

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

MDRP、MRSA 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究

研究分担者	飯沼由嗣	（金沢医科大学・臨床感染症学・教授）
研究協力者	鈴木匡弘	（愛知県衛生研究所・細菌研究室・主任研究員）
研究協力者	馬場尚志	（金沢医科大学・臨床感染症学・准教授）

研究要旨

本研究では、施設内感染伝播に関わる MDRP や MRSA の菌株 (danger strain) を遺伝学的に解析し、感染伝播防止対策の確立を目指す。北陸地区のサーベイランスにて収集された市中感染型 MRSA (CA-MRSA) の病原因子および遺伝子型の解析を行った。その結果、伝染性膿痂疹から検出される ETA 陽性の MRSA は、小児における主要な CA-MRSA クローンとなっていた。さらに、これらの株も含めて、全ゲノムシーケンス解析をおこなったところ、ETA 陽性 MSSA に *SCCmec* が挿入され、成立した CA-MRSA クローンであることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、施設内あるいは施設を超える院内感染伝播や予後不良に関わる MDRP や MRSA の菌株 (danger strain) を遺伝学的に解析し、その簡易同定法の開発および感染伝播防止対策の確立を目指す。本年度は、北陸地区の薬剤耐性菌サーベイランスにて収集した市中感染型 MRSA (CA-MRSA) の解析をすすめた。また、高頻度に検出され施設地域を超えて分離される POT 型の MRSA について、全ゲノムシーケンスを用いて解析を行った。

B. 研究方法

1) CA-MRSA 解析

1. 菌株収集

北陸地区の薬剤耐性菌サーベイランスにて外来患者分離 MRSA を収集した (約 400 株)。

2. 病原因子の解析

Panton-Valentine leukocidin (PVL)、Arginine catabolic mobile element (ACME)、Exfoliative toxin A,B (ETA, ETB)、Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 遺伝子の PCR 法による検出を行った。

3. 菌株相同性解析

PCR-based open-reading frame typing (POT) 法を用いて菌株の相同性解析を行った。

2) 全ゲノムシーケンスによるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の解析

1. 使用菌株

POT 法で選別された臨床分離 MRSA 18 株を用いた。解析には主に外来患者から分離された菌株を用いた。内訳は NY/Japan クローン (推定 CC5) として POT 型 93-223-117 (2010 年分離 3 株、2013 年分離 3 株) および POT 型 93-201-103 6 株 (2005 年分離 1 株、2007 年分離 2 株、2012 年分離 2 株、2013 年分離 1 株) CA-MRSA として POT 型 70-18-81 5 株 (2007 年分離 2 株、2012 年分離 3 株、全て ST121) POT 型 6-18-81 2003 年分離 1 株 (ST121) である。このうち POT 型 6-18-81 は 70-18-81 と近縁関係が予想される MSSA である。

2. MiSeq シークエンサーによる全ゲノムシーケンス (WGS) 解析

シーケンサーから得られたデータは Abyss (Genome Res. 19:1117-1123, 2009) にて contig を作成し、MUMer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いて single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し、FastTree (PLoS ONE, 5(3):e9490, 2010) で系統樹解析し、MEGA5 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011) で系統樹の描画を行った。また得られた contig は CONTIGuator (Source Code for Biology and Medicine 6:11, 2011) を用いて Mu50 株全ゲノム

データにマッピングを行った。また参考のため、POT 型 70-18-81 のデータは Mu50 にマッピング、整列した contig に POT 型 6-18-81 を再マッピングし、比較した。

倫理面への配慮 臨床データを不可逆的に切り離した菌株のみを扱う研究であり、倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果

1) CA-MRSA 解析

1. 病原性因子保有株の解析

PVL 保有株は 2 株のみであった。いずれも膿検体から検出され、それぞれ POT 型は 110-16-49, 104-27-113 となった。一方 ACME 保有株は 13 株 (3.2%) あり、12 株が POT1=93 すなわち NY/Japan クローン (推定 CC5) と推測された。さらにこのうち 6 株は TSST-1 も陽性となった。POT1=93 の株のうち、TSST-1 陰性の 6 株 (93-153-127 が 2 株、93-191-103 が 4 株) は、Takano ら (AAC 57:1589-95, 2013) が報告した ST764 クローンの可能性が示唆された。

ETA 保有株は 44 株 (10.9%) に対して、ETB 保有株は 6 株 (1.5%) にとどまった。また TSST-1 保有株は 103 株 (25.4%) に及んだ。ETA 陽性株の内 26 株が小児・新生児由来株であり、23 株が皮膚・膿検体由来であった。また小児・新生児株は POT 型 70-18-81 (推定 CC121) となった。一方 TSST-1 陽性株では 25 株が小児・新生児由来株であり、POT1=106 (推定 CC8) が 20 株と多かった。

2. 小児由来 CA-MRSA の解析

上記結果より小児由来 CA-MRSA に流行クローンの存在が示唆されたため、10 才未満の小児由来の CA-MRSA 株について更に解析をすすめた。なお、CA-MRSA の定義は、CDC の定義を用いた。この結果 62 株が対象となった。

