



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 <i>Staphylococcus aureus</i> (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA-II) isolated from a university hospital in Japan (2) Genetic diversity of emerging Panton-Valentine leukocidine / arginine catabolic mobile element (ACME)-positive ST8 SCCmec-IVa methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strains and ACME-positive CC5(ST5/ST764)-MRSA strains in northern Japan (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-SCCmec IV 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	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

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			
<p>メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> : 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。</p> <p>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。</p>			
研究方法			
<p>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 <i>mecA</i> (メチシリン耐性遺伝子)、PVL、</p>			

ACME-*arcA* 遺伝子の保有とコアグラエゼ遺伝子型 (*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⁺/ACME⁺) と SA1725 (PVL⁺/ACME⁻) の 2 株は、PVL/ACME⁺ 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⁺/ACME⁺) 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⁺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⁺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-selu*) 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-SCCmec 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-SCCmec 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⁺/ACME⁺)と ST5-t002- II (PVL/ACME⁺)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⁺/ACME⁺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⁺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* を持っていないかった。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⁺/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⁺/ACME⁺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⁺/ACME⁺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⁺-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⁺/ACME⁺-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 *blaZ* 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- Δ 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⁺ 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- Δ 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⁺/ACME- I⁺ ST8-MRSA が北海道で初めて分離され、PVL/ACME- Δ II⁺ 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。

論文審査の要旨及び担当者

平成 25 年 12 月 26 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2765 号	氏名	川口谷 充代
論文審査 担当者	主査 小林 宣道	副査 横田 伸一	
	委員 渡邊 直樹	委員 山下 利春	

論文題名	<p>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 <i>Staphylococcus aureus</i> (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA-II) isolated from a university hospital in Japan (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) Genetic diversity of emerging Panton-Valentine leukocidine / arginine catabolic mobile element (ACME)-positive ST8 SCCmec-IV a methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) strains and ACME-positive CC5(ST5/ST764)-MRSA strains in northern Japan (北日本における新興の PVL/ACME 陽性 ST8-SCCmecIVa-MRSA 及び ACME 陽性 CC5(ST5/ST764)-MRSA 株の遺伝学的多様性)</p>
結果の要旨	<p>本研究は、世界的な分布の拡大が懸念されている市中感染型 MRSA (CA-MRSA)の北海道における分布状況とその分子疫学的特徴を、多数の臨床分離株を対象として解析したものである。日本における USA300 クロンの検出報告は海外からの輸入例がほとんどであるが、今回の研究により USA300 クロンの低頻度ながら国内感染例の原因となっていることを証明するとともに、それらの多剤耐性化の傾向をつきとめ、USA300 の分布の拡大を示唆した。また院内感染型として優勢な ST5 - MRSA の中に、皮膚への高い定着能に関与する ACME を持つ菌株を多数同定し、そのような MRSA に対する感染対策の重要性を示した。以上の理由から、本研究は医学博士の学位に値するとの評価を受けた。</p>