新生児における髄膜炎および敗血症に関与する主な起因菌の一つである。2002 年に改定された Center for Diseases Control and Prevention (CDC) の「新生児における GBS 疾病の予防に関するガイドライン」では、妊娠 35~37 週のすべての妊婦に対して腔と直腸内の GBS 検査を推奨している。今回 GBS の選択性増菌プロスである Todd-Hewitt broth (THB, 日研生物医学研究所) とコリスチン-ナリジクス酸加血液寒天培地 (CNA, 日研生物医学研究所) を組み合わせた増菌法の有用性を検討した。2005 年 2 月~11 月に当院産科外来を受診した妊娠後期 206 症例の妊婦から得られた 221 件の腔スワブを対象に 5% ヒツジ血液寒天 (日水製薬) への直接接種する方法 (直接法) と THB で増菌後 CNA へサブカルチャーする方法 (増菌法) との比較を行った。GBS 陽性は直接法で 12 件 (5%), 増菌法は 25 件 (11%) であった。直接法陽性の 12 件はすべて増菌法陽性であり、直接法のみ陽性例はなかった。

妊婦の腔 GBS スクリーニングは直接法より増菌法を用いた方法で検出率の向上を認めた。検査経費の削減を考慮した場合、直接法を省略し増菌法のみでの検査でスクリーニング可能であることが示唆された。

Key words: group B streptococcus, liquid media, screening in pregnant women

序 文

B 群溶血性連鎖球菌 (Group B Streptococcus; 以下 GBS) は腔や腸管に常在する菌の一つである。本菌は出産時に新生児へ垂直感染することで、髄膜炎および敗血症を発症させる主な起因菌となる。疾病管理予防センター (The Centers for Disease Control and Prevention; 以下 CDC) は 1996 年に新生児における GBS 疾患の予防に関するガイドラインを発行した¹⁾。その後、2002 年に改訂版が発行された²⁾。そこでは妊娠 35~37 週のすべての妊婦に対し、腔および直腸の GBS 保菌検査を推奨し、GBS が検出された場合は分娩時に抗菌薬を予防投与するよう勧告している。当院では 1996 年より妊娠後期に腔スワブを直接血液寒天培地に接種するスクリーニング (以下直接法) を実施

している。Bosch-Mestres³⁾や Elsayed⁴⁾は直接法と増菌法の GBS の分離率を比較し、明らかに後者が高いことを報告している。しかし、増菌法の併用が GBS の検出率にどれほど効果が認められるかについては不明な点が多い。また、国内における GBS の増菌培地は製品化されたキットが過去に存在しなかったため、増菌培地は自家調整が必要な点から、多くの検査室ではほとんど直接法による GBS スクリーニングがなされているのが現状である。今回 GBS の選択性増菌プロスである Todd-Hewitt broth (以下 THB, 日研生物医学研究所) とコリスチン-ナリジクス酸加血液寒天培地 (以下 CNA, 日研生物医学研究所) を検討する機会を得たため、本キットの有用性を検証したので報告する。

著者連絡先: (〒632-8552) 奈良県天理市三島町 200 番地
天理よろづ相談所病院臨床病理部
岩崎瑞穂
TEL: 0743-63-5611 内線 8665
FAX: 0743-62-5576
E-mail: microbiology@tenriyorozu-hp.or.jp

対象および方法

1. 対象

2005 年 2 月~11 月に天理よろづ相談所病院産科外来にて妊婦検診を受診した妊娠後期 (32~34 週) の妊婦 206 症例から採取された腔分泌物スワブ 221 検

体とした。

2. 方法

1) 腔分泌物スワブの採取

検体は腔前庭部から外陰部にかけて滅菌木軸綿棒(2φ×150 mm, 綿の太さ 4.8φ, 栄研器材)で擦過し, それを滅菌中試験管(滅菌 SP チューブ: 栄研器材)に入れて検査室へ提出されたものを用いた。

2) 分離培養, 同定

提出された腔分泌物スワブは採取した当日中に以下2法で培養検査を実施した。すなわち, 第1の方法は, 採取したスワブを5%ヒツジ血液寒天培地(以下BA, 日水製薬)の培地表面上層に直径3 cm程度の大きさで5~6回円状に塗り広げた後, エーゼで培地全面へストリークし, 35°C, 5% CO₂ 下で18~24時間培養後にGBS集落の有無を判定する方法(以下直接法)とした。第2の方法はTHB(colistin 10 μg/ml, nalidixic acid 15 μg/ml含有)中に腔スワブを10回程度上下回転させて洗い出し, 35°C好気環境下で18~24時間培養後, 増菌液10 μlをCNAへサブカルチャー後判定する方法(以下増菌法)とした。また, 直接法と増菌法実施時にBAとCNA間でGBSの発育に差があるか検討した。

GBSの同定は, 集落性状(湿潤, 大きさ, 透明度な

ど)からGBSが疑われる複数の集落をそれぞれ非選択培地で継代し, グラム染色による形態観察, カタラーゼ反応およびラテックス凝集反応(ストレップLA[®], デンカ生研)を使用した。

