

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	増田 加奈子
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Molecular characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from skin infection (皮膚感染症由来黄色ブドウ球菌の分子疫学解析)			
論文審査担当者			
主査	教授	小松澤 均	印
審査委員	教授	大毛 宏喜	
審査委員	教授	太田 耕司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】 Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) は Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> (MSSA) が耐性遺伝子である <i>mecA</i> を獲得したことによって発生したと考えられている。<i>mecA</i> は SCC<i>mec</i> 上に存在しており，細菌学的には SCC<i>mec</i> I, II, III型を院内感染型の HA-MRSA, IV, V型を市中感染型の CA-MRSA と定義されている。CA-MRSA は皮膚・軟部組織感染症や壊死性肺炎を引き起こす起因菌として知られているが，遺伝的多様性があり，様々なタイプが世界中に存在している。中でも Sequence type (ST) 8 に分類され Panton-Valentine leukocidin (PVL) 陽性の USA300 は高病原性を有する株として知られている。一方，日本においては USA300 系統とは異なる SCC<i>mec</i> IV1型の ST8 CA-MRSA (ST8 CA-MRSA/J) が日本固有株として2003年に報告され，侵襲性の高い感染症の原因菌として検出されている。外来における MRSA は HA-MRSA と CA-MRSA が混在していると考えられるが，その割合は不明である。本研究では，西日本における皮膚感染症由来 <i>S. aureus</i> の遺伝的型別を解析し，HA-MRSA と CA-MRSA の分布，各クローンが保有する病原因子や薬剤感受性の特徴および ST8 CA-MRSA/J 株の分子疫学解析を行った。また，本研究で見出されたオキサシリン感性 <i>mecA</i> 陽性 <i>S. aureus</i> (OS-MRSA) について，MPIPc に感性を示す要因について検討した。</p> <p>【方法】 2015年6月から2018年12月までに臨床検査センターで分離された外来や個人病院から提出された皮膚病変由来 <i>S. aureus</i> 540株（開放膿由来315株，非開放膿由来108株，褥瘡由来117株）の次世代シーケンス解析を実施し，得られたゲノムデータから ST, Clonal complex (CC), 病原遺伝子，薬剤耐性遺伝子を探索した。薬剤感受性試験は MicroScan Walkaway を用いて19薬剤の MIC を測定した。OS-MRSA の検討では臨床検査センターで MSSA と判定され，PCR法により <i>mecA</i> 陽性であった株を検体とした。ムピロシン (stringent stress response を誘導する) 存在下あるいは非存在下で MPIPc の MIC を微量液体希釈法により測定し，Western blotting により膜画分における penicillin binding protein 2' (PBP2') の産生性を確認した。</p> <p>【結果・考察】 全540株の CC の割合は CC8 (21%)，CC121 (14%)，CC15 (13%)，CC5 (12%) であった。各 CC はそれぞれ特定のコアグララーゼ型と SCC<i>mec</i> 型を示し，一部の CC は <i>mecA</i> 陰性株のみであった。<i>mecA</i> 陽性株の割合は全体で40%，開放膿は38%，非開放膿は14%，褥瘡は70%であり，非開放膿は MSSA，褥瘡は MRSA</p>			

が主な原因となっていることがわかった。SCC*mec* 型は MRSA のうち、36%が HA-MRSA の主流の I 型と II 型、64%が CA-MRSA の主流の IV 型と V 型であった。また、開放膿と非開放膿では IV, V 型、褥瘡では I, II 型が半数以上を占め、SCC*mec* 型の割合は病態により異なった。病態における CC の割合は、開放膿では全体の割合と同様に CC121, 8, 15, MSSA が主な非開放膿では、CC15, 8, 45, MRSA が主な褥瘡では CC8, 5, 1 が大半を占め、病態ごとに優位な CC が異なった。このことは皮膚病変由来の *S. aureus* の遺伝子型と病態に関連があることを示唆している。上位の CC が保有する病原遺伝子について検索したところ、CC により保有する病原遺伝子が異なること、また同一 CC であっても病態によって病原遺伝子の保有率が異なることが明らかとなった。例えば、開放膿から分離された CC121 は Exfoliative toxin (ET) 遺伝子の陽性率が 86%と高く、CC15 も 63%の陽性率であった。一方、非開放膿から分離された CC15 の ET 遺伝子の陽性率は 15%と低かった。いずれの病態からも一定程度の割合で検出された CC8 のほとんどが ST8 であった (97/113 株)。ST8 のうち、USA300 は 2/97 株 (2%) であったが、ST8 CA-MRSA/J に特徴的な SCC*mec* IV1 型, toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) および staphylococcal enterotoxin C (SEC) 遺伝子を保有する株は 20/97 株 (21%), *mecA* を保有しないが ST8 CA-MRSA/J と同様の病原遺伝子保有パターンを示す ST8 CA-MSSA/J は 17/97 株 (18%) 存在した。ST8 CA-MRSA/J, ST8 CA-MSSA/J は ST8 の 4 割近くを占め、皮膚病変由来 *S. aureus* においては、USA300 よりもはるかに高い検出率を示した。薬剤感受性測定の結果、抗 MRSA 薬, ST 合剤および RFP の MIC は大部分の株で低値であった。SCC*mec* 型別では IV・V 型に比べ、I・II 型の方が多くの薬剤に耐性を示した。CA-MRSA はアミノグリコシド系薬やキノロン系薬に感性を示す場合が多いとされるが、SCC*mec* IV, V 型にもゲンタマイシンやレボフロキサシンに耐性を示す株が多く存在した。*mecA* を保有しながら MIPIC に感性を示す OS-MRSA が 11 株存在し、そのゲノタイプは全て ST121, SCC*mec*V 型であった。これらの株は共通して *mecA* のプロモーター配列に点変異があり、*mecA* リプレッサーの MecI/BlaI が結合するパリンドローム構造内の 18 番目の塩基が C から T に置換していた。この変異は SCC*mec*V 型株全てに共通に保存されていた。この変異は PBP2'産生を低下させることが知られており (Ender M et al., Int J Med Microbiol, 298:607-617, 2008), ST121-SCC*mec*V 株は PBP2'の発現量が低いために OS-MRSA の形質を示すと考えられた。また、これらの株の多くがムピロシン存在下で MIPIC 耐性に変化し、ムピロシン単独では PBP2'の産生増加は認められなかったが、ムピロシンと MIPIC 両方の添加で PBP2'の産生増加が確認された。OS-MRSA を臨床現場で見逃さないためにムピロシン添加培地は有用であることが示唆された。

以上の結果から、本論文は皮膚の病態ごとに分離される黄色ブドウ球菌の優位な CC が異なること、またそれぞれの CC が保有する病原因子や薬剤感受性にも特徴がみられることを明らかにした点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が増田 加奈子に博士 (歯学) の学位を授与することに十分な価値あるものと認めた。