

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460804

研究課題名(和文) わが国に出現した新規市中感染型MRSAの蔓延状況と分子疫学的性状の解明

研究課題名(英文) Study on prevalence and molecular epidemiological characteristics of novel community-acquired MRSA that emerged in Japan

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は古くから知られる薬剤耐性菌である。最近日本国内で新たな遺伝子学的特徴を有する2種類のMRSA(新規遺伝子複合体SCCmec-IVIを持つコアグラーゼIII型MRSA、皮膚への付着に関連する遺伝子複合体ACMEを有するコアグラーゼII型MRSA)が報告されたため、北海道の臨床分離菌株における分布状況を調査した。は市中・外来患者由来の菌株では各々3.5%、5.1%、大学病院で分離された菌株では3%、0.9%に検出された。ACMEを保有するMRSAには遺伝学的多様性が見られ、それらの市中、病院への拡がり懸念された。

研究成果の概要(英文)：Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is drug-resistant bacteria known for a long time. Recently, two MRSA clones with novel genetic traits (MRSA harboring SCCmec-IVI which is a novel genetic complex; Coagulase type-II MRSA having ACME which is a genetic complex related to attachment to human skin) have been reported. We investigated their prevalence in clinical isolates in Hokkaido, Japan. These MRSA , were detected in 3.5% and 5.1% of isolates from outpatients of community, and 3% and 0.9% of isolates from a university hospital, respectively. Genetic diversity was found in MRSA with ACME, and their spread in the community and hospitals was concerned.

研究分野：衛生学

キーワード：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 ACME SCCmec-IVI 北海道

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アウトブレイクの発生は、公衆衛生上の主要な問題の一つである。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は1960年代以降世界中に分布が拡大し、今なお最も重要な薬剤耐性菌、院内感染起因菌として存続している。わが国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、米国、南欧諸国などともにMRSAの高汚染国と考えられている。一方、MRSAのうち、病院外すなわち市中において分布する市中感染型MRSA(CA-MRSA)の重要性が1990年代後半より認知され、これが病院感染型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、オーストラリアなどを中心に報告されたが、その後2000年に入ってからヨーロッパ、アジアなどにも分布が広がっていることが明らかとなり、CA-MRSA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。

MRSAは、菌のゲノムに外来性の遺伝子要素であるメチシリン耐性領域(SCCmec)を持つ。CA-MRSAは一部の例外を除きタイプIV、VのSCCmecを保有することが特徴的であり、タイプI~III-SCCmecを持つHA-MRSAと異なる。またCA-MRSAにはPVL(Panton-Valentine leukocidine)を産生する株が多い。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。CA-MRSAは、世界的には遺伝学的に多様なクローンが存在する。遺伝子型(Multilocus sequence typing, MLST)による分類では、北米ではST8型、ヨーロッパではST80型、台湾ではST59型が優勢なクローンとして知られ、それらは世界的に分布が拡大しつつある。特に米国で顕著な増加が見られたST8型CA-MRSA(別名USA300)クローンはアルギニン代謝系可動性遺伝子構造(ACME)をゲノム中に有し、これが組織への強い定着性を付与するとされ、このクローンの蔓延に関与していると推測されている。

米国に蔓延したUSA300クローンは世界中に分布が拡大しつつあり、わが国でも2007年以降散発例を中心に検出が報告されるようになった。我々は北海道におけるCA-MRSAの調査を2009年以降行ない、2009年から2011年の間USA300クローンを初めて同定し、その後も断続的に検出を確認し、日本においてもUSA300クローンが伝播し感染が維持されていることを明らかにした。それと同時に、USA300に類似しつつも異なる2種類のクローン、すなわちST8に属するもPVLを持たないMRSA、病院感染型MRSAに多い遺伝子型ST5(およびそれに遺伝的に近いST764)に属しACMEを有する株(PVL陰性)が検出されたことに注

