

## 劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来 G 群レンサ球菌の細菌学的検討

研究分担者：池辺 忠義（国立感染症研究所細菌第一部）

**研究要旨** 劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、 $\beta$  溶血性レンサ球菌である。近年、 $\beta$  溶血性レンサ球菌のうち、G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の報告数が増加している。本研究では、10道県における G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の *emm* 型および薬剤感受性試験を行った。10道県で14症例の劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こした G 群レンサ球菌が収集された。地域間で *emm* 型の違いは見られなかった。薬剤感受性試験の結果、すべての株でペニシリン系薬剤に対して感受性であった。一方、エリスロマイシン、クリンダマイシン耐性株が2株みられた。これら耐性株は、ともに *ermB* 遺伝子を保有しており、*emm* 型は *stG245* 型であった。

### A. 研究目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、 $\beta$  溶血性レンサ球菌であり、小児に咽頭炎などを引き起こすありふれた病原体である。近年、 $\beta$  溶血性レンサ球菌のうち、特に G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の報告数が増加している。しかしながら、近年どのような菌種でどのような型が流行しているか、また薬剤耐性株が流行しているのか明らかでない。そこで、本研究では、10道県における G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症に注目し、劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の *emm* 遺伝子型を決定すること、および、6 薬剤に対する薬剤感受性試験を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. 生物材料及培養方法

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、10道県より集められた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome.

JAMA 269: 390-391. に基づいて定められた感染症法の診断基準に従った。G 群レンサ球菌の生育には、固形培地としてコロニア 5 % 羊血液寒天培地 (Becton Dickinson) を使用した。薬剤感受性試験に用いる液体培地として、ヘモサブリメント (栄研化学) を含むミュラーヒントンブイオン液体培地 (栄研化学) を使用した。

#### 2. ゲノム DNA の調製

血液寒天培地に塗末した菌を 90  $\mu$  L の TE (pH 8.0) に懸たく後、mutanolysin (Sigma) を添加し、37°C で 1 時間処理した後、DNA 精製キットを用いて精製した。

#### 3. 塩基配列の決定

Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer、あるいは、ABI 3500 Genetic Analyzer を用いて、塩基配列を決定した。

#### 4. *emm* 遺伝子型別

アメリカ CDC のホームページの方法に従い、primer 1 (TATT (C/G) GCTTAGAAAATT AA)、primer 2 (GCAAGTTCTTCAGCTT GTTT) を用いて、PCR により *emm* 遺伝子を増幅する。得られた PCR 産物を High Pure PCR Product purification kit (Roche) を用いて精製し、*emm* seq 2 (TATTGCTTAGAAAATT

AAAAACAGG) プライマーを用いてシーケンス反応を行い、sephadex G-50を用いて精製後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をBlast-*emm* 検索サイト (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>) に必要事項を入力後送信し、*emm* 遺伝子型を決定した。

## 5. 薬剤感受性試験

分離株の薬剤感受性試験は、ペニシリンG、アンピシリン、セフトキシム、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リネゾリド6薬剤について、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) により推奨されている微量液体希釈法で測定した。各薬剤の耐性のブレイクポイントはCSLIの基準に従い、判定した。

## 6. 薬剤耐性遺伝子の検出

エリスロマイシン、クリンダマイシン耐性株が保有する各耐性遺伝子 (*mefA*, *ermA*, *ermB*) 遺伝子の検出は、De Azavedoら、および、Sutcliffeらの論文に記載されたプライマーを用いてPCRを行い、電気泳動後各薬剤耐性遺伝子の有無を決定した。

(倫理面への配慮)

Helsinki宣言に法り、患者の尊厳を守り、症例記録票では患者氏名は連結可能匿名化するため、プライバシーは保護される。患者情報については診療録から匿名化して情報を抽出し、解析および発表において個々の患者が同定されることはないため、患者に対する不利益は無い。また、インフォームドコンセントの必要性は該当しない。

## C. 研究結果

### 1. 10道県から分離された劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の群別、G群レンサ球菌の菌種

10道県から劇症型溶血性レンサ球菌感染症の患者由来株43株の溶血性レンサ球菌を収集した。道県別では、北海道11株、山形県2株、宮城県4株、新潟県11株、三重県2株、高知県2株、福岡県10株、沖縄県1株であった。そのうちA群レンサ球菌によるものが27株、G群レンサ球菌によるものが14株、B群レンサ球菌によるものが1株、C群レンサ球菌によるものが1株であった(表1)。

表1. 2016年に10道県で分離された劇症型レンサ球菌感染症患者分離株

	A群	B群	C群	G群	計
北海道	8	0	0	3	11
山形県	0	0	1	1	2
宮城県	2	0	0	2	4
新潟県	7	0	0	4	11
三重県	2	0	0	0	2
奈良県	0	0	0	0	0
高知県	2	0	0	0	2
福岡県	5	1	0	4	10
鹿児島県	0	0	0	0	0
沖縄県	1	0	0	0	1
計	27	1	1	14	43

G群レンサ球菌の菌種は、13株が*Streptococcus dysgalactiae subspieces equisimilis*であり、1株が*Streptococcus anginosus*であった。

### 2. G群レンサ球菌の*emm*型

*Streptococcus dysgalactiae subspieces equisimilis*として同定された13株について*emm*型を決定した。その結果、*stG6792*, *stG245*, *stG485*型が各3株、*stG10*, *stG6*が2株ずつであった(図1)。

### 3. G群レンサ球菌の薬剤感受性試験

*Streptococcus dysgalactiae subspieces equisimilis*であった13株について薬剤感受性試験を行った。調べた薬剤は、ペニシリンG、アンピシリン、セフトキシム、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リネゾリドである。薬剤感受性試験を行った結果、ペニシリンG、アンピシリン、セフトキシム、リネゾリドについてはすべての株で感受性であった。一方、エリスロマイシン、クリンダマイシンについては2株がエリスロマイシン、クリンダマイシン両方に耐性であった。これら2株の耐性遺伝子の保有をPCR法により調べた結果、2株とも*ermB*遺伝子を保有していた。

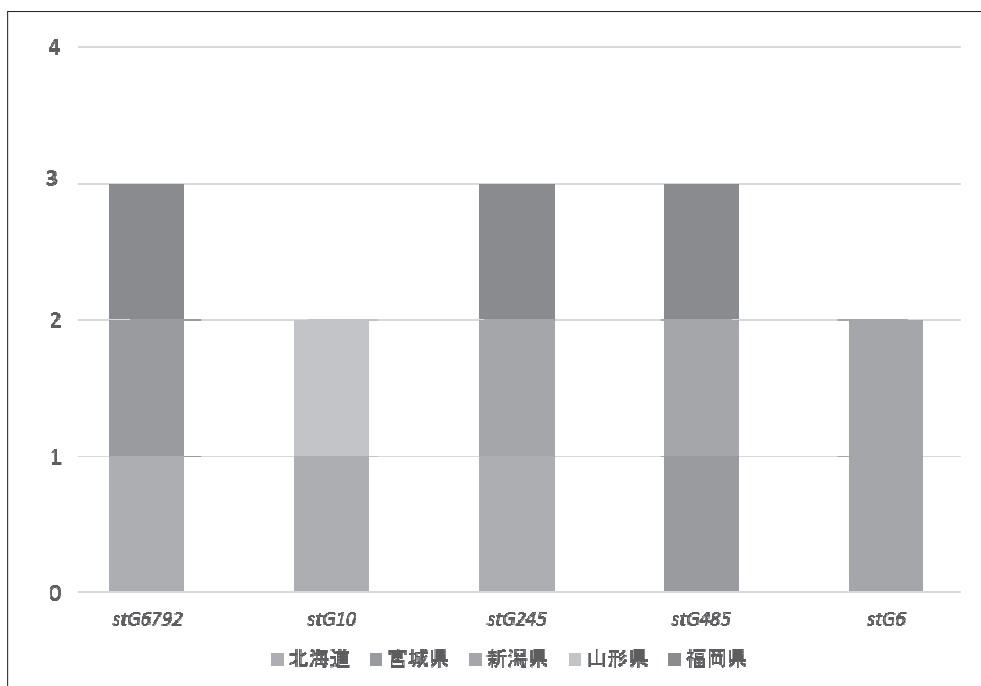


図1. 2016年に10道県で分離された劇症型G群レンサ球菌感染症患者分離株13株のemm型

#### D. 考察

劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来のG群レンサ球菌はstG6792、stG245、stG485型が3株と多かったが、特定の型が多いわけではなかった。また、それぞれのemm型について道県別にみても、特定の県で特定の型がみられるのではなく、3株とも異なる道県で分離されていることが判明した(図1)。このことから、現段階では特定の遺伝子型が特定の県で増えているのではないことが示唆された。

薬剤感受性試験を行った結果、2株においてエリスロマイシンとクリンダマイシンに対して耐性を示し、薬剤耐性遺伝子としてermB遺伝子を保有していた。この2株のemm型は、stG245型であった。クリンダマイシンは、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の治療に推奨されていることから、今後このstG245型のクリンダマイシン耐性株の動向を注視する必要がある。

#### E. 結論

- ・10道県で14症例の劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こしたG群レンサ球菌が収集された。
- ・地域間でemm型の違いは見られなかった。

- ・すべての株でペニシリン系薬剤に対して感受性であった。
- ・エリスロマイシン、クリンダマイシン耐性株が2株みられた。
- ・耐性株は、ともにermB遺伝子を保有しており、emm型はstG245型であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. Sci Rep 6: 28761 (2016).

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし