

皮膚科外来患者由来 MRSA 株に見られる新規 MRSA クローンの出現状況

MRSA clones identified in outpatients' clinics of dermatology

細谷志乃¹、伊藤輝代^{1,2}、三澤成毅³、吉池高志⁴、小栗豊子⁵、平松啓一^{1,2}

Shino Hosoya, Teruyo Ito, Shigeki Misawa, Takashi Yoshiike,
Kunimitsu Yamada, Toyoko Oguri, Keiichi Hiramatsu

- 1 順天堂大学大学院感染制御科学
- 2 順天堂大学医学部細菌学教室
- 3 順天堂大学医学部附属順天堂医院 臨床検査部
- 4 順天堂静岡病院皮膚科
- 5 亀田総合病院 臨床検査部

所属英文

1. Department of Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University
2. Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University
3. Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital
5. Department of Clinical Laboratory, Kameda General Hospital.

Key Word

community-acquired MRSA, MRSA clones, Staphylococcal cassette
chromosome *mec* (SCC*mec*) , pathogenicity island, Phage open
reading frame typing (POT)

ランニングタイトル： TSST-1 保有新規 MRSA クローンの増加

別冊希望部数：30

別冊請求先：順天堂大学大学院感染制御科学

郵便番号113-8421

東京都文京区本郷2-1-1

ページ数：20ページ

図表の数：6

署名 _____ 印

要旨

我が国の市中に広がるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の特徴を明らかにする目的で、2009年2月から2012年9月に順天堂大学附属4病院の皮膚科外来患者の検査材料から分離された methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) 54株の Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) のタイプと Multi Locus Sequence Typing (MLST) を決定した。加えて4種の毒素遺伝子の保有を検討した。

10の染色体タイプ (Clonal Complex) と12のSCC*mec*タイプが存在し、この二つの組み合わせで定義されるMRSAクローンは15種類以上あった。最も多く検出されたのはClonal Complex (CC)5-typeIIa SCC*mec*株 (16株) であった。我が国の院内感染事例から分離される株の多くが毒素性ショック症候群毒素遺伝子 (toxic shock syndrome toxin gene; *tst*) 陽性のCC5-typeIIa SCC*mec*株であるのに比べ、今回の供試菌株中では *tst*陽性のCC5-typeIIa SCC*mec*株はわずか2株で、他は *tst*陰性であった。CC5株以外が38株 (70.4%) あった。その中ではCC8株が12株と多かったが、*tst*陽性CC8-typeIV1 SCC*mec*株9株、Panton-Valentine Leukocidin (PVL) 遺伝子 (*lukS*, *F-PV*) を保有するCC8-typeIVa SCC*mec*株1株など、既知の毒素遺伝子保有株が10株を占めた。続いて多かったのはとびひと関連するクローンで

CC89-typeV SCC*mec*株およびCC89-typeIIb SCC*mec*株では、6株中5株
および5株中2株がb型表皮剥奪性毒素遺伝子 (exofoliative toxin
b; *etb*) を保有していた。CC121-typeV SCC*mec*株は、2株中2株がa型
表皮剥奪性毒素遺伝子 (exofoliative toxin a; *eta*) を保有してい
た。他にCC1-type IVa SCC*mec*株, CC8-typeI SCC*mec*株, CC81-type IVg
SCC*mec*株, CC97-type IVc SCC*mec*株, CC89-type IVa SCC*mec*株,
CC91-type IVa SCC*mec*株, CC45-typeIIIn SCC*mec*株 (サブタイプの決
まらない株), CC59-type IVg SCC*mec*株, 及び本研究で見いだされ
た新規サブタイプのCC8-typeIVm SCC*mec*, CC89-SCC*mec*未同定株が存
在し, 多様なMRSAクローンが出現している状況が本検討で明らか
にされた。