目していた。ところが時期を同じくして、それらと同様の性状を持つST8、ST764株が日本国内で他の研究グループによっても報告された。それらはわが国で出現した新規のCA-MRSAと考えられ、すでに国内に広く浸淫していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、わが国で出現した新規CA-MRSAの蔓延状況を、市中分離株および病院分離株を対象として明らかにすることである。日本で出現したと報告された新規CA-MRSAは、次の2種類である。第一は、PVL陰性でST8に属するMRSA(ST8-CA-MRSA/J)である。このクローンは2003年以降、日本(本州および九州)、香港で分離され、USA300と異なるのはPVL遺伝子陰性であることと新規のSCCmec(SCCmecIV)および細胞表面蛋白をコードするsasL遺伝子をゲノム中に持つ点である。第二は、ST764-CA-MRSAであり、PVL陰性であるがACMEを持つのが特徴である。市中感染症におけるCA-MRSAの分布に関する調査を、本研究の実施期間内で、市中の臨床検査センター等からの臨床分離株(CA-MRSAが多数含まれる)を対象として行う。また近年、市中におけるCA-MRSAが病院に持ち込まれ、院内での流行、定着が報告されていることから、病院内でのCA-MRSAの分布にも注目する必要がある。そこでPVL遺伝子、タイプIV、V-SCCmec、ACME遺伝子をマーカーとして、大学病院での臨床分離株を対象にCA-MRSAの特徴を有する菌株の存在と頻度を調査する。また検出された新規CA-MRSAについて、遺伝子型、薬剤耐性、および保有する病原因子、薬剤耐性遺伝子を明らかにするとともに、PVL、ACMEなどの遺伝子学的特徴について解析を行う。

3. 研究の方法

北海道内の外来患者の臨床材料より分離されたMRSA株(2013-2014年)および札幌医科大学附属病院からの臨床分離株(2011-2014年)を研究対象とした。全菌株を対象に、mecA遺伝子の検出とSCCmec型別、PVL遺伝子・ACME(arcA)遺伝子の検出、コアグラーゼ遺伝子型別を多重PCR法により行う。型別の結果より新規CA-MRSAと推定される菌株を含め、代表的な菌株に対し、MLSTによるST、spa-type等、各種遺伝子型を決定する。また各種病原因子遺伝子、付着蛋白遺伝子、sasL遺伝子、薬剤耐性遺伝子等、計約60種類の遺伝子をPCRにより検出する。ACMEの遺伝子型の同定、ACMEとSCCmecの相対的な位置関係の解析をPCRのプロファイルによって行う。その結果、既知のものとは異なる、または新規と考えられる場合には、SCCmec-ACME領域の遺伝子配列を解析する。主要な薬剤に対する感受性

(MIC)を微量液体希釈法により測定する。これらの解析データを各菌株に関する患者の属性(性別、年齢、疾患、材料等)と合わせ、わが国特有の新規 CA-MRSA クローンの特徴を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 外来患者由来 MRSA の解析

北海道各地の医療機関における外来患者から分離同定された MRSA 624 株を研究対象とした。大部分の株(577 株、92.5%)は PVL、ACME とともに陰性であった。その多く(407 株、70.5%)が SCCmec-II を持ち、コアグラゼ型 II 型(*coa-IIa*)に属していた。その他の MRSA では SCCmec-IVa (69 株)、SCCmec-IVl (24 株)、SCCmec-V (29 株)などが検出された。SCCmec-IVl/*coa-IIIa* に型別されたのは 22 株(3.5%)であった。

PVL 陽性株は 11 株あり、うち 9 株は ACME I を保有していた。これら PVL+/ACME+株は SCCmec-IVa を有し、コアグラゼ遺伝子型 IIIa (*coa-IIIa*)、*agr-I*、*spa-t008*、ST8 に属していたため USA300 と同じクローンであると考えられた(検出率 1.4%)。PVL 陰性でかつ ACME 陽性の菌株は 36 株(5.8%)検出され、いずれも *coa-IIa* に属し、このうち 32 株(全体の 5.1%)は SCCmec-II、4 株は SCCmec-V を持っていた。これらの ACME はすべて II'型(ACME II')であった。

