

13. 千葉県立医療機関で分離されるMRSAの分子疫学的解析

江下倉重（千葉県衛生研究所）

横山栄二（千葉県衛生研究所）

佐藤正一（千葉県循環器病センター）

斉藤佳子（千葉県循環器病センター）

1. 目的

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) による院内感染は公衆衛生上の重大な問題であるが、発生時にはMRSAを適当な方法で型別することで感染ルートの特定を行うことが必要である。パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) は様々な病原細菌を型別する場合の gold standard となっているが、MRSA でもその有効性が確認されている。しかし、PFGE は特殊な泳動装置が必要であり、結果判明までに時間を要することから一般的な病院の検査室では実施困難である。

近年、一般的な病院の検査室でも日常行っている薬剤感受性試験結果のクラスター解析 (MIC 法) によって MRSA の院内感染をスクリーニングする方法が報告された¹⁾。しかし、薬剤感受性結果と PFGE を比較しただけでは MIC 法を十分に評価出来ず、より詳細な分子疫学的解析が必要とされた。そこで、やはり近年報告された簡易な MRSA の分子疫学的解析法である phage ORF typing (POT)法²⁾、および他の病原細菌の分子疫学的解析法として有効性が報告されている variable number of tandem repeat (VNTR)法を用いて、一般的な病院の検査室で実施可能な MRSA による院内感染のスクリーニング法について検討した。

2. 材料および方法

1) 菌株

2005～2006年に千葉県循環器病センターで分離されたMRSA 73株を使用した。当該菌株が保有する staphylococcal cassette chromosome *mec* の型を Zhang ら³⁾に準じて調査した。

2) 分子疫学的解析

POT 法は Suzuki ら²⁾に準じて実施した。VNTR 法は Hardy ら⁴⁾に準じて、SIRU01、SIRU05、SIRU07、SIRU13、SIRU15 および SIRU21 の6領域を調査対象とした。

3) クラスター解析

分子疫学的解析の結果を BioNumerics Ver.5 に入力し、クラスター解析を行った。POT 法については、simple matching 係数で類似度算出を行い、UPGMA でクラスター解析を行った。VNTR 法については、Pearson の相関係数で類似度算出を行い、UPGMA でクラ

スター解析を行った。クラスター解析結果に基づく系統解析として、minimum spanning tree (MST) を作成した。作成法は、POT 法については binary 係数で、VNTR 法については Manhattan 距離で行った。

3. 結果

PFGE のクラスター解析で形成した 11 のクラスターごとに、MIC 法、POT 法および VNTR 法の類似度との一致率を調査した (表 1)。

表1 各解析法ごとのクラスターした菌株数

クラスター No.	解析法	各類似度におけるクラスターした菌株数		
		90-100%	80-90%	80%未満
P1	MIC	5	5	5
	POT	5	5	5
	VNTR	4	4	5
P2	MIC	2	2	2
	POT	2	2	2
	VNTR	2	2	2
P3	MIC	2	3	4
	POT	4	4	4
	VNTR	4	4	4
P4	MIC	0	2	4
	POT	2	3	4
	VNTR	3	4	4
P5	MIC	0	2	2
	POT	2	2	2
	VNTR	2	2	2
P6	MIC	7	7	8
	POT	8	8	8
	VNTR	8	8	8
P7	MIC	2	2	2
	POT	2	2	2
	VNTR	2	2	2
P8	MIC	2	3	3
	POT	2	3	3
	VNTR	3	3	3
P9	MIC	6	6	7
	POT	5	5	7
	VNTR	5	5	7
P10	MIC	0	0	2
	POT	2	2	2
	VNTR	2	2	2
P11	MIC	5	6	7
	POT	7	7	7
	VNTR	7	7	7

