

博士論文

(2022年 1月 19日 提出)

論文題目

呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌
(MRSA) の分子疫学解析および抗菌薬使用状況の調査

指導教員 三宅 勝志



補助教員 佐和 章弘



大学院

薬学 研究科

医療薬学 専攻

申請者氏名 前田 龍人



広島国際大学大学院

略語一覽

AMR	:	Antimicrobial resistance
AS	:	Antimicrobial Stewardship
AST	:	Antimicrobial Stewardship Team
AUD	:	Antimicrobial Use Density
AUR	:	Anitiotic Use and Resistance
AZM	:	Azithromycin
CA-MRSA	:	Community-associated or acquired MRSA
CC	:	Clonal complex
CLDM	:	Clindamycin
CPFX	:	Ciprofloxacin
DDD	:	Defined daily dose
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
DOT	:	Days of Therapy
EM	:	Erythromycin
HA-MRSA	:	Hospital-associated MRSA
JANIS	:	Japan Nosocomial Infections Surveillance
LVFX	:	Levofloxacin
MIC	:	Minimum inhibitory concentration
MLST	:	Multilocus sequence typing
MRSA	:	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NICU	:	Neonatal Intensive Care Unit
PBP2'	:	Penicillin binding protein 2'
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PD	:	Pharmacodynamics
PFGE	:	Pulsed-field gel electrophoresis
PK	:	Pharmacokinetics
POT	:	PCR-based ORF Typing
PVL	:	Panton-Valentine leucocidin
RPLA	:	Reverse passive latex agglutination
SCC <i>mec</i>	:	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
SEA	:	Staphylococcal enterotoxin A
SEB	:	Staphylococcal enterotoxin B
SEC	:	Staphylococcal enterotoxin C
TSST-1	:	Toxic shock syndrome toxin-1

目次

序論	1
本論	
第1章 抗菌薬使用密度および使用日数と MRSA 分離率の関係性の調査	
第1節 緒言	4
第2節 方法	6
1. 調査施設と調査機関	
2. 調査対象の注射用抗菌薬と AUD、DOT 並びに AUD/DOT 比の算定	
3. 調査対象の臨床分離菌と薬剤耐性率の算定	
第3節 結果	8
1. 注射用抗菌薬の AUD/DOT 比の経年推移	
2. MRSA 分離率の経年推移	
3. 全注射用および各種注射用抗菌薬の AUD/DOT 比と MRSA 分離率の関係	
第4節 考察および小括	14
第2章 呉医療センターで分離された MRSA の分子疫学的解析	
第1節 緒言	16
第2節 方法	17
1. パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulse-field gel electrophoresis: PFGE)	
2. SCCmec タイピング	
3. POT 法	
4. コアグララーゼ遺伝子タイピング	
5. MLST (Multilocus sequence typing)	
6. PVL (Panton-Valentine leukocidin) の検出	
7. 毒素の検出	
第3節 結果	25
1. 当院で検出率の高い菌種について	

- 2. 分子疫学的解析
 - 2-1. PFGE による解析と系統樹解析
 - 2-2. SCCmec 遺伝子型の確認
 - 2-3. MLST による解析
 - 2-4. *pvl* 遺伝子の有無
 - 2-5. コアグラーゼ遺伝子タイピング
 - 2-6. 毒素産生性の確認

第4節 考察および小括	37
総括	40
謝辞	42
引用文献	43

序論

近年、抗菌薬の普及に伴い病原体が様々に変質し、抗菌薬に対する耐性(Antimicrobial Resistance : AMR)を獲得することが社会問題として取り上げられている。しかし、抗菌薬の新規開発は滞っており、現存する抗菌薬の不適切な使用は耐性菌選択圧を高めるだけでなく、耐性菌による院内感染の拡大にも直結して医療経済的に打撃を与えるなど多くの問題を含んでいる。何も対策を取らず現在のペースでAMRが増加した場合、2050年には世界中で1,000万人の死亡が想定されている。この死者数は現在の、がんによる死亡者数を超えるという指摘もある。このような経緯から、2015年5月の世界保健総会では、AMRに関するグローバル・アクション・プランが採択され、AMRの制御は世界規模のプロジェクトとなっている。我が国の医療機関においては2007年4月の改正医療法で、すべての医療機関において管理者の責任の下で院内感染対策のための体制の確保が義務化された^[1]。そのため、医療施設内で抗菌薬適正使用の適正化を図り、耐性菌の出現・拡大を防止する取り組みが重要になっている。

厚生労働省発の平成30年診療報酬改定資料で、「抗菌薬適正使用支援加算」が新設され、施設内で組織化された抗菌薬適正使用支援チーム(Antimicrobial Stewardship : AST)が臨床に供される抗菌薬を届出制・許可制などにより適正に管理かつ使用した上で、AMRを制御する重要性が示された。しかし、この加算の要件を単に満たすだけでは不十分であり、適正使用の結果が各種耐性菌の制御に真に直結しなければならないことを示している。これらは各医療機関が個別に実施する問題ではなく、抗菌薬の使用量などの情報を同一医療圏に属する施設同士が相互に共有化し、地域全体が一体化して耐性菌を制御する仕組みを作る必要が叫ばれている^[2]。すなわち、実効性・継続性・地域性を併せ持つ抗菌薬管理プログラムを構築し臨床上問題となる耐性菌の選択圧を低下させ、院内感染対策の充実・推進が可能となる環境を医療現場は必要としている。しかしながら、抗菌薬は多種多様である上に、どの抗菌薬をどの程度使用すると耐性菌の出現や拡大のリスクが高まるか、また耐性菌の地域内にお

ける拡散などについての情報は本邦における報告は過去に殆どなく、抗菌薬管理プログラムの一環として上述した抗菌薬の届出制などの使用規制施策を地域医療圏で敢行しようとしても、根拠となる使用量などに関するデータが乏しいのが現状である。加えて、医療施設内で分離された各種の耐性菌が同一菌株由来のものかなど、細菌学的な見地に立ったデータの集積も十分とは言えない状況にある。そこで今回、本邦の医療事情に即した抗菌薬管理プログラムの構築へ応用できる学術的基盤を築くことを主たる目的に、当院における注射用抗菌薬の使用密度 (Antimicrobial Use Density : AUD)、使用日数 (Days of Therapy : DOT) を経年的に調査して臨床現場で実使用された各種抗菌薬の使用動向の実態を把握することとした。

一方、本研究では筆者が所属する国立病院機構呉医療センター・中国がんセンターにおける Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離状況について調査を実施すると共に、臨床分離された MRSA 株の遺伝子タイピングを実施して分子疫学的な情報の集積を進めた。これまで主に緑膿菌の耐性菌分離率や感受性変化と抗菌薬使用量の変化についての報告はいくつかあるが^[3, 4]、MRSA の分離率と抗菌薬使用量および抗菌薬使用日数の変化の相関性、さらに分離された MRSA の遺伝子タイピングによる疫学的調査結果を総括した報告例はほとんどない。

本研究で対象とした MRSA は医療関連感染を起こす代表的な病原菌として知られており、院内で分離される耐性菌として最も分離頻度が高い。近年、本菌の臨床分離率は減少傾向にあるが、厚生労働省院内感染対策サーベイランス (Japan Nosocomial Infections Surveillance : JANIS) の調査では依然として高い割合を占めている^[5, 6]。

MRSA は黄色ブドウ球菌が *mecA* 遺伝子を獲得することにより penicillin binding protein 2' (PBP2') を産生し、この PBP2' はペニシリン抗菌薬や β -ラクタム系抗菌薬に対する親和性が低く、結果としてペニシリン系抗菌薬をはじめ、ほとんどの β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すことが知られている^[7]。*mecA* 遺伝子は染色体上の可動性遺伝子である *staphylococcus cassette*

chromosome(SCC)上に複合体を形成し、SCCmec として存在しており、SCCmec は mec 複合体と cassette chromosome recombinase(ccr)複合体の構造の違いから、type I～XI に分けられている^[8-10]。SCCmec には、この領域の染色体の特定の部分への挿入に関する組み換え遺伝子 ccr が存在し、他にも薬剤耐性遺伝子をコードする plasmid pUB110 や IS431、Tn554 といった転移因子などが挿入されており、マクロライド系抗菌薬やテトラサイクリン系抗菌薬といったβ-ラクタム系抗菌薬以外の薬剤にも耐性を獲得している。つまり MRSA が多剤耐性を示し、抗菌薬の治療効果を低下させる要因のひとつとなっている。

本菌は組織破壊性が強く化膿性病変を引き起こすだけでなく、腸管毒素 (enterotoxin)、毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin-1 : TSST-1)、表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin)、白血球溶血毒素(Panton-Valentine leucocidin : PVL) を産生して皮膚組織病変、肺炎、敗血症などの種々の疾患や食中毒の原因に関係している^[11-14]。また、近年 MRSA は市中感染症型 (community-associated or acquired MRSA : CA-MRSA)が増加しており、従来からの院内感染型 (hospital-associated MRSA : HA-MRSA)と併せて選択圧の管理が重要となってきた。MRSA 保菌者は MRSA 感染症を引き起こすリスクが高く、他者への MRSA 伝播の原因にもなり得るため、医療施設の組織的な感染対策が必要であると同時に、抗菌薬の使用量は薬剤耐性と関係性が高いため^[15]、施設内における本薬剤の使用動向を監視し、適切に管理することが必要とされている^[16]。

以上の背景より、本研究では当院で分離された MRSA 臨床株に関して、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) による遺伝子タイピングに加え、種々の病原因子の遺伝子の保有状況を調査した。それらの調査結果より、当院において分離される MRSA 株の経年変化を分子生物学的観点から考察すると共に、最初の段落で記した抗菌薬使用動向の結果と併せて総合的に考察した。

本論

第1章 抗菌薬使用密度および使用日数と MRSA 分離率の関係性の調査

第1節 緒言

抗菌薬適正使用については米国感染症学会や米国医療疫学学会などが提唱している Antimicrobial Stewardship(AS)の概念があり、近年わが国においても浸透している。この概念は治療効果の最大化、有害事象の最小化、薬剤感受性の回復、医療財源の適正利用など薬剤選択や治療効果のみならず医療経済面に至るまで、幅広い視野をもつことが抗菌薬適正使用につながるとされる。今回の研究で用いた AUD や DOT などは抗菌薬適正使用を推進するための多くの手法がある中における一つの指標である。

