

宮城県における黄色ブドウ球菌と メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の疫学調査

Epidemiological study of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in Miyagi

坂上 亜希恵 田中 初芽 小泉 光*1 山谷 聡子 中村 久子*2
小林 妙子 渡邊 節 畠山 敬

Akie SAKAGAMI, Hajime TANAKA, Hikari KOIZUMI, Satoko YAMAYA, Hisako NAKAMURA,
Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE, Takashi HATAKEYAMA

2016年から2017年に、ヒトおよび動物(ブタ、イヌ、ネコ)由来の検体572件を対象として、*Staphylococcus aureus* および MRSA の分離同定を行い、当所の保存株69株とあわせて分子疫学解析を実施した。調査の結果、ヒト由来36件(23.1%)、ブタ由来75件(36.2%)、イヌ由来5件(17.9%)、ネコ由来56件(30.9%)から*S. aureus*を検出した。*S. aureus*の分子疫学解析では、食中毒事例由来株と高い相同性を示す株が市中に存在することが明らかとなった。また、ヒト由来1株、ネコ由来1株、急性胃腸炎患者由来5株でMRSAを検出した。MRSAでは、地域的に類似株が存在する可能性が示唆された。本調査により、*S. aureus*およびMRSAの県内における実態や過去の事例との関連性が明らかとなった。得られた疫学的な知見は今後の食中毒および薬剤耐性菌対策の有効な情報となると考えられた。

キーワード：黄色ブドウ球菌；メチシリン耐性黄色ブドウ球菌；食中毒；感染症；薬剤耐性

Key words : *Staphylococcus aureus* ; MRSA ; foodborne diseases ;
infectious diseases ; antimicrobial resistance

1 はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトや動物の皮膚や消化管内などに常在し、環境中に広く分布している。一般的に病原性は弱いですが、皮膚炎・肺炎・敗血症など様々な感染症や食中毒・トキシシンショック症候群などの毒素性疾患の原因となる。従来、本菌による食中毒の疫学解析では、コアグラウゼ型別やエンテロトキシン産生性など生化学性状による分類が主に用いられ、遺伝子解析など近年の検査技術はあまり応用されていない。当所においても、保存されている過去の分離株の疫学情報については不明な点が多い。

一方で、*S. aureus*は、院内感染の主要な起因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) として重要視されてきた。米国疾病管理予防センターが2013年に発行した薬剤耐性菌レポートにおいても、未だに“深刻な脅威”と位置づけられている¹⁾。近年では、従来の院内感染型MRSAに加え、医療現場と接点のない市中から分離される市中感染型MRSAや家畜、畜産業従事者および食肉から高率に検出される家畜関連型MRSAによるヒト医療への影響が懸念されている²⁾。現在、薬剤耐性菌対策は国際的な課題であり、我が国においても2016年に薬剤耐性対策アクションプランが策定された。アクションプランの柱の一つには動

向調査・監視が挙げられており³⁾、薬剤耐性菌動向調査の重要性は増しているが、ヒト・動物・環境の横断的な研究は少ない。

そこで、本研究では、*S. aureus*のヒトおよびヒトを取り巻く環境中における実態を調査するとともに、分離株や保存株の遺伝子解析および関連性を比較した。また、MRSAの宮城県における疫学的な知見を得るため実態調査を行った。

2 材料および方法

2.1 対象

2016年5月から2017年11月に、ヒトおよび動物(ブタ、イヌ、ネコ)を対象として調査を行った。ヒトは宮城県内の保健所来所者、保健所職員および当所職員156名に協力を依頼した。検体はPro-media ST-25(エルメックス)を用いて、両手の手のひら全面を拭き取った。ブタは宮城県食肉衛生検査所で健康畜としてと畜検査を行ったブタ(約6ヶ月齢)の両鼻腔からBBLカルチャースワブEZ(日本BD)を用い、一農場あたり5頭を目安として207頭から鼻腔スワブを採取した。イヌとネコは宮城県動物愛護センターへ搬入されたイヌ28頭、ネコ181頭からBBLカルチャースワブEZを用い、口腔スワブを採取した。同腹の個体は一腹につき一頭を採材した。

さらに、過去の*S. aureus*による食中毒事例由来6事例16株、急性胃腸炎患者から分離された*S. aureus*41株、収去検査等の食品から分離された*S. aureus*12株を