成 績

Table 1にGBSが検出された25例の直接法での血液寒天培地上の集落数(CFU/plate)およびTable 2に直接法と増菌法の比較成績を示した。BAおよびCNA間にGBSの検出率に差を認めなかった。またGBSの発育性に関しては若干の集落性状の違いはあるものの, いずれもGBSの特徴的な性状を呈した集落であった。221件中直接法でGBS陽性は12件(5%), 増菌法は25件(11%)あった($p=0.039$)。直接法陽性の12件はすべて増菌法陽性であり, 残り13件は増菌法のみ陽性であった。また, 直接法のみ陽性例は認めなかった。増菌液中のGBSの菌数はすべての検体で10⁵ CFU/plate以上であった。

Fig. 1に直接法陰性で増菌法陽性を示した検体のそ

Table 1. Colony count of 25 cases that *Streptococcus agalactiae* were detected by the direct culture on the sheep blood agar

Colony count (CFU/plate)	No.
(-)	13
=1	1
=10	3
=100	4
=1,000	4
Total	25

CFU, colony forming unit

Table 2. Comparison of detection rate of *Streptococcus agalactiae* between direct culture and enriched culture method

		Enriched culture		Total	(%)
		Positive	Negative		
Direct culture	Positive	12	0	12	(5)
	Negative	13	196	209	(95)
	Total	25	196	221	(100)
	(%)	(11)	(89)	(100)	



Fig. 1. Blood agar plates including colistin and nalidixic acid (CNA agar) of one specimen that was direct culture-negative (left) and enriched culture-positive (right).

それぞれの分離培地写真を示す。直接法では乳酸桿菌とブドウ球菌様集落の発育を認めるが、GBS を疑う集落の発育は認めず、増菌後の培地には純培養状に GBS の発育を認め、雑菌類の発育はほとんど認めなかった。なお、一部の検体でわずかにブドウ球菌などの共存菌の発育を認めたものの、GBS の集落観察を困難にする検体は認められなかった。

考 察

日本の新生児の GBS 感染症発症率は妊婦保菌者から出産した新生児の約 1~2% とされ、約 2,000 分娩に 1 例の割合と報告されている⁵⁾。新生児 GBS 感染を発症した場合、死亡率 17.8~22.2%、後遺症 10.8~20.4% と極めて予後不良なため⁵⁾、感染予防を徹底することが重要である。当院では GBS スクリーニングで陽性となった妊婦に対しては、ペニシリン系の薬剤を 2 週間投与して陰性を確認している。また、GBS のスクリーニングが最適な時期（妊娠 35~37 週）に腔および直腸部にて採取された材料で実施されることによって、早発性の新生児の GBS 疾患を減少させることが可能であるという報告もあり^{2, 6)}、出生前の GBS スクリーニング検査は重要となる。

1996 年に初めて発刊された CDC の「新生児 GBS 感染予防に関するガイドライン」には妊娠 35~37 週のすべての妊婦に腔および直腸内の培養法による GBS のスクリーニングを推奨しており¹⁾、さらに 2002 年の改定では、GBS 検査の検体収集法、培養法および薬剤感受性試験法の詳細な手順が追加された²⁾。これに伴い、GBS 検査のための改良培地や選択増菌ブrossの評価も報告された^{4, 7)}。国内の妊婦腔内の GBS の保菌率は、脇本らは 8.7~21.7%⁸⁾、寺久保らは 13.3%⁹⁾ および三嶋らは 23.0%⁹⁾ と報告したが、このように報告によって陽性率はさまざまである。これらの報告はいずれも検出法や母集団が異なるが、われわれの検討における直接法の陽性率は 5% と低値であった。しかし、増菌法を実施した場合 11% と上昇し、これらの方法とほぼ同等の成績を示した。今回われわれが用いた分離培地は非選択性 5% 羊血液寒天培地および選択性のある CNA 培地を用いて行ったが、これら培地間での検出率の差は認めなかった。しかし CDC ガイドラインでは、腔および直腸から材料を採取することを推奨しており、腔単独の検査よりも GBS の検出率は増加するという報告がある^{10, 11)}。CNA は選択性を有するため、直腸材料などの常在菌が多量に存在する場合は、非選択性の血液寒天培地を使用するよりも GBS の分離率が高くなることが予測されるが、今

回の検討では明らかにできなかった。しかし、少なくとも直腸材料より常在菌種の少ない腔材料では非選択性血液寒天培地でも使用できることが示唆された。直腸材料に関して、今回の研究では GBS 検査に関する検出の意義は明らかにできなかったが、腔および直腸採取と腔のみの採取で GBS の検出率に差を認めないとの報告も見られ¹²⁾、直腸採取による評価は今後の追跡調査が必要であると思われた。

