

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590746

研究課題名(和文) 市中感染型MRSA新興クローンの同定と伝播動態に関する分子疫学的解析

研究課題名(英文) Identification and molecular epidemiological analysis of emerging clones of community-acquired MRSA

研究代表者

小林 宣道 (Kobayashi, Nobumichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80186759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：世界的な分布の拡大が懸念される市中感染型MRSA(CA-MRSA)の、日本における分布状況とその分子疫学的特徴を調べるため、札幌医大附属病院での臨床分離株、道内各地の医療機関(外来患者)に由来するMRSAを解析した。その結果、CA-MRSAの遺伝学的指標であるSCCmec type IVおよびVを有する株が札幌医大附属病院で4.3%、道内医療機関で17.1%に検出された。それらの中から米国で優勢なUSA300クローン(ST8；PVLおよびACME陽性)と考えられる株を計7株同定したほか、ACMEを有するST5株が多数検出され、それらの新興クローンが日本国内でも分布していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：To investigate prevalence in Japan of community-acquired MRSA (CA-MRSA) which is concerned for its global spread, and their molecular epidemiological characteristics, we analyzed clinical isolates from the Sapporo Medical University Hospital (601 isolates, 2008-2010) and those from local hospitals/clinics in Hokkaido prefecture (outpatients, 422 isolates in 2011). As a result, SCCmec types IV and V, which are genetic markers of CA-MRSA, were detected in 4.3% and 17.1% in the isolates from the University Hospital and local hospitals/clinics, respectively. Among them, seven isolates were revealed to be USA300 clone which is dominant in the US (ST8, positive for PVL and ACME), and many ST5 MRSA having ACME were detected. These emerging CA-MRSA clones were confirmed to be distributed in Japan.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：MRSA 市中感染 分子疫学

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の蔓延とそれによる院内感染アウトブレイクの発生は、現代医療の抱える主要な問題の一つであり、社会問題としても関心が高まっている。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は1960年代以降世界中に分布が拡大し、今なお最も重要な薬剤耐性菌、院内感染起因菌として存続している。わが国における病院感染起因菌としてのMRSA検出率は世界的に最も高いレベルにあり、米国、南欧諸国などともにMRSAの高汚染国と考えられている。一方、MRSAのうち、病院外すなわち市中において分布するMRSA(CA-MRSA)の重要性が1990年代後半より認知され、これが病院感染型MRSA(HA-MRSA)とは異なる特徴を持つ感染症起因菌であることが注目された。CA-MRSAは当初、米国、オーストラリアなどを中心に報告されたが、その後2000年に入ってからヨーロッパ、アジアなどにも分布が広がっていることが明らかとなり、CA-MRSA感染症はグローバル感染症・新興感染症として認識されるに至っている。

MRSAは、菌の染色体DNAに外来性の遺伝子要素であるメチシリン耐性領域(SCCmec)を持つ。CA-MRSAはタイプIV、VのSCCmecを保有することが特徴的であり、タイプI-III-SCCmecを持つHA-MRSAと異なる。またCA-MRSAにはPVL(Panton-Valentine leukocidine)を産生する株が多い。PVLは白血球破壊毒素の一つであり、皮膚や粘膜の壊死にも関与し、全身症状の重篤化にも深く関わっていると考えられている。臨床的にはCA-MRSAは皮膚・軟部組織の感染を起こすことが多く、全身感染はその重篤化に伴う場合が多い。CA-MRSAは、世界的には遺伝学的に多様なクローンが存在する。遺伝子型(Multilocus sequence typingによるST)による分類では、北米ではST1型、ST8型、ヨーロッパではST80型、台湾ではST59型が優勢なクローンとして知られるほか、ST30とその変異型が世界中に分布している。特に米国ではST8型CA-MRSAの増加が顕著に見られている。ST8型クローンはアルギニン代謝系可動性遺伝子構造(ACME)を有し、これが組織への強い定着性を付与することが知られ、このクローンの蔓延に関与していると推測される。

わが国ではCA-MRSAの分布に関する調査、特に遺伝子型(ST)まで解析した報告は、東京、新潟など幾つかの地域における調査に限られきわめて少ないが、ごく最近、米国に多いST8型クローン、台湾に多いST59型が報告された。我々は北海道におけるCA-MRSAの調査を2009年に行ない、わが国で2例目の発見となるST59型のほか、今まで報告のない新しい型であるST6型クローンを検出した。さらにACMEを保有するST5型CA-MRSAクローンを同定した。それらは海

外から伝播した、あるいは地域内で形成されたCA-MRSAの新興クローンと考えられ、そ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。また分布拡大の見られるCA-MRSAクローンを特定し、その性状を調査・解析し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。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、わが国において分布するCA-MRSAの分子疫学的・遺伝学的特長を解析し、特に欧米やアジアに特徴的なクローン、わが国特有のクローン、すなわち新興クローンの浸淫状況を明らかにすることである。第二は、それらCA-MRSAの各種毒素遺伝子の保有とその遺伝学的特長を解明することにより、わが国で見られるCA-MRSAの伝播動態を探究することである。研究成果はCA-MRSAの市中での感染経路を明らかにし、その感染予防対策に資すると考えられる。

3. 研究の方法

研究対象として、由来の異なる2つのグループのMRSAを用いた。一つは、2008年2月~2010年12月に札幌医科大学附属病院(検査部細菌検査室)で臨床材料より分離同定された、黄色ブドウ球菌1366株(MRSA 601株)であり、もう一つは札幌臨床検査センターで北海道各地の医療機関における外来患者から2011年1~12月に分離同定されたMRSA 422株であった。大学病院からは比較的重症の患者に由来する菌株が得られ、臨床検査センター(道内医療機関)からは主に市中感染由来の菌株が得られることを想定した。

黄色ブドウ球菌全株に対して、*mecA*(メチシリン耐性遺伝子)、PVL、ACME-*arcA*遺伝子の保有とコアグラエゼ遺伝子型(*coa* type)をmultiplex PCR(M-PCR)を用いて検出した。また*mecA*が検出された菌株に対して、SCCmec型およびそのサブタイプ型別をM-PCRで行った。ACME陽性株に対してACME typeをlong-range PCRで分類し、さらにPVL、ACME-*arcA*遺伝子が検出された全菌株を含む一部の菌株に対して、16種の抗菌薬への最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、さらに薬剤耐性遺伝子、ヘモリジン、ロイコシジン、エンテロトキシン等の病原因子遺伝子、発現調節遺伝子型(*agr* type)をM-PCRで検出した。遺伝子配列の決定にはPCR direct sequencing法を用い、ST(sequence type)、*spa*(プロテインA遺伝子)の反復配列解析による*spa* type、ACME-*arcA*遺伝子および*sarU*プロモータ領域の配列等を決定した。加えてUSA300に特徴的な遺伝子*chp*、*sak*等の保有をPCRで検出し、PVL陽性株に対してファージ型別をM-PCRで行った。特にPVL遺伝子(*lukS-PV*および*lukF-PV*:1981bp)と、

ACMEにおける *arc*cluster の5 遺伝子 (*argR*, *arcA*, *arcD*, *arcB*, *arcC*: 6174bp) と *opp* cluster の5 遺伝子 (*opp3A*, *opp3B*, *opp3C*, *opp3D*, *opp3E*: 2950bp) についてはそれらの全遺伝子配列を決定し、USA300 クローンなど既知の菌株の遺伝子配列と比較することにより一塩基多型 (SNP) 解析を行った。以上の結果を総合して、最近の北海道における PVL/ACME 陽性 MRSA の分子疫学的状況を評価し考察した。

4. 研究成果

< 研究 1 > 札幌医科大学附属病院で分離された黄色ブドウ球菌 1366 株 (MRSA601 株) の解析

黄色ブドウ球菌臨床分離株 1366 株のうち MRSA は 601 株 (44%)、MSSA は 765 株 (56%) で、MRSA の 95.1% が SCC*mec* type II (SCC*mec* II)-*coa* type IIa を有し、一方 MSSA の *coa* type は多様であった。PVL 遺伝子は 3 株の MRSA (MRSA の 0.5%)、ACME-*arcA* 遺伝子は 8 株の MRSA (MRSA の 1.3%) と 1 株の MSSA で検出され、このうち 2 株の MRSA が PVL 遺伝子も有していた。PVL 遺伝子を有する 3 株は、SCC*mec* IV (subtype; a=2, c=1)、ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type I に属した。このうち SA2269 (PVL+/ACME+) と SA1725 (PVL-/ACME-) の 2 株は、PVL-/ACME+ MRSA 株より抗菌薬に感受性で病原因子遺伝子が少なかったが、SA1483 (PVL+/ACME+) は、薬剤耐性遺伝子 *tet(K)*、*msrA*、*aph(3')*-IIIa 等を有し、多剤耐性傾向を示した。PVL および ACME 陽性 ST8 の 2 株 (SA1483, SA2269) は、USA300 と同じ ACME-type I で、この 2 株のみ USA300 に特徴的な病原因子遺伝子 *selK* と *selQ* を有していた。さらにこの 2 株は、ACME-*arcA* 遺伝子 (1236bp) の配列が USA300 と 100% の一致率を示し、また *sarU* promoter 領域において USA300 とは 2 塩基の違いのみしか見られなかった。

上記 2 株の PVL+ ST8-MRSA の他に、ACME (type- II) が 7 株の ST5-SCC*mec* II で検出され、それらは *spa* type (t002, t067, and t071)-*coa* type II-*agr* type II に属していた。これらの PVL-/ACME+MRSA は多剤耐性を示し、日本で最も多い HA-MRSA クローン (ST5-SCC*mec*II) と同様に、エンテロトキシン 遺伝子 クラスタ (*egc* : *seg-sei-selm-seln-selo-selu*) を含む様々な病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子 *ermA*、*ermB*、*ant(9)-Ia* を有していた。ST5-ACME-II を含む ST8 以外の MRSA 全株は、ACME-*arcA* 遺伝子は USA300 と 99.8% の一致率を示し、*sarU* promoter 領域においては、同一の位置で 6 塩基の違いが認められた。

本研究で、USA300 と同じ特徴を有する PVL・ACME 陽性 ST8 が 2 株 (SA1483, SA2269) 検出され、USA300 に特徴的な遺伝子 *selK* と *selQ* を有し、ACME-*arcA* 遺伝子は 100% の相同性を示した。特に SA1483 は、薬剤耐性遺伝

子の中で USA300-FPR3757 が有する *tet(K)* を、USA300-TCH1516 が有する *msrA*、*aph(3')*-IIIa を持ち、このことから米国で報告されている USA300 に最も類似していると考えられた。また SA1483 はこれまでの日本における報告よりも高い薬剤耐性化傾向を示し、それゆえヒト-ヒト間での伝播の過程でさらなる薬剤耐性を獲得したことが示唆された。New York/Japan クローンとして知られる ST5-SCC*mec* II は、日本で最も広く分布する HA-MRSA クローンであり、本研究での分離率も 95.1% と高かった。本研究で注目されたことは、この優勢な ST5-SCC*mec* II MRSA の一部に ACME の保有が認められたことであり、USA300 と同様に、本クローンの宿主への定着能を高め、その存続と伝播を容易にすることが推察される。さらに *sarU* promoter 領域における塩基配列の多様性が、本菌株の病原性に影響を与える可能性も考えられる。

< 研究 2 > 北海道内の医療機関における外来患者由来 MRSA422 株の解析

本研究で解析した 422 株の MRSA において、最も優勢な SCC*mec* 型は II (74.2%) で、次に IV (12.1%)、I (5.5%)、V (5.0%) の順で検出された。SCC*mec* II MRSA では、*coa* type IIa が最も多く (91.1%)、一方 SCC*mec* IV では *coa* type III が最も多かった (64.7%)。PVL-/ACME-MRSA 1 株が SCC*mec* IV の新しいサブタイプ SCC*mec* IV1 を有していた。

PVL 遺伝子は 8 株 (1.9%) で検出された。ACME-*arcA* は 20 株 (4.7%) で検出され、そのうち 5 株は PVL 遺伝子と SCC*mec* IVa を有し、PVL 陰性株の多くは SCC*mec* II を持っていた。検出された 5 株の PVL+/ACME+ は USA300 と同じ遺伝学的特徴 (ACME-type I、ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type I) を持ち、SaPI5 (SaPI: Staphylococcal pathogenicity island) 上に存在する遺伝子 (*sek*、*seq*)、Sa3USA にある遺伝子 (*sak*、*chp*) を有し、病原因子のプロフィールはこれら 5 株とも同一であった。薬剤耐性遺伝子の検出において、4 株は USA300-TCH1516 が有する *aph(3')*-III を、2 株は USA300-FPR3757 が有する *tet(K)* を有していた。

一方 15 株の PVL-/ACME+ は、ACME-type II を持ち、CC (clonal complex) 5 に含まれる ST5 (3 株) または ST764 (12 株) に属し、*spa* type (t001, t002, t3557) -*coa* type IIa-*agr* type II に分類された。これらの分離株は、エンテロトキシン 遺伝子 クラスタを持ち、PVL 陽性分離株よりも薬剤耐性遺伝子を有し多剤耐性を示したが、USA300 に特徴的な遺伝子 *tet(K)* と *msrA* を持っていなかった。加えて 3 株の ST5-ACME-II において、1 株は SaPI3 上に存在する *seb*、*sek*、*seq*、*sep* を、他の 2 株は SaPI にある *tsst-1*、*sec*、*sel* を持っていた。PVL 遺伝子のみ陽性の 3 株のクローナルタイプ (ST-*spa*-SCC*mec*) は、それぞれ ST772-t11587-V、ST30-t019-II、

ST30-t019-IV であり、ST772 と ST30 は異なる病原因子と耐性遺伝子プロフィールを示した。

sarU promoter 領域を USA300-FPR3757 と比較すると、ST8-PVL+/ACME-I 株は2塩基短く、ST5 および ST764 PVL-/ACME-II は6塩基短かった。PVL 遺伝子のファージ typing と SNP 解析において、5 株の ST8-PVL+/ACME+ は全て haplotype R1 でかつ SA2USA を有し、USA300 と同一であったが、2 株の ST30-PVL+/ACME- は、haplotype H2 または H3 で、USA300 と異なる SLT を有していた。ACME の SNP 解析において、ST8 の 5 株すべてが USA300 と同一配列の *arc* cluster (haplotype AC1) と *opp3* cluster を有していた。一方 AC1 (USA300 と上記 ST8) と他の ACME+-CC5-MRSA の間においては、4 カ所の同義置換を含む 9-11 塩基の違いがあった。

日本のいくつかの研究において USA300 (ST8-SCCmec IVa) は報告されているが、米国における典型的な USA300-0114 (-0114; subtype) クローン PVL+/ACME+-ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type I の報告は、日本では本研究の報告を含めてわずかである。本研究で検出された 5 株の ST8-SCCmec IVa は、USA300-0114 が有する SaPI5 と SA3USA にある遺伝子を持ち、PVL 遺伝子および ACME と 100% の相同性を示し、2 塩基欠失が *sarU* promoter 領域に見られた。それゆえ、本研究で検出された USA300 は、USA300-0114 (USA300-FPR3757、USA300-TCH1516) とほぼ同一のゲノムを有し、米国から日本へ伝播する間にわずかに遺伝子が多様化したと推察される。さらにこれら 5 株は USA300 にある薬剤耐性遺伝子 *blaZ* と *msrA* を有していたが、*ermC* と *mupA* を持っておらず、FPR3757 および TCH1516 とは異なる。それゆえ、USA300 ゲノムは高い安定性を持っていると考えられるものの、ヒト-ヒト間での伝播を通じ、薬剤耐性プラスミドの獲得などにより分子進化を経た可能性が示唆された。

ACME-II を持つ PVL-MRSA は、今回の 2 つの研究で検出され、2009 年の研究よりも検出率がわずかに増加し、ST5 に加えて ST764 が検出された。この ST764 は、院内感染型 ST5 の新しい変異型 (1 ローカス変異) で、ST5 と同様に多剤耐性である。また *spa* type において *spa*-t001 は *spa*-t002 の 1 ローカス変異型で、一方 *spa*-t3557 は *spa*-t001 の 2 ローカス変異型で、本研究で分離された PVL-/ACME+ MRSA 株は互いに遺伝学的に近い関係にあることが示唆される。2009 年の北海道における調査でも ST764 の MRSA は検出されているが、ACME-*arcA* 遺伝子の保有は見られていない。また ACMEII-CC5 (ST5/ST764)-MRSA 株では、SCCmec type、*arc* cluster の SNP、保有する病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子に関し遺伝学的多様性が認められた。このことから ST5/ST764-MRSA は、遺伝学的に高い保存性が見られる ST8-MRSA よりも頻繁

に伝播しつつ分布を拡大させ、その過程で遺伝学的多様性が生じたことが示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Kawaguchiya M, Urushibara N, Yamamoto D, Yamashita T, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N. Characterization of PVL/ACME-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA-II) isolated from a university hospital in Japan. *Microb Drug Resist*, 2013, 19:48-56. (査読有り) doi: 10.1089/mdr.2012.0089
2. Isogai N, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ghosh S, Suzuki K, Watanabe N, Quiñones D, Kobayashi N. Characterization of *Enterococcus faecium* with macrolide resistance and reduced susceptibility to quinupristin/dalfopristin in a Japanese hospital : detection of extensive diversity in *erm(B)*-regulator regions. *Microb Drug Resist*, 2013, 19:298-307. (査読有り) doi: 10.1089/mdr.2012.0176
3. Sumi A, Rajendran K, Ramamurthy T, Krishnan T, Nair GB, Harigane K, Kobayashi N. Effect of temperature, relative humidity, and rainfall on rotavirus infections in Kolkata, India. *Epidemiol Infect*, 2013, 141:1652- 1661. (査読有り) doi: 10.1017/S0950268812002208
4. Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Kuwahara O, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Genetic diversity of emerging PVL/ACME-positive ST8-MRSA-IVa and ACME-positive CC5 (ST5/ST764)-MRSA strains in northern Japan. *J Med Microbiol*, 2013, 62:1852-1863. (査読有り) doi: 10.1099/jmm.0.062125-0

[学会発表](計10件)

1. Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Novel multiplex PCR in combination with mutagenic PCR-RFLP analysis to distinguish *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A, 6B, 6C, and 6D. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. 2014, Tokyo (March 25).
2. Urushibara N, Kawaguchiya M, Paul SK, Kobayashi N. Two novel staphylococcal cassette chromosome *mec* elements containing two copies of *mecA* genes

- identified in Bangladeshi clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. International Interscience Conference on Infection and Chemotherapy, 2013, Seoul, Korea (November 8).
3. Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Ito M, Kudo K, Kuwahara O, Kobayashi N. Serotype distribution and analysis of macrolide- and penicillin-resistance among non-invasive *S. pneumoniae* isolates in northern Japan. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, Yokohama (June 7).
 4. Kobayashi N, Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Ito M, Kudo K, Kuwahara O, Quiñones D. Characterization and genetic diversity of PVL/ACME-positive MRSA strains isolated in Hokkaido, the northern main island of Japan. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, Yokohama (June 6).
 5. Onishi M, Urushibara N, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N. Prevalence and genetic characterization of SCCmec and ACME in coagulase-negative staphylococci. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, Yokohama (June 6).
 6. Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Structural variations of ACME-SCCmec composite islands in MRSA carrying SCCmec type II collected in Hokkaido, Japan. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, Yokohama (June 6).
 7. Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Genetic diversities in ACME-SCCmec composite islands in MRSA isolates collected in Hokkaido, the northern main island of Japan. 15th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2012, Lyon, France.
 8. Kobayashi N, Isogai N, Urushibara N, Watanabe N. Analysis of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Enterococcus faecium* isolated in a Japanese hospital. The 13th Asia-Pacific congress of Clinical Microbiology and Infection, 2012, Beijing (Oct.26).
 9. Kawaguchiya M, Urushibara N, Yamamoto D, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N. Genetic analysis of PVL/ACME-positive *Staphylococcus aureus* isolated in a Japanese hospital. 13th International Congress of

Bacteriology and Applied Microbiology, 2011, Sapporo.

10. Isogai N, Urushibara N, Quiñones D, Kobayashi N. Prevalence and genetic mechanisms of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Enterococcus faecium* isolated in a Japanese hospital. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011, Sapporo.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
小林宣道 (KOBAYASHI NOBUMICHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：80186759
- (2)研究分担者
鷲見紋子 (SUMI AYAKO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10363699
漆原範子 (URUSHIBARA NORIKO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80396308
ゴッシュ ソウビク (GHOSH SOUVIK)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80597175
- (3)連携研究者
なし