

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10450

研究課題名(和文) 口腔から分離されるブドウ球菌の分子疫学的解析と新規市中感染型MRSAの蔓延状況

研究課題名(英文) Genetic Characteristics of Staphylococci and Prevalence of CA-MRSA Isolated from Oral Cavity

研究代表者

広瀬 弥奈 (HIROSE, Mina)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：10265077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内における新規市中感染型MRSAの蔓延状況を把握するために、2019年12月～2021年12月までに、本学病院の患者、スタッフ、および学生、計629人の唾液と手指に分布するブドウ球菌種の保有状況を調べ、分子疫学的解析を行った。

その結果、口腔からのMRSA検出率は1.43%、手指では0.32%であった。このうち、新規市中感染型MRSAであるST8-SCCmec-IVI (CA-MRSA/J) が1例、USA300の遺伝子的特徴をもつST6562(CC8)-SCCmec-IVaが2例口腔から検出された。また、USA400の遺伝子的特徴をもつST1-SCCmec-IVaが1例手指から検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (CA-MRSA) は、各国で広がりを見せている。最近、日本特有の新規CA-MRSAが検出されたが、歯科領域の検体からの報告は皆無であるため、歯性感染症および健康人の口腔から分離される新規CA-MRSAの検出状況と分子疫学的・遺伝的特徴(遺伝子型、各種毒素・耐性遺伝子の保有)を解析し、感染(種類、重症度)との関係を明らかにする。また、菌間で遺伝子の移動が推測されるMRSA以外のブドウ球菌も解析し、現時点における口腔領域のブドウ球菌の伝播動態を解明する。本成果は、口腔領域のCA-MRSAの起源と伝播動態を探究することでその感染予防対策に資すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The study was conducted to investigate the prevalence, antimicrobial resistance and genetic characteristics of Staphylococcus isolates from the oral cavity and skin (hand) of systemically healthy subjects with dental disease and dental staff as well as university's students from 2019/12 to 2021/12.

Among a total of 629 subjects (213 patients, 68 staff, 330 students), the MRSA detection rate from oral cavity was 1.43%, and that from hand was 0.32%, respectively. ST8-SCCmec-IVI (CA-MRSA/J), a new community-acquired MRSA, was detected 1 case, and ST6562(CC8)-SCCmec-IVa, which has the genetic characteristics of USA300, was detected in 2 cases from oral cavity. In addition, ST1-SCCmec-IVa, which has the genetic characteristics of USA400, was detected in one case from hand. These findings indicated the potential distribution of USA300 clone-like MRSA in the oral cavity of dental patients and even though systemically healthy subjects.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：CA-MRSA 口腔 歯性感染症 S. argenteus コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 ブドウ球菌 唾液 小児

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Community-acquired MRSA ; CA-MRSA) は、遺伝学的に多様なクローンが存在し、米国で流行した USA300 に類似しつつも異なる 2 種類の新規クローンが既に日本国内に広く浸淫していることが示唆されている。1 つは、ST (sequence type) 8 に属する MRSA で、Iwao らにより ST8-CA-MRSA/J と命名されている (Iwao et al., J Infect Chemother, 18:96, 228, 2012 ; Antimicrobe Agents Chemother, 57:1589, 2013.)。このクローンは、北海道 (Kawaguchiya et al., Microbial Drug Resist, 2013, J Med Microbiol, 2013)、本州・九州 (Iwao ら、既出) でも分離され、USA300 と異なるのは、PVL (Panton valentine leucocidin) 遺伝子が陰性であることと、新規の細胞表面蛋白をコードする *spj* 遺伝子をゲノム中に持つ点である。これらは海外から伝播した USA300 クローンと国内の MRSA との間で、ゲノム間のハイブリッド等により形成された新興クローンと考えられている。もう 1 つのクローンは、ST764-CA-MRSA で、PVL 陰性であるが ACME (アルギニン代謝系可動性遺伝子構造) を持つのが特徴である。さらに、ST5 に遺伝的に近い ST764-MRSA (ACME 陽性) も日本に独自に分布する新しい CA-MRSA と考えられている (Kawaguchiya, 既述)。したがって、これらの分布状況を疫学的に解析し、蔓延状況を把握することはわが国における CA-MRSA 感染対策上、危急の課題と考えられる。それらの性状を調査・解析し、市中感染における意義を明らかにし、その情報を公開することは、世界的な感染コントロールの上からも急務である。健康なヒトの口腔から分離されたクローンを対象としたこれらの疫学調査は行われていないため、口腔に分布する新規 CA-MRSA の遺伝子解析とその蔓延状況を明らかにするために本研究を行った。

### 2. 研究の目的

CA-MRSA は、1981 年に初めて米国で報告されて以来、各国で広がりを見せている。日本では 2003 年に伝染性膿化疹の患者から分離され、2006 年には肺炎による死亡例も出ており、今後蔓延が危惧される。最近、日本特有と考えられる新規の CA-MRSA クローンが検出された。しかし、歯科領域の検体からの報告は我々の報告以外皆無であるため、歯性感染症および健康人の口腔から分離される新規 CA-MRSA の検出状況とそれらの分子疫学的・遺伝的特徴 (各種遺伝子型、各種毒素・耐性遺伝子の保有) 細菌学的性状を解析し、感染 (種類、重症度等) との関係性を明らかにする。また、バイオフィーム形成に関与し菌間で遺伝子の移動が推測される MRSA 以外のブドウ球菌 (Coagulase negative Staphylococci; CNS) も解析し、現時点における口腔領域のブドウ球菌の伝播動態を解明する。本成果は、口腔領域の CA-MRSA の起源と伝播動態を探究することでその感染予防対策に資すると考えられる。

### 3. 研究の方法

滅菌綿棒で唾液、口腔内病巣、手指スワブを採取し、選択培地でブドウ球菌を分離培養後、DNA を抽出した。PCR により *mecA* 遺伝子等を検出した。*Staphylococcus aureus* については、コアグララーゼ (*coa*) 型別と、MLST 解析、メチシリン耐性株に対しては SCC*mec* 型別を行った。*coa* 陰性ブドウ球菌 (CNS) については、16SrRNA 遺伝子の解析により菌種を同定した。18 種の抗菌薬に対する薬剤感受性を微量液体希釈法により測定し (ドライプレート '栄研' DP32、栄研株式会社、栃木)、薬剤耐性遺伝子を PCR により検出した。また、エンテロトキシンなどの病原遺伝子等も PCR により検出した。

### 4. 研究成果

本学の歯科スタッフ 42 人と、健康な患者 91 人を対象に、口腔 (唾液) 歯科病巣、皮膚 (手指) からサンプルを採取後、選択培地でブドウ球菌を分離培養し、MRSA の保有率、抗菌薬耐性遺伝子等を調査した。計 133 人の被験者のうち、59 人 (44.4%) から合計 87 株のコアグララーゼ陽性ブドウ球菌 (83 株の *S. aureus* と 4 株の *S. argenteus*) と、95 人 (71.4%) から 162 株の CNS が分離された。口腔分離株のうち 3 株は MRSA であり、保有率は 3.6% (3/83) であった。遺伝子型は ST8-SCC*mec*-IV1、ST4775 (CC1)-SCC*mec*-IVa、ST6562 (CC8)-SCC*mec*-IVa であった。ST6562 は、ΦSa2usa に PVL 遺伝子と、I 型の ACME を保有していた。また、メチシリン感受性 *S. argenteus* が 4 株分離され (ST1223、ST2250) エンテロトキシン遺伝子 *egc-2* と *sey* のいずれかを保有していた。一方、14 種の CNS が同定され、メチシリン耐性 (MR) 株は 11 株で、*S. saprophyticus* と *S. haemolyticus* に多かった。ACME は、*S. epidermidis* と *S.*

*capitis* にもみ認められた。以上の結果から、 歯科外来患者の口腔内には、 USA300 クローン様 MRSA、毒素産生性 *S. argenteus*、および MR-CNS が潜在的に分布していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ito M, Habaderac S, Kobayashi N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Clonal diversity of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) from bloodstream infections in northern Japan: Identification of spermidine N-acetyltransferase gene (speG) in staphylococcal cassette chromosomes (SCCs) associated with type II and IV SCCmec.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resist	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jgar.2020.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ike M, Ito M, Kobayashi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution of Virulence Factors and Resistance Determinants in Three Genotypes of <i>Staphylococcus argenteus</i> Clinical Isolates in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 163-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10020163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirose M, Aung MS, Fukuda A, Yahata S, Fujita Y, Saitoh M, Hirose Y, Urushibara N, Kobayashi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiological Characteristics of Methicillin-Resistant and Susceptible <i>Staphylococcal</i> Isolates from Oral Cavity of Dental Patients and Staff in Northern Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1316-1330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10111316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬弥奈, 福田敦史, 八幡祥子, 村田幸枝, 齊藤正人
2. 発表標題 健康小児の唾液から検出された黄色ブドウ球菌の保有状況と分子疫学的解析
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬弥奈, 福田敦史, 八幡祥子, 村田幸枝, 齊藤正人
2. 発表標題 健康な小児の唾液から検出された高病原性ブドウ球菌の保有状況と分子疫学的解析
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬 弥奈, 福田 敦史, 八幡 祥子, 藤田 裕介
2. 発表標題 病院スタッフ・患者の口腔・手掌に分布するブドウ球菌種の分子疫学的特徴と薬剤耐性遺伝子の分布
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬弥奈, 福田敦史, 八幡祥子, 藤田裕介, 齊藤正人
2. 発表標題 小児の口腔・手指に分布するブドウ球菌種の分子疫学的特徴と薬剤耐性遺伝子の分布
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬弥奈、八幡祥子
2. 発表標題 小児の口腔・手指から分離されたコアグラ-ゼ陽性ブドウ球菌の保有状況と薬剤耐性および病原性遺伝子の分布
3. 学会等名 第33回日本小児口腔外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Meiji Sae Aung,、漆原範子、川口谷充代、伊藤政彦、幅寺敏、廣瀬弥奈、小林宣道
2. 発表標題 Molecular epidemiological study of Staphylococcus argenteus clinical isolates in Hokkaido
3. 学会等名 第95回日本細菌学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八幡 祥子 (YAHATA Shoko) (10285538)	北海道医療大学・歯学部・講師  (30110)	
研究分担者	福田 敦史 (FUKUDA Atsushi) (10453276)	北海道医療大学・歯学部・助教  (30110)	
研究分担者	村田 幸枝 (MURATA Yukie) (90455676)	北海道医療大学・歯学部・講師  (30110)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	アウン メイジ ソウ  (AUNG Meiji Soe)		
研究協力者	小林 宣道  (KOBAYASHI Nobumichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関