様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：３０１１０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６３２６０

研究課題名（和文）歯性感染症から分離される高病原性市中感染型黄色ブドウ球菌検出状況と分子疫学的解析

研究課題名（英文）Identification and molecular epidemiological analysis of emerging clones of community-acquired MRSA obtained from odontogenic infection disease

研究代表者
広瀬　弥奈（HIROSE, MINA）

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：１０２６５０７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：　健康小児526名の唾液から分離されたブドウ球菌254株のDNAを抽出し、PCR法により16sRNA、 nuc、 mecA、 PVL 、arcAの陽性/陰性を確認後、菌種を同定した。nuc陽性株（MSSA、MRSA）についてはコアグラーゼ型別、mecA陽性株についてはSCCmec型別分析を行なった。その後、薬剤耐性試験と薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子の検出、MLST解析を行なった。MRSA検出率は6.1%(9/147)で、2株は新型のST8-SCCmec IVlであった。nuc陰性株ではS.epidermidisのmecA陽性率が最も高く(60.7%)、SCCmec IVaが多かった。

研究成果の概要（英文）： A total of 254 staphylococcal isolates were collected from oral cavity of 526 healthy children were analysed. Multiplex PCR was performed to detect mecA, PVL genes and ACME-arcA gene. SCCmec typing was determined for all isolates, and coagulase gene (coa) genotype was assigned to all S. aureus. ST (sequence type) based on MLST scheme, agr type, prevalence of virulence factors, antibiotic susceptibility were analysed for the selected 20 S. aureus isolates.
The most prevalent species was S. aureus (n=147), followed by S. epidermidis (n=89), S. warneri (n=12), S. haemolyticus (n=4), and S. hominis (n=2). The mecA was detected in 6.1% of S. aureus, 60.7% of S. epidermidis, and 8.3% in S. warneri, and SCCmec was typed as IV (75%) or V, with IVa subtype being dominant. MRSA were classified into ST1, ST5, ST8, ST89, ST120. Two ST8 were SCCmec IVl, coa-IIIa, and had sec, sei, sel, tst-1, and spj/sasL gene which is characteristic trait for an emerging Japanese MRSA clone.

研究分野：小児歯科学

キーワード：MRSA　小児　唾液　MLST

１．研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の蔓延とそれによる院内感染の発生は、現代医療の抱える主要な問題の一つである。日本における病院感染起因菌としての MRSA 検出率は世界的に最も高いレベルにあり、欧米諸国などとともに MRSA の高汚染国と考えられている。1990 年代には、病院外すなわち市中において分布する MRSA (Community-acquired MRSA；CA-MRSA)の重要性が認知され、病院感染型 MRSA（HA-MRSA）とは異なる特徴を持つ感染症起因菌であることが注目された。CA-MRSA は当初、米国を中心に報告されたが、2000 年以降、西欧、アジアなどにも分布していることが明らかとなり、本感染症はグローバル感染症・新興感染症として認識されるに至っている。一方、歯性感染症から分離される MRSA についてはこれまでにも報告はあるものの、近年注目されている市中感染型の検出状況については国内外においてまだ報告されていない。

MRSA は、菌の染色体 DNA に外来性の遺伝子要素であるメチシリン耐性領域（SCC*mec*）を持つ。その中で CA-MRSA は、IV、V 型の SCC*mec* を保有することが特徴的であり、Ⅰ～Ⅲ型 SCC*mec* を持つ HA-MRSA とは異なる。また、白血球破壊毒素の一つである PVL (Panton-Valentine leukocidine)を産生する株が多く、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ことから、歯科領域における CA-MRSA の検出状況を把握し、口腔への感染経路を明らかにすることは、今後危惧される本菌による感染症への対策を構築する上でも極めて重要といえる。

２．研究の目的

CA-MRSA は、1981 年に初めて米国で報告されて以来、各国で広がりを見せている。日本では 2003 年に伝染性膿化疹の患者から分離され、2006 年には肺炎による死亡例も出ており、今後蔓延が危惧される。しかし、歯科領域の検体からの調査報告は皆無であるため、本研究では、歯性感染症サンプルの他に健常人の口腔検体から分離される CA-MRSA の検出状況を明らかにすることを目的とする。検出された CA-MRSA の分子疫学的・遺伝的特徴を解析し、口腔領域の CA-MRSA の起源と伝播動態を探究する。研究成果は CA-MRSA の口腔への感染経路を明らかにし、その感染予防対策に資すると考えられる。

