

分子生物学的手法による *Streptococcus pyogenes* の薬剤耐性の検討

保 富 宗 城 Dewan S. Billal 森 山 智 美

安 井 紀 代 藤 原 啓 次

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科

杉 田 麟 也 山 中 昇

杉田耳鼻咽喉科

Molecular Characteristics of Macrolide Resistance in *Streptococcus pyogenes*

Muneki HOTOMI, Dewan S. BILLAL, Satomi MORIYAMA, Noriyo YASUI,
Keiji FUJIHARA

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wakayama Medical University,
Wakayama

Rinya SUGITA, Noboru YAMANAKA

Sugita ENT Clinic

The growing number of macrolide-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) is an increasing problem in upper respiratory tract infectious diseases. This study evaluated minimal inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin (EM) and azithromycin (AZM) and expression of three macrolide resistance genes, *mefA*, *ermB* and *ermTR* among the 300 strains of *S. pyogenes* isolated from the upper respiratory tract. The genetic relationships among the EM-resistant strains were also analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Twenty-nine (9.7%) EM-resistant *S. pyogenes* were identified among the 300 strains. Twenty-two isolates (7.3%) expressed the *mefA* gene, 2 isolates (0.1%) *ermB* gene and 5 isolates *ermTR* gene, respectively. The strains possessing *ermB* gene were highly resistant to EM (MIC>100 μ g/ml). Restriction fragment polymorphism analyzed by PFGE by *ApaI* digestions showed several clones among the *mefA*-positive *S. pyogenes*. Our findings suggest that the *mefA* gene is the predominant mechanism for macrolide resistance among *S. pyogenes* isolated from upper respiratory tract. Physicians need to take into consideration the macrolide resistance of some strains of *S. pyogenes*.

はじめに

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) は、咽頭炎、扁桃炎をはじめとする上気道感染症の重要な起炎菌である。ペニシリン系抗菌薬は、従来より本細菌に対し良好な感受性を示すためその薬剤耐性化が問題とされることは少なかった。しかし、近年ペニシリン系抗菌薬に変わる第2選択薬として、マクロライド系抗菌薬の使用頻度が増加するに伴い、*S. pyogenes* のマクロライド系抗菌薬への耐性化が再び増加し注目されている。

S. pyogenes のマクロライド系抗菌薬に対する耐性化機序は、近年の分子生物学的手法の進歩に伴い、薬剤排出機構である efflux pump に関係する *mefA* 遺伝子、マクロライド系抗菌薬の作用標的である 24S rRNA のメチル化に関係する *ermTR* 遺伝子、*ermB* 遺伝子の検出と遺伝子レベルでの解明がなされるとともに、遺伝子多型性に基づく *S. pyogenes* の伝播を検討することも可能となっている¹⁾。本研究では、耳鼻咽喉科領域より検出された *S. pyogenes* のマクロライド系抗菌薬に対する薬剤感受性およびマクロライド耐性遺伝子の検出を行うと共に、マクロライド耐性株の遺伝子多型性について pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法により検討した。

対象と方法

S. pyogenes 株

2000年1月～2002年6月に耳鼻咽喉科領域より分離された *S. pyogenes* 株 300株を用いた。対象疾患の内訳は、扁桃炎 (186株)、咽頭炎 (44株)、鼻副鼻腔炎 (43株)、中耳炎 (27株) であった。対象患者は男性 142名、女性 158名で、年齢分布は1歳～64歳 (平均 17.6歳) であった。*S. pyogenes* は、血液寒天培地上のβ溶血、グラム染色、ラテックス凝集反応 (Bio Merieux)、バシトラシン感受性の検討にて同定した。

薬剤感受性検査

EM, アジスロマイシン (azithromycin: AZM) に対する薬剤感受性は、米国臨床検査標準委員会 (the National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) の基準に従い、微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentrations: MICs) の測定を行い、EM の感受性が 1 μg/ml 以上の株を EM 耐性菌とした。

マクロライド耐性遺伝子の検出

Polymerase chain reaction 法 (PCR 法) によりマクロライド耐性遺伝子: *ermB* 遺伝子 (primer ERM-B1: 5'- CGA GTG AAA AAG TAC TCA ACC -3', primer ERM-B2: 5'- GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG -3'), *ermTR* 遺伝子 (primer ERM-TR1: 5'- GCA TGA CAT AAA CCT TCA -3', primer ERM-TR-2: 5'- AGG TTA TAA TGA AAC AGA -3'), *mefA* 遺伝子 (primer MEF-A1: 5'- AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC -3', primer MEF-A1: 5'- TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG -3') の検出を行った¹⁾。PCR 反応溶液は、細菌溶解液 (1 μl), 10mM dNTP 混合液 (2 μl), Taq DNA polymerase (0.25 μl), 10×PCR 溶液 (2.5 μl), 25mM MgCl₂ (1 μl), Q-solution (Qiagen, Germany) (5.0 μl), primer (0.5 μl) とした。PCR 反応は、95°C, 10 分間の denaturation 後、1 サイクルを denaturation : 95°C 1 分間, annealing : 55°C 1 分間, extension : 72°C 1 分間とし、30 サイクルの反応を行った。

