

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

分担課題名：食品由来ブドウ球菌の薬剤耐性及び病原性に関する研究

研究分担者：久恒 順三

研究要旨

食肉由来のブドウ球菌の薬剤耐性と病原性について、ヒトや伴侶動物などと比較解析による特徴を明らかにしてワンヘルスにおける基礎情報を構築することを目的とする。

A. 研究目的：

黄色ブドウ球菌は主にヒトの皮膚常在菌であるにもかかわらず、さまざまな感染症を引き起こす。また、本菌による食中毒は、主に食品中で増殖する際に産生されたブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxins, SEs) を摂取することで発症する典型的な毒素型食中毒である。近年、日本のブドウ球菌食中毒において、SEB産生 *S. argenteus* による食中毒事例も新しい報告にある。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は様々な薬剤に耐性を示して治療抵抗性を現して临床上問題となる。MRSAはこれまでに遺伝学的に医療関連型 MRSA (HA-MRSA)、健康人に感染する市中感染型 MRSA (CA-MRSA) に代別されてきたが、現代では、CA-MRSA に属するクローンが医療施設内で検出されていて広がっていることから、それらの呼び名の区別が困難となってきた。一方、獣医学の領域では、2004年にオランダで養豚家の娘が豚由来の MRSA 感染症が報告され、それ以降、欧州を中心に家畜関連 MRSA (LA-MRSA) が広がっている。日本の畜産動物での調査においても MRSA-ST398-SCC*mecV*、いわゆる、豚 MRSA が報告されている。LA-MRSAの中にはメチシリン耐性遺伝子 *mecA* とは異なる配列の *mecC* を保有する株が知られており、益々認知されるようになってきた。さらに、長年見過ごされてきた伴侶動物の調査では、ヒト用抗菌薬と動物用抗菌薬に耐性を示す MRSA が報告されており、ヒトや畜産動物とはまた異なった薬剤耐性の広がり懸念される。

動物は人に影響を及ぼすブドウ球菌の重要なソースであると考えられるが、日本における MRSA を含むメチシリン耐性ブドウ球菌種に関するゲノム解析による疫学解析が未だ不十分である。

本研究では、動物あるいは食品由来のブドウ球菌とヒト由来ブドウ球菌と比較し、それらのゲノ

ム疫学による特徴および薬剤耐性や病原性 (毒素産生性及びバイオフィーム形成能) を明らかにすることが目的である。

B. 研究方法：

検体の収集

食肉または食品由来ブドウ球菌の菌株は本研究班の研究分担者である岐阜大 浅井先生のご協力いただき収集された分離されたブドウ球菌株を当センターでゲノム解析を実施した。また、ヒト由来株ブドウ球菌株は JARBS サーベイランスで収集された株をゲノム比較解析に供した。愛玩動物由来株は薬剤耐性菌バンクに保管されている菌株を使用した。検体を受け入れた後、質量分析により菌種同定し、確認された菌株を薬剤耐性菌バンクに登録し、-80℃保存した。

ゲノム解析

分離された全株は、イルミナ社ショートリードシーケンスに供するため、研究分担者で当センターの菅原先生の超多サンプル全自動前処理生産ラインでライブラリ作成して Nova-Seq 6000 によるシーケンスを委託した。または、一部の株は当センター所有の MiSeq, MiniSeq にて解読された。私どもは、この解読データを用いて、ANI%による菌種確認、MLST 解析、SCC*mec* typing、*spa* typing、SNP 解析、薬剤耐性遺伝子および毒素関連遺伝子の検索等実施した。さらに、選抜株については遺伝構造やプラスミド解析等に使用するため、Nanopores 社製 GridION にてロングリードシーケンスを行い、完全長配列を決定した。

病原性解析

黄色ブドウ球菌が産生する多数のエンテロトキシンの産生量を評価するために、Bioplex を用いたマルチプレックス迅速測定システムを構築する

ため、まず主な毒素の組み換え体及び抗体作製を行った。その後、ELISA 測定条件（特異性、再現性等）を評価した。

C. 研究結果:

市販豚肉由来 MRSA の R6 年度収集分について、浅井先生より豚から分離されるメチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌（CNS）235 を受け入れて、菌種及び系統解析を行うため、質量分析とゲノムシーケンスを行った。*S. capitis* 1 株、*S. chromogenes* 11 株、*S. epidermidis* 2 株、*S. lentus* 2 株、*S. simulans* 2 株、そして、*Mammaliicoccus sciuri* 203 株であった。最も多かった *sciuri* について、ゲノム解析を行った結果、全て *mecA* を保有しており、このうち、1 株は *mecA* と *mecC* を同時に保有していた。また、ヒト由来株や伴侶動物由来株と系統比較したところ、豚由来株は異なるクラスターを形成していることがわかった。引き続きに解析を進めている。

食品由来 MRSA については R6 年度末に 10 株を受け入れて保存したため、現在ゲノム情報解析を進めているところである。黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシンの ELISA による定量法を構築するため、各種抗原用毒素および抗血清を作製して特異的抗体を調製した。また、臨床分離株を用いて C 型エンテロトキシン（SEC）産生量を定量するアッセイ系を確立した。引き続きに、他の毒素（毒素性ショック症候群毒素 TSST-1 や Panton-Valentin leukocidin PVL など）の ELISA 定量系の構築を進めている。

D. 考察:

豚由来メチシリン陽性 CNS で最も多かった *M. sciuri* は近年ブドウ球菌属から *Mammaliicocci* に再分類された菌種である。系統比較した結果、豚由来株はヒトや伴侶動物由来株とは異なる系統・性質を持つこと、また *mecA* と *mecC* のダブル陽性株を検出された事から、薬剤耐性等の特徴についてさらなる究明が必要と考えられた。加えて、ヒトや動物間でのこの菌種・系統の動態を理解するために引き続きに調査する。

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンファミリーの ELISA 定量測定系について、一部の SE（SEL 等）で交差反応があつて条件検討を改善する必要があつた。一方、質量分析を用いた多分子の定量測定法についても検討を進めていく。

E. 結論

食肉由来ブドウ球菌において、MRSA だけでなく、他の CNS、特に豚で多く分離される *M. sciuri* の薬剤耐性や病原性を解析するのは将来の

ワンヘルス観点からも重要になってくると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特記事項なし

2. 学会発表
特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特記事項なし

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし