

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10054

研究課題名（和文）新型エンテロトキシン・病原因子を保有する黄色ブドウ球菌・MRSAの分子疫学

研究課題名（英文）Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus*, MRSA having novel enterotoxins and virulence factors

研究代表者

アウン メイジソウ (Aung, Meiji Soe)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10749584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：新型エンテロトキシン（SE）（様）毒素遺伝子について、黄色ブドウ球菌および近縁菌種 *S. argenteus* における分布状況と分子疫学的特徴を解析した。selw、selxは調べられた黄色ブドウ球菌の8割以上に検出され、また遺伝子学的多様性が認められた。sey、selzは黄色ブドウ球菌での分布は低率で、sel26、sel27は検出されなかった。*S. argenteus*のST2250に属する株はすべてseyを持ち、半分以上の株がselz、sel26、sel27を保有していた。新型SE（様）遺伝子の分布は、これらの菌種の遺伝子学的系統（ST）により異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄色ブドウ球菌は、市中での食中毒や病院感染の主要な原因菌である。本菌種の病原性は、本菌が持つ毒素、病原因子に起因すると考えられており、すでに腸管毒（エンテロトキシン、SE）、白血球障害毒素、組織付着因子などが同定されている。SE遺伝子にはsea-see、seg-seuなど多数の種類が知られるが、2011年以降、selw、selx、sey、selz、sel26、sel27などの新型SE（様）遺伝子が同定された。本研究ではそれらSE（様）遺伝子の黄色ブドウ球菌およびその近縁種における分布状況を明らかにするとともに、菌の遺伝子学的系統によって分布するSE（様）遺伝子の種類に違いがあることを示した。

研究成果の概要（英文）：Prevalence of novel staphylococcal enterotoxin (SE)(-like) toxin genes in *Staphylococcus aureus* and its relative species *S. argenteus*, and their molecular epidemiological characteristics were analyzed. selw and selx were detected in more than 80% of *S. aureus* isolates examined, and showed diversity in their nucleotide sequences. *S. aureus* harbored sey and selz at low rate, without having sel26 and sel27. The sey gene was detected in all the ST2250 *S. argenteus* isolates, and more than half of this lineage harbored selz, sel26, and sel27. Prevalence of novel SE (-like) genes was revealed to be different depending on lineages of *S. aureus* and *S. argenteus*.

研究分野：衛生学 微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌 MRSA *S. argenteus* 新型エンテロトキシン 病原因子 分子疫学 ST

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、健康人の約 3 割が皮膚・鼻腔に保有すると同時に、市中・病院感染の原因として世界中で普遍的に見られ、皮膚・軟部組織感染症、深部膿瘍、毒素性ショック症候群、食中毒など多様な疾患を引き起こすことが知られる。中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は最も古くから知られる病院感染起因菌・薬剤耐性菌のひとつであるが、発見から 60 年を経過した現在においても公衆衛生上の懸念となっている。近年特に問題となっているのは、市中において健常人に分布する市中感染型 MRSA (community-associated MRSA: CA-MRSA) や家畜に由来する家畜関連 MRSA の世界的な拡がりである。