類似度 90%で cut off した場合、MIC 法は POT 法と比較して $P=0.02139$ で、また VNTR 法と比較して $P=0.00879$ で、有意に PFGE との一致率が低かった (Fisher's exact test)。一方、類似度 80%で cut off した場合、MIC 法は POT 法と比較して $P=0.55091$ で、また VNTR 法と比較して $P=0.35375$ で、一致率に有意差はなかった (Fisher's exact test)。

POT 法による MST は、SCCmec II 型の菌株が 4 個の complex に細分化されたが、一部の I 型と II 型菌株が同一 node に属していた (図 1)。

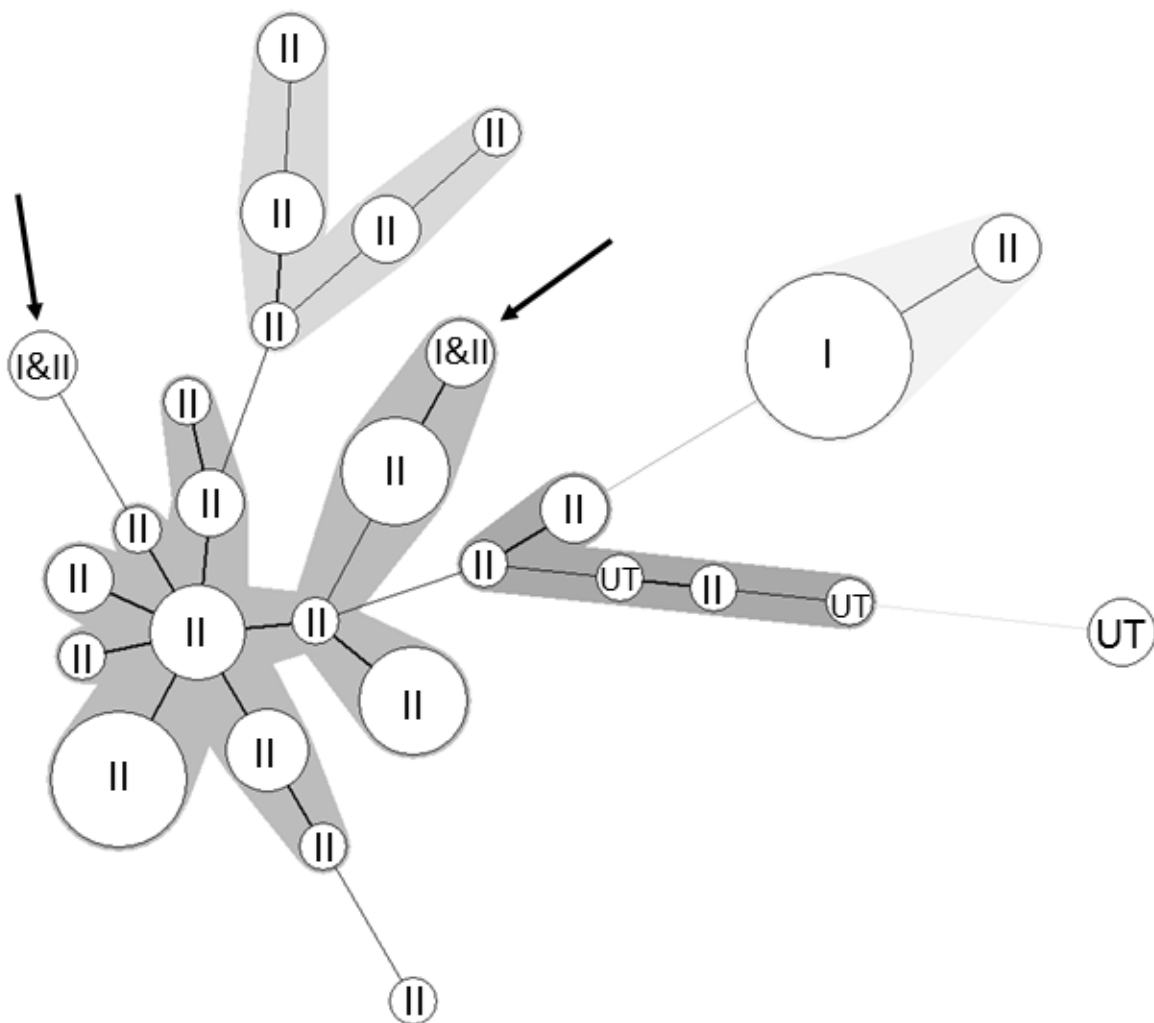


図1 POT法によるminimum spanning treeおよびSCCmec型

POT 法による MST で複数の菌株が認められた node に属する菌株を、VNTR 法で解析したところ、全 58 株中類似度が 80%未満であった 4 株および類似度が 80~90%であった 1 株以外の 53 株は類似度が 90%以上であった（データ示さず）。

VNTR 法による MST は node の数が少なく、POT 法による MST と同様に異なる SCCmec 型の菌株が同一 node に混在していた（データ示さず）。

4 . 考察

PFGE と MIC 法、POT 法および VNTR 法の類似度一致率を調査したところ、MIC 法は他の方法と比較して有意に一致率が低く、類似度の cut off 値を低めに設定する必要があることが判明した。類似度の cut off 値を低くすることは MRSA の院内感染に関係しない散発的分離株がクラスターする可能性が高くなる。しかし、同一クラスターに属する MRSA 菌株の増加傾向を監視しておけば、多少の散発的分離株の紛れ込みがあっても MIC 法で十分に院内感染の発生状況をスクリーニングすることが可能であると思われる。

POT 法および VNTR 法は PFGE との一致率が高く、MRSA の院内感染把握に有効な分子疫学的解析法であることが確認された。しかし一般的な病院の検査室では、POT 法および VNTR 法に必要な試薬や機器等が整備されていないことが懸念される。今後、試薬の検査キット化といった一般的な病院の検査室でも簡単に実施出来るような工夫が求められる。

MRSA による院内感染を防止するためには、病院内における MRSA の分化状況を把握する必要がある。そこで、POT 法に基づく MST を作成して系統学的解析を行おうとしたが、その MST 上で SCCmec の型が異なる菌株が同一 node となったことから、POT 法では allele が不足しているため院内感染を起こしている MRSA の分化状況を十分に把握出来ないことが示唆された。VNTR 法でも同様の傾向が認められた（データ示さず）。さらに POT 法の MST 上の各 node における VNTR 法の類似度が高いことから、POT 法と VNTR 法のデータがリンクして変異していることが考えられたため、今回用いた VNTR 法も系統学的解析には適していないと思われる。

VNTR 法は解析対象とする領域を増やすことで型別能力を向上させ、ひいては allele を増やすことが可能である。また近年における他の病原細菌の VNTR 解析によって、VNTR 領域のなかに系統学的意義を有する領域とそうでない領域が存在することが明らかになってきている。今後 MRSA の系統学的解析に適した VNTR 領域を調査することで、VNTR 法を用いて MRSA の系統学的解析が実施可能になるとと思われる。

5 . 参考文献

- 1)佐藤正一、斉藤佳子、佐藤洋子、澤田恭子. (2008) MRSA における薬剤感受性クラスター解析およびパルスフィールド・ゲル電気泳動パターンの関連性. 医学検査 57: 229-235.
- 2)Suzuki M, Tawada Y, Kato M, et al. (2006) Development of a rapid strain

differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. J Appl Microbiol 101: 938-947.

3)Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, et al. (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 43: 5026-5033.

4)Hardy KJ, Oppenheim BA, Gssain S, et al. (2006) Use of variation in staphylococcal interspersed repeat units for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Micorboil 44: 271-273.

6 . 使 途 明 細

品名等	価格
蛍光primer合成	¥94,500
シークエンサー消耗品	¥201,600
Taq polymerase	¥67,200
sequencing外注費用	¥90,000
参考図書等購入	¥14,200
送料・手数料等	¥9,835
消費税等	¥22,665
合 計	¥500,000