

【短報】

大韓民国で分離されたペニシリン高度耐性肺炎球菌の
遺伝型解析を組み合わせた再同定について山田 尚¹⁾・雨山 智²⁾・福田 淑子²⁾・満山 順一²⁾・南 新三郎³⁾¹⁾富山化学工業株式会社創薬基盤研究所*, ²⁾同 総合研究所, ³⁾同 事業開発部

(平成16年1月15日受付・平成16年2月5日受理)

1997年に大韓民国で分離された、ペニシリンに高度耐性を示す肺炎球菌について、表現型および遺伝型の両面から改めて同定を行った。本菌株は、 α 溶血性およびオプトヒン感受性から肺炎球菌としていたが、自己融解酵素(*lytA*)を有しておらず、アピ[®] 20 ストレップにおいて口腔内連鎖球菌と判定されたことから、肺炎球菌と異なる菌種であることが示唆された。肺炎球菌を正確に同定するためには、特徴的な表現型だけでなく、遺伝子型の解析等も組み合わせて行うことが重要であると考えられた。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, identification, phenotype, genotype

われわれは、本邦および大韓民国で小児より分離された肺炎球菌の各種抗菌薬に対する薬剤感受性を調べ、感受性分布を両国間で比較した結果、 β ラクタム系薬に対する中等度耐性株、高度耐性株の割合が、富山県内分離株より大韓民国分離株が高かったことを本誌において報告した¹⁾。本報告で、われわれは大韓民国分離株の中から、ペニシリンGに対して高度耐性(64 μ g/mL)を示す株を見出した。本菌株は、他の β ラクタム系薬に対しても同様に高度耐性を示しただけでなく、ミノサイクリン、ゲンタマイシンおよびクラリスロマイシンのMICがそれぞれ16 μ g/mL, 64 μ g/mL, >64 μ g/mLと多剤耐性を示した。試験を実施した時点で、本菌株はオプトヒンに感受性であり、血液寒天平板上で α 溶血性を示したことから肺炎球菌と判断した。しかし近年、遺伝子解析等の新たな手法の導入に伴い^{2,3)}、誤って肺炎球菌と同定された連鎖球菌が存在するとの報告⁴⁾があり、慎重な同定の重要性が示唆されたことから、今回、遺伝型解析も含めた種々の方法を用い改めて本菌株の同定を行った。

簡易同定法として、アピ[®] 20 ストレップ(日本ビオメリュー)を用いた迅速同定を、McFarland 4およびMcFarland 1の菌液を用いて行った。さらに、ハウスキーピング遺伝子の*hexB*、*recP*および*xpt*の各遺伝子断片⁵⁾をPCRにて増幅し、塩基配列解析(タカラバイオに委託)後、blastn(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)にて相同配列の検索を行った。また、北里大学生命化学研究所 生方公子先生より、本菌株のデオキシコール酸溶解性、血清型および自己融解遺伝子*lytA*のPCRによる確認試験の情報を提供していただいた。

本菌株の表現型の試験結果をTable 1に、遺伝型の試験結果をTable 2に示す。アピ[®] 20 ストレップによる迅

速同定の結果では、口腔内連鎖球菌の*Streptococcus constellatus*の可能性が90%以上と高く、ついで*Gemella*属の可能性が示唆された。また、表現型においては、デオキシコール酸溶解性は弱く、血清型は判別不能であった。これらの結果は、オプトヒン感受性および溶血性が肺炎球菌に特徴的な性質を示したのとは対照的であった。遺伝型においては、3種のハウスキーピング遺伝子が、いずれも広い領域にわたり肺炎球菌由来の遺伝子と高い相同性(90~96%)を示したが、肺炎球菌に特徴的な遺伝子である*lytA*は検出されなかった。

連鎖球菌は、溶血性の特徴から大きく4つの群に大別され種々の添加物に対する耐性等の表現型の特徴から、さらに細かく分類されている³⁾。肺炎球菌の同定は、一般に血液寒天平板における溶血性、オプトヒン感受性、デオキシコール酸溶解性および血清型等の表現型の特徴に基づいて行われる⁷⁾。 α 溶血性を示す連鎖球菌において、オプトヒン感受性やデオキシコール酸溶解性は肺炎球菌に特徴的な表現型であることに加え、試験法が簡便であることから、肺炎球菌を同定する一手段として広く用いられてきた。しかし、 β ラクタム耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子の肺炎球菌への水平伝播⁸⁾や、オプトヒン感受性遺伝子の口腔内連鎖球菌への伝播⁹⁾など、遺伝的に近縁の菌種間で遺伝子の水平伝播が起こる可能性もあり、分離株によっては分類が困難な場合も生ずると思われる。一方、遺伝子配列解析技術の進歩は、遺伝型の解析を可能とし、特徴的な塩基配列解析など、新たな観点からの同定をもたらした。しかしながら、ハウスキーピング遺伝子やrRNAの塩基配列の解析は、あくまでも配列が明らかとなった菌種のみを対象としていることから、現状では遺伝型による菌種同定にも限界がある。より正確な分類を

Table 1. Phenotypic characteristics of the isolate showing high resistance to penicillin G

Examinations	Results
Hemolysis	-hemolysis
Optochin susceptibility	Susceptible
Identification by Api® 20 strep	
McFarland 4	<i>Streptococcus constellatus</i> (98.3%) <i>Gemella haemolysans</i> (0.5%)
McFarland 1	<i>Streptococcus constellatus</i> (97.3%) <i>Gemella morbillorum</i> (1.2%)
Bile solubility*	Weak solubility
Serotype*	Uncertain

*: Data kindly provided by Dr. Ubukata.

Table 2. Genetic characteristics of the isolate showing high resistance to penicillin G

Sequence analysis (Gene name)	Hit species	Blast search	
		Identity	Expected
<i>hexB</i>	<i>S. pneumoniae</i>	678/747 (90%)	0.0
	<i>S. mitis</i>	268/285 (94%)	e-117
<i>recP</i>	<i>S. pneumoniae</i>	703/750 (93%)	0.0
	<i>S. mitis</i>	390/406 (96%)	0.0
<i>xpt</i>	<i>S. Pneumoniae</i>	522/552 (94%)	0.0
	<i>S. mitis</i>	470/486 (96%)	0.0
Presence of <i>lytA</i> (PCR)*		Negative	

*: Data kindly provided by Dr. Ubukata.

行うためには、表現型および遺伝型の特徴を組み合わせることで調べることが重要であり、肺炎球菌の場合は、溶血性やオプトヒン感受性といった表現型の特徴に加え、*lytA* 遺伝子の有無を確認することが、有力な手がかりの一つと考えられる⁵⁾。

口腔内連鎖球菌等のβラクタム感受性は肺炎球菌と比較して低く、口腔内連鎖球菌の混在は、感受性推移などの解析結果に影響を及ぼす危険性があることが報告されている⁴⁾。また、口腔内連鎖球菌は、免疫が低下した状態では菌血症を起こしやすいとの報告もあることから⁶⁾、咽頭拭い液以外の臨床材料からも分離される可能性を十分考慮しなければならない。詳細な同定は時間やコストに問題があり、すべての菌株に適用することは容易でないが、少なくともペニシリンGに対する感受性が著しく低い場合には、詳細に同定することが必要と考えられる。

以上、本菌株は肺炎球菌と異なり、口腔内連鎖球菌の一種である可能性が示唆された。このように肺炎球菌と異なる高度耐性株が誤って混入することは大きな問題であり、慎重に対処すべきであった。感受性推移等を調べる際には、大量の菌株を扱うことが多く、期間面およびコスト面から、簡便法で同定を済ませてしまうケースも考えられるが、肺炎球菌は市中肺炎の主要な起炎菌とし

て、その薬剤感受性推移が注目されていることから、慎重に同定し、信頼できる結果を示すことが大切であり、今後十分に注意したい。

なお、試験にあたり、適切なお助言、ご指導および貴重な情報を提供していただいた北里大学生命科学研究所生方公子先生に心からの御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 山田 尚, 濱田朱美子, 南新三郎: 本邦および大韓民国で分離された小児由来肺炎球菌の各種薬剤感受性. 日化療会誌 50: 182 ~ 185, 2002
- 2) Garcia A, Roson B, Perez J L, et al: Usefulness of PCR and Antigen Latex Agglutination Test with Samples Obtained by Transthoracic Needle Aspiration for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. J Clin Microbiol 37: 709 ~ 714, 1999
- 3) Facklam R: What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol Rev 15: 613 ~ 630, 2002
- 4) Wester C W, Ariga D, Nathan C, et al: Possible Overestimation of Penicillin Resistant *Streptococcus pneumoniae* Colonization Rates Due to Misidentification of Oropharyngeal streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 42: 263 ~ 268, 2002
- 5) Whatmore A M, Efstratiou A, Pickerill A P, et al: Genetic Relationships between Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and

- Streptococcus mitis*. Characterization of " Atypical " Pneumococci and Organisms Allied to *S. mitis* Harboring *S. pneumoniae* Virulence Factor-Encoding Genes. Infection and Immunity 68: 1374 ~ 1382, 2000
- 6) Edmond M B, Wallace S E, McClish D K, et al: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 29: 239 ~ 244, 1999
- 7) Lund E, Henrichsen J: Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Methods Microbiol 12: 241 ~ 262, 1978
- 8) Hakenbeck R, Konig A, Kern I, et al: Acquisition of Five High-Mr Penicillin-Binding Protein Variants during Transfer of High-Level β -Lactam Resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. J Bact 180: 1831 ~ 1840, 1998
- 9) Antonio J M, Balsalobre L, Fenoll A, et al: Genetic Characterization of Optochin-Susceptible Viridans Group Streptococci. Antimicrob Agents Chemother 47: 3187 ~ 3194, 2003

Phenotypic and genotypic analysis of a highly penicillin-resistant putative *Streptococcus pneumoniae* strain isolated in the Republic of Korea

Hisashi Yamada¹⁾, Satoshi Ameyama²⁾, Yoshiko Fukuda²⁾,
Junichi Mitsuyama²⁾ and Shinzaburo Minami³⁾

¹⁾Discovery Laboratories and ²⁾Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., 2 4 1 Shimookui, Toyama, Japan

³⁾Business Development Department, Toyama Chemical Co., Ltd.

A highly penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*, isolated in the Republic of Korea in 1997, was identified in detail on the basis of its phenotypic and genotypic features. The strain had been identified as *Streptococcus pneumoniae* based on its α -haemolytic activity and optochin susceptibility. However, the results of further study showing that it was negative for the *lytA* gene by PCR and the API-Strep results showing that it was an oral streptococcus, suggested that the strain was an oral streptococcus and not *Streptococcus pneumoniae*.

This finding indicates that the genotype as well as the characteristic phenotype must be checked to accurately identify *Streptococcus pneumoniae*.