

博士論文

溶血性レンサ球菌における定着性・  
抗菌薬耐性機序の解明

DI-21005 前田 貴広

指導教授 高橋 孝

北里大学大学院 感染制御科学府 感染制御科学専攻  
感染症学研究室

# 目次

使用実験機器一覧 .....	viii
I. 緒言 .....	1
II. 本論 .....	5
第1章 非侵襲性 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> における biofilm 産生能 と関連因子の解析に関する特徴：人由来株との比較解析 .....	5
1. 序論 .....	5
1-1. 目的 .....	5
1-2. SDSE における biofilm 産生能 .....	5
2. 材料および方法 .....	6
2-1. 菌株収集 .....	6
2-2. 菌種同定 .....	6
2-3. Biofilm 産生能の評価 .....	8
2-4. Lancefield 分類 .....	9
2-5. M タンパク遺伝子 ( <i>emm</i> ) 型の決定 .....	9
2-6. Multi locus sequence typing (MLST) 解析 .....	10

2-7. 薬剤感受性の判定 .....	12
2-8. AMR 遺伝子の検出 .....	13
2-9. 病原性遺伝子の検出 .....	14
2-10. 統計解析.....	16
2-11. 倫理委員会承認.....	16
3. 結果 .....	17
3-1. 菌株収集.....	17
3-2. 菌種同定.....	17
3-3. Biofilm 産生能の評価.....	19
3-4. Lancefield 分類 .....	19
3-5. <i>emm</i> 型の決定 .....	19
3-6. MLST 解析.....	22
3-7. 薬剤感受性の判定 .....	22
3-8. AMR 遺伝子の検出 .....	22
3-9. 病原性遺伝子の検出 .....	23
4. 考察 .....	24
4-1. Lancefield 分類 .....	24

4-2. <i>emm</i> 型の決定 .....	25
4-3. MLST 解析.....	25
4-4. 薬剤感受性の判定・AMR 遺伝子の検出 .....	26
4-5. 病原性遺伝子の検出 .....	26
第 2 章 <i>Streptococcus agalactiae</i> における biofilm 産生能と関連因子の解析 .....	28
1. 序論 .....	28
1-1. 目的 .....	28
1-2. 伴侶動物.....	28
1-3. GBS における biofilm 産生能.....	28
1-4. 製剤におけるベルベリン .....	29
2. 材料および方法.....	30
2-1. 菌株収集.....	30
2-2. 菌株同定.....	30
2-3. Biofilm 産生能の評価 .....	33
2-4. 病原性遺伝子の検出 .....	34
2-5. <i>cps</i> 遺伝子型の決定.....	36
2-6. MLST 解析 .....	38

2-7. 薬剤感受性の判定 .....	40
2-8. AMR 遺伝子の検出 .....	40
2-9. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響 .....	42
2-10. 統計解析 .....	43
2-11. 倫理委員会承認 .....	43
3. 結果 .....	44
3-1. 菌株収集 .....	44
3-2. 菌株同定 .....	44
3-3. Biofilm 産生能の評価 .....	44
3-4. 病原性遺伝子の検出 .....	46
3-5. <i>cps</i> 遺伝子型の決定 .....	47
3-6. MLST 解析 .....	47
3-7. 薬剤感受性の判定 .....	49
3-8. AMR 遺伝子の検出 .....	49
3-9. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響 .....	50
4. 考察 .....	51
4-1. 病原性遺伝子の検出 .....	51

4-2. <i>cps</i> 遺伝子型の決定.....	52
4-3. MLST 解析.....	52
4-4. 薬剤感受性の判定・AMR 遺伝子の検出 .....	52
4-5. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響.....	53

### 第3章 伴侶動物由来キノロン耐性 *Streptococcus agalactiae* が有するキノロン耐性

決定領域中のアミノ酸置換 .....	55
1. 序論 .....	55
1-1. 目的 .....	55
1-2. GBS におけるキノロン系抗菌薬の位置づけ .....	55
1-3. キノロン耐性決定領域 (QRDR) .....	55
2. 材料および方法.....	57
2-1. 菌株収集.....	57
2-2. 菌株同定.....	57
2-3. 薬剤感受性の判定 .....	57
2-4. QRDR 配列決定.....	58
2-5. <i>cps</i> 遺伝子型の決定.....	61
2-6. MLST 解析 .....	61

2-7. AMR 遺伝子の検出 .....	61
2-8. 統計解析.....	61
2-9. 倫理委員会承認 .....	61
3. 結果 .....	62
3-1. 菌株収集.....	62
3-2. 菌株同定.....	63
3-3. 薬剤感受性の判定 .....	63
3-4. QRDR 配列決定.....	66
3-5. <i>cps</i> 遺伝子型の決定.....	67
3-6. MLST 解析 .....	67
3-7. AMR 遺伝子の検出 .....	69
4. 考察 .....	70
4-1. QRDR 配列決定.....	70
4-2. <i>cps</i> 遺伝子型の決定.....	71
4-3. MLST 解析.....	71
4-4. AMR 遺伝子の検出 .....	71
III. 結論.....	73

IV. 謝辭.....	75
V. 參考文獻.....	76
VI. 附 .....	88



## 使用機器一覧

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| 1. CO <sub>2</sub> インキュベーター | MCO-175 (三洋電機株式会社)  |
| 2. サーマルサイクラー                | LifeECO TC-96/G/H(b)C<br>(Bioer Technology)                     |
| 3. UV トランスイルミネーター           | 蛍光イルミネーター ECX-F15.M<br>(Vilber Lourmat)                         |
| 4. 卓上遠心機                    | 卓上マイクロ冷却遠心機 Model 3520/3520H<br>(久保田商事株式会社)                     |
| 5. マイクロプレートリーダー             | ChroMate (Awareness Technology Inc.),<br>Infinite M 200 (TECAN) |

# I. 緒言

近年のペットブームにより、人と伴侶動物との距離が密接になっている。加えて、COVID-19 の影響により、新規ペット飼育者が増加した<sup>1)</sup>。また、伴侶動物は、対象者の精神的、肉体的機能の向上により社会性を高めることを目的とした動物介在療法や盲導犬、災害救助など人の生活において必要不可欠な存在である。一方で、レンサ球菌感染症、パストレラ症、猫ひっかき病や狂犬病など、人と動物の間に伝播可能な感染症である人獣共通感染症に罹患する危険性がある。これら人獣共通感染症は人や伴侶動物の健康を損なわせ、時には致死的な症状も呈するほか、食品などの取引や生産に混乱が生じさせると考えられている。さらに、人獣共通感染症の原因菌の薬剤耐性 (AMR) も問題視されている<sup>2)</sup>。このため、我が国では、2016 年より人獣共通感染症などに対して、動植物や環境などのそれぞれの分野で横断的に連携して取り組む One Health に基づいて、AMR 対策アクションプランを推進している<sup>3)</sup>。

## 人獣共通感染症

人獣共通感染症とは、「人と人以外の脊椎動物の間に自然環境の中で伝播し得るすべての感染症または病気」と World Health Organization (WHO) が定義している<sup>4)</sup>。人獣共通感染症は、人と動物の両宿主に症状を呈する感染症 (狂犬病やレンサ球菌感染症など) と一方の宿主においては不顕性であるが、もう一方の宿主においては症状を呈する感染症 (パストレラ症など) が存在する。これら感染症の原因菌の中で、*Streptococcus* 属菌、*Pasteurella* 属菌などは、人や伴侶動物などにおいて、常在菌である。しかしながら、人において特殊な条件下 (新生児、免疫機能低下など) で重篤・致死的な症状を呈する。このため、同菌による感染症は、感染源の根絶および感染経路の遮断による感染予防が困難なことから、より重要であると考えられる。

## **One Health**

One Health は、「人、動物、植物、および環境の間での相互関係を認識して最適な健康状態を目指すことを目的とした、地域、国、および世界レベルで機能し、多様な分野に及ぶ協調的な考えに基づく、アプローチ」である

(<https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>, 最終アクセス日 2024 年 1 月 6 日). 我が国においては、第 2 回世界獣医師会-世界医師会 One Health に関する国際会議が行われた 2016 年頃から認知され始め、AMR 対策アクションプランが推進されている<sup>3)</sup>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の年次報告によると、米国では、2017 年において動物との接触に関連する腸疾患のアウトブレイクは 59 件発生し、1518 名に症状が現れ、312 名が入院、3 名が死亡したと報告している<sup>5)</sup>.

## **AMR 対策アクションプラン**

我が国の AMR 対策アクションプランは、AMR 菌の発生を遅らせ、その拡大を防ぐことを目的に、① 普及啓発・教育、② 動向調査・監視、③ 感染予防・管理、④ 抗微生物剤の適正使用、⑤ 研究開発・創薬、⑥ 国際協力の 6 つの目標にむけた、2016 年から 2020 年に、集中的に取り組んできた。現在においても、2020 年に得られたデータに基づいて新たに目標を策定した AMR 対策アクションプラン (2023-2027) を取り組まれている<sup>3)</sup>.

この中において、「愛玩動物分野における AMR の動向調査・監視体制の構築」があり、2017 年、2018 年によりそれぞれ病気の愛玩動物、健康な愛玩動物を対象に、薬剤感受性動向調査が行われている。このような動向は、人医療だけでなく、獣医領域においても関心を促しているといえる。

しかし、薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2022 において、疾病に罹患した愛玩動物由来 *Enterococcus* spp. では、人医療にて重要な抗菌薬である、シプロフロキサシン (CPF) 耐性率が 27.8 %, 40.6 % (犬由来株, 猫由来株) であることが示された<sup>6)</sup>. この結果は健康な愛玩動物の *Enterococcus* spp. における CPF 耐性率よりも高か

った (犬由来株: 5.5 %, 猫由来株: 4.8 %) と報告されている<sup>6)</sup>. このことから 2020 年から開始された愛玩動物における抗菌薬の慎重使用の手引きの普及を含む, 更なる動向調査が望まれる. また, 愛玩動物は, 伴侶動物に相当する.

### **Streptococcus dysgalactiae の概要**

*S. dysgalactiae* は, レンサ球菌属菌における pyogenic group に属する. 当 group に属するレンサ球菌は, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS) があり, いずれも  $\beta$  溶血性を示し, 炎症性化膿性疾患などを引き起こすことが知られている<sup>7)</sup>. また, *S. dysgalactiae* は, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) および *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* の 2 亜種が存在する. SDSE について, 人や伴侶動物などより分離される常在菌である. 一方で, SDSE においては, 免疫機能低下者や高齢者に対して, 蜂窩織炎や streptococcal toxic shock syndrome (STSS) を引き起こす. 特に STSS に関しては, 近年においても致死率は高く, 20 % を超える<sup>8)</sup><sup>9)</sup><sup>10)</sup>. 近年の報告では, 80 歳以上の患者における侵襲性 *S. dysgalactiae* 感染症の有病率は, 侵襲性 *S. pyogenes* または GBS 感染症の有病率よりも高かったことが示された<sup>11)</sup>. また, 伴侶動物においても皮膚膿瘍などの感染症状を引き起こす<sup>12)</sup>.

### **Streptococcus agalactiae の概要**

GBS は, 1930 年代初頭に牛の乳房炎の原因菌として同定された<sup>13)</sup>.

同菌は, 伴侶動物・他の動物・人などの消化管, 泌尿器や生殖器などより分離される常在菌である. 一方で, 人の診療現場では, 主に垂直感染により新生児に対して, 致死的な侵襲性感染症 (敗血症・髄膜炎など) を引き起こす. 新生児 GBS 感染症は, 生後 7 日未満に発症する早発型と生後 7 日以降に発症する遅発型に分類される. 早発型は, 主に垂直感染に由来し, 一般的に敗血症や肺炎の発症が多い. また, 35 週から 37 週の全妊婦に対する検査および抗菌薬の予防投与により発症を予防することが出来る. 一方, 遅発型においては, 髄膜炎が多く, 後遺症では難聴, 認知障害, 失明があ

り、これら後遺症発症率は最大 50 % であると報告されている<sup>13)</sup>。加えて、高齢者などの免疫機能が低下している成人に対しても髄膜炎などを引き起こす<sup>14)</sup>。日本においても、菌血症/敗血症、感染性心内膜炎 (IE)、敗血症性関節炎、および髄膜炎などの侵襲性感染症に罹患した新生児または高齢者から分離されている<sup>9) 15)</sup>。

また、伴侶動物においても塞栓を伴う IE を引き起こすことが、8 歳の犬で報告されている<sup>16)</sup>。

## **Biofilm の概要**

Biofilm は、細菌による多糖類、タンパク質や DNA などで構成され、物質表面に固着した状態の細菌の集合体であると定義される<sup>17)</sup>。細菌における biofilm 産生能力はコロニー形成など定着性に関連する病原性因子である<sup>17) 18)</sup>。加えて、biofilm 産生能は、AMR, pH 耐性や宿主免疫に対する耐性を与え、抗菌薬による薬物治療を困難とさせる<sup>19) 20) 21)</sup>。

これらのことから、SDSE および GBS は、AMR 因子、種間伝播や定着性などが、これら感染症に対する予防および治療に様々な悪影響を与えと考えられる。このため、本研究では、溶血性レンサ球菌における定着性・抗菌薬耐性機序の解明を主たる目的とした。

## II. 本論

### 第1章 非侵襲性 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* における biofilm 産生能と関連因子の解析

#### 1. 序論

##### 1-1. 目的

本研究では非侵襲性 SDSE 株を対象として, biofilm 産生能に関連する宿主情報, および分子特性を明らかにすることを目的とした.

##### 1-2. SDSE における biofilm 産生能

SDSE は, *S. pyogenes* と遺伝的に近い関係にある. 加えて, SDSE 感染症においても STSS など *S. pyogenes* 感染症 (化膿レンサ球菌感染症) と同様の症状を呈する<sup>22)</sup>. 一方で, *S. pyogenes* とは異なり, biofilm 産生に関わる知見は未だ明確になっていない. *S. pyogenes* における biofilm 産生においては, 線毛と呼ばれる繊維状構造物が関与している<sup>23)</sup>. *S. pyogenes* における線毛は, 1 種類知られており, 主に backbone protein, 2 種の ancillary protein, 2 種の sortase で構成される<sup>24)</sup>. 一方, SDSE における線毛は, 2 種確認されており, コードする遺伝子群はそれぞれ pilus island 1 (PI-1), pilus island 2 (PI-2) と呼ばれている. この PI-1 は, GBS における PI-1 と類似しているが, いくつかの属する遺伝子および配列が異なっている. 一方, PI-2 は, *S. pyogenes* の PI と非常に類似している<sup>25)</sup>.

これらのことから, 本研究を実施にするにあたり, 我々は, *S. pyogenes* と同様に, SDSE における線毛が biofilm 産生に関与していると仮説をたてた.

## 2. 材料および方法

### 2-1. 菌株収集

#### 2-1-1. 分離菌株収集

人由来株は、病態生理研究所および北里大学メディカルセンターより SDSE 分離株およびその患者情報の収集を試みた。また、伴侶動物由来株は、サンリツセルコバ検査センターより SDSE 分離株およびその宿主情報の収集を試みた<sup>26) 27) 28)</sup>。加えて、実験精度管理株として Lancefield 分類における G 群, C 群に属する SDSE の参照株である American Type Culture Collection (ATCC) 12394, ATCC 12388 を研究に用いた。

本研究では、無菌的検体由来株に属さない株を非侵襲性株と定義した。

#### 2-1-2. 分離菌株の培養および保存

分離菌株は、当研究室において heart infusion broth ・濃グリセリン混合液に懸濁し、-70 °C から -80 °C で保存した。分離菌株は、37 °C の条件下、ヒツジ血液寒天培地上で 24 時間培養後、実験に使用した。

### 2-2. 菌株同定

#### 2-2-1. DNA テンプレートの抽出

分離菌株を TE buffer (表 1) 100 μL に、濁度がマックファーランド 0.5 となるように懸濁した。その後、サーマルサイクラーを用いて、97 °C, 10 分間の反応条件下で分離菌株の溶菌操作を行った<sup>29) 30)</sup>。卓上遠心機を用いて、10,000 rpm, 2 分間の遠心分離後、沈殿物を吸い取らないように上清を回収した。この上清を template DNA 溶液として実験に用いた。

表1. TE buffer 組成

試薬	用量 (500 mL)	最終濃度
1.0 M トリス塩酸 buffer	5 mL	10 mM
0.5 M EDTA	1 mL	1 mM
Distilled water	494 mL	

## 2-2-2. 16S rRNA 配列解析による菌種同定

16S rRNA について, 2-2-1 により得られた template DNA 溶液, 16S rRNA を特異的に増幅するプライマー (表 2) を用いて, 表 3 に示す反応液組成, 反応条件下で, PCR 法により増幅させた<sup>30) 31)</sup>. その後, PCR 増幅産物を用いて, アガロースゲル電気泳動を行い, 泳動後, 臭化エチジウム溶液にて染色した. 染色後, UV トランスイルミネーターにて, 増幅バンドを確認した.

16S rRNA 増幅産物は, DNA 精製キット (QIAquick® PCR Purification Kit, キアゲン, 東京) により, 増幅産物の精製を行った. その後, BigDye Terminator v3.1, BigDye Xterminator によりシーケンス反応, 精製を行い, 3130xl Genetic Analyzer を用いて泳動した. 得られた塩基配列は, Finch TV version 1.4.0 (フリーソフト, Geospiza, <http://www.digitalworldbiology.com/finchtv>) により, 正確性を検証した. Serial Cloner version 2.6.1 (フリーソフト, [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)) を用いて, SDSE の基準株である, National Collection of Type Cultures (NCTC) 13762<sup>T</sup> の 16S rRNA 配列との相同性が 98.7 % 以上であることを確認した.

表2. 16S rRNA増幅用プライマー配列 (M = A or C)

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	1,497	30, 31
	1485R	TACGGTTACCTTGTTACGAC	20		



表3. 16S rRNA増幅における反応液組成および反応条件

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	1 min	
primer R (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	2 $\mu$ L	アニーリング	62 $^{\circ}$ C	90 sec	35 cycles
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	90 sec	
Deionized and sterilized water	30.75 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	10 min	
	50 $\mu$ L				

### 2-3. Biofilm 産生能の評価

人由来株 5 株 (CG1, CG2, CG3, CG31, CG34), 伴侶動物由来株 4 株 (FU9, FU98, KU17, KU108) および SDSE 参照株 (ATCC 12394, ATCC 12388) の成長曲線に基づいて,  $OD_{600} = 1$  あたりの CFU/mL の係数を得た ( $OD_{600} = 1$  の時,  $5 \times 10^8$  CFU/mL).

実験対象株におけるヒツジ血液寒天培地上のシングルコロニーを brain heart infusion (BHI) broth 5 mL に接種し, 37  $^{\circ}$ C, 14 時間培養した. この 14 時間培養液を先述の係数に基づいて,  $1 \times 10^5$  CFU/mL に希釈した. この希釈溶液 100  $\mu$ L を平底 96 ウェルポリスチレンマイクロプレート (CELLSTAR<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, 東京) に入れ, 37  $^{\circ}$ C, 48 時間培養した. その後, リン酸 buffer にて 4 回洗浄し, 60  $^{\circ}$ C, 1 時間乾燥させた. 乾燥後, 0.1 % クリスタルバイオレット溶液 100  $\mu$ L を各ウェルに加え, 2 分間染色した. 染色液を丁寧に取り除いた後, 超純水にて洗浄を行った. その後, 脱染液 (7.5 % 酢酸/10 % メタノール水溶液) 100  $\mu$ L を各ウェルに加え, 光学密度 (Optical density, OD) を主波長 545 nm, 副波長 630 nm にて測定した. 各株のサンプル数は 5 とし, 実験は 2 回以上行い, 再現性を確認した. また, 本実験において, BHI broth のみの状態を negative control として用いた.

得られた各株の OD 値の平均値を, 表 4 の基準に従い, biofilm 産生能の分類を行った<sup>32) 33)</sup>.

表4. Biofilm 産生能の分類

Classification of biofilm producers	Definition
Strong biofilm producer (+++)	$(4 \times OD_c) < OD_{\text{isolate}}$
Moderate biofilm producer (++)	$(2 \times OD_c) < OD_{\text{isolate}} \leq (4 \times OD_c)$
Weak biofilm producer (+)	$OD_c < OD_{\text{isolate}} \leq (2 \times OD_c)$
No biofilm producer (-)	$OD_{\text{isolate}} \leq OD_c$
$OD_{\text{isolate}}$ = mean value of optical density (OD) at 545 nm for isolates. $OD_{\text{control}}$ = OD at 545 nm for the culture medium alone (as the blank). $OD_c$ = mean value of $OD_{\text{control}} + (3 \times \text{standard deviation of } OD_{\text{control}})$ .	

