

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590493

研究課題名（和文）

市中に出現する PVL 陽性 MRSA の調査とその病原性に関する研究

研究課題名（英文）

Spread and pathogenecity of PVL-positive MRSA strains emerging in the community

研究代表者

伊藤 輝代 (ITO TERUYO)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10095763

研究成果の概要（和文）：

皮膚科外来患者由来 MRSA の性状および PVL の保有を検討し、市中感染型 MRSA に多い *SCCmec* を保有する株が多く分離されることを明らかにした。得られた PVL 陽性株を分子疫学的に解析した結果、米国、インド、台湾などの諸外国からの持ち込みと思われる PVL 陽性株と我が国特有と思われるものの存在を明らかにした。インドおよび台湾由来と推定される PVL 陽性株は group 3 に属する新規 PVL ファージを保有していることを明らかにした。小児及び成人血清中の黄色ブドウ球菌及び PVL に対する抗体値を作成し、小児の場合、抗体価が低い場合が多いことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

The majority of MRSA strains isolated from outpatients of dermatology carried types IV or V *SCCmec* elements, which are characteristic in community-acquired MRSA strains. PVL positive isolates were roughly classified into two, the international clones that might be imported from other countries, e.g., US, India, or Taiwan, and the domestic clones.

Two novel PVL phages belonging to group 3 siphoviridae were identified in two international clones, ST59 and ST772. Titers of anti-PVL as well as anti-*staphylococcus aureus* antibodies in the sera of children were lower than those of adults, suggesting that it might be a reason that life-threatening infection was occurred among children.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	1,040,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	1,580,000	4,680,000

研究分野：細菌学（含真菌学）

科研費の分科・細目：医学 病理：細菌学

キーワード：MRSA, PVL, 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

MRSAは院内感染の代表的原因菌として知られてきたが、近年では市中感染症からも数多く分離される。2000年代にはいると、米国を始めとして、それまでにMRSA分離率の低かったデンマーク、オランダなどでも、市中感染型MRSA

(community-associated MRSA; CA-MRSA)が顕著に増加してきた。米国やヨーロッパ諸国のCA-MRSAはPanton Valentine Leukocidine (PVL)と呼ぶ白血球溶解毒素を産生することも、その特徴の一つである。米国の代表的CA-MRSAはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) にてUSA300及びUSA400と分類される泳動パターンを示すPVL陽性MRSAである。特にUSA300クローンは出現して間もなく全米へ急速に広まり、病院感染からも分離される事態となり、米国で大問題となった。CA-MRSAは皮膚及び軟部組織感染症から数多く分離されるが、まれに壊死性肺炎、壊死性筋膜炎や敗血症性関節炎などを起こし、重症化し、死亡することがありその病原性の解明と対処法の確立が急がれている。

PVL遺伝子はバクテリオファージにコードされている。世界のCA-MRSA株及び我が国の1980年代分離株に於いては2種類のPVLファージ、6角形の頭部を持つもの (phage 108タイプ) と長円形の頭部を持つもの (phage 2958タイプ) とが存在することが知られていた。

2. 研究の目的

現在の我が国でのPVL陽性MRSAの広まりを調査し、PVLの病原性への関与を菌と宿主との相互の視点から解析する。具体的には以下のことを目的とした。

(1) 順天堂病院皮膚科外来MRSAの継続的解析：

(2) 他施設で分離されたPVL陽性株を含めたPVL陽性株を分子疫学的に解析し、1980年代に日本に蔓延していたPVL陽性株の子孫であるか、米国、台湾などの諸外国の株の持ち込みであるかを明らかにする。(3) PVL産生量を測定する。(4) PVL陽性菌の産生する毒素の作用をCell sorterを用いて測定する。細胞としてはヒト多形角白血球 (Polymorphonuclear Leukocyte; PMN) および肺培養細胞検討する(5) 小児と成人のPVLに対する感受性の比較するため、抗体価の測定を行う。

3. 研究の方法

順天堂病院本院、浦安病院、静岡病院、練馬病院の皮膚科外来患者由来株を入手する。

(1) PVL遺伝子の保有及びSCC*mec*タイプを決定する。PVL陽性株及び新規SCC*mec*を保有する株についてコアグラマーゼ型、*spa* type、MLSTを決定する。

(2) DENKA生研の開発したラテックス凝集反応を用いてPVL産生量を測定する

(3) PVLファージの塩基配列

(4) 肺培養細胞を使用した細胞壊死測定システムの開発

(5) PVL抗体の測定を倫理委員会に申請する。小児科医師、総合診療科医師の協力の下に患者血清を収集し、酵素抗体法にて抗体価を測定する。

4. 研究成果

(1) 皮膚科外来患者由来株の解析

[1] 順天堂病院皮膚科外来患者由来 93株を本郷(2009-2010年13株、2011年61株)、練馬(3株)、静岡(9株)、浦安(7株)の各病院より御分与いただき、PVL遺伝子の保持を検討した。PVL陽性株は93株中1株であった。

[2] そこで2007-2008年に順天堂病院皮膚科外来患者より分離された3株を合わせた計4株をPVL陽性株として解析した。解析した結果、JCSC7483株はST8で

USA300 と判断され、JCSC9076 は ST8 であるが USA300 とは異なると判断され、JCSC7481 株は ST772 でベンガルクロンと判断され、JCSC7472 は ST30 で我が国に従来より蔓延していたと判断された。[3] 93 株の MRSA 株はすべて *mecA* 遺伝子を保持していた。このうち *SCCmec* のタイプの解析が終了した 42 株では、type I, II, IV, V の *SCCmec* が検出され多様な *SCCmec* を持つ事が確認された。もっとも多いのは type II 株は 20 株 (48%) で、次いで、Type IV 株、13 株 (31%)、Type V、5 株 (12%) であった。typeIV*SCCmec* の中には新規サブタイプのものも存在したため、これらのうちの 3 株を選んで typeIV*SCCmec* の全塩基配列を決定した。同時に表皮剥奪性毒素遺伝子 (*eta* 及び *etb*) と毒素性ショック症候群遺伝子 (*tst*) の検出を試み、表皮剥奪性毒素遺伝子は特定の染色体タイプの株のみ保持していることが確認された。また typeIV *SCCmec* をもつ ST8 株で *tst* 遺伝子を持つ数株が確認された。これは *tst* をもつゲルムアイランドが転移したことを示唆しており、今後の更なる解析が必要と思われる。

2. ラテックス凝集反応による PVL 産生量の測定。

当教室の保存株より、PVL 遺伝子保有株 54 株 (MRSA46 株、MSSA8 株) を使用し、デンカ生研にて開発されたラテックス凝集反応にてその産生量を測定した。BHI ブイヨンで培養した場合 PVL 陽性株はすべてその産生がラテックス凝集反応にて陽性となったが、PVL 産生量は菌株により異なっていた。54 株中 49 株 (90%) は凝集素価で 8-32 の範囲であり、5 株が >256 以上の価を示した。米国の代表的市中感染型 MRSA 株や近年の順天堂病院分離株の PVL 産生量は前者に属し、後者の >256 以上の多量に PVL を産生した株は 1980 年代の分離株であった。

3. PVL フェージの塩基配列の決定

日本及び台湾で分離された PVL 陽性 ST59 株のもつ PVL フェージの塩基配列を決定し、これまでに報告された PVL フェージとは異なる第 3 のグループに属することを見だし、報告した。加えて、アフリカのチュニジアで分離された ST80 株のもつ PVL フェージが米国で蔓延する市中感染型 MRSAUSA400 の持つフェージと殆ど同じであること、我が国で分離された USA300 とは異なる ST8 株のもつ PVL フェ

ージも米国で蔓延する PVL 陽性 ST8 MRSA (USA300) と同じであることを明らかにした。これまでの研究は近年出現した市中感染型 MRSA はそれぞれの地域で別個に PVL フェージを持つ菌が出現したことを示唆する。

5. 肺培養細胞の実験系の確立

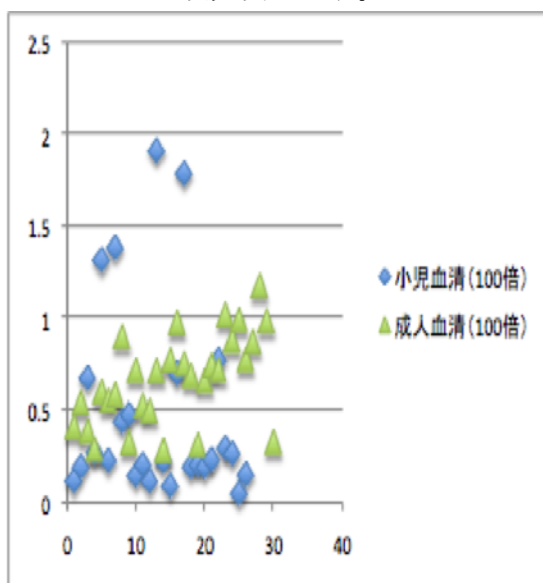
ヒト肺胞上皮細胞 II 型、正常ヒト気管支上皮細胞を用いて検討したが、これらの細胞に対して PVL の作用は見られなかった。今後他の培養細胞を用いた系を引き続き検討する予定である。

6. 血清中の抗体価の測定

「ヒト血清中の Panton-Valentine 型ブドウ球菌白血球溶解毒素に反応する抗体量の検討」の課題で病院倫理委員会の承諾を得、順天堂病院小児科、順天堂病院総合診療科の医師の協力で小児、成人の血清を御分与いただいた。小児血清 26 検体、成人血清 30 検体を用いて PVL タンパクおよび黄色ブドウ球菌菌体に結合する IgG の量を ELISA にて測定した。結果は図 1 に示す。成人の場合、PVL および黄色ブドウ球菌菌体に反応する IgG の量は比較的均一であり、100 倍希釈した場合でも ELISA にて強い反応を示す血清が殆どであった。これに対して、小児の場合、PVL および黄色ブドウ球菌菌体に反応する IgG の量は、成人の場合よりも多いと判定されるものもある一方、非常に少ないものもあった点が注目に値した。特に PVL に対する抗体価も黄色ブドウ球菌に対する抗体価も低い 3 名の小児がいた。このことは、このような小児に PVL 産生黄色ブドウ球菌が感染した場合に、非常に重篤になる可能性を示唆している。

図 1 精製 PVL を用いた ELISA 結果

横軸は検体番号を縦軸は 15 分後の OD405nm の吸光度を示す。



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 19 件)
(全て査読有)

- Higashiyama M, Ito T, Han X, Nishiyama J, Tanno A, Wada T, Funaoka Y, Yoshida Y, Mikita K, Ogawa T, Okusa Y, Kaku K, Hatada J, Hiramatsu K, Kawana A. Trial to control an outbreak of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a boarding school in Japan. *Am J Infect Control*. 2011 Dec;39(10):858-65. Epub 2011 Jun 12.
- Yamakawa J, Aminaka M, Okuzumi K, Kobayashi H, Katayama Y, Kondo S, Nakamura A, Oguri T, Hori S, Cui L, Ito T, Jin J, Kurosawa H, Kaneko K, Hiramatsu K. Heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: a retrospective study. *J Infect Chemother*. 2011 Oct 29. [Epub ahead of print]
- Hisata K, Ito T, Matsunaga N, Komatsu M, Jin J, Li S, Watanabe S, Shimizu T, Hiramatsu K. Dissemination of multiple MRSA clones among community-associated

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections from Japanese children with impetigo. *J Infect Chemother*. 2011 Feb 17. [Epub ahead of print]

- Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element *SCCmec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathog*. 2011 Feb 3;7(2):e1001267.
- Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T, Hiramatsu K, Boost MV. Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *J Hosp Infect*. 2011 Jun;78(2):113-7. Epub 2011 Apr 19.
- Zhang M, Ito T, Li S, Jin J, Takeuchi F, Lauderdale TL, Higashide M, Hiramatsu K. Identification of the third type of PVL phage in ST59 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 323 (1) : 20-8 doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02355.x.
- Shanshuang Li, Robert Leo Skov, Xiao Han, Anders Rhod Larsen, Jesper Larsen, Marit Sørum, Mireille Wulf, Andreas Voss, Keiichi Hiramatsu, and Teruyo Ito Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in CC398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):3046-50. Epub 2011 Mar 21.
- Higashiyama M, Ito T, Han X, Ono K, Minamimura K, Sakakibara F, Tanno A, Nishiyama J, Hatada J, Hiramatsu K, Kawana A. Epidural abscess caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Japan *J Infect Chemother*. 2010 Oct;16(5):345-9. Epub 2010 Apr 3.

9. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Wilailuckana C, Kaewkes W, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. Preliminary report of SCCmec-types and antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a university hospital in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010 Jul;41(4):920-7.
10. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. Phenol-soluble modulins alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *J Infect Dis*. 2009 Sep 1;200(5):715-23.
11. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Use of a sensitive chemiluminescence-based assay to evaluate the metabolic suppression activity of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing reduced susceptibility to vancomycin. *J Microbiol Biotechnol*. 2009 Jul;19(7):734-42.
12. 世界各地で分離された Vancomycin-intermediate *S. aureus* 46 株の分子疫学的解析 金京勲、伊藤輝代、平松啓一 順天堂医学 (2011)
13. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):4961-7. Epub 2009 Aug 31.
14. Lulitanond A, Engchanil C, Chaimanee P, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. The First Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) in Thailand. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr 29. [Epub ahead of print]
15. Han X, Ito T, Takeuchi F, Ma XX, Takasu M, Uehara Y, Oliveira DC, de Lencastre H, Hiramatsu K. Identification of a novel variant of SCCmec, type-II. 5, and its truncated form by the insertion of putative conjugative transposon Tn6012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr 13. [Epub ahead of print]
16. Arakere G, Nadig S, Ito T, Ma XX, Hiramatsu K. A novel type-III staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) variant among Indian isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*.
17. Baba T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama I, Takeuchi F, Ito T, Hiramatsu K. Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J Bacteriol*.
18. Berglund C, Ito T, Ma XX, Ikeda M, Watanabe S, Söderquist B, Hiramatsu K. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCCmec in Örebro County and the western region of Sweden. *J Antimicrob Chemother*.
19. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Use of a sensitive chemiluminescence-based assay to evaluate the metabolic suppression activity of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing reduced susceptibility to vancomycin. *J Microbiol Biotechnol*. 2009 Jul;19(7):734-42.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Teruyo ITO, Meng ZHANG, Shanshuang LI, Shigeki MISAWA, Shigemi KONDO, Takashi MIIDA, Akimichi OHSAKA, and Keiichi HIRAMATSU Identification of a novel subtype of type V SCCmec among strains negative in the BD GeneOhm™ MRSA assay IUMS 2011、9月、札幌 convention center
2. Meng ZHANG, Teruyo ITO, XX MA, Fumihiko TAKEUCHI, Tsai-Ling Yang LAUDERDALEL, Mariem JEMILI and Keiichi HIRAMATSU Evolution and spread of PVL carrying phages IUMS 2011、9月、札幌 convention center
3. Hongo, I., Matsuo, M., Ito, T., and Hiramatsu K. Identification of novel

leukocidin/haemolysin toxin family
proteins, MW1941 and MW1942, in
Staphylococcus aureus IUMS
2011、9月、札幌 convention center

4. Xiao Han, Teruyo Ito, Isamu Hondo, Meng Zhang, Kanenaru Oishi, Keiichi Hiramatsu. Quantification of Pantone Valentine Leukocidin with reverse passive latex agglutination test ISAAR (2011) 2011、4月、Soeul
5. 伊藤 輝代、張 萌、韓 笑、細谷 志乃、平松 啓一 近年我が国で分離される PVL 陽性 MRSA について 第 56 回ブドウ球菌研究会 2011、9月、高知医科大学
6. 伊藤 輝代 市中に拡まる MRSA 札幌 小児医会北海道 札幌 札幌パークホテル 2011
7. Ito T. SCCmec: Diversity and Evolution The 8th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance. April 6-8, 2011 COEX, Seoul, Korea. Soeul, Korea. COEX 2011
8. Meng Zhang, Teruyo Ito, Shanshuang Li and Keiichi Hiramatsu Organization of genomes of PVL-carrying phages 第 83 回日本細菌学会 2010、3月パシフィコ横浜
9. 張 萌、伊藤 輝代、李善爽、平松啓一 ST59 株の保持する新規 PVL フェージの同定 第 55 回ブドウ球菌研究会 2010、7月東京 慈恵会医科大学

[図書] (計 1 件)

1. Teruyo Ito, Sae Tsubakishita, Kyoko Kuwahara, Xiao Han and Keiichi Hiramatsu. Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC): A Unique Gene Transfer System in Staphylococci Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements, edited by Adam P. Roberts and Peter Mullany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 輝代 (TERUYO ITO)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10095763