

薬剤感受性, dru塩基長および制限酵素断片分析の MRSA菌株識別精度に関する研究

馬竹美穂¹, 落合 宏², 吉田郁子³, 田澤賢次⁴

¹富山医科薬科大学大学院学系研究修士課程

看護学専攻成人看護学Ⅱ

²富山医科薬科大学医学部看護学科人間科学(1)

³富山医科薬科大学附属病院臨床検査室

⁴富山医科薬科大学医学部看護学科成人看護学Ⅱ

要 約

臨床材料由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)20株,メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)1株の計21株を用い,16剤の薬剤感受性試験を行ったところ,MSSAとは明らかに異なり,MRSAは全株とも12剤に耐性,また2剤(ST合剤,バイコマイシン)に感受性であった。しかし,ゲンタマイシンとミノマイシンに対する感受性は株により異なり,この2剤の感受性パターンに基づいて4タイプに分類された。polymerase chain reaction(PCR)によりmecAおよびdru遺伝子を増幅したところ,これらの遺伝子はMRSA株にのみ検出され,MRSAの同定に有用であることが確認できた。特にdru遺伝子増幅産物の塩基長は株依存性変異を示し,404bpと501bpの2タイプに分類された。パルスフィールド電気泳動法で検出された染色体DNAのrestriction fragment length polymorphism(RFLP)からは13タイプに分類された。また,薬剤感受性タイプのある群とdru塩基長タイプのある群には,それぞれ7つの異なるRFLPタイプが分布したことから,薬剤感受性あるいはdru塩基長タイピングの菌株識別精度は,RFLPタイピングの少なくとも1/7であることが示唆された。菌株の由来病室を指標にしてみたところ,同一RFLPタイプに属した菌株群の一部は特定病室から集中的に分離されており,そこでの交差感染の存在を推定することができた。これらの結果から,感染源・伝播経路追求にRFLP分析は極めて有効な分子疫学的手法であると考えられた。

キーワード

MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌),RFLP,dru,院内感染

はじめに

院内感染は,メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)による院内感染の全国的な広がりを契機に,一段と注目を浴びるようになった。¹⁾MRSA

は,メチシリンに限らず,臨床的に頻用されている多くの薬剤に対しても耐性であるため,基礎疾患のある患者が一度,感染症を起こすと,治療が困難であり時には致命的となる。¹⁾従って,MRSAによる院内感染の減少が,医療現場に限らず社会的にも強く求められてきている。

そのためには感染源、感染経路を明らかにし、的確な対処を行うことが極めて重要であり、このような感染源、感染経路の追及には、同じ院内から分離された多くのMRSA株について個々の菌株を識別できる疫学的手法の導入が基本となる²⁾。その方法として、最初に利用されたのが、抗菌薬感受性パターン、フェージ型あるいはコアグラーゼ型別による識別であったが、今まで比較的良く用いられてきたコアグラーゼ型別において、II型がほとんどを占めるに至った現在ではその有用性が減じつつあり、新たなタイピング法の開発が望まれていた³⁾。そこに登場したのが、プラスミドや染色体DNAの塩基配列の相違に基づく分子疫学（分子レベルで同定された遺伝子及び環境因子と、家族内、地域の疾病の発生、分布、予防との関連に研究する科学的）的手法であり、現在も目的になかった有用な方法とされている^{2~4)}。

MRSAは、その染色体上に β -ラクタム剤耐性化に本質的役割を担っているmecA オペロンを獲得している⁵⁾。mecAオペロンは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: MSSA）には存在しない細胞壁合成酵素であるペニシリン結合蛋白2'（PBP-2'）をコードしている。またmecAの約2.5キロ塩基（kb）下流には、トランスポゾンの転移酵素をコードしているIS431と呼ばれる領域があり、この部位に遺伝子の挿入が起こりやすいとされている。mecAとIS431とは含まれた約2 kbの領域は株間で多型性がみられ、hypervariable regionと呼ばれており、dru遺伝子が存在している⁴⁾。このmecAとdru遺伝子が遺伝子増幅反応（polymerase chain reaction: PCR）の標的領域として、しばしば用いられている。一方、制限酵素断片解析（restriction fragment length polymorphism: RFLP）は、染色体DNAを制限酵素で切断しそのパルスフィールドゲル電気泳動（pulsed-field gel electrophoresis: PFGE）によりパターンを比較する方法であるが、その多様性と分析精度から病院内などの狭い範囲の感染経路を追跡するには最も優れた方法の一つと言われている²⁾³⁾。

看護は患者のみを対象としている訳ではない。

特に感染症の分野では、その発生予防を働きかけるのも看護領域分野として重要である⁶⁾。現在多くの医療施設において、医師・看護職・薬剤師・検査技師・事務系職員などからなる感染予防委員会が設置され、感染予防への積極的な取り組みの気運が高まってきている⁷⁾。これらの構成メンバーの中で、患者に接する機会が多く、現場状況に最も精通している看護職には、感染予防に関する全ての活動において中心的役割を果たすことが求められている⁷⁾。このような観点から、感染源・感染経路の追及に有用な方法を看護領域の視点から追及することは意義あるものと考えられる。

本研究では、臨床分離MRSA株を対象として、まず薬剤感受性タイピングを試み、次いでPCRによるmecA遺伝子検出に加え、hypervariable regionの領域に含まれるdru遺伝子増幅産物の多型性を基にした遺伝子タイピング法を検討した。更にRFLPに基づくタイピングを行ったので、それらの成績について報告したい。

研究方法

1. 供試MRSAおよびMSSA菌株とその培養

富山医科薬科大学附属病院検査部細菌検査室より分与を受けた入院患者の種々臨床材料由来のMRSA20株とMSSA 1株、計21株を対象とした。MRSA20株の分離年月日は、1997年2月から5月の比較的短期間に限定した。また、由来病棟に関しては、8株は限定せずランダムに選択し（病棟非限定群）、残り12株は特定病棟に限定した（病棟限定群）。各菌株の由来材料、分離年月日、病棟は表1に示した。供試菌株は、6 μ g/mlオキサシリン、4%NaClを含むMSO寒天培地（日本製薬）を用いて、MRSAあるいはMSSAであることを再確認後、ミューラー・ヒントン・ブロス（MHB, DIFCO）を液体培地として使用し37℃で一晩培養し使用した。得られた新鮮培養液の一部は、その1 mlに80%グリセロール250 μ lを加え-80℃で凍結保存した。また、MHBに寒天（Agar Noble, Difco）1.5%を加えた寒天培地をコロニー選択に用いた。

2. 薬剤感受性試験

最少発育阻止濃度（minimum inhibitory

concentration : MIC) は日本化学療法学会標準法⁸⁾に準拠し、液体希釈法により求めた。新鮮培養菌液を適宜培地で希釈し、菌数が 10^4 colony forming units (CFU)/ $50 \mu\text{l}$ となるように調製した。調製菌液 $50 \mu\text{l}$ をあらかじめ96穴マイクロプレートで作製した薬剤倍数希釈系列の各 $50 \mu\text{l}$ に加えよく混和後 37°C で一晩培養、翌日波長 580 nm (OD 580nm)を用いた比濁計 (Corona)により菌増殖による濁度を判定し、増殖抑制 (OD 580nm が0.1以下)を認めた最少濃度をMICとした。感受性の程度は、上記検査室で作成されたプロトコール (米国 National Commitee for Clinical Laboratory Standardsにより提唱された方法に準拠)に従い、MIC値により感受性 (S)、中間 (I) および耐性 (R) の3段階に分けて表現した。供試薬剤 (16剤) の名称および略号は表1に示した。

3. PCR法によるmecA, dru遺伝子の増幅

寒天培地で一晩培養した菌から、1コロニーを選択し、滅菌楊枝の先端で釣菌し、 0.2 ml マイクロチューブに入ったProteinase K溶液 ($144 \mu\text{g}/\text{ml}$) $10 \mu\text{l}$ に接種し、 37°C 30分にて溶菌させた。次いで、 99°C 5分にて酵素を失活させた。冷却後、PCR反応後 (DNA $10 \mu\text{l}$, $10 \times \text{buf.}$ $3 \mu\text{l}$, 25 mM MgCl_2 $1.8 \mu\text{l}$, dNTP $3 \mu\text{l}$, 各primer $0.5 \mu\text{l}$, Taq $0.3 \mu\text{l}$, 蒸溜水 $10.9 \mu\text{l}$)にてPCRを行った。PCRに用いたプライマーは、既報に基づき設定した²⁾。プライマーの塩基配列は、mecAでは、増幅産物の塩基長が 531 bp になるように $5'$ -CTT TGCTAGAGTAGCACTCG - $3'$ (mecA1, 1538-1557) および $5'$ -GCTAGCCATTCCTTTATCT TG - $3'$ (mecA2, 2049-2069) とした。druでは $5'$ -ACTATTCCCTCAGGCGTCC - $3'$ (HVR1, 388-356) および $5'$ -GGAGTTAATCTAC GTCTCATC - $3'$ (HVR2, 892-912) とした。

各プライマー後の括弧内の番号は塩基番号 (シーケンスナンバー)を示すが、それらはそれぞれ EMBL Data Library, Accession No. X52593 and X52594に記載されたものによる²⁾。

PCRの条件は、初回のみ 95°C 1分の熱変性を行い、続けて変性 94°C 1分、アニーリング 55°C 1分、伸長 72°C 2分、40サイクルとした。サイクル

