

## 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 ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究

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 木村 幸司（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・講師）

#### 研究要旨

B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。今回は、羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する多剤耐性 PRGBS 株の解析(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)、MLST による PRGBS とペニシリン感性 GBS(PSGBS)の比較解析(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)、臨床分離 A 群連鎖球菌(GAS)にもペニシリン低感受性株が出現しているのかの検討(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)、PRGBS を含むベータラクタム低感受性 GBS の分類法の提案(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)を行った。

#### A. 研究目的

B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、新生児の敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であるとともに、高齢者や糖尿病患者等に侵襲的な感染症を引き起こす。GBS は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。これまでに、PRGBS の検出には、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテンの各ディスクを用いたディスク拡散法が有効であること

(Kimura K., et al. JCM 2009)、数週間の間隔をあけて遺伝的に同一と考えられる PRGBS 二株が分離された症例 (Nagano N., Kimura K., et al. JAC 2009)、PRGBS の PBP 遺伝子の変異箇所の解析から、PRGBS が多源的に出現していること(Nagano N., Nagano Y., Kimura K., et al. AAC 2008; ASM Microbe 誌の Journal Highlight に取り上げられる)、Multilocus sequence typing (MLST) により、国内の PRGBS は、ST458 と ST1 を含む CC から多く出現しているが、その他遺伝的に関連性の薄い菌株群からも多源的に出現していること (Kimura K., et al. JAC 2011)、2007-2008 年に分離された妊婦膣スワブ由来 141 株の GBS の中からは PRGBS は検出できず、妊婦膣スワブ由来 GBS では PRGBS は稀であること (Kimura K., et al. JJID 2013)、PRGBS は 1990 年代に

出現したと推定されること(Kimura K., et al. JJID 2013)、PRGBS は多剤耐性化傾向があること (Kimura K., et al. JAC 2013)、広く国内で使用されている、A 社の自動感受性測定機器では、PRGBS の半数程度(13/28, 46.4%)がペニシリンに対する感受性を正しく判定できないこと (Kimura K., et al. JAC 2013)、PRGBS の検出を促進するために、GBS 検出用 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を開発 (Kimura K., et al. JJID 2013)、また、GBS はPBP2X のみならず PBP1A にも変異を獲得するとセフチゾキシム高度耐性を獲得すること (Kimura K., et al. JAC 2013)などを明らかにしてきた。

今回は、羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する PRGBS 疑い株の解析(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)、MLST による PRGBS とペニシリン感性 GBS(PSGBS)の比較解析(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)、臨床分離 A 群連鎖球菌 (GAS)にもペニシリン低感受性株が出現しているのかの検討(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)、PRGBS を含むベータラクタム低感受性 GBS の分類法の提案(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)を行った。

## B. 研究方法

通常、GBS は $\beta$ 溶血を示すが、ごく稀に $\beta$ 溶血しない GBS が分離されることがある。これまで PRGBS はすべて $\beta$ 溶血を示してきたが、今回、 $\beta$ 溶血しない臨床分離 PRGBS 疑い株を入手した。この株は、血液検体からも分離されており、高い病原性を有していると考えられる。また、同一医療施設より、類似の株が1年ほどの間隔をあけて分離されており、医療環境に長期間にわたり定着しやすい株である可能性がある。今回、この $\beta$ 溶血しない PRGBS 株のペニシリン低感受性機構及び $\beta$ 溶血しない理由を解析した。これら $\beta$ 溶血しない PRGBS 疑い株について、申請者らが開発した PRGBS を検出できるディスク拡散法(Kimura K., et al. JCM 2009)も実施した。また、平板希釈法により、正確な薬剤感受性試験を行い、

PRGBS であることを確認した。これらの株の PBP2X 遺伝子配列を決定し、変異の有無を確認した。 $\beta$ 溶血は、ヘモリジンにより担われていることが知られている。ヘモリジンの発現低下、機能欠損を念頭に、ヘモリジン遺伝子の配列及びヘモリジン遺伝子を調節する転写因子群の配列を検討した。類似の株群が、同一の遺伝的背景をもつかを MLST 法及び Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)法により検討した (Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

これまで、PRGBS は、主に高齢者の呼吸器系検体から分離されており、MLST 解析により、国内分離 PRGBS 株の多くは Sequence type 1 group に属していることが明らかになっている(Kimura K., et al., JAC 2011)。しかしながら、成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性 GBS の MLST 解析の報告が少なく、PRGBS が成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性 GBS と同じような遺伝的背景をもっているのか、それとも異なる遺伝的背景であるのかは不明である。今回、38 株の成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性 GBS の MLST 解析を行った。成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性 GBS 株の MLST 解析を行い、既に解析が終わっている PRGBS との遺伝的背景について比較検討した(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

臨床分離 GAS は、一様にベータラクタムに感性であると考えられているが、日本からベータラクタム低感受性 GAS の存在を示唆する論文が発表された(Ogawa T., et al. FEMS Microbiol Lett 2011; 318:143-51.)。我々は、その真偽を明らかにするために、国内の 256 株の GAS を集め、PRGBS が高い MIC 値を示すことが明らかになっている 5 つのベータラクタム系薬(ペニシリン、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテン、セファクロル)について、平板希釈法により、MIC 値を決定した。また、比較的 MIC 値の高い株については、PBPs の遺伝子配列を決定した(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)。

PRGBS を含め、ベータラクタム低感受性 GBS(Group B Streptococcus with

reduced beta-lactam susceptibility, GBS-RBS)の報告が増加傾向にある。我々は、これらの PBP<sub>s</sub> の変異箇所を比較し、GBS-RBS の分類を考案した(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

#### 倫理面への配慮

今回の研究は、主に菌株を対象とした研究であり、倫理審査を必要とする研究計画は含まれていない。

#### C. 研究結果

羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する PRGBS 疑い株は、PBP<sub>2X</sub> に変異を持ち、かつマクロライド系及びフルオロキノロン系耐性である多剤耐性 PRGBS であることが明らかになった。MLST 解析、PFGE 解析により、類似の 3 株は、遺伝的に近縁な菌株群であることが明らかになった。これらの株は、チョコレート寒天培地上では、通常の GBS と同等の大きさのコロニーを形成すること、PRGBS を検出できるディスク拡散法(Kimura K., et al JCM 2009)では、正しく PRGBS と判定可能であることを明らかにした。また、ヘモリジン遺伝子を含む *cyl* operon のうち、*cylK* 遺伝子に部分欠損があることを見いだし、この部分欠損が非溶血性のコロニーを形成する一因である可能性を見いだした(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

PRGBS 中でもっと頻度の高い ST458 (10/19, 53%)は、PSGBS 中では認められなかった。36 株の PSGBS は、6 つの異なる ST で ST1/19/10 の group に属し、残りの 2 株は異なる group である ST23 であった。このことから、PRGBS の ST の分布は、単に PSGBS の ST 分布をそのまま反映しているのではないことが示唆された(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

256 株の GAS の薬剤感受性試験により、明らかなベータラクタム低感受性 GAS は検出されなかった。我々は、念のため、比較的 MIC 値の高い 8 株について解析を行ったが、3 株が *Streptococcus pyogenes*, 5 株

が A 群抗原を持つ *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)であった。これらの株の PBP<sub>s</sub> を解析したが、ベータラクタム低感受性を付与すると考えられる変異は認められなかった(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)。

我々は、十分に解析がなされている GBS-RBS に関する論文を熟読し、PBP<sub>s</sub> の変異の箇所によって、GBS-RBS を Class I-IV に分類し、更に PBP<sub>2X</sub> での変異の種類により、Subclass “a”, “b”, “c”, “z”に分類する分類法を考案した(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

#### D. 考察

羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する多剤耐性 PRGBS 株については、医療現場の細菌検査室で誤同定を引き起こす可能性があるため、このような特殊な多剤耐性 PRGBS 株の存在を留意する必要がある(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

今回の PSGBS の MLST 解析では、PRGBS 中でもっと頻度の高い ST458 は、検出されず、ST458 の由来は依然、不明であり、その由来を明らかにすることは今後の課題である(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

