

原 著

本学学生から検出された *mecA* 陽性ブドウ球菌の解析と
mecA 遺伝子伝播状況の推測

片 岡 嗣 雄 森 大 気 猪 俣 恵 引 頭 毅

Analysis of *mecA*-positive staphylococci detected from the students of Asahi University and inferences of propagation of *mecA* gene among commensal staphylococci

KATAOKA HIDEO, MORI TAIKI, INOMATA MEGUMI, INTO TAKESHI

mecA は β -ラクタム系抗菌薬が結合できないペプチドグリカン合成酵素 PBP2' をコードする遺伝子であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) はこの遺伝子を獲得することで β -ラクタム耐性を獲得している。*mecA* 遺伝子は可動性染色体カセット (SCC*mec*) を構成する一遺伝子として水平的に伝播し、黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌 (コアグララーゼ陰性ブドウ球菌, CoNS) も SCC*mec* の獲得によって β -ラクタム耐性を獲得しうる。SCC*mec* は構成や配列の異なる複数のタイプが存在するため、その解析によって *mecA* 遺伝子の伝播状況が推測できる。本研究では、本学学生 143 名を被検者として *mecA* 陽性ブドウ球菌の検出を行い、その SCC*mec* のタイプを解析することで *mecA* 遺伝子の伝播状況の推測を行うことを目的とした。被検者から鼻腔検体を採取し、 β -ラクタム系抗菌薬セフォキシチンと高濃度食塩を含む選択鑑別分離培地で培養して検出されたブドウ球菌について、*mecA* 遺伝子の有無とその SCC*mec* のタイプを PCR 法で解析した。その結果、143 名中 65 名 (45%) から合計 86 菌株の *mecA* 陽性ブドウ球菌が検出された。さらに、*mecA* 陽性ブドウ球菌 86 株中 84 株 (98%) は黄色ブドウ球菌ではなく、CoNS であることが分かった。これらの菌株は市中でも頻繁にみられる SCC*mec* type IV a を保有していた。これらの結果から、ヒトの鼻腔や皮膚の常在菌である CoNS が、他のブドウ球菌に *mecA* 遺伝子を水平的に伝播しながら *mecA* 陽性ブドウ球菌が拡散している可能性が示唆された。今後は、常在菌が潜在的な薬剤耐性菌となりうる危険性を考慮して、薬剤耐性に対するアクションプランを推進していかなければならないと考えられる。

キーワード：*mecA*、メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (MR-CoNS)、常在菌

*The mecA gene encodes for peptidoglycan synthase PBP2' protein that escapes binding of β -lactam antibiotics, by which methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) acquires antibiotic resistance. mecA is known to be horizontally transferred by mobile chromosome cassette (SCC*mec*) which acts as a vehicle that enables acquisition of β -lactam resistance of staphylococcal species, including Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci (CoNS). Since SCC*mec* elements are classified into many types, investigation of the SCC*mec* types in isolated *mecA*-positive staphylococci might make the prediction of propagation of *mecA* among commensal staphylococci possible. The purpose of this study was to detect *mecA*-positive staphylococci from a random population of 143 students of our university as subjects, and to analyze SCC*mec* types to estimate the propagation of *mecA*. Nasal swab specimens were collected from the subjects and were cultured in a selective agar media containing the β -lactam antibiotic cefoxitin and a high concentration of sodium chloride. The presence or absence of *mecA* and the type of SCC*mec* for those β -lactam-resistant staphylococci were analyzed by PCR. As a result, a total of 86 strains of *mecA*-positive*

staphylococci were detected in 65 out of 143 subjects studied (45%) . Furthermore, analysis of the detected mecA-positive staphylococci revealed that 84 of the 86 strains (98%) were belonging to the CoNS type, but not S. aureus. These strains possessed SCCmec type IVa, which is frequently found in community-acquired MRSA. Hence, the results suggest that CoNS, a resident staphylococcal type present in the human nasal cavity and skin, might transfer mecA gene to other staphylococci in the nasal cavity, resulting in the spread of mecA-positive staphylococci. In the future, it is necessary to promote an action plan for drug resistance in consideration of the danger of commensal bacteria potentially becoming drug-resistant bacteria.

