

原著

半年間で同一遺伝子型の MRSA
感染症を呈した 4 小児例渡部 達¹⁾ 石原由華²⁾

要旨 今回われわれは半年間に当科に入院した MRSA 感染症例がすべて同一遺伝子型によるものであった 4 症例を報告する。すべての菌株で phage open reading frame typing (POT) 法により, POT104-9-2, pulsed field gel electrophoresis で一致, SCC (staphylococcal cassette chromosome) *mec* IVc, Panton Valentine leukocidin (PVL) が陰性, toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 陽性, staphylococcal enterotoxin type C の community acquired MRSA (CA-MRSA) であった。近年 CA-MRSA 感染症が小児領域において増加しており, 若干の考察を加えて報告する。

はじめに

近年 community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) が小児領域において増加している¹⁾。CA-MRSA は従来の MRSA とは異なり, 市中で感染を拡大・流行し, 小児においても致死的な疾患を, 数は少ないが起こし得る。しかしながら日本における小児 CA-MRSA の感染疫学は不明である。今回われわれは, 半年間に当科で入院加療した MRSA 感染症小児例がすべて同一の遺伝子型によるものであった 4 例を経験したので報告する。

I. 症例呈示 (表 1)

1. 症例 1: 3 歳 11 カ月, 男児

主訴: 右上腕腫脹。

既往歴: 乳児期からアトピー性皮膚炎があり,

2 歳時に伝染性膿痂疹に 2 回罹患したことがある。

現病歴: 第 1 病日から右上腕の熱感, 腫脹, 微熱があり, 徐々に腫脹が増悪し, 第 6 病日から cefditoren-pivoxil (CDTR-PI) の内服を開始した。第 8 病日に 39°C の発熱があり, 精査加療を目的に入院となった。

入院時現症: 体重 14 kg, 心拍数 100 回/分, 呼吸数 22 回/分, SpO₂ 98% (室内気), 体温 38.5°C であった。全身状態は良好であった。頸胸腹部に異常はなかった。右上腕の熱感, 腫脹, 疼痛を認めた。

入院時検査所見: 血液検査では WBC 17,200/ μ l (好中球 62%), CRP 6.1 mg/dl と炎症反応の上昇を認め, 肝腎機能は正常であった。鼻前庭と血液培養は陰性であった。

入院後経過: 全身状態は良好であり, ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT) 投与を開始した。解

Key words: 市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, 白血球溶解毒素, staphylococcal cassette chromosome *mec*, phage open reading frame typing, 毒素ショック症候群毒素-1

1) 磐田市立総合病院小児科

[〒438-0002 磐田市大久保 512-3]

2) 椋山女学園大学看護学部

表 1 患者情報①

Case	Age	Sex	Diagnosis	Lesion	WBC (/ μ l)	CRP (mg/dl)	Antibiotics, days
1	3 y 11 m	Male	Abscess	Right upper arm	17,200	6.1	DRPM 10 CLDM 8
2	10 y 3 m	Male	Cellulitis	Left upper arm	16,200	4.4	LZD 12
3	8 y 5 m	Male	Abscess	Right groin	6,500	0.1	LZD 8 MINO 7
4	Day 20	Male	Sepsis	Blood	10,200	1.2	VCM 14

Y : year, m : month, DRPM : doripenem, CLDM : clindamycin, LZD : linezolid, MINO : minocyclin, VCM : vancomycin

熱傾向ではあったが、入院5日目に再発熱を認め、右上腕に腫瘍を認めたため、MRI 検査を行い、右上腕皮下膿瘍と診断した。切開排膿ドレナージを行い、同部位の迅速塗抹検査ではブドウ状のグラム陽性球菌を認めたため、ABPC/SBT を doripenem (DRPM) に変更した。その後、速やかに解熱を認めた。膿の培養検査で MRSA が検出された。DRPM の感受性は sensitive であったが、MRSA に対して自然耐性とされているため、clindamycin (CLDM) の併用も開始した。D-zone test は陰性であった。入院9日目に CRP 0.4 mg/dl と改善しドレーン抜去とした。入院13日目に CRP 陰性化を確認し、DRPM を計10日間、CLDM を8日間投与後、tebipenem pivoxil (TBPM-PI) 内服へ切り替え、14日目に退院となった。その後再発は認めていない。

2. 症例2 : 10歳3カ月, 男児

主訴 : 左上腕腫脹。

家族歴 : 父と妹がアトピー性皮膚炎である。

既往歴 : 乳児期からアトピー性皮膚炎があり、5歳時に右大腿部の MRSA 皮下膿瘍で当科入院歴がある。10歳時に伝染性膿痂疹の罹患歴もある。

現病歴 : 第1病日からの左上腕の掻痒、第6病日から同部位の発赤・腫脹・熱感・疼痛を認めた。第8病日に腫脹が増悪してきたため、当科を受診して、左上腕蜂窩織炎の診断で入院となった。

入院時現症 : 体重 33 kg, 心拍数 100 回/分, 呼吸数 22 回/分, SpO₂ 98% (室内気), 体温 38.4°C であった。全身状態は良好であった。頸胸腹部に異常はなかった。右下肢に掻破痕を認めた。左上腕は発赤、腫脹、熱感、疼痛を伴っていた。

入院時検査所見 : 血液検査では WBC 16,200/ μ l (好中球 66%), CRP 4.4 mg/dl, と炎症反応の上昇を認め、肝腎機能は正常であった。血液培養は陰性であったが、鼻前庭と左上腕の滲出部位から MRSA が検出された。

入院後経過 : 入院後左上腕 MRI 検査では、蜂窩織炎の所見を認めた。治療薬としては腎機能障害が少なく、therapeutic drug monitoring が不要で、組織移行性がよく、内服への切替が可能である linezolid (LZD) の投与を開始した。入院2日目には解熱を認め、左上腕の炎症所見も徐々に改善を認めた。左上腕滲出部位から MRSA が検出され、その minimum inhibitory concentration (MIC) 値は LZD 2 μ g/ml であった。入院6日目に CRP の陰性化を認め、7日目に LZD 内服へ変更して退院した。計12日間 LZD 内服とした。その後再発は認めていない。

3. 症例3 : 8歳5カ月, 男児

主訴 : 右鼠径部腫脹。

家族歴 : 妹がアトピー性皮膚炎である。

既往歴 : 特になし。

現病歴 : 第1病日から右鼠径部発赤があり、第3病日から同部位の腫脹・疼痛を認めた。CDTR-PI 内服を開始され、第6病日に発熱、第13病日に当科を受診して、右鼠径部穿刺、排膿を施行し、TBPM-PI 内服を開始した。第15病日に膿培養で MRSA が検出され、右鼠径部膿瘍と化膿性リンパ節炎の診断で入院となった。

入院時現症 : 体重 25 kg, 心拍数 97 回/分, 呼吸数 20 回/分, SpO₂ 97% (室内気), 体温 36.4°C であった。頸胸部に異常はなかった。四肢に掻破

表 2 患者情報②

Case	POT	SCC <i>mec</i>	PVL	ETA	ETB	TSST-1	SEA	SEB	SEC	SED
1	104-9-2	IVc	-	-	-	+	-	-	+	-
2	104-9-2	IVc	-	-	-	+	-	-	+	-
3	104-9-2	IVc	-	-	-	+	-	-	+	-
4	104-9-2	IVc	-	-	-	+	-	-	+	-

PVL: Panton Valentine leukocidin, ETA: exfoliative toxin A, ETB: exfoliative toxin B, TSST-1: toxic shock syndrome toxin-1, SEA: staphylococcal enterotoxin A, SEB: staphylococcal enterotoxin B, SEC: staphylococcal enterotoxin C, SED: staphylococcal enterotoxin D

痕を認めた。右鼠径部に約3 cmの発赤、腫脹、熱感、疼痛を認めた。

入院時検査所見: 血液検査ではWBC 6,500/ μ l (好中球40%), CRP 0.1 mg/dlであり、肝腎機能は正常であった。血液培養は陰性であった。

入院後経過: 右鼠径部MRI検査では、膿瘍を伴う化膿性リンパ節炎の所見を認めた。LZDの点滴投与を開始し、右鼠径部の腫脹・硬結は改善した。入院4日目にLZDの内服へ変更して退院となった。計8日間の投与で肝機能障害を認め、minocyclin (MINO) の1週間投与へ変更した。その後は再燃なく軽快した。

4. 症例4: 日齢20, 男児

主訴: 発熱。

家族歴: 兄が高IgE血症(アトピー性素因)で当院かかりつけであり、本児発症の2カ月前に伝染性膿痂疹に罹患した。鼻前庭にMRSAを保菌していた。

既往歴: 39週3日, 2,720 g当院で出生した。その後完全母乳栄養である。

現病歴: 第1病日に発熱を認め、当院受診した。新生児発熱に対して精査加療を目的に入院した。

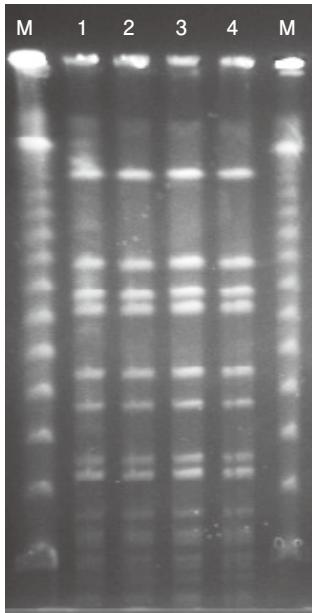
入院時現症: 体重3,000 g, 心拍数166回/分, 呼吸数40回/分, SpO₂ 95% (室内気), 体温39.3°Cであった。全身状態は比較的良好であった。頸胸腹部に異常はなかった。

入院時検査所見: 血液検査ではWBC 10,200/ μ l (好中球30%), CRP 1.2 mg/dlと軽度炎症反応の上昇を認めた。肝腎機能は正常であった。

入院後経過: 全身状態は良好であったが、炎症反応の軽度上昇からは細菌感染を完全には否定できず、当科で細菌感染症に対して第一選択薬とし

てルーチンに使用しているpiperacillin (PIPC)投与を開始した。入院2日目に血液・鼻前庭・尿・便培養検査からすべてMRSAが検出された。入院時にはみられなかった左下腿の腫脹・発赤も出現し、MRI検査により左下腿蜂窩織炎と診断した。同日からvancomycin (VCM)投与を開始し、入院7日目に左下腿に膿瘍形成を認めたため、切開排膿ドレナージを併用し、解熱と臨床症状の改善を認めた。左下腿排膿液や母の腔・母乳培養からもMRSAが検出され、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)により母と児のMRSA菌株が一致した。VCMの感受性はsensitiveで、MIC値は1 μ g/mlであった。13日目にCRP 0.3 mg/dlと改善し、計14日間のVCM投与後に退院となった。原発性免疫不全症は各種検査(好中球殺菌能・貪食能, IgGサブクラス, T・B細胞比率, PHAリンパ球幼若化試験)で否定され、排尿時膀胱尿道造影検査では明らかな膀胱尿管逆流症はなかった。退院後再発は認めておらず、成長発達は順調である。

症例1~4の菌株の薬剤感受性結果では、MIC値はABPC/SBT 4, meropenem \leq 2, CLDM \leq 0.25, VCM 1, LZD 2 μ g/mlと、その他の薬剤に関してもすべて同一値を示していた。さらにCica Geneus Staph POT (phage open reading frame typing) Kitを用いてタイピングすると、すべてPOT104-9-2であり、同一遺伝子型であった。Panton Valentine leukocidin (PVL)はすべて陰性であり、staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec*はPCR法による解析ですべてIVcであった(表2)。菌培養上清の10倍希釈を被検液



