

[短 報]

血液培養から分離されたフルオロキノロン高度耐性のムコイド型
Streptococcus pyogenes の耐性遺伝子解析川口 亮¹⁾・松尾啓左¹⁾・生方公子²⁾¹⁾ 医療法人白十字会 佐世保中央病院 臨床検査技術部²⁾ 北里大学大学院感染制御科学府 & 北里生命科学研究所
病原微生物分子疫学研究室

(平成 22 年 1 月 22 日受付, 平成 22 年 4 月 19 日受理)

蜂窩織炎にて入院中の成人女性に施行された血液培養よりムコイド型を示す *Streptococcus pyogenes* を分離した。本例は基礎疾患として全身性エリテマトーデスを有していた。分離された *S. pyogenes* はフルオロキノロン高度耐性株で, DNA ジャイレースをコードする *gyrA* とトポイソメラーゼをコードする *parC* 遺伝子上のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region) に変異が認められた。すなわち, *gyrA* 遺伝子におけるセリン (Ser)81 のフェニルアラニン (Phe) へのアミノ酸置換, および *parC* 遺伝子変異における Ser79 の Phe へのアミノ酸置換であった。成人に対するニューキノロン系薬の使用量増加に伴い, 今後耐性菌の増加が懸念される。その動向には十分注意する必要がある。

Key words: *Streptococcus pyogenes*, fluoroquinolone resistance, *gerA* gene, *parC* gene

序 文

A 群溶血性レンサ球菌, すなわち *Streptococcus pyogenes* (GAS) は, 主に小児に対し咽頭/扁桃炎や膿痂疹などの化膿性疾患を引き起こすポピュラーな細菌であるが, 1980 年代の後半, 欧米において劇症型溶血性連鎖球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) が報告され, 本菌は再び注目されるようになった。この菌による劇症型感染症は, 本邦においても 1993 年に清水ら¹⁾によって報告されて以来, 年間数十名の患者が第 5 類感染症として報告されており, 致死率は高いとされている (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/str2008-1.pdf>)。そのほかにも, しばしば蜂窩織炎, 蜂巣炎, 化膿性関節炎, あるいは敗血症など各種の侵襲性感染症を引き起こすことで知られる。

本菌に対し, β -ラクタム系薬は優れた感受性を示し, 今までに耐性菌の出現は報告されていない。しかし, 経口抗菌薬のマクロライド系 (ML) 薬やフルオロキノロン系 (FQ) 薬には, 耐性菌が見られることがすでに欧米においてはいくつか報告されている^{2~4)}。特に, 成人の呼吸器感染症に対し, 我が国よりもこれらの抗菌薬を使用する機会の多いことがその引き金になっていると思われる。

私たちの検査室においては, 2007 年に蜂窩織炎の診断で入院となった症例の血液から分離された GAS が薬剤感受性検査の結果, 明らかな FQ 耐性と判定され, しかも当該菌はムコイド型であった。つづいて行った FQ 耐性化にかかわる遺伝子解析では, 耐性化にかかわるとされる遺伝子領域に変異があり, アミノ酸置換も確認された。

この論文においては, i) FQ 耐性の GAS が分離された症例の入院後の臨床経過と抗菌薬の使用状況, ii) FQ 耐性化にかかわる遺伝子解析, iii) 病原性にかかわる菌体表層の M タンパクをコードする *emm* 遺伝子解析の成績について報告する。

著者連絡先: (〒857-1195) 長崎県佐世保市大和町 15 番地
医療法人白十字会 佐世保中央病院
臨床検査技術部微生物検査室
川口 亮
TEL: 0956-33-8597
FAX: 0956-33-1552
E-mail: sch-kensa@hakujujikai.or.jp

