

病院から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の
分子疫学研究

2015 年度

伊藤 歩

【 目 次 】

序論	1
第 1 章: 多摩地域の基幹病院から分離された MRSA の分子疫学的解析	
諸言	7
材料と方法	9
1. 使用菌株	9
2. 使用培地および培養条件	9
3. MRSA の同定	9
4. PCR 法による SCCmec typing と ACME、毒素遺伝子の検出	9
5. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)	11
6. <i>Staphylococcus protein A (spa)</i> typing と multilocus sequence typing (MLST)	12
7. 使用薬剤	15
8. 薬剤感受性の測定	15
9. 統計学的解析	15
結果	16
1. SCCmec typing と毒素遺伝子 (<i>tst</i> および <i>pvl</i>) の有無.....	16
2. MRSA の薬剤感受性	17
3. PFGE による遺伝学的背景の比較	20
4. <i>spa</i> type および ST	22
5. ACME と毒素遺伝子 (<i>seb</i>) の有無	22
6. Pulsotype ごとの薬剤感受性	22
考察	26
第 2 章: 単一医療施設で流行する MRSA の年次推移	
諸言	28
材料と方法	29
1. 使用菌株	29
2. 使用培地および培養条件	29
3. MRSA の同定	29
4. PCR 法による SCCmec typing と 毒素遺伝子 (<i>tst</i> および <i>pvl</i>) の有無.....	29
5. 使用薬剤	29
6. 薬剤感受性の測定	29
結果	30
1. 分離された診療科と SCCmec type の年次推移	30

2. 毒素遺伝子 (<i>tst</i> および <i>pvl</i>) の年次推移	34
3. 薬剤感受性の年次推移	35
考察	39
第3章: 医療施設で流行する市中類似型 MRSA の遺伝学的特徴	
諸言	41
材料と方法	42
1. 使用菌株	42
2. 薬剤感受性の測定	42
3. 毒素遺伝子 (<i>tst</i> および <i>pvl</i>) の有無	42
4. MLST	42
5. PFGE	42
結果	43
1. SCC <i>mec</i> type IV 株と type II 株の薬剤感受性	43
2. SCC <i>mec</i> type IV 株と type II 株の clonal complex (CC) の分布	47
3. SCC <i>mec</i> type IV の CC5 と CC8 の薬剤感受性	47
4. PFGE と clonal complex (CC)、SCC <i>mec</i> type、 毒素遺伝子 (<i>tst</i> および <i>pvl</i>)	50
考察	52
総括	54
謝辞	55
参考文献	56
研究成果の掲載誌	66

【 略 語 一 覧 】

1. 用語

ABC : ATP-binding cassette

ACME : arginine catabolic mobile element

CAMHB : cation-adjusted Mueller-Hinton broth

CA-MRSA : community-acquired MRSA

CC : clonal complex

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EDTA : Etylenediaminetetraacetic acid

HA-MRSA : healthcare-associated MRSA

MLST : multilocus sequence typing

MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA : methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

MHA : Mueller-Hinton agar

MHB : Mueller-Hinton broth

MIC : minimum inhibitory concentration

MIC₅₀ : 50% minimum inhibitory concentration

MIC₉₀ : 90% minimum inhibitory concentration

O. D. : optical density

PBP2 ϕ : penicillin-binding protein 2 ϕ

PCR : polymerase chain reaction

PVL : Pantan-Valentine leukocidin

PFGE : pulsed field gel electrophoresis

SCC : staphylococcal cassette chromosome

Spa : *Staphylococcus* protein A

ST : sequence type

Tris : 2-amino-2-(hydroxymethyl)-propane-1,3-diol

TSA : Tryptone soya agar

TSB : Tryptone soya broth

TSST : toxic shock syndrome toxin-1

序 論

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、ブドウ球菌科 *Staphylococcaceae* *Staphylococcus* 属の細菌である。0.5 ~ 2.5 μm の大きさでブドウの房状の形態をなす、グラム陽性球菌である。特徴として、通性嫌気性でマンニト分解性を示し、高濃度の食塩 (5.8 ~ 25%) または胆汁 (40%) 存在下で増殖できる^{1,2)}。*S. aureus* は *Staphylococcus* 属の中で、最も病原性が高い菌である。本菌が侵入・増殖したことによる感染症を *S. aureus* 感染症と呼ぶ。本菌は組織破壊性が強いため、*S. aureus* 感染症は、化膿性病変を主体とする。本菌は、腸管毒素 (enterotoxin)、毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin-1: TSST-1)、表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin)、Panton-Valentine leukocidin (PVL) などの毒素を産生する。これらの毒素は、化膿性膿痂疹や皮膚炎、壊死性肺炎、敗血症などの種々の疾患や食中毒の発生に密接に関連している³⁻⁶⁾。

S. aureus 感染症の治療には、抗菌薬の使用が必要不可欠である。1929年に Fleming がグラム陽性細菌の細胞壁合成を阻害する抗生物質 penicillin を発見した。その後、Florey と Chain が benzylpenicillin の精製と量産化に成功し、世界的に用いられるようになった。Penicillin は当初 *S. aureus* に奏功したが、1940年代後半にはすでに penicillin 耐性菌が存在しており、1948年には Staphylococci の50%以上が耐性を示したという報告もある⁷⁾。この耐性機構は、penicillin の β -lactam 環を加水分解し、不活化する酵素 penicillinase の産生によるものであった。そこで、1960年に penicillinase で分解されない methicillin が開発されたが、翌年には methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) が出現した⁸⁾。MRSA は本邦でも、1980年代から病院内で分離され始め、急速に拡大し、現在では、臨床分離される *S. aureus* の約50%を占めるといわれている⁹⁾。また、本邦の医療施設における MRSA の分離率は、他国と比較して高いとされる¹⁰⁾。

細菌の薬剤耐性機構は、染色体上の遺伝子の変異や薬剤耐性遺伝子の獲得が知られている。MRSA は、methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) が、methicillin 耐性遺伝子 *mecA* を獲得することで出現する¹¹⁾。*mecA* はペプチドグリカン架橋酵素 penicillin binding protein 2 ϕ (PBP2 ϕ) をコードしている。 β -lactam 系抗菌薬は、細菌の細胞壁合成におけるペプチドグリカンの架橋反応を担う PBP に結合し、細胞壁合成を阻害することで殺菌的な作用を持つ。しかし、PBP2 ϕ は β -lactam 系抗菌薬に低親和性であるため、MRSA はほとんどの β -lactam 系抗菌薬に耐性を示す。

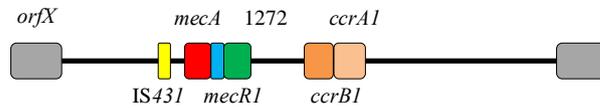
mecA は染色体上の可動性遺伝子である staphylococcal cassette chromosome (SCC) 上に複合体を形成し SCC*mec* として存在している。SCC*mec* は *mec* 複合体と cassette chromosome recombinase (*ccr*) 複合体の構造の違いから、type I ~ XI に分けられている (Fig. 1)¹²⁻¹⁴⁾。一部の type は、内部に薬剤耐性遺伝子をコードする plasmid pUB110 や

transposon Tn554 が挿入されているため、macrolide 系や tetracycline 系といった β -lactam 系抗菌薬以外の薬剤にも耐性を獲得している。すなわち、MRSA は多剤耐性を示し、このことは抗菌薬の治療効果を低下させる要因の一つとなっている。

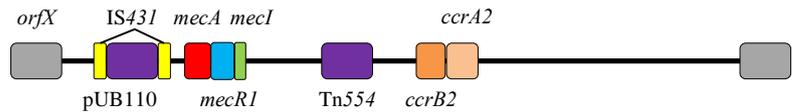
SCCmec type

(strain)

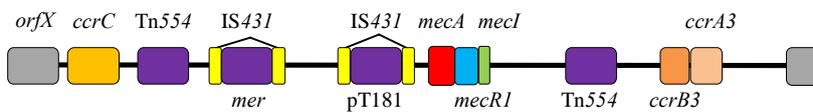
Type I
(NCTC10442)



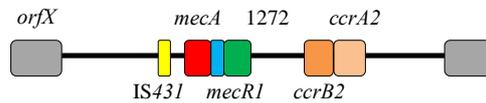
Type II
(N315)



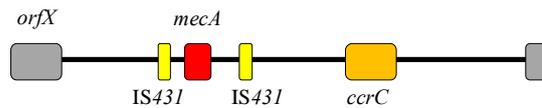
Type III
(85/2082)



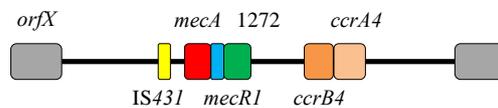
Type IV
(JCSC4744)



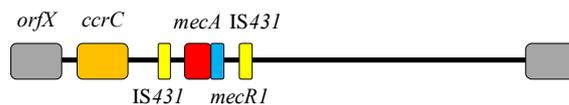
Type V
(WIS)



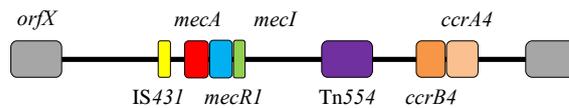
Type VI
(HDE288)



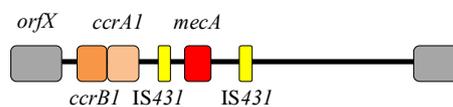
Type VII
(JCSC6082)



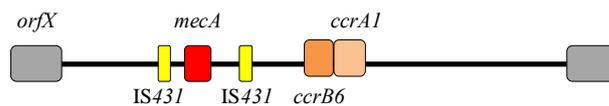
Type VIII
(C10682)



Type IX
(JCSC6943)



Type X
(JCSC6945)



Type XI
(M10/0061)

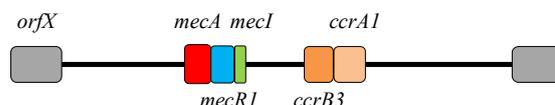


Fig. 1. Schematic structures of SCCmec elements

MRSA は抗菌薬の使用により選択的に増加すると考えられているため、抗菌薬が汎用される医療施設において、入院患者や医療従事者、医療施設的环境中に存在しやすいことが推測される。このような院内に存在する MRSA による感染症を院内感染型 MRSA (healthcare-associated MRSA: HA-MRSA) 感染症と称し、これは入院直後の患者から MRSA が分離されず、入院 48 時間以降に MRSA が分離された場合として、疫学的に定義されている¹⁵⁾。HA-MRSA の一般的な特徴として、多剤耐性傾向を示し、 β -lactam 系抗菌薬のみならず macrolide 系や fluoroquinolone 系抗菌薬などに対しても高度耐性を示す¹⁵⁾。また、本邦で分離される HA-MRSA は、スーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群の原因毒素として知られている毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) をコードする遺伝子 *tst* を保有することが多い¹⁶⁾。従来、HA-MRSA は、抗菌薬の選択圧が比較的少ない市中へ移動した場合、市中の *S. aureus* との生存競争に負け淘汰されると考えられてきた。しかし、1982 年に米国で、市中で感染症を起こす市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA: CA-MRSA) が報告された¹⁷⁾。さらに、最近ではいくつかの国で医療施設における CA-MRSA の流行が世界的な問題となっている^{18,19)}。CA-MRSA の疫学的な定義では、過去 1 年間、HA-MRSA のリスク因子 (入院、手術、カテーテルの留置など) がない、または入院 48 時間以内に患者から分離された MRSA が該当する¹⁵⁾。CA-MRSA の一般的な特徴は、 β -lactam 系以外の薬剤に感受性が高いとされる^{20,21)}。しかし、様々な毒素を産生することが知られている²²⁾。特に、白血球破壊毒素 (PVL) は致死性の高い壊死性肺炎と関連していることが報告されている²³⁻²⁵⁾。PVL 陽性 CA-MRSA は世界各国で報告されており、分子疫学的解析の結果、地域独自の clone が流行していることが明らかとなった²⁶⁻²⁹⁾。したがって、現在では MRSA が院内と市中両方に分布しているため、MRSA の流行を防止するには、医療施設及びその周辺地域を含めた包括的な感染対策を行う必要がある。

MRSA の分類には菌株間で異なる遺伝学的特徴を利用した分子疫学的解析法がある。分子疫学的解析法を行うことで、同じ施設だけでなく異なる施設から分離された MRSA を比較することができる。解析方法として、SCCmec typing、*Staphylococcus* protein A (*spa*) typing、multilocus sequence typing (MLST)、pulsed field gel electrophoresis (PFGE) がある。前述したように SCCmec 領域は I ~ XI の型に分けられるため、この違いを polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、分類する方法が確立されている^{12,13,30-32)}。一方、*spa* typing と MLST は、*S. aureus* が持つ遺伝子の塩基配列に基づいた分類方法である^{33,34)}。*spa* typing は *S. aureus* に特異的な protein A をコードする *spa* の繰返し配列により分類する方法である³⁵⁾。MLST は *S. aureus* が生存に必須とする 7 つの housekeeping gene (*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi*、*yqiL*) を対象とした型別法である³⁶⁾。これらの塩基配列の多型からそれぞれの allele 番号が規定されている。この組み合わせにより sequence type (ST) が決定される。また、7 つの遺伝子のうち、5 つ以上が完全に同じ allele 番号である場合、clonal complex (CC) という類似した clone に属すると定義されている³⁷⁻⁴⁰⁾。*spa* typing と MLST は、世界的なデータベースがイ

ンターネット上に公開されているため、海外の菌株との比較解析が行える。しかし、*spa* typing と MLST は、塩基配列の解析が必要なため、解析装置を持たない臨床現場で容易に行うことができない。もう1つの分子疫学的解析法として PFGE がある。これは、細菌の全ゲノム DNA を制限酵素で切断し、得られた断片の電気泳動パターンの相同性から菌株の識別する方法である⁴¹⁾。本方法は、操作が煩雑で長時間を要し、技術的な難度がある。また、泳動条件の違いや解析する断片の判断に個人差が生じるためデータの互換性に乏しい。しかし、全ゲノム DNA を解析の対象とするため解析度が高く、特定のコミュニティにおける菌株の識別に適している⁴²⁾。よって、これらの方法を組み合わせることで、MRSA を詳細に分類・識別することが可能である⁴³⁾。

医療施設で流行する感染性細菌の流行や耐性化を抑制するために、適切な抗菌薬の使用が求められる。*S. aureus* 感染症の治療は、 β -lactam 系、fluoroquinolone 系、macrolide 系、aminoglycoside 系、tetracycline 系抗菌薬が適応される (Fig. 2)。しかし、MRSA 感染症に対しては、aminoglycoside 系の arbekacin、glycopeptide 系の vancomycin と teicoplanin、oxazolidinone 系の linezolid、lipopeptide 系の daptomycin の5種類の抗菌薬のみが適応される (Fig. 3)。感染症治療においては、原因となる微生物の特定及び感染部位を明らかにし、これらに最適な抗菌薬を選択することが重要である。しかし、原因菌の特定及び薬剤感受性の測定までには数日を要するため、原因菌の推定とそれに基づく抗菌薬を用いたエンピリック治療が行われる。そこで、エンピリック治療を効率的に行うため、antibiogram が作成されている。Antibiogram とは、菌種ごとに各種抗菌薬感受性をまとめたものである。医療施設ごとに分離される菌の薬剤感受性は異なるため、各施設で antibiogram を作成し、使用可能な抗菌薬を推測する必要がある。MRSA に関しても同様であり、MRSA の薬剤感受性は、使用される抗菌薬の種類や使用量による選択圧がかかることで変動すると考えられる。そのため、臨床で活用できる antibiogram を作成するためには、継続したサーベイランスで常に見直すことが必要である。また、医療施設に存在する MRSA が患者を介して他の医療施設へ伝播することが推測される。したがって、地域に点在する医療施設の antibiogram をまとめた、地域単位での antibiogram を作成することで、その地域における外来患者のエンピリック治療に活用できると考えられる。

本邦における MRSA の分子疫学的解析は、医療施設で分離された HA-MRSA を対象としたものが一般的である。CA-MRSA の分離とその分子疫学的解析の報告は非常に少ない。しかし、最近では諸外国で CA-MRSA が医療施設へ流入し、拡大していることが報告されている^{44,45)}。本邦においても同様の現象が起こると推測される。そこで本研究では、本邦の医療施設における CA-MRSA の動向を明らかにするため、東京都多摩地域の基幹病院から分離された MRSA の分子疫学的特徴を地理的・時間的観点から解析した。第1章では地理的観測として、同一年度に4つの基幹病院から分離された MRSA を対象に解析を行った。第2章では時間的観測として、単一施設を対象とした11年間の MRSA の年次推移を解析した。第3章では、本研究中に分離した

多剤高度耐性を示す CA-MRSA の詳細な分子疫学的特徴を解析した。

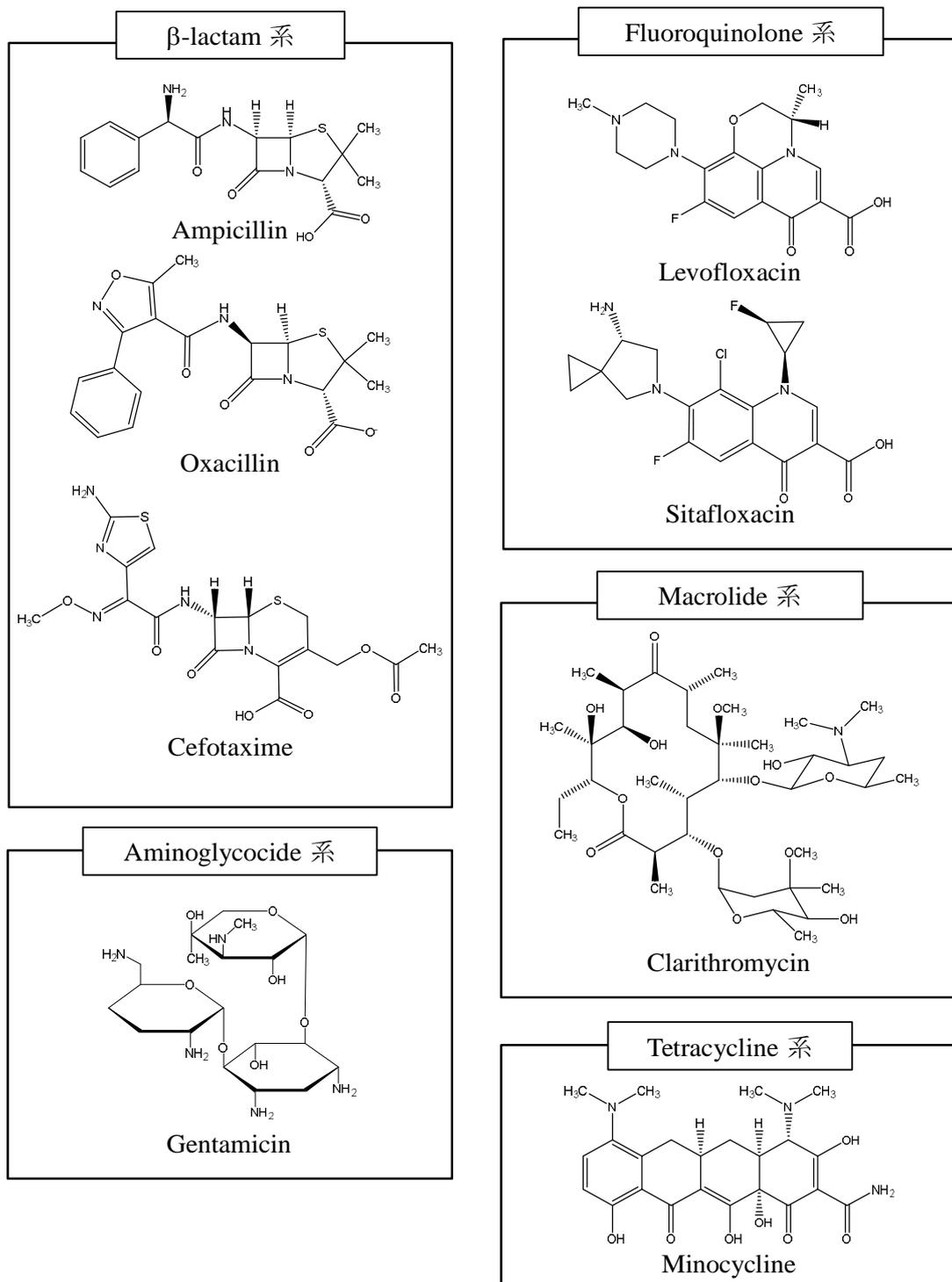
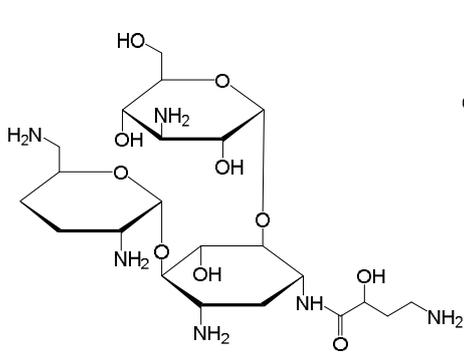
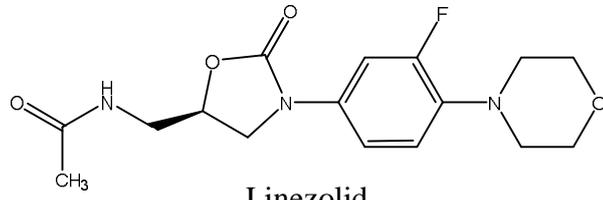


Fig. 2. 抗菌薬の構造

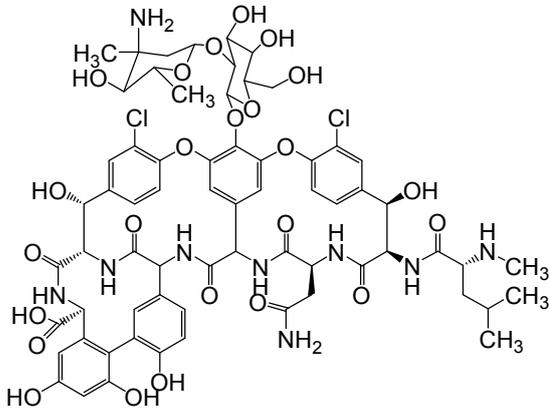
抗MRSA薬



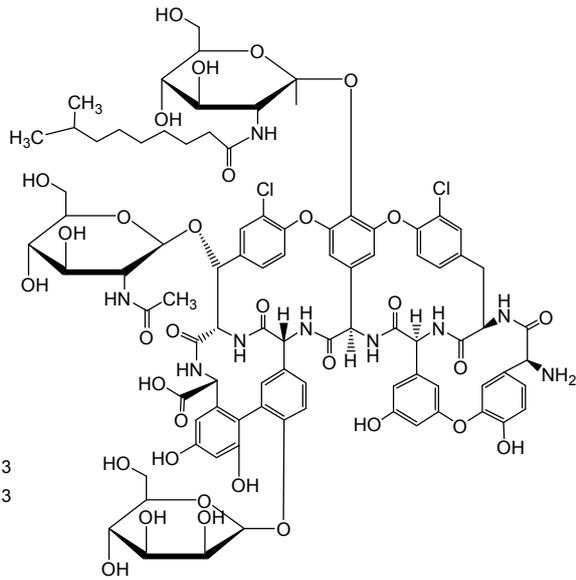
Arbekacin



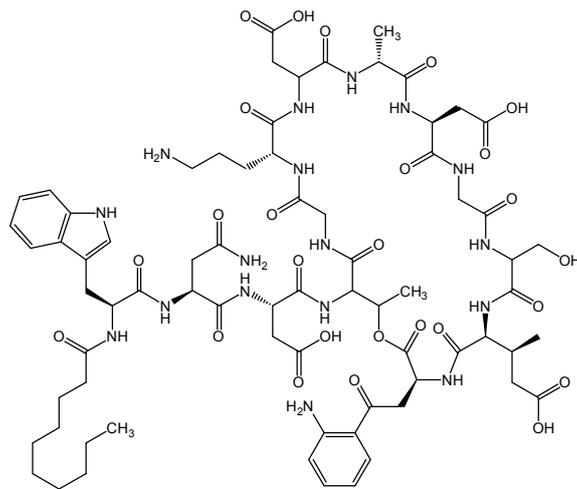
Linezolid



Vancomycin



Teicoplanin



Daptomycin

Fig. 3. 抗MRSA薬の構造

第 1 章

多摩地域の基幹病院から分離された MRSA の

分子疫学的解析

【 緒 言 】

従来は、抗菌薬が汎用される医療施設において、多剤耐性を示す HA-MRSA による感染症が問題視されていた。しかし最近では、市中に分布する CA-MRSA を原因菌とする肺炎・敗血症による死亡例や PVL を産生する MRSA の分離が注目される^{46,47)}。また、分子疫学的解析より、CA-MRSA が市中から院内へ伝播したことが報告されている⁴⁸⁻⁵¹⁾。

MRSA の分子疫学的解析法として、薬剤感受性の測定による表現型の解析や PCR 法による毒素遺伝子の検出、SCCmec typing、spa typing、MLST、PFGE などの遺伝学的解析がある^{34,39,41,52)}。これらの方法を用いることで、HA-MRSA と CA-MRSA を分類することが可能である^{15,20,21)}。一般的に、本邦で流行する HA-MRSA は、多剤高度耐性を示し、SCCmec type II、spa type t002、MLST で ST5 とされ、New York/Japan clone と呼ばれている⁵³⁻⁵⁵⁾。一方、CA-MRSA は、β-lactam 系抗菌薬以外の薬剤に感受性を示し、SCCmec type IV または V、spa type t008、MLST で ST8 や ST30 が多いとされる^{28,56)}。また、本邦の CA-MRSA での報告は少ないが、重症感染症や死亡例との関連が報告されている PVL の産生や、病原性や定着性を促進する arginine catabolic mobile element (ACME) を保有するといった特徴が挙げられる^{18,57)}。ACME は arginine deiminase gene cluster (*arc*) と oligopeptide permease operon gene cluster (*opp3*) から構成されている。ACME がコードする arginine deiminase は L-arginine を加水分解することでアンモニアを産生し、弱酸性のヒト皮膚環境での菌の定着を促進する^{57,58)}。Opp3 は ATP-binding cassette (ABC) transporter family に属し、quorum sensing、真核細胞への接着、抗菌 peptide への抵抗性などに関与し、菌の増殖や発育を促進する^{57,59)}。

近年、CA-MRSA の病原性に類似した特徴を持ち、HA-MRSA に多い ST5 と同一の clonal complex である ST764 に分類される NN54 株が新潟で初めて発見された⁶⁰⁾。NN54 株は type II SCCmec element に隣接した *arc* cluster を保有するが、ST5 株から高頻度で検出される毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) 産生遺伝子 *tst* を含む病原性アイランド SaPI_{m1/n1} を保有していない。しかし、staphylococcal enterotoxin B をコードする *seb* を含む SaPI_{nn54} を保有していた。また、この clone は、北海道でも外来患者から分離されている⁶¹⁾。

以上のことから、本邦の医療施設においても、CA-MRSA の特徴を持つ株が流行し

つつある可能性がある。また、**MRSA** は接触感染で伝播し、人を介して医療施設や市中を移動していると考えられる。したがって、疫学調査は複数の施設を包括して行うことで、流行株の特徴とその動向を解明できると考えた。そこで本章では、**MRSA** の地理的な解析を行う観点から、多摩地域に位置する 4 つの基幹病院から分離された **MRSA** について、院内で流行する **CA-MRSA** の分子疫学的特徴を解析した。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株

使用菌株は 2009 年に、東京医科大学八王子医療センター (THM: 259 株)、東海大学医学部付属八王子病院 (THH: 117 株)、日本医科大学多摩永山病院 (NTH: 115 株)、国立病院機構災害医療センター (TNM: 63 株) から分離された MRSA 554 株を用いた。薬剤感受性の測定に、*S. aureus* の薬剤感受性標準株として JCM2874 株、MRSA の標準株として N315 株を使用した。*tst* の標準株として三重大学から分与された臨床分離株 TPS 1199 株 (MSSA)、*pvl* の標準株として順天堂大学から分与された MW2 株 (MRSA) を用いた⁶²⁾。SCC*mec* typing のコントロール株として、順天堂大学より分与を受けた NCTC10442 株 (type I)、N315 株 (type II)、85/2082 株 (type III)、JCSC4744 株 (type IV)、および WIS 株 (type V) を使用した⁶³⁾。PFGE の参照株として、染色体 DNA の全塩基配列が解析されている N315 株 (Accession No. BA000018) を用いた⁶⁴⁾。

2. 使用培地および培養条件

S. aureus の増殖に、Tryptone Soya broth (TSB: Oxoid) に agar bacteriological (Agar No.1: Oxoid) を加えた Tryptone Soya agar (TSA) を用いた。菌株は、好気条件で 35 °C、一晚培養した。

3. MRSA の同定

検体は、mannitol salt agar (Oxoid) に塗布し、増殖したコロニーを純培養後、グラム染色および PS Latex (Eiken Chemical) を用いたコアグララーゼ試験を行った。グラム陽性球菌であり、コアグララーゼ試験が陽性を示した株を *S. aureus* とした。さらに、6 µg/mL oxacillin (Sigma-Aldrich) と 4% NaCl (Wako) を含有した Mueller-Hinton agar (MHA: Oxoid) に増殖し、後述する PCR より *mecA* が検出された株を MRSA とした⁶⁵⁾。

4. PCR 法による SCC*mec* typing と ACME、毒素遺伝子の検出

4-1. プライマーの合成

S. aureus が産生する enterotoxin 産生遺伝子 *seb*、毒素性ショック症候群毒素産生遺伝子 *tst*、白血球破壊毒素産生遺伝子 *pvl*、アルギニン異化可動性要素 ACME を構成する遺伝子 *arcA* と *opp3-C*、methicillin 耐性遺伝子 *mecA* の保有を確認するため、それぞれに特異的なプライマーを合成した (Table 1)⁶⁶⁻⁶⁹⁾。SCC*mec* typing は Boye らが報告した multiplex PCR 法で使用されている 8 種類のプライマーを使用した (Table 2)⁷⁰⁾。プライマーの合成は、Sigma-Aldrich または北海道システムサイエンスに依頼した。

Table 1. Oligonucleotide primers used for the detection of *mecA*, *seb*, *tst*, *pvl*, *arcA*, and *opp3-C*

Gene / primer	Primer sequence (5' to 3')	Reference
<i>mecA</i>		67)
mecA-F	GTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGC	
mecA-R	GTCAACGATTGTGACACGATAGC	
<i>seb</i>		69)
seb-F	ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG	
seb-R	TGCAGGCATCATGTCATACCA	
<i>tst</i>		69)
tsst-F	GCTTGCGACAACCTGCTACAG	
tsst-R	TGGATCCGTCATTCATTGTTAT	
<i>pvl</i>		68)
pvl-F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	
pvl-R	GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC	
<i>arcA</i>		70)
arcA-F	GAGCCAGAAGTACGCGAG	
arcA-R	CACGTAACCTGCTAGAACGAG	
<i>opp3-C</i>		70)
opp3-F	GCAAATCTGTAAATGGTCTGTT	
opp3-R	GAAGATTGGCAGCACAAAGTG	

F, forward; R, reverse.

Table 2. Oligonucleotide primers used for the determination of SCC*mec* type

Primer	Primer sequence (5' to 3')	SCC <i>mec</i>
β	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	II, IV
α_3	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	
ccrCF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	III, V
ccrCR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAATAT	
1272F1	GCCACTCATAACATATGGAA	I, IV
1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA	
5R <i>mecA</i>	TATACCAAACCCGACAACACTAC	V
5R431	CGGCTACAGTGATAACATCC	

4 - 2. PCR 法

8 連 PCR チューブ (Bio-Bik) に Go Taq[®] Master Mix (Promega) 5 μ L、各種合成プライマーを各々 10 pmol、PCR 試料 1 μ L を加え、超ろ過滅菌水にて全量を 10 μ L とした。PCR の試料は菌株の 1 コロニーを滅菌水 100 μ L に懸濁した菌液を直接用いた。これらをよく混合した後、DNA サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700: Applied Biosystems) にセットした。*mecA* は 95°C、2 min の加熱により DNA を変性させた後、95°C、30 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。*tst* 及び *pvl* は 95°C、2 min の加熱により DNA を変性させた後、95°C、30 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。*seb* は 95°C、2 min の加熱により DNA を変性させた後、95°C、30 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。SCC*mec* typing は 95°C、2 min の加熱により DNA を変性させた後、95°C、30 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。ACME は 95°C、2 min の加熱により DNA を変性させた後、95°C、30 sec の変性、58°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。DNA 増幅バンドの確認はアガロースゲル電気泳動法により行った。

4 - 3. アガロースゲル電気泳動法⁷¹⁾

PCR 反応液 1 μ L を用いて電気泳動用サンプルとした。TAE buffer [40 mM Tris-acetate (pH 8.2)、2 mM EDTA 2Na] を用い、2% agarose S (Nippon Gene) ゲルにて 100 V、30 min 電気泳動を行った。電気泳動装置は、水平サブマリン型電気泳動槽 i-Mupid (Cosmo Bio) を使用した。泳動後、100 μ g/mL ethidium bromide (Wako) 溶液でゲルを 30 min 染色し、水洗後、305 nm の紫外線照射下で蛍光を発した DNA を写真撮影した。DNA 断片の分子量は、分子量既知の 100 bp DNA ladder (TaKaRa Bio) と泳動距離を比較することにより求めた。

5. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)⁴¹⁾

5 - 1. PFGE

DNA 抽出、制限酵素による切断は GenePath Enzyme Module Group (Bio-Rad) と GenePath Universal Module (Bio-Rad) に記載の方法を用いて行った。試料となる菌は TSA で 35°C、一晚培養したものをを用いた。増殖した菌を滅菌生理食塩水に懸濁し、optical density (O. D.) at 600 nm = 0.6 に合わせ、1 mL を 20,000 \times g、2 min の条件で遠心分離し集菌した後、上清を捨て cell suspension buffer [10 mM EDTA 2Na、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl] 150 μ L に懸濁した。この懸濁液に lysozyme/lysostaphin 溶液 [25 mg/mL lysozyme (Wako)、2 mg/mL lysostaphin (Wako)] 6 μ L を加え、15 min 放置した後、embedding agarose [1.2% agarose low melt preparative grade (Bio-Rad)、10 mM

Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl] 150 μ L を加え、直ちに Disposable Plug Mold (Bio-Rad) に 100 μ L 流し込み、4°C、30 min 放置しプラグを作成した。マイクロ遠心チューブに lysozyme/lysostaphin 溶液 12 μ L 含有の lysis buffer [1% sodium lauryl sulfate (SDS: Wako)、100 mM EDTA 2Na、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl] 300 μ L を分注し、作成したプラグを入れて 37°C、1 hr 反応させた。その後、lysis buffer を除去し、TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA 2Na] 600 μ L で 2 回洗浄した後、新たなマイクロ遠心チューブに 20 mg/mL proteinase K (Wako) 12 μ L 含有 proteinase K buffer [1% sodium N-lauryl sarcosinate、0.5 mM EDTA 2Na] 300 μ L を分注し、プラグを加えて 50°C、16 ~ 24 hr 反応させた。反応後、proteinase K buffer を除去し、wash buffer [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)] 600 μ L で 3 回、TE buffer 600 μ L で 2 回、*Sma*I buffer [330 mM Tris-acetate (pH 7.9)、100 mM Mg(OAc)₂ · 4H₂O、660 mM KOAc、5 mM (±) - dithiothreitol、0.1% bovine serum albumin] 500 μ L で 1 回洗浄した。その後、25 U *Sma*I (Takara Bio) 含有 *Sma*I buffer 300 μ L にプラグを加え、25°C、16 ~ 24 hr 反応させた。反応後、*Sma*I buffer を除去し、TE buffer で 1 回洗浄後、適当な大きさに切断したプラグを 1% pulsed field certified agarose (Bio-Rad) ゲルのウェルに挿入し、TBE buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM B(OH)₃、0.5 mM EDTA 2Na] を用いて電気泳動を行った。

泳動は CHEF Mapper (Bio-Rad) で行った。泳動条件は initial switch time 5.3 sec、final switch time 34.9 sec、run time 20 hr、angle 120°、gradient 6.0 V/cm、temperature 14°C、ramping factor linear とした。泳動終了後、ゲルを 100 μ g/mL ethidium bromide 溶液で 15 min 染色し、45 min 精製水中で脱色後、305 nm の紫外線照射下で写真撮影を行った。

5 - 2. 泳動パターンの解析

得られた PFGE の DNA 泳動パターンは Bio Numerics (Applied Math, Ver. 5.10) を用いて解析を行った。Dice 係数を用いた平均距離法 (Unweighted Air Group Method with Arithmetic average: UPGMA) による樹形図を作成した (Band Tolerance 1.0%、Optimization 1.0%)。100%の相同性を示し、かつ同グループに 3 施設以上から分離された菌株を含むグループを epidemic pulsotype とした。

6. *Staphylococcus protein A (spa) typing* と multilocus sequence typing (MLST)

6 - 1. プライマーの合成

spa typing では、*S. aureus* の染色体上に存在する protein A 遺伝子⁷²⁾の X 領域を増幅するために、Shopsin らが報告したプライマーを用いた (Table 3)³³⁾。一方、MLST では、*S. aureus* が生存に必要なとする housekeeping gene (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) を増幅するために、各遺伝子特異的なプライマーを合成した (Table 3)。プライマーの合成は、Sigma-Aldrich または北海道システムサイエンスに依頼した。

Table 3. Oligonucleotide primers used for *spa* typing and MLST

Gene / primer	Primer sequence (5' to 3')	Reference
<i>spa</i>		
1095F	AGACGATCCTTCGGTGAGC	33)
1517R	GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	33)
<i>arcC</i>		
arcC-F	CGGTAATGCGATACAGACA	this study
arcC-R	TGCTACATCAATATCATCGATT	this study
<i>aroE</i>		
aroE-F	AGGACCAGGAGCTAAAGTAA	this study
aroE-R	GCGCTCTGCTTCCTCTA	this study
<i>glpF</i>		
glpF-F	GGAGGACATTTAATATGAATGTA	this study
glpF-R	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	this study
<i>gmk</i>		
gmk-F	GGTCGTAAGGCATGGATA	this study
gmk-R	GCTGCAGTTGTTGCAAT	this study
<i>pta</i>		
pta-F	GGAGGACATTATGGCTGA	this study
pta-R	TTGTCACGTCGTCTGATT	this study
<i>tpi</i>		
tpi-F	GTGCGTTCACAGGTGAA	this study
tpi-R	GCATTACCATGTTTCGCTT	this study
<i>yqiL</i>		
yqiL-F	GGCGTATTGGTTCATTAGA	this study
yqiL-R	GCTGGTCTTAAGCGACTTA	this study

F, forward; R, reverse.

6 - 2. PCR 法による DNA の増幅

8 連 PCR チューブに、PhusionTM DNA polymerase (Finnzymes) 0.2 U、5×PhusionTM HF buffer (Finnzymes) 2 μL、2.5 mM dNTPs mixture (Takara Bio) 0.8 μL、2 種類の合成プライマー各々 25 pmol、滅菌超純水で 10 倍に希釈した PCR 試料 1 μL を加え、滅菌超純水にて全量が 10 μL となるように混合した。これらを DNA サーマルサイクラーにセットした。98°C、30 sec の加熱により DNA を変性させた後、98°C、10 sec の変性、55°C、30 sec のアニーリング、72°C、45 sec の伸長反応の行程を 30 サイクル行った。

6-3. PCR 産物の精製

spa typing および MLST で作成した PCR 産物は、illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare) を用いて精製した。PCR 産物 10 μL に alkaline phosphatase 1 μL と exonuclease 1 μL を加えて、37°C、15 min、その後、80°C、15 min で処理したものを PCR 精製物とした。

6-4. シーケンス反応

ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle sequence Kit (Applied Biosystems) を用いて、ジデオキシターミネーター法によりシーケンス反応を行った。8 連 PCR チューブに Ready reaction premix 1 μL、5 × sequencing buffer 1.5 μL、プライマー 1.6 pmol、PCR 生成物 20 ~ 50 ng を加え、滅菌超純水にて全量を 10 μL となるように混合した。これらを DNA サーマルサイクラーにセットした。96°C、5 min の加熱により DNA を変性させた後、96°C、10 sec の変性、50°C、5 sec のアニーリング、60°C、4 min の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。反応液をマイクロ遠心チューブに移し、滅菌超純水 7.5 μL で共洗い後、3 M NaOAc (pH 4.6) 1.5 μL、95% ethanol 31.3 μL を加え、よく混合し 15 min 放置した。その後、遠心 (室温、20,000 × g、20 min) し、上清をできる限り除去した。70% ethanol 125 μL を加え、遠心 (室温、20,000 × g、10 min) し、上清をできる限り除去した。真空乾燥により ethanol を完全に除去した後、ペレットを Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems) 20 μL に溶解し、電気泳動試料とした。

6-5. マルチキャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動には、オートシーケンサー ABI PRISM™ 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いた。10 × genetic analyzer buffer with EDTA (Applied Biosystems) を超純水で 10 倍希釈し、陽極バッファリザーバーおよび陰極バッファリザーバーとし、ポンプブロック及びオートサンプラーにそれぞれセットした。泳動用試料を MicroAmp™ optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) に移して電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

6-6. *spa* type、sequence type (ST)、clonal complex (CC) の算出

得られた塩基配列をもとに、Bio Numerics (Applied Math, Ver. 7.1) を用いて *spa* type 及び ST を求めた。Web 上のデータベースとして、*spa* type は Ridom SpaServer (<http://www.spaserver.ridom.de>)、ST および CC は MLST.net (<http://www.mlst.net>) を用いた。

7. 使用薬剤

薬剤感受性の測定には、抗菌薬として ampicillin (Wako)、oxacillin、cefotaxime (Wako)、levofloxacin (Wako)、sitafloxacin (Daiichi-sankyo)、clarithromycin (Wako)、gentamicin (Wako)、arbakacin (Meiji-Sika)、minocycline (Wako)、vancomycin (Sigma-Aldrich)、teicoplanin (Sanofi)、linezolid (Pfizer) を使用した。

8. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性は、最少発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) から判定した。MIC は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じ、2 倍寒天希釈法により測定した⁷³⁾。MHA で 35°C、24 hr 培養した菌を Mueller-Hinton broth (MHB: Oxoid) に McFarland standard (bioMèrieux) 0.5 と同等 (約 1.5×10^8 cells/mL) に懸濁させ 10 倍希釈し、薬剤を含有した MHA に、ミクロプランター MIT-P 型 (Sakuma) を用いて接種した。35°C で 18 ~ 24 hr 培養後、菌の生育を判定し、菌の発育を阻止した薬剤の最小濃度をその菌株に対する MIC ($\mu\text{g/mL}$) とした。それぞれの薬剤に対する耐性のブレイクポイントは CLSI に準じて、ampicillin: $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 、oxacillin: $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 、cefotaxime: $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ 、levofloxacin: $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 、clarithromycin: $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 、gentamicin: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、vancomycin: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、teicoplanin: $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 、linezolid: $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ を耐性とした⁷⁴⁾。sitafloxacin と arbakacin のブレイクポイントについては、CLSI により定義されていないため、感受性株である JCM2874 株との比較により、sitafloxacin: $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 、arbakacin: $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ を耐性とした。

9. 統計学的解析

毒素遺伝子の検出率の差は、JMP software (SAS Institute) を用いて、 χ^2 検定により検定し、 $p < 0.05$ のときに統計学的に有意とした。

【 結 果 】

1. SCCmec type と毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の有無

分離された MRSA を HA-MRSA と CA-MRSA に大別するため、MRSA 554 株を対象に SCCmec typing を行った。その結果、全ての医療施設で、HA-MRSA に多い type II が全体の 70%以上を占め、次いで CA-MRSA に多い type IV が 10%以上検出された (Table 4)。全施設の SCCmec type の分布と比較すると、type III と type IV は東海大学医学部附属八王子病院 (THH)、nontypeable (NT) は国立病院機構災害医療センター (TNM) で有意に多く検出された (各々 $p < 0.05$)。これより、複数施設で SCCmec type IV の MRSA が分布していることが示された。

MRSA 554 株を対象に毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の有無を解析したところ、*tst* は 348 株 (62.8%)、*pvl* は 6 株 (1.1%) から検出された (Table 5)。全体の *tst* 保有率と比較すると、東京医科大学八王子医療センター (THM) で有意に高く、東海大学医学部附属八王子病院 (THH) と日本医科大学多摩永山病院 (NTH) で有意に低かった (各々 $p < 0.05$)。一方、*pvl* 保有率は、国立病院機構災害医療センター (TNM) で有意に高かった ($p < 0.05$)。両遺伝子を保有する株は検出されなかった。*tst* 保有株のうち、297 株 (85.3%) は type II、31 株 (8.9%) は type IV であった。一方、*pvl* 保有株はすべて type IV であった (Fig. 4)。これらの結果から、SCCmec type II と *tst*、SCCmec type IV と *pvl* の保有に相関がみられた。

Table 4. Distributions of SCCmec types in MRSA isolates obtained from four hospitals

SCCmec type	No. (%) of strains				
	THM (n = 259)	THH (n = 117)	NTH (n = 115)	TNM (n = 63)	Total (n = 554)
I	7 (2.7)	3 (2.6)	0	0	10 (1.8)
II	210 (81.1)	83 (70.9)	91 (79.1)	46 (73.0)	430 (77.6)
III	0	6 (5.1*)	1 (0.9)	0	7 (1.3)
IV	28 (10.8)	23 (19.7*)	15 (13.0)	9 (14.3)	75 (13.5)
V	1 (0.4)	0	2 (1.7)	0	3 (0.5)
NT	13 (5.0)	2 (1.7)	6 (5.2)	8*(12.7*)	29 (5.2)

THM, Tokyo Medical University Hachioji Medical Centre; THH, Tokai University Hachioji Hospital; NTH, Nippon Medical School Tama Nagayama Hospital; TNM, Tachikawa National Disaster Medical Centre; NT, nontypeable. *, $p < 0.05$ versus detection rate of SCCmec types in all strains as determined by χ^2 test.

Table 5. Distributions of *tst* and *pvl* genes in MRSA isolates obtained from four hospitals

Gene	No. (%) of strains				
	THM (n = 259)	THH (n = 117)	NTH (n = 115)	TNM (n = 63)	Total (n = 554)
<i>tst</i>	176 (68.0*)	64 (54.7*)	63 (54.8*)	45 (71.4)	348 (62.8)
<i>pvl</i>	0	1 (0.9)	1 (0.9)	4 (6.3*)	6 (1.1)

*, $p < 0.05$ versus the detection rate of these genes in all the strains, as determined by χ^2 test.

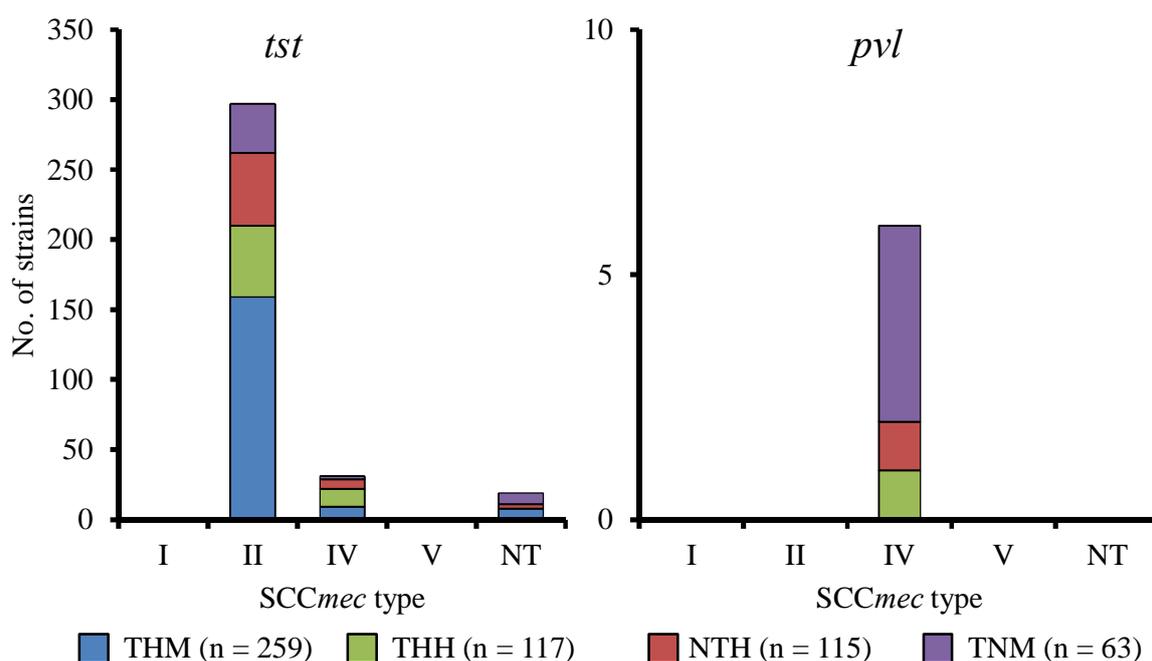


Fig. 4. Comparison of toxin genes and SCCmec types

2. MRSA の薬剤感受性

MRSA の薬剤感受性に施設差があるかを比較するため、MIC を測定した (Table 6)。施設ごとの MIC₅₀、MIC₉₀ に顕著な差は認められなかった。全施設の耐性率と比較すると、東京医科大学八王子医療センター (THM) では levofloxacin、clarithromycin、gentamicin が有意に高かった (各々 $p < 0.05$)。一方、東海大学医学部附属八王子病院 (THH) の levofloxacin と clarithromycin および日本医科大学多摩永山病院 (NTH) の gentamicin は有意に低かった (各々 $p < 0.05$)。全ての施設で β -lactam 系抗菌薬、levofloxacin、clarithromycin、gentamicin に高度耐性を示したが、vancomycin、teicoplanin、linezolid に耐性を示す株は認められなかった。MIC 分布をみると、対象施設間で顕著な差は認められなかった (Fig. 5)。

Table 6. Antimicrobial susceptibilities of MRSA isolates (n = 554)

Antimicrobial agent	THM (n = 259)		THH (n = 117)		NTH (n = 115)		TNM (n = 63)		Total (n = 554)	
	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)
Ampicillin	32 / 64	100	32 / 32	100	32 / 32	100	32 / 32	100	32 / 64	100
Oxacillin	×256 / ×256	99.6	×256 / ×256	100	×256 / ×256	100	×256 / ×256	100	×256 / ×256	99.8
Cefotaxime	×256 / ×256	90.3	×256 / ×256	88.0	×256 / ×256	91.3	×256 / ×256	90.5	×256 / ×256	90.1
Levofloxacin	32 / ×256	90.0*	8 / ×256	80.3*	8 / ×256	82.6	16 / ×256	88.9	16 / ×256	86.3
Sitafloxacin	1 / 32	42.5	0.5 / 32	33.3	1 / 32	42.6	1 / 8	38.1	1 / 32	40.1
Clarithromycin	×256 / ×256	90.3*	×256 / ×256	81.2*	×256 / ×256	87.0	×256 / ×256	85.7	×256 / ×256	87.2
Gentamicin	64 / ×256	68.7*	32 / 128	60.7	32 / 128	53.0*	64 / 128	55.6	32 / 128	62.3
Arbekacin	0.5 / 2	0	0.5 / 1	0.9	0.5 / 1	0	0.5 / 1	0	0.5 / 2	0.2
Minocycline	8 / 16	40.2	8 / 32	42.7	8 / 32	44.3	16 / 16	54.0	8 / 32	43.1
Vancomycin	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0	0.5 / 1	0	1 / 1	0
Teicoplanin	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 4	0	1 / 2	0
Linezolid	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 1	0	0.5 / 2	0	1 / 2	0

MIC₅₀ / MIC₉₀: the values indicate the MICs (µg/mL) that inhibit the growth of 50 % / 90 % of the strains. R (%): rate of resistant strains (%). The resistance break-points of the following antimicrobial agents were determined according to CLSI and this study: ampicillin, × 0.5 µg/mL; oxacillin, × 4 µg/mL; cefotaxime, × 64 µg/mL; levofloxacin, × 4 µg/mL; sitafloxacin, × 2 µg/mL; clarithromycin, × 32 µg/mL; gentamicin, × 16 µg/mL; arbekacin, × 8 µg/mL; minocycline, × 16 µg/mL; vancomycin, × 16 µg/mL; teicoplanin, × 32 µg/mL; linezolid, × 8 µg/mL. *, $p < 0.05$ versus the detection rate of these genes in all the strains, as determined by χ^2 test.

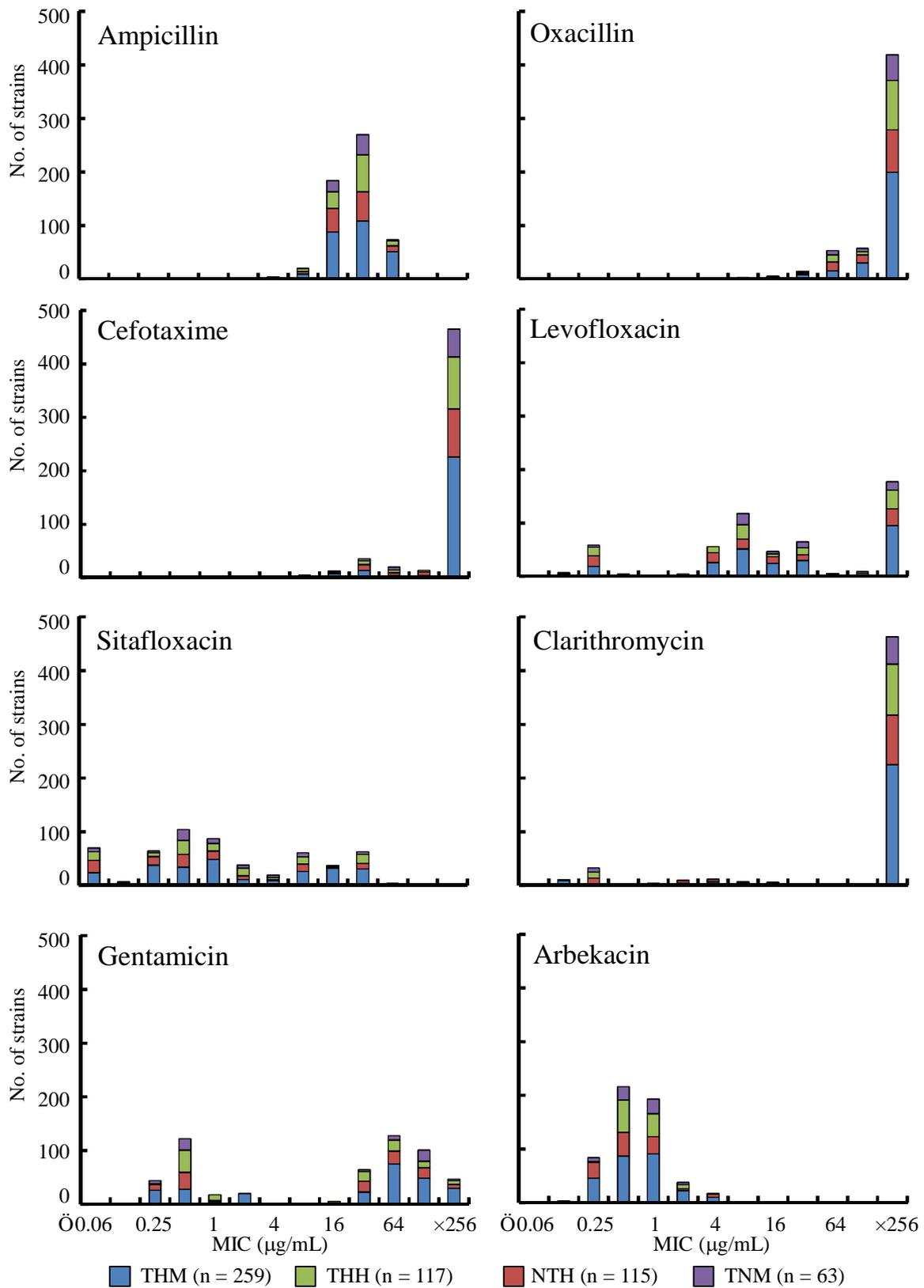


Fig. 5 - 1. Distributions of MIC in MRSA isolates

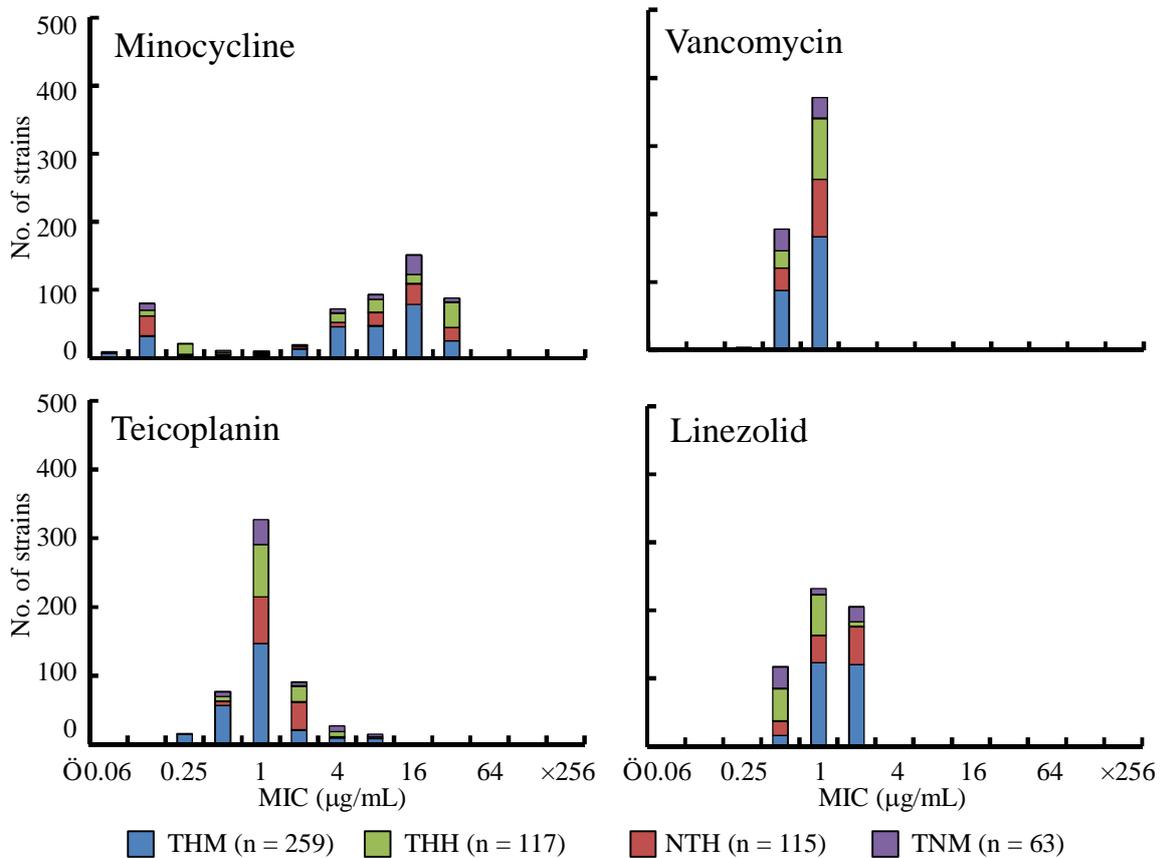


Fig. 5 - 2. Distributions of MIC in MRSA isolates

3. PFGE による遺伝学的背景の比較

分離された MRSA の遺伝学的背景を比較するために PFGE 解析を行った。溶菌せず制限酵素により染色体 DNA が切断されなかったため、解析が行えなかった 33 株は除外した。そのため PFGE の解析は、東京医科大学八王子医療センター (THM) から 246 株、東海大学医学部附属八王子病院 (THH) から 115 株、日本医科大学多摩永山病院 (NTH) から 114 株、国立病院機構災害医療センター (TNM) から 56 株、合計 521 株を対象に行った (Fig. 6)。その結果、異なる病院から分離され、100% の遺伝的相同性を示す MRSA で構成された 4 つの pulsotype が認められた。Pulsotype I ~ IV に属する株はすべて SCCmec type II に分類された。Pulsotype I から *tst* は検出されなかった。一方で、pulsotype II からは 2 株 (28.6%)、pulsotype III は 9 株 (100%)、pulsotype IV は 9 株 (90%) から検出された。これらの結果から、複数の医療施設に遺伝的に同じ SCCmec type II の MRSA が存在することが明らかとなった。

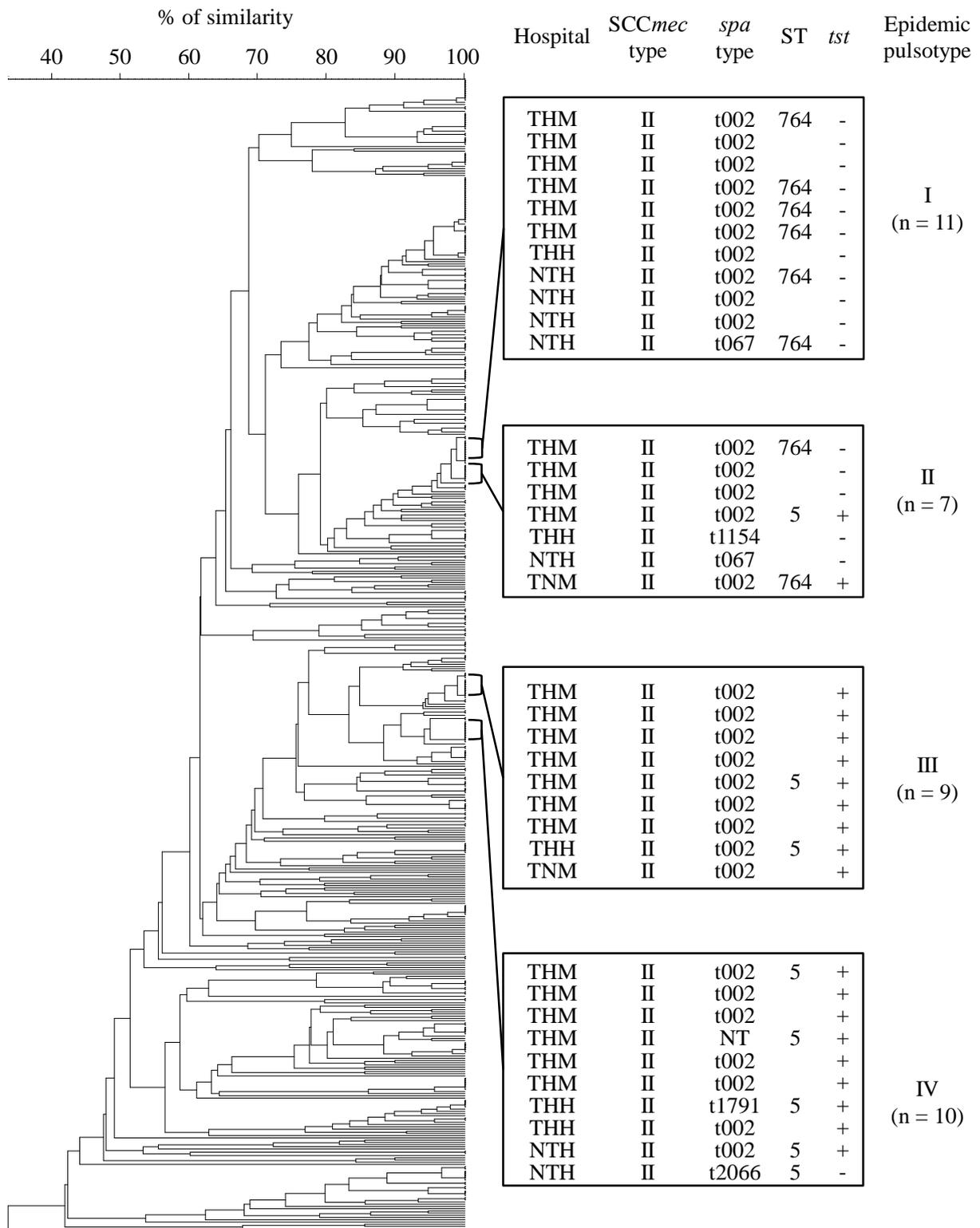


Fig. 6. Molecular phylogenetic analysis of MRSA isolates (n = 521)

4. *spa* type および ST

Pulsotype I ~ IV の 37 株について、さらに詳細な遺伝学的型別を行った。HA-MRSA の代表的な clone である New York/Japan clone と同じ *spa* type t002 は、pulsotype I ~ IV に属するそれぞれ 10 株 (90.9%)、5 株 (71.4%)、9 株 (100%)、7 株 (70.0%) で認められた (Fig. 6)。一部の株を対象に MLST を行ったところ、Pulsotype I と II は、北海道と新潟で報告された HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を有する ST764 が主流であった。一方、pulsotype III と IV は、New York/Japan clone と同じ ST5 が主流であった。これより、複数施設で流行している MRSA は、New York/Japan clone と ST764 clone であることが示された。

5. ACME と毒素遺伝子 (*seb*) の有無

Pulsotype I ~ IV に属する株を対象に、ACME を構成する *arcA* と *opp3-C*、enterotoxin 産生遺伝子 *seb* の有無を解析した。その結果、pulsotype に属する株から *arcA* と *opp3-C* は検出されなかった。一方、*seb* はすべての株から検出された。北海道と新潟で報告された ST764 株は ACME を保有しているのに対し^{60,61}、本研究で分離された ST764 株は ACME を保有していないことから、既報の株とは遺伝学的に異なる株であることが示された。

6. Pulsotype ごとの薬剤感受性

Pulsotype I ~ IV に属する株を対象に薬剤感受性を比較した (Table 7)。Pulsotype I と II は、arbakacin、vancomycin、teicoplanin、linezolid を除いた複数系統の薬剤に高度耐性を示した。一方、pulsotype III と IV は、pulsotype I と II と比較して、levofloxacin と sitafloxacin の MIC₅₀ および MIC₉₀ が低く、sitafloxacin、gentamicin、minocycline の耐性率が低かった。Pulsotype ごとの MIC 分布をみると、levofloxacin と sitafloxacin では、pulsotype I および II は高度耐性、pulsotype III および IV は感受性の領域にピークが認められた (Fig. 7)。Gentamicin では、pulsotype III および IV は感受性株と高度耐性株の 2 群に分布していた。これより、New York/Japan clone と ST764 clone の薬剤感受性パターンが異なることが示された。

Table 7. Antimicrobial susceptibilities of MRSA isolates belonging to the epidemic pulsotypes

Antimicrobial agent	Epidemic pulsotype											
	I (n = 11)			II (n = 7)			III (n = 9)			IV (n = 10)		
	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	R (%)
Ampicillin	16 / 32	100	100	32 / 32	100	100	32 / 32	100	100	16 / 32	100	100
Oxacillin	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100
Cefotaxime	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100
Levofloxacin	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	8 / 32	100	100	4 / 8	100	100
Sitafloxacin	8 / 8	100	100	8 / 16	85.7	85.7	0.25 / 1	0	0	0.5 / 0.5	0	0
Clarithromycin	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100	×256 / ×256	100	100
Gentamicin	64 / 128	81.8	100	128 / 128	100	100	×256 / ×256	66.7	66.7	0.5 / ×256	30.0	30.0
Arbekacin	1 / 2	0	0	1 / 1	0	0	2 / 4	0	0	0.5 / 2	0	0
Minocycline	32 / 32	100	100	32 / 32	71.4	71.4	16 / 16	55.6	55.6	8 / 16	30.0	30.0
Vancomycin	1 / 1	0	0	1 / 1	0	0	1 / 1	0	0	1 / 1	0	0
Teicoplanin	1 / 2	0	0	1 / 2	0	0	1 / 2	0	0	1 / 2	0	0
Linezolid	1 / 2	0	0	1 / 2	0	0	1 / 1	0	0	1 / 2	0	0

MIC₅₀ / MIC₉₀: the values indicate the MICs (µg/mL) that inhibit the growth of 50 % / 90 % of the strains. R (%): rate of resistant strains (%). The resistance break-points of the following antimicrobial agents were determined according to CLSI and this study: ampicillin, × 0.5 µg/mL; oxacillin, × 4 µg/mL; cefotaxime, × 64 µg/mL; levofloxacin, × 4 µg/mL; sitafloxacin, × 2 µg/mL; clarithromycin, × 8 µg/mL; gentamicin, × 16 µg/mL; arbekacin, × 8 µg/mL; minocycline, × 16 µg/mL; vancomycin, × 16 µg/mL; teicoplanin, × 32 µg/mL; linezolid, × 8 µg/mL.

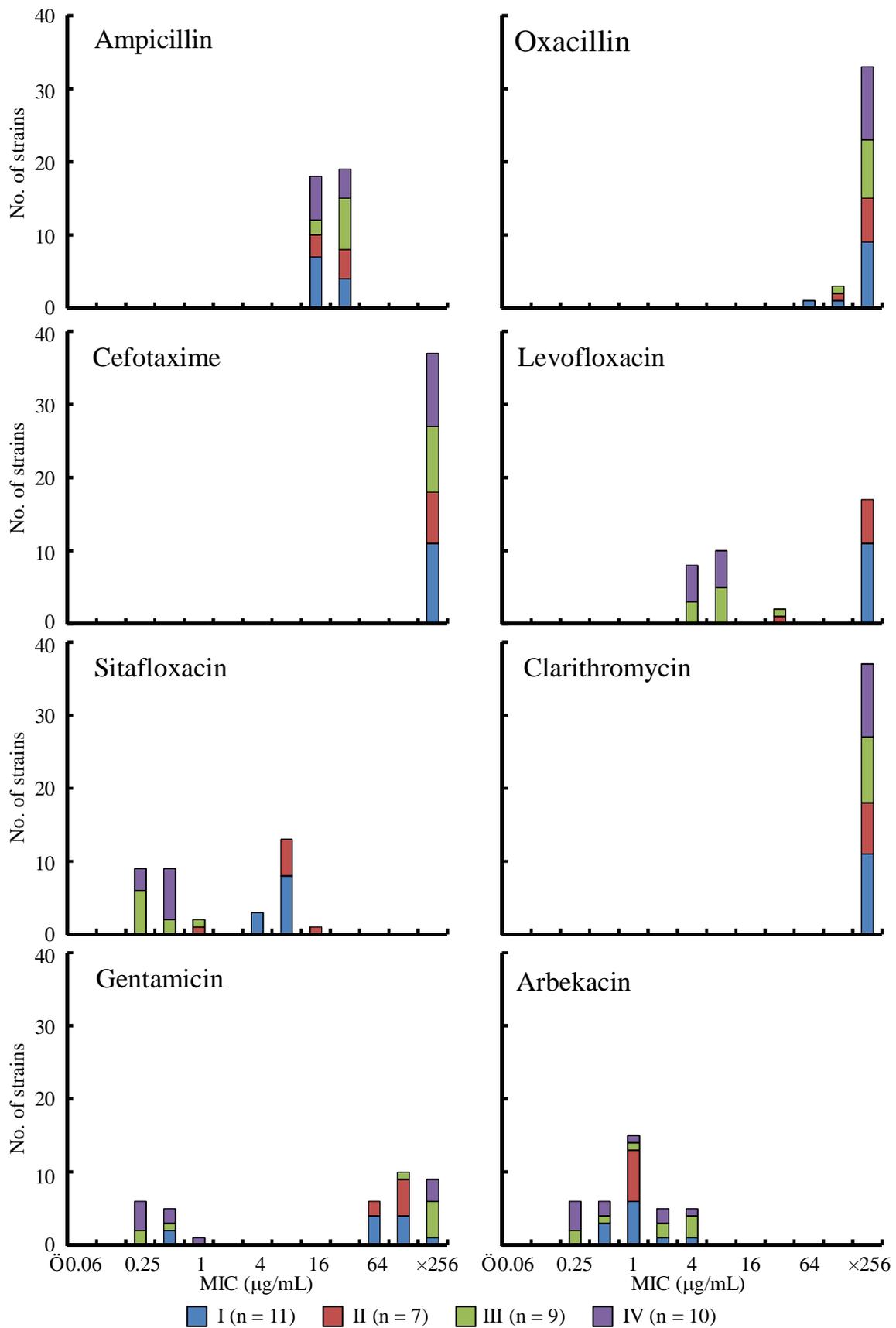


Fig. 7 - 1. Distributions of MIC in MRSA strains belonging to the epidemic pulsotypes

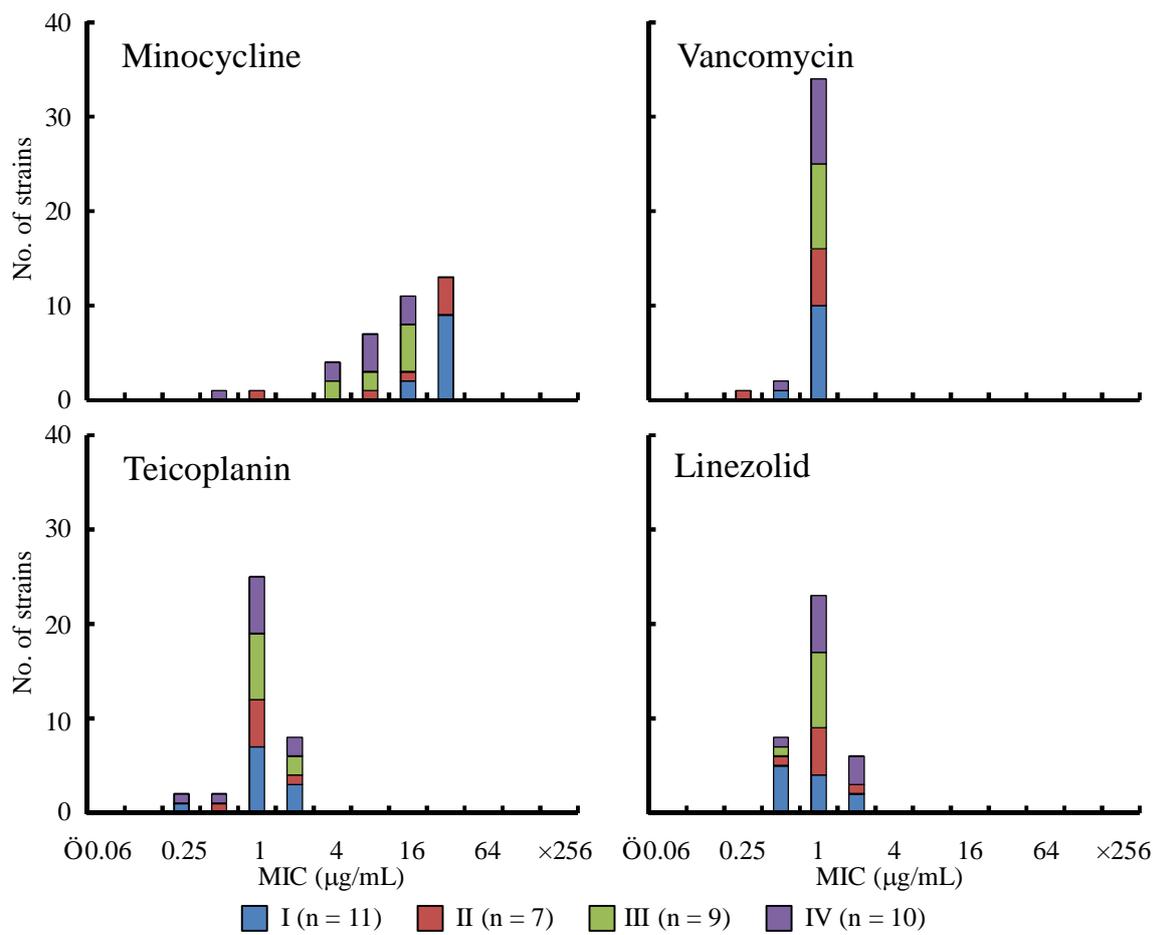


Fig. 7 - 2. Distributions of MIC in MRSA strains belonging to the epidemic pulsotypes

【 考 察 】

本章では、東京の多摩地域に位置する 4 つの基幹病院から分離された MRSA 554 株を対象に SCCmec type、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の検出、PFGE、*spa* typing および MLST を行った。また、PFGE を行った株の一部について *spa* type と ST および ACME、毒素遺伝子 (*seb*) の有無を検証した。これらの分子疫学的解析より、特定地域で流行する MRSA の特徴を明らかにした。

SCCmec typing より、HA-MRSA に多い type II がすべての施設で約 70% を占めていた。しかし、CA-MRSA に多い type IV 株が約 10% を占めていた。この結果は、同時期に行われた入院患者を対象とした日本全国のサーベイランスの結果と類似していた (SCCmec type II: 75.8%, SCCmec type IV: 17.8%)⁷⁵⁾。欧米諸国では CA-MRSA による院内感染症が深刻な問題となっている。本研究でも、院内に分布する type IV 株の存在が明らかとなった。そのため将来的に、日本においても CA-MRSA による院内感染症の増加が懸念される。

毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) に関して、*tst* 保有率は施設間で差が認められたが、全施設で保有率が 50% 以上と高頻度で検出された。また、*tst* 保有株の 85.3% が SCCmec type II であった。*tst* は SCCmec type II 株の染色体上にある病原性アイランド SaPI_{m1/n1} に位置するため、SCCmec type II と *tst* 保有率に相関性があると考えられる。*pvl* 保有率は災害医療センターが他施設より有意に高く、*pvl* 保有株は、全て市中型の SCCmec type IV であった。これは、災害医療センターに救急外来患者が多いことに起因していると考えられる。本邦の *pvl* 陽性 MRSA の検出頻度は欧米諸国よりも非常に少ないとされる²⁸⁾。しかし、本邦においても救急患者から *pvl* 陽性 MRSA が分離されており、SCCmec type IV との相関が認められた⁷⁶⁾。よって、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) 保有率は、施設ごとの SCCmec type の割合の影響を受けると考えられる。

薬剤ごとの耐性率では、levofloxacin、clarithromycin、gentamicin において、全 MRSA と比較すると、施設によって有意差が認められた。しかし、耐性率の水準はいずれも高いことから、抗菌薬の使用に関しては十分に監視する必要がある。また、多摩地域では類似した薬剤感受性パターンを示す MRSA が分布していることが明らかとなった。医療施設ごとの年間の抗菌薬使用量や採用抗菌薬の詳細は不明であるが、各医療施設では類似した抗菌薬の使用がなされていると考えられる。

PFGE 解析より、ある病院で流行している MRSA は、他の病院においても流行していることが明らかとなった。さらに Pulsotype の株ごとに特徴があると考え、詳細に分子疫学的解析を行った。これより、pulsotype、*spa* type、ST が同じ MRSA が複数の病院に存在していた。この結果は、院内で流行する MRSA が人を介して他施設に伝播したと考えられる。本調査で流行株と推測される pulsotype 株は、New York/Japan

clone と ST764 clone と考えられる。また、すべての pulsotype に属する株は、*seb* 陽性であり、ACME は検出されなかった。新潟と北海道で分離された ST764 clone は、*seb* を含む SaPI₅₄ と *arcA* を保有するとされ、本研究で見出された株と遺伝学的に異なることが明らかとなった^{60,61}。よって、本調査地域で流行する ST764 clone は新規の株であると考えられる。これらのことから、本邦では依然として New York/Japan clone が広く分布していることが示された。しかし、新規 ST764 clone が検出されたことから、前述の SCC_{mec} type IV 株と同様に CA-MRSA の流入に注意するだけでなく、CA-MRSA の特徴を有する HA-MRSA への対策を講じる必要がある。

Pulsotype に属する株の薬剤感受性は、新規 ST764 clone を中心とする pulsotype I および II 株は fluoroquinolone 系、macrolide 系、gentamicin 系、minocycline 系抗菌薬に高度耐性を示した。この耐性パターンは、典型的な HA-MRSA および既報の ST764 clone と類似していた^{54,60,61}。一方、New York/Japan clone を中心とする pulsotype III および IV 株の sitafloxacin、gentamicin、minocycline の耐性率は、pulsotype I および II 株と比較して低かった。これらの結果から、New York/Japan clone の薬剤感受性は、わずかに変化している可能性がある。また、新規 ST764 clone が従来の多剤高度耐性 HA-MRSA と同等の薬剤感受性を獲得した可能性がある。

本研究より、SCC_{mec} type II を持つ株は、本邦の代表的な HA-MRSA の New York/Japan clone 以外に、HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を有する ST764 clone が流行していることが明らかとなった。また、各施設で相同性の高い pulsotype 株は遺伝学的特徴が類似し、患者や医療従事者などを介して、他の医療施設へ伝播すると考えられる。さらに、本邦の医療施設で CA-MRSA に多い SCC_{mec} type IV 株の存在が認められた。これより、市中から院内への CA-MRSA の流入が示唆される。したがって、医療施設での MRSA の流行を抑制するために、施設ごとで行う感染対策以外に、地域規模で感染対策を行う必要があると考えられる。

第 2 章

単一医療施設で流行する MRSA の年次推移

【 緒 言 】

第 1 章の地理的な MRSA の解析より、特定の MRSA が施設間で流行していることが明らかとなった。流行株は本邦の代表的な HA-MRSA である New York/Japan clone と、HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を有する ST764 clone が認められた。しかし、本研究で見い出された ST764 clone は、北海道と新潟で報告された ST764 clone とは遺伝学的特徴が異なるため、新規の ST764 clone であると考えられる。さらに、本邦の医療施設においても海外同様に、CA-MRSA に多い SCCmec type IV 株が存在することが明らかとなった。これらの結果から、市中から院内への CA-MRSA の流入または院内での拡大が推測される。また、海外の CA-MRSA が保有する白血球破壊毒素 PVL をコードする遺伝子 *pvl* が複数施設から検出されたことから、本邦の医療施設においても高病原性 MRSA の出現が示唆される。

MRSA の特徴は、医療施設で使用される抗菌薬の種類や使用量、外来患者や医療従事者の流れの影響を受け、変化していると考えられる。MRSA の分子疫学的特徴の変化を解析するためには、同一条件で継続した調査が行える単一の医療施設を対象とする長期サーベイランスが有用である。

そこで第 2 章では、単一の医療施設を対象とした年次推移という時間的な MRSA の分子疫学的特徴の変化を解析した。併せて、2011 年に抗 MRSA 薬として上市された daptomycin の薬剤感受性の変動について検討した。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株

使用菌株は、2002年から2012年に東京医科大学八王子医療センターから分離されたMRSA 3,135株を用いた。薬剤感受性、SCC*mec* typing、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の標準株は、第1章 - 【材料と方法】 - 1 に記した菌株を用いた。

2. 使用培地および培養条件

第1章 - 【材料と方法】 - 2 に記した方法により行った。

3. MRSA の同定

第1章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法により行った。

4. PCR 法による SCC*mec* typing と毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の有無

第1章 - 【材料と方法】 - 4 に記した方法により行った。

5. 使用薬剤

第1章 - 【材料と方法】 - 7 に記した薬剤を使用した。追加薬剤として daptomycin (MSD K.K) を用いた。

6. 薬剤感受性の測定

第1章 - 【材料と方法】 - 8 に記した方法により行った。Daptomycin の薬剤感受性は、Ca²⁺ 濃度が 50 µg/mL に調整した cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) を用いた⁷³⁾。CAMHB の Ca²⁺ 濃度は、LAQUAtwin B-751[®] calcium ion meter (HORIBA) を用いた。Daptomycin の感受性ブレイクポイントは CLSI に準じて、≤ 1 µg/mL とした⁷⁴⁾。

【 結 果 】

1. 分離された診療科と SCCmec type の年次推移

MRSA が分離される診療科の傾向を明らかにするため、診療科ごとの MRSA の分離頻度を調査した (Table 8)。1 年ごとの解析は困難なため、年次推移は 2002 年から 2004 年を 1 つの群、それ以降は 2 年間で 1 つの群としてまとめた。調査期間では、皮膚科、救命救急科、消化器外科・移植外科、耳鼻咽喉科から MRSA が分離される割合が上位を占めていた。

分離された MRSA 全体の SCCmec type を解析したところ、type II は 2,685 株 (85.6%)、type IV は 276 株 (8.8%) から検出された (Table 9 and Fig. 8)。Type I、V、nontypeable (NT) はそれぞれ 61 株 (1.9%)、15 株 (0.5%)、98 株 (3.1%) であった。Type III は検出されなかった。年次推移を見ると、type II の検出率は、89.0% (2002-2004) から 74.5% (2011-2012) と有意に減少していた ($p < 0.05$)。一方、type IV の検出率は、7.6% から 16.5% と有意に増加していた ($p < 0.05$)。また NT の検出率も 1.4% から 6.0% と有意に増加していた ($p < 0.05$)。よって、院内では従来型の HA-MRSA に多い SCCmec type II が減少し、CA-MRSA に多い SCCmec type IV が増加していることが明らかとなった。

さらに、診療科ごとの SCCmec type の推移を調査した (Table 10)。その結果、type IV は、皮膚科、腎臓内科、整形外科、小児科、形成外科といった外来患者が多い科で有意に多く分離された (各々 $p < 0.05$)。Type II は各診療科に幅広く分布していた。これより、CA-MRSA は外来患者を介して院内に導入したと考えられる。

Table 8. Clinical department of patients carrying MRSA

Clinical department	No. (%) of patients						Total (n = 3,135)
	2002-2004 (n = 798)	2005-2006 (n = 707)	2007-2008 (n = 610)	2009-2010 (n = 486)	2011-2012 (n = 534)		
Cardiovascular Internal Medicine	45 (5.6)	17 (2.4)	1 (0.2)	17 (3.5)	8 (1.5)	88 (2.8)	
Cardiovascular Surgery	17 (2.1)	7 (1.0)	3 (0.5)	9 (1.9)	12 (2.2)	48 (1.5)	
Dermatology	12 (1.5)	39 (5.5)	16 (2.6)	26 (5.3)	44 (8.2)	137 (4.4)	
Diabetes, Endocrine and Metabolism Medicine	4 (0.5)	0	0	1 (0.2)	0	5 (0.2)	
Emergency Medical Care Center	135 (16.9)	51 (7.2)	20 (3.3)	44 (9.1)	46 (8.6)	296 (9.4)	
Gastroenterological Medicine	15 (1.9)	6 (0.8)	5 (0.8)	11 (2.3)	6 (1.1)	43 (1.4)	
Gastroenterological Surgery and Transplantation	63 (7.9)	49 (6.9)	8 (1.3)	55 (11.3)	28 (5.2)	203 (6.5)	
General Physics	0	0	0	0	1 (0.2)	1 (0.1)	
Geriatrics	26 (3.3)	20 (2.8)	3 (0.5)	12 (2.5)	6 (1.1)	67 (2.1)	
Glandula Mammaria	0	0	0	0	1 (0.2)	1 (0.1)	
Hematology	28 (3.5)	17 (2.4)	0	3 (0.6)	0	48 (1.5)	
Intensive Care Unit	0	6 (0.8)	5 (0.8)	12 (2.5)	8 (1.5)	31 (1.0)	
Nephrology	19 (2.4)	18 (2.5)	5 (0.8)	14 (2.9)	20 (3.7)	76 (2.4)	
Neurological Medicine	15 (1.9)	13 (1.8)	4 (0.7)	10 (2.1)	11 (2.1)	53 (1.7)	
Neurosurgery	26 (3.3)	6 (0.8)	2 (0.3)	16 (3.3)	13 (2.4)	63 (2.0)	
Obstetrics and Gynecology	10 (1.3)	4 (0.6)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	17 (0.5)	
Ophthalmology	2 (0.3)	1 (0.1)	0	2 (0.4)	1 (0.2)	6 (0.2)	
Oral and Maxillofacial Surgery	6 (0.8)	1 (0.1)	0	0	0	7 (0.2)	
Orthopedic Surgery	9 (1.1)	22 (3.1)	3 (0.5)	8 (1.6)	8 (1.5)	50 (1.6)	
Otolaryngology - Head and Neck Surgery	83 (10.4)	57 (8.1)	18 (3.0)	62 (12.8)	20 (3.7)	240 (7.7)	
Pediatrics	33 (4.1)	59 (8.3)	13 (2.1)	41 (8.4)	20 (3.7)	166 (5.3)	
Plastic Surgery	13 (1.6)	17 (2.4)	5 (0.8)	12 (2.5)	22 (4.1)	69 (2.2)	
Respiratory Medicine	0	0	6 (1.0)	5 (1.0)	13 (2.4)	24 (0.8)	
Respiratory Surgery	0	0	0	0	1 (0.2)	1 (0.1)	
Rheumatology	0	0	0	0	2 (0.4)	2 (0.1)	
Urology	32 (4.0)	18 (2.5)	7 (1.1)	24 (4.9)	9 (1.7)	90 (2.9)	
No information	205 (25.7)	279 (39.5)	485 (79.5)	101 (20.8)	233 (43.6)	1,303 (41.6)	

Table 9. Annual transition of SCCmec types in MRSA strains between 2002 and 2012

SCCmec type	No. (%) of strains					Total (n = 3,135)
	2002-2004 (n = 798)	2005-2006 (n = 707)	2007-2008 (n = 610)	2009-2010 (n = 486)	2011-2012 (n = 534)	
I	14 (1.8)	9 (1.3)	19 (3.1)	10 (2.1)	9 (1.7)	61 (1.9)
II	710 (89.0*)	636 (90.0*)	537 (88.0*)	404 (83.1*)	398 (74.5)	2,685 (85.6)
IV	61 (7.6*)	41 (5.8*)	35 (5.7*)	51 (10.5*)	88 (16.5)	276 (8.8)
V	2 (0.3*)	2 (0.3*)	3 (0.5)	1 (0.2)	7 (1.3)	15 (0.5)
NT	11 (1.4*)	19 (2.7*)	16 (2.6*)	20 (4.1)	32 (6.0)	98 (3.1)

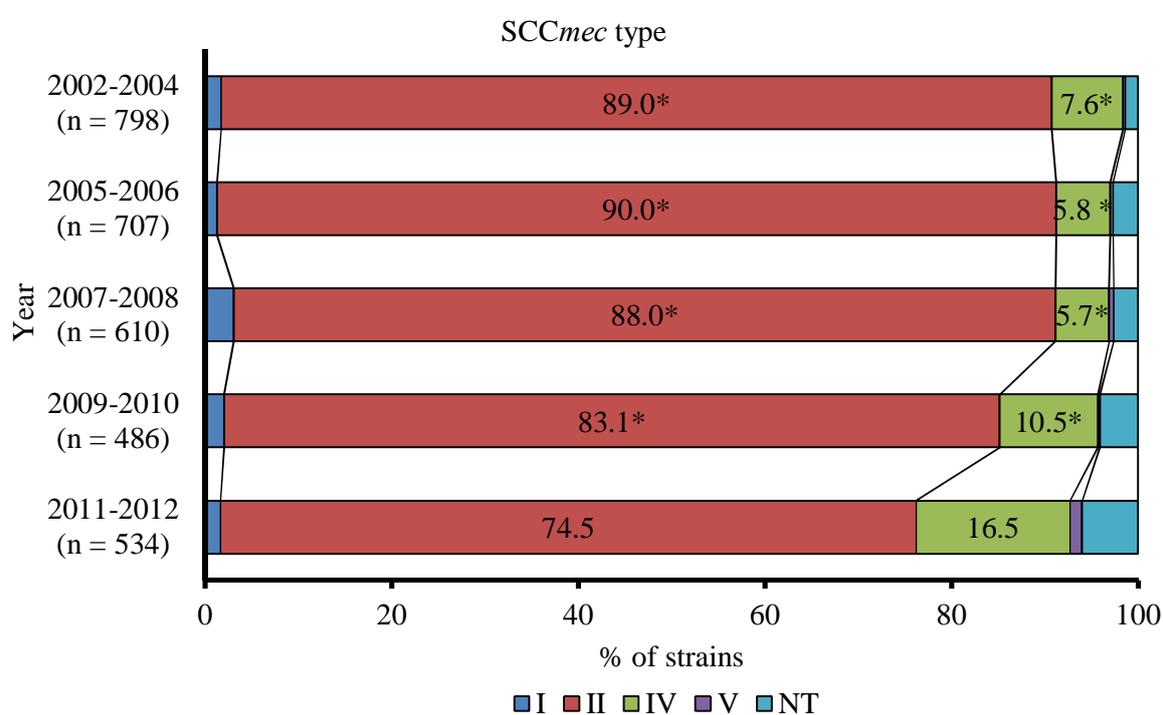


Fig. 8. Annual transition of SCCmec types in MRSA strains between 2002 and 2012
 NT, nontypeable. *, $p < 0.05$ versus % of strains in 2011-2012, as determined by χ^2 test.

Table 10. Comparison between clinical departments and SCCmec types in MRSA

Clinical department	No. (%) of strains	
	SCCmec type II	SCCmec type IV
	(n = 2,685)	(n = 276)
Cardiovascular Internal Medicine	82 (3.1)	2 (0.7*)
Cardiovascular Surgery	35 (1.3)	7 (2.5)
Dermatology	89 (3.3)	35 (12.7*)
Diabetes, Endocrine and Metabolism Medicine	4 (0.1)	1 (0.4)
Emergency Medical Care Center	255 (9.5)	28 (10.1)
Gastroenterological Medicine	39 (1.5)	3 (1.1)
Gastroenterological Surgery and Transplantation	171 (6.4)	18 (6.5)
General Physics	1 (0.1)	0
Geriatrics	59 (2.2)	6 (2.2)
Glandula Mammaria	1 (0.1)	0
Hematology	47 (1.8)	1 (0.4)
Intensive Care Unit	28 (1.0)	1 (0.4)
Nephrology	61 (2.3)	13 (4.7*)
Neurological Medicine	47 (1.8)	2 (0.7)
Neurosurgery	56 (2.1)	5 (1.8)
Obstetrics and Gynecology	14 (0.5)	2 (0.7)
Ophthalmology	6 (0.2)	0
Oral and Maxillofacial Surgery	5 (0.2)	2 (0.7)
Orthopedic Surgery	40 (1.5)	9 (3.3*)
Otolaryngology - Head and Neck Surgery	215 (8.0)	17 (6.2)
Pediatrics	118 (4.4)	31 (11.2*)
Plastic Surgery	53 (2.0)	13 (4.7*)
Respiratory Medicine	19 (0.7)	4 (1.4)
Respiratory Surgery	1 (0.1)	0
Rheumatology	0	1 (0.4)
Urology	78 (2.9)	4 (1.4)
No information	1,161 (43.2)	71 (25.7*)

*, $p < 0.05$ versus % of strains with SCCmec type II, as determined by χ^2 test.

2. 毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の年次推移

SCC*mec* type の割合が年々変化していることから、SCC*mec* type と相関する毒素遺伝子の保有率も変化すると考えられる。そこで、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の年次推移を調査した (Table 11)。*tst* と *pvl* はそれぞれ 2,209 株 (70.5%) と 18 株 (0.8%) から検出された。*tst* 保有率は、88.1% (2002-2004) から 52.4% (2011-2012) と有意に減少し、*pvl* 保有率は、0% から 2.2% と有意に増加していた (各々 $p < 0.05$)。*tst* 保有株のうち、SCC*mec* type I、II、IV、V、NT の割合はそれぞれ、0.8%、90.3%、5.1%、0.1%、3.7% と type II が約 90% を占めていた。一方、*pvl* 保有株のうち、SCC*mec* type I、II、IV、NT の割合はそれぞれ、5.6%、11.1%、77.8%、5.6% と type IV 株が約 78% を占めていた。*tst* と *pvl* の両方を保有する株は 3 株が検出され、そのうち type I が 1 株、type IV が 2 株であった。

tst 保有株または *pvl* 保有株の SCC*mec* type の年次推移を解析した (Fig. 9)。*tst* を保有する type II 株が年々減少していた。一方、*pvl* を保有する type IV 株は増加傾向を示した。これより、*tst* は SCC*mec* type II と、*pvl* は SCC*mec* type IV に相関関係が認められた。

Table 11. Distribution of *tst* and *pvl* genes in MRSA

Gene	No. (%) of strains					Total (n = 3,135)
	2002-2004 (n = 798)	2005-2006 (n = 707)	2007-2008 (n = 610)	2009-2010 (n = 486)	2011-2012 (n = 534)	
<i>tst</i>	703 (88.1*)	472 (66.8*)	432 (70.8*)	322 (66.3*)	280 (52.4)	2,209 (70.5)
<i>pvl</i>	0	1 (0.1*)	5 (0.8)	0	12 (2.2)	18 (0.8)

*, $p < 0.05$ versus % of strains in 2011-2012, determined by χ^2 test.

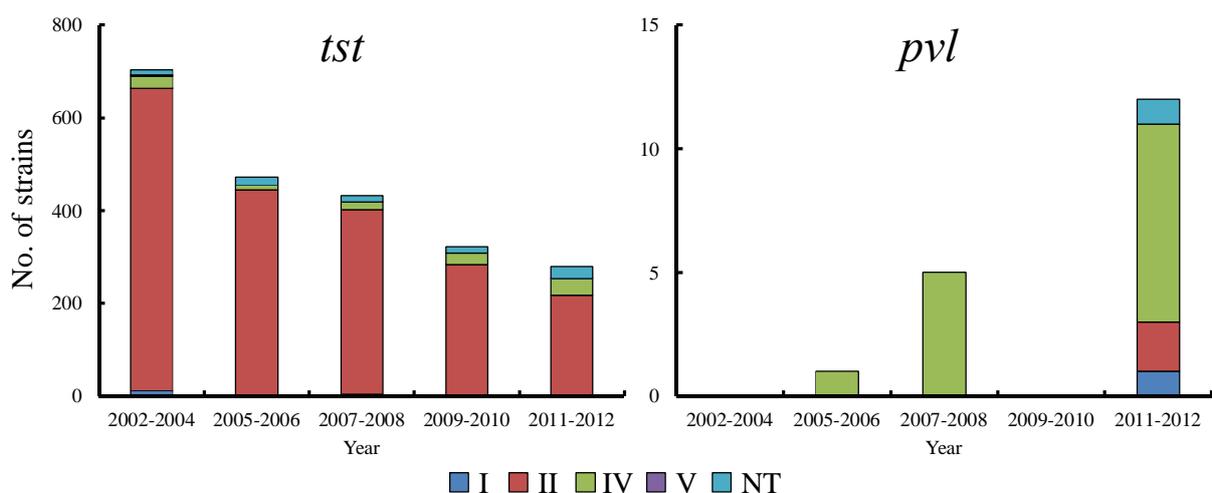


Fig. 9. Comparison between annual transition of SCC*mec* type and toxin genes

3. 薬剤感受性の年次推移

主要な抗菌薬に対する MRSA の感受性の推移を調査した (Table 12)。Oxacillin、cefotaxime、clarithromycin の MIC₅₀、MIC₉₀ に変化は認められなかった。Ampicillin と oxacillin の耐性率の推移に変化は見られなかったが、cefotaxime、levofloxacin、clarithromycin、minocycline の耐性率は年々有意に減少していた (各々 $p < 0.05$)。一方、sitafloxacin と gentamicin の耐性率は、2005-2006 年から 2011-2012 年にかけて減少傾向が認められた。抗 MRSA 薬では、vancomycin、teicoplanin、linezolid に対して、すべての分離株は感受性を示したが、arbekacin では 23 株が耐性を示した。

薬剤ごとの MIC 分布の年次推移を見ると、 β -lactam 系、aminoglycoside 系、tetracycline 系抗菌薬で高度耐性を示す菌株の割合が減少し、低感受性株の割合が増加していた (Fig. 10)。抗 MRSA 薬の MIC 分布に変化は認められなかった。これらの結果から、院内全体の MRSA において、複数の抗菌薬で感受性が改善していることが明らかとなった。

Daptomycin に関しては 2009-2010 年を対象に、薬剤感受性を測定した。その結果、daptomycin の感受性ブレイクポイント近傍の MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株が 159 株、MIC が 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株が 17 株であった。この時に使用した CAMHB の Ca^{2+} 濃度を測定すると、 $33.8 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示し、CLSI が規定する 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を下回っていた。そこで、 Ca^{2+} 濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることを確認した CAMHB を用いて再測定したところ、MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株が 4 株、MIC が 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株が 176 株であり、MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株が有意に減少した ($p < 0.05$) (Fig. 11)。感受性ブレイクポイントを上回る MIC が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株は、 Ca^{2+} 濃度補正前に 3 株、 Ca^{2+} 濃度補正後に 2 株認められた。よって、daptomycin の薬剤感受性は培地中の Ca^{2+} 濃度に影響を強く受けることが示された。

Table 12. Antimicrobial susceptibilities of MRSA strains

Antimicrobial agent	2002-2004 (n = 798)		2005-2006 (n = 707)		2007-2008 (n = 610)		2009-2010 (n = 486)		2011-2012 (n = 534)	
	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)
Ampicillin	32 / 64	100	32 / 64	99.9	32 / 64	100	32 / 64	100	16 / 32	100
Oxacillin	×256 / ×256	100	×256 / ×256	99.7	×256 / ×256	100	×256 / ×256	99.8	×256 / ×256	99.4
Cefotaxime	×256 / ×256	96.0*	×256 / ×256	96.7*	×256 / ×256	94.6*	×256 / ×256	91.6*	×256 / ×256	86.3
Levofloxacin	8 / ×256	92.0*	32 / ×256	92.2*	32 / ×256	92.1*	16 / ×256	90.1	32 / ×256	87.6
Sitafloxacin	0.5 / 8	28.3*	2 / 16	50.1*	2 / 32	51.0*	1 / 32	40.3	1 / 16	44.8
Clarithromycin	×256 / ×256	94.9*	×256 / ×256	95.6*	×256 / ×256	95.2*	×256 / ×256	93.0*	×256 / ×256	89.5
Gentamicin	2 / 64	40.5*	32 / 128	64.6	64 / 128	65.4	64 / ×256	66.5	64 / 128	62.7
Arbekacin	0.5 / 1	0.1*	0.25 / 2	1.4	0.5 / 1	0.2*	0.5 / 2	0.8	0.5 / 2	1.3
Minocycline	32 / 32	77.7*	32 / 32	73.1*	16 / 32	63.6*	8 / 32	48.8	8 / 16	47.8
Vancomycin	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0
Teicoplanin ^a	ND	ND	ND	ND	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0
Linezolid ^b	ND	ND	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0
Daptomycin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5 / 0.5	0.4	ND	ND

^aThe data were available from 2008 (n = 283). ^bThe data were available from 2006 (n = 341). MIC₅₀ / MIC₉₀, the values indicate the MICs (µg/mL) that inhibit the growth of 50% /

90% of the strains; R, rate of resistant strains; ND, no data. The resistance break-points of the following antimicrobial agents were determined according to CLSI and this study: ampicillin, × 0.5 µg/mL; oxacillin, × 4 µg/mL; cefotaxime, × 64 µg/mL; levofloxacin, × 4 µg/mL; sitafloxacin, × 2 µg/mL; clarithromycin, × 8 µg/mL; gentamicin, × 16 µg/mL; arbekacin, × 8 µg/mL; minocycline, × 16 µg/mL; vancomycin, × 16 µg/mL; teicoplanin, × 32 µg/mL; linezolid, × 8 µg/mL; daptomycin, × 2 µg/mL. *, *p* < 0.05 versus the antimicrobial susceptibilities in 2011-2012, as determined by χ^2 test.

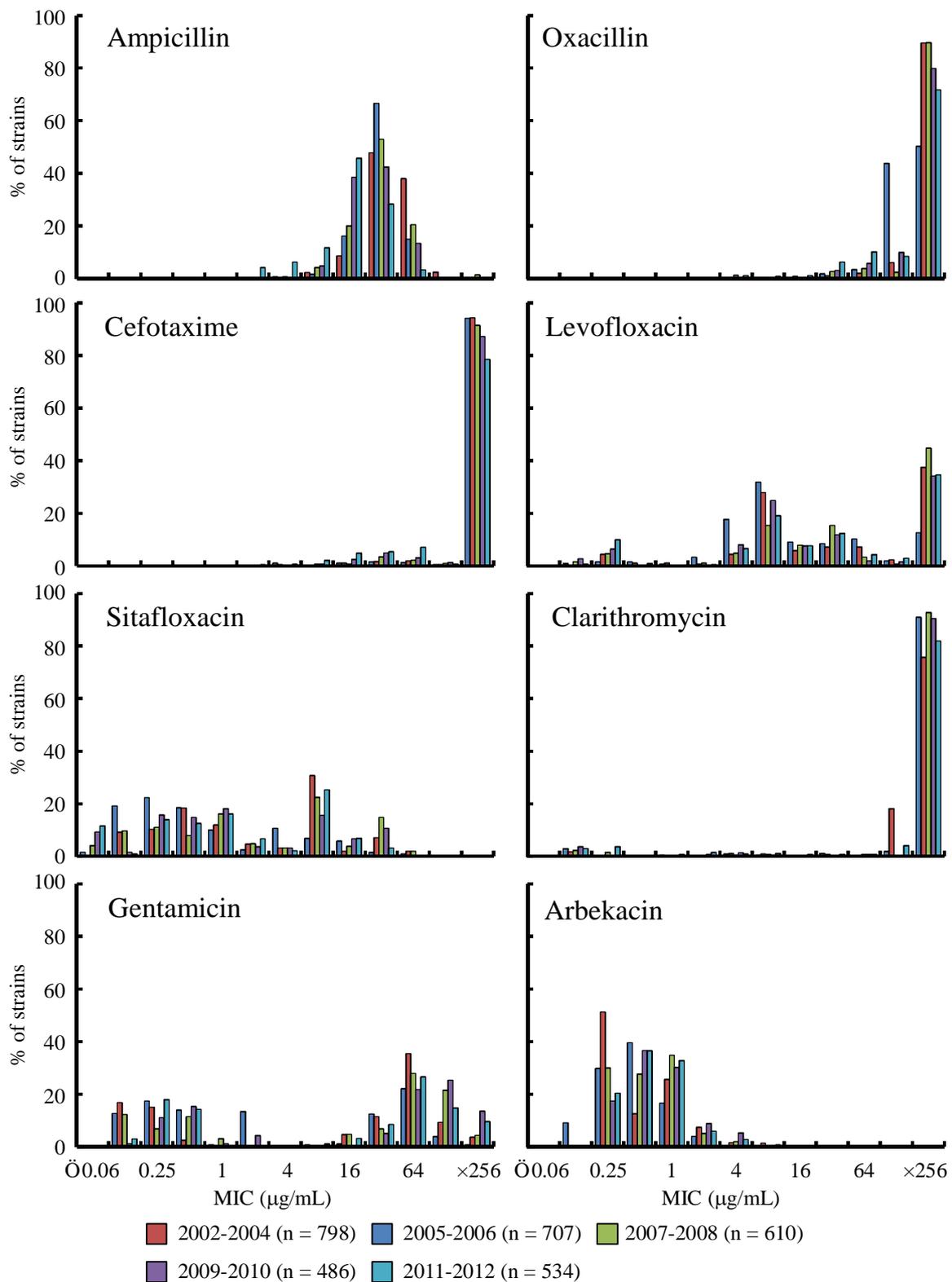


Fig. 10 - 1. Annual transition of the MIC distributions in MRSA strains between 2002 and 2012

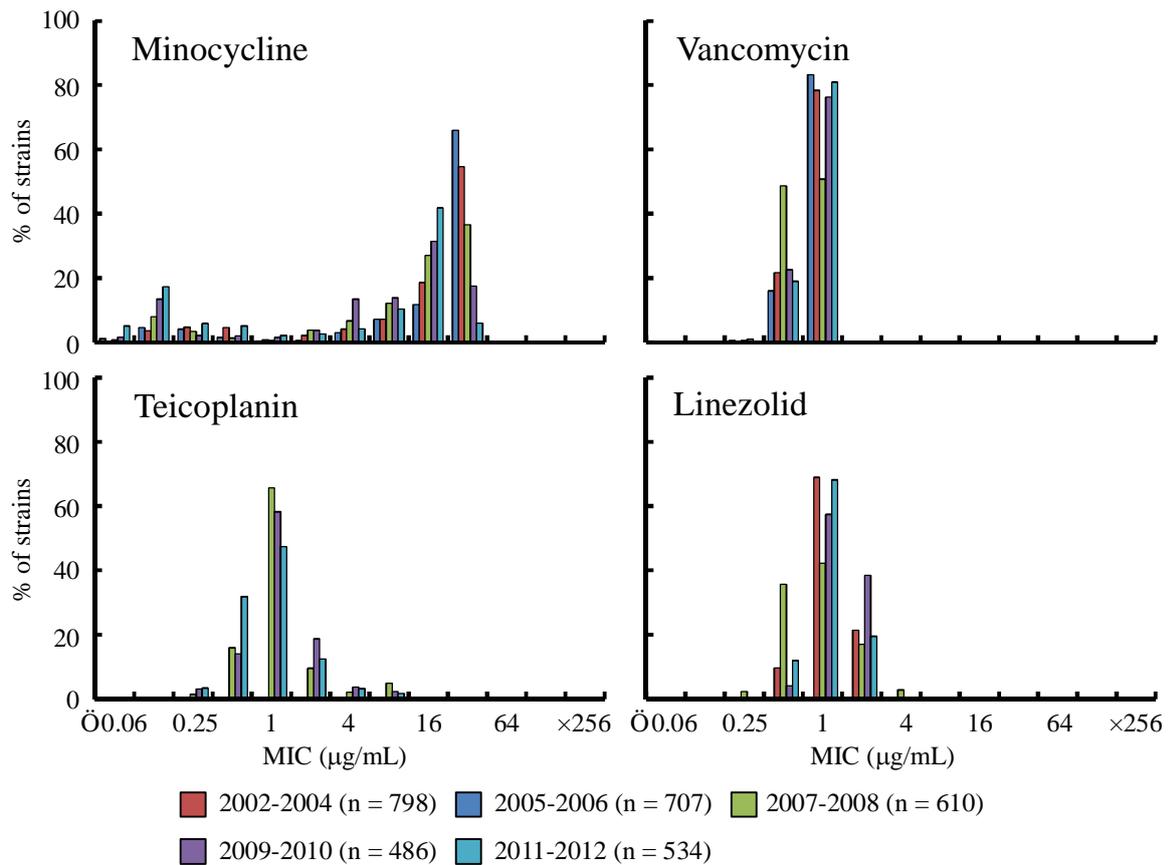


Fig. 10 - 2. Annual transition of the MIC distributions in MRSA strains between 2002 and 2012

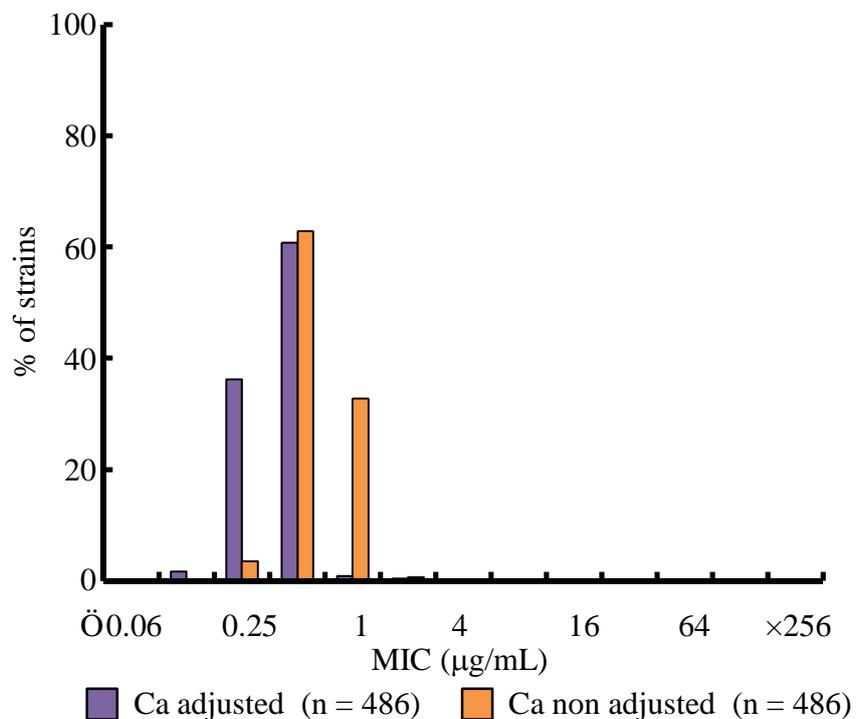


Fig. 11. MIC distribution of daptomycin in MRSA strains

【 考 察 】

医療施設から分離される MRSA の長期サーベイランスは、病原性因子や薬剤感受性の推移を調査する手法として用いられる。MRSA は常に進化していると考えられるため、これらの情報は MRSA 感染症の拡大予防や感染症の治療に有益である。

各診療科から分離される MRSA の SCCmec type を比較したところ、type II が様々な診療科から検出された。これは、入院患者は外来患者と比較して、院内型の type II 株に感染する可能性が高いためと考えられる。一方、type IV は、外来患者の診療が多い科から検出された。また、腎臓内科には、人工透析センターが併設されているため、医療従事者は外来患者と接触する機会が多いと推測される。したがって、医療施設に分布する CA-MRSA は、外来患者を介して市中から院内に流入していると考えられる。これらの考察から、院内における CA-MRSA の流入や流行を防止するため、外来患者が受診する割合が高い診療科を対象に、重点的な感染対策が求められる。

SCCmec type の推移は、type II は有意に減少し、type IV は有意に増加していた。この傾向は、海外の医療施設から分離される MRSA においても認められている⁷⁷⁾。これより、本邦の医療施設においても諸外国と同様に、type IV が院内で増加していることが明らかとなった。また、SCCmec typing で分類できない株 (nontypeable; NT) が増加していた。これは MRSA の SCCmec が日々進化しているためと推測される。そのため、既存の HA-MRSA または CA-MRSA にない分子疫学的特徴を保有する可能性が考えられる。

毒素遺伝子の年次推移に関して、*tst* 保有率は、年々減少していた。また、*tst* 陽性株の約 90% が SCCmec type II であった。一方、*pvl* 保有率は増加傾向にあり、*pvl* 陽性株の約 78% が type IV であった。よって、MRSA の毒素遺伝子保有率の推移は、SCCmec type の推移の影響を受けていると考えられる。欧米諸国では、*pvl* は CA-MRSA に広く分布していることが報告されているが、本邦における *pvl* を保有する MRSA 感染症は 2000 年ではまれであると報告されている^{78,79)}。本研究では、2005 年から *pvl* 陽性の SCCmec type IV 株の増加が認められたことから、今後 *pvl* を保有する CA-MRSA が増加すると考えられる。

薬剤感受性の測定では、複数の抗菌薬の耐性率が減少傾向を示し、高度耐性株の減少および低感受性株の増加が認められた。この原因は、高度耐性菌が感受性側に年々移行しているのではなく、高度耐性である HA-MRSA の減少と低度耐性である CA-MRSA の増加と考えられる。従来分子疫学的解析では、全 MRSA を対象としているため、多剤高度耐性を示す HA-MRSA と薬剤感受性が高い CA-MRSA を混在して薬剤感受性を評価している。特に、臨床検査では耐性か、感受性かの結果が求められ、幅広い MIC 測定が行われていない。そのため、数値的に院内の MRSA の薬剤感受性

が改善していると誤解される恐れがある。正確な MRSA 臨床分離株の薬剤感受性を解析するために、MRSA の分子疫学的特徴を考慮した解析が必要と考えられる。また、本研究では、23 株の arbekacin 耐性株が検出された。Aminoglycoside 系抗菌薬の耐性機構として、アセチル転移酵素 AAC (6 ϕ) / APH (2 ϕ) による薬剤の不活性化が報告されている^{80,81)}。本邦で分離される AAC (6 ϕ) / APH (2 ϕ) を持つ MRSA の 90 % 以上は、gentamicin に高度耐性を示すが、arbekacin に感受性を示すと報告されている⁸²⁾。しかし、arbekacin 耐性は AAC (6 ϕ) / APH (2 ϕ) の過剰産生により促進されるという報告もある⁸³⁾。MRSA 感染対策を行う上で、arbekacin 耐性株の存在を考慮したサーベイランスが必要である。

さらに daptomycin に低感受性を示す株が 2 株認められた。これらの株は、daptomycin が本邦で上市された 2011 年以前の株であることから、daptomycin 耐性能を自然獲得したと推測される。Daptomycin の作用機序は、Ca²⁺ を用いて細菌細胞膜に結合し、脱分極により細胞内の K⁺ を放出させることで殺菌的に作用する^{84,85)}。そのため、daptomycin の抗菌活性発現には、適切な Ca²⁺ 濃度が必須である^{86,87)}。したがって、正確な薬剤感受性を測定するために、CLSI が規定する CAMHB が使用される⁷³⁾。本研究では、2009-2010 年に分離された MRSA を用いて daptomycin の薬剤感受性を測定したところ、MIC が高い傾向が認められた。そこで、使用する CAMHB の Ca²⁺ 濃度を測定したところ、50 μ g/mL に到達していなかった。この原因として、培地に含まれるキレート剤やタンパク質などが Ca²⁺ を吸着することで、理論値よりも Ca²⁺ 濃度が低くなることが予想される^{88,89)}。Ca²⁺ 濃度が低い CAMHB を用いた daptomycin の感受性測定では、daptomycin 非感受性と誤って判定される株が多くなる可能性がある^{86,87)}。したがって、CAMHB が適切な Ca²⁺ 濃度に調整されていることを確認してから daptomycin の薬剤感受性を測定する必要がある。

本章の研究から、CA-MRSA が医療機関で増加しており、その結果、院内で分離される MRSA の薬剤感受性及び毒素遺伝子保有率の年次推移が変化していることが明らかとなった。そのため、本邦においても PVL 産生能を獲得した高病原性 CA-MRSA の増加が予想される。したがって、感染対策は医療施設に留まらず、市中を含めて取り組むことが望まれる。しかし、これらの結果は HA-MRSA と CA-MRSA の区別をしていないため、個々の MRSA の詳細は明らかとなっていない。これらについて、次章で詳細な解析を行う。

第3章

医療施設で流行する市中類似型 MRSA の遺伝学的特徴

【 緒 言 】

第1章と第2章の結果から、CA-MRSA が複数施設に存在し、年々増加していることが明らかとなった。しかし、薬剤感受性が高いとされる CA-MRSA が増加しているにも関わらず、抗菌薬の耐性率は依然として高い水準を維持している。そのため、CA-MRSA が HA-MRSA と同様に多剤高度耐性を獲得したと考えられる。多剤高度耐性 CA-MRSA は、市中から流入した CA-MRSA が医療施設で多剤耐性能を獲得した、もしくは医療施設に存在する多剤耐性 MSSA が医療施設に流入した CA-MRSA から SCCmec type を獲得したと推測される。すでに、SCCmec は MRSA の染色体 DNA 上に存在する可動性因子であり、ファージを介して菌株間を伝播することが報告されている^{90,91)}。

そこで第3章では、SCCmec type IV 株を中心に、多剤高度耐性を示す株の遺伝学的背景を詳細に解析し、多剤耐性 type IV 株の起源を考察した。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株

使用菌株は、第2章で用いた *SCCmec* type IV の MRSA 276 株と比較対象として *SCCmec* type II の MRSA 2,685 株を抽出し供試した。

2. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性の結果は第2章 - 【結果】 - 3 を用いた。

3. 毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の有無

毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の結果は第2章 - 【結果】 - 2 を用いた。

4. MLST

2009年から2011年に分離された *SCCmec* type IV 201 株と type II 101 株を対象に MLST を行った。MLST は、第1章 - 【材料と方法】 - 6 に記した方法を用いた。対象株は MLST より解析された塩基配列から、eBRUST を用いて CC を求めた。

5. PFGE

CC を求めた *SCCmec* type IV 201 株と type II 101 株を対象に、PFGE を行った。PFGE は、第1章 - 【材料と方法】 - 5 に記した方法を用いた。

【 結 果 】

1. SCCmec type IV 株と type II 株の薬剤感受性

SCCmec type IV 株と type II 株の薬剤感受性の違いを明らかにするため、比較を行った (Table 13)。Type IV 株は type II 株よりも ampicillin、oxacillin、cefotaxime、vancomycin、teicoplanin で MIC range の下限が高く、ampicillin、sitafloxacin、teicoplanin で MIC range の上限が低かった。また、MIC₉₀ の結果は類似していたが、gentamicin と抗 MRSA 薬を除いた抗菌薬の MIC₅₀ は type IV 株の方が低い値を示した。Penicillin 系抗菌薬において、MIC₉₀ と耐性率に差は認められなかった。しかし、cefotaxime、levofloxacin、sitafloxacin、clarithromycin、minocycline の耐性率は、type IV 株の方が type II 株と比較して有意に低かった (各々 $p < 0.05$)。一方、gentamicin の耐性率は、type IV 株の方が有意に高かった ($p < 0.05$)。Vancomycin、teicoplanin、linezolid に耐性を示す株は、どちらも検出されなかった。

Type IV 株と type II 株の MIC 分布を比較すると、ampicillin、oxacillin、cefotaxime、levofloxacin、clarithromycin、minocycline では、type IV 株の方が高度耐性株の割合が少なく、感受性株の割合が多かった (Fig. 12)。

以上の結果から、type IV 株は type II 株よりも、複数系統の抗菌薬に感受性を示すことが明らかとなった。しかし、type IV 株の一部は type II 株と同様に、多剤高度耐性を示す株も存在していた (Fig. 12)。

Table 13. Comparison of antimicrobial susceptibilities between the strains of SCCmec type II and IV

Antimicrobial agent	SCCmec type II (n = 2,685)			SCCmec type IV (n = 276)		
	MIC range	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC range	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)
Ampicillin	0.13 - ≥ 256	32 / 64	100	2 - 128	16 / 64	100
Oxacillin	0.5 - ≥ 256	× 256 / ≥ 256	99.9	1 - ≥ 256	64 / ≥ 256	99.6
Cefotaxime	2 - ≥ 256	× 256 / ≥ 256	97.1	4 - ≥ 256	64 / ≥ 256	63.8*
Levofloxacin	0.13 - ≥ 256	32 / ≥ 256	94.5	0.13 - ≥ 256	8 / ≥ 256	58.7*
Sitafloxacin	≤ 0.06 - 128	1 / 16	42.9	≤ 0.06 - 64	0.25 / 16	30.4*
Clarithromycin	≤ 0.06 - ≥ 256	× 256 / ≥ 256	98.0	≤ 0.06 - ≥ 256	128 / ≥ 256	60.1*
Gentamicin	0.13 - ≥ 256	32 / 128	57.0	0.13 - ≥ 256	32 / 128	65.9*
Arbekacin	0.13 - 16	0.5 / 1	0.7	0.13 - 16	0.5 / 1	1.4
Minocycline	≤ 0.06 - 32	16 / 32	71.9	≤ 0.06 - 32	0.25 / 32	17.0*
Vancomycin	0.13 - 1	1 / 1	0	0.5 - 1	1 / 1	0
Teicoplanin ^a	0.13 - 8	1 / 2	0	0.25 - 4	1 / 1	0
Linezolid ^b	0.25 - 4	1 / 2	0	0.25 - 4	2 / 2	0

^an = 1,052 (SCC mec type II) and 158 (SCC mec type IV). ^bn = 1,643 (SCC mec type II) and 197 (SCC mec type IV). MIC₅₀ / MIC₉₀, the values indicate the MICs (µg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of the strains; R, rate of resistant strains. The resistance break-points of the following antimicrobial agents were determined according to CLSI and this study: ampicillin, × 0.5 µg/mL; oxacillin, × 4 µg/mL; cefotaxime, × 64 µg/mL; levofloxacin, × 4 µg/mL; sitafloxacin, × 2 µg/mL; clarithromycin, × 8 µg/mL; gentamicin, × 16 µg/mL; arbekacin, × 8 µg/mL; minocycline, × 16 µg/mL; vancomycin, × 16 µg/mL; teicoplanin, × 32 µg/mL; linezolid, × 8 µg/mL. *, $p < 0.05$ versus the antimicrobial susceptibilities of MRSA with SCCmec type II, as determined by χ^2 test.

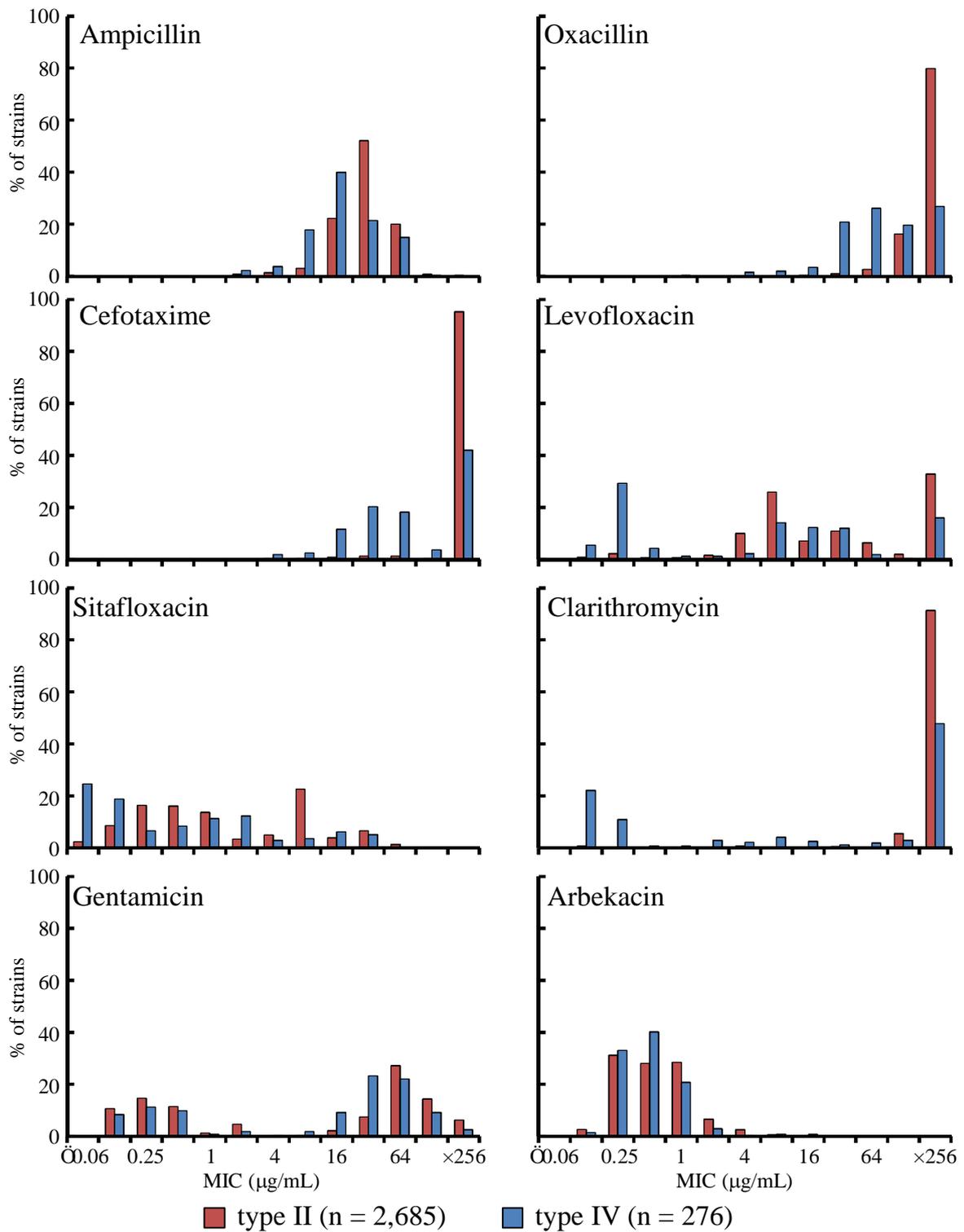


Fig. 12 - 1. Distribution of MIC between the strains of SCCmec type II and type IV

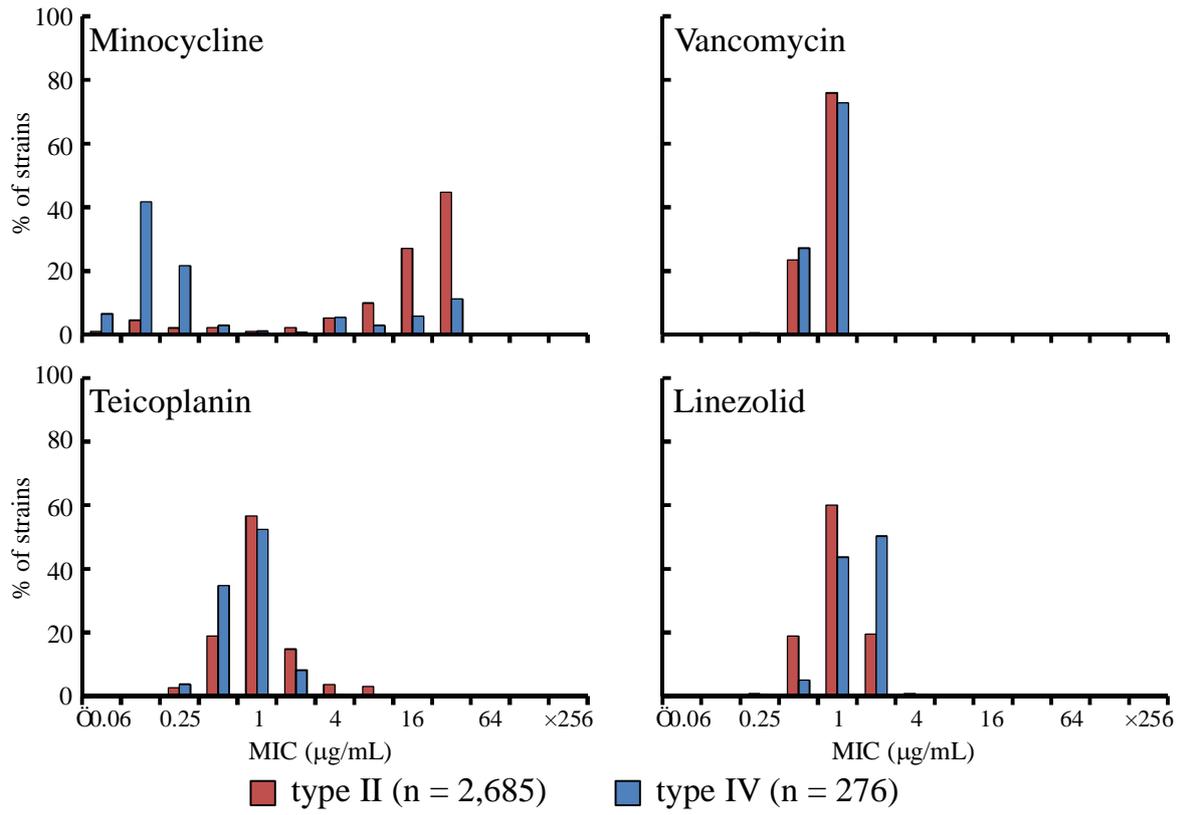


Fig. 12 - 2. Distribution of MIC between the strains of SCCmec type II and type IV

2. SCCmec type IV 株と type II 株の clonal complex (CC) の分布

多剤高度耐性 SCCmec type IV 株の遺伝学的背景を明らかにするため、SCCmec type IV 201 株と type II 101 株を対象に MLST を行い、CC を求めた (Table 14)。Type II 株の 92 株 (91.1%) は、New York/Japan clone と同じ CC5 に属した。Type IV 株の CC の分布も CC5 が最も多く、64 株 (31.8%) が検出された。CC5 に次いで、アメリカの主要な CA-MRSA である USA300 と同じ CC8 に属する株が 50 株 (24.9%) 検出された。これらの結果から、type IV 株には多様な clone が存在することが示された。また type II 株は New York/Japan clone が主流であることが明らかとなった。

Table 14. Distribution of clonal complex (CC) in the strains of SCCmec type II and type IV

CC	No. (%) of the strains of SCCmec type;	
	II (n = 101)	IV (n = 201)
1	0	36 (17.9*)
5	92 (91.1)	64 (31.8*)
8	4 (4.0)	50 (24.9*)
9	0	3 (1.5)
15	1 (1.0)	0
30	0	10 (5.0*)
45	0	1 (0.5)
72	0	1 (0.5)
80	1 (1.0)	0
88	0	4 (2.0)
89	3 (3.0)	32 (15.9*)
NT	0	1 (0.5)

NT: nontypeable. *, $p < 0.05$ versus the isolates with SCCmec type II, as determined by χ^2 test.

3. SCCmec type IV の CC5 と CC8 の薬剤感受性

SCCmec type IV 株の薬剤感受性が、SCCmec type IV の主流を占める CC5 と CC8 に依存すると考え、両者の薬剤感受性を比較した (Table 15)。CC8 は CC5 よりも MIC range の上限、MIC₅₀、MIC₉₀ が低い値を示した。CC8 の耐性率は、ampicillin と oxacillin で CC5 と同等の耐性を示したが、cefotaxime、levofloxacin、sitafloxacin、clarithromycin、minocycline では、CC5 と比較して有意に低かった (各々 $p < 0.05$)。しかし、CC8 の gentamicin の耐性率は CC5 よりも高かった。

SCCmec type IV の CC5 と CC8 の MIC 分布を比較すると、ampicillin、oxacillin、cefotaxime、levofloxacin、sitafloxacin、clarithromycin、minocycline では、CC8 は CC5 と比較して MIC 分布が感受性よりに偏っていた (Fig. 13)。したがって、多剤耐性を示す type IV の MRSA は、CC5 の MRSA の寄与が大きいことが明らかとなった。

Table 15 Antimicrobial susceptibilities of MRSA strains of CC5 and CC8 for the strains of SCC_{mec} type IV

Antimicrobial agent	CC5 (n = 64)			CC8 (n = 50)		
	MIC range	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)	MIC range	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (%)
Ampicillin	4 - 128	32 / 64	100	2 - 64	16 / 32	100
Oxacillin	8 - × 256	× 256 / × 256	100	4 - × 256	64 / × 256	100
Cefotaxime	4 - × 256	× 256 / × 256	90.6	16 - × 256	64 / × 256	66.0*
Levofloxacin	0.25 - × 256	32 / × 256	89.1	0.13 - 32	0.25 / 8	26.0*
Sitafloxacin	≤ 0.06 - 64	2 / 32	53.1	≤ 0.06 - 2	≤ 0.06 / 1	4.0*
Clarithromycin	0.13 - × 256	× 256 / × 256	87.5	0.13 - × 256	0.25 / × 256	36.0*
Gentamicin	0.13 - 128	32 / 128	64.1	0.13 - × 256	32 / 64	70.0
Arbekacin	0.13 - 4	0.5 / 1	0	0.13 - 2	0.5 / 1	0
Minocycline	≤ 0.06 - 32	4 / 32	39.1	≤ 0.06 - 16	0.13 / 4	6.0*
Vancomycin	0.5 - 1	1 / 1	0	0.5 - 1	1 / 1	0
Teicoplanin ^a	0.25 - 2	1 / 2	0	0.25 - 2	1 / 2	0
Linezolid ^b	0.5 - 2	1 / 2	0	0.25 - 2	2 / 2	0

^an = 29 (CC5) and 35 (CC8). ^bn = 37 (CC5) and 42 (CC8). MIC₅₀ / MIC₉₀, the values indicate the MICs (μg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of the strains; R, rate of resistant strains. The resistance break-points of the following antimicrobial agents were determined according to CLSI and this study: ampicillin, × 0.5 μg/mL; oxacillin, × 4 μg/mL; cefotaxime, × 64 μg/mL; levofloxacin, × 4 μg/mL; sitafloxacin, × 2 μg/mL; clarithromycin, × 8 μg/mL; gentamicin, × 16 μg/mL; arbekacin, × 8 μg/mL; minocycline, × 16 μg/mL; vancomycin, × 16 μg/mL; teicoplanin, × 32 μg/mL; linezolid, × 8 μg/mL. *, p < 0.05 versus the resistance rates of CC 5 isolates, as determined by χ^2 test.

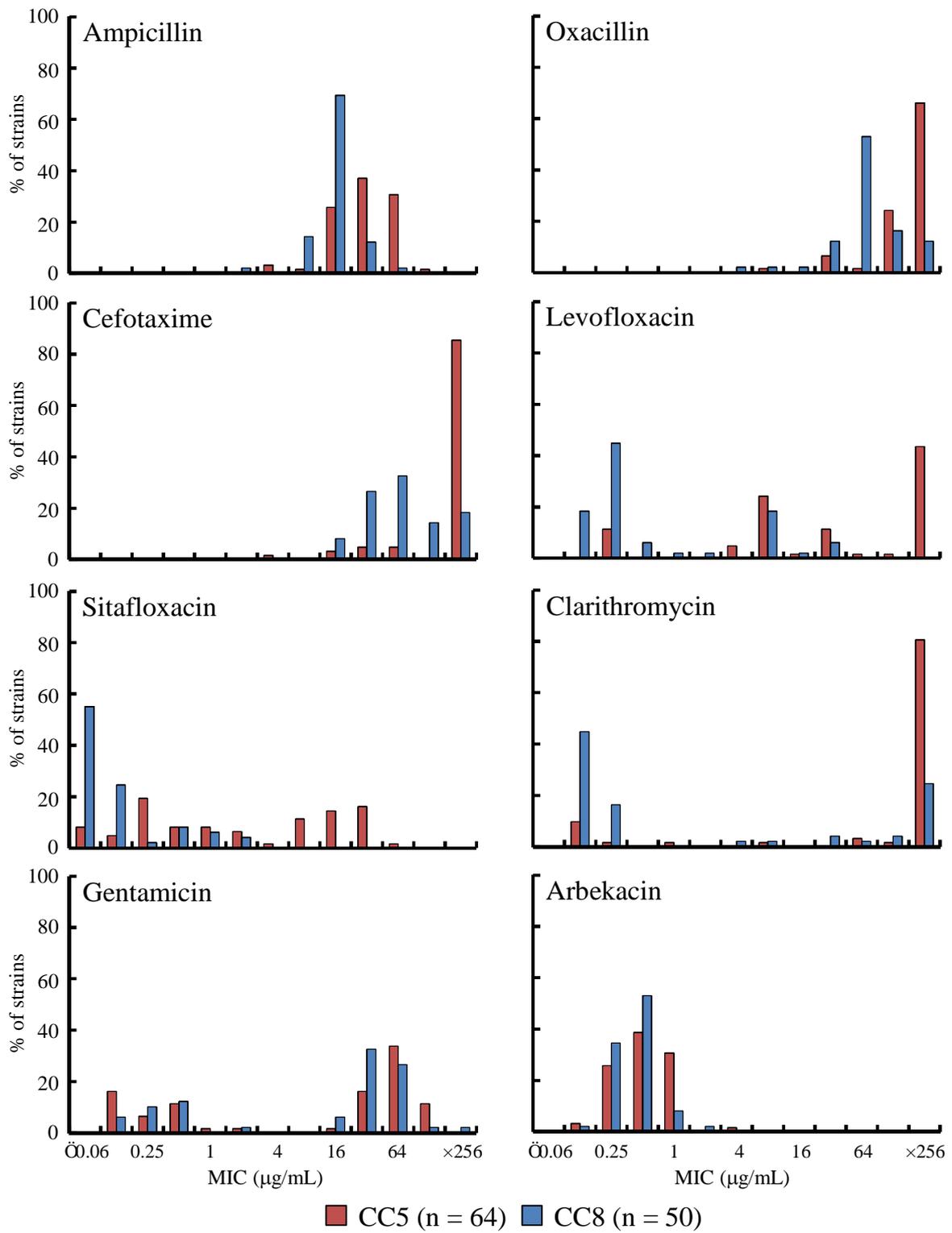


Fig. 13 - 1. Distribution of MIC between SCCmec type IV strains of CC5 and CC8

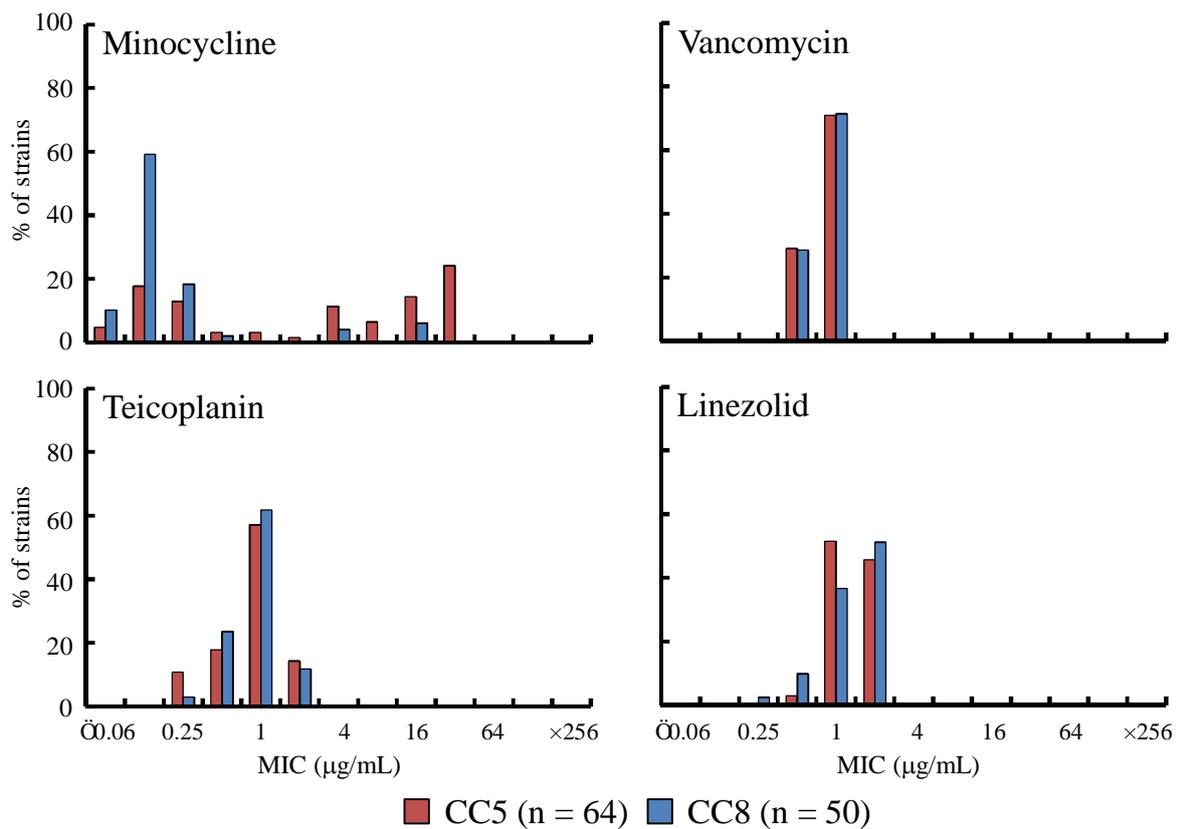


Fig. 13 - 2. Distribution of MIC between SCCmec type IV strains of CC5 and CC8

4. PFGE と clonal complex (CC)、SCCmec type、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*)

Clonal complex (CC) を求めた SCCmec type IV 201 株と type II 101 株を対象に、PFGE による解析を行った。そのうち、PFGE の解析が行えた type IV 79 株と type II 101 株の結果を示した (Fig. 14)。PFGE より、SCCmec type II の CC5 株同士は高い相同性を示したが、type IV の CC 同士の相同性は低いことが示された。CC を見ると、CC5 のグループと CC1、8、30、89 のグループに大きく分類された。SCCmec type を見ると、HA-MRSA グループに SCCmec type IV 株が混在していた。毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の保有の有無による明確なグループは形成されなかった。*tst* は CC5 または CC8 の株に散見された。一方、*pvl* は CC30 から検出された。これらの解析より、多剤耐性を示す SCCmec type IV 株が CC5 の HA-MRSA と類似した遺伝学的特徴を持つことが示された。

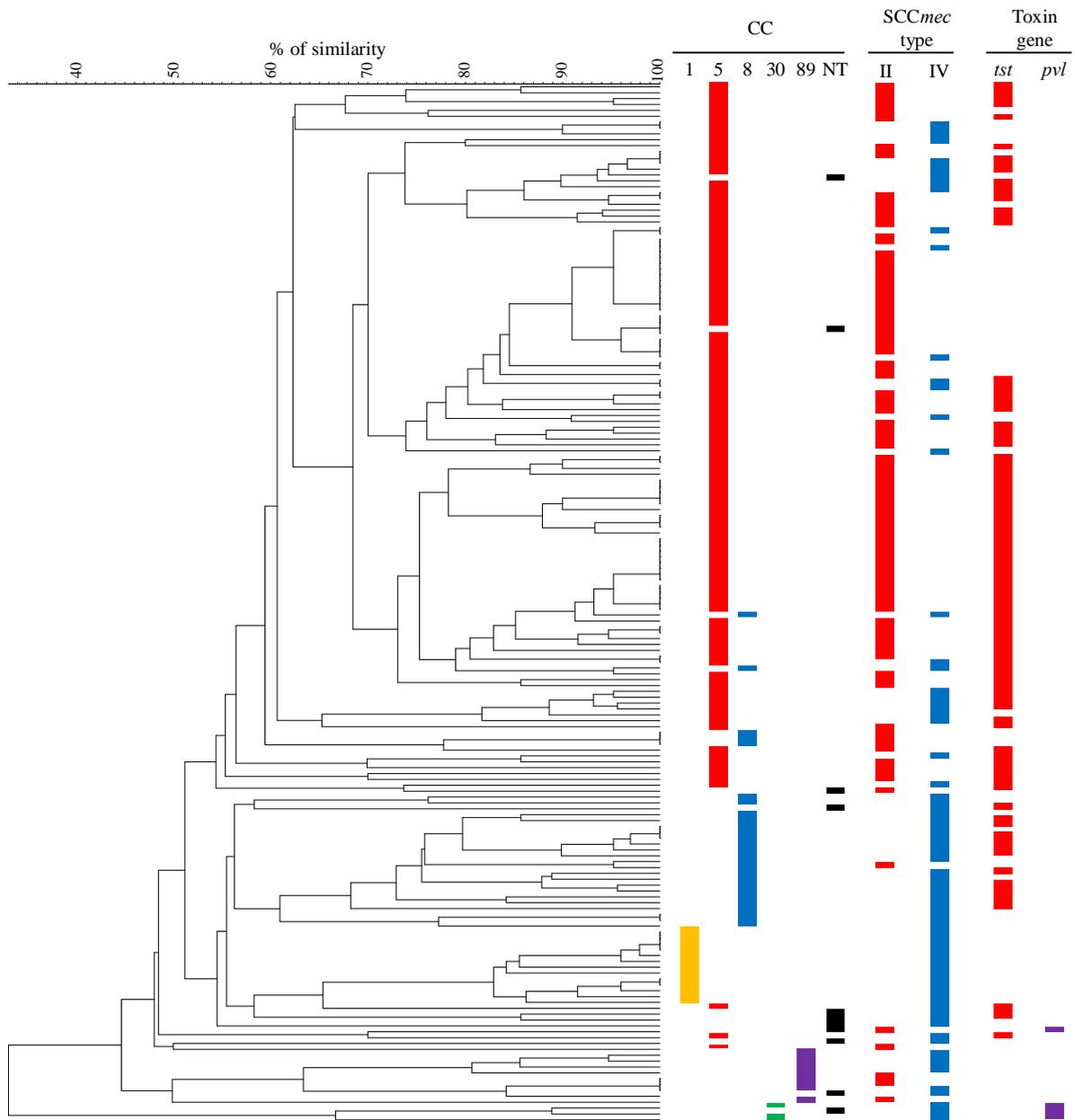


Fig. 14. Molecular phylogenetic analysis of MRSA strains of SCCmec type II (n = 101) and type IV (n = 79)

【 考 察 】

市中の健常人や外来患者から分離された CA-MRSA を起因とする重症感染症が報告されている^{25,92)}。諸外国では、医療施設で流行した CA-MRSA の分子疫学的特徴を解析した報告がなされているが、本邦における同様の報告は少ない⁹³⁾。第1章と第2章より、本邦の医療施設においても、院内で CA-MRSA が流行していることが明らかとなった。そこで本章では、多剤高度耐性 CA-MRSA の起源を解明するために、その分子疫学的特徴を解析した。

SCC*mec* type IV 株のほとんどは、 β -lactam 系抗菌薬に対して高い耐性率を示すが、 β -lactam 系を除く抗菌薬に対して低感受性あるいは感受性を示した。しかしながら、type II 株同様に多剤高度耐性を示す type IV 株が散見された。よって、CA-MRSA の中に、多剤高度耐性を獲得した株が存在することが示された。

そこで type IV 株の由来を明らかにするため、MLST 解析から clonal complex (CC) を求めた。Type II 株は、New York/Japan clone と同じ CC5 (USA100) が約 90% を占めていた。一方、type IV 株は、CC8 (USA300 または USA500) に加え、CC1 (USA400)、CC30 (USA1100)、CC89 に分類された^{25,94-100)}。しかし、CC5 (USA800) に分類される株も多数認められた⁹⁸⁾。これらより、市中に多様な CA-MRSA clone が存在することが示された (Table 16)。また、type IV 株の中で CC5 の占める割合が高いことから、医療施設に分布する CC5 株が院外から流入した SCC*mec* type IV 株の SCC*mec* を獲得した可能性が考えられる。そのため、多様な CA-MRSA が院内に流入することで、HA-MRSA と生存競争が起こり、MRSA の遺伝学的背景が大きく変化する可能性が考えられる。

Table 16. Characterizations of MRSA^{25,94-100)}

PFGE type	ST	CC	SCC <i>mec</i> type	PVL gene	MRSA type	Resistant agents	Clone type	Reference
USA100	5	5	II	Neg	HA	MDR	New York/Japan	95, 98)
USA300	8	8	IV	Pos	CA	MDR		25, 95, 98, 99)
USA400	1	1	IV	Pos	CA	β -lactams		25,94, 98)
USA500	250	8	I or IV	Neg	HA	MDR	Archaic/ Iberian	95, 98)
USA800	5	5	IV	Neg	HA	β -lactams	Pediatric	95, 96, 98)
USA1100	30	30	IV	Pos	CA	β -lactams		25, 97, 100)

Neg, negative; Pos, positive; HA, healthcare-associated; CA, community-acquired; MDR, multidrug resistant.

Type IV 株のうち、CC5 と CC8 の占める割合が高いことから、MRSA の薬剤感受性が CC に依存すると考えた。そこで、type IV に属する CC5 株と CC8 株の薬剤感受性を比較した。その結果、type IV の CC5 株は HA-MRSA と同様、抗 MRSA 薬を除いて多剤高度耐性を示した。一方、CC8 株は fluoroquinolone 系、macrolide 系、tetracycline 系に高い感受性を示し、aminoglycoside 系に対して耐性を示した。CC8 株が aminoglycoside 系に耐性を示した原因として、市中のクリニックでは gentamicin 外用薬が汎用されているため、CA-MRSA の CC8 株が aminoglycoside 系耐性を獲得したと考えられる。これらの結果より、薬剤感受性は clonal complex に依存していることが示された。

さらに、多剤高度耐性 SCCmec type IV 株の詳細を解明するため、PFGE を行った。その結果、SCCmec type IV 株は遺伝的に多様であることが示された。よって、感受性の高い CC8 と多剤耐性の CC5 は、遺伝的に大きく異なるため、その起源も異なる MRSA であることが明らかとなった。また、SCCmec type IV を持つ CC5 が散見されたことから、院内に分布する CC5 株が、外部から流入した SCCmec type IV 株から SCCmec を獲得した可能性が示唆された。SCCmec type IV かつ CC5 の株として USA800 がブラジルでの流行が報告されているが、この株は β -lactam 系以外の薬剤に感受性を示す⁹⁶⁾。また、本邦で分離された報告はない。そのため、多剤高度耐性 SCCmec type IV 株は、院内に分布する CC5 の MSSA が SCCmec type IV を獲得したと考えられる。しかし、SCCmec がファージを介して菌株間を移動することが報告されているが、臨床分離株のファージによる SCCmec の伝播の有無を証明することは困難である。そのため、本研究ではファージによる SCCmec の伝達について検討を行っていない。今後、多剤高度耐性市中型 MRSA の出現機構を解明することが必要である。

本研究より、院内に分布する CC5 の多剤高度耐性 MSSA が SCCmec type IV を獲得し、HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を有する市中類似型 MRSA が出現していることが示唆された。市中類似型 MRSA の出現を防止するために、CA-MRSA の流入抑制および HA-MRSA の拡大予防が重要と考えられる。

総 括

本研究では、地理的・時間的観点から MRSA の分子疫学的解析を行い、以下のことを明らかにした。

第 1 章では、多摩地域の 4 つの基幹病院を対象とした地理的解析を行い、遺伝的に同じ SCCmec type II の HA-MRSA や HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を持つ ST764 clone が病院間で流行していること、複数施設で CA-MRSA に多い SCCmec type IV 株が存在することを明らかにした。さらに SCCmec type IV 株から、本邦ではまれな白血球破壊毒素遺伝子 *pvl* が検出された。

第 2 章では、単一の医療施設を対象とした時間的解析を行い、SCCmec type IV 株の増加傾向および SCCmec type II 株の減少傾向が明らかとなった。また、これに伴い *pvl* 保有率の増加および *tst* 保有率の減少、薬剤感受性化が起きていた。

第 3 章では、多剤高度耐性 SCCmec type IV 株について詳細に解析した。MLST 解析より、type IV 株にも関わらず HA-MRSA に多い CC5 に分類される株が認められた。これらの株の多くは多剤高度耐性を示した。また PFGE 解析より、CC5 と CC8 が遺伝学的に大きく異なることが明らかとなった。さらに、遺伝的相同性の高い CC5 の type II 株と type IV 株が散見された。これより、院内に分布する多剤高度耐性 MSSA が、CA-MRSA の SCCmec type IV を獲得することで、市中類似型 MRSA が出現すると考えられる。

本研究の結果から、本邦の医療施設で CA-MRSA と市中類似型 MRSA が拡大していることが明らかとなった。したがって、院内における MRSA 感染症の抑制には、市中からの CA-MRSA の流入および院内での拡大防止対策が必要であると考えられる。そのためには、院内だけでなく地域全体の MRSA の動向について分子疫学的にサーベイランスを行うことが重要である。

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学病原微生物学教室 野口 雅久 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御助言を頂きました東京薬科大学病原微生物学教室 中南 秀将 講師、輪島 文明 助教、中瀬 恵亮 助手に心から感謝致します。

また、臨床検体の提供に御協力頂きました、東京医科大学八王子医療センターの内海 健太 先生、藤井 毅 先生、東海大学医学部附属八王子病院の坂本 春生 先生、日本医科大学多摩永山病院の丸山 弘 先生、国立病院機構災害医療センターの高里 良男 先生、妹尾 正子 先生、公立阿伎留医療センターの西成田 進 先生および各医療機関の臨床検査室の諸先生方に篤く感謝の意を表します。

最後に、実験を遂行するにあたり御協力を頂きました、池田 雅司 氏、城野 千夏 氏、長谷川 茉莉子 氏、所司 真美 氏、佐藤 朝美 氏を始めとする東京薬科大学病原微生物学教室諸氏に心より御礼申し上げます。

【 参 考 文 献 】

1. Zemelman R, Longeri L. Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Appl Microbiol*, **13**, 167-170 (1965).
2. Parfentjev IA, Catelli AR. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J Bacteriol*, **88**, 1-3 (1964).
3. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*, **2**, 1148-1165 (2010).
4. Hu DL, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur J Pharmacol*, **722**, 95-107 (2014).
5. Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *J Infect Chemother*, **16**, 225-254 (2010).
6. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 16-34, table of contents (2000).
7. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*, **2**, 641-644 (1948).
8. Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *BMJ*, **i**, 124-125 (1961).
9. 厚生労働省.; 院内感染対策サーベイランス検査部門公開情報 (2013 年報). (2014).
10. Watanabe A, Yanagihara K, Matsumoto T, Kohno S, Aoki N, Oguri T, Sato J, Muratani T, Yagisawa M, Ogasawara K, Koashi N, Kozuki T, Komoto A, Takahashi Y, Tsuji T, Terada M, Nakanishi K, Hattori R, Hirako Y, Maruo A, Minamitani S, Morita K, Wakamura T, Sunakawa K, Hanaki H, Ohsaki Y, Honda Y, Sasaoka S, Takeda H, Ikeda H, Sugai A, Miki M, Nakanowatari S, Takahashi H, Utagawa M, Kobayashi N, Takasaki J, Konosaki H, Aoki Y, Shoji M, Goto H, Saraya T, Kurai D, Okazaki M, Kobayashi Y, Katono Y, Kawana A, Saionji K, Miyazawa N, Sato Y, Watanuki Y, Kudo M, Ehara S, Tsukada H, Imai Y, Watabe N, Aso S, Honma Y, Mikamo H, Yamagishi Y, Takesue Y, Wada Y, Nakamura T, Mitsuno N, Mikasa K, Kasahara K, Uno K, Sano R, Miyashita N, Kurokawa Y, Takaya M, Kuwabara M, Watanabe Y, Doi M, Shimizu S, Negayama K, Kadota J, Hiramatsu K, Morinaga Y, Honda J, Fujita M, Iwata S, Iwamoto A, Ezaki T, Onodera S, Kusachi S, Tateda K, Tanaka M, Totsuka K, Niki Y. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Surveillance Committee of Japanese Society of Chemotherapy, Japanese Association

- for Infectious Diseases, and Japanese Society for Clinical Microbiology in 2009: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother*, **18**, 609-620 (2012).
11. Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*, **39**, 526-533 (1998).
 12. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 3765-3773 (2011).
 13. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sorum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 3046-3050 (2011).
 14. IWG-SCC.; Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 4961-4967 (2009).
 15. 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**, 2976-2984 (2003).
 16. Ohkura T, Yamada K, Okamoto A, Baba H, Ike Y, Arakawa Y, Hasegawa T, Ohta M. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese hospitals. *J Med Microbiol*, **58**, 1329-1336 (2009).
 17. Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med*, **97**, 325-329 (1982).
 18. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **375**, 1557-1568 (2010).
 19. Chuang YY, Huang YC. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia. *Lancet Infect Dis*, **13**, 698-708 (2013).
 20. Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**,

- 196-203 (2003).
21. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*, **16**, 103-124 (2003).
 22. Takano T, Higuchi W, Yamamoto T. Superior in vitro activity of carbapenems over anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and some related antimicrobial agents for community-acquired MRSA but not for hospital-acquired MRSA. *J Infect Chemother*, **15**, 54-57 (2009).
 23. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, Reverdy ME, Enright MC, Vandenesch F, Etienne J. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis*, **13**, 594-600 (2007).
 24. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis*, **40**, 562-573 (2005).
 25. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, **9**, 978-984 (2003).
 26. Diep BA, Sensabaugh GF, Somboonna N, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. *J Clin Microbiol*, **42**, 2080-2084 (2004).
 27. Shibuya Y, Hara M, Higuchi W, Takano T, Iwao Y, Yamamoto T. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. *J Infect Chemother*, **14**, 439-441 (2008).
 28. Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T, Yamamoto T. A Panton-Valentine leukocidin (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 Clin Microbiol*, **43**, 3356-3363 (2005).
 29. Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Faria NA, Tavares A, Hryniewicz W, Fluit AC, de Lencastre H. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One*, **7**, e34768 (2012).
 30. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and

- type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 531-540 (2009).
31. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Soderquist B, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 3512-3516 (2008).
 32. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 264-274 (2007).
 33. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, **37**, 3556-3563 (1999).
 34. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, **13**, 222-235 (2007).
 35. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **15**, 60-64 (1996).
 36. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3140-3145 (1998).
 37. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species-the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett*, **241**, 129-134 (2004).
 38. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7687-7692 (2002).
 39. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **38**, 1008-1015 (2000).
 40. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, **7**, 482-487 (1999).
 41. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH,

- Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33**, 2233-2239 (1995).
42. 木村凡. これからの細菌のゲノムタイピングとしての MLST 法. モダンメディア, 栄研化学. **52**, 209-216 (2006).
 43. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, **46**, 136-144 (2008).
 44. Larsen AR, Bocher S, Stegger M, Goering R, Pallesen LV, Skov R. Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *J Clin Microbiol*, **46**, 62-68 (2008).
 45. Saiman L, O'Keefe M, Graham PL, 3rd, Wu F, Said-Salim B, Kreiswirth B, LaSala A, Schlievert PM, Della-Latta P. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis*, **37**, 1313-1319 (2003).
 46. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*, **35**, 819-824 (2002).
 47. CDC. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and north Dakota, 1997-1999. *JAMA*, **282**, 1123-1125 (1999).
 48. Klein EY, Sun L, Smith DL, Laxminarayan R. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study. *Am J Epidemiol*, **177**, 666-674 (2013).
 49. Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. *J Antimicrob Chemother*, **69**, 2913-2919 (2014).
 50. Bush K, Leal J, Fathima S, Li V, Vickers D, Chui L, Louie M, Taylor G, Henderson E. The molecular epidemiology of incident methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cases among hospitalized patients in Alberta, Canada: a retrospective cohort study. *Antimicrob Resist Infect Control*, **4**, 35 (2015).
 51. Hetem DJ, Westh H, Boye K, Jarlov JO, Bonten MJ, Bootsma MC. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Danish hospitals. *J Antimicrob Chemother*, **67**, 1775-1780 (2012).

52. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; **46**, 2155-2161 (2002).
53. Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, Song JH. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. *J Clin Microbiol*, **43**, 421-426 (2005).
54. Ozaki K, Takano M, Higuchi W, Takano T, Yabe S, Nitahara Y, Nishiyama A, Yamamoto T. Genotypes, intrafamilial transmission, and virulence potential of nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children in the community. *J Infect Chemother*; **15**, 84-91 (2009).
55. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*, **2**, 180-189 (2002).
56. Iwao Y, Ishii R, Tomita Y, Shibuya Y, Takano T, Hung WC, Higuchi W, Isobe H, Nishiyama A, Yano M, Matsumoto T, Ogata K, Okubo T, Khokhlova O, Ho PL, Yamamoto T. The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics. *J Infect Chemother*; **18**, 228-240 (2012).
57. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol*, **16**, 361-369 (2008).
58. Cunin R, Glansdorff N, Pierard A, Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev*, **50**, 314-352 (1986).
59. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **367**, 731-739 (2006).
60. Takano T, Hung WC, Shibuya M, Higuchi W, Iwao Y, Nishiyama A, Reva I, Khokhlova OE, Yabe S, Ozaki K, Takano M, Yamamoto T. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob Agents Chemother*; **57**, 1589-1595 (2013).
61. Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Kuwahara O, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Genetic diversity of emerging Panton-Valentine leukocidine/arginine catabolic mobile element (ACME)-positive ST8 SCC*mec*-IVa methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains and ACME-positive CC5 (ST5/ST764) MRSA strains in northern Japan. *J Med Microbiol*, **62**, 1852-1863 (2013).

62. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **359**, 1819-1827 (2002).
63. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2637-2651 (2004).
64. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225-1240 (2001).
65. Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol*, **30**, 1728-1733 (1992).
66. Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Microbiol*, **44**, 2119-2125 (2006).
67. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, **70**, 631-641 (2002).
68. Lovseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol*, **42**, 3869-3872 (2004).
69. Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, Yang C, Cao C, Lu Y, Li M. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One*, **8**, e62742 (2013).
70. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Moller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCC*mec* types I-V. *Clin Microbiol Infect*, **13**, 725-727 (2007).
71. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.*, (1989).

72. Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*, **259**, 1695-1702 (1984).
73. CLSI.; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved Standard-eighth edition M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute*, (2009).
74. CLSI.; Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-MS21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute*, (2011).
75. Yanagihara K, Araki N, Watanabe S, Kinebuchi T, Kaku M, Maesaki S, Yamaguchi K, Matsumoto T, Mikamo H, Takesue Y, Kadota J, Fujita J, Iwatsuki K, Hino H, Kaneko T, Asagoe K, Ikeda M, Yasuoka A, Kohno S. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of 857 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 16 medical centers in Japan (2008-2009): nationwide survey of community-acquired and nosocomial MRSA. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **72**, 253-257 (2012).
76. Taguchi H, Noguchi N, Nakaminami H, Sasatsu M. Panton-Valentine leukocidin-positive MRSA infection in inpatients at a tertiary care centre in Tokyo, Japan. *J Hosp Infect*, **76**, 268-269 (2010).
77. Nichol KA, Adam HJ, Hussain Z, Mulvey MR, McCracken M, Mataseje LF, Thompson K, Kost S, Lagace-Wiens PR, Hoban DJ, Zhanel GG. Comparison of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **69**, 320-325 (2011).
78. Isobe H, Takano T, Nishiyama A, Hung WC, Kuniyuki S, Shibuya Y, Reva I, Yabe S, Iwao Y, Higuchi W, Khokhlova OE, Okubo T, Yamamoto T. Evolution and virulence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan. *Biomed Res*, **33**, 97-109 (2012).
79. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*, **5**, 275-286 (2005).
80. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. Belgian Study Group of Hospital Infections (GDEPIH/GOSPIZ). *J Med Microbiol*, **41**, 282-290 (1994).

81. Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A, Konno M. Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**, 754-759 (1984).
82. Ishino K, Ishikawa J, Ikeda Y, Hotta K. Characterization of a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme with novel substrate specificity and its gene from a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high arbekacin resistance. *J Antibiot (Tokyo)*, **57**, 679-686 (2004).
83. Matsuo H, Kobayashi M, Kumagai T, Kuwabara M, Sugiyama M. Molecular mechanism for the enhancement of arbekacin resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*, **546**, 401-406 (2003).
84. Cotroneo N, Harris R, Perlmutter N, Beveridge T, Silverman JA. Daptomycin exerts bactericidal activity without lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 2223-2225 (2008).
85. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2538-2544 (2003).
86. Silverman JA, Oliver N, Andrew T, Li T. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1799-1802 (2001).
87. Quinn B, Hussain S, Malik M, Drlica K, Zhao X. Daptomycin inoculum effects and mutant prevention concentration with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **60**, 1380-1383 (2007).
88. Proescher F, Nolan J. Progress in blood preservation. *Calif Med*, **81**, 221-225 (1954).
89. Besarab A, DeGuzman A, Swanson JW. Effect of albumin and free calcium concentrations on calcium binding in vitro. *J Clin Pathol*, **34**, 1361-1367 (1981).
90. Scharn CR, Tenover FC, Goering RV. Transduction of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements between strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**, 5233-5238 (2013).
91. Chlebowicz MA, Maslanova I, Kuntova L, Grundmann H, Pantucek R, Doskar J, van Dijl JM, Buist G. The Staphylococcal cassette chromosome *mec* type V from *Staphylococcus aureus* ST398 is packaged into bacteriophage capsids. *Int J Med Microbiol*, **304**, 764-774 (2014).
92. Chen J, Luo Y, Zhang S, Liang Z, Wang Y, Zhang Y, Zhou G, Jia Y, Chen L, She D. Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a Chinese teenager: case report and literature review. *Int J Infect Dis*, **26**, 17-21 (2014).
93. Khokhlova OE, Hung WC, Wan TW, Iwao Y, Takano T, Higuchi W, Yachenko SV, Teplyakova OV, Kamshilova VV, Kotlovsky YV, Nishiyama A, Reva IV, Sidorenko SV,

- Peryanova OV, Reva GV, Teng LJ, Salmina AB, Yamamoto T. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution. *PLoS One*, **10**, e0128017 (2015).
94. Jones RN, Nilius AM, Akinlade BK, Deshpande LM, Notario GF. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from a 2005 clinical trial of uncomplicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 3381-3384 (2007).
95. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis*, **42**, 647-656 (2006).
96. de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CF, Figueiredo AM. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect*, **13**, 1165-1172 (2007).
97. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, **193**, 1495-1503 (2006).
98. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol*, **41**, 5113-5120 (2003).
99. Diep BA, Chambers HF, Graber CJ, Szumowski JD, Miller LG, Han LL, Chen JH, Lin F, Lin J, Phan TH, Carleton HA, McDougal LK, Tenover FC, Cohen DE, Mayer KH, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. *Ann Intern Med*, **148**, 249-257 (2008).
100. Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GM, Souza MJ, Vieira EN, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Figueiredo AM. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz J Med Biol Res*, **42**, 756-760 (2009).

【 研 究 成 果 の 掲 載 誌 】

本論文は以下の報告を中心としてまとめた。

【第1章】

- 1) Nakaminami H, Noguchi N, Ito A, Ikeda M, Utsumi K, Maruyama H, Sakamoto H, Senoo M, Takasato Y, Nishinarita S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother*, **20** (8): 512-515 (2014)

【第2章】

- 1) 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)
- 2) Ito A, Nakaminami H, Wajima T, Noguchi N. Impact of calcium concentration in Muller-Hinton medium on the antimicrobial activity of daptomycin. *J Global Antimicrob Resist*. **4**: 76-77 (2015)