

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 24-26 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、MDRP 等の薬剤耐性菌の感染伝播様式の解析のため、再現性が高く実施が比較的容易な分子疫学解析法の開発及び評価を目的とした。菌株毎に保有状態の異なる open reading frame(ORF)の臨床分離株における保有パターンに関する研究を行い、緑膿菌においては ORF の保有パターンが菌株毎に異なることを発見し、ORF 保有パターンにもとづく菌株タイピング開発の可能性が示された。また、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を目指す。新たなタイピング法としての質量分析装置（MALDI-TOF MS）による MRSA および緑膿菌の解析を試みた。また、緑膿菌の PCR を用いたタイピング法（PCR-based ORF typing (POT)法）の MLST や PFGE 法との比較検討を行った。MRSA に関しては、地域サーベイランスによる小児流行 MRSA クローンの同定解析、さらには次世代シーケンサーを用いた解析を行い、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

1) MALDI-TOF（ブルカー社）を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. MRSA POT 法で同一パターンを示し、施設内伝播が疑われる MRSA 臨床分離株を用いて、MALDI-TOF による質量分析解析を行った。

2. POT 法にて遺伝子型の判明している緑膿菌保存株について同様に質量分析解析を行った。

3. 通常同定に加えて、波形パターンの解析を専用ソフトウェアである ClinPro Tools を用いて行った。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 1 医療機関にて 7 ヶ月間に連続して分離された緑膿菌 214 株を POT 法で解析し、緑膿菌の遺伝子型の多様性を評価した。

2. 臨床分離株および ATCC 標準株の合計 179 株を MLST 解析し、POT 法による結果と比較した。

3. 臨床分離株 183 株（集団感染 2 事例を含む）を PFGE 解析し、POT 法と比較した。

3) 小児由来 CA（市中感染）MRSA の解析

北陸地区の地域サーベイランスにより、小児 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 CA-MRSA 株 62 株について解析をすすめた。

4) 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 3）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。

事例 3：市中感染型 MRSA として ST121、SCC*mec* type V の株を 12 株および対照として ST121 のメ

チシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 10 株を用いた。MSSA のうち POT 型 6-18-81 は 70-18-81 と近縁関係が期待される株である。

2. MiSeq シークエ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。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) MALDI-TOF (ブルカー社) を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. POT 型で分類される 6 グループ (それぞれのグループに 2~10 株の同一 POT 型の MRSA 菌株あり) の質量分析波形パターンを解析した。それぞれのグループ間でのパターンはよく保存されており、同一遺伝子型の MRSA は同一質量分析パターンを示す傾向がみられた。一方で、異なる POT 型の株においても多くの波形が類似しており、遺伝子型毎の特徴的な波形を見いだすことは容易ではなかった (図 1)。

2. 緑膿菌については、菌種同定については良好な判定が可能であったが、同一の遺伝子型の菌においても多様性が高く、質量分析による株レベルでの判定は困難であった。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 7 ヶ月間に分離された緑膿菌は 132 の POT 型に分類された。同一 POT 型となった株数は POT

型 823-0 が 15 株と最も多く、次いで 646-48 の 9 株、28-16 および 634-0 の 6 株と続いた。他の 178 株は 128 の POT 型に分けられた。同一 POT 型株が多く見られた 823-0 と 646-0 については病院内の水平伝播が強く疑われた。

2. MLST 解析との比較から POT 型の最初の数値 (POT1 値) と MLST 解析による clonal complex (CC) 型との相関が見られた。52 種類の POT1 値は CC 型との間に 1 : 1 の関係が見られた (表 1)。一方 20 種類の POT1 値には複数の CC 型が含まれた (表 2)。

3. PFGE 解析に用いた 183 株は POT 法では 76 遺伝子型に分けられた。POT 法による菌株識別能力は PFGE 法で homology 80% を同一とした場合 (68 遺伝子型) と同等かやや上回っていた。集団感染由来株はおおのこの事例内で同一 POT 型となった (図 2)。一方 PFGE 解析では同一集団感染由来株のホモロジーは 78.99% ~ 93.97% となった。

3) 小児由来 CA (市中感染) MRSA の解析

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%) づつ、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 4)

4) 全ゲノムシークエ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 4)。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5)。

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6)。

事例3: SNPによる系統樹解析によって ST121 の MRSA と MSSA は異なるクラスタに分かれたが(図7)、6-18-81 の MSSA は MRSA と最も近い位置に来た。また、MRSA 70-18-81 と 6-18-81 の MSSA 間の主な違いは SCCmec の有無だけであった(図8)。

D. 考察

MALDI-TOF による質量分析解析結果から、MRSA については専用ソフトを用いる事により、疫学的な解析が可能となる可能性が示された。一方で、本研究課題の目的である danger strain の判定については、さらなる菌株解析が必要であると考えられた。緑膿菌については、解析時の菌株の調整方法など、波形データの安定性を高める処理が必要であると考えられた。

緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね PFGE パターンのデンドログラム解析による homology 80%程度に相当した。これは MLST 解析の識別能力とほぼ一致する菌株識別能力と考えられるが、CC 型との相関を想定して設計した POT1 値が主な菌株識別能を担っていることから妥当な結果と考えられる。臨床分離される株の POT 型の多様性は非常に高いことも確認され、院内感染疑い時の分子疫学解析法として十分な菌株識別能力があると考えられた。

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。

ST121 の市中感染型 MRSA は元々日本に存在した MSSA に SCCmec が挿入されて、成立したクローンと考えられる。現在では小児から分離される、伝染性膿痂疹関連 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

質量分析により、MRSA の菌株識別の可能性が示唆された。緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね MLST 解析程度と考えられた。臨床分離株の多様性が非常に高いことから、集団感染の判定に必要な十分な菌株識別能力が備わっていると結論された。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N, Ichiyama S. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31(6):1095-100, 2012.
- 2) 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.
- 3) 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) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他市中獲得型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 USA300 の市販抗菌薬

- 軟膏耐性、第 86 回日本感染症学会 (2012 年 4 月) 長崎市
- 2) 鈴木匡弘、他、緑膿菌集団感染事例の緑膿菌 POT 法および PFGE 法による分子疫学解析、第 61 回日本感染症学会東日本地方会 (2012 年 10 月) 東京都
- 3) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他 緑膿菌のデジタル分子疫学法の開発、第 41 回薬剤耐性菌研究会 (2012 年 10 月) 岐阜県下呂市
- 4) Baba H, Suzuki M, Linuma Y, Investigation of the Clonality of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Ishikawa Prefecture of Japan by Using Phage-Derived Open Reading Frames Typing. IDWeek 2012, San Diego, Oct 2012.
- 5) 馬場尚志、飯沼由嗣 PCR-based open reading frames typing 法によるカルバペネム耐性緑膿菌の疫学的解析、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (2012 年 11 月) 京都市
- 5) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 緑膿菌の PCR-based ORF typing (POT) 法の開発と性能評価、第 24 回日本臨床微生物学会 (2013 年 2 月) 横浜市
- 6) 細羽恵理子、鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 MLST 解析との比較による緑膿菌用 PCR-based ORF typing (POT) 法の評価、第 24 回日本臨床微生物学会 (2013 年 2 月) 横浜市
- 7) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 緑膿菌の PCR-based ORF typing、法の開発、第 47 回緑膿菌感染症研究会 (2013 年 2 月) 札幌市
- 8) 鈴木匡弘、他 ORF 検出パターンによる緑膿菌の迅速簡易分子疫学解析法の開発、第 86 回日本細菌学会 (2013 年 3 月) 千葉市
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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 (2014 年 3 月) 東京都
- 18) 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
- 19) 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
- 20) Suzuki M, Linuma Y, et al. Development of a PCR-based molecular epidemiology method for *Pseudomonas aeruginosa*. IUMS2014 (July 2014) Montreal, Canada

- 21) 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
- 22) 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 特願 2012-10593 緑膿菌の遺伝子型別分類法およびこれに用いるプライマーセット
2. 実用新案登録 なし
3. その他

図1 MALDI-TOF を用いた MRSA の波形分析結果

Group	株数	POT 型
1	2	65-152-80
2	4	70-152-80
3	10	93-201-103
4	5	93-219-111
5	10	93-223-117
6	4	106-9-80

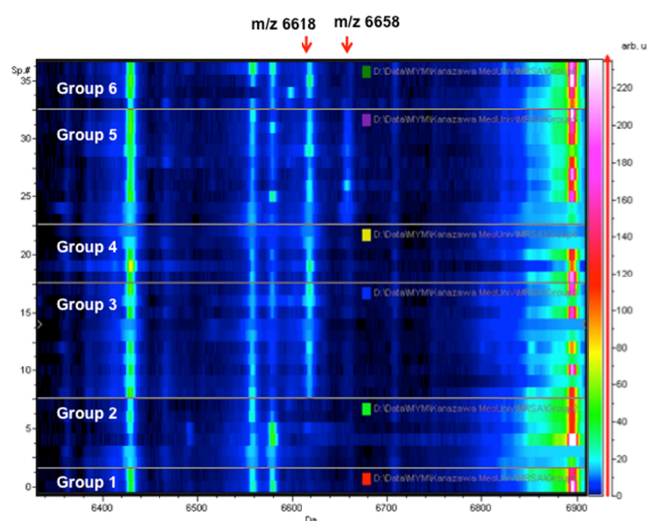


表1 POT1 値と ST 型 (CC 型) が 1:1 で対応した組み合わせ

POT1	ST	株数	POT1	ST	株数	POT1	ST	株数
14	new	1	207	CC235	14	574	CC360	2
44	CC1239	2	249	ST164	5	604	CC687	1
45	new	1	278	new	1	622	ST447	1
46	CC241	2	287	CC875	1	634	CC242	5
56	ST966	1	302	CC406	1	635	new	1
70	CC859	1	307	new	1	636	CC155	6
74	new	1	311	ST209	1	646	CC3657	8
92	new	1	314	CC260	2	656	ST532	2
105	ST252	2	316	ST1129	2	706	ST319	3
108	ST654	4	318	ST245	2	822	CC569	1
118	CC879	1	319	ST270	1	823	ST274	6
123	CC464	1	392	ST313	3	879	ST4	1
126	ST439	1	398	ST971	1	886	new	1
136	ST1051	1	410	ST1076	6	887	CC381	2
199	ST620	1	450	ST1203	1	894	ST132	2
201	ST829	1	458	ST1027	1	974	CC446	3
203	ST308	5	467	ST1197	1			
206	new	1	554	ST233	5			

表2 一つの POT1 値に複数の ST 型 (CC 型) が見られた組み合わせ

POT1	POT2	ST	株数	POT1	POT2	ST	株数
28	16	ST186	2	382	4	CC852	1
	0	CC992	1		0	ST549	1
60	0	ST262	2	383	52	CC244	1
	0	new	1		44		1
62	0	ST291	1	572	0/48/58	CC282	3
	16	ST412	1		76	ST983	1
	0	new	1		0	new	1
63	0	ST272	1	639	8	new	1
	4	new	1		0	ST1284	1
109	0	new	1	643	0	new	1
	4	new	1		0	new	1
122	0	ST859	1	573	2/16	CC179	4
	0/8	new	3		16	new	1
124	0	ST389	1	637	0	ST882	1
	0	ST641	1		0	ST1033	1
	0	ST988	1		52	new	1
	0	new	1		380	0	CC17
125	0	ST635	1	575	16	CC17	3
	0	CC1058	2		45	ST1285	2
335	16	ST606	1	830	0	ST645	2
367	16		1		15	ST254	1
		0	CC1045	1			

図2 PFGE パターンのデンドログラム解析(抜粋)

集団感染事例は同一 POT 型となった (2008N625 株は集団事例由来株ではない)。POT 法はおおむね PFGE パターンのホモロジー80%程度の菌株識別能力であった。

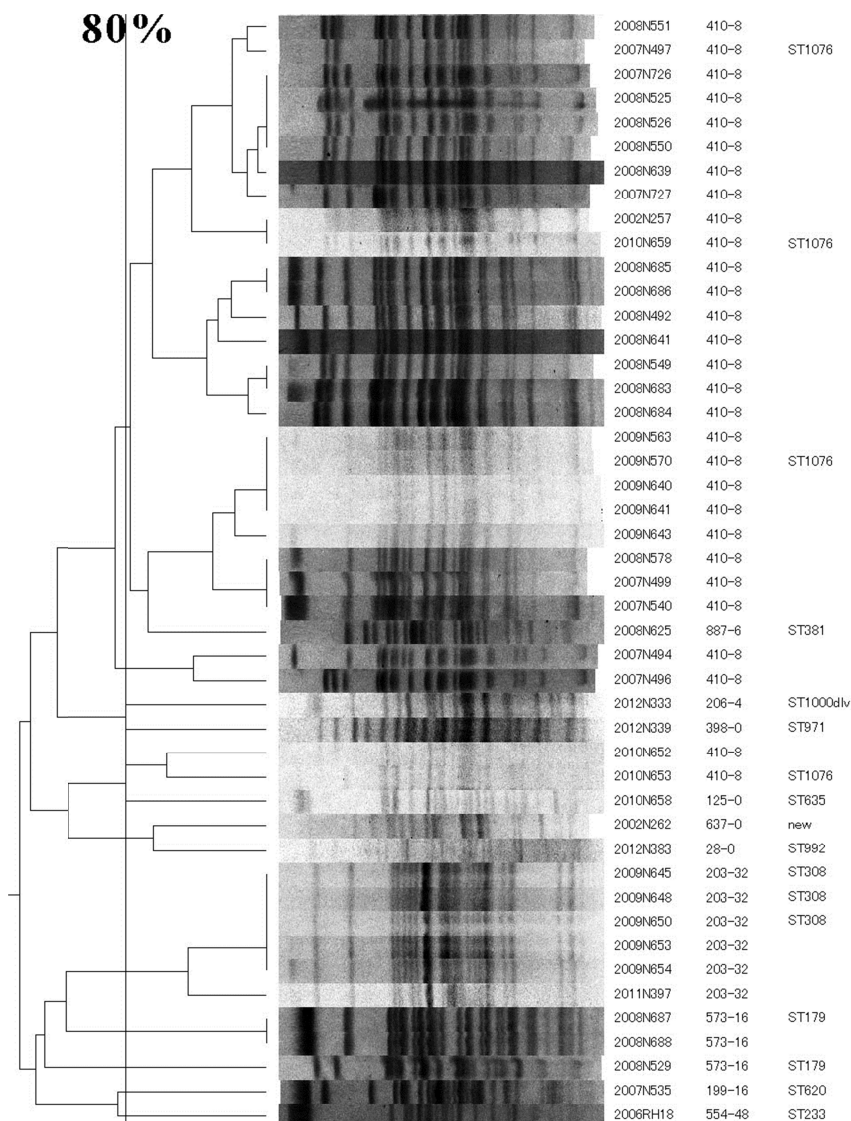


表3 全ゲノム解析に用いた菌株

	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
事例 3	70-18-81	7	MRSA、ETA 産生株、散発
	70-18-1	5	MRSA、ETA 非産生株、散発
	6-18-81	1	MSSA、ETA 産生株、散発
	多様	4	MSSA、ETA 産生株、散発
	多様	5	MSSA、ETA 非産生株、散発

表4 北陸地区サーベイランスによって集積がみられた POT 型を示す CA-MASA

POT 型 70-18-81 23 株

POT 型 106-9-80 7 株

ETA: exfoliative toxin A, TSST-1: toxic shock syndrome toxin-1

Hospital	Age	POT	ETA
A (n=1)	0	70-18-81	+
B (n=1)	0		
C (n=4)	2~5		
D (n=2)	4~5		
E (n=2)	2~8		
F (n=2)	2~5		
G (n=1)	4		
H (n=7)	0~9		
I (n=2)	3~5		
J (n=1)	9		

Hospital (各1株)	Age	POT	TSST-1
B, F, H	0~2	106-9-2	+
A, B, E, F, I, K, L	0~4	106-9-80	
B	0	106-9-80	
C, C, M	0~5	106-11-64	+
C	4	106-11-72	

図4 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)

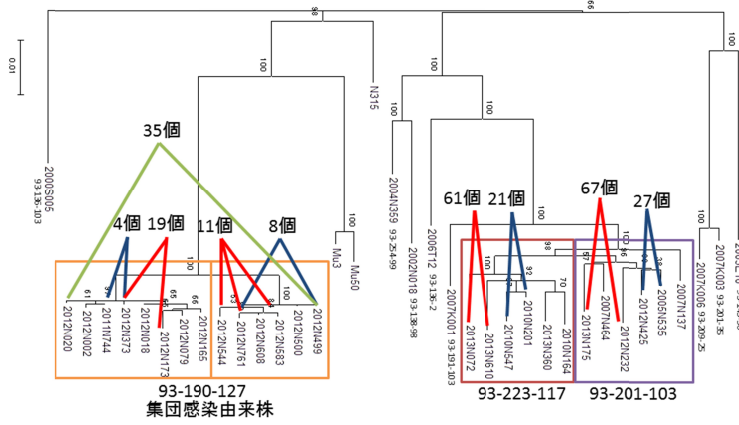
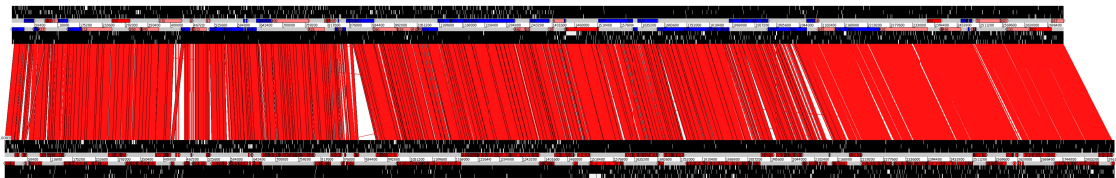


図5 NY/Japan クローン株データの Mu50 株データへのマッピング

POT 型 93-201-103 (2005N535 株)



Mu50

図6 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)

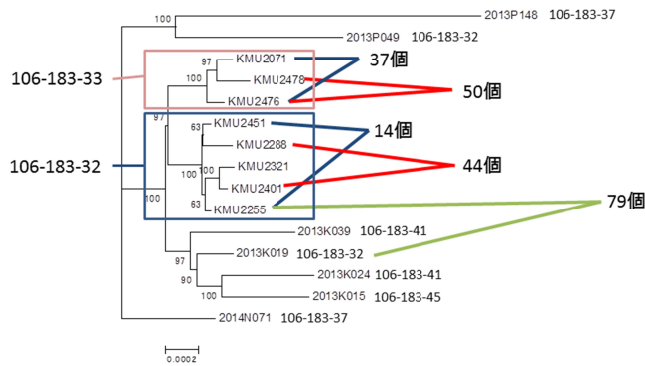


図7 ST121 市中感染クローンの全ゲノム SNP による系統樹解析

事例3 (ST121 MRSA、MSSA)

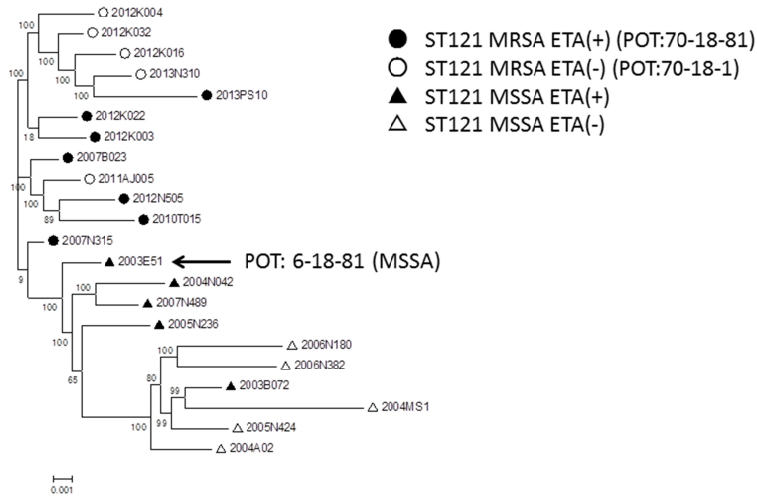
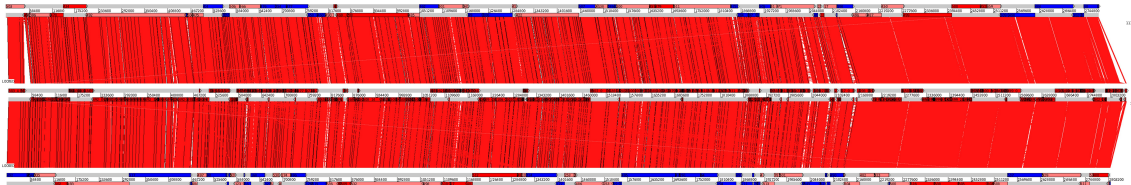


図8 ST121 市中感染型 MRSA と ST121 MSSA の比較

POT 型 6-18-81 MSSA



POT 型 70-18-81 MRSA