

犬レンサ球菌に関する抗菌薬耐性機構の解明・  
疫学解析基盤の構築・感染制御に向けた基礎的検討

北里大学大学院 感染制御科学府

感染制御科学専攻

感染制御・免疫学履修コース 感染症学研究室

DI-19003 福島 康仁

指導教授 高橋 孝

# 目次

使用実験機器一覧.....	i
略号および機能一覧.....	ii
緒言.....	1
<b>第1章 犬レンサ球菌に関する抗菌薬耐性機構の解明.....</b>	<b>4</b>
1. 犬レンサ球菌が示すフルオロキノロン系抗菌薬耐性に関するメカニズムの解明.....	4
1-1. 序論.....	4
1-2. 材料および方法.....	6
1-3. 結果.....	16
1-4. 考察.....	27
1-5. 小括.....	29
<b>第2章 犬レンサ球菌に関する疫学解析基盤の構築.....</b>	<b>31</b>
2. 新規 SCM の分子タイピングとその関連因子探索.....	31
2-1. 序論.....	31
2-2. 方法.....	32
2-3. 結果.....	36
2-4. 考察.....	46
2-5. 小括.....	50
<b>第3章 犬レンサ球菌の感染制御に向けた基礎的検討.....</b>	<b>52</b>
3. 犬レンサ球菌のバイオフィルム生産能解析.....	52
3-1. 序論.....	52
3-2. 方法.....	52

3-3. 結果.....	57
3-4. 考察.....	71
3-5. 小括.....	72
結論.....	74
引用文献.....	76
附録.....	82
謝辞.....	85

## 使用実験機器一覧

96well プレートリーダー	CHROMATE® 4300 プレートリーダー 6 波長タイプ (5011AW0060) (Awareness Technology, Inc., FL, USA)
CO <sub>2</sub> インキュベーター	MCO-175 (三洋電気 株式会社, 東京, 日本)
Thermal cycler	LifeECO TC-96GHbC (Bioer Technology, Zhejiang, 中 国)
UV トランスイルミネーター	蛍光イルミネーター (紫外線テーブル)ECX-F15.M (ヴィルバー・ルーマット社製, Collégien, 仏国)
卓上微量遠心分離機	PC-100 (Funakoshi, 東京, 日本)
微生物同定感受性分析装置	マイクロスキャン WalkAway Plus (ベックマン・コー ルター, CA, USA)
分光光度計	Hitachi Gene Spec III Spectrometer 7A0-0038 (株式会社 日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本)

## 略号および機能一覧

ABPC	Ampicillin
AMR	AntiMicrobial Resistance
AZM	Azythromycin
BHI	Brain Heat Infusion
bp	Base pair
CAM	Clarithromycin
CFPM	Cefepime
CFU	Colony forming unit
CLDM	Clindamycin
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CP	Chloramphenicol
CTRAX	Ceftriaxone
CTX	Cefotaxime
CZOP	Cefozopran
D.W.	Distiled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
EM	Erythromycin
<i>emm</i>	M protein
<i>erm</i> (A)	Inducible-type methylase
<i>erm</i> (B)	Constitutive-type methylase
<i>gki</i>	Glucose kinase
<i>gtr</i>	Glutamine transport protein
LVX	Levofloxacin
<i>mef</i>	Transmembrane domains of an ABC transporter
MEPM	Meropenem

MIC (s)	Minimum inhibitory concentration (s)
MINO	Minomycin
ML	Macrolide/Lincosamide
MLST	Multilocus sequence typing
<i>murI</i>	Glutamate racemase
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCG	Benzylpenicillin
PCR	Polymerase chain reaction
<i>recP</i>	Transketolase
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal RNA
SCM	<i>Streptococcus canis</i> M-like protein
<i>scm</i> gene	Gene coding <i>Streptococcus canis</i> M-like protein
ST	Sequence type
STSS	Streptococcal toxic shock syndrome
TC	Tetracycline
<i>tet</i> (K)	Efflux pump
<i>tet</i> (L)	Efflux pump
<i>tet</i> (M)	Ribosomal protection protein
<i>tet</i> (O)	Ribosomal protection protein
<i>tet</i> (S)	Ribosomal protection protein
VCM	Vancomycin
WHO	World health organization
<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosyl transferase
<i>yqiZ</i>	gene coding for <i>Streptococcus canis</i> acetyl-CoA-acetyltransferase

## 緒言

### OneHealth と人獣共通感染症

World Health Organization (WHO)の提唱した、「人々の健康は動物の健康および環境に関連しているため、人、動物、植物、そしてそれらが共有する環境の間の相互関係を認識しながら最適な健康目標を達成することを目的として、地域的、国家的、そして世界的なレベルで取り組む共同的・多部門的なアプローチ」という考え方である“**One Health**”は、近年の医療および健康を考えるうえで重要なポイントとなっている。

この、**OneHealth**に代表される、健康や感染症といった課題は、近年社会的に注目を集めている、持続可能な開発目標 **Sustainable Development Goals (SDGs)**を達成するうえでも重要であるといえる。

その中で、日本においては、超少子高齢化社会をはじめとする社会環境の変化、医療技術の進歩により、人と動物の関係性がより一層密接になりつつある。

特に、犬や猫といった伴侶動物はその傾向が顕著であり、家族の一員としてだけでなくメンタルケア目的として医療分野においても重要視されている。

一方で、動物と人の距離が近くなればなるほどに、課題も発生する。それは、伴侶動物から人へ感染し、感染性心内膜炎のような重症感染症を引き起こす溶血性レンサ球菌や、死亡例の報告もある *Corynebacterium ulcerans* 等といった人獣共通病原体が引き起こす人獣共通感染症である。

人獣共通感染症は、国立感染症研究所によれば、「同一の病原体により、ヒトとヒト以外の脊椎動物の双方が罹患する感染症」とされている。主要な感染症としては、Bウイルス病、Q熱、アニサキス症、ウエストナイル熱、エキノコックス症、黄熱、オウム病、回帰熱、カンピロバクター感染症、狂犬病、ブタレンサ球菌感染症等が報告されている。

これらの感染症を引き起こす病原体はそれぞれ様々な動物から人へ伝播することが知られている。

しかし、One Health を考えるうえで、人由来細菌・畜産領域由来細菌と比べ、伴侶動物から分離される病原性細菌に関する知見は少なく、人獣共通に重症感染症の起原菌となり得る溶血性レンサ球菌を中心として、さらなる情報を集積し治療や診断へと応用する必要がある。

### 伴侶動物の飼育状況について

伴侶動物における人獣共通感染症を語るうえで欠かせない事項として、同動物の一般家庭における飼育状況があげられる。しかし、我が国における、国家レベルでの飼育頭数に関する統計は存在しておらず、民間団体である、一般社団法人 ペットフード協会によるものが存在している限りである。

同団体の報告<sup>1</sup>によれば、2020年度は犬: 848万9千頭、猫: 964万4千頭となっており、「猫の飼育頭数は直近の5年間の傾向としては横ばいであるが、犬の飼育頭数は減少傾向。2017年以降今回の調査でも、猫の飼育頭数が犬の飼育頭数を上回った。」とされている。

また、新型コロナウイルス感染症の流行によると考えられる、新規飼育者数の増加が報告されていることから、伴侶動物を起点とした人獣共通感染症のリスクは十分に高まりつつあると考えられる。

### 犬レンサ球菌とは

犬レンサ球菌 (*Streptococcus canis*)は、1986年に分類された溶血性レンサ球菌の一菌種である<sup>2</sup>。

同菌種は、レンサ球菌が保有する細胞壁の群特異的な多糖体を対象とする Lancefield 分類において G 群を示し、そのコロニー性状は、灰色または白色のスムーズな大きいコロニーを呈し、ヒツジ血液寒天培地上で  $\beta$  溶血を示す。

犬レンサ球菌は、伴侶動物 (犬・猫)の口腔、咽頭、皮膚、泌尿器、肛門の正常細菌叢として存在しており<sup>3</sup>、時として皮膚炎等の感染症を引き起こす。さらには、関節炎、Streptococcal Toxic Shock Syndrome (STSS)や壊死性筋膜炎を引き起こすことも知られて

いる<sup>4,5</sup>。

そのうえ、犬レンサ球菌は、伴侶動物と密接な関係にある人に対して、菌血症や感染性心内膜炎といった感染症を引き起こすことも報告されている<sup>6,7</sup>。

犬レンサ球菌の疫学特性に関して、これまでに、著者らの研究成果<sup>8</sup>として、感染兆候の見られる伴侶動物より分離された溶血性レンサ球菌 131 株の菌種同定結果と薬剤感受性について報告している。

その結果として、全 131 株のうち 117 株が犬レンサ球菌であり、感染兆候の見られる伴侶動物より分離された溶血性レンサ球菌の大部分は犬レンサ球菌であることを確認している。

犬レンサ球菌は、他の溶血性レンサ球菌と同様の病原因子を保有しており、その中でも菌種特異的な病原因子 *Streptococcus canis* M-like protein (SCM) について研究者の注目が集まっている。

しかし、犬レンサ球菌に関する臨床的課題として、人および獣医療の臨床現場では、種レベルでの菌種同定が進められておらず、犬レンサ球菌を起因菌とする人獣共通感染症について十分に認知されておらず、過小評価されている恐れがあると考えられる。

そこで、当研究においては、この犬レンサ球菌に対する臨床的意義を明確なものとするため、その抗菌薬耐性機構の解明、疫学解析基盤の構築および感染制御における基礎的検討を研究目的とした。

## 第1章 犬レンサ球菌に関する抗菌薬耐性機構の解明

### 1. 犬レンサ球菌が示すフルオロキノロン系抗菌薬耐性に関するメカニズムの解明

#### 1-1. 序論

##### 獣医領域における抗菌薬の使用状況について

薬剤耐性菌およびその対策を考えるうえで欠かせない事項として、薬剤耐性菌の検出状況と抗菌薬の使用状況があげられる。

そのため、2016年に薬剤耐性アクションプランが決定され、人医療・獣医療において薬剤耐性菌に対する対策が進められてきている。

しかし、獣医領域においては、人における皆保険制度に類する制度が存在しておらず、診断・治療に関する費用がすべて飼い主の負担となることから、情報収集が困難かつ、使用した抗菌薬の種類や量等が不明であり、人用に販売されている抗菌薬が転用されるといった点が課題となっていた。そのため、農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 動物医薬品検査所によって平成28年1-12月の間に飼育動物診療施設に販売された人用抗菌薬の量が調査された。同調査によれば、「平成28年に愛玩動物分野に販売された動物用抗菌剤の量（7,793.1 kg）とあわせた全体の量は14,273.7 kgであり、愛玩動物分野で使用される抗菌剤の45.4%を人用抗菌剤が占めていた」とされている。その中において、伴侶動物に販売された人用抗菌薬の系統別では第1・第2世代セファロスポリン系が最も多く、約半数の3,115.0 kg、本項の研究において着目したフルオロキノロン系抗菌薬は、全体の7.0% (1004.3 kg)であると報告されていた。さらに、フルオロキノロン系抗菌薬における動物用抗菌薬と人用抗菌薬の販売量の内訳は、動物用 (890.0 kg)、人用 (114.3 kg)であった。

##### フルオロキノロン系抗菌薬の特性と耐性機構

フルオロキノロン系抗菌薬、特に levofloxacin (LVX)は、ペニシリンアレルギーが明確または疑われる患者の多くの感染症 (呼吸器感染症、尿路感染症)に対する第1/第2選択の治療薬となっている。いくつかのキノロン系抗菌薬は細菌のDNAジャイレースサブユニットAとBをコードする *gyrA* (gene coding for DNA gyrase subunit A)、*gyrB*

(gene coding for DNA gyrase subunit B)を標的とし、ATP 依存性の DNA スーパーコイルを作り<sup>9</sup>、DNA 合成を阻害することで、細菌の死を誘発する<sup>10</sup>。

*Escherichia coli* を対象とした先行研究では、*gyrA/gyrB* の領域にキノロン耐性に関連するアミノ酸 (AA)の置換が確認され、これをキノロン耐性決定領域 (Quinolone resistance-determining region, QRDR)と呼んでいた。さらに、高レベルの耐性を獲得する際には、*gyrA/gyrB* の点変異は、関連酵素である DNA トポイソメラーゼ IV に見られるようなものとなる。この酵素は、*parC* (gene coding for DNA topoisomerase IV subunit A)/*parE* (gene coding for DNA topoisomerase IV subunit B)にコードされる2つのサブユニット A/B を持ち、染色体の分裂に必須である<sup>11</sup>。

1990年代半ばより、*S. pneumoniae*<sup>12</sup>、*S. pyogenes*<sup>13</sup>、*S. agalactiae*<sup>14</sup>において *gyrA/parC* に共通の点変異をもち、キノロン系抗菌薬に耐性を示す株が報告されている。驚くべきことに *gyrB/parE* の変異によってもたらされる薬剤耐性はほとんど認められなかった<sup>15</sup>。

著者らの報告した先行研究<sup>8</sup>において、フルオロキノロン系抗菌薬に対して耐性を示す犬レンサ球菌株を複数確認した。

さらに、犬レンサ球菌においては、同属の *S. pneumoniae* や *S. pyogenes*、*S. agalactiae* らと比較して、フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性機構が明確なものとなっていなかった。

そこで、本項における研究では、犬レンサ球菌のフルオロキノロン系抗菌薬への耐性・非感受性を示す機構を明らかにし、それらと、犬レンサ球菌に特異的な疫学因子である SCM allele type、Sequence Type 等の関連因子との関係性を調査することを目的とした。

## 1-2. 材料および方法

### 1-2-1. 分離株の収集

先行研究<sup>8,16</sup>において、2015年4月-5月と2017年4月-5月の間に犬レンサ球菌68株と117株を収集した。

菌株の収集方法は次のとおりである。感染症兆候の見られる犬および猫から獣医師によって臨床検体が収集された後、検体および宿主情報がサンリツセルコバ検査センターへと送付された。そのうえで、同センターにおいて期間内にセロアイデンストレプトキット（栄研，東京，日本）を使用し、 $\beta$ 溶血性レンサ球菌と判定された全分離株の分与を受けた。分与された菌株について、Polymerase Chain Reaction 法（PCR 法）を用いた 16S rRNA 遺伝子配列解析および菌種特異的遺伝子検出を行い、犬レンサ球菌と同定された株を研究対象とした。

参照菌株として 2012 年と 2016 年に人の血液より分離された犬レンサ球菌 2 株<sup>17,18</sup>と、犬レンサ球菌標準菌株 National Collection of Type Cultures 12191<sup>T</sup> (NCTC12191<sup>T</sup>)を用いた。

### 1-2-2. 分離菌株の溶菌操作および保存

収集した全分離株を、表 1 の TE バッファー100  $\mu$ L 中にマクファーランド濁度 0.5 になるよう目視で確認しながら懸濁した。その後、サーマルサイクラー[LifeECO TC-96GHbC (Bioer Technology, Zhejiang, 中国)]を使用し、97°C、10 分間の反応条件により、分離株懸濁液の溶菌操作を行った。溶菌後、卓上微量遠心分離機[PC-100 (Funakoshi, 東京, 日本)]により、2 分間の遠心操作を行った。遠心後、白色の沈殿を吸わないように、上清を回収し、これを PCR 用テンプレート DNA 溶液とした。

分与された菌株は、当研究室において Heart Infusion 液体培地+濃グリセリン液中に懸濁し、-70°Cから-80°Cで菌株保存を行った。以後、特段の記載がない場合は、保存した菌株を 5%ヒツジ血液寒天培地（コージンバイオ，東京，日本）上で 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下、18 - 24 時間の培養後、実験に使用した。

表 1 TE バッファー組成

試薬名	容量	最終濃度
1 M トリス塩酸バッファー	5 mL	10 mM
0.5 M EDTA	1 mL	1 mM
D.W.	494 mL	
	500 mL	

### 1-2-3. 薬剤感受性試験

#### 1-2-3-1. 自動機器による薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、分離株の収集において記載した犬レンサ球菌保存菌株を継代培養し、汚染のないことを確認したうえで、マイクロスキャン WalkAway Plus (ベックマン・コールター, CA, USA)を使用し測定した。判定プレートとして、2017年分離株、人血液由来犬レンサ球菌、NCTC12191<sup>T</sup>は MICroFAST シリーズ ストレプト MICroFAST 7J (ベックマン・コールター, CA, USA)、2015年分離株は MICroFAST シリーズ ストレプト MICroFAST 5J (ベックマン・コールター, CA, USA)を用いた自動機器による微量液体希釈法によって全分離菌株の最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)を測定した。

薬剤感受性の判定は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M100-S22<sup>19</sup>に基づき、LVX の MIC の判定を行った。

#### 1-2-3-2. Etest®による薬剤感受性試験

1-2-3-1. 自動機器による薬剤感受性試験の結果より、LVX 耐性と判定された7株を選択した。また、比較対照群として、①MIC: 1 - ≤ 4 µg/mL と判定された伴侶動物由来犬レンサ球菌9株、②MIC: ≤ 0.25 µg/mL と判定された伴侶動物由来犬レンサ球菌8株を無作為に選択した。さらに、③人菌血症起因菌と推定される犬レンサ球菌2株および④NCTC12191<sup>T</sup>を選択した。その後、臨床および研究において薬剤感受性を判定する目的で使用される Etest® (バイオメリュー・ジャパン株式会社, 東京, 日本))を使

用したフルオロキノロン系抗菌薬に対する薬剤感受性試験を行った。

対象としたフルオロキノロン系薬は、Norfloxacin (NOR)、Ciprofloxacin (CIP)、LVX、Moxifloxacin (MFX)の4種の抗菌薬とし、当該製品の添付文書に則り、対象とした犬レンサ球菌27株のMICを判定した。これらの抗菌薬を選択した理由は、スペインで分離された*S. pyogenes*の耐性株6株について、これらの抗菌薬の低レベルのMIC (LVX: 2-3 µg/mL)と高レベルのMIC (LVX: >32 µg/mL)がEtest®により評価され、*gyrA/parC*の変異についても記載されていたからである<sup>20</sup>。Etest®を用いたMICの判定基準は、先行研究<sup>21</sup>として報告されているものと同様に、LVX > 1 µg/mL と CIP ≥ 2 µg/mL を非感受性株とした。

本実験は目視による判定のため、著者を含む2人の研究者が独立して判定した。図1.にEtest®の判定における参考画像を示す。

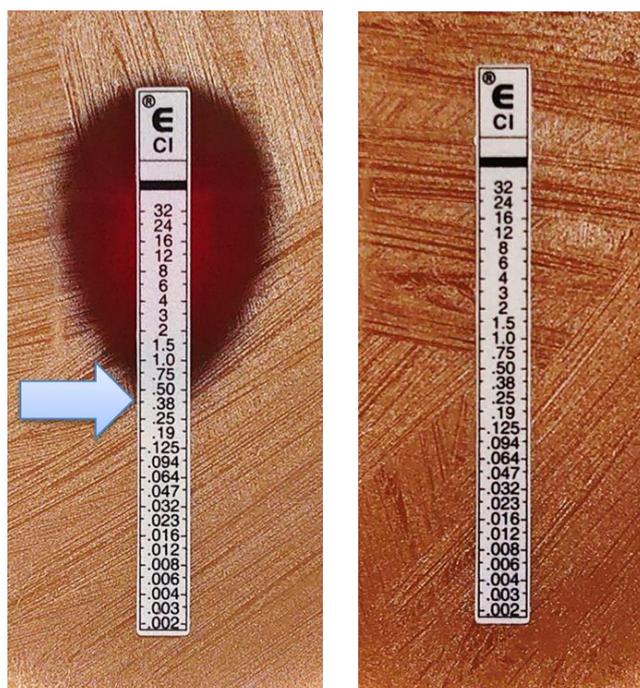


図 1. Etest®判定参考画像

#### 1-2-4. キノロン耐性決定領域の検出および配列解析

1-2-3-2. Etest®による薬剤感受性試験において選択した27株について、1-2-2. 分離菌株の溶菌操作および保存にて抽出したテンプレートDNA溶液に、表2に示した、QRDR 該当遺伝子を選択的に増幅するプライマー-primer *gyrA* F/R<sup>22</sup>、primer *gyrB* F/R

(本研究にて設計)、primer *parC* F/R<sup>22</sup>、primer *parE* F/R<sup>23</sup>、反応条件、反応液組成を用いて PCR 法を行った。反応条件は表 2 の通り、適宜変更した。PCR 増幅産物についてゲル電気泳動を行い、臭化エチジウム溶液中で泳動済みゲルの染色を行い、UV トランスイルミネーター ECX-F15.M (ヴィルバー・ルーマツト社製, Collégien, フランス) による増幅産物検出を行った。その後、QRDR の増幅産物について、DNA 精製キット QIAquick PCR Purification Kit (株式会社 キアゲン, Venlo, オランダ)を用いた増幅産物の精製を行った。精製した増幅産物について、BigDye Terminator v3.1 によるシーケンス反応後、3130xl Genetic Analyzer にて泳動した。解析結果についてフリーソフト MEGAX (version 10.0.5)<sup>24</sup> を用いて得られたシーケンスの波形を確認し、シーケンスの正確性を検証した。以降の実験において PCR 法を用いたシーケンス解析をする場合は上記の実験手順に則って実施した。また、対象株のうちバイオフィーム生産能および細胞内侵入能の高い、もしくは低い 3 株 (FU1、FU97、FU129)については、先行研究<sup>25</sup>において示した全ゲノム解析によって取得した contig 配列を使用して QRDR の変異解析を実施した。

すでにフルオロキノロン系抗菌薬に対する感受性が高いことが明らかにされている、*S. pneumoniae* (Strain: R6)、非感受性が明らかにされている *S. pyogenes* (Strain: NIH-R01-GAS)および *S. agalactiae* (Strain: GTC1966)の QRDR 配列を比較配列として、得られた犬レンサ球菌 QRDR 配列とのアライメント解析を MEGA X に搭載されている CLUSTALW を使用して実施した。その後、犬レンサ球菌株の遺伝子変異およびアミノ酸変異を確認した。

表 2. QRDR 増幅用プライマー配列、反応液組成、増幅条件

対象遺伝子	Primer名	配列 (5'→3')	アニーリング温度(°C)
DNA gyrase subunit A ( <i>gyrA</i> )	<i>gyrA</i> -F	GCAAGATCGAAATTTAATTGACGTC	61 - 36 [55 <sup>1)</sup> ]
	<i>gyrA</i> -R	ACTCTCTTGTGTACAGTCTGG	
DNA gyrase subunit B ( <i>gyrB</i> )	<i>canis_gyrB_F</i>	TGGCAATTCAGAAGTAGTTAAA	47 - 42 [42 <sup>1)</sup> ]
	<i>canis_gyrB_R</i>	TGCTTCTAAGACTGGTCTCA	
DNA topoisomerase IV subunit A ( <i>parC</i> )	<i>parC</i> -F	ATGTCAAACATTCAAAACATGTCC	61-36 [58 <sup>1)</sup> ]
	<i>parC</i> -R	AGCCTGCGGAAATACCAGAAG	
DNA topoisomerase IV subunit B ( <i>parE</i> )	<i>parE</i> -F	GCTCAGATTATCGAGAAGGA	42
	<i>parE</i> -R	CAGCATCGGTCATGATAATA	

5x Prime STAR Buffer	10 µL			
10mM dNTP mix	4 µL			
primer F (5 mM)	2 µL	94°C	10 min	
primer R (5 mM)	2 µL	94°C	1 min	
Template	2 µL (<200 ng)	61°C	1 min	30 cycles
Prime STAR HS DNA polymerase	0.2 µL	72°C	1 min	
MiliQ	29.8 µL	72°C	10 min	
	50 µL			

1) 最も多くの株の増幅に使用したアニーリング温度

### 1-2-5. フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対する SCM typing

これまでに報告<sup>26, 27</sup>されているように表 3-5 に示した検出プライマー、増幅プライマー、反応液組成、反応条件を用いて犬レンサ球菌特異的病原因子 SCM の増幅と配列決定を試みた。その後、決定した配列について SCM のアミノ酸配列に基づく allele typing についても実施した。

表 3. scm 検出用プライマー配列、反応液組成、増幅条件

対象遺伝子	Primer名	配列 (5'→3')			
scm gene ( <i>Streptococcus canis</i> M-like protein)	all_canis_fwd	5' TAGCGTTGGAACAGCATCAC 3'			
	all_canis_rev	5' CTGCCTCTGCTTTTGCTTTC 3'			
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)					
5x PrimeSTAR Buffer		5 µL			
10mM dNTP mix		2 µL			
primer F (5 mM)		1 µL	94°C	5 min	30 cycles
primer R (5 mM)		1 µL	94°C	30 sec	
DNA Template		1 µL (<200 ng)	56°C	1 min	
PrimeSTAR HS DNA polymerase		0.25 µL	72°C	2 min	
MiliQ		14.75 µL	72°C	10 min	
		25 µL			

表 4. *scm* 増幅/配列決定用プライマー配列、反応液組成、増幅条件 (1)

対象遺伝子	プライマー名	配列 (5'→3')
<i>scm</i> gene ( <i>Streptococcus canis</i> M-like protein)	M-SCAF2	5' AGTGGCCTTTCCTTTAGGGTCAT 3'
	M-SCAR3	5' GAAAGCGGTTAGAATCAGCGT 3'
	M-SCAR4 <sup>*)</sup>	5' TCACGAAAGCCACATCGGTGTCAT 3'

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)		
5x PrimeSTAR Buffer	10 μL	
10mM dNTP mix	4 μL	
primer F (5 mM)	2 μL	94°C 5 min
primer R (5 mM)	2 μL	94°C 30 sec
DNA Template	2 μL (<200 ng)	57°C 30 sec
PrimeSTAR HS DNA polymerase	0.5 μL	72°C 2 min
MiliQ	29.5 μL	72°C 10 min
	50 μL	

<sup>\*)</sup>M-SCAF2/R3 のペアにて増幅産物が得られない場合に M-SCAF2/R4 のペアを使用した。

表 5. *scm* 増幅/配列決定用プライマー配列、反応液組成、増幅条件 (2)

対象遺伝子	Primer名	Sequence (5'→3')
<i>scm</i> 増幅プライマー ( <i>Streptococcus canis</i> M-like protein)	Sc_Mprot_F1	GGTGAAGACAAGCTTTTTAGC
	Sc_Mprot_R1	CGGTGTCATTCATGTACTIONTAG
<i>scm</i> シーケンスプライマー	Sc_Mprot_F2	GGCAAAGGAAAATAAGGAGAAG
	Sc_Mprot_R2	CAGTAGATGACATGTTTGCTTT

Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

10x Ex-Taq Buffer	5 μL		
10mM dNTP mix	4 μL		
primer F (5 mM)	4 μL	94°C	1 min
primer R (5 mM)	4 μL	94°C	25 sec
Template	2 μL (<200 ng)	46°C	40 sec
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 μL	72°C	1 min 25sec
MiliQ	30.75 μL	72°C	10 min
	50 μL		

## 1-2-6. フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対する Multilocus sequence typing (MLST)

1-2-3-2. Etest®による薬剤感受性試験に供した 27 株に対して先行研究<sup>26</sup>において報告された手法に則り MLST 解析を実施した。次の表 6 に示した 7 種類の対象ハウスキーピング遺伝子 (*gki*: gene coding for glucose kinase、*gtr*: gene coding for glutamine transport protein、*murI*: gene coding for glutamate racemase、*mutS*: gene coding for DNA mismatch repair protein、*recP*: gene coding for transketolase、*xpt*: gene coding for xanthine phosphoribosyl transferase、*yqiZ*: gene coding for *Streptococcus canis* acetyl-CoA-acetyltransferase) を特異的に増幅するプライマー、反応条件、反応液組成を用いて PCR 反応を行った。*xpt* 遺伝子の増幅には、M13F ユニバーサルシーケンスプライマーを含む *xpt*-fwd-M13F と、M13R ユニバーサルシーケンスプライマーを含む *xpt*-rev-M13R-pUC を用いた。同遺伝子のシーケンス解析には、M13R ユニバーサルシーケンスプライマーを使用した。その後、増幅産物のシーケンス解析を行い、シーケンス情報に基づく MLST を行った。MLST にはオンライン MLST 用データベース Pub MLST (<https://pubmlst.org/>)を使用した。シーケンスタイプ (Sequence Type, ST) の決定は、得られた塩基配列をデータベース上に入力し、各ハウスキーピング遺伝子の組み合わせによって決定された。全ゲノム解析により contig 配列を取得した 3 株については、ウェブツール MLST2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), Center for Genomic Epidemiology)<sup>28</sup> を使用して解析を実施した。さらに、1 つのハウスキーピング遺伝子のみが異なる単一遺伝子座バリエントを Clonal Complex (CC) として定義した。

得られた ST と各ハウスキーピング遺伝子の組み合わせ、および対象株のキノロン感受性をもとに、フリーソフトである PHYLOViZ 2.0<sup>29</sup> を用いて global optimal eBURST (goeBURST) 解析を行った。

表 6. MLST 用プライマー配列、反応液組成、増幅条件

対象遺伝子	Primer名	Sequence (5'→3')
<i>gki</i>	<i>gki</i> Sc fwd	GCTGATTCGTAGGTATTGGTATGG
	<i>gki</i> Sc rev	GTGAGCGTAGAAATTCCTGCTG
<i>gtr</i>	<i>gtr</i> Sc fwd	GGAATTGATTTAGACATCATGCCAGGAG
	<i>gtr</i> Sc rev	TACAATAACCCCACCATCCATG
<i>murI</i>	<i>murI</i> Sc fwd	TTACGGACCAAGGCCAGCTGAGC
	<i>murI</i> Sc rev	TTTCAGGACTTGCTGTCGTATAAAA
<i>mutS</i>	<i>mutS</i> fwd	AGGTCAGATGTTAGAGGCTAGG
	<i>mutS</i> Sc rev (muts scanis dn)	CCTAATTCATCAAATAAAATGAGC
<i>recP</i>	<i>recP</i> fwd	TGTCCGCACCCATCAATGGAT
	<i>recP</i> Sc rev	CGTCTTTCACAAGAATGTTGCC
<i>xpt</i> (M13)	<i>xpt</i> -fwd-M13F	TGTA AACGACGCGCCAGTATGCAGTTACTTGAAGAACGCATCTTAAC
	<i>xpt</i> -rev-M13R	CAGGAAACAGCTATGACGCCTCCAAGAAGTTAGATTACCA
<i>yqiZ</i>	<i>yqiZ</i> fwd	CAGATGCTTTAACAATTACCACATGG
	<i>yqiZ</i> Sc rev	ACCATTACATTGACGATATCAGG

Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

10x Ex-Taq Buffer	5 µL			
10mM dNTP mix	4 µL			
primer F (5 mM)	2 µL	94°C	4 min	30 cycles
primer R (5 mM)	2 µL	94°C	1 min	
Template	2 µL (< 200 ng)	50°C	1 min	
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.1 µL	72°C	1 min	
MiliQ	34.9 µL	72°C	5 min	

Total volume: 50 µL

### 1-2-7. フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対するマクロライド/リンコサミド系・テトラサイクリン系抗菌薬耐性遺伝子検出

分離株について、マクロライド/リンコサミド系抗菌薬 (ML)耐性遺伝子: *erm* (A)、*erm* (B)、*mef*(A)、テトラサイクリン系抗菌薬 (TET)耐性遺伝子: *tet* (M)、*tet* (O)、*tet* (K)、*tet* (L)、*tet* (S)および陽性対照群として 16S rRNA 遺伝子を表 7 に示したプライマー、反応液組成、増幅条件にて PCR 法による増幅およびバンド検出により抗菌薬耐性遺伝子の保有を判定した。<sup>8</sup>

全ゲノム解析によって contig 配列を取得した 3 株については、ウェブツール ResFinder3.0 ([<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>], Center for Genomic Epidemiology)<sup>30</sup> を使用して抗菌薬耐性遺伝子を検出した。

表 7. 抗菌薬耐性遺伝子検出用プライマー配列、反応液組成、増幅条件

対象遺伝子	Primer名	配列 (5'→3')
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1485R	TACGGTTACCTTGTTACGAC
<i>erm</i> (A)	<i>ermA</i> -F	CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT
	<i>ermA</i> -R	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG
<i>erm</i> (B)	<i>ermB</i> -F	TGGTATTCCAAATGCGTAATG
	<i>ermB</i> -R	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT
<i>mef</i> (A)	<i>mefA</i> -F	CAATATGGGCAGGGCAAG
	<i>mefA</i> -R	AAGCTGTTCCAATGCTACGG
<i>tet</i> (M)	<i>tetM</i> -F	GTGGACAAAGGTACAACGAG
	<i>tetM</i> -R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC
<i>tet</i> (O)	<i>tetO</i> -F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC
	<i>tetO</i> -R	TCCCACTGTTCATATCGTCA
<i>tet</i> (K)	<i>tetK</i> -F	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG
	<i>tetK</i> -R	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT
<i>tet</i> (L)	<i>tetL</i> -F	TGGTGGAATGATAGCCCATT
	<i>tetL</i> -R	CAGGAATGACAGCACGCTAA
<i>tet</i> (S)	<i>tetS</i> -F	TCCGATAGTGATCCCCTTCT
	<i>tetS</i> -R	GGAAATCTGCTGGCGTACTG

Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

10x Ex-Taq Buffer	2.5 μL			
10mM dNTP mix	2 μL			
primer F (5 μM)	2 μL	93°C	3 min	
primer R (5 μM)	2 μL	93°C	1 min	
Template	1 μL (<200 ng)	62°C	1 min	30 cycles
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.125 μL	65°C	4 min	
MiliQ	15.375 μL	65°C	3 min	
	25 μL			

## 1-2-8. 統計解析

QRDR にアミノ酸変異を有する分離株とその関連因子間の有意な関係を分析するために Fisher's exact probability test (two-sided) を使用した。解析には Statcel4 (OMS Publisher, 東京, 日本) を使用した。  $p$  値が  $<0.05$  の場合、統計的有意性を示した。

## 1-3. 結果

### 1-2-3-1. 分離株の収集

本研究に採用した菌株の背景を以下の表 8 に示す。LVX の MIC が 1 以上のものを 16 株、MIC が 0.25 以下のものを 8 株選択した。CLSI Document M100-S22 に基づく判定において、16 株のうち、7 株は LVX に耐性、1 株は *intermediate* であることを確認した。比較対照とした犬レンサ球菌標準菌株 NCTC12191<sup>T</sup> および人血液由来株 TA4、OT1 の LVX における MIC は 0.5 であった。

LVX に耐性または *intermediate* であった 8 株の分離地域は、東京都 ( $n = 3$ )、千葉県 ( $n = 2$ )、愛知県/神奈川県/奈良県 ( $n = 1$ ) の 5 都県から分離された。分離年は、2017 年が 5 株、2015 年が 3 株であった。8 株の由来となった臨床材料は、すべて非無菌的部位 (開放膿、耳漏、尿) から分離された。宿主情報は、すべて犬より分離されており、平均年齢 10.0 歳、年齢幅 4~14 歳、性別はオス ( $n = 6$ )、メス ( $n = 2$ ) であった。

表 8. 対象菌株、宿主情報、臨床材料情報および微量液体希釈法による MIC

分離株名	検体由来	動物種	性別/年齢(歳)	分離地域	分離年	臨床検体	L VXの薬剤感受性 ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1)</sup>
FU47	臨床検体由来	犬	オス/不明	東京都	2017	開放膿	> 8
FU71	臨床検体由来	犬	オス/6	千葉県	2017	耳漏	> 8
FU75	臨床検体由来	犬	オス/4	愛知県	2017	開放膿	> 8
FU5	臨床検体由来	犬	メス/12	神奈川県	2017	尿	> 8
SA3	臨床検体由来	犬	オス/9	東京都	2015	耳漏	8
SA15	臨床検体由来	犬	オス/14	東京都	2015	耳漏	8
SA31	臨床検体由来	犬	オス/13	奈良県	2015	尿	8
FU95	臨床検体由来	犬	メス/12	千葉県	2017	開放膿	4
FU3	臨床検体由来	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿	2
FU32	臨床検体由来	犬	メス/不明	石川県	2017	耳漏	2
FU115	臨床検体由来	犬	メス/7	福井県	2017	開放膿	2
SA35	臨床検体由来	犬	オス/13	東京都	2015	開放膿	2
SA68	臨床検体由来	猫	オス/7	沖縄県	2015	尿	2
FU40	臨床検体由来	犬	オス/15	埼玉県	2017	皮下貯留液	1
SA16	臨床検体由来	犬	オス/17	愛知県	2015	開放膿	1
SA25	臨床検体由来	犬	オス/不明	千葉県	2015	耳垢	1
NCTC 12191 <sup>T, 2)</sup>	標準菌株	牛					0.5
FU1	臨床検体由来	猫	オス/不明	千葉県	2017	開放膿	$\leq 0.25$
FU74	臨床検体由来	犬	オス/5	東京都	2017	開放膿	$\leq 0.25$
FU92	臨床検体由来	犬	オス/12	東京都	2017	尿	$\leq 0.25$
FU97	臨床検体由来	犬	オス/11	沖縄県	2017	開放膿	$\leq 0.25$
FU129	臨床検体由来	犬	オス/9	新潟県	2017	開放膿	$\leq 0.25$
SA34	臨床検体由来	犬	オス/10	大阪府	2015	耳漏	$\leq 0.25$
SA61	臨床検体由来	犬	メス/不明	東京都	2015	耳漏	$\leq 0.25$
FU28	臨床検体由来	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿	$\leq 0.25$
TA4	臨床検体由来	人	男性/71	東京都	2016	血液	0.5
OT1	臨床検体由来	人	女性/91	岐阜県	2012	血液	0.5

1) 薬剤感受性は、Clinical and Laboratory Standards Institute の Document M100-S22 に従って判定した。

2) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

### 1-2-3-2. Etest®による薬剤感受性試験

Etest®によって判定されたフルオロキノロン系 4 抗菌薬の MIC を表 9 に示す。微量液体希釈法において耐性/intermediate を示した 8 株に加え、**1-2-3-2. Etest®による薬剤感受性試験**において定義した CIP/LVX の MIC において非感受性を示した株として、5 株を確認した。これらの株は、LVX の微量液体希釈法による感受性試験により、MIC として、2 µg/mL を示した株であった。これらの株は、千葉県、石川県、福井県、東京都、沖縄県から分離された。分離年は 2017 年に 3 株、2015 年に 2 株であった。同株は、すべて非無菌検体 (開放膿、耳漏、尿)より分離された菌株で、動物種は 4 匹の犬と 1 匹の猫から分離された株であった。同動物の宿主情報は、平均年齢 9.0 歳、年齢幅は 7~13 歳であった。性別は、オス ( $n=3$ )、メス ( $n=2$ )であった。

一方で、LVX の微量液体希釈法による感受性試験で MIC が 1 µg/mL であった株と比較対照群では、Etest®の定義においても感受性が認められた。

表 9. Etest による 4 抗菌薬の MIC (µg/mL)

分離株名	Etest®による各薬剤のMIC(µg/mL)			
	NOR	CIP	LVX	MXF
FU47	> 256	> 32	> 32	2
FU71	> 256	> 32	> 32	3
FU75	> 256	> 32	> 32	3
FU5	> 256	> 32	> 32	3
SA3	> 256	> 32	> 32	4
SA15	24	4	24	1
SA31	> 256	> 32	24	3
FU95	32	4	3	1.5
FU3	32	2	3	0.38
FU32	48	4	3	0.32
FU115	16	2	3	0.25
SA35	96	4	3	0.38
SA68	96	8	4	1
FU40	12	2	1	0.25
SA16	3	0.5	0.38	0.19
SA25	4	1	1	0.19
NCTC 12191 <sup>T, 1)</sup>	2	0.38	0.5	0.125
FU1	2	0.38	0.38	0.19
FU74	2	0.5	0.38	0.125
FU92	1.5	0.25	0.38	0.125
FU97	12	1	1	0.25
FU129	2	0.5	0.5	0.19
SA34	2	0.5	0.38	0.19
SA61	3	0.5	0.5	0.19
FU28	2	0.38	0.38	0.125
TA4	3	0.5	0.5	0.19
OT1	3	0.38	0.38	0.19

1) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

### 1-3-3 フルオロキノロン系薬耐性遺伝子変異の検出および配列解析

QRDR の変異解析結果を表 10 に示す。QRDR のアミノ酸配列のマルチプルアライメントにより、*parC* の 57/67/71/95 位、*parE* の 438 位、*gyrA* の 81/85 位、*gyrB* の 408 位に置換があることが判明した。また、Etest®の結果から、非感受性株では *parC* に Ser67Phe/Ser67Tyr/Asp71Tyr、*parE* に Asp438Asn、*gyrA* に Ser81Phe/Ser81Tyr/Glu85Lys、*gyrB* に Gly408Asp の変異が確認された。

さらに、代表的な非感受性株と比較対照群の配列を含めたアライメント図 2 を示す。アライメント結果より、同属菌種と同一部位の変異を確認した。

表 10. QRDR アミノ酸配列変異

分離株名	Etest®による各薬剤のMIC(μg/mL)				Codon(AA) at:			
	NOR	CIP	LVX	MXF	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 67位	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 71位	<i>gyrA</i> 81位	その他のQRDR変異部位
FU47	> 256	> 32	> 32	2	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions
FU71	> 256	> 32	> 32	3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions
FU75	> 256	> 32	> 32	3	TCC (Ser)	GAT (Asp)	<b>TAT (Tyr)</b>	No AA substitutions
FU5	> 256	> 32	> 32	3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions
SA3	> 256	> 32	> 32	4	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions
SA15	24	4	24	1	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	<b>AAT (Asn)</b> at position 438 in <i>parE</i> <sup>3)</sup>
SA31	> 256	> 32	24	3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions
FU95	32	4	3	1.5	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	<b>AAA (Lys)</b> at position 85 in <i>gyrA</i>
FU3	32	2	3	0.38	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU32	48	4	3	0.32	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GAC (Asp)</b> at position 408 in <i>gyrB</i> <sup>4)</sup>
FU115	16	2	3	0.25	<b>TAC (Tyr)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA35	96	4	3	0.38	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA68	96	8	4	1	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU40	12	2	1	0.25	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA16	3	0.5	0.38	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA25	4	1	1	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
NCTC 12191[T] <sup>1)</sup>	2	0.38	0.5	0.125	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU1	2	0.38	0.38	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU74	2	0.5	0.38	0.125	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU92	1.5	0.25	0.38	0.125	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
FU97	12	1	1	0.25	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>TTT (Phe)</b> at position 95 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>
FU129	2	0.5	0.5	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA34	2	0.5	0.38	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
SA61	3	0.5	0.5	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GTC (Val)</b> at position 57 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>
FU28	2	0.38	0.38	0.125	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
TA4	3	0.5	0.5	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions
OT1	3	0.38	0.38	0.19	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions

1) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

2) *S. pneumoniae* R6 *parC* アミノ酸配列の 69、79、83、107 位に対応している。

3) *S. pneumoniae* R6 *parE* アミノ酸配列の 435 位に対応している。

4) *S. pneumoniae* R6 *gyrB* アミノ酸配列の 406 位に対応している。

非感受性株/感受性株で観察された塩基およびアミノ酸の置換は太字で下線を引いた。

## parC

Position	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
<i>S. canis</i> NCTC 12191(T) <i>parC</i>	Y	R	K	S	A	K	S	V	G	N	I	M	G	N	F	H	P	H	G	D	S	S	I	Y	D
FU47 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-
FU75 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA15 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-
FU95 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
FU115 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Position	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
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC 1966 <i>parC</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-

Position	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
<i>S. canis</i> NCTC 12191(T) <i>parC</i>	A	M	V	R	M	S	Q	D	W	K	N	R	E	I	L	V	E	M	H	G	N	N	G	S	M
FU47 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU75 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA15 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU95 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU115 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Position	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC 1966 <i>parC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## gyrA

Position	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
<i>S. canis</i> NCTC 12191(T) <i>gyrA</i>	A	R	I	T	G	D	V	M	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	S	I	Y	E	A	M	V	R
FU47 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
FU75 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
SA15 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
FU95 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-
FU115 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC 1966 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-

Position	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
<i>S. canis</i> NCTC 12191(T) <i>gyrA</i>	M	A	O	W	W	S	Y	R	H	M	L	V	D	G	H	G	N	F	G	S	M	D	G	D	G
FU47 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU75 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA15 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU95 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FU115 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>S. pyogenes</i> NIH-R01-GAS <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> GTC 1966 <i>gyrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図2 QRDR アミノ酸配列変異部位

*parC* と *gyrA* の QRDR におけるアミノ酸配列のマルチプルシーケンスアラインメントを示す。矢印は、非感受性株で観察された点変異を示す。*S. canis* NCTC12191(T)の *parC* の 67/71 位のアミノ酸は、*S. pneumoniae* R6 の *parC* の 79/83 位に相当する。

FU47、FU75、SA15、FU95、FU115 は、キノロン非感受性の犬レンサ球菌株である。

*S. pneumoniae* R6 は、キノロン系抗菌薬に感受性のある株である。

*S. pyogenes* NIH-R01-GAS および *S. agalactiae* GTC 1966 はキノロン系抗菌薬非感受性株である。各株において NCTC12191<sup>T</sup> のアミノ酸と同一のアミノ酸を示すものを記号 (-) で示した。各株において NCTC12191<sup>T</sup> のアミノ酸と異なるものをアミノ酸略号で示した。アライメント中の赤色枠が耐性株、緑色枠が非感受性株を示す。

