

[原 著]

群馬県におけるペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌の分子疫学解析

熊川慎一郎¹⁾・谷本弘一²⁾・橋本佑輔³⁾・野村隆浩³⁾・富田治芳^{2) 3)}

¹⁾ 伊勢崎市民病院中央検査科

²⁾ 群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設

³⁾ 群馬大学大学院医学系研究科細菌学

(令和 4 年 8 月 16 日受付, 令和 5 年 2 月 16 日受理)

Streptococcus agalactiae (Group B Streptococci : GBS) は近年ペニシリン低感受性を示す株が注目されている。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の公開情報によると, 全国と比較して群馬県での GBS の penicillin G (PCG) 感受性率は低値である。そこで群馬県の医療機関におけるペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility : PRGBS) の分子疫学解析を行った。今回解析した PRGBS 33 株 (2014~2020 年) はペニシリン結合蛋白 2X (PBP2X) に低感受性化に重要なアミノ酸置換とされる V405A, Q557E を獲得していた。その中には過去に報告がない 585 番目のインフレーション変異を起こしている株が存在した。血清型では侵襲性感染症に関連があるとされている Ib, III 型が多く分離された。MLST 解析では PRGBS で頻回に検出されると報告されている ST458 は 1 株も分離されず, 代わりに現在のところ群馬県でのみ報告が確認されている ST1665 が広がっていたことが分かった。このことから, 特定株が外部から流入拡散したというよりも地域内で変異を積み重ねつつ広がってきた可能性が考えられた。

Key words: *Streptococcus agalactiae*, PBP2X, MLST, PFGE

序 文

Streptococcus agalactiae (Group B Streptococci : GBS) はグラム陽性の連鎖球菌であり, 血液寒天培地上に β 溶血のコロニーを形成する。GBS は膣や腸管内の常在菌であるが, 新生児に対して髄膜炎や敗血症, 高齢者に対しては皮膚軟部感染症や肺炎を起こすなど, 侵襲的な感染症を起こす重要な病原菌として知られている¹⁾²⁾。膣に GBS を持つ妊婦からの垂直感染を防ぐために, Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) が推奨するガイドラインでは妊娠 35~37 週の全ての妊婦に対して膣・直腸からの GBS スクリーニング検査が推奨されており, 陽性者には penicillin G (PCG) や ampicillin (ABPC) などの β ラクトム系抗菌薬の予防的投与が行われる³⁾。

GBS は元来全ての菌株が PCG を含む β ラクトム系抗菌薬に感性を示すと考えられてきたため, 第一選択薬としてペニシリン系抗菌薬が使用されてきた⁴⁾。しかし薬剤感受性試験の判定基準を定めている Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) での PCG 感性の基準 ($MIC \leq 0.12 \mu\text{g/mL}$) を超える菌株が 2000 年代に散見されてきた。Kimura らによって詳細な解析が進められ, ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B Streptococci with Reduced Penicillin Sus-

ceptibility : PRGBS) の存在が証明された⁵⁾。それ以降, 北米でも PRGBS が報告されており世界的にも広がりをみせていることが報告されている⁶⁾。CLSI や European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) では PRGBS の存在が記載されており, 新たな耐性菌として認められている⁴⁾⁷⁾。EUCAST においては髄膜炎由来株の GBS に対して新たに PCG のブレイクポイント ($S \leq 0.125 \mu\text{g/mL}$, $R > 0.125 \mu\text{g/mL}$) が定められるなど薬剤耐性に関心が高まってきた⁷⁾。PRGBS の耐性メカニズムは主にペニシリン結合蛋白 2X (PBP2X) のアミノ酸置換によるものであると報告されている。PBP2X の中でもペニシリン結合に関わる transpeptidase domain の活性中心を形成するとされている^{402SSN⁴⁰⁴, ⁵⁵³KSG⁵⁵⁴}の近傍にある V405A と Q557E の両方, もしくは一方の置換を有している場合において低感受性化することが分かっている⁵⁾。

PRGBS の他にも, PCG には感性でありながらもセファロsporin 系には低感受性を示すセフチプテン耐性ペニシリン感性 GBS (CTB⁺PSGBS) が 2014 年に初めて報告されている⁸⁾。PRGBS でもセファロsporin 系やマクロライド系, フルオロキノロン系も併せて耐性を示す多剤耐性 PRGBS の割合が高いことが報告されているため⁹⁾, ペニシリン系以外の感受性にも注視していかなければならない。

GBS の血清型は病原性にも密接な関係性があることが分かっている。侵襲性感染症を起こした成人より分離された GBS の血清型は Ib, V, III 型が多いとされており, その中でも Clonal Complex 10 (CC10) に含まれる Sequence Type 10 (ST10) を示す Ib 型が優位に検出されると報告されてい

著者連絡先: (〒372-0817) 群馬県伊勢崎市連取本町 12-1
伊勢崎市民病院中央検査科
熊川慎一郎
TEL: 0270-25-5022
E-mail: kumagawa.kensa@gmail.com

Table 1. Primers used for PBP2X gene analysis

Primer	Secence	Amplicom size (bp)
Amplification		
Forward	5'-CGGAATTCGTGACTTTTTTTAAAAAGCTAA-3'	2,275
Reverse	5'-ACGTCGACTTAATCTCCTATTGTAATTTTG-3'	
Sequence		
F1	5'-AACTATACGACAGCTACAGGTC-3'	
F2	5'-GTAGTGGGAATGTTCTTTTAGG-3'	
F3	5'-TCTAAGCATTTTAACTCTACTG-3'	
R1	5'-GAACCAGATTACGACGTAATTC-3'	
R2	5'-ATGAGCTCATAGCGATAGTTAC-3'	
R3	5'-TTGCAGAGGCTAGAGTCATTAC-3'	
R4	5'-CCGCCCTACGTTCTGTTGTTGC-3'	
R5	5'-AAGACAATCCTGAACCTGAACCTCC-3'	

