

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010年度

課題番号：20590608

研究課題名（和文）新規分子疫学的手法を用いたPVL陽性黄色ブドウ球菌・MRSAの蔓延状況の解明

研究課題名（英文）Study on prevalence of PVL-positive *Staphylococcus aureus* and MRSA with the use of novel molecular epidemiologic methods

研究代表者

小林 宣道（Kobayashi Nobumichi）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80186759

研究成果の概要（和文）：

北海道内の医療機関において外来患者に由来する多数の黄色ブドウ球菌を対象とし、メチシリン耐性菌（MRSA）の分布状況とその分子疫学的特徴を解析した。その結果、市中感染型MRSAの典型的な特徴であるPanton-Valentine Leukocidin (PVL) 遺伝子を保有するMRSA（遺伝子型ST6, ST59）、米国で優勢なUSA300クローンに特徴的な遺伝性因子ACMEを持つMRSAが数株検出され、これらのMRSAの市中における拡がり示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Prevalence and molecular epidemiologic characteristics of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were analyzed for numerous *Staphylococcus aureus* isolates derived from outpatients in hospitals in Hokkaido. As a result, several MRSA strains (genotypes ST6, ST59) which harbor the Panton-Valentine Leukocidin (PVL) gene typical to CA-MRSA, and the genetic element ACME unique to USA300 CA-MRSA clone predominating in USA, were identified, suggesting the wide distribution of these MRSA to the community.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：黄色ブドウ球菌、MRSA、PVL、遺伝子型、スタフィロコグラゼ、MLST

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は皮膚・軟部組織の化膿性疾患の代表的な原因菌であるとともに、敗血症、感染性心内膜炎、骨髄炎などの深部感染症や毒素性ショック症候群、食中毒などの毒素性疾患を起こす

ことが知られる。黄色ブドウ球菌の中で、ラクタム剤耐性をはじめとする多剤耐性を獲得したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は病院環境に高い適応能力を持ち、1960年代以降世界中に分布が拡大し、今なお最も重要な院内感染起因菌として存続し

ている。欧米では院内感染対策の普及によりその蔓延はコントロールされてきたが最近再び増加傾向が認められ、わが国でも病院感染起因菌として依然高い検出率が続いている。

MRSAのうち、病院外すなわち市中に分布するMRSA(CA-MRSA)があることは1980年代より知られていたが、1997-1999年に米国で4人の小児がCA-MRSAによる肺炎・敗血症で死亡したことが報じられて以降、CA-MRSAの重要性に対する認識が高まった。その後米国、ヨーロッパ、オーストラリア、アジアの一部などでCA-MRSAが報告され、CA-MRSA感染症はグローバル感染症として認識されるに至っている。CA-MRSAは、多くの場合菌の染色体DNAにIV型メチリン耐性領域(SCC*mec*)を有し、Panton-Valentine Leukocidin (PVL)を産生することが特徴である。PVLは白血球破壊毒素の一つであり、皮膚や粘膜の壊死にも関与し、全身症状の重篤化にも深く関わっていると考えられている。PVL遺伝子はバクテリオファージのゲノムの一部として存在し、黄色ブドウ球菌の染色体DNAに組み込まれている。

PVLは黄色ブドウ球菌の各種毒素・病原因子の中でも特に強い病原性に関わることから、一般の人間集団を含む環境中および病院内におけるPVL保有菌の分布に関して興味を持たれている。PVLはCA-MRSAに特徴的とされるが、病院由来のHA-MRSAにおいても検出の報告がある。しかしPVL遺伝子がある特定の系統の菌株にのみ存在するのか、あるいは多くの菌のクローンにすでに存在するのか、またPVL遺伝子を保有するファージが多種類の黄色ブドウ球菌のクローンに感染して分布が拡大するのかなどについてはまだ解明されていない。一方、米国で最近分布が拡大しつつあるCA-MRSA, USA300クローンは、ACME(アルギニン代謝系可動性因子)というゲノムアイランドを染色体上に持ち、その中に含まれる*arcA*などの遺伝子が、菌の増殖や定着能を高めていると考えられている。

PVLは黄色ブドウ球菌という最も普遍的に知られる常在菌かつ病原菌に存在しうる、医学的に最も危険性の高い毒素であり、CA-MRSAとの関連が判明した現在、その分布状況を疫学的にモニターし、またその分布拡大の状況を把握することは世界的にも急務である。またわが国においても限られた研究しか実施されておらず、正確な蔓延状況を解析することは危急の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一にわが国の市中感染症におけるPVL陽性黄色ブドウ球菌(MRSAを含む)の蔓延状況を明らかにすることであ

る。第二は、黄色ブドウ球菌の特定の遺伝子に基づいて、普遍的に利用・比較解析が可能な分子疫学的型別法、特にコアグラーゼ遺伝子の多様性に基づいた型別法を確立することである。第三に、確立された型別法と既存の型別法(MLST等)を用いて、研究対象となるPVL陽性、陰性黄色ブドウ球菌を型別し、それらの分子疫学的特長を明らかにすることである。さらに病原因子、薬剤耐性遺伝子の分布、各種薬剤感受性を調べ、PVL陽性黄色ブドウ球菌の特徴と臨床的な重要性を明らかにする。また興味深い遺伝学的特徴が見つかった場合、その点について更なる分子遺伝学的解析を進め、その意義を探求する。これらの研究によりPVL陽性黄色ブドウ球菌の分布、遺伝学的起源、多様性等を探究し、本菌の早期発見、感染予防に資することを目標とする。

3. 研究の方法

2009年1-2月および6-7月に、札幌臨床検査センターで、北海道各地の医療機関における外来患者の臨床材料から分離同定された黄色ブドウ球菌1015株を対象とした。これらの菌株はすべて異なる患者に由来し、同一患者からの分離株1株のみを用いた。全菌株に対し、多重PCRによる*mecA*, ACME-*arcA*, PVL遺伝子等の検出、コアグラーゼ遺伝子型の同定を行なった。MRSA全分離株に対してはSCC*mec*型別を行い、PVL遺伝子陽性/陰性MRSA/MSSA, ACME-*arcA*陽性株等、代表的な17株について、PCRによる*agr*型別、MLSTによる遺伝子型別、病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子の検出を行ない、各種薬剤に対し微量液体希釈法によりMICを測定した。

以上の臨床分離株を対象とした分子疫学的研究に先立ち、新規分子疫学的解析法として、コアグラーゼ遺伝子型を多重PCRにより決定する方法の開発を試みた。コアグラーゼ型は黄色ブドウ球菌が産生するスタフィロコッカス・コアグラーゼ(SC)の抗原性に基づく型別法であり、従来よりI-VIII型特異的抗血清を用いた血清学的方法(ウサギ血漿凝固阻止試験)により決定されてきた。しかしこの方法では菌株の調整から判定に至るまで時間を要し、また10-20%の臨床分離株が型別不能となることが知られ、その理由として、菌株によるコアグラーゼ産生量が低い場合や、I-VIII型以外の型の存在が考えられている。そこで既知のすべての型を包含し、菌株によるSCの産生量に影響されない遺伝子型別の開発はきわめて有意義であると考え、今回の研究の主要な柱とした。我々はすでにコアグラーゼ型I-X型までのSC遺伝子およびIV, V型のサブタイプ、各々IVb, VbのSC遺伝子配列を決定している。それらの遺伝子配列情報をもとに、型特異的配列および

共通配列を検索しプライマーを設計し、多重 PCR による、コアグラーゼ遺伝子型の簡便な同定法を考案した。

4. 研究成果

(1)新規分子疫学的型別法(コアグラーゼ遺伝子型別法)の開発

SC 遺伝子の 5' 末端側の共通配列に一致する共通プライマーと、型間多様性の存在する D1, D2 領域におもに設計された型特異的プライマーを用いて、2 つの多重 PCR 反応(Sc-R1, Sc-R2)による主要コアグラーゼ型の型別法を考案した。PCR 産物の大きさにより、Sc-R1 ではコアグラーゼ遺伝子型 I, VI 型を、Sc-R2 ではコアグラーゼ遺伝子型 VII, VIII, X 型を区別することができる。1 菌株につき、これら 2 つの PCR を実施し、いずれかにおいて型特異的増幅産物が得られれば、型の同定が完了する。いずれの PCR でも特異的増幅が見られない場合、追加 PCR 反応 Sc-R3 を行ない、IX, Vb 型のいずれかの型を検出する。VI 型が検出された場合、追加 PCR 反応 Sc-R4 を行ない、サブタイプ IVa, IVb のいずれかを決定する。今回開発した PCR による型別は、従来の血清学的方法に比べ簡便で短時間で行なうことができ、血清学的には型別できない株の約 9 割が、今回開発した多重 PCR により型別することが可能であった。

(2)わが国(北海道)における調査

MRSA は全 1015 株中、189 株(18.6%)に検出された。MRSA の検出率が高かったのは尿、喀痰、眼脂、膿であり、70 歳以上の高齢者からの分離頻度が高かった。MRSA の大部分(82.5%)はコアグラーゼ遺伝子型 IIa に属したが、MSSA は様々な型に分された。MRSA における SCCmec 型では II 型が最も多く(83.1%)、これらの殆どがコアグラーゼ型 IIa 型に属していた。CA-MRSA に特徴的とされる SCCmec 型 IV, V 型はそれぞれ 6 株(3.2%)、8 株(4.2%)に検出された。PVL 遺伝子陽性株は全 MRSA 中 3 株(1.6%)、全 MSSA 中 2 株(0.2%)であった。ACME-*arcA* は PVL 陰性 MRSA2 株に検出された。

PVL 遺伝子陽性 MRSA のうち、2 株は ST6、1 株は ST59 と決定された。ST6 株、ST59 株はそれぞれ IVa, V 型 SCCmec を持ち、コアグラーゼ遺伝子型 IVb, VIIb 型に属していた。PVL 遺伝子陰性 MRSA は、エンテロトキシン遺伝子クラスター(*seg, sei, sem, sen, seo, selu*)を有し、また殆どが *sec*, TSST-1 遺伝子を持っていたが、PVL 遺伝子陽性 MRSA の ST6 株は *sea* のみ、ST59 株は *seb, sek, seq* のみしか検出されなかった。PVL 陽性 MRSA は、PVL 陰性 MRSA および ACME-*arcA* 陽性 MRSA に比し、より多くの薬剤に感受性であり、オキサシリンに対する MIC が低く、保有する薬剤

耐性遺伝子の数も少なかった。PVL 陰性 MRSA および ACME-*arcA* 陽性 MRSA は、*ermA, ermB, aac(6)-aph(2'')*, *ant(9)-Ia* を保有し、fosfomycin, ciprofloxacin に耐性を示し、gentamycin に高度耐性を示した。

ACME-*arcA* 陽性 MRSA2 株のうち 1 株は IIa, 他の 1 株は V 型 SCCmec を持ち、ともにコアグラーゼ遺伝子型 IIa 型に属していた。PVL 陽性 MSSA はコアグラーゼ遺伝子型 Va または Vb、ST は ST188(CC1), ST121(CC121)に属していた。PVL 陰性 MRSA の殆どは IIa 型 SCCmec を有し、コアグラーゼ遺伝子型 IIa, CC5 に包含される ST(ST5, ST512, ST764)に分類された。

今回の調査では、外来患者由来のほとんどの MRSA は、日本における HA-MRSA として優勢である New York/Japan clone と同じ特徴(ST5-SCCmec II-コアグラーゼ遺伝子型 II-PVL 陰性)を有していた。このことは MRSA(HA-MRSA)の感染者または保菌者が近い過去に医学的治療を受けていたり、入院していた可能性を示唆するものであり、HA-MRSA が一時的である場合も含め市中で広く分布している状況があることが考えられた。本研究では CA-MRSA の特徴とされる PVL 陽性の MRSA が 3 株分離され、それらは ST6 と ST59 に属していた。ST6-MRSA は現在まで殆ど報告がなく、レバノンで ST6-SCCmecIVc の MRSA が検出されたとの報告が 1 例あるのみであり、その株は PVL 陰性であった。また病原アイランドの存在を示すエンテロトキシン遺伝子やファージ遺伝子の検出結果からは、米国で初期に報告された CA-MRSA (USA400 clone)とも異なる株であることが明らかとなった。従って ST6-MRSA は北海道におけるエンデミックなクローンであると考えられた。

ST59 の CA-MRSA は台湾で最も流行しており、中国、シンガポール、オーストラリア、オランダ、デンマーク、イギリス、米国において散発的な分離株として報告されている。日本では、ST59 クローンは、2007 年に本州で小児の蜂巣炎から報告されているのみである。したがって今回の ST59-PVL 陽性 MRSA の検出は日本で 2 例目の報告であり、北海道では初めての分離となる。

ACME は米国で近年、分離が急増している CA-MRSA である USA300 クローンに特徴的な病原アイランドである。現在まで、ACME-*arcA* 遺伝子は ST1-MRSA-SCCmecIVa, ST5-MRSA-SCCmecII, ST8-MRSA-SCCmecIV, ST59-MRSA-SCCmecII, ST97-MRSA-SCCmecV, ST8-MSSA で確認されている。ACME-*arcA* 遺伝子陽性の ST5-MRSA-SCCmecII は、米国の PFGE タイプ USA100 クローンにおいてのみ確認されている。したがって今回検出された ST5-MRSA-SCCmecII が米国から伝播したという可能性が考えられる。一方、ACME はコアグラーゼ陰

性ブドウ球菌にも分布しており、SCC*mec*と同様にこれが黄色ブドウ球菌に転移することも予想され、日本においてHA-MRSAとして優勢なST5-MRSAに、ACMEが転移した可能性も想定される。

