

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 主任研究官）

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31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。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、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、*ermA* 遺伝子を保有していたが、*emm* 型は異なっていた。

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、8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プイオン液体培地 (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 μ LのTE (pH8.0) 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* seq2 (TATTTCGCTTAGAAAATT AAAACAGG) 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、メロペネム、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8 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94株の溶血性レンサ球菌を収集した。道県別では、北海道25株、山形県4株、宮城県7株、新潟県10株、三重県10株、奈良県6株、高知県2株、福岡県23株、鹿児島県6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44株、G群レンサ球菌によるものが31株、B群レンサ球菌によるものが18株、C群レンサ球菌によるものが1株であった(表1)。

G群レンサ球菌の菌種は、31株すべてが*Streptococcus dysgalactiae* subspieces *equisimilis* であった。

表 1. 2019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	16	4	0	5	25
山形県	1	1	0	2	4
宮城県	2	3	0	2	7
新潟県	6	1	0	3	10
三重県	3	2	0	5	10
奈良県	2	2	0	2	6
高知県	1	1	0	0	2
福岡県	9	4	1	9	23
鹿児島県	4	0	0	2	6
沖縄県	0	0	0	1	1
計	44	18	1	31	94

2. G群レンサ球菌の*emm*型

Streptococcus dysgalactiae subspieces *equisimilis*として同定された31株について*emm*型を決定した。その結果、*stG6792*が6株、*stG10*型が5株、*stG245*、*st480*が4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31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、メロペネム、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、メロペネム、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5株、2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、2株とも*ermA*遺伝子を保有していた。*ermA*遺伝子を保有していた2株の*emm*型は、*stG840*、*stG6*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6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、新潟県で2株ずつ分離されていたが、

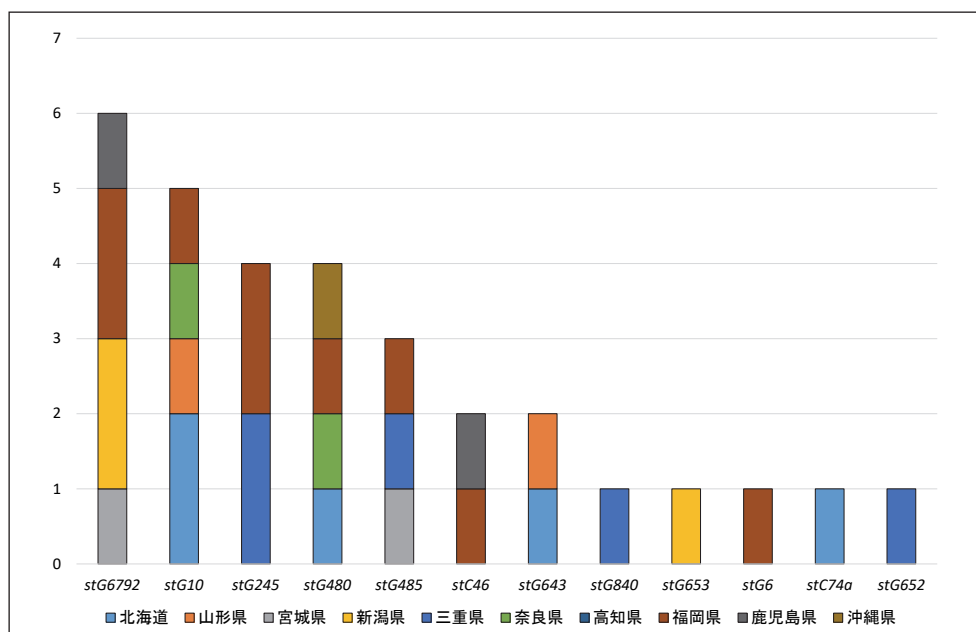


図 1. 2019年に10道県で分離された劇症型G群レンサ球菌感染症患者分離株31株のemm型

特定の道県で分離されているものではなかった(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、クリンダマイシンに対し、2株で耐性を示した。薬剤耐性遺伝子として2株とも *ermA* 遺伝子を保有していた。クリンダマイシン耐性株の分離頻度は、過去3年と比較して低かった。

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31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。
- ・ 特定のemm型が流行していなかった。
- ・ 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。
- ・ 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, Uchitani Y, Kanda Y,

Sasaki M, Uchida K, Chiba K, Yamaguchi T, Otsuka H, Suzuki M, Ohya H, Watanabe H, Ohnishi M, The Working Group for Beta-Hemolytic Streptococci in Japan. T Serotyping of group A streptococcus isolated from patients with pharyngitis or streptococcal toxic shock syndrome in Japan between 2005 and 2017. *J Infect Chemother.* 2020 in press

- 2) Matsumura T, [Ikebe T](#), Arikawa K, Hosokawa M, Aiko M, Iguchi A, Togashi I, Kai S, Ohara S, Ohara N, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Takeyama H, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. Sequential sensing by TLR2 and Mincle directs immature myeloid cells to protect against invasive group A streptococcal infection in mice. *Cell Rep.* 2019; 27 (2) : 561-571. e6.
- 3) 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; 25 (5) : 355-361.
- 4) Matsui T, Yamaguchi K, [Ikebe T](#), Aiga S, Kusakawa I. Prolonged PR Interval and

Erythema Marginatum in a Child with Acute Rheumatic Fever. J Pediatr. 2019; 212: 239-239. e1.

- 5) 池辺忠義. 溶血性レンサ球菌感染症の疫学. 日本食品微生物学会雑誌. 36 (2): 85-88 (2019).

2. 学会発表

- 1) 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の疫学 (分子疫学を含む) (パネルディスカッション: 今、考えたい日本におけるレンサ球菌感染症の現状と課題). 第93回日本感染症学会学術講演会, 愛知, 2019年.
- 2) 松村隆之, 池辺忠義, 大西 真, 山崎 晶, 高橋宜聖, 阿戸 学. The TLR2-IL-6-Mincle

axis is essential to protect against severe invasive streptococcal infection. 第92回日本細菌学会総会, 北海道, 2019年.

- 3) 住友理映子, 大霜智子, 岩城佳子, 谷畑慧子, 中埜伸二, 池辺忠義. 急激な経過をたどった劇症型A群溶連菌感染症の1例～遺伝子型解析をふまえて～. 第118回日本皮膚科学会総会, 愛知, 2019年.

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