抗菌薬使用密度を表す AUD はこれまで主流の評価方法であった。AUD の利点としては後述の DOT より比較的簡便に算出できることや、自施設と同規模で類似した条件の医療施設間の比較に適していることが挙げられる。しかし各抗菌薬の総使用量に基づいた評価方法であるため、AUD 値が増加した場合に使用量が増加したのか、使用期間が長期化しているのか、どちらに起因するかを判断することが AUD のみでは困難である。また AUD 算出に使用する DDD(defined daily dose: 1 日仮想平均維持量) は体重 70 kg の成人海外標準投与量を設定しており、高齢者、小児、腎機能低下患者、重症感染症患者などの患者集団が多い場合には乖離が起きる可能性があるため評価時に注意が必要である。DOT は抗菌薬の用法用量にかかわらず、患者に投与された日数を集計する方法であり、1回投与量に影響されないため AUD で問題となる腎機能低下症例や小児などの集団の評価を行う場合に有効であるとされている。一方で DOT の欠点は算出が簡便ではないことと、投与日数のみに着眼点をおいているため投与量が不明な点にある。よって両方のパラメータを含む AUD/DOT を用いた評価は、AUD または DOT のみで評価するよりも偏りが少なくなると考えられる。また、投与日数と併せて PK/PD 理論(薬物動態学 (Pharmacokinetics, PK) と薬力学

(Pharmacodynamics, PD) 含めた考え方が可能となる点が利点である。なお AUD/DOT 比は、薬剤が適正使用されている場合は理論的には 1 に近似し、不適切な使用がされている可能性がある場合は 1 より小さくなる指標である。これまでの抗菌薬使用評価に関する欠点を補い、適正使用の評価を総合的に実施することができると考え、本研究では AUD/DOT 値を求めて解析することにした。

第2節 方法

1. 調査施設と調査期間

調査施設は、国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター(以下、当院)である。当院は、広島県呉市に所在する地域の基幹病院であり、診療科数は35科、ベッド数は700床(救命救急センター30床、NICU6床、緩和ケア病床19床、精神病床50床を含む)を有す。また、本研究の調査期間は2015年～2019年末の5年間とした。

2. 調査対象の注射用抗菌薬とAUD、DOT並びにAUD/DOT比の算定

調査対象とした注射用抗菌薬はTable 1に示す通り、当院において臨床で実使用されている12種類(29薬剤)とした。

Table 1 List of used ATC/DDDs and antimicrobial agents

type	nonproprietary name	abbreviation	DDD(g)
Beta-lactamase sensitive penicillins	benzylpenicillin	PCG	6
Aminopenicillins	ampicillin	ABPC	2
	ampicillin and beta-lactamase inhibitor	SBT/ABPC	9
Ureidopenicillins	piperacillin	PIPC	14
	piperacillin and beta-lactamase inhibitor	TAZ/PIPC	15.75
1st generation cephalosporins	cefazolin	CEZ	3
2nd generation cephalosporins	cefmetazole	CMZ	4
	cefotiam	CTM	4
3rd generation cephalosporins	ceftazidime	CAZ	4
	cefotaxime	CTX	4
	ceftriaxone	CTRX	2
	flomoxef	FMOX	2
	cefoperazone and beta-lactamase inhibitor	SBT/CPZ	8
4th generation cephalosporins	cefepime	CFPM	4
	cefzopran	CZOP	4
Carbapenems	panipenem and betamipron	PAPM/BP	2
	imipenem and cilastatin	IPM/CS	2
	doripenem	DRPM	1.5
	meropenem	MEPM	3
Tetracyclines	minocycline	MINO	0.2
Fluoroquinolones	ciprofloxacin	CPFX	0.8
	pazufloxacin	PZFX	1
	levofloxacin	LVFX	0.5
Macrolides	erythromycin	EM	1
	azithromycin	AZM	0.5
	vancomycin	VCM	2
anti-MRSA antibiotics	teicoplanin	TEIC	0.4
	daptomycin	DAP	0.28
	linezolid	LZD	1.2

また AUD と DOT は、国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンターを事務局とする感染症教育コンソーシアム作成の抗菌薬使用量集計マニュアル*をもとに以下の式を用いて算出した。

$$(1) \text{AUD} = (\text{抗菌薬使用量 (g)}) / \text{DDD} * (\text{g}) \times \text{入院患者延べ日数} \times 1000$$

(*DDD : 規定 1 日投与量 (Defined Daily Dose))

$$(2) \text{DOT} = (\text{抗菌薬使用日数} / \text{入院患者延べ日数}) \times 1000$$

調査対象の注射用抗菌薬について種類別に AUD、DOT を算出した後、AUD/DOT 比を調査年別に求めた。

3. 調査対象の臨床分離菌と薬剤耐性率の算定

調査対象の臨床分離菌は、当院の入院患者の各種検査材料から検出された MRSA とし、全診療科からランダムかつ同一患者の同種材料から検出された同一菌の重複例が無いように選出した。MRSA の判定は、NCCLS の基準に基づいて oxacillin (MIPIC) の MIC 値が $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上とした。また薬剤耐性率は、当院で検出された全 *Staphylococcus aureus* 数に占める MRSA 数の割合とした。

第3節 結果

1. 注射用抗菌薬の AUD/DOT 比の経年推移

Fig.1 に全注射用抗菌薬(12 種類)の AUD/DOT 比の経年推移を示した。AUD/DOT 比は、2015 年から 2019 年にかけて 0.66、0.71、0.72、0.72、0.75 と経年的に理想値 1 に向けて増加しており、全体として薬剤の使用方法が適正使用に近づく傾向を示した。

また **Fig.2** に示すように、抗菌薬の種類別ではアンピシリン、第 1 世代セファロスポリン、同第 2 世代、同第 3 世代、マクロライドなどは大きく増加していた。とくにアンピシリンの AUD/DOT 比は 0.66 から 0.94 で約 1.4 倍と増加率が最も高かった。さらに第 1 世代セファロスポリン、同第 3 世代では約 1.2 倍でありアンピシリンに次いで増加率が大きかった。抗緑膿菌ペニシリン、第 4 世代セファロスポリン、カルバペネムも増加はしていたが、前述の 5 種類の抗菌薬に比べると顕著な増加はみられなかった。テトラサイクリン、ニューキノロンに経年変化はみられず、抗 MRSA 薬は 2015 年から 2017 年にかけて増加したが、その後減少に転じた。

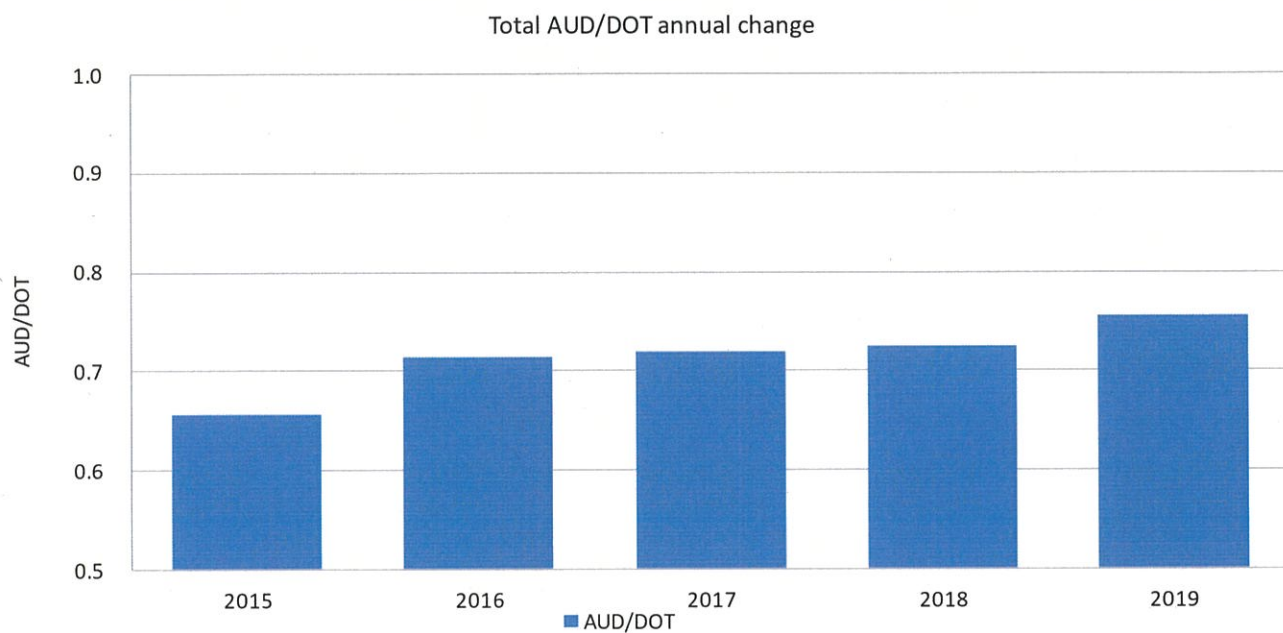


Fig. 1 Total AUD/DOT annual change

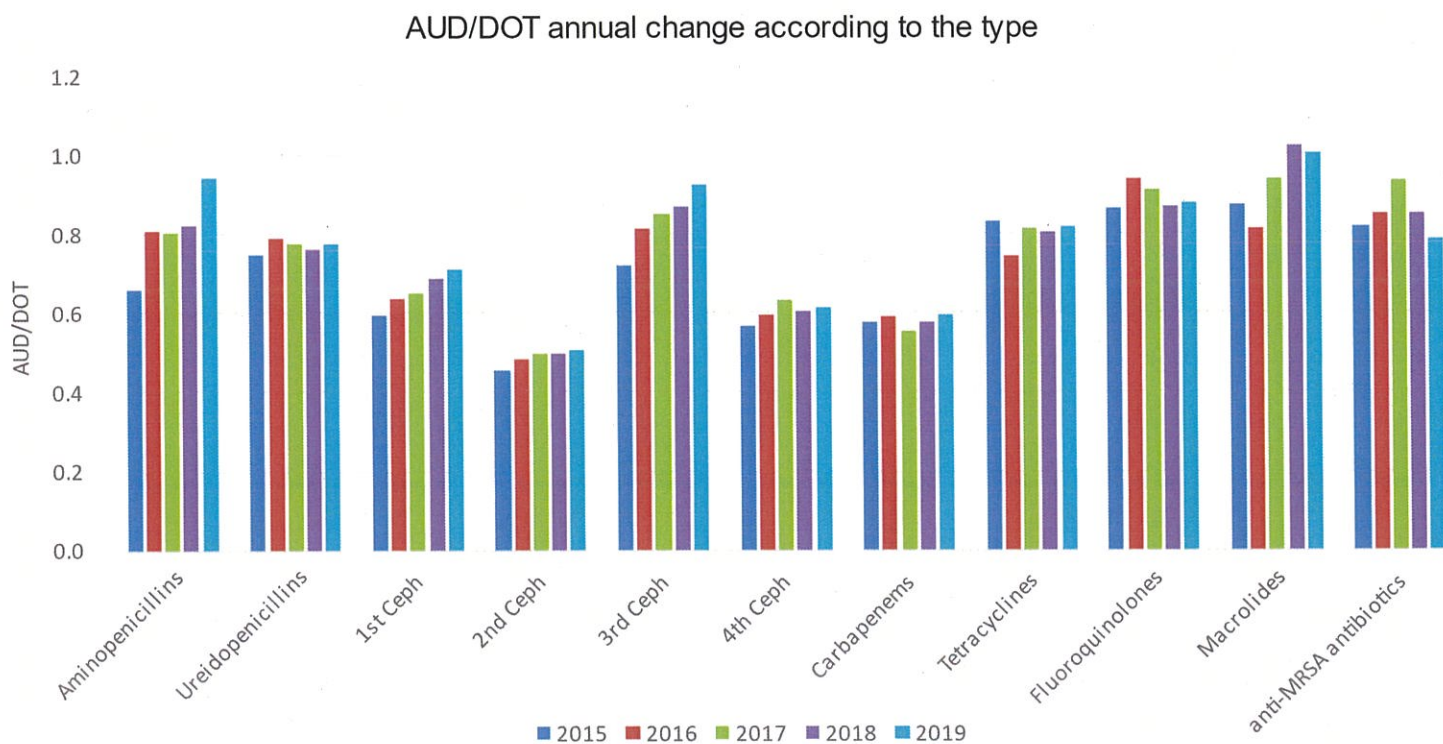


Fig. 2 AUD/DOT annual change according to the type

2. MRSA 分離率の経年推移

Fig. 3 に MRSA 分離率の経年推移を示した。MRSA 分離率は、2015 年から 2019 年にかけて 66.1%、56.6%、55.3%、54.3%、50.1%と経年的に減少傾向を示した。

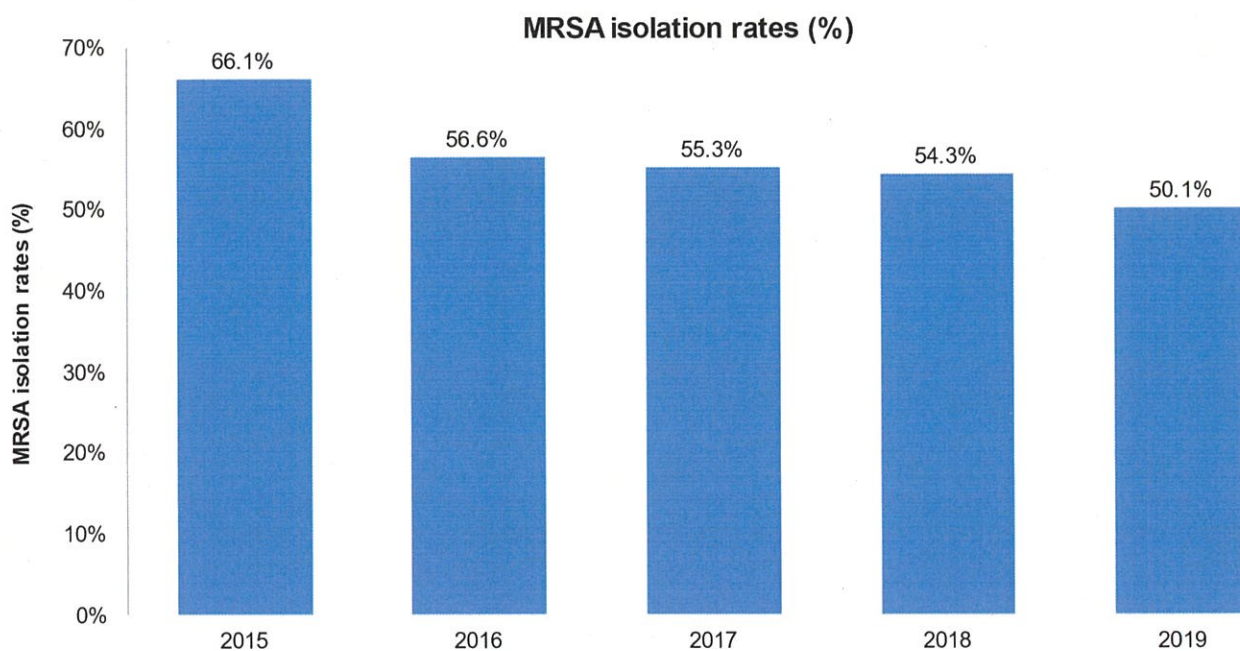


Fig. 3 MRSA isolation rates (%)

3. 全注射用および各種注射用抗菌薬の AUD/DOT 比と MRSA 分離率の関係

ピアソンの積率相関係数による検定により統計的に有意であるか確認した。

Fig. 4 に系統別注射用抗菌薬の AUD/DOT 比と MRSA 分離率の関係を示す。アミノペニシリングループ、第 1 世代セファロスポリン、同第 2 世代、同第 3 世代で統計的に有意な負相関が得られた。その他の抗菌薬についても統計的に有意な相関は得られなかったが、負の傾向がみられた。

Fig. 5 に全注射用抗菌薬(12 種類)の AUD/DOT 比と MRSA 分離率の関係を示す。図の通り AUD/DOT 比が理想値 1 に近づくに伴い MRSA 分離率は減少しており、統計的に有意な相関が認められた。

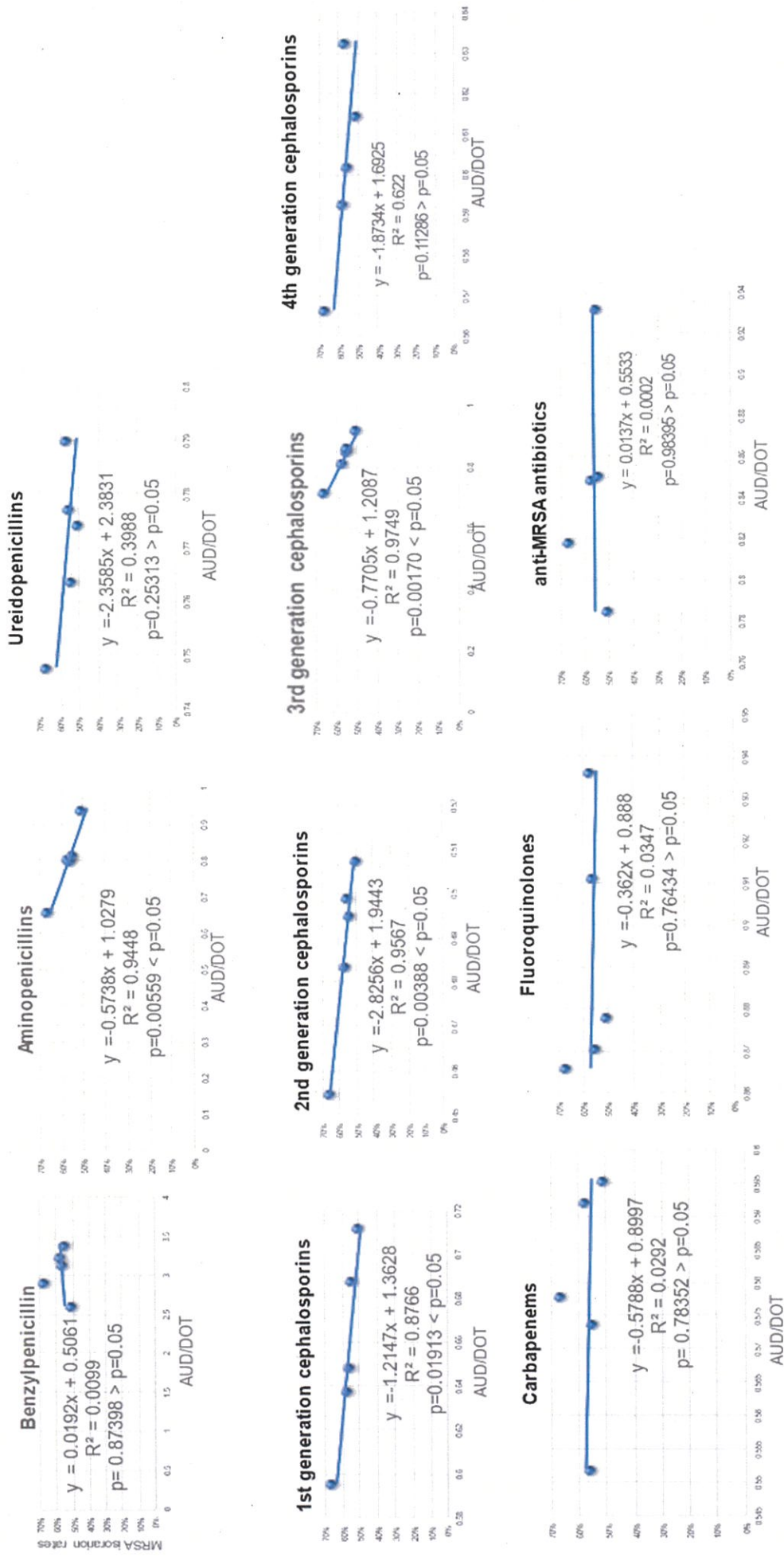


Fig. 4 Relations of AUD/DOT and the MRSA isolation rate of antimicrobial agents by type.

Relations of AUD/DOT and the MRSA isolation rate of all antimicrobial agents

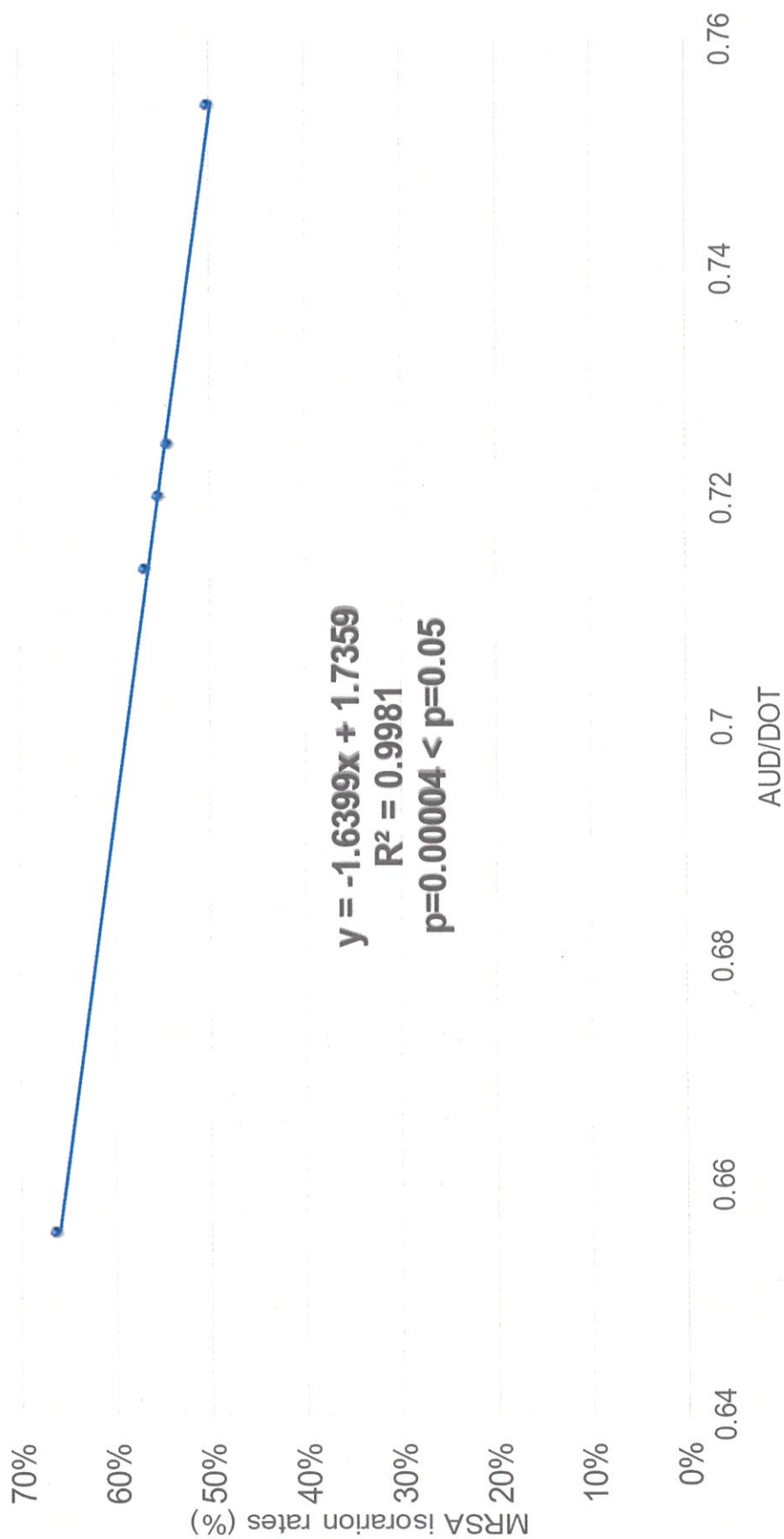


Fig. 5 Relations of AUD/DOT and the MRSA isolation rate of all antimicrobial agents. (12 kinds)

第4節 考察および小括

薬剤耐性 Antimicrobial resistance (AMR)が医療における脅威となるなかで、抗菌薬適正使用に関する世界的に取り組みが実施されている。呉地区においては以前より、複数の医療機関が連携して AUR(Antibiotic Use and Resistance)サーベイランス調査を行い、抗菌薬使用動向について継続した調査を実施してきた^[17]。

本研究において抗菌薬使用密度と抗菌薬使用日数の比である AUD/DOT は、抗菌薬が適正使用された場合の理論値である 1 に経年的に近づいており、全体として抗菌薬の適正使用が推進されていることが示唆された。また MRSA 分離率の減少と AUD/DOT の経年的な増加について負の相関が認められた抗菌薬がいくつかあった。一方、相関が認められなかった抗菌薬のにも AUD/DOT と MRSA 分離率の減少と負の傾向がみられた薬剤があった。しかしながら調査対象の全抗菌薬の AUD/DOT と MRSA 分離率にも相関がみられたため AUD/DOT を理論値 1 に近づけるよう改善することが耐性菌抑制につながる可能性があることが示唆された。

相関が認められた抗菌薬は主にアンピシリングループ、第 1 世代セファロスポリン、同第 2 世代、同第 3 世代であり、これらはグラム陽性球菌に比較的強いスペクトルをもつ薬剤であることが共通している。相関が認められなかった抗菌薬の特徴はグラム陰性菌にスペクトルが拡大されている一方でグラム陽性球菌への効力が減弱化している。上記のことから、とくにグラム陽性菌にスペクトルを有する抗菌薬の適正使用の推進が黄色ブドウ球菌の耐性率の減少に影響を与えているものと考えられる。しかしながらグラム陽性球菌に抗菌活性のあるベンジルペニシリンと MRSA 分離率の低下には相関が認められなかった。この原因は AUD つまり投与量が過小であった可能性があるかと推察する。

相関が認められなかった緑膿菌にスペクトルのあるカルバペネム系抗菌薬などのいわゆる広域抗菌薬においても、前者に比べて活性は低いながらもグラム陽性菌にもスペクトルがある。グラ

ム陽性菌に効果がある抗菌薬を使用することが MRSA 分離率の低下に寄与しているとする
と、過小投与の是正または長期使用の改善で AUD/DOT がより上昇した場合に相関が認め
られる可能性がある。この点に関して今後の継続した検討が必要である。

先行研究において Bantar らは第 3 世代セファロスポリンの使用量が MRSA の分離率に影
響を与えると報告しており、本研究は、この内容を一部支持する結果である^[18]。本研究結果
は第 3 世代セファロスポリンのみならず、第 1 世代および第 2 世代セファロスポリンの使用量
も MRSA の分離率に大きく影響しており、狭域な抗菌薬の使用が重要と考えられる。

一方、抗菌薬使用量が MRSA の分離率に影響を与えないとの報告もあるが^[19]、いずれの
研究も抗菌薬使用量に主眼を置いており、使用日数を含めた AUD/DOT での検討がされて
いない点は我々の研究との相違点である。また病院の規模、診療科、施設環境、AUD の違
いなども差異を生む大きな原因であると考えられる^[20]。

当院の AUD/DOT の改善度合いは 2015 年から 2016 年にかけて大きく上昇している。これ
は 2016 年から開始された AST 業務による影響が大きいと考えられる。当院における AST 業
務では主に薬剤師の介入により、時間依存性抗菌薬や濃度依存性抗菌薬といった薬学的な
PK/PD 理論に則り抗菌薬の用法用量について適正使用を推進してきた。また使用日数が 7
日、14 日、22 日以上経過した抗菌薬を抽出し医師に継続の必要の是非を検討し、無駄な長
期投与症例の増加を抑制してきた。さらにミーティングにおいて感染症科医師や細菌検査技
師とも協議を行うことで抗菌薬の適切な選択および長期使用化の防止と是正を図ってきたこと
が結果として現れたものと考えられる。

第2章 呉医療センターで分離された MRSA の分子疫学的解析

第1節 緒言

黄色ブドウ球菌は大きさが 0.5 μm ~2.5 μm の通性嫌気性のグラム陽性球菌であり、ぶどうの房状の形態をなす特徴を持つ。マンニト分解性を有し、高濃度食塩下(5.8~25%)でも増殖能を有し、人の常在菌であり手指、鼻腔内、咽頭などに分布しており成人の 20~30%が保有しているとされる^[21, 22]。

伝播様式は接触感染とされ、院内感染の主な原因菌として悪名高く、感染症の治療としても難渋することもあり、患者への負担および医療経済の損失を招いている。よって感染対策を行う上で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や、菌の遺伝子的特徴を把握する必要がある。

今回用いた PFGE は、菌株の全ゲノム DNA を制限酵素で切断し、切片を電気泳動により分離し、得られた電気泳動パターンを利用して遺伝子型を決定するものである。電気泳動により得られたバンドパターンは Tenover らのガイドラインに基づいて解析され、バンドパターン間の相同性の計算後、系統樹の作成が可能である。手技がやや煩雑であることやゲノム構造の大きく異なる国際間での比較は困難であるなどの欠点はあるが、本研究のように限定された地域や限定された期間内に検出された菌株の解析には適しているとされる。

第1章では、特定の抗菌薬の AUD/DOT と MRSA 分離率に相関が認められた。このことを踏まえて分子疫学的解析を行い、当該地域における MRSA の特性を調査した。

第 2 節 方法

1. パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulse-field gel electrophoresis: PFGE)

PFGE は以前に報告された方法で行った^[23]。MRSA を Luria-Bertani (LB) 培地で一夜培養し、菌液 1 mL に LB 培地を加えて 620 nm での吸光度が 1.0 ~ 0.9 の菌液を調製した。調製した菌液 200 μ L を遠心 (12,000 \times g, 3 分間) した。上清を除き Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8]) を 300 μ L 加えよく懸濁し、37°C の水浴で 10 分間インキュベーションした。Lysostaphin (L7386, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) のストック溶液 (1 mg/ml in 20 mM sodium acetate [pH 4.5]) を 4 μ L、60°C で保温した 1.5% Certified Low-Melt agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を 300 μ L 加え混合後、手早くプラグモールド (BIO-RAD) に流し込み 4°C で 15 分間静置した。EC Lysis buffer (6 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauroylsarcosine) を 3 mL 入れたチューブに固相化したサンプルプラグを入れ、37°C の水浴で 4 時間ゆっくり振盪した。EC Lysis buffer を除き、4 mL の TE buffer を加えて室温で 30 分間振盪した (4 回繰り返す)。4 mL の TE buffer を加え 4°C で保存した。サンプルプラグを半分切断し、200 μ L の 1 \times 制限酵素緩衝液を加えて 30°C で 15 分間インキュベーションした。制限酵素緩衝液を除き、200 μ L の SmaI (1085A, 10 U/ μ l; Takara Bio, Shiga, Japan) を含む制限酵素緩衝液を加えて 30°C で 3 時間インキュベーションした。1.0% PFGE agarose を 0.5 \times TBE (Bio-Rad Laboratories) に加え、加温溶解後トレーに流し固めた。サンプルプラグから制限酵素溶液を捨て、200 μ L の 0.5 \times TBE を加え室温で 5 分間静置した。泳動ゲルのウェルにサンプルプラグを入れ、マーカーである λ Ladder (1703635, Bio-Rad) と共にパルスフィールド電気泳動装置 CHEF DR-II (Bio-Rad) にて電気泳動 (Volts = 200 (6 v/cm), Temp = 14°C, Initial switch = 5 seconds, Final switch = 40 seconds, Run time = 20 hours) を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイド (0.3 μ g/mL) を含む 0.5 \times TBE 溶液中で染色し、トラン

スイルミネータ (Printgraph AE-6914, ATTO, Tokyo, Japan)で観察し撮影した。得られたバンドパターンを基に BioNumerics software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)で系統樹を作製した。クラスター解析は非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean: UPGMA)により行い、解析には Dice 係数 (tolerance: 1.25%, optimization: 0.5%)を使用した。類似度 80%以上を同一のパルスフィールドタイプクラスター (PFT)とした。

2. SCCmec タイピング

SCCmec タイピングは以前に報告された方法で行った^[24]。LB 寒天培地で一夜培養した MRSA のコロニーの 1~2 個を滅菌されたチップで採取し、100 μ L の DNA 抽出試薬混合液 (Kanto chemical, Tokyo, Japan) に加え混合した。72°C で 6 分間、94°C で 3 分間インキュベーションし、これを template DNA とした。ccr 遺伝子複合体と mecA 遺伝子を検出できる 8 種類の primer (Table 2) を用いて PCR を行った。PCR 反応液は、10 \times buffer 2.5 μ L、dNTP (2.5 mM) 2 μ L、primer 8 種 各 0.125 μ L (全 1 μ L)、template DNA 0.5 μ L、Taq DNA polymerase 0.25 μ L (Takara Bio)、滅菌水 を加えて全量を 25 μ L に調製した。PCR 条件は、94°C で 2 分間インキュベーションした後、94°C で 30 秒間、57°C で 1 分間、72°C で 1 分間を 30 回繰り返す、72°C で 2 分間インキュベーションした。PCR 産物は 2% アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイド (0.3 μ g/mL) で染色後、バンドをトランスイルミネータ (ATTO) で観察した。

Table 2

Primer	Sequence (5'→3')
SCCmec typing	
β c	ATTGCCTTGATAATAGCC[I]TCT
α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACT
γ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT
γ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT
F 1272	GCCACTCATAACATATGGAA
R 1272	CATCCGAGTGAAACCCAAA
mA7	ATATACCAAACCCGACAACACTACA
R 5R431	CGGCTACAGTGATAACATCC
coa typing	

coa1F	GCATTGGATATTTTAGAGAC
coa1R	AGAGGCACAATTTACTGGA
coa2F	AGAGGCACAATTTACTGGA
coa2R	CCATCTTTATCAAAGTGC
coa3F	GCTCTATATTATTTGGAAGACT
coa3R	GAAAATCATCCAGTGCTCTC
coa4F	AAAGTGAAAATCCACATTCTAG
coa4R	TCTCTATTTTCAGGCTTATTA
coa5F	GAGAAAGATATTTAAAAGCTGG
coa5R	TTCTTTGTTATCTTTAGGGCT
coa6F	TTACTTTTGGGGGAAAATCG
coa6R	CCATAGTTAGATTATATACAC
coa7F	TTCATTTACTGGATCAGC
coa7R	GTAAATCGCCAAGATCG
coa8F	CACTTATTACTGGGGAGT
coa8R	CTTTTTCGACTGTATATCATC
femAF	AAAAAAGCACATAACAAGCG
femAR	GATAAAGAAGAAACCAGCAG
coa6aF	GTGAATCTGAAACAAAATCGCCAGTA
coa6aR	GTAAATTGAGGTCTCGCTGG
coa6b1F	GTTGAAGAAACGAAAAAAGCAGTTAAAG
coa6b1R	GTATAATTATCGCTTAATGATGGTCTGT
coa6b2F	GAAGTCTTTTGACAAAAGTAG

coa6b2R ATTCGGTTAGGGTTATCAGA

MLST

arc up TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC

arc dn AGGTATCTGCTTCAATCAGCG

aro up ATCGGAAATCCTATTTACATTC

aro dn GGTGTTGTATTAATAACGATATC

glp up CTAGGAACTGCAATCTTAATCC

glp dn TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC

gmk up ATCGTTTTATCGGGACCATC

gmk dn TCATTA ACTACAACGTAATCGTA

pta up GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG

pta dn GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA

tpi up TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA

tpi dn TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC

yqi up CAGCATA CAGGACACCTATTGGC

yqi dn CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

Pvl

luk-PV-1 ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA

luk-PV-2 GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC

3. POT 法

POT 型の決定はシカジーニアス分子疫学解析 POT キット(黄色ブドウ球菌用)(Kanto chemical)を使用した。PCR の template DNA は上記で採取したものをを使用した。反応溶液の調製や PCR の反応条件は添付の説明書に従い実施した。Reaction mixture 1 は、試薬 A, B, C をそれぞれ 4 μL ずつ混合し、template DNA を 8 μL 加えた。PCR 条件は 94°C で 15 秒間、60°C で 3 分間を 30 回繰り返した。Reaction mixture 2 は、試薬 A, B, D をそれぞれ 4 μL ずつ混合し、template DNA を 8 μL 加えた。PCR 条件は 94°C で 15 秒間、60°C で 3 分間を 30 回繰り返した。PCR 産物は 4%アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイド (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で染色後、バンドをトランスイルミネータ(ATTO)で観察した。

4. コアグララーゼ遺伝子タイピング(*coa* typing)

コアグララーゼ遺伝子タイピングは以前に報告された方法で行った^[25]。PCR の template DNA は上記で採取したものをを使用した。また、使用した primer は Table 2 に示した。PCR 反応液は、10 \times buffer 2.5 μL 、dNTP (2.5 mM) 2 μL 、primer 各 0.15 μL 、template DNA 2.5 μL 、Taq DNA polymerase 0.25 μL (Takara Bio)、滅菌水 を加えて全量を 25 μL に調製した。PCR 条件は、94°C で 4 分間インキュベーションした後、94°C で 30 秒間、57°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間を 30 回繰り返す、72°C で 7 分間インキュベーションした。PCR 産物は 2%アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイド (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で染色後、バンドをトランスイルミネータ(ATTO)で観察した。

5. MLST (Multilocus sequence typing)

MLST は同一の PFGE グループに属する菌株から 2 菌株について実施した。以前、同じ PFGE グループに属する菌株は同一の ST (sequence type) や同一の ST に関連する CC

(clonal complex)を有していることが報告されている^[26]。MLST は以前報告された方法で行った^[27]。PCR の template DNA は上記で採取したものを使用した。各ハウスキーピング遺伝子の増幅は Table 2 に示す primer を用いた。PCR 反応液は、10×buffer 2.5 μL、dNTP (2.5 mM) 2 μL、primer 各 1 μL、template DNA 5 μL、Taq DNA polymerase 0.5 μL (Takara Bio)、滅菌水 を加えて全量を 50 μL に調製した。PCR 条件は、94°C で 2 分間インキュベーションした後、94°C で 30 秒間、55°C で 1 分間、72°C で 30 秒間を 30 回繰り返す、72°C で 10 分間インキュベーションした。増幅断片は磁気ビーズ AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA) で精製し、遺伝子配列の決定に用いた。得られた塩基配列を基に MLST database (<https://pubmlst.org>)にて ST を決定した。

6. PVL (Panton-Valentine leukocidin) の検出

PVL の検出は以前に報告された方法で行った^[28]。PCR の template DNA は上記で採取したものを使用した。PVL 遺伝子の増幅は Table 2 に示す primer を用いた。PCR 反応液は、10×buffer 2.5 μL、dNTP (2.5 mM) 2 μL、primer 2 種 各 0.5 μL (全量 1 μL)、template DNA 2.5 μL、Taq DNA polymerase 0.25 μL (Takara Bio)、滅菌水 を加えて全量を 25 μL に調製した。PCR 条件は、94°C で 2 分間インキュベーションした後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間を 30 回繰り返した。PCR 産物は 2%アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイド (0.3 μg/mL) で染色後、バンドをトランスイルミネータ (ATTO) で観察した。

7. 毒素の検出

MRSA の培養上清に含まれる毒素は reverse passive latex agglutination (RPLA)にて検出した。使用した試薬はそれぞれデンカ生研より購入した、エンテロトキシン (SET-RPLA)、毒素性ショック症候群毒素 1 (TSST-1) および表皮剥脱毒素 (EXT-RPLA) 検出キットを用いた。培

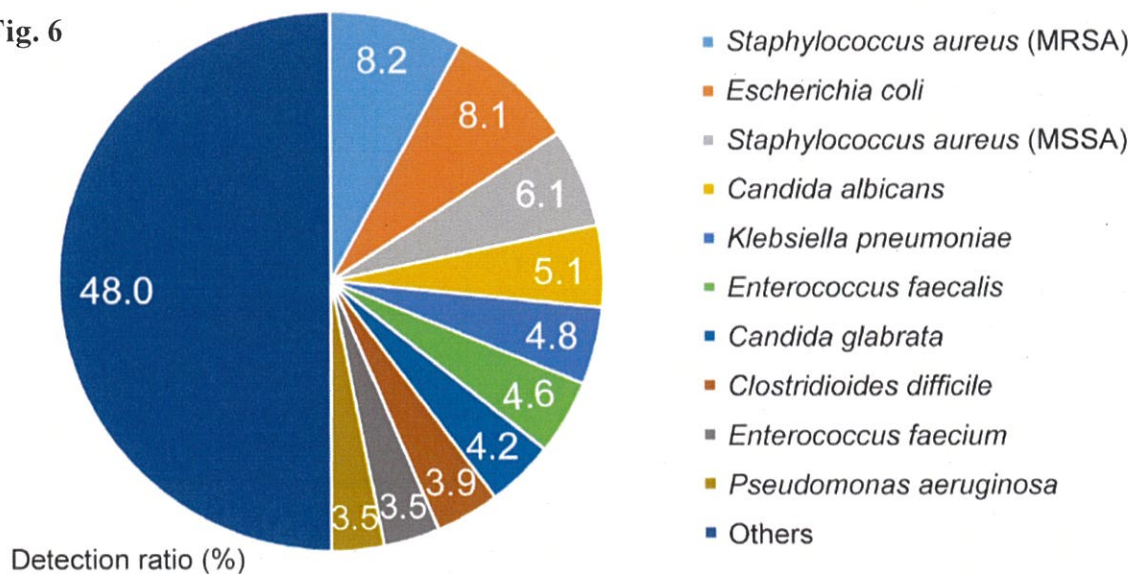
養上清は検出感度により2倍から10倍希釈したものを使用し、試薬と混合して16時間後に判定を行った。

第3節 結果

1. 当院で検出率の高い菌種について

第2章の研究では2017年から2019年の3年間当院においてMRSA株を材料に検討を行った。2017年から2019年の総検体数は12,932件であった。Fig. 6に示すように検出率の高い上位10菌種は全体の半数以上を占めており、その中でも菌別にみるとMRSAは最多の8.2%で、次いで大腸菌、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)、カンジダ・アルビカンスだった。Table3には検体が得られた部位を示しており、喀痰や皮膚・創部、血液検体のみならず、カテーテルなども含まれていた。

Fig. 6



2. 分子疫学的解析

2-1. PFGE による解析と系統樹解析

2017年から2019年にかけて当院で分離されたMRSA1,063株のうち237株についてPFGE解析を行ったところ、3年間を通して80%以上の遺伝的類似性を有する5株以上の分離株からなる12種類のPFGEタイプ(タイプA~L)が明らかになり、PFGEタイプA~Lに属するMRSA分離株は77株であった。(Fig. 7)

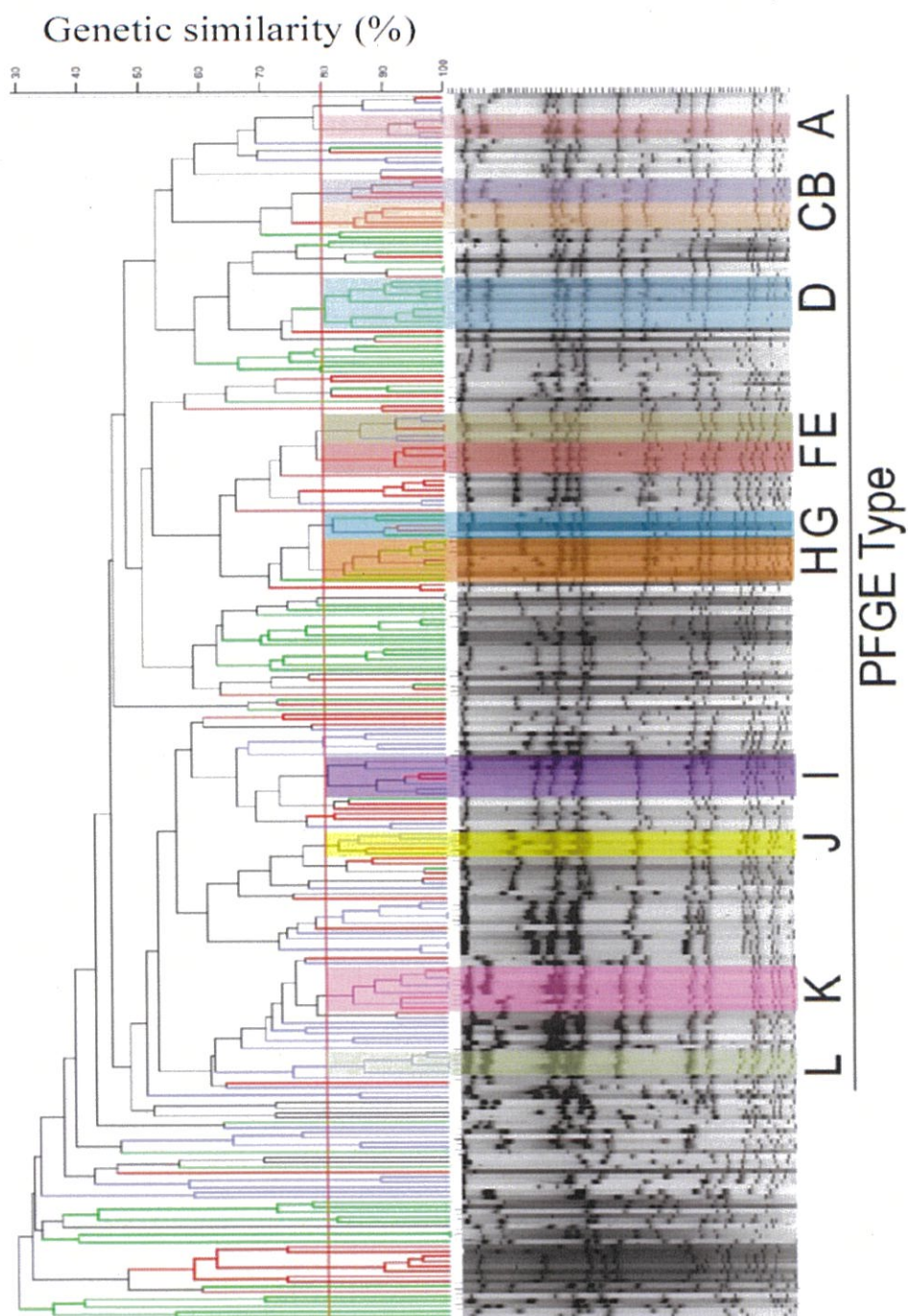


Fig. 7

A～L にタイプ分けされた株について、分離された期日に着目した結果、Table3 に示すように、2017 年から 2018 年初めにかけて PFGE タイプ C, F, G が、2018 年は主に PFGE タイプ B, E、2018 年から 2019 年にかけては PFGE タイプ A, D, H, I, J, K, L がそれぞれ分離されており、各年において優勢なタイプに違いがみられた。

Table 3 Drug resistance findings of MRSA clinical strains and their origins of their samples

PFGE Type	Strain number	Collection	Origin of the sample	Age	Gender	Resistance to antibacterial agents [R, resistant (filled with gray); S, sensitive; I, intermediate]																											
						ABPC	MPPC	AZM	PCG	CEZ	CTM	EM/CLDM	DAP	CFDN	CFPM	CMZ	EMOX	IPM	MEPM	ABPC/SBT	CFZ/SBT	TZY/FPF	ABK	GM	CLDM	MINO	TEIC	VCM	CPFX	LVPX	FOM		
A	KI-101	2018	Pharyngeal mucus	71	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	
	KI-203	2019	Sputum	81	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-230	2019	Sputum	79	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	
	KI-234	2019	Intratracheal sputum	59	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-239	2019	Sputum	90	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-127	2018	Natural urination	85	M	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
B	KI-137	2018	Obstructive pus	77	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-150	2018	Obstructive pus	47	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-151	2018	Indwelling catheter urine	85	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-153	2018	Ear secretions	64	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-155	2018	Ear secretions	76	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-007	2017	Sputum	81	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
C	KI-012	2017	Pressure ulcer	80	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-016	2017	Sputum	87	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-021	2017	Abdominal drain tip	74	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
	KI-028	2017	Indwelling catheter urine	42	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-043	2017	Skin	58	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-045	2017	Sputum	74	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-050	2017	Sputum	76	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-058	2017	Feces	60	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	KI-063	2017	Indwelling catheter urine	92	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R

Table 3 (continued)

PFGE Type	Strain number	Collection	Origin of the sample	Age	Gender	Resistance to antibacterial agents [R, resistant (filled with gray); S, sensitive; I, intermediate]																											
						ABPC	MPPC	AZM	PGI	CEZ	GTM	ENM/CLDM	DAP	CFDN	CEPM	CMZ	FMOX	IPM	MEPM	ABPC/S	BT	CPZ/SBT	PPC/TAZ	ABK	GM	CLDM	MINO	TEIC	VCM	CPIX	LVPX	FOM	
D	KI-132	2018	Open pus	63	M	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-138	2018	Sputum	84	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-201	2019	Venous blood	73	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-220	2019	Sputum	86	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-224	2019	Sputum	80	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
E	KI-236	2019	Intratracheal sputum	89	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-126	2018	Open pus	65	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-142	2018	Venous blood	74	F	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-143	2018	Indwelling catheter urine	74	M	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-145	2018	Wound	75	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-146	2018	Urine collection catheter	59	M	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-152	2018	Indwelling catheter urine	88	M	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-019	2017	Venus blood	83	F	R	R	S	R	R	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-020	2017	Obstructive pus	32	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-031	2017	Open pus	71	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
F	KI-083	2018	Skin	87	F	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-087	2018	Venus blood	80	F	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-044	2017	Open pus	81	F	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-053	2017	Intratracheal sputum	93	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
	KI-054	2017	Sputum	71	M	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
G	KI-055	2017	Venus blood	71	M	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-056	2017	Sputum	83	F	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-067	2017	Feces	59	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	
	KI-079	2017	Nasal cavity	0	F	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	

また得られた 77 株の PFGE タイプの抗菌薬感受性試験結果も示しており、今回の調査においてバンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、アルベカシン (ABK)、ダプトマイシン (DAP) などの抗 MRSA 薬に感受性があり、これらの薬が分離株に対して治療的に有効であることを示している。

2-2. SCCmec 遺伝子型の確認

Table4 に分離された MRSA 株の SCCmec 遺伝子型を示す。3 年間を通して 92%の株が SCCmec type II または IV に属していた。SCCmec type IV は 2018 年が他の年よりも多く分離されていた。

Table 4 Transition of SCCmec types of the 237 MRSA isolates subjected to PFGE analysis

SCCmec Type	Number of isolates (rates, %)		
	2017 (n=77)	2018 (n=80)	2019 (n=80)
I	0 (0)	0 (0)	4 (5)
II	30 (39)	26 (33)	31 (39)
III	0 (0)	0 (0)	1 (1)
IV	41 (53)	53 (66)*	38 (47)
V	5 (7)	0 (0)	4 (5)
NT	1 (1)	1 (1)	2 (3)

NT, nontypeable

* $P < 0.05$ vs 2019

2-3. MLST による解析

Table 5 に MLST による解析結果を示す。3 年間を通して CC1、CC5、CC8 の各クローンが優位に分離された。2019 年に CC1 クローンの有病率が著しく低下していた。

Table 5 Transition of clonal types of the 237 MRSA isolates subjected to PFGE analysis

CC (ST)	Number of isolates (rates, %)		
	2017 (n=77)	2018 (n=80)	2019 (n=80)
1 (1)	14 (18)	24 (30)	7 (9)**
5 (5, 764)	31 (41)	21 (26)	27 (34)
8 (8, 380)	21 (27)	22 (28)	27 (34)
30 (30)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
121 (121)	4 (5)	0 (0)	1 (1)
NT	6 (8)	13 (16)	18 (22)

NT, nontypeable

** $P < 0.01$ vs 2018

2-4. *pvl* 遺伝子の有無

Table 6 に示すように、2017 年から 2018 年に分離された 157 株の MRSA はいずれも *pvl* 遺伝子を保有していなかったが、2019 年に分離された 80 株の MRSA のうち 4 株が *pvl* 遺伝子を保有しており、さらにその 4 株のうち、3 株が CC8 (ST8) MRSA 株であった

Table 6 Prevalence of *pvl* gene in 237 MRSA isolates subjected to PFGE analysis

<i>pvl</i>	Number of isolates (rates, %)		
	2017 (n=77)	2018 (n=80)	2019 (n=80)
-	77 (100)	80 (100)	76 (95)
+	0 (0)	0 (0)	4 (5)

2-5. コアグララーゼ遺伝子タイピング

各年とも 90% 近くの MRSA 分離株が *coa* type 2, 3, 5, 7 のいずれかの遺伝子を保有していた (Table 7)。このうち 2018 年から 2019 年にかけて、*coa* type 5 および 7 の MRSA 分離株は大幅に減少していた。

Table 7 Transition of *coa* genotypes of the 237 MRSA isolates subjected to PFGE analysis

<i>coa</i> Type	Number of isolates (rates, %)		
	2017 (n=77)	2018 (n=80)	2019 (n=80)
1	2 (3)	0 (0)	0 (0)
2	11 (14)	27 (34)**	33 (41)**
3	23 (30)	29 (36)	32 (40)
4	2 (2)	1 (1)	4 (5)
5	20 (26)	0 (0)**	2 (3)**
7	11 (14)	20 (25)	8 (10)*
8	2 (3)	0 (0)	0 (0)
NT	6 (8)	3 (4)	1 (1)

NT, nontypeable

* $P < 0.05$ vs 2018

** $P < 0.01$ vs 2017

2-6. 毒素産生性の確認

Table 8 に毒素産生性と分子疫学的所見をまとめた。PFGE 解析結果の項で示したように、ほぼすべての MRSA 分離株が SCC*mec* type II か IV を保有しており、PFGE type は年毎に変化をみせた。毒素産生性については剥離性毒素 A または B を産生した株はなかった。サイトカインストーム様の中毒性ショック症候群を引き起こす TSST-1 を産生する株は僅かであったが^[29]、2019 年に分離された PFGE type L に属する 5 株がすべて TSST-1 を産生していた。各種 staphylococcal enterotoxin の産生は、PFGE type I を除く各 PFGE タイプで一定の割合で認められた。また、今回分離された MRSA 株の分子疫学的特徴と staphylococcal enterotoxin には次のような傾向が得られた。

まず、SCC*mec* type II を持つ株のほとんどが Enterotoxin B か C を産生し、SCC*mec* type IV を持つ株のほとんどが Enterotoxin A を産生することがわかった。

次に、staphylococcal enterotoxin A (SEA) の産生が検出された株は、すべて MLST が CC1 であった。また、staphylococcal enterotoxin B (SEB) の産生が検出された 26 株のうち 22 株 (約 85%) は、*coa* 遺伝子の type 2 を有していた。

さらに staphylococcal enterotoxin C (SEC) の産生が認められた 17 株のうち、12 株が MLST の CC5 で、5 株が CC8 であった。

Table 8 Molecular biological and bacteriological features of 77 MRSA isolates subjected to PFGE analysis

Year	no. of isolates	PFGE type	Major genotypes included in each PFGE type				no. of isolates producing each virulence factor belonging to each PFGE type (ratio, %)								
			SCCmec	CC	coa type	<i>pvl</i>	Enterotoxin A	Enterotoxin B	Enterotoxin C	Enterotoxin D	TSST-1	Exfoliative toxin A	Exfoliative toxin B		
2017	10	C	2	5	2	0(0)	0(0)	6(60)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2017	7	G	4	1	7	0(0)	3(43)	1(14)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2017-2018	5	F	4	1	7	0(0)	3(60)	0(0)	1(20)	0(0)	0(0)	0(0)	1(20)	0(0)	0(0)
2018	6	B	2	5	2	0(0)	0(0)	6(100)	2(33)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2018	6	E	4	1	7	0(0)	5(83)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2018-2019	5	A	2	5	2	0(0)	0(0)	4(80)	1(20)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2018-2019	6	D	4	1	7	0(0)	4(67)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2018-2019	8	H	4	8	3	0(0)	0(0)	1(13)	2(25)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)
2018-2019	5	I	4	8	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2018-2019	9	K	2	5	2	0(0)	0(0)	8(89)	4(44)	0(0)	0(0)	1(11)	0(0)	0(0)	0(0)
2019	5	J	4	8	3	0(0)	0(0)	0(0)	2(40)	0(0)	0(0)	2(40)	0(0)	0(0)	0(0)
2019	5	L	2	5	2	0(0)	0(0)	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)

第 4 節 考察および小括

当院で分離された上位 10 菌種はいずれも日常生活にありふれており、通常その多くは常在菌として存在している。既知の通り、これらが院内感染の主要な菌種となり得ることが図(Fig 6.)からも示唆されている。Table 3 にも示しているように検体の種類としては喀痰や皮膚・創部などが多くを占めているが、カテーテルからの検出もみられ、院内での手指消毒などの感染対策が積極的に進められている今般でも、医療機器の細菌汚染が解消されていない可能性が示唆される。

PFGE type は年毎に優勢なタイプが変化しており、市内や院内で感染した可能性がある。したがって特定の起源に由来する MRSA 株や遺伝子的に近縁な株が毎年患者の間で保有されていることが推察される。どのタイプの MRSA 株が流行しているかを認識することは、株の特徴を踏まえた感染予防や治療を行う上で重要であると考えられる。

薬剤感受性試験は抗 MRSA 薬に対する耐性はみられなかったが、グループ分けされた 77 の分離株以外の分離株についても、抗 MRSA 薬に感受性があり、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)などの耐性が当該地域ではまだ進んでいないことが示唆された。既知の通り、得られた分離株に対する β -ラクタム系抗生物質の抗菌活性は示さず、さらにほとんどの分離株は、フルオロキノロン(CPFX、LVFX)、マクロライド(AZM、EM)、およびリンコマイシン(CLDM)に耐性がみられた。

SCC*mec* 遺伝子型に関しては 92%がタイプ II か IV であり、これらが当該地域に広く分布していると考えられる。香川県の膿痂疹患者から分離された MRSA を対象とした研究^[30]でも SCC*mec* type II または IV の MRSA が主に分離されていたようだが、本研究結果と比較して、SCC*mec* type V の MRSA も多く分離されていたことがわかった。このように MRSA の分布状況は地域ごとに異なっていることが考えられる。

MLST 解析の結果では 3 年間を通して CC1、CC5、CC8 の各クローンが優位に分離され、2019 年の CC1 クローンの有病率が著明に低下していることがわかった。データには示していないが、2017 年から 2019 年の間に当院で MRSA が分離された感染症を発症した患者の割合は、CC5 と CC8 のクローン複合体を持つ MRSA によるものが最多だった。したがって、感染症を直接引き起こす病原体として、CC5 や CC8 のクローン複合体を持つ MRSA 株の動向を注視する必要があると考えられる。

pvl 遺伝子は 2019 年に分離された 80 株のうち 4 株が陽性その 4 株のうち、3 株が CC8 (ST8)MRSA 株であったことから、USA300 と同じクローン株である可能性が示唆される。USA300 株は病原性が強く、米国では公衆衛生上の問題となることが知られており^[31-33]、CC8 (ST8)に属し、病原因子 *pvl* を産生する能力を持つことが特徴である。この結果から強毒性の MRSA 株が当該地域で徐々に伝播している可能性が否定できず、今後も注意深く観察していく必要があると考えられる。また *coa* 遺伝子型解析の結果からも、特定の遺伝子型を持つ MRSA 株が優勢であり当該地域で広く分布していることが示唆された。

Staphylococcal enterotoxin 産生性と分子疫学的特徴には傾向があるようにみられた。Varshney らは、異なるクローン背景における様々な staphylococcal toxin 遺伝子の頻度を報告している^[34]。その報告では、MLST で CC5 と CC8 を持つ MRSA 株では、SEC 遺伝子の検出頻度が比較的高いことが示されていた。この結果は、本研究で SEC 生産性を示した MRSA 分離株の CC 型と関連しているように思われた。

しかし、MLST で CC1 を持つ MRSA 株では SEA 遺伝子が検出されなかったことが報告されており、この結果は本研究で得られた staphylococcal enterotoxin 産生性と MLST の関係とは異なる点である。

同様の研究が Rasmussen らによって報告されている^[35]。これらの研究結果を総合的に考えると、特定の MLST を持つ MRSA 株だけが特定の種類の staphylococcal enterotoxin を産生するとは無条件に言えない。