PFGE 法による遺伝子多型性の検討

マクロライド耐性遺伝子発現株については、PFGE 法による遺伝子多型性の検討をおこなった²⁾。すなわち、TEN 溶液 (10mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM EDTA pH 8.0; 1M NaCl) にて細菌浮遊液を調整した後、1.6%の低温溶解

性アガロース (BioWhitaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) にてプラグを作製した。プラグを細菌溶解液 (6mM Tris-HCL pH 7.6, 100mM EDTA pH 8.0, 1M NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% N-lauroylsarcosine, 50 μ g/ml ribonuclease A, 1mg/ml lysozyme) で37°Cにて24時間, さらに蛋白溶解液 (0.5mM EDTA pH 8.0, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5mg/ml proteinase K) にて55°Cにて2日間処理しDNAを抽出した。DNAを制限酵素 *ApaI* (Takara, Kyoto, Japan) にて断片化した後, 1%アガロース (Canbrex Bio science Rockland ME, USA) にて電気泳動を行った。泳動条件は, 電圧6v/cm, パルス時間5.3~34.9の条件で20時間とした。断片化したDNAはエチジウムブロマイドで染色し検出されたDNAバンドパターンを比較した。

結 果

S. pyogenes 株の薬剤感受性

EM感性株は271株 (90.3%), EM耐性株は29株 (9.7%) が検出された。このEM耐性株のすべてはAZM耐性株であった (Fig. 1, 2)。

PCR法によるマクロライド耐性遺伝子の検出

マクロライド耐性遺伝子は, 29株 (9.7%) のEM耐性株のすべてに検出された。*ermB* 遺伝子は2株 (0.1%) に, *ermTR* 遺伝子は5株 (0.67%) に, *mefA* 遺伝子は22株 (7.3%) に検出された。EM感性株ではマクロライド耐性遺伝子は検出されなかった (Fig. 1, 2)。

PFGE法による *S. pyogenes* の遺伝子多型性の検討

29株の *mefA* 陽性株はすべて *ApaI* にて識別可能であり, 7株が同一あるいは近似した遺伝子多型性を示し同一株と考えられた。5株の *ermTR* 陽性株では, 3株が同一に遺伝子多型

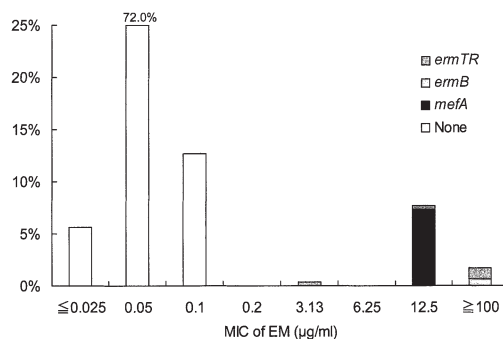


Fig. 1 Susceptibility to EM and expression of macrolide resistant genes

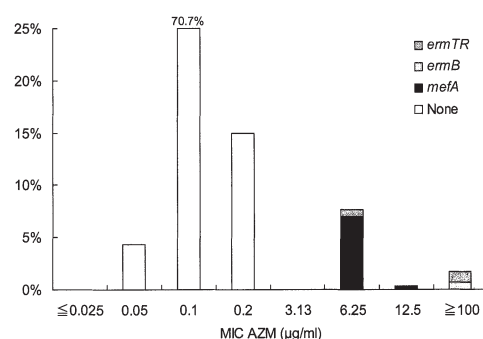


Fig. 2 Susceptibility to AZM and expression of macrolide resistant gene

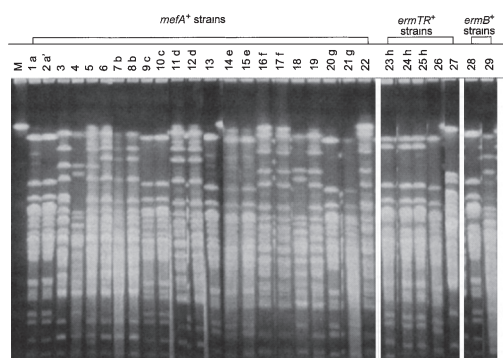


Fig. 3 Molecular characteristics of macrolide resistant strains by PFGE
M: molecular marker, 1-29: *S. pyogenes* isolates, a-h: same strains