黄色ブドウ球菌の病原性は、本菌が持つ毒素、病原因子に起因すると考えられている。この中にはエンテロトキシン (腸管毒)、表皮剥離毒素、ヘモリジン、白血球障害毒素 (Panton-Valentine leucocidin (PVL) を含む) TSST-1 (毒素性ショック症候群毒素) 殆どすべての菌株が持つコアグラーゼ、プロテイン A などのほか、様々な組織付着因子が含まれる。黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) は食中毒の直接的原因物質として催吐活性を有するほか、スーパー抗原様活性による全身症状にも関連すると考えられている。SE のうち SEA~SEE は古典的 SE として知られてきたが、2000 年以降遺伝子学的アプローチにより SE および SE 様蛋白が多数発見され報告された。特にエンテロトキシン活性を持つ SEY、SE 様蛋白 SEIW、SEIX は 2011 年以降に見つかったものであり、最近では SEIZ、SEI26、SEI27 が報告されている。血漿凝固に関与する病原因子フォン・ビルブランド因子結合蛋白 (von Willebrand factor-binding protein; vWbp) は 2002 年に報告された新規病原因子であり、その生理学的作用についての研究はあるものの、疫学的分布状況と病原的意義については調べられていない。一方、組織付着因子はおもに細菌表面に存在する蛋白で、菌体が生体内の組織に付着し、局所での増殖に寄与する。コラーゲン、エラスチン、ファイブロネクチンなど多種類の生体内蛋白への結合に関与する蛋白が見つかり、多くの菌株が持つ主要付着因子と、一部の菌株のみが持つ副次的付着因子がある。我々は最近の研究で、主要付着因子であるエラスチン結合蛋白 (EbpS) の内部に 60 アミノ酸の欠失がある変異蛋白 (EbpS-v) を同定し、それを有する菌株が日本とアジアの数か国に分布することを報告した。なお本研究期間中、従来黄色ブドウ球菌に分類されていたスタフィロコッカス・アルジェンテウス (*Staphylococcus argenteus*) の検出が質量分析により可能となった。*S. argenteus* は 2015 年に黄色ブドウ球菌から独立した新たな菌種であり、日本においては食中毒事例から検出されているが、臨床分離株としての同定報告はほとんどなく、本菌種における毒素遺伝子の分布と病原性には興味もたれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新型エンテロトキシン様毒素 (SEIW, SEIX, SEY, SEIZ, SEI26, SEI27) 新規病原因子 (フォンビルブランド因子結合蛋白: vWbp) 新規変異型付着因子 (エラスチン結合蛋白: EbpS-v) の、黄色ブドウ球菌および *S. argenteus* 臨床分離株における疫学的分布状況を明らかにし、それらの病態・疾患との関連を探ることである。またそれら毒素・蛋白遺伝子の遺伝子学的多様性および保有する菌株の分子疫学的特徴を明らかにし、既存の遺伝子データベースにある世界各地の菌株のデータとあわせ、それらの多様性を解析する。本研究は、世界中に広がる市中・病院感染起因菌 (MRSA およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA)) における新規エンテロトキシン・病原因子の分布の状況を明らかにするものであり、感染症対策の基礎資料となると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、北海道各地の医療機関で 2013-2014 年に分離された市中感染型 MRSA 624 株、2019 年 3-6 月に分離された *S. argenteus* 24 株を主な対象とした。そのほかに 2011-2014 年に札幌医科大学附属病院で分離された病院感染型 MRSA 1041 株、2017 年 8 月からの 2 年間に北海道内の医療機関で血液検体から分離された MRSA 277 株、2017 年 1 月からの 2 年間、ミャンマー・ヤンゴン市内の三次医療総合病院から分離された黄色ブドウ球菌 239 株、2013-2015 年に北海道内の健康な小児の口腔から分離された黄色ブドウ球菌 143 株についても、一部の SE (様) 遺伝子および病原因子遺伝子について分布状況を解析した。

全菌株に対し、メチシリン耐性規定遺伝子 (*mecA*) 白血球障害毒素 PVL 遺伝子、黄色ブドウ球菌特異的遺伝子 (*nuc*) 等を多重 PCR 法で検出した。*mecA* 陽性菌株について、*mecA* を含む遺伝子複合体 *SCCmec* の型別を PCR により行う。コアグラーゼ遺伝子型 (*coa*-type) を多重 PCR または *coa* 遺伝子の D1 領域配列の解析により行なった。代表的な菌株について、多座位配列型別 (MLST) による遺伝子型 (ST) 蛋白 A 遺伝子型 (*spa*-type) を決定した。

