

報 告

Staphylococcus sciuri の薬剤感受性試験判定の注意点 ～ペット由来菌株の例

鴻巣 麻子¹, 高野 真衣¹, 兎澤 理梨¹,
伊藤 慶¹, 難波 俊二¹, 酒井 翔太², 川畑 大輔², 東出 正人³

¹つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

²東京医科大学茨城医療センター 中央検査部

³（株）江東微生物研究所 品質保証部

【要 旨】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*、以下 MRSA）は容易に接触感染するため、院内感染または獣医学の分野でも重要な菌である。メチシリンはペニシリン系の抗菌薬で、現在国内では使用されていない状況であるが、寛用的にメチシリン耐性と表現している。耐性の本質としては MRSA が持つペニシリン結合タンパク質 2'（Penicillin Binding protein 2'、以下 PBP2'）であり、これはペニシリン低親和性であるため、すべての β -ラクタム系抗菌薬に耐性となる。PBP2' は MRSA の染色体に存在し、*mecA* 遺伝子にコードされている。また、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*、以下 *S. aureus*）以外のメチシリン耐性菌も存在する。

MRSA の検出は医師の薬剤選択の重要な判断材料となり、その判断基準も重要である。MRSA の検出法は、1) PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出、2) オキサシリンとセフォキシチンの薬剤感受性試験、3) PBP2' を検出する方法などがある。

我々は、*mecA* 遺伝子の PCR が陽性でありながら、薬剤感受性試験感性、PBP2' 産生が陰性のコアグラゼ陰性ブドウ球菌がペットであるウサギから検出されたため、菌の同定を行った結果、*Staphylococcus sciuri*（以下 *S. sciuri*）が同定された。本菌は祖先型 *mecA* 遺伝子（*mecA* 遺伝子ホモログ）を持つことが先行文献より報告されている。本来は *S. sciuri* はメチシリン感性だが、in vitro の実験で祖先型 *mecA* 遺伝子は抗菌薬に暴露されることにより変異がおこりメチシリン耐性を獲得するという報告がある。近年、ヒト由来の *S. sciuri* で β -ラクタム系抗菌薬に感性を示す菌と耐性を示す菌が海外で少数報告されている。しかしながら国内では *S. sciuri* の β -ラクタム系抗菌薬耐性菌の報告はほぼない。医療機関におけるメチシリン耐性ブドウ球菌は MRSA が最も重要視され、検出率も高い。しかしながら今回のようにペットから MRSA 以外のブドウ球菌で、*S. sciuri* のようなメチシリン耐性菌と感性菌が存在する菌が検出される場合もあり得る。ペットは身近な存在であ

連絡責任者：鴻巣麻子

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋 6-20-1

つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

TEL: 029-826-6000

FAX: 029-826-6937

E-mail: a-kounosu@tius.ac.jp

る。ゆえにヒトへのメチシリン耐性 *S. sciuri* による感染も可能性として考えられる。本研究では感性を示す *S. sciuri* と判明したが、*S. sciuri* が起因菌と考えられる感染症の場合、メチシリン耐性菌とメチシリン感性菌が存在するということを念頭におき、薬剤感受性試験の判断は慎重に行うべきである。

キーワード：mecA 遺伝子, MRSA, ペット, PBP2', *Staphylococcus sciuri*

I. 序論

ブドウ球菌の中でも黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は最も病原性が高いと考えられている¹⁾。さらにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) はすべての β -ラクタム系抗菌薬 (ペニシリンなど β -ラクタム環を構造物にもつ) に耐性であり、容易に接触感染するため、院内感染または獣医学の分野でも重要な菌である。メチシリンはペニシリン系抗菌薬の1つで、1960年代に広く使用されるようになったが、現在は国内では販売中止となっており、使用されていない。MRSAにおけるメチシリン耐性は、実際には β -ラクタム系抗菌薬に耐性という意味であるが、寛用的にメチシリン耐性と表現している。 β -ラクタム系抗菌薬は、その高い有効性と低い毒性により、国内でも広く使用されている抗菌薬である。作用機序は、 β -ラクタム系抗菌薬が細菌の細胞壁ペプチドグリカン合成の最終段階に参与する酵素群であるペニシリン結合タンパク質 (penicillin-binding protein: PBP) のトランスペプチダーゼ活性を阻害することによる²⁾。細菌の細胞壁合成が不完全になると、細菌自体の内圧に耐えられなくなって、細菌は溶解し死滅する。

MRSAの検出法は、1) PCR法 (ポリメラーゼ連鎖反応、Polymerase Chain Reaction、以下PCR) による *mecA* 遺伝子の検出、2) 薬剤 (オキサシリン: MIPIC、セフォキシチン: CFX) 感受性を測定する方法、3) PBP2' (Penicillin Binding protein2': PBP2'、別名PBP2A) を検出する方法などがある。MRSAの染色体に存

在する *mecA* 遺伝子は、ペニシリン低親和性であるPBP2'をコードしており、PCRが陽性であればMIPICやCFXの薬剤感受性は耐性、PBP2'が検出されるはずであるが、我々はPCR陽性でありながらCFXは感性、PBP2'が検出されないというブドウ球菌をペットから分離した。菌を同定した結果、*Staphylococcus sciuri* というコアグラール陰性ブドウ球菌 (coagulase—negative staphylococci: CNS) であり、先行文献によると *mecA* 遺伝子のホモログ (*mecA1*) を持つことが報告されている^{3), 4), 5)}。

MRSAにおける薬剤耐性の遺伝的決定因子である *mecA* 遺伝子は、*staphylococcus cassette chromosome mec* (SCCmec) と呼ばれる可動性遺伝要素で運ばれている^{6), 7), 8)}。*mecA* 遺伝子は *S. aureus* の本来の遺伝子ではなく、MSSA (メチシリン感性黄色ブドウ球菌、Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*、以下MSSA) が原始的なブドウ球菌種である *S. sciuri* から見つかった *mecA* 遺伝子ホモログ (*mecA1*) を獲得したものであると推測されている (図1)。*S. sciuri* の *mecA1* がMRSAの *mecA* 遺伝子と類似性はアミノ酸レベルでは88%であったと報告がある⁴⁾。その後、*S. sciuri* グループである *Staphylococcus fleurettii* の染色体上に *mecA* とヌクレオチド配列で99%以上の相同性を持つ遺伝子 (*mecA2*) も見つかった⁹⁾。Wuらのグループは、*S. sciuri* 菌株をメチシリンに暴露させると遺伝子に変異が入り、メチシリン耐性になる形質導入実験により、抗菌薬感性の *S. sciuri* の *mecA1* がMRSAの病原性株の *mecA* 遺伝子の進化的前駆物質である可能性が考えられると報告している¹⁰⁾ (図1)。

近年、海外の調査によると、患者と医療従事者由来 *S. sciuri* の β -ラクタム系抗菌薬耐性率を調べた結果、患者 195 人中 12 人が耐性 (6.1%)、医療従事者 105 人中 3 人が耐性 (2.9%) であった¹¹⁾。本研究のペット由来 *S. sciuri* は β -ラクタム系抗菌薬に感性であったが、この報告¹¹⁾ のようにヒト由来 *S. sciuri* の中には β -ラクタム系抗菌薬に耐性菌も存在するが、ペットが保有する *S. sciuri* も同様に β -ラクタム系抗菌薬に感性菌も耐性菌も存在することが考えられる。ペットが保有する *S. sciuri* 由来 β -ラクタム系抗菌薬の耐性菌がヒトへと感染する可能性は十分考えられるため、薬剤感受性試験の判定には注意を要する。