To know the characteristics of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus (MRSA) strains disseminating at the
Japanese community, we have determined types of Staphylococcal
cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) elements, Multi-Locus Sequence
Typing (MLST), and carriage of four exotoxin genes (toxic-shock
syndrome toxin, Panton-Valentine Leukocidine, and exfoliative
toxins a and b) using 54 MRSA strains isolated from outpatients
of clinics of dermatology at the four university hospitals of
Juntendo University. Ten clonal complexes and 12 SCC*mec* types

have been identified. As results, more than 15 MRSA clones that were defined by the combination of genotype and *SCCmec* type, were identified. Among them, Clonal Complex (CC)5-typeIIa *SCCmec* strains were the most major (16 strains). In contrast that CC5-typeIIa *SCCmec* strains known as hospital-associated MRSA clone in Japan carried toxic-shock syndrome toxin gene (*tst*), only 2 of 16 strains carried *tst*. Thirty-eight (70.4 %) of isolates belonged to the clones distinct from CC5-typeIIa *SCCmec* strains. Among them, CC8 strains were major(12 strains), which contained 9 *tst*-positive CC8-typeIVl *SCCmec* clone and CC8-typeIVa *SCCmec* strain carrying Panton Valentine Leukocidin gene (*lukS*, F-PV). Clones related to impetigo were also identified:7 exfoliative toxin b (*etb*)-positive clones, CC89-typeIIa *SCCmec* and CC89-typeV *SCCmec* strains; and 2 exfoliative toxin a (*eta*) -positive CC121-typeV *SCCmec* strains. Other clones were as follows: CC1-typeIVa *SCCmec*, CC8-typeI *SCCmec*, CC81-typeIVg *SCCmec*, CC97-typeIVc *SCCmec*, CC91-typeIVa *SCCmec*, CC59-typeIVg *SCCmec*, CC45-typeIIIn *SCCmec*, CC89-*SCCmec* nontypeable, and CC8-type IVm, novel subtype of type IV *SCCmec*

identified in this study. Our data showed that many novel MRSA clones have emerged at the community.

序文

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は出現以来, 院内感染の原因菌として問題とされてきた. しかし近年ではMRSAは市中感染症から多く分離され, 健康人が保菌していることも報告されるようになった¹⁾. とりわけ2000年代にはいると全世界でその分離率は増大し, 深刻な問題となっている. 市中感染症から分離されるMRSAのうち, 外来患者あるいは入院後48時間以内の入院患者から分離され, かつ各種医療関連の危険因子(人工装置の装着, MRSA感染の履歴, 12ヶ月以内の手術, 入院, 人工透析などの経歴) を持たない株をCommunity-associated MRSA (CA-MRSA)²⁾と呼び, 医療関連施設から分離される Healthcare-associated MRSA(HA-MRSA)と区別されるようになった.

MRSAはメチシリン耐性を担う遺伝因子である staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) がメチリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*; MSSA) 株に挿入されたものである, そしてSCC*mec*には構造の異なる多くの種類があることから³⁾ 現在では, MRSAクローンをSCC*mec*タイプとMSSA

染色体の違いの組み合わせで定義するという方法が全世界で使用されている。MSSA染色体の分類には染色体上の7つのhousekeeping遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子配列の差異(alleles)をコンピューター解析することによって菌株の識別を行うMulti Locus Sequence Typing (MLST) ⁴⁾ が用いられる。

MRSAクローンの決定が世界各地で行われると、それぞれの国に特徴的なCA-MRSAクローンが出現していることが明らかになった。またCC1-typeIV SCC*mec*株、CC8-typeIV SCC*mec*株（米国）、CC30-typeIV SCC*mec*株、CC59-typeV SCC*mec*株（台湾、中国）、CC80-typeIV SCC*mec*株（ヨーロッパ）など海外での特徴的なMRSAクローンの多くはPanton-Valentine Leukocidin(PVL)と呼ばれる強力な白血球溶解毒素産生株であった。

我が国のCA-MRSAについては、とびひ患者由来株の中でMRSAの割合が増大していることがいち早く報告され、また健康な小児や成人からも分離されることが報告されている⁵⁾。また海外のMRSAの日本への持ち込みも報告されている⁶⁾⁷⁾。本研究では我が国の市中に拡がりつつあるMRSAの特徴を明らかにすることを目的として、順天堂医院の皮膚科外来患者由来株のMRSAクローンを決定した。同時に近年院内感染MRSAの解析に用いられているPhage ORF Polymorphism Typing(POT) ⁸⁾ を実施し、POTで検出する 23 遺伝子の保有の有無と

MLSTとの対応を比較した。

材料および方法

1. 供試菌株

順天堂大学医学部附属 4 病院より分与された 2009 年 2 月から 2012 年 9 月に皮膚科外来患者（入院後 48 時間以内を含む）の表皮病巣部及び膿瘍部位（皮下、頸部など）から分離された MRSA54 株：14 株（順天堂医院），17 株（練馬病院），7 株（浦安病院），16 株（静岡病院）を実験に供した。

2. 分子疫学的解析

1) 染色体 DNA の抽出

染色体 DNA は QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, MD, USA) 及びシカジーニクス DNA 抽出試薬（関東化学，東京）を用いた簡便法にて抽出した。

2) SCC*mec* タイプの決定

Kondoらの開発したMultiplex PCRを使用した⁹⁾。TypeIV SCC*mec*のサブタイプの決定に用いたprimer setはTable 1に示す⁹⁾¹⁰⁾。

3) MLST

Enrightらの方法¹¹⁾に従って行い，MLST.netにアクセスしてSequence type (ST)を決定し，さらにeBURSTv3 でClonal complex (CC)及びFounder Group (FG)を決定した。

4) 毒素遺伝子保有の検討

PVL遺伝子 (*lukS, F-PV*), 毒素性ショック症候群毒素遺伝子 (*tst*) 表皮剥奪性毒素遺伝子 (*et*) の有無をPCRにて判定した. 使用した primer setはTable 1¹²⁾¹³⁾に示す.

Table1 挿入

3. TypeIV SCC*mec* の全塩基配列の決定

DNAはQIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, MD, USA)で抽出したものを使用した. Expand High Fidelity PCR System (Roche, IN, USA)のキットを用い, Long-range PCRにて2株 (JCSC8843, JCSC8975)の持つ typeIV SCC*mec*の全領域を増幅し, その塩基配列を primer walkingにて決定した. Long-range PCRに使用した primer 及びその位置は Fig. 1に示す. 決定した塩基配列はインシリコバイオロジー社の imc_ge を用いて解析した.

4. POT法による菌株の比較

シカジーニクス分子疫学解析POTキット (黄色ブドウ球菌用) (関東化学, 東京) を用い添付の説明書に従って 2組のPCRを実施した後, PCR産物を 3% Metaphor agarose (Lonza, ME USA) を用いて 1xTBE bufferにて電気泳動を行った. 2組のPCRにより SCC*mec*上の5つの遺伝子, 黄色ブドウ球菌の *femA*及び他の2つの染色体上のORFに加えて, バクテリオファージに代表される動く遺伝子上の 15の

ORFの検出でき、これらのPCR産物の有無により菌株を比較する⁸⁾。

成績

1. SCC*mec*タイプの決定

最も多かったのはtypeII SCC*mec*株で22株（40%）であり、次いで多かったのはtypeIV SCC*mec*株で21株（39%）であった（Table 2）。その他はtypeV SCC*mec*株は9株、typeI SCC*mec*株は1株で、1株は*mec*遺伝子複合体のクラスは決定できたが、*ccr*遺伝子が検出できなかったためSCC*mec*タイプが決定できなかった。

次にtypeII SCC*mec*及びtypeIV SCC*mec*についてKondoらの方法⁹⁾に基づきJ1領域のサブタイプを調べたところ、typeII SCC*mec*株はIIa（16株）、IIb（5株）、II n（サブタイプの決まらない株、1株）であり、typeIV SCC*mec*株はIVa（7株）、IVc（1株）、IV n（サブタイプの決まらない株、13株）であった。更にtypeIV n SCC*mec*株13株を用いて、typeIV gを検出するprimer¹⁰⁾を使用して調べた結果、IV g株が3株見いだされた。

2. Type IV SCC*mec*の塩基配列の決定

そこで、サブタイプの決まらない10株の中からJCSC8975株とJCSC8843株を選び、これらの株の持つSCC*mec*の全塩基配列を決定した。JCSC8975株のtypeIV SCC*mec*は、2012年に報告されたtypeIV1 SCC*mec*と同じであることが判明した¹⁴⁾。次にtypeIV1 SCC*mec*のサブ

タイプを検出するprimer (table 1)を用いたPCRを実施した結果, 10株中の9株はtypeIV1 SCC*mec*であった.