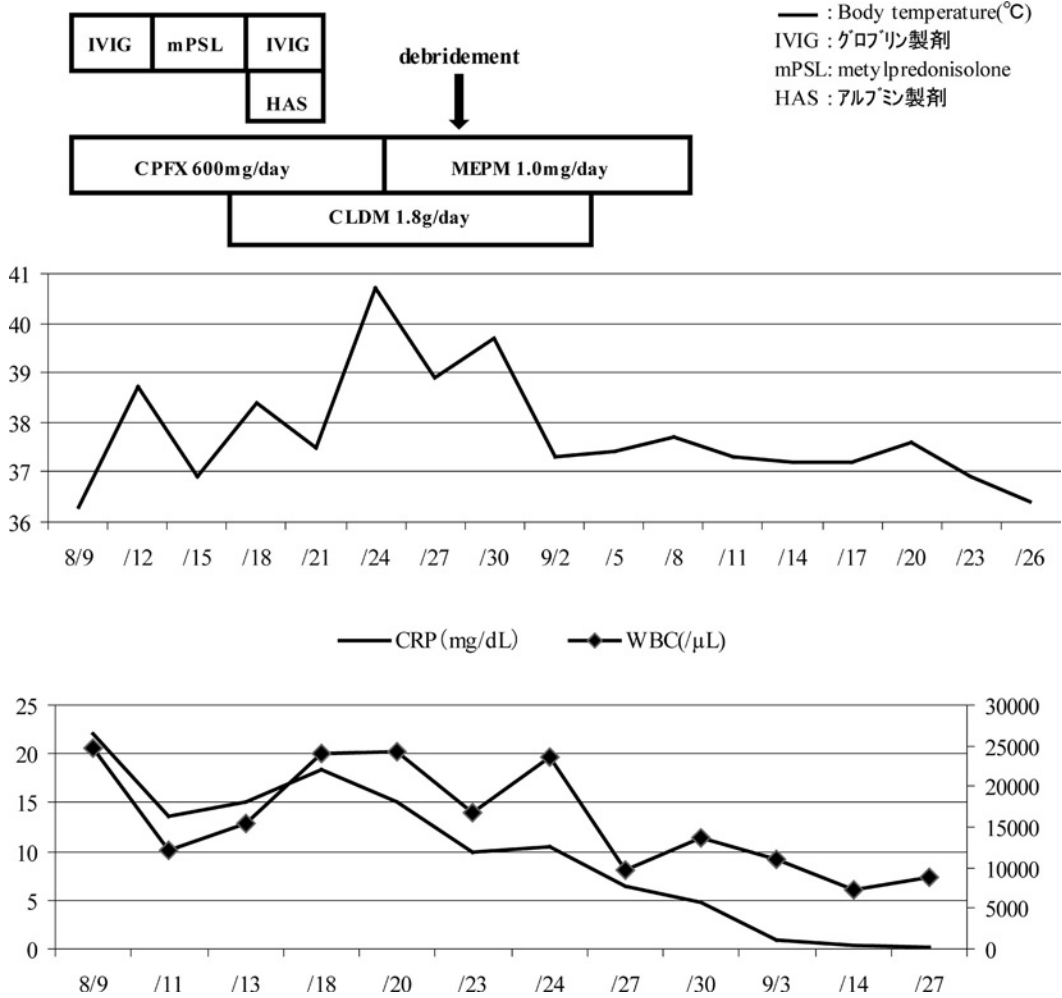


図 1. 対象症例における入院後の臨床経過

対象症例と方法

1) 症例

症例は既往歴として全身性エリテマトーデスを基礎疾患として有し、2002年2月から当病院内科を受診していた。この間、抗菌薬の治療は年に数回 cefdinir (CFDN) を、2005年6月の入院の際には imipenem/cilastatin (IPM/CS) が投薬されていたが、FQ の投与歴はなかった。

2007年8月9日、蜂窩織炎の診断にて内科に入院となった。入院後の臨床経過を図1に示す。入院時の血液検査所見は、WBC: 24,700/μl, CRP: 22.1 mg/dl, PLT: 20.5×10⁴/μl, BUN: 44.2 mg/dl, Cr: 3.92 mg/dl であり、炎症反応と腎機能障害を認めた。入院時には、細菌検査は施行されていなかった。入院後 ciproflox-

acin (CPFX) が9日間投与された。しかし、解熱しないことから、この時点で血液培養が実施され、次項で述べる GAS が分離された。その際の血液検査所見では、WBC: 24,000/μl, CRP: 18.4 mg/dl, PLT: 30.2×10⁴/μl, BUN: 43.6 mg/dl, Cr: 1.39 mg/dl であった。細菌検査結果に基づき、抗菌薬は meropenem (MEPM) へと変更され、9月28日に軽快退院となった。

2) 細菌学的検査と薬剤感受性試験

当検査室の血液培養は、BACTEC92F 好気用レズンボトルと 93F 嫌気用レズンボトル (日本ベクトンデッキンソン) を使用した BACTEC9050 システム (日本ベクトンデッキンソン) にて行われている。陽性反応を示した血液培養ボトルの液からは血液寒天培地上に図2に示すムコイド型のコロニーが発育してき



図2. 分離されたムコイド型 *Streptococcus pyogenes*
 使用培地: Sheep Blood Agar (日本ベクトン
 デッキンソン)
 培養条件: 5%炭酸ガス培養, 20 時間

た。コロニーは当検査室のマニュアルに従い, i) Lancefield group A 抗原凝集試験陽性 (セロアイデンストレプトキット, 栄研化学), ii) 連鎖球菌同定キット (API 20 Strep, シスメックス・バイオメリュー) に基づき GAS と同定された。

薬剤感受性試験は MicroScan MF3J パネル (シーメンス) を用い, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準に従い測定したところ, levofloxacin (LVFX) に $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性を示した。このため, 改めて CLSI の測定方法 (M100-S18, 2008) に準じて感受性を測定した。

3) FQ 耐性遺伝子の解析

FQ 耐性には DNA ジャイレースをコードする *gyrA* 遺伝子と *gyrB* 遺伝子, トポイソメラーゼ IV をコードする *parC* および *parE* 遺伝子のいずれかの変異が関与している。

このため, それぞれの遺伝子における変異の有無は, GAS で報告⁵⁾されている 4 種類のプライマーセットを用いた PCR を行い, 鋳型 DNA を増幅した。DNA 増幅反応の条件は $94^\circ\text{C}:5$ 分の熱変性後, $94^\circ\text{C}:30$ 秒, $52^\circ\text{C}:30$ 秒, $72^\circ\text{C}:30$ 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル実施, 最後に 72°C の伸長反応を 10 分行った。

DNA 増幅産物は, QIA quick PCR purification Kit (Qiagen) を使用して精製し, シークエンス反応用テンプレート液とした。シークエンス反応および反応生成物の精製は既報⁵⁾に従った。

表 1. 分離された *Streptococcus pyogenes* の薬剤感受性

抗菌薬	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Amoxicillin	≤ 0.015
Cefditoren	≤ 0.015
Cefotaxime	≤ 0.03
Imipenem	≤ 0.015
Erythromycin	≤ 0.25
Clindamycin	≤ 0.25
Tetracycline	≤ 0.25
Vancomycin	0.5
Levofloxacin	32
Ciprofloxacin	32

シークエンスには ABI PRISM 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan) を使用した。得られた配列は vector NTI v.10 (Invitrogen) を用いてアミノ酸配列へ翻訳し, 既知配列とのアラインメントでアミノ酸置換の有無とその位置を解析した。

対象とした既知配列の GenBank number は, *gyrA*: AF220945, *gyrB*: AE006524, *parC*: AF220946, *parE*: AE006540 である。

4) *emm* 遺伝子解析

M タンパクをコードする *emm* 遺伝子のシークエンスにはすでに報告⁵⁾されたプライマーを使用して DNA を増幅した後, 3) 項に準じてシークエンスを行った。得られた結果のうち, N 末端側の 300 bp の塩基配列結果を Centers for disease control and prevention (CDC) の *Streptococcus pyogenes* Database (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.html>) へ送信し, *emm* 遺伝子の相同性を検索した。解析結果は電子メールにて返却されてきた。*emm* 型は Beall らの定義⁶⁾に従い, 塩基配列が 95% 以上の相同性を示すことを基準とした。

結 果

1) 分離株の薬剤感受性

表 1 には血液培養より分離された GAS の微量液体希釈法による薬剤感受性成績を示す。 β -ラクタム系薬, vancomycin, マクロライド系薬, tetracycline には感性であったが, LVFX および CPFX の MIC は $32 \text{ mg}/\text{ml}$ であり, FQ 高度耐性と判定された。

2) 分離株の FQ 耐性遺伝子解析

分離された GAS 株の FQ 耐性にかかわる *gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (QRDR) を解析した成績は図 3 に示す。シークエンス解析結果をアミノ酸配列に置換し, GenBank に登

GyrA

		1		100
NC_002737	gyrA	(1)	MODRNLIDVNLTSEMKTSFIDYAMSVIVARALPDVDRGLKPVHRRILYGMNELGVTPDKPHKKSARITGDVMGKYHPHGDSIYEAMVRMAQWWSYRHML	
RE497	gyrA	(1)	-----LKPVHRRILYGMNELGVTPDKPHKKSARITGDVMGKYHPHGDFSIEAMVRMAQWWSYRHML	
		101		200
NC_002737	gyrA	(101)	VDGHGNFGSMDGGAAQRYTEARMSKIALELLRDINKNTVNFQDNYDGSEREPVLPARFPNLLVNGATGIVAGMATNIPPHNLAESIDAVKVMVEHPD	
RE497	gyrA	(63)	VDGHGNFGSMDGGAAQRYTEARMSKIALELLRDINKNTVNFQDNYDGSEREPVV-----	

ParC

		1		100
NC_002737	parC	(1)	MSNIQMSLEDIMGERFGRYSKYIIQERALPDIRDGLKPVQRRILYSMNKDGNTFEKGYRKSASVGNIMGNFHPHGDSIYDAMVRMSQDWKNREILVE	
RE497	parC	(1)	-----FGRYSKYIIQERALPDIRDGLKPVQRRILYSMNKDGNTFEKGYRKSASVGNIMGNFHPHGDFSIEYDAMVRMSQDWKNREILVE	
		101		200
NC_002737	parC	(101)	MHGNNGSMDGPPAAMRYTEARLSEIAGYLLQDIKNTVNFQDNYDGSEREPVLPAAFPNLLVNGSSGISAGYATDIPPHNLSVIVAVVYMIIDHPKAS	
RE497	parC	(86)	MHGNNGSMDGPPAAMRYTEARLSEIAGYLLQDIKNTVNFQDNYDGSEREPV-----	

図3. 分離株の耐性遺伝子塩基配列解析

録された対象株のそれと比較した。

その結果、当該株は *gyrA* 遺伝子にコードされた DNA ジャイレースのサブユニット A (GyrA) のアミノ酸 Ser81 が Phe へ、*parC* 遺伝子にコードされたトポイソメラーゼ IV のサブユニット A (ParC) のアミノ酸 Ser79 が Phe へと置換していた。

3) 分離株の *emm* 型

対象症例と方法に述べた方法に従って *emm* 遺伝子を解析し、CDC のレファレンスセンターの集積データとマッチングした。その結果、当該株 (RE497) は、99% の確率で *emm11* 型と判定された。

考 察

FQ 高度耐性の GAS 株の出現は 2000 年に米国で報告²⁾されて以来、欧州でもその出現が報告^{3,4)}されている。GAS 株の FQ 高度耐性メカニズムは、*gyrA* と *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (QRDR) 中、最低 2 カ所、つまり前者のアミノ酸 Ser81 と後者の Ser79 の変異に起因するとされる。今回、私たちが分離して解析した株も同様の変異を有していた。

我が国で分離された侵襲性感染症由来 GAS 株についての輪島らの報告⁵⁾では、感性菌が示す 0.5 μg/ml の MIC から 2~4 μg/ml へと FQ 感受性が低下している株が 15% 認められている。そして、それらの株では ParC の QRDR 領域に Ser79 のアミノ酸置換を有していることが明らかにされている。しかもそれらは、疫学的には *emm6* 型と *emm11* 型に高い比率で認められたと報告されている。

また、第 19 回日本臨床微生物学会総会で行われた

アナライザーワークショップ「侵襲性の β-溶血性連鎖球菌感染症」においても、このような軽度耐性株が 16% 認められているが、高度耐性株は見いだされていなかった⁷⁾。

今回の対象例は基礎疾患を有していたものの、蜂窩織炎を発症しており、菌の病原性は明らかであった。菌株は *emm11* 型の FQ 高度耐性株であったが、上述したようなすでに存在していた軽度耐性の *emm11* 型株が *gyrA* 遺伝子上に変異を獲得し、その結果新たなアミノ酸置換が生じて FQ に高度耐性化したのではないかと推定された。