３．研究の方法

CA-MRSA の歯科領域における検出状況に関する調査を、大学病院、臨床検査センター等からの臨床分離株、さらには、病院以外の健常者の鼻腔、及び唾液・歯垢由来の分離株を対象として行う。すなわち、歯性感染症と健常者口腔由来の MRSA 菌株から SCC*mec* 型を分析するとともに、PVL の検出状況を調査する。次に、PVL 陽性と陰性の MRSA の中から代表的な菌株を選択し、MLST (multilocus sequence typing)を行い、遺伝子型 ST を同定することでそれらの系統遺伝学的関係を調べる。黄色ブドウ球菌（*S.aureus*）の分子疫学的型別法として、菌株の遺伝学的系統を世界的規模で普遍的に比較解析できるのが MLST であり、欧米や台湾など海外で優勢なクローンか、わが国特有のクローンかを判別することができる。現在登録されている世界各国からの黄色ブドウ球菌の MLST をベースにすることで、今回新たに分離された菌株の由来を検討することができるため、本研究は分子疫学的にも大変意義がある。さらに、我々が開発したコアグラーゼ遺伝子型別法を用いて、同一 ST 型内おけるコアグラーゼ遺伝子型の種類と分布を解析し、菌株の遺伝学的多様性を明らかにする。

４．研究成果

2013 年～2015 年において、歯科検診を行った札幌および札幌近郊の保育所・幼稚園児

約1100人のうち、保護者の同意を得られた3歳～6歳児526人を対象に、採取した唾液から、マンニット食塩培地と血液寒天培地を用いて黄色ブドウ球菌を分離培養後、マイクロバンクに凍結保存した。収集した菌株526株からDNAを抽出後、黄色ブドウ球菌特異的プライマーを用いて16sRNA、nuc、***mec***A、PVL、ACME-***arc***A の陽性・陰性を確認した。nuc 陽性株（黄色ブドウ球菌：MSSA、MRSA）についてはコアグラーゼ型別、***mec***A陽性株についてはSCC***mec***型別、***arc***A陽性株については***arc***A型別分析をPCRと各種プライマーを用いて行なった。nuc陰性株（表皮ブドウ球菌：CNS）については、菌種の同定をPCRおよび生化学的試験を用いて行なった。次いで、***mec***A陽性株のすべてと MSSA の一部を対象に、薬剤耐性テストと薬剤耐性遺伝子の検出、およびMLST解析を行なった。結果を以下に示す。

(1) 526 株中ブドウ球菌は 254 株検出され(48.3%)、そのうち ***mec***A 陽性を示したのは、***S,aureus***(MRSA) が 6.1%(9/147) 、***S.epidermidis*** が 60.7%(54/89)、 ***S.waneri*** が8.3%(1/12)、***S.haemolyticus***が0%(0/4)、***S.hominis***が0%(0/2)であった。

(2) SCC***mec*** 型は、Ⅳが 75%(48/64)、Ⅴが 7.8%(5/64) 、None Typable (NT) が 17.2%(11/64)で、菌種別にみると、***S.aureus*** ではⅣa が 1 株、Ⅳc、Ⅳl、Ⅴ、NT が各 2 株、***S.epidermidis***ではⅣaが20株、Ⅳcと Ⅳdが5株、Ⅳgが1株、Ⅳ$_{NT}$が11株、Ⅴが3株、NTが9株であった。***S.waneri***ではⅣaが1株検出された。

(3) ACME（***arc***A）陽性は、***S.epidermidis*** にのみ認められ、***mec***A陽性株ではⅠが7株、ΔⅠが2株、Ⅱが1株、陰性株ではⅡが7株、NTが4株の合計21株であった。

