

秋田県内の4地域で分離されたA群レンサ球菌の T型別年次推移と薬剤感受性について

佐藤 晴美 齊籐志保子 八柳 潤

県内の4地域の医療機関において、2000年～2002年に分離されたA群レンサ球菌のT型別の年次推移、2002年に分離された株の薬剤感受性試験及び耐性株のバルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）パターンについて検討した。

その結果、地域における主流行菌型に年次推移がみられ、T型別の分離率に地域的な差がみられた。また、薬剤感受性試験ではペニシリン系薬剤に対する耐性株は認められなかったが、T-25型とT-12型の一部にEM（エリスロマイシン）とCLDM（クリンダマイシン）に対する耐性株がみられた。耐性株の性状では、T-25型の耐性株のすべてが県北地域の分離株であり、T-12型の耐性株は中央と本荘由利地域の分離株であった。T-12型の耐性株についてPFGEパターン解析を行った結果、耐性株すべてのPFGEパターンは一致し、かつ感受性株とは異なっていたことから同一クローンの耐性株が特定地域に侵襲したものと考えられた。

キーワード：A群レンサ球菌、T型別年次推移、薬剤感受性試験、PFGE

I はじめに

A群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* は、咽頭炎や扁桃炎などの軽い症状、肺炎や猩紅熱などの重篤な症状、あるいは突発的なショック症状で発病する劇症型A群レンサ球菌感染症を引き起こす病原菌である。それらの治療には第一選択薬剤としてペニシリン系薬剤が汎用されることが多いが、A群レンサ球菌では同薬剤に対する耐性株の出現割合は低いと報告されている^(1,2)。しかし近年、各菌種の薬剤耐性菌の増加の問題や、特定のT型菌の増加とともに薬剤耐性株の出現と消長に関する報告^(1,3)もある。そこで2000年～2002年に県内の4地域の医療機関において分離されたA群レンサ球菌のT型別の年次推移及び2002年に分離された株について薬剤感受性試験を行い、その結果認められた耐性株についてPFGEパターンを比較検討したのでこれらについて報告する。

II 材料及び方法

1. 使用分離株

- 1) T型の血清型別には、県内の4地域の医療機関において2000年～2002年に分離された株935株（県北地域296株、中央地域155株、本荘由利地域354株、県南地域130株）を用いた。
- 2) 薬剤感受性試験には、2002年に分離した株T-25型41株、T-12型11株、T-B 3264型15株、T-1型10株、T-4型10株の計87株を用いた。
- 3) 耐性株のPFGEパターン解析には、耐性株はT-25型5株及びT-12型4株、感受性株はT-25型4株

及びT-12型5株を用いた。

なお、これらの株は検査時まで-80℃に保存した。

2. 試験方法

- 1) T型の血清型別は、分離株をTodd-Hewitt Brothで30℃一夜培養後、「デンカ生研T型別用免疫血清」を用いてスライド凝集法を行った。
- 2) 薬剤感受性試験は、分離株を血液寒天で培養後、単コロニーを血液寒天に接種、一夜培養後、滅菌生理食塩水で作成した浮遊菌液を用いて「ドライプレート“栄研”DP-24」で最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。対象薬剤として、PCG（ベンジルペニシリンカリウム）、ABPC（アンピシリンナトリウム）、CEZ（セファゾリンナトリウム）、CTM（塩酸セフォチアム）、CTX（セフォタキシムナトリウム）、CCL（セファクロル）、CDTR（セフジトレンナトリウム）、FMOX（フロモキシセフナトリウム）、IPM（イムペネム）、MEPM（メロペネム3水和物）、EM（エリスロマイシン）、CLDM（塩酸クリンダマイシン）⁽⁴⁾、MINO（塩酸ミノサイクリン）、VCM（塩酸バンコマイシン）、LVFX（レボフロキサシン）、ST（スルファメトキサゾールトリメトプリム）を用いた。
- 3) PFGE解析^(5,6)のプラグは、Todd-Hewitt Brothで30℃一夜培養した菌液を速心分離後、滅菌精製水で作成した浮遊菌液50μlに1%低融点アガロース50μlを加えて作成した。リゾチーム処理は37℃で一夜振とうし、次いでプロテネスK処理として50℃

