

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592552

研究課題名(和文)メチシリン耐性ブドウ球菌の遺伝子解析による慢性中耳炎遷延化の病態解明と治療戦略

研究課題名(英文)Elucidation and treatment strategies for protraction of chronic otitis media by genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

研究代表者

小森 正博 (KOMORI, Masahiro)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：30565742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌がメチシリンに対する耐性遺伝子を獲得したものをMRSAといい、治療に難渋することがある。慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析を行ったところ、本症由来の黄色ブドウ球菌の集団構成は健常者のそれと明らかに異なり、すでに報告されているアトピー性皮膚炎や伝染性膿痂疹のものとも異なっていた。

次に、従来通り医療機関において病原となった病院感染型MRSAは耐性株が多く、一般社会に存在する市中感染型MRSA薬剤感受性がよいという結果であったが、抗MRSA薬であるバンコマイシンの効果が低下していること、後者ではリネゾリドの効果も低下していることに留意する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus causes about 50% of cases of chronic otitis media (COM). It is postulated that population structure of *S. aureus* is geographically different in regions or diseases such as impetigo and atopic dermatitis. This study demonstrated that population structure of *S. aureus* in COM did not reflect that of nasal strains in healthy volunteers, but rather it was specific to the disease.

The relationships among the virulence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, their antibiotic susceptibility, and the presence of enterotoxin genes have been frequently discussed. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of vancomycin was high for both hospital-associated (HA) and community-associated (CA) MRSA strains, and the MIC of linezolid was higher in CA-MRSA strains. More toxigenic genes were identified in HA-MRSA strains than in CA-MRSA strains.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：黄色ブドウ球菌 MRSA 慢性中耳炎

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌には地域特異性があり、その地域にてさまざまな進化を遂げた。その進化の過程において、メチシリンに感受性を持っていた黄色ブドウ球菌 (MSSA; Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) がメチシリンに対する耐性遺伝子を獲得したものをメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA; Methicillin-resistant SA) といい、院内において病原となった院内感染型 MRSA と一般社会に存在する市中感染型 MRSA に大別される。市中感染型 MRSA には院内感染型 MRSA には稀な毒素遺伝子を持ち院内感染型 MRSA 以上に重篤な肺炎や菌血症を引き起こすものがあるといわれている。また、遺伝子解析の進歩により、黄色ブドウ球菌の疾患特異性が報告されている。耳科領域において、黄色ブドウ球菌は慢性中耳炎の起炎菌の約半数を占める。その検討は抗菌薬の薬剤感受性、院内関連型・市中関連型 MRSA の分類、MRSA の耐性遺伝子の分類などから行われてきた。耳鼻咽喉科領域の感染性疾患において、遺伝子解析を詳細に行った報告や、健常者のぶどう球菌株と疾患から分離されたブドウ球菌株をマッチングさせた報告は認められない。

2. 研究の目的

(1)慢性中耳炎の耳漏中の黄色ブドウ球菌の遺伝子解析を行い、健常者の鼻腔内の黄色ブドウ球菌との違いを明らかにすることである。

(2)慢性中耳炎の耳漏中の MRSA の特徴を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)解析に用いる遺伝子には、ハウスキーピング遺伝子とその他の変化しやすい遺伝子を用いる場合がある。そのうち、ハウスキーピング遺伝子は細胞生存の根幹にかかわる遺伝子で、進化速度が遅く、「進化の体内時計」といわれ、進化的時間通りの系統樹が作成できる。増幅された DNA 断片の遺伝子配列を DNA シークエンサーにて同定した。そして、7つのハウスキーピング遺伝子のうち5つが一致するものを同じ遺伝子群; Clonal Complex (CC) とし、統合遺伝子解析ソフトを用いて黄色ブドウ球菌の系統樹を作成した。

(2)抗 MRSA 薬; バンコマイシン (VCM)、テイクプラニン (TEIC)、リネゾリド (LZD)、ダプトマイシン (DPT)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム (SM/TMP)、リファンピシリン (RFP)、クリンダマイシン (CLDM)、ミノマイシン (MINO) の MIC 値を E-test® を用いて測定した。また 19 の毒素遺伝子について、Multiplex PCR を行った。

4. 研究成果

(1)慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌では、CC5 が 23% と最も多く、健常者の CC との間有意差を認めた。次いで、CC8 が 17% となった。そして、CC59、CC75、CC121 と健常者には稀な Clonal Complex を比較的高い頻度で認め、健常者に多い CC508、CC188 は少なかった。MRSA は CC5 の 8 株のうち 5 株 (63%)、CC8 の 6 株のうち 5 株 (83%)、CC59 の 4 株のうち 1 株 (25%) に認めた。以上より、黄色ブドウ球菌の系統によって疾患との関わりが異なることが示唆された。

欧米において、健常者の鼻腔内黄色ブドウ球菌ならびに集中治療室にて菌血症の起炎菌となった黄色ブドウ球菌の CC は共に CC15 (28%)、CC30 (25%) が上位 2 つを占めるとされている。一方で、同施設から、アトピー性皮膚炎を重症化させる黄色ブドウ球菌の CC では、CC30 (9%) は最も少なく、CC45 (27%)、CC5 (19%) が多いことや、CC1 が CC30 よりも有意にアトピー性皮膚炎の病状を重症化させていることも報告されている。また、韓国でも、外来患者において CC30 は 35% を占めるが、アトピー性皮膚炎では 2.7% と少なく、むしろ CC188 (19.4%) と CC1 (13.9%) が上位 2 つを占め、欧米とは異なる結果を報告している。本研究において、頻度の多い CC は CC5 (23%)、CC8 (17%) となり、地域差を検討することはできないが、いずれの報告とも異なる結果になった。また、本邦では伝染性膿痂疹の起炎菌となった市中関連型 MRSA の検討において CC91 (71%) が多いと報告されているが、本研究では市中関連型 MRSA は CC8、CC59 が検出され、CC91 は認めなかった。以上より、まだ検出数が少ないが、慢性中耳炎の起炎菌となった黄色ブドウ球菌の CC はアトピー性皮膚炎を重症化させる CC や伝染性膿痂疹の起炎菌となる CC と異なっているかもしれないと考えた。

(2)VCM の MIC 値は全て 1.5ug/ml 以上となり、HA-MRSA の 40%、CA-MRSA の 80% において 2ug/ml となった。LZD の MIC 値は HA-MRSA が 0.75~0.5ug/ml であったのに対し、CA-MRSA は 2~6ug/ml であった。次に CLDM の MIC 値は HA-MRSA が全て 256ug/ml 以下で、CA-MRSA は 1 例のみ 256ug/ml 以下で残りの 4 例は 0.064~0.084ug/ml であった。MINO の MIC 値は HA-MRSA が 6~12ug/ml で、CA-MRSA は 0.064~0.094ug/ml であった。一方、TEIC、DPT、SM/TMP、RFP の MIC 値には HA-MRSA と CA-MRSA の間に明らか差を認めなかった。HA-MRSA にはこのたび検討した 19 の毒素遺伝子中の 5~7 つの遺伝子を認めた。特に、*tsst-1* は HA-MRSA の 40% に認められた。一方、CA-MRSA にはいずれの毒素遺伝子も認められなかった。また、PVL は HA-MRSA ならびに CA-MRSA のいずれにも認められなかった。

VCM の MIC 値は全国サーベイランスでは全て 1ug/ml 以下であったが、本検討では全て

1.5ug/ml 以上となり、MIC 値 2ug/ml の菌株が HA-MRSA の 40%、CA-MRSA の 80% に認められた。VCM の MIC 値が E-test にて 1.5ug/ml 以上、院内細菌検査室における微量液体希釈法にて 2ug/ml 以上の場合、MRSA 感染患者の治療効果が低下するとの報告があり注意をすべきとされている。当院では MIC 値 1 ug/ml と 2ug/ml の症例を分けることができないので、本結果をふまえ、VCM の MIC 値は 2ug/ml と考えてトラフ値を設定した方がよいかもしれないと考えている。次に、LZD の MIC 値は全国サーベイランスでは 1 ~ 4 ug/ml と薬剤感受性のブレイクポイント付近 (4 < ug/ml) にあった。本検討では HA-MRSA が 0.75 ~ 0.5ug/ml と極めて良好な薬剤感受性であったのに対し、CA-MRSA は 2~6ug/ml と大部分が薬剤感受性のブレイクポイント付近で、1 例は耐性株であった。このことから、CA-MRSA において LZD に対する薬剤耐性が進みつつあるかもしれないと考えられた。一方、その他の抗 MRSA 薬である TEIC、DPT、SM/TMP、RFP は HA-MRSA と CA-MRSA の双方に対し良好な薬剤感受性を呈していた。

CLDM と MINO の MIC 値は、過去の報告と同様に HA-MRSA が全て耐性株であったのに対し、CA-MRSA は元来より特徴とされるように大部分で感受性株であった。全国サーベイランスの報告でも感受性良好株と耐性株で MIC が大きく異なる 2 極化を示していた。黄色ブドウ球菌は溶血毒、細胞毒、表皮剥離毒素、毒素性ショック症候群 (TSS; Toxic Shock Syndrome) を発症させる *tsst-1* および *SEs* などを産生する。細胞毒である PVL の遺伝子は溶原化ファージ (細菌に感染するウイルス) のゲノム上にコードされており、ファージの感染、溶原化によって伝播する。2008 年の時点において 5 つの異なる PVL 遺伝子をもつファージがそれぞれ同定されて、黄色ブドウ球菌の染色体に潜んでいる。本邦においては、1979~1985 年の初期の MRSA は HA-MRSA であり、USA300 と同様の PVL 遺伝子をもっていたが、2000 年以降の MRSA では PVL 遺伝子ならびにファージの種類共に異なるものが同定され、MRSA に変化が起こったことが述べられている。しかしながら、近年、USA300 と同じタイプの CA-MRSA が同定されるようになった。PVL 遺伝子を有する CA-MRSA は米国では大分を占めるが、本邦では現時点で 3 ~ 5 % と割合は低いが増加する傾向にあるといわれている。耳科領域では、2011 年 PVL 陽性、CC5、MRSA による難治性慢性中耳炎の報告がなされた。本検討では PVL 遺伝子は同定されなかったが留意すべきと考えている。

SEs ならびに *tsst-1* は MHC class II 因子が提示するペプチドの種類に関わらず結合して、T 細胞を活性化し、過度のサイトカインを産生させることからスーパー抗原と呼ばれ、TSS を引き起こす可能性をもつ。CC5 の方がより多くの *SEs* を複数もつとした報告

や、伝染性膿痂疹から分離された CC8 は USA300 より *tsst-1* の産生量が多いとした報告がある。本研究にて CC5 で毒素遺伝子が多く、CC8 で全く検出されないという極端な結果になったのは、疾患特異性によるものか、あるいはサンプル数が少ないためかは不明である。まだ明らかになっていないこれらの毒素と臨床症状との関連性と合わせて今後の検討が必要と考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①小森正博、小林泰輔、松本宗一、兵頭政光 慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析；健常者の鼻腔内黄色ブドウ球菌との比較. *Otol Jpn* 査読有 24 2014. 10-14
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/otoljpn/-char/ja>

[学会発表] (計 7 件)

- ①小森正博、兵頭政光：慢性中耳炎の耳漏から分離された院内関連型・市中関連型 MRSA における抗 MRSA 薬の MIC 値の比較. 第 2 回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会総会ならびに学術講演会東京ステーションコンファレンス (東京都) 2014. 9. 5~6.
- ②小森正博、小林泰輔、松本宗一、兵頭政光：慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析～院内関連型・市中関連型 MRSA の比較～ 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 シーガイアコンベンションセンター (宮崎市) 2013. 11. 24~26
- ③Komori M, Kobayashi T, Hyodo M Genotype of *Staphylococcus aureus* isolated from otorrhea of chronic otitis media. 2013 Annual Meeting, American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery in Vancouver, Canada. 2013. 9. 29~10. 2
- ④小森正博、上原良雄、小林泰輔、森本徳仁、兵頭政光、瀬尾宏美：慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析：薬剤感受性ならびにエンテロトキシンの比較. 第 58 回日本ブドウ球菌研究会. 東京薬科大学 (八王子市), 2013. 9. 27~28.
- ⑤小森正博、兵頭政光：慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析；薬剤感受性の比較. 第 1 回耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会。レンブラントホテル大分 (大分市) 2013. 9. 6~7
- ⑥小森正博、小林泰輔、兵頭政光：慢性中耳

炎の耳漏から分離されたブドウ球菌の遺伝子解析；健常者の鼻腔内ブドウ球菌との比較. 第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会. 名古屋国際会議 (名古屋市), 2012. 10. 4~6

- ⑦ 小森正博, 上原良雄, 小林泰輔, 森本徳仁, 兵頭政光, 瀬尾宏美：慢性中耳炎の耳漏から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子解析. 第 57 回日本ブドウ球菌研究会. 広島大学東京オフィス (東京都), 2012. 9. 21~22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 正博 (KOMORI Masahiro)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：30565742

(2) 研究分担者

小林 泰輔 (KOBAYASHI Taisuke)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：30253313

(3) 連携研究者

上原 良雄 (UEHARA Yoshio)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
(H24-H25)
新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師
(H25-H26)
研究者番号：60346723