

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：23601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25862196

研究課題名（和文）新生児に対する常在細菌の移行・定着を目的とした看護介入の確立

研究課題名（英文）An investigation on the acquisition of normal bacterial flora in neonates

研究代表者

中畑 千夏子（Nakahata, Chikako）

長野県看護大学・看護学部・助教

研究者番号：60438174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000円

研究成果の概要（和文）：母児分離を余儀なくされた新生児に対する有効な正常細菌獲得を目的とした看護介入につなげるための基礎的研究を行った。まず、母児3組の鼻腔からそれぞれ表皮ブドウ球菌を分離し、それらの異同についてMLVA法を用いて調べた。3組中2組において、母児間で同一の菌株が分離された。また、分離した表皮ブドウ球菌のうち、3菌株はメチシリン耐性表皮ブドウ球菌（MRSE）であったことから、市中におけるMRSEの拡散状況を把握するため、健康な成人集団について、MRSEの保有率を調べた。その結果、MRSEの保有率は18.3%であり、同時に調査したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の保有率1.3%を大きく上回っていた。

研究成果の概要（英文）：I investigated the genotypic diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolated from 3 pairs of neonates and their mothers. Genotyping was performed by MLVA using loci VNTR1, VNTR2, VNTR3, VNTR4 and VNTR5. Two of the three pairs colonized the same strains of *S. epidermidis* respectively. It was suggested that *S. epidermidis* could transfer from mother to neonate. Of the 15 strains examined, 3 strains were MRSE. Therefore, I investigated staphylococcal strains isolated from college students of a Japanese community to evaluate the prevalence and characteristics of methicillin-resistant staphylococci. Of the 146 students examined, 2 (1.4%) and 19 (13.0%) were colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), respectively. These observations suggested that, compared with MRSA strains, MRSE strains were highly disseminated among Japanese college students.

研究分野：感染看護学

キーワード：常在細菌 正常細菌叢 新生児 MLVA法 表皮ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

感染防御に果たす常在細菌叢の役割は、我々が健康を維持していく上で極めて重要である。特に、免疫系の未発達な新生児にとって、感染の予防とりわけメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*) に代表される薬剤耐性菌の感染を防ぐためには、正常な常在細菌叢の早期獲得が重要であり、母親から児への常在細菌叢の移行・定着がそのための有用な方策であるとも考えられている。しかし、こうした細菌叢の移行について、詳細は明らかにされていなかった。将来的には、様々な理由から母親との接触が得られない新生児に、正常な常在細菌叢を獲得させるための積極的な介入方法を確立させることを目的とし、本研究を行うこととした。そこでまずは基礎研究として、母子間の直接的な接触が積極的に実施された健常新生児において、母親由来の常在細菌が児に移行し定着する過程を知る必要があると考えた。つまり、母児由来の常在細菌叢形成菌の同一性を比較することで、このことを明らかにすることとした。具体的には、ヒト常在細菌叢の主要な構成菌の一つである表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) について、特定の菌株が新生児とその母親に共通して見出されるかを経時的に調べることにした。なお対象となる表皮ブドウ球菌の異同を識別する方法には、DNA上に存在する VNTR (variable number of tandem repeats) 領域を解析する方法 (MLVA 法) を用いることとした。

2. 研究の目的

- (1) 新生児とその母親から分離された表皮ブドウ球菌の異同を明らかにすること。
- (2) 市中におけるメチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (MRSE: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*) の拡散状況を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 実験 1

A 病院で出産した母親とその児、計 3 組の鼻腔より分離された表皮ブドウ球菌を用いた。サンプリングは母親が出産後 5 日目または 6 日目の 1 回、児は生後 5 日目または 6 日目および 1 か月検診時の計 2 回とした。分離された表皮ブドウ球菌は 1 組目が母親から 2 株、児から 5 株、2 組目が母親から 2 株、児から 3 株、3 組目が母親から 2 株、児から 1 株の計 15 株であった。VNTR ローカスについては 5 種 (Se1, Se2, Se3, Se4, Se5) を解析の対象とした。まず、分離菌から DNA を抽出し、これらをテンプレートとして各々のローカスを PCR 法によって増幅した。その後、得られた増幅産物をアガロースゲル電

