

[原 著]

*Streptococcus agalactiae* における  $\beta$ -ラクタム系薬剤低感受性化に関する検討

楠木まり<sup>1)</sup>・中村竜也<sup>1)2)</sup>・小林沙織<sup>1)</sup>・小林泰菜<sup>1)</sup>・大沼健一郎<sup>1)</sup>  
矢野美由紀<sup>1)</sup>・直本拓己<sup>1)2)</sup>・中村正邦<sup>1)</sup>・林 伸英<sup>1)</sup>・木村幸司<sup>3)</sup>  
荒川宜親<sup>3)</sup>・吉田弘之<sup>2)</sup>・荒川創一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 神戸大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 神戸大学医学部附属病院感染制御部

<sup>3)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学/耐性菌制御学

(平成 27 年 1 月 30 日受付, 平成 27 年 5 月 7 日受理)

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci : GBS) 感染症の治療には主にペニシリン系抗菌薬が使用されるが, 近年 Penicillin Binding Protein (PBP) の変異による  $\beta$ -ラクタム系薬剤の低感受性化が注目されている。そこで, 2006~2013 年に神戸大学医学部附属病院臨床材料より分離された GBS72 株について PRGBS (GBS with reduced penicillin susceptibility) のスクリーニングを行った。penicillin G (PCG) の MIC は全株  $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$  で上昇は認められなかった。ceftibuten (CETB) を用いたディスク拡散法にて, 阻止円径は 15~21 mm に分布し, 72 株中 33 株で阻止円内にコロニーの発育を認めた。阻止円内コロニーを増菌し再度 CETB を用いたディスク拡散法を行うと阻止円を形成しなかった。この現象が確認された任意の 6 株では, PBP2X に S353Y, I373N, T394I, F399V のアミノ酸置換を認めた。これらは PRGBS の PBP2X において過去に報告されたものと同一かその近傍のアミノ酸置換であったが, PRGBS の PBP2X に特徴的な置換である V405A や Q557E は検出されなかった。以上より, これらの現象は  $\beta$ -ラクタム系薬剤低感受性化の前段階を捉えている可能性が示唆された。

**Key words:** PRGBS, PBP2X, ceftibuten disk,  $\beta$ -lactam

序 文

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci : GBS) は腔内および腸管の常在菌であると同時に, 敗血症や髄膜炎, 皮膚軟部組織感染症等の原因菌として知られ, 特に新生児および免疫抑制状態の高齢者において重篤な感染症を引き起こすと言われている<sup>1)~3)</sup>。また, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) は妊娠 35~37 週の妊婦に対して, 腔および直腸の GBS スクリーニングの実施を推奨しており, GBS 陽性の場合, 新生児髄膜炎の予防目的で分娩時

母体に対するペニシリン系抗菌薬投与が一般化している<sup>4)</sup>。さらに, GBS による感染症治療にもペニシリン系抗菌薬が第一選択薬として用いられていることが多い。しかし, 近年, PBP2X のアミノ酸置換によるペニシリン低感受性の GBS (PRGBS : GBS with reduced penicillin susceptibility) の存在が報告された<sup>5)~8)</sup>。これらの論文報告を受け, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) では,  $\beta$  溶血性連鎖球菌に対する薬剤感受性試験コメントの中で, penicillin G (PCG) の MIC が  $>0.12 \mu\text{g/mL}$ , あるいは ampicillin (ABPC) の MIC が  $>0.25 \mu\text{g/mL}$  と判定される菌株は非感受性と報告するとの追記がなされ<sup>9)</sup>, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) では PCG の耐性ブレイクポイントの設定に至った<sup>10)~12)</sup>。また, Nagano らは PRGBS だけではなく, セフェム系薬剤に低感受性を示す Penicillin susceptible GBS (PSGBS) の存在も報告している<sup>11)12)</sup>。

著者連絡先 : (〒650-0017) 神戸市中央区楠町 7-5-2  
神戸大学医学部附属病院検査部  
楠木まり  
TEL: 078-382-6314  
FAX: 078-382-6348  
E-mail: hyakuta@med.kobe-u.ac.jp

これらβ-ラクタム系薬剤低感受性化を呈すGBSの出現は、今後GBSによる感染予防および治療の面で大きな問題となる可能性を示唆しており、その動向を把握することが重要である。今回、我々は神戸大学医学部附属病院において各種臨床材料から分離されたGBSを対象に薬剤感受性試験、血清型別判定およびPRGBSのスクリーニング試験を施行し、その検出背景について検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 対象

2006年4月～2013年7月に神戸大学医学部附属病院において各種臨床材料から分離されたGBS72株とした。材料の年齢構成は0～93歳、男女比は34：38、入院・外来比は42：30、材料の内訳は、膈分泌物18株(25.0%)、血液17株(23.6%)、尿13株(18.1%)、創部・膿8株(11.1%)、外耳道4株(5.5%)、呼吸器系4株(5.5%)、臍部擦過物3株(4.2%)、組織2株(2.8%)、耳漏2株(2.8%)、関節液1株(1.4%)であった。

### 2. GBSの同定

ストレプトコッカス群別キット「ユニブルー」(関東化学)を用いてランスフィールド分類Group Bを確認した後、Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper system: Bruker)を用いて同定した。

### 3. 血清型別

Poyartらの方法<sup>13)</sup>に準じ、血清型Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIIIを識別可能なプライマーを用いてPCR法により行った。DNAの抽出は、シカジーニアスDNA抽出試薬(関東化学)を用いた。増幅パラメータは、94℃、10分間反応後、denature: 94℃、30秒、annealing: 60℃、30秒、extension: 72℃、1分を35サイクル実施後、その後72℃、5分とした。増幅産物は、3%アガロースゲル電気泳動を用いエチジンプロマイド染色により確認した。

### 4. 薬剤感受性

CLSI法<sup>9)</sup>に準じ、35℃、20～24時間好気培養を行い、PCG, ABPC, cefotaxime (CTX), meropenem (MEPM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), azithromycin (AZM), minocycline (MINO), levofloxacin (LVFX) および vancomycin (VCM) の10薬剤について、微量液体希釈法によるMICを測定した。使用培地は極東ウマ溶血液加ミューラーヒントンプロス(極東製薬工業株式会社)、薬剤感受性パネルはオ

プトパネルMP(極東製薬工業株式会社)を用いた。

### 5. PRGBSのスクリーニング

Kimuraらの方法<sup>14)</sup>に準じ、5%ヒツジ血液入りミューラーヒントン寒天培地(Becton Dickinson)およびceftibuten (CETB) disk (30μg含有: 栄研化学)を用いてディスク拡散法を行い、20～24時間培養後の阻止円径を計測した。また、スクリーニングのカットオフ値は20mmと設定した。PBP2X遺伝子のシーケンス解析は名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学/耐性菌制御学教室で実施した。

## 結果

### 1. 血清型別

血清型別ではIa型が15株と最も多く(20.8%)、次いでIII型12株(16.7%)、V型10株(13.9%)、II型7株(9.7%)、VI型4株(5.5%)、VIII型3株(4.2%)、Ib型2株(2.8%)、IV型1株(1.4%)の順で、判定不能(Nontypable: NT)は18株(25.0%)であった。

### 2. 薬剤感受性試験

感性率およびMIC<sub>50/90</sub>をTable 1に示した。β-ラクタム系抗菌薬はABPCを除き100%感性であった。CLDMの感性率は90.3%であったが、D-test陽性は7株存在した。LVFX(69.4%)、MINO(41.7%)は他の薬剤と比較して低い感性率であった。

### 3. CETB diskによるPRGBSのスクリーニング

CETB阻止円径は15～21mmに分布した。阻止円径が20mm未満の株は57株(79.2%)で、内PCGのMICが0.06μg/mLの株は25株(43.9%)、0.12μg/mLの株は32株(56.1%)であったが(Fig. 1)、PRGBSは認められなかった。また、血清型とCETB diskの阻止円径に関連性は認められなかった。72株中33株(45.8%)は阻止円径の大きさに関わらず、CETB阻止円内にコロニーの発育が見られ、その阻止円内のコロニーを増菌し、再度CETBによるディスク拡散法を行うと、阻止円を全く形成しなかった(Fig. 2)。この33株の血清型および由来材料に関連性は認められなかった(Table 2)。

