

短 報

MRSA の病原因子遺伝子保有状況調査から見出された リスクファクターをもつ CA-MRSA の性状解析

山田 陽一¹⁾, 阿山 未来¹⁾, 小林 美穂¹⁾, 和田 朋子²⁾, 工藤 季之¹⁾,
杉山 哲大²⁾, 塩田 澄子¹⁾ *

¹⁾ 就実大学薬学部分子生物学研究室, ²⁾ 津山中央病院薬剤部

Characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) with the high risk factors found from the toxigenic gene profile from clinical isolates

Yoichi Yamada¹⁾, Miki Ayama¹⁾, Miho Kobayashi¹⁾, Tomoko Wada²⁾, Toshiyuki Kudo¹⁾,
Tetsuhiro Sugiyama²⁾, Sumiko Shiota¹⁾ *

¹⁾ Department of Molecular Biology, School of Pharmacy, Shujitsu University,

²⁾ Department of Pharmacy, Tsuyama Chuo Hospital

(Received 15 November 2018; accepted 19 December 2018)

Abstract: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) produces various toxins. In this study, we used the possessive status of pathogenic-factor genes of MRSA isolated in Tsuyama Chuo Hospital to investigate possible genetic factors that could be used in the risk assessment of MRSA strains. Using POT type, we found that three MRSA strains determined to be identical strains simultaneously possessing the *edn* and *eta* genes related to skin infection. These strains were classified as community-acquired MRSA (CA-MRSA). Two of them were associated with skin infections in children. Furthermore, a drug susceptibility test showed that one of the three strains was resistant to clarithromycin, which commonly used in pediatric practice. On the other hand, one of these strain was detected from sputum of elderly outpatients. These results suggested that this type of MRSA were spread not only in the pediatric or dermatological area but also in the community and could be a risk.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, toxic genes, CA-MRSA

緒言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、院

内感染の主たる起因菌として重要である。近年では市中においても市中感染型 MRSA (community-

表 1. SCCmec 型ごとの病原因子遺伝子別の分離数と分離率

	SCCmec 型	<i>edn</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hlg</i>	<i>hld</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>acme</i>
HA-MRSA	I	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	II	0	0	0	20	1	20	19	0	8	0
CA-MRSA	IV	6	0	0	37	4	37	37	0	11	0
	V	3	3	0	5	1	5	5	0	0	0
		9 (14.3%)	3 (4.8%)	0 (0%)	63 (100%)	6 (9.5%)	63 (100%)	62 (98.4%)	0 (0%)	19 (30.2%)	0 (0%)

acquired MRSA : CA-MRSA) が分離されたことから、院内で見出される MRSA を院内感染型 MRSA (hospital-acquired MRSA : HA-MRSA) と区別して呼ぶ。MRSA は、*mecA* 遺伝子 (メチシリン耐性遺伝子) を含む外来性カセット染色体 (SCCmec) が黄色ブドウ球菌の染色体に挿入されることにより出現する。SCCmec は I~XI 型に分類され、日本では HA-MRSA は I, II, III 型, CA-MRSA は IV, V 型を持つものが多いとされる¹⁾。

津山中央病院の検査部が保有する MRSA について、POT (PCR-based ORF Typing) 法を用いて、菌株の同定と SCCmec 型別を行った。POT 法とは菌株ごとに保有状態が異なる 22 個の Open Reading Frame の保有パターンを PCR で検出し、遺伝子型を決定する解析法である。解析結果を数値化し 3 つの POT の数字の組合せで表記する²⁾。3 つの数字が一致すれば同一菌株とされ、同時期に複数個検出されれば院内感染が疑われる。

黄色ブドウ球菌は、表皮剥奪毒素 (exfoliative toxin : ET), α , β , γ , δ 溶血毒素 (hemolysin), 毒素性ショック症候群毒素 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1 : TSST-1), 毒素型食中毒を起こす腸管毒素 (Staphylococcal enterotoxin : SE) をはじめ、白血球を特異的に破壊する CA-MRSA に特徴的な毒素の Panton-Valentine leukocidin (PVL) など多様な毒素を産生する³⁾。また、付着や伝染性に関わるアルギニン代謝系可動性遺伝因子 (arginine catabolic mobile element : ACME)⁴⁾、皮膚感染症に関与する表皮細胞分化抑制因子 (epidermal cell differentiation inhibitor : EDIN)⁵⁾ も CA-MRSA の病原性に関わっている。

院内には易感染者が多く、ハイリスクな株が分離された際には、迅速な対応が必要となる。黄色ブドウ球菌が産生する毒素に着目し、MRSA 臨床分離株について、病原因子遺伝子の保有状況や性状解析から、院内感染のリスク判定に利用できる要素の検討を試みた。その過程において、同一 POT 型を示す 3 株が、皮膚感染症に関与する遺伝子 *edn*, *eta* を同時保有し、さらに同一菌株にもかかわらず、3 株の抗菌薬感受性が異なったため、詳細な性状解析を行ったので報告する。

方法

菌株 2015 年 1 月から 2016 年 1 月に津山中央病院で離された MRSA, 63 株を用いた。MRSA の標準株として N315 株を用いた。

遺伝子保有状況の調査 病原性に関連する遺伝子 (*edn* : EDIN, *eta*・*etb* : ET, *hla*・*hlb*・*hlg*・*hld* : ヘモリジン, *pvl* : PVL, *tst* : TSST-1, *arcA*・*opp3* : ACME) を PCR 法で検出した。マクロライド系抗菌薬耐性遺伝子 (*ermA*, *ermC*) は、*ermA* を保有する N315 株を陽性コントロールとして PCR 法で検出した。

SCCmec の判定 POT (PCR-based ORF Typing) 法を用いた和田ら⁶⁾ のデータを使用した。

起因菌の判定 抗 MRSA 薬を使用した、起因菌として治療とカルテに明記している、血液や髄液など無菌的組織から MRSA が分離された、のいずれかに当てはまる場合を起因菌とした。

MLST による ST 型の決定 黄色ブドウ球菌の遺伝子による型別 (ST 型) を決定するため、MLST 解析を行った⁷⁾。多様性を持つ 7 種類の

表 2. 同一 POT 型を示す MRSA 3 株の SCCmec 型と病原因子遺伝子の保有状況

菌株	POT 型	検査材料	<i>hla</i>	<i>hnb</i>	<i>hlg</i>	<i>hld</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>edn</i>	SCCmec
M28	70-18-81	膿	+	-	+	+	-	-	+	-	+	V
M64	70-18-81	皮膚	+	-	+	+	-	-	+	-	+	V
M79	70-18-81	喀痰	+	-	+	+	-	-	+	-	+	V

遺伝子 (*arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*) の塩基配列から allele No. を決定し, <http://saureus.beta.mlst.net/> にアクセスして解析し, ST 型を判別した。

各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定
Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) に準じて, 各種抗菌薬の MIC を求めた。

結果・考察

病原因子遺伝子別の分離数と分離率

HA-MRSA と CA-MRSA で, *hnb* 保有株はそれぞれ 1 株と 5 株, *tst* 保有株は 8 株と 11 株であり, 有意差を確認することはできなかった (表 1)。また, *hla*, *hlg*, *hld* はほぼ全株が保有していた。皮膚感染症に関連するとされている *edn*, *eta* は CA-MRSA のみ検出され, HA-MRSA では検出されなかった。今回, *etb*, *pvl*, ACME は検出されなかった。2011 年の調査では乳腺炎の患者から *pvl* が検出されたが⁸⁾, 感染対策および治療が功を奏し,

感染拡大と院内への菌の定着はなかった。

ACME は *pvl* と同様に CA-MRSA USA300 等, 欧米で見られる強毒株に存在する病原因子遺伝子である⁴⁾。今回 *pvl* と ACME 遺伝子保有株が検出されなかったことから, 最もリスクファクターの高い警戒すべき菌株の定着はなかったと考えられた。

皮膚感染症関連遺伝子保有株の POT 型の決定

表 2 に示すように, 皮膚感染症に関連する *edn*, *eta* を同時保有していたのは, SCCmec V 型 3 株であった。これら 3 株の POT 型はいずれも 70-18-81 であり, 病原因子遺伝子の保有状況も 3 株で一致していた。M28 と M64 の 2 株は 0~1 歳の皮膚検体から検出されており, M28 は起因菌であった。一方, M79 は高齢の外来患者の喀痰から検出されていた。POT 型 70-18-81 株は小児・皮膚科領域のみならず, 津山地域で市中に蔓延している可能性を示していることから, リスクファクター

表 3. 各種抗菌薬の MIC 結果

抗菌薬	MIC(μg/mL)				
	N315	M28	M64	M79	
β-ラクタム系	Ampicillin	4(R)	2(R)	2(R)	2(R)
	Oxacillin	2(S)	<0.5(S)	<0.5(S)	<0.5(S)
	Cefazolin	8(S)	0.5(S)	1(S)	1(S)
アミノグリコシド系	Gentamicin	1(S)	16(R)	256(R)	256(R)
テトラサイクリン系	Minocycline	0.5(S)	0.5(S)	1(S)	0.5(S)
マクロライド系	Clarithromycin	>1024(R)	>64(R)	0.25(S)	0.25(S)
リンコマイシン系	Clindamycin	1024(R)	0.063(S)	0.063(S)	0.063(S)
ニューキノロン系	Levofloxacin	0.125(S)	0.25(S)	0.125(S)	0.125(S)
抗 MRSA 薬	Linezolid	0.5(S)	0.5(S)	0.5(S)	0.5(S)
	Vancomycin	0.008(S)	0.008(S)	0.008(S)	0.008(S)

CLSI の基準により, 耐性 (R), 中間 (I), 感受性 (S) を示した。

をもつ株とした。

POT 型 70-18-81 株の MLST による ST 型の決定

arc, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi* の allele No. がそれぞれ 6, 5, 6, 2, 7, 14, 5 となり, POT 型 70-18-81 の 3 株の ST 型は 121 と決定された。ST121 は, 皮膚や軟部組織における感染症の起因为として世界中に分布する菌株である⁹⁾。これら 3 株も, ST121 の MRSA で保有が確認される表皮剥奪毒素 *eta* と, 小児の皮膚感染症に関わる *edn* の両方の遺伝子を保有していた。

POT 型 70-18-81 の MRSA の抗菌薬感受性

CLSI 基準より, 3 株はアンピシリン及びゲンタマイシンに耐性を示した。クリンダマイシン, レボフロキサシン, ミノサイクリン及び抗 MRSA 薬であるリネゾリド, バンコマイシンには感受性を示した (表 2)。M28 は, クラリスロマイシン耐性を示したが, M64, M79 は感受性であった。MRSA の判断基準では, オキサシリンの MIC \geq 4 μ g/mL とされているが, 今回の結果では N315 及び 3 株はオキサシリン, セファゾリンには感受性を示した。N315 のように *mecA* 遺伝子の近位に *mecI* と *mecR1* が完全な形で存在している場合には, メチシリンをはじめとする β -ラクタム系抗菌薬に感受性になりやすいことが報告されている¹⁰⁾。このことが 3 株にも当てはまると推測された。

マクロライド系抗菌薬耐性遺伝子の保有状況

クラリスロマイシン耐性であった M28 は erythromycin methylase をコードする *ermC* を保有することが分かった (図 1)。コントロールとして用いた N315 は *ermA* を持ち, 感受性株である M64 はいずれの耐性遺伝子も保有していなかった。*ermC* は伝達性プラスミド上に存在しマクロライド系抗菌薬耐性を容易に伝達させることから, 本剤が汎用される小児科領域の感染症治療が困難になる可能性もある。

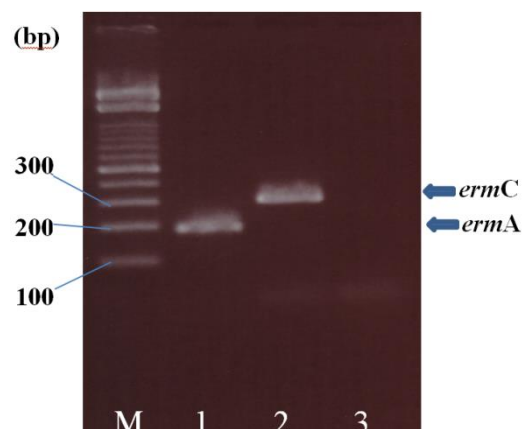


図 1. クラリスロマイシン耐性遺伝子の検出
M:分子重量マーカー 1:N315 2:M28 3:M64

以上の結果から, *edn*, *eta* を同時に有する POT 型 70-18-81 株には, 小児科, 皮膚科領域だけでなく, 市中伝播や院内への持込みによる感染拡大のリスクがあることが分かった。同 POT 型株は他地域の病院でも小児科外来で検出されたという報告がある¹¹⁾ ことと, 2011 年の調査では検出されなかった⁶⁾ ことから, 今後リスクファクターをもつ株として, 津山地域のみならず広範囲での拡大が懸念される。

謝辞 本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業からの補助金を受けて行った。

引用文献

- 1) Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S. et al.: Genomic Basis for Methicillin Resistance in *S. aureus*. *Infect Chemother.* 45(2):117-136(2013).
- 2) Suzuki M, Tawada Y, Kato M. et al.: Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage -derived open-reading frames. *J Appl Microbiol.* 101 (4):938-947(2006).
- 3) 塩田澄子, 黒田照夫編:微生物学・感染症学 (第 2 版), 化学同人, pp. 72-75, (2016).
- 4) Diep B.A, Stone, G.G, Basuino L. et al.: The arginine catabolic mobile element and staphylococcal

chromosomal cassette *mec* linkage : convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Diseases*; 197(11) : 1523-1530 (2008).

5) Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K.: A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;173(1):92-98 (1990).

6) 和田朋子, 山田陽一他: 臨床現場における市中感染型 MRSA の増加とバイオフィルム形成能の関連. *就実大学薬学雑誌* 4.16-22 (2017).

7) Enright MC, Day NP, Davies CE. et. al.: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38(3) :1008-15 (2000).

8) Hagiya H, Shiota S, Sugiyama W. et al.: Postpartum breast abscess caused by community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* in Japan. *Breastfeed Med.* 9(1):45-6 (2014).

9) Lamand V, Dauwalder O, Tristan A. et al.: Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics *Staphylococcus aureus* associated strains. *Clin Microbiol Infect.* 18(12):E514-621(2012).

10) Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. et al.: Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec*DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43: 1449~1458. (1999).

11) 山田貴子・杉浦康行他.: POT 法で解明された当院新生児センターにおける methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) アウトブレイクの伝播様式. *日本臨床微生物学雑誌.* 26 (4):311-316 (2016).