

動物から分離された*Staphylococcus aureus*の性状と遺伝学的型別法の検討

島山 薫^a, 久保田 寛顕^a, 奥野 ルミ^a, 貞升 健志^a, 甲斐 明美^b

東京都内の健康な動物から分離された*Staphylococcus aureus* 54株について薬剤感受性, 毒素産生性, multiplex-PCR法によるコアグラマーゼ型別およびMLST法による型別を行った。その結果, 54株中2株がMRSAであり, 44株(81%)がコアグラマーゼⅠ～Ⅶに型別されたが, 10株はコアグラマーゼ型別ができなかった。54株中9株(17%)は毒素産生株で, MRSA 2株はともにSEC, TSST-1産生株でコアグラマーゼⅡ型およびⅢ型であった。MLST型別では, 54株中50株(93%)でST型が決まり, 各コアグラマーゼ型のST型は2～3の型に分かれたが, 異なるコアグラマーゼ型でST型が同じとなるものは無かった。MRSA2株のうち, コアグラマーゼⅡ型はST5型, コアグラマーゼⅢ型はST8型となり, ともにヒトのMRSAの主要なST型であったため, ヒト由来の株と推測した。今回の結果から, 動物由来の*S.aureus*感染症発生時には, 性状および型別を確認することにより, ある程度その感染源の絞り込みが可能であると考えられた。

キーワード: *Staphylococcus aureus*, イヌ, ネコ, 動物, コアグラマーゼ型別 MLST型別

はじめに

Staphylococcus aureus (黄色ブドウ球菌)は, *Staphylococcus*属に属するグラム陽性球菌である。この*S.aureus*は, 膿瘍形成などの化膿性疾患や敗血症などの感染症, 産生するエンテロトキシンによる食中毒, 毒性性ショック症候群, そしてMRSA (methicillin-resistant *S.aureus*)による院内感染症等, ヒトおよび動物の共通感染症の起原菌である^{1,2)}。一方で, ヒトや動物の皮膚や粘膜等の正常細菌叢を構成する菌の一つで, 健康なヒトや動物の保菌率は9～80%と差があり, エンテロトキシン等の毒素産生株は20数%あるというヒトでの報告もある³⁾。しかしながら, 都内の動物由来の*S.aureus*についてのこれらの調査報告は無い。今回, 都内の健康な動物から分離された*S.aureus*菌株について, 毒素産生性ならびに遺伝学的型別法を中心に解析を行ったので報告する。

実験方法

1. 材料

2007年から2010年にイヌ, ネコおよび, 展示施設等で飼育されている, げっ歯類(テンジクネズミ, ハツカネズミ, プレーリードック), 反芻家畜および家禽等の糞便, 表皮等から分離された*S.aureus* 54株を供試した(表1)。

2. 方法

1) 薬剤感受性

薬剤感受性は, MRSAスクリーニング培地(ベクトンデックシンソン)を用いて, オキサシリン薬剤感受性(6 μl/ml)のスクリーニングを行い, 陽性株については*mecA*遺伝子

の確認を行った⁴⁾。

表1 菌株由来内訳

動物種	株数
イヌ	12
ネコ	14
げっ歯類	18
家禽	8
反芻家畜	2
合計	54

2) コアグラマーゼ型別

コアグラマーゼ型別は遺伝子学的手法により行った。すなわち, Sakaiら⁵⁾のプライマーを用いたmultiplex-PCR法によりコアグラマーゼⅠ型からⅧ型の型別を行った。PCR反応は, 94℃ 5分後, 94℃ 30秒, 52℃ 30秒, 72℃ 30秒を30サイクル, 72℃ 5分の条件で行った。反応終了後, 2%アガロース電気泳動を行い, 増幅産物のサイズによりコアグラマーゼ型の判定を行った。

3) 毒素産生性試験

毒素産生性試験はRPLA法(デンカ生研)で行い, エンテロトキシン(SE: staphylococcal enterotoxin) A～E, TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1), 表皮剥脱毒素(ETA, ETB)の毒素産生を判定した。

