

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790960

研究課題名（和文）ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌のセファロsporin 耐性化に関する解析  
 研究課題名（英文） Analysis of cephalosporin-resistance mechanisms of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility.

研究代表者

木村 幸司 (KIMURA KOUJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50425675

研究成果の概要（和文）：木村らは、B 群連鎖球菌がペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得することで、ペニシリン低感受性になることを既に報告した。これらペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) のうち、セファロsporin 系薬に高い Minimum inhibitory concentrations (MICs) を示す株は、PBP2X のみならず、PBP1A に変異を獲得して、セファロsporin 系薬に耐性を獲得していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：K. Kimura et al. reported that group B streptococcus became reduced susceptible to penicillin by the acquisition of mutations in the penicillin-binding protein (PBP) 2X gene. Among these group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS), the strain whom the minimum inhibitory concentrations (MICs) of cephalosporin for, become resistant to cephalosporin by the acquisition of mutations not only in PBP2X genes but also in PBP1A genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細菌学、感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科

キーワード：B 群連鎖球菌、GBS、ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌、PRGBS、薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

B 群連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS) は、新生児敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であるとともに、

高齢者、糖尿病患者等に侵襲的な感染症を引き起こす事、また、院内感染の原因菌になりうる事が知られている。臨床分離される GBS は、ペニシリンを始めとするベータラク

タム系薬に一応に感受性であると考えられ、その予防、治療にはベータラクタム系薬が第一選択薬である。しかしながら、申請者らは、近年、ペニシリン系セファロスポリン系薬に低感受性であるペニシリン低感受性B群連鎖球菌(Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の存在を世界で初めて確定し、ベータラクタム系薬の標的の一つであるペニシリン結合蛋白(Penicillin-binding protein, PBP) 2Xにアミノ酸変異を獲得することでペニシリン系セファロスポリン系薬に低感受性を獲得していることを明らかにした(K. Kimura et al. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52;pp2890-2897. 2008.)。PRGBS は、Pulsed fields gel electrophoresis (PFGE)、PBP2X 変異解析、Multilocus sequence typing (MLST)解析により、ある程度の大きさのグループから多く発生しているが、遺伝的に関連性の薄い多数の菌株から多源的に発生していることを明らかにした(N. Nagano, Y. Nagano, K. Kimura et al. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52;pp4258-4267. 2008 れる。:K. Kimura et al. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 66:pp2460-4.

2011.)。また、同一の患者の褥瘡から数週間の間隔をあけ、遺伝的に同一である PRGBS が分離された症例を報告した(N. Nagano, K. Kimura et al. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 64(6):pp1326-1328. 2009)。  
さらに申請者らは、PRGBS を簡便に検出できるディスク拡散法を開発し(K. Kimura et al. **Journal Clinical Microbiology** 47(12):pp4154-4157. 2009.)、臨床現場から多くの PRGBS 株を集めた。

Clinical and laboratory standards institute (CLSI)は、GBS に対して、ベータラクタム系薬については耐性、中間のクライテリアを設けておらず、感受性のクライテリアのみである。PRGBS は、CLSI の定めるペニシリンの感受性のクライテリア (<0.25 µg/ml)を超える MIC 値(0.25-1 µg/ml)を示すだけでなく、オキサシリン(2-8 µg/ml)、セフチゾキシム(4-128 µg/ml)に高い MIC 値を示す特徴がある。

## 2. 研究の目的

PRGBS の中でも、特にセファロスポリン系に高い MIC 値を示す株(セフチゾキシム 128 µg/ml、セフォタキシム 2 µg/ml、セファゾリン 2 µg/ml)を既に入手しており、この株のセファロスポリン系耐性機構を明らかに

することを本研究課題の目的にしている。この株は、PBP2X 遺伝子に変異が入っているうえに、PBP1A 遺伝子にも変異を有している事を既に見いだしている。この PBP1A 遺伝子の変異がセファロスポリン系耐性機構の主たる要因であるかを検討する。

### 3. 研究の方法

PRGBS のうち、セファロスポリン系薬に高い MIC 値を示す株（セファロスポリン耐性株）は、PBP2X 遺伝子のみならず、PBP1A 遺伝子に変異を有していることを既に明らかにしている。ベータラクタム系薬感受性 GBS にセファロスポリン耐性株由来の変異の入った PBP2X 遺伝子、PBP1A 遺伝子を順次、染色体上に導入し、セファロスポリン系薬に耐性を獲得するかを検討する。また、セファロスポリン耐性株の PBP 蛋白群を蛍光ペニシリンで可視化し、PBP1A に相当するバンドが減少するか否かを検討する。

