

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

感染制御科学専攻 感染制御・免疫学履修コース 感染症学

DI-19003 福島康仁

[研究背景]

人と動物相互に感染する人獣共通感染症は、World Health Organization (WHO) の提唱した、人・動物・環境を一つとして考え、良い状態へと導く“**One Health**”を実践するにあたり、人と動物の健康を考えるうえで欠くことのできない課題となっている。

その中で、近年では、人と伴侶動物の距離が密接になったことから伴侶動物の保有する病原体が起因菌となる人獣共通感染症の報告がなされている。

伴侶動物の正常細菌叢を構成する犬レンサ球菌(*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。¹

同菌種は、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 β 溶血を示すことを特徴とする。

犬レンサ球菌は、その菌種名のとおり伴侶動物(犬・猫)から高頻度に分離されることが知られており、申請者の先行研究²においても同様の研究成果を報告している。

犬レンサ球菌が分離される臨床材料として、伴侶動物においては、開放膿や耳漏といった非無菌的臨床材料から血液といった多様な臨床材料より分離されることが知られている。一方で、人においても、血液や人工物関連感染症の患者からの分離が報告されており、伴侶動物だけでなく人においても重要な病原体であるといえる。

しかし、犬レンサ球菌の病原性、疫学特性、薬剤耐性機構に関しては、人医療でまず問題となる *S. pyogenes* や *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* と比較して、十分な研究報告がされておらず、人医療、獣医療においてその病原性が十分に認識されていないことに基づく過小評価の恐れがある。

犬レンサ球菌の病原因子としては、同属の溶血性レンサ球菌が保有している病原因子(ストレプトリジン O 等)と同様のものを保有している。

その中でも特に、*Streptococcus canis* M-like protein(SCM)が注目されており、その分子タイピングおよび病原性に関する研究がなされている。

[目的]

申請者は、犬レンサ球菌の人医療、獣医療における臨床的意義を明確なものとし、その微生物学的特性を明らかにすることで、診断および治療における有益な情報を提供することを目的として次の研究を実施した。

1. 犬レンサ球菌が示すフルオロキノロン系薬剤耐性に関するメカニズムの解明
2. 新規 SCM の分子タイピングとその関連因子探索
3. 犬レンサ球菌のバイオフィーム産生能とその関連因子探索

[方法]

本研究においては、2015年および2017年の4-5月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 68株および117株を主たる解析対象とした。比較対照

群として、人血液より分離された犬レンサ球菌^{3,4}と犬血液より分離された犬レンサ球菌⁵および標準菌株 *S. canis* National Collection of Type Cultures 12191^T (NCTC12191^T)を使用した。

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で菌株を保存し実験に使用した。

1. 収集した分離株について(1)Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M100-S22 に基づき、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。(2)抽出した株について、薬剤感受性試験用試薬 Etest®によるフルオロキノロン系 4 薬剤(LVX、Ciprofloxacin (CIP)、Norfloxacin、Moxifloxacin)の感受性試験を行った。この Etest®の判定基準として先行研究⁶と同様に、LVX $> 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ と CIP $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株をフルオロキノロン系薬剤に対して非感受性株と定義した。(3)フルオロキノロン系薬剤非感受性株/感受性株について、フルオロキノロン系薬剤の作用点である DNA ジャイレーズ(*gyrA*, *gyrB*)およびトポイソメラーゼIV(*parC*, *parE*)のキノロン耐性決定領域(Quinolone resistance-determining region, QRDR)の塩基配列を PCR 法およびシーケンス解析により取得し、取得した配列をアミノ酸配列へ変換した。その後、MEGA X (version 10.0.5)搭載の CLUSTAL W によるアライメント解析を行い、変異アミノ酸の同定を行った。さらに、同菌株が保有する各種関連因子(SCM allele type、Multilocus sequence typing (MLST)、薬剤耐性表現型/遺伝子型)とフルオロキノロン系薬剤非感受性株/感受性株の関連性も解析した。

2. 収集した分離株のうち、(1)申請者の先行研究⁷において SCM の配列および SCM allele type の決定を行うことができなかった 40 株およびすでに allele type を決定している比較対照群 52 株を選定した。(2)SCM が決定できていなかった 40 株について先行研究⁸において報告された、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。(3)さらに、同菌株が保有する各種関連因子(MLST、薬剤耐性表現型/遺伝子型)と SCM allele type の関連性も解析した。

3. 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、(1)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^Tについて、バイオフィーム産生能(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^T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関連因子(SCM

allele type、MLST、病原性関連遺伝子プロファイル、薬剤耐性表現型/遺伝子型)と BPA の関連性も解析した。

[結果]

1. 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薬剤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、マクロライド/リンコサミド系薬剤耐性遺伝子、テトラサイクリン系薬剤耐性遺伝子の保有も確認した。

2. 既存の SCM type 1 ($n = 1$)および新規 SCM type10 – 15 の 6type ($n = 39$)を確認した。さらに、allele type 11 および 12 は先行研究⁸において報告されておらず新規 SCM であった。

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⁸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 においてマクロライド系薬剤耐性遺伝子型の分布、フルオロキノロン系薬剤の薬剤耐性率に有意な差を認めた。

3. 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、薬剤耐性遺伝子(テトラサイクリン系薬剤耐性遺伝子)の保有、線毛関連遺伝子 *apl* の保有を確認した。

[考察]

1. 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、人における重要薬剤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、抗菌薬の適正使用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。

2. SCM allele type 11 および 12 は先行研究⁸において報告されておらず新規 SCM 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 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、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。

3. 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高度に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]

本研究の成果より、犬レンサ球菌は、1. 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薬剤への耐性機構を示すことを確認し、2. 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、3. 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、人工物関連感染を引き起こす可能性が示唆された。

本研究の課題として、1)今回研究に使用した分離株の情報(宿主情報、治療経過等)が限られていたため疫学特性を明らかにする上ではさらなる情報収集の上でさらなる解析が必要である点、2)犬レンサ球菌の病原性について *in vivo*、*in vitro* での評価が十分でないことから、その病原性を明らかにする必要がある点があげられる。

最後に、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。

1. 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).
2. **Fukushima, Y.** *et al.* Species identification of β -hemolytic streptococci from diseased companion animals and their antimicrobial resistance data in Japan (2017). *Jpn. J. Infect. Dis.* 72, 94–98 (2019).
3. Taniyama, D. *et al.* Human case of bacteremia caused by *Streptococcus canis* sequence type 9 harboring the *scm* gene. *IDCases* 7, 48–52 (2017).
4. 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).
5. **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)
6. Lin, J. N. *et al.* High prevalence of fluoroquinolone-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* emm12 in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 187–192 (2015).
7. **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).
8. 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).