

黄色ブドウ球菌の *spa* 遺伝子解析ならびに薬剤感受性の検討

—メチシリン耐性株での特徴と型別分類への応用について—

前澤 浩美<sup>1)</sup>・吉沢 幸夫<sup>2)</sup>・柴 孝也<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 東京慈恵会医科大学内科学講座第 2 科<sup>2)</sup> 同 アイソトープセンター

(平成 8 年 2 月 9 日受付・平成 8 年 3 月 21 日受理)

黄色ブドウ球菌のなかでも特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) による感染症は、高齢者や immunocompromised host などの症例に多発することから予後不良なことが多く、感染症の原因菌の一つとして、重要視されている。この黄色ブドウ球菌の持つ細胞壁構造因子 protein A は、メチシリン耐性への関連においていくつかの報告がある。1973 年に Winblad<sup>1)</sup> らが多くの MRSA では細胞外 protein A に比し細胞内 protein A の減少が著しいと説いており、1979 年には Cohen<sup>2)</sup> らも A 676 株を用いてメチシリン耐性をもつ protein A の含有量が増加すると発表しており、*mecA* 遺伝子 (*mec*) と protein A 遺伝子 (*spa*) の関わりについては古くから論議が重ねられている。そこで著者らは、1993 年 7 月から 1994 年 6 月までの 1 年間の東京慈恵会医科大学附属病院第二内科における外来通院患者 19 例と入院患者 82 例の計 101 例から臨床分離された黄色ブドウ球菌を対象に、polymerase chain reaction (PCR) 法にてメチシリン耐性の有無、protein A・IgG 結合ドメイン数 (5,4,3,2,0) の分類 (PA 分類) を行い、この結果より *mecA* 陽性 (+) と陰性 (-) の各々の株における protein A・IgG 結合ドメイン数の分布を検討した。PA 5,4,3 を有した株は *mec* (+) の 40 株では、各々 5 株, 34 株, 1 株, *mec* (-) の 61 株では各々 38 株, 21 株, 2 株認められた。PA 2,0 の株はいずれにも認められなかった。これらの結果から、*mec* (+) の株には、PA 4 が有意に高率に認められ ( $p < 0.001, X^2 = 22.92$ )、*mec* と *spa* の関連性を示唆する成績が得られた。次にこの 101 株で、コアグラマーゼ型、ファージ型別分類、感受性検査を行った。その内訳は、コアグラマーゼ型分類では、II 型が 46 株 (45.5%) と高率に認められた。さらにこの中でメチシリン耐性を有し、かつ PA 4 の株は 30 株で、ファージ型別の内訳では、NT (判定不能) が 16 株 (53.3%) 認められたが、残りは、I, I M, I II III, III, III M, III V, V に、各 1~5 株と多様にわたっていた。薬剤感受性の検討では、*mec* (-) の株で 11 種、*mec* (+) の株で 10 種のパターンに分類することができた。以上の結果を前記の PA 分類と共に総合的に評価し、この 101 株を 54 種に分類し得た。また当科における臨床分離の MRSA は、PA 4 の株の出現頻度が高いことが判明した。今回明らかにしたドメイン数分類は、感受性検査だけでは分別不可能な株をさらに細分化する方法として利用することにより、黄色ブドウ球菌感染症の院内感染対策の一手段として有用であると考えられた。

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, *mec A*, *spa*, protein A・IgG 結合ドメイン数

院内感染の主要原因菌である黄色ブドウ球菌のなかでもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、近年、特に注目されている。

今日までの報告から、黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性と protein A の産生性については、相関関係があるといわれている<sup>1,2)</sup>。しかし遺伝子レベルで同時解析された報告はなく、protein A の各 IgG 結合ドメイン数と *mecA* の出現率との関係については、まだ明らかにはなっていない。最近、protein A が、細菌細胞壁に共有結合する菌体表面蛋白質であ

ることから、protein A の IgG 結合ドメイン数 (PA) 分類について桜田らの報告がある<sup>3)</sup>。

現在、MRSA の臨床株での型別分類では、ファージ型、コアグラマーゼ型、そして薬剤感受性検査による分類が一般的に行われているが<sup>4,5)</sup>、院内感染の疫学的研究のためにはさらに詳細な分類を必要とする。

そこで著者らは、1993 年 7 月から 1994 年 6 月までの当科臨床分離の 101 株について PA 分類を行い、その結果を *mec* の有無との関係について比較検討した。polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた黄色ブドウ球菌のメチシ