II. 材料および方法

1. 対象動物および検体

本研究内容を理解し同意を得た学生が飼育しているウサギ（1匹）の糞便検体から菌を分離

した。ウサギは9歳、2.9Kg、室内ケージ内で飼育、飼料は市販のウサギ用ペットフード（RABBIT PLUS）である。

2. 検体の分離・培養、同定

ウサギの糞便を白金耳で少量採取し、滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁させ、その溶液を 1 白金耳分、普通寒天培地（栄研化学株式会社；以下栄研、東京）、血液寒天培地（栄研）を用い 37℃、18 時間培養した。分離された集落についてはグラム陽性菌か陰性菌かを判別するためグラム染色を行った。次にグラム陽性球菌の集落に対しカタラーゼ試験を行った。ブドウ球菌属を疑うカタラーゼ陽性菌の集落を ID32 staph（バイオメリュー・ジャパン株式会社；フランス）を用い、手順書に従い同定した。ID32staph で同定を行ったが、さらに同定を確実にするために質量分析装置 MALDI Biotyper（ブルカー・ジャパン株式会社、神奈川）による同定検査を追加した。

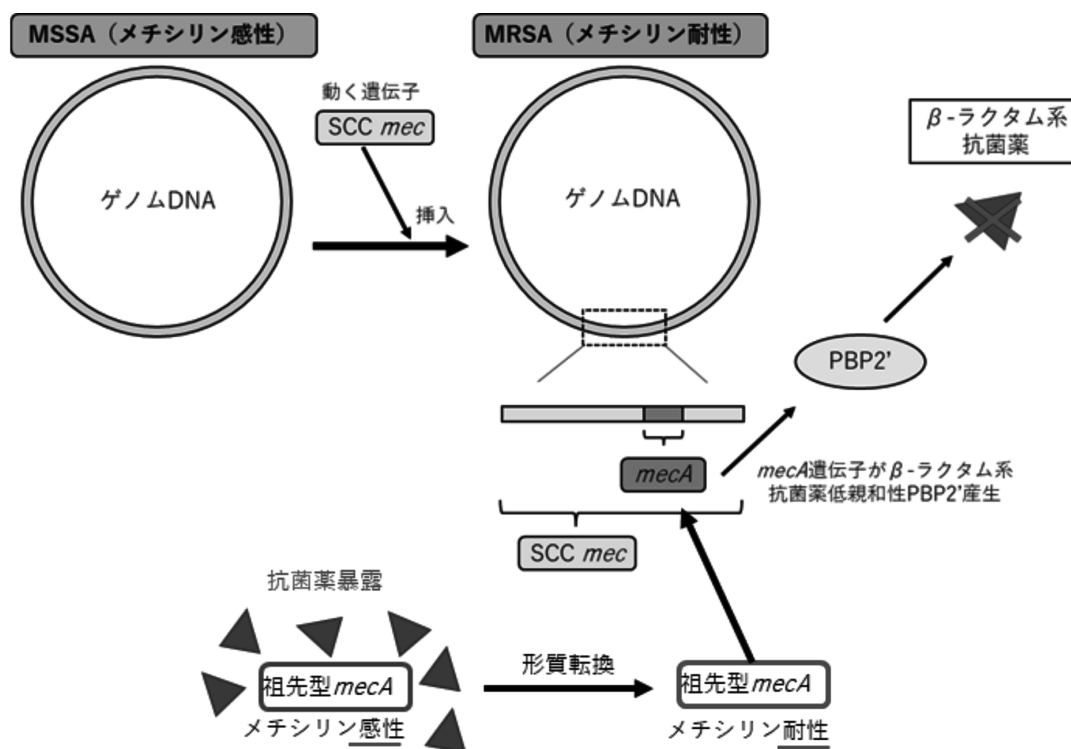


図1. メチシリン耐性獲得の模式図

3. PCR法による *mecA* 遺伝子の検出

分離培養した *S. sciuri* のコロニーから InstaGene Matrix DNA 精製キット（BioRAD、アメリカ）を用いてDNAを抽出し、以下の通りにPCRを行った。コントロール検体としてMRSA、MSSAのPCRも行った。

PCR反応液は、*S. sciuri* 由来DNA 20 μ L、 $\times$ 10 Buffer 5 μ L、dNTPmix 4 μ L、PrimerP4（100 pmol/ μ L）2 μ L、PrimerP7（100 pmol/ μ L）2 μ L、*Taq* DNA Polymerase（タカラバイオ、滋賀県）0.25 μ L、滅菌水 16.75 μ L、合計50 μ Lとした。尚、*mecA* をコードしているプライマー配列は以下である。PrimerP4：TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G、PrimerP7：CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG、PCR反応により増幅される目的のバンドは162bpである¹²⁾。PCR反応は95℃、60秒、55℃、60秒、72℃、90秒を30サイクル行った。10 μ LのPCR産物に2 μ Lの6x loading buffer（タカラバイオ）を添加し、1 x TBE（Tris-borate EDTA）で作成した2.5% Agarose gel（funakoshi、東京）を用いた。GelGreen 核酸蛍光染色試薬（コスモ・バイオ株式会社、東京）はあらかじめAgarose gelに1/1000量添加済みである。分子量マーカーは100bp DNA ladder（タカラバイオ）を用いた。50V、1.5時間泳動を行ったあと、電気泳動装置で撮影した。

4. 薬剤感受性試験（ディスク法）と判定

薬剤感受性試験（ディスク法）において、MRSAの判定はCLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI）M100, 31st ed.¹³⁾に準拠した。メチシリン耐性判定基準は *Staphylococcus* 属の菌種により異なり、*S. aureus* と *Staphylococcus lugdunensis* に対してディスク法ではCFXの阻止円 $\leq$ 21mmで耐性、微量液体希釈法ではMIPIC MIC（最小発育阻止濃度、Minimum Inhibitory Concentration、以下MIC）が $\geq$ 4 μ g/mL、CFXがMIC値 $\geq$ 8 μ g/mLで耐

性となっている。また *S. sciuri* に対してディスク法ではCFXの阻止円 $\leq$ 24 mmで耐性、微量液体希釈法ではMIPICのMIC値が $\geq$ 1 μ g/mLで耐性となっている。

純培養した *S. sciuri* およびコントロールとしてMRSA、MSSAのコロニーの菌液をMcFarland標準濁度0.5の濃度になるように濁度計にて調整し、検体懸濁液を調整した。検体懸濁液をミューラー・ヒントンス寒天培地（栄研）に塗布した。薬剤ディスクはCFXを培地に置き、37℃、16時間培養後、阻止円を測定した。

微量液体希釈法は主にMRSAに使用されることが多いため、市販のパネルは2 μ g/mLの濃度の次は0.25 μ g/mLとなるため、*S. sciuri* の判定基準である $\geq$ 1 μ g/mLが測定できないため、省略した。

5. PBP2' の検出

ブドウ球菌がもつPBP2'の検出をQライン極東（極東製薬工業株式会社、東京）にて行った。これはイムノクロマト法を測定原理とし、菌体中のPBP2'をテストプレートに含まれるモノクローナル抗体で検出するものである。

付属のチューブに2mLの抽出液を5滴加え、*S. sciuri* およびMRSA、MSSAの菌株を培養した普通寒天培地上のコロニーを1白金耳採取し抽出液に懸濁した。この懸濁液を60 μ Lテストプレートに滴下し結果を判定した。陽性はテストライン（T）とコントロールライン（C）の両方に赤紫色のラインが目視できるもの、陰性はコントロールライン（C）のみ赤紫色のラインが目視できるものとする。

6. MRSA 選択培地での発育

MRSA 選択培地（極東）にはCFXが含まれており、*S. sciuri* およびMRSA、MSSAの菌株を本培地に摂取し、37℃、16時間培養した。

Ⅲ．結果

1. 検体の分離・培養、同定

ウサギ糞便より分離培養されたグラム陽性球菌、カタラーゼ陽性菌のブドウ球菌属を疑う集落につき、ID32 staph および質量析装置 MALDI Biotyper にて同定検査を行い *S. sciuri* であると確定した。

2. PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出

PCR 反応後の電気泳動を示す（図 2）。*S. sciuri* と MRSA のみ目的である 162bp のバン

ドが検出された。MRSA は *mecA* 遺伝子配列、*S. sciuri* は *mecA* 遺伝子ホモログ配列をもつことが分かった。MSSA はバンドが検出されなかったため、*mecA* 遺伝子配列またはそのホモログ配列を持たないことがわかった。

3. 薬剤感受性試験（ディスク法）と判定

ディスク法において、メチシリン耐性の判定薬剤である CFX の *S. sciuri* の阻止円は 26mm であった（図 3）。これは CLSI M100, 31st ed. の判定基準では感性であった。また、コントロールとして MRSA の阻止円は 18mm で耐性、MSSA の阻止円は 29mm で感性であった。

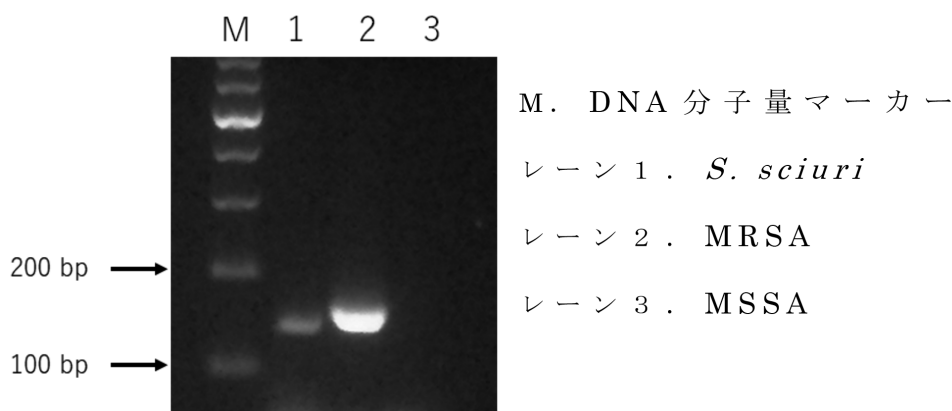


図 2. PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出

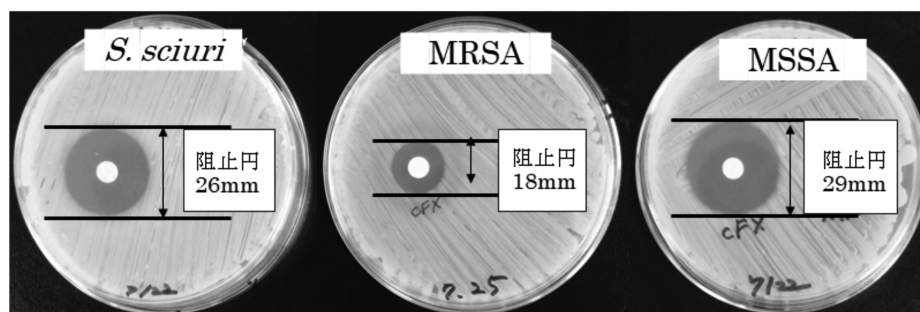


図 3. CFX ディスク法による薬剤感受性試験

4. PBP2' の検出

MRSA、MSSA、*S. sciuri* の Q ライン極東のテストプレートの結果（図4）を示す。*S. sciuri* と MSSA は PBP2' 陰性、陽性は MRSA のみであった。

