

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10459

研究課題名（和文）長期にわたり臨床分離されるMRSAの定着に関わる因子の解明と排除のための方策

研究課題名（英文）Elucidation of the fixation factor and elimination measures of MRSA colonized in clinical site for long term

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） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：2011年度～2021年度まで4期に分けて、MRSAの臨床分離株を収集し、POT型を決定し性状を解析した。各期間に、院内感染とみられる同一のPOT型をもつ複数の菌株（重複POT型株）が分離された。1～4期の全期間に継続的に分離された重複POT型株がある一方、2期以降に流入した重複POT型株が、院内に定着していることが示された。

バイオフィルム（BF）形成能を比較したところ、継続的に分離されている株の方が高いBF形成能を示す傾向があり、院内定着にBFの形成が関与していることが示された。BF形成能の高い株ではBFの成分として、細胞外DNAの割合が減少し、タンパク質の割合が増加する傾向がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一病院にて11年間で臨床分離されたMRSAを調べた結果、経年的に院内感染を起こすMRSAのPOT型の種類が増加し、新たなMRSAが院外から流入し、院内に定着していた。継続して分離される株のBF形成能は高い傾向があり、MRSAの定着にBF形成能が大きく関わっていた。BF形成を阻止するために、BFを形成する主たる成分の割合を調べた。また、耐性菌の観点から、化学物質を使わずBF形成を抑制する手法も検討をしている。2016年のAMR対策アクションプランの「2020年までのMRSAの分離率20%」の達成は抗菌薬の使用料の削減だけでは難しく、BF形成に焦点を当てた対策を推進していくことが重要となる。

研究成果の概要（英文）：Clinical isolates of MRSA were collected in four periods between 2011 and 2021. POT types were determined, and characterization was performed. During each period, multiple strains with the same POT type (duplicate POT type strain) that appeared to be nosocomial were isolated. Some duplicate POT type strains were continuously isolated from the 1st to 4th periods, but from the 2nd stage onwards, new duplicate POT type strains were introduced and established in the hospital.

The examination of BF components showed that the proportion of extracellular DNA tended to decrease and that of protein increased in strains with high BF formation ability.

研究分野：病原微生物

キーワード：MRSA 院内感染対策 バイオフィルム 薬剤感受性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2016年に策定された「AMR対策アクションプラン」では、2020年までに抗菌薬の使用量を、2013年度を基準に2/3まで減少させるとした。その成果指標の一つに2020年までに「黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性率を20%以下に低下させる」を挙げている。2010年には50%を超えていたMRSAの割合は、2015年までは減少傾向にあったが、それ以降の変動は少なく、2021年度で46.0%と、抗菌薬の使用量の削減だけでは目標達成は厳しい。2012年に始まった感染防止対策加算による感染対策強化の取り組みにより、HA-MRSAは大幅に減少したが、CA-MRSAは排除しきれず、院内に定着し、拡大した可能性がある。新たに院内に持ち込まれ、定着しやすい株に対して、有効な封じ込めの方法を確立することが急務となる。

### 2. 研究の目的

目的は「長期にわたり臨床分離されるMRSAの定着に関わる因子の解明と排除のための方策」を構築することにある。現在臨床分離されるMRSAの80%以上はCA-MRSAである。AMR対策の推進にもかかわらず排除しきれないCA-MRSAについて、蔓延状況とリスク評価を行い、効果的な対策を見出すことを目的とする。加えて、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うえで、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) 菌株

岡山県北の基幹病院で1期(2011年5月~2012年11月)、2期(2015年1月~2016年1月)、3期(2018年)、4期(2021年)に臨床分離されたMRSAのうち、POT法で識別できたSCC*mecI*型をHA-MRSA、SCC*mecIV*型をCA-MRSAとして分類した。標準株としてMRSA N315(HA-MRSA)株を用いた。

#### 2) MRSAのSCC*mec*型の分類

シカジーニアス分子疫学解析POTキット(黄色ブドウ球菌用)を用い、取扱説明書に記載されている標準プロトコールに従って実施した。

#### 3) バイオフィルム(BF)形成能の測定

1%グルコース含有Brain Heart Infusion(BHI)培地に培養したMRSAを添加した。この混合液を96穴平底プレートに分注し、37℃で24時間培養した。上清を除き、滴下洗浄後、0.1%クリスタルバイオレットで5分間染色を行った。滴下洗浄後乾燥し、30%酢酸で染色物を溶出させたのち、この溶出液について波長570nmで吸光度を測定した。1株につき3点同条件のウェルを作成した。BF(%)は標準株であるMRSAN315の吸光度に対する被験菌の吸光度の百分率で算出した。