リン耐性遺伝子 (*mecA*) の有無の判別を、岡本ら<sup>6)</sup>の方法を用いて検討した。

さらに、さきに述べた PA 分類に加え、ファージ型、コアグラゼ型、そして抗菌薬感受性分類を同時に行い、多角的な疫学的検討もあわせて行ったので、これらの成績について報告する。

## I. 対象ならびに方法

### 1. 対象

対象は 1993 年 7 月から 1994 年 6 月までの 1 年間に、東京慈恵会医科大学第二内科の外来に通院中の 19 例ならびに入院中の 82 例である。男性 69 例 (61.2 ± 15.9 歳)、女性 32 例 (55.5 ± 16.3 歳) の計 101 例であって、感染症の内訳は、呼吸器感染症 55 例、CAPD 出口部感染症 14 例、尿路感染症 9 例、カテーテル感染症 8 例、消化器感染症 3 例、皮膚感染症 2 例、敗血症 2 例、腹膜炎 1 例であり、さらに鼻腔保菌者 7 例を含む。

### 2. 方法

今回の研究には、黄色ブドウ球菌感染症または、他に基礎疾患を持つ MRSA 保菌者からの検出菌を用い、retrospective に行った。

検体は、微生物検査必携 (厚生省監修) に記載された検査法<sup>7-9)</sup>によって分離培養した。すなわち、検体を血液寒天培地にて 37°C で一晚培養し、生じたコロニー 10 個を 0.9 % NaCl 300  $\mu$ l に懸濁し、6,000 rpm で 2 分間遠心した後、その沈殿にリゾスタフィン溶液 270  $\mu$ l (0.5 M シクロース, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), リゾスタフィン 10  $\mu$ g/ml) を加えた。(37°C 30 分で処理後、10 % SDS 30  $\mu$ l, 10 mg/ml のプロテナーゼ K を 3  $\mu$ l 加え、60°C で 60 min 処理し、フェノール抽出法にて DNA を抽出して *mecA* の有無、さらに PA 分類を PCR 法にて解析した。なお、単離培養結果との一致も確認した。

また分離培養されたすべての黄色ブドウ球菌はコアグラゼ産生用培地で培養し、ブドウ球菌コアグラゼ型別を判定した。brain heart infusion (BHI) にて培養したものをファージ型別判定に用いた。さらに各株より抽出された DNA の溶解液 10  $\mu$ l を PCR mixture 40  $\mu$ l [滅菌蒸留水 24.75  $\mu$ l, 10 $\times$  Reaction Buffer 5  $\mu$ l (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 0.01 % gelatin), 各々 5  $\mu$ l の dNTP Mixture (各 2.5 mM), 2.5  $\mu$ l (1 pmol/ $\mu$ l) の各プライマー, 0.25  $\mu$ l (5 unit/ $\mu$ l) の Taq Polymelase] に加え、PCR を Perkin Elmer DNA Thermal Cycler PJ 2000 により行った<sup>10)</sup>。プライマーは Applied Biosystems model 392 PCR-MATE DNA synthesizer により作成した。

#### (1) *mec* の検出法

岡本ら (1992) の方法<sup>6)</sup>に従い、primer # 1: 5'-AGA TTG GGA TCA TAG CGT CC-3' を、Song ら<sup>11)</sup>

の方法に従い primer # 2: 5'-GAA GGT ATC ATC TTG TAC CC-3' を作成し PCR に用いた。PCR は denaturation 94°C 1 min, annealing 55°C 2 min, extension 77°C 3 min 30 サイクルで行った。得られた増幅産物を 2 % アガロースゲル, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Trisacetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) にて 50 V で 1 時間電気泳動した。その結果 258 bp にバンドを検出したものを *mec* (+) とした。

#### (2) protein A · IgG 結合ドメイン数の検出法

桜田ら (1994) の方法<sup>9)</sup>により Primer # 3: 5'-CAC CTG CTG CAA ATG CTG CG-3', primer # 4: 5'-GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC-3' を作成し PCR に用いた。PCR は denaturation 94°C 1 min, annealing 55°C 1 min, extension 77°C 3 min 30 サイクルで行い、得られた増幅産物を 2 % アガロースゲル, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いて 50 V で 1 時間電気泳動した。

#### (3) 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別

分離培養された黄色ブドウ球菌は nutrient agar (nutrient 0.8 %, NaCl 0.5 %, agar powder 1.5 %, 4 mM CaCl<sub>2</sub>) にて 1 晩培養後、コロニー 1 個をコアグラゼ産生用培地 (BHI 37 g/l 液体培地) に接種し、好氣的条件下 37°C に 1 晩静置培養した。その後 3,000 rpm, 30 分遠心分離し、上清を試験用抗原液とした。1 検体につき小試験管を 9 本用意し、すべての試験管に試験用抗原液 0.1 ml をいれ、試験管の第 1 管に I 型免疫血清、第 2 管に II 型免疫血清、以下同様に III 型から VIII 型までの免疫血清を 0.1 ml ずつ加え、第 9 試験管には対象として希釈正常ウサギ血清 (デンカ生研、ブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清) を同様に加え、ミキサーで十分攪拌した。37°C で 1 時間中和反応を行った後、すべての試験管に基質として希釈正常ウサギ血漿を 0.2 ml ずつ加え、ミキサーで攪拌後 37°C で反応させた。判定は 1 時間後に行った。型別が確定しない場合にはさらに反応時間を 2 時間、4 時間、24 時間に延長して判定した<sup>12-15)</sup>。

#### (4) 黄色ブドウ球菌のファージ型別

分離培養された黄色ブドウ球菌は、nutrient agar にて一晚培養後、コロニー 1 個を nutrient broth (UNIPATH LTD, ENGLAND) 液に接種し、好氣的条件下 37°C で  $1 \times 10^7$ /ml になるよう静置培養して試験用菌液とした。

試験用菌液 1 ml を培地表面を乾燥させた nutrient agar (Nutrient broth 1.3 %, agar powder 1.5 %, 4 mM CaCl<sub>2</sub>) に広げ、吸収されない菌液を取り除き自然乾燥後、23 種の型別ファージ液 (群馬大学医学部薬剤耐性実験施設より分与) (1 $\times$ RTD, 100 $\times$ RTD に調整済み) を接種した。30°C で一晚培養後、溶菌の有無を

Table 1. The international typing phage set in current use consists of the following 23 phages

Lytic group I	29	52	52A	79	80
Lytic group II	3A	3C	55	71	
Lytic group III	6	42E	47	53	54
	75	77	83A	84	85
Lytic group V	94	96			
Miscellaneous	81	95			

Staphylococcus Reference Laboratory, Laboratory of Hospital Infection, Central Public Health Laboratory.

判定し、ファージ型を決定した (Table 1)<sup>10)</sup>。

## II. 結 果

### 1. PCR 法によるメチシリン耐性の有無の確認と PA 分類

PCR にて 258 bp に単一のバンドが検出された *mecA* (+) は 40 株, 検出されなかった *mecA* (-) は 61 株であった。(Fig. 1)。

また PCR にて, PA 5 の株は 910 bp に単一のバンドを検出した。同様に PA 4 は 740 bp, PA 3 は 570 bp に単一のバンドを検出した。なお今回の検討では, PA 2,0 の株は認めなかった (Fig. 2)。

*mecA* (+) の 40 株のうち, PA 5 は 5 株, PA 4 は 34 株, PA 3 は 1 株であった。一方, *mecA* (-) の 61 株のうち, PA 5 は 38 株, PA 4 は 21 株, PA 3 は 2 株であり, *mecA* (-) の株に比して, *mecA* (+) の株では PA 4 の株が有意に高率に認められた ( $p < 0.001$ ,  $X^2 = 22.92$ ) (Table 2)。

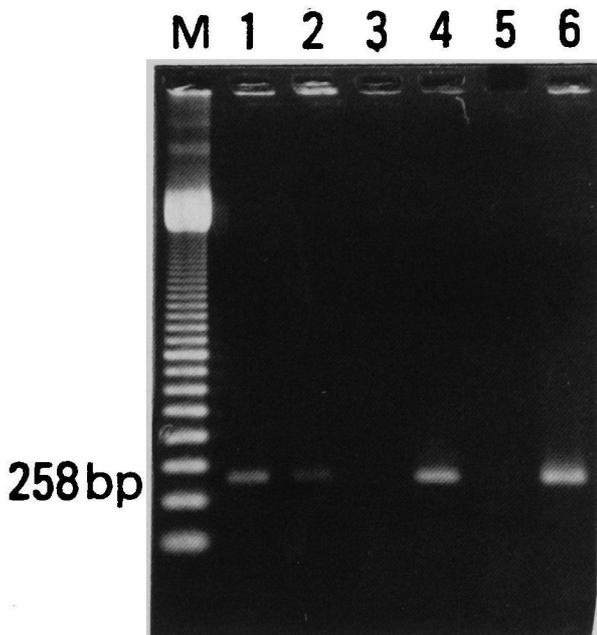


Fig. 1. Amplified DNA from *Staphylococcus aureus* possessing the *mecA* gene (lanes 1, 2, 4 and 6) and not *mecA* possessing gene (lanes 3 and 5). The *mecA*-gene-positive strains produced one fragment of 258 base pairs. Lane M contains a 100-base-pair ladder as a size marker.

Table 2. Relationship between methicillin-resistance and type of IgG-binding domain in protein A

		Protein A type				
		0	2	3	4	5
Inpatients	<i>mecA</i> (+)	0	0	1	30 <sup>a</sup>	4
	<i>mecA</i> (-)	0	0	2	17	28
Outpatients	<i>mecA</i> (+)	0	0	0	4 <sup>b</sup>	1
	<i>mecA</i> (-)	0	0	0	4	10

a:  $p < 0.001$   $X^2 = 22.92$  vs Protein A Type 5 and 3 in all patients

b:  $p < 0.001$   $X^2 = 18.15$  vs Protein A Type 5 and 3 in the inpatients

次に, この 101 例を外来通院症例由来の株と入院症例由来の株とで比較検討区別してみると, 外来 19 例では, *mecA* を有した 5 株のうち, PA 5 を有した株は 1 株, PA 4 は 4 株であった。一方, *mecA* (-) の 14 株のうち, PA 5 は 10 株, PA 4 は 4 株であって, 外来通院症例では *mecA* (+) のなかでの PA 4 の株の出現率が, *mecA* (-) のなかでの PA 4 の株の出現率に比して高い傾向を示した (Table 2)。入院中の 82 例では *mecA* (+) の 35 株のうち, PA 数 5 の株は 4 株, PA 4 は 30 株, PA 3 個 1 株であった。一方, *mecA* (-) の 47 株では, PA 5 は 28 株, PA 4 は 17 株, PA 3 は 2 株認められ, 入院症例においても, *mecA* (-) の株に比べて, *mecA* (+) の株では PA 4 の出現率が有意に高かった ( $p < 0.001$ ,  $X^2 = 18.15$ )。 (Table 2)。したがって *mecA* (+) 株における PA 4 の出現率に関して

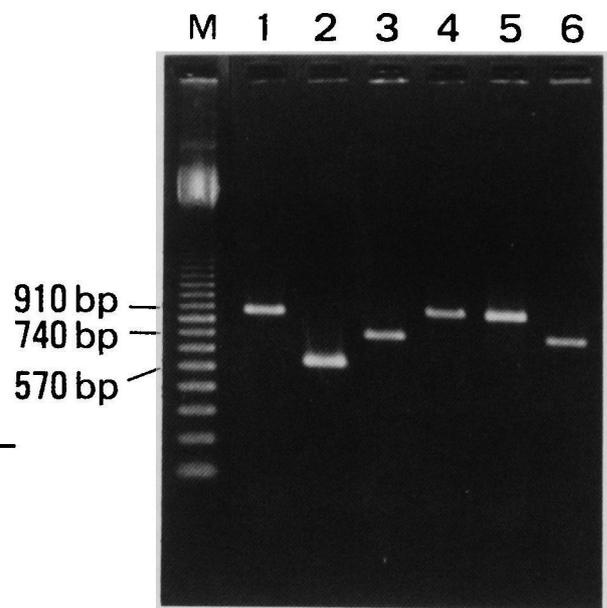


Fig. 2. Numbers of IgG-binding domains estimated from the sizes of the PCR products: the 910 (lanes 1, 4 and 5), 740 (lanes 3, 6) and 570 (lane 2) base pairs correspond to 5, 4 and 3 domains respectively. Lane M contains a 100-base-pair ladder as a size marker.

は、入院症例と外来症例との間に差異を認めなかった。

## 2. コアグラゼ型, ファージ型別分類, 感受性検査

入院中の症例より分離された 82 株の黄色ブドウ球菌株のコアグラゼ型は II 型が 40 株 (48.8%) と高率に認められた (Table 3)。さらにこの中で *mecA* (+) かつ PA 4 の株は入院例全体の 27 株 (32.9%) に認められた (Table 4)。この 27 株のファージ型別では, NT (判定不能) が 14 株と約半数を占めた。

Table 3. Coagulase type and phage type of *Staphylococcus aureus* from the 82 of inpatients and 19 outpatients

No. of strains (inpatients/outpatients)	
Coagulase type	Phage type
I 4 (2/2)	I 9 (9/0)
II 46 (40/6)	I M 4 (3/1)
III 8 (6/2)	I II III 2 (2/0)
IV 7 (5/2)	I III 4 (3/1)
V 8 (8/0)	I III M 5 (5/0)
VI 3 (1/2)	II 11 (10/1)
VII 12 (9/3)	II III 1 (0/1)
VIII 5 (5/0)	III 15 (13/2)
NT 8 (6/2)	III M 3 (3/0)
	III V 1 (1/0)
	V 3 (1/2)
	M 3 (2/1)
	NT 40 (30/10)

