

市中型 MRSA 感染症

¹⁾東京医科大学病院感染制御部, ²⁾東京医科大学微生物学講座, ³⁾同皮膚科学講座

中村 造¹⁾ 山口 哲央^{1,2)} 加藤 雪彦³⁾ 阿部名美子³⁾
林 和人³⁾ 前 賢一郎³⁾ 藤木 藍子³⁾ 坪井 良治³⁾
松本 哲哉^{1,2)}

30代 外国人女性

主訴：下肢の疼痛と痒み

既往歴：アトピー性皮膚炎. その他, 特になし.

現病歴：12月20日インド渡航中に両下肢の疼痛, かゆみ, 熱感, 腫脹が出現した. 23日現地の薬局で購入した抗菌薬を内服開始した(詳細不明). 27日症状の改善が乏しく現地の病院に入院となった. 入院後抗菌薬の経静脈投与を行い, その後, 症状が改善し経口の抗菌薬へ変更となり31日に退院となった. 翌年1月6日, 日本への帰国当日に, 再度かゆみが発生し, 日本への飛行機の中で両側下腿のかゆみが強くなり疼痛も加わるようになった. 1月8日, 当院の皮膚科外来に受診した.

生活歴：数年前に来日し, 以後, 日本に在住. 職業は英語教師. 飲酒歴なし, 喫煙歴なし

アレルギー歴はアトピー性皮膚炎以外になし. 常用薬なし.

初診時現症：血圧, 脈拍未測定, 発熱なし. 身長162.2cm, 体重95.3kg, BMI 37. 胸腹部は所見記載なし. 皮膚所見は両側下腿にくるみ大の硬結を伴う散在性の紅斑を認める. 紅斑は腫脹, 熱感があり, 中央部には滲出を認める. 同部位の排膿を試みたが, 内容物は吸引されず.

検査所見：血液検査：WBC 18900/ μ L (Neut 84.0%, Lym 7.4%, Mono 5.1%, Eos 2.2%), RBC 443×10^6 / μ L, Hb 12.8g/dL, Plt 40.9×10^4 / μ L, AST 17U/L, ALT 16U/L, LDH 247U/L, BUN 10.1mg/dL, Cre 0.53mg/dL, CPK 29U/L, Glu 124mg/dL, CRP 15.5mg/dL, RPR 陰性, TPLA 陰性, HBs Ag 陰性, HCV 抗体陰性, HIV 抗体陰性.

微生物検査：皮膚膿 グラム染色所見はグラム陽性球菌が1+, WBC 1+で貪食像は認めず. 培養結果は *Staphylococcus aureus* 2+ (感受性結果は Table 1 参照).

その後の外来経過：

初診時には, insect bite とそれに2次感染が起きていると判断され, cefazolin (CEZ) 2.0g/日の投与を行い, 連日外来通院することとなった. その後, 疼痛や発赤は徐々に改善傾向となった. 数日後, 培養結果(上記)が判明したが, CEZの投与で所見が改善していることから外来医は培養で判明したMRSA株は原因菌ではないと判断した. 治療開始7日目より cefditoren pivoxil (CFPN-PI) 1回100mg 1日3回の内服へ変更し下肢の症状は改善し, 合計14日間の治療で終了した.

しかし, 治療終了1週間ほど経過したところ, 上肢に症状が出現し発赤, 腫脹, 熱感を伴う紅斑が多数散在性に出現し, 1月28日再診となった.

再診時身体所見：血圧110/70mmHg, 脈拍78/min, 体温36.6°C, 胸腹部：特に異常なし

皮膚所見：両側前腕にくるみ大の硬結を伴う紅斑が散在. 中央部より滲出あり. 腫脹, 熱感を認め, 浮腫状. 圧迫すると中心部より膿を多量に排出した.

再診時検査所見：血液検査：WBC 17000/ μ L (Neut 84.6%, Lym 9.2%, Mono 5.0%, Eos 1.1%), RBC 432×10^6 / μ L, Hb 12.3g/dL, Plt 43.4×10^4 / μ L, AST 17U/L, ALT 12U/L, LDH 190U/L, BUN 12.7mg/dL, Cre 0.51mg/dL, CRP 17.3mg/dL

微生物検査：上肢前腕の皮膚膿 グラム染色ではグラム陽性球菌が1+, WBC 1+で貪食像は認めず. 同定結果は *aureus*. 菌量は2+. (感受性結果は Table 2 参照)

入院後経過：

入院後, MRSAによる多発皮下膿瘍と診断し経静脈的な vancomycin (VCM) 2g/日と fosfomycin

Table 1 下肢より検出された *Staphylococcus aureus* の感受性結果

薬剤	MIC	判定
MPIPC	> 2	R
ABPC	> 8	R
CEZ	< 4	R
CTM	< 4	R
CPR	< 2	R
IPM/CS	< 1	R
ABK	2	S
EM	> 4	R
CLDM	< 0.5	S
TEIC	< 2	S
VCM	< 2	S
LVFX	> 4	R
ST	< 2	S

MPIPC : oxacillin, ABPC : ampicillin, CEZ : ce-fazolin, CTM : cefotiam, CPR : cefpirome, IPM/CS : imipenem/cilastatin, ABK : arbek-acin, EM : erythromycin, CLDM : clinda-mycin, TEIC : teicoplanin, VCM : vancomycin, LVFX : levofloxacin, ST : sulfamethoxazole-trimethoprim

Table 2 上肢より検出された *Staphylococcus aureus* の感受性結果

薬剤	MIC	判定
MPIPC	> 2	R
ABPC	8	R
CEZ	< 4	R
CTM	< 4	R
CPR	< 2	R
IPM/CS	< 1	R
ABK	2	S
EM	> 4	R
CLDM	< 0.5	S
TEIC	< 2	S
VCM	< 2	S
LVFX	4	R
ST	< 2	S

Fig. 1 入院時の上肢感染部位

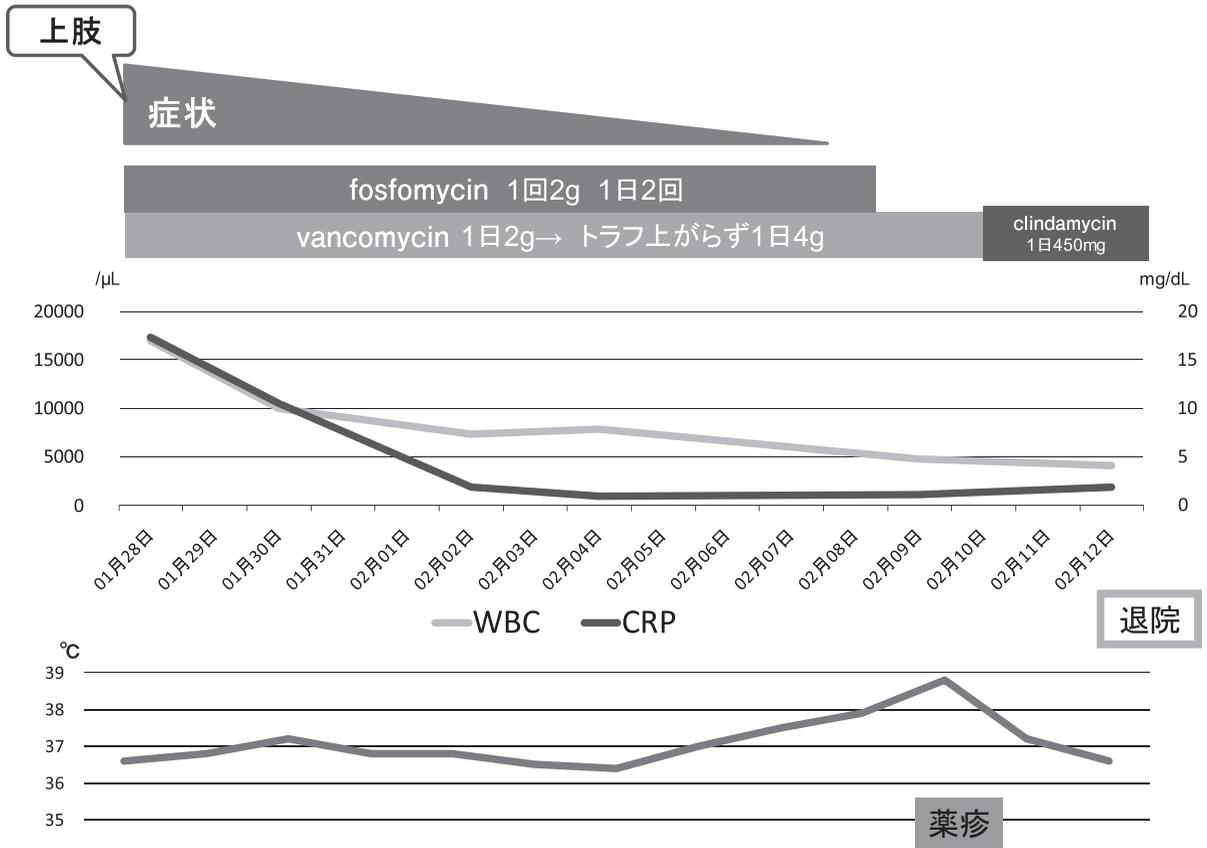


(FOM) 4g/日の投与を行った。VCMは血中濃度測定を行いトラフ 15 μ g/mLを目標とし治療開始3日目より4g/日へ増量した。その後、両側上肢前腕の皮膚所見は徐々に改善した。入院第5病日に左前腕が硬結となり切開したところ他の発赤部位と皮下で交通していたことが確認された。入院第10病日にVCMによる薬剤熱を認めたため、clindamycin (CLDM) 450mg/日へ変更し退院となった。外来でCLDM 14日間の内服治療を行った後、症状が消失し終診となった。治療期間は合計24日間行った。

(Fig. 2 参照)

健康成人に発症した難治性のMRSA皮膚感染症で、経過より市中感染型MRSA (Community-Associated MRSA : CA-MRSA) 感染症と診断した。CA-MRSAは、薬剤感受性が比較的保たれていることが特徴であり、分離されたMRSA株は多くの抗菌薬に感性であった。解析を進めたところ、SCCmec type V, PVL (+) であり、細菌学的にもCA-MRSAと判断した。最終的に市中感染型MRSAによる多発皮下腫瘍と診断した。

Fig. 2 入院後経過



“本症例の疑問点” から “研究的考察” へ

本症例は、黄色ブドウ球菌による皮膚感染症であり、外来診療では特に珍しいケースではない。ところが、健常人の黄色ブドウ球菌感染症にしては治療に難渋し、再発を繰り返した。解析の結果、community-associated MRSA (CA-MRSA) による感染症という結論に至ったわけであるが、一体 CA-MRSA とは何であるのか、hospital-associated MRSA (HA-MRSA) と比べ、具体的には何が異なるのか。“本症例の疑問点” から “研究的考察” まで、現在分かっていることを検討した。

1. CA-MRSA 感染症の細菌学的特徴は？

1) MRSA とは

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) は、メチシリンに代表されるβラクタム系抗菌薬に耐性を示す黄色ブドウ球菌である。メチシリン耐性遺伝子領域 (staphylococcal cassette chromosome *mec*:SCC*mec*) と呼ばれる DNA が存在し、この SCC*mec* 上に *mecA* 遺伝子を有する事で、メチシリン耐性を獲得している。多剤耐性であることが多く、院内感染症の主要原因菌のひとつである。

What is CA-MRSA?

Staph and MRSA can also cause illness in persons outside of hospitals and healthcare facilities. MRSA infections that are acquired by persons who have not been recently (within the past year) hospitalized or had a medical procedure (such as dialysis, surgery, catheters) are known as CA-MRSA infections. Staph or MRSA infections in the community are usually manifested as skin infections, such as pimples and boils, and occur in otherwise healthy people.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

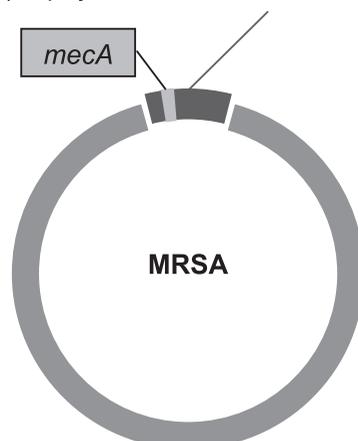
2) CA-MRSA

米国 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) では、CA-MRSA を「医療機関に関係なく健常人に感染した MRSA」と定めている。これが一般的な CA-MRSA の定義と考えるが、この定義は疫学的なもので細菌学的な特徴には触れられていない。近年 CA-MRSA の細菌学的特徴が明らかにされてきており、細菌学的な特徴から MRSA のタイプ分けがなされている。方法としては SCC*mec* typing をはじめ、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed field gel electrophoresis: PFGE) や、MLST (Multilocus sequence typing) などがある。SCC*mec* は二つの主要な遺伝子複合体 (*mec* 遺伝子複合体お

Fig. 1 MRSA とは

SCC*mec* 遺伝子

(staphylococcal cassette chromosome *mec*)



よび *ccr* 遺伝子複合体) から構成され、その組み合わせにより、現在では I 型から VIII 型まで type が分けられている (Table 1)¹⁾。CA-MRSA は SCC*mec* IV 型であることが多く、HA-MRSA の代表的なクローンである New York/Japan クローンは SCC*mec* II 型である。PFGE は染色体を制限酵素で切断し、その fragment の泳動パターンの違いで菌株の相同性を鑑別する方法であり、地域内での伝播や流行株の解析によく用いられる。米国 CDC は PFGE による MRSA のタイプ分けを行っているが、近年パルスフィールドタイプが USA300 (SCC*mec* IVa 型) の CA-MRSA が全米で急増しており、問題となっている²⁾。MLST は染色体上の 7 つの遺伝子の一定部分の塩基配列を基に sequence type を決定し、それを比較解析し相同性に基づき分類する。データベースが確立しており、世界中の菌株と比較する事が出来る。USA300 は ST8、New York/Japan clone は ST5 に分類されている (Table 2)。

Table 1 SCC*mec* typing¹⁾

SCC <i>mec</i> 型	<i>ccr</i> 遺伝子複合体	<i>mec</i> 遺伝子複合体
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A

Table 2 代表的な菌株のタイピング

菌株	PFTs	MLST	SCC <i>mec</i> typing	PVL
New York/Japan clone	USA100	ST5	II 型	-
米国流行株	USA300	ST8	IVa 型	+
MW2	USA400	ST1	IVa 型	+

Table 3 日本における CA-MRSA の疫学

	岡山	関西	宮城・京都・佐賀	新潟
疾患	癩	膿痂疹	健全児	膿痂疹
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	88	231/818 (28.2%)	84
MRSA	7/40 (17.5%)	45/88 (51.1%)	44/818 (5.4%)	16/84 (19%)
SCC <i>mec</i> IV 型	—	—	14/818 (1.7%)	7/84 (8.3%)
期間	1997年-2002年	1999年6月-1999年9月	2001年-2002年	2003年-2004年
引用	Yamasaki et al ⁸⁾	Yamaguchi et al ⁹⁾	Hisata et al ¹⁰⁾	Takizawa et al ¹¹⁾

2. CA-MRSA の病原因子は？

CA-MRSA は、致死性感染症を引き起こすことがあり、その病原因子に関しては様々な議論がなされてきた。未だ不明な点が多く存在するが、代表的なものを記載した。

1) Panton-Valentine口イコシジン (Panton-Valentine leukocidin : PVL)

PVL は黄色ブドウ球菌が産生する好中球溶解毒素の一種であり、重要な病原因子として注目されている³⁾。従来の HA-MRSA は PVL を産生しないことが多いが、CA-MRSA は PVL を産生することが多く、CA-MRSA の一つの特徴と考えられている。好中球に作用し、溶解・アポトーシスを引き起こし、好中球を破壊することで感染宿主の免疫力を下げ、病原性を発揮すると考えられている⁴⁾。動物実験の報告では PVL の病原性に関して意見が分かっているため結論は出ていないが、PVL は CA-MRSA の高病原性を説明する有力な候補のひとつである。

2) アルギニン代謝系可動性遺伝子構造 (ACME)

ACME (アルギニン代謝系可動性遺伝子構造) は現在米国で流行している USA300 の染色体上で初めて確認された。その機序としては、MRSA の接着や侵入を助けると考えられているが、現時点では詳細は不明である⁵⁾。

3) 細胞溶解ペプチド (cytolytic peptide)

細胞溶解ペプチドは全ての MRSA が産生するペプチドで、PSMs (phenol-soluble modulins) とも呼ばれる。CA-MRSA が PSMs を多量に分泌すると、菌の病原性を強め、病態に大きく影響するといわれている⁶⁾。