Key words : *mecA*, methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MR-CoNS), resident flora

緒 言

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) は染色体 DNA に *mecA* 遺伝子を獲得することで β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性を獲得した黄色ブドウ球菌である。 *mecA* 遺伝子は β -ラクタム系抗菌薬が結合できないペプチドグリカン合成酵素 PBP2' をコードしており¹⁾、この遺伝子を獲得することで黄色ブドウ球菌は β -ラクタム耐性を獲得する。 MRSA は 1960 年に英国で発見されて以来²⁾、世界中に拡がり感染症の脅威となってきた。当初は抗菌薬を多用する医療機関のみの伝播に留まっていたが、1990 年代初めから、オーストラリア、アメリカ、フランスをはじめ世界各国で、医療機関外での MRSA の感染拡大も報告されるようになった³⁻⁶⁾。このような、医療機関外で拡がる MRSA は市中感染型 MRSA (CA-MRSA) と名付けられ、従来の医療機関で感染する院内感染型 MRSA (HA-MRSA) とは別に、急速に拡がって脅威になりつつあると考えられている⁷⁾。一方、CA-MRSA の市中での分布と流行は把握しづらいため、その分布を解析して発生源を推測することは MRSA 感染拡大を防ぐうえで急務であると考えられる。

MRSA は *mecA* 遺伝子を可動性染色体カセット (SCC*mec*) により水平的に獲得する⁸⁾。 SCC*mec* は、PBP2' をコードする *mecA* 遺伝子と、カセットを染色体 DNA に組み込む酵素 *ccr* (cassette chromosome recombinase) をコードする遺伝子を含むが、この両者や挿入配列の位置によって現在 11 のタイプに分類されている⁸⁾。これらの SCC*mec* タイプのうち特に、type I ~ III は HA-MRSA, type IV ならびに type V は CA-MRSA に多くみられることが知られている⁹⁾。従って SCC*mec* タイプが MRSA の発生に際して解析され、その結果は原因菌とその感染経路の特定に役立ってきた。しかし、昨今の MRSA 感染拡大を鑑みると、特定の MRSA がヒトからヒトへと感染し増殖しているだけでなく、常在黄色ブドウ球菌を媒介して SCC*mec* が伝播している可能性が考えられてい

る¹⁰⁾。その伝播状況を掴むための一手法として、現在 MRSA 感染症とは無関係な市中の集団においてどの程度 SCC*mec* を有する黄色ブドウ球菌が常在菌として分布しているかを解析することは有効な手段であると考えられる。

一方、黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌には、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) や *Staphylococcus haemolyticus* などが含まれ、これらの菌種はいずれも黄色ブドウ球菌と同様にヒトの表皮や鼻腔における常在菌として存在している。これらの菌種は、黄色ブドウ球菌が有する血漿凝固酵素コアグラーゼを産生しないことから、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (Coagulase-negative staphylococci, CoNS) と呼ばれている。近年、この CoNS が院内感染の主要な原因菌であるという報告が相次いでいる¹¹⁻¹³⁾。1996 年の York らの報告によると、調査した 142 株の CoNS のうち 32% にあたる 45 株が *mecA* 遺伝子を持しており、調査した中で最多の菌種であった *S. epidermidis* では、57% の株に *mecA* 遺伝子が発見された¹⁴⁾。さらに、2016 年には、病院内で採取された *S. epidermidis* と *S. haemolyticus* の臨床菌株についてメチシリン耐性が調べられ、前者は 85.5% (71/83)、後者は 93.2% (55/59) がメチシリン耐性であったと報告されている¹⁵⁾。このようなメチシリン耐性の CoNS は MR-CoNS (Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci) と呼ばれ、元々常在菌であることも相俟って、今後広く拡散していくことが予想される危険な菌種である。また、MR-CoNS は様々なタイプの SCC*mec* を保持していることも報告されている^{15, 16)}。しかし、同一箇所にある CoNS ならびに黄色ブドウ球菌の SCC*mec* タイプを検索し、その水平的伝播の可能性を示す報告は存在しない。

本研究では、本学学生 143 名の協力の下、鼻腔検体を β -ラクタム系抗菌薬セフォキシチン含有のブドウ球菌選択培地で培養し、*mecA* 陽性のブドウ球菌を検出するとともに、その SCC*mec* タイプを解析した。対象となった本学学生は、東海地方のみならず近畿、関東ほか全国各地の出身者から構成されているため、

地域による特殊性は出にくいものと考えられる。また、検体採取時に重篤な感染症を発症している学生はいなかったため、市中における常在ブドウ球菌に拡大する *SCCmec* の伝播状況を把握するための重要な知見が得られると考えられた。

研究対象および方法

1. 被検者

本研究への協力に同意した本学学生 143 名（男性 103 名，女性 40 名）を被検者とした。本研究は朝日大学歯学部倫理委員会の承認（承認番号第 27019 号）を受けて実施された。

2. MRSA の検出

検体は被検者自身による鼻腔内拭き取りによって採取した。拭き取りにはエチレンオキシドガス滅菌後に個包装された綿棒（ホスピタル綿棒 W6S-1，綿径 5 mm，綿長 15 mm，全長 151 mm，平和テック，岐阜）を用いた。採取した検体はただちにポアメディア® MRSA 分離培地 II（栄研，栃木）の全面に均一に塗布させた。本培地は高濃度食塩とセフォキシチン含有する MRSA の選択分離培地だが，黄色ブドウ球菌だけでなく CoNS も発育する可能性がある。そのため，卵黄液ならびにマンニットを含み，コロニー周囲の卵黄反応，ならびにマンニット分解によるコロニーの黄変が観察できれば黄色ブドウ球菌，いずれかの反応が観察できなければ CoNS と判別できるようになっている（図 1）。本研究では，検体塗布後のポアメディア® MRSA 分離培地 II を 37℃ に保ったインキュベーター中で 2 日間好気培養し，生育したコロニーの形態と発色を観察した。

3. *mecA* の検出

ポアメディア® MRSA 分離培地 II 上に生成したコロニーは，卵黄反応の有無，コロニーの黄変の有無にかかわらず採取し，PBP2' の産生にかかわる遺伝子 *mecA* の有無をコロニーダイレクト PCR 法で検索した。

DNA ポリメラーゼは Quick Taq HS Dye Mix（TOYOBO，大阪）を使用し，プライマーは，Forward 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3'，reverse 5'-AACGTTGTAACCCACCCAAGA-3' の配列を用い，最終濃度 1 mM で使用した。PCR の条件は 94℃ 10 sec，57℃ 10 sec，68℃ 30 sec を 32 サイクルとした¹⁷⁾。PCR は T100TM サーマルサイクラー（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA，USA）を使用し，PCR 産物は 2% アガロース電気泳動にて観察した。

4. PCR による黄色ブドウ球菌の検出

ポアメディア® MRSA 分離培地 II 上に生成したコロニーは，卵黄反応，コロニー黄変の有無を観察した後，黄色ブドウ球菌に特異的な遺伝子配列の有無を PCR 法にて解析した。使用したプライマーは，黄色ブドウ球菌に特異的な配列を増幅できるとして報告されているもので，

Sa442F : 5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTC TTCACG-3'，

Sa442R : 5'-CGT AATGAGATTTTCAGTAGATAA TACAACA-3'

である^{18, 19)}。採取したコロニーを滅菌水に懸濁し，100℃ 10 min の加熱の後，15000 × g，4℃ 5 min の遠心分離によって得た上清をテンプレートとして PCR を行った。PCR の条件は，92℃ 3 min の熱変性の後，92℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 1 min のサイクルを 30 回，その後に 72℃ の伸長反応を 3 min とした。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動によって観察した。

5. *SCCmec* タイプの解析

ポアメディア® MRSA 分離培地 II 上から採取したコロニーから，前述の方法でテンプレートとなる DNA を抽出し，*SCCmec* タイプの判定法として報告されているマルチプレックス PCR 法により *SCCmec* タイプの解析を行った²⁰⁾。*SCCmec* の type I，type II，type III，type IVa，type IVb，type IVc，type IVd，type V のそれぞれの特徴的配列を標的とするプライマーを使用し（表 1），PCR を行った。PCR の条件は，94℃ 5 min の熱変性の後 94℃ 45 sec，65℃ 45 sec，72℃ 90 sec のサイクルを 10 回行い，その後再び 94℃ 45 sec，55℃ 45 sec，72℃ 90 sec のサイクルを 25 回行い，72℃ での伸長反応 10 min とした。PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動によって観察し，増幅した遺伝子のサイズの違いによって *SCCmec* のタイプを判定した。*SCCmec* type I から type V まで，それぞれのプライマーによって増幅される遺伝子のサイズも表 1 に示す。

