

氏名(本籍)	笠井智子(新潟県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第140号
学位授与年月日	平成27年9月30日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	イヌのメチシリン耐性 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 感染症の 分子疫学的研究
論文審査委員	(主査) 村上 賢 (副査) 猪股 智夫 加藤 行男 久末 正晴

論文内容の要旨

【緒言】

ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属は哺乳類の皮膚や粘膜の常在菌であるが、時に感染症の起因菌ともなりうる。イヌの常在ブドウ球菌は *S. pseudintermedius* であることが知られており、近年メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) による感染症が世界的に増加していることから、院内伝播やヒトへの影響が懸念されている。MRSP に関する研究も同様に増加しているが、その遺伝子型と臨床的背景との関連性や病原性はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、まずイヌの表在性膿皮症由来 MRSP 株について、表皮剥脱毒素遺伝子の保有状況と遺伝子型の分布を調査した(第1章)。次いで、MRSP の検出と遺伝子型別を効率的に行うために、従来の PCR 法の簡便化に取り組み、改良型 PCR 法を確立した(第2章)。さらに、疫学調査の対象を他疾患に拡大し、MRSP 株の遺伝子型・表現型と臨床的背景との関連性を分析した(第3章)。

第1章：イヌ表在性膿皮症由来 *S. pseudintermedius* 株における表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA*, *expB*) および staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type の分布調査

【背景】表在性膿皮症はイヌで頻繁にみられる感染性疾患のひとつであり、主な原因菌は *S. pseudintermedius* である。本菌種の一部の株は表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA* および *expB*) を保有し、本毒素がイヌの皮膚に表皮剥離を生じることが報告されている。一方、MRSP における *exp* の報告はいまだ存在せず、MRSP の病原性は十分に解明されていない。本章ではイヌの表在性膿皮症由来 MRSP 株について、*expA*, *expB* の保有率を調査するとともに、国内の報告が少数である SCC*mec*-type

の分布を PCR 法により解析した。

【方法】国内の個人動物病院 3 施設を受診した 74 頭の表在性膿皮症罹患犬を対象に、病変部よりスワブ採材し、定法にてブドウ球菌 74 株を分離した。得られた菌株は既存の multiplex PCR (M-PCR) による菌種同定を行い、*S. pseudintermedius* については *expA*, *expB* とメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) の有無を PCR によって確認した。MRSP は複数の M-PCR を用いて SCC*mec*-type を決定した。

【結果・考察】分離した 74 株はすべて *S. pseudintermedius* であり、52 株 (70.3%) が *mecA* 陽性の MRSP であった。*expA* はメチシリン感性 *S. pseudintermedius* (MSSP) 22 株中 5 株 (22.7%)、MRSP 1 株 (1.9%) に認められた。*expB* は MSSP 1 株 (4.5%) にのみ認められ、MRSP 株からは検出されなかった (0%)。MRSP 52 株の SCC*mec*-type の内訳は、type III-like が 33 株 (63.5%)、type V が 18 株 (34.6%) であり、1 株は型別不能 (NT) であった。本結果から、国内の表在性膿皮症において MRSP が蔓延状態にあることが明らかとなった。また、*S. pseudintermedius* のメチシリン耐性と *expA*, *expB* には関連性のないことが示唆された。

第 2 章：MRSP の検出および SCC*mec* typing の簡便化を目的とした M-PCR 法の改良

【背景】一般的な MRSP の分子疫学解析には、菌種同定と *mecA* 検出、SCC*mec* typing が含まれるが、従来の方法ではこれらの解析に 5 種の PCR 法を実施する必要がある。本章では、従来の 5 種の PCR 法を 2 種の M-PCR 法に集約することで、検査の簡便化を試みた。

【方法】既存の菌種同定用 M-PCR の反応系に *mecA* の新規に設定したプライマーセットを組み入れるとともに、既存のプライマーを部分的に改良することで、菌種と *mecA* の有無を同時に判定する反応系 (M-PCR 1) とした。さらに、従来の SCC*mec* typing 用のプライマーセットから PCR 反応の良好な組み合わせを選出し、6 つの SCC*mec*-type を一斉に検出する反応系 (M-PCR 2) とした。この改良型 M-PCR 1, 2 を用いて、菌種と *mecA*、SCC*mec*-type の判明しているブドウ球菌 15 株を参照株として分析を行った。次いで両改良法を臨床材料から分離したブドウ球菌 59 株の解析に応用し、同菌株を従来の方法で解析した結果と比較した。

【結果・考察】M-PCR 1, 2 による解析の結果、すべての参照株で菌種、*mecA* の有無、SCC*mec*-type が一致した。M-PCR 1 によるブドウ球菌 59 株の分析結果は、*S. pseudintermedius* が 48 株と *S. schleiferi* が 11 株であり、*mecA* 陽性株はそれぞれ 30 株、4 株であった。30 株の MRSP は M-PCR 2 による解析の結果、16 株 (53.3%) の SCC*mec*-type III-like と 14 株の type V (46.7%) に分類された。M-PCR 1 と 2 の結果は従来法の結果と完全に一致した。新たに確立した 2 種の改良型 M-PCR 法によって菌種、*mecA* と SCC*mec*-type の情報を簡便に得ることが可能となった。

第 3 章：イヌ由来 *S. pseudintermedius* 株の分子疫学解析

【背景】MRSP に関する報告は過去 10 年間で急増しており、その多くがヒトの重要な病原菌であるメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) の報告を参考に行われてきた。MRSA の疫学調査は、菌株を遺伝

子型に分類して解析する方法が主流である。例えば、MRSA は SCC*mec*-type I, II, III を主に保有する院内感染型 (healthcare-associated, HA-) MRSA と、SCC*mec*-type IV, V を主に保有する市中感染型 (community-associated, CA-) MRSA とに大別される。こうした遺伝子型の情報は患者のリスク評価や抗菌薬治療、流行株の予測などに活用されている。一方 MRSP では、SCC*mec*-type III-like と type V の 2 種類が世界の主要な SCC*mec* type であることが判明しており、第 1 章においても表在性膿皮症に由来する MRSP の SCC*mec*-type がこの 2 種に大別されることが確認された。しかし、SCC*mec*-type を表現型や臨床的背景と関連づけて分析した研究はほとんど存在しない。そこで本章では、*S. pseudintermedius* 感染症の治療法・予防法を検討する目的で、各種感染症に罹患したイヌから得た臨床分離株を分子疫学的に解析し、薬剤感受性パターン、遺伝的多様性ならびにリスク因子の評価を遺伝子型別に行った。

【方法】国内の個人動物病院 10 施設および麻布大学附属動物病院を受診し、細菌感染症が疑われた病犬 462 症例を対象とした。各症例の病変部よりスワブ採材し、分離された計 282 株の *S. pseudintermedius* を各種解析に供試した。菌種同定と *mecA* の検出、および MRSP の SCC*mec* typing には第 2 章で確立した M-PCR 1, 2 を用いた。薬剤感受性試験は、24 の薬剤について最小発育阻止濃度 (MIC) の測定またはディスク拡散法により行った。MRSP 株はさらにパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による型別を実施し、遺伝的多様性を評価した。また、*S. pseudintermedius* 株を遺伝子型および薬剤感受性パターンごとに分類し、各群の臨床情報 (年齢、性別、基礎疾患、治療歴) について統計学的解析を行った。検定は χ^2 検定、Fisher の確率検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて、統計学的有意差 ($P < 0.05$) の認められた項目を各群のリスク因子とした。

【結果・考察】*S. pseudintermedius* 282 株中 195 株 (69.1%) が MRSP であった。MRSP 195 株の SCC*mec*-type の内訳は、type III-like が 103 株 (52.8%)、type V が 73 株 (37.4%) であり、19 株 (9.7%) は NT であった。疾患別に SCC*mec*-type の分布をみると、type III-like は type V よりも高い頻度で入院症例から検出されていた。また、SCC*mec*-type III-like は type V に比べて PFGE 型の遺伝的相関性が高く、薬剤感受性パターンもほぼ同一であった。さらに、SCC*mec*-type III-like と type V の 2 群比較から、前者では入院・手術と抗菌薬投与がリスク因子であることが判明した。これらの結果から、SCC*mec*-type III-like と type V はそれぞれ院内感染型 MRSP (HA-MRSP)、市中感染型 MRSP (CA-MRSP) に相当することが示唆された。したがって、イヌの *S. pseudintermedius* 感染症では MSSP、HA-MRSP と CA-MRSP の 3 つのタイプを想定する必要があると言える。これら 3 タイプの薬剤感受性パターンに着目すると、MSSP では第一世代セファロスポリン、HA-MRSP ではミノサイクリンがそれぞれ高い感受性率を示した。一方、CA-MRSP では感受性パターンが多様であった。よって、実際の治療において、MSSP と HA-MRSP では上記の抗菌薬が有効と考えられるが、CA-MRSP では薬剤感受性試験に基づいた抗菌薬選択が推奨される。このような遺伝子型を考慮した薬剤の選択は、抗菌薬の治療効果を高めるだけでなく、薬剤耐性菌出現のリスクを最小限に抑える効果も期待できる。