る¹⁰⁾。

また、呼吸器材料から分離された PRGBS の症例対象研究では反復性誤嚥性肺炎とペニシリン系抗菌薬の投与は PRGBS の出現に対して有意に関連していることが報告されているため、妊婦だけでなく高齢者の保健医療においても重要である¹¹⁾。

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) 検査部門の公開情報によれば、全国の GBS の PCG 感受性率は 2015 年～2019 年で 93.1%, 94.2%, 94.0%, 94.0%, 93.6% と良好な値を示している。しかし、群馬県では 2015～2019 年の感受性率は 76.2%, 79.1%, 82.9%, 81.4%, 83.1% であり、上昇しているものの全国と比較して依然低値のままである¹²⁾。

本研究では群馬県基幹病院での PRGBS を分子疫学解析することで、世界的に蔓延している菌株との遺伝的関係性を明らかにし、蔓延のルーツや伝搬経路についての知見を得て PRGBS の感染制御の一助とすることを目的とした。

材料と方法

1. 対象

群馬県病原微生物情報研究会 (ミクロ情報研究会) において、PCG MIC $\geq$ 0.25 μ g/mL を示す GBS の収集について各医療機関に依頼し、群馬県の病院 6 施設 (伊勢崎市市民病院、前橋赤十字病院、群馬中央病院、公立富岡総合病院、桐生厚生病院、伊勢崎佐波医師会病院) から 34 株 (2014 年 4 月～2020 年 2 月) 収集した。材料の年齢構成は 68～99 歳、男女比は 50:50 であった。材料の内訳として喀痰 32 株 (94.1%)、尿 2 株 (5.9%) であった。各医療機関から収集した株数の内訳は、伊勢崎市の医療機関 (A) から 10 株 (29.4%)、前橋市の医療機関 (B) から 9 株 (26.5%)、前橋市の医療機関 (C) から 12 株 (35.3%)、富岡市の医療機関 (D) から 1 株 (2.9%)、桐生市の医療機関 (E) から 1 株 (2.9%)、伊勢崎市の医療機関 (F) から 1 株 (2.9%) であった。なお、A5・A6 は同一患者で別時期に分離された喀痰由来株で、A9・A10 は同一患者で同時期に分離された株であり、A9 は尿、A10 は喀痰由来株である。

2. GBS の同定

16S rRNA 遺伝子解析による同定検査を行った。シーケ

ンス解析後、BLAST 解析によって高い相同性をもって GBS と同定された。

3. 抗菌薬感受性試験

CLSI 法 (M100Ed32) に準じて⁴⁾、寒天平板希釈法にて好気培養下で 37℃ 24 時間培養した。Mueller Hinton Agar (Becton Dickinson) に指定した濃度の抗菌薬とヒツジ脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所) を 5% になるように加えた血液寒天培地を作製した。抗菌薬は PCG, ABPC, oxacillin (MPIPC), cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), clindamycin (CLDM), vancomycin (VCM), ceftibuten (CETB), levofloxacin (LVFX), meropenem (MEPM), erythromycin (EM) の計 11 薬剤を使用した。抗菌薬の最終濃度が 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μ g/mL になるように調整した。control strain として *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619 を使用した。なお、MIC が高値を示した株については CLSI 法に準じた⁴⁾微量液体希釈法にて再検査を行った。

4. 血清型別

B 群溶血レンサ球菌抗原処理用試薬「生研」(デンカ)にて処理を行った後、B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清「生研」(デンカ)を用いた。添付文書に則りスライド凝集法にて血清型 Ia, Ib, II, III, IV, V を判定した。

5. GBS の核酸抽出

Chelex 100 Resin (BIO-RAD) を Tris-EDTA Buffer (TE Buffer) (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA $\cdot$ 2Na) に懸濁して 10% chelex を調整した。10% chelex 200 μ l に被検菌をコロニーより爪楊枝にて適量加え懸濁した後、95℃ 10 min 加熱、Vortex 後、遠心 (15,000 $\times$ g 10 min) を行って上清を核酸抽出液とした。

6. PBP2X 遺伝子のシーケンス解析

Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) と Kimura らの方法⁵⁾を参考にした PBP2X 遺伝子を識別できるプライマーを用いて PCR 法を行った (Table 1)。反応条件は 94℃ 2 min を 1 cycle, 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 2 min 30 sec を 45 cycle で行った。次に、増幅産物を 1.2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (EtBr) (1 mg/mL) 染色により確認した。増幅産物は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を使用して精製した。精製後、BigDye

Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) を用いてシーケンスのための PCR を行った。反応条件は 96°C 1 min を 1 cycle, 96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 1 min 15 sec を 25 cycle で行った。シーケンス PCR の増幅産物は Sephadex G-50 DNA Grade (G-50) (Cytiva) によって精製した。DNA 塩基配列の解析は ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) にて行い、クラウド型遺伝子解析ツール Benchling (<https://www.benchling.com/>) を用いて解析を行った。PBP2X のアミノ酸変異を確認する際の reference strain として *Streptococcus agalactiae* A909 を使用した。

(NCBI より 引用: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP000114.1>)

7. PBP2X における DNA 塩基配列での系統樹の作成

CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を使用して系統樹を作成した。PBP2X の中でも主にペニシリン結合に関わっている transpeptidase domain の DNA 配列で比較を行った。