M: λラダー, 1, 2, 3, 4

図 パルスフィールド電気泳動法

として、ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット、ブドウ球菌 TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1) 検出用キット、ブドウ球菌表皮剥脱毒素検出用キット (デンカ生検株式会社, 東京) を用いて凝集反応を行い、各菌株の産生するエンテロトキシン型と TSST-1 産生性を調べた。TSST-1 はすべて陽性, staphylococcal enterotoxin (SE) A, B, D は陰性, SEC は陽性, exfoliative toxin (ET) A, B は陰性であった。さらに PFGE では 1, 2, 3, 4 レーンすべて同一の株と考えられた (図)。

II. 考 察

4 症例はすべて同一市内に居住しており、すべての菌株の薬剤感受性検査で MIC 値は同一、PVL は陰性, SCC *mec* は IVc であり, POT 法, PFGE により同一遺伝子株であることが判明した。当院に MRSA 感染症の入院が短期間の間に続いたことは前例がなく、市内で同一遺伝子型による CA-MRSA が何らかの形で流行していたものと思われた。CA-MRSA は高病原性型として蔓

延し問題視されており、日本においても近年注目されてきている。米国の報告では、CA-MRSA が感染する部位として皮膚・軟部組織が 87~96% で最も多く、他に骨・関節, 呼吸器系, 菌血症, 尿路系が、それぞれ 1~4% 程度で存在する²⁾。わが国で分離される CA-MRSA の菌株は、ほとんどの場合白血球溶解毒素 (PVL) は産生しないといわれており³⁾、本 4 症例においても同様であった。CA-MRSA が注目され始めた当初から、重症感染症患者より分離された CA-MRSA 株の多くが PVL を産生することから、CA-MRSA の病原性と PVL との関連が指摘されている。PVL は好中球溶解毒素の一種であり、MRSA から分泌されると好中球に作用し、好中球の融解・壊死を誘導する。その結果、好中球を破壊し、感染宿主の免疫力を下げることで病原性を発揮すると考えられている³⁾。最近では PVL 陽性の菌株が日本でも分離されており、小児領域でもこうした菌株の存在に注意が必要である。

MRSA は遺伝的背景の研究から多くの系統が存在することが判明しており、もともと methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) が、耐性遺伝子である *mecA* を獲得したことによって発生したと考えられている。MRSA の系統は、*mecA* 遺伝子が挿入されたゲノムそのものの系統と、*mecA* 遺伝子を黄色ブドウ球菌に運び込む SCC *mec* のタイプとの組合せで決まる⁴⁾。SCC *mec* は染色体上の特定の領域に自由に入り込むことのできる可動性遺伝子であり、メチシリン耐性に関与している *mecA* 遺伝子、特定の場所への挿入に関与する組換え遺伝子、そのほかにインサクション配列 (IS) 431 やトランスポゾン (*Tn*) 554 など構成されている⁵⁾。近年欧米ならびに日本でも増加している CA-MRSA の起源は、MSSA が SCC *mec* を新たに獲得したことによるという説が唱えられるようになり、SCC *mec* typing (I~VIII) が注目されるようになってきた。SCC *mec* のタイプは、*ccr* 遺伝子複合体のアロタイプの違いと *mec* 遺伝子複合体の組合せから定義される。Type-2 *ccr* 遺伝子複合体と class B *mec* 遺伝子複合体をもつ SCC *mec* を、type-IV SCC *mec* と呼んでいる⁶⁾。CA-MRSA は SCC *mec* IV, V

をもつことが多いとされており、日本においてもほとんどの CA-MRSA が SCC *mec* IV をもっていると考えられている。SCC *mec* は、J-領域 (SCC *mec* 内の *mec* 遺伝子複合体と *ccr* 遺伝子複合体以外の領域) の塩基配列の違いによりさらに subtype に分けられており、本 4 症例は細分類で IVc であった。多くの CA-MRSA が有する type-IV の遺伝子サイズが、他の type と比べて小さく耐性遺伝子の数が少ないため、一般的に CA-MRSA は多くの薬剤に良好な感受性を示すといわれており、本 4 症例でも薬剤感受性は良好で重症化する例はなかった。

POT 法は、もともと MRSA 院内感染が疑われた際に、容易に分子疫学解析を実施することを目的に開発された迅速法で、分離株が同一か否かを判定することに主眼が置かれている。PFGE は時間・労力・コストがかかるが、POT 法は 3~4 時間で結果が得られ、院内感染対策に有用である。POT 法は multiplex PCR による分子疫学的解析法であるため、通常の PCR を実施する機器が必要となる。POT 型は、POT1-POT2-POT3 と 3 つに分けて記述する。同一株では POT1-POT2-POT3 と 3 つの数値すべてが一致するとされており、本 4 症例では POT104-9-2 ですべて同一であった。POT1 の値と日本で分離される MRSA クロンの関係⁴⁾から、POT1 の値が 104 である場合は SCC *mec* は type IV となり、同一クロンの集団 (clonal complex: CC) は 12, 59, 72, 78, 89 と多様であるとされている。MRSA のゲノムそのものの系統を決めるためには、multi locus sequence typing (MLST) が利用される。MLST では、7 つの遺伝子領域のうち 5 つが完全に同じ塩基配列である場合、近縁にあると考えて「同じ CC に属している」とされる⁴⁵⁾。本 4 症例は CC までは検索できていないが、POT 型の 3 つの数値のうち、株を識別している部分である POT2 と POT3 が同一であったため、同一遺伝子型である可能性が高いと考えた。POT2 と POT3 の部分は主にファージを構成する open reading frame (ORF) の保有パターンから計算されている。また POT1 の数値は SCC *mec* 関連 ORF の検出結果と genomic islet (ゲノム内のところどころにある

ORF 1 から数個から構成される菌株ごとに保有状態の異なる小領域) の保有パターンの組合せから計算されるため、MRSA クローンと相関があり、この数値から検査した下部の MRSA クロンの大まかに推定できる^{4,7)}。したがって POT1 の数値が異なる株の場合、両者は遺伝的に遠いと考えられる。POT 値が同じでもそれに対応する CC が多型なため、厳密に言えば 4 症例の株は異なる可能性もある。この点については POT 法の限界である。院内感染対策としては、POT 値が同じであれば高確率で遺伝子的に同じ株と判断可能である。市中感染対策として POT 法を使用する場合は、対象となる地域が広がるため、院内で使用するより判別能の低下が危惧される。しかし本 4 症例は POT1~3 の値がすべて同一で、かつ 4 症例が同一市内に居住していたことから、疫学的関連の高い同一遺伝子株であったと考えた。症例 1 と 4 は当院出生で、症例 2 は MRSA 皮下膿瘍で当科入院歴あり、症例 3 は急性中耳炎で 7 年前に当科へ 1 度受診をされていた。同一市内ではあったが居住地域は離れており、同一保育園であるなどの共通点は見出せなかった。そのため、CA-MRSA ではあるが、当院との関連性がわずかにあったことから、医療関連の MRSA の可能性も示唆された。菌株間の関連性を調べる方法として coagulase 型別、enterotoxin 型別、TSST-1 産生性などの表現型タイピングや sequencing などがあるが、クロンの関連性を特定するには PFGE が最も有効であるとされている⁸⁾。そのため、4 菌株について PFGE を行い、4 菌株すべて同一であることを確認した。当病院を含めた本市において同一種の菌株が蔓延していることが示唆・危惧された。

TSST-1 は *Staphylococcus aureus* が産生する蛋白性の菌体外毒素であり、スーパー抗原として T 細胞を活性化することにより、炎症性サイトカインを産生する。そのため、MRSA は TSST-1 の産生率の低い MSSA よりも病原性が強い点として重要である。2005 年の東京都内小児患児から分離された MRSA 2,871 株の毒素産生報告のなかで TSST-1 と SEC 産生株が 80% 以上にみられたとされている⁹⁾。SEC と TSST-1 は同じ pathogenicity island (SaPI_n1) の領域に共存していると考え

られ、これは MRSA のゲノム株である N315 のゲノム上に存在する pathogenicity island である¹⁰⁾。さらにすべての株で CA-MRSA に特徴的な ETA, ETB を有していなかった。ゲノム中に毒素遺伝子などが連なって挿入されている部分があり、これらの遺伝子群は、もともとのゲノムには存在せず外来性である。病原性にかかわる genomic island の場合、pathogenicity island と呼ばれ、機能不明の外来性遺伝子群や SCC *mec* も genomic island の一種である⁴⁾。同一クローンにおける保有 genomic island や genomic island 内の多様性は高くないとされている。本 4 症例では POT 法によるスコアと毒素遺伝子が同一であった。PFGE によりさらに同一菌株であることを確認したが、われわれの症例からは POT 法と毒素遺伝子が一致すれば、同一菌株である可能性が高くなると思われた。以上より、POT 法・PFGE により同一地域内で同一菌株が流行していることが示され、当地域における小児 MRSA 感染症の流行に対して懸念が示された。

結 語

MRSA 同一遺伝子株により、異なる時期に皮下膿瘍や蜂窩織炎などの感染症を発症した 4 小児例を経験した。分子疫学的解析の進歩により、小児 MRSA 感染症に対するさらなる感染症学の蓄積が望まれる。

謝辞：MRSA 菌株の各種毒素検査、遺伝子検査を行っていただいた東京都立小児医療センター感染症科科長 堀越裕歩先生、名古屋大学名誉教授・相山女園大学看護学部教授 太田美智男先生、順天堂大学医学部感染制御科学助教授 上原由紀先生に深謝申し上げます。論文作成に関してご助言をいただ

いた愛知県衛生研究所主任研究員 鈴木匡弘先生に深謝申し上げます。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 山本達男, 他: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA). *モダンメディア* 54: 27-35, 2008
- 2) Deleo FR, et al: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375: 1557-1568, 2010
- 3) 山口哲央: 院内感染型 MRSA と市中感染型 MRSA. *Mecical Technology* 39: 540-545, 2011
- 4) 鈴木匡弘: Cica Geneus Staph POT Kit の原理とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学. *THE CHEMICAL TIMES* 3: 16-21, 2011
- 5) 長尾美紀, 他: MLST などによる MRSA の分子疫学. *日臨微生物誌* 17: 159-167, 2007
- 6) 伊藤輝代, 他: 市中感染型 MRSA の遺伝子構造と診断 (最新の知見). *感染症誌* 78: 459-469, 2004
- 7) Holden MT, et al: Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *PNAS* 101: 9786-9791, 2004
- 8) 北元憲利, 他: パルスフィールド核酸電気泳動法によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学調査. *感染症誌* 79: 129-137, 2005
- 9) 遠藤美代子, 他: 都内小児科定点病院において分離された黄色ブドウ球菌の型別成績 (1993~2004). *東京健安研七報* 56: 35-39, 2005
- 10) Kuroda M, et al: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 21 (357): 1225-1240, 2001

**Four pediatric cases caused by the same MRSA genomic typing
during a six month period**

Toru WATANABE¹⁾, Yuka ISHIHARA²⁾

¹⁾*Department of Pediatrics, Iwata City Hospital*

²⁾*Sugiyama Jogakuen University*

Four pediatric cases caused by the same MRSA genomic typing during a six month period were reported. All isolates had the same phage open reading frame typing (POT) 104-9-2, consistency by pulsed field gel electrophoresis, SCC (staphylococcal cassette chromosome) *mec IVc*, negative Pantone Valentine leukocidin (PVL), positive toxic shock syndrome toxin-1, staphylococcal enterotoxin C, and community acquired MRSA (CA-MRSA). CA-MRSA has spread widely in Japanese children recently.

(受付：2014年5月27日，受理：2014年7月30日)

* * *