#### 1-3-4. アミノ酸配列に基づく SCM allele typing

QRDR に変異のあった非感受性株 13 株では、SCM allele type1 ( $n = 3$ 、23.1%)、type2 ( $n = 7$ 、53.8%)、type4 ( $n = 2$ 、15.4%)、type10 ( $n = 1$ 、7.7%)であった。これに対して、変異のなかった感受性株 14 株では、type1 ( $n = 7$ 、50.0%)、type2 ( $n = 1$ 、7.1%)、type4 ( $n = 2$ 、14.3%)、type10 ( $n = 3$ 、21.4%)、type11 ( $n = 1$ 、7.1%)であった。そして、フルオロキノロン系抗菌薬非感受性株と SCM allele type2 の保有に関して有意な相関関係を確認した ( $p < 0.05$ )。

詳細を表 11 に示す。

表 11. QRDR 変異と SCM allele type の関係性

分離株名	Codon(AA) at:				SCM allele type
	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 67位	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 71位	<i>gyrA</i> 81位	その他のQRDR変異部位	
FU47	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
FU71	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
FU75	TCC (Ser)	GAT (Asp)	<b>TAT (Tyr)</b>	No AA substitutions	2
FU5	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
SA3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
SA15	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	<b>AAT (Asn)</b> at position 438 in <i>parE</i> <sup>3)</sup>	2
SA31	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	1
FU95	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	<b>AAA (Lys)</b> at position 85 in <i>gyrA</i>	4
FU3	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	No AA substitutions	4
FU32	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GAC (Asp)</b> at position 408 in <i>gyrB</i> <sup>4)</sup>	10
FU115	<b>TAC (Tyr)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA35	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	2
SA68	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU40	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA16	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA25	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
NCTC 12191 <sup>T, 1)</sup>	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	11
FU74	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU92	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	4
FU97	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>TTT (Phe)</b> at position 95 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	4
FU129	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
SA34	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
SA61	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GTC (Val)</b> at position 57 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	2
FU28	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
TA4	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
OT1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1

1) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

2) *S. pneumoniae* R6 *parC* アミノ酸配列の 69、79、83、107 位に対応している。

3) *S. pneumoniae* R6 *parE* アミノ酸配列の 435 位に対応している。

4) *S. pneumoniae* R6 *gyrB* アミノ酸配列の 406 位に対応している。

非感受性株/感受性株で観察された塩基およびアミノ酸の置換は太字で下線を引いた。

### 1-3-5.フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対する MLST

非感受性株からは、主に CC46 に分類される ST46 ( $n=6$ 、46.2%)と ST2 ( $n=2$ 、15.4%)が検出された。一方で、感受性株からは主に、CC9 に分類される ST9 ( $n=5$ 、35.7%)と ST3 ( $n=2$ 、14.3%)が存在していた。さらに、非感受性株と ST46 ( $p<0.01$ )および CC46 ( $p<0.01$ )との間には、有意な相関関係を認めた。

さらに、表 12 と図 3 において非感受性株/感受性株と ST (CC)との関連性を示す。

表 12. QRDR アミノ酸配列変異と ST の関連性

分離株名	Codon (AA) at:				SCM allele type
	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 67位	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 71位	<i>gyrA</i> 81位	その他のQRDR変異部位	
FU47	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
FU71	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
FU75	TCC (Ser)	GAT (Asp)	<b>TAT (Tyr)</b>	No AA substitutions	2
FU5	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
SA3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	2
SA15	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	<b>AAT (Asn)</b> at position 438 in <i>parE</i> <sup>3)</sup>	2
SA31	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	1
FU95	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	<b>AAA (Lys)</b> at position 85 in <i>gyrA</i>	4
FU3	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	No AA substitutions	4
FU32	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GAC (Asp)</b> at position 408 in <i>gyrB</i> <sup>4)</sup>	10
FU115	<b>TAC (Tyr)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA35	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	2
SA68	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU40	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA16	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
SA25	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
NCTC 12191 <sup>T, 1)</sup>	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	11
FU74	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
FU92	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	4
FU97	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>TTT (Phe)</b> at position 95 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	4
FU129	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
SA34	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	10
SA61	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GTC (Val)</b> at position 57 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	2
FU28	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
TA4	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1
OT1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	1

1) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

2) *S. pneumoniae* R6 *parC* アミノ酸配列の 69、79、83、107 位に対応している。

3) *S. pneumoniae* R6 *parE* アミノ酸配列の 435 位に対応している。

4) *S. pneumoniae* R6 *gyrB* アミノ酸配列の 406 位に対応している。

非感受性株/感受性株で観察された塩基およびアミノ酸の置換は太字で下線を引いた。

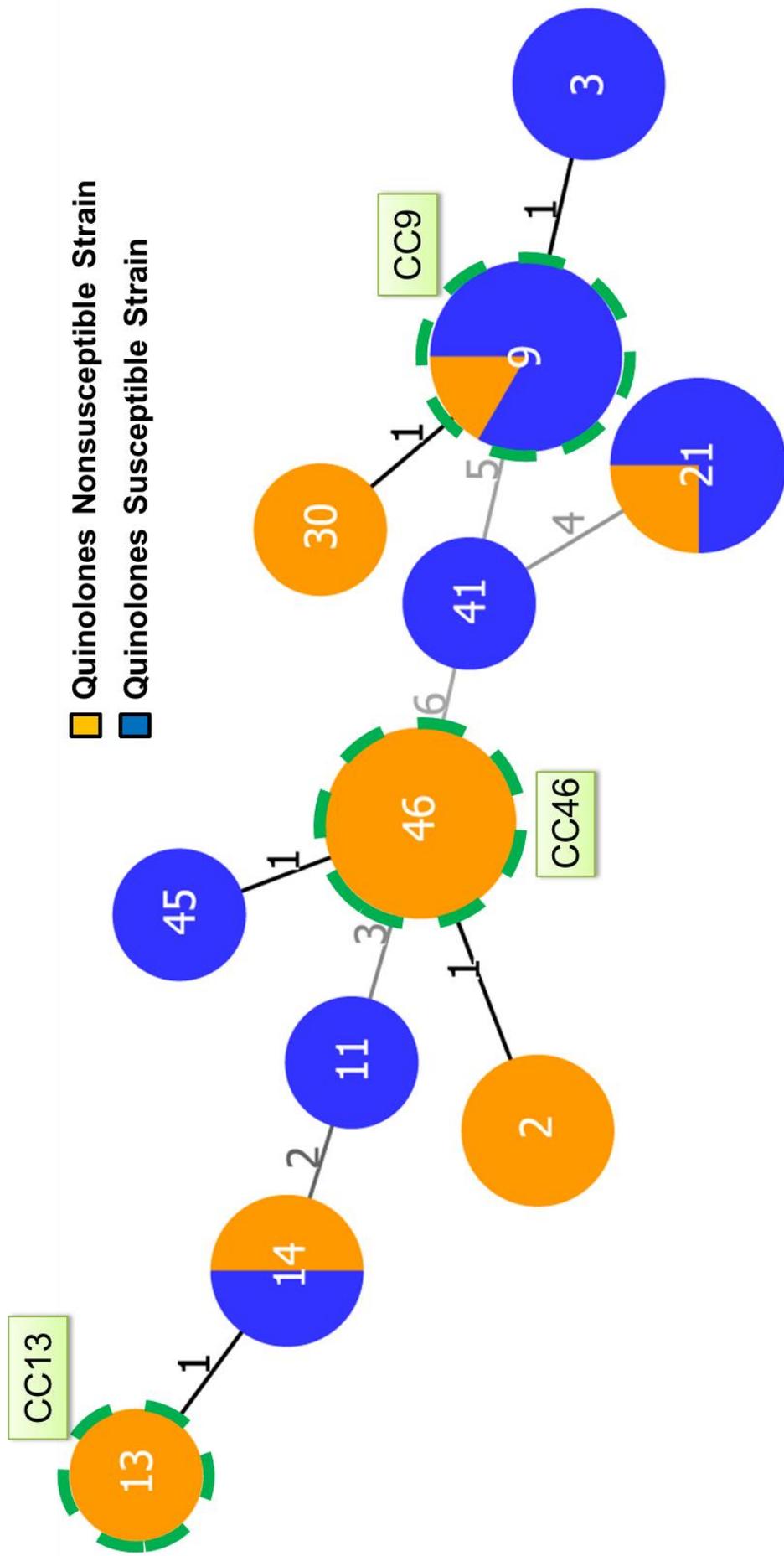


図 3. QRDR と ST の goeBURST 図

サークルの中の数字は ST を示し、サークル間の線近くの数字は、つながった 2 つの ST の間での異なる対立遺伝子座の数を示す。CC は点線のサークルおよびその近傍に示した。サークルの中のオレンジ色と青色は、それぞれキノロン系抗菌薬非感受性株と感受性株を表す。

### 1-3-6. 抗菌薬耐性遺伝子検出

QRDR に変異を保有する非感受性株については、TET 耐性遺伝子+ML 耐性遺伝子を複合して保有している株が ( $n = 7$ 、53.8%)と TET 耐性遺伝子のみを保有している株が ( $n = 3$ 、23.1%)含まれていた。複合型の耐性遺伝子が検出された株は、*erm* (B) + *tet* (O) ( $n = 5$ )、*erm* (B) + *tet* (M) + *tet* (O) ( $n = 1$ )、*erm* (B) + *mef* (A) + *tet* (O) ( $n = 1$ )であり、TET 耐性遺伝子のみは、*tet* (M) /*tet* (O) /*tet* (S) (各  $n = 1$ )であった。

一方で、変異のない株においては、*erm* (B)+*tet* (O)を含む TET 耐性遺伝子+ML 耐性遺伝子の複合型 ( $n = 1$ 、7.1%)、*tet* (O)を含む TET 耐性遺伝子のみ型 ( $n = 2$ 、14.3%)、*erm* (B)を含む ML 耐性遺伝子のみ型 ( $n = 1$ 、7.1%)が見られた。非感受性株と TET 耐性遺伝子検出 ( $p < 0.01$ )および ML 耐性遺伝子検出 ( $p < 0.05$ )との間には有意な相関関係が見られた。QRDR の変異と抗菌薬耐性遺伝子の保有に関して表 13 に示す。

表 13. QRDR の変異と ML・TET 耐性遺伝子の保有

分離株名	Codon(AA) at:				ML/TET耐性遺伝子の検出
	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 67位	<i>parC</i> <sup>2)</sup> 71位	<i>gyrA</i> 81位	その他のQRDR変異部位	
FU47	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>mef</i> (A), <i>tet</i> (O)
FU71	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU75	TCC (Ser)	GAT (Asp)	<b>TAT (Tyr)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU5	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA3	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA15	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	<b>AAT (Asn)</b> at position 438 in <i>parE</i> <sup>3)</sup>	None
SA31	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	<b>TTT (Phe)</b>	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)
FU95	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	<b>AAA (Lys)</b> at position 85 in <i>gyrA</i>	<i>tet</i> (M)
FU3	TCC (Ser)	<b>TAT (Tyr)</b>	TCT (Ser)	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU32	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GAC (Asp)</b> at position 408 in <i>gyrB</i> <sup>4)</sup>	<i>tet</i> (S)
FU115	<b>TAC (Tyr)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
SA35	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	<i>tet</i> (O)
SA68	<b>TTC (Phe)</b>	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
FU40	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	<i>tet</i> (O)
SA16	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
SA25	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
NCTC 12191 <sup>T, 1)</sup>	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
FU1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
FU74	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
FU92	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
FU97	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>TTT (Phe)</b> at position 95 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	<i>erm</i> (B)
FU129	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA34	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
SA61	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	<b>GTC (Val)</b> at position 57 in <i>parC</i> <sup>2)</sup>	None
FU28	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	<i>tet</i> (O)
TA4	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None
OT1	TCC (Ser)	GAT (Asp)	TCT (Ser)	No AA substitutions	None

1) コントロール株として *S. canis* NCTC 12191<sup>T</sup> を含めた。

2) *S. pneumoniae* R6 *parC* アミノ酸配列の 69、79、83、107 位に対応している。

3) *S. pneumoniae* R6 *parE* アミノ酸配列の 435 位に対応している。

4) *S. pneumoniae* R6 *gyrB* アミノ酸配列の 406 位に対応している。

非感受性株/感受性株で観察された塩基およびアミノ酸の置換は太字で下線を引いた。

#### 1-4. 考察

これまでの知見<sup>20</sup>と同様に 4 抗菌薬において、非感受性株 13 株の MIC の変動は一致していた。本研究において確認した非感受性株 13 株は、すべて非無菌的検体由来(開放膿、耳漏、尿)であった。しかしながら、無菌的検体由来(血液、脳脊髄液、関節液、胸水、腹水、深部閉塞性膿瘍)の非感受性株の出現は特に注意が必要であるといえる。本研究において 2015 年および 2017 年における非感受性株の検出割合はそれぞれ 7.4% (5/68)、6.8% (8/117)であった。そのため、国内のフルオロキノロン系抗菌薬非感受性株について、系統的にモニタリングを行い、さらには、非感受性株の特徴を明らかにする必要があるといえる。

本研究の非感受性株において確認した変異は、*gyrA* の Ser81/Glu85、*parC* の Ser67/Asp71 (*S. pneumoniae* R6 の 79/83 位に相当)、*parE* の Asp438 (*S. pneumoniae* R6 の 435 位に相当)、*gyrB* の Gly408 (*S. pneumoniae* R6 の 406 位に相当)の変異が確認された。中でも、一般的な変異は、Ser81 と Ser67/Asp71 であった<sup>22</sup>。しかし、Glu85、Asp438、Gly408 は、それぞれ 1 株しか発見されなかった。Glu85 と Asp438 の置換は、すでに耐性の *S. pyogenes*<sup>31</sup> や *S. pneumoniae*<sup>32</sup> で報告されている置換である。これらの 3 種類の変異が非感受性に寄与しているかどうかを明らかにするためには、すでに報告されているように<sup>22,33</sup>、本研究において対象とした菌株を使用して、*in vitro* の非感受性誘導実験を実施することで、今後これらの変異による非感受性誘導体化が引き起こされるかどうかを証明する必要がある。*parC* の Ser67/Asp71 および/または *gyrA* の Ser81 に生じた後天的な変異と、Etest®による 4 種のキノロン系抗菌薬の MIC の上昇を表 10 に示した。これらの結果より、旧世代の抗菌薬である NOR と同様に、

新しい世代の抗菌薬である MXF においても、後天的な変異が MIC の上昇に寄与している可能性が示唆された。さらには、非感受性株と SCM allele type2 および TET・ML の保有において有意な相関関係をみとめ、日本国内におけるクローンの広がりが示唆された。

他の研究者ら<sup>21,34</sup>も、*S. pyogenes* において特定の *emm* type12/6 と非感受性株について報告している。さらには、*emm* type 12/6/11/1 を保有する *S. pyogenes* の非感受性クローン ( $n = 30$ ) の 80% が *erm* (B) による ML 耐性と *tet* (M) による TET 耐性を示した<sup>35</sup>。Petrelli ら<sup>36</sup> は他の *emm* type (75/89/2) が存在していても、非感受性株 *S. pyogenes* の大部分が *emm* type6 に属しており、他の type が拡散する可能性も示唆している。したがって、今後は、伴侶動物より分離されたフルオロキノロン系抗菌薬非感受性犬レンサ球菌の拡散についてもモニタリングするべきである。

日本においてはエンロフロキサシンとオルビフロキサシンが伴侶動物診療において用いられている<sup>37</sup>。先述したとおり、伴侶動物に使用された 7.0% をフルオロキノロン系抗菌薬が占めていた。しかし、本研究の限界として、分離株と同時に宿主情報を得たもののその治療経過に関する情報 (特にフルオロキノロン系抗菌薬の使用に関して) を得ることができなかった。したがって、今後さらなる研究を実施する上では、獣医師より治療経過、特にフルオロキノロン系抗菌薬の使用に関する情報を得る必要があるといえる。

2019 年 8 月 5 日時点では、犬レンサ球菌の PubMLST 分離データベースに登録されている全 209 株において、LVX およびエンロフロキサシンのいずれに対しても耐性を持つ分離株は登録されていなかった。非感受性株において確認した ST46 は新規に最近 pubMLST データベースへ著者が登録した ST である。著者の知る限り、QRDR に点変異を持つフルオロキノロン系抗菌薬に耐性または非感受性の犬レンサ球菌の分離については、今回が初めての報告である。また、本研究において、耐性または非感受性とその関連因子についても述べた。

本研究により得られた研究成果は、日本の獣医師がレンサ球菌感染症を呈する伴侶動物を診察する際に有益であると考えられる。

## 1-5. 小括

本項では、人医療において重要な抗菌薬であるフルオロキノロン系抗菌薬に耐性/非感受性を示す犬レンサ球菌におけるその非感受性機構を明らかにすることを目的として研究を実施した。

対象株は、2015年と2017年に分離された犬レンサ球菌185株を選定した。選定方法は、レンサ球菌用パネル (MICroFAST シリーズ ストレプト MICroFAST 7J /MICroFAST シリーズ ストレプト MICroFAST 5J)による微量液体希釈法を用いた薬剤感受性試験の結果に基づいてLVXのMIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )が1以上を示す株および対照株を抽出した。さらに、NOR、CIP、MXFの薬剤ストリップを用いてEtest®による薬剤感受性試験についても実施した。Etest®は、微量液体希釈法の対象株と同一のものを対象株として実施した。このEtest®の判定基準として先行研究<sup>21</sup>と同様に、LVX > 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と CIP  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  のMICを呈する株を非感受性株として定義した。薬剤感受性試験ののち、フルオロキノロン系抗菌薬耐性機構の1つとして報告されている、4種類のDNA合成に関与する酵素をコードする遺伝子 *parC*、*parE*、*gyrA*、*gyrB* の塩基配列よりキノロン系抗菌薬耐性化に関与する領域であるQRDRのシーケンス解析を実施した。さらに、取得した塩基配列をアミノ酸配列へと変換し、アミノ酸変異を確認した。犬レンサ球菌が特異的に保有する病原因子であるSCM allele typing、ST (CC)、ML/TET 抗菌薬耐性遺伝子の保有との関連性についても解析した。

微量液体希釈法の結果より対象とした犬レンサ球菌は27株であった。同株についてEtest®を実施することにより、フルオロキノロン系抗菌薬に非感受性を示す株は13株であることを確認し、その中で、高MIC7株、低MIC6株を確認した。この非感受性株では、同属菌種 *S. pneumoniae*、*S. pyogenes*、*S. agalactiae* と同様に *parC* のQRDRにおけるSer67、Asp71や *gyrA* のQRDRにおけるSer81のアミノ酸変異の保有を確認

した。さらに、同非感受性株群では、SCM allele type 2 や ST46 (CC46)といった特定のクローンを多く認め、ML 耐性遺伝子、TET 耐性遺伝子の検出も確認した。

本項の研究結果より、伴侶動物より高頻度に分離される溶血性レンサ球菌においても、人における重要抗菌薬の耐性株が存在しており、耐性機構も人病原体と同様であったことから、伴侶動物医療においても、抗菌薬の慎重投与が重要であるとともに、適切な精度管理のなされた微生物検査(薬剤感受性試験等)を実施することも重要であると考えられた。

## 第2章 犬レンサ球菌に関する疫学解析基盤の構築

### 2. 新規 SCM の分子タイピングとその関連因子探索

#### 2-1. 序論

##### 犬レンサ球菌病原因子 Streptococcus canis M-like protein (SCM)

犬レンサ球菌の M-like protein (SCM)は、プラスミノゲンや免疫グロブリン G と結合し、抗食作用を促進する病原因子の一つである。<sup>38, 39, 40</sup>Timoney ら<sup>41</sup>は、病気または、健康な猫から分離された犬レンサ球菌に 4 つの SCM allele type が存在していることを報告し、病気の猫では彼らが定義した allele type 1 が優勢であることを示唆した。

2018 年の著者らの先行研究においては<sup>27</sup>、2015 年分離株 (48/68 = 70.6%)および 2017 年分離株 (97/117 = 82.9%)を用いて 9 つの SCM allele type を決定した。しかし、残りの 40 株においては、従来のプライマー<sup>38, 41</sup>を用いた PCR 法では増幅産物が得られずに、SCM allele type を決定することができなかった。

その後、2019 年に、Pinho ら<sup>26</sup>は、これまで、*scm* の増幅がみられなかった株についても共通して、*scm* を保有しており、同氏らが提案する、新規プライマー (図 4 に模式的に示す) を使用することで増幅が可能であると報告した。

本研究では、この新規プライマーを用いて、残りの分離株における *scm* の新規配列決定と、SCM allele type の分布を明らかにし、本邦における疫学解析情報の拡充を目的とした。また、これらの SCM allele type と ST/CC および薬剤耐性の表現型/遺伝子型との関連を示すことも目的とした。

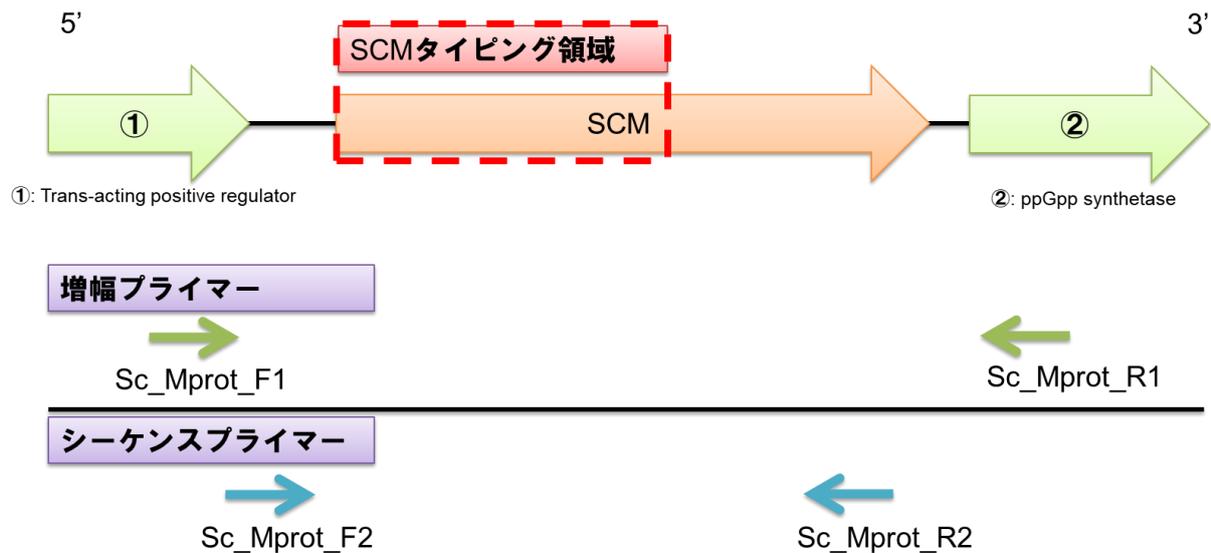


図 4. 提案された新規プライマーと増幅対象遺伝子の関係性模式図

## 2-2. 方法

### 2-2-1. 分離株の収集

*scm* の配列が未決定の 2015 年に分離された犬レンサ球菌 20 株および 2017 年に分離された犬レンサ球菌 20 株<sup>8, 16</sup>をサンリツセルコバ検査センターより動物種、性別、年齢、臨床材料、採取日、分離地域を含めて収集し、本研究に使用した。

これらの検体は、2015 年または 2017 年の 4 月から 5 月の間の 2 か月間に動物病院・クリニックを受診した、顕著に感染兆候の見られる伴侶動物より獣医師が分離したものである。各分離株を 5%ヒツジ血寒天プレートに接種し、5%CO<sub>2</sub>、35°Cで 24 時間培養した。β溶血を引き起こした灰白色のコロニーについて、セロアイデンストレプトキットを用いて、ラテックス凝集試験を行った。生化学的性状を観察するために、各分離株について、rapid ID 32 STREP API V4.0 (バイオメリュー・ジャパン株式会社、東京、日本)を実施した<sup>27</sup>。rapid ID 32 STREP API を用いてデータを採用する基準は、80%以上の確率で分離株が唯一の選択肢として同定されることとした。さらには、16S rRNA の塩基配列データ<sup>8, 16</sup>に基づいて、分離株を種レベルで同定した。

また、犬レンサ球菌特異的な遺伝子である CAMP 因子をコードする、*cfg* (gene coding for camp factor)を PCR 法で増幅し、同定の精度を検証した<sup>17</sup>。すでに、SCM

allele type、ST、薬剤耐性の表現型・遺伝子型が決定された分離株を対照集団として設定した。

また、対照として犬レンサ球菌の標準菌株である NCTC12191<sup>T</sup> および、犬の咬傷による人菌血症と咬傷を伴わない人菌血症より分離された犬レンサ球菌 (TA4/OT1 株) を含めた。<sup>17, 18</sup> これらの対照群は全ゲノム解析がすでに行われている<sup>42, 43</sup>。

## 2-2-2. *scm* 塩基配列の増幅と配列決定

1-2-2. 分離菌株の溶菌操作および保存と同様に本研究に採用した分離株のテンプレート DNA 抽出を行った。さらに、1-2-5. フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対する SCM typing の表 5 に記載した Sc\_Mprot\_F1/Sc\_Mprot\_R1 のプライマーセットを用いて PCR 法による *scm* の増幅を行ったところ、1700-2100bp の多様なアンプリコンサイズの増幅産物が得られた。<sup>26</sup> 反応条件、反応液組成は、表 5 と同様のものを用いた。Sc\_Mprot\_F1、Sc\_Mprot\_F2、Sc\_Mprot\_R2 の 3 つのプライマーの組み合わせで、PCR 増幅産物の精製後にシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した。バイオフィーム生産能力および細胞内侵入能力が高いまたは低い 7 株<sup>25</sup> (FU1/FU6/FU29/FU53/FU93/FU97/FU129) については、MiSeq (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) による全ゲノム配列解析を行い、特徴的な表現型につながる特定の配列を見つけ出した。

これらの株については、PCR 法ではなく、全ゲノム配列解析により得られた contig 配列データから目的の配列を抽出した。

### 2-2-3. SCM のアミノ酸 (AA)配列に基づく系統樹の構築

1-6-2. *scm* 塩基配列の増幅と配列決定で得た塩基配列をもとに、得たアミノ酸配列を取得した。その後、MEGA X (Version10.0.5)に搭載されている Neighbor-Joining 法<sup>44</sup>を用いて系統樹を作成した。簡単に説明すると、ブートストラップテスト(1000 回繰り返し実施)<sup>45</sup>で関連する分類群がまとまった後、進化の距離と同じ単位で枝の長さを設定し、縮尺に合わせて系統樹が描かれた。これらの距離は、Poisson correction method<sup>46</sup>を用いて算出した。

SCM の外部コントロールとして、*S. pyogenes* strain MGAS5005 M protein (Accession No. AAZ52337) と *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* American Type Culture Collection (ATCC) 12394 M protein (NC\_017567) を使用した。犬レンサ球菌 M-like protein SRUC072 (MH996676)、SRUC003 (MH996675)、322 (KU754286)、SRUC005 (MH996677)、SRUC034 (MH996678)、SRUC056 (MH996679)、FMV3662.06 (MH996674)、SRUC096 (MH996673)、SRUC095 (MH996672)、FMV1451.06 (MH996671)、FMVES5.02 (MH996670)、SRUC036 (MH996667)、SRUC097 (MH996668)、FMV2322.02 (MH996669)を内部コントロールとして使用した。

### 2-2-4. SCM allele の分類と分布

本研究において配列決定を行った新規 SCM allele type と内部コントロールの位置データに基づいて、構築された系統樹上で、SCM allele type の分類が行われた。2015 年、2017 年の両時期の犬レンサ球菌分離株におけるすべての新規 SCM allele type の分布を調べた。

### 2-2-5. MLST 解析

1-2-6. フルオロキノロン耐性/感受性犬レンサ球菌に対する MLST と同様に先行研究<sup>26</sup>で報告されている手法を用いて犬レンサ球菌に対する MLST 解析を実施した。さらに、解析結果をフリーソフトである、PHYLOViZ2.0<sup>29</sup>を使用して描画し、SCM

Group と ST/CC との関係性を解析した。contig 配列データがある 7 株では、ウェブベースのアプリケーション MLST version 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>, Center for Genomic Epidemiology)<sup>28</sup> を使用して MLST 解析を実施した。

#### 2-2-6. 薬剤耐性の表現型/遺伝子型決定

各種抗菌薬の MIC は、2015 年分離株は MICroFAST Panel Type 5J、2017 年分離株は MICroFAST Panel Type 7J を使用した微量液体希釈法によって判定した。判定基準は、CLSI の  $\beta$  溶血性レンサ球菌のガイドライン<sup>19)</sup> (CLSI document M100-S22) に従い、対象抗菌薬として、Penicillin G (PCG)、Ampicillin (ABPC)、Cefepime (CFPM)、Cefotaxime (CTX)、Ceftriaxone (CTRX)、Cefozopran (CZOP)、Meropenem (MEPM)、Tetracycline (TC)/Minocycline (MINO)、Erythromycin (EM)、Clarithromycin (CAM) /Azithromycin (AZM)、Clindamycin (CLDM)、Levofloxacin (LVX)、Vancomycin (VCM) および Chloramphenicol (CP) を測定した。MINO に対する感受性試験では、CLSI ガイドラインに基づき、TC のブレイクポイントを用いた。感受性試験のクオリティコントロールとして、2 種類の ATCC 株 (ATCC 29212 および ATCC 4961) を用いて管理した。全対象株において、ML 耐性遺伝子である *erm* (A)、*erm* (B)、*mef* (A) と、TET 耐性遺伝子である *tet* (M)、*tet* (O)、*tet* (K)、*tet* (L)、*tet* (S) を含む抗菌薬耐性遺伝子の保有を PCR 法により確認した<sup>8</sup>。これらの抗菌薬耐性遺伝子の配列は、PCR 法を用いて一部の陽性分離株から確認した。全ゲノム配列解析を行った 7 株では ResFinder version 3.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, Center for Genomic Epidemiology)<sup>30</sup> を用いて抗菌薬耐性遺伝子を検出した。

#### 2-2-7. 統計解析

Fisher's exact probability test (two-sided) を用いて、新規 SCM allele type の集団と既存 SCM allele type の集団間における薬剤耐性表現型/遺伝子型、ST/CC の保有を解析した。解析には Statcel4 を使用した。 $p$  値  $< 0.05$  の場合に統計的有意性を示した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 研究対象株と比較対照群の宿主情報

2015年と2017年に分離された犬レンサ球菌において *scm* 配列が決定されなかった株について表 14 に示す。

主に千葉県 ( $n = 15$ )、愛知県 ( $n = 5$ )、東京都 ( $n = 3$ )、新潟県 ( $n = 3$ )、埼玉県 ( $n = 2$ )、茨城県 ( $n = 2$ )、岐阜県 ( $n = 2$ )の各都県から収集された。これらの分離菌は、犬 ( $n = 30$ )および猫 ( $n = 10$ )の耳・鼻領域由来の検体 ( $n = 17$ )、開放膿由来の検体 ( $n = 14$ )、泌尿生殖器領域由来の検体 ( $n = 4$ )、子宮由来の検体 ( $n = 1$ )、その他 ( $n = 4$ )から検出された。宿主動物情報は、平均年齢 9.0 歳、年齢幅 1~18 歳、男女比、オス ( $n = 25$ )、メス ( $n = 15$ )であった。さらに、両期間中の残りの分離株 ( $n = 52$ )についても、*scm* を決定し、その動物背景を表 15 に示した。主に、東京都 ( $n = 20$ )、千葉県 ( $n = 12$ )、愛知県 ( $n = 3$ )、神奈川県 ( $n = 3$ )、埼玉県 ( $n = 3$ )、京都府 ( $n = 2$ )、岡山県 ( $n = 2$ )の各都府県から収集された。これらの分離株は、犬 ( $n = 47$ )および猫 ( $n = 5$ )の開放膿由来の検体 ( $n = 18$ )、耳・鼻領域由来の検体 ( $n = 17$ )、泌尿生殖器領域由来の検体 ( $n = 9$ )、眼領域由来の検体 ( $n = 3$ )、無菌的検体(血液および子宮由来の検体) ( $n = 2$ )、その他 ( $n = 3$ )から分離された。宿主動物情報は、平均年齢 10.5 歳、年齢幅 0~19 歳、男女比、オス ( $n = 36$ )、メス ( $n = 16$ )であった。

表 14. scm 配列非決定株の詳細

分離株名	宿主動物	性別/年齢(歳)	分離地域	分離年	臨床材料
FU1	猫	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
FU7	猫	オス/不明	愛知県	2017	開放膿
FU16	犬	オス/18	東京都	2017	鼻汁
FU17	犬	メス/不明	千葉県	2017	肛門腺液
FU25	犬	オス/9	千葉県	2017	耳漏
FU30	猫	オス/不明	千葉県	2017	鼻汁
FU32	犬	メス/不明	石川県	2017	耳漏
FU53	猫	メス/不明	千葉県	2017	鼻汁
FU58	犬	メス/不明	千葉県	2017	尿
FU65	犬	オス/7	群馬県	2017	膀胱洗浄液
FU66	犬	メス/14	千葉県	2017	開放膿
FU69	猫	オス/不明	埼玉県	2017	開放膿
FU78	犬	オス/7	千葉県	2017	耳漏
FU91	犬	オス/9	千葉県	2017	耳垢
FU93	犬	メス/9	千葉県	2017	開放膿
FU100	猫	メス/12	千葉県	2017	開放膿
FU113	猫	オス/不明	愛知県	2017	開放膿
FU116	犬	オス/不明	千葉県	2017	喉スワブ
FU121	猫	メス/1	岡山県	2017	子宮膿
FU129	犬	オス/9	新潟県	2017	開放膿
SA2	犬	メス/5	愛知県	2015	尿
SA6	犬	オス/11	奈良県	2015	耳漏
SA7	犬	メス/11	千葉県	2015	耳漏
SA10	犬	オス/14	茨城県	2015	耳漏
SA18	猫	オス/1	茨城県	2015	鼻汁
SA20	犬	オス/12	埼玉県	2015	皮膚
SA23	犬	オス/12	東京都	2015	耳漏
SA25	犬	オス/不明	千葉県	2015	耳垢
SA26	犬	メス/9	千葉県	2015	口腔内
SA27	犬	オス/4	新潟県	2015	開放膿
SA34	犬	オス/10	大阪府	2015	耳漏
SA36	犬	メス/8	北海道	2015	尿
SA38	犬	メス/9	岐阜県	2015	開放膿
SA41	犬	メス/15	兵庫県	2015	耳漏
SA42	犬	メス/10	愛知県	2015	開放膿
SA43	犬	オス/不明	東京都	2015	開放膿
SA57	犬	オス/8	新潟県	2015	開放膿
SA62	犬	オス/1	岐阜県	2015	開放膿
SA69	犬	オス/不明	福井県	2015	耳漏
SA71	猫	オス/9	愛知県	2015	耳漏

表 15. 対照群の詳細

分離株名	宿主動物	性別/年齢(歳)	分離地域	分離年	臨床材料
FU3	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
FU5	犬	メス/12	神奈川県	2017	尿
FU6	猫	オス/6	岡山県	2017	開放膿
FU14	犬	メス/11	東京都	2017	左角膜
FU15	犬	メス/15	鳥取県	2017	耳漏
FU24	犬	オス/9	東京都	2017	耳漏
FU28	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
FU29	犬	メス/6	神奈川県	2017	膿スワブ
FU31	猫	オス/19	東京都	2017	鼻汁
FU40	犬	オス/15	埼玉県	2017	皮下貯留液
FU47	犬	オス/不明	東京都	2017	開放膿
FU52	犬	メス/10	東京都	2017	開放膿
FU57	犬	メス/15	愛知県	2017	子宮内容物
FU63	犬	メス/13	千葉県	2017	開放膿
FU64	犬	オス/13	長崎県	2017	耳漏
FU67	犬	オス/不明	千葉県	2017	眼脂
FU71	犬	オス/6	千葉県	2017	耳漏
FU74	犬	オス/5	東京都	2017	開放膿
FU75	犬	オス/4	愛知県	2017	開放膿
FU77	犬	メス/不明	千葉県	2017	尿
FU90	犬	オス/9	千葉県	2017	耳垢
FU92	犬	オス/12	東京都	2017	尿
FU95	犬	メス/12	千葉県	2017	開放膿
FU97	犬	オス/11	岡山県	2017	開放膿
FU112	犬	オス/15	京都府	2017	尿
FU115	犬	メス/7	福井県	2017	開放膿
FU120	犬	オス/11	東京都	2017	傷口
FU128	犬	オス/11	千葉県	2017	開放膿
SA1	犬	オス/13	東京都	2015	耳漏
SA3	犬	オス/9	東京都	2015	耳垢
SA4	犬	オス/11	千葉県	2015	耳漏
SA5	猫	メス/7	千葉県	2015	血液
SA9	犬	メス/14	東京都	2015	眼脂
SA15	犬	オス/14	東京都	2015	耳漏
SA16	犬	オス/17	愛知県	2015	開放膿
SA17	犬	メス/13	東京都	2015	尿
SA19	犬	オス/6	東京都	2015	開放膿
SA22	猫	オス/0	栃木県	2015	耳漏
SA24	犬	オス/10	京都府	2015	開放膿
SA28	犬	オス/12	東京都	2015	開放膿
SA29	犬	オス/10	千葉県	2015	開放膿
SA31	犬	オス/13	奈良県	2015	尿
SA33	犬	オス/12	埼玉県	2015	耳漏
SA35	犬	オス/13	東京都	2015	開放膿
SA37	犬	メス/8	東京都	2015	耳漏
SA39	犬	オス/14	東京都	2015	尿
SA40	犬	オス/10	埼玉県	2015	皮膚
SA44	犬	メス/9	東京都	2015	鼻汁
SA56	犬	オス/不明	岐阜県	2015	耳漏
SA61	犬	メス/不明	東京都	2015	耳漏
SA68	猫	オス/7	沖縄県	2015	尿
SA70	犬	オス/4	神奈川県	2015	耳漏

### 2-3-2. 推定された SCM アミノ酸配列の系統樹と SCM allele の分類と分布

本研究では、Pinho ら<sup>26</sup>によって報告された新規プライマーを用いて *scm* の増幅および配列決定を行うことで、様々な配列サイズの計 40 個の *scm* 配列を決定した。

Neighbor-Joining 法で推定した SCM のアミノ酸配列の系統樹を図 5 に示す。1 株 (FU66) は SCM allele type 1 であった。一方で、残りの 39 株は、クラスター解析の結果より、新規 SCM allele type 10-15 であると示された。内部コントロールの SRUC072/SRUC003 は allele type 10 に、KU754286.1/SRUC005/SRUC034/SRUC056 は allele type 13 に、FMV3662.06/SRUC096/SRUC095 は allele type 14 に、FMVES5.02/SRUC036/SRUC097/FMV2322.02 は allele type 15 にそれぞれ属していた。本研究においては、新規の SCM allele type 10-15 を Group II SCM、既存の SCM allele type 1-9 を Group I SCM とした。2 つの調査期間における、分離株の Group II SCM を含む SCM allele type の分布を表 16 に示す。Group II SCM allele の保有率は 2015 年が 29.9%、2017 年が 16.2%であった。Group II SCM allele で最も多かったのは、両期間を通じて、SCM allele type 10 ( $n = 19$ 、10.3%)、SCM allele type 11 ( $n = 5$ 、2.7%)、SCM allele type 15 ( $n = 6$ 、3.3%)であった。

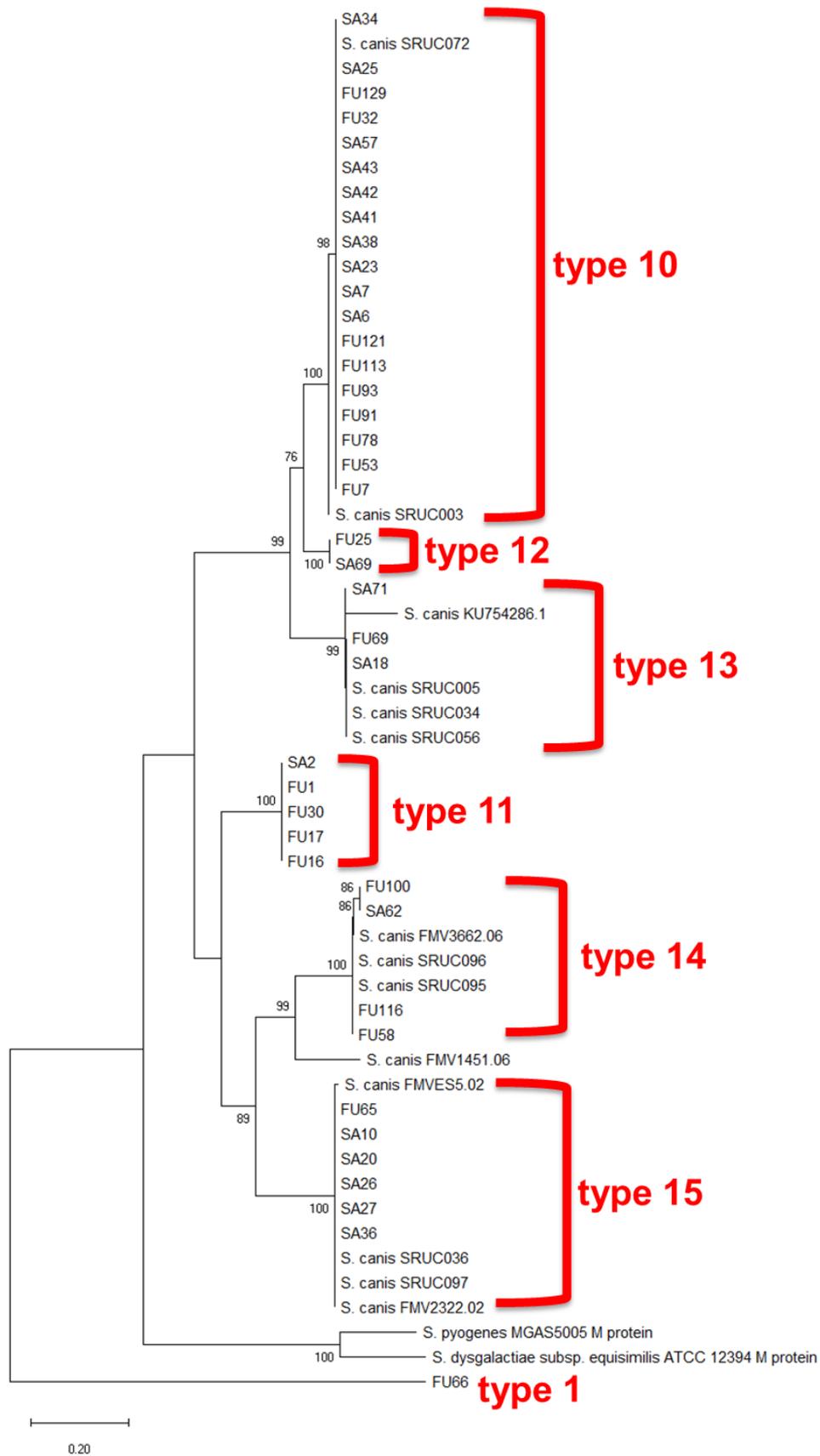


図 5. SCM のアミノ酸配列に基づく系統樹と各 type の分布

表 16. 犬レンサ球菌 SCM allele type の分布

SCM allele type	2015年分離株 分離数(%)	2015年に収集された分 分離数(%)	2017年に収集された 分離株数(%)
Type 1	SA16, SA68, SA59, SA58, SA56, 19 (28.4) SA46, SA29, SA13, SA9, SA4, SA1, SA11, SA44, SA64, SA17, SA31, SA22, SA19, SA53,	FU6, FU114, FU11, FU4, FU35, FU28, FU52, FU55, FU57, FU67, FU94, FU101, FU128, FU125, FU123, FU120, FU115, FU112, FU108, FU105, FU102, FU89, FU86, FU85, FU84, FU82, FU77, FU74, FU59, FU50, FU46, FU41, FU40, FU39, FU36, FU31, FU26, FU24, FU23, FU20, FU19, FU18, FU15, FU10, FU38, FU79, FU111, FU66	48 (41.0)
Type 2	SA3, SA8, SA73, SA74, SA15, 16 (23.9) SA60, SA33, SA35, SA28, SA67, SA70, SA51, SA48, SA49, SA61, SA24,	FU22, FU5, FU8, FU13, FU14, FU33, FU47, FU56, FU63, FU71, FU75, FU80, FU96, FU107, FU109, FU131	16 (13.7)
Type 3	SA12 1 (1.5)	FU64, FU72	2 (1.7)
Type 4	SA72, SA37, SA54, SA50, SA40, 6 (9.0) SA55	FU83, FU43, FU76, FU87, FU92, FU95, FU97, FU103, FU21, FU44, FU3, FU54, FU126, FU127, FU106	15 (12.8)
Type 5	None	FU29	1 (0.9)
Type 6	None	FU81, FU45, FU90	3 (2.6)
Type 7	None	FU70	1 (0.9)
Type 8	SA5, SA39, SA21, SA45, SA47 5 (7.5)	FU42, FU61, FU62, FU110, FU118, FU119, 8 (6.8) FU124, FU12	8 (6.8)
Type 9	None	FU48, FU51, FU49, FU104	4 (3.4)
<b>新規allele</b>			
Type 10	SA34, SA25, SA57, SA43, SA42, 10 (14.9) SA41, SA38, SA23, SA7, SA6	FU129, FU32, FU121, FU113, FU93, FU91, 9 (7.7) FU78, FU53, FU7	9 (7.7)
Type 11	SA2 1 (1.5)	FU1, FU30, FU17, FU16	4 (3.4)
Type 12	SA69 1 (1.5)	FU25	1 (0.9)
Type 13	SA71, SA18 2 (3.0)	FU69	1 (0.9)
Type 14	SA62 1 (1.5)	FU100, FU58, FU116	3 (2.6)
Type 15	SA10, SA20, SA26, SA27, SA36 5 (7.5)	FU65	1 (0.9)
Total	67 (100)		117 (100)

### 2-3-3. ST および CC

Group II SCM allele type の集団の中で ST47 ( $n = 2$ ) /ST49 ( $n = 2$ ) /ST50 ( $n = 2$ ) /ST51 ( $n = 3$ ) /ST53 ( $n = 1$ ) の新規 ST を同定した。Group I SCM allele の集団では ST44 ( $n = 1$ ) /ST45 ( $n = 1$ ) /ST46 ( $n = 10$ ) /ST48 ( $n = 4$ ) /ST52 ( $n = 1$ ) /ST54 ( $n = 1$ ) の新規 ST が存在した。Group II SCM allele 中の ST21 ( $n = 19$ ) /ST41 ( $n = 5$ ) の分布に加えて、CC1 ( $n = 6$ ) に分類される ST1 ( $n = 3$ )、ST50 及び ST53 を主に見出した。

一方、ST9 ( $n = 19$ )、ST3 ( $n = 4$ )、ST30 ( $n = 1$ ) は CC9 ( $n = 24$ ) に、ST46、ST2 ( $n = 4$ )、ST45 は CC46 ( $n = 15$ ) に、ST13 ( $n = 3$ )、ST14 ( $n = 3$ ) は CC13 ( $n = 6$ ) に、ST25 ( $n = 1$ )、ST54 は CC25 ( $n = 2$ ) に分類され、主に Group I SCM allele に存在した。

次の図 6 にすべての ST を含む goeBURST 図を示す。図 6 の通り、Group II SCM allele に属する ST は、Group I SCM allele に属する ST とは全く異なっていた。

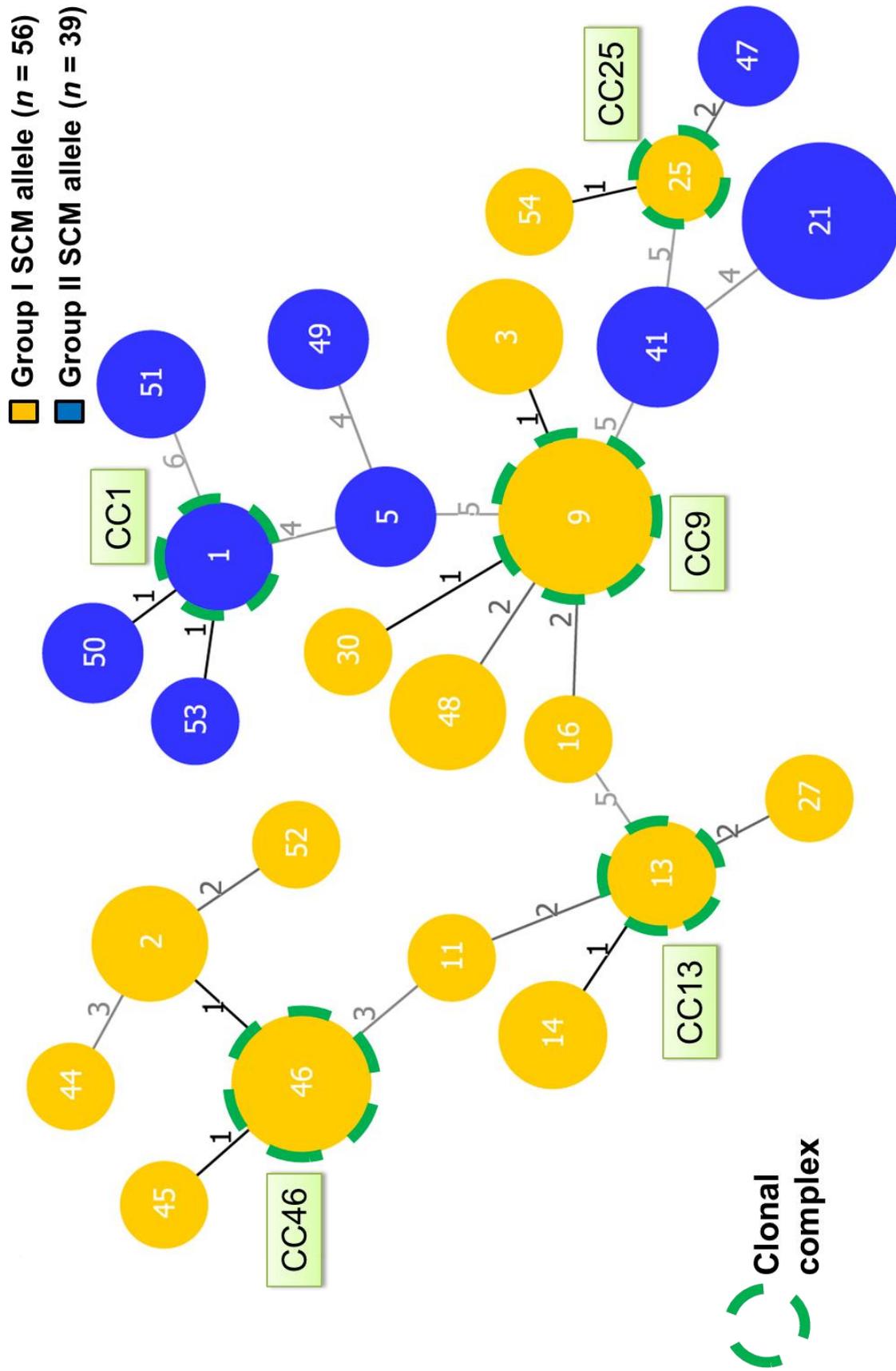


図 6. SCM allele type と ST/CC の関係性

サークルの中の数字は ST を示し、サークル間の線近くの数字は、つながった 2 つの ST の間での異なる対立遺伝子座の数を示す。CC は点線のサークルおよびその近傍に示した。サークルの中のアレンジ色と青色は、それぞれ Group I SCM allele、Group II SCM allele を表す。

#### 2-3-4. 薬剤耐性表現型/遺伝子型

両集団における薬剤耐性の表現型/遺伝子型に関するデータを表 17 および表 18 に示す。

表 17. *scm* 配列非決定株の薬剤耐性表現型/遺伝子型

分離株	薬剤耐性表現型	薬剤耐性遺伝子型
FU1	None	None
FU7	Minocycline	<i>tet</i> (O)
FU16	None	None
FU17	None	None
FU25	None	None
FU30	None	None
FU32	Minocycline	<i>tet</i> (S)
FU53	None	None
FU58	None	None
FU65	None	None
FU66	None	None
FU69	Minocycline	<i>tet</i> (M)
FU78	None	<i>tet</i> (O)
FU91	None	<i>tet</i> (S)
FU93	Minocycline	<i>tet</i> (S)
FU100	None	None
FU113	Minocycline	<i>tet</i> (O)
FU116	Minocycline	<i>tet</i> (M)
FU121	None	<i>tet</i> (O)
FU129	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA2	Tetracycline	None
SA6	None	<i>tet</i> (O)
SA7	Tetracycline	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S)
SA10	Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA18	None	None
SA20	Tetracycline, Erythromycin, Clarithromycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (M)
SA23	None	<i>tet</i> (O)
SA25	None	None
SA26	None	None
SA27	Tetracycline	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)
SA34	None	<i>tet</i> (O)
SA36	None	None
SA38	None	<i>tet</i> (O)
SA41	None	<i>tet</i> (O)
SA42	None	<i>tet</i> (O)
SA43	Tetracycline	<i>tet</i> (O)
SA57	None	<i>tet</i> (O)
SA62	None	None
SA69	None	None
SA71	None	None

表 18. 対照群の薬剤耐性表現型/遺伝子型

分離株	薬剤耐性表現型	薬剤耐性遺伝子型
FU3	Minocycline, Azithromycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU5	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU6	None	None
FU14	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU15	None	None
FU24	None	None
FU28	None	<i>tet</i> (O)
FU29	None	None
FU31	None	<i>tet</i> (O)
FU40	Minocycline	<i>tet</i> (O)
FU47	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>mef</i> (A), <i>tet</i> (O)
FU52	Minocycline	<i>tet</i> (O)
FU57	None	None
FU63	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU64	Minocycline	<i>tet</i> (M)
FU67	None	None
FU71	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU74	None	None
FU75	Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU77	None	None
FU90	Minocycline	<i>tet</i> (O)
FU92	None	None
FU95	Minocycline	<i>tet</i> (M)
FU97	Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B)
FU112	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
FU115	None	None
FU120	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
FU128	Minocycline	<i>mef</i> (A), <i>tet</i> (O)
SA1	Tetracycline	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
SA3	Tetracycline, Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA4	None	None
SA5	None	None
SA9	None	None
SA15	Tetracycline, Levofloxacin	None
SA16	None	None
SA17	None	None
SA19	None	None
SA22	Tetracycline, Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S)
SA24	None	None
SA28	None	None
SA29	None	None
SA31	Tetracycline, Levofloxacin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)
SA33	None	<i>tet</i> (O)
SA35	Tetracycline	<i>tet</i> (O)
SA37	None	<i>tet</i> (O)
SA39	None	<i>tet</i> (O)
SA40	None	None
SA44	None	None
SA56	None	None
SA61	None	None
SA68	None	None
SA70	None	<i>tet</i> (O)

Group II SCM と Group I SCM の SCM allele の各種抗菌薬のクラス (テトラサイクリン系・マクロライド系/リンコサミド系・フルオロキノロン系)における薬剤耐性率は、それぞれ 30.8%-7.7%-5.1%-0%、35.7%-21.4%-19.6%-12.5%であった。テトラサイクリン・マクロライド/リンコサミド系抗菌薬耐性遺伝子の保有率と非保有率は、Group II では 56.4%-7.7%-43.5%、Group I では 46.4%-26.8%-51.8%であった。マクロライド/リンコサミド系抗菌薬耐性遺伝子型の分布 (7.7% [Group II] vs. 26.8% [Group I]、 $p=0.0313$ )およびフルオロキノロン系抗菌薬の薬剤耐性率 (0% [Group II] vs. 12.5% [Group I]、 $p=0.0389$ )には、両集団間で有意差が認められた。

#### 2-4. 考察

2015年と2017年の異なる調査期間に、日本で分離された犬レンサ球菌において新たに6つの Group II SCM allele type (type 10-15)を確認した。

Group II において、流行している type は、SCM allele type 10、SCM allele type 11、SCM allele type 15 であった。その中で、初めて報告されたのは、SCM allele type 11 (SA2/FU1/FU30/FU17/FU16)と SCM allele type 12 (FU25/SA69)に関するものであった。これらの type は、最近報告された Pinho ら<sup>26</sup>のデータには含まれていなかった。今回の結果では、菌株が分離された地域ごとに、*scm* の配列とその SCM allele type が多様であることが示唆された。

Pinho ら<sup>26</sup>は SCM allele を Group II と I に分類したが、これらは本研究における Group II と Group I の SCM allele にそれぞれ対応していた。

Group II の SCM は、Group I のものと比較して、図7、図8に示すように開始部位の配列と後半部分の配列を除く中間領域に多様な配列を含んでいることを確認した。



Type 10	1	MTRKNTNKQYSLRKLKKGTA	SVAVALCVLGA	GLTINQTEVKAQGVGRFNEDQIREARDKVKYKEMFDDYTGATSK	YNTNGYK
Type 11	1	*****H*****	*****S*****	*****SS*****	*****LVEE*****
Type 12	1	*****H*****	*****S*****	*****EAS*****	*****VINELVTK*WK*****
Type 13	1	*****H*****	*****S*****	*****NNEA*****	*****DVIAELPAV*WK*****
Type 14	1	*****H*****	*****S*****	*****ASHHT*Q*SEDI	*****TKMMPILS
Type 15	1	*****H*****	*****S*****	*****AS*****	*****VGVSAI*DSA*****
Type 10		RKPTTELSNMQMYRDL	LAKKELSLF	LNDVLSKTI	DKKIEESDNANKQRI
Type 11		*****Q*****	*****	*****D**V**E**K**	*****DH**K*****
Type 12		*****	*****	*****NELKK*****	*****
Type 13		*****	*****	*****TKPEA*E*T*QV	*****CREV**
Type 14		*****	*****	*****LNKRI**N*	*****LQ**E*****
Type 15		*****	*****	*****	*****
Type 10		*****	*****	*****GQLKQEI	*****KDLQEA
Type 11		*****	*****	*****Q*GE*	*****K*SLQMS*
Type 12		*****	*****	*****K*ILE*	*****YVGG*
Type 13		*****	*****	*****TE*E*	*****YKQEE*
Type 14		*****	*****	*****AERE	*****LQELEVEYNQVEA
Type 15		*****	*****	*****	*****
Type 10		*****	*****	*****IAKLVND	*****DSDLKEAIE
Type 11		*****	*****	*****S*EG*	*****SLDNV*AS*
Type 12		*****	*****	*****	*****
Type 13		*****	*****	*****	*****
Type 14		*****	*****	*****	*****
Type 15		*****	*****	*****	*****
Type 10		*****	*****	*****SCKRE	*****LGDLEAKL
Type 11		*****	*****	*****ATEA*	*****AKTN*
Type 12		*****	*****	*****	*****
Type 13		*****	*****	*****	*****
Type 14		*****	*****	*****	*****
Type 15		*****	*****	*****	*****
Type 10		*****	*****	*****NAKKE	*****VDALAKLKA
Type 11		*****	*****	*****	*****
Type 12		*****	*****	*****	*****
Type 13		*****	*****	*****	*****
Type 14		*****	*****	*****	*****
Type 15		*****	*****	*****	*****

図 8. 新規 SCM allele の比較

灰色の部位は、SCM allele type 10 とは異なるアミノ酸配列を示す。  
 記号 (\*)は SCM allele type 10 と同じアミノ酸を示す。  
 記号 (h)は、削除または挿入によるギャップを示す。

本研究では、ST と Group II SCM allele の間に相関関係が見られた ( $n = 39$ )。その結果、Group II SCM allele の中に、10 種類の異なる ST (主に、ST1/ST5/ST21/ST41/ST47/ST49/ST50/ST51) を発見した。ST1 は SCM allele type 15 単独に、ST5 は SCM allele type 14 単独に、ST21 は SCM allele type 10 単独に、ST41 は SCM allele type 11 単独に、ST47 は SCM allele type 12 単独に、ST49 は SCM allele type 14 単独に、ST50 は SCM allele type 15 単独に、ST51 は SCM allele type 13 単独にそれぞれ属していた。さらに、Comparing Partitions のウェブサイト (<https://www.comparingpartitions.info>) を用いて、adjusted Wallace (AW) 係数と 95% 信頼区間 (CI) を算出した。ST は SCM allele type の良い予測因子であることが示された ( $AW_{ST \rightarrow SCM\ allele}$  および 95% CI、1.000 および 1.000–1.000)。さらに、SCM allele type は ST の良好な予測因子であった ( $AW_{SCM\ allele \rightarrow ST}$  および 95% CI、0.902 および 0.867–0.936)。ただし、allele 15 は ST1、ST50、ST53 に属し、allele 14 は ST5、ST49 に属していた。一方で、ST と Group I/II SCM allele との相関関係を評価した。ST は SCM allele の良い予測因子であったが ( $AW_{ST \rightarrow SCM\ allele}$  および 95% CI、0.958 および 0.918–0.998)、Group I/II SCM allele は ST の悪い予測因子であった ( $AW_{SCM\ allele \rightarrow ST}$  および 95% CI、0.485 および 0.358–0.612)。SCM allele type と ST との関係は、後者の知見と一致したものが、先行研究<sup>26</sup>で立証されている。これについては、より多くの分離株を用いて、その関係を調べる必要があると考えられる。

本研究では、Group II と Group I の間で、ML の抗菌薬耐性遺伝子型の分布 (7.7% vs. 25.0%) とフルオロキノロン系抗菌薬の薬剤耐性率 (0% vs. 12.5%) に有意な差が認められた。さらに、マクロライド/リンコサミド系の抗菌薬耐性遺伝子型の分布 (50.0% vs. 13.6%) や、マクロライド系 (50.0% vs. 9.9%)、リンコサミド系 (50.0% vs. 7.4%)、フルオロキノロン系 (42.9% vs. 1.2%) の薬剤耐性率についても、SCM allele type 2 とそれ以外で違いが見られた。そのうえ、TET 耐性遺伝子型 (100% vs. 44.7%)、ML 耐性遺伝子型 (80% vs. 11.8%)、抗菌薬耐性遺伝子型が非検出 (0% vs. 54.1%) の分布や、テトラサイクリン系 (70% vs. 29.4%)、マクロライド系 (70% vs.

9.4%)、リンコサミド系 (70% vs. 7.1%)、フルオロキノロン系 (60% vs. 1.2%)の薬剤耐性率についても、ST46 とそれ以外で違いが見られた。

また、テトラサイクリンの抗菌薬耐性遺伝子型の分布 (5.3% vs. 61.8%)と抗菌薬耐性遺伝子型がない場合 (94.7% vs. 36.8%)、テトラサイクリンの薬剤耐性率 (5.3% vs. 40.8%)についても、ST9 とその他で違いが見られた。

本邦の犬レンサ球菌分離株における SCM allele type/ST と薬剤耐性遺伝子型/表現型に関する記述は初めてである。Ardanuy ら<sup>47</sup>は、*S. pyogenes* 分離株のマクロライド耐性率のピークは、*emm11/ST403* および *emm28/ST52* クローンの拡散による薬剤耐性表現型の増加と関連していたが、2007-2008 年にはマクロライド耐性率が大幅に低下したと報告している。そのため、薬剤耐性の遺伝子型・表現型の今後の変化を、SCM allele type の変化と合わせて注目していく必要がある。

一方で、この研究には限界があった。Group I の SCM allele は、抗食細胞活性を促進し<sup>39</sup>、*S. pyogenes* の M タンパク質の同じ機能と一致している<sup>48</sup>。しかし、Group II の SCM allele が Group I の対立遺伝子と同様の機能を持つかどうかはまだ不明である。SCM allele の多様性が、抗ファゴサイトーシスなどの機能にどのように影響するかを評価することが重要である。したがって、Group I/II の SCM allele type を持つ分離株を用いて *in vivo / in vitro* での実験を行い、これらの機能を検証する必要がある。

結論として、本項の研究では、Group II SCM の配列と、病気の伴侶動物の間でのこれらの分布、および SCM allele type と ST の関連を記載している。著者の知る限り、日本の動物における SCM allele type とその微生物学的因子 (STs/CCs および薬剤耐性表現型/遺伝子型)に関する初めての疫学的報告である。著者は、SCM の流行と多様性の変動について順次分析・監視していく必要があると考えている。

## 2-5. 小括

本項では、先行研究<sup>26</sup>により報告されたプライマーセットを用いることで、これまでに著者が決定できていなかった SCM の配列を決定できたことから、その typing およ

び疫学解析因子(ST/CC、薬剤耐性表現型/遺伝子型)との関係性を解析した。

対象とした犬レンサ球菌は、本邦において感染兆候の見られる伴侶動物より分離された株のうち、著者の先行研究<sup>27</sup>においてSCMの配列およびtypeの決定を行うことができなかった40株および比較対照群52株を選定した。SCM allele typeが決定できていなかった40株について新規プライマーセットを用いたPCRおよびシーケンス解析により取得した塩基配列をアミノ酸配列へ変換し、系統解析を実施したところ、既存のSCM allele type 1 ( $n = 1$ )および新規SCM allele type 10 – 15 の6 type ( $n = 39$ )を確認した。さらに、SCM allele type 11 および 12 は先行研究<sup>26</sup>において報告されておらず新規SCM allele typeであった。この結果は、SCMが分離地域ごとに多様であることを示唆していると思われる。

本研究においては、既存のSCM allele typeをGroup I、新規SCM allele typeをGroup IIとしたが、この点は先行研究<sup>26</sup>と一致していた。さらに、Group Iの株が属するSTとGroup IIの株が属するSTは完全に異なっていることを確認した。一方で、Group IとIIにおいてMLの薬剤耐性遺伝子型の分布、フルオロキノロン系抗菌薬の薬剤耐性率に有意な差を認めた。

本項の課題として、Group IおよびIIのSCM多様性が犬レンサ球菌の病原性に与える影響までを評価できていない点にある。この点については、*in vivo*、*in vitro*の実験系により各SCM allele typeとその病原性、定着性等を評価する必要があると考えられる。

本項の新規性として、(1)本邦の伴侶動物より分離された犬レンサ球菌において新規SCM配列を保有していることが確認でき、本邦に分布しているクローンの地域特性が示唆された。(2)日本の伴侶動物より分離された犬レンサ球菌のSCM allele typeと疫学解析因子の関係性に関する初の報告、であることがあげられる。

犬レンサ球菌の疫学解析に関する情報は少なく、本項において示唆されたSCM allele typeの地域特異性や疫学解析因子(ST/CC)との関係性は、将来、日本の医師および獣医師らが犬レンサ球菌感染症を考えるうえで有益な情報になり得ると考えられる。

## 第3章 犬レンサ球菌の感染制御に向けた基礎的検討

### 3. 犬レンサ球菌のバイオフィルム生産能解析

#### 3-1. 序論

##### バイオフィルムとは

バイオフィルムとは、多糖類、タンパク質、DNA などからなる自己産生されたマトリックスに囲まれた細菌細胞の集合体と定義される<sup>49</sup>。いくつかの細菌にとって、バイオフィルム生産能力 (BPA) は、宿主へのコロニー形成と感染の進行に関連する重要な病原性決定因子である<sup>49,50</sup>。BPA は、厳しい環境下 (抗菌薬、極端な pH、免疫細胞など) で保護機能を発揮し、その結果、持続的な感染や重度のコロニー形成の原因となる細菌集団を維持することができる<sup>51,52</sup>。また、バイオフィルム内で生じる特定の環境条件は、表現型や遺伝子型の変異を促進することで病原性を高める選択圧となることもある<sup>52,53</sup>。

本項の研究においては、病原性・定着性を高めうる BPA の有無・強弱を明確にし、犬レンサ球菌のバイオフィルム関連感染を制御するための基礎的情報を得ることを目的とした。さらに、著者の知る限り、複数の伴侶動物由来犬レンサ球菌の BPA を評価した報告はこれが初めてである。(2020年12月12日現在)

#### 3-2. 方法

##### 3-2-1. 分離株の収集と選択

著者らの研究成果<sup>8,16</sup>として、2015年には68株、2017年には117株の犬レンサ球菌が限られた宿主情報 (動物種、性別、年齢、臨床材料、収集日、分離地域) とともに分離された。選択された菌株が感染症の原因微生物であるかどうかは不明であった。

著者は、16S rRNA の塩基配列データと、犬レンサ球菌特異的遺伝子である CAMP-factor をコードする遺伝子である *cfg* を PCR 法により増幅することで種レベルでの菌種を同定した。菌株は、各年度 40 株を無作為に選択した。陰性対照群として、全ゲノム配列データを保有するウシ由来の犬レンサ球菌の NCTC12191<sup>T</sup> を含めた。

また、人の菌血症症例から全ゲノム配列データ<sup>42, 43</sup>を有する2株 (TA4/OT1)と、犬の菌血症症例から全ゲノム配列データ<sup>54</sup>を有する1株 (FU149)を侵襲株として選択した。

### 3-2-2. バイオフィルム生産能の測定

保存されている菌株を5%ヒツジ血寒天平板に接種し、37°Cで24時間培養した。その後、5%ヒツジ血液寒天平板上に発育した1つのコロニーを5 mLのBrain Heart Infusion (BHI)液体培地に移し、37°Cで14時間培養した。培養した菌液について、犬レンサ球菌の増殖曲線に基づき、1つのウェルで $1 \times 10^5$  CFU/mLになるように、菌を含まないBHI液体培地で希釈し100  $\mu$ L/ウェルずつ滅菌済みの平底96ウェルポリスチレンマイクロタイタープレート (Greiner bio-one, Tokyo, Japan)の10ウェルに分注し、37°Cで48時間培養した。同じプレートで、BHIブロスのみを含む10ウェルをブランクコントロール、同ウェル数の*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12394を実験のクオリティコントロールとした。48時間の静置培養ののち、ウェル内に触れないように上清を除去した。その後、ウェル中に付着していない菌体を滅菌したカルシウムマグネシウム非含有 Phosphate buffered salts [PBS (-)] を用いてウェルの洗浄を4回行った。その後、プレートを60°Cで1時間乾燥させた。その後、0.1%クリスタルバイオレットを各ウェルに100  $\mu$ Lずつ加えて室温で2分間静置することで、犬レンサ球菌が生産したバイオフィルムを染色した。その後、ブランクコントロールの染色がなくなるまで、MiliQを使用してウェルを穏やかに洗浄した。洗浄後、脱染色液 (7.5%メタノールと10%酢酸を含むMiliQ)100  $\mu$ Lを各ウェルに加えた。この溶液の545 nmの波長の吸光度を、マイクロプレートリーダー (ChroMate-4300, Awareness Technology, Inc, FL, USA)を用いて測定した。各菌株の10ウェルの吸光度値を、NCTC 12191<sup>T</sup> (陰性対照群)の10ウェルの吸光度値と比較して測定した。データは倍数値 (1つの株の10ウェルの平均値/NCTC12191<sup>T</sup>の平均値)±標準偏差で表された。NCTC 12191<sup>T</sup>の2倍以上の値を示す株を biofilm producer、2倍未満の株を non-producer と定義した<sup>55</sup>。biofilm producer と non-producer の染色溶解結果の参考画像を図9に示す。

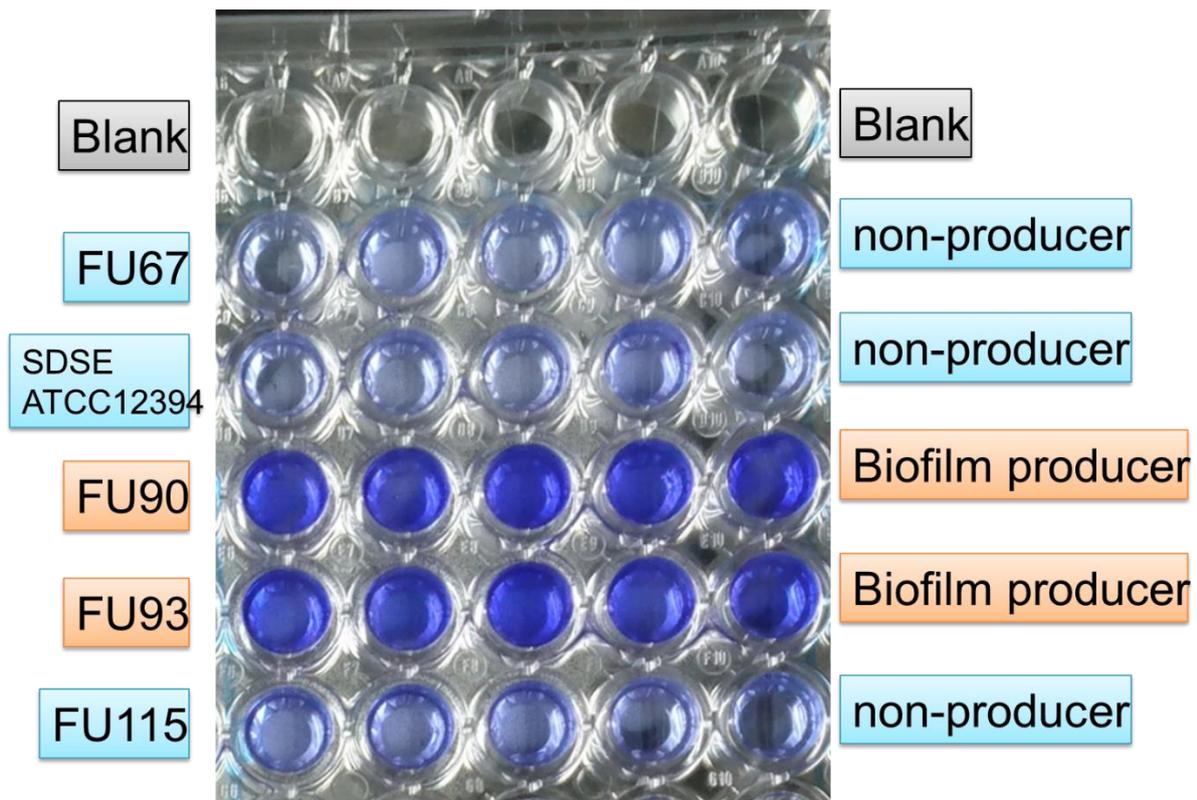


図 9. biofilm producer と non-producer の染色溶解結果

### 3-2-3. SCM allele タイピング

Sc\_Mprot\_F1/Sc\_Mprot\_R1<sup>26</sup> と M-SCAF2/M-SCAR3 または M-SCAF2/M-SCAR4<sup>41,27</sup> のプライマーセットを用いて PCR 法による *scm* の増幅を行った。精製した PCR 産物をシーケンスし塩基配列を取得した。取得した塩基配列をアミノ酸配列へ変換し、Neighbor-Joining 法<sup>44</sup>を用いて系統樹を作成した。allele typing は、可変および保存されたアミノ酸配列が作り出す、系統樹上の配置に基づいて行われた。それぞれ SCM allele type1-9 を Group I、SCM allele10-15 を Group II とした。さらに、全ゲノム配列解析データ<sup>27,25</sup>を持つ 10 株 (FU1/FU6/FU29/FU53/FU93/FU97/FU129/FU149/TA4/OT1) についても本研究の対象とした。

### 3-2-4. MLST 解析

報告されているプロトコルに従って、対象としたすべての菌株で MLST を実施した。<sup>26,56</sup> ハウスキーピング遺伝子が 1 つだけ異なる、単一遺伝子座バリエーションを CC

として定義した。さらに、解析結果をフリーソフトである、PHYLOViZ2.0<sup>29</sup> を使用して描画し、biofilm producer/non-producer と ST/CC との関係性を解析した。全ゲノム配列解析データを保有する 10 株<sup>27, 25</sup> については MLST version 2.0(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)<sup>28</sup> を用いて解析した。

### 3-2-5. 薬剤耐性の表現型および遺伝子型

いくつかの抗菌薬 (PCG、ABPC、CFPM、CTX、CTRX、CZOP、MEPM、TC/MINO、EM、CAM/AZM、CLDM、LVX、VCM および CP) の MIC は、CLSI の  $\beta$  溶血性レンサ球菌に関するガイドライン (CLSI Document M100-S22/M100-S25) に従って、微量液体希釈法を用いて判定した。MINO に対する感受性試験では、ガイドラインに沿って TC のブレイクポイントを使用した。すべての菌株における ML 耐性遺伝子 *erm* (A)、*erm* (B)、*mef* (A) および TET 耐性遺伝子 *tet* (M)、*tet* (O)、*tet* (K)、*tet* (L)、*tet* (S) の抗菌薬耐性遺伝子の有無を PCR 法で測定した<sup>8</sup>。ゲノム配列解析データを保有する 10 株<sup>27, 25</sup> については ResFinder version 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)<sup>30</sup> を用いて検出を実施した。

### 3-2-6. 病原性関連遺伝子 (VAG) プロファイル

犬レンサ球菌のアノテーションデータ (Identical Protein Groups、National Center for Biotechnology Information) に基づき、*gbp* (gene coding for glucan binding protein)、*apl* (gene coding for pilus ancillary protein 1)、*fp1* (gene coding for fimbrial protein)、*brp* (gene coding for biofilm regulatory protein) の PCR プライマーセットを設計した。設計したプライマーの配列および反応条件、反応液組成を以下の表 19 に示す。

表 19. VAG 増幅用プライマー配列、反応液組成、増幅条件

Target genes (encoding protein)	Primers	Sequence (5'→3')
<i>apl</i> (Pilus ancillary protein 1)	<i>apl</i> -F1	GAAGGTTTGCCAACTGGGTA
	<i>apl</i> -R1	ACTAGCGAAAAGCCAAACGA
<i>fpl</i> (Fimbrial protein)	<i>fpl</i> -F2	AACAGTTGGCGCAGAAGTTT
	<i>fpl</i> -R1	GAGGGTCTGGATTTCGATCA
<i>brp</i> (Biofilm regulatory protein A)	<i>brp</i> -F1	TGGTGCTGAAGCCAAACTGA
	<i>brp</i> -R1	GCTGGAACAACAGGAGTCGT
<i>gbp</i> (Glucan binding protein)	<i>gbp</i> F	AACGGACGGAAAATCCAGCT
	<i>gbp</i> R	TCCGCTACAGCTTGTTTCGTT

Ex-Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa)

10x Ex-Taq Buffer	5 µL
10mM dNTP mix	4 µL
primer F (5 mM)	4 µL
primer R (5 mM)	4 µL
Template	2 µL (<200 ng)
Ex-Taq HS DNA polymerase	0.25 µL
MiliQ	30.75 µL
Total volume	50 µL

For <i>apl</i> amplification		
94°C	3 min	
94°C	1 min	30 cycles
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
For <i>fpl</i> & <i>brp</i> amplification		
94°C	3 min	
94°C	1 min	30 cycles
64°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
For <i>gbp</i> amplification		
94°C	1 min	
95°C	30 sec	35 cycles
62°C	30 sec	
72°C	50 sec	
72°C	5 min	

いくつかの陽性株から得られたこれらの標的遺伝子の増幅産物の配列は、シーケンス解析によって確認された。

### 3-2-7. 統計解析

BPA 集団と SCM allele type、ST/CC、薬剤耐性表現型/遺伝子型、VAG プロファイルとの間のカテゴリー変数の有意差を、Fisher's exact probability test (two-sided)を用いて解析した。連続変数は、F 検定に続いて、Student's/Welch's t 検定を用いて比較した。解析には Statcel4 を使用した。統計的有意差は  $p < 0.05$  とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 犬レンサ球菌の宿主情報

本研究に登録された動物由来の犬レンサ球菌 81 株とその宿主情報を表 20 に示す。

NCTC 12191<sup>T</sup> と人由来 2 株(TA4/OT1)を除き、収集した都道府県は、千葉県 ( $n=25$ )、東京都 ( $n=19$ )、愛知県 ( $n=6$ )、埼玉県 ( $n=4$ )であった。岐阜県/岡山県/新潟県 (各  $n=3$ )、福井県/茨城県/神奈川県/京都府 (各  $n=2$ )、群馬県/北海道/兵庫県/石川県/奈良県/長崎県/沖縄県/大阪府/栃木県/鳥取県 (各  $n=1$ )であった。これらの菌株は、犬 ( $n=66$ ) および猫 ( $n=15$ )から採取した耳・鼻・喉領域由来の検体 ( $n=33$ )、開放膿・創傷・皮膚領域由来の検体 ( $n=29$ )、泌尿生殖器領域由来の検体 ( $n=11$ )、子宮・血液由来の無菌的検体 ( $n=4$ )、眼領域由来の検体 ( $n=3$ )、肛門腺液 ( $n=1$ )から検出された。宿主動物の情報は、平均年齢 9.5 歳、年齢幅 0~19 歳、性別はオス ( $n=52$ )、メス ( $n=29$ )であった。

表 20. バイオフィルム生産能測定対象犬レンサ球菌背景因子

分離株名	宿主動物	性別/年齢(歳)	分離地域	分離年	臨床材料	分離株名	宿主動物	性別/年齢(歳)	分離地域	分離年	臨床材料
SA1	犬	オス/13	東京都	2015	耳漏	FU1	猫	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
SA2	犬	メス/5	愛知県	2015	尿	FU3	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
SA4	犬	オス/11	千葉県	2015	耳漏	FU6	猫	オス/6	千葉県	2017	開放膿
SA5	猫	メス/7	千葉県	2015	血液	FU7	猫	オス/不明	岡山県	2017	開放膿
SA6	犬	オス/11	奈良県	2015	耳漏	FU14	犬	メス/11	愛知県	2017	開放膿
SA7	犬	メス/11	千葉県	2015	耳漏	FU15	犬	メス/15	東京都	2017	左角膜
SA9	犬	メス/14	東京都	2015	眼脂	FU16	犬	オス/18	鳥取県	2017	耳漏
SA10	犬	オス/14	茨城県	2015	耳漏	FU17	犬	メス/不明	東京都	2017	鼻汁
SA17	犬	メス/13	東京都	2015	尿	FU24	犬	オス/9	千葉県	2017	肛門腺液
SA18	猫	オス/1	茨城県	2015	鼻汁	FU25	犬	オス/9	東京都	2017	耳漏
SA19	犬	オス/6	東京都	2015	開放膿	FU29	犬	メス/6	千葉県	2017	耳漏
SA20	犬	オス/12	埼玉県	2015	皮膚	FU30	犬	オス/不明	神奈川県	2017	膿スロブ
SA22	猫	オス/0	栃木県	2015	耳漏	FU31	猫	オス/19	千葉県	2017	鼻汁
SA23	犬	オス/12	東京都	2015	耳漏	FU32	犬	メス/不明	東京都	2017	鼻汁
SA24	犬	オス/10	京都府	2015	開放膿	FU52	犬	メス/10	石川県	2017	開放膿
SA25	犬	オス/不明	千葉県	2015	耳垢	FU53	猫	メス/不明	東京都	2017	開放膿
SA26	犬	メス/9	千葉県	2015	口腔内	FU57	犬	メス/15	千葉県	2017	鼻汁
SA27	犬	オス/4	新潟県	2015	開放膿	FU58	犬	メス/不明	愛知県	2017	子宮内容物
SA28	犬	オス/12	東京都	2015	開放膿	FU63	犬	メス/13	千葉県	2017	尿
SA29	犬	オス/10	千葉県	2015	開放膿	FU64	犬	オス/13	千葉県	2017	開放膿
SA33	犬	オス/12	埼玉県	2015	耳漏	FU65	犬	オス/7	長崎県	2017	耳漏
SA34	犬	オス/10	大阪府	2015	耳漏	FU66	犬	メス/14	群馬県	2017	膀胱洗浄液
SA35	犬	オス/13	東京都	2015	開放膿	FU67	犬	オス/不明	千葉県	2017	開放膿
SA36	犬	メス/8	北海道	2015	尿	FU69	猫	オス/不明	千葉県	2017	眼脂
SA37	犬	メス/8	東京都	2015	耳漏	FU77	犬	メス/不明	埼玉県	2017	開放膿
SA38	犬	メス/9	岐阜県	2015	開放膿	FU78	犬	オス/7	千葉県	2017	尿
SA39	犬	オス/14	東京都	2015	尿	FU90	犬	オス/9	千葉県	2017	耳漏
SA40	犬	オス/10	埼玉県	2015	皮膚	FU91	犬	オス/9	千葉県	2017	耳垢
SA41	犬	メス/15	兵庫県	2015	耳漏	FU92	犬	オス/12	千葉県	2017	耳垢
SA42	犬	メス/10	愛知県	2015	開放膿	FU93	犬	メス/9	東京都	2017	耳垢
SA43	犬	オス/不明	東京都	2015	開放膿	FU97	犬	オス/11	千葉県	2017	耳垢
SA44	犬	メス/9	東京都	2015	鼻汁	FU100	猫	メス/12	千葉県	2017	尿
SA56	犬	オス/不明	岐阜県	2015	耳漏	FU112	犬	オス/15	千葉県	2017	開放膿
SA57	犬	オス/8	新潟県	2015	開放膿	FU113	猫	オス/不明	京都府	2017	開放膿
SA61	犬	メス/不明	東京都	2015	耳漏	FU115	犬	メス/7	愛知県	2017	開放膿
SA62	犬	オス/1	岐阜県	2015	開放膿	FU116	犬	オス/不明	福井県	2017	開放膿
SA68	猫	オス/7	沖縄県	2015	尿	FU120	犬	オス/11	千葉県	2017	喉スロブ
SA69	犬	オス/不明	福井県	2015	耳漏	FU121	猫	メス/1	東京都	2017	傷口
SA70	犬	オス/4	神奈川県	2015	耳漏	FU128	犬	オス/11	岡山県	2017	子宮膿
SA71	猫	オス/9	愛知県	2015	耳漏	FU129	犬	オス/9	千葉県	2017	開放膿
						FU149	犬	オス/11	新潟県	2017	開放膿
									千葉	2019	血液

### 3-3-2. バイオフィルム生産能 (BPA)

2015年と2017/2019年の菌株のBPAを図10、図11にそれぞれ菌株ごとに示す。2015年の菌株のうち、biofilm producerは13株、non-producerは27株であった。2017/2019年の株のうち、biofilm producerは22株、non-producerとは19株を確認した。TA4とOT1はnon-producerに属していた。BPAにおいて、2015年と2017/2019年で有意な差があった( $p < 0.01$ )。

表21は、さまざまな臨床材料によるbiofilm producerとnon-producerの分布率を示したものである。その結果、biofilm producerと臨床材料との関連性は認められなかった。

**表 21. 臨床材料別 biofilm producer と non-producer の比較**

臨床材料	biofilm producer の分布率(%)	non-producerの分布率(%)
耳・鼻・喉由来の臨床材料( $n=33$ )	51.5	48.5
開放膿/創傷/皮膚由来の臨床材料( $n=29$ )	44.8	55.2
泌尿器系の臨床材料( $n=11$ )	18.2	81.8
子宮・血液からの無菌的臨床材料( $n=6$ ) <sup>1)</sup>	16.7	83.3
眼由来の臨床材料( $n=3$ )	33.3	67.7
肛門腺液( $n=1$ )	100	0

1) ヒトの血液由来の菌株 (TA4/OT1)もこの臨床材料に含む。

# Biofilm production ability (fold value)

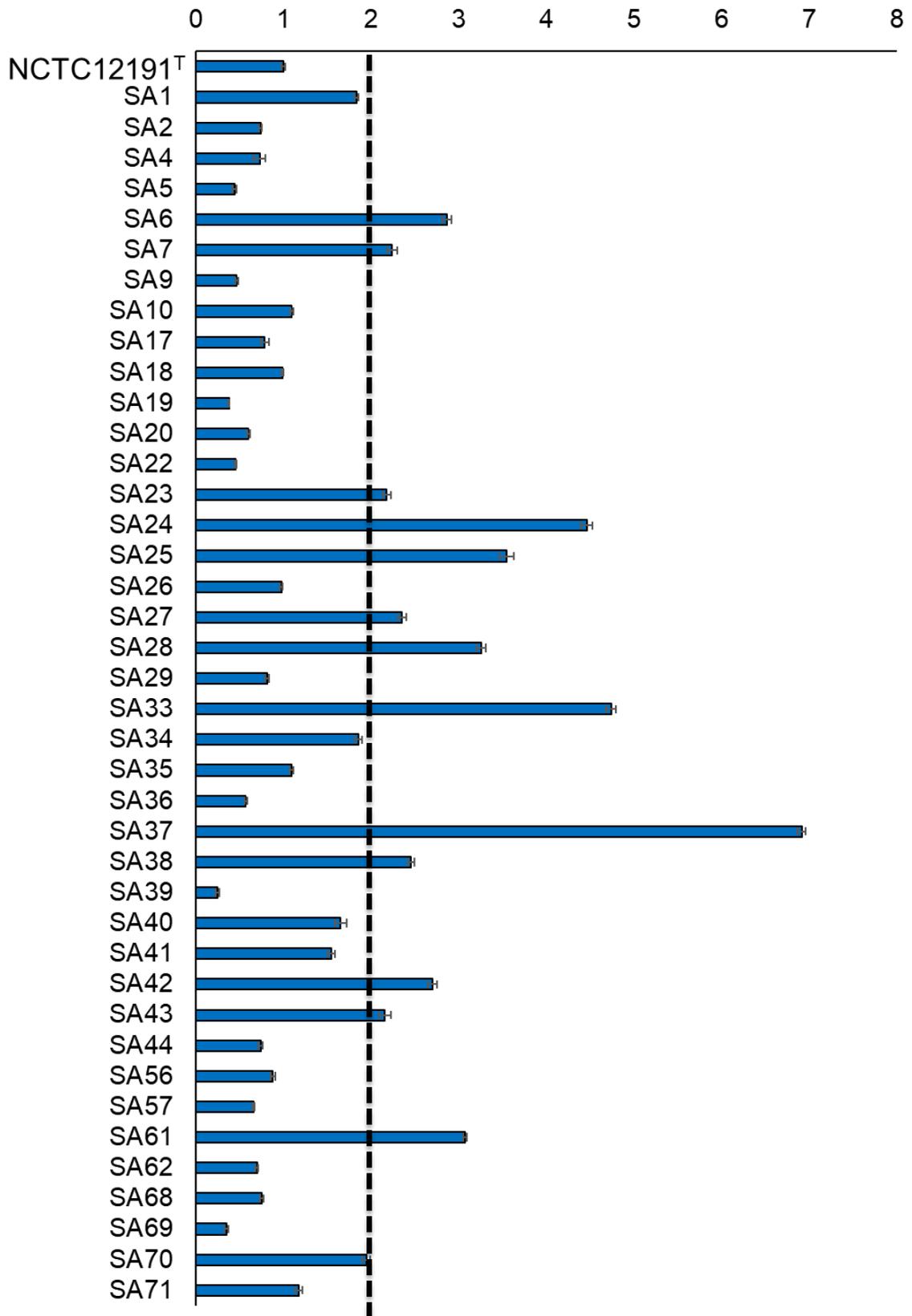


図 10. 2015 年分離株の BPA

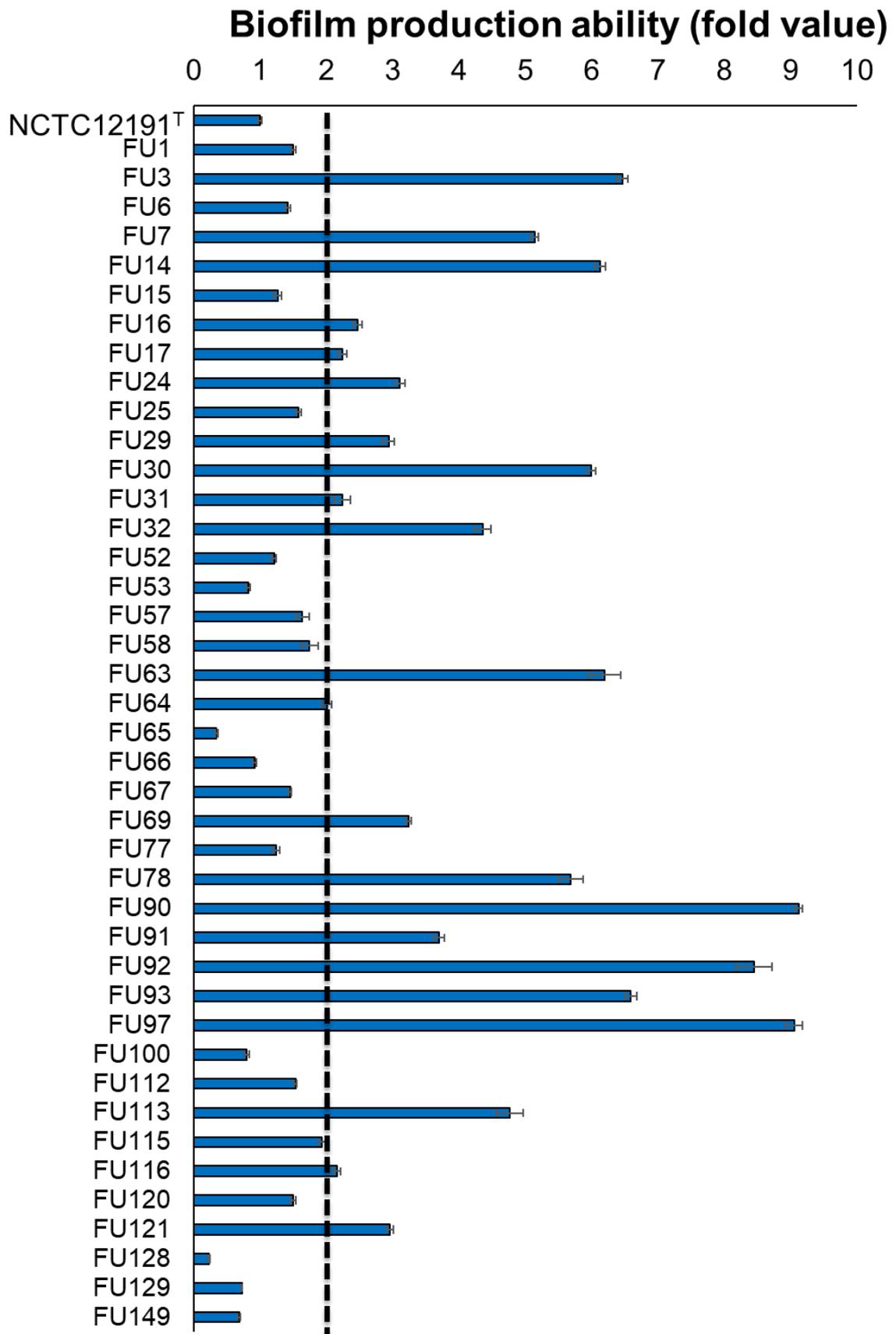


図 11. 2017/2019 年分離株の BPA

### 3-3-3. SCM allele type

SCM allele type (菌株間の SCM Group I および II を含む)の分布を表 22 に示す。動物由来の 81 株のうち、Group I には流行している SCM allele type 1 ( $n = 24$ )、SCM allele type 2 ( $n = 8$ )、SCM allele type 4 ( $n = 5$ )を含む 42 株、Group II には流行している SCM allele type 10 ( $n = 19$ )、SCM allele type 15 ( $n = 6$ )、SCM allele type 11 ( $n = 5$ )を含む 39 株が含まれていた。NCTC 12191<sup>T</sup>、TA4、OT1 は SCM allele type 1 に含まれていた。

Group I と Group II の SCM 集団の間で、biofilm producer の分布率に差は認めなかった。non-producer と SCM allele type 1 の間には有意な関連性が認められた。 ( $p < 0.01$ )  
一方で、biofilm producer と SCM allele type 10 との間には有意な関連性が認められた。  
( $p < 0.01$ )

表 22. biofilm producer と non-producer における SCM の分布状況

Strain	BPA	SCM (groups I/II)	Strain	BPA	SCM (groups I/II)
SA1	Non-producer	1 (I)	FU1	Non-producer	11 (II)
SA2	Non-producer	11 (II)	FU3	Biofilm producer	4 (I)
SA4	Non-producer	1 (I)	FU6	Non-producer	1 (I)
SA5	Non-producer	8 (I)	FU7	Biofilm producer	10 (II)
SA6	Biofilm producer	10 (II)	FU14	Biofilm producer	2 (I)
SA7	Biofilm producer	10 (II)	FU15	Non-producer	1 (I)
SA9	Non-producer	1 (I)	FU16	Biofilm producer	11 (II)
SA10	Non-producer	15 (II)	FU17	Biofilm producer	11 (II)
SA17	Non-producer	1 (I)	FU24	Biofilm producer	1 (I)
SA18	Non-producer	13 (II)	FU25	Non-producer	12 (II)
SA19	Non-producer	1 (I)	FU29	Biofilm producer	5 (I)
SA20	Non-producer	15 (II)	FU30	Biofilm producer	11 (II)
SA22	Non-producer	1 (I)	FU31	Biofilm producer	1 (I)
SA23	Biofilm producer	10 (II)	FU32	Biofilm producer	10 (II)
SA24	Biofilm producer	2 (I)	FU52	Non-producer	1 (I)
SA25	Biofilm producer	10 (II)	FU53	Non-producer	10 (II)
SA26	Non-producer	15 (II)	FU57	Non-producer	1 (I)
SA27	Biofilm producer	15 (II)	FU58	Non-producer	14 (II)
SA28	Biofilm producer	2 (I)	FU63	Biofilm producer	2 (I)
SA29	Non-producer	1 (I)	FU64	Biofilm producer	3 (I)
SA33	Biofilm producer	2 (I)	FU65	Non-producer	15 (II)
SA34	Non-producer	10 (II)	FU66	Non-producer	1 (I)
SA35	Non-producer	2 (I)	FU67	Non-producer	1 (I)
SA36	Non-producer	15 (II)	FU69	Biofilm producer	13 (II)
SA37	Biofilm producer	4 (I)	FU77	Non-producer	1 (I)
SA38	Biofilm producer	10 (II)	FU78	Biofilm producer	10 (II)
SA39	Non-producer	8 (I)	FU90	Biofilm producer	6 (I)
SA40	Non-producer	4 (I)	FU91	Biofilm producer	10 (II)
SA41	Non-producer	10 (II)	FU92	Biofilm producer	4 (I)
SA42	Biofilm producer	10 (II)	FU93	Biofilm producer	10 (II)
SA43	Biofilm producer	10 (II)	FU97	Biofilm producer	4 (I)
SA44	Non-producer	1 (I)	FU100	Non-producer	14 (II)
SA56	Non-producer	1 (I)	FU112	Non-producer	1 (I)
SA57	Non-producer	10 (II)	FU113	Biofilm producer	10 (II)
SA61	Biofilm producer	2 (I)	FU115	Non-producer	1 (I)
SA62	Non-producer	14 (II)	FU116	Biofilm producer	14 (II)
SA68	Non-producer	1 (I)	FU120	Non-producer	1 (I)
SA69	Non-producer	12 (II)	FU121	Biofilm producer	10 (II)
SA70	Non-producer	2 (I)	FU128	Non-producer	1 (I)
SA71	Non-producer	13 (II)	FU129	Non-producer	10 (II)
			FU149	Non-producer	1 (I)

### 3-3-4. Sequence Type および Clonal Complex

ST/CC の分布を表 23、図 12 に示す。81 株のうち、主に CC9 ( $n = 18$ ) にまとめられた ST9 ( $n = 15$ )、ST3 ( $n = 2$ )、ST30 ( $n = 1$ ) が観察されたほか、ST21 ( $n = 19$ ) / ST41 ( $n = 5$ ) が分布していた。CC46 は、ST46 ( $n = 4$ ) / ST2 ( $n = 3$ ) / ST45 ( $n = 1$ ) で構成されていた。CC1 には、ST1 ( $n = 3$ ) / ST50 ( $n = 2$ ) / ST53 ( $n = 1$ ) が含まれていた。CC13 には、ST13 ( $n = 2$ ) / ST14 ( $n = 3$ ) が確認された。NCTC12191<sup>T</sup>、TA4、OT1 は ST9/CC9 であった。

non-producer と CC9/ST9 の間には有意な関連性が認められた ( $p < 0.01$ )。一方で、biofilm producer と ST21 との間にも有意な関連性が認められた ( $p < 0.01$ )。CC46/CC1/CC13 とその他の集団の間では、biofilm producer の分布率に違いは認められなかった。

表 23. biofilm producer と non-producer における ST/CC の分布状況

Strain	BPA	ST (CC)	Strain	BPA	ST (CC)
SA1	Non-producer	13 (13)	FU1	Non-producer	41
SA2	Non-producer	41	FU3	Biofilm producer	14 (13)
SA4	Non-producer	9 (9)	FU6	Non-producer	9 (9)
SA5	Non-producer	54 (25)	FU7	Biofilm producer	21
SA6	Biofilm producer	21	FU14	Biofilm producer	46 (46)
SA7	Biofilm producer	21	FU15	Non-producer	9 (9)
SA9	Non-producer	9 (9)	FU16	Biofilm producer	41
SA10	Non-producer	1 (1)	FU17	Biofilm producer	41
SA17	Non-producer	9 (9)	FU24	Biofilm producer	9 (9)
SA18	Non-producer	51	FU25	Non-producer	47
SA19	Non-producer	9 (9)	FU29	Biofilm producer	44
SA20	Non-producer	1 (1)	FU30	Biofilm producer	41
SA22	Non-producer	9 (9)	FU31	Biofilm producer	48
SA23	Biofilm producer	21	FU32	Biofilm producer	21
SA24	Biofilm producer	52	FU52	Non-producer	3 (9)
SA25	Biofilm producer	21	FU53	Non-producer	21
SA26	Non-producer	1 (1)	FU57	Non-producer	2 (46)
SA27	Biofilm producer	53 (1)	FU58	Non-producer	49
SA28	Biofilm producer	2 (46)	FU63	Biofilm producer	46 (46)
SA29	Non-producer	9 (9)	FU64	Biofilm producer	13 (13)
SA33	Biofilm producer	46 (46)	FU65	Non-producer	50 (1)
SA34	Non-producer	21	FU66	Non-producer	9 (9)
SA35	Non-producer	2 (46)	FU67	Non-producer	9 (9)
SA36	Non-producer	50 (1)	FU69	Biofilm producer	51
SA37	Biofilm producer	14 (13)	FU77	Non-producer	9 (9)
SA38	Biofilm producer	21	FU78	Biofilm producer	21
SA39	Non-producer	25 (25)	FU90	Biofilm producer	27
SA40	Non-producer	16	FU91	Biofilm producer	21
SA41	Non-producer	21	FU92	Biofilm producer	11
SA42	Biofilm producer	21	FU93	Biofilm producer	21
SA43	Biofilm producer	21	FU97	Biofilm producer	14 (13)
SA44	Non-producer	9 (9)	FU100	Non-producer	5
SA56	Non-producer	48	FU112	Non-producer	48
SA57	Non-producer	21	FU113	Biofilm producer	21
SA61	Biofilm producer	45 (46)	FU115	Non-producer	30 (9)
SA62	Non-producer	5	FU116	Biofilm producer	49
SA68	Non-producer	9 (9)	FU120	Non-producer	48
SA69	Non-producer	47	FU121	Biofilm producer	21
SA70	Non-producer	46 (46)	FU128	Non-producer	3 (9)
SA71	Non-producer	51	FU129	Non-producer	21
			FU149	Non-producer	9 (9)

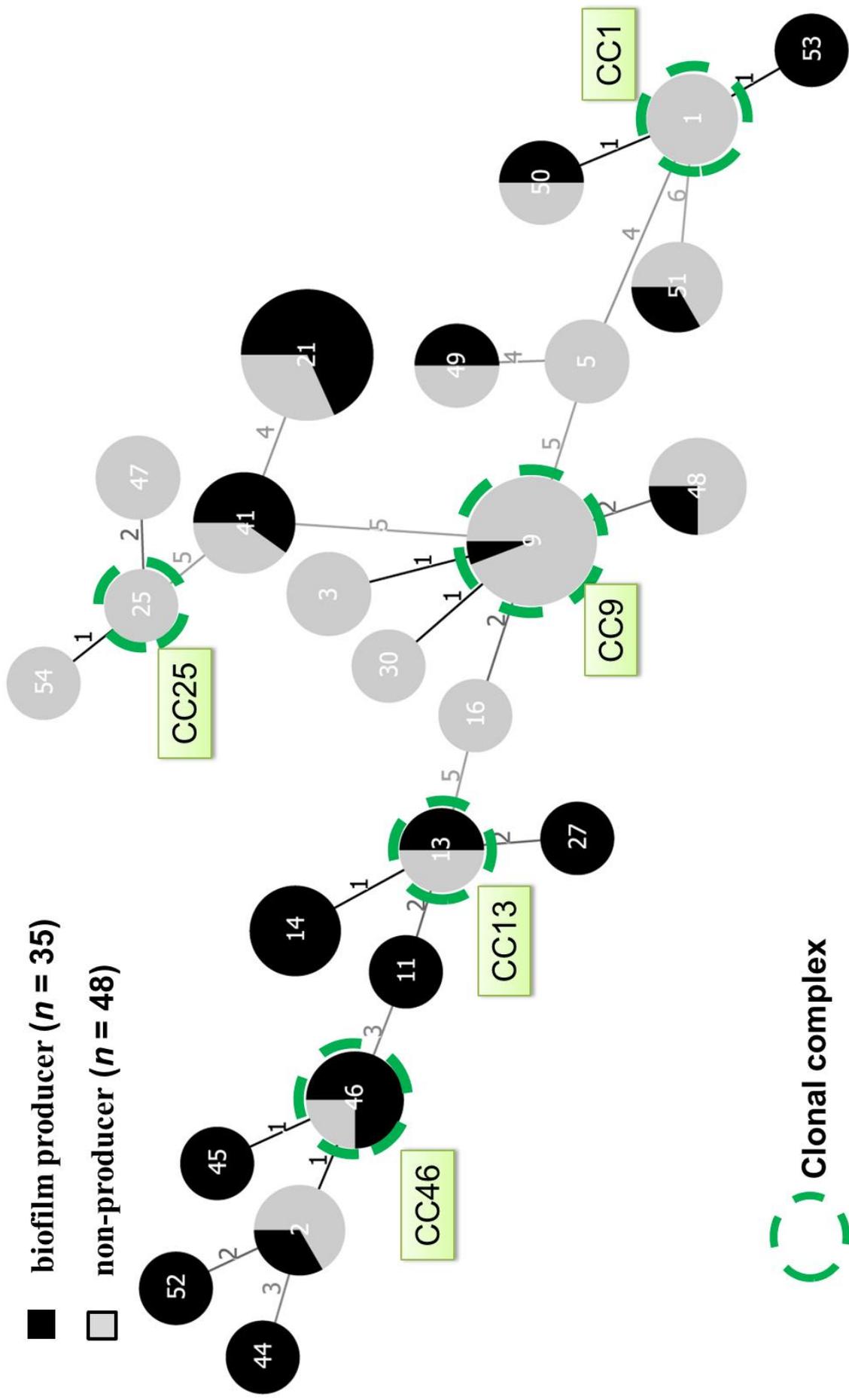


図 12. biofilm producer と non-producer における ST/CC の分布状況  
 サークルの中の数字は ST を示し、サークル間の線近くの数字は、つながった 2 つの ST の間で異なる対立遺伝子座の数を示す。

CC は点線の円および該当部近傍に示した。サークルの中の黒色と灰色は、それぞれ biofilm producer と non-producer を表す。

### 3-3-5. 薬剤耐性表現型および遺伝子型

菌株の AMR 表現型/遺伝子型に関するデータを表 24 に示す。

いずれかのクラスの抗菌薬 (テトラサイクリン・マクロライド/リンコサミド) に対する薬剤耐性の総検出率は 31.3%、薬剤耐性遺伝子型の検出率は 48.2%であった。PCG と LVX に耐性を持つ株は認められなかった。

NCTC 12191<sup>T</sup>、TA4、OT1 では、調べたすべての薬剤耐性表現型・遺伝子型が検出されなかった。biofilm producer と薬剤耐性表現型の存在との関連は見られなかったが、biofilm producer と薬剤耐性遺伝子型 (特に TET 耐性遺伝子)の存在との間には有意な関連が見られた ( $p < 0.01$ )。

表 24. biofilm producer と non-producer における薬剤耐性表現型/遺伝子型の分布状況

Strain	BPA	AMR phenotype	AMR genotype	Strain	BPA	AMR phenotype	AMR genotype
SA1	Non-producer	Tetracycline	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)	FU1	Non-producer		
SA2	Non-producer	Tetracycline		FU3	Biofilm producer	Minocycline, Azithromycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA4	Non-producer			FU6	Non-producer		
SA5	Non-producer			FU7	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (O)
SA6	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU14	Biofilm producer	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA7	Biofilm producer	Tetracycline	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S)	FU15	Non-producer		
SA9	Non-producer			FU16	Biofilm producer		
SA10	Non-producer	Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)	FU17	Biofilm producer		
SA17	Non-producer			FU24	Biofilm producer		
SA18	Non-producer			FU25	Non-producer		
SA19	Non-producer			FU29	Biofilm producer		
SA20	Non-producer	Tetracycline, Erythromycin, Clarithromycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (M)	FU30	Biofilm producer		
SA22	Non-producer	Tetracycline, Erythromycin, Clarithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S)	FU31	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)
SA23	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU32	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (S)
SA24	Biofilm producer			FU52	Non-producer	Minocycline	<i>tet</i> (O)
SA25	Biofilm producer			FU53	Non-producer		
SA26	Non-producer			FU57	Non-producer		
SA27	Biofilm producer	Tetracycline	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)	FU58	Non-producer		
SA28	Biofilm producer			FU63	Biofilm producer	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA29	Non-producer			FU64	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (M)
SA33	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU65	Non-producer		
SA34	Non-producer		<i>tet</i> (O)	FU66	Non-producer		
SA35	Non-producer	Tetracycline	<i>tet</i> (O)	FU67	Non-producer		
SA36	Non-producer			FU69	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (M)
SA37	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU77	Non-producer		
SA38	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU78	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)
SA39	Non-producer		<i>tet</i> (O)	FU90	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (O)
SA40	Non-producer			FU91	Biofilm producer		<i>tet</i> (S)
SA41	Non-producer		<i>tet</i> (O)	FU92	Biofilm producer		
SA42	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)	FU93	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (S)
SA43	Biofilm producer	Tetracycline	<i>tet</i> (O)	FU97	Biofilm producer	Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B)
SA44	Non-producer			FU100	Non-producer		
SA56	Non-producer			FU112	Non-producer	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
SA57	Non-producer		<i>tet</i> (O)	FU113	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (O)
SA61	Biofilm producer			FU115	Non-producer		
SA62	Non-producer			FU116	Biofilm producer	Minocycline	<i>tet</i> (M)
SA68	Non-producer			FU120	Non-producer	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
SA69	Non-producer			FU121	Biofilm producer		<i>tet</i> (O)
SA70	Non-producer		<i>tet</i> (O)	FU128	Non-producer	Minocycline	<i>mef</i> (A), <i>tet</i> (O)
SA71	Non-producer			FU129	Non-producer	Minocycline, Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (O)
				FU149	Non-producer		

### 3-3-6. Virulence associated gene プロファイル

菌株の Virulence associated gene プロファイルに関するデータを表 25 に示す。

調べた 83 株のうち、*gbp* 陽性 57 株 (68.7%)、*ap1* 陽性 19 株 (22.9%)、*fp1* 陽性 35 株

(42.2%)、*brp* 陽性 74 株 (89.2%)であった。NCTC12191<sup>T</sup>は *gbp-brp* 陽性のプロファイルを示すことを確認した。

non-producer と *gbp* 検出の間には有意な関連性が認められた。 ( $p < 0.05$ )さらには、biofilm producer と *ap1* 検出の間には有意な関連性が認められた ( $p < 0.01$ )。一方で、biofilm producer と *fp1* 検出/*brp* 検出の間には相関関係が見られなかった。

表 25. biofilm producer と non-producer における VAG プロファイルの分布状況

Strain	BPA	Virulence-associated gene profile	Strain	BPA	Virulence-associated gene profile
		<i>gbp ap1 fp1 brp</i>			<i>gbp ap1 fp1 brp</i>
SA1	Non-producer	<i>brp</i>	FU1	Non-producer	<i>fp1 brp</i>
SA2	Non-producer	<i>fp1 brp</i>	FU3	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA4	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU6	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA5	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU7	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>
SA6	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU14	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA7	Biofilm producer	<i>ap1 fp1 brp</i>	FU15	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA9	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU16	Biofilm producer	<i>fp1 brp</i>
SA10	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>	FU17	Biofilm producer	<i>fp1 brp</i>
SA17	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU24	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA18	Non-producer	<i>brp</i>	FU25	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>
SA19	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU29	Biofilm producer	<i>brp</i>
SA20	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>	FU30	Biofilm producer	<i>fp1 brp</i>
SA22	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU31	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA23	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU32	Biofilm producer	<i>ap1 fp1 brp</i>
SA24	Biofilm producer	<i>brp</i>	FU52	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA25	Biofilm producer	<i>ap1 fp1 brp</i>	FU53	Non-producer	<i>ap1 fp1 brp</i>
SA26	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>	FU57	Non-producer	<i>brp</i>
SA27	Biofilm producer	<i>fp1 brp</i>	FU58	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>
SA28	Biofilm producer	<i>brp</i>	FU63	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA29	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU64	Biofilm producer	
SA33	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>	FU65	Non-producer	<i>gbp fp1</i>
SA34	Non-producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU66	Non-producer	<i>gbp</i>
SA35	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU67	Non-producer	<i>gbp</i>
SA36	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>	FU69	Biofilm producer	<i>gbp</i>
SA37	Biofilm producer	<i>brp</i>	FU77	Non-producer	<i>gbp</i>
SA38	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU78	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1</i>
SA39	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU90	Biofilm producer	
SA40	Non-producer	<i>brp</i>	FU91	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1</i>
SA41	Non-producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU92	Biofilm producer	<i>brp</i>
SA42	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU93	Biofilm producer	<i>ap1 fp1 brp</i>
SA43	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU97	Biofilm producer	<i>gbp brp</i>
SA44	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU100	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>
SA56	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU112	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA57	Non-producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>	FU113	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>
SA61	Biofilm producer	<i>brp</i>	FU115	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA62	Non-producer	<i>brp</i>	FU116	Biofilm producer	<i>gbp fp1 brp</i>
SA68	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU120	Non-producer	<i>gbp brp</i>
SA69	Non-producer	<i>gbp fp1 brp</i>	FU121	Biofilm producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>
SA70	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU128	Non-producer	<i>brp</i>
SA71	Non-producer	<i>gbp brp</i>	FU129	Non-producer	<i>gbp ap1 fp1 brp</i>
			FU149	Non-producer	<i>gbp brp</i>

### 3-4. 考察

各年 (2015/2017 年)から 40 株を順に無作為抽出で割り当て、BPA と微生物学的特徴の関係を偏りなく分析した。biofilm producer と SCM allele type 10/ST21/*ap1* の検出、non-producer と SCM allele type 1/ST9/*gbp* の間には関連性があり、犬レンサ球菌の遺伝的なクローナリティがバイオフィーム産生に寄与している可能性が示唆された。

所属研究室の成果<sup>57</sup>により、細胞内侵入能力と関連する微生物学的特徴 (SCM allele type 10/type 11 または ST21/ST41)が、高レベル細胞内侵入集団の遺伝的なクローナリティの可能性を支持することが明らかになった。そのため、クローナリティを持つ複数の菌株が高病原性の表現型を持っているかどうかを、他の *in vivo/in vitro* の実験で明らかにする必要があると考えられる。

2015 年から 2017 年にかけての犬レンサ球菌株の抗菌薬耐性率の変化は、著者の先行研究<sup>8</sup>にて報告している。2017 年のテトラサイクリン (41.0%)、マクロライド (18.8%)、リンコサミド (17.1%)の各抗菌薬クラスに対する薬剤耐性率は、2015 年と比較して有意に増加していた。そのうえ、今回の研究において、2017 年の分離と biofilm producer の関連性が認められ、biofilm producer と薬剤耐性遺伝子型 (特に TET 耐性遺伝子)の存在との間にも関連性が認められた。このように、BPA の 2015 年と 2017 年の違いは、潜在的なメカニズム (抗菌薬の拡散障害、薬剤の非感受性、バイオフィーム特異的な遺伝子的メカニズムの発現、持続的に生存している細菌の存在など)を通じて、薬剤耐性表現型/遺伝子型の 2015 年と 2017 年の違いとリンクしていると思われる。<sup>58</sup>特に、BPA が寄与すると考えられる薬剤耐性の悪化については、各菌株の間で注意が必要である。

伴侶動物由来の BPA 保有株は、限られた宿主情報 (動物種、性別、年齢、隔離年、分離地域、臨床材料)しか得られなかったため、その臨床的影響との関連を分析することができなかった。そのため、BPA 保有株と臨床的意義との関係を明らかにするためには、日本の獣医師からより詳細な情報 (基礎疾患、感染症の診断、治療方法、治療結果など)を収集する必要がある。

著者が明らかにした、BPA のデータと臨床的な関連性を組み合わせることで、獣医師がレンサ球菌感染症を示唆する症状や兆候を持つ動物を診察・治療する際に役立つ可能性がある。

結論として、著者の研究結果は、biofilm producer と他の微生物学的特徴 (分離年/SCM allele type 10/ST21/抗菌薬耐性遺伝子型の存在/*ap1* の検出など)との間に相関関係があることを示唆している。今後は、培養環境の因子や宿主の基礎疾患 (糖尿病等)と BPA との関連を明らかにしていくことが必要であると考えられる。

さらには、これらの所見の変動を監視するために、類似した集団の間でのモニタリングを継続して行う必要がある。

### 3-5. 小括

本項の研究では、2015 年および 2017 年に感染兆候の見られる伴侶動物より分離された犬レンサ球菌 185 株から、無作為に抽出した各年度 40 株の計 80 株および、人血液由来 2 株、犬血液由来 1 株、標準菌株 NCTC12191<sup>T</sup> について、BPA の測定と関連因子との関係性を評価した。

BPA を評価するために、滅菌済みの平底 96 ウェルポリスチレンマイクロタイタープレート 10 ウェルに対象菌を接種し、クリスタルバイオレット染色法により BPA を定量的に評価した。その後、NCTC12191<sup>T</sup> が示す BPA の 2 倍以上を示す株を biofilm producer、2 倍未満の株を non-producer と定義した。さらに、同菌株が保有する各種遺伝子型(SCM allele type、ST、VAG プロファイル、薬剤耐性表現型/遺伝子型)と BPA の関連性も解析した。

その結果として、biofilm producer ( $n = 35$ )、non-producer ( $n = 48$ )を確認した。biofilm producer と有意に関連する微生物学的因子として、2017 年に分離された株、SCM allele type10、ST21、抗菌薬耐性遺伝子(TET 耐性遺伝子)の保有、線毛関連遺伝子 *ap1* の保有を確認した。

本項の研究成果より、犬レンサ球菌においてもバイオフィルムを産生する株が存在

していることが確認できたため、犬や猫といった伴侶動物を飼育している症例において、カテーテル等の人工物に関連する感染症を呈する症例等においては、同菌種を起  
因菌とする感染症を検討する必要があると考えられる。

## 結論

犬レンサ球菌は、感染兆候の見られる犬や猫より分離される溶血性レンサ球菌の中で最も分離頻度の高い菌種である。しかも、同菌種は人獣共通に感染症を引き起こすことが報告されており、伴侶動物では、開放膿や耳漏といった非無菌的検体から血液等幅広い臨床材料から分離される。その一方で、人においても菌血症や人工関節関連感染症を引き起こした患者が知られている。

しかし、先述したとおり、犬や猫から高頻度に分離されるものの、獣医領域というその診療体系上、起因菌である犬レンサ球菌の病原性や疫学情報といった微生物学的特性にまで迫られることは少ない。人医療においても、多くの感染症を引き起こす可能性は十分にあるが、溶血性レンサ球菌感染症の治療においては、Lancefield 分類や質量分析機器をもとにした菌種同定により治療方針が決定され、遺伝学的手法を用いた正確な菌種同定までに行き届くことが稀であるため、G 群に分類される犬レンサ球菌は見過ごされている可能性がある。

そこで当研究においては、感染兆候の見られる伴侶動物や人血液より分離された犬レンサ球菌を用いて、抗菌薬耐性機構の解明、疫学解析基盤の構築および感染制御にむけた基礎的検討を目的として研究を実施した。本研究において得られた新規性のある研究成果として、(1)犬レンサ球菌のキノロン系薬剤耐性機構に関与するアミノ酸変異の同定、(2)犬レンサ球菌特異的病原因子 SCM の新規配列 typing と微生物学的因子の関連性評価、(3)犬レンサ球菌の BPA の有無と微生物学的因子の関係性評価を解析したことがあげられる。

本研究の成果より、犬レンサ球菌は、同属菌種と同様のアミノ酸変異によるフルオロキノロン系抗菌薬への耐性機構を示すことを確認し、SCM allele typing の結果より、地域による多様性と特定のクローンの分布が示唆された。さらに、BPA の評価により、犬レンサ球菌においてもバイオフィルムを生産することが確認でき、人工物関連感染についても警戒する必要性が示唆された。これにより、人と伴侶動物のより良い関係性を構築する上で、臨床上重要と考えられる研究成果(抗菌薬耐性機構、疫学

解析情報の拡充、バイオフィルム産生能等)を明らかにすることができたと考えられる。

特に、本研究の成果より、人血液由来犬レンサ球菌 (TA4、OT1)と NCTC12191<sup>T</sup>株を比較すると、1)レンサ球菌専用パネルを用いた薬剤感受性試験の結果はすべて感受性、2)SCM allele type はすべて allele type 1 の SCM を保有している、3)ST はすべて 9 を示す、4)BPA は non-producer、といった結果となり、BPA を除き、微生物学的特性が非常に近似していることが確認できた。そのため、犬レンサ球菌は、伴侶動物(犬、猫)を中心として保有が確認されている菌種ではあるものの、人においても注意すべき菌種であることが改めて推察される結果となった。

人と伴侶動物は切り離すことができない、家族である。そのため、本研究成果が社会に認知されることにより、伴侶動物由来溶血性レンサ球菌を起因菌とする人感染症により、飼い主が人医療機関を受診した場合に、伴侶動物と共生していることを医師に伝えることで、より適切な診断、治療を受けることが可能になると考えられる。

さらには、犬レンサ球菌の微生物学的特性および疫学特性に関する報告は少ないことから、本研究において明らかにした成果が、将来、人および獣医臨床において有効活用されることを期待したい。

## 引用文献

1. 一般社団法人ペットフード協会. 令和2年 全国犬猫飼育実態調査. 1–5 (2020).
2. Devriese, L. A. *et al.* *Streptococcus canis* sp. nov.: A species of group G streptococci from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 422–425 (1986).
3. Devriese, L. A. *et al.* Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 421–425 (1992).
4. DeWinter L.M. *et al.* Relatedness of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. *Can J Vet Res.* 63, 90–5 (1999).
5. Lamm, C. G. *et al.* Streptococcal infection in dogs: A retrospective study of 393 cases. *Vet. Pathol.* 47, 387–395 (2010).
6. Tatiana Galpérine. *et al.* *Streptococcus canis* infections in humans: retrospective study of 54 patients. *J. Infect.* 55, 23–26 (2007).
7. Amsallem M. *et al.* First reported human case of native mitral infective endocarditis caused by *Streptococcus canis*. *Can J Cardiol.* 30, 1462.e1–2. (2014).
8. Fukushima, Y. *et al.* Species identification of  $\beta$ -hemolytic streptococci from diseased companion animals and their antimicrobial resistance data in japan (2017). *Jpn. J. Infect. Dis.* 72, 94–98 (2019).
9. Gellert, M. *et al.* DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3872–3876 (1976).
10. Fisher L. M. *et al.* Site-specific interaction of DNA gyrase with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4165–4169 (1981).
11. Kato, J. *et al.* New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. *Cell* 63, 393–404 (1990).
12. Janoir, C. *et al.* High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2760–2764

- (1996).
13. Yan SS. *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.* 44, 3196–3198 (2000).
  14. Kawamura, Y. *et al.* First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3605–3609 (2003).
  15. Malhotra-Kumar, S. *et al.* Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 320–325 (2005).
  16. Tsuyuki, Y. *et al.* Identification of group G streptococcal isolates from companion animals in Japan and their antimicrobial resistance patterns. *Jpn. J. Infect. Dis.* 79, 394–398 (2017).
  17. Taniyama, D. *et al.* Human case of bacteremia caused by *Streptococcus canis* sequence type 9 harboring the *scm* gene. *IDCases* 7, 48–52 (2017).
  18. Ohtaki, H. *et al.* A case of sepsis caused by *Streptococcus canis* in a dog owner: A first case report of sepsis without dog bite in Japan. *J. Infect. Chemother.* 19, 1206–1209 (2013).
  19. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement. **CLSI document M100-S22.** 32, (2012).
  20. Rivera, A. *et al.* Characterisation of fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Barcelona, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 759–761 (2005).
  21. Lin, J. N. *et al.* High prevalence of fluoroquinolone-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* emm12 in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 187–192 (2015).
  22. Billal, D. S. *et al.* In vitro induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants

- of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple emm types. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 28–34 (2007).
23. Jones, H. E. *et al.* A multidrug efflux phenotype mutant of *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 707–710 (2003).
  24. Kumar, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549 (2018).
  25. Yoshida, H. *et al.* Draft genome sequences of seven *Streptococcus canis* strains isolated from diseased companion animals in Japan. *Microbiol. Resour. Announc.* 2020 Apr 16;9(16):e00123-20. (2020).
  26. Pinho, M. D. *et al.* *Streptococcus canis* are a single population infecting multiple animal hosts despite the diversity of the universally present M-like protein SCM. *Front. Microbiol.* 10, 1–10 (2019).
  27. Fukushima, Y. *et al.* Prevalence and diversity of M-like protein (SCM) gene in *Streptococcus canis* isolates from diseased companion animals in Japan: Implication of SCM allele. *Vet. Microbiol.* 225, (2018).
  28. Larsen, M. V. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361 (2012).
  29. Nascimento, M. *et al.* PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics.* 33, 128–129 (2017).
  30. Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644 (2012).
  31. Arai, K. *et al.* Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 494–498 (2011).
  32. Yokota, S. *et al.* Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus*

- pneumoniae* in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 78, 428–434 (2004).
33. Malhotra-Kumar, S. *et al.* Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in emm 6 *Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 886–894 (2009).
  34. Ingrey, K. T. *et al.* A fluoroquinolone induces a novel mitogen-encoding bacteriophage in *Streptococcus canis*. *Infect. Immun.* 71, 3028–3033 (2003).
  35. Shen, Y. *et al.* Identification and characterization of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes* clones harboring tetracycline and macrolide resistance in Shanghai, China. *Front. Microbiol.* 9, 1–10 (2018).
  36. Petrelli, D. *et al.* Characterization of levofloxacin non-susceptible clinical *Streptococcus pyogenes* isolated in the central part of Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 241–244 (2014).
  37. Tsuyuki, Y. *et al.* Isolated bacteria and their antimicrobial susceptibility through urine culture obtained from companion animals in Japan. *Kansenshogaku Zasshi.* 91, 392–8 (2017).
  38. Fulde, M. *et al.* SCM, a novel M-like protein from *Streptococcus canis*, binds (mini)-plasminogen with high affinity and facilitates bacterial transmigration. *Biochem. J.* 434, 523–535 (2011).
  39. Fulde, M. *et al.* Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via M protein and enolase enhances bacterial survival. *MBio.* 4, 1–12 (2013).
  40. Bergmann, S. *et al.* SCM, the M protein of *Streptococcus canis* binds immunoglobulin G. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, (2017).
  41. Timoney, J. F. *et al.* Biotypes and ScM types of isolates of *Streptococcus canis* from diseased and healthy cats. *Vet Rec.* 2017 Apr 8;180(14):358. (2017).
  42. Yoshida, H. *et al.* Draft genome sequence of *Streptococcus canis* clinical strain TA4, harboring the M-Like protein gene and isolated in Japan from a patient with bacteremia.

- Genome Announc.* 2018 Jan 18;6(3):e01469-17. (2018).
43. Yoshida, H. *et al.* Draft genome sequence of *Streptococcus canis* clinical strain OT1, isolated from a dog owner with invasive infection without a dog bite in Japan. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019 Sep 26;8(39):e00770-19. (2019).
44. Saitou, N. *et al.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425 (1987).
45. Joseph, F. Confidence limits on phylogenies : An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783–791 (1985).
46. Zuckerkandl, E. *et al.* Evolutionary divergence and convergence in proteins BT - Evolving genes and proteins. *Evol. genes proteins.* 97–166 (1965)
47. Ardanuy, C. *et al.* Molecular characterization of macrolide-and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 634–643 (2010).
48. Carlsson, F. *et al.* Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in *Streptococcus pyogenes* M protein. *J. Exp. Med.* 198, 1057–1068 (2003).
49. Costerton, J. W. *et al.* Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318–1322 (1999).
50. K., Lewis. Persister Cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem.* 70, 267–74 (2005).
51. Yung-Hua Li. *et al.* A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184, 2699–708 (2002).
52. Stewart, P. S. *et al.* Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358, 135–138 (2001).
53. Hall-Stoodley, L. *et al.* Biofilm formation and dispersal and the transmission of human

- pathogens. *Trends Microbiol.* 13, 7–10 (2005).
54. Fukushima, Y. *et al.* Draft genome sequence of blood-origin *Streptococcus canis* strain FU149, isolated from a dog with necrotizing soft tissue infection. *Microbiol. Resour. Announc.* 2020 Aug 27;9(35):e00737-20. (2020).
55. Fowler, V. G. *et al.* The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med. Microbiol. Immunol.* 189, 127–131 (2000).
56. 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.* 73, 242–249 (2020).
57. Yoshida, H. *et al.* Intracellular invasion ability and associated microbiological characteristics of *Streptococcus canis* in isolates from Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 74, 129–136 (2021).
58. Lebeaux, D. *et al.* Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543 (2014).

## 附錄

### 【博士論文関連図表目録】

1. 附録 1. QRDR accession number
2. 附録 2. Group II *scm* accession number

### 附錄 1. QRDR accession number

Accession number	EntryID	Accession number	EntryID	Accession number	EntryID
LC495778	FU47-gyrA	LC495779	FU71-gyrA	LC495780	FU75-gyrA
LC495781	FU5-gyrA	LC495782	SA3-gyrA	LC495783	SA15-gyrA
LC495784	SA31-gyrA	LC495785	FU95-gyrA	LC495786	FU3-gyrA
LC495787	FU32-gyrA	LC495788	FU115-gyrA	LC495789	SA35-gyrA
LC495790	SA68-gyrA	LC495791	FU40-gyrA	LC495792	SA16-gyrA
LC495793	SA25-gyrA	LC495794	FU1-gyrA	LC495795	FU74-gyrA
LC495796	FU92-gyrA	LC495797	FU97-gyrA	LC495798	FU129-gyrA
LC495799	SA34-gyrA	LC495800	SA61-gyrA	LC495801	FU28-gyrA
LC495802	TA4-gyrA	LC495803	OT1-gyrA	LC495804	FU47-gyrB
LC495805	FU71-gyrB	LC495806	FU75-gyrB	LC495807	FU5-gyrB
LC495808	SA3-gyrB	LC495809	SA15-gyrB	LC495810	SA31-gyrB
LC495811	FU95-gyrB	LC495812	FU3-gyrB	LC495813	FU32-gyrB
LC495814	FU115-gyrB	LC495815	SA35-gyrB	LC495816	SA68-gyrB
LC495817	FU40-gyrB	LC495818	SA16-gyrB	LC495819	SA25-gyrB
LC495820	FU1-gyrB	LC495821	FU74-gyrB	LC495822	FU92-gyrB
LC495823	FU97-gyrB	LC495824	FU129-gyrB	LC495825	SA34-gyrB
LC495826	SA61-gyrB	LC495827	FU28-gyrB	LC495828	TA4-gyrB
LC495829	OT1-gyrB	LC495830	FU47-parC	LC495831	FU71-parC
LC495832	FU75-parC	LC495833	FU5-parC	LC495834	SA3-parC
LC495835	SA15-parC	LC495836	SA31-parC	LC495837	FU95-parC
LC495838	FU3-parC	LC495839	FU32-parC	LC495840	FU115-parC
LC495841	SA35-parC	LC495842	SA68-parC	LC495843	FU40-parC
LC495844	SA16-parC	LC495845	SA25-parC	LC495846	FU1-parC
LC495847	FU74-parC	LC495848	FU92-parC	LC495849	FU97-parC
LC495850	FU129-parC	LC495851	SA34-parC	LC495852	SA61-parC
LC495853	FU28-parC	LC495854	TA4-parC	LC495855	OT1-parC
LC495856	FU47-parE	LC495857	FU71-parE	LC495858	FU75-parE
LC495859	FU5-parE	LC495860	SA3-parE	LC495861	SA15-parE
LC495862	SA31-parE	LC495863	FU95-parE	LC495864	FU3-parE
LC495865	FU32-parE	LC495866	FU115-parE	LC495867	SA35-parE
LC495868	SA68-parE	LC495869	FU40-parE	LC495870	SA16-parE
LC495871	SA25-parE	LC495872	FU1-parE	LC495873	FU74-parE
LC495874	FU92-parE	LC495875	FU97-parE	LC495876	FU129-parE
LC495877	SA34-parE	LC495878	SA61-parE	LC495879	FU28-parE
LC495880	TA4-parE	LC495881	OT1-parE	LC500134	FU1_scm
LC500135	FU32_scm	LC500136	FU129_scm	LC500137	SA25_scm
LC500138	SA34_scm				

## 附錄 2. Group II *scm* accession number

Accession number	EntryID	Accession number	EntryID	Accession number	EntryID
LC500134	FU1_scm	LC500135	FU32_scm	LC500136	FU129_scm
LC500137	SA25_scm	LC500138	SA34_scm	LC505637	FU7_scm
LC505638	FU16_scm	LC505639	FU17_scm	LC505640	FU25_scm
LC505641	FU30_scm	LC505642	FU53_scm	LC505643	FU58_scm
LC505644	FU65_scm	LC505645	FU66_scm	LC505646	FU69_scm
LC505647	FU78_scm	LC505648	FU91_scm	LC505649	FU93_scm
LC505650	FU100_scm	LC505651	FU113_scm	LC505652	FU116_scm
LC505653	FU121_scm	LC505654	SA2_scm	LC505655	SA6_scm
LC505656	SA7_scm	LC505657	SA10_scm	LC505658	SA18_scm
LC505659	SA20_scm	LC505660	SA23_scm	LC505661	SA26_scm
LC505662	SA27_scm	LC505663	SA36_scm	LC505664	SA38_scm
LC505665	SA41_scm	LC505666	SA42_scm	LC505667	SA43_scm
LC505668	SA57_scm	LC505669	SA62_scm	LC505670	SA69_scm
LC505671	SA71_scm				

## 謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、また様々な御指導や御助言を賜りました、北里大学 大学院 感染制御科学府・北里大村智記念研究所 感染制御・免疫学大講座 感染症学研究室の高橋 孝 教授に心より御礼申し上げます。

北里大学 薬学部 基礎薬学分野 微生物学教室 岡田 信彦 教授、北里大学 大学院 感染制御科学府・北里大村智記念研究所 感染制御・免疫学大講座 細菌感染制御学研究室 阿部 章夫 教授、北里大学 大学院 感染制御科学府・北里大村智記念研究所 創薬科学大講座 和漢薬物学研究室 清原 寛章 教授、日本薬科大学 生命科学薬学分野 渡邊 峰雄 教授には本論文作成にあたり、ご助言を賜り心より御礼申し上げます。

本研究に用いた菌株を分与して頂き、微生物学的解析に関して種々の御助言、ご協力を賜りましたサンリツセルコバ検査センター 臨床検査部 露木 勇三 先生に深く感謝致します。

実験の御指導、お力添えのみならず多方面に関して御意見を賜り、また相談に快く応じて頂き、生活面でも温かく見守って下さいました、北里大学 大学院 感染制御科学府・北里大村智記念研究所 感染制御・免疫学大講座 感染症学研究室 吉田 春乃 先生、後藤 美江子 先生、日本薬科大学 漢方薬学分野 高野 文英 教授に心から感謝致します。実験や研究のサポートをして頂いた、前田 貴広 氏、栗田 吾郎 氏に感謝申し上げます。

最後に、長きにわたり支援を賜りました、母、親族、友人に心から感謝致します。

2022年3月 福島 康仁