### 4. PBP2X遺伝子のシーケンス解析

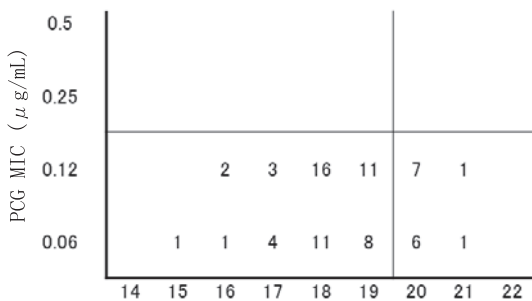
Fig. 2のようにCETB diskに全く阻止円を形成しなかった任意の6株についてPBP2X遺伝子のシーケンス解析を実施したところ、S353Y, I373N, T394I, F399Vのアミノ酸置換が認められた。これらは、PRGBSのPBP2Xにおいてこれまでに報告されてきたものと同<sup>5)6)</sup>のアミノ酸置換あるいはその近傍のアミノ酸置換であった。しかし、PRGBSのPBP2Xに

Table 1. Distribution of MIC<sub>50/90</sub> of 10 antibiotics for 72 clinical isolates

Antimicrobial	MIC range (μg/mL)	MIC <sub>50/90</sub> (μg/mL)	Susceptibility rates* (%)
PCG	0.06-0.12	0.12/0.12	100
ABPC	0.25-0.5	0.25/0.25	91.7
CTX	0.06-0.12	0.12/0.12	100
MEPM	0.03-0.12	0.06/0.06	100
EM	<0.06->8	<0.06/4	77.8
CLDM	<0.06->8	<0.06/0.25	90.3
AZM	<0.06->8	<0.06/4	77.8
MINO	<0.06->8	8/>8	41.7
LVFX	0.5->8	1/>8	69.4
VCM	0.25-0.5	0.5/0.5	100

PCG: penicillin G, ABPC: ampicillin, CTX: cefotaxime, MEPM: meropenem, EM: erythromycin, CLDM: clindamycin, AZM: azithromycin, MINO: minocycline, LVFX: levofloxacin, VCM: vancomycin

\*Susceptibility rates was determined according to the protocol recommended by the CLSI in document M100-S23.



Zones of Inhibition 30 μg ceftibuten disks (mm)

Fig. 1. Scatter diagram of MICs and the size of the growth-inhibition zone using CETB disks

PCG MICs was determined according to the protocol recommended by the CLSI in document M100-S23 and diameters of the growth-inhibitory zone measured by CLSI-recommended standard disk diffusion method.

共通して認められるアミノ酸置換である V405A や Q557E<sup>5)~8)</sup>は検出されなかった (Table 3)。

## 考 察

β-ラクタム系抗菌薬の作用点である細胞壁合成酵素は、ペニシリンとの結合親和性が強いことから PBP と呼ばれ、β-ラクタム系抗菌薬と結合することによってその酵素活性が失活し、菌の細胞壁伸長、隔壁合成等が阻害され、最終的に菌は破裂し死滅する<sup>15)</sup>。PBP をコードする遺伝子上に生じた塩基変異がアミノ酸レ

ベルの置換となるような PBP の変化が生じると、β-ラクタム系抗菌薬との親和性が低下し耐性を示す<sup>16)</sup>。これまでに報告された PRGBS は、そのほとんどが PBP2X に V405A と Q557E のいずれか一方または両方のアミノ酸置換を獲得し<sup>5)~8)</sup>、これらのアミノ酸置換が PRGBS の β-ラクタム系抗菌薬低感受性化の主たる原因であることが報告されている<sup>5)8)</sup>。今回の検討では PRGBS は検出されなかった。国内で報告のあった PRGBS のスクリーニングでは 20~24 時間培養後の CETB 阻止円径はほとんどが 10 mm 以下であるが、19 mm の株も確認されている<sup>14)</sup>。今回、初代分離での CETB 阻止円径はカットオフである 20 mm を下回る菌株も多数存在したが、阻止円径 15 mm 未満の菌株はなく、PCG の MIC 上昇も認められなかった。また、PRGBS はペニシリン系のみならずセフェム系薬剤である CTX の MIC 上昇も認めているが<sup>5)6)</sup>、今回の検討では CTX の MIC 上昇は認められなかった。PRGBS は高齢者の呼吸器系材料から多く検出され<sup>5)6)8)12)17)18)</sup>、その血清型は VI 型が多い<sup>17)18)</sup>。今回、呼吸器系材料由来株は少なかったこと、血清型の分布も Ia, III, V 型が多くを占めたことも PRGBS が検出されなかった一因と考えられる。