8. Multilocus Sequence Typing (MLST) のシーケンス解析

GBS では alcohol dehydrogenase (*adhP*), phenylalanyl tRNA synthetase (*PheS*), glutamine transporter protein (*atr*), glutamine synthetase (*glnA*), serine dehydratase (*sdhA*), glucose kinase (*glcK*), transketolase (*tkt*) の 7 種類のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定して分類する。最終的に 7 つの allele を組み合わせて MLST のデータベース PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae/>) を用いて sequence type (ST) を得た。MLST に使用したプライマーは PubMLST に準じたものを使用した。対象遺伝子を増幅させるための PCR 反応条件は 94°C 2 min を 1 cycle, 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min を 45 cycle で行った。増幅産物の確認から DNA 塩基配列の解析までは PBP2X 遺伝子のシーケンス解析と同様な工程で行った。

9. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

GBS を 1% アガロースゲルに包埋したゲルブロックをリゾチーム処理、ムタノリシン処理、プロテイナーゼ K 処理した後、制限酵素 *ApaI* (NEW ENGLAND BioLabs) を用いて 37°C で 24 時間消化した。泳動条件は Banno らの方法¹³⁾ に準じて、電圧 6.0 V/cm, 角度 120 度, 温度 14°C, スイッチタイムを 1 sec から 18 sec, 泳動時間 23 時間で行った。泳動後、アガロースゲルを EtBr 染色して、ゲル撮影装置 E-BOX (Vilber Lourmat) にて撮影した。系統樹の作成は得られた画像データをもとに FPQuest (BIO-RAD) を使用して行った。平均距離法 (UPGMA 法) により tolerance 値は 5.0% で解析した。

結 果

1. 抗菌薬感受性試験

抗菌薬感受性試験を 11 薬剤で行った (Table 2)。PCG は 33 株が非感性 ($MIC \geq 0.25 \mu\text{g/mL}$), 1 株 (B4) のみ感性を示した。B4 の株も他の PRGBS の株と同様に CETB の MIC が高値 ($MIC \geq 128 \mu\text{g/mL}$) となっていたため、CTB'PSGBS

である可能性が示唆された。今回収集した PRGBS 33 株での EM の耐性率 ($MIC \geq 1 \mu\text{g/mL}$) は 39.4%, CLDM の耐性率 ($MIC \geq 1 \mu\text{g/mL}$) は 42.4%, LVFX の非感性率 ($MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$) は 100% だった。PRGBS の中で多剤耐性 PRGBS (EM 耐性/LVFX 非感性の基準を共に満たした PRGBS) の割合は 39.4% であった。

2. 血清型別

免疫血清によるスライド凝集法にて血清型を決定した (Table 2)。PRGBS の血清型別では III 型が 11 株 (33.3%) と最も多く、次いで Ib 型 10 株 (30.3%), Ia 型 6 株 (18.2%), II 型 4 株 (12.1%) の順で、判定不能 (Non-typeable: NT) は 2 株 (6.1%) であった。CTB'PSGBS である B4 は Ib 型として分類された。

3. PBP2X 遺伝子のシーケンス解析

得られた DNA 塩基配列から解析した 34 株中 27 株は G398A, V405A, Q557E の 3 か所のアミノ酸置換がみられた (Table 3)。低感受性化に重要な置換とされている V405A, Q557E の両方もしくは一方を全ての PRGBS の株が保有していたことが分かった。PCG MIC $1 \mu\text{g/mL}$ を示した B1, C12 の株は他の菌株よりも多くの置換がみられた。C12 では I378V, G398A, V405A, H438Y, Q557E および 3 塩基の挿入によって 585 番目の N が KS になるインフレーム変異を含めた 6 つの置換が確認できた。I378V と 585 番目のインフレーム変異は今回の解析において初めて報告された (accession no. LC744379)。D1 (富岡), E1 (桐生) の菌株は G329A, G398A, V405A, G429D と他の株とは違ったタイプの置換を示した。CTB'PSGBS である B4 の置換は T394A のみであった。

4. PBP2X 内にある transpeptidase domain の DNA 塩基配列を用いた系統樹の作製

34 株中 28 株は同じ塩基配列だったため同一のグループ (Group 1) を形成した。一方、そのグループとは別に D1・E1, B1・C12 はそれぞれ別のグループを形成していた。C8 (PRGBS) と B4 (CTB'PSGBS) は Group 1 から離れており、同一のグループ (Group 2) を形成していた (Figure 1)。

5. MLST

PRGBS 33 株と CTB'PSGBS 1 株の Sequence Type (ST) 別の割合を示した (Table 4)。PRGBS 33 株では ST1 (10 株: 30%), ST358 (9 株: 27%), ST3 (8 株: 24%), ST1665 (6 株: 18%) の順に多かった。1 株の CTB'PSGBS は ST1753 であった。今回の解析で得られた ST は Clonal Complex 1 (CC1) と CC12 に属する ST だった。ST1665 は 2021 年に新しく登録された ST であり、PubMLST (https://pubmlst.org/bigsdb?page=profileInfo&db=pubmlst_sagalactiae_seqdef&scheme_id=1&profile_id=1665) にて群馬県の菌株 1 株でのみ報告されている。ST1665 と ST1753 は ST1 と比較して共に 1 つの allele のみが異なっていた。ST1665 に含まれる *sdhA*: 3 は ST1 に含まれる *sdhA*: 1 と比較して 9 塩基の変異を認めた。ST1753 は今回の解析で初めて登録した ST であり、*atr*: 214 は ST1 に含まれる *atr*: 2 と比較して 1 塩基の変異を認めた。

6. PFGE と系統樹

類似度を 85% に設定して PFGE により得られたバンドパ

Table 2. Antimicrobial susceptibility testing of 34 clinical isolates by agar dilution method