(4) PVL陽性を示すものは認められなかった。

(5)コアグラーゼ型別の結果は、MRSA においてⅡa が 44.4%(4/9)と最も高く、Ⅰa とⅢa が22.2%(2/9)、Ⅶbが11.1%(1/9)であったのに対し、MSSA において最も多かったのはⅣa で 22.5%(31/138) 、次いで Ⅶb で 18.8%(26/138)、Ⅹa で 12.3%(17/138)、Ⅴb で10.1%(14/138)、Ⅲaで9.4%(13/138)の順であった。

(6) MRSAのMLST解析では、ST1(1株)、ST5(3株)、ST8(2株)、ST89(2株)、ST120(1株)が検出され、ST8 のうち SCC***mec*** type がⅣl でコアグラーゼ型がⅢaを示す新型が2株認められ、いずれも病原性遺伝子として ***sec***、***sei***、***sel***、***tst-1***、***spj/sasL***が検出された。

(7) MRSA 全株から薬剤耐性遺伝子として ***blaZ***（βラクタマーゼ遺伝子）が検出され、アンピシリン(AMP)耐性を示した。また、***mec***A陽性を示した ***S.epidermidis*** 15 株を対象に調べた結果、いずれも ***blaZ*** が検出され、オキサシリン(OXA)とアンピシリン(AMP)に耐性を示した。

Table 1. Frequency of Staphylocoagulase (*coa*) genotypes and SCC*mec* types in *Staphylococcus aureus* isolates

genotype		No. of isolates		Total
		MRSA	MSSA	
coa				
	Ia	2		2
	IIa	4	8	12
	IIIa	2	13	15
	IVa		31	31
	IVb		3	3
	Va		3	3
	Vb		14	14
	VIa		5	5
	VIIa		8	8
	VIIb	1	26	27
	VIIIa		9	9
	IXa		0	0
	Xa		17	17
	NT		1*	1
		9	138	**147**
SCC*mec*				
	IVa	1		
	IVc	2		
	IVl	2		
	V	2		
	NT	2		

Table 2. Frequencies of isolates with *mecA* (SCC*mec* type) and ACME among different staphylococcal species

Spieces	*mecA*	No. of isolates	ACME		SCC*mec* type								
			No of isolates	ACME type	IVa	IVb	IVc	IVd	IVg	IVl	IVNT	V	NT
S.aureus (n=147)	+	9	0		1		2			2		2	2
	-	138	0										
S.epidermidis (n=89)	+	54	10	I (7), Δ I (2), II (1)	20		5	5	1		11	3	9
	-	35	11	II (7), NT*(4)									
S.waneri (n=12)	+	1	0		1								
	-	11	0										
S.haemolyticus (n=4)	+	0	0										
	-	4	0										
S.hominis (n=2)	+	0	0										
	-	2	0										
total		254	21		22	0	7	5	1	2	11	5	11

* ACME-NT- only copA+

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１件）

1） Mina Hirose, Yukie Murata, Atsushi Fukuda, Yusuke Fujita, Maiko Otomo, Shoko Yahata, Masato Saitoh, Fluoride retention in saliva following toothbrushing using different types of fluoridated dentifrices containing 1500 ppm F of NaF and MFP, Pedatric Denta Journal, 25:45-49, 2015.(査読有り)（DOI：10.1016/j.pdj.2015.04.001）

〔学会発表〕（計２件）

1) Hirose Mina, Aung Meiji, Fukuda Atsushi, Murata Yukie, Kobayashi Nobumichi, Prevalence and genetic characteristics of MRSA and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy children in Japan, 17th Inter national Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Seoul, Korea, August 30-September 2, 2016.

2) Hirose Mina, Fukuda Atsushi, Murata Yukie, Yahata Shoko, Changes in unstimulated salivary factors obtained from preschool children, 10th IADR World Congress on Preventive Dentistry, Budapest, Hungary, October 9-12, 2013.

６．研究組織

(1)研究代表者

廣瀬　弥奈　（HIROSE MINA）
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号：10265077

(2)研究分担者

福田　敦史　（FUKUDA　ATSUSHI）
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：10453276

村田　幸枝　（MURATA YUKIE）
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：90455676

(3)連携研究者

小林　宣道　（KOBAYASHI NOBUMICHI）
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：80186759