4) ST (Sequence Type) 型別

分子疫学的解析手法のMLST (Multi Locus Sequence Typing) 法により, 7つのハウスキーピング遺伝子(*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*)の遺伝子配列を調べる

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ことでST型別を行った。M.C.Enring⁶⁾らのプライマーを改変(表2)し、PCR反応は、95°C 5分後、95°C 1分、55°C 1分、72°C 1分を30サイクル、72°C 5分の条件で行った。PCR法により増幅された増幅産物の塩基配列を調べ、*S.aureus* MLSTデータベース (<http://saureus.mlst.net>) で照合を行い、ST型を決定した。

結 果

54株のコアグララーゼ型、毒素型、ST型を表3-1、3-2に示した。

1. 薬剤感受性

54株中2株(ネコ1株、げっ歯類1株)が、スクリーニング培地に発育し、*mecA*遺伝子を保有するMRSAであった。それ以外の52株はMSSA (methicillin-susceptible *S.aureus*) であった。

2. コアグララーゼ型別

54株中44株(81%)がコアグララーゼI~VIIに型別され、10株はPCR法による増幅ができず、遺伝子学的手法によるコアグララーゼ型別はできなかった。コアグララーゼ型別ができた44株は、I型13株、II型11株、III型5株、IV型2株、V型5株、VI型2株、VII型6株であった。菌株が分離された動物種別にみると、コアグララーゼI型、III型は、げっ歯類、ネコおよびイヌから分離され、II型、VII型は多様な動物から分離された株であった。また、コアグララーゼ型別ができなかった10株は、イヌから分離された株がほとんどであっ

た。

3. 毒素産生性試験

毒素産生性試験では、54株中9株(17%)が毒素産生株であった。とくに、MRSA 2株は、ともにSEC、TSST-1産生株で、コアグララーゼII型およびIII型であった。その他の毒素産生株は、コアグララーゼI型でSEC 4株、コアグララーゼIII型でSEC 1株、コアグララーゼVII型でSEB 1株およびコアグララーゼ型別不能でETA産生株が1株であった。

4. ST型別

54株中50株(93%)でST型が決まったが、コアグララーゼ型別ができなかった10株中4株では、MLSTプロファイルは決定できたが、ST型は決定できなかった。

表3で示したとおり、各コアグララーゼ型のST型は2~3の型に分かれたが、異なるコアグララーゼ型でST型が同じとなるものは無かった。*S.aureus* MLSTデータベースに登録されているST型ごとの菌株由来を見ると、ヒト臨床検体から分離されたST型(ST2271, 88, 188, 120, 30, 291, 15)、動物から分離されたST型(ST133, 1639, 630)、ヒト、動物から分離されたST型(ST49, 89, 72, 49, 5, 8, 45, 81)に分かれた。MRSA 2株のうち、コアグララーゼII型はST5型、コアグララーゼIII型はST8型となり、ともに世界的にヒトから分離されているMRSAの主要なST型であった。

表2 *S.aureus* MLST法シーケンスプライマー

target gene	primer	Sequence (5'-3')	size
<i>arcC</i>	arcF	TGTCATTGCATTAGGCGGTA	813bp
	arcR	ATTTTTGGCAACATCGATCC	
<i>aroE</i>	aroF	GGCAAAGAGAAACGYGATGTTA	710bp
	aroR	CGTTATTTCCAGCCATACCC	
<i>glpF</i>	glpF	TTTCTACGAGCCAAACTGCT	705bp
	glpR	AGGAACGATTGCATATGACC	
<i>gmk</i>	gmkF2-Up	ATCGTTTTATCRGGACCATC	556bp
	gmkR	CGCGCTCTCTTTTAAAGTGC	
<i>pta</i>	ptaF	GGTGACGTGGCATTATGAA	725b
	ptaR	TGTCACGTCGTCTGATTTAGC	
<i>tpi</i>	tpiF	AGATAATGGTGCGTTCACAGG	702bp
	tpiR	TAAGCCACTCGCTTCGATTT	
<i>yqiL</i>	yqiF2-Up	CAGCATACAGGACACCYATTGGC	598bp
	yqiR2-Dn	CGTTGRGGAATCGATACTGGAAC	