### 4. 研究成果

ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) のうち、セファロスポリン系薬に高い MIC 値を示す株（セファロスポリン耐性株）は、PBP2X 遺伝子のみならず、

PBP1A 遺伝子に変異を有しているが既に明らかであった。この二つの遺伝子に変異が入っていることが、セファロスポリン耐性機構の主たる要因であるとの仮説を証明するため、以下の実験を行った。

#### (1) allelic exchange

ベータラクタム系薬感受性 GBS にセファロスポリン耐性株由来の変異の入った PBP2X 遺伝子、PBP1A 遺伝子を順次、染色体上に導入し、セファロスポリン系薬に耐性を獲得するかを検討した。セファロスポリン耐性株由来の変異の入った PBP2X 遺伝子、PBP1A 遺伝子を導入した株は、親株と同等にセファロスポリン系薬に高い MIC 値を示した。このことから PBP2X 遺伝子、PBP1A 遺伝子の変異が PRGBS のセファロスポリン耐性機構の主たる要因であることが明らかになった。

#### (2) PBP binding assay

セファロスポリン耐性株及び先の allelic exchange で得た組換え体の膜画分を粗精製し、蛍光ペニシリンと反応させ、SDS-PAGE で展開し、PBP 蛋白群を可視化した。PBP1A に対する抗体を合成ペプチドを抗原にしてウサギを用いて作成し、可視化した PBP 蛋白群のうち、いずれが PBP1A に相当するバ

ンドであるかを明らかにした。

#### 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5件)

1. N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, K. Kimura, T. Tamura, K. Shibayama, Y. Arakawa (2011)

“Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** in press 査読有

2. K. Kimura, N. Nagano, Y. Nagano, J. Wachino, S. Suzuki, K. Shibayama, Y. Arakawa (2011)

“Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 66:pp2460-4. 査読有

3. J. Wachino, K. Shibayama, K. Kimura, K. Yamane, S. Suzuki, Y. Arakawa (2010)

“RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms”

**FEMS Microbiol Lett** 311(1):pp56-60. 査読有

4. J. Wachino, K. Yamane, S. Suzuki, K. Kimura, Y. Arakawa (2010)

“Prevalence of Fosfomycin Resistance among CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Japan and Identification of Novel Plasmid-Mediated

Fosfomycin-Modifying Enzymes”

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 54(7):pp3061-3064. 査読有

5. 北澤克彦、本多昭仁、荒畑幸絵、木村幸司、荒川宜親 (2010)

“ステロイド治療中の10歳女兒に発症したB群レンサ球菌による菌血症の1例”  
感染症学雑誌 第84巻第4号 p460-463.  
日本感染症学会 査読有

[学会発表] (計19件)

1. 外山雅美、長野則之、長野由紀子、田村孝志、木村幸司、荒川宜親 (2012)

“同一施設で検出された多剤耐性・ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の分子学的特性”  
第23回日本臨床微生物学会総会 横浜 1月21日22日

2. 大野智子、三嶋廣繁、澤村治樹、小坂功、山田敦子、末松寛之、山岸由佳、長野則之、外山雅美、長野由紀子、木村幸司、荒川宜親 (2012)

“愛知医科大学病院で検出されたペニシリン低感受性B群連鎖球菌の分子学的解析”  
第23回日本臨床微生物学会総会 横浜 1月21日22日

3. 木村幸司、長野則之、長野由紀子、荒川宜親 (2011)

“これまでのペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGS)の研究”  
第40回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 群馬 12月1日2日

4. 長野則之、長野由紀子、外山雅美、木村幸司、田村孝志、柴山恵吾、荒川宜親 (2011)

“Clonal complex 1のST-458に属する多剤耐性・ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の院内伝播”  
第40回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 群馬 12月1日2日