62 株の病原性因子解析では、PVL および ACME 保有株が各 1 株 (1.6%) ずつ、ETA 保有株が 24 株 (38.7%)、ETB 保有株が 3 株 (4.8%)、TSST-1 保有株が 18 株 (29.0%) となった。

POT 解析では、POT1=70 (推定 CC121) が 30 株 (48.4%) と最も多く、次に POT1=106 (推定 CC8) が 24 株 (38.7%)、POT1=65 (推定 CC89) および

93 (推定 CC5) がそれぞれ 2 株 (3.2%) ずつとなった。

地域において集積がみられた POT 型、病原性因子の組合せは、POT 型 70-18-81, ETA 陽性が 23 株 (37.1%) と最も多かった。次に POT 型 106-9-80、TSST-1 陽性が 7 株 (11.3%) となった。POT1=106, TSST-1 陽性株は全 13 株となった (表 1)。

2) 全ゲノムシーケンスによる MRSA の解析

SNP によるデンドログラム解析の結果、すべての POT 型株において、POT 型が同一の分離株は近縁関係にあり、クラスタを形成していた (図 2, 図 3)。しかし、系統樹と分離年代に、明確な相関は認められなかった。また、Mu50 株に contig をマッピングした結果、Mu50 株と今回解析した NY/Japan クローンとの主な差異は溶原ファージと pathogenicity island であった (図 4)。また、CA-MRSA POT 型 70-18-81 の 5 株と 6-18-81 の MSSA 間の主な違いは SCCmec の有無だけであった (図 5)。

D. 考察

本年度は CA-MRSA の解析を中心に行った。北陸地区のサーベイランスにて検出された菌株のうち、ACME 陽性株は 13 株あり、うち POT1=93 かつ TSST-1 陰性株については、NY/Japan クローン類似の遺伝子学的背景をもつ流行クローンである ST764 クローンの可能性が示唆された。さらに解析をすすめる予定である。

小児由来 CA-MRSA 株では、POT 型 70-18-81 (推定 CC121) ETA 陽性株が最も多く、次に POT1=106 (推定 CC8) TSST-1 陽性株が次につづいた。これらの市中流行株の遺伝子解析について、次世代シーケンスを用いた全ゲノムシーケンスによる解析を行うこととした。

全ゲノムデータを元にした SNP 解析によって、高精度の分子疫学解析が可能であった。その一方、今回の検討では SNP 抽出の正確性などの検討が不十分であることから、信頼性の検討を行う必要がある。また、ファージ構造については詳細な検討ができていないことから、ファージについてもシーケンスデータを精査し、POT 型との関係を明確にする必要がある。

CA-MRSA POT 型 70-18-81 (推定 CC121) は元々日本に存在した同じ遺伝子型の MSSA に SCCmec が

挿入されて、成立したクローンと考えられた。現在では小児から分離される、伝染性膿痂疹関連 CA-MRSA としては主要なクローンとなっており、メチシリン耐性獲得が同クローンの拡散に貢献した可能性が示唆された。

E. 結論

伝染性膿痂疹から検出される ETA 陽性の MRSA は、小児における主要な CA-MRSA クローンとなっている。全ゲノムシーケンス解析により、元来 ETA 陽性 MSSA に *SCCmec* が挿入され、成立した CA-MRSA クローンであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他 臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析、第 87 回日本感染症学会総会 (2013 年 6 月) 横浜市
- 3) linuma Y, Baba H, et al. Multicenter survey of the antibiotic susceptibility of anaerobic Gram-negative bacilli in Japan. ID WEEK (Oct, 2013) San Francisco, USA
- 4) Baba H, linuma Y, et al. Antimicrobial resistance in Hokriku District, Possible

spreading of exfoliative toxin A-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan as the dominant clone of community-associated MRSA among children. ID WEEK (Oct, 2013) San Francisco, USA

- 5) 金谷和美、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における嫌気性グラム陰性桿菌に関するサーベイランス、第 25 回日本臨床微生物学会総会 (2014 年 1 月) 名古屋市
- 6) 新川晶子、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における黄色ブドウ球菌及び肺炎球菌の薬剤耐性について、第 25 回日本臨床微生物学会総会 (2014 年 1 月) 名古屋市
- 7) 坂上有貴子、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における ESBL 産生腸内細菌および薬剤耐性緑膿菌の検出状況、第 25 回日本臨床微生物学会総会 (2014 年 1 月) 名古屋市
- 8) 早川恭江、鈴木匡弘、他、耐性緑膿菌に対する分子疫学解析、第 29 回日本環境感染学会総会 (2014 年 2 月) 東京都
- 9) 鈴木匡弘、他、薬剤耐性菌の分子疫学解析法開発、第 87 回日本細菌学会総会 (2014 年 3 月) 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

【データ保護のため非表示】

【データ保護のため非表示】