



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	北海道における PVL/ACME 陽性 MRSA の分布状況と遺伝学的多様性 (1) Characterization of PVL/ACME-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA- II ) isolated from a university hospital in Japan (2) Genetic diversity of emerging Panton-Valentine (1 日本の大学病院から分離された PVL/ACME 陽性メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (genotypes ST8-MRSA-IV 及び ST5-MRSA- II) の特徴 2 北日本における新興の PVL/ACME 陽性 ST8-SCCmecIV a-MRSA 及び ACME 陽性 CC5(ST5/ST764)-MRSA 株の遺伝学的多様性)
Author(s) 著者	川口谷, 充代
Degree number 学位記番号	甲第 2765 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	(1) Microbial Drug Resistance. 2013; 19: 48-56. (2) Journal of Medical Microbiology. 2013; 62: 1852-1863.
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

# 博士論文の要約

報告番号

甲第 2765 号

氏名

川口谷 充代

## 北海道における PVL/ACME 陽性 MRSA の分布状況と遺伝学的多様性

### 研究目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* : MRSA) は院内 (医療関連) 感染、日和見感染の主要な原因菌であり、世界中で古くから知られる MRSA は院内感染型 MRSA (hospital-associated MRSA: HA-MRSA) とも呼ばれる。しかし 1990 年代後半以降、従来からの HA-MRSA とは特徴を異にする市中感染型 MRSA (community-associated MRSA: CA-MRSA) が欧米を中心に報告されるようになり、その世界的な拡がりのゆえにグローバルな新興感染症の病原体として認識されている。黄色ブドウ球菌の遺伝学的系統は multilocus sequence typing による ST(sequence type)により、MRSA はそのメチシリン耐性に関与する遺伝子領域 SCCmec (Staphylococcal cassette chromosome mec)の遺伝子型により分類される。世界中の HA-MRSA は数種類の ST のグループに属し、多くは I, II, III型のいずれかの SCCmec を有する。一方 CA-MRSA は、HA-MRSA に比し極めて多数の ST に分類され、IV または V 型の SCCmec を持つことが特徴である。また一部の CA-MRSA は白血球溶解毒素 PVL (Panton-Valentine Leukocidin)を産生し、本菌株による重篤な感染症状 (膿瘍、壊死性肺炎など) に関与する。近年米国では USA300 と呼ばれる CA-MRSA クローンの急速な拡がり と分離の増加傾向が報告され、その世界的な分布の拡大が懸念されている。USA300 クローンは ST8 に属し、IVa 型 SCCmec (SCCmec IV)、PVL を有するほか、他の CA-MRSA と異なる特徴として ACME (arginine catabolic mobile element : アルギニン代謝系可動性遺伝構造) を染色体中に保有している。ACME は主要な 2 つの遺伝子群 (arc cluster, opp3 cluster)を含んでおり、ヒトの皮膚への定着能、増殖能を高めると考えられている。また CA-MRSA はメチシリンを除く多数の薬剤に概して感受性であるが、USA300 クローンでは多剤耐性化の傾向が見られ、これもこのクローンの拡がりが懸念される理由のひとつである。

本邦における USA300 クローン及び PVL/ACME 陽性 MRSA の検出率はまだきわめて低い。私が 2009 年に修士課程の特別研究で行った CA-MRSA の解析では、少数ながら PVL や ACME を保有する株が検出されたが、米国の主要型クローン USA300 は皆無であり、検出された MRSA は HA-MRSA に類似する遺伝学的特徴を持つものが多かった。しかしその後の本邦における USA300 クローン及び PVL/ACME 陽性 MRSA の拡がりや、その遺伝学的特徴についてはよく調べられていない。そこで博士課程の本研究では、札幌医科大学附属病院および北海道各地の医療機関に由来する多数の MRSA 臨床分離株を対象として分子疫学的調査を継続的に実施した。今回は特に PVL 及び ACME 保有株に着目し、その遺伝学的特徴をより詳細に解析し、国内や欧米で報告されている CA-MRSA との関連や伝播状況を考察した。本邦における CA-MRSA の遺伝学的特徴および薬剤耐性に関する特徴の解析は、市中感染における本菌の重要性をより明確にし、分子疫学的解析から得られた知見は CA-MRSA の世界的な伝播状況を示唆すると思われ、CA-MRSA による感染症対策のための基盤情報として重要な意義をもつと考えられる。

### 研究方法

主論文 1 においては、2008 年 2 月～2010 年 12 月に札幌医科大学附属病院 (検査部細菌検査室) で臨床材料より分離同定された、黄色ブドウ球菌 1366 株 (MRSA601 株) を対象とし、主論文 2 においては、札幌臨床検査センターで北海道各地の医療機関における外来患者から 2011 年 1～12 月に分離同定された MRSA422 株を研究対象とした。黄色ブドウ球菌全株に対して mecA (メチシリン耐性遺伝子)、PVL、ACME-arcA 遺伝子の保有とコアグラゼ遺伝子型 (coa type) を multiplex PCR (M-PCR) を用いて検出し

た。また *mecA* が検出された菌株に対して、SCC*mec* 型およびそのサブタイプ型別を M-PCR で行った。ACME 陽性株に対して ACME type を long-range PCR で分類し、さらに PVL、ACME-*arcA* 遺伝子が検出された全菌株を含む一部の菌株に対して、16 種の抗菌薬への最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、さらに薬剤耐性遺伝子、ヘモリジン、ロイコシジン、エンテロトキシン等の病原因子遺伝子、発現調節遺伝子型 (*agr* type) を M-PCR で検出した。遺伝子配列の決定には PCR - direct sequencing 法を用い、ST (sequence type)、*spa* (プロテイン A 遺伝子) の反復配列解析による *spa* type、ACME-*arcA* 遺伝子および *sarU* プロモータ領域の配列等を決定した。加えて主論文 2 の解析対象菌株においては、USA300 に特徴的な遺伝子 *chp*、*sak* 等の保有を PCR で検出し、PVL 陽性株に対してファージ型別を M-PCR で行った。特に PVL 遺伝子 (*lukS-PV* および *lukS-PV*: 1981bp) と、ACME における *arc* cluster の 5 遺伝子 (*argR*, *arcA*, *arcD*, *arcB*, *arcC*:6174bp) と *opp* cluster の 5 遺伝子 (*opp3A*, *opp3B*, *opp3C*, *opp3D*, *opp3E*: 2950bp) についてはそれらの全遺伝子配列を決定し、USA300 クローンなど既知の菌株の遺伝子配列と比較することにより一塩基多型 (SNP) 解析を行った。以上の結果を総合して、最近の北海道における PVL/ACME 陽性 MRSA の分子疫学的状況を評価し考察した。

## 研究成果および考察

主論文 1. 札幌医科大学附属病院で分離された黄色ブドウ球菌 1366 株 (MRSA601 株) の解析  
[結果]

黄色ブドウ球菌臨床分離株 1366 株のうち MRSA は 601 株 (44%)、MSSA は 765 株 (56%) で、MRSA の 95.1% が SCC*mec* type II (SCC*mec* II)-*coa* type II a を有し、一方 MSSA の *coa* type は多様であった。

PVL 遺伝子は 3 株の MRSA (MRSA の 0.5%)、ACME-*arcA* 遺伝子は 8 株の MRSA (MRSA の 1.3%) と 1 株の MSSA で検出され、このうち 2 株の MRSA が PVL 遺伝子も有していた。PVL 遺伝子を有する 3 株は、SCC*mec*IV(subtype; a=2, c=1)、ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type I に属した。このうち SA2269 (PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>) と SA1725 (PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>-</sup>) の 2 株は、PVL/ACME<sup>+</sup> MRSA 株より抗菌薬に感受性で病原因子遺伝子が少なかったが、SA1483 (PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>) は、薬剤耐性遺伝子 *tet(K)*、*msrA*、*aph(3')-IIIa* 等を有し、多剤耐性傾向を示した。PVL および ACME 陽性 ST8 の 2 株 (SA1483, SA2269) は、USA300 と同じ ACME-type I で、この 2 株のみ USA300 に特徴的な病原因子遺伝子 *selk* と *selq* を有していた。さらにこの 2 株は、ACME-*arcA* 遺伝子 (1236bp) の配列が USA300 と 100% の一致率を示し、また *sarU* promoter 領域において USA300 とは 2 塩基の違いのみしか見られなかった。

上記 2 株の PVL<sup>+</sup>ST8-MRSA の他に、ACME(type-Δ II) が 7 株の ST5-SCC*mec* II で検出され、それらは *spa* type(t002, t067, and t071)-*coa* type II-*agr* type II に属していた。これらの PVL/ACME<sup>+</sup>MRSA は多剤耐性を示し、日本で最も多い HA-MRSA クローン(ST5-SCC*mec* II)と同様に、エンテロトキシン遺伝子クラスター (*egc*: *seg-sei-selm-seln-selo-seli*) を含む様々な病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子 *ermA*、*ermB*、*ant(9)-Ia* を有していた。ST5-ACME-Δ II を含む ST8 以外の MRSA 全株は、ACME-*arcA* 遺伝子は USA300 と 99.8% の一致率を示し、*sarU* promoter 領域においては、同一の位置で 6 塩基の違いが認められた。

## [考察]

本研究で、USA300 と同じ特徴を有する PVL・ACME 陽性 ST8 が 2 株 (SA1483, SA2269) 検出され、USA300 に特徴的な遺伝子 *selk* と *selq* を有し、ACME-*arcA* 遺伝子は 100% の相同性を示した。特に SA1483 は、薬剤耐性遺伝子において USA300-FPR3757 が有する *tet(K)* を、USA300-TCH1516 が有する *msrA*、*aph(3')-IIIa* を持ち、このことから米国で報告されている USA300 に最も類似していると考えられた。また SA1483 はこれまでの日本における報告よりも高い薬剤耐性化傾向を示し、それゆえヒト-ヒト間での伝播の過程でさらなる薬剤耐性を獲得したことが示唆された。New York/Japan クローンとして知られる

ST5-SCC*mec* II は、日本で最も広く分布する HA-MRSA クローンであり、本研究での分離率も 95.1% と高かった。本研究で注目されたことは、この優勢な ST5-SCC*mec* II MRSA の一部に ACME の保有が認め

られたことであり、USA300と同様に、本クローンの宿主への定着能を高め、その存続と伝播を容易にすることが推察される。さらに *sarU* promoter 領域における塩基配列の多様性が、本菌株の病原性に影響を与える可能性も考えられる。

これら 2 つのクローナルタイプ(ST-*spa*-SCCmec),すなわち ST8-t008-IV(PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>)と ST5-t002-II(PVL/ACME<sup>+</sup>)に属するMRSAは様々な耐性遺伝子を保持し、さらにヒトへの高い定着能に関連しているとされるACMEを有していることから、今後もUSA300を含むACME保有株の動向を調査し、情報を蓄積していくことが必要であると考えられた。

## 主論文 2. 北海道内の医療機関における外来神患者由来MRSA422株の解析

### [結果]

本研究で解析した422株のMRSAにおいて、最も優勢なSCCmec型はII(74.2%)で、次にIV(12.1%)、I(59.5%)、V(5.0%)の順で検出された。SCCmec II MRSAでは、*coa* type II aが最も多く(91.1%)、一方SCCmec IVでは*coa* type IIIが最も多かった(64.7%)。PVL/ACME MRSA1株がSCCmec IVの新しいサブタイプSCCmec IV1を有していた。

PVL遺伝子は8株(1.9%)で検出された。ACME-*arcA*は20株(4.7%)で検出され、そのうち5株はPVL遺伝子とSCCmec IVaを有し、PVL陰性株の多くはSCCmec IIを持っていた。検出された5株のPVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>はUSA300と同じ遺伝学的特徴(ACME-type I、ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type I)を持ち、SaPI5(SaPI: Staphylococcal pathogenicity island)上に存在する遺伝子(*sek*, *seg*)、ΦSa3USAにある遺伝子(*sak*, *chp*)を有し、病原因子のプロフィールはこれら5株とも同一であった。薬剤耐性遺伝子の検出において、4株はUSA300-TCH1516が有する*aph*(3')-IIIを、2株はUSA300-FPR3757が有する*tet*(K)を有していた。

一方15株のPVL/ACME<sup>+</sup>は、ACME-type Δ IIを持ち、CC(clonal complex)5に含まれるST5(3株)またはST764(12株)に属し、*spa* type(t001, t002, t3557)-*coa* type II a-*agr* type IIに分類された。これらの分離株は、エンテロトキシン遺伝子クラスターを持ち、PVL陽性分離株よりも薬剤耐性遺伝子を有し多剤耐性を示したが、USA300に特徴的な遺伝子*tet*(K)と*msrA*を持っていなかった。加えて3株の

ST5-ACME-Δ IIにおいて、1株はSaPI3上に存在する*seb*, *sek*, *seq*, *sep*を、他の2株はSaPIにある*tsst*-I、*sec*, *sel*を持っていた。PVL遺伝子のみ陽性の3株のクローナルタイプ(ST-*spa*-SCCmec)は、それぞれST772-t11587-V、ST30-t019-II、ST30-t019-IVであり、ST772とST30は異なる病原因子と耐性遺伝子プロフィールを示した。

*sarU* promoter 領域をUSA300-FPR3757と比較すると、ST8-PVL<sup>+</sup>/ACME-I株は2塩基短く、ST5およびST764 PVL/ACME-Δ IIは6塩基短かった。PVL遺伝子のファージ typing と SNP 解析において、5株のSTB-PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>は全てhaplotype R1でかつΦSA2USAを有し、USA300と同一であったが、2株のST30-PVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>は、haplotype H2またはH3で、USA300と異なるΦSLTを有していた。ACMEのSNP解析において、ST8の5株すべてがUSA300と同一配列の*arc* cluster (haplotype AC1)と*opp3* clusterを有していた。一方AC1(USA300と上記ST8)と他のACME<sup>+</sup>-CC5-MRSAの間においては、4カ所の同義置換を含む9-11塩基の違いがあった。

### [考察]

日本のいくつかの研究においてUSA300(ST8 - SCCmec IVa)は報告されているが、米国における典型的なUSA300-0114(-0114; subtype)クローンPVL<sup>+</sup>/ACME<sup>+</sup>-ST8-*spa* type t008-*coa* type III-*agr* type Iの報告は、日本では本研究の報告を含めてわずかである。本研究で検出された5株のST8-SCCmec IVaは、USA300-0114が有するSaPI5とのΦSA3USAにある遺伝子を持ち、PVL遺伝子およびACMEと100%の相同性を示し、2塩基欠失が*sarU* promoter 領域に見られた。それゆえ、本研究で検出されたUSA300は、USA300-0114(USA300-FPR3757、USA300-TCH1516)とはほぼ同一のゲノムを有し、米国から日本へ伝播する間にわずかに遺伝子が多様化したと推察される。さらにこれら5株はUSA300にある薬剤耐性遺伝子*bla*Zと*msrA*を有していたが、*ermC*と*mupA*を持っておらず、FPR3757およびTCH1516とは異なる。

それゆえ、USA300 ゲノムは高い安定性を持っていると考えられるものの、ヒト-ヒト間での伝播を通じ、薬剤耐性プラスミドの獲得などにより分子進化を経た可能性が示唆された。

ACME- $\Delta$  II を持つ PVL/MRSA は、今回の 2 つの研究で検出され、2009 年の研究よりも検出率がわずかに増加し、ST5 に加えて ST764 が検出された。この ST764 は、院内感染型 ST5 の新しい変異型(1 ローカス変異)で、ST5 と同様に多剤耐性である。また *spa* type において *spa-t001* は *spa-t002* の 1 ローカス変異型で、一方 *spa-t3557* は *spa-t001* の 2 ローカス変異型で、本研究で分離された PVL/ACME<sup>+</sup> MRSA 株は互いに遺伝学的に近い関係にあることが示唆される。2009 年の北海道における調査でも ST764 の MRSA は検出されているが、ACME-*arcA* 遺伝子の保有は見られていない。また ACME- $\Delta$  II-CC5(ST5/ST764)-MRSA 株では、SCC*mec* type、*arc* cluster の SNP、保有する病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子に関し遺伝学的多様性が認められた。このことから ST5/ST764-MRSA は、遺伝学的に高い保存性が見られる ST8-MRSA よりも頻繁に伝播しつつ分布を拡大させ、その過程で遺伝学的多様性が生じたことが示唆される。

## 結論

本研究では USA300 と同じクローンと考えられる PVL<sup>+</sup>/ACME- I<sup>+</sup> ST8-MRSA が北海道で初めて分離され、PVL/ACME- $\Delta$  II<sup>+</sup> CC5(ST5/ST764)-MRSA が多数検出された。北海道において、これら PVL および ACME 陽性 ST8-MRSA と ACME 陽性 CC5(ST5/ST764)-MRSA が潜在的に伝播している可能性があり、それらの分布状況を監視し感染拡大を防止するため、分子疫学的解析によるモニタリングの継続が必要であると考えられた。