

伝染性膿痂疹由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) がもつコラーゲン付着因子に関する遺伝学的解析

史 達・樋口 渉・斎藤 幸平

高野 智洋・山本 達男

新潟大学大学院医歯学総合研究科

国際感染医学講座細菌学分野

Molecular Analysis of the Collagen Adhesin Gene in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Bullous Impetigo

Da SHI, Wataru HIGUCHI, Kohei SAITO,

Tomomi TAKANO and Tatsuo YAMAMOTO

Division of Bacteriology,

Department of Infectious Disease Control and International Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) はその発見 (1961年) 以来院内感染の主要菌で, 院内感染型 MRSA (hospital - acquired MRSA, HA - MRSA) と呼ばれてきた。一方, 1997 - 1999年以降, 市中で感染拡大する市中感染型 MRSA (community - acquired MRSA, CA - MRSA) が出現, 世界の注目を集めた。日本では CA - MRSA は小児の伝染性膿痂疹 (水疱型膿痂疹 bullous impetigo) から分離される。本研究では伝染性膿痂疹から分離された CA - MRSA (biCA - MRSA) の病原性状を解析した。伝染性膿痂疹は黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin, ET) によって惹起される。しかし, biCA - MRSA の場合には ET 陽性率は 52.3 % にすぎなかった。一方, コラーゲン付着因子 (collagen adhesin, CNA) 陽性率は 85.7 % で, CNA 陽性率が ET 陽性率より有意に高率であった ($P = 0.043$)。CNA 遺伝子構造を決定した結果, 各ドメイン領域は高度に保存されて

Reprint requests to: Tatsuo YAMAMOTO
Division of Bacteriology Department of
Infectious Disease Control and International
Medicine Niigata University Graduate School
of Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講
座細菌学分野 山本 達男

いたが、B領域（幹ドメイン）の繰り返し数は biCA-MRSA の ST 型によって異なり、分離頻度が一番高い ST89 型で 3 回と最も多かった。biCA-MRSA の場合、CNA（特に B 領域の繰り返し数）が感染に強く関連していることが示唆された。

キーワード：伝染性膿痂疹，市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（CA-MRSA），表皮剥脱毒素（ET），コラーゲン付着因子（CNA），遺伝子構造

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has played a principal role in hospital infection since it was detected in 1961. It is termed hospital-acquired MRSA (HA-MRSA). On the other hand, community-acquired MRSA (CA-MRSA) appeared after 1997 to 1999, and has been internationally investigated. In Japan, CA-MRSA is also isolated from children with contagious impetigo (bullous impetigo). In this study, we analyzed CA-MRSA (biCA-MRSA) strains isolated from children with bullous impetigo. Of these strains, 52.3 and 85.7 % were positive for exfoliative toxin (ET) and collagen adhesion factor (CNA), respectively, showing a significant difference ($P = 0.043$). When determining the CNA gene structure, each domain region was favorably maintained. However, the number of B-region (stem-domain) repetitions depended on the ST type of biCA-MRSA. ST89 type strains, which were most commonly isolated, showed the largest number (3 times). The results suggest that CNA (especially the number of B-region repetitions) is closely involved in infection with biCA-MRSA.

Key words: Bullous impetigo, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), exfoliative toxin (ET), collagen adhesin (CNA), gene structure

緒言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）は 1961 年に英国で分離されて以来，世界中で院内感染の主要菌として注目されてきた¹⁾²⁾。MRSA はペニシリン系やセフェム系等の β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すだけでなく，マクロライド系，テトラサイクリン系，さらにキノロン系抗菌薬等にも耐性を示す多剤耐性菌である。日本や米国では 1970 年代後半から 1990 年代初期にかけて深刻な MRSA 流行が発生した¹⁾²⁾。現在でも日本や米国では黄色ブドウ球菌に占める割合が 60%前後で，MRSA 高度汚染国である。感染者は主に 50 歳代から 60 歳代の入院患者あるいは易感染者で，MRSA は院内感染型 MRSA (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) と呼ばれてきた¹⁾³⁾。HA-MRSA は一つのクローンではなく，多様なクロー

ンが世界に分布する²⁾⁴⁾。日本に分布する主要な HA-MRSA は，米国にも分布する New York/ Japan clone (遺伝型：ST5) である⁴⁾⁵⁾。

一方，1997 年から 1999 年にかけて米国で新興 MRSA による市中肺炎や敗血症による小児死亡例が続発，世界の注目を集めた¹⁾⁵⁾⁻⁷⁾。この MRSA は従来の MRSA とは異なり，市中で感染を拡大，流行するために市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA, CA-MRSA) と呼ばれている。CA-MRSA にも多様なクローンが存在する⁷⁾。当初に報告された CA-MRSA 群は Pantone-Valentine ロイコシジン (PVL) と呼ばれる白血球破壊毒素を産生する MRSA で，PVL が陰性の従来の MRSA とは明白な差異が存在することから，“免疫抵抗性の強毒性 MRSA”として特に注目された¹⁾⁶⁾⁷⁾。PVL 陽性の CA-MRSA には，主に米国に分布する USA400 クローン (遺伝型：ST1)⁵⁾⁷⁾，USA300 クローン (遺伝型：ST8)⁵⁾⁷⁾，

主にヨーロッパに分布する ST80 型⁷⁾、そして日本を含む世界に広く分布する ST30 型¹⁾⁷⁾⁻¹⁰⁾ が含まれる。PVL 陽性 CA-MRSA は、健康な小児や若年運動選手等が皮膚の接触によって感染することが多く、癬(せつ)や癰(よう)を含む膿瘍と強く関連する¹⁾⁶⁾⁷⁾。

なお、PVL 陰性の CA-MRSA も存在する¹¹⁾。日本では ST8 型、ST88 型、ST89 型、ST91 型などが伝染性膿痂疹(水疱型膿痂疹、いわゆる“とびひ”)から分離される¹¹⁾。病型が不明な PVL 陰性 CA-MRSA も分布する¹²⁾¹³⁾。

伝染性膿痂疹(水疱型膿痂疹)は、黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素(exfoliative toxin, ET)によって引き起こされる毒素性疾患である¹⁴⁾。ETはプロテアーゼで、デスマグレイン1(デスマソームに存在するカドヘリン様の細胞間付着因子)を切断することで、表皮顆粒層を破壊、棘融解を起し水疱を生じる¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。小児に多発する。なお、5歳以下の乳幼児の場合には、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群(staphylococcus scalded skin syndrome, SSSS)と関連する¹⁴⁾¹⁷⁾。ETは抗原性によってA、B、C、Dの4型に区別されているが、ヒトの疾患と関連するのはETA、ETB、ETDの3型で、伝染性膿痂疹(水疱型膿痂疹)とSSSSの場合にはETAとETBが関連する¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