しかし、高頻度に CETB 阻止円内に発育したコロニー、すなわち CETB の阻止円を形成しない PSGBS (CETB 耐性 PSGBS) の存在を認めた。その血清型および由来材料に関連性は認められず、あらゆる臨床由来材料にて検出されることが示唆された。また、その株の PBP2X には、これまでに報告のあった PRGBS

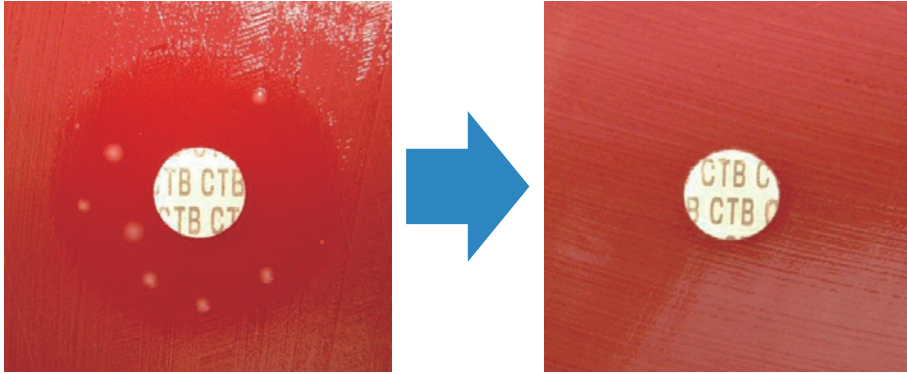


Fig. 2. Disk diffusion method using CETB disk

Colonies grew in the growth-inhibitory zone using CETB disk ( $n=33$ , left panel). Screening test of detecting PRGBS was performed again after purified culture of these colonies. No growth inhibition zone around CETB disk appeared (right panel).

Table 2. Relationship between specimen and GBS serotype in 33 CETB non-susceptible PSGBS

Specimen	No. of isolates								total
	Ia	Ib	II	III	V	VI	VIII	NT	
blood	1	1	2	2	1			3	10
vagina	1		1	3	1		1	2	9
urine	1		1		1		1	2	6
umbilicus	1							1	2
tissue			1	1					2
ear canal	1								1
respiratory system						1			1
wound · pus								1	1
joint fluid								1	1
total	5	1	5	6	3	1	2	10	33

と同じアミノ酸あるいは近傍のアミノ酸置換が確認された。そのアミノ酸置換には PRGBS に共通して認められる V405E や Q557E は検出されなかったため、PCG を含む  $\beta$ -ラクタム系薬剤の MIC 上昇には至らなかったと考えられた。CETB 耐性 PSGBS の存在は Nagano らの報告<sup>11)12)</sup>でも検証され、PBP2X のアミノ酸置換が CETB の阻止円を形成しない原因となったことが示唆された。その報告では、CETB の阻止円を形成しない PSGBS (CTB'PSGBS) が検出された同一患者から数日後に PRGBS が分離されているが、CTB'PSGBS と PRGBS の起源は同じで、同一クローンの PSGBS からそれぞれ独立して CTB'PSGBS と PRGBS が派生したと推測されている。しかし、実際我々は、20~24 時間培養では CETB の阻止円内にコロニーの発育を認めなかった PSGBS18 株において、14 日間の CETB 存在下で CETB の阻止円内にコロ

ニーの発育を認め、その阻止円内コロニーを増菌して再度 CETB によるディスク拡散法を行うと、20~24 時間培養にて CETB に全く阻止円を形成しなかった事実や、20~24 時間培養にて CETB 耐性 PSGBS となった任意の株において、ABPC によるディスク拡散法を行っても阻止円内にコロニーは発育しなかった事実を経験した (データ非公開)。以上より、今回は CETB 下 14 日間培養後のペニシリン系薬剤を含む  $\beta$ -ラクタム系薬剤の MIC は測定していないが、CETB に長期間晒されることで徐々に CETB 耐性が選択された可能性、すなわち CETB が GBS において PBP2X 遺伝子変異を起こしやすい可能性が推測される現象であると示唆された。高齢者の呼吸器系材料から PRGBS が多く検出されるのも、経口セフェム系抗菌薬が上気道感染症などに汎用され、長期にわたる曝露によって PBP 遺伝子変異を獲得した可能性が理由の一つとし