5. 岩田あや、内田佳子、仁紙宏之、木村幸司、荒川宜親(2011)  
“Ultra late onset GBS感染症の2例”  
第43回日本小児感染症学会総会 岡山 10月29日30日
6. 長野則之、長野由紀子、木村幸司、荒川宜親(2011)  
“B群レンサ球菌の病原性クローン(ST-17)におけるペニシリン低感受性株出現の可能性”  
第59回日本化学療法学会総会 札幌 6月23-25日 P-C43
7. 長野則之、長野由紀子、外山雅美、田村孝志、木村幸司、荒川宜親(2011)  
“同一施設で検出された多剤耐性・ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の分子学的解析”  
第59回日本化学療法学会総会 札幌 6月23-25日 P-C44
8. 木村幸司、長野則之、長野由紀子、柴山恵吾、荒川宜親(2011)  
“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の遺伝学的背景に関する解析”  
第20回Lancefieldレンサ球菌研究会、第43回レンサ球菌感染症研究会合同開催(口頭発表) 名古屋 6.17-18.
9. 長野由紀子、長野則之、木村幸司、柴山恵吾、荒川宜親(2011)  
“B群レンサ球菌の病原性クローン(ST-17)におけるペニシリン低感受性株出現の可能性”  
第20回Lancefieldレンサ球菌研究会、第43回レンサ球菌感染症研究会合同開催(口頭発表) 名古屋 6.17-18.
10. 外山雅美、長野則之、長野由紀子、田村孝志、木村幸司、柴山恵吾、荒川宜親(2011)  
“同一施設で検出された多剤耐性・ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の分子学的解析”  
第20回Lancefieldレンサ球菌研究会、第43回レンサ球菌感染症研究会合同開催(口頭発表) 名古屋 6.17-18.
11. 長野則之、長野由紀子、木村幸司、荒川宜親(2011)  
“B群レンサ球菌の病原性クローン(ST-17)におけるペニシリン低感受性株出現の可能性”  
第22回日本臨床微生物学会総会 岡山 1月8-9日
12. 金山明子、小林寅喆、長谷川美幸、雑賀威、池田文昭、木村幸司、荒川宜親、山藤満、佐藤吉壮(2010)  
“日本で分離されるpenicillin低感受性Group B streptococciの遺伝的性状”  
第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第57回日本化学療法学会東日本支部総会、合同大会 東京 10月21-22日
13. 長野則之、木村幸司、長野由紀子、荒川宜親(2010)  
“仙骨褥瘡から分離されたペニシリン低感受性B群レンサ球菌の分子学的特性”  
第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第57回日本化学療法学会東日本支部総会、合同大会 東京 10月21-22日
14. 金山明子、渋谷理恵、長谷川美幸、池田文昭、木村幸司、荒川宜親、小林寅喆  
“Molecular Characterization of Group B Streptococci in Japan with Reduced Susceptibility to Penicillin”  
50<sup>th</sup> ICAAC, Boston, 2010 C2-122
15. 松井真理、鈴木里和、山根一和、和知野純一、木村幸司、筒井敦子、山岸拓也、近田俊文、荒川宜親  
“Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Acinetobacter baumannii* Isolated in Japan”  
50<sup>th</sup> ICAAC, Boston, 2010 C2-101

16. 松原康策、木村幸司、荒川宜親、岩田あや、由良和夫、竹内康人、片山和明(2010)  
“2007-08年の臍由来GBSのペニシリン低感受性株サーベイランスと血清型分布の検討” GBS with reduced penicillin-susceptibility and serotype distribution among GBS strains in 2007-2008.  
第46回日本周産期・新生児医学会 神戸 7月11日-13日 P0-416
17. 木村幸司、長野則之、長野由起子、荒川宜親(2010)  
“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌の最新の知見”  
第58回日本化学療法学会 長崎 6月2日-4日 若手セミナー3
18. 木村幸司、長野則之、長野由起子、荒川宜親(2010)  
“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の遺伝学的背景に関する解析”  
第84回日本感染症学会 京都 4月5日-6日 W16-4

19. 松原康策、木村幸司、山本剛、荒川宜親(2010)  
“2007-08年の臍由来GBSの薬剤感受性と血清型分布-ペニシリン低感受性菌のサーベイランスと血清型ワクチン導入の考察-”  
第84回日本感染症学会 京都 4月5日-6日 W13-5

[図書] (計1件)

木村幸司 (2010)

“中枢神経系感染症”  
感染症診療の基礎と臨床～耐性菌の制御に向けて～ 一山智 山口恵三監修 飯沼由嗣 舘田一博編 医薬ジャーナル社 p226-229

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木村 幸司 (KIMURA KOUJI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50425675

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし