

## [総 説]

## MLST などによる MRSA の分子疫学

長尾美紀<sup>1)</sup>・太田美智男<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 京都大学医学部附属病院検査部・感染制御部<sup>2)</sup> 名古屋大学医学系研究科分子病原細菌学

(平成 19 年 6 月 26 日受付)

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) は院内感染の最も重要な起因菌である。また最近では市中感染症例の報告も相次ぎ、病原性の高さからその重要性が再認識されてきている。MRSA の問題点は接触により容易に周囲に広がっていくことができることに加え、次から次に新たな病原性や耐性をもつ株が出現してくることにあり、その感染経路を把握することは感染対策を講じるうえでも必須である。本稿では MRSA の分子疫学において代表的な Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), *spa* typing, SCCmec typing について解説した。これらの手法、特に MLST を用いることで、世界に広がる MRSA には独立に誕生した多くの clone (クローン) があり、国や地域によって異なったクローンが定着していることが明らかになった。また空間的な要素と時間的な要素を加味してダイナミックに変容する MRSA の姿が浮き彫りになってきた。

**Key words:** MRSA, 分子疫学, MLST, PFGE, *spa* typing

Methicillin が使用開始されたのが 1960 年であるが、すでに同年には MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: methicillin 耐性黄色ブドウ球菌) の出現がヨーロッパで報告されている。現在わかっている最初の MRSA 検出の報告は 1960 年にイギリスの病院からで、英国中から *S. aureus* フェージ型別レファレンス・ラボに送られた 5,440 株のなかで 3 株 (同一病院由来、おそらく同一株だろう) が methicillin 耐性であった<sup>1)</sup>。その後デンマークなどヨーロッパの他の国でも MRSA が分離されるようになった。我が国でも 1980 年代に“MRSA パニック”と揶揄されるような爆発的な院内感染の増加を経験し、MRSA はいまや院内感染の原因として最も重要な菌となっている。現在、院内で分離される *S. aureus* のうち methicillin 耐性のもは 60~70% に及ぶといわれており諸外国と比較して際だって高いことがわかっている<sup>2)</sup>。

MRSA は接触感染で容易に広がる。また環境中に長く生存することができ、人に対し定着/保菌という状態をとることができるためさらに問題を複雑にしている。

感染対策をするうえでまずは伝播を防ぐことが重要であり、そのために疫学的な手法を用いて感染経路を調査する必要がある。

1950 年代、特定のクローンの *S. aureus* が病院間や地域内で蔓延したことが初めてフェージタイピングによって証明された。菌株を区別する方法として、このほかに薬剤感受性パターンなどが用いられていたが、臨床的には近縁とは考えられない菌株でも同一のグループに分類されたり、分類不能となる菌株が多いなどの問題点があった。

しかし分子生物学の進歩により、遺伝子解析の技術が進み細菌の分子疫学の分野も飛躍的な進歩を遂げた。その代表的なものに pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multi locus sequence typing (MLST), *spa* typing, SCCmec typing などがある。

ここではそれらの疫学的手法の概説と、MLST を中心とした MRSA の分子疫学の最近の見解についてまとめた。

---

著者連絡先: (〒466-8550) 名古屋市昭和区鶴舞町 65  
名古屋大学医学系研究科分子病原細菌学  
太田美智男  
TEL: 052-744-2106  
FAX: 052-744-2107  
E-mail: mohta@med.nagoya-u.ac.jp

### PFGE (pulsed field gel electrophoresis)

疫学調査の reference standard と考えられており、広く行われている手法である。

菌株の全ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その切断断片を電気泳動により分離し、その電気泳動のバンドパターンを利用して遺伝子型を決定する。電気泳動により得られたバンドのパターンは Tenover らのガイドラインに基づいて解析され<sup>3)</sup>、UPGMA (unweighed pair-group matching analysis) によってクラスタリングされる。また、バンドパターン間の相同性の計算を行い、数値で表し、系統樹の作成もできる。

限られた地域から、あるいは限られた期限内に集められた菌株を区別するのに適しており、基本的には溶菌ができる実験条件さえ設定できれば解析可能である<sup>4)</sup>。しかし手技が煩雑で再現性に乏しいこと、迅速性に欠ける、コストがかかる、特殊な機械を要する、個々のバンドがどのような遺伝情報を反映するかわからない、違う電気泳動のゲル間での比較が難しいなどといった問題がある<sup>4)~6)</sup>。また、国内のデータの比較はできるが、ゲノム構造の大きく異なる菌株が見られる国際間での比較は難しいという欠点がある。

### MLST (multi locus sequence typing)

菌株ごとに複数遺伝子の配列の差異をパターン化してそれらを統合し遺伝子解析ソフトにより解析する手法である。近年多くの菌種において MLST が行われるようになった。それぞれの菌種により、あるいは解析を行う研究者によって対象とする遺伝子の種類やそのなかの領域について異なることがある。しかし個々の研究者による解析結果の比較を行う必要性から、それぞれの菌種においてしだいに解析対象の遺伝子が一

定の組み合わせとなってきた。解析対象遺伝子として、すべての菌株に必ず存在する遺伝子であること、塩基配列が安定して存在すること、わずかに塩基置換が見られること、多くの場合それらの塩基置換がアミノ酸変異を伴わない、などの条件が望ましい。したがって菌の生育に必須の遺伝子（ハウスキーピング遺伝子と呼ばれる）が多くの場合選択される。例えば解糖系、アミノ酸合成あるいは利用遺伝子など代謝活動に関与する遺伝子である。S. aureus では *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* といった遺伝子の組み合わせで、それぞれの遺伝子のなかの多様性が見られる決まった領域を PCR で増幅してその塩基配列を決定する。そして塩基配列情報を数値化し、データベース化される。塩基配列の部分的に異なった配列を allele (対立遺伝子, アレル) という。最初に塩基配列の決定された菌株を基にすればそれらの allele はすべて変異 (mutation) ということになるが、どの配列がその菌種の最も古いもの (原種) かわからないので、変異という呼び方は正しくない。allele と呼ぶべきである。解析した七つの遺伝子領域それぞれに特有の allele が見いだされ、個々の菌株はそれぞれの allele をナンバー化しその組み合わせで表される。例えば New York/Japan クロンの allelic profile (対立遺伝子のプロファイル) は 1-4-1-4-12-1-10 と表すことができる<sup>7)</sup> (表 1)。七つの遺伝子のうち、五つが完全に同じ塩基配列 (=同じ数字) である場合、近い関係にあると考えて同じ clonal complex (同一クロンの集団) に属しているとされる<sup>8)~11)</sup>

MLST は 1 塩基の違いを検出することによって PFGE 以上の解像度で株の識別能を達成することができる。

表 1. MRSA の主要クローン (文献 6 より 一部改変)

Clone	MLST profile	ST	CC	SCCmec	<i>spa</i> type <sup>#</sup>
Archaic	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	t008
Southern Germany	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	t001
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	t001, t002
Iberian	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	t008, t051
Irish-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	t008
New York/Japan	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	t001, t002
UK EMRSA 16	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II	t018
Brazilian/Hungarian	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t037
Berlin	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	t004
Paediatric	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	t001, t002
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	t008
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	t032

<sup>#</sup> 代表的な *spa* type を示した。

得られた allelic profile はそのままその菌の遺伝情報であり、数値化されたものは容易に比較検討することが可能で、再現性もよい。また、*S. aureus* の MLST のデータベースはインターネット上で公開されており、1,500 以上の臨床分離株のデータが蓄積されている。しかし、それぞれの菌株に対し、七つの遺伝子領域について合計 3,500 bp の塩基配列を決定するのは、塩基配列決定の自動化が進んでいるとはいえ、解析の株数が多ければ相当な手間と経費がかかるという欠点がある。したがって病院検査室において容易に行える解析手法ではない。また、特定の病院内などの狭い範囲での分離菌株相互を比較するというような目的には、多分ほとんどの株の allelic profile が同じ結果になってしまい、向きである。そのような解析には PFGE のほうが適している。MLST が最も向いているのは、30 年前の株と現在の流行株の比較やある国と別の国の株間の違いを比較する場合などである。

ここでなぜ PFGE が狭い範囲での菌株間の相違を検出できるかについて簡単に触れる。PFGE の検出するバンドパターンの違いは大まかにいって、①特定の制限酵素が認識する塩基配列の染色体全体のなかでの位置と数の違い、②切断された DNA 断片のサイズの違いである。細菌染色体 DNA は 2 分裂で増殖した娘細胞にそのまま受け継がれるが、トランスポゾン (*Tn*)、インサージョン配列 (IS) などによる非同相組換えによって容易に配列を変える。また染色体中に飛び込んだフェージゲノムが離脱したり、あるいは新しく飛び込んだりする。これらの DNA 変化は制限酵素によって切断される断片のサイズを変え、PFGE パターンの違いとなる。このような細菌染色体の大きな改変は意外に高頻度で起こり、同じ患者からしばらくして再度分離された MRSA 株が最初の株の PFGE とよく似てはいるが一部異なることがしばしば見られる。逆にこのようなゲノムの不安定性が狭い範囲で分離された菌株の PFGE におけるバリエーションを生じるという利点になる。なお、ゲノムの改変は実験室保存株でも頻繁に起こるので、患者からの最初の分離株を凍結保存して解析に用い、寒天平板で長期室温保存したり何回も植え継ぎした菌株の使用を極力避けるのが原則である。

近年では塩基配列の解析に DNA マイクロアレイを用いて 1 塩基の違いを検出し解析する方法も試みられている<sup>12)</sup>。現在のところコストが高く結果の再現性に問題があるが、大量にマイクロアレイが生産されればコストは下げられる。また種々の方法によって技術の向上が図られているので、いずれ実用化されるかもし

れない。

### spa typing

MLST は菌株の識別能が高く再現性もよいが、七つの遺伝子について塩基配列を決定しなくてはならず、労力を要する。その欠点を補うために一つの遺伝子 locus の塩基配列を決定することで疫学に用いることができないか、と考案されたのが *spa* typing である<sup>13)</sup>。

これは、*S. aureus* の病原因子の一つであり、免疫グロブリンを結合するタンパク質である protein A の遺伝子 (*spa*) の多変領域 polymorphic region X の塩基配列の決定がベースとなっている。この領域は 24 bp の繰返し配列がいくつかあり、菌株ごとにバリエーションがある (表 2)。一般にこういった繰返し配列のある箇所は自然の遺伝子組換え (相同組換え) を起こしやすく、*spa* のこの部位には主に欠失や重複、まれには点変異が認められ、解析によって得られた塩基配列情報は専用ソフトを用いて解析することができる<sup>14), 15)</sup>。

また、インターネットでアクセスできるデータベースが公開されており、1,200 もの *spa* type が登録されている。菌株の識別能は PFGE と MLST の中間であり、遺伝子解析の技術があり (塩基配列の決定が可能であり) 費用をいとわないのであれば PFGE よりも簡便に行うことができる。また MLST や PFGE と組み合わせると型別の評価がされることが多い<sup>15), 16)</sup>。欧米では *spa* typing が比較的よく行われているが、本邦での報告例は少ない。その理由として、MLST についても同じだが塩基配列の決定費用が欧米と比べると割高となっていることがある。今後そのコストが下がれば、塩基配列を基にした分子疫学が本邦でもっと普及するだろう。

### SCCmec typing

SCCmec は染色体上の特定の領域に自由に入り込むことのできる可動性遺伝子であり、メチシリン耐性に関与している *mecA* 遺伝子、特定の場所への挿入に関与する組換え遺伝子 *ccr* (chromosomal cassette recombinase) 遺伝子、そのほかに IS431 や *Tn554* などで構成されている。近年欧米ならびに我が国でも増加している市中感染 MRSA (community-acquired MRSA, CA-MRSA) の起源は MSSA が SCCmec を新たに獲得したことによる、という説が唱えられるようになり、SCCmec typing が注目されるようになってきた。

表2. 個々の *spa* repeats の塩基配列の例と, 基本配列からのバリエーション. 塩基配列の異なった配列のみを示した. 2,500 以上の *spa* 配列がインターネットに公開されている.

Repeat code	DNA Sequence																							
Consensus	A	A	A	G	A	A	G	A	C	A	A	C	A	A	C	A	A	G	C	C	T	G	G	C
H2	g	—	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	—
S1	g	—	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	—	—
D2	g	—	g	—	—	—	—	—	—	—	—	t	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	t
U1	g	—	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	t
K2	—	—	—	—	—	—	—	—	t	g	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	—	t
Q1	—	—	—	—	—	—	—	—	t	g	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	t
N1	—	—	—	—	—	—	—	—	t	g	g	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	—
G2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	g	g	—	—	—	a	—	—	a	—	—	—	—	—	—
K1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	g	g	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	t
E1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	—	—	—	—	—	t
E2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	t	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	t
H1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	t	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

SCC*mec* typing は通常 Multiplex PCR や real time PCR を用いて行われる<sup>17)~21)</sup>. 三つの *mec* 領域のクラスと四つの *ccr* 領域のアロタイプの組み合わせから I から V のタイプに分類でき, *mec* 領域と *ccr* 領域の間にある J 領域の違いによりさらにサブタイプに分けることができる。

SCC*mec* 型については 2 種類の表記方法がなされている。

一つは Hiramatsu らが提唱したもので SCC*mec* 内の制御因子や挿入配列, *ccr* 遺伝子の多型を加味して分類される<sup>22), 24)</sup>. もう一つは de Lancastre らが提唱した分類方法で *mec* 領域の遺伝学的特徴のみで *ccr* 領域の多型については含まれていない分類になっている<sup>23)</sup>. いずれもローマ数字で表記されていることから, 二つの表記方法を混同する可能性があり, Ito らは *mec* 領域をアルファベットで, *ccr* 領域はアラビア数字で表記するという方法を提唱しており, さらに J1 領域や J2~3 領域を加味した分類も提唱されてきている<sup>24), 30)</sup> (表 3). また *mecA* 遺伝子をもたない SCC が少なくとも 4 種類見いだされており, 今後より多くの SCC*mec* 領域が解析されれば新しい型がさらに見いだされていくと思われる。

このほかにも特定の遺伝子領域の PCR 産物を用いた制限酵素切断長多型 (PCR-based restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP) によるタイピングや IS256 間のスペーサー多型を PCR で比較する方法, コアグラマーゼ型別などがある。これらによる分子疫学解析は一部に報告があるが, 世界的に広く用いられているわけではない。しかし本邦ではコアグ

表3. Chongtrakool らによって提案された SCC*mec* elements のタイプ

Reported	SCC <i>mec</i> type name		<i>ccr</i> type	<i>mec</i> class
	Reported	Proposed		
I		1B.1.1 (I.1.1)	1	B
IA		1B.1.2 (I.1.2)	1	B
IIa		2A.1.1 (II.1.1)	2	A
II variant		2A.1.2 (II.1.2)	2	A
IIB		2A.2 (II.2)	2	A
IIA		2A.3.1 (II.3.1)	2	A
IIB		2A.3.2 (II.3.2)	2	A
IIC		2A.3.3 (II.3.3)	2	A
IID		2A.3.4 (II.3.4)	2	A
IIE		2A.3.5 (II.3.5)	3	A
III		3A.1.1 (III.1)	3	A
IIIA		3A.1.2 (III.1.2)	3	A
IIIB		3A.1.3 (III.1.3)	3	A
		3A.1.4 (III.1.4)	3	A
IVa		2B.1 (IV.1)	2	B
IVb		2B.2.1 (IV.2.1)	2	B
IVc		2B.3.1 (IV.3.1)	2	B
IVc		2B.3.2 (IV.3.2)	2	B
IVE		2B.3.3 (IV.3.3)	2	B
IVF		2B.2.2 (IV.2.2)	2	B
IVd		2B.4 (IV.4)	2	B
IV		4B (VI.1)	4	B
IVAb		2B.N.2 (IV.N.2)	(2)	(B)
IVg		2B.5 (IV.5)	2	B
V		5C.1 (V.1)	5	C

SCC*mec* elements は *ccr* 型と *mec* クラスならびに J1 と J2~3 領域の違いによって分類されている (文献 30 より一部改変)。

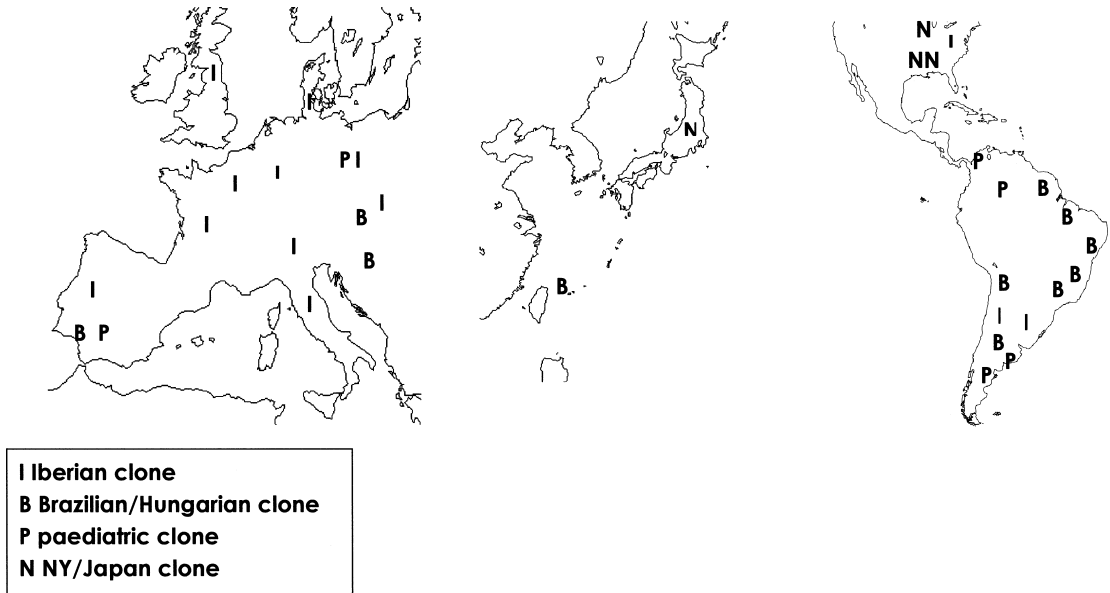


図1. パンデミック MRSA clone の国際的広がり (文献 27 より改変)

ラーゼ型別が比較的良好に行われている。他の国からのコアグラエ型別報告がほとんどないのは、型別キットが日本のメーカーの製品であり国内に普及しているのに対し、他の国では普及していないことによるのだろう。コアグラエ型はこれまで8種類が報告されている。しかしそれだけでは菌株を分けるのには不十分であろう。最近の分子疫学研究は PFGE と *spa* typing, もしくは PFGE のみで遺伝学的背景ごとに大きくグループ分けし、それぞれの代表的な菌株について MLST と *SCCmec* typing によってさらに解析する、というのが主流となっている<sup>25), 26)</sup>。

#### MLST による MRSA の分子疫学

最近の分子疫学の進歩によって、MRSA には独立に誕生した多くの clone (クローン) があり、国や地域によって異なるクローンが定着していることが明らかになりつつある<sup>27)</sup>。理論的には *SCCmec* の種類と、MLST などでもわかるそれぞれの菌株の染色体の種類を組み合わせてクローン型が決められる。MRSA クローンの国際的な名称はこの分類に基づいてつけられている。

南ヨーロッパ、西ヨーロッパ、南米および米国で 1994 年から 2000 年に分離された 3,000 株の MRSA を *mecA* の多型、*Tn554* の挿入パターン、PFGE のパターンで分類したところ、世界に流行している MRSA は主に五つのクローンに分けられることがわ

かった (表 1, 図 1)。ST 型と *SCCmec* type でさらに細かくクローンの名称がつけられてはいるが、これらは CC5, 8, 22, 30, 45 の五つの clonal complex (クローン集合体) に属している。

五つの主要なクローン集合体は、最初に分離された地域によりそれぞれ Iberian, Brazilian, Hungarian, New York/Japan, paediatric クローンと呼ばれている (図 1)。しかし、それぞれのクローンはその地域にのみ蔓延しているのではなく、海を越えて広く広がっていることがわかっている。また主に *mec* 領域を中心とした解析によると、これらの主要なクローンは遺伝的背景により A, B の 2 種類に分類される (図 2)。

一方、MLST による解析により、1990 年代半ばに英国の病院に蔓延した MRSA クローンは E-MRSA 15 と E-MRSA 16 と呼ばれる、五つの主要なクローンと異なる遺伝的背景をもつ新たなクローンであることが明らかになった<sup>28), 29)</sup>。また韓国と日本で近年分離される MRSA は、CC5 や CC1 に属しているものが主体であるが、アジアの他の地域では CC8 に属するクローンが広がっていると報告されている<sup>30)</sup>。

近年、病院由来の MRSA (HA-MRSA) と比べて性質の異なる、市中感染で見られる CA-MRSA が問題となっている。1981 年の米国 CDC からの報告を皮切りにヨーロッパやアジアの各地から、皮膚軟部組織感染症や菌血症、ウイルス性上気道感染症後に発生する重症の出血性肺炎などの症例が報告されている<sup>31)~37)</sup>。

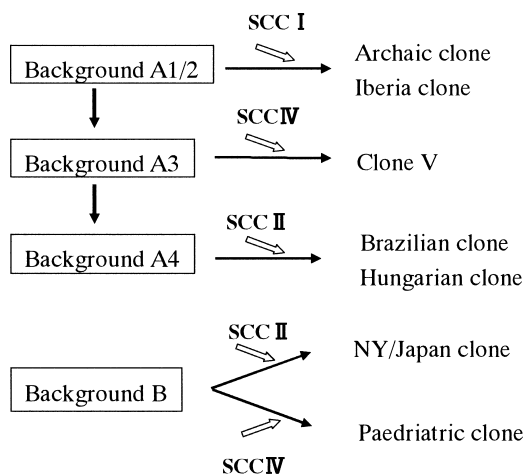


図2. パンデミック MRSA clone の国際的広がり  
(文献 27 より改変)

CA-MRSA 株は HA-MRSA 株より病原性が高いといわれており、世界各国からあいつぐ CA-MRSA の報告は、市中においても医療現場においても問題となっている。CA-MRSA の定義は“従来の HA-MRSA 感染のリスク因子が該当しない患者から分離された MRSA”とされており、細菌学的には Pantone-Valentine leukocidin (PVL) を産生し IV 型や V 型などの SCCmec 領域をもつ MRSA を指すことが多い<sup>38), 39)</sup>。しかし、CA-MRSA の中にも SCCmec I, II, III を有するものがあり、HA-MRSA であっても SCCmec IV を有するものがあるため、SCCmec タイプで CA-MRSA を特徴づけるのは難しい<sup>39)~41)</sup>。CA-MRSA の定義には曖昧なところがあり、当初欧米の PVL 産生 MRSA 株のみ指していたが、我が国では exfoliative toxin A, B (表皮はく離毒素, ETA, ETB) 産生 MRSA 株も含めている。さらには一般的に外来患者から分離される MRSA 株をも含めている報告もある。近年欧米の論文にも同様の傾向が見られ、CA-MRSA については拡大解釈の方向である。

MLST 型で見ると、HA-MRSA はさまざまなクローンが分布していることがわかる。一方 CA-MRSA においては米国に特徴的な ST1 型と ST8 型、ヨーロッパに特徴的な ST80 型、世界に広く分布する ST30 型などが存在する<sup>41)~43)</sup>。それぞれの大陸で主要な CA-MRSA の ST 型はその地域の HA-MRSA や MSSA の ST 型と異なっていることがわかっている<sup>44)</sup>。CA-MRSA の起源について諸説があるが、このような MLST や PFGE をもとにした解析により、CA-MRSA は PVL をもつ MSSA に *mecA* 遺伝子

(SCCmec) が挿入されたものと推測されている<sup>45)~48)</sup>。事実、SCCmec IV はほかの SCCmec 型より可動性に富むという報告がある<sup>49)</sup>。

しかし、いくつかの共通の特徴を有する CA-MRSA と HA-MRSA もあり、両者は同じ起源をもつのではないか、という報告もある<sup>50), 51)</sup>。現在日本で分離される院内感染型の MRSA は ST5 型である。しかし MRSA による院内感染が急増し深刻化した 1980 年代には、PVL 陽性の ST30 型あるいは PVL 陰性の ST81 型や ST239 型が主な菌のタイプだった可能性があり、最近になり PVL 陽性の ST30 型の菌株が日本でも分離された<sup>52)</sup>。加えて、PVL 陰性の ST8 型、ST88 型などの複数の ST 型の CA-MRSA はすでに広く分布しており、その多くの株は exfoliative toxin A, B (表皮はく離毒素, ETA, ETB) を産生し、とびひと関連しているという報告や、NICU に浸透していて新生児の SSSS に関与しているという報告がある<sup>52), 53)</sup>。

時代の流れとともにある地域に広がる支配クローンは変化していると考えられるが、このような変遷は一つの病院レベルでも観察されている。あるメキシコの病院では 1997 年には ST30 型のクローンが主であったが、2000 年には ST5 型が主となっていることが報告されている<sup>46)</sup>。また、スペインのある病院では、1998 年から 2002 年の間に ST247 型から ST36 型への変遷が見られている<sup>47)</sup>。このように MRSA は地域による違いに加え、市中から病院環境へ、病院環境から市中へ、と空間的な要素と時間的な要素を加味して循環あるいは変容しているものと考えられる。

*S. aureus* (MRSA を含む) は新しい毒素遺伝子や耐性遺伝子を手に入れ、絶えず変容していく。われわれが細菌学の分野で研究を始めてから三十数年を過ぎたが、この間に新しい病原菌や耐性菌が次々と生まれるのを見てきた。*S. aureus* も例外ではなく、30 年前は MRSA という言葉もなかったのである。生理用タンポン汚染による毒素ショックを起こした TSST-1 が発見されたのは 1981 年のことであり、そんなに昔のことではない。今後どのようなタイプの病原性をもった菌が出現するか、ダイナミックに変容する *S. aureus* の行く末を見届けたい気がする。そのためにも分子疫学による菌株の識別は重要である。また狭い範囲の院内感染の解析のためにも分子疫学の手法が必須であることは広く知られている。本稿で述べたように、これまで各種の分子疫学方法が開発されてきた。それらによってわれわれは世界的な菌株の比較から個々の病院内の感染経路を追うこともできるように

なった。分子疫学の方法としてはこれでもう十分な気がする。今後は新たな疫学方法の開発よりもすでに利用できる方法を用いて実際の菌株の解析を行い、データを蓄積していく必要がある。世界で行われている共通の方法を用いることにより、他の国からのデータと比較できる“共通の言葉”で議論していくことが必要であろう。

## 文 献

- 1) Jevons, M. P. 1961. "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. *British Med. J.* 1: 124-125.
- 2) 吉田 勇, 木村美司, 東山伊佐夫, 他. 2003. 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス—2000年分離グラム陽性球菌および嫌気性菌に対する抗菌力—. *日本化学療法学会雑誌* 51: 179-208.
- 3) 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.
- 4) Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 407-415.
- 5) Murchan, S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, et al. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1574-1585.
- 6) van Belkum, A., W. van Leeuwen, M. E. Kaufmann, et al. 1998. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1653-1659.
- 7) Deurenberg, R. H., C. Vink, S. Kalenic, et al. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 222-235.
- 8) Enright, M. C., B. G. Spratt. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7: 482-487.
- 9) Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, et al. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1008-1015.
- 10) Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, et al. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7687-7692.
- 11) Spratt, B. G., W. P. Hanage, B. Li, et al. 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species—the eBURST approach. *FEMS Microbiol. Lett.* 241: 129-134.
- 12) van Leeuwen, W. B., C. Jay, S. Shijders, et al. 2003. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3323-3326.
- 13) Frenay, H. M., A. E. Bunschoten, L. M. Schouls, et al. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 60-64.
- 14) Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery, et al. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3556-3563.
- 15) Kahl, B. C., A. Mellmann, S. Deiwick, et al. 2005. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 502-505.
- 16) Cookson, B. D., A. Robinson, A. B. Monk, et al. 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) —the HARMONY collection. *J. Clin. Microbiol.*, in press.
- 17) Oliveira, D. C., H. de Lencastre. 2002. 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.
- 18) Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, et al. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1323-1336.
- 19) Okuma, K., K. Iwakawa, J. D. Turnidge et al. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4289-4294.
- 20) Francois, P., G. Renzi, D. Pittet, et al. 2004. A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3309-3312.
- 21) Chung, M., G. Dickinson, H. de Lencastre, et al. 2004. International clones of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J. Clin. Microbiol.* 42: 542-547.
- 22) Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn et al. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1147-1152.
- 23) Oliveira, D. C., A. Tomasz, H. de Lencastre. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* 7: 349-361.
- 24) Ito, T., 2005. Genetics and evolution of hospital and community MRSA. Program and abstracts of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance; April 27-29, 2005; Seoul, Korea. Abstract G-2.
- 25) Aires de Sousa, M., J. D. Turnidge. 2005. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portugues hospitals and the community. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5150-5157.
- 26) Denis, O., A. Deplano, C. Nonhoff, et al. 2004. National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3625-3629.
- 27) Oliveira, D. C., A. Tomasz, H. de Lencastre. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* 2: 180-189.
- 28) Cox, R. A., C. Conquest, C. Mallaghan, et al. 1995. A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). *J. Hosp. Infect.* 00: 87-106.
- 29) Witte, W., M. Enright, F. J. Schmitz, et al. 2001. Characteristics of a new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA 15. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 677-682.
- 30) Chongtrakool, P., T. Ito, X. X. Ma., et al. 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1001-1012.
- 31) Adcock, P. M., P. Pastor, F. Medley, et al. 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. *J. Infect. Dis.* 178: 577-580.
- 32) CDC, 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48: 707-710.
- 33) Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, et al. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 279: 593-598.
- 34) Dufour, P., Y. Gillet, M. Bes, et al. 2002. 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.
- 35) Witte, W., C. Cuny, B. Strommenger, et al. 2004. emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. *Eur. Surveill.* 9: 16-18.
- 36) Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, et al. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 978-984.
- 37) Takizawa, Y., I. Taneike, S. Nakagawa, et al. 2005. 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.
- 38) Wannet, W. J., E. Spalburg, M. E. Heck, et al. 2005. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3341-3345.
- 39) Trindade, Pde. A., R. L. Pacheco, S. F. Costa, et al. 2005. Prevalence of SCC*mec* type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3435-3437.
- 40) Chung, M., G. Dickinson, H. De Lencastre, et al. 2004. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J. Clin. Microbiol.* 42: 542-547.
- 41) Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, et al. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 978-984.
- 42) Chambers, H. F., 2005. Community-associated MRSA—resistance and virulence converge. *N. Engl. J. Med.* 352: 1485-1487.



- 43) Witte, W., C. Braulke, C. Cuny, et al. 2005. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 1-5.
- 44) Hallin, M., O. Denis, A. Deplano, et al. 2007. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 465-472.
- 45) Taneike, I., T. Otsuka, S. Dohmae, et al. 2006. Molecular nature of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* derived from explosive nosocomial outbreaks of the 1980s in Japan. *FEBS Lett.* 580: 2323-2334.
- 46) Velazquez-Meza, M. E., M. Aires De Sousa, G. Echaniz-Aviles, et al. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997-2003): clonal evolution and impact of infection control. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3752-3757.
- 47) Perez-Roth, E., F. Lorenzo-Diaz, N. Batista, et al. 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during 5-year period (1998-2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4649-4656.
- 48) Naimi, T. S., K. H. LeDell, B. K. Como-Sabetti, et al. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 290: 2976-2984
- 49) Wielders, C. L., M. R. Vriens, S. Brisse, et al. 2001. *In-vivo* transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1674-1675.
- 50) Aires de Sousa, M., H. de Lencastre. 2003. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3806-3815.
- 51) Robinson D. A., A. M. Kearns, A. Holmes, et al. 2005. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 365: 1256-1258.
- 52) Takizawa, Y., I. Taneike, S. Nakagawa, et al. 2005. A Panton-Valentine leucocidin (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.
- 53) Yamaguchi, T., Y. Yokota, J. Terajima, et al. 2002. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *J. Infect. Dis.* 185: 1511-1516.

## Molecular Epidemiology of MRSA Based on MLST and Other Methods

Miki Nagao,<sup>1)</sup> Michio Ohta<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Laboratory and Department of Infection Control and Prevention, Kyoto University Hospital

<sup>2)</sup> Department of Bacteriology, Nagoya University School of Medicine

*Staphylococcus aureus*, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), is a leading cause of human diseases in the hospital setting as well as in the community, accounting for a wide variety of diseases. Because this pathogen can be a transient component of nose and skin flora of the human and easily transmits by contact, it is crucial to know its epidemiology to break a chain of infection. The advancement in molecular biology has led to the technological development of gene analysis, which has brought about a great breakthrough in the field of bacterial molecular epidemiology. The epidemiology of MRSA has been investigated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), *spa* typing and SCC*mec* typing. By combining these methods, interesting facts about the global distribution of MRSA and its evolution have been revealed. This review summarizes the outline of these epidemiologic methods and the latest molecular epidemiological knowledge about MRSA with emphasizing a focus on MLST.