

原著論文

## 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

和田 朋子<sup>1),2)\*</sup>, 山田 陽一<sup>3)</sup>, 近藤 祥代<sup>4)</sup>, 杉山 哲大<sup>2)</sup>, 塩田 澄子<sup>1),3)</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学大学院医療薬学研究科, <sup>2)</sup> 津山中央病院薬剤部,  
<sup>3)</sup> 就実大学薬学部分子生物学研究室, <sup>4)</sup> HITO 病院薬剤科

### Relation between the increase of the isolation number of Community-Acquired MRSA and their biofilm formation

Tomoko Wada<sup>1),2)</sup>, Yoichi Yamada<sup>3)</sup>, Sachiyo Kondo<sup>4)</sup>,  
Tetsuhiro Sugiyama<sup>2)</sup>, Sumiko Shiota<sup>1),3)</sup>

<sup>1)</sup> *Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University,*

<sup>2)</sup> *Department of Pharmacy, Tsuyama Chuo Hospital*

<sup>3)</sup> *Laboratory of Molecular Biology, Shujitsu University Hospital*

<sup>4)</sup> *Department of Pharmacy, HITO Medical Center*

(Received 31 October 2016; accepted 21 November 2016)

---

**Abstract:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a multidrug-resistant pathogen and causes nosocomial infections. Community-acquired MRSA (CA-MRSA) shows a higher virulence than hospital-acquired MRSA (HA-MRSA). The number of CA-MRSA isolated in clinical practice has increased recently. We isolated 83 and 63 MRSA strains in Tsuyama Chuo Hospital from October 2011 to May 2012 and January 2015 to March 2016, respectively. MRSA strains were classified using Phage Open-reading Frames Typing (POT) and their biofilm formation was measured. There were some MRSA strains isolated in both periods. The biofilm formation of CA-MRSA was higher than that of HA-MRSA ( $p < 0.001$ ). We concluded that higher biofilm formation helped to CA-MRSA to colonize and affected the increase of the isolation.

Keywords: CA-MRSA; HA-MRSA; POT-method; biofilm

---

緒言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)は院内感染の代表的な原因菌であり,多くの抗菌薬に耐性を

示す多剤耐性菌として知られている。厚生労働省院内感染対策サーベイランス(Japan Nosocomial Infections Surveillance; JANIS)の2014年報によると、MRSAは集計対象医療機関全てから検出されており、全黄色ブドウ球菌中に占めるMRSAの割合は近年減少傾向にあるものの49.1%と高い割合で検出されている<sup>1)</sup>。

MRSAに関する薬剤耐性機構や産生毒素、遺伝子等の解析は数多く行われているが、臨床分離株を用いた総合的解析は実施されていない<sup>2)</sup>。その背景として、標準株と異なり臨床分離株は様々な遺伝的背景を有すること、分離される患者背景も様々であり、解析結果を単純に比較することができない、などが挙げられる。代表的な分子疫学的解析法として Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), *spa* typing, staphylococcal cassette chromosome *mec* typing (SCC*mec*型)がある。MLSTやPFGE解析は手技が煩雑であり、時間やコストがかかる、特殊な機械が必要である、など様々な理由から臨床現場で日常的に行うことは困難である<sup>3),4),5)</sup>。また、*spa* typingは日本での報告数は少ない。SCC*mec*型は現在までにI~VIIIの8つの型が報告されており<sup>6)</sup>、日本では主としてSCC*mec* I~V型が分離される。また、SCC*mec* I~III型は院内感染型MRSA (HA-MRSA)から、SCC*mec* VI型とSCC*mec* V型は市中感染型MRSA (CA-MRSA)から分離されることが知られている<sup>7)</sup>。

Phage Open-reading Frame Typing (POT)法は愛知県衛生研究所の鈴木匡弘らが開発した手法であり、短時間かつ簡便に再現性良く解析を行うことが可能である<sup>8)</sup>。POT法は菌株毎に保有状態の異なる Open Reading Frame (ORF)の保有パターンを multiplex PCRによって検出することで菌株の遺伝子型を検出する方法である。解析結果を数値化し、POT値として表現することで同一菌株であるかを確認することができる。近年、臨床現場においてもMRSA感染症集団発生時に実施する分子疫学的解析法としてPOT法を用いる施設が増

加してきている<sup>9),10)</sup>。POT法はSCC*mec*関連遺伝子を検出するため、SCC*mec*型が推定できる。

本研究では一病院におけるMRSA感染対策を行うことを目的としており、簡便にMRSAの型の判定ができるPOT法を用い、SCC*mec*型からCA-MRSAとHA-MRSAに分けて解析を行った。それぞれの分離率とそれに関わる因子としてバイオフィーム形成能を測定した結果を報告する。

## 方法 菌株

2011年5月から2012年11月(第1期)および2015年1月から2016年1月(第2期)に津山中央病院で分離されたMRSAを用いた。バイオフィーム形成能の測定は標準株としてMRSA N315株を用いた。

## 染色体DNAの抽出

DNA抽出は、シカジーニクスDNA抽出試薬(関東化学株式会社)を用い、標準プロトコールに従って行った。

## POT法

シカジーニクス分子疫学解析POTキット(黄色ブドウ球菌用)(関東化学株式会社)を用い、取扱説明書に記載されているプロトコールに従って行った。

## POT型の判定

POT法により検出される増幅産物は表1の通りPOT1, POT2, POT3に分類されており、目的サイズのバンドの有無からPOT係数の合計を算出しPOT型を判定した。POT型はPOT1値-POT2値-POT3値で表現する。POT1の値がMRSAの型別に用いるSCC*mec*関連のORFを検出するため、SCC*mec*型の推定が可能である。POT1の値が64, 70はV型, 73, 77, 93はII型, 98はI型, 104, 106, 108, 110がIV型となる。なお、POT1の値によりSCC*mec* II型と判定されたものをHA-MRSA, IV型もしくはV型と判定されたものをCA-MRSAとした<sup>11)</sup>。

表 1 検出 ORF の種類と PCR 増幅産物サイズ

	POT No.	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域	POT 係数
Reaction mixture 1	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> の確認	
	POT1-1	530	<i>mecA</i>	64
	POT1-2	449	class B *1	32
	POT1-3	355	Type II a *2	16
	POT2-1	304	Tn554	128
	POT2-2	271	プロファージ	64
	POT2-3	228	プロファージ	32
	POT2-4	197	プロファージ	16
	POT2-5	161	プロファージ	8
	POT2-6	131	プロファージ	4
Reaction mixture 2	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> の確認	
	POT1-4	477	<i>ccrA2</i> *3	8
	POT1-5	388	genomic islet	4
	POT1-6	320	genomic islet	2
	POT1-7	273	class A *4	1
	POT3-1	243	プロファージ	64
	POT3-2	197	プロファージ	32
	POT3-3	171	プロファージ	16
	POT3-4	140	プロファージ	8
	POT3-5	115	プロファージ	4
POT3-6	95	プロファージ	2	
POT3-7	78	プロファージ	1	

\*1 *mec* gene complex class B, \*2 *SCCmec* type IIa specific, \*3 cassette chromosome recombinase A2, \*4 *mec* gene complex class A

シカジーニクス®分子疫学解析 POT キット (黄色ブドウ球菌用) 取扱説明書 (関東化学株式会社) より抜粋

### MRSA の起因率の比較

カルテ情報より①抗 MRSA 薬を用いた, もしくは②カルテに起因菌として治療の旨を記載していた, のいずれかに該当する場合に起因菌と判断し, 起因率を算出した. なお, HA-MRSA と CA-

MRSA の起因率をそれぞれで算出した.

### バイオフィーム形成能の測定

N 培地で一晚振とう培養した MRSA を BHI 培地で 100 分の 1 に希釈して O.D.=0.7 まで 37°C で振とう培養した. この菌液をグルコース添加した BHI 培地に 200:1 (グルコースの最終濃度:1%) の割合で加え, 96 穴平底プレートに移し 37°C で 48 時間静置培養した. 形成されたバイオフィームを 0.1% クリスタルバイオレット溶液で染色した後 DMSO で溶解させ, 溶解液を 3 倍希釈して O.D.<sub>570</sub> を測定した. バイオフィーム形成能は MRSA N315 株を 100% として算出した.

### 統計解析

統計学的解析は JSTAT を用いて行った. F 検定により有意水準 5% で母分散が等しい場合 Student's t-test により, 母分散が等しいとみなせない場合 Welch's t-test で検定した. *p* 値は両側検定によって算出し, 有意水準は *p* < 0.05 とした.

### 倫理的配慮

本研究は, 津山中央病院および就実大学の倫理委員会の承認を得て実施した. 患者情報は個人を特定できないよう匿名化した.

### 結果

#### POT 型の判定

図 1 に代表的な臨床分離株の POT 法の電気泳動パターンを示した. 臨床分離株 1~5 の POT 型はそれぞれ 1: 10-191-112, 2: 106-137-114, 3: 106-213-112, 4: 106-9-2, 5: 93-235-61 となった. したがって, 臨床分離株 2, 3, 4 は *SCCmec* IV 型で CA-MRSA, 臨床分離株 5 は *SCCmec* II 型で HA-MRSA と判定された.

同様に, 全ての臨床分離された MRSA について POT 型を判定した. 第 1 期に分離された MRSA 83 株のうち, HA-MRSA は 52 株, CA-MRSA は 31 株あり, CA-MRSA の占める割合は 37% であった. 一方, 第 2 期に分離された MRSA のうち HA-MRSA は 21 株, CA-MRSA は 42 株であり, CA-MRSA の割合は 67% であった. 第 2 期の CA-

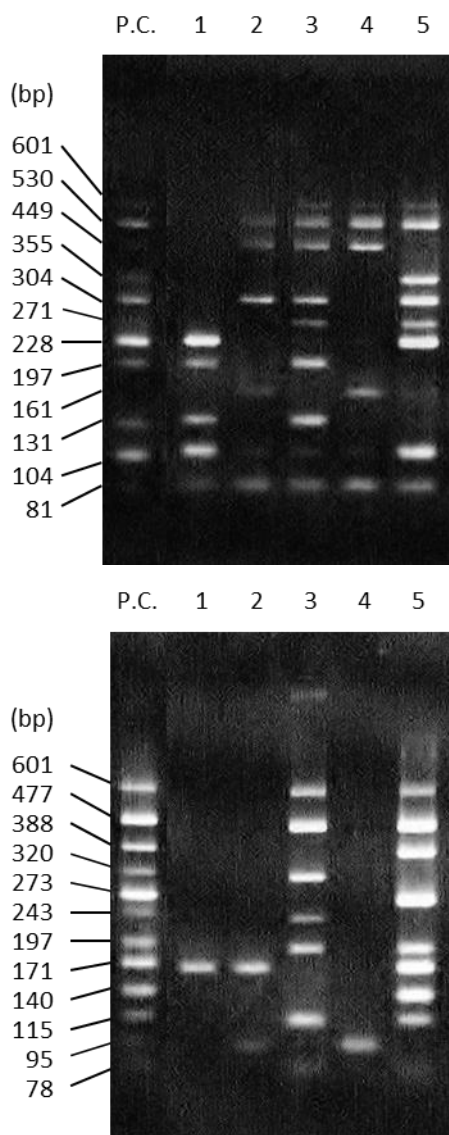


図1 POT法の電気泳動パターン  
 上段: Reaction mixture 1, 下段: Reaction mixture 2,  
 P.C.: positive control

MRSA の割合は第1期よりも大幅に増加していた(表2)。

### HA-MRSA と CA-MRSA の起因率の比較

第1期は HA-MRSA の起因率が 25%, CA-MRSA では 29%であり, 両者の起因率に差はなかった。第2期は HA-MRSA の起因率が 38%, CA-MRSA では 33%であり, 第2期においても両者の起因率に差はなかった(表2)。

表2 MRSA の分離数と起因率

	第1期		第2期	
	分離数 (%)	起因菌数 起因率(%)*	分離数 (%)	起因菌数 起因率(%)*
HA-MRSA	52 (63)	13 (25)	21 (33)	8 (38)
CA-MRSA	31 (37)	9 (29)	42 (67)	14 (33)
全数	83	22 (27)	63	22 (35)

\* HA-MRSA および CA-MRSA 別の起因率を算出

### MRSA 分離患者の年齢の比較

各期間で MRSA が分離された患者の年齢を表3に示す。第1期の HA-MRSA は  $75.1 \pm 15.1$  歳, CA-MRSA は  $61.6 \pm 29.6$  歳であり CA-MRSA の方が有意に年齢の低い患者から検出されていた ( $P < 0.05$ )。第2期においても HA-MRSA は  $78.0 \pm 11.4$  歳, CA-MRSA は  $59.2 \pm 31.2$  歳であり, 第2期においても有意に年齢の低い患者から検出されていた ( $P < 0.05$ )。

表3 患者年齢

	第1期 (歳)	第2期 (歳)	p 値
HA-MRSA	$75.1 \pm 15.1$	$78.0 \pm 11.4$	$< 0.05$
CA-MRSA	$61.6 \pm 29.6$	$59.2 \pm 31.2$	$< 0.05$

Welch's t-test; 平均値±標準偏差で示した

### 長期間継続して分離される MRSA

第1期と第2期で共通して分離された株の有無を POT 型で検討した。結果を表4および表5に示す。HA-MRSA については4種の菌株が第1期と第2期で共通して分離された。一方, CA-MRSA は, 2種の菌株が共通して分離された。

表4 各期間で共通して分離された HA-MRSA

POT 型	第1期 (分離数)	第2期 (分離数)
93-155-111	11	3
93-191-103	10	4
93-235-61	1	2
93-255-61	3	1

表5 各期間で共通して分離された CA-MRSA

POT 型	第1期 (分離数)	第2期 (分離数)
106-9-2	10	5
106-9-80	3	3

表6 各期間のバイオフィーム形成能の比較

	第1期 (%)	第2期 (%)	p 値
HA-MRSA	28.0 ± 14.9	28.4 ± 16.6	< 0.001
CA-MRSA	90.0 ± 31.6	68.6 ± 21.2	< 0.001

MRSA 315 株のバイオフィーム形成能を 100% としたときの比(Student's t-test): 平均値 ± 標準偏差で示した

### 分離株のバイオフィーム形成能

MRSA の定着にかかわる因子としてバイオフィーム形成能がある。そこで、各菌株のバイオフィーム形成能を比較検討した。各期間でバイオフィーム形成能を比較した結果、第1期の HA-MRSA のバイオフィーム形成能は平均 28.0 ± 14.9%、CA-MRSA は平均 90.0 ± 31.6% と CA-MRSA の方が有意にバイオフィーム形成能が高かった ( $P < 0.001$ )。また、第2期の HA-MRSA のバイオフィーム形成能は平均 28.4 ± 16.6%、CA-MRSA は平均 68.6 ± 21.2% と、第2期においても CA-MRSA の方が有意にバイオフィーム形成能が高かった ( $P < 0.001$ )。第2期のバイオフィーム形成能を図2に示す。

### 考察

臨床分離される MRSA の解析に POT 法を用いることで比較的簡便に分子疫学的解析を実施することができた。POT 法は近年開発された新しい方法であり、特に改良版が市販されて以降、研究だけでなく臨床で徐々に利用されてきている。しかし、従来の PFGE 法と比較すると臨床分離株を用いた解析実施例が少なく、精度の検証やデータの蓄積が必要である。今回、2つの期間に臨床分離された MRSA について POT 法を用いて比較検討した。

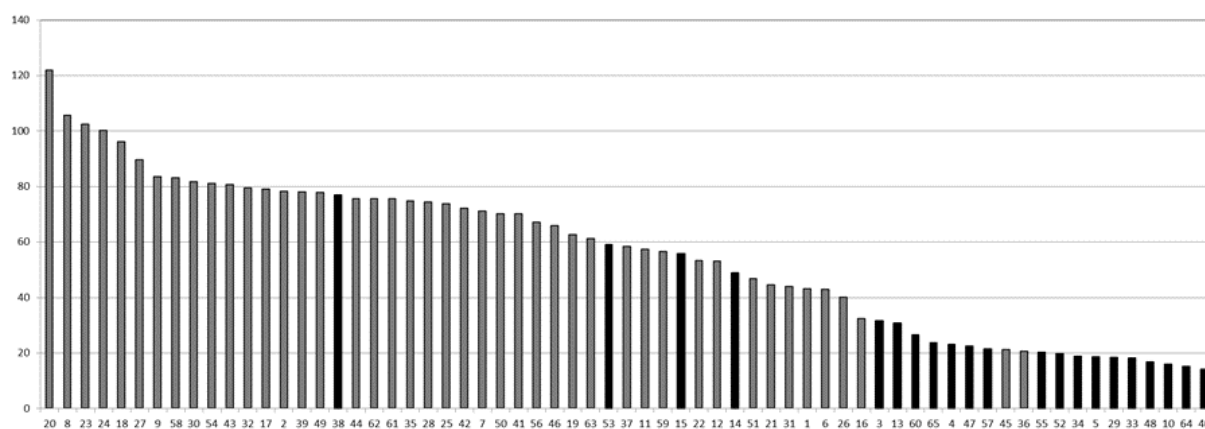


図2 第2期の MRSA のバイオフィーム形成能

■ : CA-MRSA, ■ : HA-MRSA

院内感染を引き起こす MRSA はこれまで HA-MRSA が主流とされてきたが, CA-MRSA の検出率が増加してきているという報告がある<sup>12),13)</sup>. 今回, 第1期は HA-MRSA の分離率の方が高かったが, 第2期は CA-MRSA の分離率の方が高く, 院内の主流な MRSA が HA-MRSA から CA-MRSA に置き換わっていた.

CA-MRSA は HA-MRSA と比較し各種抗菌薬への感受性は高いものの, 病原性が高いことが知られており, 比較的健康的な若年の患者にも重篤な感染症を引き起こすことがある<sup>14),15),16)</sup>. 今回の結果で, CA-MRSA が比較的若年の患者から検出されているが, 起因率は HA-MRSA と差はなかった. 実際, CA-MRSA の中に米国で報告されているような強毒株は, 今回調べた中には存在していなかった.

HA-MRSA と CA-MRSA のバイオフィルム形成能を比較した結果, CA-MRSA のバイオフィルム形成能は極めて高かった.

CA-MRSA の分離率の高さの理由の一つとしてバイオフィルム形成能の高さが挙げられる. MRSA を含む黄色ブドウ球菌の感染経路の一つとしてベッド柵やドアノブなどを介した接触感染が挙げられる. 特に入院患者は易感染状態にある. カテーテルやペースメーカー, 人工関節などの医療デバイスの入った患者がバイオフィルム形成能の高い CA-MRSA に感染すると治療が難渋化し, 患者への身体的負担が増加するのに加え, 入院期間の延長など医療費の増大にもつながる.

さらに, 今回調べた2つの期間に同一菌株が継続して分離されていた. バイオフィルム形成能が高い CA-MRSA が増加すれば同一菌株による集団感染が起こる危険性が高まる.

津山中央病院における MRSA の分離率は減少している. 今回の結果から, 院内感染対策の効果により HA-MRSA が減少していることがわかった. 一方で, 従来の院内感染対策ではバイオフィルム形成能の高い CA-MRSA が排除されにくく, 分離率が相対的に増加したものと考えられる.

今後は CA-MRSA の特性に合わせた院内感染対策が必要になってくる. 院内に定着する MRSA を精査し, その性質を明らかにすることで効果的な感染対策を考えていきたい.

## 引用文献

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業; 公開情報 検査部門 年報 2014 年
- 2) D. J. Hetem, L. P. G. Empel, J. Empel, A. Mroczkowska, M. Orczykowska-Kotyna, A. Kozin´ska, W. Hryniewicz, H. Goossens and M. J. M. Bonten on behalf of the MOSAR WP Study Group: Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries, *J Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 45-52 (2015)
- 3) Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B.: Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application Tracing the Spread of Related Strains, *J. Clin. Microbiol.*, 41 (4), 1574-1585 (2003)
- 4) van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brien F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H.: Assessment of Resolution and Intercenter Reproducibility of Results of Genotyping *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *SmaI* Macrorestriction Fragments: a Multicenter Study, *J.*

- Cin. Microbiol.,36 (6), 1653-1659 (1998)
- 5) Tenover FC1, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, MAURY Mulligan M, Pfaller : Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*, J. Cin. Microbiol.,36 (6), 407-415 (1994)
- 6) International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC): Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec), Antimicrob Agents Chemother. 53(12), 4961-4967 (2009)
- 7) Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H.: A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V: Clin Microbiol Infect., 13(7), 725-727 (2007)
- 8) 鈴木匡弘 : Cica Geneus Staph POT Kit の原理とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学, THE CHEMICAL TIMES 2011 No.3 (通巻 221 号)
- 9) 森山英彦, 他, : MRSAの院内伝播制御に有用なPOT法を用いた分子疫学解析, 感染症誌86, 115-120 (2012).
- 10) 細谷志乃, 他, 皮膚科外来患者由来 MRSA 株に見られる新規 MRSA クローンの出現状況, 感染症誌 88, 840-848 (2014)
- 11) Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R.: Comparison of community- and health care-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, JAMA, 290 (22), 2976-2984 (2003)
- 12) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T, Yamamoto T : A Pantone-Valentine Leucocidin (PVL)- Positive Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain, Another Such Strain Carrying a Multiple-Drug Resistance Plasmid, and Other More-Typical PVL-Negative MRSA Strains Found in Japan, J. Cin. Microbiol., 43 (7), 3356-3363 (2005)
- 13) Ito A, Nakaminami H, Fujii T, Utsumi K, Noguchi N.: Increase in SCCmec type IV strains affects trends in antibiograms of Methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary -care hospital, J. Med. Microbiol., 64 (7), 745-751 (2015)
- 14) Nakamura I, Yamaguchi T, Miura Y, Shimizu H, Fukushima S, Mizuno Y, Matsumoto T : Clinical Aspects of Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Strain, Generally Regarded as Community-Acquired, in Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 66, 416-420 (2013)
- 15) Wang SH, Hines L, van Balen J, Mediavilla JR, Pan X, Hoet AE, Kreiswirth BN, Pancholi P, Stevenson KB : Molecular and Clinical Characteristics of Hospital and Community Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bloodstream Infections, J. Cin. Microbiol.,53 (5), 1599-1608 (2015)
- 16) Changchien CH, Chen SW, Chen YY, Chu C : Antibiotic susceptibility and genomic variations in *Staphylococcus aureus* associated with Skin and Soft Tissue Infection (SSTI) disease groups, BMC Infect Dis., 16, 276 (2016)