気泳動法で解析した。その際、全塩基配列が決定されている ATCC12228 株のゲノム DNA (理化学研究所より分与) を reference standard として用いた。観察された DNA フラグメントのサイズを求め、reference standard のそれを基に各 VNTR を構成する repeat unit の繰り返し数 (repeat copy number) を決定した。

(2) 実験 2

健康な母子から採取した表皮ブドウ球菌のうち、3 株は *mecA* 遺伝子を保有する MRSE であった。このことから、市中における MRSE の拡散状況を把握するための基礎調査として、健康な成人集団を対象とし、MRSE の保有率について調査を行った。

1) ブドウ球菌の分離および同定

この研究では、A 大学の学生 146 名 (年齢範囲: 19 歳 ~ 39 歳) の鼻腔内から分離された 162 株の表皮ブドウ球菌および黄色ブドウ球菌を研究の対象とした。

具体的には、対象者の鼻腔内スワブからソイビーンカゼインダイジェスト (SCD) 寒天培地 (栄研化学) によりコロニーを分離し、卵黄加マンニット食塩寒天培地® (栄研化学) に接種して、*Staphylococcus* 属菌を選択した。卵黄加マンニット食塩寒天培地上で培地の黄変を認め、なおかつ卵黄反応のみられたコロニーを黄色ブドウ球菌とし、培地の黄変を認めなかったものを CNS: Coagulase negative *Staphylococcus* として、それぞれを更に SCD 寒天培地に接種し、37 °C で一昼夜培養することで分離菌株を得た。なお、これらの分離菌株については、グラム染色法によってグラム陽性球菌であることを確認した。

2) DNA の調製

分離菌からの DNA の抽出には、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) を使用した。SCD 寒天培地上の 1~2 コロニー (直径 1~2 mm) を同試薬の 1 ml に懸濁し、100 rpm で 10 分間の処理を行った。遠心分離 (15000rpm, 5min) 後に上清を分取し、分離菌の DNA 溶液として -20 °C で保存した。

3) 分離菌の同定

分離菌の同定には、黄色ブドウ球菌に特異的な遺伝子である *nucA* と、表皮ブドウ球菌の特異的なゲノム DNA 領域である Se705 を検出の対象とした PCR 法を用いた (Louie et al., 2000; Martineau et al., 1996)。その際、メチシリン耐性遺伝子 (*mecA* 遺伝子) の保有の有無を調べることで、MRSA あるいは MRSE の判別も行った。DNA ポリメラーゼには HotStar Taq (QIAGEN)、プライマーには *mecA1*, *mecA2*, *nucA1*, *nucA2*, Se705-1 および Se705-2 を用いた。分離菌から得た DNA 溶液を滅菌水にて 20 倍に希釈し、その

うちの 5 μ l を試料 DNA として PCR 反応に用いた。増幅反応は、95 で 1 分(変性), 55 で 1 分(アニーリング), 72 で 1 分(伸長)の各ステップからなる反応を 30 サイクル繰り返し行った。アガロース電気泳動法による増幅産物の分析には、2.5% NuSieve3:1 Agarose (Lonza) を用いた。緩衝液は Tris-acetate/EDTA(TAE)を使用し、アガロースゲルの染色には SYBR Green (Molecular Pross)を用いた。

4) 薬剤感受性試験

分離された MRSA および MRSE のオキサリリン(OX)に対する最小発育阻止

濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)は、E-test(シメックス・ピオメリユ)によって判定した。また、その他の抗菌薬についての薬剤感受性試験は、KB ディスク(栄研化学)を用いたディスク拡散法により行った。

使用した抗菌薬は、ベンジルペニシリン(PCG)、セファゾリン(CEZ)、ノルフロキサシン(NFX)、ゲンタマイシン(GM)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、バンコマイシン(VCM)およびアンピシリン(ABPC)とした。