Table 3. Amino acid substitutions in PBP2X of 6 CETB non-susceptible PSGBS

Isolates	Amino acid substitutions in PBP2X						MIC (μg/mL)			CETB* (mm)		
							PCG	ABPC	CTX			
PRGBS												
B1	-	-	-	-	F399I	-	Q557E	0.5	0.12	2	6	Previous reports <sup>5)6)14)</sup>
B60	-	-	-	T394A	-	-	Q557E	0.25	0.25	0.25	6	
M16	-	-	-	-	-	-	Q557E				19	
R6	-	-	A374V	-	-	V405A	-	0.5	0.5	0.5		
R7	S353F	-	-	-	-	-	Q557E	1	0.5	1		
PSGBS with no growth-inhibitory zone of CETB disk												
No. 29	-	-	-	-	F399V	-	-	0.12	0.25	0.12	21	This study
No. 36	-	-	-	-	F399V	-	-	0.12	0.25	0.12	19	
No. 48	-	-	-	T394I	-	-	-	0.12	0.25	0.12	16	
No. 56	-	I373N	-	-	-	-	-	0.12	0.5	0.12	19	
No. 62	S353Y	-	-	-	-	-	-	0.12	0.25	0.12	18	
No. 70	-	-	-	-	F399V	-	-	0.12	0.25	0.12	18	

PCG: penicillin G, ABPC: ampicillin, CTX: cefotaxime, CETB: ceftibuten

\*Diameter of growth-inhibitory zone with 1st time CETB disk method

て考えられた。現在までに妊婦の膣分泌物や新生児の髄液から PRGBS が検出されたという報告はないが、今回我々の検討にて、血液や膣分泌物、尿、膿から CETB 耐性 PSGBS が多数検出されており、これに抗菌薬曝露など何らかの要因が加わって PRGBS へと変化する可能性も否定できない。また、過去には PRGBS に特徴的なアミノ酸置換である V405E や Q557E は認められないが今回のアミノ酸置換と同様のアミノ酸置換を有する PRGBS も報告されている<sup>14)</sup>ため、今後更なる詳細な検討が必要である。

日本産科婦人科学会のガイドライン<sup>19)</sup>では、GBS 陽性妊婦の出産時における母子垂直感染の予防にはペニシリン系抗菌薬の投与が有用、CDC では ABPC の投与が推奨されていることから、一般的に ABPC が予防投与される頻度が高い。しかし、GBS 感染症治療では、第一選択とされている ABPC や CTX 投与例においても予後不良の場合が少なくないとの報告<sup>20)</sup>や、CETB 耐性 PSGBS の出現はペニシリン系薬剤に感性であっても必ずしもセフェム系薬剤を含む他のβ-ラクタム系薬剤に感性であるとは限らないとの報告<sup>11)</sup>があり、重篤な GBS 感染においては PRGBS スクリーニングを含めた薬剤感受性試験が重要であると考えられた。また、近年では PRGBS の中には、キノロン耐性やマクロライド系、リンコマイシン系、テトラサイクリン系にも耐性を獲得した多剤耐性株が存在し、医療施設内で院内伝播した例も報告されている<sup>12)18)</sup>。今回の検討においても、β-ラクタム系以外の抗菌薬に

は耐性率が高い傾向にあるため、GBS の多剤耐性化を助長しない適正な抗菌薬の使用法の検討が必要になると考えられた。

**謝辞：**本研究のうち、菌株の遺伝子解析に関しては、厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症事業「新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究」(H24-新興一般-010) の支援を受け行いました。ここに謝意を表します。

**利益相反：**この研究に関して申告すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Regan, J.A., M.A. Klebanoff, R.P. Nugent, et al. 1991. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 77: 604-610.
- 2) Baker, C.J. 2000. Group B streptococcal infections. p. 222-237. In: *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis* (D.L. Stevens, E.L. Kaplan ed.), Oxford University Press, Oxford, England.
- 3) Farley, M.M., R.C. Harvey, T. Stull, et al. 1993. A population-based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in nonpregnant adults. *N. Engl. J. med.* 328: 1807-1811.
- 4) Schrag, S., R. Gorwitz, K. Fulz-Butts, et al. 2002. Pre-