Strain	Date of isolation (mo/yr)	Age	Sex	serotype	MIC (μg/mL)										
					① PCG	ABPC	MIPIC	CEZ	CZX	CETB	EM	CLDM	LVFX	VCM	MEPM
A1	March/2019	77	F	Ib	0.5	0.5	16	2	≥64	≥128	≥128	≥128	32	0.06	0.06
A2	July/2019	87	F	NT*	0.5	0.25	8	2	32	≥128	1	64	16	0.5	0.25
A3	August/2019	90	F	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	16	0.5	0.25
A4	September/2019	93	F	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	16	0.5	0.25
A5	October/2019	78	M	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	8	0.5	0.25
A6	October/2019	78	M	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	0.5	0.25	16	0.5	0.25
A7	November/2019	86	F	Ib	1	0.25	4	2	32	≥128	≤0.03	≤0.03	128	0.5	0.25
A8	January/2020	87	M	III	0.5	0.25	4	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	16	0.5	0.25
A9	February/2020	86	M	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	16	0.5	0.25
A10	February/2020	86	M	III	0.5	0.25	8	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	8	0.5	0.25
B1	February/2015	92	M	II	1	0.5	4	4	32	≥128	1	128	64	0.5	0.125
B2	February/2015	91	F	NT*	0.5	0.25	4	2	32	≥128	≤0.03	≤0.03	32	0.5	0.5
B3	June/2015	68	M	Ib	0.5	0.25	8	2	32	≥128	0.5	64	32	0.5	0.25
B4	July/2015	99	F	Ib	0.06	0.125	1	0.25	1	≥128	≤0.03	≤0.03	64	0.5	0.06
B5	November/2015	86	M	Ib	0.5	0.25	4	2	32	≥128	≥128	≥128	16	0.5	0.5
B6	November/2015	81	M	II	0.5	0.125	4	0.5	16	≥128	≤0.03	≤0.03	32	0.5	0.125
B7	February/2016	93	F	II	0.5	0.125	4	0.5	16	≥128	≤0.03	≤0.03	32	0.5	0.125
B8	April/2016	79	F	II	0.5	0.125	4	0.5	16	≥128	≤0.03	≤0.03	32	0.5	0.125
B9	August/2017	86	F	III	0.5	0.25	4	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	32	0.5	0.25
C1	April/2014	90	F	Ib	1	0.5	8	4	32	≥128	0.06	0.06	128	0.06	≤0.03
C2	October/2015	81	M	Ib	0.5	0.25	16	4	≥64	≥128	1	≥128	64	0.25	≤0.03
C3	November/2015	96	M	Ib	0.5	0.25	16	4	≥64	≥128	1	≥128	64	0.125	≤0.03
C4	November/2015	90	M	Ib	0.5	0.25	8	4	≥64	≥128	1	≥128	64	0.25	≤0.03
C5	January/2016	90	F	Ia	0.5	0.5	8	4	32	≥128	0.5	≥128	128	0.06	≤0.03
C6	March/2016	85	F	III	0.5	0.5	8	2	32	≥128	0.5	0.5	128	0.06	≤0.03
C7	September/2016	88	M	Ia	0.5	0.25	16	1	≥64	≥128	1	≥128	64	0.06	≤0.03
C8	November/2016	88	M	Ib	0.5	0.125	8	1	≥64	≥128	0.5	0.06	64	0.125	≤0.03
C9	November/2016	75	M	Ia	0.5	0.125	8	1	≥64	≥128	1	128	64	0.25	≤0.03
C10	February/2017	69	M	Ia	0.5	0.25	8	1	32	≥128	1	≥128	128	0.06	≤0.03
C11	February/2017	69	M	Ia	0.5	0.25	8	2	32	≥128	1	≥128	128	0.06	≤0.03
C12	January/2019	89	F	Ib	1	1	16	8	≥64	≥128	≥128	≥128	64	0.06	0.06
D1	August/2019	69	F	Ia	0.5	0.25	4	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	4	0.5	0.25
E1	September/2019	85	F	III	0.25	0.25	4	1	16	≥128	1	≤0.03	32	0.5	0.125
F1	April/2019	87	F	III	0.5	0.25	4	1	16	≥128	≤0.03	≤0.03	64	0.5	0.06

①: Abbreviations for antimicrobials used all on follows: penicillinG (PCG), ampicillin (ABPC), oxacillin (MIPIC), cefazolin (CEZ), ceftiofur (CETB), meropenem (MEPM), erythromycin (EM), VCM, ceftibuten (CETB), levofloxacin (LVFX), meropenem (MEPM), erythromycin (EM).

*: non-typeable (NT).

Table 3. Amino acid substitutions in PBP2X of clinical PRGBS and CTB^rPSGBS isolates

strain A909*	hospital	Date of isolation (mo/yr)	PCG MIC (μg/ml)	PBP2X											
				165 S	329 G	378 I	394 T	398 G	400 A	405 V	429 G	438 H	445 P	557 Q	585 N
A1	A	March/2019	0.5	F				A		A				E	
A2	A	July/2019	0.5					A		A				E	
A3	A	August/2019	0.5					A		A				E	
A4	A	September/2019	0.5					A		A				E	
A5	A	October/2019	0.5					A		A				E	
A6	A	October/2019	0.5					A		A				E	
A7	A	November/2019	1					A		A				E	
A8	A	January/2020	0.5					A		A				E	
A9	A	February/2020	0.5					A		A				E	
A10	A	February/2020	0.5					A		A				E	
B1	B	February/2015	1					A		A			S	E	
B2	B	February/2015	0.5					A		A				E	
B3	B	June/2015	0.5					A		A				E	
B4	B	July/2015	0.06				A								
B5	B	November/2015	0.5					A		A				E	
B6	B	November/2015	0.5					A		A				E	
B7	B	February/2016	0.5					A		A				E	
B8	B	April/2016	0.5					A		A				E	
B9	B	August/2017	0.5					A		A				E	
C1	C	April/2014	1					A		A				E	
C2	C	October/2015	0.5					A		A				E	
C3	C	November/2015	0.5					A		A				E	
C4	C	November/2015	0.5					A		A				E	
C5	C	January/2016	0.5					A		A				E	
C6	C	March/2016	0.5					A		A				E	
C7	C	September/2016	0.5					A		A				E	
C8	C	November/2016	0.5						V					E	
C9	C	November/2016	0.5					A		A				E	
C10	C	February/2017	0.5					A		A				E	
C11	C	February/2017	0.5					A		A				E	
C12	C	January/2019	1			V		A		A		Y		E	KS
D1	D	August/2019	0.5		V			A		A	D				
E1	E	September/2019	0.25		V			A		A	D				
F1	F	April/2019	0.5					A		A				E	