で一夜振とう後、さらにプラグ洗浄し、制限酵素処理を行った。泳動装置はCHEF-DR II (BIO-RAD)を使用し、Block1：電圧0.6V/cm、パルスタイム4秒から8秒、泳動時間9時間、Block2：パルスタイム8秒から50秒、泳動時間13時間、バッファー温度14℃の条件で行った。泳動後のゲルは、Ethidium bromide で染色し、UVトランスイルミネーターを用いて写真撮影した。制限酵素は、T-12型では *Sma*I、T-25型では *Sma*I及び *Sfi*Iを使用した。

Ⅲ 結 果

1. T型別の年次推移

1) 県北地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移を表1に示した。県北地域では、2000年はT-4型、T-12型及びT-B3264型が主流行菌型であった。2001年は、T-4型及びT-12型が減少し、T-B3264型、T-1型及びT-11型が増加し、さらにT-3型並びにT-25型が出現した。2002年はT-1型とT-25型の増加が顕著であったが、主流行菌型はT-1型、T-4型及びT-B3264型であった。

表1 県北地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移

T 型	2000年		2001年		2002年	
	株 数	分離率	株 数	分離率	株 数	分離率
4	48	49.5	17	25.4	29	22.0
12	22	22.7	7	10.4	3	2.3
B3264	12	12.4	24	35.8	26	19.7
1	8	8.2	7	10.4	35	26.5
11	1	1.0	6	9.0	4	3.0
3	—	—	2	3.0	1	0.8
25	—	—	1	1.5	17	12.9
Other	2	2.1	2	3.0	2	1.5
U T	4	4.1	1	1.5	15	11.3
合計	97	100.0	67	100.0	132	100.0

分離率：％

2) 中央地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移を表2に示した。中央地域では、2000年はT-4型、T-12型及びT-1型が主流行菌型であった。2001年は、2000年の主流行菌型が大幅に減少し、T-28型、T-25型及びT-B3264型が出現した。2002年の主流行菌型はT-25型、T-B3264型及びT-1型であった。

3) 本荘由利地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移を表3に示した。本荘由利地域では、2000年はT-12型、T-4型及びT-2型が主流行菌型であった。2001年はT-4型及びT-2型が大幅に減少したが、T-B3264型、T-25型の増加が顕著にみられた。2002年はT-B3264型、T-25型及びT-

表2 中央地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移

T 型	2000年		2001年		2002年	
	株 数	分離率	株 数	分離率	株 数	分離率
4	18	31.6	3	7.5	5	8.6
12	17	29.8	5	12.5	5	8.6
1	10	17.5	3	7.5	7	12.1
2	3	5.3	2	5.0	3	5.2
11	2	3.5	—	—	—	—
28	—	—	4	10.0	3	5.2
25	—	—	3	7.5	17	29.3
B3264	—	—	3	7.5	9	15.5
Other	6	10.5	3	7.5	3	5.2
U T	1	1.8	14	35.0	6	10.3
合計	57	100.0	40	100.0	58	100.0

分離率：％

表3 本荘由利地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移

T 型	2000年		2001年		2002年	
	株 数	分離率	株 数	分離率	株 数	分離率
12	72	42.4	35	42.7	2	2.0
4	45	26.5	16	19.5	3	2.9
2	30	17.6	—	—	—	—
B3264	6	3.5	16	19.5	37	36.3
1	3	1.8	4	4.9	19	18.6
25	2	1.2	6	7.3	34	33.3
28	—	—	1	1.2	2	2.0
11	—	—	1	1.2	1	1.0
Other	6	3.5	2	2.5	—	—
U T	6	3.5	1	1.2	4	3.9
合計	170	100.0	82	100.0	102	100.0

分離率：％

表4 県南地域で分離されたA群レンサ球菌のT型別年次推移

T 型	2000年		2001年		2002年	
	株 数	分離率	株 数	分離率	株 数	分離率
12	17	85.0	2	18.2	1	1.0
4	1	5.0	4	36.4	36	36.4
B3264	1	5.0	2	18.2	12	12.1
28	—	—	2	18.2	4	4.0
25	—	—	—	—	13	13.1
1	—	—	—	—	11	11.1
3	—	—	—	—	6	6.1
13	—	—	1	9.1	—	—
U T	1	—	—	—	16	16.2
合計	20	100.0	11	100.0	99	100.0

分離率：％

1 型の増加が顕著にみられ、これらが主流行菌型であった。

4) 県南地域で分離された A 群レンサ球菌の T 型別年次推移を表 4 に示した。県南地域では、2000 年及び 2001 年の分離株数が少なかったが、2000 年は T-12 型また 2001 年と 2002 年は T-4 型が主流行菌型であった。

2. 薬剤感受性試験

T 型別の薬剤感受性試験成績を表 5 に示した。2002 年に分離された 5 菌型 87 株を用いて感受性試験を行った結果、ペニシリン系薬剤、セファム系薬剤、テトラサイクリン系薬剤に耐性株はみられなかった。薬剤耐性株の分離では、T-B3264 型、T-1 型、T-4 型に耐性株はみられなかったが、T-25 型では 5 株 (12.2%) が EM に耐性を示し、T-12 型では 4 株 (36.4%) が EM 及び CLDM に耐性を示した。

T-25 型及び T-12 型の耐性株の性状を表 6 に示した。T-25 型で EM 耐性を示した株はすべて県北地域の医療機関で 10 月から 12 月に分離され、MIC は 1 ~ 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。T-12 型で EM と CLDM に耐性を示した 4 株のうち 3 株は中央地域、1 株が本荘由利地域の医療機関で分離され、MIC は 1 ~ ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。このことから今後も薬剤耐性に対する監視が必要と思われた。

表 5 T 型別の薬剤感受性試験成績

T 型	株 数	耐 性 株 数		
		EM	EM/CLDM	合計 (%)
T-25	41	5	0	5 (12.2)
T-B3264	15	0	0	0
T-12	11	0	4	4 (36.4)
T-1	10	0	0	0
T-4	10	0	0	0
合計	87	5	4	9 (10.3)

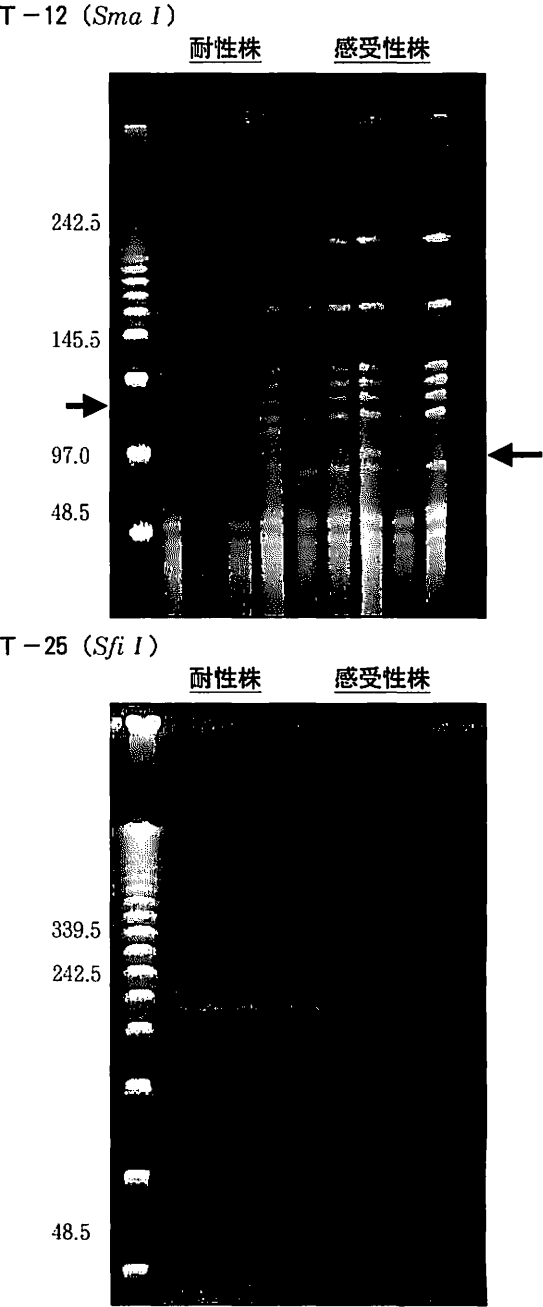
表 6 T-25 及び T-12 型の耐性株の性状

No	T 型	地域	分離月	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
				EM	CLDM
1	25	県北	10	2	≤ 0.06
2	25	県北	10	2	≤ 0.06
3	25	県北	11	1	≤ 0.06
4	25	県北	11	2	≤ 0.06
5	25	県北	12	2	≤ 0.06
6	12	中央	5	1	≥ 2
7	12	中央	8	1	1
8	12	中央	2	≥ 2	2
9	12	本荘由利	7	2	2

3. 耐性株の PFGE パターンの比較

図 1 に T-12 型の EM 及び CLDM 耐性株 4 株と感受性株 5 株の PFGE パターンの比較した結果を示した。耐性株 4 株のパターンはすべて同一であったが、このパターンは感受性株 5 株の 97.0kb 付近のバンドと異なっていた。

一方、T-25 型の EM 耐性株 5 株と感受性株 4 株について制限酵素 *Sma*I を用いて PFGE を行った結果、*Sma*I では DNA の切断がみられなかった。このことから *Sfi*I を用いて PFGE を行った結果、*Sfi*I ではバンド数が少なく解析することができなかった。今後さらに、使用制限酵素等について詳細な検討が必要と考えられた。



IV 考 察

今回、県内の4地域で共通にみられたT型別の主流行菌型の年次推移は、T-12型が減少傾向、T-25型が増加傾向であった。この結果の要因として、森田が述べている⁽²⁾A群レンサ球菌の感染頻度の減少、あるいは過去の感染により獲得したT抗体産生の減少の可能性、また菌型による地域社会における侵襲差や感染時の抗体産生の差などが推測された。今後、主流行菌型に年次推移がみられた要因についてさらに詳細に解析することが必要と考えられた。

また、耐性株のPFGEパターンを比較した結果、同一クローンと考えられる耐性株が特定地域に侵襲したものと考えられたが、今後これらについても注目していく必要がある。

V ま と め

1. A群レンサ球菌の地域におけるT型別の主流行菌型に年次推移がみられた。また、年次ごとのT型別の分離率に地域的な差がみられた。
2. 薬剤感受性試験では、ペニシリン系薬剤、セファム系薬剤、テトラサイクリン系薬剤に対する耐性株はみられなかった。しかし、T-25型にEM耐性株がみられ、T-12型にはEM及びCLDM耐性株がみられ、これらは特定の地域で分離される傾向があった。また今回の調査では、劇症型A群レンサ球菌感染症の治療薬の一つであるCLDMに対する耐性株が少数確認された。
3. 県北地域の医療機関で分離された耐性株のうちT-12型については、PFGEパターンはすべて同一であった。

VI 謝 辞

本調査に関してご助言をいただきました秋田大学医学部実験実習機器センターの天野憲一先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 奥山道子他. 大阪市内1小学校の健康学童の咽頭分離溶血レンサ球菌(A,B,C,G群)の長期観察(1980～1992年)第2編 薬剤感受性. 平成6年;68(5):665-679
- 2) 森田盛大. A群レンサ球菌感染と疫学. 臨床と微生物. 1996;23(1):35-42
- 3) 飯村達. レンサ球菌感染症の歴史. 臨床と微生物. 1996;23(1):3-12
- 4) 清水可方. 劇症A群レンサ球菌感染症の臨床. 臨床と微生物. 1996;23(1):29-34
- 5) 秋田県衛生科学研究所微生物部細菌担当. 平成12年度厚生科学研究費補助新興・再興感染症研究事業総括・分担研究報告パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究. 34-35
- 6) 田中大祐他. パルスフィールド電気泳動像によるB群溶血レンサ球菌型別. 感染症学雑誌. 平成7年;69(4):455-460