しかしながら、小児の伝染性膿痂疹から分離されたCA-MRSA(CA-MRSA from bullous impetigo, biCA-MRSA)の場合にはET陽性率が56.3%¹¹⁾あるいは61.5%¹⁸⁾にすぎなかった。一方で、コラーゲン付着因子(collagen adhesin, CNA)をコードする遺伝子(*cna*)の陽性率は73.1%¹⁸⁾と高く、CA-MRSAの場合にはCNAと伝染性膿痂疹の関連が示唆された。

コラーゲン付着因子はブドウ球菌表面付着因子(microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs)の一種であり、細胞外マトリックスに存在するコラーゲンを特異的に認識、結合する¹⁹⁾²⁰⁾。本研究ではbiCA-MRSAがもつCNAと伝染性膿痂疹の関連を解明するために、CNA遺伝子の構造解析を行った。

材料と方法

使用菌株

biCA-MRSAとして21株を使用した。このうち、NN1株(PVL陽性ST30型)とNN3からNN11までの9株(PVL陰性のST8型、ST89型、ST91型)は2003年に7ヶ月から4歳までの小児から¹¹⁾、NN14からNN17までの4株(PVL陰性のST89型、ST91型)は2004年に1歳から6歳までの小児から¹¹⁾、そしてNN18からNN23までの6株とNN28株(PVL陰性のST8型、ST89型、ST91型)は2005年に3歳から6歳までの小児からそれぞれ分離された。使用したHA-MRSAは235株であった。このうち、127株は2003年から2005年に新生児集中治療部(NICU)の新生児(鼻粘膜拭取り等の検体)から、107株は2005年に入院成人患者(血液、唾液、尿液等の検体)から分離された。また、ゲノム配列が決定されたMRSA Mu50株(Genbank accession no. BA00017)²¹⁾を用いた。

培養

MRSA株はLB液体培地(Difco Laboratories, Detroit, MI)を用いて、37℃で対数増殖期まで培養した。固体培地には普通寒天培地(栄研化学)を用いた。

遺伝型別

MRSA株について、multilocus sequence typing(ST型別)、proteinA gene typing(*spa*型別)、accessory gene regulator(*agr*) typing(*agr*型別)、staphylococcal cassette chromosome *mec*(SCC*mec*) typing(SCC*mec*型別)、そしてコアグラマーゼ型別を行った²²⁾²³⁾。

病原性遺伝子の検出

MRSA株がもつ病原性遺伝子はPCR法で検出した²²⁾²³⁾。標的とした毒素遺伝子は、PVL遺伝子(*luk_{PV}SF*)、白血球毒素遺伝子(*lukE-lukD*)、3種類のET遺伝子(*eta*, *etb*, *etd*)、10種類のエンテロトキシン(staphylococcal enterotoxin, SE)

遺伝子 (*tst*, *sea*, *sec* など), 5種類の溶血毒素 (α -ヘモリジン遺伝子 [*hla*], β -ヘモリジン遺伝子 [*hly*], γ -ヘモリジン遺伝子 [*hlg*] など) の計 21 遺伝子であった。付着因子遺伝子は、バイオフィルム形成関連因子遺伝子 (*icaA*, *icaD*), コラーゲン付着因子 (CNA) 遺伝子 (*cna*), ラミニン付着因子遺伝子 (*eno*), フィブロネクチン付着因子遺伝子 (*fnbA*, *fnbB*), エラスチン付着因子遺伝子 (*ebpS*), フィブリノーゲン付着因子遺伝子 (*clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*), そして骨シアロプロテイン付着因子 (BBP) 遺伝子 (*bbp*) の 14 遺伝子であった。用いた PCR プライマーは表 1 に示した。

薬剤感受性試験

MRSA 株の薬剤感受性は、米国 CLSI の薬剤感受性試験実施標準法に基づき、Mueller-Hinton 培地を用いて寒天平板希釈法で測定した³⁵⁾。

CNA 遺伝子構造解析

MRSA252 株 (GenBank accession no. BX571856) のゲノム配列を基にして、全 CNA 遺伝子配列を増幅するためのプライマー (フォワードプライマー [CNAS-F1], リバースプライマー [CNAS-R1]) を設計した (表 1)。PCR によって増幅した DNA を精製後、塩基配列を決定した。遺伝子構造解析の為に、黄色ブドウ球菌 FDA574 株, MW2 株, MSSA476 株, MRSA252 株の CNA 遺伝子配列 (GenBank accession nos.: M81736, BA000033, BX571857, BX571856) を参照配列とした。

遺伝子系統樹解析

ソフトウェア ClustalX 及び TreeView (Version 1.6.6) を用いて CNA 遺伝子の系統的多様性 (phylogenetic diversity) を分析した。

統計学的解析

比較群の有意差検定には Fisher 検定法を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意差があると判定した。

結 果

CNA 遺伝子の検出と biCA-MRSA との関連性

MRSA がもつ CNA 遺伝子は PCR 法で検出した。図 1 に解析例を示した。biCA-MRSA である NN6 株は CNA 遺伝子をもつが、日本の病院に広く分布する HA-MRSA (New York/Japan clone, Mu50 株) は CNA 遺伝子をもたないことが分かる。

biCA-MRSA21 株と HA-MRSA234 株について、PVL 遺伝子, ET 遺伝子, CNA 遺伝子を PCR 法で調査した結果を表 2 にまとめた。biCA-MRSA には 4 つの ST 型 MRSA が含まれていた。ST8 型は 14.3 % (3/21), ST30 型は 4.8 % (1/21), ST89 型は 66.7 % (14/21), ST91 型は 14.3 % (3/21) で、ST89 型が biCA-MRSA の主要な ST 型であった。

このうち、ST30 型 biCA-MRSA (NN1 株) のみが PVL 陽性で、他の biCA-MRSA は PVL 陰性であった。HA-MRSA もすべて PVL 陰性であった。

ET に関しては、biCA-MRSA では 21 株中 11 株 (52.3 %) が陽性で、陽性株はすべて ETB 陽性株であった。ST 型で見ると、多くの ST89 型 (57.1 % [8/14]) と ST91 型が ETB 陽性で、ST8 型と ST30 型は ET 陰性であった。HA-MRSA ($n = 234$) では、成人入院患者からの MRSA ($n = 107$) はすべて ET 陰性であったが、NICU からの MRSA ($n = 127$) の場合には 1 株が ETB 陽性であった。全 HA-MRSA では 0.4 % [1/234] が ETB 陽性であった。成績をまとめると、予想通り、biCA-MRSA の ET 保有率 (52.3 %) は HA-MRSA の ET 保有率 (0.4 %) より高かった ($P < 0.00001$)。