このように、MLST などの分子疫学的特性は、MRSA の菌株間の遺伝的背景を示しているにすぎず、これらの特性だけで病原性を評価することはできないと思われる。しかしながら、毒素産生量や遺伝子型など様々な特性を組み合わせることで、MRSA の特性をより正確に理解する一助になるのではないかと考える。また、MRSA の特性を詳細に把握することで、より適切な治療薬の選択など、医療現場での対応にもつながると考える。

総括

近年、抗菌薬に対する耐性 (AMR) を獲得することが社会的な問題として取り上げられてきた。もし何も対策を取らず現在のペースで AMR が増加した場合、2050 年には世界中で 1,000 万人の死亡が想定されている。この数は現在のがんによる死亡者数を超えることになるという試算がある。このような経緯から 2015 年 5 月の世界保健総会では、AMR に関するグローバル・アクション・プランが採択され AMR の制御は世界規模のプロジェクトとなっている。我が国の医療機関においては 2007 年 4 月の改正医療法で、すべての医療機関において管理者の責任の下で院内感染対策のための体制の確保が義務化されている。そのため、医療施設内で抗菌薬使用の適正化を図り、耐性菌の出現・拡大を防止する取り組みが重要になっている。

このような状況下で実臨床において使用される抗菌薬は多種多様である上に、どの抗菌薬をどの程度使用すると耐性菌の出現や拡大のリスクが高まるのか、また耐性菌の地域内における拡散などについての情報は本邦において過去に殆んど報告がなく、評価するためのデータも乏しいのが現状である。そこで本研究では、地域の複数医療施設における抗菌薬使用数量や分離された耐性菌の細菌学的な基礎データの集積と解析を行った。

第 1 章では 2015 年から 2019 年の当院における抗菌薬使用密度および使用日数と MRSA 分離率の関係性の調査を行ったところ、全抗菌薬の AUD/DOT 比の増加と MRSA 分離率の低下には相関が認められ、AUD/DOT での評価の有用性が示された。とくにグラム陽性菌にスペクトルを有す抗菌薬の AUD/DOT を上昇させることが MRSA 分離率抑制に繋がることが示唆された。AUD/DOT の改善には AST 業務による抗菌薬適正使用推進が寄与していると考えられるため継続した介入が重要であると結論付けた。

第 2 章では当該地域での MRSA の分布状況を遺伝子学的観点から確認するために、分子疫学的解析を行った。2017 年から 2019 年に分離された菌株の遺伝子型別分類を実施し

た結果、分離年代ごとの当該地域における主要なクローンとその特徴が明らかになった。経時的な遺伝子型の推移を明らかにすることで、アウトブレイクによる菌の分布を知ることができ、迅速な感染防止対策を講じるための重要な情報となると考えられる。

一般的に菌株を区別する方法として、遺伝子解析の実施できない医療機関では主に薬剤感受性パターンで区別する方法があるが、臨床的には近縁と考えられない菌株でも実際には同一のグループで分類されるため、遺伝子解析を実施し地域での流行株等を把握することは感染対策上意義があると考えられた。

抗菌薬使用状況と MRSA の遺伝子型の関係性については、各年代における注射薬の AUD/DOT 比の増加が、分離された MRSA の遺伝子型に変化を及ぼした可能性もあるが、今回実施した調査期間や範囲が限定されており、明確な関係性を示すデータの取得には至っていない。

我が国において医療施設の抗菌薬使用状況に加え MRSA の遺伝子型解析を行った報告例は少なく、本研究は新たな抗菌薬管理プログラムの基盤の策定に向けた取り組みの一つとして役立つと考えており、今後も医療機関と研究機関が協力し継続した調査研究が必要である。

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました広島国際大学薬学部
医療薬学研究センター 三宅 勝志 教授、佐和 章弘 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御助言を頂きました広島国際大学薬学部
微生物科学研究室 山中 浩泰 教授、小林 秀丈 講師、清家 総史 助教に心から感謝
致します。

また、臨床検体の提供に御協力頂きました、独立行政法人国立病院機構呉医療センター
細菌検査科の東谷 麻未 技師、および本研究を遂行するにあたりご協力を頂きました同院
薬剤部の松久 哲章 薬剤部長に篤く感謝の意を表します。

最後に、実験を遂行するにあたり御協力を頂きました広島国際大学薬学部分子微生物科
学研究室諸氏に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. 徳本 史: 【中小規模施設・診療所・在宅・成育・老健などでの感染対策 改正医療法への対応を含めて】医療法に規定されている院内感染対策. *INFECTION CONTROL* 2008, **17**:528-533.
2. 小笠原 康, 荒川 隆, 池本 雅, 岡本 麻, 岡野 太, 竹山 知, 土井 久, 藤井 秀, 松本 俊, 向田 俊, et al: 広島県下 19 施設における抗菌薬使用密度と耐性菌検出率に関するサーベイランス. *日本環境感染学会誌* 2011, **26**:378-384.
3. 藤原信二, 綺田尚久, 西嶋長: **Antimicrobial Use Density** 値と緑膿菌薬剤感受性の経時的相関性. *日本病院薬剤師会雑誌* 2017, **53**:448-454.
4. 富永綾, 豊口禎子, 細谷順, 白石正, 今田恒夫: 抗菌薬の **Antimicrobial Use Density** および **Days of Therapy** と耐性率の検討. *山形医学* 2019, **37**:8-18.
5. 院内感染対策サーベイランス検査部門公開情報(2017 年報)
[https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/1/ken_Open_Report_201700.pdf]
6. 厚生労働省:院内感染対策サーベイランス全入院患者部門公開情報(2017 年報)
[https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/2/zen_Open_Report_201700.pdf]
7. Ito T, Hiramatsu K: **Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Yonsei medical journal* 1998, **39**:526-533.
8. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome E: **Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009, **53**:4961-4967.
9. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T: **Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011, **55**:3046-3050.
10. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC: **Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011, **55**:3765-3773.
11. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM: **Exotoxins of Staphylococcus aureus.** *Clin Microbiol*

- Rev 2000, **13**:16-34, table of contents.
12. Hu DL, Nakane A: **Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis.** *Eur J Pharmacol* 2014, **722**:95-107.
 13. Oliveira D, Borges A, Simões M: **Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases.** *Toxins (Basel)* 2018, **10**.
 14. Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D: **Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: community transmission, pathogenesis, and drug resistance.** *J Infect Chemother* 2010, **16**:225-254.
 15. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M: **A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance.** *BMC Infect Dis* 2014, **14**:13.
 16. Dancer SJ, Kirkpatrick P, Corcoran DS, Christison F, Farmer D, Robertson C: **Approaching zero: temporal effects of a restrictive antibiotic policy on hospital-acquired Clostridium difficile, extended-spectrum β -lactamase-producing coliforms and methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Int J Antimicrob Agents* 2013, **41**:137-142.
 17. 池本雅章, 安原昌子, 山口伸二, 綾部ゆか, 荒川隆之, 石井佑佳, 今津智子, 植竹宣江, 宇川大悟, 大森真規, et al: 広島県下 31 施設における抗菌薬使用率に関するサーベイランス. *広島県病院薬剤師会誌* 2021, **56**:11-24.
 18. Bantar C, Sartori B, Vesco E, Heft C, Saul M, Salamone F, Oliva ME: **A hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**:180-186.
 19. Matsumoto K, Shigemi A, Yaji K, Shimodozono Y, Takeda Y, Ikawa K, Morikawa N, Miyanochara H, Kawamura H, Orita M, et al: **Reduction in the incidence of MRSA with use of alcohol-based hand rub solutions and gloves.** *J Infect Chemother* 2012, **18**:269-271.
 20. 齋藤佑輔, 林由紀子, 海崎佳史, 細田清美, 藤澤克憲: **Antimicrobial Stewardship Team 介入とその効果.** *日本病院薬剤師会雑誌* 2017, **53**:681-686.
 21. Parfentjev IA, Catelli AR: **TOLERANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO SODIUM CHLORIDE.** *Journal of bacteriology* 1964, **88**:1-3.
 22. Zemelman R, Longeri L: **CHARACTERIZATION OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM RAW MILK.** *Applied microbiology* 1965, **13**:167-170.
 23. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC: **Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database.** *Journal of clinical microbiology* 2003, **41**:5113-5120.

24. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K: **Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007, **51**:264-274.
25. Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN: **Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**:3453-3456.
26. Deurenberg RH, Vink C, Oudhuis GJ, Mooij JE, Driessen C, Coppens G, Craeghs J, De Brauwier E, Lemmen S, Wagenvoort H, et al: **Different clonal complexes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005, **49**:4263-4271.
27. 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.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**:1008-1015.
28. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J: **Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1999, **29**:1128-1132.
29. Schlievert PM: **Staphylococcal toxic shock syndrome: still a problem.** In *Book Staphylococcal toxic shock syndrome: still a problem* (Editor ed.^eds.), vol. 182. pp. 651-652. City; 2005:651-652.
30. Sasai N, Nakaminami H, Iwasaki M, Iwao M, Misegawa K, Hasui M, Sato M, Yamamoto S, Yoshida T, Asano T, et al: **Clonal change of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from patients with impetigo in Kagawa, Japan.** *The Journal of Dermatology* 2019, **46**:301-307.
31. Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Tendolkar S, McDanel JS, Doern GV: **Continued emergence of USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the United States: results from a nationwide surveillance study.** *Infection control and hospital epidemiology* 2014, **35**:285-292.
32. Lepuschitz S, Huhulescu S, Hyden P, Springer B, Rattei T, Allerberger F, Mach RL, Ruppitsch W: **Characterization of a community-acquired-MRSA USA300 isolate from a river sample in Austria and whole genome sequence based comparison to a diverse collection of USA300 isolates.** *Scientific reports* 2018, **8**:9467.
33. Tenover FC, Goering RV: **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300: origin and epidemiology.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009, **64**:441-446.

34. Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Wang X, Gialanella P, Levi MH, Kreiswirth BN, Fries BC: **Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York.** *Applied and environmental microbiology* 2009, **75**:6839-6849.
35. Rasmussen G, Monecke S, Ehricht R, Söderquist B: **Prevalence of Clonal Complexes and Virulence Genes among Commensal and Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates in Sweden.** *PLoS One* 2013, **8**.