5) SCCmec のタイピング

SCCmec は、cassette chromosome recombinases (ccr) 遺伝子複合体と mecA 遺伝子複合体によって構成される (Fig.1)。分離菌について、この SCCmec のタイプを決定するために、multiplex-PCR 法による解析を行った(Kondo et al., 2007)。ccr 遺伝子複合体の解析では、プライマーとして mA1, mA2, α 1, α 2, α 3, β c, α 4.2, β 4.2, γ R および γ F を使用し、TKARAEX Taq HS (Takara Bio) を用いて増幅反応を行った。なお mA1 と mA2 は、陽性コントロールとしての mecA 遺伝子を確認するためのプライマーとしてこの反応に用いた。反応は 94 で 2 分(変性), 57 で 1 分(アニーリング), 72 で 2 分(伸長)の各ステップを 30 サイクル繰り返し、増幅産物の解析は 1.5% Seakem GTG Agarose (Lonza)を用いたアガロースゲル電気泳動法で行った。mecA 遺伝子複合体のクラスを判定するための PCR には、プライマーとして ml6, IS7, IS2(iS-2), mA7 を用いた。DNA ポリメラーゼには TKARAEX Taq HS を用い、増幅は 94 で 2 分(変性), 60 で 1 分(アニーリング), 72 で 3 分(伸長)のステップを 35 サイクル行った。アガロースゲル電気泳動とゲルの染色は、ccr 遺伝子複合体の場合と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 母児から分離された表皮ブドウ球菌株の異同

分離菌 15 株について、5 種類の VNTR ロードカスを解析した。その結果、3 組中 1 組で

は母親から分離された 2 株のうち 1 株が、児から分離された 4 株と遺伝型が一致した。また他の 1 組では、母親から分離された 2 株のうち 1 株について、児から分離された株と遺伝型が一致した。これらのことから、出産後には、母親が保有している表皮ブドウ球菌が児へ移行し、少なくとも 1 か月間は保持されることが明らかとなった。しかしながら、3 組中 1 組については、母児の分離株の遺伝型がまったく一致しなかった。今回の研究では、対象の母児 3 組に関して、出産や産後の経過等についての詳細なデータは得ていない。そのため、母児間での表皮ブドウ球菌の移行が成立した過程やその条件に関する詳細な検討は行っていない。今後、母児間で表皮ブドウ球菌が移行したケースと、移行しなかったケースについてそれぞれの経過を比較することで、特に出生直後に母児分離を余儀なくされたケースにおける母児間の常在細菌移行を目的とした具体的な介入方法への示唆を得たい。

(2) 市中における MRSE の拡散状況

1) 分離状況

この研究では 146 名の大学生から得られた 162 株のブドウ球菌について、nucA 遺伝子と Se705 領域を指標として、黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌の同定を行い、mecA 遺伝子の保有の有無から MRSA および MRSE を識別した。黄色ブドウ球菌は 47 名から計 47 株が分離された。そのうち MRSA については 146 名中 2 名(1.4%)が保有していた。MRSE については 19 名から分離され、その保有率は 13.0%と MRSA のそれに対して 9.3 倍であった。また、黄色ブドウ球菌の中で MRSA の占める割合は 4.3%であった。表皮ブドウ球菌については MRSE が 18.3%を占め、黄色ブドウ球菌における MRSA の割合である 4.3%よりも高い値を示した。このように、市中におけるメチシリン耐性菌株については、表皮ブドウ球菌が優位であり、MRSE が MRSA よりも広く分布していた。メチシリン耐性能の獲得についても表皮ブドウ球菌の進行は顕著であり、その割合は黄色ブドウ球菌の約 4 倍であった。

2) 薬剤感受性の状況

分離同定された 2 菌株の MRSA と 19 菌株の MRSE について、各種抗菌薬に対する耐性能の獲得状況を把握するために薬剤感受性試験を実施した。MRSA の OX に対する MIC は、8 μ g/ml と 64 μ g/ml であった。MRSE については、0.19 μ g/ml から 16 μ g/ml までの様々な MIC を有していた。全般的に MRSA のそれよりも低いものの、2 菌株については、それぞれ 16 μ g/ml および 8 μ g/ml と、比較的高い値を示した。MRSA の判定基準は OX に対して 4 μ g/ml 以上の MIC を有することであり、MRSE についてはその値が 0.5 μ g/ml 以上と規定されている (Clinical and

Laboratory Standards Institute: CLSI, 2014). 3株のMRSEは, MRSAの基準に相当するMICを示した. MRSEの1菌株については, mecA遺伝子を有するにもかかわらず, CLSIの判定基準である0.5 μ g/mlよりも低いMICを有していた.