CNA に関しては、biCA-MRSA では ST30 型 (1 株), ST89 型 (全 14 株), ST91 型 (全 3 株) が陽性であった。ST8 型の 3 株はすべて陰性であった。まとめると、biCA-MRSA では 85.7 % (18/21) が CNA 陽性であった。一方、HA-MRSA では、成人入院患者からの MRSA はすべて CNA 陰性であったが、NICU からの MRSA の場合には

表1 List of PCR primers used in this study

Target gene	Primer		PCR product size (bp)	Reference for the PCR primer
	Name	Sequence		
(1) Primers for PCR assay				
Leukocidin				
<i>luk_{ps}SF</i>	PVL-1	5'-ATCATTAGGTAAAATGCTGGACATGATCCA	433	24
	NPVL-2	5'-GCATCAASTGTATTGGATGACAAAAGC		
<i>lukE-lukD</i>	LUKED-F1	5'-CAGATGTGAAGGGTAGTGA	832	23
	LUKED-R5	5'-TCATTATCAGATGTTGCTGTGG		
Exfoliative toxin				
<i>eta</i>	ETA-3	5'-CTAGTGCATTTGTIATCAAGACG	119	25
	ETA-4	5'-TGCATTGACACCATAGTACTTATTC		
<i>etb</i>	ETB-3	5'-ACGGCTATATACATTCAAITCAATG	262	25
	ETB-4	5'-AAAGTTATTCATTTAATGCACGTGCTC		
<i>etb</i>	Netd-1	5'-CAAACATCATGTATCAAGGATGG	378	26
	Netd-2	5'-CCAGAATTTCCCGACTCAG		
Staphylococcal enterotoxin				
<i> tst</i>	TST-3	5'-AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445	25
	TST-6	5'-ATCGAAGCTTTGGCCCATACTTT		
<i> sea</i>	SEA-3	5'-CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	127	25
	SEA-4	5'-TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
<i> sec</i>	SEC-3	5'-CTCAAGAAGCTAGACATAAAAAGCTAGG	271	25
	SEC-4	5'-TCAAAATCGGATTAACATTATCC		
<i> seg</i>	SEG-1	5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642	27
	SEG-2	5'-AAACTTATATGGAAACAAAAGGTACTAGTTC		
<i> sei</i>	SEI-1	5'-CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576	27
	SEI-2	5'-AAAAAAGCTTACAGGCAGTCCATCTC		
<i> sel</i>	sel-F	5'-ATCAATGGCAAGCATCAAACAG	264	28
	sel-R	5'-TGGAAGACCGTATCCTGTG		
<i> sem</i>	mpSEM-1	5'-CTATTAATCTTTGGYITTAATGGAGAAC	300	25
	mpSEM-2	5'-TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCCAT		
<i> sen</i>	mpSEN-1	5'-ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	680	25
	mpSEN-2	5'-AACTCTGCTCCCACTGAAC		
<i> seo</i>	mpSEO-1	5'-AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	180	25
	mpSEO-2	5'-ATCTTTAAATTCAGCAGATATCCATCTAAC		
<i> seu</i>	PSE2	5'-TAAATAAATGGCTCTAAAATTGATGG	142	29
	PSE6	5'-ATCCCGTGAAAAATAGCATTGAT		
Hemolysin				
<i> hla</i>	HLA-1	5'-CTGATTACTCAAGAATTCGATTG	209	24
	HLA-2	5'-CTTTCAGCCCTACTTTTTTATCAGT		
<i> hlg</i>	mpHLG-1	5'-GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	24
	mpHLG-2	5'-CACCAAAATGTATAGCCTAAAGTG		
<i> hlg-v</i>	mpHLG2-1	5'-GACATAGACTCCATAATGCATTYGT	390	24
	mpHLG2-2	5'-ATAGTCAITTTGGATTAGGTTTCACAAAAG		
<i> hld</i>	HLD-1	5'-AAGAATTTTTTACTCTTAATTAAGGAAGGATG	111	24
	HLD-2	5'-TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA		
Adhesin				
<i> cna</i>	CNA-1	5'-GTCAAGCAGTTATTAACACCGAC	423	30
	CNA-2	5'-AATCAGTAATGTCACCTTTGTCCACTG		
<i> icaA</i>	ica-U	5'-TGGCTGTATTAAGCGGAAGTC	231	31
	ica-L	5'-TTCCAAAGACCTCCCAATGT		
<i> icaD</i>	ICADF	5'-AAACGTAAGAGAGGTGG	381	32
	ICADR	5'-GGCAATATGATCAAGATAC		
<i> eno</i>	ENO-1	5'-ACGTGCAGCAGCTGACT	302	30
	ENO-2	5'-CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC		
<i> fnbA</i>	*	5'-CATAAATGGGAGCAGCATCA	127	33
	*	5'-ATCAGCAGCTGAATTCCTCCATT		
<i> fnbB</i>	FNBB-1	5'-GTAACAGCTAATGGTCAATGATACT	524	30
	FNBB-2	5'-CAAGTTCGATAGGACTACTATGTTC		
<i> ebpS</i>	*	5'-AGAATGCTTTTGCAATGGAT	652	33
	*	5'-AATATCGCTAATGCACCGAT		
<i> clfA</i>	CLFA-1	5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	30
	CLFA-2	5'-CGTTTCTTCCGTAGTTGCAITTTG		
<i> clfB</i>	CLFB-1	5'-ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205	30
	CLFB-2	5'-TTCGCACTGTTTGTGTTGTCAC		
<i> fib</i>	FIB-1	5'-CTCAACTACAATGCGGTCAACAG	404	30
	FIB-2	5'-GCTCTTGTAAAGACCAITTTCTTCAC		
<i> sdrC</i>	SDRC-F1	5'-GGCGACCAAAAGAAATATAATC	287	34
	SDRC-R1	5'-GTTGTAGTTAGTCCATCAGA		
<i> sdrD</i>	SDRD-F1	5'-CCAATGGAAATAAAGTTGAAG	325	34
	SDRD-R1	5'-CGTTTAGGTGCTGTACTTT		
<i> sdrE</i>	SDRE-F1	5'-TGCTCAGCTCCAACAAG	326	34
	SDRE-R1	5'-CAATGACCTCTCTGATGG		
<i> bbp</i>	BBP-1	5'-AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575	30
	BBP-2	5'-ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT		
(2) Primers for sequence determination				
<i> cna</i>	CNAS-F1	5'-AACTGGTATAGTTGGTGTTTATT	-	This study
	CNAS-R1	5'-AAGGCCACTCTTAGTCTGC	-	

* Names of primers not given.