全被検菌株の中から、PVL+/ACME+ (9 株)、PVL+/ACME- (2 株)、PVL-/ACME+ (15 株: SCCmec-IIa 12 株、SCCmec-V 3 株)、PVL-/ACME- (5 株)の計 31 株について詳細な解析を行った。PVL-/ACME-株では新規の SCCmec-IVl サブタイプを有していた 5 株を解析に加えた。USA300 クローン以外の PVL 陽性株 2 株は ST30 と ST59 に属していた。PVL-/ACME+ 15 株は *coa IIa*、*agr II* に属していたが、ST は ST5 (7 株)と ST764 (8 株)に分けられた。(ST764 は ST5 の single locus variant) SCCmec-V 株はいずれも ST5 に属していた。これら 15 株の ACME はすべて ACME II'であったが、SCCmec-ACME 複合体は大きく 5 つ(ii, iii, iv, v, vi)に分類された。(i 型は USA300 クローンのもの指す。)これらのうち ii 型(25 株)は既報での variant A2(11 株)と A3(14 株)、iii 型(5 株)は B1 の構造と一致していた。v、vi 型(各々 2、1 株)は今回新規に同定された CI であった。v 型では ii 型で見られる ACME II' と SCCmec II の間に SCC4610 様の遺伝子要素が挿入され、vi 型では *orfX* と ACME II' の間に、SCC266 様の遺伝子要素が挿入されていた。iv、v、vi 型の菌株では *speG* が検出された(iv 型の 1 株を除く)。v、vi 型の株では、SCC4610 様、SCC266 様遺伝子要素の中に *speG* が含まれていた。

今回の研究では SCCmec-IIa を持つ *coa-*

IIa の MRSA、すなわち病院感染型 MRSA (HA-MRSA) の New York/Japan クローンと同じ株が多くを占め、ST8(USA300 clone)、ST59 (Taiwan clone)は低率であった。これらは米国や台湾からの世界的な拡大が懸念されてきた MRSA であるが、日本(北海道)においてはあまり広がっていないと考えられる。それに対し、ACME II'を持つ SCCmec-IIa/*coa-IIa* MRSA の検出は特徴的であり、SCCmec-IIa の中では 2008 年の 0.86% から 2014 年の 10.5%へと増加している。このことは、HA-MRSA および CA-MRSA の中で最も多い SCCmec-IIa/*coa-IIa* クローンの一部が ACME (ACME II')を獲得し、それにより皮膚へのより高い定着能を持った株が徐々に分布を拡大していることを示唆する。また ACME-SCCmec 複合体には 5 つの型、その ii 型には 2 つの variant が見られ、SCCmec-IIa MRSA の遺伝学的多様性が広がっていると思われる。ii 型 ACME-SCCmec 複合体のうち、A2 variant より短い A3 variant が多く見られたことは、菌のゲノムにとって生物学的負荷が少ない(短い)CI(A3 variant)を持つ菌株が増加の傾向にある可能性が考えられた。また、USA300 の ACME I において特徴的であった *speG* が、SCCmec-IIa/V、ST5 MRSA (5 株)で検出されたことは興味深い。それらの菌株は ACME に加え、*speG* の存在により、ヒトの皮膚に対しさらに高い定着能を有している可能性が考えられ、今後の動向には注視する必要がある。

今回解析した SCCmec-IVl を有する MRSA (PVL-/ACME-、24 株; 3.8%)は、いずれも ST8、大部分が *coa-IIIa* に属し、細胞表面蛋白遺伝子 *sasL* を保有していた。これらの特徴は、我が国固有の MRSA として報告された CA-MRSA/J と同じであり、北海道においてもこのクローンが分布していることが明らかとなった。今回 ST まで調べたのは 5 株であったが、*sasL* 陽性の *coa-IIIa* 株は 22 株(全体の 3.5%、*coa-IIIa* 中 30%)あり、これらは CA-MRSA/J と考えられた。

(2) 病院由来 MRSA の解析

本学附属病院からの臨床分離株計 1041 株を研究対象とした。うち入院患者由来株が 87% を占めた。PVL+/ACME+株は 3 株(0.3%)で、SCCmec-IVa を有し、コアグラゼ遺伝子型 IIIa (*coa-IIIa*)、*spa-t008*、ST8 に属していたので USA300 クローンと考えられた。ACME 陰性で PVL 陽性株は 2 株であった。PVL-/ACME+は 9 株(0.9%)であり、いずれも SCCmec-IIa を持ち *coa-IIa*、*spa-t002* に属し、ST は ST5 (2 株)または ST764 (7 株)に分類された。ACME 遺伝子型は II'が 5 株であったが、残りは I の変異型と考えられ、現在解析中である。

