

平成21年6月30日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790441
 研究課題名（和文） 薬剤耐性株の出現は、B群溶血性レンサ球菌感染症の治療と予防に対する脅威となるか？
 研究課題名（英文） Determination of the prevalence of drug resistant Group B Streptococci isolates from hospitals and meat.
 研究代表者
 河原 隆二 (KAWAHARA RYUJI)
 大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任研究員
 研究者番号：10332454

研究成果の概要：

医療機関および食肉から分離された B 群溶血性レンサ球菌（GBS）について、薬剤感受性や遺伝子型別等の解析を行った。一部の菌株で分離由来にかかわらず共通の薬剤耐性および遺伝型が認められ、医療および畜産環境間を伝播している耐性株の存在が示唆された。一方、治療の第一選択薬に耐性を持つ株は特定の医療機関に限られており、現時点では大きな脅威となっていないものと思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	0	1,800,000
平成20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：母子保健

1. 研究開始当初の背景

B 群溶血性レンサ球菌 (*Streptococcus agalactiae*、以下 GBS) は主に新生児では髄膜炎や敗血症などの重篤な感染症を引き起こす。特に 4 ヶ月齢未満の髄膜炎の原因菌としては一番多く、最近の調査でも死亡率が高い。治療は抗菌薬の投与によって行われ、アンピシリン (以下 ABPC) とセフトキシム (以下 CTX)、または ABPC とアミノグリコシド系薬剤の混合投与などが推奨されている。

主な感染経路は出生時の暴露と考えられており、母体中の GBS のコントロールが本感染症を予防する上で重要である。米国疾病

管理予防センターのガイドラインでは、すべての妊婦に対し GBS 保菌検査を行い、検出された場合は分娩時に抗菌薬を予防投与することが推奨されている。すなわち、通常はペニシリン、セファゾリンまたはクリンダマイシンの点滴投与による除菌を行う。

このように GBS に対する治療・予防には抗菌薬の投与が不可欠である。しかしながら、その薬剤感受性は低下しつつあり、テトラサイクリン (85%)、クリンダマイシンなどマクロライド系薬剤 (8~30%)、ゲンタマイシン (100%)、さらにニューキノロン系薬剤 (10%) に耐性となり、大阪府内の医療機関でもペニシリン G (PCG)、ABPC および CTX に対して耐性を示す株が世界で初めて

分離された。

これらの耐性株は本感染症の治療及び予防戦略を根底から揺るがしかねず、その蔓延が危惧されている。

2. 研究の目的

GBS の各種抗菌薬に対する耐性状況を把握し、現在推奨されている薬剤が本当に有効であるかどうか、さらに将来的な耐性菌の出現と拡散のリスクを検討すること。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株および血清型別の実施

各種薬剤による選択圧力を常時受けやすい環境として、医療機関および畜産環境を想定した。

医療機関から、髄膜炎・血液培養由来株およびその他の臨床分離株 111 株を収集した。

また、畜産環境から市中へと流通するものとして市販食肉等の畜産品からの GBS 分離を行った。食肉（鶏肉、豚肉、牛肉）10 g に LIM 培地 100 ml を添加し、37 °C で 24 時間増菌培養を行った。増菌培地 1 エーゼを血液寒天培地および羊血液加 Granada 培地に広げ、37 °C で 24 時間培養し、β 溶血を示したコロニーまたは羊血液加 Granada 培地上でオレンジ色を呈したコロニーを釣菌した。

以上の菌株は、生化学的性状、Lancefield 群型別で GBS であることを確認し、さらに B 群溶連菌型別血清を用いて血清型別を行った。

(2) 薬剤感受性試験の実施および耐性遺伝子の解析

分離された GBS がどのような耐性を持っているのかを解析するため、PCG、CTX、テトラサイクリン (TC)、エリスロマイシン (EM)、オフロフロキサシン (OFLX) に対する最小発育濃度 (MIC) を測定した。

さらに、何らかの耐性を示した株について、マルチプレックス PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて各薬剤耐性関連遺伝子の検出・解析を行った。一部の遺伝子についてはその遺伝子配列を DNA シーケンサーで決定し、解析を行った。

(3) 分子疫学的解析

菌株間の分子疫学的解析を行うため、「Multi Locus Sequence typing (以下 MLST)」を行い、得られたデータは eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 菌株および血清型別

医療機関で分離された GBS 111 株について血清型別を行った (図 1-a)。JM9 型がもっとも多く 23%で、以下 NT6 型 (21%)、Ia 型 (12%)、Ib 型 (12%)、III 型 (10%) となった。新生児の髄膜炎では III 型が多いと言われているが、本研究で用いた菌株は皮膚や咽頭に単に常在菌として付着していたと思われるものも多く含まれているため、このような結果となったと考えられた。

さらに、一般的に流通している生鮮食肉（鶏肉、豚肉、牛肉）計 530 検体を対象に、GBS の分離を行った。予備実験としていくつかの増菌培地、分離平板培地を組み合わせる GBS の検出を試みたところ、LIM 培地および血液加 Granada 培地でもっとも検出率がよかったことから、本研究ではこれらの培地を用いて菌分離を実施した。その結果、31 株（分離率 5.8%）の GBS が分離され、図 1-b に示したように、Ia (19%)、Ib (16%)、II (10%)、III (6%) の 4 種類で全体の 50%以上を占め、医療機関由来株の傾向と異なる結果となった。

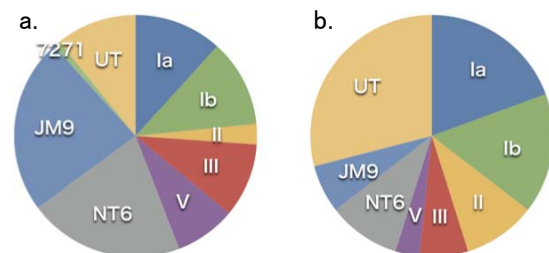


図 1. 由来による GBS 株の血清型割合

a. 医療機関由来株
b. 食肉由来株

(2) 各菌株の薬剤耐性および耐性遺伝子の解析

各々の菌株について薬剤感受性試験を行い、その抗菌剤に対する耐性を検討した。

図 2 に示したように、医療機関由来株における薬剤耐性株の割合は高く、PCG : 19.8%、CTX : 19.8%、EM : 30.1%、TC : 49.3%、OFLX : 21.9% となった。なお、PCG 耐性株と CTX 耐性株はすべて同一の菌株であった。

一方、食肉由来株では PCG・CTX 耐性株は全く検出されず、他の 3 剤については TC、OFLX の耐性率は高かったものの、医療機関由来株よりも低い割合を示した。

これらの耐性株の保有する耐性遺伝子を解析したところ、PCG・CTX 耐性株はペニシリン結合タンパクの変異、EM 耐性株は主に *ermB*、TC 耐性株は主に *tetM*、OFLX 耐性株は *gyrA* お

よび *parC* の変異であることが明らかとなった。

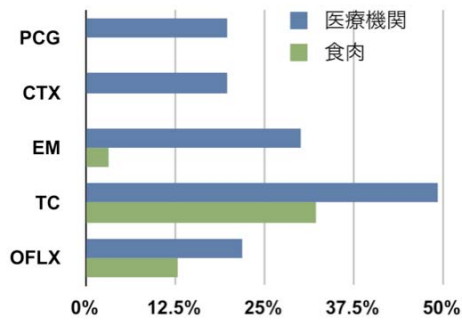


図 2.各薬剤に対する薬剤耐性株の割合

(3) 菌株間の遺伝学的関連性の検討

菌株間の関連性を検討するため、MLST による population 解析を行った。この際、比較対照として“eBURST V3”ウェブサイト (<http://eburst.mlst.net/>) の *Streptococcus agalactiae* データセットを用いた。

図 3 に、GBS の構成する clonal complex (cc) と、本研究で用いた各菌株の型別結果を矢印で示した。医療機関由来株と食肉由来株間で同じ ST 型、もしくは同じ cc となって関連性が示唆されたのは、cc-1、cc-23、cc-10 であった。これらのうち、同じ薬剤耐性パターンが認められたのは cc-23 と cc-10 で、由来にかかわらずそれぞれ TC 耐性株、OFLX 耐性株であった。

一方、cc-1 に分類された医療機関由来株は、特定の医療機関から分離された PCG・CTX 耐性の JM9 型が多かったが、このグループには他機関の感受性株やいくつかの血清型も含まれていた。また、食肉由来株はほとんどが感受性株で血清型の偏りも見られなかった。

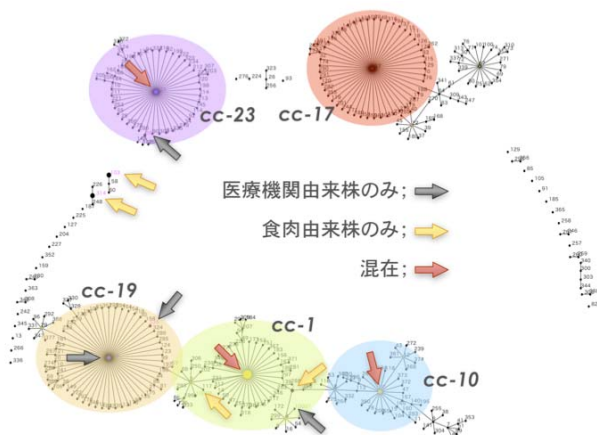


図 3. eBURST 解析による“Population Snapshot”

(4) まとめ

以上の結果から、OFLX 等のニューキノロンおよび TC 耐性株については遺伝的関連性が認められ、医療機関および畜産環境を行き来している可能性が示唆された。一方、治療で第一選択となる PCG・CTX に対する耐性株は特定の医療機関のみで分離され、血清型も限られることから、その医療機関固有のクローンで、他の医療機関や畜産環境では現在のところ拡散は生じていないと考えられた。よって、現時点で GBS 感染は薬剤耐性のために治療不能となる可能性は低いと考えられた。

しかし、本研究で解析した PCG・CTX 耐性株がどのように発生したのか、本研究で遺伝的に関連が示唆された耐性株がどのように伝播しているのかなど、いまだに不明な点も多く、今後さらに解析を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- 〔雑誌論文〕 (計 0 件)
- 〔学会発表〕 (計 0 件)
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 隆二 (KAWAHARA RYUJI)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任
研究員

研究者番号：10332454

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者