*: *Streptococcus agalactiae* A909 is reference strain.

ターンをもとに系統樹を作成した (Figure 2)。ST1665 を示した C2, C3, C4, C5 と ST3 を示した A3, A4, A5, A6 および ST1 を示した B6, B7, B8 はそれぞれ高い近似性を示し同一菌株の蔓延が示唆された。全体的には大きく分けて前橋市と伊勢崎・桐生・富岡地域に分かれており, B6, B7, B8 の菌株は単独でグループを形成していた。

考 察

本邦において血液由来や髄液由来を含む新生児の侵襲性感染症に関連している PRGBS は現時点では確認されておらず, 臨床的意義の観点では更なる調査が求められている段階である¹⁴⁾。しかし, 反復性誤嚥性肺炎の患者やペニシリン投与歴のある患者の呼吸器材料から PRGBS が有意に検出されている¹¹⁾。本研究と同様に PRGBS は高齢者の喀痰から分離されることが多く, 高齢化社会が進んでいる日本にとって無視で

きない耐性菌となっている。

今回収集した 34 株の薬剤感受性試験を行った結果, PCG MIC 0.25~1 μg/mL を示す株が分離された。PRGBS はセファロsporin系, マクロライド系, フルオロキノロン系にも非感性を示す多剤耐性 PRGBS である割合が高いことが報告されている⁹⁾。EM の耐性率 (MIC ≥ 1 μg/mL) と LVFX の非感性率 (MIC ≥ 4 μg/mL) が PSGBS ではそれぞれ 7.9%, 18.4% であるのに対し, PRGBS ではそれぞれ 47.4%, 100% であったという報告がある¹⁵⁾。今回の結果では EM の耐性率は 39.4%, LEFX の非感性率は 100% であった。また, 本邦において PRGBS 中の多剤耐性 PRGBS の割合が 68.9% であったとの報告がある⁹⁾。本解析では 39.4% と比較的低値であったが多剤耐性化が進んでいることを改めて確認することができた。2010 年に改定された周産期 GBS 感染症の予防に関するガイドラインでは, 重度なペニシリンアレルギーの女

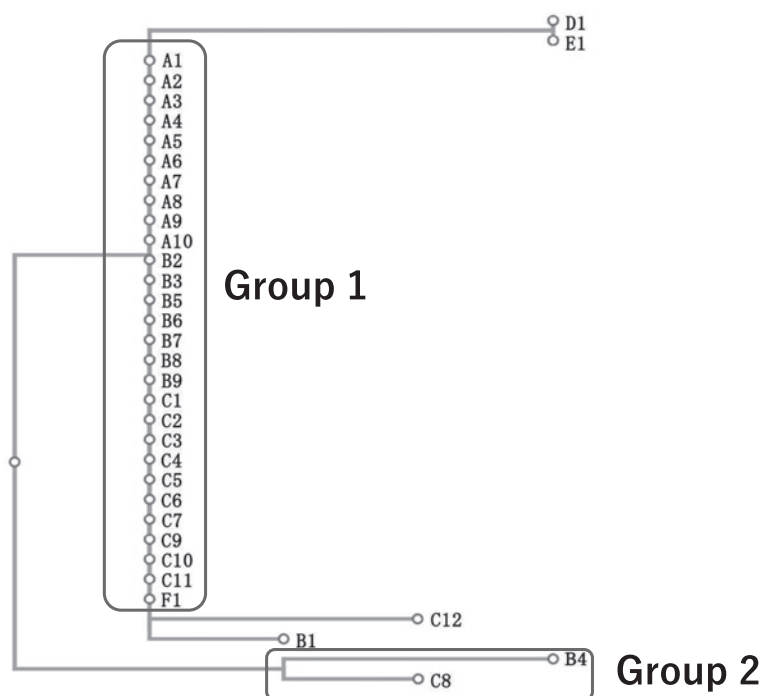


Figure 1. Phylogenetic relationships between DNA sequences of the transpeptidase domain that were detected in PBP2X. To perform the comparison with the DNA sequence of the transpeptidase domain in PBP2X, we used the ClustalW Multiple Sequence Alignment tool and PhyML (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Table 4. Sequence type of PRGBS and CTB⁺PSGBS isolates

	Sequence type (ST)	clonal complex (CC)	ST profile	Allele profile							The number of strains
				① <i>adhP</i>	<i>PheS</i>	<i>atr</i>	<i>glnA</i>	<i>sdhA</i>	<i>glcK</i>	<i>tkt</i>	
PRGBS	ST1	CC1	ST1 (template)	1	1	2	1	1	2	2	10 (30%)
	ST1665	CC1	1 allelic variant	1	1	2	1	3	2	2	6 (18%)
	ST3	CC1	2 allelic variant	1	1	4	1	1	3	2	8 (24%)
	ST358	CC12	3 allelic variant	1	1	4	1	3	3	2	9 (27%)
											total 33 (100%)
CTB ⁺ PSGBS	ST1753	CC1	1 allelic variant	1	1	214	1	1	2	2	1
											total 1

①: Abbreviations for house-keeping genes used for MLST analysis all on follows: alcohol dehydrogenase (*adhP*), phenylalanyl tRNA synthetase (*PheS*), glutamine transporter protein (*atr*), glutamine synthetase (*glnA*), serine dehydratase (*sdhA*), glucose kinase (*glcK*), transketolase (*tkt*).