NT: untypable

外来症例から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型は, II 型が 19 株中 6 株 (31.6%) であった (Table 3)。同様に *mecA* (+) かつ PA 4 の株は外来全体で 3 株 (15.8%) であり, うちファージ型は NT 型 2 株, V 型 1 株であった (Table 4)。

さらに入院中の症例から分離された黄色ブドウ球菌株のコアグラゼ型とファージ型について入院時期別に 2 カ月間隔で検討した。各種コアグラゼ型とファージ型の出現数は年間を通じて均等に分布し, 特定時期に偏った結果は得られなかった (Table 5)。

また, 抗菌薬感受性による分類を同時に行うと, *mecA* (-) の株では 11 通り, *mecA* (+) の株では 10 通りに分けられた (Tables 6, 7)。

Table 4. Coagulase type and phage type of the methicillin-resistant and Protein-A type-4 strains

No. of strains (inpatients/outpatients)	
Coagulase type	Phage type of coagulase-II strains
I 1 (0/1)	I 3 (3/0)
II 30 (27/3)	I M 1 (1/0)
III 0	I II III 1 (1/0)
IV 1 (1/0)	III 5 (5/0)
V 0	III M 2 (2/0)
VI 0	III V 1 (1/0)
VII 0	V 1 (0/1)
VIII 0	NT 16 (14/2)

NT: untypable

Table 5. Coagulase type and phage type of the 82 strains isolated from inpatients between July 1993 to June 1994

(Year) (Month)	1993		1994			
	7~8	9~10	11~12	1~2	3~4	5~6
<b>Coagulase type</b>						
I (2)	1	0	0	0	1	0
II (40)	8	6	7	10	2	7
III (6)	0	1	2	2	1	0
IV (5)	1	1	0	0	3	0
V (8)	0	2	2	3	1	0
VI (1)	0	0	1	0	0	0
VII (9)	0	0	2	1	6	0
VIII (5)	0	1	1	2	1	0
NT (6)	1	2	1	1	1	0
<b>Phage type</b>						
I (9)	2	1	0	3	3	0
IM (3)	0	1	2	0	0	0
I II III (2)	1	1	0	0	0	0
I III (3)	1	0	1	0	1	0
I III M (5)	0	0	1	2	2	0
II (10)	0	2	3	4	1	0
III (13)	3	2	1	2	4	1
III M (3)	0	1	1	1	0	0
III V (1)	0	0	0	0	0	1
V (1)	0	0	0	1	0	0
M (2)	0	0	0	1	1	0
NT (30)	4	5	7	5	4	5

NT: untypable

Table 6. Susceptibility type of *mecA* (-) stocks in this study

Number	Protein-A type	Coagulase type	Phage type	Susceptibility type	Susceptibility type	ABPC	MCIPC	CEZ	CMZ	GM	EM	MINO	FOM	IPM	OFLX	CLDM	VCM	ABK
1					1	-	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	3+	3+
2	3	II	II	6	2	-	-	-	-	3+	-	3+	-	-	-	3+	3+	3+
1	4	VII	I	3	3	-	-	-	-	3+	-	1+	-	-	-	-	3+	3+
5	4	V	II	5	4	-	3+	3+	3+	3+	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	4	—	NT	6	5	-	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
2	4	—	II	6	6	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
3	4	VII	NT	6	7	-	-	-	-	-	-	3+	-	-	-	3+	3+	3+
2	4	IV	NT	6	8	-	3+	3+	3+	3+	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	4	VIII	II	6	9	-	3+	3+	3+	-	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	4	VII	III	6	10	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	4	VII	III	8	11	2+	-	-	3+	3+	-	3+	-	-	-	3+	3+	3+
1	4	II	NT	10														
2	4	VII	NT	10														
1	5	III	I III M	1														
3	5	VIII	NT	2														
1	5	IV	I	2														
1	5	II	III	2														
1	5	—	II	4														
2	5	V	I	6														
2	5	I	NT	6														
2	5	V	NT	6														
1	5	IV	II III	6														
3	5	II	V	6														
2	5	VIII	M	7														
3	5	III	I III M	9														
3	5	II	NT	10														
2	5	—	NT	10														
1	5	VII	I M	10														
4	5	I	III	10														
2	5	IV	I III	10														
4	5	II	III	10														
1	5	—	M	11														

ABPC: ampicillin, MCIPC: cloxacillin, CEZ: cefazolin, CMZ: cefmetazole, GM: gentamicin, EM: erythromycin, MINO: minocycline, FOM: fosfomicin, IPM: imipenem, OFLX: ofloxacin, CLDM: clindamycin, VCM: vancomycin, ABK: arbekacin

以上のごとく、PA 分類と前述の分類を総合評価すると、101 株を 54 種に分類することができた。

### III. 考 察

1986 年から 1993 年までの当科における入院症例での菌血症やカテーテル感染の原因菌の検討<sup>17,18)</sup>では、グラム陽性球菌がもっとも多く、なかでも MRSA 検出症例は予後不良であるなど、黄色ブドウ球菌は、感染症の原因菌としてもっとも重要な存在であることを示唆する成績を得ている。

グラム陽性球菌の細胞壁は、表在蛋白を含む特徴的な構造を呈しており、黄色ブドウ球菌の場合の表在蛋白は、protein A、フィブロネクチン結合蛋白等である<sup>19)</sup>。この protein A の遺伝子 (*spa*) は、黄色ブドウ球菌の多くが有する細胞壁の構成要素遺伝子で、IgG の FC 領域と結合している。Sjodahl ら<sup>20)</sup>は、Cowan I 株の *spa* より、IgG 結合ドメインの塩基配列が 5 型に分類されることを提唱し、protein A の IgG 結合は、8 塩基の 0~5 回の反復からなることを報告している<sup>21)</sup>。さらに桜田ら<sup>3)</sup>は、*spa* のサイズと IgG 結合ドメイン数 (5,

4, 3, 2) を解析し、各々 0.91, 0.74, 0.57, 0.40 kb であると報告している。

今回、当科における臨床分離の黄色ブドウ球菌を用いて、Protein A の IgG 結合ドメイン数 (PA) 分類を行ったところ、MRSA において、PA 4 の出現頻度が有意に高率であった。

現在メチシリン耐性については、*mecA* が、水平伝達により他菌種から取り込まれた<sup>22)</sup>とされ、*mecA* の表現型は *mecI* や *mecR* による *mecA* の抑制がはずれた時点ではじめて現れるとされている<sup>23)</sup>。また、*spa* と *mec* が遺伝子地図上、同一の G フラグメントに認められることは、Pattee の報告の通りである<sup>24)</sup>。黄色ブドウ球菌の遺伝子地図の解明がまだ不十分であった 1979 年においても、すでに Cohen らにより *spa* と *mecA* との関係については、報告されている<sup>2)</sup>。また、吉沢ら<sup>25)</sup>は、*mecA* 近傍には *mecA* 遺伝子の脱落を支配する挿入配列が存在し、*spa* も一緒に脱落したと考えられるケースが存在すると述べている。*spa* と *mecA* の間にはこのように多くの関連性が見いだされており、今回の我々の結

Table 7. Susceptibility type of *mecA* (+) stocks in this study

Number	Protein-A type	Coagulase type	Phage type	Susceptibility type	Susceptibility type	ABPC	MCIPC	CEZ	CMZ	GM	EM	MINO	FOM	IPM	OFLX	CLDM	VCM	ABK
					①	-	3+	3+	3+	3+	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	3	II	NT	③	②	-	1+	3+	3+	3+	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1	4	III	I III M	①	③	-	-	-	-	3+	-	3+	-	-	-	-	3+	3+
1	4	II	V	②	④	-	-	-	-	1+	-	3+	-	-	3+	-	3+	3+
1	4	II	NT	②	⑤	-	-	-	-	-	-	3+	-	-	-	-	3+	3+
1	4	I	NT	③	⑥	-	-	-	-	3+	-	1+	-	-	-	-	3+	3+
2	4	II	III	③	⑦	-	-	-	-	3+	-	3+	2+	-	-	3+	3+	3+
1	4	I	III	③	⑧	-	-	-	-	3+	-	1+	2+	-	-	-	3+	3+
1	4	IV	I III	③	⑨	1+	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	3+	-
1	4	II	I	③	⑩	1+	-	-	-	-	-	1+	-	-	1+	-	3+	-
2	4	II	NT	③														
3	4	II	III M	④														
1	4	II	III V	⑤														
2	4	II	NT	⑤														
2	4	II	NT	⑥														
1	4	II	III	⑦														
1	4	II	NT	⑧														
1	4	II	I	⑨														
7	4	II	NT	⑩														
1	4	II	I II III	⑩														
2	4	II	III	⑩														
2	4	II	NT	⑩														
3	5	II	NT	③														
2	5	III	NT	③														

ABPC: ampicillin, MCIPC: cloxacillin, CEZ: cefazolin, CMZ: cefmetazole, GM: gentamicin, EM: erythromycin, MINO: minocycline, FOM: fosfomicin, IPM: imipenem, OFLX: ofloxacin, CLDM: clindamycin, VCM: vancomycin, ABK: arbekacin

果とも一致するものである。

次に、当科で分離された 101 株に関して、コアグラゼ型ならびにファージ型分類について検討すると、コアグラゼ型では、II 型が 46 株 (45.5%) と高率に認められた (Table 3)。抗菌薬感受性においてはこの 101 株の大半の 42 株 (91.3%) が、MRSA であった (Tables 6, 7)。さらにこのなかで *mecA* を有し、かつ PA 4 の株は 33 株 (全体の 32.7%) 認められた。33 株中のファージ型別では、NT (判定不能) が 17 株と約半数を示したが、残りは 8 種類にわたるファージ型に分類されるなど多彩であり、分類された MRSA の由来が異なると推測された。

また、Marples ら<sup>5)</sup> は、イングランド、ウェールズ地方の一病院で、1987 年から 1988 年にかけての 6 か月間に、10 種ものファージ型の MRSA が検出されたと報告しているが、これらの型はいずれも当科で同定したものと異なるものであった。当科の株は、ファージ型 III か untaypable が多く認められた。

感受性についての検討では、当科で分離した MRSA 40 株中 27 株 (67.5%) が arbekacin (ABK) に、18 株 (45%) が gentamicin (GM) に感受性を示した。ABK は現在でもなお MRSA に対して臨床適応と考えられてはいるが、多くの MRSA は、bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme によって、アミノ配糖体に耐性を獲得しているとされており<sup>26)</sup>、今日では、vancomycin が臨床上的特効薬と考えられている<sup>27)</sup>。

一般には、临床上、菌の感受性にファージ型、コアグラゼ型等をあわせて同一由来菌か否かを判断することが多い。単一方法による分類では、ファージ型分類が比較的細分化可能とされているが、100 RTD まで調べても untaypable であることが少なくない。実際に今回の検討でも 12 種までの分類にとどまるなど、判定の指標として単独では活用度が低い。そこで、ファージ型分類で untaypable となりこれ以上の細分化が不可能であった株を PA 分類をあわせることにより、さらに 3 種に分け、最終的に感受性、コアグラゼ型とあわせて、計 54 種まで分類可能としている。

院内感染対策の目的で疫学研究を行うにあたって、このような細分類を行うことにより伝播経路の推測が可能にならなければ、実際の予防対策を行うことはできない。したがって、今回、我々が検討してきた分子生物学的手法とともに、コアグラゼ型別、ファージ型別そして薬剤感受性分類も含めた菌の多角的な分析結果は、今後の院内感染対策として意義のあることと考える。

なお、実際の臨床での実用化にあたっては、手技の簡便化と迅速性も考慮しなければならない。現行法では第一に PA 分類とコアグラゼ型別を行い、さらに細分類が必要な際にファージ型別、薬剤感受性の順に追加していくのが望ましい。

謝 辞

稿を終えるに際し、ご懇篤なるご指導、御校閲を賜

った東京慈恵会医科大学内科学酒井紀教授に深謝致します。

なお本論文の要旨は第6回臨床微生物学会(1995年1月, 東京), 第43回日本化学療法学会(1995年6月, 東京)において発表した。

#### 文 献

- 1) Winblad S, Ericson C: Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B81: 150~156, 1973
- 2) Cohen S, Sweeney H M: Modulation of Protein A formation in *Staphylococcus aureus* by genetic determinants for Methicillin resistance. J Bacteriol 140: 1028~1035, 1979
- 3) Sakurada J, et al. : Biochemical and genetic heterogeneity of staphylococcal protein A. FEMS Microbiology Letters 119: 59~64, 1994
- 4) Fang F C, McClelland M, Guiney D G, Jackson M M, Hartstein A I, Morthland V H, Devis C E, McPherson D C, Welsh J: Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. JAMA 270: 1323~1328, 1993
- 5) Marples R R, Reith S: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales. Communicable disease 2: R 25~R 29, 1992
- 6) 岡本了一, 大久保豊司, 井上松久: PCR 法による MRSA 迅速診断法. Modern Physician 11: 1421~1425, 1991
- 7) 厚生省監修: 経口感染症, ブドウ球菌, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版. 日本公衆衛生協会, D-133~D-141, 1987
- 8) 厚生省監修: 創傷感染症, ブドウ球菌, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版. 日本公衆衛生協会, J-15~J-24, 1987
- 9) 厚生省監修: 下痢・食中毒-ブドウ球菌, コアグラゼ試験, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第2版. 日本公衆衛生協会, 269~271, 1987
- 10) Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487~491, 1988
- 11) Song M D, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsuhashi M: Evolution of aninducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FBES Lett 221: 167~171, 1987
- 12) 善養寺浩, 寺山 武: ブドウ球菌コアグラゼ型別法(術式編). モダンメディア 12: 500~508, 1966
- 13) 善養寺浩, 寺山 武: ブドウ球菌コアグラゼ型別法(応用編). モダンメディア 13: 39~47, 1966
- 14) 潮田 弘, 寺山 武, 坂井千三, 善養寺浩: 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別簡易法とその応用. 東京衛研年報 26: 1~6, 1975
- 15) 横尾 裕, 五十嵐英夫: 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別法の簡易・迅速な型別用キットの開発. 日本細菌学会誌 49: 237, 1994
- 16) 井上松久, 大久保豊司: 黄色ブドウ球菌のファージ型別法. 検査と技術 17: 1611~1615, 1989
- 17) 前澤浩美: カテーテル感染の現状. 第10回東八幡平シンポジウム 57~60, 1992
- 18) 前澤浩美, 吉田正樹: 敗血症. 臨床透析 9: 882~884, 1993
- 19) Schneewind O, Model P, Fischetti V A: Sorting of ProteinA to the staphylococcal Cell Wall. Cell 70: 267~281, 1992
- 20) Sjobahl J: Structural studies on the four repetitive Fe-binding regions in proteinA from *Staphylococcus aureus*. Eur J Biochem 78: 471~490, 1977
- 21) Uhlen M, Gess B, Nilsson B, Gatlenbek S, Philipson L, Lindberg M: Complete sequence of the Staphylococcal Genes encoding ProteinA. J Biol Chem 259: 1695~1702, 1984
- 22) Archer G L, Niemeyer D M: Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends in microbiol 2: 343~347, 1994
- 23) Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T: FEBS Lett 298: 133~136, 1992
- 24) Pattee P A: The genetic map of *Staphylococcus aureus*. in Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria (Sonenshein A L, Hoch A J, Losick R. ed.), American society for microbiology, p489~496, 1993
- 25) 吉沢幸夫, 前澤浩美: 黄色ブドウ球菌 *spa* 遺伝子および *mecA* 遺伝子の PCR 法による解析. 日本細菌学雑誌 50: 197, 1995
- 26) Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Ant A Chemother 25: 754~759, 1984
- 27) 前澤浩美, 柴 孝也: 経口抗菌薬の使い方. 化学療法剤の全て. 臨床成人病 24: 1557~1560, 1994

Clinical analysis of *Staphylococcus aureus*: Relationship between the methicillin-resistance of *Staphylococcus aureus* and the size of the IgG binding domain in the *spa* gene

Hiromi Maezawa<sup>1)</sup>, Yukio Yoshizawa<sup>2)</sup> and Kohya Shiba<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Internal Medicine II and <sup>2)</sup> Isotope Research Center, The Jikei University School of medicine, 3-25-8, Nishi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

The existence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important clinical problem. *Staphylococcus aureus* strains were isolated from 101 patients (19 outpatients and 82 inpatients) during the one-year period from July 1993 to June 1994. The *mecA* gene and the *spa* gene of these strains were analyzed by the polymerase chain reaction, and the strains were classified according to susceptibility to antibiotics, coagulase type, and phage type. Five of the 40 MRSA strains isolated produced type-5 protein A, 34 produced type-4 protein A and one produced type-3 protein A. In contrast, 38 of 61 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strains produced type-5 protein A, 21 produced type-4 protein A, 2 produced type-3 protein A. The rate of expression of type-4 protein A by MRSA was significantly higher than in MSSA ( $p < 0.001$ ,  $X^2 = 22.92$ ). Coagulase type-II strains were the most common among the 8 serotypes (46 of 101 strains [45.5%]). Thirty coagulase type-II strains were detected among the type-4 protein A producing MRSA, but their phage types varied: 16 were untypable, 3 were type I, 1 was type I and M, 1 types I, II, and III, 5 type III, 2 type III and M, 1 types III and V, and 1 type V, suggesting that these strains were not of the same origin. The strains that produced type-4 protein A showed high resistance to other antibiotics. The results of this study indicated that most MRSA strains have type-4 protein A, which is uncommon in MSSA strains.