終了後、反応液 $10 \mu\text{l}$ を1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後トランスイルミネーターで増幅産物のバンドを確認し、写真撮影した。サンプルの塩基長 (bp) は、同時に泳動したマーカー (DNA Molecular Weight Marker VIII : boehringer mannheim) の易動度により判定した。

4. パルスフィールドゲル電気泳動法

物理的なDNAの切断を避けるため、操作は細菌をアガロースゲル内に包埋して行った。約 10^9 CFU/mlに調整した菌液を1.2%低融点アガロースゲル内に固めたブロックを用い、エペンドルフチューブ内で溶菌操作及び制限酵素によるDNAの切断を行った。溶菌のため、チューブにアクロモペプチダーゼ ($5 \text{ mg}/\text{ml}$) $400 \mu\text{l}$ とリゾスタフィン (Takara) $20 \mu\text{l}$ を加え 37°C 、一晩作用させた。翌日Proteinase K液 $800 \mu\text{l}$ の入った新しいチューブにブロックを移しさらに 50°C で一晩放置した。溶菌操作後、Phenylmethyl-sulfonylfluoridにてProteinase Kを不活化し、さらにブロックをTris-EDTA (TE) bufferで洗浄した後、制限酵素液 (*Sma* I : boehringer mannheim) $50 \mu\text{l}$ を加え、 30°C 一晩反応させDNAの切断を行った。酵素処理が終わった時点でゲル ($0.5 \times \text{TBE}$ buffer 130 ml にアガロース 1.3 g を溶解)にブロックを埋め込み、さらに隙間にあらかじめ溶かしておいた0.5%低融点アガロース溶液を少量注いだ。 4°C で固化後、パルスフィールド電気泳動装置にセットし、パルスタイム5秒、電圧 170 V 、電流 100 mA 、電力 150 W にて24時間泳動した。泳動終了後は、エチジウムブロマイド溶液で染色後、蒸留水で脱色し観察・撮影した。

結 果

1. 供試菌のプロフィール

供試菌株21株の薬剤感受性プロフィールを表1に示した。

対照としたMSSAの薬剤感受性プロフィールをみると、確かにメチシリンに感受性を示しており、他にも、 β ラクタム剤であるペニシリン、アンピシリン、ピペラシリン、セファメジン、セフォイアムとセフテゾールに加え、イミペネム、エリス

表1. 供試菌株のプロファイル (由来臨床材料, 由来病棟, 分離年月日, 遺伝子分析および薬剤感受性)

菌株番号	材料	病棟	分離年月日	遺伝子分析		薬剤感受性試験																						
				mec A	dru PFG/E	P	Mpc	Ap	Pip	Cez	Ctm	Cmz	Imp	Gm	Em	Cld	Min	Vcm	Fom	Ofl	ST							
1	胸水	A6	1997.2.27	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
2	糞便-普通	B3	1997.2.12	○	404	III-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	鼻腔内分泌	B3	1997.4.16	○	404	III-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	膿	B5	1997.2.14	○	404	VI-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	喀痰	A5	1997.3.12	○	501	IV-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	咽頭粘膜	A3	1997.3.26	○	404	IV-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	喀痰	B6	1997.3.7	○	501	II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
14	ドレン分泌物	A6	1997.5.14	○	404	IV-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16	左耳漏	B5	1997.5.15	○	501	IV-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	褥創分泌物	A5	1997.5.16	○	404	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
19	膿	A3	1997.5.17	○	404	III-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
101	喀痰	A5	1997.2.12	○	501	VI-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
102	喀痰	A5	1997.2.12	○	501	VI-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
103	糞便-軟便	A5	1997.3.4	○	501	VI-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
104	咽頭粘液	A5	1997.4.14	○	404	VI-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
105	咽頭粘液	A5	1997.4.14	○	404	VI-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
106	気管内吸引物	A5	1997.4.23	○	501	V-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
107	喀痰	A5	1997.5.19	○	501	VI-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
108	喀痰	A5	1997.5.20	○	501	V-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
109	褥創分泌物	A5	1997.5.22	○	404	III-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
110	ダブルルーメン管	A5	1997.5.25	○	404	VI-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

※薬剤略号 P: ペニシリン, Mpc: メチシリン, Ap: アンピシリン, Pip: ピペラシリン, Cez: セフトアザム, Ctm: セフトゾラム, Cmz: セフトゾール, Imp: イミペネム, Gm: ゲンタマイシン, Em: エリスロマイシン, Cld: クリンダマイシン, Min:ミノマイシン, Vcm:バンコマイシン, Fom: ホスホマイシン, Ofl: オフロキサシン, ST: S/T合剤

ロマイシン, クリンドマイシン, ミノマイシン, バンコマイシン, ホスホマイシン, ST合剤の14薬剤に対しても感受性を示した。但し, ゲンタマイシンおよびオフロキサキシンには耐性であった。

一方MRSA20株は, 全てメチシリンに対して耐性であった。また, これらの株は, ペニシリン, セフェム系であるセファメジン, セフォチアム, セフトゾールの薬剤に対してすべての株が耐性を示し, その他イミペネム, エリスロマイシン, クリンドマイシンなどの薬剤に対しても耐性を示しており, 多剤耐性菌であることが明らかにされた。逆に20株すべてが感受性であった薬剤として, バンコマイシンとST合剤の2剤の存在が認められた。しかし, 16剤のうちミノマイシンとゲンタマイシンの2剤に対する感受性は株間で異なり, ゲンタマイシンでは7株の35%が, またミノマイシンでは10株の50%が感受性を示した。その結果, 両剤に対する感受性に基づき供試MRSA菌株20株は, ゲンタマイシン感受性・ミノマイシン感受性(GsMs)グループに1株(菌株番号:105), ゲンタマイシン耐性・ミノマイシン感受性(GrMs)グループ9株(菌番号:2, 3, 5, 7, 14, 16, 19, 104, 110), ゲンタマイシン感受性・ミノマイシン中間(GsMi)グループに6株(菌株番号:8, 17, 102, 103, 106, 108)およびゲンタマイシン耐性・ミノマイシン中間(GrMi)グループに4株(菌株番号:6, 101, 107, 109)と4タイプに分類できた。

2. PCRによるmecAおよびdru遺伝子の検出

MRSA20株とMSSA1株についてmecAの増幅反応を行ったところ, 予想された531bpのバンドが全てのMRSA株で検出された。一方, 対照として用いたMSSAではそれに相当するバンドは検出されなかった(図1および2)。

druの増幅反応の結果も, MRSA株でのみバンドが見られ, MSSAではそれに相当するバンドは検出されなかった(図1)。druの増幅産物は, mecA増幅産物とは明らかに異なり, 株によって404bpおよび501bpと塩基長に違いが認められた(図1および3)。その結果, 菌株番号2, 3, 5, 7, 14, 17, 19, 104, 105, 109, 110の11株が属する404bpグループと, 残りの菌株番号6,

8, 16, 101, 102, 103, 106, 107, 108の9株が属する。501bpグループの2タイプに分類された(表1および図5)。

3. PEGEによるRFLPの検出

各MRSA20株のゲノムを制限酵素Sma Iで切断して得られたDNA断片のPFGE後の検出パターンは, 切断片の塩基長に依存して菌株に固有の多様なはしご状を呈した。撮影した写真を基に図4のように, 生じたDNA断片のうち菌株の識別に適する明瞭なバンド6本に着目してI~VIグループと大別し, 更に特定のグループを設定しタイピングを行った結果, I, II, III-1, III-2, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, V-1, V-2, VI-1, VI-2, VI-3の13タイプに分類された。それぞれのタイプに属した菌株数は, 最多で4株(VI-3グループ), 次いで3株(VI-1グループ)と2株(III-1, II-2グループ)であり, 残りの9グループには各1株のみが分布した(表1)。

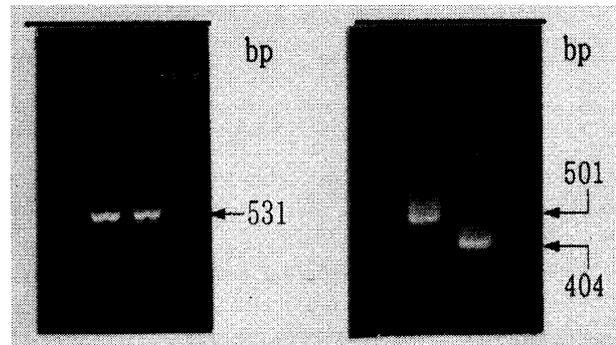


図1. PCRによるMRSAとMSSAにおけるmecAおよびdru遺伝子の増幅検出
1: MSSA株, 109, 110: MRSA株, bpマーカー

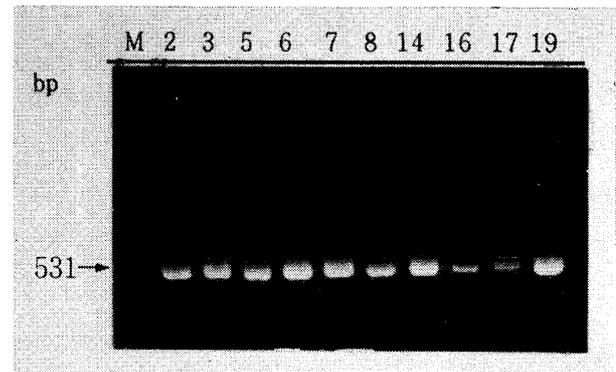


図2. MRSA株におけるmecA遺伝子増幅検出例
M: bpマーカー, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 16, 17, 19: MRSA株

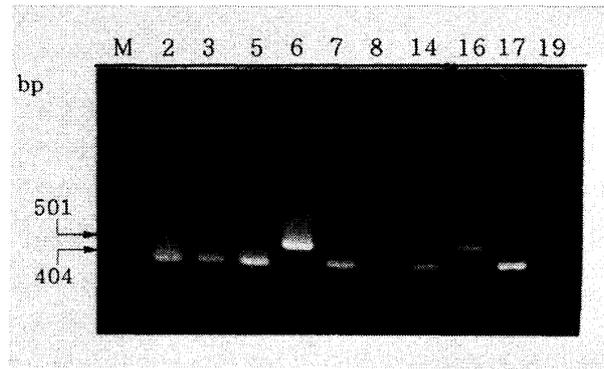


図3. MRSA株におけるdru遺伝子増幅検出例
M: bpマーカー, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 16, 17, 19: MRSA株

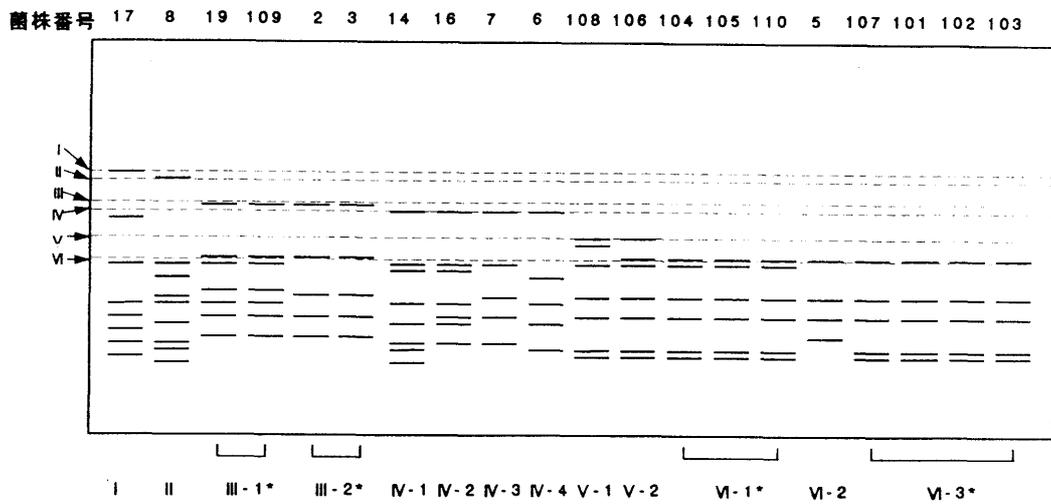


図4. PFGEによるDNA断片泳動パターンに基づくRFLPのタイピング

*複数株分布

薬剤感受性タイプ

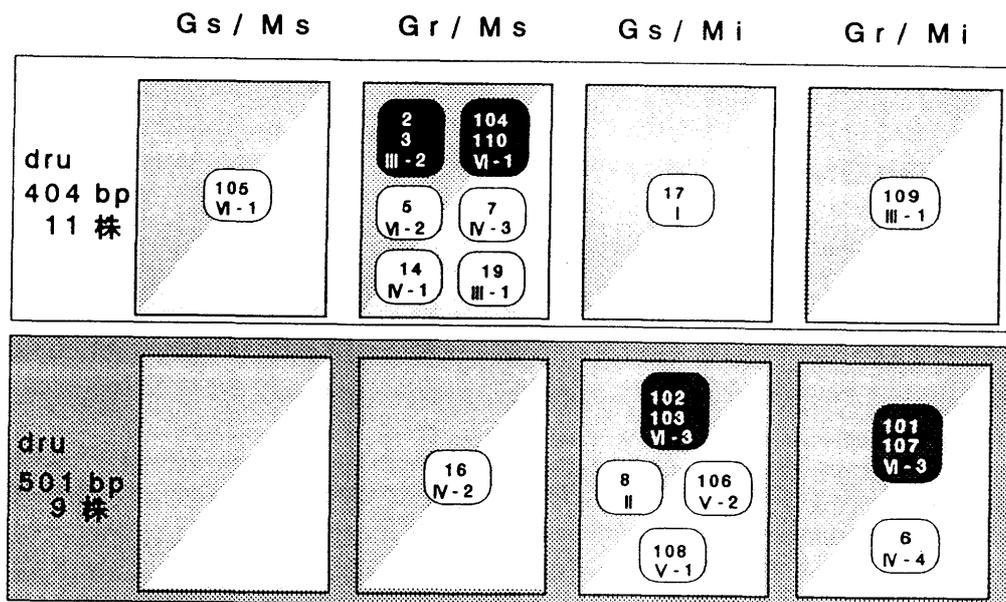


図5. 3種マーカー (薬剤感受性・dru・RFLP) の相互関係

四角の中の数字は上段が菌株名, 下段がRFLPタイプを示す。
黒四角は同一RFLPタイプに属した菌株を示す。

考 察

本研究は、MRSA20株を対象に、薬剤感受性試験および分子疫学的手法（PCRによるmecAとdru遺伝子領域の増幅検出およびRFLPタイピング）を用い、MRSA菌株間の識別精度を比較検討し、分子疫学的手法の有用性を検証することを目的として行った。

MRSAによる院内感染の発生要因として、①患者自身の保菌から感染が引き起こされる内因感染と、②他の患者から直接的、あるいは医療従事者から間接的に起こる交差感染、そして③汚染された病院環境や医療機器などから発症する外因感染の3つが主なものとして挙げられている^{1) 9)}。医療従事者および医療機器の関与する感染については、医療関係者の適切な対策によってある程度の予防は可能であるが、患者間で起こる直接的な交差感染では、ときに集団発生を引き起こすといった危険性が高い¹⁾。交差感染や外因感染を防ぐためには、抗生物質、消毒薬の適切な使用は無論のこと、さらに感染源および感染経路を知るための有効な疫学調査が必要となる。

MRSAに関する疫学マーカーとして、当初よりフェージ型、コアグララーゼ型あるいは薬剤感受性型が採用されてきた。しかし薬剤感受性については、新しい分離株になるにつれ耐性の程度も増加傾向を示し、また、抗生剤使用前後の感受性パターンの変動も指摘されており、マーカーとしての信頼性は低いと考えられている¹⁾。フェージ型別やコアグララーゼ型別においても特定の型に集中する傾向があり、これらの生物学的マーカーの有用性は減りつつあるのが現状である³⁾。

本研究でも、16剤を用いて薬剤感受性試験に基づくタイピングを試みたが、供試MRSA菌株20株のいずれも、メチシリンを含めた12剤に対し、多剤耐性を示した。このことから、耐性度において確かに供試MRSA菌株である20株全てがMRSAとしての性質を有することが確認された。しかし、ゲンタマイシンとミノマイシンの2剤に対する感受性は株間で相違が認められた。この結果、両剤に対する感受性にに基づき供試MRSA菌株20数はかろうじて4タイプに分類でき、以下に記した分

子疫学的マーカーと比較した（表1および図5）。さらに、バンコマイシンおよびST合剤の2剤に対しては全ての菌株が感受性を示し、これらの薬剤は少なくとも供試菌株由来医療施設において、MRSA感染症の治療にはなお有効であることが示された。その有効性の維持のためにも、今後も適切な使用が要望される場所である。

一方、再現性および精度の点で優れた方法としてゲノムの解析を行うPCR法やRFLPで代表される分子疫学的手法が最近用いられてきた。これらの手法は全て微生物に存在する遺伝子を解析するものであり、原理的にMRSAのみならず他菌種、真菌あるいはウイルスなど多くの微生物に適応できる利点がある¹⁾。PCR法は、20bp程度の特異的プライマーを用い、目的とする遺伝子領域を短時間で数十万倍に増幅する方法である。本研究では、MRSAに特異的に存在するmecAおよびdru遺伝子に焦点を当て、増幅検出を試みた。その結果、供試MRSA菌株全てに、予想された531bpを有するmecA遺伝子相当バンドが増幅検出された。一方、dru遺伝子の増幅産物は菌株依存性に、404bp（11株）あるいは501bp（9株）の位置に検出された。今回の成績は、dru遺伝子領域の塩基長は、菌株により異なることを示した西らの報告⁴⁾に一致するものであった。mecA遺伝子もdru遺伝子に相当するバンドも、MSSAには検出されなかった。このことから、供試MRSA菌株全てが、薬剤感受性試験に加え遺伝学的にも確かにMRSAであることが確認された。

上記のように、供試MRSA菌20株は薬剤感受性から4タイプ、druタイピングから2タイプに分類された。しかし、両マーカーを組み合わせても6タイプに分類されるに過ぎなかった。薬剤感受性タイピングに用いられた2剤のうち、ゲンタマイシンよりもミノマイシンの感受性パターンがdruのタイピングに一致する傾向を認めた。このことから、もし両者をマーカーにして疫学調査するならば、薬剤としてはゲンタマイシンの方が有用であるものと考えられた。また同一RFLPグループに属した株は、必ず同一druグループに分布したが、薬剤感受性では異なるグループに解離して分布する傾向が強かった。この理由として、細菌

が染色体DNAと染色体外DNA（プラスミド）の二つを持ち、パルスフィールド電気泳動法により分離されたのは比較的長いDNA断片を有している前者で、またゲンタマイシンやミノサイクリン系薬剤耐性遺伝子はプラスミドに保有されており¹⁰⁾、そのため、RFLPグループと薬剤感受性タイピングでは、多くの株が一致せず、解離したものと考えられた。

次に、識別精度が高いことが報告されているRFLPによるタイピングをパルスフィールド電気泳動法によるパターン分析により検討した。RFLP検討の前提になるDNAの切断には、MRSA DNAのGC%からして最適とされる制限酵素*Sma* Iを用いた^{11) 9) 11) 12)}。パルスフィールド電気泳動法は、異なる2方向の電場を交互に負荷（パルス）してDNAを方向転換させるため、巨大なDNAでも分離が可能となる^{2) 13)}。今回、RFLP分析の結果、供試MRSA菌20株は13タイプに分類され、このうち複数株（2～4株）が分布したのは4タイプであった。一山ら¹²⁾は111株のMRSAを31通りのパターンに分類している。用いた菌株数を考慮すると、今回のRFLPの解析度は、ほぼ一山らの報告に匹敵するものと考えられた。これらの結果を総合して、3種マーカーの中でRFLPが個々の菌株の識別精度が最も高いことが示された。

供試MRSA菌株の選択に際し、疫学調査のシュミレーションを想定し、分離年月日を比較的短期間に限定し、8株の病棟非限定群と12株の病棟限定群に分けた。薬剤感受性タイピングでは、GrMsタイプが一部でクラスターを形成して分布する傾向を認めたものの、特定病棟への集中傾向は認められなかった。同様にdruタイピングにおいても、病棟限定あるいは非限定群へと分散し、集中して分布する傾向は認められなかった。しかしRFLPタイピングをみると、病棟限定群では、12株中7株（58%）が特定の2タイプ（4株がVI-1、3株がVI-3）にクラスターを形成し分布していた。しかも、このうち少なくとも1つのクラスターは薬剤感受性では異なるタイプに属していたが、追跡調査により同一病室由来であることが確認された。一方、病棟非限定群には多様なRFLPタイプが存在し、8株中2株（25%）のみがRFLPの同

タイプ（III-2）に分布した。この2株も、追跡調査により少なくとも同一診療科由来であることが確認された。このことから、RFLPで同一タイプに属した菌は近接した場所から分離されたものであり、交差感染の存在が強く示唆された。今回のシュミレーションとして、由来菌株の関連情報（患者の移動、抗生物質使用状況、担当医療従事者の保菌状況等）をあえて入手しなかったが、この結果は、RFLPの導入により感染源あるいは感染経路の追及がいかに精度高く行えるかを強く示しているものと考えられた。

最後に、感染看護分野への分子疫学的手法の導入・定着化を視野に入れ、今回の経験から得た技術的問題に触れてみたい。DNA抽出や酵素処理あるいは電気泳動は、マニュアル化した操作手順に従えば何ら問題なく出来た。要した日数は、PCR法で2日間、またはRFLP分析も一連の操作を連続的に行うと1週間で終了できた。このようなことから、日数の短縮化等の改善が加われば、看護分野への本方法の定着化には、必ずしも多くの困難は伴わないものと考えられた。今後、精度の高い疫学情報が得られる一従って、より適格な予防対策が講じられる一分子疫学的手法が感染看護の分野に積極的に導入されていくことに期待したい。

結 論

臨床材料由来MRSA20株について、薬剤感受性タイピングと分子疫学的手法（PCR法、PFGE法）による遺伝子タイピングを行い以下の結果を得た。

- 1) 供試MRSA20株は、対照MSSA株とは著しく異なり、メチシリンを含め多剤耐性を示した。しかし、バンコマイシンとST合剤に対しては全ての株で感受性を示し、これらの薬剤は少なくとも供試菌由来医療施設において、なお有用なMRSA感染症の治療薬として位置づけられた。
- 2) ゲンタマイシンとミノマイシンの2剤に対する感受性パターンは菌株により異なりその結果供試MRSA20株は4タイプに分類された。
- 3) PCRによる*mecA*遺伝子の検出では、531bpのバンドがすべてのMRSA株で検出されたが、

MSSA株では検出されなかった。このことからMRSAの同定にmecAの遺伝子診断を用いることは有用であると考えた。

4) dru遺伝子の増幅検出においてもMRSA株でのみバンドが認められ、MSSAでは検出されなかった。また、druの増幅産物は株によって404bpおよび501bpと塩基長に違いが認められた。その結果、供試MRSA20株は2タイプに分類された。

5) 供試MRSA20株の全遺伝子を制限酵素Sma Iで切断し、PFGE法を用いてRFLPタイピングを行った結果、13のタイプに分類された。このうち、4タイプに複数株(2~4株)が分布した。

6) 上記結果より、3マーカーの中で、RFLPタイピングが個々の菌株の識別精度が高く、その分より詳細な疫学的情報が得られるということが確認できた。さらに、疫学調査のシュミレーションからも、感染源・感染経路の追及にRFLPタイピングの導入は有用であることが示唆された。

謝 辞

本研究にあたり、使用した菌株の分与に加え、抗生物質感受性試験に際し丁寧なご指導をいただきました富山医科薬科大学附属病院中央検査部細菌検査室の検査技師の皆様、そしてパルスフィールド電気泳動に関してご指導下さり、さらに暖かい助言と激励を承ました名古屋大学医学部附属病院検査部 感染症・遺伝子部門の皆様には厚くお礼申し上げます。

終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました富山医科薬科大学医学部看護学科感染看護実験室の皆様方に心より感謝の意を表します。

文 献

1) 一山智：パルスフィールド・ゲル電気泳動法 *Staphylococcus aureus*. 臨床と微生物, 23 (6): 626-629, 1996.

2) 下方薫, 一山智：MRSAの遺伝私学的解析と分子疫学. 最新医学, 49 (8): 1472-1474, 1994.

3) 一山智：MRSA院内感染の臨床疫学. 臨床病理, 42 (5): 441-445, 1994.

4) 西順一郎他：mec-hypervariable regionの多型性によるMRSAの遺伝子タイピング. 臨床病理, 42 (12): 1227-1233, 1994.

5) 小林寛伊：MRSA一病院感染を克服するために(1). 真興交易医書出版部, 8-73, 1996.

6) 境美代子他：富山県内の病院を対象とした院内感染予防防止対策に関する実態調査. 環境感染, 12: 109-112, 1197.

7) 小林寛伊監修：院内感染. スミスクライン・ビーチャム製薬株式会社, 7-11, 1996.

8) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について. Chemotherapy, 29: 76-79, 1981.

9) 一山智, 太田美智男：パルスフィールドゲル電気泳動法とその分子疫学研究への応用. 日本臨床, 50 (特別号): 143-148, 1992.

10) 太田美智男編：新遺伝子操作の基礎技術. 菜根出版, 20-34, 1996.

11) 一山智：パルスフィールド・ゲル電気泳動法原理と方法. 臨床と微生物, 23 (6): 621-625, 1996.

12) 一山智：パルスフィールドゲル電気泳動によるMRSAのDNA解析とその疫学的応用. 日本臨床, 50 (5): 922-997, 1992.

13) 大ヶ瀬浩史：PCR法によるMRSA分子疫学. INFECTION CONTROL, 3 (6): 561-567, 1994.

Comparative studies on the strain-distinguishing efficiency among drug sensitivity tests, dru genes products and restriction fragment length polymorphism (RFLP) -typing of methcillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Miho Umatake¹, Hiroshi Ochiai², Ikuko Yoshida³ and Kenji Tazawa²

¹Graduate School of Nursing, Toyama Medical and Pharmaceutical University

²School of Nursing, Toyama Medical and Pharmaceutical University

³Division of Clinical Laboratory, Toyama Medical and Pharmaceutical University-affiliated Hospital

Abstract

To search the most indicative epidemiological marker of methcillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), we compared the strain-distinguishing efficiency among several typing methods such as drug-sensitivity test, analysis of polymerase chain reaction (PCR) -amplified products of *mecA* and *dru* genes, and restriction fragment length polymorphism (RFLP) -typing after digestion of chromosomal DNA with restriction enzyme of *Sma* I, using 20 MRSA strains isolated from the hospitalized patients in various wards. Drug sensitivity tests against 16 drugs showed that all MRSA strains were equally resistant or sensitive to 12 drugs or two drugs (vancomycin and sulfamethoxazole/trimethoprim), respectively, but these strains could be divided into 4 types depending on the different sensitivity profiles in only the remaining two drugs (gentamycin and minomycin). PCR assay confirmed that all MRSA strains possess both *mecA* and *dru* genes, whereas a control strain of methcillin-sensitive *Staphylococcus aureus* does not. Although *mecA* gene was amplified into single product with 531 base pair (bp) in all strains, amplified product of *dru* gene drew a dividing product into two bands either with 404 or 501 bp depending on the strains. In a sharp contrast to a fewer types in drug-sensitivity and *dru* typings, RFLP-typing could classified these strains into as much as 13 types, suggesting that RFLP-typing could provide the most indicative epidemiological information among the typings examined in this study. In a mimic epidemiological study, an occurrence of cross-infection was estimated in one patient room at which a cluster of strains with the same marker in RFLP was isolated within a relatively short period. These findings indicate that RFLP is a powerful tool for search the source of infections and disseminating routes to prevent nosocomial infections with MRSA.

Key words

MRSA (methcillin-resistant *Staphylococcus aureus*),
RFLP, *dru*, nosocomial infections