他の一株, JCSC8843の持つtypeIV SCC*mec*の構造をFig. 1に示す. SCC*mec*_{JCSC8843}のサイズは28.4kbで, *orfX*の下流から*mec*遺伝子複合体, *ccr*遺伝子複合体までの約17kbの領域はこれまでに報告されたtypeIV SCC*mec*とほぼ同じであった. しかし, *ccr*遺伝子複合体の下流からSCC*mec*の右端末端までの領域 (J1領域) は, これまでに報告されたものとは全く異なっていたので SCC*mec*_{JCSC8843}をtypeIVm SCC*mec*と命名した. J1領域には9個のORFが存在した. 特徴的なORFとしてLPXTGモチーフを持つORF (3288bp) が存在した. **Type IV1SCC*mec***上にも同様な蛋白が存在する. これらのORFのC末端を代表的な表層蛋白と比較したところ (Figure 2), 共通してC末端側に, LPXTGモチーフ, 疎水性アミノ酸領域, 陽性に荷電したアミノ酸が存在したので, これらのORFは*Staphylococcus aureus* surface protein (*sas*)の一種であると判断された¹⁵⁾¹⁶⁾. そして, typeIV1 SCC*mec*上に存在する*sas*を*sasL*, typeIVm SCC*mec*上に存在する*sas*を*sasM*と命名することを提案する.

3. 皮膚科外来患者由来MRSAクローンの特徴

54株のMLSTをすべて決定した (Table 3). 現在MLSTのWebsiteでは, 旧来のClonal complex (CC) を新しく包括するグループ分けとして

Founder group (FG) を用いているので、それに従ったが、特にFG1に属する場合は、従来のCCを使用したほうがより明確にクローンの違いを表わすことができると考え、両者を併記するとともに、MRSAクローン記載としてはCCを用いた。既知のSTに属さず、今回新たにST番号を登録した株が7株存在したが、これらはFG10（2株）、FG4（1株）、FG1（3株）、FG7（1株）とFG3以外のすべてのグループに分布していた。54株の外来患者由来株は5つのFG、10のCCに属した。MRSAクローンを保持するSCC*mec*のタイプと染色体タイプをCCで表示した場合、FG1に属するCC1-typeIVa SCC*mec*, CC5-typeIIa SCC*mec*, CC8-typeI SCC*mec*, CC8-typeIVa SCC*mec*, CC8-typeIV1 SCC*mec*, CC8-typeIVm SCC*mec*, CC81-typeIVg SCC*mec*, CC97-typeIVsSCC*mec*, FG10に属するCC89-typeIIb SCC*mec*, CC89-typeIVaSCC*mec*, CC89-typeV SCC*mec*, CC89-untypabel SCC*mec*, CC91-typeIVa SCC*mec*を始め、CC45-typeIIn SCC*mec* (FG 3, CC121-typeV SCC*mec* (FG4), CC59-typeIVg SCC*mec* (FG7))と16種類のMRSAクローンが存在していた。Table3に示すように、CC5-typeIIa SCC*mec*株が最も多く、CC8-typeIV1 SCC*mec*株がこれに続いた。毒素遺伝子の保有をPCRにて検討した結果は、*tst*陽性株は12株、*lukS*, *F*-PV陽性株は1株、*eta*陽性株は2株、*etb*陽性株は7株であった。*tst*は、CC5-typeIIa SCC*mec*株（2/16）、CC98-typeIVc SCC*mec*株（1）、CC8-typeIV1 SCC*mec*株（9/9）に保持されていた。*lukS*, *F*-PV

はCC8-typeIVa SCC*mec*株に保持されていた.米国で蔓延するUSA300の可能性を検討するためarginine catabolic mobile elementの存在をPCRで調べたが,陰性であった.*eta*はCC121-typeV SCC*mec*株に保持され,*etb*はCC89-typeIIb SCC*mec*株,CC89-typeV SCC*mec*株に保持されていた.

Table 2挿入

4. POT法の検討

POT法を用いて54株を解析した. POT法では2組のmultiplex PCRを実施し黄色ブドウ球菌のマーカールとしての*femA*遺伝子の検出に加え(1) SCC*mec*上の5つの遺伝子(*mecA*, type 2 *ccrA*, IS1272のトランスポゼース, *mecI*, type II SCC*mec*のJ1領域に存在する*kdpC*), (2) N315株及びMW2株の染色体上のORF(SA2259及びMW0919), (3) 染色体上に挿入されたトランスポゾンTn554, バクテリオファージなどの動く遺伝子上の15のORFの保持を検出できる. Table 3に SCC*mec*上の5つの遺伝子及び染色体上の2つのORFの検出結果及びこれらの結果を基にPOT値として数値化された結果を示す (Table 3) .

先に決定したMRSAクローンと対比した場合, CC5-typeIIa SCC*mec*株では, *mecA*, *mecI*, classA type2 *ccr*遺伝子の保持及びtypeIIa SCC*mec*の特徴的ORFである*kdpC*が検出され, かつN315株の染色体上のORFを

保持していることが確認された。しかしPOT 1 値が106を示す株 (*mecA*, IS1272, type 2 *ccr*, MW0919陽性) にはCC1-typeIVa SCC*mec*, CC8に属し typeIVa, IV1, IVnew SCC*mec*を持つ株, CC81-typeIVg SCC*mec*, CC97-typeIVc SCC*mec*株が含まれた。またPOT 1 値が104を示す株 (*mecA*, IS1272, type 2 *ccr*陽性) にはCC59-typeIVg SCC*mec*, CC89-IVa SCC*mec*, CC91-typeIVa SCC*mec*が含まれた。CC8-typeIV SCC*mec*の場合は*mecA*とIS1272のみが検出され, CC121-typeV SCC*mec*及びCC89-typeV SCC*mec*の場合は検出されたのは*mecA*のみであった。

Table3挿入

考察

これまでの我が国の病院分離株ではST5-typeIIa SCC*mec*株が主要であるとされている。今回の解析では, 検査室から分与された株は63株であった。この中には後に入院患者由来株と判明したため集計から除外された株が9株存在した。この9株中では ST5株が5株と大半を占めており, 依然としてST5-typeIIa SCC*mec*クローンが病院感染の起原菌として主要な位置を占めていると判断された。今回の解析においてわずか54株中に16種類のクローンが存在した。CC5-typeIIa SCC*mec*クローンのうちでもST5に属する株は9株で, また他の7株はそれ以外のSTであった。この点を考慮にいたした場合, 病院に主に蔓延し

ているST5-typeIIa SCC*mec*以外のクローンは54株中45株（83％）であった．今回分離されたクローンは*eta*, *etb*保有株はとびひ由来株として報告されたクローンと同じであった．今回の検討した株の中には海外のMRSAの持ち込みと推定された株は存在しなかった．しかし,我々の以前の検討では順天堂病院の皮膚科外来患者由来株より米国で蔓延しているUSA300と判定された株が1株,台湾で蔓延しているST59と判定された株が分離された．USA300は我が国では2008年に最初に報告されているが,その後,報告例は増加し爆発的ではないが徐々にその分離株が増加していると思われる⁶⁾⁷⁾．

毒素性ショック症候群毒素 *toxic shock syndrome toxin*(TSST-1)

は1981年に米国で初めて報告された毒素性ショック症候群*toxic shock syndrome*の原因毒素である．*tst*は黄色ブドウ球菌染色体上の*pathogenicity island* (PI) 上にコードされている．最初に報告されたRN4282株のもつSaPIは*integrase*の相同性からゲノム上の3時の位置に挿入されていると推定される．これに対して我が国のtypeII SCC*mec*株の多くがもつ*tst*は10時の位置に存在する別の*integrase*を持つPI (vSa4) 上にコードされている．ST8-type IV 1株の多くは*tst*遺伝子を保持していたが,これはIwaoらにより既に報告されているようにSaPImと同様に3時の位置に挿入されていると推定される¹⁴⁾．本研究で見出されたもう1株の*tst*保有株であるCC97株の場合も,同