今回の我々の GAS256 株の解析の結果からは、日本において、ベータラクタム低感受性 GAS は、存在しない、もしくは、存在するとしても極めて稀であるということが示唆される。GAS についても、正確な薬剤感受性試験を基にした調査が引き続き行われることが望まれる(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)。

我々の考案した GBS-RBS の分類法により、今後、情報が蓄積され、分類から薬剤感受性試験の結果が推定できるようになるかも知れない。今後、広く世界で我々の分類法が使用され、情報が蓄積されていくことが望まれる(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

#### E. 結論

我々が世界に先駆けて報告した新規耐性菌である PRGBS に関しては、我々のグループが一連の研究により知見を重ねてきたが、不明な点が未だ多々あり、十分に研究され尽くしたとは言いがたい。今後、PRGBS に関する研究をさらに拡充し、十分な解析が行われることが望まれる。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) **K. Kimura**, N. Nagano, **Y. Arakawa** (2015)

“Classification of Group B Streptococci with Reduced  $\beta$ -Lactam Susceptibility (GBS-RBS) Based on the Amino Acid Substitutions in Penicillin-binding Proteins (PBPs)”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** in press

2) T. Suzuki, **K. Kimura**, H. Suzuki, H. Banno, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, **Y. Arakawa** (2015)

“Have Group A Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility Emerged?”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** in press

3) R. Yamada, **K. Kimura**, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2015)

“Comparative Analysis of Penicillin-Susceptible and Non-Susceptible Isolates in Group B Streptococci by Multilocus Sequence Typing”

**Japanese Journal of Infectious Diseases** in press.

4) H. Banno, **K. Kimura**, Y. Tanaka, H. Kitanaka, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2014)

“Characterization of Multi-drug-Resistant Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS) Forming Small Non- $\beta$ -hemolytic Colonies on Sheep Blood Agar Plates”

**Journal Clinical Microbiology** 52(6): p2169-71.

### 2. 学会発表

1) 長野則之、長野由紀子、外山雅美、**木村幸司**、柴山恵吾、**荒川宣親**(2015)

“ペニシリン低感受性B群レンサ球菌株の血清型の変遷とその分子生物学的特性”  
第26回日本臨床微生物学会総会学術集会（口頭発表） 東京 1月31日、2月1日 0-005

2) 和知野純一、**木村幸司**、山田景子、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、**荒川宣親**(2015)

“ESBL産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易識別法の開発”  
第26回日本臨床微生物学会総会学術集会（口頭発表） 東京 1月31日、2月1日 O-162

3) 鈴木健史、**木村幸司**、鈴木寛、坂野弘嗣、金万春、和知野純一、山田景子、**荒川宣親**(2014)

“ $\beta$ -ラクタム系抗菌薬低感受性A群 $\beta$ 溶血性レンサ球菌は国内で出現したのか？”  
第43回薬剤耐性菌研究会（口頭発表） 加賀市 10月31日-11月1日

4) 中村元気、和知野純一、佐藤夏巳、**木村幸司**、山田景子、金万春、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、**荒川宣親**(2014)

“ESBL産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発”  
第43回薬剤耐性菌研究会（口頭発表） 加賀市 10月31日-11月1日

5) 山田景子、金万春、岡本陽、和知野純一、**木村幸司**、**荒川宣親** (2014)

“ニワトリIgY抗体を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌MRSAの検出”  
第51回日本細菌学会中部支部会（口頭発表） 金沢 10月17日18日

6) 伊藤亮太、進藤有一郎、小林大介、安藤昌彦、金万春、和知野純一、山田景子、**木村幸司**、八木哲也、長谷川好規、**荒川宣親**(2014)

“肺炎患者より検出された*Klebsiella pneumoniae*の分子疫学的解析”  
第51回日本細菌学会中部支部会(口頭発表)  
金沢 10月17日18日

7) 金万春、和知野純一、山田景子、**木村幸司**、**荒川宣親**(2014)

“*Serratia marcescens*より発見された新規プラスミド媒介性アミノ配糖体アセチル化酵素の解析”  
第51回日本細菌学会中部支部会(口頭発表)  
金沢 10月17日18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他