

アジアとロシアに分布するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌
Hungarian clone の multiplex PCR による迅速検出

Olga Khokholova

(ロシア・クラスノヤルスク医科大学)

Wei-Chun Hung · Lee-Jene Teng

(台湾・台湾大学)

樋口 渉 · Olga Razvina · 高野 智洋 · 山本 達男

(新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野)

**Multiplex PCR Assay of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
Hungarian Clone, a Major Clone Spreading in Asia and Russia**

Olga KHOKHOLOVA

Department of Microbiology, Krasnoyarsk State Medical University, Russia

Wei-Chun HUNG and Lee-Jene TENG

National Taiwan University, Taiwan

Wataru HIGUCHI, Olga RAZVINA, Tomomi TAKANO and Tatsuo YAMAMOTO

Division of Bacteriology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Abstract

Dr. Olga Khokhlova from Krasnoyarsk (Russia) took part in the young doctor program, a new Japan - Russia exchange program started in 2008, and studied methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), in collaboration with young scientists from National Taiwan

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

University and Niigata University. The Hungarian MRSA clone (and related clones) is a major pandemic clone spreading worldwide including Europe, South America, Africa, Asia, and Russia. In this study, we developed the multiplex PCR targeting the combination of the five genes (*nuc*, *mecA*, *sea*, *seq*, *cna*), which were present only in the Hungarian clone, and unambiguously distinguished the Hungarian clone from other pandemic MRSA clones, such as the New York/Japan clone.

はじめに

新潟大学医学部とロシアの医科大学の間で1993年以来日露医学生交流が引き継がれてきた。Young doctor programは15年の節目となった2008年に始まった新しい交流プログラムで、日露の若い医師・研究者が臨床や研究現場で感じている問題点をもちより、交流をとおして解決を図ること、若い医師・研究者のモチベーションを高めること、そして日露交流のレベルアップを図ることを目的としている。初年度はDr. Olga Khokhlovaがクラスノヤルスク医科大学の推薦を受けて参加、分子レベルでの感染症研究にチャレンジした(図1)。なお、Dr. Olga Khokhlovaは2009年にもクラスノヤルスク医科大学から派遣されて技術研修・共同研究で研鑽をつみ、クラスノヤルスク医科大学での拠点形成に取り組んでいる。なお、この研究プロジェクトには台湾大学からの留学生Wei-Chun Hung大学院生の献身的な協力があつた。

米国では黄色ブドウ球菌に占めるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の割合が65.6%で、MRSA高汚染国である。その米国ではMRSA深部感染症が深刻で、2005年の感染者数は9万4360人、そのうち死亡者数1万8650人と、死亡率が19.7%に達した¹⁾。わが国もMRSAの割合が約60%で、米国と並ぶMRSA高汚染国である。

MRSAは黄色ブドウ球菌(MSSA)にSCCmec遺伝構造が挿入されて出現する。そのMRSAが世界中に流行したのが現在院内で目にするMRSAである。主な世界流行型MRSA(pandemic MRSA)は7クローンで、New York/Japan(ST5/SCCmec II), Pediatric(ST5/SCCmec IV), Berlin(ST45/SCCmec IV), Iberian

(ST247/SCCmecIA), Hungarian(ST239/SCCmec III), EMRSA-15(ST22/SCCmec IV), EMRSA-16(ST36/SCCmec II)である²⁾。このうちNew York/Japan cloneは主にわが国と米国で流行しているMRSAで、Hungarian cloneは主にアジア、ロシア³⁾、南米等で流行しているクローンである。本研究では、台湾とロシアで流行しているHungarian cloneのmultiplex PCR法を用いた迅速DNA診断法を確立した。

材料と方法

台湾とロシアの入院患者から分離されたHungarian cloneを用いた。対照として、台湾とわが国の入院患者から分離されたNew York/Japan cloneを用いた。その他に、H. de Lencastre博士から分与されたpandemic MRSA標準株を用いた。PCR解析には2%アガロースを用いた。薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子などのPCR解析は既報の方法で行った⁴⁾。Multiplex PCRプライマーは市中感染型MRSA(NN1株)のDNA情報に基づいて設計した。設計したプライマー名は、黄色ブドウ球菌(*nuc*遺伝子⁵⁾)を検出するためのプライマー *nuc1/nuc2*, メチシリン耐性(*mecA*遺伝子)を検出するためのプライマー *mecA-QF2/mecA-QR2*, スーパー抗原毒素SEA(*sea*遺伝子)を検出するためのプライマー *sea-F1/sea-R1*, スーパー抗原毒素SEQ(*seq*遺伝子)を検出するためのプライマー *seq-F2/seq-R2*, コラーゲン粘着因子CNA(*cna*遺伝子)を検出するためのプライマー *cna-QF1/cna-QR1*であった。PCR条件は初期変性が94℃3分、その後、変性94℃90秒、アニーリング55℃60秒、伸長72℃60秒を30サイクル繰り返し、最終伸長72℃10分とした。



図1 細菌学教室での研修

結 果

Pandemic MRSA 標準株について各種 PCR 反応で検討した結果, Hungarian clone のみが *nuc*, *mecA*, *sea*, *seq*, *cna* の5つの遺伝子が陽性であった. 例えばわが国と米国の主要 MRSA (New York/Japan clone) は *nuc* と *mecA* 遺伝子のみが陽性で, *sea*, *seq*, *cna* 遺伝子は陰性であった. この結果に基づいて *nuc*, *mecA*, *sea*, *seq*, *cna* の5つの遺伝子を同時に検出するための multiplex PCR プライマーを設計した. この multiplex PCR プライマーセットを用いた実験結果を図2に示す. Hungarian clone (台湾とロシアの分離株) は予想したサイズの5本のバンドを与えた. 一方, New York/Japan clone (台湾と日本の分離株) は *nuc* と *mecA* 遺伝子のみが陽性となった.

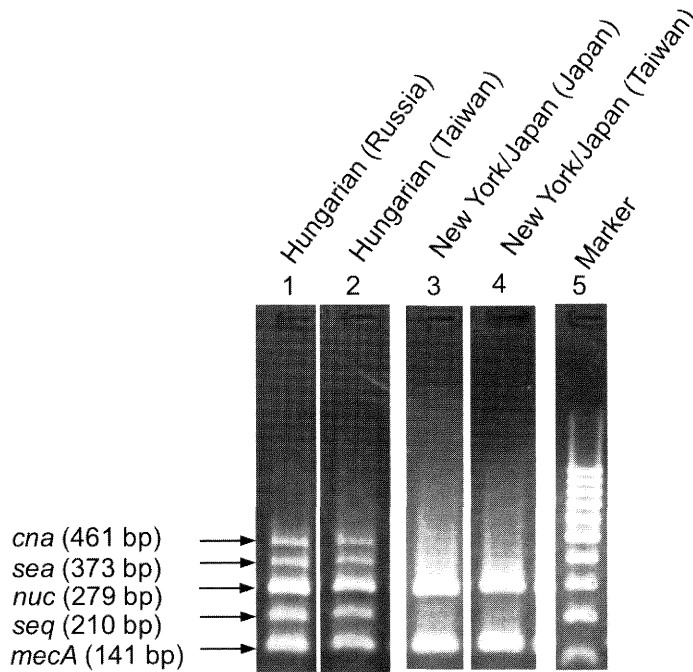


図2 Hungarian clone と New York/Japan clone の multiplex PCR による鑑別

考 察

従来から単に MRSA と呼ばれてきたいわゆる院内感染型 MRSA には、異なった病原性遺伝子セットをもった多様な流行クローンが存在する。従って、病院で分離される MRSA についてはクローン型別が重要である。Hungarian clone の特徴は、①アジア・ロシア地域での強い伝達性、②多剤耐性、③ *sea*, *seq*, *cna* の3つの病原性遺伝子を持つ点である。*sea* は MRSA 腸炎や侵襲性に関連する強毒性マーカーで⁶⁾、*cna* は損傷した粘膜（露出したコラーゲン）への定着で機能し、肺炎等に関連する⁷⁾。MRSA 感染患者の病型を把握するために MRSA を構成している病原性遺伝子を把握することが必要である。本研究ではこのような病原性遺伝子の組み合わせに基づき Hungarian clone のみを簡便に検出する multiplex PCR 検出系を開発した。

謝 辞

日露医学交流を支援して頂いた財団法人日露医学医療交流財団、財団法人新潟医学振興会、財団法人協和会、財団法人交流協会に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 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, Fridkin SK and Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators: Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 298: 1763 - 1771, 2007.
- 2) 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.
- 3) Vorobieva V, Bazhukova T, Hanssen AM, Caugant DA, Semenova N, Haldorsen BC, Simonsen GS and Sundsfjord A: Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leukocidin genes. APMSIS 116: 877 - 887, 2008.
- 4) 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.
- 5) Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T and Conly JM: New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 42: 4947 - 4955, 2004.
- 6) Ferry T, Thomas D, Genestier AL, Bes M, Lina G, Vandenesch F and Etienne J: Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin Infect Dis 41: 771 - 777, 2005.
- 7) 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.

(平成21年12月7日受付)