

原 著

Polymerase Chain Reaction(PCR)法による Methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA)の 疫学的解析法の有用性

長岡中央総合病院、院内感染対策委員会、病理部；臨床検査士¹⁾、検査科；臨床検査士²⁾
呼吸器内科；内科医³⁾

長谷川秀浩¹⁾、金子陽子²⁾、阿部多美子²⁾、岩島明³⁾

目的：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) は、院内感染の原因菌として最も注意を払わなければならない菌であり、アウトブレイクが疑われた際には感染源の確認と感染拡大の防止策を緊急に講じる必要性から分子生物学技術を用いた疫学的解析法の導入が望まれる。

方法：2006年6月から9月に当院において分離されたMRSA116株のゲノムタイピングを Polymerase chain reaction (PCR) 法を応用した ribosome spacer PCR (RS-PCR) 法と Arbitrarily primer PCR (AP-PCR) 法を用いて行なった。

結果：検討を行なった116株のMRSAの遺伝子型はRS-PCR法により8種類に分類されAP-PCR法では17種類に分類された。さらに双方の結果を組み合わせる事により51種類にゲノムタイピングされた。

結論：臨床材料から分離されたMRSAを迅速にタイピングできるRS-PCR法およびAP-PCR法は、リアルタイムな対応が求められる院内感染発生時において、感染源の特定と感染拡大の防止に貢献できるものと判断された。

キーワード：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、遺伝子型別、ribosome spacer PCR (RS-PCR) 法、Arbitrarily primer PCR (AP-PCR) 法

緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) は、ペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効な β -ラクタム薬であるメチシリンに耐性を獲得した黄色ブドウ球菌である。MRSAの病原性は、多種の抗生剤に耐性を示し、治療が著しく困難になるという点を除けば皮膚の常在菌である黄色ブドウ球菌と同等であり、健常者の皮膚や口腔などに定着していても症状は比較的軽微なことが多い。しかし、乳幼児、老人、免疫不全状態、術後患者等では術創感染症や敗血症、MRSA腸炎などを引き起こしショック症状や多臓器不全を経て死亡に至る場合もあるなど、本菌の蔓延は特に医療現場において深刻に対処すべき菌であることから院内感染において最も注意

を払わなければならない菌として重要視され、多くの病院に感染対策委員会 (ICC) やインフェクションコントロールチーム (ICT) が設けられ動向の把握とともに様々な感染防止対策が施されている。特に本菌によるアウトブレイク (病院感染拡大) 発生の際には、その拡大防止のため感染源の究明と感染経路を早急に遮断する事が重要である。そのためにはMRSAのタイピングは必要不可欠であり従来、コアグラーゼ型別試験、エンテロトキシン血清型やToxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) の産生試験など生物学的特性を利用した表現型のタイピングが行なわれてきたが、分離されるMRSAの表現型が特定のタイプに集中している事が明らかとなり、さらに詳細なタイピングの必要性に迫られてきた⁽¹⁾。そこで1990年代にはパルスフィールド電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis : PFGE) に代表されるような分子生物学的解析法がMRSAの感染源や感染経路の特定に用いられるようになってきた^{(2)~(3)}。また、近年ではPCR法を応用して、より迅速かつ簡便にゲノムタイピングを行なう方法として16S~23SのrRNAに挟まれたspacer領域をユニバーサルプライマーにより増幅させるRibosome spacer PCR (RS-PCR) や9~10mer程度のランダムな塩基配列をしたプライマーを使用し、不特定多数の増幅産物を形成させるArbitrarily primer PCR (AP-PCR) などが微生物の識別法として試みられている^{(4)~(6)}。今回我々はMRSAによるアウトブレイクが発生した際の対応策を構築するにあたりRS-PCR法とAP-PCR法により迅速にMRSAのフィンガープリントをおこない感染源の特定と感染経路を遮断するシステムの構築を目的にMRSAのゲノムタイピングを行なった。

材 料 と 方 法

1. 材料

2006年6月から9月に当院において臨床材料から分離された*Staphylococcus aureus*より薬剤感受性試験でOxacillinに対する最小発育阻止濃度4 μ g/ml以上であり、PCR法でmec A遺伝子の増幅が認められた116株について検討を行なった。

2. DNA 抽出

テンプレート DNA の抽出にはミュラーヒントン培地にて純粋培養された MRSA を 1 エーゼ (1mm のエーゼにて 1 loopful) を滅菌蒸留水に浮遊させ、95℃にて10分間過熱した後、10,000rpmにて10分間遠心分離を行い上清を回収し、DNA濃度を50ng/ μ l に調整した。

3. mec A の検出

Song 等が mec A 遺伝子の増幅に用いた sense 5'-AGT TGT AGT TGT CGG GTT TG-3' と antisense 5'-AGT GGA ACG AAG GTA TCA TC-3' のプライマーを合成し20pM に調整した。Taq polymerase には Ampli Taq Gold (Applied Bio Systems) を使用し PCR 反応液は20 μ l で調整した¹¹⁾。(d-DW: 14 μ l, PCR buffer with 15mM MgCl₂: 2 μ l, 2mM dNTP: 2 μ l, Primer G1: 0.5 μ l, L1: 0.5 μ l, Taq polymerase 1U, DNA テンプレート: 1 μ l) PCR 反応には Program Temp Control System PC701 (アステック) を使用し94℃ 3分の hot start を行なった後、denature 94℃ 1分、annealing 52℃ 1分、extension 72℃ 2分を40サイクル行なった後、72℃ 10分の last extension を行なった。PCR 反応産物は10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い EtBr 染色を施した後、UV イルミネーター下で604bp のバンドを確認できた株を陽性とした (図 1)。

4. MRSA のタイピング

RS-PCR 法

プライマーには Jensen 等⁷⁾が細菌のタイピングに用いた G1: 5'-GAA GTC GTA ACA AGC-3' と L1: 5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3' を合成し各20pM に調整した。PCR 反応液は20 μ l で調整し (d-DW: 14 μ l, PCR buffer with 15mM MgCl₂: 2 μ l, 2mM dNTP: 2 μ l, Primer G1: 0.5 μ l, L1: 0.5 μ l, Taq polymerase 1U, DNA テンプレート: 1 μ l), PCR サイクルコンディションは94℃10分の Hot start を行なった後、denature 94℃ 1分、annealing 41℃ 2分、extension 72℃ 2分を40サイクル行なった後、72℃10分の last extension を行なった。

AP-PCR 法

Mahenthalingam E 等⁶⁾が AP-PCR 法により P. aeruginosa のタイピングを行なった際に用いたプライマー-272: 5'-AGG GGG CCA A-3' を合成し20pM に調整した。RS-PCR 法と同様に PCR 反応液は20 μ l (d-DW: 14 μ l, PCR buffer with 15mM MgCl₂: 2 μ l, 2mM dNTP: 2 μ l, Primer 272: 1 μ l, Taq polymerase 1U, DNA テンプレート: 1 μ l) で調整した。尚、RS-PCR 法、AP-PCR 法ともに Taq polymerase は Ampli Taq Gold (Applied Bio Systems) を使用した。PCR のサイクルコンディションは94℃10分の hot start を行なった後、denature 94℃ 1分、annealing 41℃ 2分、extension 72℃ 2分を40サイクル行なった後、72℃10分の last extension を行なった。反応終了後、RS-PCR および AP-PCR の増幅産物は10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い EtBr 染色を施した後、UV イルミネーター下で泳動像を Printgraph (ATTO) で撮影し、その泳動パターンよりタイピングを行なった。

結 果

RS-PCR 法では200bp~700bp の間で確認されるバンドの本数とその位置から図 2 のように I 型~VIII 型の 8 種類に分類された。タイピングの結果は表 1 に示すように I 型が全体の約 4 割を占め、次いで II 型が 3 割を占めていた。また、AP-PCR 法では図 3 に示すように 200bp~1000bp の間に認められたバンドの位置を用いて A 型~Q 型の 17 種類に分類された。表 2 に示すようにタイピングの結果から A 型が優位を示しており、双方のタイピングの結果を組み合わせる事により表 3 に示すように 116 株の MRSA は 51 種類にゲノムタイピングされた。

考 察

MRSA による院内感染の拡大を防ぐため感染源の迅速なる把握および、それに対する適切な対策が要求されており、そのためには感染源の特定と分離された菌との同一性に関する科学的データを迅速に収集することが必要不可欠である。一般に患者から分離された菌の分子生物学的手法を利用してタイピング法は PFGE 法がゴールドスタンダードであり、院内のアウトブレイクの確認に利用されている。しかし、PFGE 法は分離、解析能に優れているものの特殊な電気泳動装置が必要であり、解析のための全行程は煩雑なうえ 5 日から一週間程度の日数が必要とされ迅速性や簡便さに欠ける。PCR 法を応用した新しいゲノムタイピング法として RS-PCR 法を利用した Warren N 等¹³⁾による Clostridium のタイピングや D. N. kumari 等¹⁴⁾により MRSA のゲノムタイピングが行われており、それぞれ PFGE 法と比較した結果 RS-PCR 法の解析能力は PFGE 法にはやや劣るもののスクリーニングの解析には極めて有用であると報告している。一方、AP-PCR の再現性は PFGE 法に比較すると不安定であると報告されており、特に PCR 反応液の Mg イオンの濃度やテンプレート DNA 量が泳動パターンに大きく影響することが知られている。Antonio O. 等¹⁰⁾による AP-PCR 法の最適条件の検討では、分解能や再現性を向上させるにはテンプレート DNA 量は 50ng/ μ l に調整し、Mg イオン濃度を高くすることによりプライマーのプライミング効率を向上させたことと報告しているが、我々は高濃度のテンプレート DNA 量は反対にプライマーのプライミング効率低下の原因になる可能性があることから PCR 反応液の組成と反応条件を検討した。その結果、テンプレート DNA 量の最終濃度が 2.5ng/ μ l が適正と判断し、Mg イオン濃度は 1.5mM と通常の PCR 反応に供される程度の濃度とし、アニーリングの温度を下げることによりプライミングの効率を向上させ充分タイピングが可能な安定した結果を得る事ができた。AP-PCR 法を用いて細菌のゲノムタイプを行った向川等⁹⁾は結核菌の集団感染事例において、迅速に原因菌株を型別できる方法であると報告しており、また中村等¹⁰⁾はセラチア菌の IMP-1 型メトロ- β ラクタマーゼ産生株の検出が可能であったと報告している。さらに小林等⁵⁾は MRSA の PFGE 法と AP-PCR 法によるタイピングの比較を行なった結果、PFGE 法では検出できない薬物感受性などの内在的な特異部位での違

いに対し AP-PCR 法を用いた解析で検出が可能であったと報告しており、RS-PCR 法と AP-PCR 法の解析結果を合わせてゲノムタイピングを行った場合、解析能力の向上とともに薬剤感受性など生物学的特性をも網羅できるゲノムタイピングが行える可能性が考えられる。また、予め各遺伝子型の検出頻度が明らかであるならば院内感染が疑われた場合、本法を用いたゲノムタイピングのみにより同一発生源か否かを検討することだけではなく、それぞれの遺伝子型の検出頻度から、その遺伝子型が偶然一致する確率や同一発生源である可能性を数値化し、更に客観的な報告が可能とされる。今回行った MRSA のタイピングでは I A および II A 型が優位に検出されたが、これは本解析に用いたプライマーを使用した場合に検出される MRSA のスタンダードな型が反映されているものであると考えられ、さらに検討数を重ね当院における検出傾向の把握を含めデータの蓄積が必要であるものと考えられた。PFGE 法に比べ手技が簡易で特殊な機器の必要がない本法は、実用面において十分な菌株識別能力を有しており、病院検査室に導入しやすい解析法である。また、リアルタイムでの結果報告が可能である事から緊急な対策を講じなければならない必要のある院内感染において、本法により得られた疫学的データを解析することにより感染経路の詳細な解析が可能となり感染拡大の防止に貢献できると判断された。

参 考 文 献

1. 脇孝博. 整形外科病棟入院患者および同医療従事者より分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* のゲノムタイピング. 感染症誌 2003; 77: 1058-1066.
2. 一山智. パルスフィールドゲル電気泳動法 *Staphylococcus aureus*. 臨床と微生物 1996; 23(6): 626-629.
3. Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol 1991; 29: 2690-2695.
4. Tamer E, Kamel A, Nael A, Galeb A, Ahmed S. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by ribosome spacer and arbitrarily primed polymerase chain reaction. Turk J Med Sci 2004; 34: 5-9.
5. 小林昌彦, 岩本優子, 金子 克. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のパルスフィールド電気泳動および AP-PCR によるゲノムタイピング. 感染症誌 1997; 71: 620-627.
6. Kondoh K, Furuyama D, Yamgihashi A, Uehara N, et al. Comparison of arbitrary primed-polymerase chain reaction and pulse-field gel electrophoresis for characterizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbio 2002; 35: 62-67.
7. Jensen M A, J A Webster, N Straus. Rapid identification of bacteria on the basis of PCR-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 945-952.
8. Mahenthalingam E, et al. Random amplified poly-

morphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol 1996; 34: 1129-1135.

9. 向川 純, 下島優香子, 村田以和夫, 遠藤美代子, 柳川義勢, 諸角 聖. 結核集団感染の分子疫学的解析における Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法の有用性. 感染症誌 2003; 77: 1040-1047.
10. 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 奥田和之, 中村千代, 平城 均, 他. 1991年から2000年の間に血液培養により分離された *Serratia marcescens* における IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の解析. 感染症誌 2002; 76: 246-253.
11. Song MD, Wachi M, Doi M, et al. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Letter 221 1987; 167-171.
12. Antonio O, Juan J C, Jose M U, et al. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. Clin Microbiol 1998; 36: 1128-1134.
13. Warren N F, Peter P, Paul V, et al. Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom epidemic strain (CPCR ribotype1). Clin Microbiol 2005; 43: 2685-2696.
14. D N Kumari, V Keer, P M Hawkey et al. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin Microbiol 1997; 35: 881-885.

英 文 抄 録

Original article

The Epidemiological analysis of the epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) by polymerase chain reaction (PCR)

Nagaoka central general hospital, Infection control team of Nagaoka Central General Hospital, Department of Pathology; Medical technician¹⁾, Department of Clinical laboratory; Medical technologist²⁾, Department of Respiratory diseases; Physician³⁾
Hidehiro Hasegawa¹⁾, Yohko Kaneko²⁾, Tamiko Abe²⁾, Akira Iwashima³⁾

Objective: methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) has been one of major causative agents of nosocomial infections. When was prevalent, the rapid MRSA-genotyping guaranteed the confirmation of both its of infectious source and transmission route to prevent its expansion.

Study design: 116 specimens of MRSA separated from our hospital were genotypically studied by ribosome spacer polymerase chain reaction (RS-PCR) and Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR).

Results: RS-PCR showed 8 different genotypes. AP-PCR

defined 17 different DNA banding pattern. The combination of RS-PCR and AP-PCR patterns define 51 clusters.

Conclusion: Genotypes of MRSA strains were determined by RS-PCR and AP-PCR to analyze the in-

fection source and transmission route of infection.

Key words : methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), genotype, ribosome spacer PCR (RS-PCR), Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)

表 1 RS-PCR 法による MRSA のタイピング結果と検出頻度

型	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX
株数	45	35	4	6	17	3	3	3
検出頻度 (%)	38.7%	30.2%	3.5%	5.2%	14.6%	2.6%	2.6%	2.6%

表 2 AP-PCR 法による MRSA のタイピング結果と検出頻度

型	A	B	C	D	E	F	G	H	I
株数	38	13	4	3	5	5	8	11	3
検出頻度 (%)	32.8%	11.2%	3.5%	2.5%	4.3%	4.3%	6.9%	9.5%	2.5%

型	J	K	L	M	N	O	P	Q	n
株数	1	11	2	2	1	1	1	7	114
検出頻度 (%)	0.9%	9.5%	1.7%	1.7%	0.9%	0.9%	0.9%	6.0%	100.0%

表 3 RS-PCR 法と AP-PCR 法による MRSA のタイピング結果

I 型		II 型		III 型	IV 型	V 型		VI 型	VII 型	VIII 型
型数	型数	型数	型数	型数	型数	型数	型数	型数	型数	型数
A 19	I 1	A 11	H 1	B 1	A 1	A 3	N 1	C 1	A 2	A 2
B 4	J 1	B 4	I 1	C 1	B 2	B 1		G 1	B 1	I 1
D 2	K 1	C 1	K 3	E 1	F 1	C 1		O 1		
E 1	L 1	D 1	L 1	F 1	G 1	E 1				
F 2	M 1	E 2	M 1		K 1	G 3				
G 2	Q 1	F 1	P 1			H 1				
H 9		G 1	Q 6			K 6				
小計45		小計35		小計 4	小計 6	小計17		小計 3	小計 3	小計 3

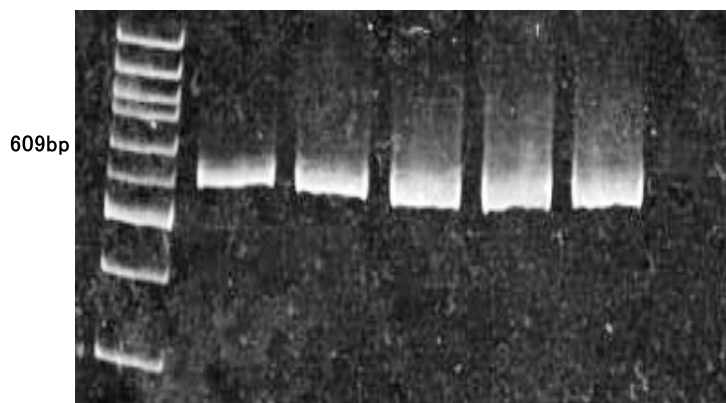


図1 PCR法による mec A 遺伝子の検出

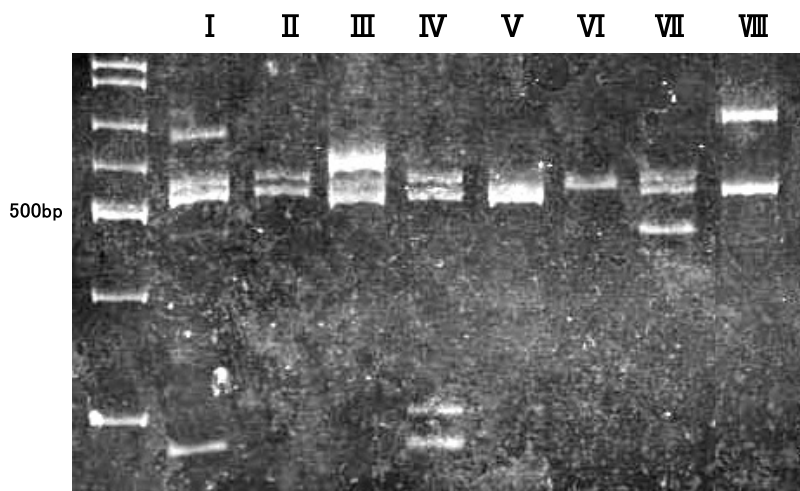


図2 RS-PCR法によりタイピングされたMRSAの泳動パターン

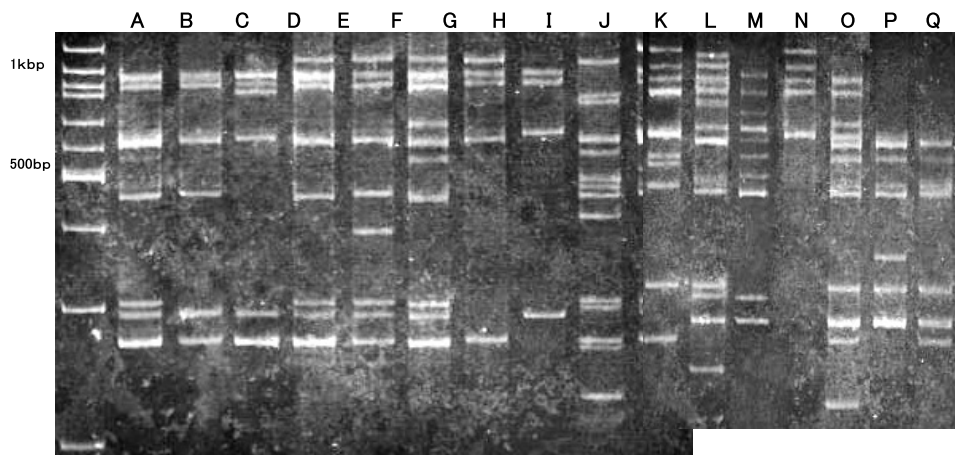


図3 AP-PCR法によりタイピングされたMRSAの泳動パターン