

## 別紙

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）  
平成 26 年度 分担研究総合報告書

### 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

本研究では次世代シーケンサーを利用したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の分子疫学解析の可能性を検討した。一塩基多型（SNP）による系統樹解析によって、集団感染株を識別可能であることが示された。

#### 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。次世代シーケンサーが登場し、細菌の全ゲノム塩基配列を分子疫学解析に利用することが可能となってきた。本年度は、臨床分離された集団感染由来のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）をゲノム解析し、一塩基多型（SNP）を利用した系統樹解析による分子疫学解析の可能性を検討した。

#### B. 研究方法

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(表1)使用した菌株はすべて Cica Geneus Staph POT kit (関東化学)を用いて遺伝子型を決定し、全ゲノム解析株選別の参考とした。  
事例1：NY/Japan クローンの臨床分離 MRSA 34 株を用いた。内訳としては集団感染由来株(14 株)および散発事例から分離された菌株(20 株)。  
事例2：ST1、SCC*mec* type IV の臨床分離 MRSA 15 株。内訳としては集団感染由来株(8 株)および POT 型から散発事例と判断された 7 株。

2. MiSeq シーケンサーを用いて解析した。得られたデータは Abyss (Genome Res. 19:1117-1123, 2009)にて contig を作成し、MUMmer (Genome Biology, 5:R12, 2004)を用いて single

nucleotide polymorphisms (SNPs)を抽出した。Genomic islands および SNP 集積が見られた領域を除いたコアゲノムから得られた SNP を用いて、RAxML(Bioinformatics, btu033, 2014)で系統樹解析し、MEGA6 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011)を用いて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。

倫理面への配慮 臨床データを不可逆的に切り離れ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

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

事例1：SNP による系統樹解析の結果、集団感染事例由来株はきわめて近縁な関係にあり、同一集団事例内における SNP 数は 4-19 個であった。また、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1)。しかし、同一 POT 型株でも散発事例由来株間の SNP 数は 21-67 個と多かった。さらに 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2)。

事例2： SNPによる系統樹解析の結果、集団感染事例由来株は近縁な関係にあり、同一集団事例内における SNP 数は 14-50 個であった。ST1 のクローンでは POT 型とデンドログラムの間に明確な相関関係は見られなかった(図3)。

#### D. 考察

全ゲノムデータを元にした SNP による系統樹解析によって、高精度の分子疫学解析が可能であった。その一方、クローンによって SNP の入り方に差があることが示唆され、集団感染事例を解析する際、同一集団と判定するための SNP 数の閾値を特定の値に設定することは困難であると考えられた。クローン間で SNP 数に差が出た原因としては、コアゲノムの選択による変動が含まれた可能性がある。

全ゲノム解析による分子疫学解析は未だ報告事例が少ないため、データを蓄積し、集団感染と判断するための判断基準を作成する必要があると考えられた。

#### E. 結論

全ゲノム配列を利用した SNP による系統樹解析によって、高精度に分子疫学解析できる可能性が示されたが、院内感染時の分子疫学解析に使うには、データの蓄積が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 松浦香里、飯沼由嗣、他 多剤耐性緑膿菌の検出におけるクロモアガー-MDRP スクリーン培地の基礎検討 医学検査 62:64-68, 2014.
- 2) 飯沼由嗣 医療関連感染と制御 2 医療関連感染で問題となる病原微生物・感染性因子の制御(1)細菌 防菌防黴 42:517-515, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) 飯沼由嗣、馬場尚志、他 北陸地区における嫌気性グラム陰性桿菌の感受性サーベイランス. 第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会

(2014 年 6 月) 福岡

- 2) 馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区におけるカルバペネム耐性緑膿菌に関する疫学的検討. 第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会(2014 年 6 月) 福岡
- 3) Suzuki M, Iinuma Y, et al. Development of a PCR-based molecular epidemiology method for *Pseudomonas aeruginosa*. IUMS2014 (July 2014) Montreal, Canada
- 4) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 次世代シーケンサーによる MRSA 集団感染事例の解析、第 43 回薬剤耐性菌研究会 (2014 年 10 月) 加賀市
- 5) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 次世代シーケンサーによる MRSA 集団感染事例の解析、第 26 回日本臨床微生物学会 (2015 年 1 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

表1 全ゲノム解析に用いた菌株

	POT 型	株数	備考
事例 1	93-190-127	8	集団感染事例
	93-190-127	6	集団感染事例
	93-223-117	6	散発事例
	93-201-103	6	散発事例
	93-136-103	1	散発事例
	93-254-99	1	散発事例
	93-138-98	1	散発事例
	93-136-2	1	散発事例
	93-191-103	1	散発事例
	93-209-25	1	散発事例
	93-201-35	1	散発事例
	93-145-56	1	散発事例
事例 2	106-183-32	5	集団感染事例
	106-183-33	3	集団感染事例
	106-183-32	2	散発事例
	106-183-37	2	散発事例
	106-183-41	2	散発事例
	106-183-45	1	散発事例

図1 NY/Japan クローンの全ゲノム SNP による系統樹解析

事例1 (NY/Japanクローン)

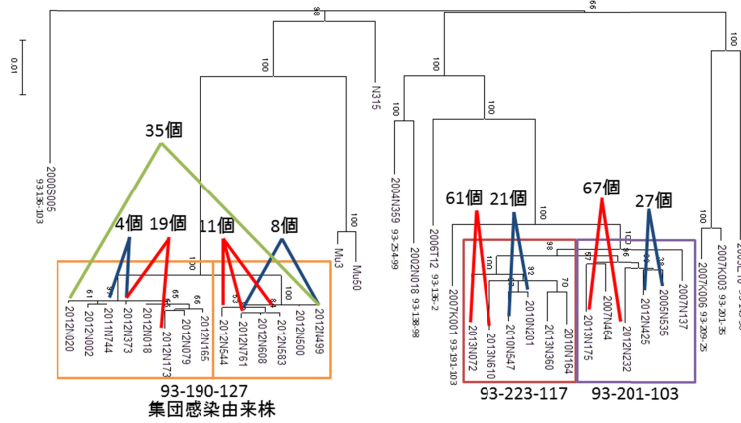
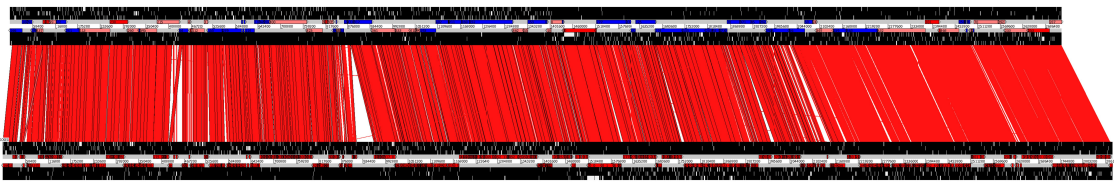


図2 NY/Japan クローン株データの Mu50 株データへのマッピング

POT 型 93-201-103 (2005N535 株)



Mu50

図3 ST1 SCCmec type IV の全ゲノム SNP による系統樹解析

事例2 (ST1 SCCmec type IV)

