

氏名（本籍）	<small>いとう あゆむ</small> 伊藤 歩（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第268号
学位授与の日付	平成28年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	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
論文審査委員（主査）	教授 野口 雅久 教授 杉浦 宗敏 教授 大野 尚仁

## 論文内容の要旨

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin-1: TSST-1) や白血球破壊毒素 (Panton-Valentine leukocidin: PVL) などの毒素を産生し、ブドウ球菌の中で最も病原性が高い菌である。*S. aureus* 感染症の治療に抗菌薬が用いられるが、薬剤耐性を示す methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) が出現し、世界規模で問題となっている。

MRSA は当初、抗菌薬が汎用される医療施設を中心に流行していたが、近年、市中でも流行が認められる。さらに、入院患者から分離される MRSA と市中の健康者から分離される MRSA の特徴は大きく異なることがわかってきた。そのため、前者は院内感染型 MRSA (healthcare-associated MRSA: HA-MRSA)、後者は市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA: CA-MRSA) に分けられている。

これらの MRSA は、SCC*mec* typing、*spa* typing、multilocus sequence typing (MLST)、pulsed field gel electrophoresis (PFGE) などの分子疫学的解析法によって分類が行われる。SCC*mec* typing は methicillin 耐性遺伝子 *mecA* を含む可動性因子の構造の違いから MRSA を簡便に分類することができる。*spa* typing は *S. aureus* 特異的な *spa* 遺伝子上の繰返し配列により、MLST は7つの housekeeping gene の塩基配列から求めた sequence type (ST) と clonal complex (CC) から *S. aureus* を分類する。*spa* typing と MLST は、世界的なデータベースが存在するため、海外の MRSA と比較が行える。PFGE は、染色体 DNA の制限酵素切断パターンの相同性から菌株の識別が可能である。これらの方法を用いることで MRSA を詳細に分類・識別することが可能である。

本邦で分離される HA-MRSA は、多剤高度耐性を示し、SCC*mec* type II、*spa* type t002、ST5 の New York/Japan clone に分類される。一方、CA-MRSA はβ-lactam 系抗菌薬以外の薬剤に比較的感受性を示し、SCC*mec* type IV、*spa* type t008、ST8 に分類されることが多いが、HA-MRSA

に比べ非常に多様である。そのため、本邦における 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。特定地域から分離された MRSA の分子疫学的特徴を調査することで、CA-MRSA の流行状況や伝播が推測できる。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に、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: 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

地理的な MRSA の流行を解析するため、2009 年に多摩地域に位置する 4 つの基幹病院で分離された MRSA 554 株を用いた。

SCCmec type の解析より、すべての病院で SCCmec type II が 70%以上を占め、type II に次いで type IV が検出された。毒素遺伝子 *tst* と *pvl* は、それぞれ 348 株 (62.8%) と 6 株 (1.1%) から検出された。*pvl* 保有株はすべて type IV 株であった。PFGE 解析した 521 株から、100% 相同性を示しかつ複数施設から分離された MRSA を含む pulsotype が 4 グループ認められた。これは同じ MRSA 株が異なる病院に伝播・流行していることを示している。Pulsotype I と II は、*spa* type t002、ST764 clone が主流であった。一方、pulsotype III と IV は、*spa* type t002、ST5 clone が主流であった。Pulsotype I と II 株は多剤高度耐性を示したが、pulsotype III と IV 株は、sitafloxacin、gentamicin、minocycline の耐性率が低かった (Table 1)。

以上より、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 CA-MRSA に多い SCCmec type IV 株が認められた。これより、本邦の医療施設で CA-MRSA の特徴を持つ株が分布していることが明らかとなった。

Table 1. 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 <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)
Ampicillin	16 / 32	100	32 / 32	100	32 / 32	100	16 / 32	100
Oxacillin	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100
Cefotaxime	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100
Levofloxacin	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	8 / 32	100	4 / 8	100
Sitafloxacin	8 / 8	100	8 / 16	85.7	0.25 / 1	0	0.5 / 0.5	0
Clarithromycin	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100	≥256 / ≥256	100
Gentamicin	64 / 128	81.8	128 / 128	100	≥256 / ≥256	66.7	0.5 / ≥256	30.0
Arbekacin	1 / 2	0	1 / 1	0	2 / 4	0	0.5 / 2	0
Minocycline	32 / 32	100	32 / 32	71.4	16 / 16	55.6	8 / 16	30.0
Vancomycin	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0	1 / 1	0
Teicoplanin	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 2	0
Linezolid	1 / 2	0	1 / 2	0	1 / 1	0	1 / 2	0

MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>90</sub>: the values indicate the MICs (μg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of the strains.

## 第 2 章: 単一医療施設で流行する MRSA の年次推移

本章では、年次推移という時間的な MRSA の変化を解析した。使用菌株は 2002 年から 2012

年に単一の医療施設から分離された MRSA 3,135 株とし、SCCmec type、毒素遺伝子 (*tst* および *pvl*) の有無、薬剤感受性を調査した。

SCCmec type より、type II 検出率は、89.0% (2002-2004) から 74.5% (2011-2012) と有意に減少していた。一方、type IV 検出率は、7.6%から 16.5%と有意に増加していた。分離された診療科と SCCmec type を比較すると、type IV は、type II よりも皮膚科、腎臓内科、小児科など外来患者が多い科で有意に多く分離されていた。*tst* 検出率は、88.1% (2002-2004) から 52.4% (2011-2012) と有意に減少し、*pvl* 検出率は、0%から 2.2%と有意に増加していた。薬剤感受性は、penicillin 系抗菌薬の耐性率に大きな変化は見られなかったが、cefotaxime、levofloxacin、clarithromycin、minocycline の耐性率は有意に減少していた。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 (Table 2)。加えて、daptomycin の感受性が Ca<sup>2+</sup> 濃度によって鋭敏に変動することを明らかにした。

単一医療施設を対象とした MRSA の長期サーベイランスより、市中型の SCCmec type IV 株が年々増加していることが明らかとなった。これらの株の多くは、外来患者が多い診療科から分離されたことから、院外からの CA-MRSA の流入が推測される。この type IV 株の増加に

Table 2. 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 <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)		MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)		MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)		MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)		MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	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 <sup>a</sup>	ND	ND		ND	ND		1 / 2	0		1 / 2	0		1 / 2	0	
Linezolid <sup>b</sup>	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	

<sup>a</sup>The data were available from 2008 (n = 283). <sup>b</sup>The data were available from 2006 (n = 341). MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>90</sub>, 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. \*, p < 0.05 versus the antimicrobial susceptibilities in 2011-2012, as determined by χ<sup>2</sup> test.

伴い、*pvl* 保有率の増加および薬剤感受性化が認められたと考えられる。

### 第3章: 医療施設で流行する市中類似型 MRSA の遺伝的特徴

院内で分離される SCCmec type IV 株の遺伝学的背景を解明するため、MLST および PFGE を行った。使用菌株は第2章で用いた type IV の MRSA 276 株と比較対象として type II の MRSA 2,685 株を抽出し供試した。薬剤感受性を比較すると、type IV 株の薬剤感受性は type II 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 (Table 3)。そこで、これらの高度耐性株について、MLST より分類される clonal complex (CC) を調べたところ、type IV 株は CA-MRSA に多い CC8 (24.9%) と HA-MRSA に多い CC5 (31.4%) に分類された。一方、type II 株の約 90% が CC5 に分類された。Type IV 株のうち、CC5 株と CC8 株の薬剤感受性を比較すると、CC5 株は多剤高度耐性を示した (Table 4)。また PFGE 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。

これらの解析から、薬剤感受性が高いとされる CA-MRSA に分類されても、clonal complex が CC5 に分類された場合、多剤高度耐性を示すことが明らかとなった。したがって、院内に分布する CC5 の多剤高度耐性 *S. aureus* 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。

Table 3. 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 <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)	MIC range	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	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 <sup>a</sup>	0.13 - 8	1 / 2	0	0.25 - 4	1 / 1	0
Linezolid <sup>b</sup>	0.25 - 4	1 / 2	0	0.25 - 4	2 / 2	0

<sup>a</sup>n = 1,052 (SCCmec type II) and 158 (SCCmec type IV). <sup>b</sup>n = 1,643 (SCCmec type II) and 197 (SCCmec type IV). MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>90</sub>, the values indicate the MICs (μg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of the strains; R, rate of resistant strains. \*, p < 0.05 versus the antimicrobial susceptibilities of MRSA with SCCmec type II, as determined by  $\chi^2$  test.

Table 4 Antimicrobial susceptibilities of MRSA strains of CC5 and CC8 for the strains of SCCmec type IV

Antimicrobial agent	CC5 (n = 64)			CC8 (n = 50)		
	MIC range	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	R (%)	MIC range	MIC <sub>50</sub> / MIC <sub>90</sub>	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 <sup>a</sup>	0.25 - 2	1 / 2	0	0.25 - 2	1 / 2	0
Linezolid <sup>b</sup>	0.5 - 2	1 / 2	0	0.25 - 2	2 / 2	0

<sup>a</sup>n = 29 (CC5) and 35 (CC8). <sup>b</sup>n = 37 (CC5) and 42 (CC8). MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>90</sub>, the values indicate the MICs (μg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of the strains; R, rate of resistant strains. \*, p < 0.05 versus the resistance rates of CC5 isolates, as determined by  $\chi^2$  test.

## 総括

本研究では、特定の MRSA が病院間で流行しながら地理的・時間的に変化していることに加え、CA-MRSA が院内に流入していることを明らかにした。また、HA-MRSA と CA-MRSA の性質を持つ ST764 や CA-MRSA に多い SCCmec type IV を持つ株にも関わらず高度耐性を示す CC5 株が存在することも明らかとした。これらの MRSA は患者や医療従事者を媒介として、市中を経由することで他の医療施設へ伝播していることが強く示唆される。SCCmec はバクテリオファージを介し *S. aureus* 間を転移することが知られている。このような現象が医療施設内や施設間の *S. aureus* でも起きていると考えられるため、MRSA 感染症を抑制するためには、市中からの CA-MRSA の流入および院内での拡大を防止することが有用と考えられる。そのためにも院内だけでなく地域全体の MRSA の動向をサーベイランスすることが重要である。

### 【研究結果の掲載雑誌】

- 1) *J Infect Chemother.* **20** (8): 512-515 (2014)
- 2) *J Med Microbiol.* **64** (7): 745-751 (2015)
- 3) *J Global Antimicrob Resist.* **4**: 76-77 (2015)

## 論文審査の結果の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染の主要な原因菌である。MRSA は当初、医療施設を中心に流行していたが、近年、市中でも流行が認められ、問題となっている。これらは特徴が大きく異なるため、院内型 MRSA (HA-MRSA) と市中型 MRSA (CA-MRSA) に分けられている。しかし、本邦における 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。学位申請者の伊藤氏は、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に、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 章では地理的な MRSA の流行を解析するため、2009 年に多摩地域に位置する 4 つの基幹病院で分離された MRSA 554 株について分子疫学的解析を行った。その結果、本邦の代表的な HA-MRSA 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を明らかとした。また、各施設で CA-MRSA に多い SCCmec type IV 株が認められた。これより、本邦の医療施設で CA-MRSA の特徴を持つ株が分布していることを明らかとした。第 2 章では、年次推移という時間的な MRSA の変化を解析した。その結果、市中型の SCCmec type IV 株が年々増加していることを明らかとした。これらの株の多くは、外来患者が多い診療科から分離されたことから、院外からの CA-MRSA の流入が推測される。この type IV 株の増加に伴い、pvl 保有率の増加および薬剤感受性が認められたと考えられる。加えて、daptomycin の感受性が Ca<sup>2+</sup> 濃度によって鋭敏に変動することを明らかにした。第 3 章では院内で分離される市中類似型 SCCmec type IV の MRSA 株の遺伝学的背景を解明するため、MLST および PFGE を行った。これらの解析から、院内に市中型 MRSA が流入しているとともに、院内に分布する CC5 の多剤高度耐性 *S. aureus* 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を明らかとした。

以上、伊藤氏の論文は病院における MRSA が市中型 MRSA の流入によりその分布が変化し、かつ進化していることを明らかとした。さらに、本研究結果は多摩地域の病院に感染対策情報としてフィードバックを行った。

このように、本論文は MRSA の院内感染対策に重要な情報を提供する価値あるものである。したがって、本論文は、博士 (薬学) の学位論文として相応しい価値あるものと判断する。