じく3時の位置に挿入されている別のPIを保持していると思われる (Uehara, 未発表データ) . 今回検討した菌株は外来患者あるいは入院後48時間以内の入院患者から分離された株ではあるが, 各種医療関連の危険因子に関する情報は得ることができなかつたので community-onset MRSA に分類される可能性は否定できず community-onset MRSA と community-associated MRSA の混合したものとみなすのが妥当であると考えているが, 今回のデータは, *tst* をコードする新しいPIが出現し, 市中に広まっていることを示していると考えられた. また typeIVl SCC*mec*上に存在するはLPXTGモチーフをもつORF (5046bp) 及び本研究で明らかにした typeIVm SCC*mec*上の LPXTGモチーフをもつORF (*sasM*, 3288bp) など, *Sas*タンパク質を持つ TypeIVSCC*mec*を持つ株が10株存在したのも一つの特徴であった.

黄色ブドウ球菌は宿主組織との結合や宿主の免疫を回避するために働く各種の表層タンパクを産生することで知られる. 免疫グロブリンIgGと結合するprotein A, フィブリノーゲン結合蛋白などが代表的なものとして古くから知られているが, これらのタンパク質は共通してC末端側に (1) sortaseの働きにより切断されるLPXTGモチーフ, (2) 疎水性アミノ酸領域, (3) 陽性に荷電したアミノ酸を持っている¹⁵⁾¹⁶⁾. 報告されたゲノム配列をコンピューター解析した結果, 先に報告された11のLPXTGモチーフをもつタンパク質に加えて

更に10の新規タンパク質が見出された¹⁶⁾¹⁷⁾.これらのタンパク質は先の報告^{15~17)}に基づき *Staphylococcus aureus* surface (Sas) proteinと命名されている.SCC*mec*上で見出された最初のsas蛋白は typeI SCC*mec*のコードするplasmin sensitive protein (*pls*)である.今回検討したtypeIV1 SCC*mec*上のORF 及び新規typeIV SCC*mec*上のORFもsas蛋白に分類するのが妥当と考えた.これらのORFの機能はまだ特定されていないが,何らかの宿主への定着,宿主免疫からの回避に働いていることが推測される.

Figure2挿入

POT法は2組のmultiplex PCRを実施し,生成されたDNA断片から菌株の特徴を推定する方法でSuzuki等により開発された方法⁸⁾を基に,改良されたものが市販されている.菌株から簡便法で抽出したDNAを用いて菌株間の相同性を簡便に比較する事ができるので,院内感染の解明などに役立つとされている.しかし,特定のORFを検出してMRSAクローンを推定するのは,原理的にも非常に難しいと推定される.今回の我々の検討では,設計されたprimerから予想された通りCC5-typeIIa SCC*mec*株の検出は確実にでき,菌株相互の比較もできることが示された.またtypeIV SCC*mec*株の同定もできる.しかし,複数のMRSAクローンが同じPOT値を示す事から他のゲノタイプのMRSA,他のSCC*mec*タイプ株は特定のクローンを同定できるという段

階には至っていないと判断された。Nakaoらは入院小児患者の糞便分離株と鼻腔由来株をPOT法にて比較し、同一の菌株が鼻腔及び糞便から分離されたことを推定している¹⁸⁾。POT値からMRSAクローンを推定する作業は、MRSAクローンを推定する原理に基づいたものではないため、POT値からMRSAクローンを推定することせず、簡便法として利用し、我が国の病院に蔓延する代表的なCC5-typeIIa SCC*mec*株の同定あるいはそれとの識別、及び増幅されたDNA断片のパターンの比較により菌株間の相同性を見ることに留めるべきであると考え

謝辞

菌株の収集に御協力いただいた順天堂大学附属静岡病院検査部 山田邦光氏、順天堂大学附属浦安病院検査部 中澤武司氏、順天堂大学附属練馬病院検査部 立花勇一氏に感謝申し上げます。また研究を御指導、御協力頂いた順天堂大学感染制御科学 韓笑博士、張萌博士、呂宇傑氏に感謝申し上げます。本研究は文部科学省基盤研究(C19590456)及び私立大学戦略的基盤形成支援事業(2012-2017)の支援を受けた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1) Salgado CD, Farr BM, Calfee DP:Community-acquired

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis 2003;36:131-139.
- 2) Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, et al.: Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007;298: 1763-1771.
- 3) Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2009;53: 4961-4967.
- 4) Enright MC, D.A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, and B. G. Spratt: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci 2002;99:7687-7692.
- 5) Ken Hisata, Kyoko Kuwahara-Arai, Munetaka Yamamoto, Teruyo Ito, Yasuo Nakatomi, et al.: Dissemination of Methicillin-Resistant Staphylococci among Healthy Japanese Children . J Clin Microbiol 2005;43:3364-3372
- 6) Shibuya Y, Hara M, Higuchi W, Takano T, Iwao Y, et al.: Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. J Infect Chemother 2008;14: 439-441.

- 7) Higashiyama M, Ito T, Han X, Ono K, Minamimura K, et al.: Epidural abscess caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Japan. J Infect Chemother 2010;16: 345-349.
- 8) Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, et al.: Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. J Appl Microbiol 2006;101: 938-947.
- 9) Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, et al.: Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007;51: 264-274.
- 10) Kwon, NH, Park, KT, Moon, JS, Jung, WK, Kim, SH, Kim, JM, et al.: Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. J Antimicrob Chemother 2005;56 : 624-632

- 11) Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG : Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000;38: 1008-1015.
- 12) Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K: Predominance of clones carrying Pantone-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. J Clin Microbiol 2006;44:4515-27.
- 13) Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, et al. : Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B Infect Immun 2002;70:5835-45.
- 14) Yasuhisa Iwao · Rumiko Ishii · Yusuke Tomita · Yasuhiro Shibuya · Tomomi Takano, et al. : The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics. J Infect Chemother 2012;18:228-240
- 15) Iwao Y, Takano T, Higuchi W, Yamamoto T : A new staphylococcal cassette chromosome *mec* IV encoding a novel cell-wall-anchored

surface protein in a major ST8 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Japan. J Infect Chemother 2012;18: 96-104.

16) Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O : Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 2001;40: 1049-1057.

17) Roche FM, Massey R, Peacock SJ, Day NP, Visai L, et al. : Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. Microbiology 2003;149: 643-654.

18) Akihiro Nakao, Teruyo Ito, Xiao Han, Yu Jie Lu, Ken Hisata, et al. : Intestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal MRSA carriers hospitalized in the neonatal intensive care unit. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2014, **3**:14

Fig. 1. Structure of two type IV SCCmec elements.

Structures of type IV SCCmec of a new subtype and type IV1 SCCmec are illustrated based on the nucleotide sequences deposited in the DDBJ/EMBL/Genbank databases under the accession nos. AB872254 and AB872255 respectively. The black triangles (▲) indicated the positions of direct repeat sequences located at the both ends of the elements. The arrows indicated locations of the primer' s pairs used for amplifying DNA fragments used for nucleotide sequencing. Nucleotide sequences of primers are as follows:

cR2 (5' -AAACGACATGAAAATCACCAT-3'),
mA1 (5' -TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3'), mA2 (5' -AACGTTGTAACCCCAAGA-3'),
pSJ21-3 (5' -TATCTCTTAAGGCGTTGACAACAT-3'),
com13 (5' -AGCTGTATCAGTCGCTGGTAA-3'), L02-N
(5' -CAGTCGCATCAAATGTCTCTAATG-3').

ORFs encoded by SCCmecJCSC8975 (21 ORFs) and SCCmecJCSC8843 (28 ORFs) are indicated by thick arrows.

Fig. 2

Comparison of C-terminus amino acids of LPXTG-motif proteins.

Amino acid sequences of C-terminus of two *Staphylococcus aureus* surface proteins (Sas) are compared to 3 representative LPXTG-motif proteins. LPXTG-motif (five amino acids sequence), which are composed of L(Leucine), P(Proline), X (Aspartic acid or Glutamic acid), T(Threonine), and G(Glycine), are marked with underlines. Three representative LPXTG motif proteins are *S. aureus* protein A (Spa), fibronectin-binding protein (FbpA), plasmin sensitive protein (Pls). All of them are cell-wall anchor proteins. Spa bind immunoglobulins through the Fc part of several kinds of IgG antibodies. FbpA influences host tissue adherence by binding to host fibronectin. Pls, which is associated with poor bacterial adherence to fibronectin and immunoglobulin G, are suggested to be a virulence factor

for septic arthritis and sepsis.

