

【短 報】

横浜市 7 病院の臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の疫学的解析

山田三紀子・松本裕子・石黒裕紀子・北爪晴恵・武藤哲典・鳥羽和憲
横浜市衛生研究所

(平成 18 年 10 月 25 日受付, 平成 19 年 4 月 9 日受理)

院内感染の疫学調査を目的として, 1997~2003 年に横浜市内の 7 病院で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)124 株の生物学的検査と分子疫学的検査を行った。前者はコアグララーゼ型, 毒素(Staphylococcal Enterotoxin (SE), Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1), Exfoliative Toxin (EXT))の検査を, 後者は制限酵素 *Sma*I と *Csp*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)パターンの多型性解析を行った。

コアグララーゼ型については II 型 80 株(65%), 次いで型別不能(UT) 35 株(28%)が多かった。SE 産生は 106 株(85%), そのうち C 型が 91 株(73%)と多かった。TSST-1 産生は 108 株(87%)であったが, EXT 産生は 7 株(5.6%)と少なかった。

*Sma*I 処理後の PFGE パターン解析が可能であった 122 株は, 83 のクラスターに分類され, 類似度は 0.56~1.00 であった。さらに *Sma*I 切断 DNA が同一の泳動パターンであった株について, *Csp*I 処理を組み合わせてマルチエンザイム解析も行ったところ, 生物学的性状が同一の菌株間のより詳細な解析が可能であった。

Key words: MRSA, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), molecular epidemiology, epidemiological marker

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)などによる院内感染の感染源や感染経路を明らかにするためには, 分離菌を種々の疫学マーカーを用いて解析することが不可欠である。しかし時間, 費用, 専用の機器などを必要とするため, この解析を行っている病院は少ない。当所では横浜市内の病院で院内感染を疑う事例などについて検査依頼があった場合には, 検出菌について各種の疫学マーカーを用いた解析を行い, 結果を迅速に還元している¹⁾。

今回, 1997~2003 年の 7 年間に市内の 7 病院の臨床検体から分離され, 横浜市衛生研究所に検査を依頼された 124 株の MRSA について, 生物学的検査(コアグララーゼ型別検査, 毒素検査)およびパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による分子疫学的検査を行い, それらの結果を解析したので報告する。

使用菌株は, 横浜市内 7 病院(A~G)由来の臨床分離株で同一患者からの重複菌株を除く MRSA 124 株(1997 年 4 株, 1998 年 3 株, 1999 年 9 株, 2000 年 35 株, 2001 年 22 株, 2002 年 24 株, 2003 年 27 株)で, 当所にて *mec* 遺伝子の保有を PCR 法により確認したものをを用いた。

生物学的検査のうちコアグララーゼ型別検査は, ブドウ球菌コアグララーゼ型別免疫血清「生研」(デンカ生研)を用い, 添付書に準拠して行った。Staphylococcal Enterotoxin (SE)検査は A, B, C, D について SET-RPLA「生研」(デンカ生研)を用い, Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST)検査は TSST-1 について TST-RPLA「生研」(デンカ生研)を用い, Exfoliative Toxin (EXT)検査は A, B について EXT-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いた。検査はそれぞれ添付書に準拠し逆受身ラテックス凝集反応により行った。

PFGE による分子疫学的検査は, GenePath Reagent Kit (BioRAD)にて処理した後, 制限酵素 *Sma*I (TaKaRa)により DNA を切断し, ジーンパス電気泳動プログラム 5 で 20 時間泳動した。遺伝子 DNA 断

著者連絡先: (〒235-0012) 横浜市磯子区滝頭 1-2-17
山田三紀子
TEL: 045-754-9800
FAX: 045-754-2210
E-mail: mi03-yamada@city.yokohama.jp

片の多型性を解析ソフト (Diversity Database Ver. 2.7.d1: PDI 社) を用いて解析し, 相同性の算出には Dice の係数を汎用し, このときの検出感度 (Sensitivity) は 10.0 に設定した。菌株間の類似度 (similarity) は UPGMA 法にて算出し, 系統樹解析を行った^{2)~4)}。また, *SmaI* による切断パターンが同一の菌株については, 他の制限酵素 *CspI*⁴⁾ (TaKaRa) および *ApaI*⁵⁾ (TaKaRa) を用いて同様の処理を行い, より詳細なマルチエンザイム解析を行った。

この調査に用いた MRSA 124 株について, 病院, 採取部位, 分離年の内訳を Table 1 に示した。なお, 病院については, 依頼検体数も多く, 集団感染の疑われる事例を含んでいる A, B 病院と, それぞれからの依頼検体数の少ない C~G 病院の 3 グループに分けて表示した。1997 年から 2003 年の 7 年間に市内 7 病院 (A~G) で分離された MRSA 124 株のうち, A 病院由来のものが 89 株 (72%) を占め, そのうち 2000 年に分離されたものが 35 株と多かった。ついで B 病院由来が 21 株 (17%) であった。採取検体について見ると, 血液 (静脈血 69 株, 動脈血 3 株) が 72 株と多く, 次いで痰 14 株, 鼻汁 9 株, 開放・閉鎖膿 6 株で, その他 (尿, 便, 皮膚, 胃液, 不明) は 23 株であった。

生物学的検査の結果, コアグララーゼ型は I, II, III, VII と UT (型別不能) に分別され, そのうち II 型が 80 株

(65%), 次いで UT が 35 株 (28%) を占めていた。SE については産生が 106 株 (85%) で, その型別は AB, BC, B, C であり, C 型が 91 株 (73%) を占めていた。一方, 非産生のもも 18 株 (15%) 認められた。TSST-1 については産生が 108 株 (87%) と大多数を占めていた。しかし, EXT 産生は 7 株 (6%) と少なく, その内訳は A 産生 1 株, B 産生 6 株であった。コアグララーゼ型と各毒素の組み合わせを見ると, SE 型では II 型-C 型の組み合わせが最も多く (68 株, 55%), TSST-1 産生性とは II 型-TSST-1 (+) が 77 株 (62%), EXT 産生性とは II 型-EXT 非産生が 79 株 (63%) であった。

分子疫学的検査は 124 株のうち, PFGE パターンがスメア状になり解析不能であった 2 株を除く 122 株について, 制限酵素 *SmaI* による泳動パターンを UPGMA 法により, 類似度を算出した。その値から系統樹を作成すると, 83 のクラスターに分類され, 類似度は 0.56 から 1.00 であった (Fig. 1)。全菌株の系統樹から病院群毎に抜き出して系統樹を作成してみると, A 病院の株については類似度 0.61~1.00 の 65 のクラスターに, B 病院由来株は類似度 0.70~1.00 の 13 クラスターにそれぞれ分かれた。一方, C~G 病院群の株は類似度 0.53~1.00 の 13 クラスターになった。類似度を大きく 3 段階 (≤ 0.70 , $0.71\sim 0.80$, $0.81\sim 1.00$) に分けて分布を見ると, 122 株中 74 株 (61%)

Table 1. Origins of 124 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from 7 hospitals (A to G)

Hospital	Specimen	Year of isolation							Total	Rate (%)
		1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003		
A	Blood			5	18	18	12	16	69	
	Sputum			2	7				9	
	Pus				5				5	
	Others			1	5				6	
	Subtotal	0	0	8	35	18	12	16	89	71.8
B	Blood							2	2	
	Sputum						3	2	5	
	Nasal discharge						2	7	9	
	Others							5	5	
	Subtotal	0	0	0	0	0	5	16	21	6.9
C, D, E, F, & G	Blood					1			1	
	Pus		1						1	
	Others	4	2	1		3	2		12	
	Subtotal	4	3	1	0	4	2	0	14	11.3
	Total	4	3	9	35	22	19	32	124	100.0

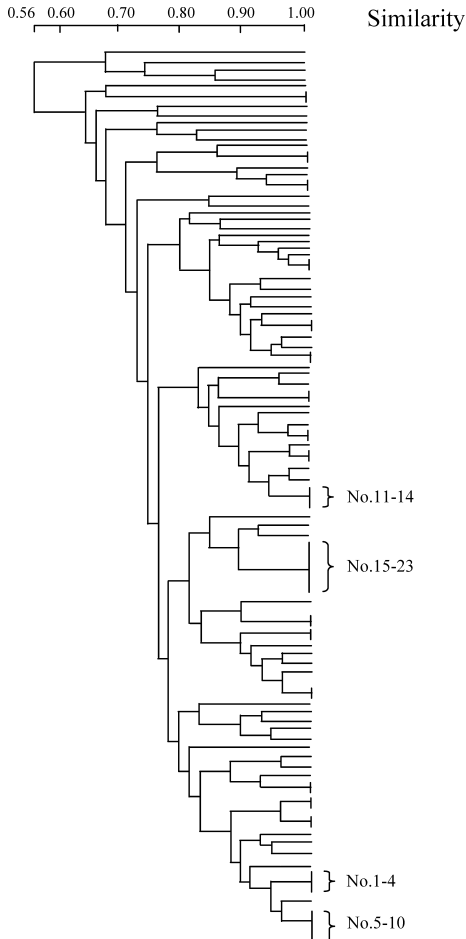


Fig. 1. Dendrogram of the cluster analysis (dice similarity coefficient: UPGMA) of *Sma*I-digested DNA of 122 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

が類似度 0.71~0.80 の群に、39 株 (32%) が 0.81~1.00 の群に分かれた。これを病院群別に見ると 0.71~0.80, 0.81~1.00 の 2 群の合計が A 病院由来株は 95% 以上を占め、B 病院由来株では 100% であった。これに対し C~G の異なる病院からの菌株については、0.71 以上の二つの群の占める割合が 57% と低く、A, B 病院とは差が認められた。

なお、*Sma*I 切断 DNA の PFGE で同一パターン (類似度 1.00) であったものが 19 クラスターあり、そのうち 15 クラスターは 2 株ずつの 15 グループ (30 株) であり、それぞれ家族などの関係者で分離日も近かった。その他の 4 クラスターは 4 グループ (以下 *Sma*-1, *Sma*-2, *Sma*-3, *Sma*-4) 23 株であった (Table

2)。このうち 2 グループ (*Sma*-2: No.5~10, *Sma*-3: No.11~14) は同一病院 (A 病院) 由来で、それぞれ 2000~2001 年, 1999~2000 年と 2 年間にわたって検出されていた。また他の 2 グループ (*Sma*-1: No.1~4, *Sma*-4: No.15~23) は異なる病院 (A と E, A と B) で異なる年 (1998 年と 2000 年, 2000 年と 2003 年) に検出されていた。*Sma*I に追加して *Csp*I あるいは *Apa*I の制限酵素による切断を行ったところ、いずれの制限酵素におけるバンド数も 13 から 20 本であり、*Csp*I と *Apa*I の酵素間で差は認められなかった。しかし分画分子量の範囲は *Apa*I 処理では約 20 から 170 kb であったのに比べ、*Csp*I では約 20 から 600 kb と幅広く、また検出されたバンドも明瞭であった。この結果から、同じサンプルを複数の制限酵素で処理し複数の画像から一つの系統樹を作成するマルチエンザイム処理解析には、*Sma*I と *Csp*I を用いた (Fig. 2)。*Sma*I での切断パターンが異なる *Sma*-1 と *Sma*-2, *Sma*-3 (類似度 0.93:0.86) は *Csp*I では同一の泳動パターン (*Csp*-1) を示した。一方、*Sma*-3 の 4 株 (No.11~14) は *Csp*I 切断では二つのグループ (*Csp*-2: No.11~12, *Csp*-3: No.13~14, 類似度 0.67) に分かれ、マルチエンザイム処理解析によりこの 2 グループの類似度を求めると 0.88 であった。これら 23 株の生物学的性状を見ると、22 株はコアグラゼ II 型, SE が C 型, TSST-1 産生, EXT 非産生であった。残りの 1 株 (No.14) はコアグラゼ型 UT で, TSST-1 産生能は低く 22 株とは異なっていた。

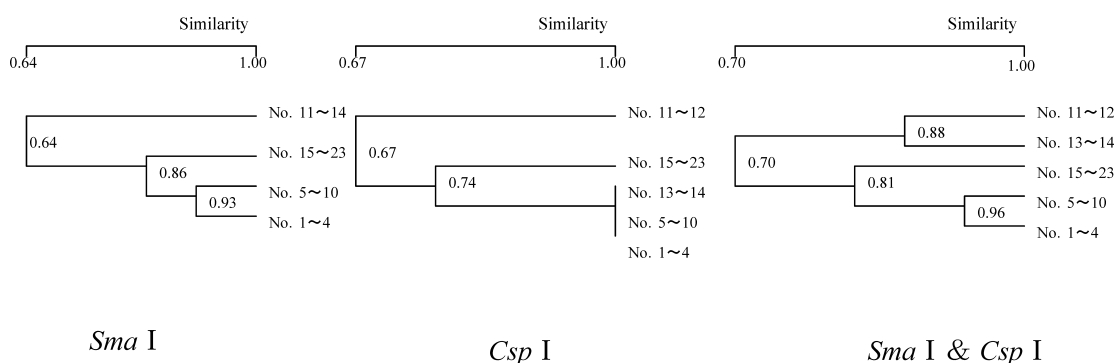
筆者らは、1997 年から 2003 年の 7 年間に当所に送付された合計 124 株の MRSA について、各種の疫学マーカーの結果と、菌株の背景因子を合せて考察した。

生物学的性状のうち、コアグラゼ型については II 型が 65% と多かった。これは院内感染事例由来株について調査し、II 型が多いと報告している山崎ら⁶⁾と同様の結果であり、食中毒事例のヒト由来株は VII 型が多いとの報告⁷⁾とは異なっていた。毒素産生性を見ると、SE 産生の株が 86% を占め、食品由来株の SE 産生率を調べた報告 (37.5%)⁷⁾より高率であった。なお、SE の型については山崎らの報告⁶⁾と同様 C 型が 73% と多かった。TSST-1 については 87% が産生性であった。今回はすべて臨床材料由来株なので一概には比べられないが、1992 年に筆者らも加わって行われた横浜市の調査では、健康な妊婦の臍由来検体 308 件のうち 36 件から黄色ブドウ球菌が検出されたが、すべてが TSST-1 非産生であった。なお、このうち 1 株のみが MRSA であった⁸⁾。また、TSST-1 産生率に

Table 2. Biological phenotypes of 23 strains of MRSA which constituted unique groups after digesting with restriction enzyme *Sma*I or *Csp*I.

Strain No.	Year	Hospital	SE	Coagulase type	TSST-1	EXT	Group by PFGE-pattern	
1	1998	E	C	II	+	-	<i>Sma</i> -1	<i>Csp</i> -1
2	1998	E	C	II	+	-	<i>Sma</i> -1	<i>Csp</i> -1
3	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -1	<i>Csp</i> -1
4	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -1	<i>Csp</i> -1
5	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
6	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
7	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
8	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
9	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
10	2001	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -2	<i>Csp</i> -1
11	1999	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -3	<i>Csp</i> -2
12	1999	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -3	<i>Csp</i> -2
13	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -3	<i>Csp</i> -3
14	2000	A	C	UT	+	-	<i>Sma</i> -3	<i>Csp</i> -3
15	2000	A	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
16	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
17	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
18	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
19	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
20	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
21	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
22	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1
23	2003	B	C	II	+	-	<i>Sma</i> -4	<i>Csp</i> -1

UT: Untypable

Fig. 2. Dendrogram of the cluster analysis (dice similarity coefficient: UPGMA) of *Sma*I-digested DNA and *Csp*I-digested DNA of 23 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

については1980年には5%以下、1990年には80%以上、2001年には90%近くと経時的な変化が見られたとの報告があるが^{9), 10)}、今回の筆者らの調査(1997~2003年)における高い産生率は近年の傾向を示しているとも考えられる。TSST-1産生のMRSAに新生児などが感染すると、重症化しやすくなるとの報告が

あり¹¹⁾、今回の検体にも新生児由来株が含まれていたことを考えると注意を要すると思われた。一方、表皮はく離を起こす毒素であるEXTの産生株は7株(6%)と少なかった。しかし、これらのMRSAは皮膚疾患(びらん、皮疹)、創感染を呈していた患者の膿、痰、皮膚滲出液、耳分泌物から分離されていた。

*Sma*I 切断 DNA で 4 株以上が同一の泳動パターン (類似度 1.00) を示した 4 グループ 23 株の由来を見ると病院 (A と E, A と B) や分離年が異なっているものも含まれていた。病院や年をまたがって同一の泳動パターンの MRSA が分離されたことは、これらの 3 病院は横浜市内の異なる区の中核病院で、地理的にも離れ、患者も医療関係者の行き来も少ないと思われ、原因は不明である。しかし、そのうち A 病院由来で 2000 年に分離された 5 株 (No. 5~No. 9) および B 病院由来で 2003 年に分離された 8 株 (No. 16~No. 23) は、コアグララーゼ型、毒素産生性の生物学的性状もすべて一致していたことから、それぞれ院内感染による集団事例であることが推定された。また、23 株中 22 株は生物学的性状が同じため解析に限界があったが、*Csp*I 処理のデータを加え二つの酵素を組み合わせるマルチエンザイム解析を行うことにより、判別のレベルが高まりより詳細な解析が可能であった。この結果から MRSA の DNA 解析には *Sma*I とともに *Csp*I が適した制限酵素であること、また、制限酵素の種類を増やすことにより、さらに詳細な疫学解析が可能になることが明らかになった。

ここで用いたソフト解析システム (Diversity Database Ver. 2.7. d1: PDI 社) は、複数の制限酵素による DNA 切断パターンを解析するマルチエンザイム処理ができるため、検体間の比較解析を多面的に行えるという利点がある^{12), 13)}。今後、さらに臨床現場との連携を深めて菌株を収集し、患者発生状況などと複数のエンザイム処理を組み合わせた多様な DNA 多型情報をデータベース化することにより、MRSA についての分子疫学的解析の内容を深めていきたい。

謝辞 稿を終わるにあたり、菌株を分与してくださった医療機関の先生方に深謝いたします。

引用文献

- 1) 山田三紀子, 松本裕子, 北爪晴恵, 他. 2005. 横浜市内の病院で発生した緑膿菌およびセラチアによる院内感染の疫学調査. 横浜衛研年報 44: 55-58.
- 2) 満田年宏. 2002. 感染対策のための分子疫学入門—パルスフィールドゲル電気泳動法を中心に—,

メディカ出版.

- 3) 根井正利. 1990. 分子進化遺伝学. pp. 252-256. (五條堀孝, 斉藤成也 共訳), 培風館.
- 4) Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.
- 5) Tenover F. C., M. V. Lancaster, B. C. Hill, et al. 1998. Characterization of Staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J. Clin. Microbiol. 36: 1020-1027.
- 6) 山崎 勉, 遠藤一博, 富永一則, 他. 2004. 当院より分離された arbekacin 耐性メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 株の疫学的検討. 感染症誌 78: 305-311.
- 7) 岸本 満, 鈴木匡弘, 森田妃美子, 他. 2004. 調理施設から採取された黄色ブドウ球菌の RAPD-PCR, BSFGE および PFGE による遺伝子多型解析. 日食微誌 21: 193-200.
- 8) 荒井一二, 満田年宏, 藤田伸二, 他. 1993. 分娩時の膣から検出されたメチシリン耐性と Toxic Shock Syndrome Toxin-1 産生性ならびにエンテロトキシン型, Protease pattern, コアグララーゼ型の分布. 感染症誌 67: 1005-1010.
- 9) 花木秀明, 平松啓一. 1997. MRSA の変遷とバンコマイシン耐性 MRSA の出現. 臨床科学 33: 1052-1059.
- 10) 奈田 俊, 馬場尚志, 後藤康仁, 他. 2004. 臨床検体からの MRSA 検出状況および薬剤感受性率の推移 1992~2003. 日本臨床微生物学雑誌 14: 215-222.
- 11) 岡田陸滋, 牧本 敦, 北村明子. 2000. 毒素産生 MRSA による新たな新生児発疹性疾患—局所, 血中毒素およびサイトカインからみた病態—. 感染症誌 74: 573-579.
- 12) 松永数彦, 矢野 博, 原田久也. 1997. 新しい DNA フィンガープリンティングソフトによる解析例. DNA 多型, 5, 別冊, pp. 163-169. 東洋書店, 東京.
- 13) Olsen J. E., M. N. Skov, O. Angen, et al. 1997. Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enteritica* subsp. *enterica* serotype typhimurium defined by ribotyping IS200 typing and PFGE. Microbiology. 143: 1471-1479.

An Analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
Isolated in 7 Hospitals in Yokohama City

Mikiko Yamada, Yuko Matsumoto, Yukiko Ishiguro,
Harue Kitazume, Tetsunori Muto, Masanori Toba
Yokohama City Institute of Health

An analysis of hospital-derived methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was conducted using 124 strains isolated in 7 hospitals in Yokohama city from 1997 to 2003. Although coagulase produced by 80 strains (65%) revealed to be type II, that of 35 isolates (28%) remained "untypable". As for toxins, among Staphylococcal Enterotoxin types AB, BC, B, and C which were observed in 106 strains (85%), the majority was type C (91; 73%), and 108 strains (87%) produced Toxic Shock Syndrome Toxin - 1, while Exfoliative Toxin was detected only in 7(5.6%) isolates. Analysis of PFGE patterns after digestion with restriction enzyme *Sma*I was done using 122 isolates. These were grouped into 83 clusters, and the Dice similarity coefficients of them scattered from 0.56 to 1.00. Patterns of *Csp*I-digested DNA fragments were also compared in combination with the above results, and the fact of interest found out was that several groups having similarity coefficient 1.00 with either *Sma*I or *Csp*I treatment were divided into 2 clusters when digested with the other enzyme.