PVL 陰性、ACME 陰性株の大部分(86%)は SCCmec-IIa を保有していたが、それに次

いで多かったのは SCCmec-IVl (32 株、3%) で *coa-IIIa* に属していた。SCCmec-IVl 株のうち解析された 5 株は ST8 と型別されたが、*spa*-type には 3 種の型が同定された。いずれの菌株も多数の病原因子遺伝子、付着蛋白遺伝子を有していた。

(3) 新規 CA-MRSA 検出の要約

本邦で出現したと考えられる新規 CA-MRSA は、PVL-/ACME-、SCCmec-IVl、ST8/*coa-IIIa*、PVL-/ACME+、ST764/*coa-IIa* の特徴を有する。それらの MRSA (ST 未同定株を含む) の検出率は、市中感染・外来患者由来株で各々 3.5%、5.1%、大学病院分離株では 3%、0.9%であった。頻度はまだ低いものの、市中、病院分離株のいずれにおいても検出され、また市中分離株のほうでより高い検出率が認められた。また市中分離株、病院分離株ともに、ACME 型または SCCmec-ACME 複合体に遺伝学的多様性がみられたことは、これらのクローンが盛んに増殖、伝播を繰り返していることを示唆している。これらの MRSA は欧米での報告はなく、日本においてのみ知られているものであるが、アジアにおいては分子疫学的研究が行われていない地域を含め分布している可能性があり、その拡がりを今後明らかにする必要がある。またこれらの MRSA 株は多数の病原因子、付着因子、薬剤耐性遺伝子を有し多くの薬剤へ耐性を示すが、臨床的意義についてはまだよく分かっておらず、今後継続的な調査が望まれる。

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 11 件)

1. Aung MS, Zi H, New KM, Maw WW, Aung MT, Min WW, Nyein N, Kawaguchiya M, Urushibara N, Sumi A, Kobayashi N. Drug resistance and genetic characteristics of clinical isolates of staphylococci in Myanmar : high prevalence of PVL among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* belonging to various sequence types. *New Microbes and New Infections*, 2016, 10:58-65. doi: 10.1016/j.nmni.2015.12.007
2. Urushibara N, Kawaguchiya M, Onishi M, Mise K, Aung MS, Kobayashi N. Arginine catabolic mobile elements in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) genotype ST5-MRSA-II and ST764-MRSA-II in Japan: novel structures and temporal changes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60:3119-3122. doi: 10.1128/AAC.02356-15
3. Pokhrel RM, Aung MS, Thapa B, Chaudhary R, Mishra SK, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Detection of ST772 Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Bengal Bay clone) and ST22 *S. aureus* isolates with a genetic variant of elastin binding protein in Nepal. *New Microbes and New Infections* 2016, 11:20-27. doi: 10.1016/j.nmni.2016.02.001
4. Togashi A, Aung MS, Yoto Y, Akane Y, Tsugawa T, Kawaguchiya M, Tsutsumi H, Kobayashi N. First report of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST88 harboring Sa2usa isolated from refractory breast abscesses in Japan. *New Microbes and New Infections*, 2016, 13:62-64. doi: 10.1016/j.nmni.2016.06.006
5. Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Sumi A, Ito M, Kudo K, Morimoto S, Hosoya S, Kobayashi N. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from outpatients in northern Japan : increasing tendency of ST5/ST764 MRSA-IIa with arginine catabolic mobile element (ACME II'). *Microb Drug Resist*, 2017, 23:616-625. doi: 10.1089/mdr.2016.0176
6. Togashi A, Aung MS, Yoto Y, Tsugawa T, Sueoka H, Kawaguchiya M, Tsutsumi H, Kobayashi N. Septic arthritis caused by an emerging ST121 methicillin-susceptible, PVL-negative *Staphylococcus aureus* harboring a variant of bone sialoprotein-binding protein gene. *New Microbes and New Infections* 2017, 24:19:17-18. doi: 10.1016/j.nmni.2017.05.010
7. Aung MS, San T, Aye MM, Mya S, Maw WW, Zan KN, Htut WHW, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Prevalence and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* isolates harboring Pantone-Valentine leukocidin, enterotoxins, and TSST-1 genes from food handlers in Myanmar. *Toxins* (Basel). 2017, 9. pii: E241. doi: 10.3390/toxins9080241
8. Minami K, Terakawa R, Sato M, Shoji Y, Hiroma T, Nakamura T, Horiuchi A, Otsuka A, Kubota N, Hidaka E, Kawakami Y, Aung MS, Kobayashi N. A Colonization Outbreak of Penicillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Ward of Children's Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018, 39(2):239-241. doi: 10.1017/ice.2017.266
9. Edslev SM, Westh H, Andersen PS, Skov R, Kobayashi N, Bartels MD, Vandenesch F, Petersen A, Worning P, Larsen AR, Stegger M. Identification of a PVL-negative SCCmec-IVa sublineage of the

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA. Clin Microbiol Infect, 2018, 24:273-278. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.022
10. 小林宣道、川口谷充代、漆原範子、メイジソウアウン . グローバル感染症と薬剤耐性菌対策の動向 ~ 最近の MRSA、薬剤耐性肺炎球菌の特徴について ~ . 産業医学ジャーナル、2017、40:52-57 .
 11. 佐藤多嘉之、高橋一人、酒井好幸、メイジソウアウン、小林宣道 . ウシからの由来が推定される黄色ブドウ球菌による感染性心内膜炎の 1 例 . 日本臨床微生物学雑誌、2018. 28 : 42-47.
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Panton-Valentine leucocidin (PVL) / Arginine catabolic mobile element (ACME)-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the community and the hospital in Japan. The 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections (ISSSI). Seoul, 2016.
 2. Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Molecular epidemiological characterizations of MRSA isolates harboring PVL genes and/or ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido, northern main island of Japan. The 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections (ISSSI). Seoul, 2016.
 3. Kobayashi N, Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Pokhrel RM, Thapa B. Genetic characterizations of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* in Nepal : detection of ST772 MRSA (Bengal Bay clone) and ST22 isolates with elastin-binding protein gene variant. The 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections (ISSSI). Seoul, 2016.
 4. Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Molecular epidemiological characterizations of MRSA isolates harbouring PVL genes and/or ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido, northern main island of Japan. 16th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection, Melbourne, Australia , 2016.
 5. Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from outpatients in Hokkaido, Japan. 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS, 2017), Singapore, 2017.
 6. Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Variation in ACME-SCCmec composite elements in MRSA clinical isolates in the CC5 lineage in Japan. 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS, 2017), Singapore, 2017.
 7. Kobayashi N, Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Sumi A, Quiñones D. Molecular epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from community in northern Japan. Simposio internacional resistencia antimicrobiana: perspectivas actuales frente al enfoque “una salud”. Congreso “80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kouri”, IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, VI Congreso Nacional de Medicina Tropical, VI Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. Havana, Cuba, 2017.
 8. アウンメイジソウ、サン ティダ、川口谷充代、漆原範子、小林宣道 . ミャンマーにおける食品取扱業者由来の黄色ブドウ球菌およびアルジェンテウスブドウ球菌の遺伝子型と病原因子 . 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年、仙台 .
 9. 小林宣道、アウンメイジソウ、川口谷充代、漆原範子 . 北海道における ACME (アルギニン代謝系可動性遺伝子要素) 保有 MRSA の分子疫学的研究 . 第 87 回日本衛生学会総会、2017 年、宮崎 .
 10. 漆原範子、川口谷充代、アウンメイジソウ、小林宣道 . 本邦での黄色ブドウ球菌ゲノム中の ACME (アルギニン代謝系可動性遺伝子要素) . 第 62 回日本ブドウ球菌研究会、2017 年、十和田 .
 11. メイジ・ソウ・アウン、漆原範子、川口谷充代、小林宣道 . Molecular epidemiology of MRSA isolates harbouring PVL genes and/or ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido . 第 62 回日本ブドウ球菌研究会、2017 年、十和田 .
- 〔図書〕
- なし
- 〔産業財産権〕
- なし
- 〔その他〕
- ホームページ等
<http://web.sapmed.ac.jp/hygiene/index.html>

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

鷺見 紋子 (SUMI Ayako)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10363699

漆原 範子 (URUSHIBARA Noriko)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80396308

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

川口谷 充代 (KAWAGUCHIYA Mitsuyo)
アウン メイジソウ (AUNG Meijisoe)
伊藤 政彦 (ITO Masahiko)
品川 雅明 (SHINAGAWA Masaaki)