Asterisks indicate common sequences between five proteins. H(Histidine), K(Lysine), and R(Arginine) are positively-charged residues; D(Aspartic) and E(Glutamine) are negatively-charged residues.

Table 2 Characteristics of 54 MRSA clones

Founder groups	Clonal complexes	SCC <i>mec</i> types	
FG1	CC1 (n=2)	IVa(n=2)	
	CC5 (n=16)	IIa(n=16)	
	CC8 (n=12)	I(n=1)	
		IVa(n=1)	
		IVl(n=9)	
		IVm(n=1)	
		IVg(n=2)	
		IVc(n=1)	
	FG3	CC45 (n=1)	IIIn(n=1)
	FG4	CC121 (n=2)	V(n=2)
FG7	CC59 (n=1)	IVg(n=1)	
FG10	CC89 (n=16)	IIb(n=5)	
		IVa(n=4)	
		V(n=6)	
		ND*(n=1)	
		IVa(n=1)	
	CC91 (n=1)	IVa(n=1)	

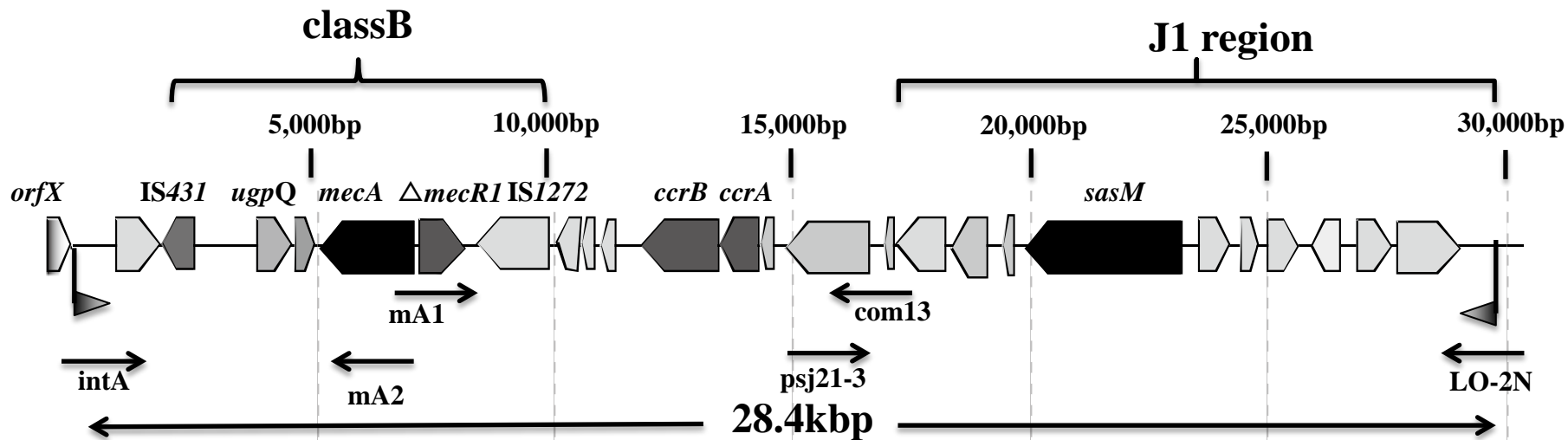
1) Abbreviations: *tst*, toxic shock syndrome toxin; *lukS*, *F-PV*; genes for S-a: *etb*, exfoliative toxin b.

*ND :Not determined

carriage of exotoxin genes ¹⁾				
<i>tst</i>	<i>lukS,F-PV</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	
-	-	-	-	-
+ (2/16)	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	+ (1/1)	-	-	-
+ (9/9)	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
+ (1/1)	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	+ (2/2)	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	+ (2/5)	-
-	-	-	-	-
-	-	-	+ (5/6)	-
-	-	-	-	-

fragment and F-fragment for Panton Valentine Leucokidin; *eta* , exfoliative toxin

SCCmecJCSC8843



SCCmecJCSC8975

