

令和元年6月15日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09566

研究課題名(和文) ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の病原性に関わる莢膜多糖体の血清型変化事象の解明

研究課題名(英文) Population-level transition of capsular polysaccharide types among sequence type 1 group B Streptococcus isolates with reduced penicillin susceptibility during a long-term hospital epidemic.

研究代表者

長野 則之(Nagano, Noriyuki)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：00747371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生児及び高齢者の重篤感染症治療の第一選択薬であるペニシリン系薬に低感受性を示すB群レンサ球菌(PRGBS)株が、同一医療機関での長期流行中に血清型の集団的な変遷をみせた。流行初期の血清型IIIの株と変遷後のIaの株はいずれもST1に属し、ペニシリン結合蛋白(PBPs)に共通のアミノ酸置換を有した。血清型IIIとIaの代表株でゲノム配列に高い相同性が確認され、且つ莢膜多糖体遺伝子クラスターとその上流、下流の遺伝子配列の血清型に特徴的な違いが血清型III、Iaの全株で確認されたことから、血清型IIIからIaへの集団的な変遷事象に莢膜スイッチング及び院内伝播が関与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRGBSにおける莢膜スイッチングを促す要因として、抗菌薬によるbacterial stressや宿主の抗莢膜抗体による免疫圧が考えられる。莢膜スイッチング事象によりGBSが宿主抗体による免疫防御を回避する可能性は、WHO主導で進行中のワクチン開発戦略における障壁となることから本成果をInt J Antimicrob Agents 2019;53:203-210にて発表した。また、選択圧となるβ-ラクタム剤の違いによって選択される耐性株がPRGBS株あるいはCTBrPSGBS株と異なる危険性を見出し、Microbiol Immunol 2019;63:65-76にて報告した。

研究成果の概要(英文)：Group B Streptococcus isolates with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) were detected from elderly patients, accompanying population-level transition of serotypes during a long-term hospital epidemic. Serotype III predominated in the first 9 months, which was replaced predominantly by serotype Ia for 9 months. Serotypes III and Ia isolates, belonging to ST1, shared four substitutions in penicillin-binding protein 2X. WGS revealed that the serotype III strain SU12 had a higher degree of genomic similarity with serotype Ia strain SU97. Moreover, the sequence characteristics of the disruption of the hyaluronidase gene located upstream of cpsY by insertion of IS1548 in strain SU12 and the insertion of ISSag8 between tRNA-Arg and rpsA genes located downstream of cpsL in strain SU97 were shared by other serotype III and Ia isolates, respectively. Capsular switching and nosocomial transmission may possibly contribute to population-level serotype replacement among ST1 PRGBS isolates.

研究分野：臨床微生物の薬剤耐性機構

キーワード：B群レンサ球菌 PRGBS 莢膜スイッチング CTBrPSGBS ワクチン戦略

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) B 群レンサ球菌(GBS)は新生児及び高齢者侵襲性感染症の主要な原因菌で特に血清型 III や Ia の株が高病原性を示し、死亡例や後遺症を伴う場合もある。また、高齢者や糖尿病、免疫不全などの慢性基礎疾患を有する患者では尿路感染や皮膚軟部組織感染、あるいは敗血症などのより重篤な感染症を引き起こす。米国では新生児の産道感染を防ぐ目的で推奨される分娩時ペニシリン予防投与により早発型感染症の発生率が劇的に減少してきており、日本でも実施されるようになった。

(2) 我々は GBS 感染症の第 1 選択薬であるペニシリン (PCG) に低感受性を示す GBS (PRGBS) 株において、ペニシリン結合蛋白 (PBP) 2X の特定のアミノ酸置換によるペニシリン結合量の低下がペニシリン低感受性の主な機序であることを世界で初めて明らかにし、この分野での研究を先導してきている。また、PRGBS では他系統の抗菌薬にも耐性を示す多剤耐性株が高頻度に認められ、侵襲性感染症の治療戦略に多大な影響を及ぼす。

(3) 国内での PRGBS の検出頻度は海外に比べて高く、特に高齢者の呼吸器材料から多く検出されるが、なかには敗血症や肺炎へと進展する侵襲性感染症も確認しており、高齢化社会の中にあって懸念すべき薬剤耐性菌と考える。

2. 研究の目的

(1) 同一医療機関で 3 年間の長期にわたり PRGBS 株が検出され、莢膜多糖体の血清型に III→Ib→Ia と経時的な集団変遷がみられた。予備実験の結果、血清型 III と Ia の PRGBS 株が PBP 2X、2B、1A に共通のアミノ酸置換を有し、且つ遺伝的に同一なクローンであることを確認した。そこで、これらの同一クローンに属する PRGBS 株の血清型の集団変遷事象への、本菌の virulence factor、且つワクチン標的物質として重要な莢膜多糖体の遺伝子クラスターの遺伝子組み換え(capsular switching)の関与の解明を目的とした。なお、解析対象となる血清型の III 型、Ia 型及び Ib 型は他の血清型に比較して病原性がより高いとされる血清型である。

(2) また、これまでに PRGBS 株の報告がない血清型 III の新生児高病原性クローン ST17 株を対象に各種β-ラクタム系薬の選択圧の違いが PRGBS やセフトラベン耐性ペニシリン感性 GBS (CTB^rPSGBS) の選択に及ぼす影響を *in vitro* 実験により解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 73 事例由来 PRGBS 77 株を検出し、代表株を対象に PBP 2X、2B、1A のアミノ酸置換解析、multilocus sequence typing (MLST) による sequence type (ST) の同定を実施した。さらに血清型 III、Ia、Ib の PRGBS 代表株各 1 株に加え、同時期に検出された血清型 Ib の CTB^rPSGBS 1 株の全ゲノム配列解析を実施した。

(2) 新生児髄膜炎由来血清型 III ST17 の strain N3 (MICs ; PCG 0.06 μg/mL, セフトラキシム [CTX] 0.12 μg/mL, CTB 32μg/mL) を用いた。PRGBS の *in vitro* 選択実験には 3 種のβ-ラクタム系薬と 2 種の選択法を取り入れ、薬剤耐性菌が選択されるリスクが生じる不適切な治療条件を模している。Stepwise 法は PCG, セフトラキシム (CTX), セフトラベン (CTB) の各希釈系列で継代培養, sublethal 法は各薬剤の 1/2 MIC 濃度で 50 回継代培養を実施した。さらに抗菌薬非含有培地で 10 回継代し耐性の安定性を評価した。また、コロニーの観察及び薬剤感受性試験, PBP 2X, 2B, 1A のアミノ酸置換解析を実施した。

4. 研究成果

(1) PRGBS の血清型は最初の 9 か月間 (period I) は III が優位で (III が 16 株/Ib が 1 株)、次の 3 か月間 (period II) は Ib が 3 株認められ、次の 9 か月間 (period III) は Ia が優位となった (Ia が 20 株/III が 1 株/NT が 1 株)。その後の 14 か月間 (period IV) は Ia が 25 株、III が 10 株認められた (Figure 1A)。

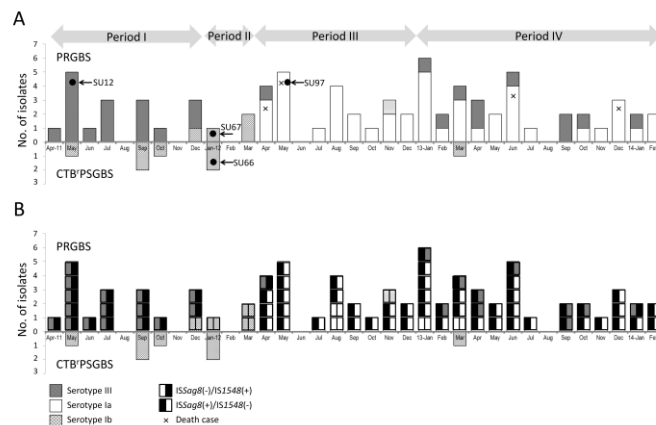


Figure 1. Seventy-seven isolates of group B *Streptococcus* with reduced susceptibility to penicillin detected in a regional general hospital. (A) Transition of serotypes during Periods I to IV. (B) The presence or absence of Δ ISSag8 between tRNA-Arg and *rpsA* genes or ISJ548 in hyaluronidase gene *hylB* for each isolate.