上記以外にも CA-MRSA 感染の病態に結び付く病原因子はいくつか報告されているが、本来、黄色ブドウ球菌は多数の病原因子を有する菌種であり、各病原因子の実際の病態への関与についてはまだ結論は出ていない。現時点ではこれらの病原因子がともに作用しあって、病原性を発揮していると考えられている。

3. 日本および欧米における CA-MRSA の疫学的特徴は？

1) 米国における CA-MRSA 調査

米国では、1990年代に USA400 と呼ばれる CA-MRSA が致死性肺炎を引き起こし話題となったが、現在は USA300 と呼ばれる CA-MRSA が全米各地で蔓延しており、問題となっている。米国で 2004 年に行われた調査では、皮膚・軟部組織感染症から検出された黄色ブドウ球菌のうち 78% が MRSA というものであり、驚くべきことに解析された MRSA のうち 97% がパルスフィールドタイ

プ：USA300 の同一クローンという結果であった²⁾。USA300 は SCCmec IVa 型、PVL 陽性の菌株で、基本的には皮膚疾患を中心に感染症を引き起こすが²⁷⁾、稀に壊死性肺炎に至り、この場合致死率は高い。

2) 日本における CA-MRSA 調査

日本においては CA-MRSA の現状を詳細に検討したデータは少ない。過去の疫学的な調査をまとめると、皮膚・軟部組織感染症から分離された黄色ブドウ球菌のうち、MRSA が占める割合は 17～51% であるが、結果に少々バラつきがある (Table 3)。地域性もあるため、全国的な疫学調査が望まれる。新潟の報告では、CA-MRSA のうち、SCCmec IV 型は 44%、PVL 陽性株は 1 株のみ (6%) ということであった。日本における CA-MRSA は皮膚・軟部組織感染症を引き起こすが、ほとんどが PVL 陰性である。MLST は ST89、ST91 であることが多く¹²⁾、米国の CA-MRSA (特に USA300) とは異なりこのタイプは病原性が強くないと考えられている。ただし、日本においても小児の致死性重症肺炎の報告があり、感染を引き起こした菌株は ST30、SCCmec IV 型、PVL 陽性であった。このタイプは病原性が高いと考えられ注意が必要である。CA-MRSA の中にも様々なタイプが存在することをしておく必要がある。

Table 4 CA-MRSA のリスクがある集団¹³⁾

Risk groups
小児 < 2 歳
運動選手 (特に接触するスポーツの競技者)
注射薬使用者
同性愛者
軍人
囚人
獣医、ペット所有者、養豚家
インフルエンザ感染後や重症肺炎後の患者
皮膚・軟部組織疾患を合併している患者
CA-MRSA 感染の既往がある
抗菌薬の使用歴 (特にキノロン系、マクロライド系) がある

4. 現場で CA-MRSA をどのように疑うか、診断するか？

1) 皮膚・軟部組織疾患

皮膚・軟部組織感染症を診療した場合、原因菌としては *S. aureus* や *Streptococcus pyogenes* を考える。ここで問題となるのは *S. aureus* が MSSA か MRSA かということだが、残念ながら症状から鑑別することは難しい。ただし、再発する、適切な治

Table 5 CA-MRSA 感染症に対する抗菌薬療法⁷⁾

	耐性化	Note
CLDM	3-24%	・主に皮膚・軟部組織感染に対して良好な治療成績を示している。 ・皮膚・軟部組織感染の原因菌を広くカバーしている。 ・D テストが必要 (EM が耐性の場合、誘導耐性が起こる可能性がある)
MINO	9-24%	・CA-MRSA に対してよく使用される。 ・A 群溶連菌に効かない
ST	0-10%	・皮膚・軟部組織 CA-MRSA 感染に対して内服療法が適している。 ・A 群溶連菌感染が疑われる際は他の抗菌薬を考慮。
RFP	< 1%	・他の有効薬剤と併用すべき。
LZD	< 1%	・皮膚・軟部組織感染、肺炎に適応がある。

CLDM: clindamycin, MINO: minocycline, ST: sulfametazole-trimethoprim, RFP: rifampicin, LZD: linezolid

療（ドレナージ、抗菌薬投与）に反応が悪い、過去に抗菌薬使用歴（特にキノロン、マクロライド）、家族内・スポーツチーム内での流行等があった場合は積極的にCA-MRSAを疑うべきである（Table 4）。

2) CA-MRSA の院内への浸透

院内にも、CA-MRSA が浸透している可能性は十分あるが、院内で分離されたMRSAをCA-MRSA由来のものと同定することは容易ではない。SCCmec IV型をCA-MRSAとして扱う分け方もあるが、必ずしもその分け方が菌の特徴を表しているとはいえない。SCCmec IV型ということだけで、病原性が強いとは言えず、薬剤感受性が良好なことを考えると、むしろ治療という意味では抗菌薬の選択肢が増える可能性もある。

5. CA-MRSA 感染症に対する抗菌薬療法は？

1) CA-MRSA の薬剤感受性

HA-MRSA とくらべ、薬剤感受性は良好であることがCA-MRSAの特徴であるが、近年、欧米ではCA-MRSAの耐性化が進んでいる。日本においてはペニシリン・セフェム系抗菌薬以外の薬剤は感受性良好であると言われてきたが、最近ではアミノグリコシドやキノロン系抗菌薬に耐性の菌株が分離されている。

2) CA-MRSA 感染症に対する抗菌薬療法

皮膚・軟部組織感染症の治療は、切開・ドレナージが基本である。CDCや英国のガイドラインでは、蜂窩織炎がある場合や治療抵抗性の場合には抗菌薬の投与が推奨されている¹³⁾。抗菌薬はclindamycin (CLDM)、minocyclin (MINO)、sulfamethazole-trimethoprim (ST) 合剤の投与が推奨されるが、深部感染症の場合は、linezolid (LZD) の投与や、vancomycin (VCM) とCLDMの併用が推奨されている。また、使用に際して注意が必要な点がある（Table 5）。一点目は、MINO、ST合剤は*S. pyogenes*に感受性がないため、皮膚・軟部組織感染症に対してエンピリック治療を行う際は選択すべきでないということ。もう一点は、薬剤感受性試験において、CLDM感受性であっても、erythromycin (EM) 耐性の場合、Dテストが必要であることである。

6. 欧米ではかなりの死亡例が出ているが、重症化要因は？

1) 米国における CA-MRSA 重症感染症

欧米におけるPVL陽性CA-MRSAによる死亡例は増加しつつある。致死的な疾患としては壊死性肺

炎と敗血症が挙げられる。米国においてはST1 (USA400, SCCmec IVa型)、ST8 (USA300, SCCmec IVa型)、欧州においてはST80, ST30、台湾においてはST59などが、壊死性肺炎や敗血症を引き起こしている。特に米国では、USA300 (SCCmec IVa型, PVL陽性) が蔓延しており、このような背景から、CDCではCA-MRSAを最も注意すべき感染症の一つとして挙げている。英国においては、米国の様なPVL陽性同一クローンの蔓延は進んでいないが、ガイドラインではCA-MRSA感染症を疑った際、PVL陽性か否かが治療方針を決める際のひとつの指標になっている。

2) 日本における CA-MRSA 重症感染症

日本においては2009年にPVL陽性CA-MRSAによる重症肺炎死亡例が報告されている¹⁴⁾。既往歴のない1歳4カ月の小児であり、本邦で初めての典型的なCA-MRSAによる死亡例であった。この菌株はST30, SCCmec IVa型であったが、その後もST30のCA-MRSAによる重症感染例が報告されている。このタイプのCA-MRSAは、日本において検出頻度の高いPVL陰性のCA-MRSAとは区別する必要があるかもしれない。今回の症例はインド帰りの感染例であった。インドにおいても同じSCCmec V型のCA-MRSA感染症例が報告されており、MLSTもST772で一致したため¹⁶⁾、輸入感染症の可能性が高い。USA300による輸入感染例も報告されている¹⁵⁾。今後、病原性の高い菌株が輸入され、広がる可能性もあるため、菌株の動向に関しては注意深く監視していく必要がある。臨床の現場で、難治性のMRSA感染症を診療した場合は、こうしたタイプのCA-MRSAが関与している可能性も考える必要があり、積極的に解析を進めるべきである。

7. 次に必要な、現場で実施できる臨床研究は？

- I. 日本におけるCA-MRSAの広がり？
- II. 国内で分離されるCA-MRSAの特徴は？
- III. 国内でのCA-MRSA感染症の病像は？
- IV. CA-MRSAの容易な鑑別法は？
- V. PVLの容易な検出法は？
- VI. CA-MRSA感染症に適した抗菌薬療法は？

文献

- 1) International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12): 4961-7.
- 2) Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med.* 2006; 355 (7): 666-74.
- 3) Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest.* 2007; 87 (1): 3-9.
- 4) Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 2005; 115 (11): 3117-27.
- 5) Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA 300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2008; 197 (11): 1523-30
- 6) Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med.* 2007; 13 (12): 1510-4.
- 7) Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* *Lancet.* 2010; 375 (9725): 1557-68
- 8) Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, et al. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin Infect Dis.* 2005; 40 (3): 381-5.
- 9) Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, Hayashi T, Aepfelbacher M, Ohara M, et al. 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.* 2002; 185 (10): 1511-6
- 10) Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (7): 3364-72.
- 11) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, et al. 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.* 2005; 43 (7): 3356-63.
- 12) Tatsuo Yamamoto, Akihito Nishiyama, Tomomi Takano, Shizuka Yabe, Wataru Higuchi, Olga Razvina and Da Shi. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *J Infect Chemother* DOI:10.1007/s10156-010-0045-9 (16.4 収録予定)
- 13) Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, et al. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61 (5): 976-94
- 14) Ito T, Iijima M, Fukushima T, Nonoyama M, Ishii M, Baranovich T, et al. Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (8): 1312-4
- 15) 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.* 2008; 14 (6): 439-41
- 16) Kulkarni GB, Pal PK, Veena Kumari HB, Goyal M, Kovoov JM, Nadig S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pyomyositis with myelitis: A rare occurrence with diverse presentation. *Neurol India.* 2009; 57 (5): 653-6

市中感染型 MRSA の遺伝子構造と診断（最新の知見）

順天堂大学医学部細菌学教室

伊藤 輝代 桑原 京子 久田 研
大熊 慶湖 崔 龍洙 平松 啓一

はじめに

1961年にイギリスで MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) が報告されて以来、MRSA は院内感染の原因菌として知られてきた。しかし、1981年に米国の CDC が初めて院内感染でない MRSA (community-acquired MRSA) による感染症を報告して以来、病院外の感染症例でも MRSA が分離されることが諸外国でも日本でも数多く報告されるようになってきた。とりわけ、1999年に CDC から4例の community-acquired MRSA による死亡例が報告されるに及んで重大な問題として取り組まれるようになった。

市中感染症から MRSA が分離される状況は、病院内に蔓延している MRSA が患者や医療従事者により、病院外へ持ち出された結果であるとも当初は考えられた。しかし、我々が、分離された MRSA を統計学的、分子遺伝学的に解析した結果、市中に蔓延する MRSA の多くが、病院で院内感染の原因となっている MRSA とは由来を異にする MRSA であることが、明らかとなった。ここでは、community-acquired MRSA に関するこれまでの知見と MRSA クローンの分子遺伝学的解析法に関して述べる。

1. 市中に存在する MRSA

MRSA が市中感染症患者から分離されるようになって以来、入院患者や医療関係者及び医療施設から分離される MRSA を Hospital-associated MRSA あるいは Health-care associated MRSA (H-MRSA) と呼び、市中感染症患者や健康人から分離され、かつ病院に蔓延する MRSA の感染を受けるリスクファクターのないものを Community-

acquired MRSA あるいは Community-associated MRSA (C-MRSA) と区別して呼ぶようになった。

先に述べたように、Community-acquired MRSA という用語は1981年に CDC の発行する MMWR (morbidity and mortality weekly report) の報告の中で用いられたのが最初である¹⁾。その報告では1980年7月から12月までの間にミシガン州、デトロイトの病院で外来患者から多数の黄色ブドウ球菌が分離され、そのうちおよそ1/4が MRSA であったこと、MRSA の分離された患者98人中96人はヘロイン使用者であったこと、98人中83人の MRSA のファージ型別を行ったところ、70株は同じファージタイプ (29/52/80) に属したことから、同一の MRSA クローンがヘロイン使用者の間に伝播したと推察されたことなどが述べられている。

その後、1990年代になると、Table 1 に示すように市中での MRSA 感染症に関する報告は徐々に増加し、ラグビー²⁾、レスリングの選手の間で MRSA が伝播した例³⁾、刑務所内での MRSA 感染症の集団発生⁴⁾、MRSA による食中毒⁵⁾などが報告されるようになった。

1999年の11月以来、ミシシッピ州立刑務所で31名の受刑者が MRSA による皮膚及び軟部組織感染症にかかったことが判明した。そこで、1,757名の受刑者を対象として MRSA の保菌状況を検査したところ、86名 (4.9%) が MRSA carrier であることが判明したこと、更に59名の受刑者から分離された MRSA のうち、41株を検討したところ、40株 (98%) がと同一の薬剤感受性パターン [gentamicin, rifampin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin, vancomycin, chloramphenicol に感受性] を示し、Pulsed Field Gel

別刷請求先：(〒113-8421) 東京都文京区本郷 2-1-1
順天堂大学細菌学教室 伊藤 輝代

平成16年6月20日

Table 1 Reports of C-MRSA and outbreaks of MRSA infection in the community

Reported year	Country	description	isolated from	references
1981	U.S.A.	The first reported outbreak of C-MRSA infection	invasive disease	(1)
1992	U.K.	A symptomatic carriage of MRSA in Adults	Nares	(7)
1995	U.S.A.	C-MRSA strains isolated at Hospital in Texas	skin and soft tissue infections etc.	(8)
1998	U.K.	An outbreak of MRSA infection in a rugby football team	cutaneous infection	(2)
1998	U.S.A.	C-MRSA transmission in a family	abscess	(9)
1998	Australia	C-MRSA strains isolated in a northern Australian hospital	skin infection etc.	(10)
1998	U.S.A.	C-MRSA in two child care centers	Nares and axilla	(11)
1998	U.S.A.	C-MRSA strains isolated from children of MRSA infections at Hospital in Chicago	skin and soft tissue infections etc.	(12)
1999	U.S.A.	A symptomatic carriage of MRSA in children	Nares and perineum	(13)
1999	U.S.A.	Four pediatric deaths from C-MRSA-Minnesota and North Dakota	fatal cases with C-MRSA infection	(14)
1999	Australia	C-MRSA strain involved in a hospital outbreak	nostrils, throat, finger webs, and any skin lesions	(6)
2000	U.S.A.	Prevalence of MRSA in the community	Nares	(15)
2000	U.S.A.	C-MRSA strains isolated at a tertiary care pediatric facility	clinical isolates	(16)
2000	Saudi Arabia	Nasal carriage of MRSA from hospital and non-hospital personnel in Abha	Nares	(17)
2000	Australia	community acquisition of gentamicin-sensitive MRSA in southeast Queensland, Australia	clinical isolates	(18)
2001	U.S.A.	C-MRSA infection in a state prison-Mississippi	skin or soft tissue infections	(4)
2001	U.S.A.	C-MRSA in a rural American Indian community	skin and soft tissue infections etc	(19)
2001	U.S.A.	C-MRSA strains isolated in Minnesota	abscess and superficial infections etc.	(20)
2002	U.S.A.	An outbreak of foodborn illness caused by MRSA		(5)

Electrophoresis (PFGE) の banding pattern は genotype [A] 24 株 (59%), genotype [B] 7 株 (17%), genotype [C] 4 株 (10%) と三つのパターンが主要であったため, MRSA の所内感染が推察されている⁴⁾.

また, 病院に蔓延する MRSA が市中に流出したのではなく, ある地域の住民の保有する MRSA が病院に持ち込まれ, 院内感染の原因となった西オーストラリアからの報告もある. 西オーストラリアは, MRSA に対するサーベイランスと制御プログラムを徹底して行った結果, MRSA の院内感染が非常に少ない地域である. その西オーストラリアのある病院で発生した MRSA の院内感染を検討した結果, ただ一つのクローンによっておこったことが判明し, その MRSA は, すでに感染していた患者により持ち込まれたのであろうと推定された. そこで, 病院の近隣の患者の居住地域の住民の協力により, 二つの地域の住民の MRSA の保有状況を調べた所, 非常に驚くべきことに,

一つの地域では 43 人中 18 人 (42%), もう一つの地域では 74 人中 18 人 (24%) の住民が MRSA を保有していた. これらの分離された MRSA の薬剤感受性, plasmid の保有状況, PFGE パターンを比較したところ, 一つの地域から分離された MRSA の 39% 及びもう一つの地域から分離された MRSA の 17% が, 病院から分離された株と殆ど同じであり, 市中で生息していた MRSA が病院内に持ち込まれ, 院内感染の起因菌となったことが推定されている⁶⁾. Table 1 に示すように C-MRSA に関する報告はアメリカ及びオーストラリアが多いが中国, フランス, 日本からも報告されている. Eady らの総説にこれらが詳しくまとめられているので, 参照されたい²¹⁾.

2. C-MRSA と H-MRSA の区別

市中で起こった MRSA 感染症の場合でも, 外来患者由来の MRSA でも, 入院歴のある患者が市中に持ち出すなど, H-MRSA が市中に流出した可能性も考えられる. そこで, 疫学的手法を用いて,

これまでに確立されている院内感染の起原因菌である H-MRSA に感染するリスクファクターを適用し、H-MRSA 感染のリスクファクターに該当するものが無いものが C-MRSA とされた^{7)8)11)15)~17)20)22)}。その理由は、H-MRSA のリスクファクターに相当するものが C-MRSA の場合には定義できないと判断されたからである。Naimi らは次のような患者から分離されたものを H-MRSA とし、これにあてはまらないものを C-MRSA としている²³⁾。

(1) 入院後、48 時間以後に分離された MRSA

(2) MRSA が検出された 1 年以内に入院、手術、人工透析、長期療養施設に滞在したことがある。

(3) MRSA 検出時にカテーテルなどの医療器具を体腔内に留置している。

(4) 検査時以前に MRSA が検出されたことがある。

これらのリスクファクターの定義は研究者により若干異なり、これまでの報告で C-MRSA として報告されているものが、必ずしも同じ基準ではないが²²⁾、Table 1 にあげた多くの C-MRSA に関する報告では上記に類似した定義を用いて C-MRSA と H-MRSA を区別している。

3. C-MRSA の特徴

C-MRSA は以下のような特徴をもつ MRSA であると指摘されている^{21)23)~25)}。

(1) オキサシリンに耐性を示すが、その耐性度は高くなく、多くはヘテロ耐性を示す。

(2) 1 部にエリスロマイシンに耐性を示すものもあるが、オキサシリン以外のほとんどの薬剤に感受性である。

(3) 小児から多く分離される。

(4) 皮膚および軟部組織感染症から多く分離される。

(5) C-MRSA には Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) を持つ株が多く時に重篤な感染症を起こす。

(6) C-MRSA は H-MRSA と異なる Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) を持つ。

(1) から (4) までの特徴は 1999 年までの

平成16年6月20日

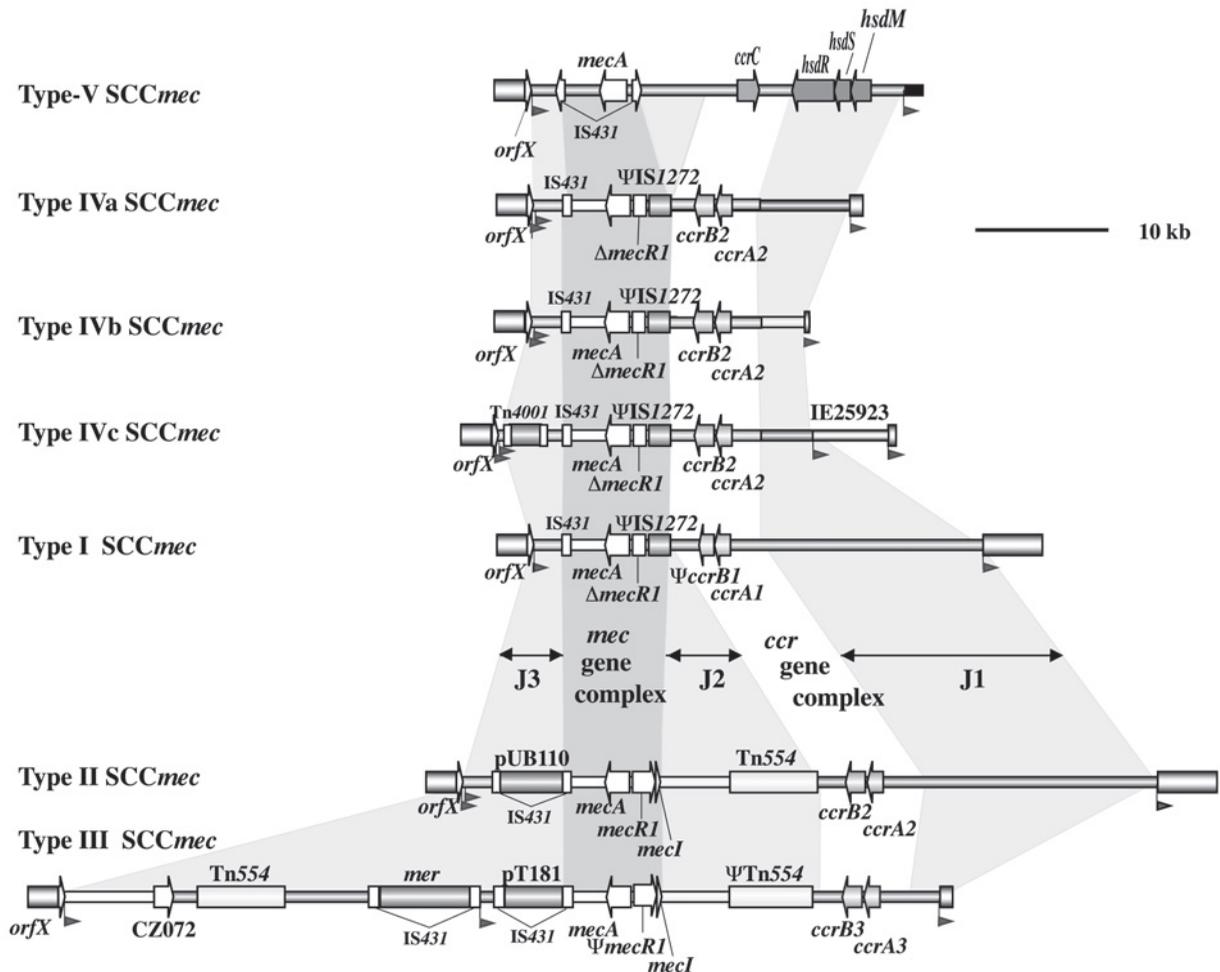
C-MRSA に関する報告でもすでに述べられていた特徴であったが (5) 及び (6) の特徴は、当教室の研究で見出された事実に基づいており、とりわけ (6) は MRSA を分子遺伝学的に区別する重要な特徴である。

1999 年に CDC はミネソタ州と北ダコタ州の 4 人の子供 (7 歳, 12 カ月, 16 カ月, 13 歳) が、病院外で MRSA 感染症にかかり、入院後 5 週間以内に死亡したことを報告した¹⁴⁾。MW 2 株はそのうちの一人、北ダコタ州に住む 16 カ月のアメリカインディアンの幼女が MRSA 感染症により死亡した直後に採取された血液から分離された株である。その幼女は高熱 (40.6°C)、痙攣、びまん性点状出血斑を示す状態で病院に運ばれ、セフトリアキソンの治療を受けたが、呼吸困難になり、病院に運ばれて後 2 時間を経ずして死亡した。MW 2 株は、強毒な病原因子として白血球溶解酵素である Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) 遺伝子及び collagen-binding protein 遺伝子 (*cna*) を持つことが当教室の MW2 の全ゲノム配列決定の結果明らかとなった²⁶⁾。

SCC*mec* はメチシリン耐性をコードする動く遺伝因子である^{27)~29)}。SCC*mec* の獲得により MRSA となったメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (methicillin-susceptible *S. aureus*; MSSA) には、いくつかの種類があり、また SCC*mec* にもいくつかのアロタイプ (allotype) が存在するので、MRSA のゲノタイプ (遺伝型 clone genotype; clonotype) は、SCC*mec* の allotype と、その染色体の genotype の組合せによって定義される (Fig. 1)。我々は最初にシカゴ大学で分離された C-MRSA2 株の SCC*mec* の全塩基配列を決定し、C-MRSA は新しいタイプの SCC*mec* type-IV を持つことを見出した³⁰⁾。2 株の type-IV SCC*mec* は異なる J-region を持つ株であり、その違いにより更に二つのサブタイプ (subtype a, b) に分類された。MW2 株も type-IV a SCC*mec* を持つ株であった。更に、アメリカで分離された C-MRSA 及びオーストラリアで分離された C-MRSA/NORSA (non-multiresistant oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*) の SCC*mec* のタイプを検討し、これら

Fig. 1 Structures of five types of *SCCmec*.

The structures of *SCCmec* are illustrated based on the nucleotide sequences deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession no. AB033763 (type-I *SCCmec*), D86934 (type-II *SCCmec*), AB037671 (type-III *SCCmec*), AB063172 (type-IVa *SCCmec*), AB063173 (type-IVb *SCCmec*), AB096217 (type-IVc *SCCmec*) and AB121219 (type-V *SCCmec*). *SCCmec* elements are integrated in *orfX* at its 3'-end. *SCCmec* are composed of two essential gene complexes, the *ccr* gene complex and the *mec* gene complex. *Ccr* gene complexes is composed of *ccr* genes which are responsible for the mobility of *SCCmec* and some *orfs* surrounding them. *Mec* gene complex is responsible for β -lactam resistance. Other areas of the *SCCmec* are non-essential, and are divided into three regions, J1-3. Various drug resistance genes are found within the J2 and J3 region of some *SCCmec* element. Some *orfs* specific for each type are found within the J1 region, such as *pls* in type-I *SCCmec* or *kdp* operon in type-II *SCCmec*. Type-IV *SCCmec* is mostly composed of essential gene complexes. The sizes of J1 which is distinct from those of other *SCCmec* types as well as other subtypes each other is very small, and J2 region is not found in it. The very short sizes of J region make the size of type-IV *SCCmec* small one. Arrow heads indicate the direct repeat sequences found at the end of *orfX* and the right extremity of *SCCmec* elements. Two direct repeat sequences, which are 102 bases apart from each other, are found in the right extremity of type-II and type-IV *SCCmec* elements. The left extremity sequences (from *orfX* to IS431) carrying restriction enzymes *mcrB* in it are almost identical between type-I, type-II, and type-IV *SCCmec* elements.



の株は type-IV *SCCmec* あるいは type-V *SCCmec* を持つ株であることを報告した^{31),32)}.

Naimi らは、ミネソタ州の 12 施設の 1,100 例の

MRSA 感染症から分離された株を、先に述べた規定に基づいて H-MRSA と C-MRSA とに分類し、その諸特徴を比較する大規模な疫学調査を行っ

Table 2 Exotoxin Genes and Gene Alleles Among Community-Associated and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates

Gene Sequence	Community-Associated (N=26)	No. (%) of Cases With Gene Sequence Health Care-Associated (N=26)	Odds Ratio (95% Confidence Interval)
Exotoxin Gene			
β -Hemolysin	2 (8)	0	Undefined
γ Hemolysin variant	25 (96)	26 (100)	0 (0-1.00)
Leukocidin E-D	24 (92)	26 (100)	0 (0-1.00)
PVL	20 (77)	1 (4)	5.01 (3.49-5.25)
sea	15 (58)	1 (4)	3.03 (2.03-3.22)
seb	6 (23)	1 (4)	3.35 (0.80-5.14)
sec	13 (50)	0	Undefined
sed	5 (19)	14 (54)	0.41 (0.13-0.93)
seg	5 (19)	25 (96)	0.17 (0-0.67)
seh	17 (65)	1 (4)	3.63 (2.47-3.84)
sei	5 (19)	25 (96)	0.17 (0-0.67)
sej	5 (19)	14 (54)	0.41 (0.13-0.93)
sek	16 (62)	0	Undefined
sem	5 (19)	25 (96)	0.17 (0-0.67)
sen	5 (19)	25 (96)	0.17 (0-0.67)
seo	5 (19)	25 (96)	0.17 (0-0.67)
Gene Allele			
agr2	4 (15)	25 (96)	0.20 (0-0.67)
agr3	17 (65)	1 (4)	3.63 (2.47-3.84)
SCCmec II	3 (12)	21 (81)	0.14 (0-0.53)
SCCmec IV	22 (85)	3 (12)	5.87 (3.67-6.55)

Abbreviations : agr, accessory gene regulator ; PVL, Panton Valentine leukocidins ; SCC, Staphylococcal chromosomal cassette ; se, Staphylococcal enterotoxin

The corrected odds ratio of being associated with community-associated vs health care associated case isolates.

(The quotation of the table was kindly permitted by Dr. Naimi)

た。その結果、C-MRSA は先に述べた特徴のほとんど備えていることを示しており、結論として H-MRSA とは由来の異なる MRSA であると思われると述べている。Table 2 には彼らの調査した C-MRSA と H-MRSA の保有する毒素遺伝子及び SCCmec のアロタイプの比較を示す。C-MRSA の場合 Type-IV SCCmec を持つ株が 85% であり、PVL 遺伝子の保有率は 77% であった²³⁾。

Enright らは MLST (Multi Locus Sequence Typing) により MRSA の genotype を決定し、世界各地から分離された MRSA 912 株と調べた結果、11 の主要なクローンがあることを報告した³³⁾。また Oliveira らは、MRSA 3,000 株を調べた結果、その内の 70% は 5 つのクローンで占められることを報告した³⁴⁾。これに対して、我々は MLST により C-MRSA の genotype を決定した

結果、C-MRSA は H-MRSA とは異なりきわめて多様な genotype を持ち、その多様性のレベルは一般健康人が常在菌として保有する MSSA の多様性に匹敵することを見出した³¹⁾³⁵⁾。このことは、C-MRSA の増加という現象は、多様な遺伝型を持つ一般人の常在 MSSA が type-IV, V などの “promiscuous” SCCmec により広範に MRSA に転換されつつあることを示唆している³⁶⁾³⁷⁾。

4. 日本の MRSA

日本の H-MRSA の SCCmec のタイプを調べてみると 1999 年に日本の 14 施設から分与された MRSA 138 株の 91% が type II SCCmec を持つ株であった。これに対して日本で MRSA 問題となってきた初期の MRSA には type IV SCCmec を持つ株が多く、しかも PVL を持つ株がかなりな程度存在することが判明している (Main prepara-

Table 3 Carriage of MRSA and MRC-NS among the children in Japanese community

	No (%) . of children				
	Miyagi		Kyoto	Saga	total
	1 st	2 nd			
screened	362	294	150	250	1,056
carrying					
<i>S.aureus</i>	133 (36.7)	68 (23.1)	28 (18.7)	58 (23.2)	287 (27.1)
MRSA	19 (5.2)	11 (3.7)	6 (4.0)	8 (3.2)	44 (4.2)
MRC-NS ^{a)}	144 (39.7)	71 (24.1)	29 (19.3)	38 (15.2)	282 (26.7)
MRSE ^{b)}	115 (31.8)	58 (19.7)	11 (7.3)	18 (7.2)	202 (19.1)

a) MRC-NS ; methicillin resistant coagulase-negative staphylococci

b) MRSE ; methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*

Table 4 SCCmec types of MRC-NS isolated from community

Species identified	No. of isolates	No. of strains carrying SCC mec elements						
		I	a	b	c	nt	NT	
<i>S.auricularis</i>	n=1	1						
<i>S.capitis</i>	n=4		2	1				1
<i>S.caprae</i>	n=6			1			2	1
<i>S.cohnii</i>	n=6	1						5
<i>S.delphini</i>	n=1						1	
<i>S.epidermidis</i>	n=202	2	6	6	133	8	22	1
<i>S.haemolyticus</i>	n=16		3		2	3	1	3
<i>S.hominis</i>	n=6		1		1	1		3
<i>S.saprophyticus</i>	n=15		1	3		1		10
<i>S.sciuri</i>	n=2							2
<i>S.simulans</i>	n=6		1				1	4
<i>S.warneri</i>	n=16				5	2	1	8
<i>S.xylosus</i>	n=1				1			
total	n=282	2	14	11	144	1	14	28
								5
								63

NT, non typable

tion). このことは、病院に蔓延する MRSA にも変遷があり、1980 年代初期の PVL 遺伝子を保有し type-I 及び type-IV SCCmec をもつ MRSA から、多くの薬剤耐性遺伝子を保有する type-II SCCmec を持つ現在の病院に蔓延する MRSA に置き換わっていったことを示している。

病院外での黄色ブドウ球菌感染症からも MRSA が分離されている。Yamaguchi らは、とびひ患者由来の *S. aureus* の疫学調査を行った際に、その中の 51.1% が MRSA であったと報告している³⁸⁾。当教室では 6 カ所の保育園, 2 カ所の幼稚園

の子供を対象に MRSA 及び methicillin resistant coagulase-negative staphylococci (MRC-NS) の保有状況の調査を行ったところ、健康な子供でも MRSA を保有していることを確認した (Hisata in preparation)。調査した子供の 1,056 名中 44 名 (4.2%) が MRSA を 282 名 (26.7%) が MRC-NS を保有していた (Table 3)。MRSA の SCCmec は II が 29 株, IV が 14 株であった。SCCmec は J-region の違いで更に幾つかのサブタイプに分類される。29 株の type-II SCCmec のサブタイプを調べたところ、type-IIa SCCmec (Fig. 1 に示す

Table 5 Primers used for typing of SCC_{mec} elements

Genes	primer names	Nucleotide sequence (5' → 3')	Primer position	Sizes of amplified DNA fragment (kb)
<i>mecA</i>	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	0.28
	mA2	AACGTTGTAACCCACCCAAGA	<i>mecA</i>	
<i>ccr</i> gene complex for <i>ccr1</i> , 2, and 3				
<i>ccrB</i>	βc (β2)	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	all types of <i>ccrB</i>	
<i>ccr1</i>	α1 (α2)	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	type1 : 0.7
<i>ccr2</i>	α2 (α3)	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	type2 : 1
<i>ccr3</i>	α3 (α4)	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	type3 : 1.6
for <i>ccrC</i>				
<i>ccrC</i>	γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i>	0.52
	γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>	
<i>mec</i> gene complex				
<i>mecI-mecR1</i> (class-A)	mI4	CAAGTGAATTGAAACCGCCT	<i>mecI</i>	1.9
	mcR3	ATCTCCACGTTAATTCCATT	<i>mecR1</i> (MS domain)	
IS1272- <i>mecA</i> (class-B)	IS5	AACGCCACTCATAACATATGGAA	IS1272	2
	mA6	TATACCAAACCGGACAAC	<i>mecA</i>	
IS431 <i>mec</i> L- <i>mecA</i> (class-C)	mA2	AACGTTGTAACCCACCCAAGA	<i>mecA</i>	2
	IS2	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	IS431 <i>mec</i>	
Subtype of SCC _{mec}				
subtype-IIa	2a1	ATGTCAGAGCTTTCTAACTTAGTCA	J1 resion of IIa : kdp operon	0.45
		2a2		
subtype-IVa	4a1	TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT	J1 resion of type IVa SCC _{mec}	1
		4a2		
subtype-IVb	4b1	AGTACATTTTATCTTTGCGTA	J1 resion of type IVb SCC _{mec}	0.67
		4b2		
subtype-IVc	4c1	TCTATTCAATCGTTCTCGTATTT	J1 resion of type IVc SCC _{mec}	
		4c2		

N315 と同様に kdp オペロンを含む長い J1-region を持つものは 10 株で, type-IIb SCC_{mec} (J1 region は比較的短く, その塩基配列は IIa のものとは全く異なる) が 14 株であった. 更に MLST にて genotype を調べたところ, IIa の MRSA は日本の H-MRSA と同じクローンであるが, これに対して IIb および IV の MRSA は異なるクローンであることが明らかになった. MRC-NS は 13 の菌種が同定されたが, このうち *S. epidermidis* がもっとも多く 202 株 (71.6%) であった (Table 4). MRC-NS の SCC_{mec} のタイプは IV が最も多く 282 株中 187 株 (66.3%) を占めた.

このように日本に於いても市中感染症の原因となっている MRSA が存在し, 健康人からも MRSA 及び MRC-NS が分離される状況となっている. このことは特に小児の市中感染黄色ブドウ

球菌感染症では, MRSA の存在を念頭において抗菌薬の投与を行う必要があることを示唆している.

5. MRSA の疫学に用いる手法

MRSA クローンは SCC_{mec} のタイプとそれが挿入された MSSA の genotype により規定される. 以下, 当教室で用いている MRSA の病原性, MRSA クローンの決定に用いられる分子生物学的手法を述べる.

1. 染色体 DNA の抽出

TSB 培地で培養した菌液 1.5ml をチューブにとり, 集菌後, 2mg/ml の lysostaphin を 2μl 添加し, 37°C で 10 分間保温し, スフェロプラストとし, ISOPLANT II (Nippon gene) を使用して染色体 DNA を抽出した.

2. PCR による毒素遺伝子の検出

平成16年6月20日

Table 5 に示す各種 primer の set を用いて PCR 反応 ([94°C : 30sec, 50°C : 1min, 72°C : 2min] 30 cycles) を行った。

3. PCR による SCCmec タイプの決定

Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) はブドウ球菌属に広く存在する Staphylococcal cassette chromosome (SCC) と命名された動く遺伝因子の一種であり、メチシリン耐性遺伝子 *mecA* を持つ SCC である。

SCCmec はブドウ球菌染色体上の複製開始点のすぐ近くの特定の位置 (*orfX* の 3' 末端) に挿入されており、両末端に特徴的な塩基配列 (inverted repeats, direct repeats) を持っている。SCCmec は二つの主要な遺伝子複合体 (*mec* 遺伝子複合体及び *ccr* 遺伝子複合体) をもつ。

Mec 遺伝子複合体には、これまでに 4 つのクラスが知られている: *mecI-mecR1-mecA-IS431* 複合体を class A *mec* gene complex と呼ぶ。class B *mec* gene complex の場合、*mecR1* の 3' 側が欠落し、代わりに IS1272 が挿入され IS1272- Δ *mecR1-mecA-IS431* 複合体となっている。更に、*mecA* の上流にも IS431 が挿入されて IS431- Δ *mecR1-mecA-IS431* 複合体を形成しているもの (class C)、及び、*mecR1* の 3' 側が途中から欠落しているが、上流側に IS431 や IS1272 などの挿入配列が Long PCR でも検出されない Δ *mecR1-mecA-IS431* 複合体 (class D) が存在する³⁹⁾。

Ccr 遺伝子複合体は SCCmec の mobility に関する cassette chromosome recombinase とその周辺の遺伝子から構成される。これまでに 4 つのアロタイプの *ccrA*、*ccrB* 遺伝子、及び *ccrC* が報告されている。

SCCmec のタイプは *ccr* 遺伝子複合体のアロタイプの違いと *mec* 遺伝子複合体の組み合わせから定義される。type-1 *ccr* 遺伝子複合体と class B *mec* 遺伝子複合体をもつ SCCmec を Type-I SCCmec, type-2 *ccr* 遺伝子複合体と class A *mec* 遺伝子複合体をもつ SCCmec を Type-II SCCmec, type-3 *ccr* 遺伝子複合体と class A *mec* 遺伝子複合体をもつ SCCmec を Type-III SCCmec, type-2 *ccr* 遺伝子複合体と class B *mec*

遺伝子複合体をもつ SCCmec を Type-IV SCCmec, type-5 *ccr* 遺伝子複合体 (*ccrC* 遺伝子を持つもの) と class C2 *mec* 遺伝子複合体をもつ SCCmec を Type-V SCCmec と呼んでいる。

これらの遺伝子複合体を Fig. 1 及び Table 5 に示す primer のセットを用いて検出して SCCmec のタイプを決定する²⁸⁾³¹⁾。

SCCmec は J-領域 (SCCmec 内の *mec* 遺伝子複合体と *ccr* 遺伝子複合体以外の領域) の塩基配列の違いにより、更に subtype に分けられている。サブタイプの決定のための primer も Table 5 に示す。

4. MLST によるゲノタイプの決定

MLST (Multi Locus Sequence Typing) とは、*S. aureus* の染色体上に存在する house keeping gene のうち、7 つの遺伝子の塩基配列を解析し、その塩基配列の相同性をもとに、その株の genotype を決定していく方法である⁴⁰⁾。Database 化された塩基配列は異なる施設間でも data が共有できるので、世界規模での比較検討が可能手段として疫学的解析に用いられるようになった。PFGE は、genomic island の違いにより *Sma*-I 切断片のサイズが異なりバンディングパターンの違いとして認識されるのに対して、MLST は、*S. aureus* が本来持つ遺伝子の間の比較であり、genomic island の影響は受けず、MRSA および MSSA の比較検討も可能である。

ここでは、MLST の実際の方法を簡単に紹介する。

1) *S. aureus* 染色体上の *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* の 7 つの housekeeping gene を対象とし、Table 6 に示す各 primer を用い、PCR により各遺伝子の増幅を行う。

PCR 条件: 95°C : 5min, (55°C : 1min, 72°C : 1min, 95°C : 1min) 30cycles, 72°C : 5min

2) ついで、反応産物を精製し、シークエンサーにより、各遺伝子の塩基配列を決定する。

3) 決定された塩基配列から allele 決定に必要な塩基配列のみを選択し、インターネット上の MLST web site (<http://www.mlst.net>) に入力し、allele number を決定する。

Table 6 List of primers used for MLST⁴⁰⁾

gene names	products	Primer names	Sequence (5' → 3')	Sequence size for MLST analysis (bp)
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	<i>arcC</i> -up	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC	456
		<i>arcC</i> -dn	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG	
<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase	<i>aroE</i> -up	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC	456
		<i>aroE</i> -dn	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC	
<i>glpF</i>	Glycerol kinase	<i>glpF</i> -up	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C	465
		<i>glpF</i> -dn	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC	
<i>gmk</i>	Guanylate kinase	<i>gmk</i> -up	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC	429
		<i>gmk</i> -dn	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA	
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	<i>pta</i> -up	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG	474
		<i>pta</i> -dn	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA	
<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	<i>tpi</i> -up	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA	402
		<i>tpi</i> -dn	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC	
<i>yqiL</i>	Asetyl coenzyme A acetyltransferase	<i>yqiL</i> -up	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC	516
		<i>yqiL</i> -dn	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC	

4) 各 gene の allele を決定したのち、同 web site 上にて、すべての allele number を入力すると、登録されている ST (Sequence type) の中から、allele number がすべて一致する ST number が表示され、ST を決定することができる。

5) ST の決定により、同一 ST を呈する菌株は、同じ clone 由来であると解釈される。

6) また、近年、世界各国にて MRSA 株および MSSA 株の ST が登録され、それぞれの株の遺伝的関連性が解明しつつある。多数の ST の関連性を解析し、その菌株の clone 性の位置づけを行う場合には、BURST analysis が必要となる。ST は 7 つの housekeeping gene allele により決定されるが、BURST analysis では、7 つの gene のうち、2 つまでの allele の相違は、同じ clone からの派生と考え、同一の Clonal complex に分類するようプログラムされている。すなわち、同 CC に分類される菌株は、同一 clone もしくは ancestor clone から派生した近縁の株であり、逆に、異なる CC に分類される菌株は、由来が大きく異なるものと解釈される。現在登録されている世界各国からの *S. aureus* の MLST を base にすることで、新たに分離された菌株の由来を検討することが可能である。たとえば、1982 年に日本で分離された pre MRSA N315 株の MLST は、ST5, CC5 に登録さ

れているが、現在の病院由来の MRSA 株を MLST 解析すると N315 株と同じ ST5, CC5 に分類されるため、N315 株と同様のクローンから由来したこと推定することができる。

文 献

- 1) CDC : Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections—Michigan. Morb Mortal Wkly Rep 1981 ; 30 : 185—7.
- 2) Stacey AR, Endersby KE, Chan PC, Marples RR : An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in a rugby football team. Br J Sports Med 1998 ; 32 : 153—4.
- 3) Lindenmayer JM, Schoenfeld S, O'Grady R, Carney JK : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high school wrestling team and the surrounding community. Arch Intern Med 1998 ; 158 : 895—9.
- 4) CDC : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a state prison—Mississippi, 2000. Morb Mortal Wkly Rep 2001 ; 50 : 919—22.
- 5) Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W : An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2002 ; 8 : 82—4.
- 6) O'Brien FG, Pearman JW, Gracey M, Riley TV, Grubb WB : Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2858—

平成16年6月20日

- 62.
- 7) Shuhaibar MN, Falkiner FR : The prevalence, antibiotic susceptibility and phage-type of nasally carried *Staphylococcus aureus* in the Dublin community. *Ir J Med Sci* 1992 ; 161 : 589—92.
 - 8) Moreno F, Crisp C, Jorgensen JH, Patterson JE : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin Infect Dis* 1995 ; 21 : 1308—12.
 - 9) Gross-Schulman S, Dassey D, Mascola L, Anaya C : Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1998 ; 280 : 421—2.
 - 10) Maguire GP, Arthur AD, Boustead PJ, Dwyer B, Currie BJ : Clinical experience and outcomes of community-acquired and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a northern Australian hospital. *Journal of Hospital Infection* 1998 ; 38 : 273—81.
 - 11) Adcock PM, Pastor P, Medley F, Patterson JE, Murphy TV : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. *J Infect Dis* 1998 ; 178 : 577—80.
 - 12) Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, *et al.* : Community-Acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Children with no identified predisposing risk. *JAMA* 1998 ; 279 : 593—8.
 - 13) Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra A, Daum RS : Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. *Pediatr Infect Dis J* 1999 ; 18 : 410—4.
 - 14) 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* 1999 ; 282 : 1123—5.
 - 15) Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, *et al.* : Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis* 2000 ; 182 : 359—62.
 - 16) Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS : Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J* 2000 ; 19 : 1163—6.
 - 17) Alghaithy AA, Bilal NE, Gedebou M, Weily AH : Nasal carriage and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and non-hospital personnel in Abha, Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 ; 94 : 504—7.
 - 18) Nimmo GR, Schooneveldt J, O’Kane G, McCall B, Vickery A : Community acquisition of gentamicin-sensitive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southeast Queensland, Australia. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 (11) : 3926—31.
 - 19) Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, *et al.* : Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American indian community. *JAMA* 2001 ; 286 : 1201—5.
 - 20) Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK, *et al.* : Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis* 2001 ; 33 : 990—6.
 - 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* 2003 ; 16 : 103—24.
 - 22) Salgado CD, Farr BM, Calfee DP : Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 2003 ; 36 : 131—9.
 - 23) Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, *et al.* : Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama* 2003 ; 290 : 2976—84.
 - 24) Vandenesch F, T Naimi, MC Enright, G Lina, GR Nimmo, H Heffernan, *et al.* : Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes : worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 978—84.
 - 25) Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, *et al.* : Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 ; 47 : 196—203.
 - 26) Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, *et al.* : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002 ; 359 : 1819—27.
 - 27) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K : A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 1549—55.
 - 28) Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, *et al.* : Structural comparison of three types of staphylococcal cassette

- chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001 ; 45 : 1323—36.
- 29) Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K : Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole Genome : genomic island SCC. Drug Resist Update 2003 ; 6 : 41—52.
- 30) Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, *et al.* : Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. Antimicrob Agents Chemother 2002 ; 46 : 1147—52.
- 31) Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, *et al.* : Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 4289—94.
- 32) Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K : Identification of a novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (type V) driven by a novel cassette chromosome recombinase *ccrC*. Antimicrob Agents and Chemother 2004 ; 48 : 1—15.
- 33) 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 2002 ; 99 : 7687—92.
- 34) 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 2002 ; 2 : 180—9.
- 35) Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, *et al.* : A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. J Infect Dis 2002 ; 186 : 1344—7.
- 36) Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T : The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001 ; 9 : 486—93.
- 37) Hiramatsu K, Okuma K, Ma XX, Yamamoto M, Hori S, Kapi M : New trends in *Staphylococcus aureus* infections : glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. Curr Opin Infect Dis 2002 ; 15 : 407—13.
- 38) Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, Hayashi T, Aepfelbacher M, Ohara M, *et al.* : 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 2002 ; 185 : 1511—6.
- 39) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K : Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical Staphylococcal strains : role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 2001 ; 45 : 1955—63.
- 40) 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 2000 ; 38 : 1008—15.

Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* :
Current Status and Molecular Epidemiological Perspective

Teruyo ITO, Kyoko KUWAHARA, Ken HISATA, Keiko OKUMA,
Longzhu CUI & Keiichi HIRAMATSU
Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Juntendo University

MRSA has been a major causative agent of nosocomial infection. However, recently MRSA has become increasingly isolated from community-associated infections. We summarized here up to date information about community-associated MRSA (C-MRSA) infections and characteristics of C-MRSA strains based on molecular analysis. By using the SCC*mec* typing, strong evidence was provided for the independent derivation of healthcare-associated MRSA and C-MRSA clones.

[J.J.A. Inf. D. 78 : 459—469, 2004]