

実験動物マウスにおける黄色ブドウ球菌のゲノミクスと 施設内伝播検証法

佐々木崇

札幌医科大学 医学部 動物実験施設部

要約

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、免疫正常な実験動物マウス系統で保菌が見られても発病は稀と考えられ、多くの動物実験施設では免疫正常マウス系統の微生物モニタリング対象としていない。しかし本菌は、マウスの原因不明死亡検体から最も多く菌分離され、施設内で保菌/感染が拡大(伝播)したことを示唆する過去の文献も見られる。一方、免疫不全マウスでは本菌により重篤な症状が発症しうるため、ブリーダーは微生物モニタリングレポートの公開とともに本菌陰性動物を販売している。このように、実験動物マウス飼養保管施設における黄色ブドウ球菌の感染対策上の位置付けには十分な配慮が必要である。特に、免疫正常か免疫不全かを問わず施設内のマウス系統で本菌保有個体が複数見つかった際、施設内伝播に起因していたかの判断は、検証法の問題点と相まって結論を出すことが困難である。

本稿では、本菌の施設内伝播検証に用いる遺伝子型別法の新旧方法論について概説する。その理解に不可欠な本菌ゲノミクスの基本知識(ゲノム構造、進化機序)と実験動物マウス最優勢クローンである Sequence type (ST) 88 型系統株の遺伝的多様性について解説する。それを踏まえ、施設内伝播検証法としての従来の遺伝子型別法の分解能不足という欠点と、それを補う次世代シーケンサーによる全ゲノム解析法の応用性を考察する。

(実験動物ニュース 2024 Vol. 73 No. 3, p. 102-111.)

1. はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒト・マウス・ラットなど哺乳類広域種の皮膚に常在するグラム染色陽性の球菌であり、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* 属) に属する。本菌は日和見的に様々な臓器で感染病態を引き起こす、ブドウ球菌属中最も病原性が高い種である。本菌は自律性可動遺伝因子(後述)と呼ばれる複数の機構によりゲノム中に外来遺伝子を取り込む。この機構により生じる、本菌の多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) は、ヒトの医療現場で水平伝播し抗菌薬治療や感染対策を難しくすることから、各国や地域で流行する遺伝的起源を同一にする MRSA クローンの動向が世界的に監視されている。

黄色ブドウ球菌は、健康人の約3割に保菌が見られ、主な常在部位として鼻前庭、手指、会陰部皮膚の順に優勢であることが報告されている [1]。宿主動物種により優勢常在部位が異なることが示唆され [2]、保菌個体を高感度にスクリーニングするには対象動物種の最優勢部位からの検体採取が重要である。

本菌が皮膚常在菌であることと、ヒトや動物の本菌保菌調査で糞便検体を用いた過去の報告が見られないことから、実験動物マウス対象のスクリーニング検査で糞便検体を用いる場合には、検出感度の低下を考慮し結果を解釈すべきかもしれない。

黄色ブドウ球菌は、実験動物マウスの Specific-pathogen-free (SPF) 対象病原体に含まれていない。文献的に、ブリーダーによっては20%もの SPF 個体から本菌が菌分離されるという [3]。免疫正常マウスで本菌が検出されても通常は特別な措置は求められないが、マウス死亡例の検査依頼検体から最も多く分離されるとも報告されている (ICLAS モニタリングセンター HP: 事業報告>微生物検査結果)。

実験動物マウス飼養保管施設において、黄色ブドウ球菌の施設内伝播を想起させる事例が報告されているが [4]、この報告における検証では、菌株の遺伝子型別は病原性遺伝子の有無を解析する PCR 法や、生存必須遺伝子の部分塩基配列を解析する従来の方法が用いられていた。医学領域の MRSA 院内伝播検証スキームは近年、全ゲノムシーケンスによる一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism;

後述) 解析を用いた高分解能検査をゴールドスタンダードとしている。この方法を用いることで、従来の遺伝子型別法では同一と判断された菌株でも、SNP 数や分子系統の差分により遺伝的差異をさらに分解できる。実験動物マウス飼養保管施設において本菌が施設内伝播するかを結論づけるには、全ゲノムシーケンスによる方法を用いる必要があると筆者は考えている。

このように、黄色ブドウ球菌の実験動物マウス飼養保管施設における感染対策上の位置付けの決定には、施設内伝播検証に用いる遺伝子型別法のアップデートが求められる。そこで本稿では、黄色ブドウ球菌の新旧遺伝子型別法を理解するため、前半部分で本菌のゲノミクスの基礎とマウス最優勢クローンである Sequence type (ST) 88 型系統株のゲノム疫学について解説する。後半部分では、本菌の従来の遺伝子型別法が施設内伝播検証目的には分解能不足である点を提起し、その解決法としての次世代シーケンサーによる全ゲノム解析法の応用性や課題を概説する。

2. ブドウ球菌のゲノム特性

2001 年、世界で初めて黄色ブドウ球菌株 (N315 という株名の MRSA 株) の完全長配列が報告された [5]。ゲノムサイズ 2.81 Mbp, GC 含量約 32.8% を示す本菌のゲノム特性は、同じバチルス綱のグラム陽性菌である肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae* TIGR4 株, 2.16 Mbp, 39.7%) や枯草菌 (*Bacillus subtilis* 168 株, 4.21 Mbp, 43.5%) と類似し、大腸菌 (*Escherichia coli* EDL933 株, 5.53 Mbp, 50.4%) や緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株, 6.26 Mbp, 66.6%) といったグラム陰性菌に比して小型かつ低 GC 含量を示す。

ブドウ球菌属は現在約 50 菌種が分類記載され、種や株レベルで遺伝的多様化が進んできた [6]。他の細菌分類群同様、遺伝的多様性獲得の基本機序は、ortholog 遺伝子と呼ばれる相同遺伝子上に生じた点変異、塩基配列の挿入/欠失、相同組換えなどの蓄積とそれらの遺伝的垂直伝播である。このような微小変異は、細菌分類群ごとにおおよそ定まった進化速度に呼応して緩やかに進み、祖先集団からの遺伝的多様性を積み上げ、外部環境からの選択圧の結果として種分化し、生理・生化学的機能を収斂させてきたと考えられる。黄色ブドウ球菌 (N315 株)、肺炎球菌 (TIGR4 株)、枯草菌 (168 株) の全染色体性遺伝子中の属内コア遺伝子 (各属内全菌種で保存された ortholog 遺伝子) の割合を、今回新たに算出してみたところ、それぞれ約 46%, 30%, 25% であった。この数値差は、ブドウ球菌属が一定環境でコアゲノム構造を固持してきた分類群であることと、レンサ球菌属及びバチルス属が多様な環境適応のためユ

ニークな進化を遂げた菌種を多く包含することを示唆している。

3. ブドウ球菌属の外来遺伝子獲得機構

ブドウ球菌属には、前述した病原体特有の緩やかな進化を一足飛びにするダイナミックな進化機序も知られている。Insertion sequences (ISs) と呼ばれる特有の繰り返し配列や、トランスポゾン、バクテリオファージといった自律性可動遺伝因子 (Mobile genetic elements: MGEs) を介した外来遺伝子の獲得、そしてそれらの挿入部位にコードされていた既存遺伝子の破損・脱落が起こり、本属菌はこのイベントだけで親株との大規模なゲノム差異を生じうる。以下に、本菌に特徴的な 2 つの MGEs について概説する。

3-1. ゲノミックアイランド (Genomic islands: GIs)

ブドウ球菌属のゲノム多様性獲得に寄与した遺伝因子として、ゲノミックアイランド (Genomic islands: GIs) と呼ばれる MGEs が知られている。GIs は、バクテリオファージ感染でファージゲノムが細菌ゲノム内にインテグレートされ形成される。GIs は、ファージ誘導が起こるまで細菌ゲノム中にプロファージとして維持される可動性タイプ (Φ [phi]) と、ファージとして自律移動するための遺伝因子を失い細菌ゲノム内に定着した非可動性タイプ (ν [neu]) とに区別される。

GIs 領域は、宿主への病原性を担う毒素遺伝子やスーパー抗原活性に関与する遺伝子が多数並ぶことから、病原性アイランドとも呼称されている。個々の GIs 領域は黄色ブドウ球菌株間でも多様性が見られ、株レベルの病原性差異にも寄与している [7]。図 1 は、完全長配列が登録されている黄色ブドウ球菌研究でしばしば用いられる著名な菌株のゲノム中の GIs 分布を示している。非可動性 GIs である ν Saa/ $\beta/\gamma/\epsilon$ は、全ての黄色ブドウ球菌系統のゲノム内に保存されている。黄色ブドウ球菌が属内で突出した高病原性種となったのは、共通祖先がこれらのファージを獲得したことに起因していると考えられる。

また、感染ファージゲノムがもたらす特定遺伝子が、黄色ブドウ球菌株が宿主にとって無害あるいは病気を引き起こすかの免疫学的均衡を崩すドライバーとなることが報告されている [8]。この研究では、黄色ブドウ球菌の細胞壁を構成するリポタイコ酸を標的とした宿主免疫応答が、通常では本菌による発症を制御しているものの、リポタイコ酸を修飾する酵素 TarP をコードする遺伝子がファージによりもたらされた菌株では、エピトープ変化と免疫原性低下が生じ、既存宿主免疫応答からの回避を介した病態発症が起こることを示唆している。

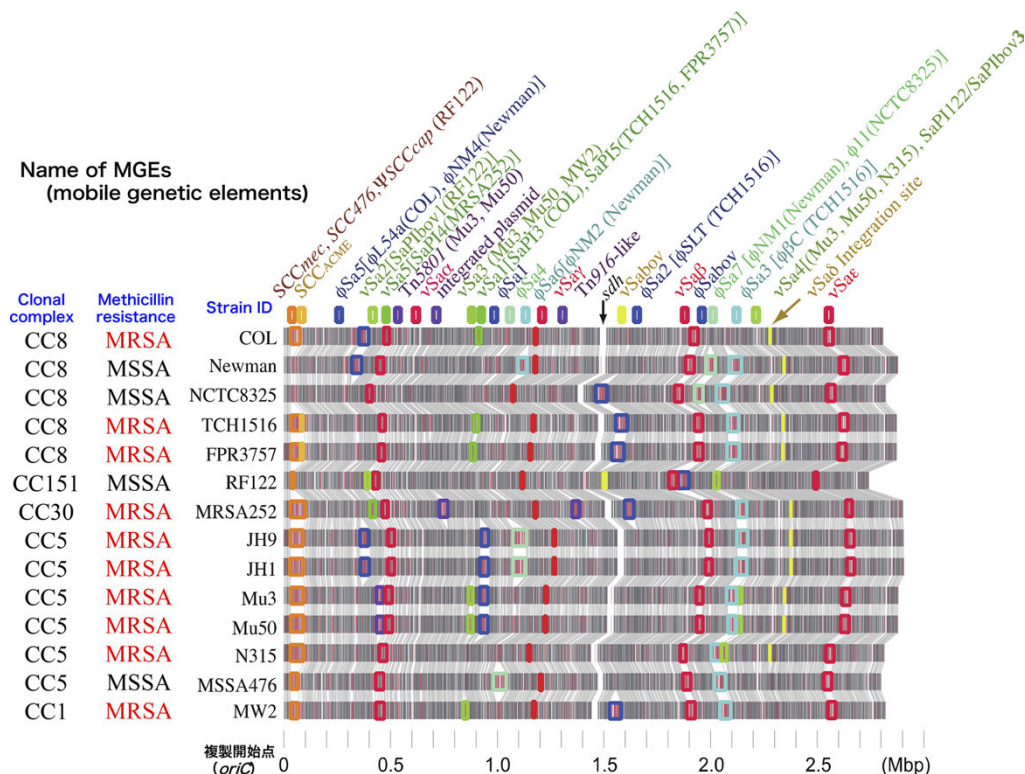


図1 黄色ブドウ球菌 14 株の全ゲノムアラインメント

本図は、複製開始点を左端とし、黄色ブドウ球菌 14 株 (MRSA10 株と MSSA4 株) の全ゲノムアラインメントを表現している。Strain ID の左に Clonal complex とメチシリン耐性を示した。各株のゲノム配列中、灰色は全株共有のコア遺伝子、赤色は非共有遺伝子を意味している。図上部に示した GIs (Genomic islands) のうち、Φ [phi] は可動性 GIs であるプロファージ、v [neu] は非可動性 GIs、Tn はトランスポゾン、SCC はブドウ球菌カセット染色体を意味している。sdh 遺伝子は、ゲノム中の terC (複製終結点) 付近に位置する 1.1 メガダルトンの細胞壁関連フィブロネクチン結合タンパク質をコードし、大部分の黄色ブドウ球菌株に保存された単一巨大遺伝子である。図は、Hiramatsu K et al. *Infect Chemother.* 2013. Jun; 45(2): 117–136. (参考文献 7) の Figure 1 (A) を引用し、遺伝子型、メチシリン耐性の有無、複製開始点の位置等に関する表記を加え改変した。

3-2. ブドウ球菌カセット染色体 (Staphylococcal cassette chromosome : SCC)

進化の過程でブドウ球菌属の遺伝的多様化を促進した因子の一つとして、ブドウ球菌カセット染色体 (Staphylococcal cassette chromosome : SCC) と呼ばれる MGE が知られ、これも GIs の一種である [7]。SCC は、部位特異的組換え酵素をコードする *ccr* 遺伝子を搭載し、この働きにより黄色ブドウ球菌 N315 株ゲノム上の複製開始点 (*oriC*) に程近い 23 番目の遺伝子 *orfX* (SA0023 : リボソーム RNA メチルトランスフェラーゼ) の 3' 末端側に部位特異的に挿入される。このゲノム領域は *oriC* environ と呼称されている。ゲノム中に組み込まれた SCC 内部には、inverted repeat, direct repeat, トランスポゾン、特有の挿入配列等が複数コピー含まれ、これらを糊代とした遺伝子の挿入・欠失が頻繁に繰り返される。やがて *ccr* 遺伝子の脱落と共に SCC は可動性を失い、外部獲得した遺伝子群のうち、その菌株にとって有用なものだけが選択的に *oriC* environ にストレージされてい

く。この機構により、ブドウ球菌属は菌種間・菌株間の多様性を形成してきたと考えられる。SCC はブドウ球菌属の菌株間を水平伝播することでもたらされる。ブドウ球菌属の菌種同定で評価される生化学的性状をコードする遺伝子群もこの領域に複数搭載されている [9]。

SCC には抗菌薬耐性遺伝子が搭載されていることも多い。メチシリン耐性の責任遺伝子 *mecA* を搭載した SCC は SCCmec と呼ばれ、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) がこれを外部から獲得し MRSA が出現したと説明されている (図 2)。

4. 実験動物マウス由来黄色ブドウ球菌

Sequence type (ST) 88 型株のゲノミクス

実験動物マウスに適応した黄色ブドウ球菌株は、Multi-locus sequence typing (MLST) と呼ばれる塩基配列に基づく型別で ST88 型を含む数系統しかないことを以前本誌において概説した [10]。このような背景から、実験動物マウス飼養保管施設内で本菌の施

設内伝播検証をするには、同時期に複数分離された菌株が互いに同一 ST 型であることを示しただけでは水平伝播の証拠にはならず、さらなる微小なゲノム差異を検出する高分解能検査が必要となる。ここからは本菌の ST88 型株のゲノム特性と分子疫学について解説する。

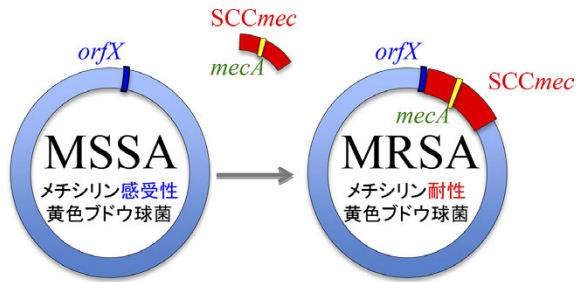


図 2 MRSA の進化概念図

メチシリン耐性遺伝子 *mecA* を搭載した SCC (Staphylococcal cassette chromosome) は *SCCmec* と呼ばれ、MSSA (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌) ゲノム中の *orfX* 遺伝子 3' 末端側に部位特異的に挿入されると MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) となる。

4-1. 実験動物マウス由来黄色ブドウ球菌 ST88 型株のゲノム解析状況と特性

実験動物マウスに由来する ST88 型株の全ゲノムデータは、ニュージーランドの C57BL/6J オス個体から分離された JSNZ 株 1 株のドラフト配列が登録されているのみである [4]。この他には、ネズミ上科 (Muroidea) のキタハタネズミ (*Microtus agrestis*) に由来する ST88 型株のドラフト配列も入手可能である (muC88d 株：ドイツの野生個体由来) [11]。

JSNZ 株は、ドラフト配列登録のみでゲノム関連情報を記載した文献がないため、今回、本稿で各種解析を実施した。JSNZ 株は、ゲノムサイズは 2,692,570 bp、GC 含量は 32.8%、推定遺伝子数は 2,552 と、黄色ブドウ球菌ゲノムの一般構造としては平均的であった。既知の抗菌薬耐性遺伝子は検出されなかった。病原性関連遺伝子は、黄色ブドウ球菌全菌株に共通保存されたプロテアーゼ aureolysin (*aur*) や *splA*、赤血球溶解毒素 (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*)、白血球溶解毒素 (*lukD-E*, *lukG-H*) の保有が見られるものの、黄色ブドウ球菌の高病原性株でしばしば見られる Panton-Valentine leukocidin (PVL: *lukF-S*)、表皮剥脱毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxin: SE) など、特筆すべき病原性遺伝子の保有はなかった。キタハタネズミ由来 muC88d 株も同様であった。

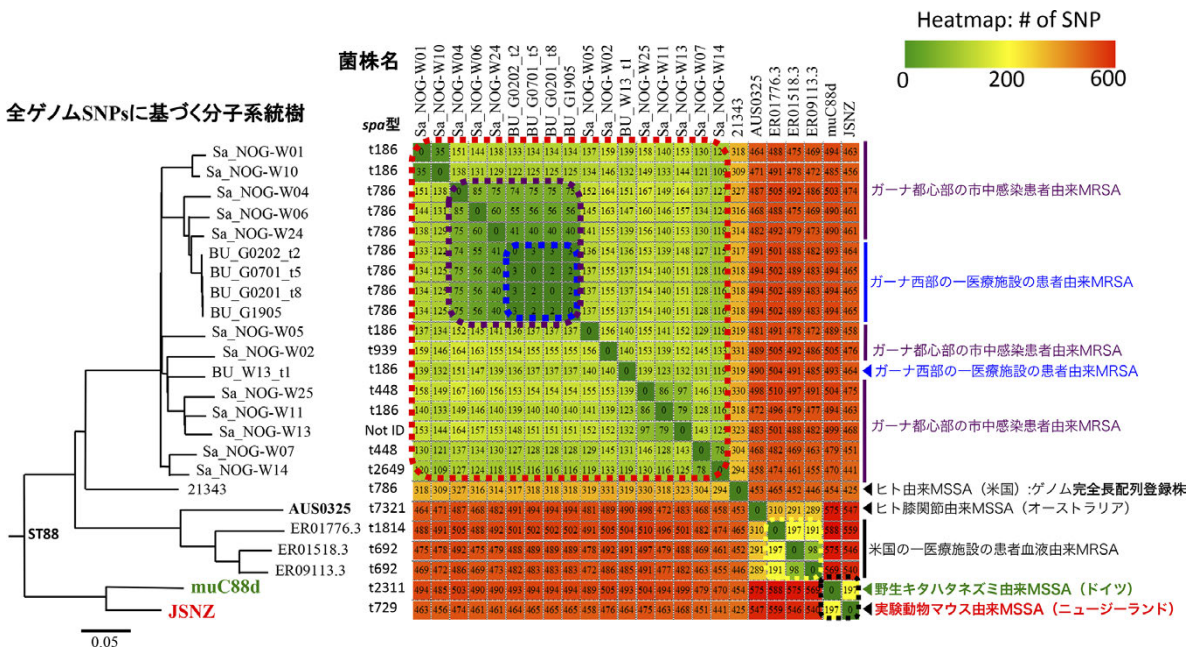


図 3 ST88 型系統の全ゲノム SNP 系統樹とペアワイズ SNP 数のヒートマップ

ST88 型を示す 24 株 (ガーナ株 17, 他地域のヒト由来株 5 および実験動物マウスとキタハタネズミ由来株各 1) の全ゲノム配列について、完全長配列が登録されている AUS0325 株をレファレンスとして SNP を検出し、系統樹を描画した (左)。右図では各株間で検出したペアワイズの SNP 数を記載するとともに、その SNP 数を 0 から 600 に至るヒートマップとして緑、黄、赤色の段階的表現で示した。また、株間で類似した SNP 数を示すものを点線で囲んだ。

4-2. ヒト由来 ST88 型 MRSA 株による

院内・地域アウトブレイク事例

本項では、ST88 型 MRSA 株が地域優勢クローンとして広がっているガーナの文献を引用し、MRSA 株における SNP 数解釈について解説する [12]。

図 3 に、公的データベースからゲノム配列が入手可能な ST88 型系統 24 株をデータセットとし、AU0325 株をレファレンスとした全ゲノム SNP 系統樹と各株間におけるペアワイズ SNP 数を示した。

図 3 右側のヒートマップを見ると、ガーナ西部の一医療施設の患者由来 MRSA である 4 株 (BU_G0202_t2 ~ BU_G1905; 青色点線部) 中の SNP 数はわずか一桁台であった。ガーナ都心部の市中感染患者由来 MRSA 株まで含めた 7 株 (Sa_NOG-W04 ~ BU_G1905; 紫色点線部) に広げると、SNP 数は二桁台にまで増加した。そしてガーナ由来株全体 (Sa_NOG-W01 ~ Sa_NOG-W14 までの 17 株; 赤色の点線部) まで範囲を広げると、SNP 数は最大で 167 を示した。

同様に、文献としての報告はなかったが、米国の一医療施設の患者 3 名から分離された血液培養由来 ST88 型 3 株の登録ゲノムを用い SNP 数を算出したところ、200 以下であった (黄色点線部)。

文献的に、医療現場における MRSA 院内アウトブレイクでは 50 SNPs 以下、地域内アウトブレイクでは 200 SNPs 以下という報告があり、これらがしばしば SNP 数解釈の基準として引用される [13-17]。前述のガーナ及び米国の事例とも、菌株背景と SNP 数の関係が概ねこの基準値と合致している。

4-3. げっ歯類由来黄色ブドウ球菌 ST88 型株の

分子系統解析と SNP 数解釈

図 3 には、げっ歯類に由来する ST88 型 2 株も含まれている。実験動物マウス由来 JSNZ 株とキタハタネズミ由来 muC88d 株は、ヒト由来株で構成されるクラスターとは独立しているため、この両株はげっ歯類特異的な進化系統であることが予想される。しかしそれを結論づけるには、実験動物マウスやその他のげっ歯類に由来するさらなるゲノムデータ集積と再現性確認が必要である。

SNP 数に目を向けると、JSNZ 株と muC88d 株の差異はわずか 197 であり (黒色点線部)、ヒト MRSA 株の SNP 数解釈基準では地域内アウトブレイク (200 SNPs 以下) に相当する。しかし両株は由来する国も宿主動物種も異なっており、ヒト MRSA 株の SNP 数解釈基準を直ちに適用することには無理があった。多様な黄色ブドウ球菌クローンを許容するヒト宿主とは異なり、わずかに数系統の適応しか許容していないと考えられるマウス宿主では、本菌の進化速度低下の可能性を考慮すべきかもしれない。実験動物マウスに特化した施設内伝播検証のための SNP 数解釈基準の構築には、今後のゲノム情報登録とケーススタディの集積に期待するしかない。

4-4. 実験動物マウス定着性に関する

黄色ブドウ球菌の遺伝子変異

黄色ブドウ球菌の実験動物マウス皮膚組織への定着性に関する遺伝子やその変異は、少数ながら報告されている。

USA300 株 (ST8-MRSA 株、ヒトにおける市中感染型 MRSA の代表株の一つ) を用いたマウス皮膚感染モデルでは、解糖系及び TCA サイクル関連遺伝子の非同義置換や転写誘導変異を獲得した変異株が選択されたことが報告されている [18]。

MW2 株 (ST1-MRSA 株、ヒトにおける市中感染型 MRSA の代表株の一つ) は、 β 溶血毒素 (*hly*) 遺伝子のコーディング配列内部に挿入されたプロファージを持つが、このファージ脱落により同遺伝子の復帰変異を果たした変異株が、同じく皮膚感染マウスモデルにおいて選択されたことも報告されている [19]。*hly* 遺伝子は、皮膚角層中のスフィンゴミエリンをセラミドへ加水分解する機能を有していることから、宿主表皮バリアの破壊に寄与する本菌変異体が宿主内で選択されたと考察されている。図 4 に、げっ歯類由来 ST88 型 2 株とヒト由来 ST88 型 1 株の *hly* 遺伝子近傍領域のゲノムマップを示した。キタハタネズミ由来 muC88d 株及びヒト由来 AUS0325 株では、*hly* 遺伝子内部にプロファージ ϕ Sa3 が挿入され、*hly* 遺伝子の 2 つの断片がスプリットしている。それに対し、実験動物マウス由来 JSNZ 株では、この領域にプロファージ ϕ Sa3 の痕跡はなく *hly* 遺伝子のコーディング領域全長が保持されていることから、プロファージ脱落による *hly* 遺伝子の復帰変異が生じたことが示唆される。

本菌のマウス定着性を上昇させるという既報の遺伝子変異が ST88 型株においても普遍的な現象かは、さらなる研究で示される必要がある。

5. 黄色ブドウ球菌株の従来の遺伝子型別法

本菌分離株の遺伝子型別法は、多剤耐性菌 MRSA の院内、地域、国家間におけるクローンの蔓延状況を知る分子疫学解析ツールとして汎用されてきた。MRSA 蔓延の黎明期は、遺伝的に多様な MRSA クローンが院内や市中に分布していたため [20]、従来法でも施設内伝播検証にある程度応用できた。しかし近年は、同一 ST 型を示す院内感染型 MRSA クローンが広範な地域間で同時多発的に検出されるモノクローナルなクローン分布となっているため、高分解能検査である全ゲノム解析がこの検証目的では主流となっている。そのような意味合いとは異なるが、実験動物マウスでは適応クローンが特定 ST 型に限られる背景から、本菌による施設内伝播を検証するには同一 ST 型株間の SNP レベルのゲノム差異を評価できる方法によらなければ妥当な検証結果が得られない。

以下に、本菌分離株を遺伝子型別するための従来法 3 種類について概説し、解析事例を紹介する。

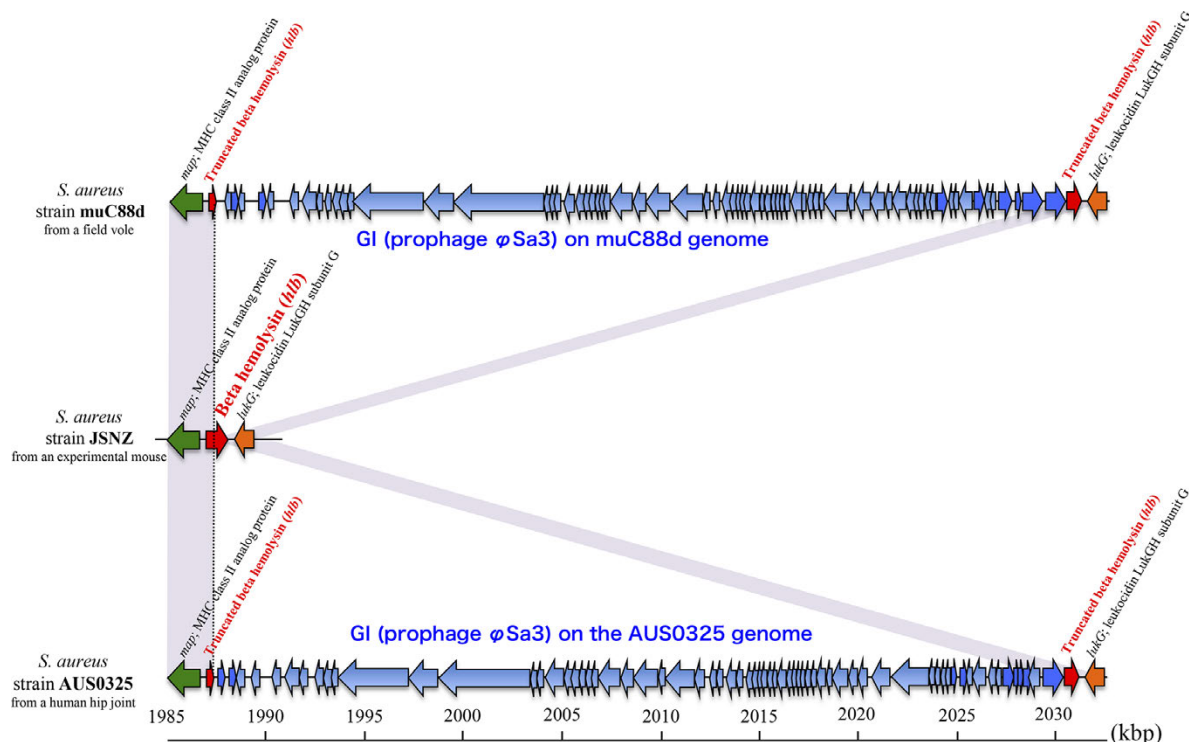


図4 *hlyB* 遺伝子及びプロファージ ϕ Sa3 近傍のゲノムマップ

キタハタネズミ由来 muC88d 株（上段）及びヒト由来 AUS0325 株（下段）では、プロファージ ϕ Sa3 が *hlyB* 遺伝子内部に挿入され、*hlyB* 遺伝子が断裂しているため機能していない。一方、実験動物マウス由来 JSNZ 株（中段）では、このプロファージの脱落により *hlyB* 遺伝子が復帰変異を起こしている。

5-1. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

多くの細菌分類群で古くから応用されるゲノム全体を反映した遺伝子型別法である。制限酵素処理(黄色ブドウ球菌では制限酵素 *Sma* I が用いられる)した断片化ゲノム DNA を、電場の方向を一定時間毎に変化させる条件で泳動することで、数百 kbp にも及ぶ巨大 DNA 断片の泳動が可能となり、得られた各供試菌株のバンディングパターンから菌株間の遺伝的差異を評価する。

かつては MRSA 院内感染事例の施設内伝播検証に用いられてきたが [21], 手技的に煩雑かつ時間を要し、得られる結果がアナログデータのためラボラトリー間比較も難しかった。遺伝的差異を評価するための分解能も十分ではなく、近年はこの用途で用いられなくなった。

5-2. Multi-locus sequence typing (MLST) 法

多くの細菌分類群で現在も広く用いられる遺伝子型別法である。ゲノム全域に散在する生存必須 7 遺伝子の各 500 塩基ほどの部分塩基配列を解析対象とするゲノム全体を反映する遺伝子型別法である。黄色ブドウ球菌では、*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* がマーカー遺伝子とされる [22]。塩基配列の違いによって各遺伝子の allotype が付与され、そ

の組み合わせにより Sequence type (ST) が数字として付与される。互いに近縁な複数の ST 型を包含する群として Clonal complex (CC) という表記がなされることもある。本菌の分子疫学研究では今なお必須の基本データとして扱われる。しかし遺伝的差異を評価するための分解能は PFGE 法にも劣ると考えられ、同一 ST 型を示すクローナルな菌株間でも全ゲノム解析で数千もの SNP 数を示すことがあり、本法単独解析による施設内伝播検証は不可能である。

5-3. *spa* 型別法

spa 遺伝子は、多くの動物種の IgG 抗体の Fc 領域に結合するプロテイン A をコードする黄色ブドウ球菌特有の遺伝子である。繰り返し配列に富む本遺伝子単独の塩基配列を解析することで、アルファベットと数字の組み合わせの型番が付与される [23]。同一 ST 型あるいは PFGE 型でも、本法でゲノム差異を表現できることもあり、高分解能な遺伝子型別法の一つと捉えられている。しかし単一遺伝子解析のため、ゲノム全体の遺伝子型を反映するとは限らず、異なる ST あるいは PFGE 型でも同一 *spa* 型を示す菌株も見られ、適切な結果解釈には他の型別法との併用を要する。

5-4. PFGE, MLST および *spa* 型別法による
黄色ブドウ球菌の解析例

これら3種類の遺伝子型別法としての分解能は *spa* 型別法 > PFGE 法 > MLST 法の順と一般的には考えられているが、必ずしもこれに当てはまらない事例も見られる。

図5に、埼玉県の小児患者由来 MRSA 株に対する3つの型別法を併用した解析例を示した [13]。PFGE 法に基づくデンドログラム（樹形図）で同一クラスターと判定した株が、MLST 法で ST834 と ST2578 の2つの型に判定が分かれた（図5:点線部分）。また、同一 *spa* 型 (t9624) が、ST834, ST2578, ST1566, ST1558 の4つの ST 型にまたがって判定されている（図5:太字部分）。このように、3つの従来法を全て併用しても結果解釈に難渋する本例のようなケースが見られる。

その一方、ここで引用した文献では、前述の全ゲノム SNP 解析における菌株間のペアワイズ SNP 数として 35-119 という定量的数値と分子系統解析結果が得られ、当地域の小児患者で ST834 型系統の MRSA による地域的アウトブレイクが起きていると結論づけられた。

6. 全ゲノム解析による実験動物マウス由来
黄色ブドウ球菌株の施設内伝播検証

ここまで、黄色ブドウ球菌の施設内伝播検証では、従来の遺伝子型別法の分解能不足と結果解釈の困難さに問題点があることを挙げ、高分解能かつ定量性のある全ゲノム解析の必要性を述べた。そこで本セクションでは、実験動物施設でマウス死亡事例が同時期に多発し、複数の死亡個体から本菌が分離されたケースを想定し、次世代シーケンサーを用いた全

ゲノム解析の流れや費用、バイオインフォマティクス解析などを紹介する。

6-1. 次世代シーケンスまでの流れ,

シーケンス取得量, 出力ファイル

まず、施設内で分離された黄色ブドウ球菌複数株に対し、PCR 法のような確実な方法による菌種同定 [24] を実施する。初期スクリーニングとして、従来のサンガーシーケンス法による MLST 法が推奨される。複数分離株が同一 ST 型であることが確認されれば、水平伝播が疑われるため全ゲノム解析の工程に進める意義がある。

被検菌1株あたりの次世代シーケンス取得量として、黄色ブドウ球菌であればカバレッジとして少なくともゲノムサイズ約 3 Mbp の 50 倍に相当するリード数が必要であり、100 倍程度あれば大抵のインフォマティクス解析ができる。外部受託サービス依頼時にはこの点を確認されたい。

次世代シーケンスの出力ファイルは、用いる解析プラットフォームによるが、Illumina 社のペアエンド解析を利用する場合、ショートリードの解読クオリティと塩基配列の情報を格納した fastq ファイルというテキストファイルが生データとして出力され、1 検体あたり数百メガバイトの2ファイルが得られる。

6-2. 解析時間, 費用

次世代シーケンサー本体を所有し、試薬一式を購入し保持している施設では、2-3 日程度あれば解析結果の解釈が可能となる。外部受託サービスを利用する場合は、依頼先や時期、解析プランにもよるが、解析結果納品までに1-2ヶ月はかかる。費用面では、次世代シーケンス受託会社に DNA 抽出から依頼する

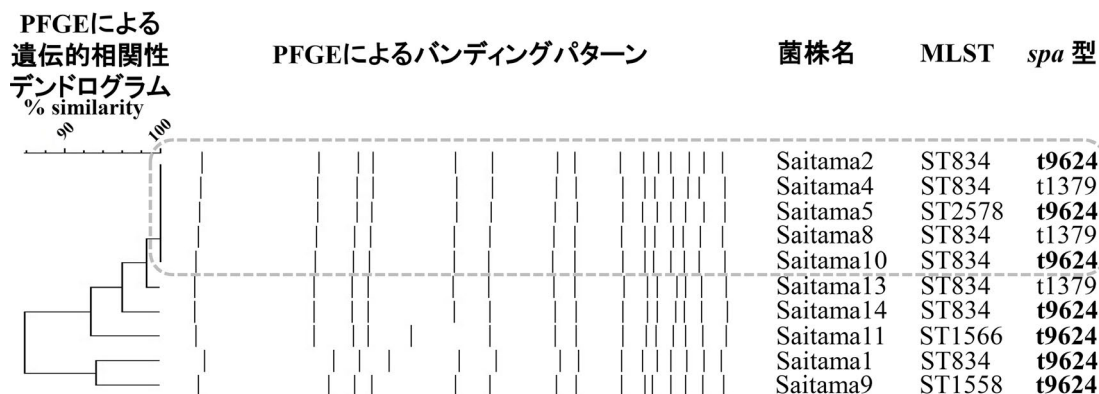


図5 黄色ブドウ球菌株における従来の遺伝子型別法3種類の解析事例

PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動), MLST (Multi-locus Sequence Typing), *spa* 型別法の解析例を示す。PFGE によるデンドログラム (樹形図) で同一クラスターと判定した菌株でも、MLST 型や *spa* 型が異なる菌株や、MLST 型や *spa* 型が同一でも PFGE デンドログラムとの判定が一致しない菌株がある。このように、従来法3種を併用しても結果解釈は困難な場合があり、単独の型別法だけでは誤って解釈する可能性が大きい。図は、Uehara Y et al. *BMC Infect Dis.* 2019 Jan 9;19(1):35. (参考文献 13) の Fig. 2a に日本語説明を追加し改変した。

場合、この工程だけで一検体数千円程度の費用がかかる。自前で精製した DNA 検体を受託会社に送付する場合は、次世代シーケンス費用のみの依頼で一株 2 万円前後が一般的である。バイオインフォマティクス解析も依頼する場合、一般的には次世代シーケンス費そのものを上回る場合があり、納期も遅れる。次世代シーケンサーには多種多様なプラットフォームがあるため、ライブラリー作製法や機器の使用法の解説は本稿では割愛する。

6-3. バイオインフォマティクス解析

前述のように、施設内伝播検証には、全ゲノムシーケンスを利用した SNP 解析が有効である。この解析には、次世代シーケンスの生データである fastq ファイルを用いる方法と、生データを用いゲノムアセンブリして得られるコンティグの fasta ファイルを用いる方法とがある。いずれも同一 ST 型を示す菌株のみをデータセットとし、一括で SNP 解析を実施する。図 6 に示した通り、ST 型が異なるなど、遺伝的に遠縁の菌株同士の解析では SNP 解析の対象となる相同領域が大幅に減少してしまうため、異なる ST 型株はデータセットから除外することが重要である。

バイオインフォマティクス解析を自前で実施する場合は、デンマーク工科大学が提供している web ベースの解析フォーム Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/>) が大変便利である。アカウント登録の必要はなく無料で使用できる。コマンドライン操作が不要で、初心者でも直感的に操作できる。

同 web サイト内の「MLST」を用いると、被検菌株の MLST 型を改めて確認できる。SNP 解析には「CSIphylogeny」を用いる。同一 ST 型を示す被検菌株の fastq ファイルあるいはコンティグ fasta ファイル

を一括アップロードし解析を実行すれば、施設内伝播検証に必要な菌株間ペアワイズ SNP 数や系統樹ファイルなど、各種ファイルが出力される。解析の混雑状況によるが、2-3 日以内に解析結果が得られる。現時点において本法で留意すべき点は、前述の通り、実験動物マウス由来黄色ブドウ球菌株における SNP 数の解釈基準が存在しないことである。実験動物マウス由来黄色ブドウ球菌株のゲノムデータの蓄積と関連研究の進展が待たれる。

そのほか、薬剤耐性遺伝子の保有状況を出力する「ResFinder」や病原因子関連の遺伝子保有状況を出力する「VirulenceFinder」などがあり、いずれの解析プログラムも次世代シーケンスデータを同 web サイト上でアップロードし、菌種名や解析条件を選択するのみで簡便に解析結果が得られる。同 web サイトは、黄色ブドウ球菌のほか、緑膿菌を含む多くの細菌種に対するユニバーサルなゲノム解析プラットフォームを提供している。

7. おわりに

実験動物マウスにおける黄色ブドウ球菌株の施設内伝播を全ゲノム解析で検証するには、SNP データ解析の基準構築が課題として残されている。それには、実験動物マウス由来菌株のゲノム情報とケーススタディの今後の集積が不可欠であるが、そのようにして飼育室間、研究施設間、あるいは国や地域間に跨る本菌の挙動が明らかになれば、本菌の感染対策上の位置づけも明確に決まってくるだろう。

実験者や飼育者が保菌する本菌のヒト宿主適応株が、免疫正常マウス系統に容易には伝播し定着しないことは既に知られている。しかし、免疫不全マウスの各系統でもその伝播および定着動向が同様であるかを示した過去の報告は見られず未解明のまま

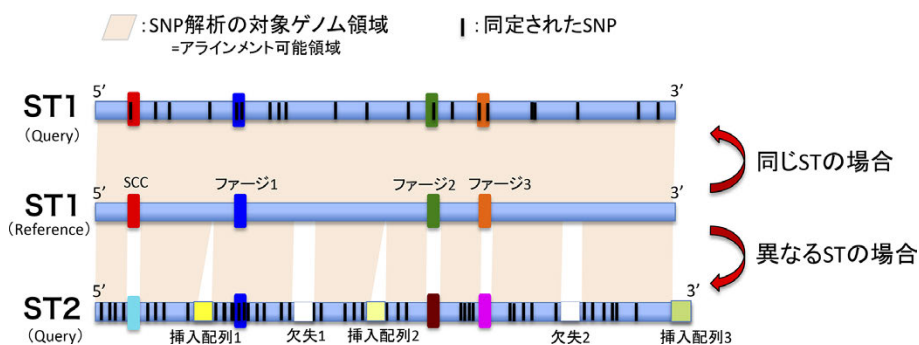


図 6 SNP (Single Nucleotide Polymorphism ; 一塩基多型) 解析の概念図

SNP 解析では、レファレンスとする株と解析対象 (クエリー) 株のゲノム塩基配列間で塩基配列アラインメントが可能な相同領域を解析対象とする。同一 ST 型の菌株間では、外来獲得遺伝子配列 (SCC やファージ)、挿入・欠失配列が株間でほぼ同一であることが多く、SNP 解析の対象領域が広がる。一方、異なる ST 型の菌株間では外来獲得配列や挿入・欠失配列が双方で大きく異なるため、ゲノム中の SNP 解析対象領域が狭くなる。施設内伝播検証で SNP 数を解釈する場合、同じ ST 型を示す菌株のみを解析対象とするなど、ゲノム中の相同領域の割合 (%) を把握した上で数値比較することが重要である。

ある。これを明らかにする研究が進めば、各免疫不全マウス系統における宿主免疫の特定機構の欠落が、黄色ブドウ球菌クローン定着の許容度にどう影響するかが判明する可能性もあり、本菌のみならず常在菌と免疫との関連について新展開が見えてくるかもしれない。今後の本分野の発展を期待したい。

参考文献

1. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005 Dec;5(12):751-62. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
2. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):418-29. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.
3. Schulz D, Grumann D, Trübe P, Pritchett-Corning K, Johnson S, Reppschläger K, et al. Laboratory mice are frequently colonized with *Staphylococcus aureus* and mount a systemic immune response-note of caution for in vivo infection experiments. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 2;7:152. doi: 10.3389/fcimb.2017.00152. eCollection 2017.
4. Holtfreter S, Radcliff FJ, Grumann D, Read H, Johnson S, Monecke S et al. Characterization of a Mouse-Adapted *Staphylococcus aureus* Strain. *PLoS One*. 2013 Sep 2;8(9):e71142. doi: 10.1371/journal.pone.0071142. eCollection 2013. PMID: 24023720
5. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Apr 21;357(9264):1225-40. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04403-2.
6. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13.
7. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother*. 2013. Jun; 45(2): 117–136. doi: 10.3947/ic.2013.45.2.117
8. Gerlach D, Guo Y, De Castro C, Kim SH, Schlatterer K, Xu FF et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alters cell wall glycosylation to evade immunity. *Nature*. 2018 Nov;563(7733):705-709. doi: 10.1038/s41586-018-0730-x.
9. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol*. 2005 Nov;187(21):7292-308. doi: 10.1128/JB.187.21.7292-7308.2005.
10. 佐々木崇. 実験動物におけるブドウ球菌感染症の宿主特異性, 日本実験動物学会 実験動物ニュース. 2021. Vol. 70. No. 2 (2021年4月) 64–70.
11. Trübe P, Hertlein T, Mrochen DM, Schulz D, Jorde I, Krause B et al. Bringing together what belongs together: Optimizing murine infection models by using mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strains. *Int J Med Microbiol*. 2019 Jan;309(1):26-38. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.10.007.
12. Kpeli G, Buultjens AH, Giulieri S, Owusu-Mireku E, Aboagye SY, Baines SL et al. Genomic analysis of ST88 community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Ghana. *PeerJ*. 2017 Feb 28;5:e3047. doi: 10.7717/peerj.3047. eCollection 2017.
13. Uehara Y, Sasaki T, Baba T, Lu Y, Imajo E, Sato Y et al. Regional outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST834 in Japanese children. *BMC Infect Dis*. 2019 Jan 9;19(1):35. doi: 10.1186/s12879-018-3646-z.
14. Köser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med*. 2012 Jun 14;366(24):2267-75. doi: 10.1056/NEJMoa1109910.
15. Harris SR, Cartwright EJ, Török ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2013 Feb;13(2):130-6. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70268-2.
16. Tewhey R, Cannavino CR, Leake JA, Bansal V, Topol EJ, Torkamani A et al. Genetic structure of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *BMC Genomics*. 2012 Sep 25;13:508. doi: 10.1186/1471-2164-13-508.
17. Alam MT, Read TD, Petit RA 3rd, Boyle-Vavra S, Miller LG, Eells SJ et al. Transmission and microevolution of USA300 MRSA in U.S. households: evidence from whole-genome sequencing. *mBio*. 2015 Mar 10;6(2):e00054. doi: 10.1128/mBio.00054-15.
18. Acker KP, Wong Fok Lung T, West E, Craft J, Narechania A et al. Strains of *Staphylococcus aureus* that colonize and infect skin harbor mutations in metabolic genes. *iScience*. 2019 Sep 27;19:281-290. doi: 10.1016/j.isci.2019.07.037.
19. Katayama Y, Baba T, Sekine M, Fukuda M, Hiramatsu K. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2013 Mar;195(6):1194-203. doi: 10.1128/JB.01786-12.

20. Zuo H, Uehara Y, Lu Y, Sasaki T, Hiramatsu K. Genetic and phenotypic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Japanese inpatients in the early 1980s. *Sci Rep*. 2021 Mar 8;11(1):5447. doi: 10.1038/s41598-021-84481-6.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233-9. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.
22. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1008-15. doi: 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000.
23. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996 Jan;15(1):60-4. doi: 10.1007/BF01586186.
24. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotsuki S et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2010 Mar;48(3):765-9. doi: 10.1128/JCM.01232-09.