

原著

## 健康な看護学生から分離された黄色ブドウ球菌の疫学調査 —エンテロトキシンおよびTSST-1産生とコアグララーゼ遺伝子型別—

目野 郁子\* 吉武 美佐子\*\* 藤本 秀士\*\*\*

### <要 旨>

健康な看護学生の鼻腔から分離した黄色ブドウ球菌91株についてエンテロトキシン (*Staphylococcal enterotoxin*: SE) A~DあるいはToxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) 産生性とコアグララーゼ遺伝子型を調べた。分離された91株のうち43株 (47.3%) が、SEA~SEDあるいはTSST-1のいずれかを産生していた。毒素産生株においてTSST-1 (TSST-1, TSST-1+SEA, TSST-1+SEC)、SEA (SEA, SEA+SEB, TSST-1+SEA) そしてSEB (SEB, SEA+SEB) がそれぞれ46.5%、41.9%、34.9%と比較的高頻度で検出された。コアグララーゼ遺伝子型別は、Polymerase chain reaction (PCR) 法によるコアグララーゼ遺伝子の増幅と増幅物のRestriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析により行った。すべての分離菌は異なる12のRFLPパターン (A~L) に分類され、毒素産生株はそのうちの8パターン (A~F) に属していた。毒素産生株43株のRFLPパターンで最も多くみられたのはFパターン (51.2%)、次にBパターン (20.9%) であった。FパターンはTSST-1 産生株 (TSST, TSST+SEA, TSST+SEC) のほとんどでみられBパターンはSEB産生株にみられた。

キーワード：黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン、TSST-1、コアグララーゼ遺伝子型別、PCR

Running title：黄色ブドウ球菌の疫学調査

### I. 緒言

黄色ブドウ球菌は健康なひとが保有する常在菌である。しかし時によっては、この菌が病原性を発揮し感染症を惹起することがある。菌が産生する毒素は病原因子の一つとして作用する。特にエンテロトキシンは食中毒の原因として、TSST-1はToxic shock syndrome (TSS) の原因として病態に深く関与している<sup>1)</sup>。また医療の現場ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) など抗生物質が効かない菌が、院内感染起炎菌として問題になっている。

このような黄色ブドウ球菌の疫学調査には多種の方法が開発され利用されてきた。従来、コアグララーゼ血清型別やフェージ型別、毒素産生型などの方法が広く用いられてきた。それに加えて最近では、ゲノムDNAの多型性を判別することで菌を識別するパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)<sup>2)~4)</sup>やリボタイプ法<sup>5)6)</sup>が利用されるようになった。またPCR法はより迅速で簡便な方法として注目されている。PCR法

を利用した黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ遺伝子型別法は、菌特有のコアグララーゼ遺伝子の増幅片のサイズ同定とともに、その断片のAlu I 切断パターンを解析する方法である<sup>6)7)</sup>。この方法はMRSAによる院内感染の疫学調査に利用され感染源、感染経路を明らかにするうえで有用な方法となっている<sup>6)8)</sup>。

そこで本研究では健康な看護学生が鼻腔内に保有している黄色ブドウ球菌の疫学調査をエンテロトキシン (SEA~D)、TSST-1産生性とPCR法を用いたコアグララーゼ遺伝子型別の二つを用いて行なった。そして特に毒素産生菌に焦点をあて毒素産生/毒素型とコアグララーゼ遺伝子型との関連について検討を行った。

### II. 研究対象および方法

#### 1. 対象および供試菌株

西南女学院大学保健福祉学部看護学科学生198名の鼻腔内から分離した黄色ブドウ球菌91株を用いた。菌は同一人物から1ないし2株採取した。なお詳細な分

\* 西南女学院大学保健福祉学部看護学科 教授

\*\* 西南女学院大学保健福祉学部看護学科 助手

\*\*\* 九州大学医学部保健学科 教授

離同定の方法は以前報告した文献に記載している<sup>9)</sup>。

## 2. エンテロトキシンおよびTSST-1産生性

黄色ブドウ球菌をブレインハートインフュージョン (BHI, Difco) 液体培地で振盪培養し、その培養上清から黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンA~DおよびTSST-1の検出を行った。エンテロトキシンおよびTSST-1検出には、市販のキットSET-RPLA (デンカ生研)、TST-RPLA (デンカ生研) をそれぞれ用いた。いずれの試験もキットに記載された方法に準拠して行った。