*1 現 気仙沼保健福祉事務所

*2 現 仙台保健福祉事務所岩沼支所

用いた。

2.2 方法

2.2.1 *S. aureus* の分離・同定

採材した検体は 7.5% NaCl 加ハートインヒュージョンブイオンで増菌培養後、卵黄加マンニット食塩培地で分離培養し、マンニット分解および卵黄反応陽性のコロニーを鈎菌して、カタラーゼ試験、グラム染色およびコアグララーゼ試験を行い、*S. aureus* を同定した。同定した株については、逆受身ラテックス凝集反応によるブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット（デンカ生研）を用い、産生毒素であるエンテロトキシンの型別を行った。エンテロトキシン産生株については、ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」（デンカ生研）を用い、コアグララーゼ型別試験を実施した。

2.2.2 MRSA の分離・同定

S. aureus と同定した株および当所保存株について、MRSA 選択寒天培地（日本 BD）でのスクリーニングを行った。スクリーニング陽性株は、オキサシリン感受性試験⁴⁾での表現型による MRSA の同定とメチシリン耐性遺伝子 *mecA*、*S. aureus* に特異的な遺伝子である *femA*、白血球溶解毒素遺伝子 *pvl* を標的とした Multiplex PCR による MRSA の同定を行った（表 1）。PCR に用いるテンプレートの作成は国立感染症研究所の方法⁵⁾に準じた。

PCR 反応は Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用い、反応液は最終濃度 1×HF PCR Buffer (containing 1.5 mM MgCl₂)、1 U Phusion DNA Polymerase、200 μM dNTP mix、200 nM 各プライマーにテンプレート 1 μL を加え、滅菌蒸留水で 50 μL に調整した。反応サイクルは 98°C 30 秒の反応後、98 °C 5 秒の熱変性反応、57°C 10 秒のアニーリング反応および 72°C 10 秒の伸長反応を 30 サイクル、72°C 5 分で反応を終了し電気泳動を行うまで 4°C で保存した。

2.2.3 薬剤感受性試験

MRSA を対象として、アンピシリン (ABPC)、セファロチン (CET)、セフォキシチン (CFX)、セフォタキシム (CTX)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、ST 合剤 (ST)、テトラサイクリン (TC)、ゲンタマイシン (GM)、エリスロマイシン (EM)、カナマイシン (KM)、ノルフロキサシン (NFLX)、レボフロキサシン (LVFX)、クロラムフェニコール (CP) の計 14 薬剤について、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 法⁴⁾に準拠したディスク法による薬剤感受性試験を実施した。

2.2.4 疫学解析

分離株と保存株のエンテロトキシン A の産生がみられた株および MRSA を対象として、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施した。供試菌液は OD 610 nm で 1.0 に調整し、アガロースに包埋する際に国立感染症研

究所の方法⁵⁾に準じて Lysostaphyn を 5 μg/100 μL 濃度に混合した。アガロースブロックは、Lysostaphyn を 1 μg/100 μL 加えた 0.5 M EDTA pH8.0 中で 37°C 4 時間インキュベートした後、1 mg/mL の proteinase K で overnight 処理を実施した。PFGE は *Sma* I (30 U/sample) を用いて 30°C で 3 時間の制限酵素処理を行い、パルスタイム 5.3 秒から 34.9 秒、電圧 6 V/cm で 20 時間泳動した。泳動像の解析は Fingerprinting II (BIO-RAD) を用い、統計解析にはバンドを基にした Dice の相同性係数を求める方法で行った。系統樹の作成は Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) で行った。

2.2.5 アンケート調査

S. aureus および MRSA の保菌リスクについて検討するため、ヒト手指拭き取り時にアンケート調査を行った。調査項目は、成人または学生などの属性、食品関係業務への従事の有無の他、動物飼育の有無、手あれや傷の有無、1 ヶ月以内の抗生物質服用の有無および 1 年以内の入院や手術の有無など既知の *S. aureus* および MRSA リスク因子とした。アンケート調査に用いた項目におけるリスク因子を検討するため、JMP Pro 13 (SAS Institute Inc.) を用いて変数減少法ステップワイズ (Wald) でのロジスティック回帰分析による統計処理を行った。

3 結果

3.1 *S. aureus* 検出状況

ヒト由来 36 件 (23.1%)、ブタ由来 75 件 (36.2%)、イヌ由来 5 件 (17.9%)、ネコ由来 56 件 (30.9%) の合計 172 件から *S. aureus* を検出した (表 2)。エンテロトキシン型別の結果、食中毒事例から多く分離されるエンテロトキシン型 A を、ヒト由来株で 3 株、ネコ由来株で 2 株検出した (表 3)。また、複数のエンテロトキシンを産生する、複合型を含めたエンテロトキシン A 産生株のコアグララーゼ型別は、Ⅶ型が 3 株、Ⅳ型が 3 株、Ⅱ型とⅢ型および不明が各 1 株であった (表 4)。

3.2 MRSA 検出状況

S. aureus を検出した 172 件中、ヒト手指由来 1 株、ネコ由来 1 株、*S. aureus* 保存株 69 株中急性胃腸炎患者由来 5 株で MRSA を検出した (表 2)。

3.3 薬剤感受性試験

MRSA の耐性型は 2 剤から 11 剤耐性がみられ、2 株が同一の耐性パターンを示した (表 5)。

3.4 PFGE 解析

エンテロトキシン A 産生株 27 株、MRSA 7 株について PFGE による解析を実施した。エンテロトキシン A 産生株は、85% の類似率で 10 のクラスターに分類された (図 1)。MRSA では、2 株が 90% の類似率を示した (図 2)。

3.5 アンケート解析

アンケート調査の結果、137名から回答を得た。ロジスティック回帰分析では、*S. aureus* 保菌についてのオッズ比は成人に対し学生で14.8倍であった(図3)。アンケート回答者においてMRSAの検出はなかった。

4 考察

*S. aureus*の保菌率はヒト、ブタ、ネコでいずれも30%前後であった。ブタについては合計23農場から採材を行ったが、農場による保菌率に顕著な偏りはなかった。イヌについては保菌率がやや低かったが、検体数が少なかったことによる影響も考えられる。エンテロトキシン型別の結果、食中毒事例から多く分離されるエンテロトキシン型Aが、ヒトのみでなく動物由来株においても見られた。複合型を含めたエンテロトキシンA産生株のコアグラゼ型別は、VII型が3株、IV型が3株、II型とIII型および不明が各1株であった。食中毒事例から多く分離される型⁹⁾と同様の傾向であることから、食中毒の原因となりうる*S. aureus*が健康なヒトや動物に存在していることが確認された。

PFGEによるエンテロトキシンA産生株の分子疫学解析では、菌株は10のクラスターに分類された(図1)。食中毒事例由来株に注目すると、クラスターEでは食中毒事例由来株、ヒト手指由来株、および急性胃腸炎患者由来株が分類された。これらの株の分離年は2010年から2017年に及び、地域も様々であった。また、クラスターJでは、2011年食中毒事例由来株とヒト手指から分離された株が分類された。これらのクラスターはいずれも85%以上と高い相同性を示しており、分類された株は同一由来であると考えられる。よって、食中毒事例の原因となった株と同一由来の株がヒト手指や散発性の急性胃腸炎患者にも存在していることが明らかとなった。

MRSAは、*S. aureus*を検出した172件中、ヒト手指由来1株、ネコ由来1株、*S. aureus*保存株69株中急性胃腸炎患者由来5株で検出された。

薬剤感受性試験の結果、耐性型は2剤から11剤耐性がみられた。特に、ネコ由来株は14剤中11剤に対し高度耐性を示し、ヒト医療で重要視されているカルバペネム系への耐性や、家畜関連MRSAの特徴とされるテトラサイクリン系への耐性もみられた²⁾。なお、当該ネコは3ヶ月齢未満であり、所有者不明のネコとして引取られた。引取前に動物病院への受診歴があるが、MRSA保菌との関係は不明である。MRSAなどの薬剤耐性菌はヒトと動物間での伝播も知られており²⁾、動物における動向についても注視していく必要がある。

また、過去の食中毒事例由来株からMRSAは検出されなかったが、海外では市中感染型MRSAによる食中毒事例も報告されている¹⁰⁾。通常の食中毒検査においては原因菌の薬剤感受性試験を行うことは少ないが、国内にも薬剤耐性菌を原因とする食中毒が潜在的に存在する

可能性がある。

MRSAの疫学解析では、近隣地域の急性胃腸炎患者由来株2株が90%の遺伝子相同性を示したことから、地域的に類似株が存在する可能性が示唆された(図2)。

アンケート解析では、回答者においてMRSAの検出がなかったことから、*S. aureus*保菌についてのみ解析を実施した。ロジスティック回帰分析では、*S. aureus*保菌についてのオッズ比は成人に対し学生で14.8倍であった(図3)。この理由としては、対象とした成人が食品関係業務を主とした保健所来所者や保健所職員および当所職員であったことから、一般的な成人よりも手指衛生を熟知していた可能性がある。また、対象とした学生は小中学生であり、野外など環境との接触がより頻回であったとも考えられる。

本研究により、県内における*S. aureus*およびMRSAの実態や過去の事例との関連性が明らかになった。ヒトでの感染対策に加えて、動物や環境から検出される病原菌や耐性菌にも注目した総合的な対策が必要であることから、得られた疫学的な知見は今後の食中毒および薬剤耐性菌対策の有効な情報となるものと考えられる。

参考文献

- Centers for Disease Control and Prevention : “ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013”, (2013)
- 日本化学療法学会, 日本感染症学会 : “MRSA 感染症の治療ガイドライン”, (2017)
- 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議 : “薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン(2016-2020)”, (2016)
- Clinical and Laboratory Standards Institute : M100 “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”, 28th edition, (2018)
- 国立感染症研究所 : “病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌”, (2016)
- Tsuchizaki N, J Ishikawa, and K Hotta : Jpn J Antibiot., **53**, 422 (2000)
- Paule SM, AC Pasquariello, DM Hacek, AG Fisher, RB Thomson, KL Kaul, and LR Peterson : J Mol Diagn., **6**, 191 (2004)
- Lina G, Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, J. Etienne : Clin Infect Dis., **29**, 1128 (1999)
- 社団法人畜産技術協会 : “平成21年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」”, (2010)
- Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W : Emerg Infect Dis., **8**, 82 (2002)

謝辞

本調査を実施するにあたり御協力いただいた、宮城県内保健所支所、宮城県動物愛護センター、宮城県食肉衛

生検査所、宮城県保健環境センターの皆様にご感謝申し上げます。

表1 MRSA 同定に用いたプライマー

標的領域	配列 (5'→3')	増幅産物 (bp)	引用文献
<i>mecA</i>	TGT CCG TAA CCT GAA TCA GC TGC TAT CCA CCC TCA AAC AG	519	[6]
<i>femA</i>	AAC TGT TGG CCA CTA TGA GT CCA GCA TTA CCT GTA ATC TCG	308	[7]
<i>pvl</i>	TCA TTA GGT AAA ATG TCT GGA CAT GAT CCA GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433	[8]

表2 分離・同定結果

由来	検体数	分離数 (%)	
		<i>S. aureus</i>	MRSA
調査対象			
ヒト	156	36 (23.1)	1 (0.6)
ブタ	207	75 (36.2)	0
イヌ	28	5 (17.9)	0
ネコ	181	56 (30.9)	1 (0.6)
保存株 (<i>S. aureus</i>)			
食中毒事例	16	NT	0
急性胃腸炎患者	41	NT	5 (11.9)
食品	12	NT	0

NT; Not tested

表3 エンテロトキシン産生株

由来	分離数	エンテロトキシン	
		産生株数	型 (株数)
ヒト	36	14	A(3), C(2), D(3), A+D(3), C+D(2), A+C+D(1)
ブタ	75	12	D(12)
イヌ	5	0	
ネコ	56	14	A(2), D(11), C+D(1)

表4 分離株のコアグララーゼ型とエンテロトキシン型

エンテロトキシン型	コアグララーゼ型								合計
	I	II	III	IV	V	VII	II+VII	不明	
A			1	1		2		1	5
C		1						1	2
D	4	2			2	13	1	4	26
A+D		1		1		1			3
C+D		1	1	1					3
A+C+D				1					1
合計	4	5	2	4	2	16	1	6	40

表5 薬剤感受性試験結果

耐性薬剤数	耐性薬剤	株数		
		ヒト手指	ネコ	急性胃腸炎患者
11	ABPC, CET, CFX, CTX, IPM, MEPM, TC, EM, KM, NFLX, LVFX		1	
6	ABPC, CFX, CTX, EM, NFLX, LVFX	1		1
5	ABPC, CFX, GM, EM, KM			1
	ABPC, CFX, EM, NFLX, LVFX			1
4	ABPC, CFX, CTX, MEPM			1
2	ABPC, EM			1

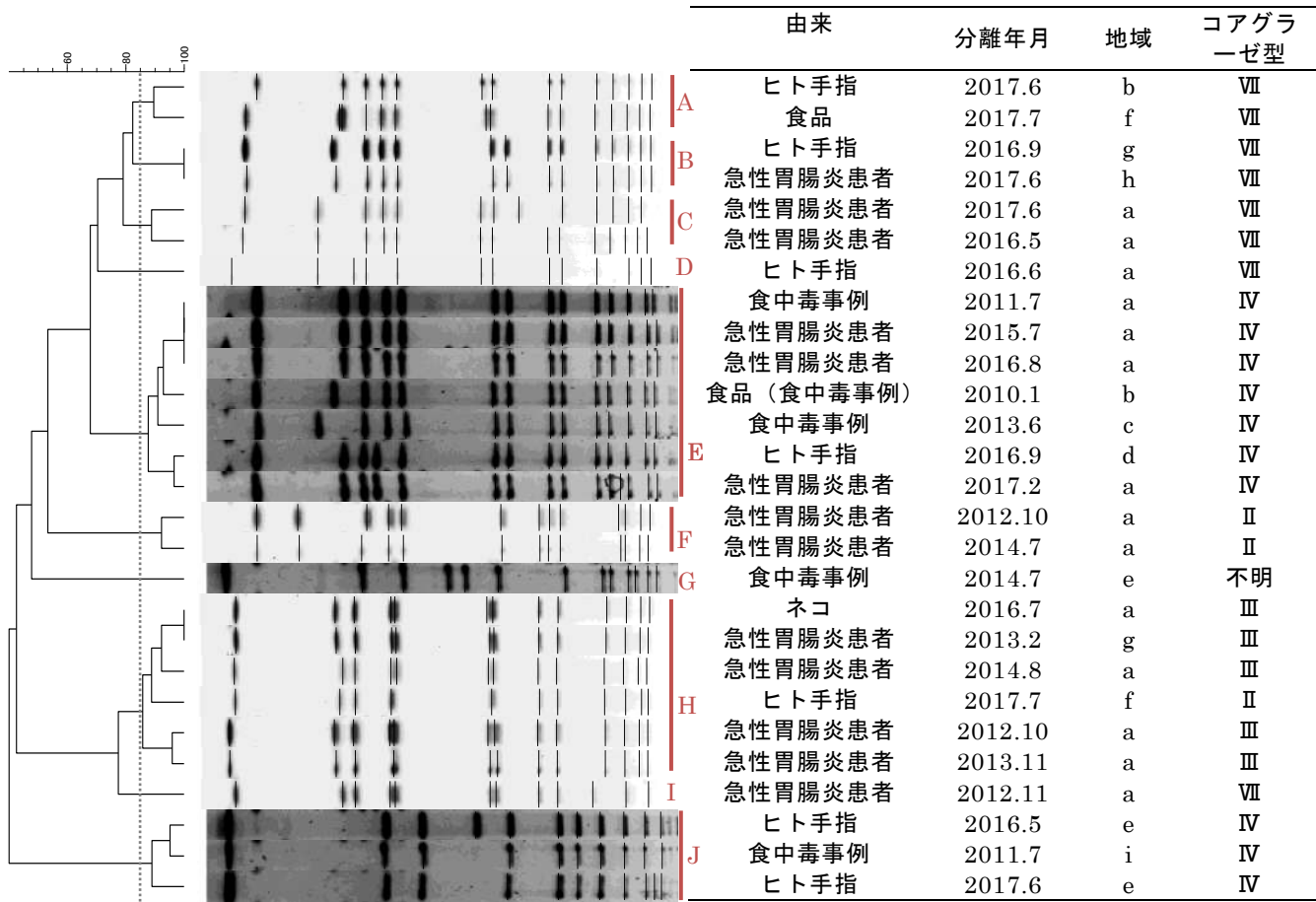


図1 エンテロトキシンA産生株のPFGE解析

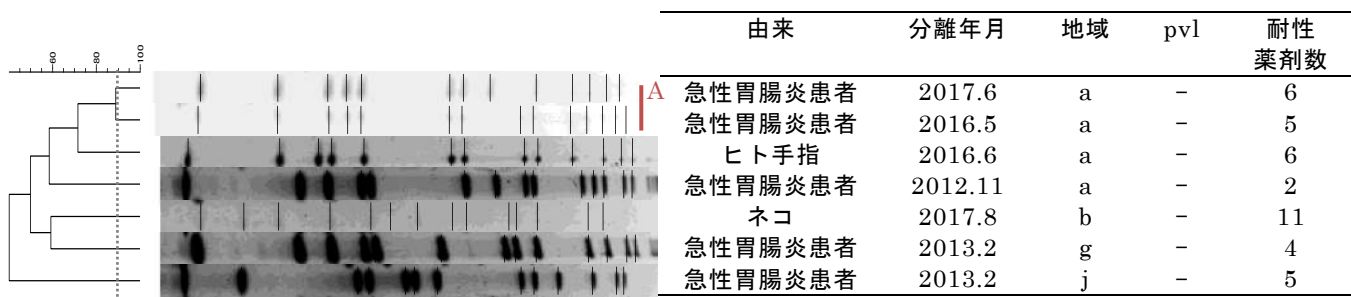


図2 MRSAのPFGE解析

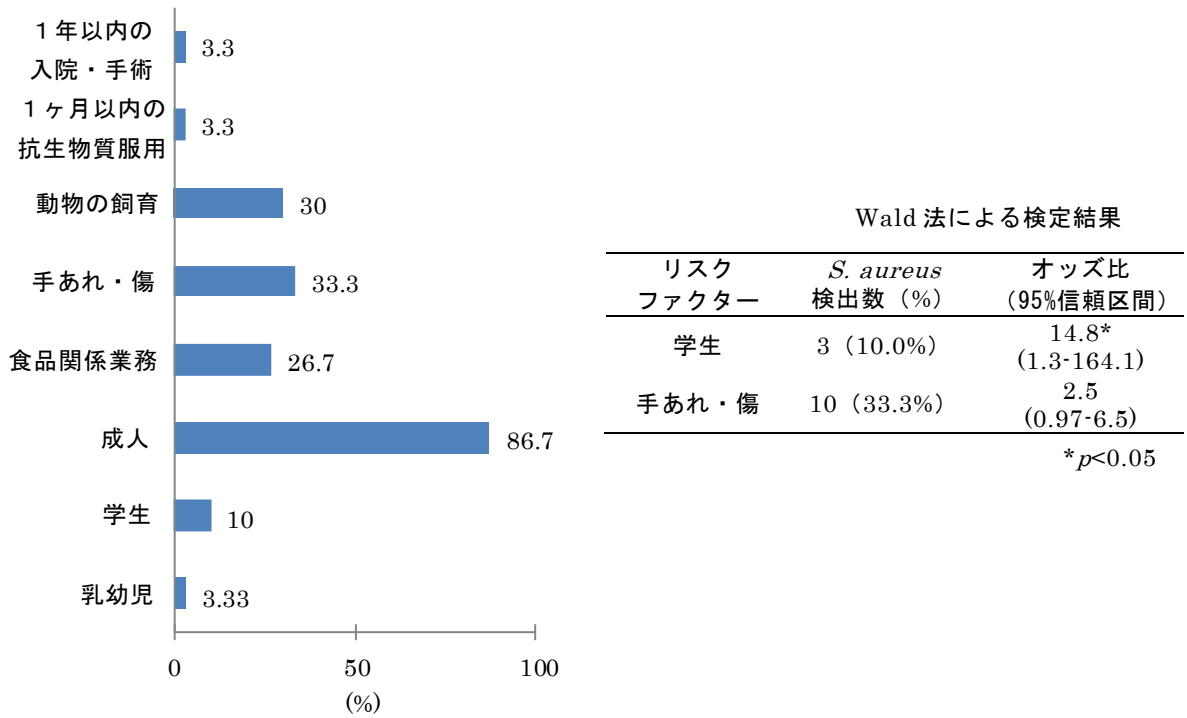


図3 アンケート解析

(左：アンケート調査に用いた項目の *S. aureus* 検出数に占める割合，右：ロジスティック回帰分析結果)