

令和元年6月10日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08358

研究課題名(和文) 院内蔓延状況から急務となる市中感染型MRSAに対する効果的なリスク評価と対策

研究課題名(英文) Effective risk assessments and measures for community-acquired MRSA, are urgently necessary from the spread situation in the hospital

研究代表者

塩田 澄子 (Shiota, Sumiko)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：00368698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：2011年～2018年を3期に分け、MRSAの臨床分離株の解析を行った。1期で84%を占めた院内感染型MRSA(HA-MRSA)の分離率が第2期では12%になり、MRSAの多くは市中感染型MRSA(CA-MRSA)で変わった。CA-MRSAはHA-MRSAより低年齢層で分離され、バイオフィーム形成能がHA-MRSAに比して極めて高かった。バイオフィームによりCA-MRSAが院内に拡散し定着したと思われる。強毒素を産生するCA-MRSAの分離株が増加しており、対策が急務である。スクリーニングを行い、有用なMRSAのバイオフィーム形成阻害物質を見出し、作用機序や臨床応用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2011年～18年の間にMRSAの主流はHA-MRSAからCA-MRSAに置き換わった。CA-MRSAはバイオフィーム形成能が極めて高く、院内に拡散し定着した。CA-MRSAは低年齢層から分離され、1期では皮膚感染症に関わる毒素であるedn, eta遺伝子を同時に保有する株が小児の皮膚科領域で複数株検出たのに加え、PVLを産生株も複数個見出された。特に2期ではpvlとacme遺伝子を同時に保有する強毒株のUSA300株が今回の調査では初めて検出された。新たなリスクファクターを有するCA-MRSAが小児科・皮膚科で拡大することが懸念され、CA-MRSA有効な院内感染対策の構築が求められる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of MRSA clinically isolated in a cooperative hospital was conducted from year of 2011(Phase I), from January 2015 to March 2016 (Phase II) and year of 2018 (Phase III).

The prevailing type of MRSA in the hospital is replaced hospital-acquired (HA-MRSA) with community-acquired (CA-MRSA) from 2011 to 2018. CA-MRSA was isolated from lower age patients than HA-MRSA, and the biofilm formation ability was extremely high compared to HA-MRSA. Although the number of HA-MRSA isolates has been reduced by the conventional measures against nosocomial infections, instead CA-MRSA has been brought in from the outpatients. CA-MRSA is considered to be spread and colonized in the hospital because of the high ability to form a biofilm. The number of isolates of CA-MRSA producing strong toxins is increasing. We screened and found effective inhibitors of biofilm formation of MRSA, and examined its mechanism of action and clinical application.

研究分野：病原微生物学

キーワード：MRSA 院内感染 市中感染型MRSA バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MRSA は環境での生存性が高く、接触感染で容易に伝播し、カテーテル関連血流感染症 (CRBSI) や感染性心内膜炎 (IE) 等難治性疾患を惹起する。近年では市中においても MRSA (市中感染型 MRSA : CA-MRSA) が分離される。日本では海外の CA-MRSA が有する強毒の Panton-Valentine Leukocidin (PVL) を持たない CA-MRSA が、伝染性膿痂疹 (とびひ) 患者から多く分離されている。このような CA-MRSA の出現に伴い、院内で見出される MRSA を院内感染型 MRSA (Hospital-acquired MRSA : HA-MRSA) と区別して呼ぶようになった。

連携病院の検査部が保管する MRSA について、SCC_{mec} 型別を行ったところ、2011 年の時点では、II 型 (HA-MRSA) が最も多かったが、IV 型 (CA-MRSA) も 30% 検出され、予想以上に CA-MRSA が院内に蔓延していることが分かった。院内感染対策の充実から従来の方で HA-MRSA の排除がうまく行われている一方で、病原性の高い CA-MRSA は排除しきれず院内への定着が進んでいることが示唆される。このことから CA-MRSA の蔓延状況とリスク評価を行い、効果的な対策が求められる。

2. 研究の目的

MRSA を一種類の菌と考えるのではなく、HA-MRSA と CA-MRSA に分け、リスクの高い CA-MRSA に特化した方策を確立することが急務と考えた。そこで MRSA の型別を行い、型ごとにリスク遺伝子の保有状況からリスクファクターを見出すこととした。また長期にわたり、院内に継続的に定着する MRSA のどのような因子が病院内への定着と蔓延に関わっているのかを明らかにするために精査した。その上で、院内からリスクの高い CA-MRSA を排除する方法を探ることとした。

3. 研究の方法

1) 対象

2011 年 5 月から 2012 年 11 月を第 1 期、2015 年 1 月から 2016 年 1 月を第 2 期、2018 年を第 3 期年とし、この間に津山中央病院で臨床分離された MRSA を用いた。

2) CA-MRSA の同定

MRSA について、POT 法にて POT 型と SCC_{mec} タイプを決定した。POT 型で I、II、III 型と判定されたものを HA-MRSA とし、SCC_{mec} IV 及び V 型と判定されたものを CA-MRSA とした。院内での存在比の比較や経年変化を調べた。

3) 定着因子の解析と院内に蔓延するため必要な因子の特定

MRSA の定着因子を解析し、比較する。CA-MRSA は HA-MRSA より高いバイオフィーム形成能を有しているという結果を得ているが、検体数を増やして同じ傾向が得られるかどうか調べる。高バイオフィーム形成能をもつ CA-MRSA の特徴として ACME 遺伝子を保有しているという報告がある。日本での報告は少ないが、ACME 遺伝子の保有状況について調べる。

4) 遺伝子保有状況の調査

病原性に関連する遺伝子 (*edn* : EDIN, *eta*・*etb* : ET, *hla*・*hlb*・*hlg*・*hld* : ヘモリジン, *pvl* : PVL, *tst* : TSST-1, *arcA*・*opp3* : ACME) を PCR 法で検出した。マクロライド系抗菌薬耐性遺伝子 (*ermA*, *ermC*) は、*ermA* を保有する N315 を陽性コントロールとして PCR 法で検出した。

4. 研究成果

1) 第 1 期～第 3 期までの HA-MRSA と CA-MRSA の分離率の比較

POT 法を用いて SCC_{mec} タイプを決定し、分離した時期ごとに HA-MRSA と CA-MRSA の分離率を比較した。I 期では HA-MRSA の分離率が 63%、CA-MRSA が 37%、II 期では HA-MRSA が 33%、CA-MRSA が 58% であり、主流の MRSA が CA-MRSA に置き変わっていた。第 III 期は CA-MRSA が 84% と、分離される MRSA のほとんどが CA-MRSA になっていることが分かった。

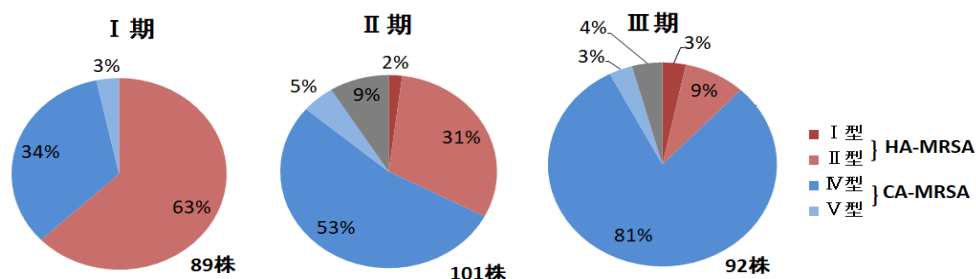


図 MRSA の SCC_{mec} 型ごとの分離率

2) 第1期及び2期分離株における HA-MRSA と CA-MRSA のバイオフィルム形成能の比較

いずれに期間においても HA-MRSA と比較して CA-MRSA は有意にバイオフィルム形成能が高かった($p < 0.001$)。このことから、CA-MRSA の分離率の高さは院内にバイオフィルムを形成して存在している可能性が示唆された。

表 第1期及び2期のバイオフィルム形成能の比較

| | 第1期 | 第2期 |
|---------|-----------|-----------|
| HA-MRSA | 28.0±14.9 | 29.9±15.6 |
| CA-MRSA | 90.0±31.6 | 71.1±25.2 |
| p-value | <0.001 | <0.001 |

平均値±標準偏差で示した .p 値は Welch's t-test により算出した。第1期の HA-MRSA: n=56, CA-MRSA: n=33、第2期の HA-MRSA: n=31, CA-MRSA: n=59

3) 第1期及び2期分離株における同一 POT 型が分離された種類の比較

各期間で、複数の患者から同一 POT 型の MRSA が分離された場合の POT 型の種類の数を調べた。HA-MRSA の場合、第1期は7種類であるが、第2期になると4種類に減少していた。一方、CA-MRSA の場合、第1期では3種類であるのに対し、第2期では8種類に増加していた。新規 POT 型を持つ CA-MRSA が院内に持ち込まれ、広がったことが示唆された。

表 同一 POT 型が複数分離された場合の POT 型の種類

| | 第1期 | 第2期 |
|---------|-----|-----|
| HA-MRSA | 7 | 5 |
| CA-MRSA | 3 | 9 |

4) 病原因子のリスクを持つ CA-MRSA の増加

臨床分離株の病原遺伝子の保有状況を調べたところ、第2期から3期にかけて皮膚感染症関連遺伝子 *eta* と *edn* を同時に保有する CA-MRSA が見出された。第2期では両遺伝子を持つ3株が同一 POT 型であったことから院内感染が疑われた。うち2株は小児の皮膚感染症に関連のある株であった。特にIII期では *pvl* と *acme* 遺伝子を同時に保有する強毒株の USA300 株が今回の調査では初めて検出された。新たなリスクファクターを持つ CA-MRSA が小児科・皮膚科領域で拡大していることが懸念された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) Hagiya H, Haruki Y, Uchida T, Wada T, Shiota S, Ishida T, Ogawa H, Murase T, Otsuka F. Emergence of Daptomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* during Treatment. Intern Med.;55(1):73-78 (2016)
- 2) 和田朋子, 山田陽一, 近藤祥代, 杉山哲大, 塩田澄子. 臨床現場における市中感染型 MRSA の増加とバイオフィルム形成能の関連. 就実大学薬学雑誌第4巻 p16-22 (2017)
- 3) 田平明啓, 石田里和, 塩田澄子, 山田陽一. *Legionella pneumophila* の新規多剤排出ポンプのクローニングと解析 Gene cloning and characterization of a novel multidrug pump in *Legionella pneumophila*. 就実大学薬学雑誌 Vol.4 p49-53 (2017)
- 4) Hisatsune J, Hagiya H, Shiota S, Sugai M. Complete Genome Sequence of Systemically Disseminated Sequence Type 8 Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type IVI Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Genome Announc.:5(35) (2017)
- 5) 山田陽一, 阿山未来, 小林美穂, 和田朋子, 工藤季之, 杉山 哲大, 塩田 澄子. MRSA の病原因子遺伝子保有状況調査から見出されたリスクファクターをもつ CA-MRSA の性状解析. 就実大学薬学雑誌. 第6巻 p50-54 (2019)

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 和田朋子, 山田陽一, 近藤祥代, 杉山哲大, 塩田澄子. 津山中央病院で臨床分離される市中感染型 MRSA の割合とバイオフィルム形成能. 第26回日本医療薬学会. 2016年
- 2) 山田陽一, 塩田澄子. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌の抗菌薬非存在下における減少と消滅. 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会.
- 3) 和田朋子, 山田陽一, 近藤祥代, 杉山哲大, 塩田澄子. POT 法による臨床分離された MRSA の解析と院内感染対策への応用. 第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会. 2016年

- 4) 塩田澄子, 山田陽一, 院内における市中感染型 MRSA の分離率の変遷とバイオフィルム形成能の関連性. 第 64 回日本化学療法学会西日本支部総会. 2016 年
- 5) 阿山未来, 山田陽一, 和田朋子, 杉山哲大, 塩田澄子, 津山中央病院から臨床分離された MRSA の病原因子と性状解析. 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会, (2017) 南菌淳, 山田陽一, 坂本早加, 塩田澄子, 松由来の天然化合物を用いた口腔レンサ球菌におけるバイオフィルム阻害効果. 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会, 2017 年
- 7) 小林美穂, 山田陽一, 阿山未来, 和田朋子, 杉山哲大, 塩田澄子, 津山中央病院から臨床分離された市中感染型 MRSA の性状解析. 第 30 回微生物シンポジウム, 2018 年
- 8) 中村美悠, 山田陽一, 坂本早加, 南菌淳, 塩田澄子, 松由来の天然化合物を用いたグラム陽性菌バイオフィルム形成阻害効果. 第 30 回微生物シンポジウム 2018 年
- 9) 中村美悠, 山田陽一, 南菌淳, 工藤季之, 塩田澄子, Rosin 及びアピエチン酸類化合物を用いたブドウ球菌と腸球菌におけるバイオフィルム形成阻害効果と作用機序の検討. 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2018 年

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 塩田澄子:「スタンダード薬学シリーズ II6 医療薬学 IV.薬理・病態・薬物治療(4)」日本薬学会編(東京化学同人)2017 年 呼吸器感染症 p36-45, 薬剤耐性菌・全身性細菌感染症 p71-80, 抗菌薬の化学構造 p263-266.
- 2) 塩田澄子:「化学療法学 - 病原微生物・がんと戦う改定第 2 版」南江堂 2018 年 第 1 章 微生物感染症 A 微生物学総論 p1~6, B 微生物学各論 p7~31, C 微生物感染症 p38~57
- 3) 塩田澄子:「シンプル微生物学改定第 6 版」南江堂 2018 年 第 1 章 8. 化学療法と細菌感染症の治療 p68~83 (他 2 名と共同執筆), Advance 腸管出血性大腸菌 (EHEC) p 142, かぜ症候群と抗菌薬の予防投与 p325

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

特許、2017-070776

名称:発明者:フェカリス菌由来バイオフィルム形成抑制組成物、医療用バイオフィルム形成抑制剤およびフェカリス菌由来バイオフィルム形成抑制方法

権利者:塩田澄子、山田陽一、川島真一、彌永美樹、北川絵里

種類:特許

番号:2017-070776

出願年:2017

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:山田陽一(就実大学・薬学部・助教)

ローマ字氏名: Youichi Yamada

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。