本研究は、北海道で初めてとなるCA-MRSAを標的とした疫学調査である。調査の簡便さから、今回外来患者由来の分離株のみを用いて解析したが、その中にはHA-MRSAと同じ特徴のMRSAが約8割ほど含まれていた。このことは市中にも、病院由来のMRSAが、一時的に持ち出されたものも含め、高率に分布している状況を示唆する。CA-MRSAは、病歴、通院歴によりHA-MRSAと区別することも可能であるが、現状ではこれらの区別が非常に難しくなっている。HA-MRSAは市中ではほとんどなく消滅すると考えられているが、どのくらいの期間、市中で保持されるのか、市中での人-人伝播が起こりうるのか、今後調査する必要があると思われる。また今回初めて同定されたPVL陽性のST6、台湾で優勢なST59-MRSAについて、今後継続的な調査を進め、それらの市中での蔓延状況を把握することが重要となってくるであろう。

MRSAにおけるACMEの検出は日本でもきわめて稀であるが、ACMEは菌の増殖、定着能を高め、米国で見られるような、特定のクローンの蔓延拡大につながるおそれがある。したがって今後、PVLのみではなく、ACMEにも注目し、その保有株の分布実態を調査することが望まれる。今回の調査では検出されなかったが、米国で蔓延するCA-MRSA USA300クローンの世界的な拡がり懸念されている。日本では報告が極めて少ないが、近い将来このクローンが市中に拡がることも予想されるので、これについても注意を向けなければならないと思われる。

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4件)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Kuwahara O, Ito M, Mise K, Kobayashi N. Molecular characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Hokkaido, northern main island of Japan: identification of ST6 and ST59 PVL-positive CA-MRSA. *Microbial Drug Resistance*, 2011, in press.

Urushibara N, Paul SK, Hossain MA, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Analysis of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus sciuri*:

identification of a novel *ccr* gene complex with a newly identified *ccrA* allotype (*ccrA7*). *Microbial Drug Resistance*, 2011, in press.

Hirose M, Kobayashi N, Ghosh S, Paul SK, Shen T, Urushibara N, Kawaguchiya M, Shinagawa M, Watanabe N. Identification of Staphylocoagulase genotypes I-X and discrimination of type IV and V subtypes by multiplex PCR assay for clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63:257-263.

Afroz S, Kobayashi N, Nagashima S, Alam MM, Hossain ABMB, Rahman A, Islam MR, Lutfur AB, Muazzam N, Khan MAH, Paul SK, Shamsuzzaman AKM, Mahmud MC, Musa AKM, Hossain MA. Genetic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in Bangladesh. *Jpn J Infect Dis*, 2008, 61:393-396.

[学会発表](計8件)

Urushibara N, Kawaguchiya M, Paul SK, Kobayashi N. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* harboring two copies of *mecA* and two copies of *ccrC* genes found in a Bangladeshi clinical strain of *Staphylococcus haemolyticus*. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, 2010年12月4日、シンガポール。

Kobayashi N, Nwe KM, Aung TS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ghosh S. Genetic characteristics and distribution of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* isolates in Myanmar. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, 2010年12月4日、シンガポール。

漆原範子、川口谷充代、S.K.Paul、小林宣道。バングラデシュにて分離されたコアグラーゼ陰性ブドウ球菌における新規SCC*mec*型。第80回日本衛生学会総会 2010年5月11日、仙台。

小林宣道、漆原範子、川口谷充代。ミャンマーにおいて検出された黄色ブドウ球菌の遺伝学的性状と各種病原因子遺伝子の分布。第83回日本細菌学会総会 2010年3月28日、横浜。

川口谷充代、漆原範子、桑原理、伊藤政彦、小林宣道。北海道における市中感染型MRSAの分布状況と疫学的特徴。第83回日本細菌学会総会 2010年3月28日、横浜。
Kobayashi N, Watanabe S, Nagashima S, Quinones D, Urushibara N. Genetic diversity of enterococci harboring

high-level gentamicin resistance genes aac(6)-Ie-aph(2")-Ia or aph(2")-Ie in a Japanese hospital. 14th International Congress on Infectious Diseases. 2010年3月10日、マイアミ、米国。

Kobayashi N, Ghosh S, Hirose M, Paul SK, Urushibara N, Kawaguchiya M. Developing of genetic typing method to assign staphylocoagulase (SC) serotype I-X and two SC genotypes for Staphylococcus aureus. 14th International Congress on Infectious Diseases. 2010年3月10日、マイアミ、米国。

小林宣道、渡辺祥二郎。PCRによる黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型・コアグラーゼ遺伝子型同定法の確立。第82回日本細菌学会総会 2009年3月13日、名古屋。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 宣道 (KOBAYASHI NOBUMICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80186759

(2)研究分担者

石埜 正穂 (ISHINO MASAHO)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30232325

鷺見 紋子 (SUMI AYAKO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10363699

長嶋 茂雄 (NAGASHIMA MSHIGEO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60433116

漆原 範子 (URUSHIBARA NORIKO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80396308