

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850194

研究課題名(和文) 犬におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の起源解明

研究課題名(英文) The research for ancestor of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs in Japan

研究代表者

石原 加奈子 (Ishihara, Kanako)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60515849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) の出現は、獣医療及び公衆衛生上、重要である。本研究では、日本の犬から分離された43株のMRSPの遺伝子解析を行い、海外のMRSPと比較した。

欧州を初め、世界各地で分離されたSCCmec II-IIIのMRSPは、すべてST71に分類されると報告されていたが、日本のSCCmec II-IIIのMRSPは、ST71に関連するST169および新たに認められたST354に分類された。2遺伝子の型が異なるST71およびST169は、共通の祖先から派生し、さらにST354は、ST169から派生したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The recent appearance of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) is a concern for both veterinary and human healthcare. The current study compared the molecular characteristics of 43 MRSP isolates from dogs in Japan with those of MRSP from previous reports using multilocus sequence typing, SCCmec typing, and detection of antimicrobial resistance genes.

Three related clonal lineages, ST71, ST169, and the newly registered ST354, were observed amongst SCCmec II-III isolates from Japan, despite MRSP SCCmec II-III isolates being thought to belong to a single clonal lineage. The majority of SCCmec II-III isolates belonging to ST169 (9/11) and ST354 (3/3), but not ST71 (0/11), harboured tetM. Since the allele sequences of two loci (ack and sar) differ between ST71 and ST169 isolates, ST71 and ST169 clones have been derived from a common ancestral clone. ST354 is likely a variant clone of ST169.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：メチシリン耐性 ブドウ球菌 犬

1. 研究開始当初の背景

抗菌剤を細菌性疾患の治療に使用するようになり、細菌性疾患による死亡者が減少した。しかし同時に、薬剤耐性菌が出現し、再び、細菌性感染症の治療が困難になる症例が増加している。抗菌剤の使用以前から、「薬剤耐性遺伝子」は、人や動物の常在細菌および自然環境菌が保有しており、その耐性遺伝子を病原性細菌が獲得し、医療・獣医療上の問題となっている。

院内感染の原因となるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と同じメチシリン耐性遺伝子 *mecA* を持つ *Staphylococcus intermedius* が 1999 年に初めて、報告された。これは現在の *S. pseudintermedius* と考えられ、これが、メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) の初めての報告である。*S. pseudintermedius* は、犬の膿皮症の原因菌である。MRSP が増加し、抗菌剤により症状が改善しない犬の膿皮症の症例の増加や、MRSP の術後感染も報告されている。

通常、人は *S. pseudintermedius* を保菌しないが、犬との接触者に感染することがあり、人獣共通感染症の原因菌の 1 つである。犬と接触歴のある人の MRSP 感染症例が報告されている。

mecA は、染色体上の Staphylococcal cassette chromosome (SCC) とよばれる可動性遺伝子カセット上に保有されており、この SCC*mec* の遺伝子座は、分子疫学マーカーとして利用されている。

現在では、世界各国で MRSP が分離され、欧米を中心とした MRSP の分子疫学解析により、欧州の MRSP は、2 種類の SCC*mec* が組み合った SCC*mec* II-III 型を持つ ST71 クロノンが主体であり、北米の MRSP は SCC*mec* V 型の ST68 クロノンが主体であることが報告されている。

2. 研究の目的

日本の犬から分離した MRSP は、SCC*mec* II-III 型 (29 株) 又は V 型 (12 株) に分類できたが、SCC*mec* II-III 型の MRSP は、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により、2 つのクラスターに大別され、その相同性は 50% と低く、単一クロノンではなく複数の起源があると推察された。日本の MRSP が欧州クロノンのみに起源をもつとは考えにくいことから、日本の MRSP の起源を明らかにするため、欧州と日本の MRSP の遺伝子型をより詳しく比較することとした。また、SCC*mec* の起源はコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) と考えられており、犬由来メチシリン耐性コアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS) と MRSP の SCC*mec* 構造を比較することにより、日本の MRSP の起源と MRCNS の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **Multilocus sequence typing (MLST)**; MLST は菌種ごとにデータベース化された複数の遺伝子座の塩基配列を比較する手法で、国際的に株間の遺伝子型の比較が可能である。表 1 に示す 7 遺伝子座を比較する識別能の高い *S. pseudintermedius* の MLST が、2013 年初めに確立され、ウェブ上に公開された (<https://pubmlst.org/spseudintermedius/>)。2018 年 5 月には、解析する 7 遺伝子座の allele type について、それぞれ 20 から 85 type が登録されている。この 7 遺伝子座の配列の組み合わせにより、sequence type (ST) を決定した。

表 1 MLST の対象遺伝子座

Locus	長さ(bp)	Allele
<i>tuf</i>	417	20
<i>cpn60</i>	431	85
<i>pta</i>	492	66
<i>purA</i>	405	66
<i>fdh</i>	259	24
<i>ack</i>	564	38
<i>sar</i>	376	32

(2) **Spa typing**; *Spa* typing は、Protein A 遺伝子 (*spa*) の繰り返し配列による型別である。黄色ブドウ球菌は、MLST により、3,112 型の ST が登録されているのに対し (<http://saureus.mlst.net/>)、*spa* typing により、17,897 型に区別され、圧倒的に識別能が高い (<https://www.spaserver.ridom.de/>)。また、MLST は 7 遺伝子座の配列を決定する必要があるが、*spa* typing は 1 遺伝子座の配列決定で型別ができ、効率的である。Moodley らにより開発された *S. pseudintermedius* の *spa* typing も高い識別能が期待できるため、本研究でも MRSP の型別として活用した。

(3) **耐性遺伝子の比較**; MRSP は、多剤耐性菌であり、複数の耐性遺伝子を持つ。同系統の薬剤に対する耐性でも、関与する耐性遺伝子は多様である。そこで、日本の MRSP および MRCNS がいずれの耐性遺伝子を保有するかを確認するため、欧州や北米で分離された MRSP が保有する薬剤耐性遺伝子を中心に、*blaZ*、*aac6' -1e-aph2' -1a*、*aph3' -III*、*ant6' -1a*、*sat4*、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*dfrG*、*InuA*、*tetK*、*tetL*、*tetM*、*tetQ*、*tetS*、*tetW* および *cat_{pc221}* を PCR で検出し、比較した。同一耐性遺伝子でも、多様性が知られる場合には、塩基配列を決定し、比較した。

(4) **MRCNS の SCC*mec* の配列解析**; SCC*mec* は、表 2 に示す通り、*ccr* gene complex の type

および *mec* gene complex の class により型別できる。犬由来 MRSP について、この型別を行った後、*ccr* gene complex および *mec* gene complex を挟んだ領域の配列を決定し、MRSP の SCC*mec* と比較した。

表 2 SCC*mec* 型

SCC <i>mec</i> 型	<i>ccr</i> gene complex	<i>mec</i> gene complex
I	1	B
II	2	A
III	3	A
IV	2	B
V	5	C2

(5) *dru* type の決定; SCC*mec* 上に存在し、多様性のある *mec*-associated direct repeat unit (*dru*) reageon の繰り返し配列を決定した。その配列から、*dru* type のデータベースに基づき、その type を決定した (<http://dru-typing.org/site/>)。

4. 研究成果

(1) Multilocus sequence typing

SCC*mec* II-III の MRSP は、MLST により ST71, ST169 および ST354 に分類された。SCC*mec* V の MRSP は ST121, ST276, ST323 および ST324 に分類された(表 3)。ST275, ST276, ST323, ST324, ST325 および ST354 は、本研究で新たに確認され、新たな ST として、データベースに登録された。

S. pseudintermedius の MLST では、7 遺伝子座の配列を決定するが、ST71 および ST169 では、2 遺伝子座に違いが認められたため、ST71 および ST169 は共通の祖先からそれぞれ派生したか(図 1-a)、いずれか一方から、別のクローンを経由し、他方のクローンが派生したと考えられた(図 1-b)。ST71 および ST169 の共通祖先に該当するクローンや、ST71 から ST169 またはその逆向きに派生する過程に經由するクローンは本研究では認められなかった。

また、ST169 および ST354 には 1 遺伝子座に違いが認められ、ST354 は、ST169 から派生したと考えられた(図 1-a, b)。

表 3 日本の犬由来 MRSP の遺伝子型

SCC <i>mec</i>	MLST	株数
II-III	ST71	11
	ST169	11
	ST354	3
III	ST275	3
IV	ST325	1
V	ST121	1
	ST276	9
	ST323	2
	ST324	1
	ST275	1
型別不明	ST275	1

(2) *Spa* typing

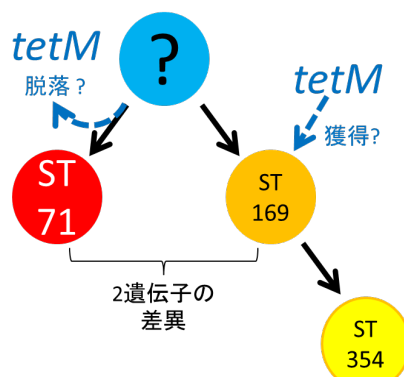
MRSP の *spa* type は、t02, t06, t58, t60 および t62 に分類されたが、43 株中、27 株は *spa* 遺伝子が増幅できず、型別ができなかった。特に、SCC*mec* II-III 型の ST169 および ST354, SCC*mec* III 型の ST275, SCC*mec* IV 型の ST325 ならびに SCC*mec* V 型の ST276 の *spa* type は決定できない株が多かった。

(3) 耐性遺伝子

欧州で分離された ST71 の MRSP や、日本の ST71 の MRSP の 11 株がテトラサイクリン耐性遺伝子 *tetM* を保有しなかったのに対し、ST169 の 9 株および ST354 の 3 株は *tetM* を保有した。*tetM* は、その配列の相同性からいくつかのグループに分けられることから、塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。その結果、図 2 に示すように、MRSP が保有する *tetM* もいくつかのグループに分類できたが、ST169 の 9 株および ST354 の 3 株が保有する *tetM* の塩基配列は完全に一致した。

これらの解析から、ST169 は、*tetM* を保有した後、日本の犬の間で伝播したと考えられた(図 1)。

a) 共通祖先からの派生



b)

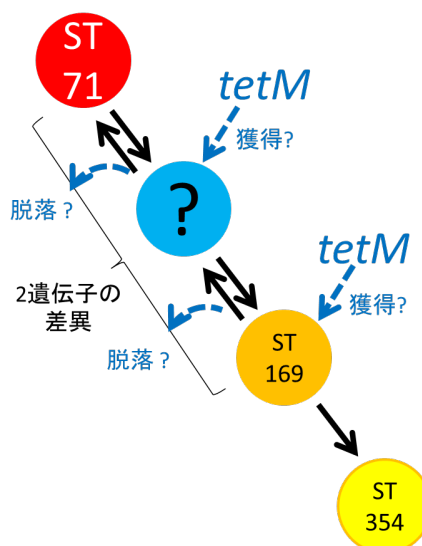


図 1 MRSP クローンの派生

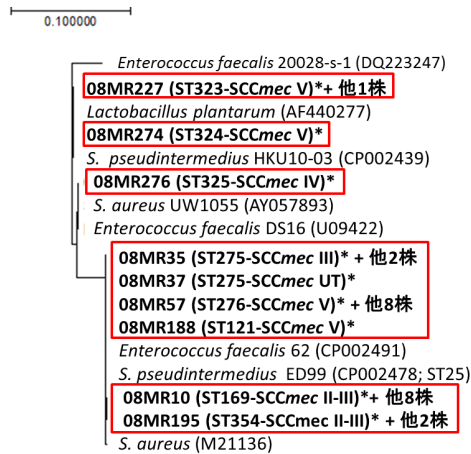


図2 MRSP の保有する *tetM* 遺伝子の系統樹解析

*日本の犬由来 MRSP (赤枠内)
(Sequence type-SCCmec type)

(4) MRCNS の SCCmec の配列解析

日本の犬から分離された MRCNS 24 株のうち、MRSP の SCCmec II-III と同様に type 3 *ccr* gene complex および class A *mec* gene complex を保有する 4 株の SCCmec 構造を解析した。

その結果、*S. sciuri* 2 株で 30.8 kbp および 32.7 kbp、*S. cohnii* subsp. *urealyticum* で 31.2 kbp、*S. capitis* subsp. *ureolyticus* で 30.1 kbp の SCCmec の塩基配列が決定できた。*S. capitis* subsp. *ureolyticus* の SCCmec は、MRSP の SCCmec II-III にプラスミド pUB110 (6 kbp) が挿入された構造であった。また、*S. sciuri* および *S. cohnii* subsp. *urealyticum* の 2 株の SCCmec は、MRSP の SCCmec II-III にカドミウム耐性オペロン (6.4 kbp) が挿入された構造であった。

MRSP および MRCNS に同一の構造の SCCmec は認められなかったが、構造は類似していた。

(5) *dru* type の決定

日本の犬から分離された SCCmec II-III 型 MRSP の多くの *dru* type は dt9a に分類された。また、MRSP と最も類似した SCCmec を保有していた MRCNS は dt9a から繰り返し配列が一つ欠損した dt8b に分類された。*dru* typing は短い配列の決定で型別出来るため、SCCmec の比較に有用な型別法と考えられた。

(6) まとめ

以上の結果から、日本の SCCmec II-III 型 MRSP は、欧州を中心に分布する ST71 と同じ MRSP クロンのほかに、関連する ST169 および ST354 に分けられた。これまで、SCCmec II-III 型をもつ MRSP は、単一クロンと考えられていたが、ST71 と ST169 には 7 遺伝子座のうち 2 遺伝子座の配列に違いがあり、い

ずれか一方から他方が直接、派生したとは考えられなかった。

欧州や日本の ST71 の MRSP は、テトラサイクリン耐性遺伝子 *tetM* を保有しないが、ST169 の 9 株および ST354 の 3 株は配列が同一の *tetM* を保有し、ST169 は、*tetM* を保有した後、日本の犬の間で伝播したと考えられた。

犬由来 MRCNS のもつ SCCmec は、MRSP とは完全には一致しなかったものの、類似性が高く、MRSP の出現に参与したと考えられた。

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)

1. Ishihara K., Koizumi A, Saito M., Muramatsu Y., and Tamura Y. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST169 and novel ST354 SCCmec II-III isolates related to the worldwide ST71 clone. *Epidemiol Infect* 2016. 144, 434-442.
doi: 10.1017/S0950268815001545

[学会発表](計 1 件)

1. 石原加奈子、小泉明穂、田村 豊、新たに認められたメチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の sequence type、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌市、2014 年 9 月

[その他]

ホームページ等

http://rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20150618_5.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 加奈子 (ISHIHARA, Kanako)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 60515849

(4) 研究協力者

田村 豊 (TAMURA, Yutaka)
酪農学園大学・動物薬教育研究センター・教授

村松 康和 (MURAMATSU, Yasukazu)
酪農学園大学・獣医学群・教授