増菌法を用いると直接法と比較して最終結果が出るまで 1~2 日間の追加検査所要時間が必要になり、従来から実施してきた直接法と比較して迅速に検査結果を提供できないことが予測される。しかし、増菌法を併用することにより、保菌者を多く検出することができ臨床的に有意であると考えられる。本院では臨床側からの要望で、妊娠 32~34 週の時期に GBS スクリーニングを実施し、その結果は次回の診察までに判明してれば良いと申し合わせているため、増菌法を実施したことによる時間の延長は問題とはならない。しかし、出産予定日付近の GBS スクリーニングにおいては、早発型感染症の予防や絨毛性羊膜炎の予防に関して適切な処置が必要になることから、迅速性もより求められる。最近では、細菌検査室をもたない医院でも GBS スクリーニング検査がなされており、GBS 検出を簡易にさせる点から色調で菌の有無を判定する簡易培地を用いた方法も報告されている⁹⁾。この方法は簡便であるが、直接法とほぼ同等の検出率であり、GBS の菌量が多い材料では迅速検出も可能であるが、菌量の少ない材料に関しては、やはり THB などによる増菌法の併用が必要となる。今後、選択性が高く、さらに迅速性の高い培地の開発が望まれる。

今回の成績では、増菌法で GBS の発育阻害をきたすような雑菌性の菌の過剰な発育はほとんど認めず、THB や CNA の選択性の強さが伺われた。増菌法に発育せず、直接法のみで GBS の発育を認めた例はなかった。同様に、Elsayed らの報告⁴⁾でも GBS 陽性 128 検体の腔および直腸スワブを使用した場合、直接法陰性-増菌法陽性の割合は 21% であったものの、直接法陽性-増菌法陰性の割合は 2.3% とわずかであった。したがって、検査費用を考慮した場合、直接法を省略し、増菌法のみで GBS スクリーニングが可能であることが示唆された。

文 献

- 1) Centers for Control Disease and Prevention. 1996. Prevention of Perinatal Group B streptococcal Disease. MMWR 45[RR-7]: 1-24

- 2) Centers for Control Disease and Prevention. 2001. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMWR 51[RR-11]: 1-22
- 3) Bosch-Mestres, J., R. M. Martin-Fernandez, M. T. Jimenez de Anta-Losada. 2003. Comparative study of three culture media for detecting group B streptococcus colonization in pregnant women. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 346-349.
- 4) Elsayed, S., B. Gregson, D. L. Church. 2003. Comparison of direct selective versus nonselective agar media plus LIM broth enrichment for determination of group B streptococcus colonization status in pregnant women. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 718-720.
- 5) 寺久保繁美, 一幡良利, 嶋田甚五郎, 他. 2003. 妊婦由来 B群レンサ球菌の血清型と抗体保有状況. *感染症誌* 77: 121-126
- 6) Rosenstein, N. E., A. Schuchat, 1997. Opportunities for prevention of prenatal group B streptococcal disease ; a multistate surveillance analysis. *Neonatal Group B streptococcal disease study group. Obstet. Gynecol.* 90: 901-906.
- 7) Heelan, J. S., J. Struminsky, P. Lauro, et al. 2005. Evaluation of a new selective enrichment broth for detection of group B streptococci in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 43: 896-897.
- 8) 脇本寛子, 矢野久子, 馬場重好, 他. 2005. Group B Streptococcus の垂直伝播予防. *感染症学雑誌* 79: 549-555.
- 9) 三鴨廣繁, 川添香子, 佐藤泰昌, 他. 1997. Group B Streptococcus 選択分離培地 GBS 培地 F の検討. *産婦の世界* 49: 55-58
- 10) Madani, T. A., G. K. Harding, M. Helewa, et al. 1998. Screening pregnant women for group B streptococcal colonization. *Infection* 26: 288-291
- 11) Badri, M. S., S. Zawaneh, A. C. Cruz, et al. 1977. Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J. Infect. Dis.* 135: 308-312.
- 12) Gupata, C., L. E. Briski. 2004. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3975-3977

Clinical Utility of Liquid Media on Screening in Pregnant Women for Vaginal Colonization of Group B Streptococcus

Mizuho Iwasaki, Masaru Komatsu, Yoko Nagasaka, Saori Fukuda,
Noriyuki Abe, Akihiro Nakamura
Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital

Group B streptococcus (GBS) is a leading cause of such serious neonatal infections as meningitis and sepsis. The Centers for Disease Control and Prevention in the United States has recommended universal screening of all pregnant women at 35-37 weeks' gestation for GBS with the use of a selective broth medium. We compared an enrichment method using selective Todd-Hewitt broth with subculture to colistin-nalidixic acid blood agar to a direct culture method with 5% sheep blood agar. A total of 221 vaginal specimens submitted for detection of GBS were included in the study. Twenty-five GBS isolates (11%) were recovered from enriched culture and 12 GBS isolates (5%) were recovered from direct culture. All isolates that were detected in the direct culture were also detected in the enriched culture. These findings show that the enriched culture method with selective Todd-Hewitt broth is more sensitive than the direct culture method, and because it is more costeffective, it may become replaced as the only method used.