

大学生におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の分布とその特徴

中畑千夏子¹⁾, 奥山茜¹⁾, 原田知恵¹⁾, 下沢英里子¹⁾, 村瀬麻亜沙¹⁾,
鍵谷ゆうこ¹⁾, 羽毛田真衣¹⁾, 丸山理沙¹⁾, 坂田憲昭¹⁾

【要 旨】 本研究では、地域間格差の少ないと考えられる成人集団として大学生を対象に、市中におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*: MRSE)の保有率とその薬剤耐性の状況、それらのSCC*mec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*)タイプについて検討した。その結果、MRSAの保有率は1.4%(146名中2名)であり、MRSEについては13.0%(146名中19名)であった。このことから、市中ではMRSAよりもMRSEの拡散が進んでいることが明らかとなった。また、耐性化についても表皮ブドウ球菌の進行が顕著であり、その割合は黄色ブドウ球菌のおよそ4倍であった。

分離されたMRSAおよびMRSEについて、薬剤感受性のパターンは様々であったが、一般に用いられる多くの抗菌薬に対して感受性を示す菌株が大多数であった。

SCC*mec*のタイプを調べたところ、2011年に分離されたMRSAおよびMRSEの10菌株では、その8菌株が市中で分離されるメチシリン耐性ブドウ球菌に多く見られるタイプIVを有していた。残り2菌株についてはタイプの特定ができなかった。

【キーワード】 ブドウ球菌, MRSA, MRSE, 薬剤耐性, SCC*mec*

序文

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)は、病院内感染の原因菌として知られてきた。医療現場では、このMRSAによる水平感染を予防するために、医療従事者における手指衛生の徹底、入院前のスクリーニング検査や保菌者の隔離等、様々な対策を講じ、その結果として近年では、入院患者から分離された黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に占めるMRSAの割合が徐々に減少する傾向にある(鈴木, 2013)。しかしな

がら、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(Japan nosocomial infection surveillance: JANIS)が2013年1月~12月に実施した、全国551医療機関を対象とする院内感染対策サーベイランスの全入院患者部門の調査結果では、新規に発生した薬剤耐性菌による感染症の起因为菌のうち、MRSAは93.7%と未だ圧倒的に多数を占めている(厚生労働省, 2014)。このことから、MRSAは依然として重要視しなければならない薬剤耐性菌であると言える。

MRSAについては病院内で発生する感染症の原因菌となる院内感染型のMRSA(healthcare-associated

¹⁾長野県看護大学
2014年10月16日受付
2015年 3月 9日受理

MRSA: HA-MRSA)が、これまでに広く知られてきた。しかし、米国において1980年代の終わり頃から、新たなタイプのMRSAが市中での感染症から分離されるようになってきた。いわゆる市中感染型MRSA(community-acquired MRSA: CA-MRSA)である(山本, 2013)。このブドウ球菌に関する報告は年々増加する傾向にあり、本邦においてもこのタイプのMRSAによる感染症が問題になりつつある(Yamamoto et al., 2010)。

CA-MRSAはHA-MRSAとは異なる特徴を有している。すなわち、HA-MRSAのリスクファクターが高齢者であるのに対し、CA-MRSAによる感染症では若年者に患者が多くみられている。また、HA-MRSAの皮膚・軟部組織からの分離頻度は約35%であるのに対して、CA-MRSAではそれが約75%にも達する。さらにCA-MRSAは、壊死性肺炎等の重篤な疾患の原因菌になることも知られている(石井, 2013)。

ヒトから分離されるブドウ球菌属菌には、黄色ブドウ球菌の他にコアグラゼ陰性ブドウ球菌(coagulase negative staphylococci: CNS)が挙げられる。CNSの中でも、その多くを占めているのが表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)である。この菌は*Saureus*と比較して、一般にビルレンスは低いとされているが、時に留置カテーテル等の医療デバイスを介した感染や、基礎疾患等を有する易感染患者における重篤な感染症などの原因菌となることが知られている。この菌についてもβラクタム系抗菌薬などへの耐性が報告されており、現在ではメチシリン耐性表皮ブドウ球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*: MRSE)として、臨床試料から分離されることも少なくない。更にはMRSAと同様に、この菌は市中においても分布しており、健康な人が保有していることも知られている。

ブドウ球菌におけるメチシリン耐性は、staphylococcal cassette chromosome *mec*(SCC*mec*)element の獲得による(Katayama et al., 2000)。その起源についての詳細は不明であるが、まずはCNSに持ち込まれ、それらの間で共有された後、*S. aureus*に水平伝播されたと考えられている(Tsubakishita et al., 2010)。実際にMRSEの保有するSCC*mec*は高度な多様性

をもち、MRSAのものと極めて高い相同性を有するSCC*mec*の存在も報告されている(Barbier et al., 2010; Whisplinghoff et al., 2003)。このことは、ヒトから分離される主要なCNSである*S. epidermidis*から*S. aureus*への伝播により、今後も新たなタイプの耐性菌が出現する可能性を示唆する。

こうしたことから、市中におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の疫学的な拡がり、薬剤耐性能の獲得状況及びその特性について把握することは、今後のブドウ球菌感染症に対する治療や感染管理において重要な情報を提供する。しかしながら、これに関する国内の研究は、その対象が小児に限定されており、それ以外の集団についての報告はみられない(Hisata et al., 2005; Jamaluddin et al., 2008)。この研究では、地域間格差の少ないと考えられる大学生の一集団を対象として、MRSAおよびヒトの主要なCNSであるMRSEの保有率および耐性化の状況と、それらが有するSCC*mec*のタイプについて検討した。

材料と方法

1. ブドウ球菌の分離および同定

この研究では、2011年から2012年にかけて、A大学の学生146名(年齢範囲: 19歳~39歳)の鼻腔内から分離された162株の*S. aureus*および*S. epidermidis*を研究の対象とした。

具体的には、対象者の鼻腔内スワブからソイビーンカゼインダイジェスト(SCD)寒天培地(栄研化学)によりコロニーを分離し、卵黄加マンニット食塩寒天培地上(栄研化学)に接種して、*Staphylococcus*属菌を選択した。卵黄加マンニット食塩寒天培地上で培地の黄変を認め、なおかつ卵黄反応のみられたコロニーを*Saureus*とし、培地の黄変を認めなかったものをCNSとして、それぞれを更にSCD寒天培地に接種し、37°Cで一昼夜培養することで分離菌株を得た。なお、これらの分離菌株については、グラム染色法によってグラム陽性球菌であることを確認した。

2. DNAの調製

分離菌からのDNAの抽出には、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems)

Table 1. Primers used for the identification of staphylococci*

Primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	Gene for primer	Expected size
mecA1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	<i>mecA</i>	553bp
mecA2	AGT TCT GCA GTA CCG GTA TTG C		
nucA1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	<i>nucA</i>	270bp
nucA2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
Se705-1	ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A	Se705	124bp
Se705-2	CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A		

*These primers were reported in the references. (Martineau et al., 1996 ; Louie et al., 2000)

を使用した。SCD寒天培地上の1~2コロニー（直径1~2 mm）を同試薬の1 mlに懸濁し、100℃で10分間の処理を行った。遠心分離(15000rpm, 5min)後に上清を分取し、分離菌のDNA溶液として-20℃で保存した。

3. 分離菌の同定

分離菌の同定には、*S. aureus*に特異的な遺伝子である*nucA*と、*S. epidermidis*の特異的なゲノムDNA領域であるSe705を検出の対象としたPCR法を用いた(Louie et al., 2000; Martineau et al., 1996)。その際、メチシリン耐性遺伝子(*mecA* 遺伝子)の保有の有無を調べることで、MRSAあるいはMRSEの判別も行った。DNAポリメラーゼにはHotStar *Taq*(QIAGEN),

プライマーには*mecA1*, *mecA2*, *nucA1*, *nucA2*, Se705-1およびSe705-2を用いた(Table1)。分離菌から得たDNA溶液を滅菌水にて20倍に希釈し、そのうちの5 μlを試料DNAとしてPCR反応に用いた。増幅反応は、95℃で1分(変性)、55℃で1分(アニーリング)、72℃で1分(伸長)の各ステップからなる反応を30サイクル繰り返し行った。アガロース電気泳動法による増幅産物の分析には、2.5% NuSieve3:1 Agarose(Lonza)を用いた。緩衝液はTris-acetate/EDTA(TAE)を使用し、アガロースゲルの染色にはSYBR Green I (Molecular Pross)を用いた。

4. 薬剤感受性試験

分離されたMRSAおよびMRSEのオキサシリン(OX)

Table 2. Primers used for SCC*mec* typing*

Primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	Gene for primer	Expected size (amplified region)
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i>	1963 bp(<i>mecA</i> - <i>mecI</i> for classA)
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	IS1272 in the upstream of <i>mecA</i>	2827 bp(<i>mecA</i> -IS1272 for classB)
IS2(iS-2)	TGAGGTTATTTCAGATATTTTCGATGT	IS431 in the upstream of <i>mecA</i>	804 bp(<i>mecA</i> -IS431 for classC)
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA	<i>mecA</i>	
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	286 bp (<i>mecA</i>)
mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	<i>mecA</i>	
α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	695 bp (<i>ccrA1</i> - <i>ccrB1</i>)
α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	937 bp (<i>ccrA2</i> - <i>ccrB2</i>)
α3	AGCTCAAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	1791 bp (<i>ccrA3</i> - <i>ccrB3</i>)
βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1</i> , <i>ccrB2</i> , <i>ccrB3</i>	
α4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	<i>ccrA4</i>	1287 bp (<i>ccrA4</i> - <i>ccrB4</i>)
β4.2	TTGCGACTCTCTTGGCGTTT	<i>ccrB4</i>	
γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i>	518 bp (<i>ccrC</i>)
γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>	

*These primers were reported in the reference. (Kondo et al., 2007)

に対する最小発育阻止

濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)は、E-test(シメックス・ピオメリュー)によって判定した。また、その他の抗菌薬についての薬剤感受性試験は、KBディスク(栄研化学)を用いたディスク拡散法により行った。

使用した抗菌薬は、ベンジルペニシリン(PCG)、セファゾリン(CEZ)、ノルフロキサシン(NFX)、ゲンタマイシン(GM)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、バンコマイシン(VCM)およびアンピシリン(ABPC)とした。

5. SCCmecのタイピング

SCCmecは、cassette chromosome recombinases (*ccr*) 遺伝子複合体と*mecA*遺伝子複合体によって構成される(Fig.1)。分離菌について、このSCCmecのタイプを決定するために、multiplex-PCR法による解析を行った(Kondo et al., 2007)。*ccr*遺伝子複合体の解析では、プライマーとしてmA1, mA2, α1, α2, α3, βc, α4.2, β4.2, γRおよびγFを使用し(Table 2.)、TKARAEX Taq HS(Takara Bio)を用いて増幅反応を行った。なおmA1とmA2は、陽性コントロールとしての*mecA*遺伝子を確認するためのプライマーとしてこの反応に用いた。反応は94℃で2分(変性)、57℃で1分(アニーリング)、72℃で2分(伸長)の各ステップを30サイクル繰り返し、増幅産物の解析は1.5%Seakem GTG Agarose (Lonza)を用いたアガロースゲル電気泳動法で行った。*mecA*遺伝子複合体のクラスを判定するためのPCRには、プライマーとしてml6, IS7, IS2(iS-2), mA7を用いた(Table 2.)。DNAポリメラーゼにはTKARAEX Taq HSを用い、増幅は94℃で2分(変性)、60℃で1分(アニーリング)、72℃で3分(伸長)のステップを35サイクル行った。アガロースゲル電気泳動とゲルの染色は、*ccr*遺伝子複合体の場合と同様に行った。なお、*mecA*遺伝子複合体と*ccr*遺伝子複合体における各プライマーの位置をFig.1に示した。

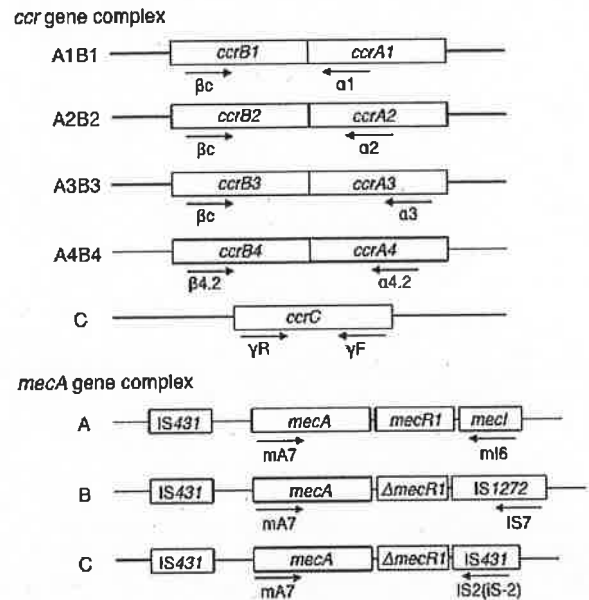


Figure 1. Schematic structures of *mecA* and *ccr* gene complex. The locations of PCR primers used for SCCmec typing are indicated by arrows.

6. 倫理的配慮

本研究は、長野県看護大学倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号：2011-07)。

結果

1. ブドウ球菌の分離およびメチシリン耐性の獲得状況

この研究では146名の大学生から得られた162株のブドウ球菌について、*nucA*遺伝子とSe705領域を指標として、*S. aureus*と*S. epidermidis*の同定を行い、*mecA*遺伝子の保有の有無からMRSAおよびMRSEを識別した。菌株は2011年と2012年に、それぞれ67名と79名から、各菌種について重複の無いように分離された(Table3)。*S. aureus*は2011年に24名(35.8%)、2012年では23名(29.1%)から計47株が分離された。そのうちMRSAについてはそれぞれの年で1名ずつ、総計146名中2名(1.4%)が保有していた。MRSEについては19名から分離され、その保有率は13.0%とMRSAのそれに対して9.3倍であった。また、*S. aureus*の中でMRSAの占める割合は4.3%であった。*S. epidermidis*についてはMRSEが18.3%を占め、*S. aureus*におけるMRSAの割合である4.3%よりも高い値を示した。このように、市中におけるメチシリン耐性菌株について

Table 3. Carriage of methicillin resistant staphylococci by individuals

Year of Sampling	Total number of individuals	Total number of isolates	Number of isolated strains (%)			
			MSSA*	MRSA	MSSE**	MRSE
2011	67	79	23 (34.3)	1(1.5)	39 (58.2)	9 (13.4)
2012	79	83	22 (27.8)	1(1.3)	46 (58.2)	10 (12.7)
Total	146	162	45 (30.8)	2 (1.4)	85 (58.2)	19 (13.0)

*MSSA: Methicillin susceptible Staphylococcus aureus

**MSSE: Methicillin susceptible Staphylococcus epidermidis

は、*S. epidermidis*が優位であり、MRSEがMRSAよりも広く分布していた。メチシリン耐性能の獲得についても*S. epidermidis*の進行は顕著であり、その割合は*S. aureus*の約4倍であった。また、各分離菌株の割合を試料採取年毎に比較すると、2年間ではほとんど差が見られなかった。

2. 薬剤感受性の状況

分離同定された2株のMRSAと19株のMRSEについて、各種抗菌薬に対する耐性能の獲得状況を把握するために薬剤感受性試験を実施した(Table 4)。MRSAのOXに対するMICは、11N2-9Aが8 μ g/ml、12N2-2Aでは64 μ g/mlであった。MRSEについては、0.19 μ g/mlから16 μ g/mlまでの様々なMICを有していた。全般的にMRSAのそれよりも低いものの、11N1-21Cと11N1-25Cについては、それぞれ16 μ g/mlおよび8 μ g/mlと、比較的高い値を示した。MRSAの判定基準はOXに対して4 μ g/ml以上のMICを有することであり、MRSEについてはその値が0.5 μ g/ml以上と規定されている(Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI, 2014)。3株のMRSE(11N1-21C, 11N1-25C, 11N2-16C)は、MRSAの基準に相当するMICを示した。MRSEであった12N2-22Cについては、*mecA*遺伝子を有するにもかかわらず、CLSIの判定基準である0.5 μ g/mlよりも低いMICを有していた。

ディスク拡散法により、PCG, ABPC, CEZ, VCM, NFX, GM, EM, TCに対する感受性を調べたところ、ペニシリン系薬であるPCGとABPCに対しては、MRSEの1株(12N2-22C)と2株(11N1-25C, 12N2-22C)がそれぞれに感受性を示し、これらを除く他のすべての菌株は耐性を有していた。CEZに

対してはMRSAの1株(12N2-2A)だけが耐性を示し、その他はすべて感受性であった。VCMに対しては、すべての分離菌が感受性であった。また、MRSAのうち、11N2-9AはPCG, NFX, ABPCに耐性を示したが、その他の対象薬剤に対しては感受性を示した。一方、12N2-2Aが感受性を示した薬剤はTCとVCMのみで、他の対象薬剤すべてに対して耐性であった。

MRSEでは、対象薬剤8種のうち、耐性を示したものが半数の4種にとどまる菌株がほとんどであったが、11N1-36CのようにCEZ, TC, VCM以外のすべてに耐性を示した菌株がみられた他、12N2-23CではCEZ, VCM以外のすべてに耐性を示したように、複数の薬剤に対して耐性能を持った菌株も含まれていた。

3. SCCmecタイプの同定

2011年に分離されたMRSA 1株とMRSE 9株について、multiplex-PCR法によりSCCmecタイプの同定を行った(Fig.2)。SCCmecのタイプはそれを構成している*ccr*遺伝子複合体のタイプと*mecA*遺伝子複合体のクラスとの組み合わせによって決定される(International working group, 2009)(Table 5)。*mec*遺伝子複合体の解析では、10株の分離菌のうち9株において、class Bに由来すると考えられる約2.8kbの増幅産物が得られた(Fig.2A)。MRSEである11N1-36Cでは、これまでに報告されている3種類のアレールに由来すると考えられる増幅産物は得られず、それらとは大きさの異なる約4kbのバンドが観察された(Fig.2A, lane 5)。*ccr*遺伝子複合体の増幅では、すべての菌株について*mecA*遺伝子に由来する約0.3 kbと*ccrA2B2*遺伝子に由来する約0.9 kbのそれぞれに相当するバンドがアガロースゲル上で観察された

Table 4. Antimicrobial susceptibility testing for the staphylococcal isolates

Isolation (year)	Strain	Staphylococci spp.	Oxacillin MIC (μg/ml)	Disk diffusion test							
				PCG	ABPC	CEZ	VCM	NFX	GM	EM	TC
2011	11N2-9A	MRSA	8	R	R	S	S	R	S	S	S
	11N1-19C	MRSE	2	R	R	S	S	S	S	R	S
	11N1-21C	MRSE	16	R	R	S	S	R	S	S	S
	11N1-25C	MRSE	8	R	S	S	S	S	S	S	S
	11N1-36C	MRSE	1	R	R	S	S	R	R	R	S
	11N2-8C	MRSE	2	R	R	S	S	S	S	R	S
	11N2-9C	MRSE	2	R	R	S	S	S	S	S	S
	11N2-16C	MRSE	4	R	R	S	S	S	R	S	R
	11N2-26C	MRSE	2	R	R	S	S	R	S	R	R
	11N2-27C	MRSE	2	R	R	S	S	S	S	S	S
2012	12N2-2A	MRSA	64	R	R	R	S	R	R	R	S
	12N1-21C	MRSE	1	R	R	S	S	S	S	R	S
	12N1-22C	MRSE	0.5	R	R	S	S	S	S	R	S
	12N1-23C	MRSE	3	R	R	S	S	R	S	S	S
	12N1-31C	MRSE	0.5	R	R	S	S	R	R	S	S
	12N2-16C	MRSE	1	R	R	S	S	S	S	S	S
	12N2-17C	MRSE	1.5	R	R	S	S	R	S	R	S
	12N2-22C	MRSE	0.19	S	S	S	S	S	S	R	S
	12N2-23C	MRSE	1.5	R	R	S	S	R	R	R	R
	12N2-34C	MRSE	0.5	R	R	S	S	R	R	S	S
	12N2-42C	MRSE	1.5	R	R	S	S	R	S	R	S

S:sensitive R:resistant

(Fig.2B). これら各菌株から得られた*mecA*遺伝子複合体および*ccr*遺伝子複合体のタイプの組み合わせから、MRSAである11N1-9AとMRSEの7菌株(11N1-19C, 11N1-21C, 11N1-25C, 11N2-8C, 11N2-16C, 11N2-26C, 11N2-27C)については、いずれもSCC*mec*タイプをIVと判定した。11N1-36Cについては、前述のように得られた増幅産物がこれまでに知られている3つのクラスの*mec*遺伝子複合体に由来するものとは考えられず、何れのタイプにも分類すること

ができなかった。11N2-9Cの*ccr*遺伝子複合体解析においては、*ccrA2B2*遺伝子に由来すると考えられる約0.9 kbのフラグメントが得られたが、その他に約0.5 kbの増幅産物も観察された(Fig.2B, lane 7)。これはおそらく*ccr*遺伝子のアレルのひとつである*ccrC*に由来するものと考えられた。このことは、この菌株の*ccr*遺伝子複合体上には2つのタイプが混在することを示しており、既知のSCC*mec*タイプに分類することができなかった。

Table 5. Classification of SCC*mec* elements *

SCC <i>mec</i> type	<i>ccr</i> gene complex	<i>mecA</i> gene complex
I	A1B1	B
II	A2B2	A
III	A3B3	A
IV	A2B2	B
V	C	C2
VI	A4B4	B
VII	C	C1
VIII	A4B4	A

*Types were defined with International Working Group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2009)

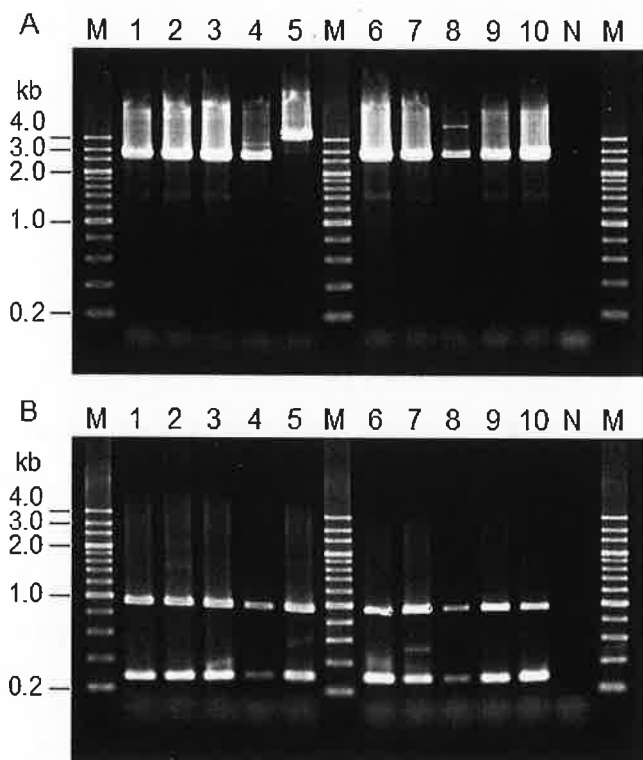


Figure.2 SCCmec multiplex PCR patterns of the isolated staphylococci. (A) and (B) are for identification of *mec* gene complex and *ccr* gene complex, respectively. Lane 1, 11-N2-9A; lane 2, 11-N1-19C; lane 3, 11-N1-21C; lane 4, 11-N1-25C; lane 5, 11-N1-36C; lane 6, 11-N2-8C; lane 7, 11-N2-9C; lane 8, 11-N2-16C; lane 9, 11-N2-26C; lane 10, 11-N2-27C; N, negative control. M, molecular size marker (in kb)

一方で、MRSEの保有率は13.0%であり、MRSAのそれを大きく上回っていた。このことから、小児を対象とした先行研究(Hisata et al.,2005, Jamaluddin et al.,2008)の結果と同様に、市中では成人の間においてもMRSAに比べ、MRSEがより拡散していることが考えられた。

CA-MRSAにおける薬剤感受性の特徴としては、OXに対する耐性度があまり高くないことと、一部はEMに耐性を示すものの、OXを除く多くの抗菌薬に対して感受性を有すること等が知られている(伊藤ら, 2004)。今回分離されたMRSAのうち、11N2-9AはOXに対するMICが $8\mu\text{g/ml}$ とそれほど高くはなく、それに加えてペニシリン系薬であるPCGおよびABPCと、ニューキノロン系薬であるNFXを除くその他の抗菌薬に対して感受性がみられた。このことは、前述したCA-MRSAの特徴と一致する。一方、12-N2-2AはOXに対してMICが $64\mu\text{g/ml}$ と、高い耐性を有していた。VCM, TCには感受性を示したものの、それ以外のすべての抗菌薬に耐性であったことから、この

菌株はHA-MRSAの可能性の高いことが考えられた。これについては、この菌株の保有者が検体提供の3日前まで病院における臨床実習に参加していたことから、この間にMRSAが定着した可能性も考えられた。この定着が一過性であるか、あるいは常在細菌叢の構成菌になりうるものを明らかにするためには、更に一定の期間をおいた長期的な保有状況の調査が必要である。

OXに対してMRSAの基準に相当するMICを示した3菌株のMRSE(11N1-21C, 11N1-25C, 11N2-16C)については、ディスク拡散法による薬剤感受性試験において、1~3種のペニシリン系抗菌薬あるいはニューキノロンに対して耐性を示したが、他のすべてには感受性であった。また、MRSEのうち、OXに対して基準値以下の低いMICを示した12N2-22Cについては、確かに*mecA*遺伝子を有しているにも関わらず、ペニシリン系薬やセフェム系薬などの β ラクタム系薬には感受性をもち、マクロライド系薬であるEMのみに耐性を示す結果となった。このようなPBP2' (Penicillin Binding Protein 2 prime)をコードする遺伝子の保有に相反するような、 β ラクタム系薬に対するMIC値を含めた耐性能の低さは、*mecA*遺伝子の発現制御系の関与によると思われる。このようにCA-MRSEでは、それらの薬剤耐性能のパターンは様々であるが、多くの抗菌薬の有効な菌株がその大半を占めていることが明らかとなった。その一方で、12N2-23Cは、OXに対するMICは $1.5\mu\text{g/ml}$ とそれほど高くはないものの、CEZ, VCM以外の一般的に用いられている抗菌薬の多くに耐性を有していた。このことから、ヒト常在細菌叢の主要な構成菌である*S. epidermidis*の多剤耐性化に関しても、*S. aureus*の場合と同じく、今後十分に把握していく必要があると考える。

2011年に分離されたMRSAの1菌株およびMRSEの9菌株に対するSCCmecのタイピングでは、11N1-36Cおよび11N2-9Cを除く8菌株において、*mecA*遺伝子複合体のタイプはclassBであり、*ccr*遺伝子複合体のタイプはA2B2であった(Fig.2)。このことから、これらのSCCmecのタイプをIVと判定した(Table6)。11N1-36Cについては、*ccr*遺伝子複合体のタイプはA2B2であったが、*mecA*遺伝子複合体の識別にお

Table 6. SCCmec types identified in the staphylococcal isolates

Strain	Staphylococci spp.	ccr type	mec class	SCCmec type
11N2-9A	MRSA	2 (A2B2)	B	IV
11N1-19C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N1-21C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N1-25C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N1-36C	MRSE	2 (A2B2)	Unidentified	NT*
11N2-8C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N2-9C	MRSE	2 (A2B2), 5C	B	NT*
11N2-16C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N2-26C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV
11N2-27C	MRSE	2 (A2B2)	B	IV

*NT, nontypeable

いて、未知の増幅産物が検出されたため、そのクラスを特定するには至らなかった。これについては塩基配列の解析を含めた今後の研究が必要と考える。

11N2-9Cについては、この菌株の*ccr*遺伝子複合体上にA2B2とCの2つのタイプが混在する可能性が示され、既知のいずれのSCCmecタイプにも分類することができなかった。MRSEについては、*ccr*遺伝子複合体に多くのバリエーションの存在することが知られており、11N2-9Cに見られるタイプをもつ菌株もいくつか報告されている(Zong et al. 2011; Ibrahim et al., 2009)。

SCCmecのタイプについてCA-MRSAでは、タイプIVが多いとされている(Jamaluddin et al., 2008)。本研究においては、MRSAおよびMRSEの分離菌株についても、10株中8株がタイプIVを有しており、タイプIIのようなHA-MRSAに多いとされるSCCmecは見られなかった。このことは、HA-MRSAの市中への拡散がそれほど進行していないことを示しているのかもしれない。

これまで、MRSAは医療従事者の手指を介して伝播するため、医療従事者の適切な手指衛生の実施によってこの伝播を断ち切ることが可能であると言われてきた(Boyce et al., 2002)。しかしながら、実際にはこの手指衛生を中心とした対策を講じてMRSAの水平感染をゼロにすることは至難の業であり、依然としてMRSAが医療関連感染の原因菌として最も重要な菌であることに変わりはない。

かつては病院等に入入りし、ケアや処置または治

療を受ける患者が、MRSAの保菌や感染症に対してリスクの高い集団とされていた。しかしながら近年では、市中においてCA-MRSAが拡がる傾向にあり、こういった従来のリスクを持たない健康人がMRSAの保菌者になる機会も増えつつある。したがって今後は、HA-MRSAのみならずCA-MRSAも含めた総合的な感染対策の対応が必要とされる(藤田, 2013)。

また一方で、MRSAに対する研究が多数あるにも関わらず、MRSEについてはあまり重要視されてこなかった。MRSEは比較的病原性が弱いものの、免疫力の低下した患者に対しては日和見感染の原因菌となる上に、健常者にとっても時に膀胱炎、心内膜炎、血管カテーテル感染症、皮膚軟部組織感染症などの原因菌となるため、病原菌として、決して軽視できるものではない。また、MRSAの薬剤耐性遺伝子が、ヒトの分離菌としてはMRSEがそのほとんどを占めるMR-CNSから伝播されているとも言われていることから(Jamaluddin et al., 2008)、MRSEの保菌状況や拡がりを把握する必要がある。

本研究では、対象を大学生の集団とした。今後さらに、対象者あるいは対象とするコミュニティを広げ、同様の検討を行うことによって、これらメチシリン耐性ブドウ球菌の市中及び病院内において伝播を予防する方策を確立する一助としたい。

文献

Barbier F., Ruppe E., Hernandez D., et al.(2010): Methicillin-resistant coagulase-negative

- staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis., 202, 270-281.
- Boyce J. M., Pittet D.,(2002): Healthcare infection Control Practices Advisory Committee; HICPAC/ SHEA/ APIC/ IDSA Hand Hygiene Task Force. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/ SHEA/ APIC/ IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/ Association for Professionals in Infection Control/ Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep, 51,1-45.
- Clinical and Laboratory Standards Institute(2014): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Hisata K., Kuwahara K.A., Yamamoto M., et al.(2005): Dissemination of Methicillin- resistant staphylococci among healthy Japanese children. J. Clin. Microbiol., 43(7), 3364-3372.
- 藤田直久(2013)：MRSAの院内感染対策（手指衛生、環境整備と保菌者の除菌に注目して）日本外科感染症学会雑誌10(3): 283~292.
- Ibrahem S., Salmenlinna S., Virolainen A., et al. (2009): Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCCmec types in long-term-care facility. J. Clin. Microbiol., 47, 32-37.
- International Working Group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2009): Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. Antimicrob. Agents Chemother., 53(12), 4961-4967.
- 伊藤輝代, 桑原京子, 久田研, 他3名(2004)：市中感染型MRSAの遺伝子構造と診断（最新の知見），感染症学雑誌, 78(6), 459-469.
- 石井良和(2013)：世界的視点で捉える耐性菌感染症の動向, 臨床と微生物, 40(3), 195-200.
- Jamaluddin T. Z. M. T., Kuwahara A.K., Hisata K., et al. (2008): Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among Healthy Japanese Children. J. Clin. Microbiol., 46(11), 3778-3783.
- Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. (2000): A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec. encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 44, 1549-1555.
- Kondo Y., Ito T., Ma X.X., et al. (2007): 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(1), 264-274.
- 厚生労働省／厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (2014.5.9)：全入院患者部門JANIS（一般向け）年報, 2014.9.30, <http://www.nih-janis.jp/report/zen.html>.
- Louie L., Matsumura S. O., Choi E., et al. (2000): Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., 38(6), 2170-2173.
- Martineau F., Picard F. J., Roy P. H., et al., (1996): Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*, J. Clin. Microbiol., 34(12), 2888-2893. *epidermidis*, J. Clin. Microbiol., 34(12), 2888-2893.
- 鈴木里和(2014)：日本の耐性菌の状況, Therapeutic Research, 35(3), 226-232.
- Tsubakishita S., Kuwahara-Arai K., Sasaki T., et al. (2010): Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother.,

54, 4351-4359.

Whisplinghoff H., Rosato A.E., Enright M.C., et al. (2003): Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3574-3579.

Yamamoto T., Nishiyama A., Takano T., et al. (2010): Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ; community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *J. Infect. Chemother.*, 16, 225-254.

山本達男(2013)：MRSA感染症，臨床と研究，90(12), 35-40.

Zong Z., Peng C., Lü X. (2011): Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *Plos One*, 6, 1-6.

【Original Article】

Dissemination of Methicillin-Resistant Staphylococci among Japanese College Students

Chikako Nakahata¹⁾, Akane Okuyama¹⁾, Chie Harada¹⁾, Eriko Shimosawa¹⁾,
Maasa Murase¹⁾, Yuko kagiya¹⁾, Mai Haketa¹⁾, Risa Maruyama¹⁾, Noriaki Sakata¹⁾

¹⁾Nagano College of Nursing

【Abstract】 We investigated staphylococcal strains isolated from college students of a Japanese community to evaluate the prevalence and characteristics of methicillin-resistant staphylococci. Of the 146 students examined, 2 (1.4%) and 19 (13.0%) were colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), respectively. These observations suggested that, compared with MRSA strains, MRSE strains were highly disseminated among Japanese college students. Moreover, these MRSE strains accounted for 18.3% of all isolated *S. epidermidis* strains, and 4.3% of *S. aureus* isolates possessed *mecA* gene that confers methicillin resistance in staphylococci. *S. epidermidis* was more predominant than *S. aureus* with regard to acquisition of the resistance gene. Antimicrobial susceptibility was tested by the disk diffusion method, and minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the E-test. The wide range of MICs, 0.19 to 64 µg/ml, was observed to oxacillin, and most of MRSE and MRSA strains were still susceptible to the various kinds of antibiotics used in this study.

To determine the clonal compositions of the MRSA and MRSE isolates, 10 strains were subjected to SCC*mec* PCR typing. Eight strains were found to harbor SCC*mec* type IV elements, although the other 2 strains were not classified. This type of the element appeared to be mainly distributed among the resistant staphylococci in the Japanese community studied.

【Keywords】 Staphylococci, MRSA, MRSE, antimicrobial susceptibility, SCC*mec*

中畑千夏子
〒399-4117
長野県駒ヶ根市赤穂1694番地
長野県看護大学
Tel: 0265-81-5165 Fax: 0265-81-5165
E-mail:chikako@nagano-nurs.ac.jp
Chikako Nakahata
NaganoPrefecture
Nagano College of Nursing
1694Akaho,Komagane,Nagano,399-4117JAPAN
TEL: +81-0265-81-5165 FAX: +81-0265-81-5165
E-mail:chikako@nagano-nurs.ac.jp

