

	おおつか たけと
氏 名	大塚 岳 人
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第151号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Key adhesin gene in community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌における特異的粘着 因子遺伝子の解析)
論文審査委員	主査 教授 内 山 聖 副査 教授 山 本 達 男 副査 教授 藤 井 雅 寛

博士論文の要旨

【背景】

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の出現が世界中から報告されている。市中感染型 MRSA はその世界分布において 2 タイプに大別できる。ひとつは必須遺伝子塩基配列型別 (ST) 30 型に代表される“世界流行型”でアメリカ、ヨーロッパ、オセアニア、日本、ブラジルなどから報告されている。もうひとつは ST1 型、8 型、80 型に代表される“大陸特異型”である。ST1 型、8 型は主にアメリカ、ST80 型はヨーロッパに分布している。本菌は Panton-Valentine 白血球破壊毒素 (PVL) をコードする遺伝子 (*luk_{PV}*) を有し、その機能、病原性、病態への関与が議論されている。市中感染型 MRSA は“せつ”や“よう”などの軽微な皮膚軟部組織感染症ばかりでなく、深部感染症として骨髄炎や壊死性肺炎に関連することが大きな問題である。加えて、従来の MRSA 感染症におけるリスク因子 (入院、手術、透析など) のない健康若年者においても致死的な感染症を惹起する。このため感染症対策、制御の観点から最も緊急性の高い研究分野のひとつであり、現在までに深部感染症の発症機序として PVL とコラーゲン粘着因子 (壊死性肺炎)、骨シアロプロテイン粘着因子 (骨髄炎) の関与が指摘されている。

【目的】

PVL 陽性市中感染型 MRSA (世界流行型および大陸特異型)、PVL 陰性市中感染型 MRSA、院内感染型 MRSA の粘着因子保有状況を明らかにする。“世界流行型”市中感染型 MRSA が持つ骨シアロプロテイン粘着因子遺伝子 (*bbp*) の塩基配列を決定し、*bbp*、*luk_{PV}* をリアルタイム PCR 法で同時に検出する実験系を確立することで、特異的かつ迅速な PVL 陽性市中感染型 MRSA の診断を可能にする。

【材料と方法】

[供試菌株]

日本、オランダ、アメリカ、オーストラリアで分離された“世界流行型”市中感染型 MRSA (ST30 型)、計 5 株。1980-90 年代の MRSA パニック時に日本で分離された PVL 陽性院内感染型 MRSA (ST30 型) 6 株。アメリカ、台湾、オランダ、フランスで分離された“大陸特異型”市中感染型 MRSA、計 7 株。PVL 陰性市中感染型 MRSA 3 株、院内感染型 MRSA 300 株。

[菌型の決定]

ST 型、SCCmec 型の解析を既報の方法で行った。

[粘着因子解析]

以下の 14 種類の粘着因子遺伝子について PCR 解析を行った。バイオフィーム関連因子 (*icaA*、*icaD*)、ラミニン粘着因子 (*eno*)、フィブロネクチン粘着因子 (*fnbA*、*fnbB*)、エラスチン粘着因子 (*ebpS*)、フィブリノーゲン粘着因子 (*clfA*、*clfB*、*fib*、*sdrC*、*sdrD*、*sdrE*)、コラーゲン粘着因子 (*cna*)、骨シアロプロテイン粘着因子 (*bbp*)。

[*bbp* 遺伝子の塩基配列決定]

既報の塩基配列を参考に *bbp* 遺伝子の上下流にプライマーを設計した後、PCR 法で増幅し塩基配列を決定した。

[リアルタイム PCR 法]

既報の 2 株 (O-24 株、MRSA252 株) と本研究で決定した 5 株の *bbp* 遺伝子塩基配列を参考に、リアルタイム PCR 法に用いるプライマーとプローブを設計した。2 遺伝子の同時検出を目的に *bbp* 遺伝子には FAM 蛍光色素、*luk_{PV}* 遺伝子には VIC 蛍光色素でラベルした。1 CFU/ml から 1×10^9 CFU/ml の菌液を作成し、実験プロトコールに従ってリアルタイム PCR 法による *bbp*、*luk_{PV}* 両遺伝子検出実験を行った。

【結果と考察】

[粘着因子]

“世界流行型”市中感染型 MRSA の全株で *bbp* 遺伝子を検出したが、“大陸特異型”市中感染型 MRSA からは *bbp* 遺伝子が検出されなかった。また、1980-90 年代に分離された PVL 陽性院内感染型 MRSA は *bbp* 遺伝子を持つが、近年分離された院内感染型 MRSA からは *bbp* 遺伝子が検出されなかった。コラーゲン粘着因子をコードする遺伝子 (*cna*) も“世界流行型”市中感染型 MRSA との関連が示唆されたが、その他の MRSA においても保有株が認められた。以上から“世界流行型”市中感染型 MRSA は *luk_{PV}*、*bbp*、および *cna* の各遺伝子の組み合わせで分類することが可能と考えられた。

[*bbp* 遺伝子の塩基配列]

市中感染型 MRSA の塩基配列は S、A、B、W、M の各領域で既報の配列に 95.6-100% の相同性を示した。しかしセリン-アスパラギン酸繰り返し構造を持つ R 領域の相同性は 86.0% で、18 塩基または 36 塩基の規則的な挿入領域が見い出された。

[リアルタイム PCR 法]

検出限界は 1×10^2 CFU/ml で、陽性/陰性コントロールに対しても良好な結果を得た。*bbp*、*luk_{PV}* 両遺伝子を標的にすることで、“世界流行型”市中感染型 MRSA の迅速検出系を確立した。

【まとめ】

感染症流行の予防措置を講じる際には迅速診断による大規模なサーベイランスが必要とされる。本研究では、わが国にも分布する“世界流行型”市中感染型 MRSA が特異的に *bbp* 遺伝子を持つことを明らかにした。また *bbp* 遺伝子配列の解析結果に基づいて当該市中感染型 MRSA の迅速診断法を確立した。

論文審査の要旨

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は世界流行型と大陸特異型に大別される。Panton-Valentine 白血球破壊毒素（PVL）をコードする遺伝子（*lukPV*）をもち、致命的深部感染症を起こすが、発症には PVL、コラーゲン粘着因子、骨シアロプロテイン粘着因子が関与している。

本研究は、PVL 陽性市中感染型（世界流行型、大陸特異型）、PVL 陰性市中感染型、院内感染型各 MRSA の粘着因子を明らかにするほか、世界流行型が持つ骨シアロプロテイン粘着因子遺伝子（*bbp*）の塩基配列を決定し、PVL 陽性市中感染型の迅速診断法を確立することを目的とした。

世界流行型全株と 80-90 年代に分離された PVL 陽性院内感染型から *bbp* 遺伝子を検出したが、大陸特異型と近年分離された院内感染型からは検出しなかった。コラーゲン粘着因子をコードする遺伝子（*cna*）も世界流行型との関連が示唆されたが、他の MRSA でも認めた。以上から、各遺伝子の組み合わせで世界流行型市中感染型 MRSA を分類区別することができた。また、*bbp* 遺伝子の塩基配列を明らかにし、リアルタイム PCR 法で *bbp*、*lukPV* 両遺伝子を標的にする迅速検出系が確立できた。

以上、本研究は、わが国にも分布する世界流行型市中感染型 MRSA が特異的に *bbp* 遺伝子を持つことを明らかにし、さらに *bbp* 遺伝子配列の解析結果に基づいて世界流行型市中感染型 MRSA の迅速診断法を確立した点に学位論文としての価値を認める。