

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明
セファロスポリン系薬低感受性を示すペニシリン感性 B 群レンサ球菌に関する研究

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学 / 耐性菌制御学・教授）
研究協力者 長野 則之（信州大学大学院医学系研究科・医療生命科学分野・教授
前所属：船橋市立医療センター）
長野 由紀子（国立感染症研究所 細菌第二部・協力研究員）
外山 雅美（船橋市立医療センター）

研究要旨

セフチブテン(CTB)ディスクで阻止帯を形成しない B 群レンサ球菌(GBS)のほとんどはペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌(PRGBS)であるが、ごく少数ながらペニシリン感性株(PSGBS)も存在する。この研究では CTB ディスクで阻止帯を形成しない PSGBS (CTB^rPSGBS) の分子学的解析を行った。同一医療機関において 2011 年 5 月～2012 年 1 月の 8 か月間に異なる患者から CTB^rPSGBS 6 株が検出され、全株が血清型 Ib であった。これらの解析対象株に加え、同期間に検出された血清型 Ib の PRGBS 2 株と PSGBS 1 株を比較に用いた。CTB^rPSGBS 6 株全てペニシリンとアンピシリンに感性であった。CTB^rPSGBS 株と PRGBS 株共にセファクロールの MIC は上昇していた(8～16 µg/ml)が、セフチゾキシムの MIC は PRGBS が >32 µg/ml に上昇していたのに対して CTB^rPSGBS の場合 0.75～1.5 µg/ml とわずかな上昇であった。CTB^rPSGBS 6 株は PBP2X に T394A、PBP2B に T567I を共有していた。加えて 3 株が PBP2X に G429S、他の 3 株が PBP1A に T145A を保有していた。PRGBS 2 株は PBP2X に A400V とキー置換の V405A 及び Q557E、PBP2B に T567I を共有していた。CTB^rPSGBS 株は全て ST1 に属していたが、PFGE プロファイルは相互に異なり、また、PRGBS のプロファイルとも異なっていた。PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の系統解析の結果、CTB^rPSGBS と PRGBS のグループは姉妹クレードを形成していた。CTB^rPSGBS と PRGBS は、一つの祖先型の PSGBS が PBP に異なる組み合わせでアミノ酸置換を獲得することによってそれぞれ独立して出現してきた可能性が考えられる。

A. 研究目的

ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 (PRGBS) についてはセフチブテン(CTB)ディスクによる簡便なスクリーニングが木村らによって提案されている。我々はこの CTB ディスク周囲に発育阻止帯を形成しない GBS の多くが、ペニシリンの MIC が ≥ 0.25 µg/ml の PRGBS であることを確認している。しかしながら、CTB ディスクで阻止帯を形成しない GBS でペニシリンの MIC が < 0.25 µg/ml のペニシリン感性株(PSGBS)が同一医療機関で 6 株検出された。本研究はこの CTB ディスクで阻止帯を形成しない PSGBS(CTB^rPSGBS)株 の PBP_s 遺伝子や遺

伝的関連性などの解析を目的とする。

B. 研究方法

2011 年 5 月～2012 年 1 月の 8 か月間に同一医療機関で検出された 6 株の CTB^rPSGBS (B1～B6)を解析対象とした。また、これら 6 株は全て血清型 Ib であったことから比較解析の目的で、当該施設で研究対象期間に検出されている血清型 Ib の PRGBS 2 株(A1、A2)と PSGBS 1 株(B7)を選択した。

CTB ディスク周囲の阻止帯測定は CLSI に従い Kirby-Bauer 法にて実施した。MIC 測定は CLSI の微量液体希釈法により行った。セフチゾキシム(CZX)の MIC 測定には

E テストを用いた。ペニシリン結合蛋白 PBP2X、2B、1A 遺伝子について完全長の塩基配列を決定した。MLST 解析には 7 種のハウスキーピング遺伝子 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK*、*tkl* を用いた。また、SmaI 消化 DNA の PFGE 解析を行った。PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の系統解析を行った。

