

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76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* 型の違いは見られた。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20株、105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、7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ンビア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 $^{\circ}$ 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* seq2 (TATTCGCTTAGAAAATTAAA AACAGG) 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/E*, *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184株の溶血性レンサ球菌を収集した。道県別では、北海道30株、山形県3株、宮城県12株、新潟県27株、三重県20株、奈良県17株、高知県10株、福岡県44株、鹿児島県4株、沖縄県17株であった。そのうちA群レンサ球菌によるものが82株、G群レンサ球菌によるものが76株、B群レンサ球菌によるものが23株であった(表1)。

G群レンサ球菌の菌種は、76株株中75株が*Streptococcus dysgalactiae* subspieces *equisimilis*であり、1株が*S. anginosus*であった。

表1. 2016-2018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	17	4	0	9	30
山形県	1	0	1	1	3
宮城県	8	0	0	4	12
新潟県	11	3	1	12	27
三重県	11	2	0	7	20
奈良県	3	2	0	12	17
高知県	4	3	0	3	10
福岡県	16	7	0	21	44
鹿児島県	2	0	0	2	4
沖縄県	9	2	1	5	17
計	82	23	3	76	184

2. G群レンサ球菌の*emm*型

Streptococcus dysgalactiae subspieces *equisimilis*として同定された75株について*emm*型を決定した。その結果、*stG6792*が32株、*stG485*型が12株、*stG245*が7株であった(図1)。

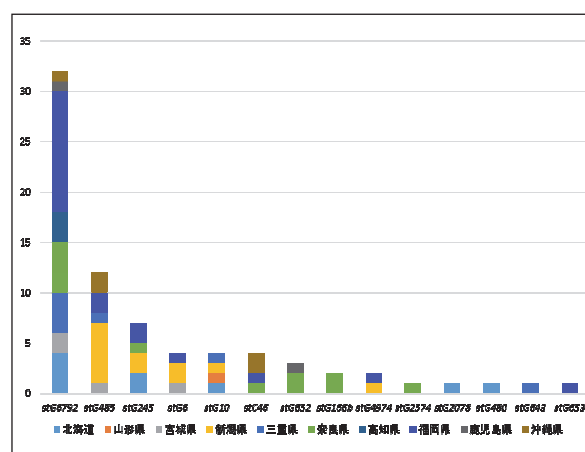


図1. 2016-2018年に分離されたSTSS由来G群レンサ球菌の*emm*遺伝子型

3. G群レンサ球菌の薬剤感受性試験

Streptococcus dysgalactiae subspieces *equisimilis*であった75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、シプロフロキサシン、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、シプロフロキサシン、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20株、10株で耐性であった。クリンダマイシン耐性株10株は、すべてエリスロマイシン耐性であった。

クリンダマイシン耐性株10株の耐性遺伝子の保有をPCR法により調べた結果、5株が*ermA*遺伝子を、5株が*ermB*遺伝子を保有していた。*ermB*遺伝子を保有していた5株の*emm*型は、すべて*stG245*型であった。一方、*ermA*遺伝子を保有していた5株の*emm*型は、*stG485*（3株）、*stG6792*（1株）、*stG4974*（1株）であり、様々であった。

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32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、北海道、奈良県、福岡県は*stG6792*型が多く分離されていたが、新潟県において*stG6792*型は分離されておらず、*stG485*型が約50%分離されていた。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、クリンダマイシンに対し、10株で耐性を示した。薬剤耐性遺伝子として5株が*ermA*遺伝子を、5株が*ermB*遺伝子を保有していた。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76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) Imai T, Matsumura T, Mayer-Lambertz S, Wells CA, Ishikawa E, Butcher SK, Barnett TC, Walker MJ, Imamura A, Ishida H, Ikebe T, Miyamoto T, Ato M, Ohga S, Lepenies B, van Sorge NM, Yamasaki S. Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A *Streptococcus* infection. Proc Natl Acad Sci USA. 2019 in press
- 2) Yoshizawa S, Matsumura T, Ikebe T, Ichibayashi R, Fukui Y, Satoh T, Tsubota T, Honda M, Ishii Y, Tateda K, Ato M. Streptococcal toxic shock syndrome caused by β -hemolytic streptococci: clinical features and cytokine and chemokine analyses of 15 cases. J Infect Chemother. 2019 in press
- 3) 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) . DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2017.9.13>
- 4) 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).
- 5) 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) . doi:10.1038/srep28761

2. 学会発表

- 1) 池辺忠義. 連鎖球菌感染症の疫学（シンポジウム：食品媒介連鎖球菌感染症の疫学・食品微生物学・病原機構）. 第39回日本食品微生物学会学術総会，大阪，2018年9月27-28日.
- 2) 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌について. 2018年東海北陸ブロック地域レファレンスセンター連絡会議，愛知，2018年11月16日.
- 3) 渡辺美絵，池辺忠義，岡村暢大. 劇的な経過を辿ったG群溶血性連鎖球菌感染症の一例. 第88回日本感染症学会西日本地方会学術集会，鹿児島，2018年11月16-18日.
- 4) 木村 浩，岡田和弘，中野晃子，屋敷尚司，近澤博夫，池辺忠義. Lancefield群別でA群に凝集した*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の1例. 第91回日本感染症学会学術講演会，東京，2017年4月6-8日.
- 5) 松村隆之，池辺忠義，大西 真，阿戸 学. IL-6-deficient immature myeloid cells have no protective function against *Streptococcus* infection. 第90回日本細菌学会総会，仙台，2017年3月19-21日.

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