## 2-4. Lancefield 分類

Lancefield 分類について、分与を受けた施設において、すべての SDSE 分離株がラテックス凝集法によって分類された。

## 2-5. M タンパク遺伝子 (*emm*) 型の決定

2-2-1 より得られた template DNA 溶液から、*emm* の増幅を 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 5, 表 6), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>29) 34)</sup>。*emm* 反応液組成は、必要に応じて、(1) または (2) のどちらかを使用した。

*emm* 増幅産物は、2-2-2 と同様の方法で精製され、塩基配列の取得および正確性の検証を行った。得られた塩基配列に基づいて、Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>, 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) により、*emm* 型を決定した。

表5. *emm* プライマー配列 (S= C or G)

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>emm</i>	emm1	TATTSGCTTAGAAAATTAA	19	1,000 to 1,500	34
	emm2	GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT	20		

表6. *emm* 増幅における反応液組成および反応条件

(1) PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	5 min	
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	2 $\mu$ L	アニーリング	52 $^{\circ}$ C	60 sec	30 cycles
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.2 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	120 sec	
Deionized and sterilized water	29.8 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	10 min	
	50 $\mu$ L				

(2) Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	5 min	
primer R (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	2 $\mu$ L	アニーリング	52 $^{\circ}$ C	60 sec	30 cycles
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	120 sec	
Deionized and sterilized water	30.75 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	10 min	
	50 $\mu$ L				

## 2-6. Multi locus sequence typing (MLST) 解析

SDSE におけるハウスキーピング遺伝子である, *gki* (encoding glucose kinase), *gtr* (encoding glutamine transporter protein), *murI* (encoding glutamate racemase), *mutS* (encoding DNA mismatch repair protein), *recP* (encoding transketolase), *xpt* (encoding xanthine phosphoribosyl transferase), *atoB* (encoding acetoacetyl-coathiolase) の増幅を 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 7, 表 8), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>29) 34) 35)</sup>. MLST 反応液組成は, 必要に応じて, (1) または (2) のどちらかを使用した.

7 種のハウスキーピング遺伝子の増幅産物は, 2-2-2 と同様の方法で精製され, 塩基配列の取得および正確性の検証を行った. 得られた塩基配列に基づいて, PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-dysgalactiae>, 最終アクセス日 2023 年 12 月

20 日) により, 各ハウスキーピング遺伝子の allele number を決定した. 加えて, 同サイトにて各ハウスキーピング遺伝子の allele number の組み合わせから sequence type (ST) を決定した. Allele プロファイルのうち, single locus variant となる, 異なる ST を同一の clonal complex (CC) として系統化した.

ST に基づいた最小スパニングツリーは, PHYLOViZ 2.0 (フリーソフト, <http://www.phyloviz.net/>) を用いて goeBURST アルゴリズムにより作成した<sup>36)</sup>.

表7. MLST 増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>gki</i>	gki-F	GCAGATTTTATTGGTATCGGTATCGGTATGG	31	652	34, 35
	gki-R	GTGAACGTAAGAATTCTCCTGCTG	24		
<i>gtr</i>	gtr-F	GGAATTGATTTAAACATTATGTCAGGAG	28	591	
	gtr-R	CACAATAACGCCGCCATCCATA	22		
<i>murI</i>	murI-F	TTATGGTCCAAGACCTGCTGAGC	23	608	
	murI-R	TTTCAGGACTTGCCGTTGTGTAAAA	25		
<i>mutS</i>	mutS-F	AGGTCAGATGTTAGAGGCTAGG	22	553	
	mutS-R	CCTAGTTCATCAAATAGAATAAGGGAA	27		
<i>recP</i>	recP-F	TGTCCGCACCCTATCAATGGAT	22	626	
	recP-R	CATCTTTCACAAGGATATGTTGCC	24		
<i>xpt</i>	xpt-F	ATGCAGTTACTTGAAGAACGCATCTTAAC	29	572	
	xpt-R	GCCTCCAAGAAGTTTAGATTACCA	24		
<i>atoB</i>	atoB-F	CAGATGCTTTTAACAATTACCACATGG	27	579	
	atoB-R	CCCATTACATTACGATTTCTGG	24		

表8. MLST 増幅における反応液組成および反応条件

(1) PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	5 min	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	2 $\mu$ L	アニーリング	55 $^{\circ}$ C	1 min	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Deionized and sterilized water	29.5 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	5 min	
	50 $\mu$ L				

(2) Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	5 min	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	2 $\mu$ L	アニーリング	55 $^{\circ}$ C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Deionized and sterilized water	30.75 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	5 min	
	50 $\mu$ L				

## 2-7. 薬剤感受性の判定

薬剤感受性試験について、分与を受けた施設において、微量液体希釈法によって MIC 値が測定された。米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) document M100-S22/S25 に準拠し、penicillin G (PCG), tetracycline (TC)/minocycline (MINO), erythromycin (EM)/clarithromycin (CAM)/azithromycin (AZM), clindamycin (CLDM) および levofloxacin (LVFX) の感受性が判定された<sup>37)38)</sup>。

## 2-8. AMR 遺伝子の検出

2-2-1 により得られた template DNA 溶液を使用して、テトラサイクリン系耐性遺伝子となる *tet*(M) (encoding ribosomal protection protein), *tet*(O) (encoding ribosomal protection protein), *tet*(K) (encoding membrane-associated efflux pump), *tet*(L) (encoding membrane-associated efflux pump), *tet*(S) (encoding ribosomal protection protein) およびマクロライド/リンコマイシン/ストレプトグラミン B (MLS<sub>B</sub>) 耐性遺伝子となる *erm*(A) (encoding inducible-type methylase), *erm*(B) (encoding constitutive-type methylase), *mef*(A) (encoding transmembrane domains of ABC transporter) の増幅を 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 9, 表 10), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>39)40)</sup>.

表9. 薬剤耐性遺伝子増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer )	Amplicon size (bp)	Reference
<i>tet</i> (M)	tetM-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	20	406	39
	tetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	20		
<i>tet</i> (O)	tetO-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	21	515	
	tetO-R	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	21		
<i>tet</i> (K)	tetK-F	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	25	155	
	tetK-R	TTTTGTTGATTACCAGGTACCATT	25		
<i>tet</i> (L)	tetL-F	TGGTGGAATGATAGCCCAT	20	229	40
	tetL-R	CAGGAATGACAGCACGCTAA	20		
<i>tet</i> (S)	tetS-F	TCCGATAGTGATCCCCTTCT	20	445	
	tetS-R	GGAAATCTGCTGGCGTACTG	20		
<i>erm</i> (A)	ermA-F	CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT	24	590	39
	ermA-R	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	23		
<i>erm</i> (B)	ermB-F	TGGTATTCCAAATGCGTAATG	21	745	
	ermB-R	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	20		
<i>mef</i> (A)	mefA-F	CAATATGGGCAGGGCAAG	18	317	
	mefA-R	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	20		

表10. 薬剤耐性遺伝子増幅における反応液組成および反応条件

Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)					
試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	2 µL	初回変性	93 °C	3 min	30 cycles
primer R (5 µM)	2 µL	変性	93 °C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	62 °C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 µL	伸長	65 °C	4 min	
Deionized and sterilized water	15.375 µL	最終伸長	65 °C	3 min	
	25 µL				

## 2-9. 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子として, *prtF1* (encoding fibronectin-binding protein 1), *prtF2* (encoding fibronectin-binding protein 2), *lmb* (encoding laminin-binding protein), *cbp* (encoding collagen-binding protein), *sicG* (encoding streptococcal inhibitor of complement-mediated cell lysis), *srtp1* (encoding sortase of pilus island 1), *srtp2* (encoding sortase of pilus island 2), *brpA* (encoding biofilm regulatory protein) を, 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 11, 表 12), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>12) 34) 41) 42)</sup>.

*brpA* および *srtp1* を特異的に増幅するプライマーは, それぞれ National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている SDSE RE378 株の全ゲノム配列 (GenBank accession number: AP011114.1) における coding sequence (locus tags: GGS\_1620, GGS\_0160) に基づき, Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) を用いて設計した. *srtp2* を特異的に増幅するプライマーは, NCBI に登録されている *Streptococcus pyogenes* emm58 株の全ゲノム配列 (GenBank accession number: CP035443.1) における coding sequence (locus tags: ETT56\_02280) に基づき, Primer3Plus を用いて設計した.

表11. 病原性遺伝子増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>prtF1</i>	prtF1-F	TATCAAAATCTTCTAAGTGCTGAG	24	1,009	41, 42
	prtF1-R	AATGGAACACTAACTTCGGACGGG	24		
<i>prtF2</i>	prtF2-F	ATAGGATTGTCCGGAGTATCA	21	2,000	
	prtF2-R	TTATGTTGCTTCTCACCA	18		
<i>lmb</i>	lmb-F	GATGTGAGGATGATCCAATC	20	135	12, 34, 42
	lmb-R	GCTTCTAAGGTATGTGAATG	20		
<i>cbp</i>	cbp-F	GACAAACTCTGGAGAACTCA	20	240	
	cbp-R	TCTGTTGTCAAACCAGTTGG	20		
<i>sicG</i>	sicn2F	GGAGGTCACAACTAAGCAA	20	608	This study
	sicc3R	TGCCTATAGAAGGCACAACCT	20		
<i>srtpl</i>	srtpl-F	CGGCTCATAGAGGGTTACCA	20	245	
	srtpl-R	AGCCCTCACACCTCTTACCA	20		
<i>srtpl2</i>	srtpl2-F	TTGGGATTGTGGGATTTCATT	20	181	This study
	srtpl2-R	TCGTCTTCCCTTGAACAACC	20		
<i>brpA</i>	brpA-F	TGCGTTATGATGACCCAGAA	20	201	
	brpA-R	GGGCATCCCGATAACCTAAT	20		

表12. 病原性遺伝子増幅における反応液組成および反応条件

(1) *prtF1*, *prtF2*, *lmb*, *cbp*, *srtpl2*, *brpA*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	2 min 30 sec	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	56 $^{\circ}$ C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	10 min	
	25 $\mu$ L				



### (2) *sicG*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	2 min	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	55 $^{\circ}$ C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	5 min	
	25 $\mu$ L				

### (3) *srtpl*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	5 min	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	64 $^{\circ}$ C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	10 min	
	25 $\mu$ L				

## 2-10. 統計解析

本研究における統計解析において、2 群間の比較では Mann-Whitney U test, 3 群以上の比較では, Kruskal-Wallis test により有意差がみられた検定について, Steel-Dwass test によるノンパラメトリック多重比較検定を行った. また,  $p$  値が 0.05 未満を統計学的に有意とした.

## 2-11. 倫理委員会承認

本研究は、宿主情報漏洩防止の観点から、病態生理研究所 (承認番号: 02-900-01), 北里大学メディカルセンター (承認番号: 2021002) およびサンリツセルコバ検査センター (承認番号: SZ20220224) の倫理委員会による承認を得て実施した.

### 3. 結果

#### 3-1. 菌株収集

人由来株について、2015 年 6 月から 2016 年 5 月の期間中に分離された非侵襲性 SDSE 49 株を病態生理研究所より収集できた。加えて、2021 年 1 月から 2021 年 10 月の期間中に分離された SDSE 15 株を北里大学メディカルセンターより収集できた。

本研究では、乱数表を用いて、病態生理研究所収集株から 40 株、北里大学メディカルセンター収集株から 12 株選出し、実験に供した。加えて、菌株における分離部位を (1) 口腔/気道、(2) 泌尿/生殖器、(3) 膿/皮膚、(4) 眼/耳に分類した。

宿主情報として、16 歳から 95 歳 (平均年齢 68.5 歳) であり、男性は 32 人、女性は 20 人であった。分離部位は、口腔/気道由来 20 株、泌尿/生殖器由来 19 株、膿/皮膚由来 12 株、眼/耳由来 1 株であった。また、分離地域は、東京都 17 株、埼玉県 16 株、千葉県 10 株、長野県 4 株、大阪府 2 株、茨城県、神奈川県、栃木県 各 1 株であった。

一方、伴侶動物由来株は、2015 年 4 月から 2021 年 6 月の期間に分離された非侵襲性 SDSE 12 株を収集できた。宿主情報として、犬 11 匹、猫 1 匹であり、8 歳から 17 歳 (平均年齢 11.1 歳)、雄 6 匹、雌 6 匹であった。分離部位は、口腔/気道由来 2 株、膿/皮膚由来 5 株、眼/耳由来 5 株であった。泌尿/生殖器に属した伴侶動物由来株はなかった。また、分離地域は、茨城県、千葉県 各 3 株、東京都、奈良県 各 2 株、神奈川県、宮城県 各 1 株であった (表 13)。

#### 3-2. 菌株同定

すべての実験対象株において、16S rRNA 配列が NCTC 13762<sup>T</sup> の 16S rRNA 配列との相同性が 98.7 % 以上であった為、SDSE と同定した。

表13. 実験対象株における菌株背景および表現型/遺伝子型

Isolate ID no.	Host species	Sex	Age (year)	Isolation year	Isolation source	Prefecture	Lancefield group	Biofilm production category	Genotypic feature (detection of genes)										Antimicrobial resistance (AMR) phenotype (MIC, minimum inhibitory concentration μg/mL.)							
									prtF1	prtF2	lmb	cbp	sicG	srp1	srp2	brpA	emm genotype	Sequence type (clonal complex)	Tetracycline resistance	Macrolide/lincosamide resistance	Penicillin G	Minocycline (tetracycline)	Erythromycin	Azithromycin (clarithromycin)	Clindamycin	Levofloxacin
CG1	Human	Female	16	2015	Pharyngeal mucus	Chiba	G	(+)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stC74a	ST29 (CC29)	tet(M)		0.06	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
CG2	Human	Male	80	2015	Urethral discharge	Chiba	G	(+++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG3	Human	Male	73	2015	Nail	Osaka	G	(-)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG10	ST15	tet(M), tet(L)		≤0.03	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
CG4	Human	Male	38	2015	Pharyngeal mucus	Chiba	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG166b	ST25 (CC127)	tet(M)		≤0.03	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	≤0.25
CG5	Human	Female	31	2016	Sputum	Tokyo	G	(+)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG10	ST15	tet(M)	erm(B)	≤0.03	> 4	> 2	> 4	> 1	1
CG6	Human	Male	33	2016	Pharyngeal mucus	Tokyo	G	(+++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			0.06	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG7	Human	Male	84	2016	Sputum	Nagano	G	(++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG8	Human	Male	86	2015	Urine	Tokyo	G	(+++)	prtF1		lmb	cbp		srp1		brpA	stG652	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG9	Human	Male	27	2016	Open pus	Tokyo	G	(++)			lmb			srp1		brpA	stG652	ST138 (CC138)	tet(M)	erm(A)	≤0.03	4	2	4	≤0.12	≤0.25
CG10	Human	Male	21	2015	Pharyngeal mucus	Chiba	G	(++)	prtF1		lmb	cbp		srp1		brpA	stG653	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG11	Human	Female	60	2015	Open pus	Tokyo	G	(+)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG2078	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG12	Human	Male	53	2015	Pharyngeal mucus	Tokyo	G	(+++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG2574	ST9		erm(A)	≤0.03	2	1	2	≤0.12	0.5
CG13	Human	Male	23	2015	Sputum	Kanagawa	G	(+++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stC3345	ST107		erm(A)	≤0.03	≤0.5	2	> 4	> 1	0.5
CG14	Human	Female	92	2016	Sputum	Tokyo	G	(++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG15	Human	Male	83	2015	Urine	Tokyo	G	(-)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG652	ST269 (CC269)	tet(M)		≤0.03	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG16	Human	Male	77	2015	Eye discharge	Tokyo	G	(+)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
CG17	Human	Male	91	2016	Open pus	Nagano	G	(++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG18	Human	Female	90	2016	Sputum	Chiba	G	(++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG10	ST15	tet(M)	erm(A)	≤0.03	> 4	2	4	≤0.12	0.5
CG19	Human	Male	82	2015	Cutaneous secretion	Tokyo	G	(+++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)	tet(M)	erm(B), mef(A)	≤0.03	> 4	> 2	> 4	> 1	8
CG20	Human	Female	73	2015	Sputum	Nagano	G	(-)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG21	Human	Male	79	2015	Urine	Chiba	G	(+)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	≤0.25
CG24	Human	Male	92	2015	Open pus	Saitama	G	(++)	prtF1		lmb	cbp		srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG25	Human	Female	93	2016	Sputum	Ibaraki	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG245	ST127 (CC127)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
CG26	Human	Male	83	2015	Urine	Chiba	G	(++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG2078	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	> 2	> 4	0.5	0.5
CG27	Human	Female	85	2016	Sputum	Tokyo	G	(++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG10	ST15	tet(M)	erm(A)	≤0.03	> 4	2	> 4	≤0.12	1
CG28	Human	Male	89	2016	Open pus	Tokyo	G	(++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG29	Human	Male	73	2015	Cutaneous secretion	Osaka	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG245	ST127 (CC127)	tet(M)	mef(A)	≤0.03	> 4	> 2	4	≤0.12	≤0.25
CG30	Human	Male	86	2016	Cutaneous secretion	Tokyo	G	(+)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG31	Human	Male	72	2016	Sputum	Saitama	C	(-)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG5063	ST612		mef(A)	≤0.03	≤0.5	> 2	4	≤0.12	0.5
CG32	Human	Female	84	2016	Vaginal discharge	Ibaraki	G	(++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG33	Human	Female	75	2015	Urine	Saitama	G	(++)	prtF1		lmb	cbp		srp1		brpA	stG4974	ST175 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG34	Human	Male	79	2016	Sputum	Tokyo	C	(-)	prtF1		lmb					brpA	stC6979	ST129			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG36	Human	Male	72	2015	Urine	Chiba	G	(-)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	2
CG37	Human	Male	20	2015	Open pus	Tokyo	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG245	ST127 (CC127)	tet(M)	erm(B)	≤0.03	4	> 2	> 4	> 1	1
CG38	Human	Male	35	2016	Pharyngeal mucus	Chiba	G	(++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			0.12	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG39	Human	Male	81	2015	Sputum	Tokyo	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG245	ST127 (CC127)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
CG40	Human	Male	67	2015	Sputum	Saitama	G	(+++)			lmb			srp1		brpA	stG245	ST127 (CC127)	tet(M)	erm(B)	≤0.03	4	> 2	> 4	> 1	≤0.25
CG41	Human	Male	79	2015	Urine	Chiba	G	(+)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG42	Human	Male	85	2015	Urine	Nagano	G	(++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
CG43	Human	Female	84	2015	Open pus	Tokyo	G	(+++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG652	ST269 (CC269)	tet(M)		≤0.03	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
SD-1	Human	Female	83	2021	Vaginal discharge	Saitama	G	(+++)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG652	ST268 (CC138)	tet(M)		≤0.03	> 4	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
SD-2	Human	Female	30	2021	Vaginal discharge	Saitama	G	(+)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)			≤0.03	1	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
SD-3	Human	Female	77	2021	Urine	Saitama	G	(++)	prtF1		lmb	cbp	sicG	srp1		brpA	stG6792	ST17 (CC17)			≤0.03	1	≤0.12	≤0.25	≤0.12	1
SD-4	Human	Female	95	2021	Sputum	Saitama	G	(++)	prtF1		lmb			srp1		brpA	stG6	ST146			≤0.03	1	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
SD-5	Human	Female	80	2021	Urine	Saitama	G	(+)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG652	ST149 (CC29)			≤0.03	1	≤0.12	≤0.25	≤0.12	≤0.25
SD-7	Human	Female	78	2021	Sputum	Saitama	G	(+++)			lmb	cbp		srp1		brpA	stG480	ST8			≤0.03	≤0.5	0.5	1	≤0.12	≤0.25
SD-8	Human	Male	88	2021	Urine	Saitama	G	(+)			lmb			srp1	srp2	brpA	stG4222	ST269 (CC269)	tet(M)		≤0.03	≤0.5	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
SD-9	Human	Male	89	2021	Urine	Saitama	G	(+++)	prtF1		lmb			srp1		brpA	stG485	ST128	tet(M)		≤0.03	2	≤0.12	≤0.25	≤0.12	0.5
SD-10	Human	Female	49	2021	Urine	Saitama	G	(-)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stG485	ST29 (CC29)		erm(A)	≤0.03	≤0.5	1	4	≤0.12	0.5
SD-11	Human	Female	23	2021	Open pus	Saitama	G	(+++)			lmb		sicG	srp1	srp2	brpA	stC839	ST3		mef(A)	≤0.03	≤0.5	> 2	4	≤0.12	0.5
SD-12	Human	Male	76	2021	Urine	Saitama	G	(++)	prtF1		lmb			srp1	srp2	brpA	stC									

### 3-3. Biofilm 産生能の評価

すべての実験対象株において, biofilm 産生能が評価された. Biofilm 産生能について, strong biofilm producer (+++) が 17 株 (26.6 %), moderate biofilm producer (++) が 24 株 (37.5 %), weak biofilm producer (+) が 12 株 (18.8 %), no biofilm producer (-) が 11 株 (17.2 %) であった (表 13). また, ATCC 12394 および ATCC 12388 は, それぞれ moderate biofilm producer (++) , weak biofilm producer (+) であった.

宿主種と biofilm 産生能との関連性について, 人由来株において伴侶動物由来株と比較して, 有意に高かった ( $p < 0.05$ ). 分離部位と biofilm 産生能との関連性について, 多重比較検定により, 膿/皮膚由来株は, 眼/耳由来株と比較して, biofilm 産生能が有意に高かった ( $p < 0.05$ ). 分離地域と biofilm 産生において, 有意な関連性はみられなかった (表 14).

### 3-4. Lancefield 分類

Lancefield 分類について, G 群に属する株は, 55 株 (人由来 50 株, 伴侶動物由来 5 株) であった. また, C 群に属する株は, 8 株 (人由来 2 株, 伴侶動物由来 6 株) であり, A 群に属する株は 1 株 (伴侶動物由来株) であった.

Biofilm 産生能との関連性について, 多重比較検定により, G 群に属する株は, C 群に属する株と比較して, biofilm 産生能が有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (表 14).

### 3-5. *emm* 型の決定

すべての実験対象株において, *emm* 型が決定された. *emm* 型について, *stG485*, *stG6792* が各 12 株, *stG245*, *stG652* が各 6 株, *stC9431* が 5 株, *stG10* が 4 株, *stC74a*, *stG2078*, *stL1929* (*stC1929*) が各 2 株であった (表 13). また, ATCC 12394, ATCC 12388 における *emm* 型は, それぞれ *stG166b*, *stC74a* であった.

*emm* 型と biofilm 産生において, 有意な関連性はみられなかった (表 15).

20 表15. 実験対象株における biofilm 産生能と遺伝的特徴との関連性

OD<sub>isolate</sub> = mean value of optical density (OD) at 545 nm for isolates. OD<sub>control</sub> = OD at 545 nm for the culture medium alone (as the blank).  
ODc = mean value of OD<sub>control</sub> + (3 × standard deviation of OD<sub>control</sub>).

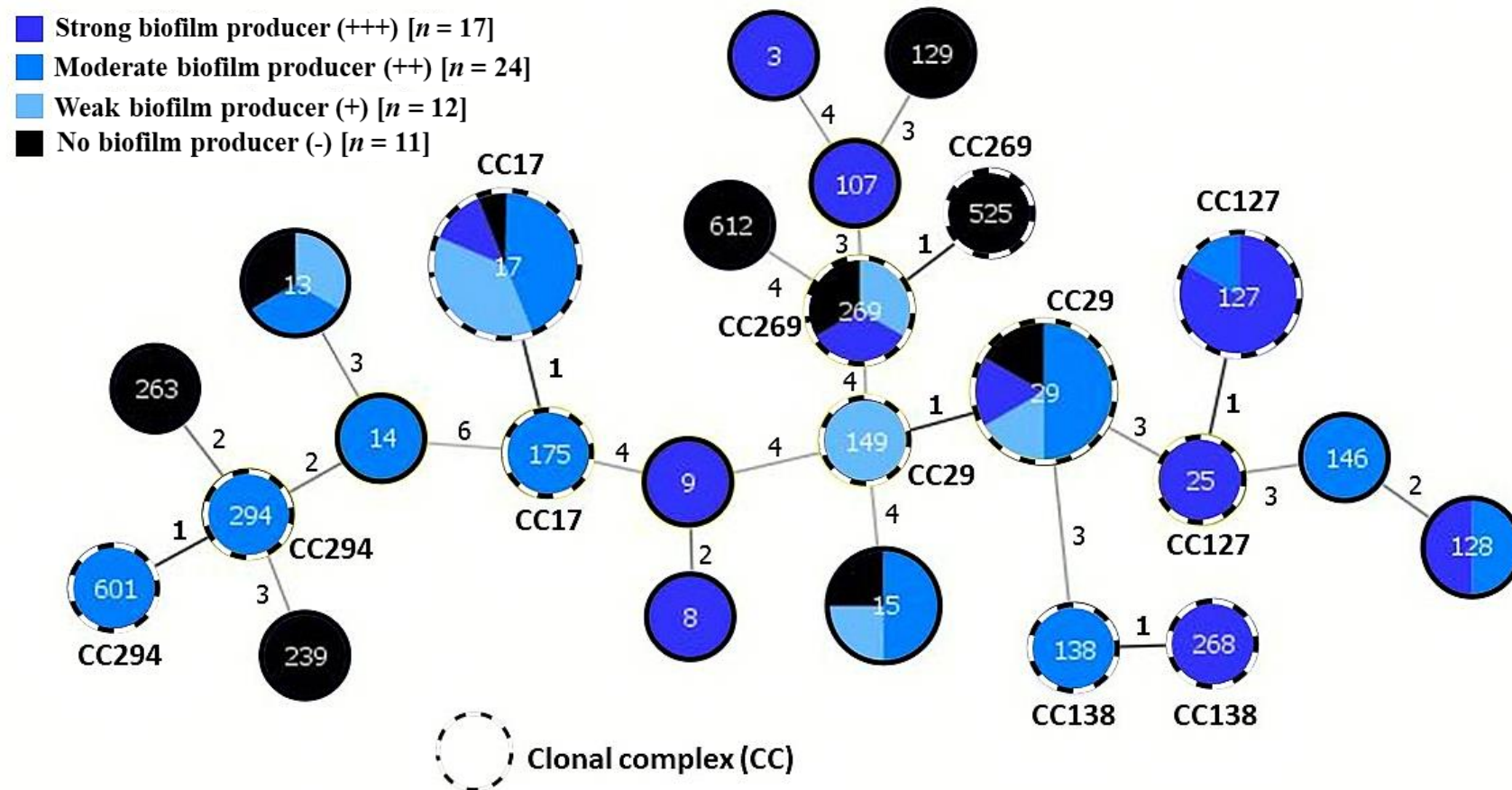


図1. SDSE における goeBURST

円中の数字は, sequence type (ST) を示す. 線に隣接する数字は, 接続する 2 つの ST 間の allele の variant 数を示す. 点線の円は, clonal complex (CC) を示す.

### 3-6. MLST 解析

人由来株 (CG31) において, 新規 ST (Allele: *gki-gtr-murI-mutS-recP-xpt-atoB*) である, ST612 (3-66-4-1-76-15-10) を決定した. 伴侶動物由来株 (KU108) においても, 新規 ST である ST601 (10-6-7-7-12-13-8) を決定した.

CC17 に属する株 (ST17, ST175) は 17 株, CC29 に属する株 (ST29, ST149) は 13 株, CC127 に属する株 (ST127, ST25) は 7 株, CC269 に属する株 (ST269, ST525) は 4 株, CC138 に属する株 (ST138, ST268) は 2 株, CC294 に属する株 (ST294, ST601) は 2 株であった (表 13). また, ATCC 12394, ATCC 12388 における ST は, それぞれ ST25, ST70 であった.

Biofilm 産生能との関連性について, 多重比較検定により, CC127 に属する株は, CC17 に属する株と比較して, 有意に biofilm 産生能が高かった ( $p < 0.05$ ) (図 1).

### 3-7. 薬剤感受性の判定

すべての実験対象株では, PCG に対して感性であった. TC/MINO に対しては, 12 株が耐性であった. EM/CAM/AZM に対しては, 17 株が耐性であった. CLDM に対しては, 6 株が耐性であった. LVFX に対しては, 1 株が耐性であった (表 13). また, ATCC 12394 および ATCC 12388 において, 本研究で用いたすべての抗菌薬に対して感性であった.

薬剤感受性結果と biofilm 産生において, 有意な関連性はみられなかった.

### 3-8. AMR 遺伝子の検出

AMR 遺伝子が検出された実験対象株は 27 株であった.

薬剤感受性結果に基づいた薬剤耐性株 23 株は, 1 株を除く, すべての株で対応する抗菌薬における AMR 遺伝子が検出された. AMR 遺伝子検出株において, 対応する抗菌薬に感性を示した例は 5 例 (SD-8: *tet*(M)-MINO, SD-9: *tet*(M)-MINO, SD-12: *tet*(M)-MINO, KU108: *tet*(O)-MINO, KU108: *erm*(B)-MLS<sub>B</sub>) あった (表 13). また, ATCC

12394 および ATCC 12388 において、本研究で用いたすべての AMR 遺伝子は、検出されなかった。

AMR 遺伝子検出率と biofilm 産生において、有意な関連性はみられなかった。

### 3-9. 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子の検出率について、すべての実験対象株で *brpA* が検出された。次に *srtpl* 検出率が高く 96.9 % であり、*lmb* 検出率が 87.5 %, *prtF1* 検出率が 57.8 %, *srtpl2* 検出率が 40.6 %, *cbp* 検出率が 28.1 %, *sicG* 検出率が 21.9 % であった。加えて、本研究におけるすべての実験対象株で、*prtF2* は検出されなかった (表 13)。また、ATCC 12394, ATCC 12388 における病原性遺伝子プロファイルは、それぞれ *lmb-srtpl-brpA*, *prtF1-lmb-sicG-srtpl-brpA* であった。

Biofilm 産生能との関連性について、*srtpl* 検出率は biofilm 産生能が有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (表 15)。



## 4. 考察

本研究では人由来, 伴侶動物由来非侵襲性 SDSE 分離株における biofilm 産生能を評価し, biofilm 産生能に関連する特徴を明らかにした.

本研究では, biofilm 産生能と宿主種, 分離部位, Lancefield 分類, CC, 病原性遺伝子との間に関連性が示された. 一方, Ciszewski らは, 人由来 6 株と犬由来 6 株との間で biofilm 産生能に有意な差はみられなかったと報告している<sup>41)</sup>. 本研究との異なる結果が示されたことは, 実験株数が少数である点および biofilm 産生能が 4 種に分類されていないことが考えられる.

本研究では, 多重比較検定により, 膿/皮膚由来株と眼/耳由来株との間で biofilm 産生能に有意な差がみられた. 一方で, Ma らは, 台湾における人由来 G 群 SDSE 分離株では biofilm 産生能と分離部位との間に有意な関連性はなかったと報告している<sup>43)</sup>.

先行研究結果が, 本研究結果と異なったことは, 分離地域・調査した疫学因子の違いに由来すると示唆されるが, 本研究における結果の妥当性を確認するために, さらなる調査が必要と考えられる.

### 4-1. Lancefield 分類

Lancefield 分類は, 溶血性レンサ球菌における細胞壁上の多糖体抗原に基づいている<sup>44)</sup>. SDSE は, G 群, C 群, 稀に A 群に属することが知られている<sup>45) 46)</sup>.

本研究では, Lancefield 分類における G 群に属する株が最も多かった (85.9 %). また, G 群に属する株と C 群に属する株との間で biofilm 産生能に有意な差がみられた ( $p < 0.01$ ). G 群に属する株の biofilm 産生能において, strong biofilm producer (+++) が 17 株 (30.9 %), moderate biofilm producer (++) が 21 株 (38.2 %), weak biofilm producer (+) が 11 株 (20.0 %), no biofilm producer (-) が 6 株 (10.9 %)であった. 一方, C 群に属する株では, moderate biofilm producer (++) が 2 株 (25 %), weak biofilm producer (+) が 1 株 (12.5 %), no biofilm producer (-) が 5 株 (62.5 %) であり, strong

biofilm producer (+++) に属する株は観察されなかった.

同様の報告では, G 群に属する人由来 SDSE の biofilm 産生能において, strong biofilm producer (+++) および moderate biofilm producer (++) が 43.5 %, weak biofilm producer (+) および no biofilm producer (-) が 56.5 % と報告されている<sup>43)</sup>. 一方, C 群に属する人由来 SDSE の biofilm 産生能において, strong biofilm producer (+++) が 2.4 %, moderate biofilm producer (++) が 7.1 %, weak biofilm producer (+) が 29.8 %, no biofilm producer (-) が 60.7 % と報告しており<sup>47)</sup>, 本研究結果と同様の結果となった. これらのことから, Lancefield 分類が biofilm 産生能を特徴づける要因の 1 つになり得ると考えられる.

#### 4-2. *emm* 型の決定

本研究において, biofilm 産生能と *emm* 型との間に有意な関連性はなかった. 一方で, 先行研究では, biofilm 産生能と *stG10* との間に正の関連性, *stG245/stG840/stG6* との間に負の関連性が報告されている<sup>43)</sup>. 加えて, Santos らは, 高い biofilm 産生能を示した人由来, 馬由来 C 群 SDSE 分離株 21 株では, *stC6979* および *stC74a* が一般的であると報告した<sup>48)</sup>. これらのことから, 本研究結果は地域差が関連していると考えられる.

#### 4-3. MLST 解析

本研究では, CC127 と CC17 との間で biofilm 産生能に有意な差がみられた. 私たちの知る限り, SDSE における biofilm 産生能と CC との関連性を示した初めての報告である.

また, 本研究において, CC17 が最も多く (26.6%), 次に CC29 (20.3 %), CC127 (10.9 %) が多かった. McMillan らは, オーストラリア, ポルトガルおよびアメリカから分離された人由来 SDSE 分離株において, CC15 が最も多く (17.1 %), CC17, CC127 はそれぞれ 9.4 %, 6.0 % であったと報告した<sup>49)</sup>. 一方, Shinohara らは, 日本において

分離された人由来 SDSE 分離株では, CC17 が最も多く (34.2 %), 次に CC127 (28.1 %) であったと報告した<sup>50)</sup>. これらのことから, CC127, CC17 における biofilm 産生能との関連性は, 特に日本における SDSE の特徴づけに有用となり得ると考えられる.

#### 4-4. 薬剤感受性の判定・AMR 遺伝子の検出

本研究において, biofilm 産生能と薬剤感受性結果・AMR 遺伝子検出率との間に有意な関連性はなかった.

本研究では TC/MINO 耐性株が 18.8 %, EM/CAM/AZM 耐性株が 26.6 %, CLDM 耐性株が 9.4 % であった. また, 本研究における AMR 遺伝子検出率は, *tet(M)* が最も高く, 29.7 % であり, *erm(A)* および *erm(B)* 検出率は, それぞれ 10.9 %, 9.4 % であった. これらは, Shinohara らが示した薬剤感受性結果 (MINO: 30.8 %, EM: 31.5 %, CLDM: 25.5 %), AMR 遺伝子検出率 (*tet(M)*: 31.5 %, *erm(A)*: 8.9 %, *erm(B)*: 20.5 %) と CLDM 感受性結果, *erm(B)* 検出率を除いて, 同様の結果となった<sup>50)</sup>.

加えて, 本研究で観察された, 薬剤感受性結果と AMR 遺伝子の検出結果との乖離は, PCR 法による AMR 遺伝子増幅配列外の欠損などが要因であると考えられる<sup>51)</sup><sup>52)</sup>. このため, 薬剤感受性結果と AMR 遺伝子について, さらなる特徴づけが必要と考えられる.

#### 4-5. 病原性遺伝子の検出

本研究では, biofilm 産生能と *srtp1* 検出率との間に有意な関連性がみられた. 同様の報告では, *S. pyogenes* において, 線毛が biofilm 産生能に関与していることが報告されている<sup>53)</sup>.

SDSE において, 2 種の pilus islands (PI-1, PI-2) が報告されており, *srtp1* は PI-1 に属する sortase をコードしている<sup>25)43)</sup>. これらのことから, SDSE において, PI-1 が biofilm 産生能に影響していると示唆された. しかしながら本研究で得られた *srtp1* 非

検出株は 2 株だけであった。このため本研究における結果の妥当性を確認するために、さらなる菌株収集、調査が必要と考える。

本研究では、宿主の基礎疾患、抗菌薬使用歴、治療経過などの情報が限られていた。このため、biofilm 産生能とこれら臨床情報との関連性を明確にすることが出来なかった。しかし、biofilm 産生能と臨床情報との関連性は、レンサ球菌感染症の診断や治療において、有用である可能性がある。

加えて、本研究では、RT-qPCR による線毛関連遺伝子などの発現量を調査していない。Genteluci GL らは、biofilm 産生能が高い株において、線毛関連遺伝子の発現量が増加していること報告している<sup>47)</sup>。このため、病原性遺伝子の発現解析などさらなる調査が必要と考える。

本研究結果から、非侵襲性 SDSE 株における biofilm 産生能と宿主情報、Lancefield 分類、CC および病原性遺伝子との関連性を明らかにした。今後、biofilm 産生能と宿主情報（基礎疾患、抗菌薬使用歴、治療経過など）との関連性および培地の変化（ブドウ糖、人血清添加など）による biofilm 産生能への影響の調査が必要であると考ええる。

## 第2章 *Streptococcus agalactiae* における biofilm 産生能と関連因子の解析

### 2. 序論

#### 1-1. 目的

本研究では伴侶動物/人由来 GBS 株を対象として, biofilm 産生能の評価とその関連因子の探索を目的とした. 加えて, 同菌の biofilm 産生能に対するベルベリンの影響を明らかにすることを目的とした.

#### 1-2. 伴侶動物

伴侶動物はペットとして愛玩されるとともに, 動物介在療法など, 人の精神的・肉体的な機能の向上を目的に, 明確な役割を担うこともある. また, 「家庭どうぶつ白書 2018」によると, 日本における動物病院/診療所数は, 2017 年において 11,839 施設あり, 2005 年からその数は徐々に増加している<sup>54)</sup>. また, 獣医学の発展や飼育法の普及により飼い猫・犬の平均寿命は延びており, 2021 年において, それぞれ 14.7 歳, 14.2 歳であった<sup>55)</sup>.

これらのことから人と伴侶動物の接点はさらに増加することが予想され, CDC が提唱する One Health の考え方にに基づき, 人間, 動物, および環境間で伝播し得る AMR 菌を, 全体的な健康状態を維持するために監視していく必要がある.

#### 1-3. GBS における biofilm 産生能

GBS は, 人以外においても牛, 伴侶動物や魚など様々な宿主から分離される<sup>56)</sup>. 当研究室の先行研究において, 16S rRNA 配列解析と GBS の菌種特異的遺伝子である, *dltS* (encoding histidine kinase membrane sensor protein) の検出による種の同定について, 罹患した犬と猫から分離された,  $\beta$  溶血性レンサ球菌 131 株の中で, GBS と同定された株が 5.3 % 占めたことが明らかとなった<sup>27)</sup>.

GBS における biofilm 産生能において, いくつかの病原因子が影響していると考えられている<sup>24)</sup>. これら病原因子の中で, 線毛が biofilm 産生の発達に寄与する. GBS における線毛は, 3 種類知られており, それぞれ, PI-1 (SDSE における PI-1 とは異なる

る), PI-2a, PI-2b と呼ばれている。また, PI-2a, PI-2b は互いに対立遺伝子座の関係にあり, GBS はどちらかの遺伝子座を有することが知られている<sup>57)</sup>。これら線毛の中で, biofilm 産生能に影響を与えるものは, PI-1, PI-2a であると人/牛由来株で報告された<sup>58)</sup><sup>59)</sup>。しかしながら, これら知見は, 伴侶動物由来株においては明らかにされていない。

#### 1-4. 製剤におけるベルベリン

ベルベリンは, 生薬におけるオウバク (Phellodendron bark) から抽出されるアルカロイドの 1 種である。人および動物に用いられる製剤としてのベルベリンの適応症は, 下痢症のみである<sup>60) 61)</sup>。一方で, ベルベリンにおける特徴として, 抗菌活性があると知られている<sup>62)</sup>。また, 近年 *Staphylococcus* 属菌で biofilm 産生阻害活性が示された<sup>63) 64)</sup>。

これらのことから, 本研究を実施にするにあたり, 我々はベルベリンが GBS における biofilm 産生においても影響を与えると仮説をたてた。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 菌株収集

#### 2-1-1. 分離菌株

本研究においては, 2017 年 4 月から 2019 年 10 月の期間に伴侶動物より分離された GBS 22 株 (非侵襲性株 21 株, 定着株 1 株) および 2015 年 1 月から 2019 年 5 月の期間に人より分離された GBS 52 株 (侵襲性株 2 株, 非侵襲性株 15 株, 定着株 35 株) を実験対象株とした<sup>30)</sup>. 加えて, 精度管理株として GBS 基準株である ATCC 13813<sup>T</sup> を研究に用いた.

また, 本研究における分離菌株は, 無菌的検体由来株を侵襲性株, 尿・膿由来株を定着株, これらに属さない株を非侵襲性株と定義した.

#### 2-1-2. 分離菌株の培養および保存

分離菌株は, 当研究室において heart infusion broth・濃グリセリン混合液に懸濁し, -70 °C から -80 °C で保存した. 分離菌株は, 37 °C の条件下, ヒツジ血液寒天培地上で 24 時間培養後, 実験に使用した.

### 2-2. 菌株同定

#### 2-2-1. DNA テンプレートの抽出

分離菌株を TE buffer (表 16) 100  $\mu$ L に, 濁度がマックファーランド 0.5 となるように懸濁した. その後, サーマルサイクラーを用いて, 97 °C, 10 分間の反応条件下で分離菌株の溶菌操作を行った<sup>29)30)</sup>. 卓上遠心機を用いて, 10,000 rpm, 2 分間の遠心分離後, 沈殿物を吸い取らないように上清を回収した. この上清を template DNA 溶液として実験に用いた.

表16. TE buffer 組成

試薬	用量 (500 mL)	最終濃度
1.0 M トリス塩酸 buffer	5 mL	10 mM
0.5 M EDTA	1 mL	1 mM
Distilled water	494 mL	

## 2-2-2. 16S rRNA 配列解析, 菌種特異的遺伝子 (*dltS*) 検出による菌種同定

16S rRNA について, 2-2-1 により得られた template DNA 溶液, 16S rRNA を特異的に増幅するプライマー (表 17) を用いて, 表 18 に示す反応液組成, 反応条件下で, PCR 法により増幅させた<sup>30)31)</sup>. その後, PCR 増幅産物を用いて, アガロースゲル電気泳動を行い, 泳動後, 臭化エチジウム溶液にて染色した. 染色後, UV トランスイルミネーターにて, 増幅バンドを確認した. 16S rRNA 反応液組成, 反応条件は, 必要に応じて, (1), (2) または (3) のいずれかを使用した.

16S rRNA 増幅産物は, DNA 精製キット (QIAquick® PCR Purification Kit, キアゲン, 東京) により, 増幅産物の精製を行った. その後, BigDye Terminator v3.1, BigDye Xterminator によりシーケンス反応, 精製を行い, 3130xl Genetic Analyzer を用いて泳動した. 得られた塩基配列は, Finch TV version 1.4.0 (フリーソフト, Geospiza, <http://www.digitalworldbiology.com/finchtv>) により, 正確性を検証した. Serial Cloner version 2.6.1 (フリーソフト, [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)) を用いて, ATCC 13813<sup>T</sup> の 16S rRNA 配列との相同性が 98.7 % 以上であることを確認した.

加えて, GBS の菌種特異的遺伝子である, *dltS* について, 2-2-1 により得られた template DNA 溶液, *dltS* を特異的に増幅するプライマー (表 19) を用いて, 表 20 に示す反応液組成, 反応条件下で, PCR 法により増幅後, 臭化エチジウム染色にて増幅バンドを確認した<sup>65)</sup>.



表17. 16S rRNA増幅用プライマー配列 (M = A or C)

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	1,497	30, 31
	1485R	TACGGTTACCTTGTTACGAC	20		

表18. 16S rRNA増幅における反応液組成および反応条件

(1) PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 µL	初回変性	94 °C	1 min	
primer F (5 mM)	2 µL	変性	94 °C	30 sec	
primer R (5 mM)	2 µL	アニーリング	62 °C	90 sec	35 cycles
Template DNA (< 200 ng)	2 µL	伸長	72 °C	90 sec	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.2 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
Deionized and sterilized water	29.8 µL				
	50 µL				

(2) Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 µL	初回変性	94 °C	1 min	
primer F (5 µM)	4 µL	変性	94 °C	30 sec	
primer R (5 µM)	4 µL	アニーリング	62 °C	90 sec	35 cycles
Template DNA (< 200 ng)	2 µL	伸長	72 °C	90 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
Deionized and sterilized water	30.75 µL				
	50 µL				

(3) Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 µL	初回変性	93 °C	3 min	
primer F (5 mM)	2 µL	変性	93 °C	1 min	
primer R (5 mM)	2 µL	アニーリング	62 °C	1 min	30 cycles
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	伸長	65 °C	4 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 µL	最終伸長	65 °C	3 min	
Deionized and sterilized water	15.375 µL				
	25 µL				

表19. 菌種特異的遺伝子増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>dltS</i>	dlts-F	CTGTAAGTCTTTATCTTTCTCG	22	199	66
	dlts-R	TCCATTCGCTTAGTCTCC	18		

表20. 菌種特異的遺伝子増幅における反応液組成および反応条件

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	1 µL	初回変性	95 °C	2 min	40 cycles
primer R (5 µM)	1 µL	変性	95 °C	10 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	53 °C	30 sec	
PrimeSTAR HS polymerase	0.25 µL	伸長	72 °C	20 sec	
Deionized and sterilized water	14.75 µL	最終伸長	72 °C	5 min	
	25 µL				

### 2-3. Biofilm 産生能の評価

人由来株 6 株 (非侵襲性株 3 株, 定着株 3 株), 伴侶動物由来株 5 株 (非侵襲性株 5 株) および ATCC 13813<sup>T</sup> の成長曲線に基づいて, OD<sub>600</sub> = 1 あたりの CFU/mL の係数を得た (OD<sub>600</sub> = 1 の時, 人由来株:  $5 \times 10^8$  CFU/mL, 伴侶動物由来株:  $1 \times 10^9$  CFU/mL).

実験対象株におけるヒツジ血液寒天培地上のシングルコロニーを BHI broth 5 mL に接種し, 37 °C, 14 時間培養した. この 14 時間培養液を先述の係数に基づいて,  $1 \times 10^5$  CFU/mL に希釈した. この希釈溶液 100 µL を平底 96 ウェルポリスチレンマイクロプレート (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, 東京) に入れ, 37 °C, 48 時間培養した. その後, リン酸 buffer にて 4 回洗浄し, 60 °C, 1 時間乾燥させた. 乾燥後, 0.1 % クリスタルバイオレット溶液 100 µL を各ウェルに加え, 2 分間染色した. 染色液を丁寧に取り除いた後, 超純水にて洗浄を行った. その後, 脱染液 (7.5 % 酢酸/10 % メタ

ノール水溶液) 100 μL を各ウェルに加え, OD を主波長 545 nm, 副波長 630 nm にて測定した. 各株のサンプル数は 5 とし, 実験は 2 回以上行い, 再現性を確認した. また, 本実験において, BHI broth のみの状態を negative control として用いた.

得られた各株の OD 値の平均値を, 表 21 の基準に従い, biofilm 産生能の分類を行った<sup>32) 33)</sup>. その後, 本研究において, strong biofilm producer (+++), moderate biofilm producer (++) および weak biofilm producer (+) に属する株を biofilm 産生群, no biofilm producer (-) に属する株を biofilm 非産生群と分類した.

表21. Biofilm 産生能の分類

Classification of biofilm producers	Definition
Strong biofilm producer (+++)	$(4 \times OD_c) < OD_{isolate}$
Moderate biofilm producer (++)	$(2 \times OD_c) < OD_{isolate} \leq (4 \times OD_c)$
Weak biofilm producer (+)	$OD_c < OD_{isolate} \leq (2 \times OD_c)$
No biofilm producer (-)	$OD_{isolate} \leq OD_c$
$OD_{isolate}$ = mean value of optical density (OD) at 545 nm for isolates. $OD_{control}$ = OD at 545 nm for the culture medium alone (as the blank). $OD_c$ = mean value of $OD_{control} + (3 \times \text{standard deviation of } OD_{control})$ .	

## 2-4. 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子として, *hylB* (encoding hyaluronate lyase), *pavA* (encoding fibronectin-binding protein), *pilB* (encoding backbone protein of pilus island 2a), *spbI* (encoding backbone protein of pilus island 2b), *srtC1* (encoding sortase C1 of pilus island 1), *brpA* (encoding biofilm regulatory protein) を, 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 22, 表 23), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>57) 66) 67) 68)</sup>.

表22. 病原性遺伝子増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>hylB</i>	hylB-F	GATATAGAAGGCTCTGCCAA	20	413	66
	hylB-R	GGCAGCAATTGTGTCAAACCA	21		
<i>pavA</i>	pavA-F	CCTATCGTACTATCCTTCCTGG	22	408	
	pavA-R	TCTCTAACTCACTTTGAACAC	21		
<i>pilB</i>	pilB-F	CCGAAAAGACAAAGGTGTTGT	21	450	
	pilB-R	CCATCTACTGCCAGTCTTTAAT	23		
<i>spb1</i>	spb1-F	CCTGGGTCATCATTGCTAGT	20	208	57
	spb1-R	CGATTACTATTCCGTGGGCA	20		
<i>srtC1</i>	srtC1-F	CTACCAACGGCCAAGCTATTTACC	24	394	67
	srtC1-R	TAGCCGCTTTTTTCATTCTTTCTCC	24		
<i>brpA</i>	brpA-F	CTATGCTTCTGGTGGTGCGGAA	22	726	68
	brpA-R	CCACTGTAACCTGGTGGTGCTTCTG	25		

表23. 病原性遺伝子増幅における反応液組成および反応条件

(1) *hylB*, *pavA*, *srtC1*, *brpA*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	2 µL	初回変性	94 °C	2 min 30 sec	35 cycles
primer R (5 µM)	2 µL	変性	94 °C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	56 °C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 µL	伸長	72 °C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
	25 µL				

(2) *pilB*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	2 µL	初回変性	94 °C	2 min	35 cycles
primer R (5 µM)	2 µL	変性	94 °C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	64 °C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 µL	伸長	72 °C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 µL	最終伸長	72 °C	5 min	
	25 µL				

(3) *spbl*

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	2 µL	初回変性	94 °C	5 min	35 cycles
primer R (5 µM)	2 µL	変性	94 °C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	60 °C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 µL	伸長	72 °C	1 min	
Deionized and sterilized water	15.375 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
	25 µL				

## 2-5. *cps* 遺伝子型の決定

すべての分離株の template DNA 溶液から、菌体が産生する *cps* のコード領域の増幅を PCR 法 (表 24, 表 25), 臭化エチジウム染色により観察し, *cps* 遺伝子型 (*Ia*, *Ib*, *II~VIII*) を判定した<sup>15) 30)</sup>. また, すべての遺伝子型が増幅されなかった株を non-typeable と定義した.

表24. 莢膜遺伝子型決定用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>cps (Ia)</i>	Ia-F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATG	23	210	15, 30
	Ia-R	TAGCTACTATTCCAGCCCTG	20		
<i>cps (Ib)</i>	Ib-F	TATACTTGCCCAACCAAC	18	194	
	Ib-R	ACTTATTGGTTTGTGATATTCC	22		
<i>cps (II)</i>	II-F	TTACAATGACTATACGCAATTAGG	24	210	
	II-R	TCTTTCAAACACTTACTTCTATCG	25		
<i>cps (III)</i>	III-F	CGTTATTATGTTACACGCTC	20	281	
	III-R	CAAGTATGCGATTATCTTCC	20		
<i>cps (IV)</i>	IV-F	TAGGGTGGAATTATTTAGTAATTTATATGG	30	238	
	IV-R	ACTGTAAGAAGAACTCATTATACTAGC	27		
<i>cps (V)</i>	V-F	GACAGTGATGATGTTTATCTTCC	23	268	
	V-R	TTCCTTCTGGATATGGATTACTC	23		
<i>cps (VI)</i>	VI-F	AGTACAAGATTGACAGTCTATTACG	25	300	
	VI-R	CAATACAACACTCCAATGATTAGG	24		
<i>cps (VII)</i>	VII-F	ATGGCGGTCAATCCTCTGC	19	167	
	VII-R	GCGGTCTTCGATTCCAGTTATC	22		
<i>cps (VIII)</i>	VIII-F	ATAATGGTGGTCTATCTGATGCG	23	202	
	VIII-R	TTCTCGTGTGTCTCTTGATTACC	23		

表25. 莢膜遺伝子型決定における反応液組成および反応条件

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	5 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
dNTP mix	2 µL				
primer F (5 µM)	1 µL	初回変性	95 °C	2 min	
primer R (5 µM)	1 µL	変性	95 °C	10 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 µL	アニーリング	53 °C	30 sec	
PrimeSTAR HS polymerase	0.25 µL	伸長	72 °C	20 sec	40 cycles
Deionized and sterilized water	14.75 µL	最終伸長	72 °C	5 min	
	25 µL				

## 2-6. MLST 解析

GBS におけるハウスキーピング遺伝子である, *adhP* (encoding alcohol dehydrogenase), *pheS* (encoding phenylalanyl tRNA synthetase), *atr* (encoding glutamine transporter protein), *glnA* (encoding glutamine synthetase), *sdhA* (encoding serine dehydratase), *glcK* (encoding glucose kinase), *tkt* (encoding transketolase) の増幅を 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 26, 表 27), 臭化エチジウム染色により観察した<sup>69)</sup>. MLST 反応液組成は, 必要に応じて, (1) または (2) のどちらかを使用した.

7 種のハウスキーピング遺伝子の増幅産物は, 2-2-2 と同様の方法で精製され, シーケンシング用プライマー (表 28) を使用して, 塩基配列の取得および正確性の検証を行った. 得られた塩基配列に基づいて, PubMLST ([https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst\\_sagalactiae\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_sagalactiae_seqdef), 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) により, 各ハウスキーピング遺伝子の allele number を決定した. 加えて, 同サイトにて各ハウスキーピング遺伝子の allele number の組み合わせから ST を決定した. Allele プロファイルのうち, single locus variant となる, 異なる ST を同一の CC として系統化した.

ST に基づいた最小スパニングツリーは, PHYLOViZ 2.0 (フリーソフト, <http://www.phyloviz.net/>) を用いて goeBURST アルゴリズムにより作成した<sup>36)</sup>.

表26. MLST増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>adhP</i>	adhP-F	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	20	672	70
	adhP-R	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	20		
<i>pheS</i>	pheS-F	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	20	723	
	pheS-R	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	20		
<i>atr</i>	atr-F	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	20	627	
	atr-R	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	20		
<i>glnA</i>	glnA-F	CCGGCTACAGATGAACAATT	20	589	
	glnA-R	CTGATAATTGCCATTCCACG	20		
<i>sdhA</i>	sdhA-F	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	20	646	
	sdhA-R	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	20		
<i>glcK</i>	glcK-F	CTCGGAGGAACGACCATTAA	20	607	
	glcK-R	CTTGTAACAGTATCACCGTT	20		
<i>tkt</i>	tkt-F	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	20	859	
	tkt-R	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	20		

表27. MLST増幅における反応液組成および反応条件

## (1) PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 μL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 μL				
primer F (5 μM)	2 μL	初回変性	94 °C	2 min	35 cycles
primer R (5 μM)	2 μL	変性	94 °C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	2 μL	アニーリング	53 °C	45 sec	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 μL	伸長	72 °C	1 min	
Deionized and sterilized water	29.5 μL	最終伸長	72 °C	5 min	
	50 μL				

## (2) Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	5 μL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 μL				
primer F (5 μM)	4 μL	初回変性	94 °C	2 min	35 cycles
primer R (5 μM)	4 μL	変性	94 °C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	2 μL	アニーリング	53 °C	45 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 μL	伸長	72 °C	1 min	
Deionized and sterilized water	30.75 μL	最終伸長	72 °C	5 min	
	50 μL				



表28. MLSTシーケンシング用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Reference
<i>adhP</i>	adhP-seq-F	GGTGTGTGCCATACTGATTT	20	70
	adhP-seq-R	ACAGCAGTCACAACCACTCC	20	
<i>pheS</i>	pheS-seq-R	TGATGGAATTGATGGCTATG	20	
<i>atr</i>	atr-seq-R	CCTTGCTCAACAATAATGCC	20	
<i>glnA</i>	glnA-seq-F	AATAAAGCAATGTTTGATGG	20	
	glnA-seq-R	GCATTGTTCCCTTCATTATC	20	
<i>sdhA</i>	sdhA-seq-F	AACATAGCAGAGCTCATGAT	20	
	sdhA-seq-R	GGGACTTCAACTAAACCTGC	20	
<i>glcK</i>	glcK-seq-F	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	20	
	glcK-seq-R	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	20	
<i>tkt</i>	tkt-seq-F	ACACTTCATGGTGATGGTTG	20	
	tkt-seq-R	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	20	

## 2-7. 薬剤感受性の判定

薬剤感受性試験について、分与を受けた施設において、微量液体希釈法によって MIC 値が測定された。CLSI document M100-S22/S25 に準拠し、PCG, MINO, EM/CLDM および LVFX の感受性が判定された<sup>37) 38)</sup>。

## 2-8. AMR 遺伝子の検出

2-2-1 により得られた template DNA 溶液を使用して、テトラサイクリン系耐性遺伝子となる *tet*(M) (encoding ribosomal protection protein), *tet*(O) (encoding ribosomal protection protein), *tet*(K) (encoding membrane-associated efflux pump), *tet*(L) (encoding membrane-associated efflux pump), *tet*(S) (encoding ribosomal protection protein), *tet*(Q) (encoding ribosomal protection protein) および MLS<sub>B</sub> 耐性遺伝子となる *erm*(A) (encoding inducible-type methylase), *erm*(B) (encoding constitutive-type methylase), *erm*(F) (encoding constitutive-type methylase), *mef*(A) (encoding transmembrane domains of ABC transporter) の増幅を 2-2-2 と同様に PCR 法 (表 29, 表 30), 臭化エチジウム染色に

より観察した<sup>39) 40) 70)</sup>.

表29. 薬剤耐性遺伝子増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer )	Amplicon size (bp)	Reference
<i>tet</i> (M)	tetM-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	20	406	39
	tetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	20		
<i>tet</i> (O)	tetO-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	21	515	
	tetO-R	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	21		
<i>tet</i> (K)	tetK-F	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	25	155	39
	tetK-R	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT	25		
<i>tet</i> (L)	tetL-F	TGGTGGAATGATAGCCCAT	20	229	
	tetL-R	CAGGAATGACAGCACGCTAA	20		
<i>tet</i> (S)	tetS-F	TCCGATAGTGATCCCCTTCT	20	445	40
	tetS-R	GGAAATCTGCTGGCGTACTG	20		
<i>tet</i> (Q)	MR6	TTATACTTCCTCCGGCATCGGT	22	658	70
	MR7	CTGTCCCTAACGGTAAGG	18		
<i>erm</i> (A)	ermA-F	CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT	24	590	39
	ermA-R	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	23		
<i>erm</i> (B)	ermB-F	TGGTATTCCAAATGCGTAATG	21	745	
	ermB-R	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	20		
<i>erm</i> (F)	F1	CGGGTCAGCACTTTACTATTG	21	466	70
	F2	GGACCTACCTCATAGACAAG	20		
<i>mef</i> (A)	mefA-F	CAATATGGGCAGGGCAAG	18	317	39
	mefA-R	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	20		

表30. 薬剤耐性遺伝子増幅における反応液組成および反応条件

(1) *tet* (M), *tet* (O), *tet* (K), *tet* (L), *tet* (S), *erm* (A), *erm* (B), *mef* (A)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	93 $^{\circ}$ C	3 min	30 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	93 $^{\circ}$ C	1 min	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	62 $^{\circ}$ C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	65 $^{\circ}$ C	4 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	65 $^{\circ}$ C	3 min	
	25 $\mu$ L				

(2) *tet* (Q)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	3 min	35 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	96 $^{\circ}$ C	20 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	46 $^{\circ}$ C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	2 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	5 min	
	25 $\mu$ L				

(3) *erm* (F)

試薬	用量	反応条件			
10x Ex-Taq Buffer	2.5 $\mu$ L	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	2 $\mu$ L				
primer F (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	初回変性	94 $^{\circ}$ C	3 min	35 cycles
primer R (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	変性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA (< 200 ng)	1 $\mu$ L	アニーリング	50 $^{\circ}$ C	30 sec	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 $\mu$ L	伸長	72 $^{\circ}$ C	2 min	
Deionized and sterilized water	15.375 $\mu$ L	最終伸長	72 $^{\circ}$ C	5 min	
	25 $\mu$ L				

## 2-9. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響

乾燥した *Phellodendron bark* (*Phellodendri cortex*, ウチダ和漢薬, 東京) 100 g をメタノール 400 mL へ 80  $^{\circ}$ C, 3 時間浸潤させた. その後, ろ過によりメタノールを回収し, 減圧下で 30 mL となるまで濃縮した. この濃縮液に 2 mol/L 塩酸 20 mL を加え, 室温で 10 分間攪拌した. その後, 溶液中のベルベリン塩酸塩の粗結晶 2.4 g をろ過により回収し, 酢酸エチルにて 2 回洗浄し, メタノール 30 mL に再溶解させた. こ

のメタノール溶液を室温で 18 時間静置させ、ろ過により結晶 1.3 g を回収した。得られた結晶を同様の方法でメタノールによる再結晶を 2 回行い、ベルベリン塩酸塩 0.92 g を回収し、高速液体クロマトグラフを用いて、純度 98 % 以上であることを確認した。

本研究において *Phellodendron bark* から抽出したベルベリン塩酸塩を用いた (deposit #: H210016)。

ATCC 13813<sup>T</sup> および strong biofilm producer (+++) に属した株におけるベルベリン塩酸塩に対する MIC 値を寒天平板希釈法により測定した。加えて、精度管理株として、*S. pyogenes* ATCC 12344<sup>T</sup>, ATCC 12394, *Streptococcus canis* NCTC 12191<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 および *Escherichia coli* ATCC 25922 におけるベルベリン塩酸塩に対する MIC 値を併せて測定した。

得られた ATCC 13813<sup>T</sup> における MIC 値の 2, 1, 0.5, 0.25 および 0.125 倍濃度となるようにベルベリン塩酸塩を BHI broth へ溶解し、2-3 における 14 時間培養液を希釈する溶媒として用いた。その後、strong biofilm producer (+++) に属した株を対象として、2-3 と同様の方法で biofilm 産生能を評価した。

## 2-10. 統計解析

本研究におけるすべての統計解析は、web 上のアプリケーション (<http://www.grade-jpn.com/2x2.html>, 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) により、Fisher の直接確率検定 (両側検定) を用いて有意差検定を行った。また、*p* 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 2-11. 倫理委員会承認

本研究は、宿主情報漏洩防止の観点から、サンリツセルコバ検査センター (承認番号: SZ20201218-2) および北里大学メディカルセンター (承認番号: 2018024) の倫理委員会による承認を得て実施した。

### 3. 結果

#### 3-1. 菌株収集

分離部位として、無菌的検体由来株 (blood, chorionic membrane) 2 株, 皮膚科領域由来株 (open pus, skin) 12 株, 耳鼻科領域由来株 (ear, nose, throat) 12 株, 喀痰由来株 8 株, 眼科領域由来株 3 株, 乳由来株 1 株, 膣由来株 24 株, 尿由来株 12 株であった. 宿主情報として, 伴侶動物由来株では, 犬 20 匹 (平均年齢 11.2 歳, 雄 8 匹, 雌 12 匹), 猫 1 匹 (年齢不明, 雄) であり, 人由来株では, 23 歳から 94 歳 (平均年齢 51.1 歳) であり, 男性は 19 人, 女性は 33 人であった.

#### 3-2. 菌株同定

すべての実験対象株において, 16S rRNA 配列が ATCC 13813<sup>T</sup> における 16S rRNA 配列との相同性が 98.7 % 以上であり, かつ *dltS* が増幅された.

#### 3-3. Biofilm 産生能の評価

すべての実験対象株において, biofilm 産生能が評価された. Biofilm 産生能について, strong biofilm producer (+++) が 5 株 (6.8 %), moderate biofilm producer (++) が 26 株 (35.1 %), weak biofilm producer (+) が 26 株 (35.1 %), no biofilm producer (-) が 17 株 (23.0 %) であり, biofilm 産生群には 57 株, biofilm 非産生群には 17 株が属した (表 31). また, ATCC 13813<sup>T</sup> は, moderate biofilm producer (++) であった.

Biofilm 産生群 には, 伴侶動物由来株 18 株 (31.6 %) が属し, 人由来株 39 株 (68.4 %) が属した. 一方, biofilm 非産生群には, 伴侶動物由来株 4 株 (23.5 %) が属し, 人由来株 13 株 (76.5 %) が属した. しかしながら, 宿主種と biofilm 産生において, 有意な関連性はみられなかった. 分離部位と biofilm 産生能との関連性について, 膣由来株は biofilm 産生群において有意に多かった ( $p < 0.05$ ) (表 32).

表31. 実験対象株における biofilm 産生能

Classification of biofilm producers	Definition	Isolate (n)
Strong biofilm producer (+++)	$(4 \times \text{ODc}) < \text{OD}_{\text{isolate}}$	GB53, GB58, GB62, GB74, GB80 (5)
Moderate biofilm producer (++)	$(2 \times \text{ODc}) < \text{OD}_{\text{isolate}} \leq (4 \times \text{ODc})$	FU68, FU99, FU139, FU140, FU142, FU143, FU146, FU147, GB48, GB51, GB52, GB56, GB59, GB64, GB65, GB66, GB75, GB77, GB78, GB79, GB84, GB86, GB114, GB116, GB120, GB121 (26)
Weak biofilm producer (+)	$\text{ODc} < \text{OD}_{\text{isolate}} \leq (2 \times \text{ODc})$	FU37, FU60, FU73, FU117, FU135, FU136, FU141, FU144, FU148, FU151, GB10, GB13, GB20, GB50, GB54, GB55, GB63, GB68, GB71, GB72, GB73, GB76, GB82, GB83, GB85, GB119 (26)
No biofilm producer (-)	$\text{OD}_{\text{isolate}} \leq \text{ODc}$	FU130, FU137, FU138, FU145, GB14, GB21, GB22, GB57, GB60, GB61, GB67, GB69, GB70, GB81, GB115, GB117, GB118 (17)

$\text{OD}_{\text{isolate}}$  = mean value of optical density (OD) at 545 nm for isolates.

$\text{OD}_{\text{control}}$  = OD at 545 nm for the culture medium alone (as the blank).

$\text{ODc}$  = mean value of  $\text{OD}_{\text{control}} + (3 \times \text{standard deviation of } \text{OD}_{\text{control}})$ .

FU isolates ( $n = 22$ ) were recovered from companion animals, while GB isolates ( $n = 52$ ) were recovered from humans.

*S. agalactiae* type strain belonged to moderate biofilm producer.

表32. 実験対象株における biofilm 産生能と分離部位との関連性

Clinical specimen	Two biofilm groups consisting of strong, moderate, or weak producers and a non-producer	
	Prevalence (%) in a producer group ( $n = 57$ )	Prevalence (%) in a non-producer group ( $n = 17$ )
Vaginal specimen ( $n = 24$ )	38.6**	11.8**
Urinary specimen ( $n = 12$ )	14.0	23.5
Open pus/skin-derived specimens ( $n = 12$ )	17.5	11.8
Ear/nose/throat-origin specimens ( $n = 12$ )	15.8	17.6
Sputum ( $n = 8$ )	7.0	23.5
Eye discharge ( $n = 3$ )	3.5	5.9
Sterile specimens ( $n = 2$ )	1.8	5.9
Milk ( $n = 1$ )	1.8	0.0
Total no. 74	100%	100%

We defined strong, moderate, or weak biofilm producers as a producer group.

\*\*  $p < 0.05$ , a producer group vs. a non-producer group.

### 3-4. 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子の検出率について、すべての実験対象株で *pavA* および *brpA* が検出された。Biofilm 産生能との関連性について、*pilB* 検出率は biofilm 産生群において有意に高かった ( $p < 0.05$ )。一方、*spb1* 検出率は biofilm 非産生群において有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (表 33)。

6 種の病原性遺伝子プロファイルに関して、*hylB-pavA-pilB-srtC1-brpA* ( $n = 33$ ) が最も多かった。次に *hylB-pavA-spb1-srtC1-brpA* ( $n = 17$ ) が多く、その後 *hylB-pavA-spb1-brpA* ( $n = 9$ ) および *hylB-pavA-srtC1-brpA* ( $n = 7$ ) が多く観察された。Biofilm 産生能との関連性について、*hylB-pavA-pilB-srtC1-brpA* からなるプロファイルの検出率は biofilm 産生群において有意に高かった ( $p < 0.05$ )。一方、*hylB-pavA-spb1-srtC1-brpA* からなるプロファイルの検出率は biofilm 非産生群において有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (表 33)。また、ATCC 13813<sup>T</sup> における病原性遺伝子プロファイルは、*hylB-pavA-spb1-brpA* であった。

表33. 実験対象株における biofilm 産生能と病原性遺伝子との関連性

Virulence gene/gene profile	Two biofilm groups consisting of strong, moderate, or weak producers and a non-producer	
	Detection rate (%) in a producer group ( $n = 57$ )	Detection rate (%) in a non-producer group ( $n = 17$ )
Virulence gene		
<i>hylB</i>	98.2	100
<i>pavA</i>	100	100
<i>pilB</i>	57.9**	23.5**
<i>spb1</i>	24.6*	70.6*
<i>srtC1</i>	78.9	70.6
<i>brpA</i>	100	100
Virulence gene profile (total $n = 74$ )	100%	100%
<i>hylB-pavA-pilB-srtC1-brpA</i> ( $n = 33$ )	52.6**	17.6**
<i>hylB-pavA-spb1-srtC1-brpA</i> ( $n = 17$ )	15.8**	47.1**
<i>hylB-pavA-spb1-brpA</i> ( $n = 9$ )	8.8	23.5
<i>hylB-pavA-srtC1-brpA</i> ( $n = 7$ )	10.5	5.9
<i>hylB-pavA-pilB-brpA</i> ( $n = 4$ )	5.3	5.9
<i>hylB-pavA-brpA</i> ( $n = 3$ )	5.3	0
<i>pavA-brpA</i> ( $n = 1$ )	1.8	0

We defined strong, moderate, or weak biofilm producers as a producer group.

\*  $p < 0.01$ , a producer group vs. a non-producer group. \*\*  $p < 0.05$ , a producer group vs. a non-producer group.

*S. agalactiae* type strain harbored the *hylB-pavA-spb1-brpA* profile.

### 3-5. *cps* 遺伝子型の決定

Biofilm 産生群に属する 2 株を除いて、すべての実験対象株において *cps* 遺伝子型を決定された。観察された *cps* 遺伝子型において, *Ib* 型 ( $n = 25$ ), *V* 型 ( $n = 16$ ), *Ia* 型 ( $n = 9$ ), *III* 型 ( $n = 9$ ), *II* 型 ( $n = 6$ ), *VI* 型 ( $n = 4$ ), *VIII* 型 ( $n = 2$ ) および *IV* 型 ( $n = 1$ ) であった。Biofilm 産生能との関連性について、両群間で有意な差は見られなかった (表 34)。また, ATCC 13813<sup>T</sup> における *cps* 遺伝子型は *II* 型であった。

表34. 実験対象株における biofilm 産生能と *cps* 遺伝子型/CC との関連性

Capsular genotype/CC [consisting of STs]	Two biofilm groups consisting of strong, moderate, or weak producers and a non-producer	
	Prevalence (%) in a producer group ( $n = 57$ )	Prevalence (%) in a non-producer group ( $n = 17$ )
Capsular genotype	100%	100%
<i>Ib</i> ( $n = 25$ )	33.3	35.3
<i>V</i> ( $n = 16$ )	19.3	29.4
<i>Ia</i> ( $n = 9$ )	12.3	11.8
<i>III</i> ( $n = 9$ )	12.3	11.8
<i>II</i> ( $n = 6$ )	10.5	0.0
<i>VI</i> ( $n = 4$ )	5.3	5.9
<i>VIII</i> ( $n = 2$ )	1.8	5.9
<i>IV</i> ( $n = 1$ )	1.8	0.0
Non-typeable ( $n = 2$ )	3.5	0.0
CC [consisting of STs]	100%	100%
CC1 [ST1, ST2, ST458, ST676, and ST1388] ( $n = 28$ )	35.1	47.1
CC10 [ST10, ST1370, ST1383, and ST1396] ( $n = 13$ )	21.1	5.9
CC19 [ST19, ST27, ST335, and ST861] ( $n = 13$ )	15.8	23.5
CC23 [ST23 and ST144] ( $n = 9$ )	12.3	11.7
CC3 [ST3 and ST414] ( $n = 3$ )	3.5	5.9
Singleton [ST17, ST26, ST127, ST196, ST569, and ST1400] ( $n = 8$ )	12.3	5.9

CC, clonal complex; ST, sequence type. We defined strong, moderate, or weak biofilm producers as a producer group.

*S. agalactiae* type strain belonged to capsular genotype *II* and ST61.

### 3-6. MLST 解析

CC1 に属する株 (ST1, ST2, ST458, ST676, ST1388) は 28 株, CC10 に属する株 (ST10, ST1370, ST1383, ST1396) は 13 株, CC19 に属する株 (ST19, ST27, ST335, ST861) は 13 株, CC23 に属する株 (ST23, ST144) は 9 株であった (表 34, 図 2)。Biofilm 産生能との関連性について、両群間で有意な差は見られなかった。また, ATCC 13813<sup>T</sup> では, ST61 であった。



- Biofilm producer group [n = 57]
- Biofilm non-producer group [n = 17]

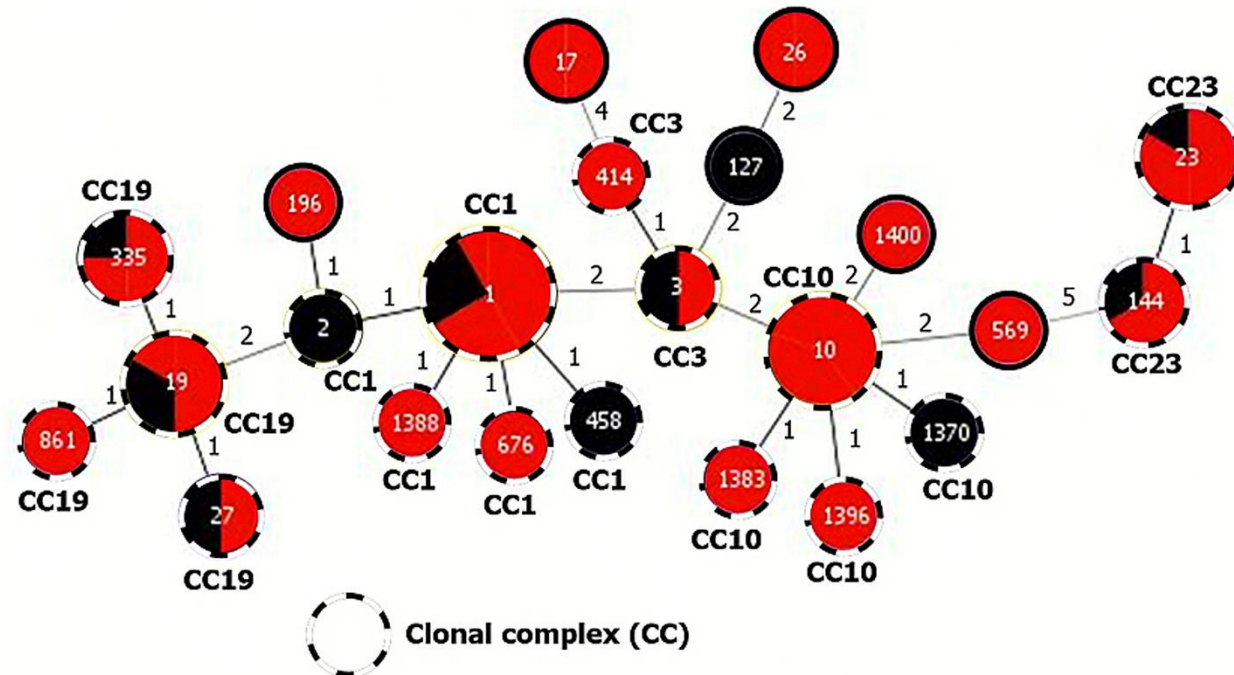


図2. GBS における goeBURST

円中の数字は, sequence type (ST) を示す. 線に隣接する数字は, 接続する 2 つの ST 間の allele の variant 数を示す. 点線の円は, clonal complex (CC) を示す.

### 3-7. 薬剤感受性の判定

人由来株 1 株 (GB68) を除く、すべての実験対象株で PCG に対して感性であった。MINO 耐性率は, biofilm 産生群で 48.9 %, biofilm 非産生群で 11.8 % であった。EM/CLDM 耐性率は, biofilm 産生群で 28.1 %, biofilm 非産生群で 35.3 % であった。LVFX 耐性率は, biofilm 産生群で 38.6 %, biofilm 非産生群で 35.3 % であった。

Biofilm 産生能との関連性について, MINO 耐性率 ( $p < 0.05$ ) を除いて, 両群間で有意な差は見られなかった (表 35)。また, ATCC 13813<sup>T</sup> において, 本研究で用いたすべての抗菌薬に対して感性であった。

表35. 実験対象株における biofilm 産生能と薬剤感受性/AMR 遺伝子との関連性

AMR phenotype/genotype	Two biofilm groups consisting of strong, moderate, or weak producers and a non-producer	
	Detection rate (%) in a producer group ( <i>n</i> = 57)	Detection rate (%) in a non-producer group ( <i>n</i> = 17)
Presence of AMR phenotype	77.2	64.7
AMR to minocycline	48.9**	11.8**
AMR to erythromycin/clindamycin	28.1	35.3
AMR to levofloxacin	38.6	35.3
Absence of AMR phenotype	22.8	35.3
Presence of AMR genotype	63.2	52.9
<i>tet</i> (M)/ <i>tet</i> (O)	54.4	52.9
<i>erm</i> (A)/ <i>erm</i> (B)/ <i>mef</i> (A)	31.6	35.3
Absence of AMR genotype	36.8	47.1

AMR, antimicrobial resistance. We defined strong, moderate, or weak biofilm producers as a producer group.

\*\*  $p < 0.05$ , a producer group vs. a non-producer group.

*S. agalactiae* type strain revealed the absence of all AMR phenotypes/genotypes examined.

### 3-8. AMR 遺伝子の検出

すべての実験対象株で *tet*(K), *tet*(L), *tet*(S), *tet*(Q) および *erm*(F) は検出されなかった。また, テトラサイクリン系耐性遺伝子 (*tet*(M), *tet*(O)) 検出率は, biofilm 産生群で 54.4 %, biofilm 非産生群で 52.9 % であった。MLS<sub>B</sub> 耐性遺伝子 (*erm*(A), *erm*(B), *mef*(A)) 検出率は, biofilm 産生群で 31.6 %, biofilm 非産生群で 35.3 % であった。Biofilm 産生能との関連性について, 両群間で有意な差は見られなかった (表 35)。ま

た, ATCC 13813<sup>T</sup> において, 本研究で用いたすべての AMR 遺伝子は, 検出されなかった.

### 3-9. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響

ATCC 13813<sup>T</sup> におけるベルベリン塩酸塩に対する MIC 値は, 128 µg/mL であった. また, ATCC 12344<sup>T</sup>, ATCC 12394, NCTC 12191<sup>T</sup>, ATCC 25923 における MIC 値は, それぞれ 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 128 µg/mL であった. ATCC 25922 においては, 本研究で用いたベルベリンの濃度範囲を超える MIC 値 (> 256 µg/mL) を示した.

本研究では, strong biofilm producer (+++) に属した 5 株 (GB53, GB58, GB62, GB74, GB80) を対象とした. すべての対象株および ATCC13813<sup>T</sup> において, ベルベリンの ATCC 13813<sup>T</sup> に対する sub-MIC 値 (≤ 64 µg/mL) で biofilm 産生阻害を示した. また, GB74 (MIC 値: 8 µg/mL) を除いて, すべての strong biofilm producer (+++) に属した株におけるベルベリン塩酸塩に対する MIC 値は 64 µg/mL であった (表 36).

表36. ベルベリンにおける biofilm 産生能への影響および MIC 値

Isolate	BPA baseline without berberine	Berberine exposure at 2 x MIC* (256 µg/mL)	Berberine exposure at 1 x MIC* (128 µg/mL)	Berberine exposure at 1/2 x MIC* (64 µg/mL)	Berberine exposure at 1/4 x MIC* (32 µg/mL)	Berberine exposure at 1/8 x MIC* (16 µg/mL)	MICs of berberine against different isolates
GB53	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)	64 µg/mL
GB58	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)	64 µg/mL
GB62	(+++)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	64 µg/mL
GB74	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	8 µg/mL
GB80	(+++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)	64 µg/mL
ATCC 13813 <sup>T</sup>	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)	128 µg/mL

The meaning of (+++), (++), (+), and (-) is strong, moderate, weak, and, no biofilm producers, respectively.

\* This means MIC of berberine against ATCC 13813<sup>T</sup>.

## 4. 考察

本研究では伴侶動物由来、人由来 GBS 株における biofilm 産生能を評価し, biofilm 産生能に関連する特徴を明らかにした.

本研究における宿主情報と biofilm 産生能との関連性について, 膣由来株が biofilm 産生群において有意に多いことが示された. この結果は, GBS は女性の約 18 %に膣内で定着していることが知られていることから, 産科領域における GBS の薬物治療において重要であると考えられる<sup>71)</sup>. 一方, 膣における低 pH という環境は, GBS が定着するためには適していないという報告がある<sup>72)</sup>. このため, 膣由来株は他の分離部位由来株と比較して, 高い定着能力を有していると示唆される. また, 近年, Thomas らが GBS は膣内の定着には, BvaP が関連していると報告した<sup>73)</sup>.

本研究における結果の妥当性を確認するために, BvaP の発現解析を含むさらなる調査が必要と考えられる.

### 4-1. 病原性遺伝子の検出

本研究では, biofilm 産生能と *pilB* 検出率, *spb1* 検出率との間に有意な関連性がみられた.

GBS において, 3 種の pilus islands (pilus island 1, pilus island 2a; PI-2a, pilus island 2b; PI-2b) が報告されており, *pilB* および *spb1* は, それぞれ PI-2a, PI-2b に属する backbone protein をコードしている<sup>57) 66)</sup>. また, PI-2a, PI-2b は互いに対立遺伝子座の関係にあるが, これらの知見は, 本研究における biofilm 産生と *pilB* 検出率との正の相関, *spb1* 検出率との負の相関結果と一致していた<sup>57)</sup>. 加えて, *hylB-pavA-pilB-srtC1-brpA*, *hylB-pavA-spb1-srtC1-brpA* プロファイルにおいても同様の相関関係が観察された.

同様の先行研究において, PI-2a が biofilm 産生を促進することが示された<sup>58)</sup>. 加えて, Parker らは, 人由来株および牛由来株における biofilm 産生能が pilus island 1 を含む保有率と pilus island 関連遺伝子の変異によって影響を受けることを報告した<sup>59)</sup>.

これらのことから、本研究において、GBS の PI-2a と biofilm 産生能との間に正の相関があると示唆された。私たちの知る限り、伴侶動物由来 GBS 株における biofilm 産生能と線毛関連遺伝子との関連性を示した初めての報告である。これら結果は、小動物臨床医学の分野における GBS の新たな知見を与えるとともに、*pilB* が人臨床領域を含む GBS ワクチンにおける標的因子となり得ることを示した。

#### 4-2. *cps* 遺伝子型の決定

莢膜は人血漿下における biofilm 産生において必要であると報告されている<sup>74)</sup>。一方で、Ferreira らは、*cps* 血清型と biofilm 産生能との関連性はなかったと報告している<sup>75)</sup>。本研究においても、*cps* 遺伝子型と biofilm 産生能との関連性は観察されなかった。しかしながら、GBS における *cps* 遺伝子型、*cps* 血清型は、病原性と深く関連していることが知られているため、今後も biofilm 産生能との関連性を観察していく必要があると考える<sup>65) 75)</sup>。

#### 4-3. MLST 解析

本研究において、biofilm 産生能と CC との間に有意な関連性はなかった。一方、同様の報告では、CC17 および CC19 において biofilm 産生能が低かったと報告されている<sup>59)</sup>。

これら結果の違いは、本研究における実験対象株数が少数であったためであると考えられる。このため、伴侶動物由来株を含む GBS 株のさらなる収集および調査を行う必要があると考える。

#### 4-4. 薬剤感受性の判定・AMR 遺伝子の検出

本研究では、MINO 耐性率を除いて、biofilm 産生能と薬剤感受性結果・AMR 遺伝子検出率との間に有意な関連性はなかった。

Biofilm 産生能と MINO 耐性率との関連性について、テトラサイクリン系抗菌薬が

畜産動物を含む動物抗菌薬の販売量において最も多いことが影響を与えていると考えられるが、本研究では因果関係を明確に説明できなかった。しかしながら、biofilm 産生は抗菌薬治療を困難とさせるため、今後も調査が必要であると考え<sup>19)20)</sup>。

#### 4-5. ベルベリンによる biofilm 産生能への影響

本研究では、ATCC 13813<sup>T</sup> に対する sub-MIC 値 ( $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ ) でベルベリンの biofilm 産生阻害活性を strong biofilm producer (+++) に属した 5 株および ATCC 13813<sup>T</sup> において示した。加えて、GB74 を除く、strong biofilm producer (+++) に属した 4 株および ATCC 13813<sup>T</sup> における MIC 値を  $64 \mu\text{g/mL}$  から  $128 \mu\text{g/mL}$  で確認した。このことから、GBS におけるベルベリンに対する MIC 値は、biofilm 産生阻害濃度と関連していると考え<sup>る</sup>。

Wang らは、*Staphylococcus epidermidis* のベルベリンに対する sub-MIC 値 ( $30\text{--}45 \mu\text{g/mL}$ ) で biofilm 産生阻害活性を報告した<sup>63)</sup>。また、同様の先行研究において、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* のベルベリンに対する sub-MIC 値 ( $1\text{--}64 \mu\text{g/mL}$ ) で biofilm 産生に用量依存的に影響を与えることが報告された<sup>64)</sup>。加えて、近年、プロテオーム解析により、*S. pyogenes* においてベルベリンが脂肪酸生合成、酸化的リン酸化経路および解糖系に影響を与えることが報告された<sup>76)</sup>。

したがって、GBS において、ベルベリンが biofilm 産生能に影響を与える作用機序を今後の明らかにするとともに、既存の抗菌薬と組み合わせたベルベリンの抗菌活性および biofilm 産生阻害活性を評価する必要があると考える。

本研究では、宿主の動物種、年齢、抗菌薬使用歴、治療経過などの情報が限られていた。このため、特に動物由来株における biofilm 産生能とこれら臨床情報との関連性を明確にすることが出来なかった。このため、今後獣医師からより詳細な宿主情報を収集する必要がある。これら biofilm 産生能と臨床情報との関連性は、伴侶動物を含むレンサ球菌感染症の診断や治療において、有用となる可能性がある。

以前に我々は、乳房切除術および腋窩リンパ節郭清後のリンパ浮腫を伴う患者において、異なる遺伝型、表現型を有する侵襲性 GBS 株による反復性蜂窩織炎を報告した<sup>77)</sup>。加えて、先行研究において、反復感染または単発感染を引き起こした、人由来侵襲性 SDSE 3 株における比較解析において、biofilm 産生能は反復感染に寄与していないと報告された<sup>78)</sup>。

また、Bonsaglia らは、牛の乳房炎検体から分離された GBS 32 株において培養環境が biofilm 産生に影響を及ぼすと報告した<sup>79)</sup>。

これらのことから、今後 GBS における反復感染株と単発感染株との比較解析により、反復感染に対する biofilm 産生能の寄与を明確にするとともに、培養環境因子との関連性を明らかにする必要があると考える。

### 第3章 伴侶動物由来キノロン耐性 *Streptococcus agalactiae* が有するキノロン耐性決定領域中のアミノ酸置換

#### 3. 序論

##### 1-1. 目的

キノロン耐性 GBS 株におけるキノロン感受性と疫学特性・薬剤耐性因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

##### 1-2. GBS におけるキノロン系抗菌薬の位置づけ

GBS 感染症において、第一選択薬として PCG やアモキシシリンが用いられる。一方で、ペニシリンアレルギーである場合、呼吸器および尿路感染症または術後感染予防において、グリコペプチド系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬やキノロン系抗菌薬などが選択される<sup>80) 81) 82)</sup>。

##### 1-3. キノロン耐性決定領域 (QRDR)

キノロン系抗菌薬は、細菌の DNA の複製に必須である ATP 依存性 DNA スーパーコイルに関与する DNA ジャイレースおよび DNA 二本鎖の切断・再結合に関与するトポイソメラーゼ IV を阻害し、殺菌作用を示す。DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV は、共に 2 種のサブユニットが 4 量体を形成している。それぞれのサブユニットは DNA ジャイレースでは, GyrA, GyrB, トポイソメラーゼ IV では, ParC, ParE と呼ばれている。

1990 年代半ば以降, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* および GBS がキノロン系抗菌薬に耐性を示し始め, それぞれの *gyrA*, *parC* の共通の領域に点変異がみられたという報告がなされている<sup>83) 84) 85)</sup>。このように *gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* において, キノロン耐性に影響を与えやすい領域を QRDR と呼ばれている。

近年, *S. canis* において, QRDR のアミノ酸置換と分子特性との関連性が報告された



<sup>86)</sup> しかしながら、これら知見は、伴侶動物由来 GBS 株においては明らかにされていない。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 菌株収集

#### 2-1-1. 分離菌株

本研究においては, 2017 年 4 月から 2019 年 10 月の期間に伴侶動物より分離された GBS 22 株 (非侵襲性株 21 株, 定着株 1 株) を実験対象株とした. 加えて, 対照菌株として, 2015 年 1 月から 2019 年 5 月の期間に人より分離された GBS 52 株から乱数表を用いて微量液体希釈法により判定された, LVFX 耐性株 3 株, LVFX 感性株 3 株を選出し, 実験対象株とした<sup>30)</sup>. また, 精度管理株として ATCC 13813<sup>T</sup> を研究に用いた.

また, 本研究における分離菌株は, 無菌的検体由来株を侵襲性株, 尿・膿由来株を定着株, これらに属さない株を非侵襲性株と定義した.

#### 2-1-2. 分離菌株の培養および保存

分離菌株は, 当研究室において heart infusion broth・濃グリセリン混合液に懸濁し, -70℃ から -80℃ で保存した. 分離菌株は, 37℃ の条件下, ヒツジ血液寒天培地上で 24 時間培養後, 実験に使用した.

### 2-2. 菌株同定

第 2 章で得られた実験対象株における template DNA 溶液を用いた. また, 第 2 章と同様の方法で, 16S rRNA 配列解析および *dltS* 検出による菌種同定が行われた.

### 2-3. 薬剤感受性の判定

すべての実験対象株および ATCC 13813<sup>T</sup> における LVFX (富士フイルム和光純薬, 東京), ciprofloxacin (CPFX) (東京化成工業, 東京), moxifloxacin (MFLX) (東京化成工業, 東京) を用いて, 寒天平板希釈法にて MIC 値を判定した<sup>86)</sup>. また, 精度管理として PCG (ナカライテスク, 東京) における薬剤感受性の判定も併せて行われた (濃度範囲:

0.03125-0.125 µg/mL). MIC 値における判定では、異なる 2 人の研究者により行われた。また、精度管理株として、ATCC 25923 および ATCC 25922 における各抗菌薬に対する MIC 値を併せて測定した。

CLSI document M100-S16/S25 に準拠し、LVFX および MFLX の耐性/非耐性が判定された<sup>38) 87)</sup>。CPFX については、CLSI document M100 に記載が無いため、先行研究における高度耐性とされた MIC 値 (16-64 µg/mL) を参考とした<sup>84)</sup>。

## 2-4. QRDR 配列決定

*gyrA* (encoding DNA gyrase subunits A), *gyrB* (encoding DNA gyrase subunits B), *parC* (encoding topoisomerase IV subunits A), *parE* (encoding topoisomerase IV subunits B) における QRDR を特異的に増幅するプライマー (表 37) を用いて、表 38 に示す反応液組成、反応条件下で、PCR 法により増幅させた<sup>85) 88) 89)</sup>。

これら増幅産物は、DNA 精製キット (QIAquick® PCR Purification Kit, キアゲン, 東京) により、増幅産物の精製を行った。その後、BigDye Terminator v3.1, BigDye Xterminator によりシーケンス反応、精製を行い、3130xl Genetic Analyzer を用いて泳動した。得られた塩基配列は、Finch TV version 1.4.0 (フリーソフト, Geospiza, <http://www.digitalworldbiology.com/finchtv>) により、正確性を検証した。

*gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* における QRDR のアミノ酸配列を推定するために、キノロン非耐性である ATCC 13813<sup>T</sup> および *S. pneumoniae* R6, キノロン耐性である *S. pyogenes* NIH-R01-GAS および GBS GTC 1966 における QRDR のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った。これらアライメントは、MEGA X version 10.0.5 における ClustalW を用いて行われた<sup>90)</sup>。

表37. QRDR 増幅用プライマー配列

Target genes	Primers	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>gyrA</i>	GBS- <i>gyrA</i> -F	GACAAGTGAAATGAAAACGAG	21	474	85
	GBS- <i>gyrA</i> -R	CGCTCCATTGACTAATAAATTAGG	24		
<i>gyrB</i>	GBS- <i>gyrB</i> -F	TTTCGTACTGCCTTGACACG	20	650	88
	GBS- <i>gyrB</i> -R	TCAACATCGGCATCAGTCAT	20		
<i>parC</i>	GBS- <i>parC</i> -F	CAAAACATGTCCCTTGAGGA	20	586	85
	GBS- <i>parC</i> -R	CTAGCTTTGGGATGATCAATCAT	23		
<i>parE</i>	GBS- <i>parE</i> -F	CGTAAGGCATAAAAGCACG	19	547	89
	GBS- <i>parE</i> -R	CTATATCCGTCCAAGCATAC	20		

表38. QRDR 増幅における反応液組成および反応条件

(1) *gyrA*

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 µL	初回変性	94 °C	5 min	
primer F (5 µM)	2 µL	変性	94 °C	1 min	
primer R (5 µM)	2 µL	アニーリング	46-50 °C	1 min	30 cycles
Template DNA (< 200 ng)	2 µL	伸長	72 °C	1 min	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
Deionized and sterilized water	29.5 µL				
	50 µL				

(2) *gyrB*

試薬	用量	反応条件			
5x PrimeSTAR Buffer	10 µL	ステップ	温度	時間	サイクル数
10mM dNTP mix	4 µL	初回変性	94 °C	5 min	
primer F (5 µM)	2 µL	変性	94 °C	1 min	
primer R (5 µM)	2 µL	アニーリング	42-50 °C	1 min	30 cycles
Template DNA (< 200 ng)	2 µL	伸長	72 °C	1 min	
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 µL	最終伸長	72 °C	10 min	
Deionized and sterilized water	29.5 µL				
	50 µL				

(3) *parC*

試薬	用量
5x PrimeSTAR Buffer	10 µL
10mM dNTP mix	4 µL
primer F (5 µM)	2 µL
primer R (5 µM)	2 µL
Template DNA (< 200 ng)	2 µL
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 µL
Deionized and sterilized water	29.5 µL
	50 µL

試薬	用量
10x Ex-Taq Buffer	5 µL
10mM dNTP mix	4 µL
primer F (5 µM)	4 µL
primer R (5 µM)	4 µL
Template DNA (< 200 ng)	2 µL
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 µL
Deionized and sterilized water	30.75 µL
	50 µL

反応条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
初回変性	94 °C	5 min	
変性	94 °C	1 min	
アニーリング	40-50 °C	1 min	30 cycles
伸長	72 °C	1 min	
最終伸長	72 °C	10 min	

(4) *parE*

試薬	用量
5x PrimeSTAR Buffer	10 µL
10mM dNTP mix	4 µL
primer F (5 µM)	2 µL
primer R (5 µM)	2 µL
Template DNA (< 200 ng)	2 µL
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 µL
Deionized and sterilized water	29.5 µL
	50 µL

試薬	用量
10x Ex-Taq Buffer	5 µL
10mM dNTP mix	4 µL
primer F (5 µM)	4 µL
primer R (5 µM)	4 µL
Template DNA (< 200 ng)	2 µL
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 µL
Deionized and sterilized water	30.75 µL
	50 µL

反応条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
初回変性	94 °C	5 min	
変性	94 °C	1 min	
アニーリング	42-50 °C	1 min	30 cycles
伸長	72 °C	1 min	
最終伸長	72 °C	10 min	

## 2-5. *cps* 遺伝子型の決定

第 2 章にて判定された, 伴侶動物由来株における *cps* 遺伝子型とキノロン感受性との関連性を確認した.

## 2-6. MLST 解析

第 2 章にて決定された, すべての実験対象株における allele number, ST に基づいて, single locus variant となる, 異なる ST を同一の CC として系統化した. また, 伴侶動物由来株における ST/CC とキノロン感受性との関連性を確認した.

ST に基づいた最小スパニングツリーは, PHYLOViZ 2.0 (フリーソフト, <http://www.phyloviz.net/>) を用いて goeBURST アルゴリズムにより作成した<sup>36)</sup>.

## 2-7. AMR 遺伝子の検出

第 2 章にて得られた, 伴侶動物由来株における AMR 遺伝子 (*tet*(M), *tet*(O), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(S), *tet*(Q), *erm*(A), *erm*(B), *erm*(F), *mef*(A)) 検出率とキノロン感受性との関連性を確認した.

## 2-8. 統計解析

本研究におけるすべての統計解析は, web 上のアプリケーション (<http://www.grade-jpn.com/2x2.html>, 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) により, Fisher の直接確率検定 (両側検定) を用いて有意差検定を行った. また, *p* 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした.

## 2-9. 倫理委員会承認

本研究は, 宿主情報漏洩防止の観点から, サンリツセルコバ検査センター (承認番号: SZ20210121-1) および北里大学メディカルセンター (承認番号: 2018024) の倫理委員会による承認を得て実施した.

### 3. 結果

#### 3-1. 菌株収集

実験対象株における伴侶動物由来株 22 株について、微量液体希釈法により判定された LVFX 感受性 (MIC; 耐性:  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ , 感性:  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ) は, LVFX 耐性株 7 株 (31.8%), LVFX 感性株 15 株 (68.2%) であった. また, 人由来株について, LVFX 耐性株 3 株における LVFX に対する MIC 値は, すべての株で  $> 8 \mu\text{g/mL}$  であった. 一方, 人由来 LVFX 感性株 3 株では,  $0.5\text{--}1 \mu\text{g/mL}$  であった. また, ATCC 13813<sup>T</sup> における LVFX に対する MIC 値は,  $0.5 \mu\text{g/mL}$  であった (表 39).

伴侶動物由来 LVFX 耐性株における分離部位として, 鼻汁由来 2 株, 耳漏由来 2 株, 眼脂由来 1 株, 尿由来 1 株, 皮膚分泌物由来 1 株であった. 一方, 人由来 LVFX 耐性株においては, 膿由来 2 株, 喀痰由来 1 株であった (表 39).

表39. 実験対象株における宿主情報および微量液体希釈法による MIC 値

Strain	Host species	Sex and age (year)	Prefecture	Isolation year	Isolation source	Antimicrobial activity of levofloxacin ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>
ATCC 13813 <sup>Tb</sup>	Environment				Milk	0.5
FU37	Dog	Male and unknown	Ibaraki	2017	Cutaneous secretion	1
FU60	Dog	Male and 12	Chiba	2017	Open pus	0.5
FU68	Dog	Female and unknown	Ibaraki	2017	Ear discharge	$> 8$
FU73	Dog	Female and 4	Kanagawa	2017	Eye discharge	$> 8$
FU99	Dog	Male and unknown	Tokyo	2017	Urine	$> 8$
FU117	Dog	Female and 11	Chiba	2017	Ear discharge	0.5
FU130	Dog	Female and 10	Chiba	2017	Ear discharge	0.5
FU135	Dog	Female and 11	Kyoto	2018	Secretion around the nail	0.5
FU136	Dog	Male and unknown	Kyoto	2018	Eye discharge	0.5
FU137	Dog	Female and 10	Tokyo	2018	Eye discharge	0.5
FU138	Dog	Female and 10	Aichi	2018	Ear discharge	0.5
FU139	Dog	Male and unknown	Saitama	2018	Ear discharge	0.5
FU140	Dog	Male and unknown	Ibaraki	2018	Cutaneous secretion	0.5
FU141	Dog	Female and 13	Chiba	2018	Ear discharge	$> 8$
FU142	Dog	Male and 19	Chiba	2018	Open pus	0.5
FU143	Dog	Female and 15	Aichi	2018	Cutaneous secretion	1
FU144	Dog	Female and 12	Tokyo	2019	Ear discharge	0.5
FU145	Dog	Female and 10	Niigata	2019	Nasal discharge	0.5
FU146	Dog	Female and 11	Kanagawa	2019	Nasal discharge	$> 8$
FU147	Dog	Male and 9	Chiba	2019	Open pus	1
FU148	Cat	Male and unknown	Ibaraki	2019	Nasal discharge	$> 8$
FU151	Dog	Male and unknown	Ibaraki	2019	Cutaneous secretion	$> 8$
GB72	Human	Female and 26	Saitama	2019	Vaginal discharge	$> 8$
GB73	Human	Male and 94	Saitama	2019	Sputum	$> 8$
GB76	Human	Female and 28	Saitama	2019	Vaginal discharge	$> 8$
GB80	Human	Female and 36	Saitama	2019	Vaginal discharge	1
GB81	Human	Male and 46	Saitama	2019	Urine	0.5
GB114	Human	Male and 53	Saitama	2019	Open pus	1

<sup>a</sup> Antimicrobial activity was determined using broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute documents M100-S25.

<sup>b</sup> We included ATCC 13813(T) of *S. agalactiae* as a quality control.

### 3-2. 菌株同定

すべての実験対象株において、16S rRNA 配列が ATCC 13813<sup>T</sup> における 16S rRNA 配列との相同性が 98.7 % 以上であり、かつ *dltS* が増幅された。

### 3-3. 薬剤感受性の判定

すべての実験対象株において、寒天平板希釈法による 3 種のキノロン系抗菌薬の MIC 値が評価された (表 40)。伴侶動物由来株について、キノロン耐性株 7 株 (FU68, FU73, FU99, FU141, FU146, FU148, FU151) における各 MIC 値は、LVFX で 16-32 µg/mL, CPFEX で 32 µg/mL, MFLX で 2-4 µg/mL であった。一方、キノロン感性株 15 株では、LVFX で 0.5-1 µg/mL, CPFEX で 0.5-1 µg/mL, MFLX で 0.125-0.25 µg/mL であった。また、人由来株について、キノロン耐性株 3 株 (GB72, GB73, GB76) における各 MIC 値は、LVFX で 16-64 µg/mL, CPFEX で 32 µg/mL, MFLX で 2-16 µg/mL であった。一方、キノロン感性株 3 株では、LVFX で 0.5 µg/mL, CPFEX で 0.5 µg/mL, MFLX で 0.125 µg/mL であった。また、ATCC 13813<sup>T</sup>, ATCC 25923 および ATCC 25922 における各 MIC 値は、それぞれ LVFX で 0.5 µg/mL,  $\leq 0.25$  µg/mL,  $\leq 0.25$  µg/mL, CPFEX で 0.5 µg/mL,  $\leq 0.25$  µg/mL,  $\leq 0.25$  µg/mL, MXF で 0.125 µg/mL,  $\leq 0.0625$  µg/mL,  $\leq 0.0625$  µg/mL であった。



表40. 実験対象株における寒天平板希釈法による MIC 値/QRDR 配列および遺伝的特徴

Strain	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of each drug by agar plate dilution method			Codon (AA) at:			Capsular genotype	ST (allelic profile)	Macrolide/lincosamide and/or tetracycline resistance gene
	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Position 81 in <i>gyrA</i>	Position 79 in <i>parC</i>	Other positions in QRDR			
ATCC 13813 <sup>T</sup>	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>II</i>	61 (13-1-1-13-1-1-1)	None
FU37	1	1	0.25	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>II</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	None
FU60	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>III</i>	335 (1-1-43-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M)
FU68	16	32	2	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>Ib</i>	10 (9-1-4-1-3-3-2)	<i>erm</i> (B)
FU73	16	32	4	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>Ib</i>	10 (9-1-4-1-3-3-2)	<i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B)
FU99	32	32	4	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> AC ( <b>Tyr</b> )	<u>G</u> AT ( <b>Asp</b> ) at position 128 in <i>parC</i>	<i>III</i>	17 (2-1-1-2-1-1-1)	<i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B)
FU117	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>V</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	<i>tet</i> (M)
FU130	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>III</i>	335 (1-1-43-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B)
FU135	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 503 in <i>parE</i>	<i>V</i>	26 (1-1-5-4-1-4-6)	None
FU136	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>III</i>	861 (1-1-89-2-2-2-2)	<i>tet</i> (O)
FU137	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>VIII</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	None
FU138	1	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>Ia</i>	144 (5-4-1-3-2-1-3)	<i>tet</i> (M)
FU139	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>V</i>	19 (1-1-3-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M)
FU140	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>Ia</i>	23 (5-4-6-3-2-1-3)	<i>tet</i> (M)
FU141	16	32	4	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>II</i>	414 (1-1-4-2-1-3-2)	None
FU142	1	1	0.25	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>Ib</i>	676 (1-51-2-1-1-2-2)	None
FU143	1	1	0.25	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>II</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	<i>tet</i> (M)
FU144	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>Ia</i>	23 (5-4-6-3-2-1-3)	<i>tet</i> (M), <i>mef</i> (A)
FU145	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>Ib</i>	1370 (269-1-4-1-3-3-2)	<i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B)
FU146	16	32	2	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>Ib</i>	1383 (9-1-4-1-107-3-2)	None
FU147	1	0.5	0.25	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>II</i>	569 (9-1-1-1-3-1-2)	<i>tet</i> (M)
FU148	16	32	4	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>Ib</i>	10 (9-1-4-1-3-3-2)	<i>erm</i> (B)
FU151	16	32	2	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>V</i>	19 (1-1-3-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>mef</i> (A)
GB72	16	32	4	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>Ib</i>	10 (9-1-4-1-3-3-2)	None
GB73	64	32	16	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	<u>A</u> AC ( <b>Asn</b> ) at position 83 in <i>parC</i>	<i>Ib</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	None
GB76	16	32	2	<u>T</u> TA ( <b>Leu</b> )	<u>T</u> TC ( <b>Phe</b> )	No AA substitutions	<i>V</i>	19 (1-1-3-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>mef</i> (A)
GB80	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	<u>A</u> TT ( <b>Ile</b> ) at position 495 in <i>parE</i>	<i>V</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	<i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B)
GB81	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>V</i>	19 (1-1-3-2-2-2-2)	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B)
GB114	0.5	0.5	0.125	TCA (Ser)	TCC (Ser)	No AA substitutions	<i>VI</i>	1 (1-1-2-1-1-2-2)	None

MIC, minimum inhibitory concentration; AA, amino acid; QRDR, quinolone resistance-determining region; ST, sequence type.

The nucleotide and AA substitutions observed in the strains are underlined in bold letters. Gray shading indicates the quinolone-resistant strains.

We found significant associations ( $p = 0.023/p = 0.021$ ) between the quinolone-resistant strains and ST10/CC10.

## A

Strain	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
ATCC 13813 <sup>T</sup>	D	V	M	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	S	I	Y	E	A	M	V	R	M	A	Q	W	W	S	Y	R	H	M	L	V
FU68, FU73, FU99, FU141, FU146, FU148, FU151, GB72, GB73, GB76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC1966	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-
FU37,FU60, FU117, FU130, FU135, FU136, FU137, FU138, FU139, FU140, FU142, FU143, FU144, FU145, FU147, GB80, GB81, GB114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## B

Strain	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	...	...	125	126	127	128	129	130
ATCC 13813 <sup>T</sup>	M	G	N	F	H	P	H	G	D	S	S	I	Y	D	A	M	V	R	M	S	Q	D	W	K	...	...	E	I	A	G	Y	L
FU68, FU73, FU141, FU146, FU148, FU151, GB72, GB76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-
FU99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	D	-	-
GB73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC1966	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-
FU37, FU60, FU117, FU130, FU135, FU136, FU137, FU138, FU139, FU140, FU142, FU143, FU144, FU145, FU147, GB80, GB81, GB114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-	-	-

図3. *gyrA/parC* における QRDR アミノ酸配列およびアライメント

*gyrA* (A), *parC* (B) における QRDR アミノ酸配列およびアライメント. 青枠内は, キノロン耐性株で確認された点変異を示す. 背景色が灰色の株は, キノロン耐性株であることを示す.

### 3-4. QRDR 配列決定

すべての実験対象株における *gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* の QRDR 塩基配列およびアミノ酸配列を決定できた (表 40). QRDR アミノ酸配列を用いたアライメント結果において, *gyrA* の 81 位, *parC* の 79 位, 83 位, 128 位, *parE* の 495 位, 503 位に点変異が確認された. また, 寒天平板希釈法による薬剤感受性結果に基づいたキノロン耐性株では, *gyrA* の Ser81Leu, *parC* の Ser79Phe, Ser79Tyr, Asp83Asn, Gly128Asp の点変異が確認された. 一方, キノロン感性株において, *parE* の Leu495Ile, Val503 Ile の点変異が確認された (図 3, 附 1).

また, すべての実験対象株における *gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* の QRDR 配列は NCBI データベースに登録された (表 41).

表41. 実験対象株における QRDR 配列の NCBI accession number

Strain	Accession no. of <i>gyrA</i> QRDR	Accession no. of <i>gyrB</i> QRDR	Accession no. of <i>parC</i> QRDR	Accession no. of <i>parE</i> QRDR
ATCC 13813 <sup>T</sup>	LC640632	LC649406	LC649435	LC649612
FU37	LC640633	LC649407	LC649436	LC649613
FU60	LC640634	LC649408	LC649437	LC649614
FU68	LC640635	LC649409	LC649438	LC649615
FU73	LC640636	LC649410	LC649439	LC649616
FU99	LC640637	LC649411	LC649440	LC649617
FU117	LC640638	LC649412	LC649441	LC649618
FU130	LC640639	LC649413	LC649442	LC649619
FU135	LC640640	LC649414	LC649443	LC649620
FU136	LC640641	LC649415	LC649444	LC649621
FU137	LC640642	LC649416	LC649445	LC649622
FU138	LC640643	LC649417	LC649446	LC649623
FU139	LC640644	LC649418	LC649447	LC649624
FU140	LC640645	LC649419	LC649448	LC649625
FU141	LC640646	LC649420	LC649449	LC649626
FU142	LC640647	LC649421	LC649450	LC649627
FU143	LC640648	LC649422	LC649451	LC649628
FU144	LC640649	LC649423	LC649452	LC649629
FU145	LC640650	LC649424	LC649453	LC649630
FU146	LC640651	LC649425	LC649454	LC649631
FU147	LC640652	LC649426	LC649455	LC649632
FU148	LC640653	LC649427	LC649456	LC649633
FU151	LC640654	LC649428	LC649457	LC649634
GB72	LC640655	LC649429	LC649458	LC649635
GB73	LC640656	LC649430	LC649459	LC649636
GB76	LC640657	LC649431	LC649460	LC649637
GB80	LC640658	LC649432	LC649461	LC649638
GB81	LC640659	LC649433	LC649462	LC649639
GB114	LC640660	LC649434	LC649463	LC649640

### 3-5. *cps* 遺伝子型の決定

伴侶動物由来株について、キノロン耐性株では、*Ib* 型 ( $n=4$ ), *II* 型 ( $n=1$ ), *III* 型 ( $n=1$ ), *V* 型 ( $n=1$ ) を観察した。一方、キノロン感性株において、*Ia* 型 ( $n=3$ ), *II* 型 ( $n=3$ ), *III* 型 ( $n=3$ ), *V* 型 ( $n=3$ ), *Ib* 型 ( $n=2$ ) および *VIII* 型 ( $n=1$ ) が観察された。また、人由来株において、キノロン耐性株では、*Ib* 型 ( $n=2$ ), *V* 型 ( $n=1$ ) が観察され、キノロン感性株では、*V* 型 ( $n=2$ ), *VI* 型 ( $n=1$ ) が観察された (表 40)。

本研究において、伴侶動物由来株における、*cps* 遺伝子型とキノロン感受性との間に有意な関連性は確認されなかった。

### 3-6. MLST 解析

伴侶動物由来株について、キノロン耐性株では、ST10 が 3 株、ST17, ST19, ST414, ST1383 が各 1 株確認された。また、CC10 (ST10, ST1383) に属する株は 4 株であった。一方、キノロン感性株では、CC1 (ST1, ST676) に属する株は 5 株、CC19 (ST19, ST335, ST861) に属する株は 4 株、CC23 (ST23, ST144) に属する株は 3 株であった。加えて、ST26, ST569, ST1370 が各 1 株であった (表 40, 図 4)。

また、人由来株について、キノロン耐性株では、ST1, ST10, ST19 が各 1 株であり、キノロン感性株では、ST1 が 2 株、ST19 が 1 株であった。

伴侶動物由来株において、ST10/CC10 に属する株は、キノロン感性株と比較して、キノロン耐性株において有意に多かった ( $p=0.023/p=0.021$ )。

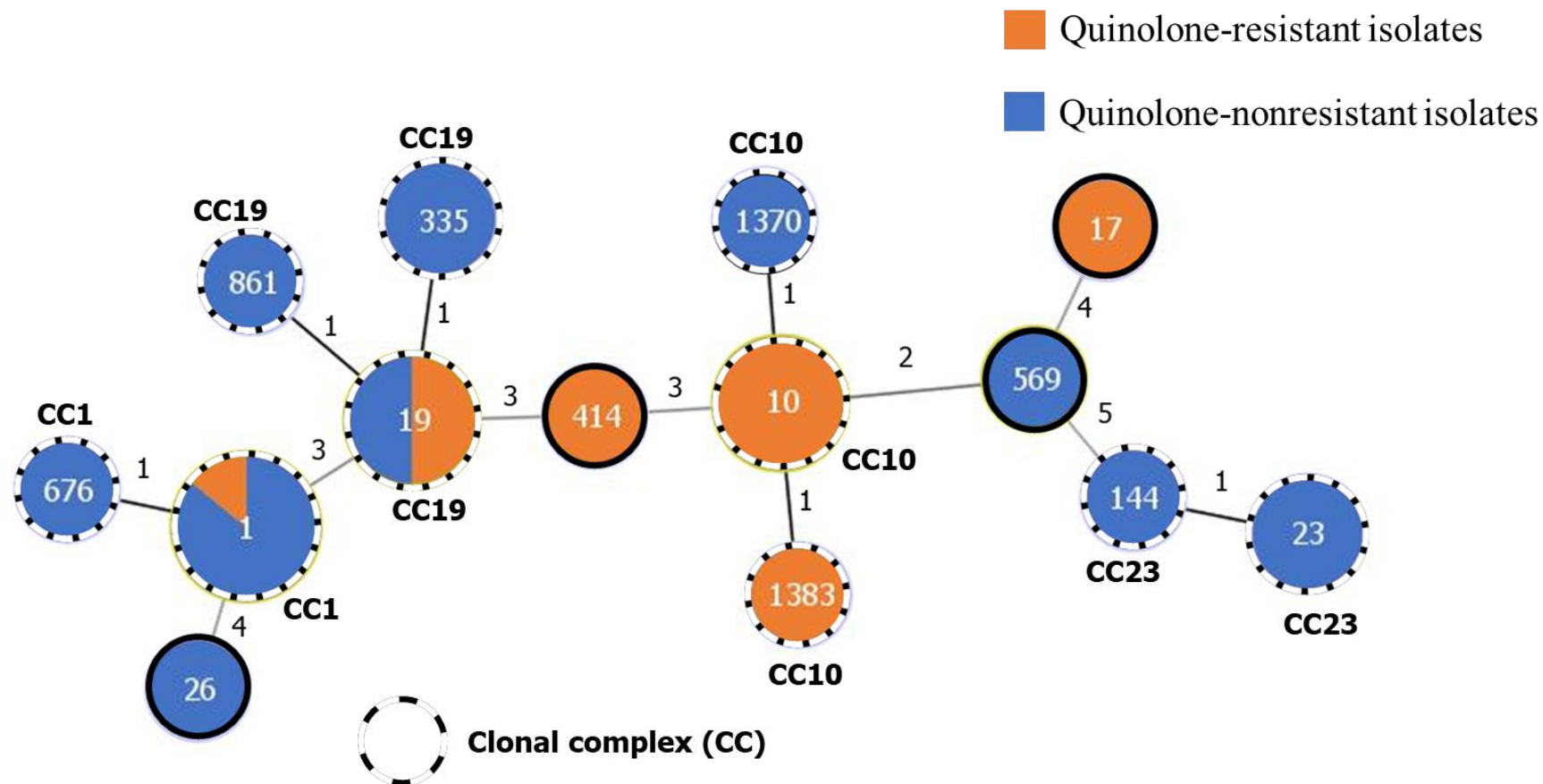


図4. 伴侶動物由来 GBS 株における goeBURST

円中の数字は, sequence type (ST) を示す. 線に隣接する数字は, 接続する 2 つの ST 間の allele の variant 数を示す. 点線の円は, clonal complex (CC) を示す.

### 3-7. AMR 遺伝子の検出

伴侶動物由来株について、キノロン耐性株では、テトラサイクリン系耐性遺伝子および MLS<sub>B</sub> 耐性遺伝子の両者検出された (TC-MLS<sub>B</sub> genotype) 株は 3 株, MLS<sub>B</sub> 耐性遺伝子のみ検出された株は 2 株, テトラサイクリン系耐性遺伝子および MLS<sub>B</sub> 耐性遺伝子が共に検出されなかった (no AMR genotype) 株は 2 株であった. 一方, キノロン感性株では, テトラサイクリン系耐性遺伝子のみ検出された株は 8 株, TC-MLS<sub>B</sub> genotype 株は 3 株, no AMR genotype 株は 4 株であった.

また人由来株について、キノロン耐性株では, TC-MLS<sub>B</sub> genotype 株は 1 株, no AMR genotype 株は 2 株であった. 一方, キノロン感性株では TC-MLS<sub>B</sub> genotype 株は 2 株, no AMR genotype 株は 1 株であった.

本研究において、伴侶動物由来株における, AMR 遺伝子型とキノロン感受性との間に有意な関連性は確認されなかった.

## 4. 考察

本研究では、寒天平板希釈法により、伴侶動物由来キノロン耐性株 7 株が観察された。これらキノロン耐性株は、鼻汁、耳漏、眼脂、尿、皮膚分泌物に由来する株であった。同様の先行研究では、Etest によりキノロン耐性を示した、*S. canis* の分離部位は、耳漏、膿、尿であった<sup>86)</sup>。また、フランスにおけるキノロン耐性 GBS 株の大部分は、膿由来 (86.2 %), 尿由来 (12.1 %) であったと報告された<sup>91)</sup>。

しかしながら、ペニシリンアレルギー患者における第二選択薬となり得ることから、今後も無菌的検体からのキノロン耐性株の出現には特に注意を払う必要がある。したがって、薬剤耐性株は今後も監視し続ける必要があると考える。

### 4-1. QRDR 配列決定

図 3 は、本研究に用いた株、ATCC 13813<sup>T</sup>, *S. agalactiae* GTC 1966、*S. pyogenes* NIH-R01-GAS, *S. pneumoniae* R6 における *gyrA* および *parC* の QRDR アミノ酸配列のアラインメントとその点変異を示している。

本研究におけるキノロン耐性株では、*gyrA* の QRDR の Ser81Leu および *parC* の QRDR の Ser79Phe/Ser79Tyr/Asp83Asn/Gly128Asp の点変異が観察された。*gyrA* の Ser81 および *parC* の Ser79 における点変異は、人由来 GBS 株を用いた先行研究と一致していた<sup>85)</sup>。また、本研究において、*parC* の Asp83 と Gly128 における点変異は各 1 株で観察された。これら変異は、キノロン耐性 *S. pyogenes* を用いた先行研究で報告されている<sup>92)93)</sup>。これら点変異において、Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>, 最終アクセス日 2023 年 12 月 20 日) より得られた、*S. pneumoniae* における ParC (pdb entry code: 3k9F) と LVFX との分子間距離を Molegro Molecular Viewer 7.0 (Molexus)を用いて確認した<sup>94)</sup>。この結果、LVFX と Ser79 との推定分子間距離は 3.18 Å であった。一方、LVFX と Asp83/Gly128 の推定分子間距離は 7.64 Å/29.7 Å であり、LVFX-Ser79 推定分子間距離よりも長い距離であることが確認された。しかしながら、Asp83/Gly128 を含むアミノ酸変異がキノロン耐性にど

のような影響を与えているかは本研究において明確にすることが出来なかった。これらのことから, Asp83/Gly128 における点変異がキノロン耐性に影響を与えるか否かを解明するために, 薬剤耐性の誘導実験を行うなど, さらなる調査が必要と考えられる<sup>95) 96)</sup>。

#### 4-2. *cps* 遺伝子型の決定

本研究において, *cps* 遺伝子型とキノロン感受性との間に有意な関連性は確認されなかった。一方で, Hays らは, キノロン耐性株において *V* 型が多かった (51.5 %) と報告した<sup>91)</sup>。

先行研究結果が, 本研究結果と異なったことは, 分離地域・分離部位の違いに由来すると示唆されるが, 本研究における結果の妥当性を確認するために, さらなる調査が必要と考えられる。

#### 4-3. MLST 解析

本研究において, 伴侶動物由来キノロン耐性株と ST10 ( $p = 0.023$ )/CC10 ( $p = 0.021$ ) との間に有意な関連性が観察された。同様の先行研究において, Arias らは, アルゼンチンにおける人由来キノロン耐性侵襲性 GBS 株 ( $n = 24$ ) の 84 % が Ib 型/ST10 であったことを報告した<sup>97)</sup>。一方, フランス, イタリア, 中国では, 人由来キノロン耐性株のほとんどが ST19/CC19 に属することが報告されている<sup>91) 98) 99)</sup>。

私たちの知る限り, 伴侶動物由来キノロン耐性株と ST/CC との関連性を示した初めての報告である。したがって, 今後も伴侶動物由来キノロン耐性 GBS 株を監視し続ける必要があると考える。

#### 4-4. AMR 遺伝子の検出

本研究では, 伴侶動物由来キノロン耐性株と AMR 遺伝子検出率との間に有意な関連性はなかった。



テトラサイクリン系抗菌薬は畜産動物を含む動物抗菌薬の販売量において最も多い<sup>6)</sup>。このため、テトラサイクリン系抗菌薬は動物において重要な抗菌薬の 1 種である。加えて、人臨床医学において、リンコマイシン系抗菌薬は、キノロン系抗菌薬と並び、ペニシリンアレルギー患者に選択される抗菌薬の 1 種である<sup>80) 81) 82)</sup>。

したがって、今後も伴侶動物由来キノロン耐性 GBS 株における AMR 遺伝子の監視は必要であると考ええる。

伴侶動物における感染症の治療で用いられる動物用キノロン系抗菌薬には、オルビフロキサシン、エンロフロキサシンが挙げられる。一方で、人用キノロン系抗菌薬は、伴侶動物診療施設に 2016 年, 2020 年でそれぞれ 114.3 kg, 110.3 kg が販売されている<sup>100) 101)</sup>。

本研究では、キノロン系抗菌薬を含む抗菌薬使用歴、治療経過などの情報が限られていた。したがって、今後の研究において、キノロン系抗菌薬の使用データを日本の獣医師から収集する必要があると考える。

### III. 結論

#### 第4章 非侵襲性 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* における biofilm 産生能と関連因子の解析

本研究において、非侵襲性 SDSE 株における、biofilm 産生能に関連する宿主情報 (宿主種, 分離部位) および分子特性 (Lancefield 分類, 病原性遺伝子, MLST) を明らかにすることができた。これは、SDSE 感染症の予防・治療において重要な知見となり得る。しかし、本研究では、biofilm の経時的・視覚的調査および各表現型の観察を行っていない。このため、今後 Continuous-optimizing-Confocal Reflection Microscopy 法や Quartz crystal microbalance 法を用いた biofilm の経時的・視覚的調査や RT-qPCR 法による発現量解析が必要であると考え<sup>102) 103)</sup>。

#### 第5章 *Streptococcus agalactiae* における biofilm 産生能と関連因子の解析

本研究では、伴侶動物由来株を含む GBS における、biofilm 産生能に関連する宿主情報 (分離部位) および分子特性 (病原性遺伝子) を明らかにすることができた。加えて、ベルベリンによる biofilm 産生能への影響を明らかにすることができた。これは、人臨床医学および小動物臨床医学における GBS 感染症の予防・治療において重要な知見となり得る。しかし、本研究において、収集できた GBS における菌株背景 (侵襲性, 非侵襲性, 定着性) が限られており、伴侶動物由来株では、侵襲性株を収集できなかった。このため、今後、重症の伴侶動物からの侵襲性株や定着株の収集、伴侶動物の宿主情報を獣医などから、さらに収集する必要があると考える。

#### 第3章 伴侶動物由来キノロン耐性 *Streptococcus agalactiae* が有するキノロン耐性決定領域中のアミノ酸置換

本研究において、伴侶動物由来キノロン耐性 GBS 株におけるキノロン感受性と疫学特性 (MLST) および薬剤耐性因子 (QRDR 配列) との関連性を明らかにすること

ができた。本研究の成果から、伴侶動物由来株は、人由来株と同様の機序でキノロン系抗菌薬に対し、耐性を得ていることが示唆された。しかしながら、本研究では、伝播方向については明らかにすることができなかった。このため、今後、飼い主とペットの両者から分離された菌株の収集を試みるなどの取り組みが必要であると考えられる。

## IV. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切な助言を賜り、また丹念に指導して下さった北里大学・大村智記念研究所 感染制御・免疫部門 感染症学研究室 高橋 孝 教授に深く感謝申し上げます。

北里大学 薬学部 微生物学講座 岡田 信彦 教授におきましては、本論文作成にあたり、主査としてご助言を賜り、深く感謝申し上げます。

信州 大学 医学部 保健学科 検査技術科学専攻 長野 則之 特任教授、日本薬科大学 薬学部 薬学科 渡邊 峰雄 教授およびヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 木村 祐哉 准教授におきましても、本論文作成にあたり、副査としてご助言を賜り、深く感謝申し上げます。

本研究に用いた菌株を分与して頂きました、東京保健会 病態生理研究所 高山 美子 先生、サンリツセルコバ検査センター 臨床検査部門 露木 勇三 先生、北里大学 メディカルセンター 臨床検査科 藤田 朋浩 先生に深く感謝いたします。

実験のご指導、ご鞭撻のみならず、多方面に関してご助言を賜り、また相談に快く真摯に応じていただき、温かく見守って下さいました、同部門 感染制御学研究室 吉田 春乃 先生、後藤 美江子 先生、福島 康仁 氏に心から感謝いたします。

主に生活面など様々な面で支えて下さった、妻 知佳に感謝いたします。

令和6年 前田 貴広

## V. 参考文献

1. ペットフード協会. 令和4年全国犬猫飼育実態調査. 2022.
2. World Health Organization. Fact sheets, Zoonoses. 2020.
3. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2023-2027. 2023.
4. World Health Organization. Joint WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses: second report. 1959.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Outbreaks of Enteric Disease Associated with Animal Contact: Summary for 2017. 2020.
6. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2022. 東京: 厚生労働省健康局結核感染症課; 2022.
7. Suzuki H, Lefebure T, Hubisz MJ et al. Comparative Genomic Analysis of the *Streptococcus dysgalactiae* Species Group: Gene Content, Molecular Adaptation, and Promoter Evolution. *Genome Biol. Evol.* 2011;3:168-85. DOI: 10.1093/gbe/evr006.
8. Takahashi T, Sunaoshi K, Sunakawa K, et al. Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010;16:1097-103. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03047.x.
9. 大石 和徳 et al. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の疫学情報. 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 分担研究報告書. 2018.
10. Bruun T, Kittang BR, de Hoog BJ, et al. Necrotizing soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of groups C and G in western Norway. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E545-50. DOI: 10.1111/1469-0691.12276.
11. Fujiya Y, Hayakawa K, Gu Y, et al. Age-related differences in clinical characteristics of invasive group G streptococcal infection: Comparison with group A and group B

- streptococcal infections. *PLoS One*. 2019;14:e0211786. DOI: 10.1371/journal.pone.0211786.
12. Takahashi T, Fujita T, Shibayama A, et al. Prevalence of complement-mediated cell lysis-like gene (*sicG*) in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from Japan (2014-2016). *Ann Lab Med*. 2017;37:297-304. DOI: 10.3343/alm.2017.37.4.297.
  13. Shabayek S, Spellerberg B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front. Microbiol*. 2018;9:437. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00437.
  14. Chaiwarith R, Jullaket W, Bunchoo M, et al. *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study. *BMC Infect. Dis*. 2011; 11:149. DOI: 10.1186/1471-2334-11-149.
  15. Shibayama A, Yoshizaki T, Tamaki M, et al. Pyogenic sternoclavicular arthritis caused by *Streptococcus agalactiae* in an elderly patient with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc*. 2016;64:1376-7. DOI: 10.1111/jgs.14169.
  16. Messier S, Daminet S, Lemarchand T. *Streptococcus agalactiae* endocarditis with embolization in a dog. *Can. Vet. J*. 1995;36:703-4.
  17. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-322. DOI: [10.1126/science.284.5418.1318](https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318).
  18. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem*. 2005;70:267-274. DOI: [10.1007/s10541-005-0111-6](https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6).
  19. Li YH, Tang N, Aspiras MB, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2002;184:2699-708. DOI: 10.1128/jb.184.10.2699-2708.2002.
  20. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358:135-8. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.
  21. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of

- human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005;13:7-10. DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.004
22. Hughes JM, Wilson ME, Brandt CM et al. Human Infections Due to *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis*. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49:766-72. DOI: 10.1086/605085.
  23. Ogawa T, Terao Y, Okuni H, et al. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.* 2011;51:58-68. DOI: 10.1016/j.micpath.2011.03.009.
  24. P Yadav, S Verma, R Bauer, et al. Deciphering Streptococcal Biofilms. *Microorganisms.* 2020;8:1835. DOI: 10.3390/microorganisms8111835.
  25. Porcellato D, Smistad M, Skeie SB, et al. Whole genome sequencing reveals possible host species adaptation of *Streptococcus dysgalactiae*. *Sci Rep.* 2021;11: 17350. DOI:10.1038/s41598-021-96710-z.
  26. Tsuyuki Y, Kurita G, Murata Y, et al. Identification of group G streptococcal isolates from companion animals in Japan and their antimicrobial resistance patterns. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70:394-398. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.375.
  27. Fukushima Y, Tsuyuki Y, Goto M, et al. Species identification of  $\beta$ -hemolytic streptococci from diseased companion animals and their antimicrobial resistance data in Japan (2017). *Jpn J Infect Dis.* 2019;72:94-98. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2018.231.
  28. Kurita G, Tsuyuki Y, Shibata S, et al. Species identification of  $\beta$ -hemolytic streptococci from diseased companion animals and their antimicrobial resistance patterns in Japan (2021). *Jpn J Vet Res.* 2022;70:19-28. DOI: 10.14943/jjvr.70.1.19.
  29. Kim S, Byun J-H, Park H, et al. Molecular epidemiological features and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from Korea and Japan. *Ann Lab Med.* 2018;38:212-9. DOI: 10.3343/alm.2018.38.3.212.
  30. Maeda T, Tsuyuki Y, Fujita T, et al. Comparison of *Streptococcus agalactiae* Isolates from Humans and Companion Animals Reveals Genotypic and Phenotypic Differences. *Jpn. J.*

*Infect. Dis.* 2020;73:308-15.

DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.441.

31. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbial Today*. 2006;33:152-5.
32. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115:891-899. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x.
33. Chideroli RT, Amoroso N, Mainardi RM, et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture*. 2017;479:45-51. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.05.013.
34. Fujita T, Horiuchi A, Ogawa M, et al. Genetic diversity in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from patients with invasive and noninvasive infections in a Japanese university hospital (2014-2015). *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017;70:100-4. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.602.
35. Fukushima Y, Takayama Y, Yoshida H, et al. Genogrouping of type II-A CRISPR array in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from humans and companion animals compared to multilocus sequence and emm typing. *J. Infect. Chemother.* 2022;28:1571-4. DOI: 10.1016/j.jiac.2022.07.009.
36. Nasciment M, Sousa A, Ramirez M, et al. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*. 2017;33:128-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw582.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
38. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25nd informational



- supplement. Document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015.
39. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:4798-800. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4798-4800.2005.
  40. Haenni M, Saras E, Bertin S, et al. Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76:7957-65. DOI: 10.1128/AEM.00805-10.
  41. Ciszewski M, Szewczyk EM. Potential factors enabling human body colonization by animal *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. *Curr Microbiol.* 2017;74:650-654. DOI: 10.1007/s00284-017-1232-z.
  42. Fujita T, Yoshida H, Osaka S, et al. Comparison of characteristics of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates causing repetitive vs single infections. *Ann Lab Med.* 2019;39:488-492. DOI: 10.3343/alm.2019.39.5.488.
  43. Ma JS, Chen SY, Lo HH, et al. Biofilm formation of beta-hemolytic group G *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates and its association with *emm* polymorphism. *APMIS.* 2017;125:1025-32. DOI: 10.1111/apm.12746.
  44. Lancefield R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933;57:571-95. DOI: 10.1084/jem.57.4.571.
  45. Rantala S. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1303-1310. DOI: 10.1007/s10096-014-2092-0.
  46. Wajima T, Morozumi M, Hanada S, et al. Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:247-254. DOI: 10.3201/eid2202.141732.
  47. Genteluci GL, Silva LG, Souza MC, et al. Assessment and characterization of biofilm

- formation among human isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Int J Med Microbiol*. 2015;305:937-947. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.10.004.
48. Santos VL, Silva LG, Martini CL, et al. Low lineage diversity and increased virulence of group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J Med Microbiol*. 2020;69:576-86. DOI: 10.1099/jmm.0.001165.
49. McMillan DJ, Bessen DE, Pinho M, et al. Population Genetics of *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* Reveals Widely Dispersed Clones and Extensive Recombination. *PLoS One*. 2010;5: e11741. DOI: 10.1371/journal.pone.0011741.
50. Shinohara K, Murase K, Tsuchido Y, et al. Clonal Expansion of Multidrug-Resistant *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* Causing Bacteremia, Japan, 2005–2021. *Emerg Infect Dis*. 2023;29: 528-39. DOI: 10.3201/eid2903.221060.
51. Moroi H, Kimura K, Ido A, et al. Erythromycin-susceptible but clindamycin-resistant phenotype of clinical *ermB*-PCR-positive Group B streptococci isolates with IS*1216E*-inserted *ermB*. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2019;72:420-2. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.015.
52. Takahashi T, Maeda T, Lee S, Lee DH, Kim S. Clonal Distribution of Clindamycin-Resistant Erythromycin-Susceptible (CRES) *Streptococcus agalactiae* in Korea Based on Whole Genome Sequences. *Annals of Laboratory Medicine*. 2020; 40:370-81. DOI: 10.3343/alm.2020.40.5.370.
53. Manetti AG, Zingaretti C, Falugi F, et al. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2007;64:968-83. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05704.x.
54. Anicom. 家庭どうぶつ白書 2018. [https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book\\_201812.pdf](https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book_201812.pdf). 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日.
55. Anicom. 家庭どうぶつ白書 2023. [https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book\\_202312.pdf](https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book_202312.pdf). 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日.
56. Morach M, Stephan R, Schmitt S, et al. Population structure and virulence gene profiles of

- Streptococcus agalactiae* collected from different hosts worldwide. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018;37:527-36. DOI: 10.1007/s10096-017-3146-x.
57. P'erichon B, Szili N, du Merle L, et al. Regulation of PI-2b pilus expression in hypervirulent *Streptococcus agalactiae* ST-17 BM110. *PloS One*. 2017;12:e0169840. DOI: 10.1371/journal.pone.0169840.
58. Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PloS One*. 2010;5:e9216. DOI: 10.1371/journal.pone.0009216.
59. Parker RE, Laut C, Gaddy JA, et al. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 2016;16:86. DOI: 10.1186/s12866-016-0704-9.
60. 日本化薬株式会社. キョウベリン錠 添付文書. 2014.  
[https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/180102\\_2314002F2022\\_2\\_03](https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/180102_2314002F2022_2_03). 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日.
61. 共立製薬株式会社. ティアバスター注 添付文書. 2022.  
[https://www.kyoritsuseiyaku.co.jp/products/detail/17oaqs00000010wo-att/20076\\_t.pdf](https://www.kyoritsuseiyaku.co.jp/products/detail/17oaqs00000010wo-att/20076_t.pdf). 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日.
62. 大藤和美, 原英彰, 洲加本孝幸 et al. ゲンノショウコエキス配合止瀉剤の収敏作用および空腸粘膜の短絡電流に対する作用. *Folia Pharmacol. Jpn.* 1998;111:265-75.
63. Wang X, Yao X, Zhu Z, et al. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:60-6. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.033.
64. Chu M, Zhang MB, Liu YC, et al. Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Sci Rep*. 2016;6:24748. DOI: 10.1038/srep24748.
65. Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53:2650-3. DOI:

10.1128/AAC.01716-08.

66. Jiang H, Chen M, Li T, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* causing community- and hospital-acquired infections in Shanghai, China. *Front Microbiol.* 2016;7:1308. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01308.
67. Springman AC, Lacher DW, Waymire EA, et al. Pilus distribution among lineages of group B streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. *BMC Microbiol.* 2014;14:159. DOI: 10.1186/1471-2180-14-159.
68. Patras KA, Derieux J, Al-Bassam MM, et al. Group B *Streptococcus* biofilm regulatory protein A contributes to bacterial physiology and innate immune resistance. *J Infect Dis.* 2018;218:1641-52. DOI: 10.1093/infdis/jiy341.
69. Chaiwarith R, Jullaket W, Bunchoo M, et al. *Streptococcus agalactiae* in adults at chiang mai university hospital: a retrospective study. *BMC Infect. Dis.* 2011;11:149. DOI: 10.1186/1471-2334-11-149.
70. Chung WO, Young K, Leng Z, et al. Mobile elements carrying *ermF* and *tetQ* genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44:329-35. DOI: 10.1093/jac/44.3.329.
71. Armistead B, Oler E, Waldorf KA, et al. The Double Life of Group B Streptococcus: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *J. Mol. Biol.* 2019;431:2914-31. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.01.035.
72. Dilrukshi GN, Kottahachchi J, Dissanayake T, et al. In-vitro Biofilm Formation of Vaginal Isolates of *Streptococcus agalactiae*; Effect of pH and Culture Media. *Braz Arch Biol Technol.* 2021;64:e21210151. DOI: 10.1590/1678-4324-2021210151.
73. Thomas LS, Cook LC. A Novel Conserved Protein in *Streptococcus agalactiae*, BvaP, Is Important for Vaginal Colonization and Biofilm Formation. *mSphere.* 2022;7:e00421-22. DOI: 10.1128/msphere.00421-22.
74. Xia FD, Mallet A, Caliot E, et al. Capsular polysaccharide of Group B *Streptococcus*

- mediates biofilm formation in the presence of human plasma. *Microbes Infect.* 2015;17:71-6. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.10.007.
75. Ferreira MNMR, de Paula GR, Barros RR. Distribution of virulence determinants in *Streptococcus agalactiae* recovered from different clinical sources. *Microbial Pathogenesis.* 2021;161:105255. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105255.
76. Du GF, Le YJ, Sun X, et al. Proteomic investigation into the action mechanism of berberine against *Streptococcus pyogenes*. *J Proteomics.* 2020;215:103666. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103666.
77. Taniyama D, Maruki T, Maeda T, et al. Repetitive cellulitis caused by *Streptococcus agalactiae* isolates with different genotypic and phenotypic features in a patient having upper extremity with lymphedema after mastectomy and axillary lymph node dissection. *IDCases.* 2020;20:e00793. DOI: 10.1016/j.idcr.2020.e00793.
78. Fujita T, Yoshida H, Osaka S, et al. Comparison of characteristics of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates causing repetitive vs single infections. *Ann Lab Med.* 2019;39:488-92. DOI: 10.3343/alm.2019.39.5.488.
79. Bonsaglia ECR, Latosinski GS, Rossi RS, et al. Biofilm production under different atmospheres and growth media by *Streptococcus agalactiae* isolated from milk of cows with subclinical mastitis. *Arch Microbiol.* 2020;202:209-12. DOI: 10.1007/s00203-019-01727-8.
80. 日本産科婦人科学会. 産婦人科診療ガイドライン—産科編 2020. 2020.  
[https://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl\\_sanka\\_2020.pdf](https://www.jsog.or.jp/activity/pdf/gl_sanka_2020.pdf). 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日
81. 公益社団法人日本化学療法学会/一般社団法人日本外科感染症学会. 術後感染予防抗菌薬適正使用のための実践ガイドライン. 2016.  
[https://www.chemotherapy.or.jp/uploads/files/guideline/jyutsugo\\_shiyou\\_jissen.pdf](https://www.chemotherapy.or.jp/uploads/files/guideline/jyutsugo_shiyou_jissen.pdf). 最終アクセス日 最終アクセス日 2024 年 1 月 7 日

82. 公益社団法人日本化学療法学会/一般社団法人日本外科感染症学会. JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015 ―尿路感染症・男性性器感染症―. 日本化学療法学会雑誌. 2015;64.
83. Janoir C, Zeller V, Kitzis MD, et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1996;40:2760-4. DOI: 10.1128/ AAC.40.12.2760.
84. Yan SS, Fox ML, Holland SM, et al. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3196-8. DOI: 10.1128/ AAC.44.11.3196-3198.2000.
85. Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, et al. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3605-9. DOI: 10.1128/aac.47.11.3605-3609.2003.
86. Fukushima Y, Tsuyuki Y, Goto M, et al. Novel quinolone nonsusceptible *Streptococcus canis* strains with point mutations in quinolone resistance-determining regions and their related factors. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2020;73: 242-9. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.392.
87. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Document M100-S16. Wayne, PA: CLSI; 2006.
88. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, et al. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:849-56. DOI: 10.1093/jac/dkr546.
89. Ki M, Srinivasan U, Oh KY, et al. Emerging fluoroquinolone resistance in *Streptococcus agalactiae* in South Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:3199-205. DOI: 10.1007/s10096-012- 1685-8.
90. Kumar S, Stecher G, Li M, et al. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35:1547-9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

91. C Hays, M Louis, C Plainvert, et al. Changing Epidemiology of Group B *Streptococcus* Susceptibility to Fluoroquinolones and Aminoglycosides in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60: 7424-30. DOI: 10.1128/aac.01374-16.
92. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, et al. Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:320-5. DOI: 10.1093/jac/dki011.
93. Orscheln RC, Johnson DR, Olson SM, et al. Intrinsic reduced susceptibility of serotype 6 *Streptococcus pyogenes* to fluoroquinolone antibiotics. *J Infect Dis* 2005;191:1272-9. DOI: 10.1086/428856.
94. Barros RR, Kegele FC, Paula GR, et al. Molecular characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012;16:476-8. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.05.003.
95. Billal DS, Fedorko DP, Yan SS, et al. *In vitro* induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple *emm* types. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:28-4. DOI: 10.1093/jac/dkl428.
96. Malhotra-Kumar S, Van Heirstraeten L, Lammens C, et al. Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in *emm6 Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:886-94. DOI: 10.1093/jac/dkp057.
97. Arias B, Kovacec V, Vigliarolo L, et al. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* invasive isolates recovered in Argentina. *Microb Drug Resist.* 2019;25:739-43. DOI: 10.1089/ mdr.2018.0246.
98. Piccinelli G, Gargiulo F, Corbellini S, et al. Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2466-9. DOI: 10.1128/AAC.05127-14.
99. Wang H, Zhao C, He W, et al. High prevalence of fluoroquinolone-resistant group B

- streptococci among clinical isolates in China and predominance of sequence type 19 with serotype III. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1538-41. DOI: 10.1128/AAC.02317-12.
100. 農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課 動物医薬品検査所. 平成 28 年に飼育動物診療施設に販売された人用抗菌剤量調査の結果. 2019.
101. 農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課 動物医薬品検査所. 令和 2 年に飼育動物診療施設に販売された人用抗菌剤量調査の結果. 2023.
102. Yawata Y, Toda K, Setoyama E, et al. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *J. Biosci. Bioeng*. 2010;110:377-80. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.04.002.
103. Tam K, Kinsinger N, Ayala P, et al. Real-Time Monitoring of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation Using a Quartz Crystal Microbalance. *Caries Res*. 2007;41: 474-83. DOI: 10.1159/000108321.



## VI. 附

附 1. 実験対象株における QRDR アミノ酸配列およびアライメント

附1. 実験対象株における QRDR アミノ酸配列およびアライメント

A. *gyrA*

Strain	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
ATCC 13813 <sup>T</sup>	A	L	P	D	V	R	D	G	L	K	P	V	H	R	R	I	L	Y	G	M	N	E	L	G
FU37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
V	T	P	D	K	P	H	K	K	S	A	R	I	T	G	D	V	M	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	S	I	Y
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-																									

[illegible]

[illegible]

## 93

[illegible]

[illegible]

[illegible]



[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

*C. parC*

Strain	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ATCC 13813 <sup>T</sup>	D	G	L	K	P	V	Q	R	R	I	L	Y	S	M	N	K	D	G	N	T	F	E	K	G	F	R
FU37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



[illegible]

[illegible]



[illegible]

*D. parE*

Strain	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439
ATCC 13813 <sup>T</sup>	L	S	G	K	L	T	P	A	Q	S	K	N	A	K	K	N	E	L	Y	L	V	E	G	D	S	A
FU37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GB114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]



[illegible]

[illegible]