表3-1 動物から分離された*S.aureus*の型別結果1

菌株 No.	分離年	動物種	検体	薬剤感受性	コアグ ラーゼ 型	毒素産生	MLST型	
							ST型	ST型 分離報告
Sa-3	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	—	89	ヒト
Sa-4	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	—	89	
Sa-5	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	—	89	
Sa-6	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	—	89	
Sa-7	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	—	89	
Sa-8	2008	ネコ	体表	MSSA	I	—	1452	動物
Sa-9	2008	ネコ	体表	MSSA	I	—	1452	
Sa-10	2008	ネコ	体表	MSSA	I	—	1452	
Sa-11	2008	ネコ	体表	MSSA	I	—	1452	
Sa-1	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	SEC	49	ヒト, ブタ
Sa-2	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	SEC	49	
Sa-13	2010	テングネズミ	ふん便	MSSA	I	SEC	49	ヒト
Sa-12	2010	イヌ	ふん便	MSSA	I	SEC	72	
Sa-14	2007	テングネズミ	ふん便	MSSA	II	—	5	ヒト, 牛乳
Sa-15	2008	プレーリードック	ふん便	MRSA	II	SEC, TSST-1	5	
Sa-18	2008	ネコ	体表	MSSA	II	—	5	
Sa-19	2008	ネコ	体表	MSSA	II	—	5	
Sa-22	2009	ネコ	ふん便	MSSA	II	—	5	
Sa-23	2009	ネコ	ふん便	MSSA	II	—	5	ヒト
Sa-16	2008	水禽	ふん便	MSSA	II	—	2271	
Sa-17	2008	水禽	ふん便	MSSA	II	—	2271	
Sa-20	2009	水禽	ふん便	MSSA	II	—	2271	
Sa-21	2009	水禽	ふん便	MSSA	II	—	2271	
Sa-24	2010	テングネズミ	ふん便	MSSA	II	—	1639	アライグマ
Sa-25	2007	ハツカネズミ	ふん便	MSSA	III	—	88	ヒト, ブタ
Sa-26	2009	テングネズミ	ふん便	MSSA	III	SEC	88	
Sa-27	2009	ハツカネズミ	ふん便	MSSA	III	—	88	
Sa-28	2009	ネコ	ふん便	MRSA	III	SEC, TSST-1	8cc*	ヒト
Sa-29	2009	ネコ	ふん便	MSSA	III	—	630	牛乳, 不明
Sa-30	2007	ハツカネズミ	ふん便	MSSA	IV	—	30	ヒト
Sa-31	2008	ネコ	体表	MSSA	IV	—	30	