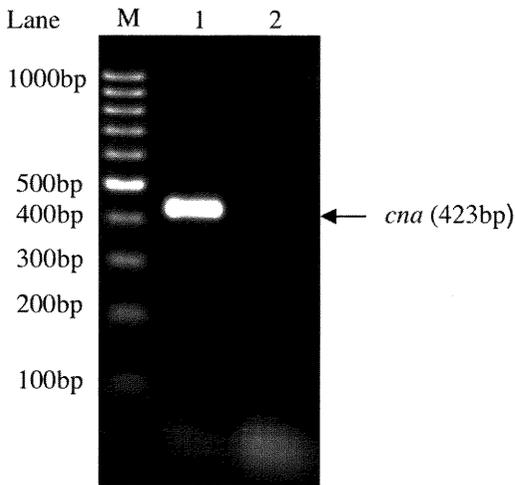


図1 PCR assay for the CNA gene (*cna*). Lane M, 100-bp DNA ladder. Lane 1, biCA-MRSA strain NN6 (ST89); lane 2, HA-MRSA strain Mu50 (ST5; New York/Japan clone). PCR products were electrophoresed in 2.0% agarose.

1株がCNA陽性であった。全HA-MRSAではCNA保有率は0.4%で、biCA-MRSAのCNA保有率(85.7%)より低かった($P < 0.00001$)。

biCA-MRSAについて、ET保有率(52.3%)とCNA保有率(85.7%)を比較すると、CNA保有率の方がET保有率より有意に高かった($P = 0.043$)。なお、NICUで分離されたMRSA(1株)はETB陽性でかつCNA陽性であった。この株のST型はNew York/JapanクローンのST5型ではなく、ST91型で、MRSA感染患者(新生児)はSSSSを発症していた。したがって、ST91 biCA-MRSAが母親あるいは医療スタッフを介してNICUに運ばれ、新生児に感染した可能性が高い。

CNA遺伝子をもつbiCA-MRSAの遺伝学的性状

CNA遺伝子が陽性であった4株のbiCA-MRSA(ST30型1株、ST89型1株、ST91型2株)について遺伝学的特性を表3にまとめた。biCA-

MRSAはCA-MRSAの特徴に一致して、SCC*mec*型はIV型で、オキサシリンの感受性値(MIC, 4または $32 \mu\text{g/ml}$)とイミペネムの感受性値(MIC, 0.06または $0.125 \mu\text{g/ml}$)は低く、非 β -ラクタム系抗菌薬耐性はアミノグリコシド系(ゲンタミシンとカナマイシン)とマクロライド系(エリスロマイシン)に限られていた。ちなみにHA-MRSA(New York/Japanクローン)の場合は、SCC*mec*型はII型で、オキサシリンとイミペネムの感受性値は高く(MIC, それぞれ $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ と $32 \mu\text{g/ml}$)、非 β -ラクタム系抗菌薬耐性はニューキノロン系(レボフロキサシン)やホスホマイシンへの耐性を含めた多剤耐性であった。

毒素に関しては、ETB陽性biCA-MRSA(ST89型とST91型)はHA-MRSAやPVL陽性biCA-MRSA(ST30型)に比べて毒素パターンが狭い傾向があった。例えば、SEの場合、HA-MRSAではSaPI*m1/n1*(*tst*, *sec*, *sel*), *egc*(*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*), *sea*などを持ち、ST30 biCA-MRSAでは*egc*などをもつが、ETB陽性biCA-MRSA(ST89型とST91型)では*sem*と*seo*のみが陽性であった。

biCA-MRSAは、HA-MRSAと同様に多くの共通MSCRAMMs(*c10ag*, 表3)をもつが、HA-MRSAと異なってさらにCNAをもっていた。ST30型の場合には、共通MSCRAMMsに加えてCNAとBBPの組み合わせをもっていた。

CNA遺伝子(*cna*)の構造解析

ST30型biCA-MRSA(NN1株)、ST89型biCA-MRSA(NN6株)、ST91型biCA-MRSA(NN11株、NN28株)のCNA遺伝子をPCR法で増幅し、その全塩基配列を決定した。

CNA遺伝子は、S領域(シグナルペプチド領域)、A領域(コラーゲン結合領域)、B領域("stalk"領域あるいは繰り返し領域)、W領域(細胞壁スパン領域)、M領域(細胞膜スパン領域)そしてC領域(細胞質側末端領域)から構成される。報告されている黄色ブドウ球菌FDA574株、ST1型CA-MRSA(USA400クローン)MW2株、MSSA476株、MRSA252株の各領域と、本研究で

表2 Distribution of the PVL, ET, and CNA genes in biCA - MRSA in comparison with HA - MRSA

Virulence gene	biCA-MRSA (n=21)					HA-MRSA (n=234)		
	ST8 (NN3, NN4, NN19)	ST30 (NN1)	ST89 (NN5, NN6, NN7, NN8, NN9, NN10, NN14, NN16, NN17, NN18, NN20, NN21, NN22, NN23)	ST91 (NN11, NN15, NN28)	Total (%) (n=21)	MRSA from NICU (n=127)	MRSA from adult inpatients (n=107)	Total (%) (n=234)
PVL	0/3	1/1	0/14	0/3	1/21 (4.8%)	0/127	0/107	0/234
ET : ETA	0/3	0/1	0/14	0/3	0/21 (0%)	0/127	0/107	0/234
ETB	0/3	0/1	8/14	3/3	11/21 (52.3%)	1 [§] /127	0/107	1/234 (0.4%)
ETD	0/3	0/1	0/14	0/3	0/21 (0%)	0/127	0/107	0/234
Total (ETA, ETB, ETD)	0/3	0/1	8/14	3/3	11/21 (52.3%) ^{*,†}	1 [§] /127	0/107	1/234 (0.4%) [*]
CNA	0/3	1/1	14/14	3/3	18/21 (85.7%) ^{†,‡}	1 [§] /127	0/107	1/234 (0.4%) [‡]

* $P < 0.00001$ † $P = 0.043$ ‡ $P < 0.00001$

§ MRSA was isolated from a neonate with SSSS in the NICU, and belonged to ST91.

表3 Molecular characteristics of biCA - MRSA in comparison with HA - MRSA

Types and Genes	biCA-MRSA				HA-MRSA
	NN1	NN6	NN11	NN28	Mu50
Types					
ST	30	89	91	91	5
CC	30	509	509	509	5
<i>spa</i>	19	416 (t375)	604 (new)	604 (new)	2 (t002)
<i>agr</i>	3	3	3	3	2
Coagulase	IV	I	I	I	II
SCCmec	IVc	IVa	IVa	IVa	II
Virulence gene					
Toxin					
Leukocidin	<i>luk_{EV}SF</i>	-	-	-	<i>lukE-lukD</i>
Exfoliative toxin		<i>etb</i>	<i>etb</i>	<i>etb</i>	
Staphylococcal enterotoxin	<i>egc (seg, sei, sem, sen, seo), seu</i>	<i>sem, seo</i>	<i>sem, seo</i>	<i>sem, seo</i>	SaPI _{m1} /n1 (<i>tst, sec, sel</i>), <i>egc (seg, sei, sem, sen, seo), sea</i>
Hemolysin	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>hld, hlg</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>hla, hld, hlg, hlg-v</i>
Adhesin					
Collagen adhesin	<i>cna</i>	<i>cna</i>	<i>cna</i>	<i>cna</i>	-
Others	<i>c10ag[*], bbp</i>	<i>c10ag[*], sdrE</i>	<i>c10ag[*], sdrE</i>	<i>c10ag[*], sdrE</i>	<i>c10ag[*], sdrD, sdrE</i>
Susceptibility [†]					
Oxacillin (MIC)	32 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml	≥256 µg/ml
Imipenem (MIC)	0.06 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	0.125 µg/ml	32 µg/ml
Resistance to non-β-lactam	-	GM, KM, EM	GM, KM, EM	GM, KM, EM	GM, KM, EM, CLDM, TC, LVFX, FOM, RFP, VCM(i) [‡] , MINO(i) [‡]

* *c10ag*, core 10 adhesin genes shared by all strains (*eno, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, fib, sdrC, icaA, icaD*).

† GM, gentamicin; KM, kanamycin; EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; TC, tetracycline; LVFX, levofloxacin; FOM, Fosfomicin; RFP, rifampicin; VCM, Vancomycin; MINO, minocycline.

‡ i, intermediate; break point for drugs resistance by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)³⁵.

決定した biCA - MRSA 株の各領域を比較し、結果を図 2 にまとめて示した。比較の基準は FDA574 株遺伝子とし、その他の遺伝子については相同性 (%) を示した。また、FDA574 株遺伝

子には B 領域が 3 回繰り返すが、最も 5' 側の B 領域を基準とし、その他の B 領域については相同性 (%) を示した。

図 2 に示した通り、比較した 8 菌株で、CNA 遺

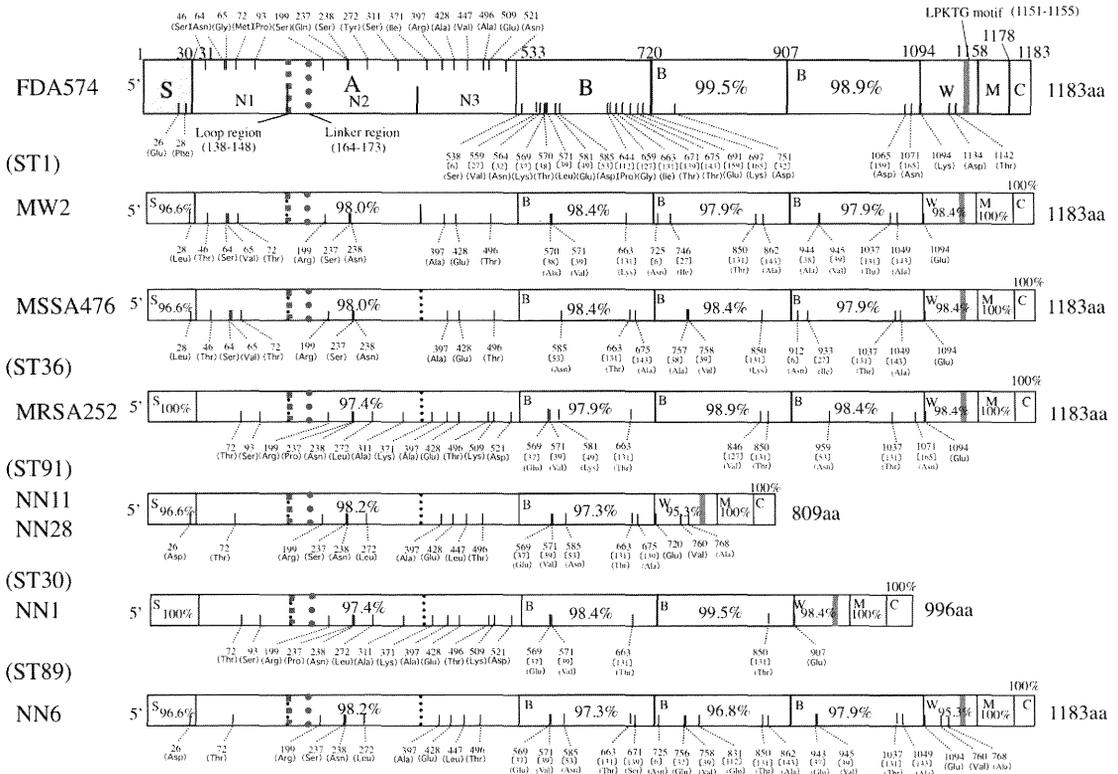


図2 Structure and sequence of the CNA gene of biCA-MRSA, compared with those of reported CNA genes of *S. aureus* or MRSA. The CNA gene information of strain FDA574 (the gene product is 1183 amino acids long) is from Ref. 36. The CNA gene sequences of strains MW2, MSSA476, and MRSA252 are from GenBank accession nos. BA000033, BX571857, and BX571856, respectively. The CNA gene sequences of strains NN11, NN28, NN1, and NN6 were determined in this study: GenBank accession nos. AB266877, AB266875, AB266874, and AB266876, respectively. Regions S, A (N1 to N3, including loop and linker regions), B, W, M, and C were drawn based on the strain FDA574 data. Nucleotide sequence comparison was made to the corresponding region of FDA574 CNA gene sequence, and homology (%) was determined. And, in each case, only amino acids that differed from those of FDA574 are shown (in the FDA574 sequence, the corresponding amino acids are shown). When region B (187 amino acids long) was compared, all comparison was made to the first region B sequence (at the C-terminus side) of FDA574.

伝子の塩基配列とアミノ酸配列（そして各領域）が高度に保存されていた。3'末端側に位置し、細胞膜側に局在するC領域とM領域は100%同一であった。W領域では約95%のこともあるが、B領域とA領域は97%以上の相同性を示した。変異はすべて単塩基置換で、アミノ酸数を変化させる

変異はなかった。また、ST91型 biCA-MRSA の2株（NN11株、NN28株）は同一塩基配列を示した。しかし、B領域の繰り返し数は biCA-MRSA のST型によって異なっていた。繰り返し数は、ST91型菌では1回、ST30型菌では2回、ST89型菌では3回であった。

表4 Comparison of the motif LPXTG in various adhesins in *S. aureus* and MRSA *

Adhesin	LPXTG	GenBank accession no.
Collagen binding adhesin		
CNA	LPKTG	Q53654, NP_647429, YP_044692, YP_042111, AB266874 [†] , AB266876 [‡] , AB266877 [§] , AB266875 ^{**}
Protein A		
SPA	LPETG	CAJ28189, CAJ28195, NP_644899, NP_370635, NP_373348, YP_039578, YP_184999
Fibronectin binding adhesin		
FnbA	LPETG	CAF32747, NP_373027, YP_501262, YP_495075, YP_041928, YP_187306
FnbB	LPETG	YP_044500, YP_501261, YP_495074, YP_187304
Fibrinogen binding adhesin		
ClfA	LPDTG	Q53653, BAE94442, BAE94443, YP_042878, NP_371335, NP_373997, YP_499368, YP_493472, YP_040268, YP_185729
ClfB	LPETG	O86476, NP_647368, NP_373154, NP_375749, YP_495199, YP_187440
SdrC	LPETG	CAA06650, YP_493249, YP_185493
SdrD	LPETG	CAA06651, YP_493250, YP_185494
SdrE	LPETG	CAA06652, YP_493251, YP_185495
Bone sialoprotein binding adhesin		
Bbp	LPETG	CAB75732, BAE97662, BAE97663, YP_040016

* LPXTG sequences were taken from GenBank data (GenBank accession no.) for each strain.

[†] CNA gene sequence for strain NN1 (Fig. 2).

[‡] CNA gene sequence for strain NN6 (Fig. 2).

[§] CNA gene sequence for strain NN11 (Fig. 2).

^{**} CNA gene sequence for strain NN28 (Fig. 2).

他の MSCRAMMs と比較すると, SDR family (フィブリノーゲン付着因子とフィブロネクチン付着因子) にある TYFTDYVD モチーフは CNA (A 領域) には存在しなかった。また, LPXTG モチーフについては, SDR family の場合には LPETG もしくは LPDTG であったが, CNA の場合には LPKTG であった (図 2, 表 4)。

CNA 遺伝子 (*cna*) の系統樹解析

図 2 に示した CNA 遺伝子についてソフトウェア TreeView を用いて系統的多様性分析を行った (図 3)。CNA 遺伝子は, ST 型 (もしくは CC 型) に関連して分岐していた。

考 察

黄色ブドウ球菌による伝染性膿痂疹 (水疱型膿痂疹) は夏季, 小児に多発する膿皮症で, 病変部には黄色ブドウ球菌が存在し, 他部位の皮膚に容易に“とび火”する他, 小児間で感染拡大する¹⁴⁾。原因毒素は黄色ブドウ球菌がつくる ET で, デスマグレイン 1 (デスマソームに存在するカドヘリン様の細胞間付着因子) を切断することで, 表皮顆粒層を破壊, 棘融解を起し水疱を生じる^{14)–16)}。主に ETA あるいは ETB が関与するが^{14)–16)}, ETD も検出される²⁶⁾。

伝染性膿痂疹 (水疱型膿痂疹) からは MRSA (CA-MRSA) も分離される¹¹⁾³⁷⁾。分離頻度は黄

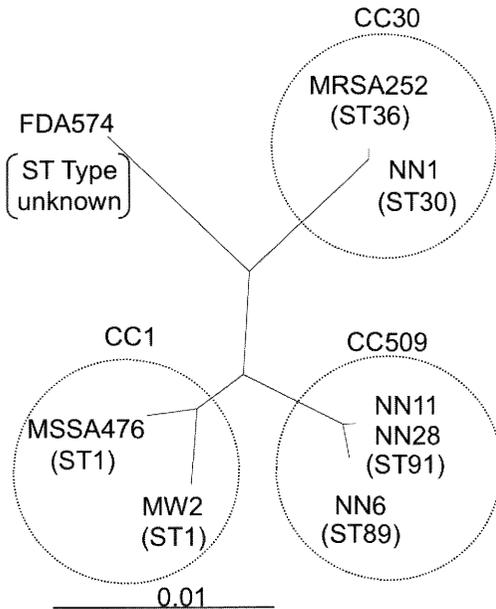


図3 Phylogenetic diversity of the CNA genes. The CNA genes of strains NN11, NN28, NN1, and NN6 are shown in Fig. 2. Those of strains FDA574, MW2, MSSA476, and MRSA252 are from GenBank accession nos. M81736, BA000033, BX571857, and BX571856, respectively. The graph was constructed by using TreeView Version 1.6.6. The positions of eight CNA genes for which gene sequences are available are shown. The scale bar (0.01) represents 0.01 nucleotide substitutions per site.

色ブドウ球菌の10-20%である。このMRSA群 (biCA-MRSA) の感染での役割については十分に理解されていない。例えば、伝染性膿痂疹（水疱型膿痂疹）から分離される黄色ブドウ球菌とは違って、ET陽性率が低い¹¹⁾。本研究でもbiCA-MRSAのET陽性率は52.3%であった。

院内にあって抗菌薬で強く選択されるHA-MRSAとは異なり、薬剤による選択圧力が少ない市中で感染拡大するCA-MRSAには幾つかの特徴がある。MRSAは黄色ブドウ球菌 (methi-

cillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) にメチシリン耐性遺伝子を含む可動性DNA (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) が挿入されて出現するが³⁸⁾、CA-MRSAのSCC*mec*型はIV型やV型が多い (HA-MRSAの場合にはI型, II型, III型が多い)²⁸⁾。また、そのメチシリン耐性レベルとオキサシリン耐性レベルは低い (HA-MRSAでは高い)³⁹⁾。さらに薬剤耐性が、CA-MRSAでは極少数に限られていて、β-ラクタム系薬耐性だけの場合やβ-ラクタム系薬とその他数種類の薬剤に耐性を示す場合が多い (HA-MRSAは典型的な多剤耐性を示す)¹⁾。今回解析したbiCA-MRSAもこの観点で典型的なCA-MRSAであった。このようなCA-MRSAは、市中で感染拡大するために、HA-MRSAに比べてより強い定着能力をもつ可能性が高い¹⁾。

本研究では、biCA-MRSAが、HA-MRSAとは異なって、CNAを高率にもつことを明確に示した上で、各ST型biCA-MRSAのCNA遺伝子の全塩基配列を決定した。CNA遺伝子産物は前駆体で、5'末端側にS領域 (シグナルペプチド) が存在するが、細胞質膜通過過程で切断される。切断後のA領域 (コラーゲン結合ドメイン)、B領域 (“stalk” 幹ドメイン)、W領域 (細胞壁貫通ドメイン)、M領域 (細胞膜貫通ドメイン)、C領域 (細胞質側末端) がCNAを構成する²⁰⁾³⁶⁾。CNAは細胞質膜貫通タンパク質で、M領域で細胞膜に固定されていて、W領域で細胞壁を貫通し、B領域が菌体表面から外部に伸長する幹の役割を担い、その先にコラーゲン結合ドメイン (A領域) が位置する。CNAは菌体表面から外部に向かって放射状に伸びる構造物である。CNA先端のA領域はN1, N2, N3の3つのドメインを含む。このうち、N1ドメインとN2ドメインはN1-N2 linkerを通して繋がっていて、コラーゲンを挟み込むようにして押さえつける (結合する)。まずN2領域がコラーゲンを特異的に認識し、その後にN1-N2 linkerを介してN1領域が結合、サンドイッチ状の結合構造を形成する。N3ドメインは、N2ドメインを幹ドメイン (B領域) に繋げている²⁰⁾。

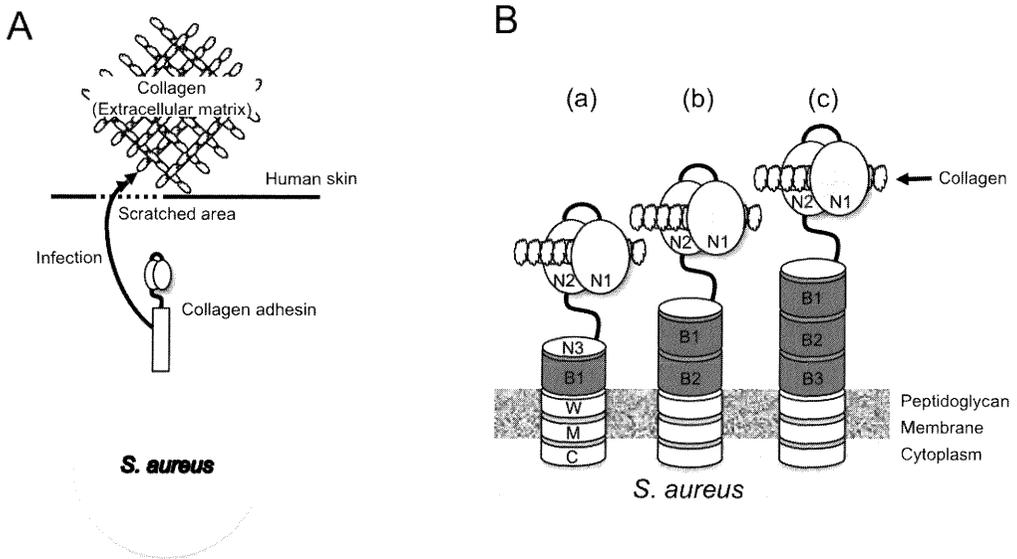


図4 The image of biCA - MRSA infection through the human skin (A) and the binding of CNA (with different B region repeats) to collagen (B). The image in B was constructed based on the CNA protein information²⁰⁾. The N2 domain linked to two or three B - region repeats (longer B stem) could recognize and bind to collagen more effectively than the N2 domain linked to one or two B - region repeats (shorter B stem).

ST30型 biCA-MRSA, ST89型 biCA-MRSA, ST91型 biCA-MRSAのCNA遺伝子構造を比較すると、各領域が高度に保存されていたが、B領域の繰り返し数は異なっていて、ST89型が3回で一番多く、次がST30型の2回、ST91型の1回であった。B領域の繰り返し数が多い程、菌体表面から外部に伸びる“幹”が長くなり、より遠くのコラーゲンとも結合ができるようになる(MRSAの付着・感染が起こりやすくなる)と考えられる(図4)。

B領域の3回繰り返しを認めたST89型は、biCA-MRSAで分離頻度が最も高い。しかも、biCA-MRSAのCNA陽性率は85.7%で、ET陽性率52.3%より有意に高かった。またHA-MRSAの場合には、多くがCNA陰性(かつET陰性)であった。以上の事実から、biCA-MRSAの場合には、CNAが重要な病原性因子であると

結論した。皮膚を掻くことによって露出したコラーゲンにbiCA-MRSAが結合、皮膚への感染が成立すると考えられた。この後、ET陽性株の場合には伝染性膿痂疹(水疱型膿痂疹)の発症につながる。ET陰性株の場合には、新規の毒素を産生する、あるいは新規の発症メカニズムをもつ等の考え方が必要になる。

なお、CNAの病原性については、PVLとCNAが連携して小児肺炎に関連する⁴⁰⁾他、CNAが骨髄炎、関節炎、心内膜炎等と関連する⁴¹⁾⁴²⁾ことが報告されている。

一方、ST8型 biCA-MRSAではCNAとETがともに陰性であった。ST8型 biCA-MRSAは、3つの毒素遺伝子(毒素性ショック症候群毒素TSST-1をコードする毒素遺伝子 [tst], SECをコードする毒素遺伝子 [sec], SELをコードする遺伝子 [se])をもつSaPI_{m1/n1}病原性遺伝子

島 (pathogenicity island)²¹⁾⁴³⁾ が陽性であった。3つの毒素遺伝子はスーパー抗原毒素遺伝子である。伝染性膿痂疹との関連性を検討する必要がある。

最後に、CNA 遺伝子をソフトウェア Tree View (Version1.6.6) を用いて系統的多様性分析した結果、CNA 遺伝子と ST 型 (もしくは CC 型) に強い関連を認めた。ファージ上の PVL 遺伝子⁴⁴⁾、ファージ上の ETA 遺伝子⁴⁵⁾、プラスミド上の ETB 遺伝子⁴⁶⁾ 等とは異なり、CNA 遺伝子は水平伝達しないのかもしれない。

結 語

小児の伝染性膿痂疹 (水疱型膿痂疹) から分離された CA-MRSA (biCA-MRSA) の場合、ET 陽性率は 52.3 %、CNA 陽性率は 85.7 % で、CNA 陽性率が ET 陽性率より有意に高率であった ($P = 0.043$)。CNA 遺伝子の各領域は調べた biCA-MRSA (ST 型) で高度に保存されていたが、B 領域 (幹ドメイン) の繰り返し数は ST 型によって異なり、分離頻度が一番高い ST89 型で 3 回と最も多かった。biCA-MRSA の場合、CNA (特に B 領域の繰り返し数) が感染に強く関連していることが示唆された。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました細菌学教室の西山晃史助教に深謝致します。

文 献

- 1) Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O and Shi D: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother, in press.
- 2) Deurenberg RH and Stobberingh EE: The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 8: 747-763, 2008.
- 3) Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB and Fridkin SK: Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 298: 1763-1771, 2007.
- 4) Aires de Sousa M, Conceição T, Simas C and de Lencastre H: Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. J Clin Microbiol 43: 5150-5157, 2005.
- 5) Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB and Dunman PM: Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. J Clin Microbiol 44: 108-118, 2006.
- 6) Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL and Bishai WR: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. Lancet Infect Dis 5: 275-286, 2005.
- 7) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME and Etienne J: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 9: 978-984, 2003.
- 8) Enany S, Higuchi W, Okubo T, Takano T, Enany M and Yamamoto T: Brain abscess caused by Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Egypt, Apr 2007. Euro Surveill 12: E070927.2, 2002.
- 9) Baranovich T, Potapov V and Yamamoto T: The first isolation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Russia. Euro Surveill 12: E070315. 4, 2007.
- 10) Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwards G, O'Brien FG, Tenover FC, McDougal LK, Monk AB and Enright MC: Re-emergence of early pandemic

- Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 365: 1256 - 1258, 2005.
- 11) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T and Yamamoto T: A Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol* 43: 3356 - 3363, 2005.
 - 12) Ozaki K, Takano M, Higuchi W, Takano T, Yabe S, Nitahara Y, Nishiyama A and Yamamoto T: Genotypes, intrafamilial transmission, and virulence potential of nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children in the community. *J Infect Chemother* 15: 84 - 91, 2009.
 - 13) Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y and Hiramatsu K: Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 43: 3364 - 3372, 2005.
 - 14) Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW and Poston SM: Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 12: 224 - 242, 1999.
 - 15) Nishifuji K, Sugai M and Amagai M: Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci* 49: 21 - 31, 2008.
 - 16) Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C and Stanley JR: Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6:1275 - 1277, 2000.
 - 17) Gemmell CG: Staphylococcal scalded skin syndrome. *J Med Microbiol* 43: 318 - 327, 1995.
 - 18) Shi D, Higuchi W, Iwao Y, Saito K, Yabe S, Takano T, Nishiyama A and Yamamoto T: Two types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated alone or in combination with methicillin-susceptible *S. aureus* from bullous impetigo in Japan. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. San Francisco, CA, USA.
 - 19) de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F and Lina G: *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis* 190: 1506 - 1515, 2004.
 - 20) Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Höök A, Gurusiddappa S, Höök M and Narayana SV: A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J* 24: 4224 - 4236, 2005.
 - 21) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H and Hiramatsu K: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225 - 1240, 2001.
 - 22) Yamamoto T, Dohmae S, Saito K, Otsuka T, Takano T, Chiba M, Fujikawa K and Tanaka M: Molecular characteristics and in vitro susceptibility to antimicrobial agents, including the des-fluoro (6) quinolone DX-619, of Pantone-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the community and hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 4077 - 4086, 2006.
 - 23) Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ and Yamamoto T: Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in

- Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 52: 837 - 845, 2008.
- 24) Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J and Vandenesch F: Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 70: 631 - 641, 2002.
- 25) Becker K, Roth R and Peters G: Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol 36: 2548 - 2553, 1998.
- 26) Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M and Sugai M: Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN - B. Infect Immun 70: 5835 - 5845, 2002.
- 27) Holtfreter S, Bauer K, Thomas D, Feig C, Lorenz V, Roschack K, Friebe E, Selleng K, Lövenich S, Greve T, Greinacher A, Panzig B, Engelmann S, Lina G and Bröker BM: *egc* - Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. Infect Immun 72: 4061 - 4071, 2004.
- 28) Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF and Perdreau - Remington F: Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital - and community - associated strains of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 193: 1495 - 1503, 2006.
- 29) Letertre C, Perelle S, Dilasser F and Fach P: Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol 95: 38 - 43, 2003.
- 30) Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F and Lina G: Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. J Clin Microbiol 41: 4465 - 4467, 2003.
- 31) Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Döring G, Mack D, Landmann R, Goerke C and Wolz C: Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by *staphylococci* in a device - related infection model. Infect Immun 73: 1811 - 1819, 2005.
- 32) Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T and Venkitanarayanan KS: Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol 92: 179 - 185, 2003.
- 33) Vancraeynest D, Hermans K and Haesebrouck F: Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Vet Microbiol 103:241 - 247, 2004.
- 34) Otsuka T, Saito K, Dohmae S, Takano T, Higuchi W, Takizawa Y, Okubo T, Iwakura N and Yamamoto T: Key adhesin gene in community - acquired methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 346: 1234 - 1244, 2006.
- 35) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th Information Supplement. M100 - S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, PA, 2008.
- 36) Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M and Höök M: Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. J Biol Chem 267: 4766 - 4772, 1992.
- 37) Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, Hayashi T, Aepfelbacher M, Ohara M, Komatsuzawa H, Watanabe H and Sugai M: Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin - resistant clonal groups in Kansai district in Japan. J Infect Dis 185: 1511 - 1516, 2002.
- 38) Noto MJ, Kreiswirth BN, Monk AB and Archer GL: Gene acquisition at the insertion site for *SCCmec*, the genomic island conferring methi-

- cillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 190: 1276 - 1283, 2008.
- 39) Takano T, Higuchi W and Yamamoto T: Superior in vitro activity of carbapenems over anti - methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and some related antimicrobial agents for community - acquired MRSA but not for hospital - acquired MRSA. J Infect Chemother 15: 54 - 57, 2009.
- 40) Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO Jr and Kaplan SL: Pulmonary manifestations in children with invasive community - acquired *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 41: 583 - 590, 2005.
- 41) Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL and Smeltzer MS: *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone 30: 275 - 280, 2002.
- 42) Patti JM, Bremell T, Krajewska - Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Rydén C and Höök M: The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. Infect Immun 62: 152 - 161, 1994.
- 43) Novick RP: Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen - encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 49: 93 - 105, 2003.
- 44) Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T and Kamio Y: Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage wPVL carrying Panton - Valentine leukocidin genes. Gene 215: 57 - 67, 1998.
- 45) Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Nakasone K, Ohnishi M, Nakayama K, Yamada S, Komatsuzawa H and Sugai M: Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 38: 694 - 705, 2000.
- 46) Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H and Sugai M: Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP - ribosyltransferase, EDIN - C. Infect Immun 69: 7760 - 7771, 2001.

(平成22年6月28日)