

# 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

感染制御科学専攻 感染制御・免疫学履修コース 感染症学

DI-21005 前田 貴広

## 【目的】

近年のペットブームにより、人と伴侶動物との距離が近くなったことから、病原体の伝播による人獣共通感染症が懸念されている。我が国においても、人獣共通感染症などに対して、異なる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。

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) および *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS) は、人や伴侶動物 (犬/猫) 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 を引き起こす。GBS においては、新生児・高齢者に対して、髄膜炎や敗血症などを引き起こすことが知られている。加えて、伴侶動物においても感染性心内膜炎を引き起こすことが報告されている<sup>1)</sup>。

1. SDSE は薬物治療を困難とさせる biofilm 産生 (BP) を行うが、同属菌と比較して BP 能に関連する報告は少ない。このため、本研究では SDSE の BP 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。
2. GBS における BP 能に関連する分子特性は未だ明確となっていない。そこで、本研究では GBS における BP 能の評価とその関連因子の探索を目的とした。加えて、GBS の BP 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。
3. GBS 感染症において、キノロン系抗菌薬はペニシリンアレルギーを疑われる患者への選択肢となり得る。近年、同属菌種において、キノロン耐性決定領域 (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>2)</sup>。本研究では、伴侶動物由来キノロン耐性 GBS 株とその分子特性との関連性を明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

1. 2015 年から 2021 年に人/伴侶動物から分離された SDSE 64 株を対象菌株とした。  
(1) **BP 能の評価**: 対象菌株における BP 能をクリスタルバイオレット染色法 (CV 染色法) により OD<sub>545nm</sub> (optical density) 値を得た。得られた OD<sub>545nm</sub> 値を表 1 の基準に従い, strong (+++), moderate (++), weak (+), no (-) の 4 段階に分類した<sup>3)4)</sup>。  
(2) **Lancefield 分類**: 対象菌株における Lancefield 分類について、ラテックス凝集法により分類した。  
(3) **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) の増幅を PCR 法により確認した。

表1. 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 <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).	
OD <sub>c</sub> = mean value of OD <sub>control</sub> + (3 × standard deviation of OD <sub>control</sub> ).	

(4) **Multilocus sequence typing (MLST) 解析**: *gki-gtr-murI-mutS-recP-xpt-atoB* を対象として, pubMLST website を用いて allele number, 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.

(5) **M タンパク遺伝子 (*emm*) 型の決定**: 対象菌株から得られた, *emm* 配列に基づいて, Centers for Disease Control and Prevention により, *emm* 型を決定した.

(6) **薬剤感受性の判定**: 微量液体希釈法により, 米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) document M100-S22/S25 を準拠し, 薬剤感受性の判定を行った.

(7) **AMR 遺伝子の検出**: Tetracyclines 耐性遺伝子となる *tet(M)-tet(O)-tet(K)-tet(L)-tet(S)*, および macrolides/lincosamides/streptogramin B 耐性遺伝子となる *erm(A)-erm(B)-mef(A)* の増幅産物の有無を PCR 法により確認した.

2. 2015 年から 2019 年に人/伴侶動物から分離された GBS 74 株を対象菌株とした.

(1) **BP 能の評価**: 対象菌株における BP 能を CV 染色法により評価した<sup>3)4)</sup>. その後, strong (+++), moderate (++), および weak (+) に属する株を BP 株, no (-) に属する株を非 BP 株と定義した.

(2) **病原性遺伝子の検出**: 病原性遺伝子として, *hylB* (encoding hyaluronidase), *pavA* (encoding fibronectin-binding protein), *pilB* (encoding backbone protein of pilus island 2a), *spbI* (encoding backbone protein of pilus island 2b), *srtCI* (encoding sortase C1 of pilus island 1), *brpA* (encoding biofilm regulatory protein) の増幅を PCR 法により確認した.

(3) **莢膜 (莢膜多糖体, *cps*) 遺伝子型の決定**: *cps* 遺伝子型となる *Ia, Ib, II~VIII* 型の増幅を PCR 法により観察した. すべての遺伝子型が増幅されない株を non-typeable と定義した.

(4) **MLST 解析**: *adhP-pheS-atr-glnA-sdhA-glcK-ktk* を対象として, pubMLST website を用いて allele number, ST/CC を決定した.

(5) **薬剤感受性の判定**: 微量液体希釈法により, CLSI document M100-S22/S25 を準拠し, 薬剤感受性の判定を行った.

(6) **AMR 遺伝子の検出**: AMR 遺伝子について, *tet(M)-tet(O)-tet(K)-tet(L)-tet(S)-tet(Q)*, および *erm(A)-erm(B)-erm(F)-mef(A)* の増幅産物の有無を PCR 法により確認した.

(7) **BP 能に対するペルペリンの影響**: 寒天平板希釈法にて, *S. agalactiae* ATCC 13813<sup>T</sup>

におけるベルベリンの MIC を決定した。その後, strong (+++) に属した 5 株を対象に, 得られた MIC に対して, 2~0.125 倍のベルベリン添加による BP 能への影響を CV 染色法により評価した。

3. 2017 年から 2019 年に分離された伴侶動物由来 GBS 22 株, および対照菌株として人由来 GBS 6 株を対象とした。

(1) キノロン系抗菌薬に対する MIC の判定: 3 種のキノロン系抗菌薬 (シプロフロキサシン (CPFX)/レボフロキサシン (LVFX)/モキシフロキサシン (MFLX)) に対する MIC を寒天平板希釈法にて判定した。また, MIC の評価として, LVFX, MFLX について CLSI document M100-S16/S25 に準拠し, CPFX について先行研究を参考とした<sup>5)</sup>。

(2) QRDR 配列決定: *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* における QRDR の塩基配列・アミノ酸配列の決定を試みた。その後, キノロン感性株である, ATCC 13813<sup>T</sup> および *Streptococcus pneumoniae* R6 における QRDR の塩基配列・アミノ酸配列との比較を行った。

(3) 疫学特性・AMR との関連: キノロン感受性と *cps* 遺伝子型, ST/CC, AMR 遺伝子との相関を確認した。

### 【結果・考察】

1. (1) BP 能分類において, strong (+++) 17 株, moderate (++) 24 株, weak (+) 12 株, no (-) 11 株であった。人由来株は, 伴侶動物由来株と比較して, 有意に BP 能が高かった。また, 膿/皮膚由来株は, 眼/耳由来株と比較して, 有意に BP 能が高かった。

(2) G 群に属する株は, C 群に属する株と比較して, 有意に BP 能が高かった。Lancefield 分類が BP 能を特徴づける要因の一つになり得ると考えられた。

(3) *srtpl* 検出株は, 有意に BP 能が高かった。SDSE における線毛が BP 能を特徴づける一因と考えられた。

(4) CC127 に属する株は, CC17 に属する株と比較して, 有意に BP 能が高かった。MLST が SDSE の特徴づけに有用であると示唆された。

(5, 6, 7) 本研究において, BP 能と *emm* 型, 薬剤感受性結果, および AMR 遺伝子検出率との関連性はみられなかった。

2. (1) BP 株群に 57 株, 非 BP 株群に 17 株が属した。

(2) *pilB* 検出率は BP 株群において有意に高かった。一方, *spbl* 検出率は非 BP 株群において有意に高かった。*pilB* を内包する pilus island 2a が BP 能に影響していると示唆された。

(3, 4, 5, 6) 本研究において, *cps* 遺伝子型, ST/CC, 薬剤感受性結果 (ミノサイクリン耐性率を除く), および AMR 遺伝子検出率は両群間で有意な差はみられなかった。

(7) すべての strong (+++) 株で, ATCC 13813<sup>T</sup> に対するベルベリンの sub-MIC で BP 阻害を示した。

3. (1) 伴侶動物由来株において、7 株がキノロン耐性を示した。各 MIC 値は CPFX 32 µg/mL, LVFX 16-32 µg/mL, MFLX 2-4 µg/mL であった。

(2) ATCC 13813<sup>T</sup> における QRDR のアミノ酸配列を基準として、伴侶動物由来キノロン耐性株では *gyrA* (Ser81Leu), および *parC* (Ser79Phe/Ser79Tyr/Gly128Asp) にアミノ酸置換を確認した。また、人由来キノロン耐性株が有する *parC* (Ser79Phe/Asp83Asn) においてアミノ酸置換を確認した。

(3) ST10/CC10 に属する株は、伴侶動物由来キノロン耐性株において、キノロン感性株と比較して有意に多かった。*cps* 遺伝子型, AMR 遺伝子検出率は両群間で有意な差はみられなかった。伴侶動物由来株において、人由来株と同様の耐性機序を示していると考えられた。

### 【結論】

本研究の成果として、

1. 日本で分離された SDSE における BP 能と宿主情報、分子特性との関連性を明らかにした。
2. GBS における BP 能と線毛関連遺伝子である *pilB* との関連性、およびベルベリンによる BP 能への影響を明らかにした。
3. 伴侶動物由来キノロン耐性 GBS 株における QRDR の変異、および ST10/CC10 との関連性を明らかにした。

本研究の課題として、本研究で用いた分離株に関連する抗菌薬使用歴、治療経過などの情報が限られていた。このため、BP 能/キノロン耐性との関連因子の解明において更なる情報収集、解析が必要である。また、本研究では表現型の評価は十分でないことから、その表現型について明らかにする必要がある。

最後に、本研究における成果が、人臨床医学および小動物臨床医学の分野で活用されることを期待したい。

### 【参考文献】

- 1) Messier S, *et al.* *Streptococcus agalactiae* endocarditis with embolization in a dog. *Can. Vet. J.* 1995;36:703-4.
- 2) Fukushima Y, *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.
- 3) Stepanović S, *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS.* 2007;115:891-9.
- 4) Chideroli RT, *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.
- 5) Janoir C, *et al.* High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40:2760-4.