- vention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51: 1-22.
- 5) Kimura, K., S. Suzuki, J. Wachino, et al. 2008. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2890-2897.
  - 6) Nagano, N., Y. Nagano, K. Kimura, et al. 2008. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4258-4267.
  - 7) Dahesh, S., M.E. Hensler, N.M. Van Sorge, et al. 2008. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2915-2918.
  - 8) 木村幸司, 荒川宜親. 2008. ペニシリン低感受性B群連鎖球菌. *小児感染免疫* 20: 312-316.
  - 9) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA.
  - 10) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 4.0, valid from 2014-01-01.
  - 11) Nagano, N., Y. Nagano, M. Toyama, et al. 2014. Penicillin-susceptible Group B Streptococcal Clinical Isolates with Reduced Cephalosporin susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 52: 3406-3410.
  - 12) 長野則之, 長野由紀子. 2014. 薬剤感受性結果判読講座  $\beta$ -Streptococcus. *Medical Technology* 42: 600-603.
  - 13) Poyart, C., A. Tazi, H. Reglier-Poupet, et al. 2007. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1985-1988.
  - 14) Kimura, K., J. Wachino, K. Kurokawa, et al. 2009. Practical Disk Diffusion Test for Detecting Group B Streptococcus with Reduced Penicillin Susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 47: 4154-4157.
  - 15) 石井良和. 2014.  $\beta$ -ラクタマーゼの機能分類. *日微生物誌* 24: 171-179.
  - 16) 生方公子. 2006. 呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化. *日本化学療法学会雑誌* 54: 69-94.
  - 17) Kimura, K., N. Nagano, Y. Nagano, et al. 2011. Prevalence of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2460-2464.
  - 18) Nagano, N., Y. Nagano, M. Toyama, et al. 2012. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 849-856.
  - 19) 日本産科婦人科学会, 日本産婦人科医会編. 産婦人科診療ガイドライン産科編 2011. p. 239-241.
  - 20) 坂田 宏. 2008. 小児におけるB群連鎖菌感染症の臨床的検討. *感染症学雑誌* 82: 633-636.

Detection of Group B Streptococci with Reduced  $\beta$ -lactam agents Susceptibility

Mari Kusuki<sup>1)</sup>, Tatsuya Nakamura<sup>1)2)</sup>, Saori Kobayashi<sup>1)</sup>, Yasuna Kobayashi<sup>1)</sup>, Kenichiro Ohnuma<sup>1)</sup>,  
Miyuki Yano<sup>1)</sup>, Takumi Jikimoto<sup>1)2)</sup>, Masakuni Nakamura<sup>1)</sup>, Nobuhide Hayashi<sup>1)</sup>, Kouji Kimura<sup>3)</sup>,  
Yoshichika Arakawa<sup>3)</sup>, Hiroyuki Yoshida<sup>2)</sup>, Soichi Arakawa<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Kobe University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Infection Control and Prevention, Kobe University Hospital

<sup>3)</sup>Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

*Streptococcus agalactiae* (group B streptococci: GBS) causes serious infections in neonates, and elderly people. Penicillins are the first-line drug for the treatment of GBS infections, since all clinically isolated GBS have been considered uniformly susceptible to  $\beta$ -lactams, including penicillins. Recently, GBS isolates with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) were reported, then we investigated the PRGBS in clinical specimens of our hospital. There was no PRGBS among 72 GBS isolates, however, 33 GBS isolates formed colonies in the growth-inhibition zone around ceftibuten disk. We sequenced PBP2X genes of 6 GBS isolates randomly chosen from these 33 isolates. Amino acid substitutions, S353Y, I373N, T394I and F399V were found in their PBP2X. These substitutions are identical or found in neighboring positions to those reported in PBP2X of PRGBS, though neither V405A nor Q557E, key substitutions of PRGBS, was found. In this study, we found the amino acid substitutions of PBP in GBS are diverse, and this observation may indicate the presence of prodromal stage for PRGBS.