## 3. PCR法によるコアグララーゼ遺伝子型別

小島ら<sup>10)</sup>の方法に従いコアグララーゼ遺伝子の増幅と解析を行なった。Luria-Bertani 寒天培地で培養した黄色ブドウ球菌をTE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に懸濁し100°C、5分間煮沸後培養上清からDNAを抽出した。コアグララーゼ遺伝子の増幅は、DNA とプライマー (COAG 2、COAG 3)<sup>10)</sup> をPCR反応液中 (Ready-To-Go PCR Beads, Amersham Pharmacia) で94°C15秒、45°C15秒、72°C30秒を30サイクル、そして最後に72°C 3分反応させることで行なった。その後、アガロースゲル電気泳動によりPCR増幅物のバンドを確認した。増幅物の分子量は分子量サイズマーカーを (Gibco BRL) を用いて測定した。さらにPCR増幅物を *Alu I* 制限酵素 (Toyobo) で37°C、一晩処理したものをアガロースゲルで電気泳動しゲル上に検出された切断断片の比較を行なった。

## III. 結果

### 1. エンテロトキシンおよびTSST-1産生と毒素型

鼻腔から分離された黄色ブドウ球菌91株のうち43株 (47.3%; 43/91株) が、エンテロトキシンA~DあるいはTSST-1のいずれかを産生していた。表1に示すように毒素産生株のうちSEB毒素型 (30.2%; 13/43株)、TSST-1+SEA毒素型 (27.9%; 12/43株) およびTSST-1毒素型 (13.9%; 6/43株) が多く認められた。また各毒素の毒素産生性に注目した場合TSST-1産生株が46.5% (20/43株)、SEA産生株が41.9% (18/43株)、SEB産生株が34.9% (15/43株) と比較的高頻度で分離された。なお同一人物から分離された2株の毒素型は同じであった。

表1 毒素産生株のエンテロトキシン型およびTSST-1産生性

毒素型	株数
SEA	4 (9.3)
SEB	13 (30.2)
SEC	4 (9.3)
SED	0 (0.0)
SEA+SEB	2 (4.7)
TSST-1	6 (13.9)
TSST-1+SEA	12 (27.9)
TSST-1+SEC	2 (4.7)
計	43 (100.0)
( ) %	

Table 1 *Staphylococcal* enterotoxins (SE) types and TSST-1 production in toxin-producing *S. aureus* strains

### 2. PCR法によるコアグララーゼ遺伝子型別

Single PCR法によりアガロースゲル上に検出された黄色ブドウ球菌91株のコアグララーゼ遺伝子増幅物の分子量サイズは550bp (8株)、650bp (24株)、750bp (14株)、800bp (37株)、850bp (6株)、1000bp (2株)であった (表2)。さらに制限酵素 *Alu I* によりコアグララーゼ遺伝子増幅物を処理しその切断パターンを比較したところ、異なる12 (A~L) のパターンに分類することができた。切断断片のサイズはいずれも81bpの倍数であった。切断パターンのうちBパターン (162bp, 243bp, 405bp) とFパターン (81bp, 162bp, 405bp) を示す株が多くみとめられ、それぞれ27.4% (25/91株)、26.4% (24/91株) をしめていた (表2)。またSEA~SEDあるいはTSST-1のいずれかを産生する毒素産生菌は、12パターンのうちの8 (A~H) パターン (表2) のいずれかに属していた。図1に示すように特にFパターン (81bp, 162bp, 405bp) を示す株が43株中22株 (51.2%) と最も多く、次にB (162bp, 243bp, 405bp) を示す株が9株 (20.9%) と多かった。同一人物から分離した菌2株のコアグララーゼ遺伝子型は一致していた。