結 果

1. 鼻腔検体からの *mecA* 陽性ブドウ球菌の検出

ポアメディア® MRSA 分離培地 II 上に塗布された被検者 143 名の鼻腔検体を好気培養したところ，65 名分の培地において明確なコロニー形成がみられた。本培地では，卵黄反応の有無とコロニー黄変の有無により黄色ブドウ球菌と CoNS を判別可能だが（図 1），65 名の被験者中には，黄色ブドウ球菌と CoNS の両

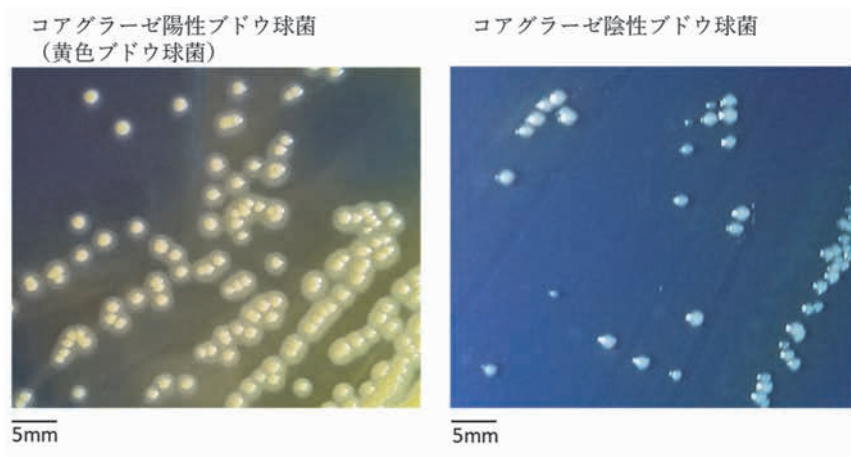


図1 ポアメディア®MRSA分離培地Ⅱ上に形成されたコロニー

被検者の鼻腔検体を塗布し好気培養したポアメディア®MRSA分離培地Ⅱ。コアグララーゼ陽性ブドウ球菌（黄色ブドウ球菌）のコロニーは黄色で、卵黄反応としてコロニー周囲に暈がみられる（左）。CoNSのコロニーは白色で周囲に暈はみられない（右）。

者のコロニーが形成されている被検者もみられた。そこで、一名の被検者でも色と形態が異なるコロニーが形成されていた場合はそれらすべてを採取していったところ、合計86個のコロニーから菌株を回収することができた。次にこれらの菌株について *mecA* 遺伝子特異的なプライマーを用いてコロニーダイレクトPCRを行ったところ、86個すべての菌株において *mecA* 遺伝子が検出された（図2）。

2. *mecA* 陽性ブドウ球菌からの黄色ブドウ球菌の検出
ポアメディア®MRSA分離培地Ⅱは高濃度食塩とセフォキシチンを含有し、平板上にコロニーを形成する細菌をβ-ラクタム系薬剤耐性ブドウ球菌、さらにコロニー周囲に卵黄反応がみられるものを黄色ブドウ球菌（コアグララーゼ産生性ブドウ球菌）と判定できる選択鑑別分離培地²²⁾である。そこで、*mecA* を持つことが確認された86菌株のうち、培地上で卵黄反応がみられた5菌株（a, b, c, d, e）を選抜し、卵黄反応がみられなかった5菌株（1, 2, 3, 4, 5）をコントロールとして、黄色ブドウ球菌特異的なプライマーを用いたPCRを行った。その結果、卵黄反応陽性の5菌株のうち黄色ブドウ球菌と判定できる菌株はaとbの2菌株にとどまった（図3）。

3. *mecA* 陽性ブドウ球菌における *SCCmec* タイプの解析
次に上記で選択した10菌株について、*SCCmec* のタイプをマルチプレックスPCR法で検索した。卵黄反応がみられた5菌株（a, b, c, d, e）の中では、b, c, d, eから抽出したDNAで280bpの増幅が見られ、卵黄

反応がみられなかった5菌株（1, 2, 3, 4, 5）の中では1, 4, 5に776bpの増幅が見られた（図4）。それぞれの *SCCmec* タイプで増幅される遺伝子のサイズから、b, c, d, eは *SCCmec* typeⅢ, 1, 4, 5は *SCCmec* typeⅣaであることが示された（表1）。

考 察

本研究では、被験者である本学学生143名中65名（45%）の鼻腔検体から *mecA* 陽性ブドウ球菌が検出された。2017年に報告した先行研究では、本学学生140名中12名（8.6%）から *mecA* 陽性ブドウ球菌が検出されている¹⁷⁾。また、2015年に報告された本研究と同様に大学生を対象とした研究では、MRSAの保有率が146名中2名（1.4%）、MR-CoNSのうちMRSE（*Mechicillin-Resistant S. epidermidis*）の保有率が146名中19名（13%）であった²¹⁾。これらの先行研究の結果と比較すると、本研究では *mecA* 陽性ブドウ球菌が検出された被験者数が著しく多い。いずれの報告でも、綿棒で採取した鼻腔検体を選択分離培地に塗布して培養することで菌体を採取しており、使用した培地の種類が異なるとはいえ、本研究で行った方法と鋭敏度においてはほぼ差がない方法である。したがって、本研究で示した結果は、*mecA* 陽性ブドウ球菌の保有率が増加している可能性を示唆すると考えられ、これはCoNSにおける *mecA* 検出率の高さと大きく関連していると思われる¹⁴⁾。また、本研究の対象となった本学学生は、寮などで全員が同一の環境で共同生活をしているわけではない。このことは、本研究で明らかになった *mecA* 陽性ブドウ球菌の拡散と保有率

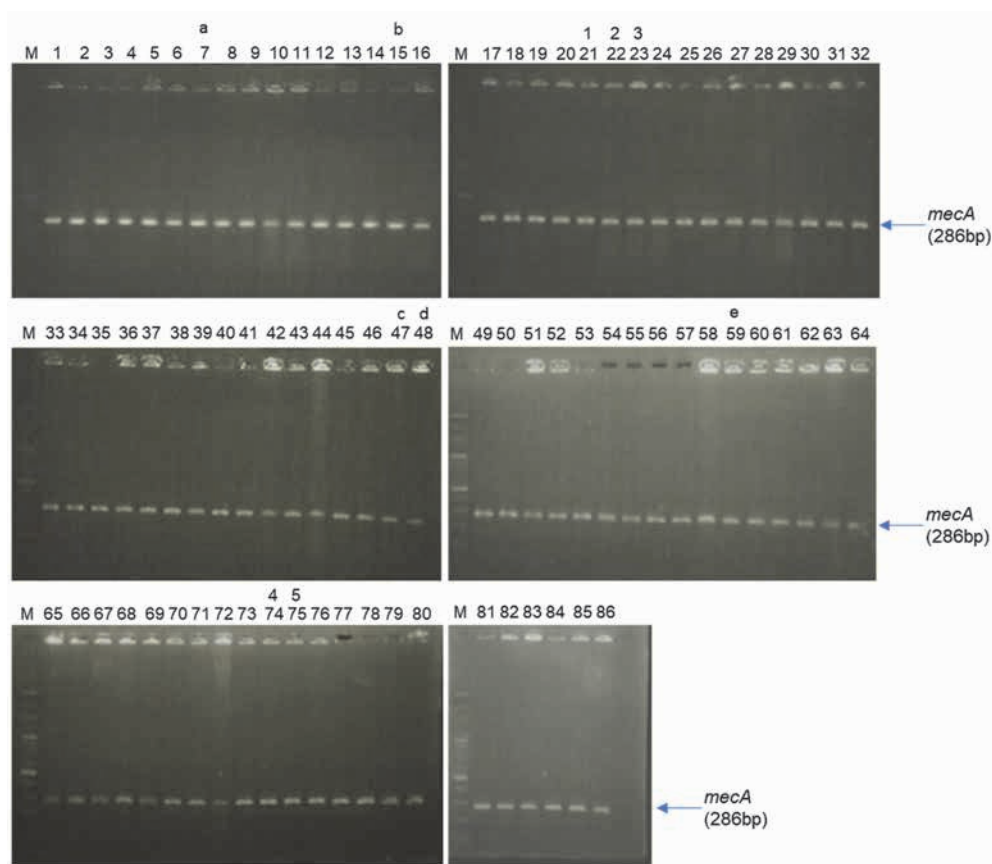


図2 PCRによる *mecA* 遺伝子の検出

ポアメディア® MRSA 分離培地 II 上にコロニーが形成された 65 名の被検者から得られた 86 菌株について PCR による *mecA* 遺伝子の検出を行った。2% アガロースゲルによる電気泳動像を示す。86 菌株すべてに *mecA* 遺伝子 (286 bp) の存在が確認された。卵黄反応陽性として選択したサンプル (a, b, c, d, e) と卵黄反応陰性として選択したサンプル (1, 2, 3, 4, 5) は、それらのサンプル番号を通し番号の上に記載した。M: 100 bp DNA ラダーマーカー。

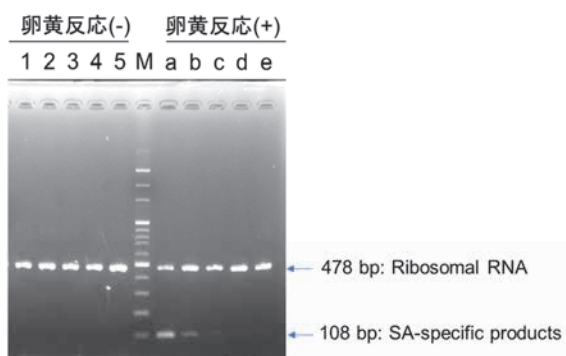


図3 PCRによる黄色ブドウ球菌の検出

mecA 陽性の 86 菌株のうち、卵黄反応陽性のサンプル (a, b, c, d, e) と卵黄反応陰性のサンプル (1, 2, 3, 4, 5) を黄色ブドウ球菌特異的なプライマー (Sa442F, Sa442R) を用いて PCR を行った。黄色ブドウ球菌特異的な PCR 産物は 108 bp のサイズで増幅される。Ribosomal RNA (16S rRNA) は内部標準として使用した。M: 100 bp DNA ラダーマーカー。

の増加は、本学学生だけに限定してみられる特殊な傾向ではない可能性を示唆している。従って本研究結果は、*mecA* 陽性ブドウ球菌の拡散防止を院内環境以外においても対処すべき問題であるということを改めて明らかにしたと言える。

本研究では、MRSA の分離のための培地としてポアメディア® MRSA 分離培地 II を使用した。この培地は高濃度食塩とセフォキシチンを含む、平板上にコロニーを形成する細菌を β -ラクタム系薬剤耐性ブドウ球菌、さらにコロニー周囲に卵黄反応がみられる細菌を黄色ブドウ球菌 (コアグラゼ産生性ブドウ球菌) と判定可能な選択鑑別分離培地である。本研究では、同培地上にコロニーを形成した 86 菌株のうち 5 菌株を卵黄反応陽性として採取したが、黄色ブドウ球菌に特異的なプライマーを使用して PCR を行ったところ、黄色ブドウ球菌と判定できたのは 5 菌株中 2 菌株のみであった。同培地では、黄色ブドウ球菌のみならず、S.

表1 SCC *mec* タイプ判定のためのマルチプレックス PCR で使用したプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'→3')	サイズ (bp)	標的遺伝子
SCC <i>mec</i> Type I			
Forward	GCTTTAAAGAGTGTCTTACAGG	613	SCC <i>mec</i> I
Reverse	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
SCC <i>mec</i> Type II			
Forward	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCC <i>mec</i> II
Reverse	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
SCC <i>mec</i> Type III			
Forward	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCC <i>mec</i> III
Reverse	CCTTAGTTGTCTGTAACAGATCG		
SCC <i>mec</i> Type IVa			
Forward	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Reverse	CTACTCTCTGAAAAGCGTCG		
SCC <i>mec</i> Type IVb			
Forward	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Reverse	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
SCC <i>mec</i> Type IVc			
Forward	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCC <i>mec</i> IVc
Reverse	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
SCC <i>mec</i> Type IVd			
Forward	CTCAAATACGGACCCCAATACA	881	SCC <i>mec</i> IVd
Reverse	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
SCC <i>mec</i> Type V			
Forward	GAACATTGTACTTAAATGAGCG	325	SCC <i>mec</i> V
Reverse	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		

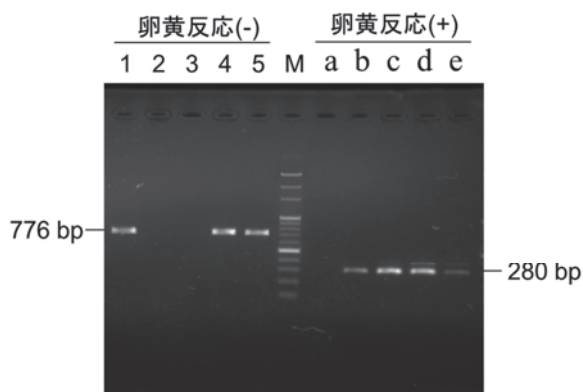


図4 マルチプレックス PCR による SCC*mec* タイプの解析 *mecA* 陽性の菌株のうち、卵黄反応陽性のサンプル (a, b, c, d, e) と卵黄反応陰性のサンプル (1, 2, 3, 4, 5) の SCC*mec* タイプを, type I, type II, type III, type IV a, type IV b, type IV c, type IV d, type V のそれぞれの特徴的配列を標的とするプライマーを使用し (表 1), マルチプレックス PCR を行った. サンプル 1, 4, 5 で type IV a の PCR 産物 (776 bp), サンプル b, c, d, e で type III の PCR 産物 (280 bp) の増幅が見られた. M : 100 bp DNA ラダーマーカー.

haemolyticus ならびに *S. epidermidis* でも希少ながら卵黄反応がみられることがあるとされているため²²⁾, 黄色ブドウ球菌の同定にはコロニーの発色や周囲の卵黄反応の有無のみで判定することは危険であることを確認した. 本研究では PCR の結果, *mecA* 陽性黄色ブドウ球菌は 2 菌株であることが示されたが, このことは被検者 143 名中 2 名 (1.4%) から MRSA が検出されたことを意味している. この結果は, 前述した中畑らの報告で示された MRSA 保有率とほぼ一致しており²¹⁾, *mecA* 陽性ブドウ球菌の中でも MRSA の拡散は比較的緩慢で, 保有率の急激な増加も見られていないことを示したと言えるだろう. しかし, この結果は同時に, 検出された 86 菌株の *mecA* 陽性ブドウ球菌のうち実に 84 菌株 (98%) が MR-CoNS であったことを示している. 818 名の小児を対象とした先行研究においても, 35 名 (4.3%) の MRSA 保有率に対して, MR-CoNS 保有率は 231 名 (28.2%) と大きく上回っている²³⁾. これらの結果は, *mecA* 陽性ブドウ球菌の急激な拡散には, MRSA ではなく MR-CoNS が大きく寄与していることを示唆している.

mecA 陽性ブドウ球菌は可動性の染色体カセット

SCC*mec* で *mecA* 遺伝子を獲得しているが、本研究においても解析した 10 菌株のうち 7 菌株が SCC*mec* を保有していることを確認し、その SCC*mec* type も解析することができた。本研究では、SCC*mec* type III を持つ MRSA が 1 株、SCC*mec* type III を持つ MR-CoNS が 3 株、SCC*mec* type IV a を持つ MR-CoNS が 3 株であったが、この結果は、MRSE では SCC*mec* type IV a が最も多かったとする Jamaluddin らの報告と概ね一致している¹⁶⁾。これらの結果から、MRSA の *mecA* 遺伝子獲得とその拡散の原因を、MR-CoNS からの SCC*mec* の水平的伝播であると推測することは妥当である。実際に、被検者から抽出した MR-CoNS の SCC*mec* タイプを解析し、その遺伝子が、世界中に広く分布している CA-MRSA と同一性が高いことが報告されている²⁴⁾。また、ブドウ球菌属の遺伝子を菌種によらず解析し、SCC*mec* が MR-CoNS から伝播している可能性も示されている¹⁶⁾。しかし、これらの報告は、ブドウ球菌の間に *mecA* 遺伝子が拡散していることを示してはいるが、どこで水平的伝播が行われているかを示すものではない。本研究では、鼻腔検体を全く同じ方法で採取した集団において、同一の SCC*mec* を保有する MR-CoNS ならびに MRSA が複数検出された。このことは、間接的に鼻腔に感染したブドウ球菌が鼻腔内で SCC*mec* を水平的に伝播している可能性を示唆したものと考えられる。そして、その伝播を主に担うのは、常在菌として鼻腔や皮膚、軟組織に長期間定着しやすい CoNS であることも示唆された。本研究結果は、先行研究の結果と同様に、集団における MRSA の保有率は比較的 low であり、急激な増加も見られなかったことを示した。したがって、MR-CoNS は、黄色ブドウ球菌に SCC*mec* を伝播することよりも、他の CoNS に SCC*mec* を拡散していくことにおいて危険性があると言えるのではないだろうか。CoNS は黄色ブドウ球菌と比較して病原性が弱いと考えられがちだが、日和見感染の原因菌として、あるいは健常者においても皮膚軟部組織感染症の原因菌として、その病原性は決して軽視できるものではない。今後、薬剤耐性対策を進めていくうえで、MR-CoNS の拡散予防は極めて重要になってくるものと考えられる。

薬剤耐性菌は世界的に増加しており、増加防止策は国際社会における大きな課題である。2015 年の WHO の総会で薬剤耐性 (AMR) に対するグローバルアクションプランが採択され、加盟各国は 2 年以内に薬剤耐性に関する国家行動計画を策定することを求められた²⁵⁾。厚生労働省がこれに呼応して我が国として初めての AMR 対策アクションプランを掲げ、黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性率を 2020 年までに 20% に抑え

するという計画を行っている。この計画に基づいた国民運動を展開するには、MRSA ならびに MR-CoNS の伝播状況を正確に把握することは必要不可欠である。本研究で得られた知見は今後、薬剤耐性対策を推進していくうえでの一助になると考えられる。

結 論

本研究では、本学学生 143 名を対象として *mecA* 陽性ブドウ球菌の検出を行ったところ、143 名中 65 名 (45%) から検出された。これは非常に高い検出率で、*mecA* 陽性ブドウ球菌の拡大を示す結果であると考えられる。さらに、検出された菌株を解析したところ 86 株中 84 株 (98%) が CoNS であった。これらの菌株は市中でも頻繁にみられる SCC*mec* type IV a を保有し、それが鼻腔内で他のブドウ球菌に水平的に伝播することで *mecA* 陽性ブドウ球菌が増加、拡散する可能性が示唆された。今後は、常在菌が潜在的な薬剤耐性菌となりうる危険性を考慮して、抗菌薬の適正使用など薬剤耐性対策を喫緊の課題として進めていかなければならないと考えられる。

謝 辞

本研究にご協力いただきました本学学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Beck WD, Berger-Bächi B, Kayser FH. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. *J Bacteriol.* 1986; 165: 373-378.
- 2) Patricia JM. 'Celbenin'-resistant staphylococci. *BMJ.* 1961; 1: 113-114.
- 3) Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect.* 1993; 25: 97-108.
- 4) Riley TV, Pearman JW, Rouse IL. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Med J Aust.* 1995; 163: 412-414.
- 5) Moreno F, Crisp C, Jorgensen JH, Patterson JE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 1308-1312.
- 6) Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy CJ, Leclercq R. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clin Infect Dis*. 1997; 25: 647–653.
- 7) Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359: 1819–1827.
 - 8) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 1549–1555.
 - 9) Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1147–1152.
 - 10) Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 4352–4359.
 - 11) Favre B, Hugonnet S, Correa L, Sax H, Rohner P, Pittet D. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005; 26: 697–702.
 - 12) Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res*, 2009; 164: 404–410.
 - 13) Longauerova A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratisl Lek Listy*, 2006; 107: 448–452.
 - 14) York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 249–253.
 - 15) Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, Camacho-Ortiz A, González-González G, Llaca-Díaz J, Rodríguez-Noriega E, Garza-González E. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20: 419–428.
 - 16) Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3778–3783.
 - 17) 引頭 毅, 猪俣 恵, 堀江 俊, 村上幸孝. *mecA* 陽性ブドウ球菌の本学学生からの検出と青年期における分布状況の推測. 岐阜歯科学会誌. 2017; 44: 65–71.
 - 18) Pereira EM, Schuenck RP, Malvar KL, Iorio NL, Matos PD, Olenzki AN, Oelemann WM, dos Santos KR. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiol Res*. 2010; 165: 243–249.
 - 19) Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 618–623.
 - 20) Amirkhiz MF, Rezaee MA, Hasani A, Aghazadeh M, Naghili B. SCC*mec* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an eight year experience. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2015; 3: e30632.
 - 21) 中畑千夏子, 奥山 茜, 原田知恵, 下沢英里子, 村瀬麻亜沙, 鍵谷ゆうこ, 羽毛田真衣, 丸山理沙, 坂田憲昭. 大学生におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の分布とその特徴. 長野県看護大学紀要. 2015; 17: 51–61.
 - 22) 栄研化学: ポアメディア”MRSA 分離培地Ⅱ. http://www.eiken.co.jp/products_technique/pamph/4083.pdf (2020年1月22日閲覧)
 - 23) Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3364–3372.
 - 24) Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, Desprez A, Maiga A, Woerther PL, Gaillard K, Jeanrot C, Wolff M, Schrenzel J, Andremont A, Ruimy R. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCC*mec* IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2010; 202: 270–281.
 - 25) 厚生労働省: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html> (2020年3月19日閲覧)