

# Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) の Polymerase Chain Reaction (PCR) による同定、 および Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) による型別

八柳 潤 鈴木 陽子 木内 雄 佐藤 宏康

*mecA* 遺伝子を標的とし、MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) の同定を目的とした PCR (Polymerase Chain Reaction)、および MRSA の疫学解析を目的とした PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) の導入を試みた。Methicillin、Cefazolin、Ceftizoxime、Oxacillin に対する薬剤感受性試験を Kirby-Bauer法 (KB法) により測定した結果、MRSA と判定された50株中49株が *mecA* 遺伝子を保有していた。これに対して、前記4薬剤に感受性であることから MSSA (Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus) と判定された18株は、すべて *mecA* 遺伝子を保有していなかった。表現形から MRSA と判定されながら *mecA* 遺伝子を保有していなかった株が1株認められたが、*mecA* 遺伝子を標的とした PCR は MRSA 同定の迅速、簡便な同定法と考えられた。一方、制限酵素に *Sma*I を使用した PFGE により MRSA から生じたバンドの数は15本以下であり、DNA パターンの肉眼的観察に基づいて比較的容易に MRSA を分類することが可能であった。本 PFGE により前記MRSA50株の型別を試みたところ、13タイプに型別されることが明らかとなり、本 PFGE 法が MRSA の疫学解析法として有用であることが確認された。

キーワード：Methicillin Resistant Staphylococcus aureus、Polymerase Chain Reaction、*mecA* 遺伝子、Pulsed-field Gel Electrophoresis

## I はじめに

MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) は1980年以降、各地で分離頻度の増加が指摘されており、院内感染の原因菌として問題となっている<sup>1)</sup>。MRSA の院内感染対策を構想するには、いかに詳細に感染源や感染ルートを解明できるかということが重要である。MRSA の感染源や感染ルートの解明を試みる場合、従来は疫学マーカーとしてコアグラゼ型、エンテロトキシン型、ファージ型等が利用されてきた。しかし、これらのマーカーを利用した解析では解析力が不十分であるなどの理由から詳細な解析は困難であった<sup>2)</sup>。

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) は1000ベースから数メガベースの DNA を効率良く分離する電気泳動技術であり<sup>3)</sup>、1990年以降 MRSA の分子疫学的解析手法としての応用が試みられている。PFGE によれば MRSA の詳細な分子疫学的解析が可能となり、院内感染や母児間感染事例などにおいてその有用性が報告されている<sup>4)</sup>。

今年度はこの PFGE による MRSA の分子疫学的解析手法の導入を試みた。また、MRSA の迅速同定を可能とする目的で *mecA* 遺伝子を標的とした PCR について検討した。

## II 材料と方法

### 1. 菌株

MRSA と MSSA (Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus) の臨床分離株それぞれ50株および18株を秋田組合総合病院、検査科伊藤優子先生から分与を受け、供試した。

### 2. PFGE 法

(1) 菌体包埋アガロースブロックの調製と染色体 DNA の制限酵素消化

ジーンパス<sup>®</sup>試薬キット 1 (バイオラッド) を使用し、取り扱い説明書に従い実施した。

(2) PFGE 装置と泳動条件

泳動装置には CHEF-DRII<sup>®</sup>システム (バイオラッド) を使用した。泳動用バッファーには0.5×TBE を、ゲルには1%PFC アガロース (バイオラッド) を使用した。泳動のパラメーターは満田たちの報告<sup>2)</sup>に従い以下のとおりとした：バッファー温度14℃、パルスタイム 5-80 秒 (Linier Lamp)、電圧0.6V/cm、泳動時間22時間。泳動が終了したゲルは常法によりエチジウムブロマイド染色後、写真撮影により泳動像を記録した。

### 3. PCR

テンプレートは、*S. aureus* の DNase の影響を避けるために proteinase K 処理を併用する、横山の方法<sup>5)</sup> に準拠して調製した。*mecA* 遺伝子検出用プライマーに

表1 患者の所属病棟と分離株のPFGEパターン

病棟名	供試株数	PFGE パターン (株数)	病棟名	供試株数	PFGE パターン (株数)
1内	3	D'' (1)	耳外	1	D (1)
		F (1)	寿	1	I (1)
		G (1)	小外	1	C (1)
2	2	A (2)	西2	6	A (6)
6	3	A (3)	西3	6	A (2)
E4	6	A (2)			A' (1)
		G' (1)			B (1)
		G'' (1)			E (1)
		H' (1)			H (1)
		J (1)	西4	5	A (1)
E5	5	A (2)			A' (1)
		B (1)			B' (1)
		L (1)			B'' (1)
		M (1)			K (1)
外2	3	A (3)	不明	9	A (9)

は、横山が報告した *mecA* 遺伝子のうちの316bpを増幅する *mecA* 1: 5'-GAA-GAT-GGC-TAT-CGT-GTC-AC-3' と *mecA* 2: 5'-CTG-GAA-CTT-GTT-GAG-CAG-AG-3' を0.5 μMの濃度で使用した。また、Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) 遺伝子検出用プライマーには市販品(タカラ)を0.25 μMの濃度で使用した。反応液の組成は既報(6)のとおりとし、ヒートサイクルは94°C 30秒、68°C 30秒、72°C 30秒25回とした。増幅断片の検出には3%アガロースゲルを使用した。

#### 4. 薬剤感受性試験

供試株のMethicillin(センシディスク、BBL)、Cefazolin、Ceftizoxime、Oxacillin(KBディスク、栄研化学)に対する感受性をKB法により検討した。

### III 結果および考察

#### 1. PFGEによるMRSA臨床分離株の解析

秋田組合総合病院から分与されたMRSA供試株50株の *smal* PFGEパターンは、AからMまでの13に分類された。*smal* PFGEパターンは、レーンに存在するバンドの数が15本以下であったことから、分類作業は肉眼的な比較検討により比較的容易に実施することが可能であった。これらのパターンのうちA、B、D、G、Hのパターンを示す株には、バンドの違いが1本のみで、サブタイプと見なし得るパターンを示す株が存在し、それらには'を付してA'、B'などと標記した。また、パターンB、D、Gにはバンドの違いが1本のみパターンを示す株が複数種存在し、それらをB'、B''などと標記した。

供試した50株のうちパターンAを示した株が30株あり、最も多かった。また、パターンA'およびBを示した株

がそれぞれ2株あり、残りのパターンを示した株はいずれも1株ずつであった。表1にMRSAが分離された患者の所属する病棟と分離されたMRSAのPFGEパターンの関連を示した。2病棟、6病棟、外2病棟、西2病棟では患者から分離された株のパターンがすべてAであったが、E4病棟、E5病棟、西3病棟、西4病棟では分離株のパターンが多岐にわたっていた。このように、分離されるMRSAのPFGEパターンには病棟毎に特徴が認められる傾向があった。

今回、1病院で患者から分離されたMRSA 50株を供試してPFGEの導入を試みた。実際にDNA包埋プラグの作製、制限酵素消化、電気泳動、得られたパターンの比較検討を行った結果、市販の試薬キットを使用することにより、比較的容易にMRSAのPFGEが実施可能であることが確認された。また、得られたパターンの比較、解析は肉眼によっても比較的容易に実施可能であったが、供試株数が多い場合や菌株の近縁度を定量的に示したり系統樹を作成する場合には、市販のコンピューター解析ソフトの併用が望ましいと考えられた。本PFGE解析技術の導入により、県の医療行政が県内の医療機関のニーズに応じて院内感染対策をサポートするための基礎的技術基盤が確立したと考えられる。

#### 2. PCRによるMRSAの同定

供試したMRSA 50株、およびMSSA 18株のMethicillin、Cefazolin、Ceftizoxime、Oxacillinに対する感受性、*mecA* 遺伝子保有状況を表2に示した。供試したMRSA 50株はすべて4薬剤に耐性を示し、その表現型からMRSAであることが確認された。これら50株のMRSAのうち49株が*mecA* 遺伝子を保有していたが、

表2 供試 MRSA、および MSSA 株の薬剤感受性、mecA 遺伝子、TSST-1 遺伝子保有状況

供試株	感受性				遺伝子保有		菌株数
	Methicillin	Ceftizoxime	Cefazolin	Oxacillin	mecA	TSST-1	
MRSA 50株	R	R	R	R	+	+	49
	R	R	R	R	-	+	1
MSSA 18株	S	S	S	S	-	-	18

R : Resistant  
S : Sensitive

1株は4薬剤に耐性であるにもかかわらず mecA 遺伝子を保有していなかった。一方、供試した MSSA 18株はすべて mecA 遺伝子を保有せず、4薬剤に感受性を示した。

医療機関から MRSA として分与された50株は表現型からすべて MRSA と判定されたが、その50株中1株から mecA 遺伝子由来の増幅断片が得られなかった。この理由として、当該株が mecA 遺伝子を保有せず、mecA 遺伝子が関与する機構以外の機構で耐性を獲得していること、あるいは当該株の mecA 遺伝子のプライマーアニーリング部位に変異があり、PCR が進行しなかったことが考えられるが詳細は不明である。この事に関して、mecA 遺伝子を保有しない MRSA や mecA 遺伝子を保有しながら methicillin に感受性を示す株が存在する<sup>2) 3)</sup>との報告もあり、methicillin 感受性の表現型と mecA 遺伝子の有無が完全には一致しないと考えられる。しかしながら、薬剤感受性の表現型から MRSA かどうかの判定をする場合、MRSA の耐性機構の本質が誘導耐性であることなどの理由により、判定に困難を来す場合があることが指摘されている<sup>3)</sup>。このため、MRSA の同定手段として mecA 遺伝子の有無を検出する PCR 法は、その迅速性も併せて、有用であるといえよう。

今回、疫学マーカーの一つとしての TSST-1 遺伝子の意義を検討する目的で供試株の TSST-1 遺伝子保有状況について検討したところ、MRSA 50株はすべて TSST-1 遺伝子を保有していたが、MSSA 18株はすべて TSST-1 遺伝子陰性であることが明らかとなった。このことは、MRSA と TSS の関連を示唆することとして興味を持たれる。

#### IV 文 献

- 1) 川上小夜子. MRSA の病棟での検出状況. 帝京医学雑誌, 1990 ; 13 : 320-324.
- 2) 満田年宏, 他. パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析. 日本細菌学雑誌, 1995 ; 50 : 1077-1086.
- 3) Chu, G. et al., Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields., Science, 1986 ; 234 : 1582-1585.
- 4) Ichiyama S. et al., Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus., J. clin. Microbiol., 1991 ; 29 : 2690-2695.
- 5) 横山俊伸. メチシリン耐性ブドウ球菌における mecA 遺伝子の検討. 感染症誌, 1993 ; 67 : 1203-1210.
- 6) 八柳 潤, 他. 平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について. 秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47.
- 7) Murakami, K. et al., Identificatyion of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction., J. clin. Microbiol., 1991 ; 29 : 2240-2244.
- 8) Tokue, Y., et al., Comparison of polymerase chain reaction assay and by convensional microbiologic method for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus., Antimicrob. Agent Chemother., 1992 ; 36 : 6-9.
- 9) 生田公子. MRSA の判定法と感受性測定時の留意点. MRSA 感染症のすべて (紺野昌俊 編) 1993 ; 143-162. 医薬ジャーナル社.