### 3. 毒素産生/毒素型とコアグララーゼ遺伝子型別との関係

コアグララーゼ遺伝子型と毒素産生型との関係について調べたところ (表3)、コアグララーゼ遺伝子型FパターンにはSEA (2株)、TSST-1 (6株)、TSST-1+SEA (12株) およびTSST-1+SEC (2株) の4種の

毒素型が含まれていた。Fに属す菌のうち91.0% (20/22株)がいずれもTSST-1産生の菌であった。BにはSEB毒素型(9株)が属していた。Fパターン、Bパターン以外ではAとCにSEB産生型(各2株)が、D

にSEA産生型(2株)、EにSEC産生型(2株)、GにSEC産生型(2株)そしてHにSEA+SEB産生型(2株)が含まれていた。

表2 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ遺伝子型

型	株数	分子量サイズ(bp)	切断パターン(bp)
A	6 (6.6)	750	(243, 486)
B	25 (27.4)	800	(162, 243, 405)
C	4 (4.4)	750	(324, 405)
D	4 (4.4)	800	(162, 486)
E	6 (6.6)	800	切断なし
F	24 (26.4)	650	(81, 162, 405)
G	8 (8.8)	550	(162, 405)
H	4 (4.4)	750	(81, 243, 405)
I	4 (4.4)	850	(324, 486)
J	2 (2.2)	800	(81, 243, 486)
K	2 (2.2)	850	(162, 729)
L	2 (2.2)	1000	(162, 324, 486)
計	91 (100.0)		

( )%

Table 2 Coagulase gene typing in *S. aureus* strains

図1 エンテロトキシンおよびTSST-1毒素産生株のコアグララーゼ遺伝子型別

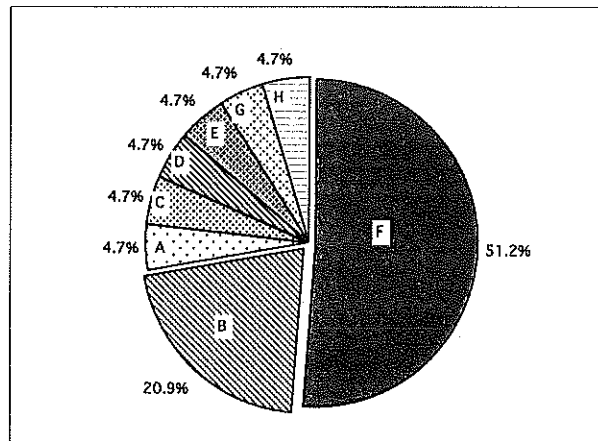


Fig. 1 Coagulase gene types in the enterotoxin- and TSST-1-producing *S. aureus* strains

表3 毒素産生株のコアグララーゼ遺伝子型と毒素型

毒素型	コアグララーゼ遺伝子型								計
	A	B	C	D	E	F	G	H	
SEA	0	0	0	2	0	2	0	0	4 (9.3)
SEB	2	9	2	0	0	0	0	0	13 (30.2)
SEC	0	0	0	0	2	0	2	0	4 (9.3)
SED	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)
SEA+SEB	0	0	0	0	0	0	0	2	2 (4.7)
TSST-1	0	0	0	0	0	6	0	0	6 (13.9)
TSST-1+SEA	0	0	0	0	0	12	0	0	12 (27.9)
TSST-1+SEC	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (4.7)
計	2 (4.7)	9 (20.9)	2 (4.7)	2 (4.7)	2 (4.7)	22 (51.2)	2 (4.7)	2 (4.7)	43 (100.0)

( )%

Table 3 Toxin types (Enterotoxins, TSST-1) and coagulase gene types in toxin-producing *S. aureus* strains