これらの血清型 III と Ia の株は ST1 に属し、検出時期に関わらず PBP2X に G329V, G398A, V405A, G429D を共有していた。一方、血清型 Ib の株も ST1 と同定されたが PBP2X には V405A を除いてこれらと異なる置換を有していた (Table1)。

Table 1. PBP amino acid substitutions in PRGBS and CTB⁺PSGBS clinical isolates

Category	Capsular type	n	MLST sequence type	Amino acid substitutions in PBPs						
				PBP2X			PBP2B		PBP1A	
PRGBS	Ia	8 (period III & IV)	1	G329V	G398A	V405A	G429D	ND	T587I	
	III	11 (period I)	1	G329V	G398A	V405A	G429D	H633Y (7) or ND (4)	T587I	
		4 (period IV)	1	G329V	G398A	V405A	G429D	ND	P385L	
CTB ⁺ PSGBS	Ib	2 (periods I & II)	1		A400V	V405A		Q557E	T567I	ND
		3 (periods I & II)	1	T394A			G429S		T567I	ND
		3 (periods I & II)	1	T394A					T567I	T145A

PBP, penicillin-binding protein; PRGBS, group B streptococci with reduced penicillin susceptibility; CTB⁺PSGBS, penicillin-susceptible group B streptococci with reduced cephalosporin susceptibility.

さらにドラフトゲノム配列の ANI 値及び SNP を指標とした系統解析の結果、血清型 III の strain SU12 (period I) と血清型 Ia の strain SU97 (period III) の間でクラスターが形成され、ゲノム配列の高い相同性が確認された (ANI 値 99.84%, 957 SNPs)。また、これらの株間で病原因子の保有プロファイルも一致していた。一方、血清型 Ib の strain SU67 (period II) は CTB⁺PSGBS の strain SU66 (period II) とクラスターを形成した (ANI 値 99.95%, 46 SNPs)。莢膜多糖体遺伝子クラスターとその上流, 下流を含む約 55 kb 領域の解析から, strain SU12 では *cpsY* 上流の *hylB* への IS1548 挿入による遺伝子破壊が認められたが, このような特徴は period I の血清型 III の全株で確認された (Figure 1B)。一方, strain SU97 では *cpsL* 下流の tRNA-Arg と *rpsA* の間への ISSag8 の挿入が認められたが, strain SU12 でみられた *hylB* の遺伝子破壊は確認されなかった (Figure 2)。このような特徴は period III と IV の血清型 Ia の株の大多数で確認された (Figure 1B)。さらに興味深いことに, 同じ配列は period IV で再出現した血清型 III の株でも認められた。*hylB* は主要な病原因子であるヒアルロニダーゼをコードしており, 血清型 Ia の株が正常な *hylB* を有していたことから血液由来の 4 株がいずれも血清型 Ia で予後不良事例であったこととの関連性が注目される。本研究から血清型 III から Ia への集団的変遷事象に capsular switching 及び院内伝播が関与している可能性が示唆される。本研究の成果は Int J Antimicrob Agents. 2019; 53: 203-210 に報告した。

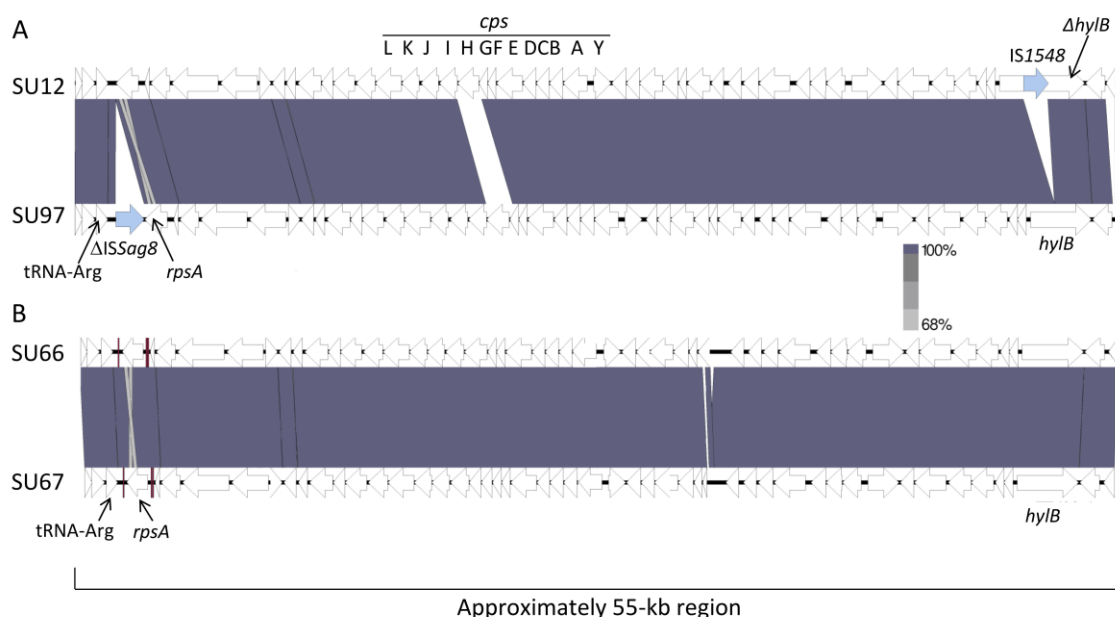


Figure 2. Alignment of approximately 55-kp region including *cps* gene clusters and the upstream and downstream flanking sequences using Easyfig v2.2.2. (A) Comparisons between serotype III group B *Streptococcus* with reduced susceptibility to penicillin (PRGBS) strain SU12 and serotype Ia PRGBS strain SU97. (B) Comparisons between serotype Ib penicillin-susceptible GBS with reduced cephalosporin susceptibility (CTB⁺PSGBS) strain SU66 and serotype Ib PRGBS strain SU67. Genes are indicated by arrows, and the level of sequence similarity is shown in the gradient scale.

(2) Stepwise 法の場合 PCG 選択株では PCG の MIC が 0.25-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と安定的に維持され正常コロニーの PRGBS 株が選択されたが、これらの株は PBP2X に PRGBS のキー置換 V405A に隣接した G406D を共有していた (Figure 3)。CTX の MIC は 0.25-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と上昇し、CTB の MIC は $>512 \mu\text{g}/\text{mL}$ と高値であった。CTX 選択株では継代早期から PBP2X に G398E を有する PRGBS (CTX MIC, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が選択され、さらに CTX の MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と非感性になった場合 G398E+G329V+H438Y が認められた。これらの PCG 選択株及び CTX 選択株では親株に比べて著しい増殖能低下が認められた (Figure 4)。CTB 選択株では安定的な CTB の MIC の上昇に伴い T555S+A354V+A536V のアミノ酸置換の蓄積がみられ、結果的に CTB^rPSGBS 株が選択された。この CTB^rPSGBS 株の増殖能は親株の場合と同等であった点が注目される。Sublethal 法の場合は、これら 3 種の抗菌薬のいずれでも PRGBS 株は選択されなかった。本研究から高病原性クローン ST17 において PRGBS が出現し新生児侵襲性感染症治療における脅威となり得ること、また抗菌薬適正使用の重要性が示唆される。本研究の成果は Microbiol Immunol. 2019; 63: 65-76 に報告した。

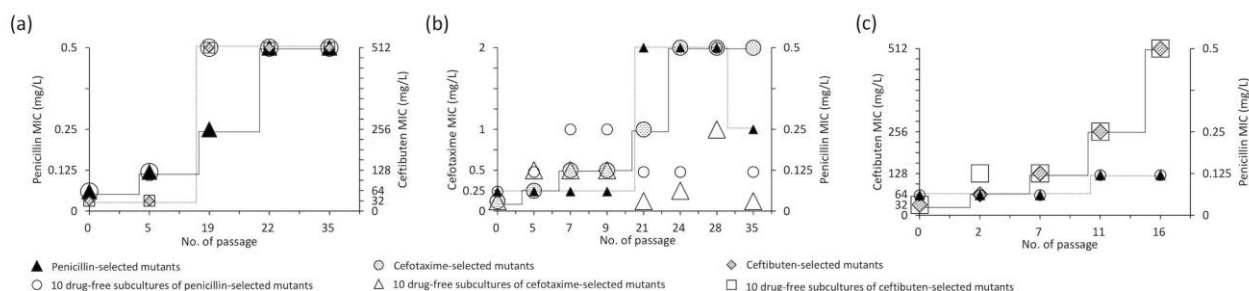


Figure 3. Changes in MIC values for selected mutants and their 10 drug-free subcultures were monitored during exposure to stepwise increasing concentrations of PCG (a), CTX (b), or CTB (c).

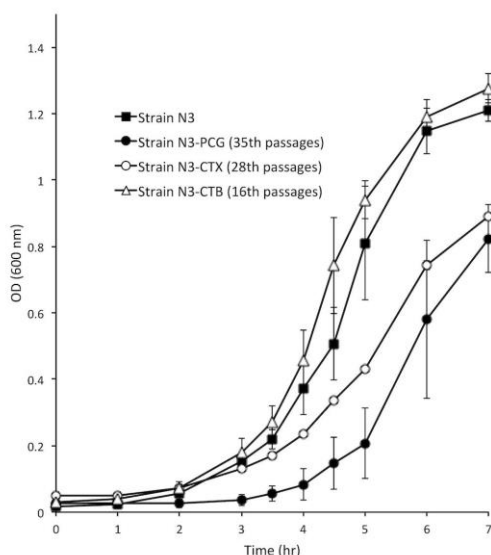


Figure 4. Growth curves of parent strain N3 and its PRGBS mutants selected by stepwise PCG exposure (filled circles), and those selected by stepwise CTX exposure (open circles), respectively, and its CTB^rPSGBS mutants selected by stepwise CTB exposure (open triangles). Values are plotted as mean \pm SD.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Koide S, Hayashi W, Taniguchi Y, Tanaka H, Kimura K, Nagano Y, Arakawa Y, **Nagano N**. Potential effect of selective pressure with different β -lactam molecules on the emergence of reduced susceptibility to β -lactams in group B *Streptococci*. Microbiol Immunol. 2019; 63: 65-76. 査読有り
- ② **Nagano N**, Koide S, Hayashi W, Taniguchi Y, Tanaka H, Maeyama Y, Suzuki M, Kimura K, Arakawa Y, Nagano Y. 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. 2019; 53: 203-210. 査読有り

〔学会発表〕（計10件）

- ① **長野則之**: シンポジウム 15: B 群レンサ球菌に対するワクチン. 第 67 回日本化学療法学会総会, 東京, 2019 年 5 月.
- ② 小出将太, 長野由紀子, 林航, 谷口唯, 田中隼人, 前山佳彦, 鈴木匡弘, 木村幸司, 荒川宜親, **長野則之**: 同一医療施設におけるペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 sequence type 1 の集団ベースでの血清型変遷事象の解明. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 東京, 2019 年 2 月.
- ③ 麻生さくら, 松永悠里, 細貝みゆき, 藤田裕美, 安藤諒, 中村竜也, 小出将太, **長野則之**: 高粘稠性 *Streptococcus agalactiae* 2 株について. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 東京, 2019 年 2 月.
- ④ 小出将太, 長野由紀子, 林航, 谷口唯, 田中隼斗, 前山佳彦, 鈴木匡弘, 木村幸司, 荒川宜親, **長野則之**: 同一医療施設におけるペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 sequence type 1 の長期流行期間における血清型変遷事象の解明. 第 47 回薬剤耐性菌研究会学術集会, 松本, 2018 年 11 月.
- ⑤ **長野則之**: 教育講演 21: ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 (PRGBS) の特性と臨床的背景. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 岐阜, 2018 年 2 月.
- ⑥ 小坂駿介, 長野由紀子, 鈴木匡弘, 小出将太, 大崎裕介, 谷口唯, 林航, **小穴こず枝**, 木村幸司, 荒川宜親, **長野則之**: ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 sequence type 1 の長期的流行に認められた血清型の集団の変遷事象への capsular switching の関わり. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 岐阜, 2018 年 2 月.
- ⑦ 小出将太, 小坂駿介, 大崎裕介, 谷口唯, 林航, 木村幸司, 長野由紀子, 荒川宜親, **長野則之**: β-ラクタム系薬選択圧下における B 群レンサ球菌のβ-ラクタム系薬耐性化への実験的考察. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 岐阜, 2018 年 2 月.
- ⑧ 小出将太, 小坂駿介, 谷口唯, 林航, 大崎裕介, 木村幸司, 長野由紀子, 荒川宜親, **長野則之**: β-ラクタム系薬の選択圧の違いが B 群レンサ球菌のβ-ラクタム系薬低感受性化へ及ぼす影響. 第 46 回薬剤耐性菌研究会学術集会, 群馬, 2017 年 11 月.
- ⑨ 小出将太, 小坂駿介, 大崎裕介, 谷口唯, 林航, 木村幸司, 長野由紀子, 荒川宜親, **長野則之**: β-ラクタム系薬選択圧下における B 群レンサ球菌の耐性化誘導. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会, 名古屋, 2017 年 10 月.
- ⑩ 小出将太, 小坂駿介, 大崎裕介, 谷口唯, 林航, 前山佳彦, **小穴こず枝**, 長野由紀子, **長野則之**: B 群レンサ球菌高病原性クローン ST17 におけるβ-ラクタム系薬低感受性株出現の可能性. 第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会, 埼玉, 2017 年 8 月.

〔図書〕（計1件）

- ① **長野則之**（編集・分担執筆）：耐性菌検査法ガイド pp.32-34, pp.92-97. 「日本臨床微生物学雑誌」第 27 巻 Supplement 3, 2017. 一般社団法人日本臨床微生物学会出版

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小穴 こず枝

ローマ字氏名：OANA, kozue

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院保健学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60115334

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。