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臨床上問題となる。MRSA はこれまでに遺伝学的に医療関連型 MRSA（HA-MRSA）、健常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事から、それらの呼び名の区別が困難となってきている。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*mec*V、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が懸念される。
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ルム形成能）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学　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。その後、この解読生データを用いて、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、ゲノタイプを調査した。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:

食品由来 MRSA については分担研究者の浅井先生グループでR6年度収集された5つの食肉製品から分離された MRSA10 株について、ゲノム解析による系統クローンの比較を実施した。その結果、ST398-MRSA-SCC*mec*V クローンと ST5-MRSA-SCC*mec*IV クローンが検出された。また、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たメチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌（CNS） 235 株の内訳は、*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* 217 株である。このうち、最も多かった *M. sciuri* について、比較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。

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。しかしながら、毒素性ショック症候群毒素 TSST-1 等一部の毒素で ELISA 測定時の安定性が良好でないものがあったため、ポリクローナル抗体からエピトープ配列を変えて特異性を向上させるために、ペプチド抗体を作製することとし、ペプチド合成を行った。その後、ウサギに免疫させて抗血清作製を進める予定である。また、質量分析装置を用いた定量的プロテオミクス解析による多種 SEs の評価系構築を検討するため、消化酵素による断片化条件の予備検討により、Proteinase K による最適条件を設定することができた。

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、MRSA が持つ SCC*mec* 構造と比較しながら、*Mammaliicocci* 属菌が *mecA* 遺伝子のリザーバーとして担っているのか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、構造類似性が高いため一部の SE の検出安定性が良好でない抗原があった。ペプチド抗体で安定するか引き続き検討を行う。加えて、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