## IV. 考察

黄色ブドウ球菌の毒素型および毒素産生状況は、感染症発症の病態や重症度に深く関わっている。今回健康な看護学生から分離した黄色ブドウ球菌の約半数が毒素産生株であった。臨床分離株からの毒素産生遺伝子の検出率が1980～1984年に比較して1999年では高くなっていることから<sup>13)</sup>近年、健康なひとが保有する毒素産生黄色ブドウ球菌が増加傾向にあると想定される。毒素産生性についてみると分離菌から多く検出された毒素はTSST-1、SEA、SEBであった。特にTSST-1産生株の分離率は46.5% (20/43株)と石原ら<sup>13)</sup>の報告に比較してかなり高い検出率を示した。TSST-1産生菌はTSSを起こす主要な毒素であるが食中毒の原因毒素SEAやSEBもTSSに関与することが報告されている<sup>14)</sup>。通常TSST-1産生菌を保有する健康キャリアが、TSSを発症する危険性は低いといわれている<sup>15)</sup>がキャリアの免疫能の低下にともなう感染症の発症や医療従事者による院内での交差感染<sup>16)</sup>の危険性を考えると今回の実験結果は、TSST-1をはじめとするSEA、SEBなどの毒素産生菌による関連疾患の発生頻度が高くなる可能性を示唆しており今後注意を払う必要がある。

分離菌のコアグララーゼ遺伝子型をRFLP解析した結果、遺伝子型は12 (A～L) パターンに分類された。小島ら<sup>10)</sup>の報告と同様多様な菌がひとの鼻腔内に存在することが示された。また同一人物から分離された2株の菌は全く同一の毒素産生とコアグララーゼ遺伝子型を示した。1種類の菌が長期にわたり健康なひとの鼻腔内に定着する<sup>17)</sup>という報告をサポートする結果かもしれない。

今回データには示していないがコアグララーゼ血清型

でⅦ型を示す菌株がコアグララーゼ遺伝子型ではさらに4タイプ (B,E,G,H) に分類できた。通常用いられているコアグララーゼ血清型別法では菌をⅠ～Ⅷ型までしか分類できない。そのため疫学調査をするうえでは多くのタイプに分類できるという点で遺伝子型別による方法が有用である<sup>18)</sup>ことが確認できた。この方法によりコアグララーゼ血清型別法で型別不能であった分離菌株もタイプ分けできると考えられる。

SEA～SED、TSST-1の毒素産生性とコアグララーゼ遺伝子型との関連についてみると毒素産生能のある菌株は12パターンのうちの8パターン (A～H) に属していた。今までの調査結果では、毒素産生株のなかでFパターン以外の各パターンに属す株数はかなり少なかったが各パターンと特定の毒素型とが関連するという傾向が示された。Fパターンは4種類 (SEA, TSST-1, TSST-1+SEA, TSST-1+SEC) の毒素型と関連していたが、Fに含まれるほとんどの菌がTSST-1産生株という特徴をもっていた。Fパターンには毒素非産生株がほとんど含まれていないことからFパターンがTSST-1産生株特有のコアグララーゼ遺伝子型である可能性が示唆された。今後さらに検討をする予定である。

## 付記

本研究の一部は2003年度西南女学院大学保健福祉学部研究所の助成金を得て行われた。

文献

- 1) 五十嵐英夫：ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンについて—ヒトにおけるトキシン産生が問題となる条件—。日本臨床微生物学雑誌. 5 : 59-65, 1995
- 2) 小林昌彦, 根本優子, 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ゲル電気泳動およびAP-PCRによるゲノムタイピング。感染症学雑誌. 71 : 620-627, 1997
- 3) Yoshida T, Kondo N, Hanifah YA and Hiramatsu K: Combined use of ribotyping, PFGE typing and IS431 typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol. 41:687-695, 1997
- 4) 森脇孝博：整形外科病棟入院患者および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。感染症学雑誌. 77 : 1058-1065, 2003
- 5) Nath SK, Shea B, Jackson S, and Rotstein C : Ribotyping of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a Canadian hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 16:717-724, 1995
- 6) Goh S H, Byrne S K, Zhang J L and Chow AW : Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 30:1642-1645, 1992
- 7) Schwarzkopf A and Karch H: Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes : potential and limits for use as epidemiological marker. J Clin Microbiol. 32:2407-2412, 1994
- 8) 山下啓子, 山中志織, 香川昌平, 他：黄色ブドウ球菌の遺伝子多型（第一報）コアグララーゼ遺伝子の疫学マーカーとしての有用性。臨床病理. 43 : 61-66, 1995
- 9) 吉武美佐子, 目野郁子：健康な看護学生の鼻腔から分離された黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンおよびTSST-1産生とコアグララーゼ型別について。西南女学院大学紀要. 7 : 1-6, 2003
- 10) 小島夫美子, 山田巖, 藤本秀士：健康な大学生における黄色ブドウ球菌の鼻腔内保菌状況とそのコアグララーゼ遺伝子型別。九州大学医療技術短期大学部紀要. 28 : 117-122, 2001
- 11) Schmitz FJ, Steiert M, Tichy HV, et al.: Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Dusseldorf by six genotypic methods. J Med Microbiol. 47:341-351, 1998
- 12) Endo H, Higurashi Y, Okuzumi K, et al.: Changes in drug susceptibility and toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures at a university hospital. J Infect Chemother. 10:8-10, 2004
- 13) 石原ともえ, 高橋智恵子, 岡本正孝：健康学生鼻腔由来ブドウ球菌について 第一報 *mec A* 遺伝子保有MRSA・CNSの検出。環境感染. 16 : 125-130, 2001
- 14) 野田公俊：細菌外毒素とその作用機序8. 黄色ブドウ球菌のTSST. 31 : 1485-1488, 1997
- 15) Bonventre PF, Linnemann C, Weckbach LS, et al.: Antibody responses to toxic-shock-syndrome (TSS) toxin by patients with TSS and by healthy *staphylococcal* carriers. J Infect Dis 150:662-666, 1984
- 16) Horikawa K, Murakami K and Kawano F: Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from nares of nurses and their gowns. Microbiol Res. 155:345-349, 2001
- 17) 梅田昭子：黄色ブドウ球菌のヒト鼻腔内への定着。福岡医学雑誌. 88(9) : 307-312, 1997
- 18) Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K, et al.: Analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by a molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms. Epidemiol Infect. 115 : 419-426, 1995

## Epidemiological Study of *Staphylococcus aureus* Isolated from Healthy Student-Nurses: Production of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and Coagulase Gene Typing

Yuko Meno, Misako Yoshitake, Shuji Fujimoto

### <Abstract>

The production of *staphylococcal* enterotoxin (SE) A to D or toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) and coagulase gene typing were examined in 91 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains isolated from nares of healthy student-nurses. Of the 91 isolates, 43 strains (47.3%) produced at least one of the SEA to SED or TSST-1. In the toxin-producing strains, TSST-1 (TSST-1, TSST-1+SEA, TSST-1+SEC), SEA (SEA, SEA+SEB, TSST-1+SEA), and SEB (SEB, SEA+SEB) were detected in relatively high incidence, 46.5%, 41.9% and 34.9%, respectively. Coagulase gene typing was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of coagulase gene and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the PCR products. Among all of the isolates, there were 12 different RFLP patterns (A~L). The 43 toxin-producing strains belonged to 8 patterns (A~F) of the 12 patterns and pattern F (51.2%) was most frequently observed, followed by pattern B (20.9%). Pattern F was seen with most of the TSST-1-producing strains (TSST, TSST+SEA, TSST+SEC) and pattern B was observed in the SEB-producing strains.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, TSST-1, Coagulase gene typing, PCR

Running title: Epidemiological study of *Staphylococcus aureus*