以上、本研究では、近年増加している MRSP 感染症を疾患別・遺伝子型別に多面的に分析した。病原性の分析では、表在性膿皮症由来の MRSP は表皮剥脱毒素遺伝子と関連性がないことを示した。対象疾患を拡大した分子疫学解析では、MRSA の院内感染型、市中感染型に相当する遺伝子型が MRSP にも存在し、HA-MRSP、CA-MRSP として分類できることを新たに見出した。この分類が国外の MRSP 感染症にも適応するか否かは、今後さまざまな地域で検証される必要がある。本研究で確立した改良型 M-PCR 法は SCCmec-type に基づいたこの分類を簡便に行えることから、今後の疫学研究に寄与するものと考えられる。また、MSSP、HA-MRSP、CA-MRSP はそれぞれ異なる薬剤感受性パターンを示したことから、これらの分類は *S. pseudintermedius* 感染症の治療に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属は哺乳類の皮膚や粘膜の常在菌であるが、時に感染症の起因菌ともなりうる。イヌの常在ブドウ球菌は *S. pseudintermedius* であることが知られており、近年メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) による感染症が世界的に増加していることから、院内伝播やヒトへの影響が懸念されている。MRSP に関する研究は増加しているが、その遺伝子型と臨床的背景との関連性や病原性はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、まずイヌの表在性膿皮症由来 MRSP 株について、遺伝子型と表皮剥脱毒素遺伝子の保有状況の分布を調査した (第 1 章)。次いで、MRSP の検出と遺伝子型別を効率的に行うために、従来の PCR 法の簡便化に取り組み、改良型 PCR 法を確立した (第 2 章)。さらに、疫学調査の対象を他疾患に拡大し、MRSP 株の遺伝子型・表現型と臨床的背景との関連性を分析した (第 3 章)。本論文は、3 章から構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

第 1 章：イヌ表在性膿皮症由来 *S. pseudintermedius* 株における表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA*, *expB*) および staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) type の分布調査

表在性膿皮症はイヌで頻繁にみられる感染性疾患のひとつであり、主な原因菌は *S. pseudintermedius* である。本菌種の一部の株は表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA* および *expB*) を保有し、本毒素がイヌの皮膚に表皮剥離を生じることが報告されている。一方、MRSP における *exp* の報告はいまだ存在せず、MRSP の病原性は十分に解明されていない。本章ではイヌの表在性膿皮症由来 MRSP 株について、*expA*, *expB* の保有率を調査するとともに、SCCmec-type の分布を PCR 法により解析した。

即ち、国内の個人動物病院 3 施設を受診した 74 頭の表在性膿皮症罹患犬を対象に、病変部よりスワブ採材し、定法にてブドウ球菌 74 株を分離した。これらについて、既知の multiplex PCR (M-PCR) による菌種同定とメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) の検出 PCR を行ったところ、分離した 74 株はすべて *S. pseudintermedius* であり、52 株 (70.3%) が *mecA* 陽性の MRSP であった。次に、*expA*, *expB* の検出 PCR を行ったところ、*expA* はメチシリン感性 *S. pseudintermedius* (MSSP) 22 株中 5 株 (22.7%)、MRSP 1 株 (1.9%) に認められ、*expB* は MSSP 1 株 (4.5%) にのみ認められ、MRSP

株では検出されなかった（0%）。また、複数の M-PCR を用いた MRSP の SCC*mec*-type 決定では、MRSP 52 株の内、type III-like が 33 株（63.5%）、type V が 18 株（34.6%）であり、1 株は型別不能（NT）であった。本結果から、国内の表在性膿皮症において MRSP が蔓延状態にあり、その遺伝子型は type III-like と type V が主流であることが明らかとなった。また、*S. pseudintermedius* のメチシリン耐性と *expA*, *expB* には関連性のないことが示唆された。

第 2 章：MRSP の検出および SCC*mec* typing の簡便化を目的とした M-PCR 法の改良

MRSP の分子疫学解析には、菌種同定と *mecA* 検出、SCC*mec* typing が含まれるが、従来の方法ではこれらの解析に 5 種の PCR 法を実施する必要があった。本章では、これを 2 種の M-PCR 法に集約することで、検査の簡便化の確立を試みた。

まず、既知の菌種同定用 M-PCR のプライマー配列を部分的に改良した反応系に新規に設定した *mecA* のプライマーセットを組み入れて、菌種同定と *mecA* の有無を同時に判定する反応系 M-PCR 1 を構築した。次に、従来の SCC*mec* typing 用のプライマーセットから PCR 反応の良好な組み合わせを選出し、6 種類の SCC*mec* -type を同時に検出できる反応系 M-PCR 2 を構築した。この改良型 M-PCR 1, 2 を用いたブドウ球菌参照株 15 株の検証では、参照データ（菌種、*mecA* の有無、SCC*mec* -type）と一致することを確認した。続いて、臨床材料から分離したブドウ球菌 59 株の分析に応用したところ、M-PCR 1 によりブドウ球菌 59 株は、48 株が *S. pseudintermedius*、11 株が *S. schleiferi* に同定され、*mecA* 陽性株はそれぞれ 30 株、4 株であった。30 株の MRSP における M-PCR 2 による解析では、16 株（53.3%）が SCC*mec*-type III-like で 14 株が type V（46.7%）に分類された。これらの結果は、同菌株を従来法で解析した結果と完全に一致した。このように、新たに確立した 2 種の改良型 M-PCR 法によって菌種、*mecA* と SCC*mec*-type の情報を簡便に得ることが可能となった。

第 3 章：イヌ由来 *S. pseudintermedius* 株の分子疫学解析

S. pseudintermedius 感染症の治療法・予防法を検討する目的で、各種感染症に罹患したイヌから得た臨床分離株である *S. pseudintermedius* を分子疫学的に解析し、薬剤感受性パターン、遺伝的多様性ならびにリスク因子の評価を遺伝子型別に行った。

即ち、国内の個人動物病院 10 施設および本学附属動物病院を受診し、細菌感染症が疑われた病犬 462 症例を対象とし、病変部より計 282 株の *S. pseudintermedius* を分離した。菌種同定と *mecA* の検出、および MRSP の SCC*mec* typing には第 2 章で確立した M-PCR 1, 2 を用いた。*S. pseudintermedius* 282 株中 195 株（69.1%）が MRSP であり、このうち 103 株（52.8%）が type III-like、73 株（37.4%）が type V であった。残りの 19 株（9.7%）は NT であった。世界の主要な SCC*mec* type である SCC*mec* -type III-like と type V の 2 種類が、第 1 章での表在性膿皮症由来 MRSP でもみられたように、ここでも主流であることを確認した。続いて、24 の薬剤での最小発育阻止濃度（MIC）の測定またはディスク拡散法による薬剤感受性試験を行い、薬剤感受性パターンを調べた。さらに、パルスフィールドド

ゲル電気泳動 (PFGE) による型別を実施し遺伝的多様性の評価や臨床情報 (年齢、性別、基礎疾患、治療歴) との関連を調べた。その結果、疾患別の SCC*mec*-type の分布では、type III-like は type V よりも高頻度で入院症例から検出され、また SCC*mec*-type III-like は type V に比べて PFGE 型の遺伝的相同性が高く、薬剤感受性パターンもほぼ同一であった。さらに、SCC*mec*-type III-like は type V に比べて、入院・手術と抗菌薬投与がリスク因子であることがわかった。SCC*mec*-type III-like と type V は、それぞれメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) で報告されている院内感染型 (healthcare-associated, HA-) と市中感染型 (community-associated, CA-) に相当すると考えられ、イヌの *S. pseudintermedius* は MSSP、HA-MRSP (院内感染型 MRSP) と CA-MRSP (市中感染型 MRSP) の 3 つのタイプに分類された。これら 3 タイプの薬剤感受性パターンに着目すると、MSSP では第一世代セファロスポリン、HA-MRSP ではミノサイクリンがそれぞれ高い感受性率を示した。一方、CA-MRSP では感受性パターンが多様であった。よって、実際の治療において、MSSP と HA-MRSP では上記の抗菌薬が有効と考えられるが、CA-MRSP では薬剤感受性試験に基づいた抗菌薬選択が推奨される。このような遺伝子型を考慮した薬剤の選択は、抗菌薬の治療効果を高めるだけでなく、薬剤耐性菌出現のリスクを最小限に抑える効果も期待できる。

以上、本研究では、近年増加している MRSP 感染症を疾患別・遺伝子型別に多面的に分析した。病原性の分析では、表在性膿皮症由来の MRSP は表皮剥脱毒素遺伝子と関連性がないことを示した。対象疾患を拡大した分子疫学解析では、MRSA の院内感染型、市中感染型に相当する遺伝子型が MRSP にも存在することを見出し、それぞれが異なる薬剤感受性パターンを示したことから、イヌの *S. pseudintermedius* の遺伝的分類は本細菌感染症の治療薬の選択に有用であると考えられた。また、本研究で確立した改良型 M-PCR 法は SCC*mec*-type に基づいた分類を簡便に行えることから、今後の疫学研究に寄与するものと考えられた。本研究で得られたイヌの *S. pseudintermedius* の分子疫学的知見は、学術的価値があるだけでなく、今後の獣医臨床分野への応用も期待できる。獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士 (獣医学) の学位を授与するのにふさわしい研究と判定した。