倫理面への配慮

患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。本研究内容は、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)の対象外である。

C. 研究結果

PRGBS 2 株と CTB^rPSGBS 6 株 はいずれも CTB ディスク周囲に発育阻止帯を形成しなかった。ペニシリンの MIC は PRGBS が 0.5 µg/ml に対して CTB^rPSGBS は 0.06 ~ 0.12 µg/ml と感性であった。セファクロール (CCL) の MIC は PRGBS が 16 µg/ml、CTB^rPSGBS が 8 ~ 16 µg/ml とほぼ同様に上昇していた。CZX の MIC は PSGBS の場合に比較して PRGBS が >32 µg/ml に上昇していたのに対して CTB^rPSGBS では 0.75 ~ 1.5 µg/ml とわずかな上昇であった (Table 1)。

解析株の PBP2X、2B、1A のアミノ酸置換をみると PRGBS 2 株共に PBP2X に A400V 及びキー置換として確認されている V405A と Q557E が認められた。一方 CTB^rPSGBS 6 株は PBP2X に T394A を共有しており、加えて B1、B3、B5 の 3 株が G429S、他の B2、B4、B6 の 3 株が PBP1A に T145A を保有していた。また PBP2B には PRGBS と CTB^rPSGBS が T567I を共有していた (Table 2)。

PFGE 解析の結果、CTB^rPSGBS の B1 ~ B6 のプロファイルは相互に異なっていた。PRGBS 株の A1 と A2 は同一のプロファイルを示したが、それぞれ外来と入院の患者由来株であった。なお、CTB^rPSGBS の B1 と PRGBS の A2 は同一患者に由来していた

不明であるが、既報の PRGBS では認められていない。

が PFGE プロファイルは異なっていた。

MLST 解析の結果、PRGBS 2 株と CTB^rPSGBS 6 株 は全て ST1 と同定された。また、対象とした PSGBS は ST10 であった。

Figure 1 に PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の phylogram に MLST 解析の結果を加えたものを示す。なお解析には既報の R1 ~ R8 及び 1 ~ 8 の PRGBS 株、既報の N1 ~ N4 の新生児感染症由来 PSGBS 株及び C1、C2 の成人由来 PSGBS 株も加えた。CTB^rPSGBS 6 株は一つのクレードを形成し、さらに本研究の A1、A2 と既報の R3、R4 の PRGBS 株で形成されるクレードの姉妹群として位置付けられ、これらの株は全て ST1 に属していた。

D. 考察

PRGBS についてはその出現とその分子学的メカニズムに関する我々の最初の報告以降、米国やカナダからも報告されたがいまだ希である。国内においては我々の後続研究で、GBS の臨床分離株における PRGBS の増加や多剤耐性化傾向、さらにはそのような多剤耐性 PRGBS クローンと院内伝播との関連性などを報告してきている。これら PRGBS 株の殆どが祖先型の genotype である ST1 を含む Clonal complex 1 に属している。

本研究では CTB^rPSGBS の分子学的特性を調べた。これまでペニシリン感性β溶血性レンサ球菌において CTB ディスク周囲に増殖阻止帯が認められない株や CCL の MIC に上昇が認められる株は報告されていない。CTB^rPSGBS に共通する PBP2X の T394A と PBP2B の T567I は我々の既報の PRGBS 株に認められているが、これらのアミノ酸置換のβ-ラクタム系薬耐性への関与については不明である。また、PBP2X の G429S は、既報の PRGBS に認められている G429D と同じアミノ酸位の置換である。PBP1A の T145A はトランスグリコシラーゼドメインの置換で CTB 耐性への関与は

CTB^rPSGBS 6 株の PFGE プロファイルが相互に異なっていたことから、短期間にお

ける単一クローンの院内伝播の可能性は低いものと考えられた。また、これらの CTB^rPSGBS 株のプロファイルは同一血清型の PRGBS 2 株のプロファイルとも異なっていた。

興味深いことに CTB^rPSGBS の B1 が分離された同じ患者の同種材料から 4 日後に PRGBS の A2 が分離されており、両株は PBP2B に T567I を共有していた。しかしながら PBP2X に共通の置換は認められなかった。我々は当初 CTB^rPSGBS が PBP のアミノ酸置換を蓄積することで PRGBS へと変化していくものと推測していたが、このようなアミノ酸置換の結果と PFGE の結果から我々の推測は否定された。MLST 解析で CTB^rPSGBS 6 株と PRGBS 2 株が全て ST1 に属していたこと、また系統解析で CTB^rPSGBS と PRGBS のグループが姉妹クレードを形成していたことから、CTB^rPSGBS と PRGBS は、一つの祖先型の PSGBS が PBP に異なる組み合わせでアミノ酸置換を獲得することによってそれぞれ独立して出現してきた可能性が考えられる。なお、同一患者で 70 日の間隔において CTB^rPSGBS が検出されていることからこのクローンの宿主内での安定性が示唆される(データ示さず)。

EUCAST では溶血性レンサ球菌でペニシリン感性の場合、β-ラクタム系薬に感性と推定されると言及している。CTB や CCL は GBS 感染症の治療薬ではないが、本研究により新しく認識された CTB^rPSGBS クローンの存在から、ペニシリン感性の GBS においても PBP のアミノ酸置換や置換位によっては経口セファロスポリンなど他の<β-ラクタム系薬の MIC が上昇することが確認された。このことは PBP の置換とβ-ラクタム系薬の感受性プロファイルとの関連性を理解するうえで重要であろう。

E. 結論

1. 血清型 Ib に見出された CTB^rPSGBS クローンはペニシリン感性でありながら特定のセファロスポリン系薬の MIC が上昇する特異的な薬剤感受性プロファイルを示していた。

2. CTB^rPSGBS の形成するクレードは PRGBS で形成されるクレードの姉妹群として位置付けられ、これらの株は全て ST1 に属していた。この知見から CTB^rPSGBS と PRGBS が、一つの祖先型の GBS が PBP に異なる組み合わせのアミノ酸置換を獲得することで独立して出現してきた可能性が考えられる。
3. CTB や CCL は GBS 感染症の治療薬ではないが、新たに認識された CTB^rPSGBS クローンの存在はペニシリン感性の GBS においても PBP のアミノ酸置換や置換位によっては他のβ-ラクタム系薬も感性であると推定することが困難な可能性を示している。このことは PBP の置換とβ-ラクタム系薬の薬剤感受性プロファイルとの関連性を理解するうえで重要と思われる。

F. 健康危険情報

B 群レンサ球菌は新生児や高齢者における敗血症や髄膜炎等重篤感染症の重要な原因菌のひとつで、ペニシリン系薬剤が治療の第一選択薬となっている。従って治療と医療関連感染対策の観点から今後も継続して PRGBS や多剤耐性 PRGBS、さらには CTB^rPSGBS の動向を監視していく必要がある。

なお、米国 FDA は 2013 年 6 月 12 日付連邦官報に PRGBS の存在は将来的に公衆衛生上脅威となる可能性があるという見解を掲載している。また CDC 発刊の Threat Report 2013 でも、PRGBS の存在は分娩時予防投与戦略を脅かし新生児早発型感染症の治療失敗につながる可能性があるという警告している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noriyuki Nagano, Yukiko Nagano, Masami Toyama, Kouji Kimura, Keigo Shibayama, and Yoshichika Arakawa. Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 3406-3410, 2014.

2. 学会発表

- ・ 第 41 回薬剤耐性菌研究会
セフチブテンディスクで阻止帯形成
が認められないペニシリン感性 B 群
レンサ球菌の分子学的解析
- ・ 第 24 回日本臨床微生物学会総会
セフチブテンディスクで阻止帯形成
が認められないペニシリン感性 B 群
レンサ球菌の分子学的解析

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきもの無し