*cc : clone complex

表3-2 動物から分離された*S.aureus*の型別結果2

菌株 No.	分離年	動物種	検体	薬剤感受性	コアグ ラーゼ 型	毒素産生	MLST型	
							ST型	ST型 分離報告
Sa-32	2007	イヌ	体表	MSSA	V	—	188	ヒト, 牛乳
Sa-33	2008	イヌ	ふん便	MSSA	V	—	188	
Sa-35	2009	七面鳥	ふん便	MSSA	V	—	188	
Sa-36	2010	イヌ	ふん便	MSSA	V	—	188	
Sa-34	2008	ネコ	体表	MSSA	V	—	120	ヒト, 牛乳
Sa-37	2007	ハツカネズミ	ふん便	MSSA	VI	—	774cc又は	トリ
Sa-38	2007	ハツカネズミ	ふん便	MSSA	VI	—	2312cc	ヒト
Sa-40	2007	ラマ	ふん便	MSSA	VII	—	291	ヒト
Sa-41	2008	水禽	ふん便	MSSA	VII	—	291	
Sa-42	2008	水禽	ふん便	MSSA	VII	—	291	
Sa-43	2009	ヤギ	ふん便	MSSA	VII	—	291	
Sa-39	2007	テンジクネズミ	ふん便	MSSA	VII	—	45	ヒト, 牛乳
Sa-44	2009	ネコ	ふん便	MSSA	VII	SEB	81	ヒト, 牛乳
Sa-47	2008	イヌ	ふん便	MSSA	UT	ETA	15	ヒト
Sa-48	2008	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	15	
Sa-49	2008	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	15	
Sa-51	2009	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	15	
Sa-52	2010	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	15	
Sa-53	2010	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	15	
Sa-45	2007	イヌ	体表	MSSA	UT	—	NT	
Sa-46	2007	イヌ	体表	MSSA	UT	—	NT	—
Sa-50	2008	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	NT	
Sa-54	2010	イヌ	ふん便	MSSA	UT	—	NT	

考 察

中野ら³⁾の調査では、健康なブタ86.4%、ウシ19.8%、トリ9.5%で*S.aureus*が分離されているものの、毒素産生株はなかったと述べている。しかし、今回、我々の検討では、動物から分離された*S.aureus*のうち17%が毒素産生株であり、ヒトや動物への感染源となりうることが判明した。このため、健康な動物から分離された*S.aureus*であっても、衛生管理上、毒素産生等の病原性を確認する必要があると思われた。

従来、コアグラーゼ型別はウサギ血漿を利用した抗血清法を用いられていたが、コアグラーゼ産生能が低い株は判定が困難であった。一方、遺伝学的手法によるコアグラーゼ型別法では、コアグラーゼ産生能にかかわらず型別が可能であるものの、コアグラーゼI～VIII型までしか型別できず、コアグラーゼIX、X型は型別できないという欠点もある。今回供試した菌株では、10株が型別できず、コアグラーゼIXまたはX型を推測するも、遺伝学的手法では型別できなかった。また、海外では、ヒトや動物等から分離された*S.aureus*のコアグラーゼ型別情報が乏しく、その型別にはMLST法や*Spa* (*S.aureus* protainA) typing法などが行われ

ているため⁸⁾、遺伝学的コアグラーゼ型別法ともども更なる検討とデータベースの充実が必要である。

MLST法は、7遺伝子領域の塩基配列を調べる必要があるため、手技的には煩雑であるが、PFGE (pulsed field gel electrophoresis) 法等とは異なり、得られた情報をデータベースと照合することによる型別ができるため、菌株を1か所に集める必要がなく、離れた施設や国際間での比較等が可能である⁸⁾。また、そのST型の菌株情報として、分離年月日、場所、材料、毒素産生性等を得ることができるため、感染症等の起因菌か、ヒト由来、動物由来か、世界的に広がっているクローンか、地域的なクローン等かを推測することも可能であるため、疫学解析を行う上で有用な解析法である。今回の検討でも、各コアグラーゼ型のST型は2～3の型に分かれたが、異なるコアグラーゼ型でST型が同じとなるものは無かったことから、動物由来の*S.aureus*の場合、これらの性状を確認することにより、感染源の絞り込みが可能と思われた。

今回供試したMRSA 2株は、ST5型とST8型で、世界的にヒトの臨床材料や院内感染等で分離されるMRSAのST型^{10,11)}であった。このため、ヒトとの接触で健康な動物が

保菌したと推測された。MRSAは、イヌ、ネコ、げっ歯類をはじめ家禽、家畜などからの分離報告がされている¹²⁻¹⁴⁾。MRSA保菌者からペット動物感染するという報告^{15,16)}や、その感染したペット動物を介してさらに他のヒトへ伝播したという報告もある¹⁷⁾。また、ヨーロッパやアメリカ等で報告されているMRSA、ST398型のように、ヒト起源のMRSAが家畜へ感染し、家畜で常在菌となった後に再びヒトへ感染、流行し世界的に問題になっていることもあることから¹⁸⁾、分離された*S.aureus*の毒素産生性等の病原性の確認や薬剤感受性試験、遺伝学的疫学解析等は重要であり、今後も方法を検討しながら、モニタリングを続けていく必要がある。

文 献

- 1) 梁川 良, 笹原二郎, 坂崎利一: 獣医微生物学, 第1版, 346-361, 1989, 養賢堂, 東京
- 2) 重茂克彦: モダンメディア, 54(4), 131-134, 2008
- 3) 中野千紗, 清水晃, 河野潤一, 他: 日本食品微生物学会誌, 26, 83-88, 2008
- 4) Louie L., Matsumura S, Choi E., *et al.*: *J.Clin.Microbiol.* **38**, 2170-2173, 2000
- 5) Sakai F., Takemoto A., Watanabe S., *et al.*: *J. Microbiol. Methods.* **5(2)**: 312-317, 2008
- 6) Enright M.C., N.P.J. Day, C.E. Davies, *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1008-1015, 2000
- 7) Watanabe S., Ito T., Takeuchi F., *et al.*: *J. Bact.*, **187**, 3698-3707, 2005
- 8) 長尾美紀, 太田美智男: 日本臨床微生物学雑誌, **7(3)**, 156-167, 2007
- 9) Iwao Y., Yabe S., Takano T., *et al.*: *Microbiol Immunol.* **56**, 76-82, 2012
- 10) Chung M., Dickinson G., Lencastre H., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **42(2)**, 542-547, 2004
- 11) Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., *et al.*: *J.Clin. Microbiol.*, **45(4)**, 1118-1125
- 12) Abbott Y., Leqqett B., Rossney AS., *et al.*: *Vet. Rec.*, **166(5)**, 451-454, 2010
- 13) Walther B., Wieler LH., Friedrich AW., *et al.*: *Vet. Microbiol.*, **127**, 171-178, 2008
- 14) Loeffler A., Boag AK., Sung J., *et al.*: *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 692-697, 2005
- 15) Rutland B.E., Weese J. S., Bolin C. *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **15(8)**, 1328-1329, 2009
- 16) Vitale C.B., Gross T.L., and Weese J.S.: *Emerg. Infect. Dis.*, **12(12)**, 1998-199, 2006
- 17) Ferreira J.P., Anderson K.L., Correa M.T., *et al.*: *PloS One*, **6**, 1-5, 2011
- 18) Duijkeren E., Wolfhagen M., Box A., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **10(12)**, 2235-2237, 2004

Characterization and Investigation of Genetic Typing Methods for *Staphylococcus aureus* in Animals

Kaoru HATAKEYAMA^a, Hiroaki KUBOTA^a, Rumi OKUNO^a, Takeshi SADAMASU^a and Akemi KAI^a

Fifty-four *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy animals were characterized by drug susceptibility test, toxin-producing test, coagulase typing by multiplex PCR, and multilocus sequence typing (MLST).

Two of 54 strains were MRSA and the others were MSSA. Forty-four of 54 strains (81%) were identified as coagulase type I–VII, but the remaining 10 were not identified. Nine of 54 strains (17%) were toxin-producing *S. aureus*. Two MRSA strains were coagulase type II and type III; both produced SEC and TSST-1. Fifty of 54 strains (93%) were typed by MLST, and each coagulase type was classified into 2 or 3 ST types, but the same ST type could be identified in different coagulase types. The coagulase type II MRSA strain belonged to ST 5 and the coagulase type III MRSA strain belonged to ST 8; both are the main ST types of human MRSA, suggesting that they are of human origin.

Based on our results, we propose that when *S. aureus* infections occur in animals, it will be possible to determine the source of infection by characterizing and typing the bacterium.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, dog, cat, animals, coagulase typing, MLS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan