

日本抗生物質学術協議会奨励賞受賞講演会記録

2011年11月4日, 学士会館 320号室

【2011年度受賞講演, 座長: 清田 浩】

ペニシリン低感受性B群連鎖球菌 (Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) の臨床分離, 流行株の解析

木村幸司

名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

B群連鎖球菌に関して

B群連鎖球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*) は, しばしば健常人の腸管, 女性生殖器から分離される菌種であるが, 新生児の敗血症, 髄膜炎の筆頭原因菌であり, 一定の割合 (欧米人では約37%, 日本人では約15%, 人種間で差があるとされている。) で成人女性が膣に無症候性に保菌していることが知られている。GBSによる侵襲性感染症を発症した児の約5%が死亡し, 一命を取り留めた場合には, 視覚, 聴覚障害や精神遅滞が頻発するとされており, 特に低出生体重児がGBS感染症の発症率が高いとされている¹⁻⁶。GBS侵襲性感染症は, その死亡率の高さ, また, 重篤な後遺症を頻発すること, 新生児医療の発達から低出生体重児が増加してきていることから, 極めて重要な細菌感染症である。そのため, 米国のCenters for disease control and prevention (CDC) 等は, GBSの新生児への垂直感染を避けるため, GBSを膣等に保菌する妊婦に対し, 分娩時にペニシリン等の抗生物質を投与する

ことを推奨し⁷⁻⁹, 多くの先進国で導入され, 米国では早期型新生児GBS感染症が1000件の出産につき1.7件から0.6件となり, 新生児のGBS感染症防止に一定の効果をあげている¹⁰。本邦においても, 多くの医療施設において, GBSを保菌する妊婦に対し, 予防的に抗生物質を投与しているようであるが, 本邦におけるGBS感染症の正確な発生率が報告されておらず, 年次推移は不明である。

一方, GBSは, 高齢者や糖尿病, 癌等の基礎疾患をもつ患者にも侵襲的な感染症を引き起こすこと, 院内感染の原因菌となることが知られている^{11,12}。成人のGBS感染症においても第一選択薬は, ペニシリン系薬であるとされており, ペニシリンを含む β -ラクタム系薬に低感受性あるいは耐性を獲得した株の出現は, 今後, GBS感染症の治療において深刻な問題に発展する恐れがある。

これまでのβ-ラクタム系薬に対するB群連鎖球菌の薬剤感受性

これまでB群連鎖球菌は、すべてβ-ラクタム系薬に感受性であると考えられてきた。しかしながら、GBSに関する一部の感受性試験においては、β-ラクタム系薬に非感受性である菌株の存在が、学会などで報告されてきた。ただし、それらの報告は、感受性試験の誤差によるものか、真の非感受性菌株の出現であるかなどが明確ではないものが多かった。そのため、Clinical and laboratory standards institute (CLSI) は、GBSを含むβ-溶血連鎖球菌において、β-ラクタム系薬に耐性を示す菌株は存在しないと、GBSにおいては、β-ラクタム系薬の resistant, intermediate の判定基準値 (break point) を設定していない¹³⁾。また、CDC も「GBSにおいては、β-ラクタム系薬耐性が確認された株はない」としている⁷⁾。

ペニシリン低感受性B群連鎖球菌

我々は、1995～2005年に国内において臨床分離された14株のペニシリン低感受性B群連鎖球菌 (Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) について、慎重かつ厳密な菌種同定と薬剤感受性試験を実施するとともに分子生物学的に耐性機構を解析した¹⁴⁾。14株のPRGBSは、すべて喀痰由来の菌株で、分離患者の多くは高齢者であった (表1)。分離県は、関東を中心に全国各地に分布していた。菌種同定として、CAMP test, 生化学同定, ribosomal RNA fingerprinting, ラテックス凝集試験を、ATCC株2株を陽性コントロールとして行い、いずれの株もGBSであることを確認した。厳密な最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) の測定により、全てのPRGBSは、確かに、ペニシリン (MIC 0.25～1 μg/ml), オキサシリン (MIC 2～8 μg/ml), セフチゾキシム (MIC 4～128 μg/ml) に低感受性を獲得していることが確認された (表

2)。また、一部のPRGBSは、アンピシリン、セファゾリン、セフェピム、セフォタキシムにも低感受性を示した。Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 解析により、14株のうち12株は、遺伝的な関連性が認められず、多様な遺伝的背景をもつGBSからPRGBSが発生していることが示唆された (図1)。β-ラクタム系薬に耐性または低感受性を示す肺炎球菌等の他の菌では、その耐性、低感受性機構として、高分子量のペニシリン結合タンパク群 (penicillin-binding proteins, PBPs) がアミノ酸置換を獲得し、β-ラクタム系薬に耐性/低感受性を獲得することが知られている。我々は、14株のPRGBSのPBPs (PBP1A, 1B, 2A, 2B, 2X) の遺伝子のシーケンス解析からそれらの推定アミノ酸配列を決定し、β-ラクタム系薬感受性GBS2株のPBPのアミノ酸配列と比較検討した。その結果、PRGBSのPBP1A, 1B, 2A, 2Bには、数個のランダムなアミノ酸置換を認めたが、PBP2Xはトランスペプチダーゼドメインに多数のアミノ酸置換が集積していた。その中で、ペニシリン耐性肺炎球菌のPBPに認められるモザイク構造のような構造ではなかったが、PRGBSでは、一株を除いて全ての株が、Q557EとV405Aの何れか一方または両方のアミノ酸置換をPBP2Xに獲得していた (図2)。Q557E, V405Aの両アミノ酸置換部位はトランスペプチダーゼドメインの活性中心を形成すると考えられる領域のごく近傍に位置すること、また、ペニシリン低感受性B群連鎖球菌のPBP2Xに認められたQ557E置換は、解析の進んでいるペニシリン耐性肺炎球菌のPBP2Xに認められるQ552E置換に相当することが、アミノ酸配列の保存性から考えられた。PRGBSで認められたPBP2XのQ557EやV405Aのアミノ酸置換が、PRGBSにおけるβ-ラクタム系薬低感受性機構の主たる要因であることが考えられた。そこで、Q557E, V405Aそれぞれのアミノ酸置換をもつPBP2X遺伝子をβ-ラクタム系薬感受性のGBS株

表 1. 菌株の特徴と分離場所, 分離年

| 菌株 | 特徴 | 血清型 | 分離場所 | 分離年 |
|-----------------------------------|---------------|------|-------|------|
| <i>S. pneumoniae</i> ATCC49619 | MIC 測定における標準株 | | | |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-611 | ゲノム解析終了株 | V | | |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 12403 | ゲノム解析終了株 | III | | |
| <i>S. agalactiae</i> strain B1 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 東京 A | 1995 |
| B6 | 臨床分離株 (喀痰由来) | VIII | 静岡 A | 1997 |
| B7 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 神奈川 A | 1997 |
| B8 | 臨床分離株 (喀痰由来) | VI | 神奈川 B | 1997 |
| B10 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 富山 A | 1997 |
| B12 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 富山 A | 1997 |
| B40 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 富山 A | 1997 |
| B60 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 神奈川 C | 1998 |
| B68 | 臨床分離株 (喀痰由来) | VI | 秋田 A | 1998 |
| B502 | 臨床分離株 (喀痰由来) | VI | 栃木 A | 2005 |
| B503 | 臨床分離株 (喀痰由来) | Ib | 静岡 B | 2005 |
| B513 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 千葉 A | 2005 |
| B514 | 臨床分離株 (喀痰由来) | VI | 神奈川 D | 2005 |
| B516 | 臨床分離株 (喀痰由来) | III | 神奈川 E | 2005 |

分離場所は、匿名化のため、都道府県名とアルファベットで示した。

(文献 14 を参考に、改変して掲載)

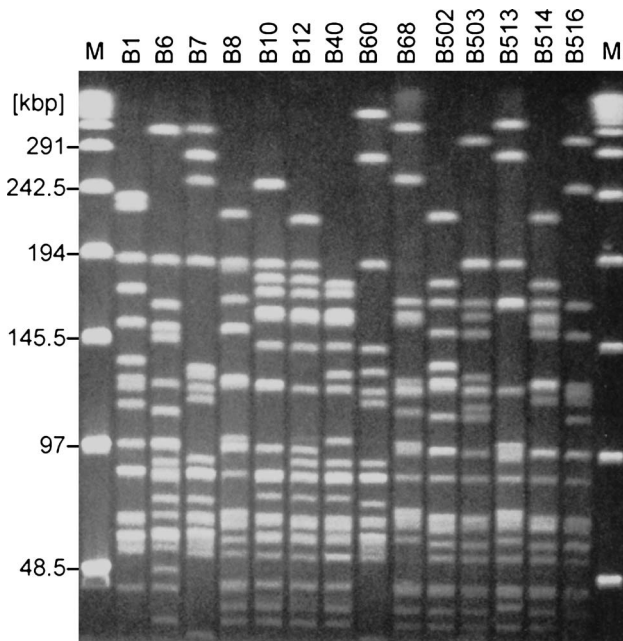
表2. 9種類のβ-ラクタム系薬のPRGBSに対するMIC値(μg/ml)

| 菌株 | PEN | PCV | AMP | OXA | CFZ | FEP | CTX | ZOX | MEM |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 | 0.25 | 0.5 | 0.12 | 1 | 1 | 0.03 | 0.03 | 0.12 | 0.06 |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-611 | 0.06 | 0.03 | 0.12 | 0.25 | 0.12 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.03 |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 12403 | 0.06 | 0.03 | 0.12 | 0.25 | 0.12 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.03 |
| <i>S. agalactiae</i> B1 | 0.5 | 0.25 | 0.12 | 4 | 2 | 0.5 | 2 | 128 | 0.06 |
| B6 | 0.25 | 0.5 | 0.12 | 4 | 1 | 0.25 | 1 | 32 | 0.06 |
| B7 | 0.25 | 0.12 | 0.12 | 2 | 0.5 | 0.25 | 0.12 | 4 | 0.25 |
| B8 | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 4 | 1 | 0.5 | 0.25 | 64 | 0.12 |
| B10 | 0.5 | 0.25 | 0.12 | 4 | 1 | 0.25 | 0.5 | 16 | 0.06 |
| B12 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | 4 | 1 | 0.5 | 0.5 | 32 | 0.25 |
| B40 | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 8 | 1 | 0.25 | 0.5 | 32 | 0.06 |
| B60 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 4 | 1 | 0.25 | 0.25 | 32 | 0.12 |
| B68 | 0.5 | 0.25 | 0.5 | 4 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 4 | 0.12 |
| B502 | 0.5 | 0.25 | 0.5 | 4 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 16 | 0.25 |
| B503 | 0.25 | 0.12 | 0.5 | 2 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 16 | 0.12 |
| B513 | 1 | 1 | 0.5 | 8 | 1 | 1 | 1 | 64 | 0.25 |
| B514 | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 4 | 1 | 0.5 | 0.25 | 32 | 0.25 |
| B516 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 4 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 16 | 0.12 |

略語 : PEN, penicillin G; PCV, penicillin V; AMP, ampicillin; OXA, oxacillin; CFZ, cefazolin; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; ZOX, ceftizoxime; MEM, meropenem.

(文献14を参考に改変して掲載)

図1. PRGBSのパルスフィールドゲル電気泳動像



同一医療施設から分離された2株を除き、すべてバンドパターンが異なり、PRGBSは遺伝的背景の異なる菌株群であることが分かる。

(文献14より改変して掲載)

に相同組み換え (homologous recombination) により導入し allelic exchange (対立遺伝子交換) を実施した。作成された対立遺伝子交換株は、親株のPRGBSと同様にペニシリン、オキサシリン、セフチゾキシムに低感受性を示したことから、PBP2XにおけるQ557E、V405Aの両置換が、PRGBSの β -ラクタム系薬低感受性の主たる要因であることが証明された (表3)。

CDCを中心としたグループは、米国で2003年に高齢者の血液から分離された4株のPRGBSについて解析し、我々の報告と同様にPBP2Xに共通してQ557Eのアミノ酸置換が認められることを明らかにした¹⁵⁾。また、4株のPRGBSは、複数の州から分離されたものの、multilocus sequence typing (MLST) により、4株すべてST19という同

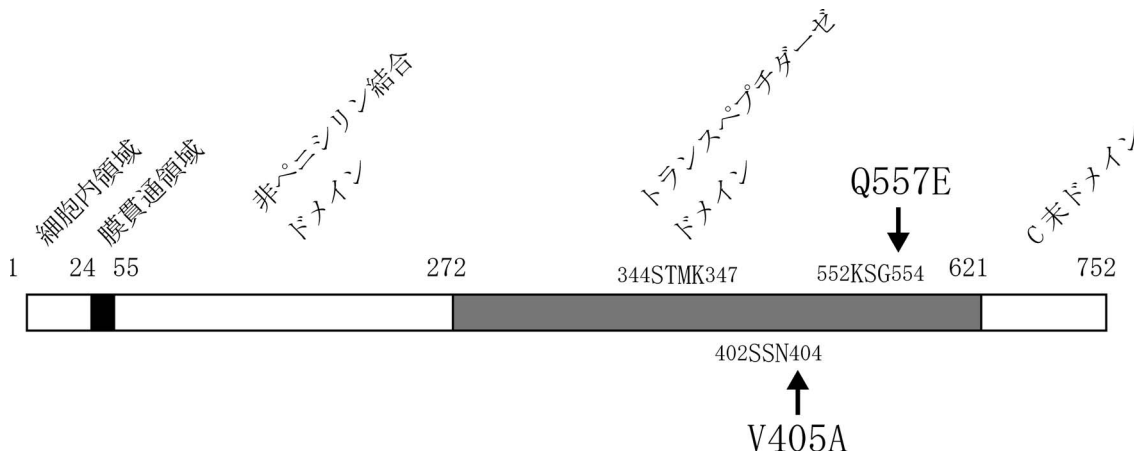
一のタイプに分類され、遺伝的に同一な背景を持った株が複数の州にまたがって広がっていることをCDCらのグループは示唆している。

我々の報告以降、日本の他のグループ¹⁶⁾、カナダの2つのグループ^{17,18)}からも、それぞれPBP2X遺伝子に変異のあるPRGBSの存在が報告されている。

ペニシリン低感受性B群連鎖球菌の検出法の開発

我々は、PRGBSを多くの医療機関の細菌検査室で検出できるようにするために、KBディスクを用いたディスク拡散法によってPRGBSを検出できるように開発した¹⁹⁾。日本国内で市販されている β -ラクタム系薬を含有しているKBディスク

図2. GBSのPBP2Xの模式図



PRGBSに共通して見られるV405A, Q557E両アミノ酸変異は, PBP2Xのトランスペプチダーゼドメインの活性中心を形成すると思われるモチーフのごく近傍に存在する。

(文献14より改変して掲載)

表3. 組換え体に対する β -ラクタム系薬のMIC ($\mu\text{g/ml}$)

| 菌株 | PEN | PCV | AMP | OXA | CFZ | FEP | CTX | ZOX | MEM |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 2 | 1 | 0.25 | 0.12 | 0.5 | 0.12 |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC BAA-611 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.12 | 0.12 | 0.06 | 0.25 | 0.06 |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 12403 | 0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.06 | 0.25 | 0.06 |
| ATCC BAA-611(B12-PBP2X) (Q557E 変異) | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 4 | 2 | 0.5 | 0.5 | 32 | 0.12 |
| ATCC BAA-611(B503-PBP2X) (V405A 変異) | 0.25 | 0.12 | 0.25 | 2 | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 16 | 0.12 |
| B12 (Q557E 変異) | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 4 | 2 | 1 | 1 | 32 | 0.12 |
| B503 (V405A 変異) | 0.25 | 0.12 | 0.25 | 2 | 0.5 | 0.5 | 0.12 | 16 | 0.12 |

略語: PEN, penicillin G; PCV, penicillin V; AMP, ampicillin; OXA, oxacillin; CFZ, cefazolin; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; ZOX, ceftizoxime; MEM, meropenem.

文献14を改変し、掲載。

を全て検討した結果, オキサシリン, セフチゾキシム, セフトピテンの各KBディスクがPRGBSの検出に有効であることを明らかにした(図3)。特に典型的なPRGBSはセフトピテンディスクの周りに増殖阻止円を形成しないため, 一目瞭然にPRGBSを検出することができる。この方法は, 多

くの医療機関の細菌検査室で行われているディスク拡散法であり, 特殊な装置や高価な機器, 試薬を必要としないため, 安価で簡便にPRGBSを検出でき, 世界中の多くの細菌検査室で実施可能であると考えられる。

表4. PRGBS の Sequence types とその数

| Sequence type (ST) | ST profile | Allele profile (<i>adhP</i> , <i>pheS</i> , <i>atr</i> , <i>glnA</i> , <i>sdhA</i> , <i>glcK</i> , <i>tkl</i>) | The numbers of PRGBS tested |
|--------------------|-------------------------------|---|-----------------------------|
| ST1 | ST1 | (1, 1, 2, 1, 1, 2, 2) | 7 (25%) |
| ST458 | One allelic variant of ST1 | (1, 1, 2, 1, 1, 2, 3) | 11 (39%) |
| ST297 | One allelic variant of ST1 | (1, 1, 2, 2, 1, 2, 2) | 3 (11%) |
| ST4 | Three allelic variant of ST1 | (1, 1, 4, 1, 1, 3, 4) | 1 (4%) |
| ST358 | Three allelic variant of ST1 | (1, 1, 4, 1, 3, 3, 2) | 1 (4%) |
| ST23 | ST23 | (5, 4, 6, 3, 2, 1, 3) | 4 (14%) |
| ST464 | Three allelic variant of ST23 | (5, 4, 4, 3, 2, 3, 1) | 1 (4%) |
| | | | Total: 28(100%) |

文献22より、改変し掲載。

数週間の間隔をあけて連続してPRGBSが分離された症例

PRGBSは、PBP2X遺伝子に変異を獲得しているため、どの程度の病原性を有しているか、また、どの程度の臨床的危険度があるか等は、現在のところ不明である。我々はPFGE解析、MLST解析、PBP2X遺伝子変異解析より、遺伝的に同一と考えられるPRGBSが数週間の間隔をあけて同一の患者の褥瘡から分離された症例を発表した²⁰⁾。この症例から、PRGBSが生体内に数週間の間、生存しうることを示唆した。

PRGBSの遺伝的背景に関して

日本で分離されたPRGBSは、Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)により遺伝的に関連性の薄い菌株から多源的に出現していることが示唆された^{14,21)}。また、PBP遺伝子の変異箇所を解析することによっても、PRGBSが多源的に出現していると考えられた²¹⁾。しかしながら、米国CDCは、米国で分離されたPRGBS 4株についてMLSTを行い、4株ともST19になることから、米国では特定のPRGBS株が広がっていると報告している¹⁵⁾。今回、我々は、日本で分離されたPRGBS 28株についてMLSTを行った²²⁾。結果、ST458 (n=11, 39%), ST1 (n=7, 25%), ST23 (n=4, 14%), ST297

(n=3, 11%), ST4 (n=1, 4%), ST358 (n=1, 4%), ST464 (n=1, 4%)となった(表4)。eBURST解析により、ST458とST1は、同じclonal complexに属することが明らかとなった(図4)。日本におけるPRGBSは、ST458とST1を含む特定のclonal complexから多く出現しているが、PFGE解析の結果を考え合わせると遺伝的に関連性の薄い菌株群から多源的に出現しているようである。幸いなことに新生児髄膜炎からの分離株で多いとされているST17は、今回の調査ではPRGBSのなかには認められなかった。

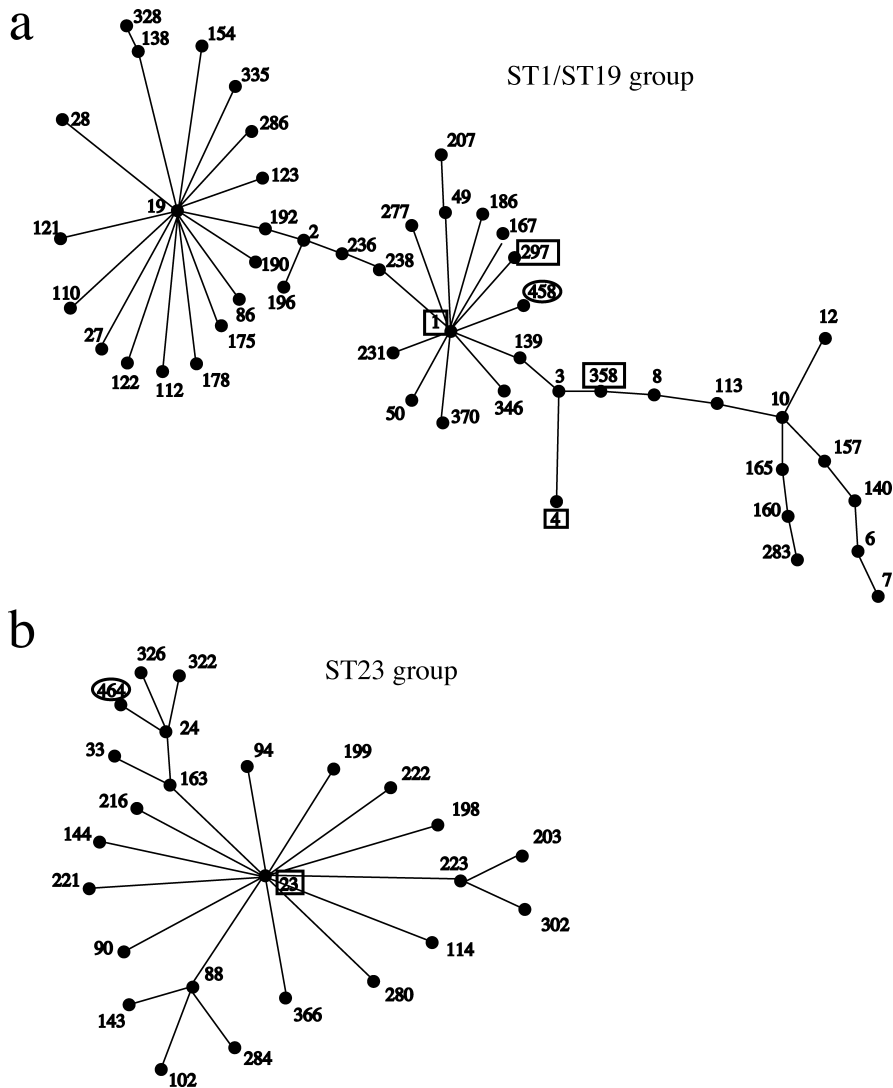
PRGBSの多剤耐性化

PRGBSの、他系統の抗菌薬に対する感受性を検討した結果、マクロライド系薬、キノロン系薬に耐性を獲得している傾向があり、統計学的に優位であることを明らかにした。このことからPRGBSは多剤耐性化傾向があることが明らかになった。(論文投稿中)

今後のPRGBSに関する研究

我々は全国各地から分離されるPRGBSのうち、遺伝的に近縁な株群があることを見いだした。この株は多剤耐性化しており、今後、詳細な解析を行う予定である。

図4. eBURST解析による各 Sequence type の関連性



図中の数字は、Sequence typeの番号。1アレルプロファイルの違うものを直線で繋いである。直線の距離は、遺伝的距離を反映したものではない。四角または丸で数字を囲ったものは、今回のPRGBSに含まれていたSequence type。丸で囲った数字は、新規のSequence type。

(文献22より改変して掲載)

考察

これまでGBSは β -ラクタム系薬に対し全て感受性を示すと考えられてきたが、我々の詳細な解析により、世界で初めてPRGBSが存在すること

が確定した。CDCを中心としたグループによっても、米国においてもPBP2Xに同様のアミノ酸置換を獲得したPRGBSが存在することが確認されたため、今後、CLSIは、GBSの β -ラクタム系薬に対するresistant, intermediateについてのクライ

テリアやブレイクポイントの設定に向けて検討を開始することになる。実際、EUCASTは、我々の報告の後にGBSのペニシリンに対するブレイクポイントを設定した。

我々の研究における14株のPFGE解析の結果からは、PRGBSは、特定の遺伝的背景をもった株ではなく、遺伝的に多様な複数のGBS株から多源的に発生していることが示唆された。また、同一病院で分離されたPRGBSがPFGE解析上、極めて類似したパターンを呈した事例があることから、PRGBSは、医療環境においてヒト-ヒト間で伝播し、院内感染の原因菌となりうる可能性があることも示唆された。他方、米国で分離されたPRGBSにおけるMLST解析では、ST19という同一な遺伝的背景に属するPRGBS株が異なる州から分離されていることから、MRSAやVREなどの薬剤耐性菌と同様にPRGBSにも epidemic strain (流行株) の存在が示唆されており、今後のPRGBSの拡散が懸念される。

PRGBSは、その存在が確定されて間もないため、今後、解決されなければならない課題が多く存在する。我々は、厳密なMIC測定により、PRGBSはペニシリンに低感受性を獲得していることを示したが、実際に髄膜炎等の治療にペニシリンを用いた場合に、PRGBS株とペニシリン感受性GBS株とによる感染症の間で治療効果に差があるか否かについては、厳密な臨床研究の結果を待つ必要がある。また、そもそも現在までにPRGBSの分離が確認されているのは、高齢者の喀痰及び血液であり、PRGBSが新生児に敗血症、髄膜炎などの侵襲性感染症を引き起こす能力をどの程度保持しているか否かも不明である。したがって、GBSによる侵襲性感染症の臨床経過に及ぼすPRGBSの影響評価に関する疫学的比較解析研究の実施が重要かつ緊急な課題となっており、そのためには、血液、髄液分離株におけるPRGBSの正確な判定とそれを可能とする我々が

開発した簡便な検査法(ディスク拡散法)の普及が強く望まれている。

謝辞

日本抗生物質学術協議会奨励賞を受賞させて頂き、感謝しております。本研究は、国立感染症研究所細菌第二部(荒川宜親前部長、柴山恵吾部長)及び名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学(荒川宜親教授)で主に行ったものであり、関係研究室員の皆様に感謝致します。特に黒川博史先生、船橋市立医療センターの長野則之、由起子両先生、ご指導頂いた荒川宜親先生に深く感謝致します。

文献

- 1) BAKER, C. J.: Group B Streptococcal Infections. In: STEVENS, D. L. & E. L. KAPLAN Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. Oxford, England: Oxford University Press, 222~237, 2000
- 2) SCHUCHAT, A.: Group B *Streptococcus*. Lancet 353: 51~56, 1999
- 3) STOLL, B. J.; N. HANSEN, A. A. FANAROFF, *et al.*: Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. N. Engl. J. Med. 347: 240~247, 2002
- 4) SCHUCHAT, A.: Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin. Microbiol. Rev. 11: 497~513, 1998
- 5) HEATH, P. T.; G. BALFOUR, A. M. WEISNER, *et al.*: Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. Lancet 363: 292~294, 2004
- 6) LACHENAUER, C. S.; D. L. KASPER, J. SHIMADA, *et al.*: Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J. Infect. Dis. 179: 1030~1033, 1999
- 7) Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Morb. Mortal. Wkly. Rep.

- 51(RR11): 1~22, 2002
- 8) Committee on Obstetric Practice. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologists, 1996
 - 9) American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Disease, Committee on Fetus and Newborn. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. *Pediatrics* 99: 489~496, 1997
 - 10) SCHRAG, S. J.; S. ZYWICKI, M. M. FARLEY, *et al.*: Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 342: 15~20, 2000
 - 11) FARLEY, M. M.; R. C. HARVEY, T. STULL, *et al.*: A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *N. Engl. J. Med.* 328: 1807~1811, 1993
 - 12) JACKSON, L. A.; R. HILSDON, M. M. FARLEY, *et al.*: Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann. Intern. Med.* 123: 415~420, 1995
 - 13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement, M100-S16. 26: 138~140, 2006
 - 14) KIMURA, K.; S. SUZUKI, J. WACHINO, *et al.*: First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2890~2897, 2008
 - 15) DAHESH, S.; M. E. HENSLER, N. M. VAN SORGE, *et al.*: Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2915~2918, 2008
 - 16) MURAYAMA, S. Y.; C. SEKI, H. SAKATA, *et al.*: Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 2650~2653, 2009
 - 17) GAUDREAU, C.; R. LECOURS, J. ISMAÏL, *et al.*: Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 594~595, 2009
 - 18) LONGTIN, J.; C. VERMEIREN, D. SHAHINAS, *et al.*: Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 2983~2985, 2011
 - 19) KIMURA, K.; J. WACHINO, H. KUROKAWA, *et al.*: Practical disk diffusion test for detecting group B *Streptococcus* with reduced penicillin susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 47: 4154~4157, 2009
 - 20) NAGANO, N.; K. KIMURA, Y. NAGANO, *et al.*: Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 1326~1328, 2009
 - 21) NAGANO, N.; Y. NAGANO, K. KIMURA, *et al.*: Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4258~4267, 2008
 - 22) KIMURA, K.; N. NAGANO, Y. NAGANO, *et al.*: Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2460~2464, 2011