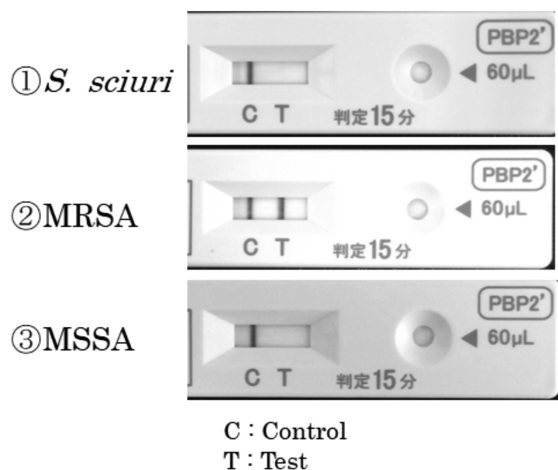


図4. PBP2' の検出結果

5. MRSA 選択培地での発育

MRSA 選択培地の発育は MRSA のみ認められ、*S. sciuri* と MSSA において発育は認められなかった（図5）。

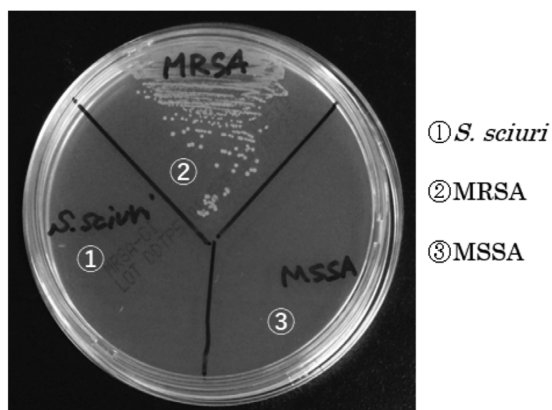


図5. MRSA 選択培地の培養結果

6. 倫理的配慮について

本研究は、愛玩動物（ペット）が対象であり、糞便に付着する菌を採取したため、動物に対する実験的処置は行っていない。しかしながら、

本学の教員、学生の飼育する愛玩動物であるため、つくば国際大学倫理委員会にて承認を得た【承認番号 R05-15】。記録の保管場所は、研究代表者の研究室（B202）にて、紙面および電子媒体にて鍵付き書庫に保存している。検体提供にあたり、研究の同意書、同意撤回書、および匿名性などには十分な説明を行った。

IV. 考察

本研究では、*Staphylococcus* 属のメチシリン耐性の同定の際の判断基準に矛盾があった菌に注目し調査を行った。結果、ウサギの糞便から分離された *S. sciuri* で *mecA* 遺伝子検出のための PCR 反応で陽性、 β -ラクタム系抗菌薬に感性という矛盾する結果が出た。*S. sciuri* は *mecA* 遺伝子とホモログをもつ祖先型の *mecA1* 遺伝子を持つため、PCR 反応で陽性になったと考えられる。進化的には、MRSA の *mecA* 遺伝子は *S. sciuri* のような原始的なブドウ球菌グループが持つ *mecA* 遺伝子ホモログが抗菌薬に暴露されることにより変異がおこり、PBP2' が産生されるようになり、SCC カセットによって MSSA に挿入されたと推測されている¹⁴⁾（図1）。

本研究で検出されたペット由来 *S. sciuri* はメチシリン感性であったが、ヒト由来の *S. sciuri* でメチシリン耐性菌が海外で報告されている¹¹⁾。同様にペット由来の *S. sciuri* もメチシリン耐性菌の存在が考えられ、ヒトへの伝播の可能性もあり得る。ヒトにおける *S. sciuri* 感染症の報告例は国内外でも非常にまれである¹⁵⁾。さらに *S. sciuri* のメチシリン感性和耐性の両タイプの菌株が存在することは、国内において報告もほほないため、あまり認識されていない。もし *S. sciuri* が感染症の起因为菌として検出された際には、菌株により β -ラクタム系抗菌薬に対する感受性が異なるため、薬剤感受性試験の判定には十分な注意が必要である。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

謝辞

本報告は、江東微生物研究所の支援を受け、つくば国際大学の学生の飼育するペットの検体の解析を基にした研究であり、協力していただいた皆様に感謝申し上げます。

文献

- 1) 国立感染症研究所：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症 1999年4月～2022年12月病原微生物検出情報（IASR）. 45(3)：33-44, 2024.
- 2) Ghuysen J. M: Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Trends Microbiol. 2: 372-380, 1994.
- 3) Couto I, de Lencastre H, Severina E, et al: Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. Microb Drug Resist. 12 (4): 377-391, 1996.
- 4) Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, et al. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. Microb Drug Resist. 2 (4): 435-441, 1996.
- 5) Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, et al: Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infection & Chemotherapy. 45: 117-136, 2013.
- 6) Katayama Y, Ito T, and Hiramatsu K: A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 44: 1549-1555, 2000.
- 7) Boundy S, Safo M. K, Wang L, et al: Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA methyltransferase encoded by *orfX*, the gene containing the staphylococcal chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) insertion site. J Biol Chem. 288: 132-140, 2013.
- 8) Rolo J, Worning P, Nielsen J B, et al: Evolutionary Origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). Antimicrob Agents Chemother. 61 (6): 1-16, 2017.
- 9) Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, et al: Origin and Molecular Evolution of the Determinant of Methicillin Resistance in Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 54 (10): 4352-4359, 2010.
- 10) Wu S W, de Lencastre H, and A Tomasz: Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 183 (8): 2417-2424, 2001.
- 11) Cirkovic I, Trajkovic J, Hauschild T, et al: Nasal and pharyngeal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* among hospitalised patients and healthcare workers in a Serbian university hospital. PLOS ONE. September 19, 1-11. 2017.
- 12) Oliveira D. C, and de Lencastre H: Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 46 (7): 2155-2161, 2002.
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance (2021) Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-ED, 31st Edition (nih.org.pk) <https://www.treata.academy/wp-content/uploads/2021/03/CLSI-31-2021.pdf>（閲覧日：

- 2024 年 8 月 14 日)
- 14) Miragaia M: Factors Contributing to the Evolution of *mecA*-Mediated β -lactam Resistance in Staphylococci: Update and New Insights From Whole Genome Sequencing (WGS). Frontiers in Microbiology. 9: 1–16, 2018.
- 15) Meservey A, Sullivan A, Wu C. et al: *Staphylococcus sciuri* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis. Zoonoses Public Health. 67 (1): 93-95, 2020.

Report

Caution regarding the criteria for determining drug susceptibility tests in *Staphylococcus sciuri*: examples of bacteria from pets

Asako KOUNOSU¹, Mai TAKANO¹, Riri TOZAWA¹, Kei ITO¹, Shunji NAMBA¹,
Shota SAKAI², Daisuke KAWAHATA², Masato HIGASHIDE²

¹ Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Tsukuba International University

² Clinical Laboratory Division, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center

³ Koto Biken Medical Laboratory inc. Department of Quality Assurance

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterium that is important in hospital infections and veterinary medicine because it is easily transmitted via contact. Methicillin is a penicillin-based antibiotic that is not used in Japan today, but is customarily referred to as methicillin-resistant. The basis of resistance is the penicillin binding protein 2' (PBP2') that MRSA possesses, which has low affinity for penicillin; therefore, MRSA is resistant to all β -lactam antibiotics. PBP2' is present on the chromosome of MRSA and is encoded by the *mecA* gene. Besides *S. aureus*, other methicillin-resistant bacteria are found in the *Staphylococcus* genus.

Detection of MRSA is an important factor that doctors consider to select drugs, and criteria for such selection are also important. Methods for detecting MRSA include 1) detection of the *mecA* gene by PCR, 2) oxacillin and cefoxitin susceptibility tests, and 3) detection of PBP2'.

We investigated a coagulase-negative *Staphylococcus* strain detected in a pet rabbit that was positive for the *mecA* gene using PCR but was negative in drug susceptibility tests and for PBP2' production; as a result, *Staphylococcus sciuri* was identified. Previous literature has shown that it has an ancestral *mecA* gene (*mecA* gene homolog), and methicillin-susceptible bacteria have been reported. *S. sciuri* is basically methicillin susceptible; however, in vitro experiments have shown that the ancestral *mecA* gene mutates when exposed to antibiotics, resulting in methicillin resistance. In recent years, human-derived *S. sciuri* strains that are sensitive to and resistant to β -lactam antibiotics a few cases have been reported overseas. On the other hand, there have been almost no reports of β -lactam antibiotic resistance in *S. sciuri* in Japan. In medical institutions, MRSA is the most important methicillin-resistant *staphylococcus*, and its detection rate is high. However, as in this case, there are cases where *staphylococcus* other than MRSA, such as *S. sciuri*, which exists as both methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains, is detected in pets. Pets are familiar to us. Therefore, infection by methicillin-resistant *S. sciuri* in humans is also a possibility. In this study, it was found that *S. sciuri* was susceptible, but in cases of infections thought to be caused by *S. sciuri*, it should be kept in mind that both methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains exist, and drug susceptibility testing should be performed with caution.

Keywords: *mecA* gene, MRSA, pets, PBP2', *Staphylococcus sciuri*