性への予防的投与として、EM よりも CLDM の投与が推奨されている³⁾。今回収集した PRGBS の CLDM 耐性率は 42.4% と高値を示したため、妊婦が PRGBS を保菌していた場合に使用薬剤の選択肢が狭められてしまうことが危惧される。

PRGBS の薬剤感受性試験は全国と同様な結果となったが血清型では違った広がり示した。高齢者の呼吸器材料から検出される PRGBS は VI 型を示す血清型が多いことが報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、本解析で使用した菌株は Ib 型や III 型の PRGBS が多く検出されており、全国の傾向とは違った拡散が起こっている可能性が示唆された。近年の報告では Ia, Ib, III など多様な血清型も認められているため¹⁸⁾、高齢者の呼吸器材料由来の PRGBS は今後更なるデータの蓄積が必

要となってくるだろう。

病原性の観点からは成人に対して侵襲性感染症を引き起こす株に多いとされている血清型が多く分離された。ST10 は過去の報告では CC10 に分類されていたが、現在は CC12 に分類されている。今回 2 番目に多く分離された ST358 は ST10 と比較して 1 allele のみの違いであり同じ CC12 に属する。本解析では Ib 型/CC10 の両方を満たす株は 1 株 (A1) のみであった。しかし、Ib 型と III 型が多く分離されていることから侵襲性感染症も引き起こす可能性に留意しなければならないと考えられた。

Kimura らの報告では PBP2X の中でペニシリン結合に関連している transpeptidase domain のアミノ酸置換により耐性をもたせるとされている⁵⁾。今回収集した株でも得られた

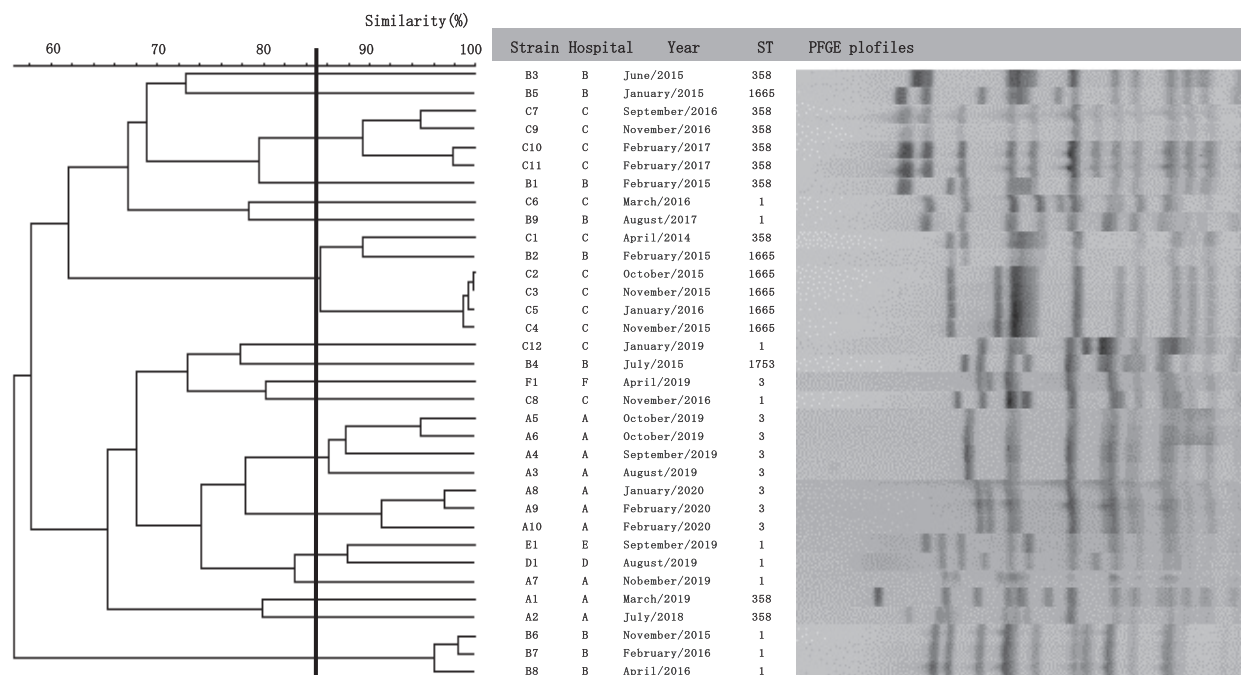


Figure 2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of 34 clinical isolates.

PFGE was performed with the restriction enzyme *Apa*I. PFGE profiles were analyzed with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) with a tolerance value of 5.0%. Strains with a similarity of 85% or greater were considered to have the same origin. A vertical line indicates a cutoff value of 85%. ST means sequence type.

DNA 塩基配列から解析した 34 株中 27 株は V405A, Q557E の両方もしくは一方の置換がみられたため、同様のアミノ酸置換を獲得していることが分かった。PCG MIC 1 µg/mL を示した C12 では I378V, G398A, V405A, H438Y, Q557E, および 3 塩基の insertion によって 585 番目のアスパラギンがリシンとセリンになるインフレーム変異を含めた 6 つの置換が確認できた。MIC の上昇をより詳細に解析するには PBP2X 以外の PBP 遺伝子の変異も同時に獲得している可能性も考えなければならないが本研究では行うことができなかった。感受性試験と PBP2X 遺伝子の解析結果から、PCG の耐性度が上がった株では多数の変異を獲得しており、変異を積み重ねることによりペニシリン系抗菌薬に耐性を示すことが分かった。

次に各菌株の関連性を確認するために PBP2X の DNA 塩基配列をもとにした系統樹を作成した。transpeptidase domain に重要なアミノ酸置換が集約していることから、今回はこの domain での DNA 配列を比較対象として作成した。D1 (富岡), E1 (桐生) の菌株は他の地域から分離された株とは異なるタイプの置換 (G329A, G398A, V405A, G429D) を示しており、D1 と E1 は地域的な距離は離れてはいるものの系統樹では同一のグループを形成していた。薬剤による選択圧をかけた場合、使用する抗菌薬によって PBP2X の変異に差が出ることから¹⁹⁾、富岡市と桐生市では抗菌薬の使用系統が類似している可能性も考えられる。しかし、県内の肺炎治療に対して抗菌薬の選択に違いがみられる可能性は少ないと考えられるため別の調査が必要になってくるだろう。今回の研究では各市町村の抗菌薬別使用量の調査は行うことが

できなかった。また、PRGBS である C8 が CTB⁺PSGBS である B4 と一つのグループを形成していることから、PRGBS と CTB⁺PSGBS は全く別の進化を遂げてきたわけではないと考えられる。

世界で分離された菌株との遺伝的な関係性を調べるために MLST 解析を行った。PRGBS は ST1 を中心とする CC1 と ST23 を中心とする CC23 で分離されることが多く、特に CC1 で優位に検出される¹⁶⁾。ST1 と ST23 は妊婦以外の成人と新生児がキャリアであるとともに侵襲性に関与する ST であり、アジア・北米・オーストラリアなど世界中で分離されている¹⁶⁾²⁰⁾。本研究で解析した菌株は CC1 および CC12 (CC1 と近縁な CC) に属する ST が検出された。CC は同一の遺伝子型が由来とされる ST の集合体であるため、この観点からみれば過去に報告されているものと同様な結果となった。しかし、検出された ST を詳細にみていくと違った広がりを示していることが判明した。CC1 に属する ST458 は PRGBS で優位に検出されるといわれていたが²¹⁾、今回の解析では 1 株も確認できず代わりに ST1665 が多数検出された。ST1665 は 2021 年に新しく登録された ST であり、群馬県の菌株 1 株が PubMLST に報告されている。群馬県以外で分離されたという報告は今のところないが、今回の解析では全体の 18% を占めていた。ST1665 は ST1 と比較して 1 つの allele のみが異なっていたことから ST1 と強い関連性があり近縁な ST である。地域別にみると、前橋市では 2015~2016 年に ST1665 が多く分離されていたが、他の地域では ST1665 は検出されなかった。前橋市では地域特異的な広がりを見せていたと考えられる。以上を鑑みると、PRGBS は CC1 の中

で地域独自に多様性を持って広がっていることが示唆された。また、CTB'PSGBS であった B4 は新しく ST1753 を登録した。ST1753 は ST1 と比較して 1 つの allele のみが異なっていたことから、これら 3 つの ST (ST1, ST1665, ST1753) は遺伝的に近い関係性であるといえる。CTB'PSGBS の収集は実施しなかったが PRGBS とは異なる ST を示したことから、ST1665 のように群馬県独自の広がりを見せている可能性が考えられた。以上のことから、特定株が外部から流入拡散したというよりも地域内で変異を積み重ねつつ広がってきた可能性が考えられた。

MLST により長期的な変化に伴う遺伝的関係性を明らかにしたが、より短い期間での変化を調べるために PFGE を実施した。大きく分けて前橋市と、伊勢崎・桐生・富岡地域の 2 グループになり、前橋市は独自の拡散が起きていることが PFGE でも確認できた。また、ST358 を示した群 (C7, C9, C10, C11) と ST1665 を示した群 (C2, C3, C4, C5), ST3 を示した群 (A3, A4, A5, A6) および ST1 を示した群 (B6, B7, B8) はそれぞれ高い近似性を示し同一菌株の広がりが考えられた。A5, A6 以外は全て別患者で検出されている株であり、多くの医療機関において院内で広がっていた可能性が考えられた。同一の医療機関より 35 か月にわたり 73 人の高齢者から 77 株の PRGBS が分離され、血清型においては III, Ib, Ia の順に集団レベルでの移行を示したことが報告されている¹⁸⁾。また、8 か月の期間を空けて同一医療機関内の異なる患者から類似した PFGE 像を示した PRGBS が検出された事例が報告されているため²²⁾、臨床現場で安定して生存できることが確認されている。A3, A4 と A5, A6 は異なる病棟の患者から分離された株で、どちらも長期入院患者から分離されていた。このことより、長期入院が必要とされる免疫低下患者に対して医療関連感染を起こす可能性が考えられた。PRGBS は反復性誤嚥性肺炎との関連性があるといわれていることから、院内感染対策を考える上で重要な耐性菌であるといえる。PRGBS は臨床の場において長期的な生存が可能であることから、感染拡大を防ぐには院内での接触感染防止に努める必要があることが分かった。今回は県内での PCG 感性株の調査は行わなかったため、県内における PSGBS と PRGBS の分子疫学的な違いを確認するためにはより詳細な研究が求められる。

今回の解析の結果、PRGBS はアミノ酸置換の集積により PCG を含めた β -ラクタム系抗菌薬の耐性化を進めることが群馬県でも確認できた。その中でも高度耐性を示す株も出現しており、今後は抗菌薬の使用にさらに留意する必要性が示唆された。また、MLST 解析では PRGBS で頻回に検出されると報告されている ST458 は 1 株も分離されず、代わりに現在のところ群馬県でのみ報告が確認されている ST1665 が地域特異的に広がっていたことが分かった。このことから特定株が外部から流入拡散したというよりも地域内で変異を積み重ねつつ広がってきた可能性が考えられた。

謝辞: 本研究遂行にあたり、技術的指導をいただきました群馬大学医学系研究科薬剤耐性菌実験施設の富江尚子氏、菌株提供にご協力いただきました、伊勢崎市民病院 笹森敏信氏、前橋赤十字病院 吉田勝一氏、群馬中央病院 武谷洋子氏、

公立富岡総合病院 竹内哲也氏、桐生厚生総合病院 三田修道氏、伊勢崎佐波医師会病院 川村佳男氏をはじめとする各施設の諸先生方に深謝いたします。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Raabe, V.N., A.L. Shane. 2019. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). Microbiology Spectrum 7 (2).
- 2) Skoff, T.M., M.M. Farley, S. Petit, et al. 2009. Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Non-pregnant Adults, 1990-2007. Clinical Infectious Diseases 49: 85-92.
- 3) American society for microbiology. 2020. Guidelines for the Detection and Identification of Group B *Streptococcus*. Initially posted. <https://asm.org/Guideline/Guidelines-for-the-Detection-and-Identification-of> 2022 年 10 月 25 日現在.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2022. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-ED32. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A.
- 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) 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.
- 7) European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. EUCAST Clinical Breakpoint Tables v.13.0, valid from 2023-01-01.
- 8) 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.
- 9) Seki, T., K. Kimura, M.E. Reid, et al. 2015. High isolation rate of multi-drug resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. J. Antimicrob. Chemother 70: 2725-2728.
- 10) Morozumi, M., T. Wajima, M. Takata, et al. 2016. Molecular characteristics of group B streptococci isolated from adults with invasive infections in Japan. J. Clin. Microbiol 54: 2695-2700.
- 11) Nishiyama, N., T. Kinjo, K. Uechi, et al. 2022. Clinical and bacterial features of Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility from respiratory specimens: a case-control study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 41: 1-8.
- 12) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) 検査部門. 公開情報 2015-2019 年 1-12 月年報. <http://www.nihjanis.jp/report/kensa.html> 2022 年 10 月 25 日現在.
- 13) Banno, H., K. Kimura, T. Seki, et al. 2018. High isolation rate and multidrug resistance tendency of penicillin-susceptible group B *Streptococcus* with reduced ceftibuten susceptibility.

- ity in Japan. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 37: 1511-1519.
- 14) Chang, B., A. Wada, M. Hosoya, et al. 2014. Characteristics of Group B *Streptococcus* Isolated from Infants with Invasive Infections: A Population-Based Study in Japan. J. Infect. Dis 67: 356-360.
 - 15) Kimura, K., N. Nagano, Y. Nagano, et al. 2013. High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother 68: 539-542.
 - 16) Kimura, K., N. Nagano, Y. Nagano, et al. 2011. Predominance 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.
 - 17) 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.
 - 18) Nagano, N., S. Koide, W. Hayashi, et al. 2019. Population-level transition of capsular polysaccharide types among sequence type 1 group B *Streptococcus* isolates with reduced penicillin susceptibility during their long-term hospital epidemic. Int. J. Antimicrob. Agents 53: 203-210.
 - 19) Koide, S., W. Hayashi, Y. Taniguchi, et al. 2019. Potential effect of selective pressure with different β -lactam molecules on the emergence of reduced susceptibility to β -lactams in group B *Streptococcus*. Microbiol. Immunol. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1348-0421.12667> 2022年10月25日現在.
 - 20) Jones, N., J.F. Bohnsack, S. Takahashi, et al. 2003. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. J. Clin. Microbiol 41: 2530-2536.
 - 21) Yamada, R., K. Kimura, N. Nagano, et al. 2015. Comparative analysis of penicillin-susceptible and non-susceptible isolates in group B Streptococci by multilocus sequence typing. J. Infect. Dis 68: 326-329.
 - 22) 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 (12): 4258-4267.

Molecular epidemiology of Group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility in Gunma Prefecture

Shinichiro Kumagawa¹⁾, Koichi Tanimoto²⁾, Yusuke Hashimoto³⁾, Takahiro Nomura³⁾, Haruyoshi Tomita^{2) 3)}

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Iseaki Municipal Hospital

²⁾Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Graduate School of Medicine, Gunma University

³⁾Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine, Gunma University

Streptococcus agalactiae with reduced susceptibility to penicillin has emerged in recent years. According to the public information retrieved from the Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS), published by the Ministry of Health, Labour and Welfare, the penicillin G susceptibility rate of group B streptococci is lower in Gunma than in other prefectures. Therefore, we performed molecular epidemiological analysis of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) in medical institutions in Gunma. Thirty-three PRGBS organisms were isolated between 2014 and 2020. All were found to have acquired the amino acid substitution V405A, Q557E, or both in penicillin-binding protein 2X (PBP2X), which are associated with low susceptibility to penicillin G. In addition, some strains acquired many amino acid substitutions, and one of them had asparagine at 585 position substituted by ricin/serine, which had not been reported previously. The accumulation of amino acid substitutions has increased the resistance of these streptococci to β -lactam antibiotics, and we observed a similar phenomenon in Gunma. We also found that PRGBS isolated in Gunma tended to be multidrug-resistant. Multilocus sequence typing (MLST) analysis revealed that infection with PRGBS of sequence type 458, which was reported to be frequently detected in PRGBS, was not isolated, but infection with PRGBS of sequence type 1665, which is currently reported only in Gunma, had spread instead. These findings indicate that this organism accumulated mutations while it spread within the region, not that particular strains from outside entered and spread through the region.