新型 SE 様毒素 (SEIW, SEIX, SEY, SEIZ, SEI26, SEI27) 新規病原因子 (vWbp, EbpS-v) 遺伝子を既報及び本研究でデザインしたプライマーを用いて検出した。それらの遺伝子が陽性的場合はそれらの遺伝子 (ORF 全体) の配列を PCR 直接決定法 (サンガー法) により決定した。さらに GenBank で公開されているそれら遺伝子とともに、MEGA ver.7 ソフトを用いて系統解析を行い、系統樹の構築を行った。また ClustalW プログラムを用い、株間の配列の一致率を解析す

るとともに、塩基、アミノ酸配列の多重整列を行い、異なる部位を特定した。

4. 研究成果

(1) 市中感染型 MRSA における新型 SE (様) 毒素遺伝子の分布と遺伝子学的多様性

市中感染型 MRSA 624 株を対象とした調査では、*selw*、*selx*、*sey*、*selz* の検出率はそれぞれ 92.9%、85.6%、35.4%、5.6% であった。*sel26*、*sel27* は検出されなかった。*selw*、*selx*、*sey*、*selz* は概ねすべての種類の臨床検体から分離され、特定の材料、疾患との関連は認められなかった。*selw*、*selx* は広く多様な遺伝子型株に見られたが、特に *selw* はコアグララーゼ遺伝子型 IIa 型、SCC*mec*-II 型で 95% 以上の高い検出率を示した。*sey* はコアグララーゼ遺伝子型 Va 型、SCC*mec*-V 型で検出率が最も高かった。*selz* はコアグララーゼ遺伝子型 Ia と Va、SCC*mec*-V 型に多く検出された。*selw*、*selx*、*sey*、*selz* の遺伝子配列に基づく系統解析では、それぞれ 10、16、7、9 のサブタイプ/グループに分けられた。*sey* は最も遺伝子学的保存性が高く (一致率 > 98.8%)、*selw* および *selx* は多様性が比較的高かった (一致率 > 93%)。 *selw* では 10 グループのうち 3 つが変異のため断裂した不完全な蛋白となっていると推定され、これは ST5 株に多く見られた。また *selw* のグループ 1、2、3、4、7 はそれぞれ今回解析した ST89、ST8、ST1、ST5、ST121 の株を多く包含していた。*selx* も ST により異なる系統に分類された。*sey* では一つのサブタイプが異なる ST の株を包含していた。同様に *selz* でも同じ遺伝子群に異なる ST が見られたほか、2 つの遺伝子群には *S. argenteus* も含まれていた。

(2) 北海道における *S. argenteus* 臨床分離株に関する解析

2019 年の 4 ヶ月間に北海道内の医療施設に由来する 24 株の *S. argenteus* を同定した。これらは研究協力施設である札幌臨床検査センターにおいて分離されたものであり、同期間に分離された黄色ブドウ球菌の 0.55% に相当する。これらはいずれもメチシリン感受性 (*mecA* 陰性) であり、12 株は ST2250 (1 株は ST2250 の single locus variant) に、残りは ST1223 (6 株) と ST2198 (6 株) に型別された。ST2250 株はすべて *sey* を持ち、また半分以上の株が *selz*、*sel26*、*sel27* を保有していた。ST2198 株はすべて *selx* を有し、*selz* が 3 株に検出された。ST1223 では全株が *selw* とエンテロトキシン遺伝子クラスター (*seg-sei-sem-sen-seo*) を有していた。エラスチン結合蛋白 (EbpS) は全株が有し、*S. argenteus* 株間では 98.9% 以上の一致率を示したが、黄色ブドウ球菌との間では 78-89% と低い一致率であった。以上の結果から、新規ブドウ球菌種 *S. argenteus* では遺伝子型により新型 SE (様) 毒素遺伝子の分布が異なること、特に *sey* は ST2250 に特徴的であり、*sel26*、*sel27* も ST2250 に多いことが明らかとなった。

(3) 病院感染型 MRSA に関する解析

2011-2014 年に大学附属病院で分離された MRSA1041 株では、大部分 (908 株、87%) が SCC*mec*-IIa コアグララーゼ遺伝子型 IIa (調べられた ST は ST5 または ST5 の single locus variant である ST764) に型別され、従来から日本で多いタイプである New York/Japan クローンに相当する菌株であった。次に多かったのは SCC*mec*-IV を有する株で (101 株、9.7%)、さらに SCC*mec*-IV は 7 種のサブタイプに分けられ、IV1、IVa、IVd の順に多かった。SCC*mec*-IV1 MRSA は ST8 に型別され、日本特有とされ MRSA/J と呼ばれるクローンであった。米国で優勢な USA300 クローン (SCC*mec*-IVa、ST8) は 3 株同定され、いずれも PVL (Panton-Valentine leukocidin) 遺伝子と ACME (Arginine catabolic mobile element) 遺伝子を有していた。また SCC*mec*-IIa、ST764 の 5 株が PVL 陰性かつ ACME を保有するという新規の特徴を示した。代表的な 56 株について新型エンテロトキシン様毒素を含む病原因子遺伝子の分布を調べたところ、*selx* が 50 株 (89%)、*selw* が 43 株 (77%) に、*sey* は 10 株 (18%) に検出された。*sel26*、*sel27* はいずれの株からも検出されなかった。EbpS、vWbp は全株に見られたが、*ebpS* のバリエーション *ebpS-v* は 6 株に同定され、これらはいずれも ST121 に属していた。

(4) 血液検体由来 MRSA に関する解析

北海道内の医療機関で血液検体から分離された MRSA277 株の解析では、SCC*mec*-IIa コアグララーゼ遺伝子型 IIa-ST5/ST764/ST2398 が 62% を占め、次いで SCC*mec*-IVa (28%)、SCC*mec*-IV1 (3.6%) の順に多かった。代表的な 73 株を調べた結果、*selx*、*selw*、*ebpS*、vWbp は全株に検出され、*selz* は 19 株、*sey* は 2 株 (ST59、ST121) に同定された。*ebpS-v* は ST121 の株のみに認められた。

(5) ミャンマーにおける病院分離株の解析

ミャンマーにおいては、多数の黄色ブドウ球菌臨床分離株を対象とした分子疫学としてはこの研究が初めてとなる。ヤンゴン市内の三次医療総合病院で分離された黄色ブドウ球菌 239 株を対象に解析した。MRSA の割合は 13.8% (33 株) であり、SCC*mec*-V が最も多く (19 株)、SCC*mec*-IV (11 株) がそれに続いた。PVL 遺伝子の検出率は高く、MRSA で 66.7%、MSSA で 28.6% であった。PVL 陽性 MRSA の中では ST772-SCC*mec*-V (Bengal Bay クローン) が優勢であった。PVL 陽性メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) の中では ST88、ST121、ST2990 が多く見られた。MRSA では *selw*、*selx* がともに 26 株 (79%) に検出され、*sey* は 4 株のみに見られた。*ebpS* は調べられた全株に見られたが、ST121 株 (MSSA) はすべて *ebpS-v* を有していた。vWbp 遺伝子が検出されない MRSA、MSSA で少数認められた。

(6) 小児の口腔から分離された黄色ブドウ球菌

北海道において小児歯科検診および幼稚園において、保護者から同意の得られた 3-6 歳の小児 526 人から唾液を検体として採取し、そこから黄色ブドウ球菌 143 株を分離した。そのうち 9 株 (6.3%) が MRSA で、それらは SCC mec -IV または SCC mec -V を有していた。その他 105 株のコアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) が分離され、その中では表皮ブドウ球菌が最多 (84 株) で、その 50% がメチシリン耐性株 ($mecA$ 陽性) であった。この研究では黄色ブドウ球菌における新規 SE 様遺伝子の分布については調べていないが、 $ebpS-v$ についての解析が行われ、ST45 と ST120 に検出された。

(7) 解析のまとめ

以上の結果から、 $selw$ 、 $selx$ は様々な臨床材料に由来する黄色ブドウ球菌/MRSA 臨床分離株の 8 割以上に分布しており、特定の感染との関連は見られず、また菌株の系統 (ST) 間で遺伝子学的多様性が認められた。それに対し sey 、 $selz$ は黄色ブドウ球菌における検出率は低かったが一部の *S. argenteus* (ST2250) では高率に認められた。 $sel26$ 、 $sel27$ は *S. argenteus* の ST2250 にのみ検出された。これらの所見から、 $selw$ 、 $selx$ は多くの黄色ブドウ球菌の系統に古くから普遍的に分布していると推測された。それに対し sey 、 $selz$ 、 $sel26$ 、 $sel27$ は黄色ブドウ球菌と *S. argenteus* の一部の系統に限局的に保有されていると考えられた。 $ebpS$ はすべての黄色ブドウ球菌に分布し、 $ebpS-v$ の検出率は低いですが、ST121 の全菌株と一部のクローンが保有していた。

黄色ブドウ球菌、*S. argenteus* は菌株の系統により様々な病原因子を保有し、それらの組み合わせによる相乗作用や遺伝子学的多様性が総合されて病原性が発現することが示唆される。今回の研究では、菌の系統 (クローン/ST) により保有する SE 遺伝子やその遺伝子型が異なることが分かった。ただしそれが普遍的なものか、地域により分布する主要な菌株が異なることを反映しているかは明らかではないため、さらに広い地域や多くの種類の感染症からの菌株を解析し、病原因子の分布の実態を明らかにしていく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Shinagawa M, Takahashi S, Kobayashi N	4. 巻 25
2. 論文標題 Clonal Diversity and Genetic Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates From a Tertiary Care Hospital in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 1164-1175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2018.0468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Takahashi S, Ike M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular Epidemiological Characterization of Staphylococcus argenteus Clinical Isolates in Japan: Identification of Three Clones (ST1223, ST2198, and ST2550) and a Novel Staphylocoagulase Genotype XV	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7100389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, San T, Urushibara N, San N, Oo WM, Soe PE, Kyaw Y, Ko PM, Thu PP, Hlaing MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular Characterization of Methicillin-Susceptible and -Resistant Staphylococcus aureus Harboring Panton-Valentine Leukocidin-Encoding Bacteriophages in a Tertiary Care Hospital in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 360-367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2019.0208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirose M, Aung MS, Fukuda A, Murata Y, Saitoh M, Kobayashi N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Prevalence and genetic characteristics of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from oral cavity of healthy children in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 400-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2018.0333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Clonal diversity of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) from bloodstream infections in northern Japan: Identification of spermidine N-acetyltransferase gene (speG) in staphylococcal cassette chromosomes (SCCs) associated with type II and IV SCCmec	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Glob Antimicrob Resist	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.12.008. Epub	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Meiji Soe Aung, Thida San, 漆原範子、川口谷充代、小林宣道
2. 発表標題 Genetic characterization of virulence factor genes in <i>Syaphylococcus argenteus</i> .
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Meijisoe Aung, 漆原範子、川口谷充代、小林宣道
2. 発表標題 日本(北海道)における <i>Staphylococcus argenteus</i> の分子疫学と分子系統.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Meiji Soe Aung, 漆原範子、Thida San、川口谷充代、小林宣道
2. 発表標題 Molecular characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus argenteus</i> from food handlers in Myanmar.
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川口谷 充代 (KAWAGUCHIYA Mitsuyo) (70733062)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	小林 宣道 (KOBAYASHI Nobumichi) (80186759)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	漆原 範子 (URUSHIBARA Noriko) (80396308)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣瀬 弥奈 (HIROSE Mina)	北海道医療大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ミャンマー	ヤンゴン小児病院	国立衛生研究所	Pinlon病院