

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

研究代表者：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、 β 溶血性レンサ球菌である。近年、 β 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28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。一部の地域間で*emm*型の違いはみられた。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それぞれ11株、5株みられた。これら耐性株は、*ermA*あるいは*ermB*遺伝子のいずれかを保有しており、*emm*型は様々であった。

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、 β 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、 β 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. 生物材料と培養方法

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ビア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、ヘモサプリメント（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

血液寒天培地に塗抹した菌を90 μ LのTE（pH8.0）に懸たく後、mutanolysin（Sigma）を添加し、37℃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）GCTTAGAAAATTAA）、primer 2（GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT）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* seq2（TATTTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG）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58株の溶血性レンサ球菌を収集した。道県別では、北海道3株、山形県1株、宮城県3株、新潟県9株、三重県7株、奈良県8株、高知県3株、福岡県16株、鹿児島県2株、沖縄県6株であった。そのうちA群レンサ球菌によるものが24株、G群レンサ球菌によるものが28株、B群レンサ球菌によるものが6株であった(表1)。

G群レンサ球菌の菌種は、28株すべてが*Streptococcus dysgalactiae subspieces equisimilis*であった。

表 1. 2017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	1	0	0	2	3
山形県	1	0	0	0	1
宮城県	2	0	0	1	3
新潟県	4	0	0	5	9
三重県	5	0	0	2	7
奈良県	1	1	0	6	8
高知県	1	1	0	1	3
福岡県	5	3	0	8	16
鹿児島県	1	0	0	1	2
沖縄県	3	1	0	2	6
計	24	6	0	28	58

2. G群レンサ球菌の*emm*型

*Streptococcus dysgalactiae subspieces equisimilis*として同定された28株について*emm*型を決定した。その結果、*stG6792*が12株、*stG485*型が3株、*stG245*、*stC46*、*stG166b*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28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、それぞれ11株、5株で耐性であった。

これらの株の耐性遺伝子の保有をPCR法により調べた結果、9株が*ermA*遺伝子を、2株が*ermB*遺伝子を保有していた。*ermB*遺伝子を保有していた2株の*emm*型は、ともに*stG245*であった。一方、*ermA*遺伝子を保有していた9株の*emm*型は、*stG485*(3株)、*stG6792*(4株)、*stG2574*(1株)、*stC46*(1株)であり、様々であった。

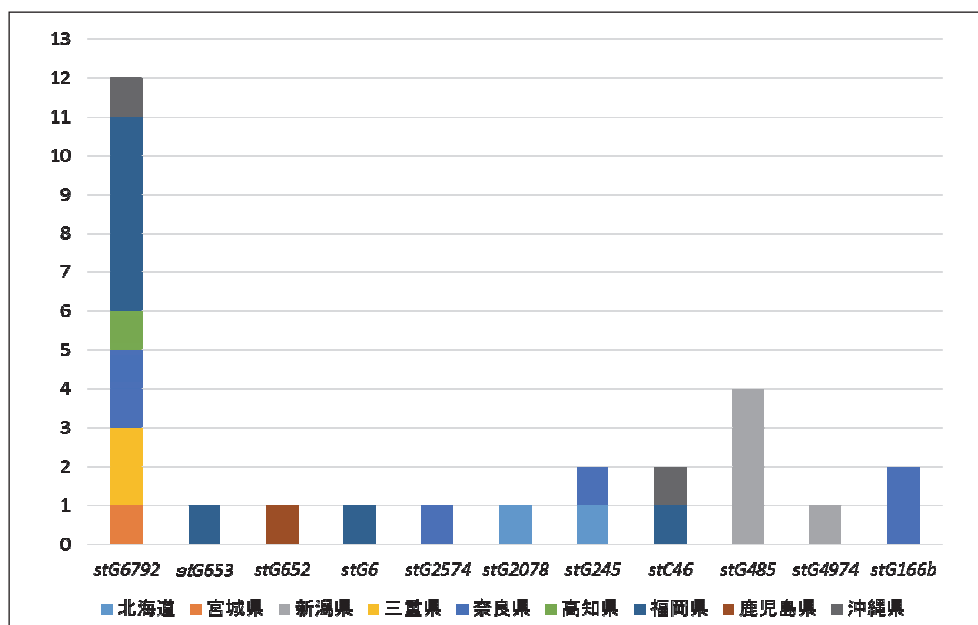


図 1. 2017年に10道県で分離された劇症型G群レンサ球菌感染症患者分離株28株のemm型

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型が12株と多かった。また、それぞれのemm型について道県別にみると、stG6792型は福岡県で多く分離されていた。また、2番目に多かったstG485型は新潟県でのみで分離されていた（図1）。このことから、一部の株については、特定の遺伝子型が特定の県で増えていることが示唆された。

薬剤感受性試験を行った結果、エリスロマイシン、クリンダマイシンに対し、それぞれ11株、5株で耐性を示した。薬剤耐性遺伝子として9株がermA遺伝子を、2株がermB遺伝子を保有していた。エリスロマイシン耐性クリンダマイシン感受性株は、すべてermA遺伝子を保有していた。これらの株はすべてエリスロマイシン存在下でクリンダマイシンに対し耐性を誘導する株であった。

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28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。

- ・地域間で一部のemm型で違いが見られた。
- ・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みられた。
- ・耐性株のemm型は、様々であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikebe T, Okuno R, Sasaki M, Kanda Y, Otsuka H, Kawahara R, Ohya H, Suzuki M, Uchida K, Nihonmatsu H, Ohnishi M, The Working Group for Beta-Hemolytic Streptococci in Japan. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome. J Infect Chemother. 24 (2) : 117-122 (2018) .
- 2) Yamamura Y, Mihara Y, Nakatani K, Nishiguchi T, Ikebe T. Unexpected Ventriculitis Complication of Neonatal Meningitis Caused by *Streptococcus gallolyticus* Subsp. *pasteurianus*: a Case Report. Jpn J Infect Dis. 71 (1) : 68-71 (2018) .

2. 学会発表

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