注目されるのは、当該株は入院症例に対し CPFx が 9 日間投与された後に実施された血液培養から分離されたことである。残念ながら、入院時に細菌検査が施行されなかったため、最初から FQ 高度耐性の GAS 株であったのか、あるいは治療中に mutant selection が生じて高度耐性化したのかは不明である。しかし、入院後の治療中に mutant selection が生じた可能性は否定できないであろう。

GAS の疫学解析には、従来、日本で実施されていた T 型別に代わり、*emm* 型別が世界的に主流となっている。その理由は、*emm* 遺伝子にコードされる M タンパクは、アミノ酸 500 前後の菌体表層から繊維状に伸びたタンパクで、菌がヒト上皮細胞に付着し病原性を発揮するうえで重要な因子であることが知られているためである。侵襲性感染症由来株には *emm1* 型、*emm3* 型、*emm11* 型などが圧倒的に多く、咽頭/扁桃炎などの非侵襲性感染症由来株では *emm4* 型や *emm12* 型が多い^{5,7)}。しかも前者の型では血液寒天培地上

でムコイド型コロニーを呈する場合が多いことが知られている。ただし、このようなムコイド株が FQ 高度耐性を獲得しやすいといった報告は見当たらない。ムコイド株でない *emm* 型の菌であっても、mutant selection を生じやすい FQ 薬の濃度に長時間さらされれば、耐性株は容易に選択されると思われる。

本邦では経口用レスピラトリーキノロン薬の開発に伴い、成人に対する FQ 薬の処方量は増加している。すでに存在する FQ 軽度耐性株から高度耐性株への選択機会が増えないよう、検査室側からもその動向には十分な監視が必要である。

謝 辞 キノロン耐性遺伝子の解析にご協力いただきました北里大学大学院感染制御科学府・修士2年の吉野美保さんに深謝します。

文 献

- 清水可方, 大山晃弘, 笠間和典, 他. 1993. A 群溶血性連鎖球菌による toxic-shock syndrome の 1 例. 感染症学雑誌 67: 236-239.
- Yan, S. S., M. L. Fox, S. M. Holland, et al. 2000. 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.
- Rivera, A., M. Rebollo, F. Sanchez, et al. 2005. Characterisation of fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Barcelona, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 759-761.
- Pletz, M. W. R., L. McGee, C. A. V. Beneden, et al. 2006. Fluoroquinolone resistance in invasive *Streptococcus pyogenes* isolates due to spontaneous mutation and horizontal gene transfer. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 943-948.
- Wajima, T., S. Y. Murayama, K. Sunayoshi, et al. 2008. Distribution of *emm* type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive disease. *J. Med. Microbiol.* 57: 1383-1388.
- Beall, B., R. Facklam, T. Thompson, 1996. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 34: 953-958.
- 生方公子. 2008. 侵襲性感染症とその検査に関する精度の検証. 第 19 回日本臨床微生物学会総会アナライザーワークショップ冊子. p. 23-29, 新日本印刷, 東京.

Analysis of Resistance Genes in Fluoroquinolone High-resistant and Mucoid Type *Streptococcus pyogenes* Isolated from Blood Culture

Ryo Kawaguchi,¹⁾ Hirosuke Matuo,¹⁾ Kimiko Ubukata²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Sasebo Chuo Hospital

²⁾ Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Kitasato University

Mucoid type *Streptococcus pyogenes* was detected in a blood culture obtained from a female with cellulitis. She had systemic lupus erythematosus. The isolate of *S. pyogenes* was highly resistant to fluoroquinolone. DNA amplification and sequencing revealed that the main mechanism of resistance was mediated by point mutations in the quinolone resistance-determining region of *gerA*, which encodes DNA gyrase, and *parC*, which encodes topoisomerase. The isolate presented a point mutation in *gyrA*, predicting that serine-81 was changed to phenylalanine-81 and in *parC*, thereby predicting that serine-79 changed to phenylalanine-79. It is feared that fluoroquinolone-resistant *S. pyogenes* might increase due recent increases in the dosages of fluoroquinolone that are being administered to adults.