

若年女性の手指より分離された黄色ブドウ球菌の 細菌学的性状に関する検討

清水 利朗・上岡はつみ・国信 清香・江戸 梢

Antimicrobial Susceptibility and Molecular Epidemiological Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Hands of Healthy Young Women

Toshiaki SHIMIZU, Hatsumi UEOKA, Kiyoka KUNINOBU and Kozue EDO

1. はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、健康なヒトの体表面、特に鼻腔や手指、腸管などからも検出される常在菌でありながら、しばしば化膿性疾患や食中毒の起炎菌となる。またその他に毒素性ショック症候群 (toxic shock syndrome: TSS) や軟部組織感染症、肺炎、骨髄炎、敗血症、心内膜炎などの原因になることも知られている¹⁾。こうした多様な疾患が、*S. aureus* の感染により起きる理由については、本菌が産生する多種の腸管毒素に加え、その他の外毒素やスーパー抗原、菌体外分泌性酵素などの病原因子に関する様々な研究により明らかにされてきている^{2,3)}。他方、わが国においては1980年代以降、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) と呼ばれる薬剤耐性菌による感染症が重要な問題となっている。現在、MRSA は病院などの医療機関内において分離される耐性菌として最も頻度が高い状況にあり⁴⁾、その感染制御対策が非常に重要である。MRSA 感染のリスク因子として、入院あるいは手術、長期療養施設への入所、透析、カテーテル等の留置などが挙げられるが、一般に MRSA 感染症は、入院患者や高齢者などの易感染性宿主に起きやすいことから、本症はいわゆる日和見感染症の1つとして理解されてきた。しかし、1997年から1999年にかけて米国ミネソタ州とノースダコタ州で発生した MRSA 感染症による死亡例では、何れも MRSA 感染リスクを有さない小児 (12ヶ月~13歳) から市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA: CA-MRSA) と呼ばれるタイプの *S. aureus* が検出され、起炎菌であると報告された⁵⁾。その後さらにフランス⁶⁾ やオーストラリア⁷⁾ でも同様に CA-MRSA を原因とした重症肺炎による死亡例が報告され、MRSA 感染症に関する新たな問題として CA-MRSA が注目されるようになった。

CA-MRSA の定義は、「従来の院内感染型 MRSA (hospital-acquired MRSA: HA-MRSA) に対するリスク因子が該当しない患者から分離される MRSA」とされている。CA-MRSA の細菌学的特徴⁸⁾ として、Panton-Valentine leukocidin (PVL) と呼ばれる白血球破壊毒素産生株が分離されることが多く、その他に staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) の型別に関しては、IV型やV型が検出される場合が多いこと、さらに CA-MRSA の薬剤感受性は HA-MRSA とは異なり、オキサシリン以外の抗菌薬に対しては感受性を示す場合が多いことなどが挙げられる。また臨床的には、CA-MRSA 感染症の患者の多くが小児や若年者であること、関連する疾患として、いわ

ゆる‘おでき’や蜂窩織炎などの皮膚・軟部組織感染症が多いことが挙げられる。しかし患者の中には骨髄炎や関節炎、肺膿瘍、壊死性肺炎などがみられる場合もあり、重症患者では致死率が高いことも特徴である^{8,9)}。CA-MRSAはHA-MRSAと同様に接触感染によってヒトからヒトへと容易に伝播し、わが国においても、多くのMRSA感染症例からCA-MRSAの検出が報告されてきている¹⁰⁻¹²⁾。近年、食品衛生分野において食肉類を含めた各種食品材料や加工食品からもMRSAが分離されるようになってきており^{13,14)}、わが国の市販鶏肉からSCCmec IV型のMRSAが分離された報告¹⁴⁾もある。多くのCA-MRSA臨床分離株がSCCmec IV型の遺伝子を保有していることから、CA-MRSAが食品を介してヒトへ伝播している可能性についても考えられる。そこで本研究では、食品を取り扱う機会の多い管理栄養士養成課程に在籍する女子大学生を対象として、手指から分離される*S. aureus*の細菌学的性状について検討した。

2. 実験方法

2.1 手指からの*S. aureus*の分離と同定

安田女子大学家政学部管理栄養学科の女子学生84名(18~21歳)に対し、十分な説明のもとに協力を依頼した。検査方法は、パームチェック黄色ブドウ球菌検査用培地(日本生物医学研究所)を被験者1人につき1セット使用し、添付書に記載の方法に従って利き手の手掌を培地表面に押し付けてもらい、スタンプを採取した。その後直ちに培地を恒温器内に静置し、35°Cで48時間培養した。培養終了後、マンニト分解陽性ならびに卵黄反応陽性を示したコロニーを、トリプトソイブイオン液体培地(栄研化学株式会社)5 mL中で増菌培養(35°C, 一晚)し、さらにトリプトソイ寒天培地で分離培養した。分離培養後のコロニーについてグラム染色、コアグラージェ試験、DNase試験を実施し、グラム陽性球菌ならびにコアグラージェ試験陽性かつDNase試験陽性を示したものを*S. aureus*と判定した。なお、コアグラージェ試験はウサギプラズマ(栄研化学)を用いた試験管法で行った。DNase試験はポアメディアDNエース培地(栄研化学)を使用し、菌の増殖にともなう培地表面の色の変化(深青色→赤紫色)により判定した。

2.2 薬剤感受性試験

トリプトソイブイオン液体培地5 mLで増菌培養(35°C, 一晚)した各*S. aureus*菌株を、ミューラー・ヒントン(M-H)寒天培地に画線接種し、さらに培養(35°C, 一晚)することでコロニーを分離した。次にM-H寒天培地上のコロニーを滅菌生理食塩水1 mLに懸濁し、マックファランド濁度0.5に相当する菌液を調製した。この菌液を滅菌綿棒を用いてM-H寒天培地表面に塗布し、培地表面が乾いてから、薬剤感受性試験用セフォキシチン(cefoxitin; CFX)ストリップ(Etest[®]:日本ビオメリュー社製)を培地表面に置き、直ちに恒温器内で培養(35°C, 18時間)した。培養終了後、マニュアルに記載の判定基準に従い、M-H培地の表面に生じた阻止円とCFXストリップの濃度目盛とが接した値を判定し、最少発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration: MIC)を求めた。

2.3 分子疫学的検査(phage open-reading flame typing: POT)

被検菌株をトリプトソイブイオン培地(5 mL)中で増菌培養(35°C, 一晚)し、培養後の菌液10 µLとシカジーニースDNA抽出試薬(関東化学株式会社)100 µLとを、マイクロチューブ

に加え、72°C-6分、94°C-3分の処理により菌体DNAを抽出した。次に抽出されたDNAを鋳型として、シカジーニクス分子疫学POTキット（関東化学）に添付された試薬とともに反応用チューブに加え、サーマルサイクラー（PC320, ASTEC社製）を用いたマルチプレックスPCR（95°C：15秒，60°C：3分；30サイクル）を行った。なお本法では、2種類のプライマーミックスを使用するため、1検体（1菌株）あたり、2本の反応用チューブを使用した。そのため本稿では便宜上、それぞれの反応用チューブをReaction mixture 1（Rxn mix 1）およびReaction mixture 2（Rxn mix 2）と表記している。また、それぞれの反応用チューブ内で合成されるアンプリコン（POTナンバー）の種類と分子量（bp）についてはTable 1に示した。PCR終了後のチューブに、プロモフェノールブルーならびにキシレンシアノール含有ゲルローディングバッファーを加えて混合し、そのうちの6 μ Lを3.5%アガロースゲル（Agarose X：株式会社ニッポンジーン）電気泳動分析（50 V, 100分）に供した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウム染色し、トランスイルミネーター上で紫外線（312 nm）を照射して写真撮影し、この成績をもとにして各供試菌株のPOT型（phage open-reading frame typing）を決定した。具体的には、アガロースゲル電気泳動の結果、各POTナンバーについて、バンドの濃淡にかかわらず、分子量（bp）な

Table 1. Open reading frames identified in *S. aureus* genome sequences for POT typing

	POT number	Amplicon size (bp)	Target gene	POT coefficient
Rxn mix 1	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> positive control	
	POT1-1	530	<i>mecA</i>	64
	POT1-2	449	<i>mec</i> gene complex class B	32
	POT1-3	355	SCC <i>mec</i> type IIa specific	16
	POT2-1	304	Tn554	128
	POT2-2	271	prophage	64
	POT2-3	228	prophage	32
	POT2-4	197	prophage	16
	POT2-5	161	prophage	8
	POT2-6	131	prophage	4
	POT2-7	104	prophage	2
	POT2-8	81	genomic island	1
	Rxn mix 2	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> positive control
POT1-4		477	Cassette chromosome recombinase A2	8
POT1-5		388	genetic background	4
POT1-6		320	genetic background	2
POT1-7		273	<i>mec</i> gene complex class A	1
POT3-1		243	prophage	64
POT3-2		197	prophage	32
POT3-3		171	prophage	16
POT3-4		140	prophage	8
POT3-5		115	prophage	4
POT3-6		95	prophage	2
POT3-7		78	prophage	1

らびに陽性コントロールと一致するバンドが認められる場合には‘1’、バンドを確認できない場合には‘0’とした。次に各 POT ナンバーに指定された POT 係数 (Table 1 参照) との積を求め、これを POT ポイントとし、さらに POT1-1 ~ POT1-7, POT2-1 ~ POT2-8, POT3-1 ~ POT3-7 までの各 POT ポイントを合計したものを POT 型として、POT1 型-POT2 型-POT3 型の順に表記した (例: 4-24-32)。

2.4 *S. aureus* 外毒素遺伝子の検出

供試 *S. aureus* 菌株をトリプトソイブイオン液体培地 (5 mL) で増菌培養し、培養後の菌液からシカジーニース DNA 抽出キット (関東化学株式会社) を使用して DNA を抽出した。その後、*S. aureus* 腸管毒素 (staphylococcal enterotoxin: SE) A 遺伝子 (*sea*) あるいは毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin-1: TSST-1) 遺伝子 (*tst*) の検出を目的として *sea* ならびに *tst* 検出用プライマー (タカラバイオ株式会社) を用いた PCR (94°C : 1 分, 55°C : 1 分, 72°C : 1 分; 35 サイクル) を行い、反応後の標品を 2% アガロースゲル電気泳動分析し、アンプリコン (*sea*: 423 bp, *tst*: 228 bp) の有無を確認した。

3. 結 果

3.1 手指からの *S. aureus* 分離頻度

被験者84名中74名 (88.1%) について検査培地上で培養陽性であることが確認された。一方、10名 (11.9%) については培養陰性の成績が得られた。さらに、培養陽性となった74名のうち、マンニト分解陽性、卵黄反応陽性が確認されたコロニーについて、さらにグラム染色、コアグラーゼ試験、DNase 試験を実施した。その結果、培養陽性であった74名のうち、21名からの分離菌株 (Sa-1, Sa-2, Sa-5, Sa-14, Sa-16, Sa-17, Sa-20, Sa-21, Sa-24, Sa-26, Sa-30, Sa-32, Sa-35, Sa-39, Sa-43, Sa-46, Sa-56, Sa-58, Sa-61, Sa-62, Sa-70) について *S. aureus* の性状が確認された。したがって今回の検討による手指からの *S. aureus* 検出頻度は25%であった。

3.2 各 *S. aureus* 菌株に対するセフォキシチン (cefoxitin: CFX) の MIC

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の定義 (CLSI M100-S20) では MRSA とは、分子遺伝学的検出法により、PBP2' を産生する *mecA* 遺伝子が検出されるか、あるいは薬剤感受性試験法により、オキサシリンの MIC が 4 µg/mL 以上、または CFX の MIC が 8 µg/mL 以上を示す *S. aureus* であるとしている。今回、被験者の手指より分離された *S. aureus* 菌株からの

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of cefoxitin for *S. aureus* strains

Strain No.	MIC (µg/mL)
Sa-1	2.0
Sa-2	2.0
Sa-5	2.0
Sa-14	2.0
Sa-16	1.5
Sa-17	2.0
Sa-20	2.0
Sa-21	3.0
Sa-24	1.5
Sa-26	2.0
Sa-30	2.0
Sa-32	1.5
Sa-35	1.5
Sa-39	1.5
Sa-43	1.5
Sa-46	1.5
Sa-56	1.5
Sa-58	1.5
Sa-61	2.0
Sa-62	2.0
Sa-70	0.75

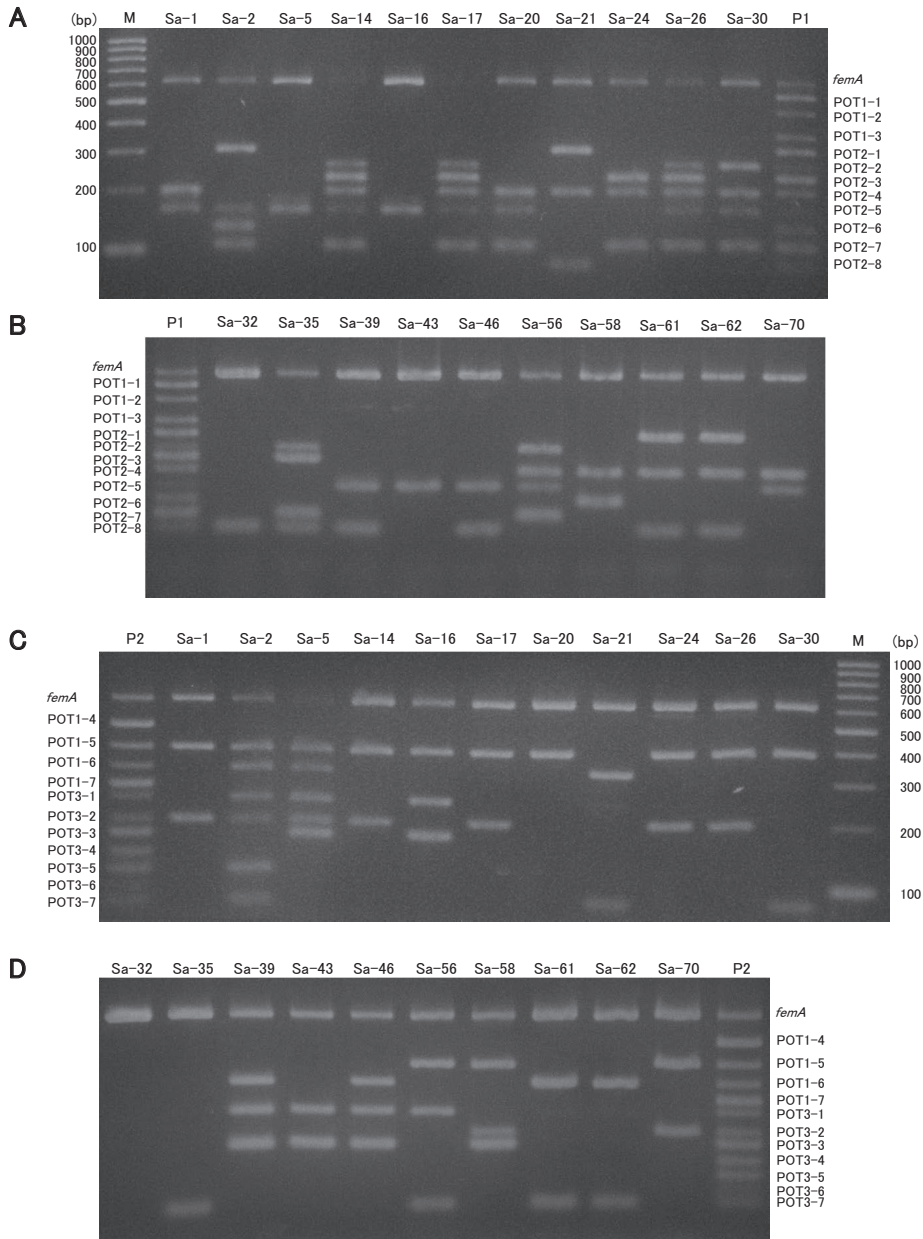


Figure 1. POT typing of *S. aureus* strains isolated from healthy 21 women's hand. For determination of POT types of each *S. aureus* strain, multiplex PCR assays were performed with primer sets which were included in the reaction mixture 1 (Fig. 1A and 1B) or 2 (Fig. 1C and 1D), allowing all POT numbers to be amplified in two reaction tubes. Aliquots of each sample were subjected to 3.5% agarose gel electrophoresis and staining. Positive controls for amplification of each POT number were shown in lane P1 (Fig. 1A and 1B) and lane P2 (Fig. 1C and 1D). Lane M: 100 b. p. DNA ladder marker.

MRSA 検出を目的として、各菌株に対する CFX の MIC を求めた。その結果は、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 1 株, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 9 株, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 10 株, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 1 株 (計 21 株) というものであり (Table 2), 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MIC を示す *S. aureus* 菌株は検出されなかった。以上の成績から、供試 *S. aureus* 菌株は全てメチシリン感受性 *S. aureus* (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*: MSSA) であると考えられた。

3.3 POT 型別による分子疫学的検査

供試 *S. aureus* 計 21 株の薬剤感受性試験と同時に POT 型別による分子疫学的検査を実施した。その結果、全ての菌株で *femA* (601 bp) 陽性となった (Figure 1 A ~ D)。*femA* は、*S. aureus* の細胞壁生合成に必要な細胞質内タンパク質をコードしており、本法では *S. aureus* 特異的な陽性コントロールとして用いられている。したがって今回の分離菌株の何れもが *S. aureus* であることが確かめられた。次に電気泳動像より、各 POT ナンバーに相当する分子量 (bp) を示すバンドの有無を確認し、各菌株の POT 型を決定した (Table 3)。その結果、まず全ての菌株について POT1 から POT4 までの成績が陰性であることが分かった。このことから、薬剤感受性試験の成績 (Table 2) と同様、供試 *S. aureus* は全て MSSA であることが示された。その他の POT ナンバーの成績に関して、POT1-5 は 13 株 (62%) が陽性、POT1-6 は 7 株 (33%) が陽性を示した。このように供試菌株において特定の POT ナンバーが比較的高い頻度で陽性になるという成績が POT2 や POT3 でも確認された。特に POT2-4, POT2-5 は、それぞれ 13 株 (62%), 14 株 (67%) で陽性となり、また POT3-1, POT3-3 では、それぞれ 7 株 (33%) と 6 株 (29%) で陽性となった。加えて、POT3-4 や POT3-6 のように供試菌株の全てで陰性となったものもあった。

Table 3. POT type of each *S. aureus* strain in this study

Strain No.	POT type		
	POT1	POT2	POT3
Sa-1	4	24	32
Sa-2	6	142	100
Sa-5	6	8	112
Sa-14	4	122	32
Sa-16	4	8	80
Sa-17	4	122	32
Sa-20	4	26	0
Sa-21	2	145	1
Sa-24	4	50	32
Sa-26	4	122	32
Sa-30	2	90	1
Sa-32	0	1	0
Sa-35	0	99	1
Sa-39	2	9	80
Sa-43	0	8	80
Sa-46	2	9	80
Sa-56	4	90	65
Sa-58	4	20	48
Sa-61	2	145	1
Sa-62	2	145	1
Sa-70	4	24	32

3.4 腸管毒素ならびに毒素性ショック症候群毒素遺伝子の検出

病原性 *S. aureus* の産生する外毒素である腸管毒素 (staphylococcal enterotoxin; SE) A 遺伝子 (*sea*) ならびに毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin-1; TSST-1) 遺伝子 (*tst*) の保有について検討した。Figure 2 に示すように *sea* については Sa-2, Sa-5, Sa-21, Sa-35, Sa-61, Sa-62 の計 6 株で陽性となった。なお、Sa-61 と Sa-62 に関しては POT 型 (Table 3) についても一致していることから、これらは同一株である可能性が高い。また、*tst* は、Sa-2 と Sa-5 の 2 株で陽性となり (Figure 3), これら 2 株は *sea* と *tst* の両方の外毒素の遺伝子を保有する株であることが示された。しかしながら POT 型別の成績 (Table 3) からは、Sa-2 株と Sa-5 株は互いに異なる菌株であろうと考えられる。

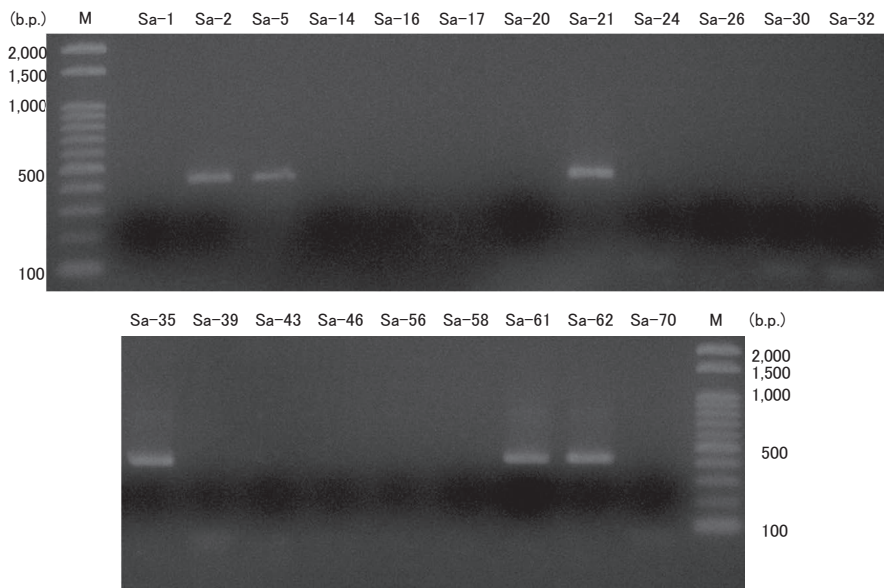


Figure 2. 2% agarose gel electrophoresis of PCR products (423 bp) obtained from amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin A (*sea*) gene. Lane M: 100 b. p. DNA ladder marker.

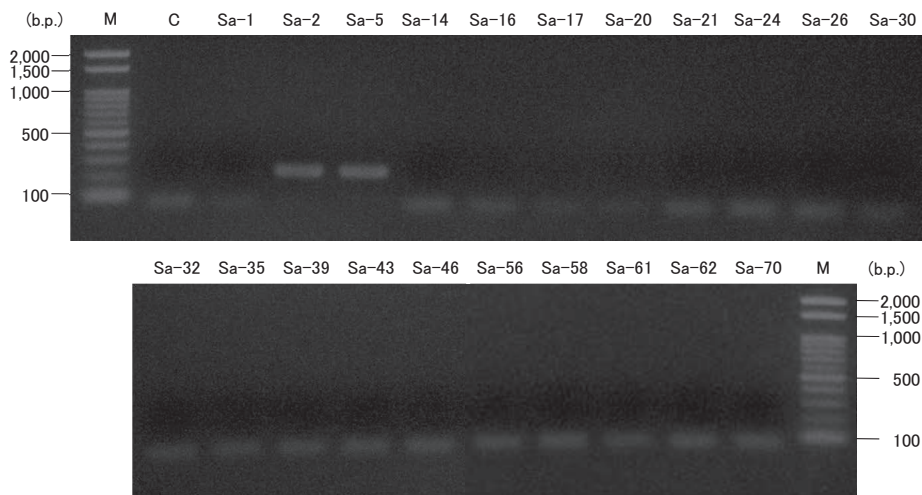


Figure 3. 2% agarose gel electrophoresis of PCR products (228 bp) obtained from amplification of the *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) gene. Lane M: 100 b.p. DNA ladder marker. Lane C: negative control (*S. aureus* 209P strain).

4. 考 察

今回、検査を実施した女子大学生84名について、手指からの *S. aureus* 検出率は25%であった。この成績は、これまでに報告のある一般成人の手指からの *S. aureus* 検出率 (27%)¹⁵⁾ にほぼ等

しいものであり、今回の被験者が特に高い頻度で *S. aureus* を保菌していたのではないことを示している。また一般に鼻腔は、*S. aureus* が最も定着しやすい部位であり、手指から *S. aureus* が検出された被験者については、鼻腔からも *S. aureus* が検出される可能性が高い¹⁵⁾。鼻腔内保菌は *S. aureus* 感染のリスク因子と考えられることから、ヒト鼻腔内の保菌率に関する報告も多い¹⁵⁻¹⁷⁾。例えば、アフリカのガボン共和国に暮らす狩猟採集民族であるバボンゴ・ピグミーを対象に実施された鼻腔からの *S. aureus* 検出に関しては、年齢層別にある程度の差が認められるものの、全体としては33%の検出率であったという報告¹⁷⁾がある。これは、わが国を含めた世界各国の成人鼻腔からの *S. aureus* 検出率が概ね30%を示すという成績とよく一致している。こうしてみると、*S. aureus* のヒト体表への定着には、人種や居住地域、生活習慣などの影響は小さいものであるように思われる。その一方、アトピー性皮膚炎患者の皮膚炎症部位では健康人の皮膚に比べて、*S. aureus* の定着率が高くなっており、皮膚炎の重症度に比例して、その定着率に増加傾向がみられることが明らかとなっている¹⁸⁾。さらにアトピー性皮膚炎の炎症部位では、抗菌性ペプチドの1種である cathelicidin (hCAP18/LL37) の産生が低下しており、皮膚常在細菌叢を構成する菌種の多様性も減少していることが示されている¹⁹⁾。こうした成績は、*S. aureus* のヒト体表への定着に、宿主-寄生体(病原体)相互作用が関与していることを示している。特に宿主の免疫系の正常な働きに加えて、表皮ブドウ球菌をはじめとする多様な皮膚常在菌の相互作用によっても維持される皮膚の恒常性が *S. aureus* の定着に強く影響していると考えられる。今後、手指などからの *S. aureus* 検出に関する検討を行う際には、被験者の基礎疾患の有無や皮膚マイクロバイオームの構成などを考慮する必要がある。

また今回、手指より分離された *S. aureus* について、CFX に対する薬剤感受性試験ならびに POT 型別により、全て MSSA であると判定することができた。加えて、今回の成績は、Feltenらの報告²⁰⁾にあるように CFX の MIC が $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である *S. aureus* は全て *mecA* 陰性であったという成績ともよく一致した。この点に関して、被検菌が MRSA である場合、特に POT1 の POT ポイントは64以上の値を示すのに対し、MSSA である場合、0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14の何れかの値を示す。さらに POT 型別では、MRSA と判定される菌株について、HA-MRSA あるいは CA-MRSA の推定も可能である²¹⁾。具体的には、HA-MRSA 臨床分離株については、NewYork/Japan (NY/Japan) クローンが多くを占める状況にあり⁹⁾、こうしたクローンは ST5/SCC*mec* typeII をゲノム中に保有している。したがって POT 型別では、Table 1 に示すように POT1-1 (*mecA*) に加えて、POT1-3 (SCC*mec* typeIIa specific)、POT1-4 (cassette chromosome recombinase A2)、POT1-7 (*mec* gene complex class A) が陽性となる株は HA-MRSA である可能性が高い。他方、USA300 クローンに代表されるような CA-MRSA は、SCC*mec* typeIV を保有するクローンが多いことから、POT1-1、POT1-2 (*mec* gene complex class B)、POT1-4 が陽性となる菌株で CA-MRSA である可能性が高い。なお、本法では、PVL 遺伝子の直接の検出は含まれていないが、特に POT1 型が64あるいは110となる株については PVL 産生株の可能性もある²¹⁾。このように POT1 が MRSA の判別に有用であるのに対して、POT2 型ならびに POT3 型は主として菌株レベルでの識別に有用である。今回の成績 (Table 3) をみても、Sa-1 と Sa-70 (POT 型: 4-24-32) や Sa-14 と Sa-17, Sa-26 (POT 型: 4-122-32), Sa-39 と Sa-46 (POT 型: 2-9-80), Sa-61 と Sa-62 (POT 型: 2-145-1) のように、それぞれの菌株は異なる被験者から分離されているながら、同一の POT 型を示す *S. aureus* が検出されていることが分かる。こうした POT 型別の特徴に関して、従来からのパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型解析法と比較した場合に菌株

識別能 (*D index*) が同等であることが示されている²²⁾。加えて、実際の MRSA による院内感染の伝播経路を特定する際に POT 型別が用いられ、その実用性や汎用性が示されている²³⁾。

さらに今回の検討では、*sea* や *tst* といった *S. aureus* の病原遺伝子と POT 型との関連についても若干の検討を行ってみたが、特定の POT 型を示す株が病原遺伝子を保有しているという傾向は認められなかった。強いて挙げると、*sea* 陰性株の全てが POT2-1 陰性であったのに対し、*sea* 陽性株である Sa-2, Sa-21, Sa-61, Sa-62 の 4 株については、POT2-1 陽性となる成績が得られた。しかしながら、別の *sea* 陽性株である Sa-5 と Sa-35 では POT2-1 陰性であることから、必ずしも *sea* 遺伝子陽性と POT2-1 陽性との間に明確な関連が認められたわけではない。一方、*tst* 陽性である Sa-2 株と Sa-5 株に関しては、この 2 株に共通して陽性となった POT ナンバーが確認されたものの、*tst* 陰性株とも比較すると、*tst* 陽性株間にもみ特異的であるといえる POT ナンバーは認められていない。病原性 *S. aureus* が保有する TSST-1 遺伝子群や腸管毒素遺伝子群、さらにその他の外毒素遺伝子群は、それぞれが特有の pathogenicity island と呼ばれる病原遺伝子群にコードされており、それらは各種のファージにより *S. aureus* 間で伝播されている²⁴⁾。したがって、特定の prophage ORF に関連する POT ナンバーが陽性であっても、それを特定の病原遺伝子の存在と関連付けることは難しいものと思われる。

以上、今回の検討では、被験者の手指から分離された *S. aureus* より HA-MRSA や CA-MRSA の性状を示す菌株は検出されなかったものの、POT 法による分子疫学解析の有用性が示された。他方、手指から分離された供試菌株の中には SEA や TSST-1 といった病原因子を保有しているものも認められることから、こうした菌株が原因となって起きる食中毒や毒素性ショック症候群の発生を防止するために、特に食品を取り扱う際には、徹底した衛生管理を行わなければならない。今後は、POT 法を用いた食品からの CA-MRSA 検出について検討を行う予定である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、境谷有利子学士、下河内麻衣学士の両名のご協力に感謝申し上げます。あわせて、被験者としてご協力を頂きました安田女子大学家政学部管理栄養学科の学生皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Crossley K. B., et al.: Staphylococci in human disease. Wiley-Blackwell, (2009)
- 2) Plata K, Rosato A. E. and Wegrzyn G.: *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimimica Polonica, 56(4): 597-612 (2009).
- 3) Ortega E., et al.: Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins, 2(8): 2117-2131 (2010).
- 4) 国立感染症研究所 感染症情報センター：年別報告数一覧 基幹定点 (月単位報告) 把握疾患, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/all-surveillance/2085-idwr/ydata/3228-report-jb2011.html>
- 5) Centers for Disease Control and Prevention: Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* -Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 48(32): 707-710 (1999).
- 6) Dufour P., et al.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France:

- emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Diseases*, 35 (7): 819–824 (2002).
- 7) Peleg A. Y. and Munchhof W. J.: Fatal necrotising pneumonia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Medical Journal of Australia*, 181(4): 228–229 (2004).
 - 8) 山本達男他: Panton-Valentine ロイコジン陽性の市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の出現—感染症の現状と細菌学的特徴—. *日本化学療法学会雑誌*, 52(11): 635–653 (2004).
 - 9) 山本達男, 高野智洋, 堂前壮史: 市中感染型 MRSA. *日本外科感染症学会雑誌*, 3 (4): 553–559 (2006).
 - 10) 富田雄介他: 市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による壊死性肺炎の2例. *日本呼吸器学会雑誌*, 46(5): 395–403 (2008).
 - 11) Yamaguchi T., et al.: Epidemiological and microbiological analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a Japanese hospital. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65(2): 175–178 (2012).
 - 12) Iwanaga N., et al.: Necrotizing pneumonia due to femoral osteomyelitis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine*, 52(13): 1531–1536 (2013).
 - 13) 村上和保他: 食品材料, 食品および調理施設からのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の検出. *日本食品微生物学会雑誌*, 19: 127–131 (2002).
 - 14) Kitai S., et al.: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67: 107–110 (2005).
 - 15) Wertheim H. F., et al.: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12): 751–762 (2005).
 - 16) Gorwitz R. J., et al.: Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(9): 1226–1234 (2008).
 - 17) Schaumburg F., et al.: Population structure of *Staphylococcus aureus* from remote african Babongo Pygmies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5): e1150 (2011).
 - 18) Kong H. H., et al.: Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*, 22(5): 850–859 (2012).
 - 19) Mallbris L, et al.: Injury downregulates the expression of the human cathelicidin protein hCAP18/LL-37 in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 19(5): 442–449 (2010).
 - 20) Felten A., et al.: Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with ceftiofur and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8): 2766–2771 (2002).
 - 21) 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*, No. 3: 16–21 (2011).
 - 22) Suzuki M., et al.: Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4): 938–947 (2006).
 - 23) 森山英彦他: MRSA の院内伝播制御に有用な POT 法を用いた分子疫学解析. *感染症学雑誌*, 86(2): 115–120 (2012).
 - 24) Maiques E., et al.: Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *Journal of Bacteriology*, 189(15): 5608–5616 (2007).

Summary

Background: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the most frequently identified antimicrobial drug-resistant pathogen in hospitals and other healthcare facilities in many countries including Japan; such cases of MRSA are termed hospital-acquired MRSA (HA-MRSA). HA-MRSA infections commonly occur in people with weakened immune systems in hospitals and

healthcare centers. In addition, risk factors for HA-MRSA infection include hospitalization, surgery, dialysis, long-term care. Meanwhile, severe infections with another type of MRSA, called community-acquired MRSA (CA-MRSA), were first reported to occur among healthy people in the United States, France, Australia, and other countries in the 1990s. Today, CA-MRSA infections are becoming more common. An MRSA-harboring staphylococcal cassette chromosome, *mec* type IV, was recently isolated from retail raw chicken meat in Japan. Therefore, CA-MRSA may be transmitted from raw meat to human hands during handling. However, the frequency of CA-MRSA isolation from human hands is unknown.

Objective: This study assessed the hand carriage of HA-MRSA and CA-MRSA among female students at Yasuda Women's University.

Methods: Handprint samples from young female university students were made on a mannitol salt agar plate and subsequently incubated aerobically at 35°C for 48 hours. Mannitol salt-positive well-isolated colonies were subsequently confirmed on the basis of whether they exhibited typical characteristics of *S. aureus* through further testing including Gram staining, coagulase, and DNase production. Antimicrobial susceptibility tests using cefoxitin strips and molecular epidemiological typing (phage open-reading flame typing) for each strain were then carried out to identify HA-MRSA and CA-MRSA. In addition, the genes for staphylococcal enterotoxin A, *sea*, and toxic shock syndrome toxin-1, *tst*, of each *S. aureus* isolate were tested by PCR.

Results: A total of 74 mannitol salt-positive isolates were obtained from 84 handprint samples; 21 of which were identified as *S. aureus*. However, the minimum inhibitory concentrations for cefoxitin of all *S. aureus* isolates were $\leq 3 \mu\text{g}/\text{mL}$. Moreover, all *S. aureus* strains were negative for *mecA*. Therefore, no MRSA isolates were detected. However, 6 and 2 *S. aureus* strains were positive for *sea* and *tst*, respectively; *tst*-positive *S. aureus* strains were detected from among *sea*-positive strains.

Conclusion: In the present study, neither HA-MRSA nor CA-MRSA were isolated from healthy young women's hands. However, pathogenic *S. aureus* strains that can cause food poisoning or toxic shock syndrome were isolated. Thus, these pathogenic *S. aureus* strains can spread easily in public places such as hospitals and schools. Therefore, preventive efforts such as thorough hand washing are important.