ディスク拡散法により, PCG, ABPC, CEZ, VCM, NFX, GM, EM, TCに対する感受性を調べたところ, ペニシリン系薬であるPCGとABPCに対しては, MRSEの3菌株がそれぞれに感受性を示し, これらを除く他のすべての菌株は耐性を有していた. CEZに対してはMRSAの1菌株だけが耐性を示し, その他はすべて感受性であった. VCMに対しては, すべての分離菌が感受性であった. また, MRSAのうち, 1菌株はPCG, NFX, ABPCに耐性を示したが, その他の対象薬剤に対しては感受性を示した. 一方, 別のMRSA菌株では感受性を示した薬剤はTCとVCMのみで, 他の対象薬剤すべてに対して耐性であった.

MRSEでは, 対象薬剤8種のうち, 耐性を示したものが半数の4種にとどまる菌株がほとんどであったが, CEZ, TC, VCM以外のすべてに耐性を示した菌株がみられた他, CEZ, VCM以外のすべてに耐性を示した菌株がみられたように, 複数の薬剤に対して耐性能を持った菌株も含まれていた.

3) SCCmec タイプの同定

MRSA 1菌株とMRSE 9菌株について, multiplex-PCR法によりSCCmecタイプの同定を行った. SCCmecのタイプはそれを構成している ccr 遺伝子複合体のタイプと mecA 遺伝子複合体のクラスとの組み合わせによって決定される(International working group, 2009). mec 遺伝子複合体の解析では, 10株の分離菌のうち9菌株において, class Bに由来すると考えられる約2.8kbの増幅産物が得られた. MRSEの1菌株では, これまでに報告されている3種類のアレルに由来すると考えられる増幅産物は得られず, それらとは大きさの異なる約4kbのバンドが観察された. ccr 遺伝子複合体の増幅では, すべての菌株について mecA 遺伝子に由来する約0.3 kbと ccrA2B2 遺伝子に由来する約0.9 kbのそれぞれに相当するバンドがアガロースゲル上で観察された. これら各菌株から得られた mecA 遺伝子複合体および ccr 遺伝子複合体のタイプの組み合わせから, MRSAの1菌株とMRSEの7菌株については, いずれもSCCmecタイプを と判定した. 1菌株については, 前述のように得られた増幅産物がこれまでに知られている3つのクラスの mec 遺伝子複合体に由来するものとは考えられず, 何れのタイプにも分類することができなかつた. 同菌株の ccr 遺伝子複合体解析においては, ccrA2B2 遺伝子に由来すると考えられる約0.9 kbのフラグメントが得られたが, その他に約0.5 kbの増幅産物も観察さ

れた. これはおそらく ccr 遺伝子のアレルのひとつである ccrC に由来するものと考えられた. このことは, この菌株の ccr 遺伝子複合体上には2つのタイプが混在することを示しており, 既知のSCCmecタイプに分類することができなかつた.

4) 考察

MRSEの保有率は13.0%であり, MRSAの保有率1.4%を大きく上回っていた. 市中ではMRSAに比べ, MRSEがより拡散していることが考えられた.

CA-MRSAにおける薬剤感受性の特徴としては, OXに対する耐性度があまり高くなく, 一部はEMに耐性を示すものの, OXを除く多くの抗菌薬に対して感受性を有すること等が知られている(伊藤ら, 2004). 今回分離されたMRSAのうち, 1菌株はOXに対するMICが8 μ g/mlとそれほど高くはなく, それに加えてペニシリン系薬であるPCGおよびABPCと, ニューキノロン系薬であるNFXを除くその他の抗菌薬に対して感受性がみられた. このことは, 前述したCA-MRSAの特徴と一致する. 一方, 他の1菌株はOXに対してMICが64 μ g/mlと, 高い耐性能を有していた. VCM, TCには感受性を示したものの, それ以外のすべての抗菌薬に耐性であったことから, この菌株はHA-MRSAの可能性の高いことが考えられた. この定着が一過性であるか, あるいは常在細菌叢の構成菌になりうるものかを明らかにするためには, 更に一定の期間をおいた長期的な保有状況の調査が必要である.

OXに対してMRSAの基準に相当するMICを示した3菌株のMRSEについては, ディスク拡散法による薬剤感受性試験において, 1~3種のペニシリン系抗菌薬あるいはニューキノロンに対して耐性を示したが, 他のすべてには感受性であった. また, MRSEのうち, OXに対して基準値以下の低いMICを示した1菌株については, 確かに mecA 遺伝子を有しているにも関わらず, ペニシリン系薬やセフェム系薬などの β ラクタム系薬には感受性をもち, マクロライド系薬であるEMのみに耐性を示す結果となった. このようなPBP2'(Penicillin Binding Protein 2 prime)をコードする遺伝子の保有に相反するような β ラクタム系薬に対するMIC値を含めた耐性能の低さは, mecA 遺伝子の発現制御系の関与によると思われる. このようにCA-MRSEでは, それらの薬剤耐性能のパターンは様々であるが, 多くの抗菌薬の有効な菌株がその大半を占めていることが明らかとなった. その一方で, 他の菌株では, OXに対するMICは1.5 μ g/mLとそれほど高くはないものの, CEZ, VCM以外の一般的に用いられている抗菌薬の多くに耐性を有していた. このことから, ヒト常在細菌叢の主要な構成菌である表皮ブドウ球菌の多剤耐性化に関しても, 黄色ブドウ球菌の場合と同じ

く、今後十分に把握していく必要があると考える。

MRSA の 1 菌株および MRSE の 9 菌株に対する SCCmec のタイピングでは、2 菌株を除く 8 菌株において、mecA 遺伝子複合体のタイプは classB であり、ccr 遺伝子複合体のタイプは A2B2 であった。このことから、これらの SCCmec のタイプを と判定した。1 菌株については、ccr 遺伝子複合体のタイプは A2B2 であったが、mecA 遺伝子複合体の識別において、未知の増幅産物が検出されたため、そのクラスを特定するには至らなかった。これについては塩基配列の解析を含めた今後の研究が必要と考える。さらに他の 1 菌株については、この菌株の ccr 遺伝子複合体上に A2B2 と C の 2 つのタイプが混在する可能性が示され、既知のいずれの SCCmec タイプにも分類することができなかった。

CA-MRSA では、タイプ が多いとされている (Jamaluddin et al., 2008)。本研究においては、MRSA および MRSE の分離菌株についても、10 株中 8 株がタイプ を有しており、タイプ のような HA-MRSA に多いとされる SCCmec は見られなかった。このことは、HA-MRSA の市中への拡散がそれほど進行していないことを示しているのかもしれない。

いずれにしても、MRSE の市中における拡散は MRSA のそれよりも進んでおり、新生児では、常在細菌叢の獲得の過程において、MRSE を保有する可能性のあることが示唆された。

[文献]

Clinical and Laboratory Standards

Institute(2014): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

International Working Group on the

classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2009): Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel

伊藤輝代, 桑原京子, 久田研, 他 3 名 (2004): 市中感染型 MRSA の遺伝子構造と診断(最新の知見), 感染症学雑誌, 78(6), 459-469.

Jamaluddin T. Z. M. T., Kuwahara A.K., Hisata K., et al. (2008): Extreme genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strains disseminated among Healthy Japanese Children. J. Clin. Microbiol., 46(11), 3778-3783.

Louie L., Matsumura S. O., Choi E., et al. (2000): Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus, J. Clin. Microbiol., 38(6),

2170-2173.

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 1 件)

中畑千夏子, 奥山茜, 原田知恵, 下沢英里子, 村瀬麻亜沙, 鍵谷ゆうこ, 羽毛田真衣, 丸山理沙, 坂田憲昭 (2015): 大学生におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の分布とその特徴. 長野県看護大学紀要, 17:51-61.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中畑 千夏子 (NAKAHATA CHIKAKO)

長野県看護大学・看護学部・助教

研究者番号: 60438174