#### 4) BF成分の解析

BFを形成後のウェルにDNase又はプロテイナーゼKを添加して、さらに37℃で24時間静置培養しBFの測定を行った。DNase又はプロテイナーゼKのどちらも添加しなかったサンプルをBF量100%とした。DNase又はプロテイナーゼKを添加したサンプルについて、添加しなかったサンプルと比較したBF量の減少率から、BF中の細胞外DNA及びタンパク質の割合を算出した。また、細胞外DNAとタンパク質以外のBF成分を多糖等として割合を算出した。

#### 5) 各種抗菌薬の最小生育阻止濃度(MIC)の測定

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)に準じてマクロライド系抗菌薬(クラリスロマイシン(CAM)(1~3期)、エリスロマイシン(EM)(4期))及びレボフロキサシン(LVFX)(1~4期)のMICを測定した。抗菌薬の耐性度について、感受性: 0.25 µg/mL、低度耐性: 0.5~4 µg/mL、高度耐性: 8 µg/mLとした。

### 4. 研究成果

POT型からSCC*mec*及び型又はSCC*mec*及び型と分類されたMRSAそれぞれをHA-MRSA、CA-MRSAとして、1期と4期で全体に占める分離率を比較した。HA-MRSAの分離率は62.9%から16.0%へ大きく減少し、一方で、CA-MRSAの分離率は33.7%から81%と増加していた。また、各期間に院内感染とみられる同一のPOT型をもつ複数の菌株(重複POT型株)を1期と3期で比較したところ、図1で、CA-MRSAのAで示すPOT型106-9-2は1期と3期に加え4期でも分離されており、長期に院内に定着していた。一方、POT型で菌株を同定し、経年的に比較することで、図1に示すように、3期のCA-MRSAでは、1期では検出されなかったPOT型をもつ株が多く検出され、さらに4期でも新規の重複POT型株が4種類分離されていることが分かった。

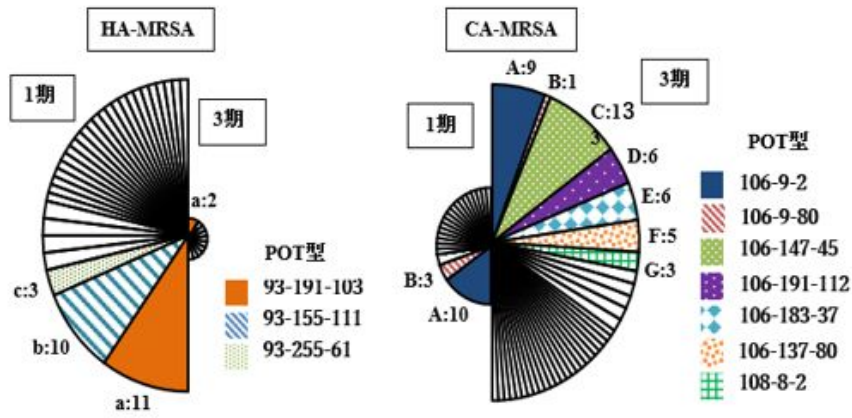


図1 1期と3期で分離されたHA-MRSAとCA-MRSAにおける重複POT型株型ごとの菌株数と種類の比較

- 1) 円の直径は各期の総分離数を反映している
- 2) a, b, c 又は A ~ G は同じ POT 型をもつ菌株が複数検出されたグループを示し、数字はその菌株数を示している。

1期~4期まで継続して分離されている株と4期で新たに分離された株のBF形成能を比較したところ、標準株のN315と比較し、それぞれ $91.0 \pm 46.5\%$ 及び $67.2 \pm 44.3\%$ 、と長期にわたり院内に定着した株の方が、BF形成率が高いことが分かった。これらの結果から院内には多数の型をもつMRSAが流入しているが、その中でもBF形成能が高い株が院内に定着していることが示された。

院内で継続して分離されるMRSAの特にBF形成能が高い株について、BF成分の割合を調べたところ、標準株のN315に比較して、細胞外DNAの割合が減少し、タンパク質の割合が増加していた。この結果がBF形成能にどのように関わっているかを今後明らかにしたい。

また、1期、3期及び4期で収集したCA-MRSAの抗菌薬感受性に関する経年分析を行った(図2)。用いた抗菌薬は「AMR対策アクションプラン」で、2020年までに抗菌薬の使用量を、2013年度を基準に2/3まで減少させるとしたマクロライド系抗菌薬及びレボフロキサシンとした。CA-MRSAでは、マクロライド系抗菌薬では、3、4期では1期に比べ感受性株が減少し、高度耐性株が増加していた。レボフロキサシンではマクロライドほど顕著ではないが、1期に比較し、感受性株が減少し、低度耐性菌が増加していた。また、3期に比べ4期では、高度耐性菌の数は減少傾向にあったことから、抗菌薬適正使用の効果が表れていると考えられた。

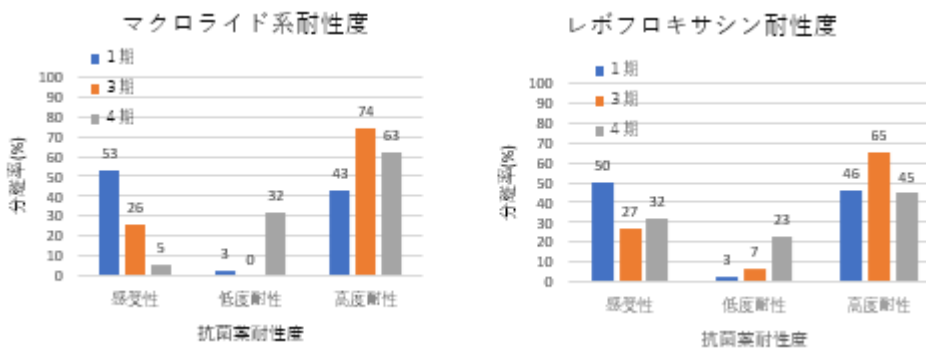


図2 CA-MRSAの抗菌薬感受性に関する経年分析(1期、3期及び4期の比較)

院内へのMRSAの流入から定着についてはBF形成能が関わっていることから、BF形成能を阻害する方法についても検討した。耐性菌の出現を防ぐ観点から、物理的手法を用い、紫外線発光ダイオード(UV-LED)の照射により、MRSAのバイオフィルム形成能が抑制されることを見出した。265nmを中心波長とするUV-LEDはMRSAの菌体への殺菌効果、初期BF中のMRSAの殺菌効果を有し、MRSA感染症対策に応用できる可能性が示唆された。今後は、抗菌薬の使用量の削減だけでなく、MRSAの院内流入量及び院内定着期間を最小化するような感染対策が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Miyake, Y. Yamada, T. Sugimoto(Wada), T. Fudeyasu, T. Sugiyama, S. Shiota	4. 巻 vol.10
2. 論文標題 The characteristics and over time analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinically isolated at Tsuyama Chuo Hospital	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Shujitsu University Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Y. Yamada, R. Shimada, S. Yamamoto, T. Maiguma, H. Nuno, T. Tanaka, T. Kudo, S. Shiota	4. 巻 vol.9
2. 論文標題 Reduction of MRSA biofilm formation with ultraviolet light emitting diode.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Shujitsu University Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 60-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 N. Ohtaguro, H. Matsuo, K. Iwasaki, S. Ueda, K. Nakagawa, T. Tsuchiya, N. Imamura, T. Dohi, Y. Yamada, S. Shiota,	4. 巻 8
2. 論文標題 Isolation and identification of a compound showing anti-Staphylococcal activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Shujitsu University Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 70-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 右近渚、山田洋一、岡本さつき、三宅悠太、杉本（和田）朋子、筆保智子、杉山哲大、塩田澄子
2. 発表標題 津山中央病院で臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の抗菌薬感受性と正常に関する経年変化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤久登、林秀樹、吉井圭佑、鈴木宗、上田剛慈、新良正典、工藤季之、島田憲一、塩田澄子、山田陽一
2. 発表標題 抗菌コーティングの開発と実証実験
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本さつき、山田陽一、益田菜々子、和田朋子、杉山哲大、塩田澄子
2. 発表標題 臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の 分類とバイオフィーム成分の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤有里菜、上田剛慈、加藤久登、工藤季之、鈴木宗、塩田澄子、山田陽一
2. 発表標題 持続的な抗菌効果・抗バイオフィーム 形成効果を示すコーティングの開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤春花、島田莉奈、山本宗市、布隼人、田中利夫、工藤季之、塩田澄子、山田陽一
2. 発表標題 紫外発光ダイオードによる バイオフィーム形成抑制
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益田菜々子、若狭成海、三宅悠太、山田陽一、岡部紀子、平順之、和田朋子、杉山哲大、塩田澄子
2. 発表標題 臨床分離されたMRSAの性状と薬剤耐性及びバイオフィルム形成能に関する変化、
3. 学会等名 第94回日本細菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田陽一、加藤久登、塩田澄子
2. 発表標題 抗菌・抗バイオフィルム形成コーティングの開発
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅悠太、山田陽一、岡部紀子、和田朋子、杉山哲大、塩田澄子
2. 発表標題 2011~2018年に臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の性状と抗菌薬感受性に関する経年分析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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	山田 陽一  (Yamada Yoichi)  (30610927)	就実大学・薬学部・講師   (35307)	

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
---------	---------