性を示した。一方 *ermB* 株は, すべて異なる遺伝子多型性を示した (Fig. 3)。

考 察

S. pyogenes のマクロライド系抗菌薬に対する薬剤耐性化は、1959年にエリスロマイシン (erythromycin: EM) 耐性株が報告されて以来、欧米を中心に広く認められた³⁾。本邦においては、1970年代に高頻度に検出され、約80%がEM耐性株と報告されている⁴⁾。その後EMの使用頻度が減少するに伴い、1980年代にはEM耐性株の検出率は数%にまで低下した⁵⁾。しかし近年、*S. pyogenes* の約2.8~6.5%がEM耐性株と、わずかであるが増加していることが特徴である^{6,7)}。今回の検討では、耳鼻咽喉科領域より分離された*S. pyogenes* に9.7%にEM耐性株が認められた。近年、従来までのEMに代わりいわゆるニューマクロライド系抗菌薬の使用頻度が増加しており、このマクロライド系抗菌薬の使用頻度の増加に伴い、*S. pyogenes* のマクロライド系抗菌薬に対する薬剤耐性化が再び増加したものと考えられる。

マクロライド耐性遺伝子の検討をおこなった結果では、*mefA* 遺伝子が22株(75.9%)と最も高頻度に検出された。一方、*ermB* 遺伝子あるいは*ermTR* 遺伝子は7株(24.1%)に検出されたにすぎなかった。*ermB* 遺伝子、*ermTR* 遺伝子は、本邦において1980年代に頻回に検出されたマクロライド耐性遺伝子あり、*mefA* 遺伝子は現在世界的にも最も高頻度に検出されるマクロライド耐性遺伝子である。2000年にMuraseらは、*ermB* 陽性株の流行を報告しているが、*mefA* 陽性株はわずかに認めるのみであった⁸⁾。今回主に検出された*mefA* 遺伝子は、マクロライド系抗菌薬の排出機構であるefflux pumpの発現と関係しており、近年のマクロライド耐性機序としてその増加が注目される。さらにPFGE法による遺伝子多型性の検討を行った結果では、*ermTR* 陽性株の5株中3株で同一株であり、また*mefA* 陽性株22株中の14株で7タイプの同一株が検出された。*mefA* 陽性株では数種の同一株が存在し、*S.*

pyogenes の伝播が疑われた。この近年増加傾向になる*mefA* 遺伝子は、常在細菌叢を形成するviridans属にも高頻度に検出されており、口腔内常在菌と*S. pyogenes* との間でマクロライド耐性遺伝子の組み換えが起こる可能性も示唆されている⁹⁾。今後、マクロライド系抗菌薬の使用とともに、これらマクロライド耐性遺伝子の変化についての検討が必要であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Weber P, Filipecki J, Bingen E, Fitoussi F, Goldfarb G, Chauvin JP, Reitz C, Portier V. Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A Streptococci isolated from adults with pharyngo-tonsillitis in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48: 291-94.
- 2) Zampaloni C, Vitali LA, Prenna M, Toscano MA, Tempera G, Ripa S. Erythromycin resistance in Italian isolates of *Streptococcus pyogenes* and correlation with pulse-field gel electrophoresis analysis. *Microbial and Drug Resistance* 2002; 8: 39-44.
- 3) Low-iburry EJJ, Hurst L. The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin and spiramycin. *Journal of Clinical Pathology* 1959; 12: 163-9.
- 4) Infectious Agents Surveillance Center. Epidemiology of streptococcal infections, Japan. 1991-1992. *Infectious Agents Surveillance Report* 1993; 14: 21-2.
- 5) Fujita K, Murono K, Yoshikawa M, Murai T. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 1994; 13: 1075-8.
- 6) Kano S and Kimura T. Prevalence of hemolytic streptococcal infection in Kitakyushu, incidence and characteristics of isolates (1994-1997) (in Japanese). *Kansenshougaku Zasshi*

- 2000; 74: 511-7.
- 7) Murayama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics: prevalence of resistance to erythromycin in Japan. *American Journal of Diseases of Children* 1979; 133: 143-45.
- 8) Murase T, Suzuki R, Watanabe Y, Yamai S. Erythromycin resistance genes in *Streptococcus pyogenes* in Kanagawa, Japan. *Microbiology and Immunology* 2000; 44: 863-65.
- 9) Perez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Morimon JM, Pineiro L. High proportion of pharyngeal carrier of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adult. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 2001; 48: 225-29.

質 疑 応 答

質問 鈴木賢二（藤田保衛大第2病院）

マクロライドの少量長期投与（量，期間）は *S. pyogenes* のマクロライド薬耐性遺伝子である *metA*, *ermB*, *ermTR* 等の発現を増加させる可能性はどれほどと考えられるか。

応答 保富宗城（和歌山医大）

現存のところ，肺炎球菌をはじめ溶連菌において，マクロライド少量長期投与による耐性化の増加の可能性を示すデータはない。今後 *metA* (+) 株のクローン解析と，マクロライド使用の関係の検討が必要と考える。

連絡先：保富 宗城

〒640-8572

和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1

和歌山県立医科大学

耳鼻咽喉科・頭頸部外科

TEL 073-441-0651 FAX 073-448-2434