

称号及び氏名	博士(獣医学)	若林 友騎
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	日本における <i>Staphylococcus argenteus</i> の分布状況調査と分離菌株の性状解析	
論文審査委員	主査	三宅 眞実
	副査	向本 雅郁
	副査	山崎 伸二

## 論文要旨

### はじめに 背景と目的

*Staphylococcus argenteus* は、2015年に新種として登録されたコアグラールゼ陽性ブドウ球菌である。本菌は、遺伝系統学的に *S. aureus* および *S. schweitzeri* と近縁種であり、これら3菌種は *Staphylococcus aureus* complex (SAC) として取り扱われる。*S. argenteus* は、皮膚軟部組織感染症や敗血症の原因菌として世界各国で分離されており、*S. aureus* と同様にヒトおよび動物に対する病原菌として認識されている。また、一部の菌株はブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を産生し、食中毒を引き起こすことが報告されており、食品衛生上の新たな危害要因として着目されている。しかし、これまでに食品衛生学領域における本菌の分離報告は数例しかなく、国内における本菌の分布状況は不明である。

そこで本研究では、*S. argenteus* の汚染実態調査を実施し、また分離菌株の性状を解析することで、本菌の国内における分布状況並びに細菌学的性状の解明を試みた。また、*S. argenteus* 国内分離株の全ゲノム配列を解読し、国外分離株と合わせてパンゲノム解析を実施することで、国内分離株の遺伝的背景の解明を試みた。

### 第一章 日本における *S. argenteus* の分布状況調査

国内の市販食品および食鳥処理施設環境における *S. argenteus* の汚染実態調査を実施した。鶏肉、豚肉、牛肉、魚介類、野菜類の計642検体の生鮮食品を調査したところ、鶏肉151検体中21検体(13.9%)から *S. argenteus* が分離されたが、その他の食品群か

らは分離されなかった。食鳥処理場における調査では、羽あるいは糞便から *S. argenteus* は分離されなかったが、チラー水 1 検体、包丁柄およびまな板のふき取り液各 1 検体、並びに解体と体のふき取り 11 検体から *S. argenteus* が分離された。鶏肉由来 21 株と食鳥処理場由来 14 株の合計 35 株の全ゲノム配列を解読し、コアゲノム上の single nucleotide variants (SNVs) に基づく系統解析を実施したところ、35 株は 4 つの Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) クラスターに分類され、鶏肉由来株と食鳥処理場由来株は同じ BAPS に分類された。食鳥処理場から分離された 13 株の pairwise-SNV を算出したところ、検出された SNV 数は、0~17 であり、同一クローンであると考えられた。これらの 13 株は同じ食鳥処理場で複数のサンプリング日に分離された菌株であることから、1 つの *S. argenteus* 株が食鳥処理場内に定着していると考えられた。さらに、2019 年 4 月に市販鶏肉から分離した 1 株と食鳥処理場由来株の間で検出された pairwise-SNV 数は 8~15 であったことから、市販鶏肉は食鳥処理場内で *S. argenteus* に汚染されることが示唆された。

食品衛生検査において、調理人手指および調理環境の拭取り、並びに加工食品から分離されたコアグラゼ陽性ブドウ球菌 191 株について菌種を同定したところ、14 株 (7.3%) が *S. argenteus* と同定された。14 株の内訳は、調理従事者の手指由来株が 9 株、調理器具由来株が 4 株、食品 (むきえび) 由来株が 1 株であった。14 株の全ゲノム配列を解読し、データベース上の *S. argenteus* ゲノム配列とともにコアゲノム SNV に基づく系統解析を実施したところ、14 株中 7 株が同じ BAPS クラスター (BAPS5) に分類された。BAPS5 に分類された 18 株 (本研究分離株 7 株、データベース登録株 11 株) について詳細に比較したところ、同じ施設の調理人手指と調理器具から分離された菌株間で検出された pairwise-SNV 数が最大で 2 SNV であったことから、手指を介して調理器具が汚染されることが示唆された。また、本研究で手指から分離した菌株と国外で有症者から分離された菌株が、遺伝的に近縁関係であったことから、手指に常在している *S. argenteus* がヒトに感染症を引き起こす可能性が考えられた。

SAC の各菌種は互いに生化学性状が類似しており、*S. argenteus* は通常の同定検査では *S. aureus* として誤同定される。大阪健康安全基盤研究所において、これまでに食中毒検査あるいは食品検査等で分離したブドウ球菌 1,190 株について、改めて菌種を再同定したところ、2009 年から 2020 年に分離された 67 株 (5.7%) が *S. argenteus* と同定された。このことから、少なくとも 2009 年には *S. argenteus* が国内に存在しており、通常の検査で *S. aureus* として分離された菌株の数%程度は、実際には *S. argenteus* であることが示唆された。

## 第二章 日本の *S. argenteus* 分離株の性状解析

国内で分離・収集した計 95 株の *S. argenteus* 株について、Multi-Locus Sequencing Typing (MLST) による遺伝子型別、SE 遺伝子の探索、並びに薬剤感受性試験を実施した。MLST の結果、95 株は 13 種類の Sequence Type (ST) に型別された。近縁な ST を Clonal Complex (CC) としてクラスタリングしたところ、13 の ST は 4 種類の CC

といずれの CC にも属さない 2 つの ST に分類された。ST1223 が 31 株と最多の分離株数で、次いで ST2250 が 27 株、ST2854 が 16 株、ST2198 が 5 株であった。タイをはじめとして、多くの国で ST2250 が主要な遺伝子型であると報告されていることから、日本の *S. argenteus* 株は、国外とは異なる遺伝子型分布を示した。

26 種類の SE 遺伝子の保有状況を PCR で探索したところ、17 種類の SE 遺伝子が少なくとも 1 株以上から検出され、その組み合わせパターン（毒素型）は 10 種類に分類された。*selx* は 95 株すべてで検出された。毒素性ショック症候群毒素-1 遺伝子が 1 株から検出されたが、Panton-Valentine Leukocidin 遺伝子を保有する菌株はなかった。

16 種類の抗菌薬について薬剤感受性試験を実施したところ、1 剤以上に耐性を示した株は 95 株中 23 株（24.2%）であった。*S. aureus* 分離株について同様に感受性試験を実施したところ、177 株中 110 株（62.1%）が 1 剤以上に耐性を示したことから、*S. argenteus* は *S. aureus* と比較して薬剤耐性化が進んでいないと考えられた。セフォキシチンに耐性を示す *S. argenteus* 株はなく、全株がメチシリン感受性 *S. argenteus* と判定された。中国やタイでは、*S. argenteus* のペニシリンおよびテトラサイクリンに対する耐性率が高いことが報告されているが、本研究で調査した国内分離株の両薬剤に対する耐性率はそれぞれ 16.8%、9.5%と低かった。

### 第三章 *S. argenteus* の大規模比較ゲノム解析

本研究で分離同定した *S. argenteus* 国内分離株 71 株の全ゲノム配列を解読した。データベースから取得した 415 株の *S. argenteus* ゲノム配列を加えた、合計 486 株の *S. argenteus* ゲノム配列を使用してパンゲノム解析を実施した。*S. argenteus* はオープンパンゲノムであり、検出された総遺伝子数は 5,590 個、コア遺伝子は 2,151 個であった。486 株の平均遺伝子数は 2,548 個であったことから、平均で全遺伝子の約 83% がコア遺伝子であると考えられた。データベースから取得した 63 株の *S. aureus* ゲノム配列を使用して同様に解析したところ、コア遺伝子数が 1,891 個、63 株の平均遺伝子数が 2,647 個であり、全遺伝子に占めるコア遺伝子の割合が約 71% と計算された。このことから、*S. argenteus* は近縁種の *S. aureus* と比較して、全ゲノムに占めるコア遺伝子の割合が高いと考えられた。

コア遺伝子上の SNV に基づく系統解析を実施したところ、486 株は 8 つの BAPS クラスタに型別された。このうち 1 つの BAPS は日本の分離株のみから構成されており、日本に特徴的な系統の存在が示唆された。病原因子遺伝子を *in-silico* で探索したところ、細胞接着に関する遺伝子、免疫逃避に関する遺伝子、外分泌酵素遺伝子、分泌装置に関する遺伝子、鉄獲得に関する遺伝子は、ほとんどすべての菌株が保有していた。また、コアグラーゼ遺伝子やフィブロネクチン結合タンパク質遺伝子、クランピングファクター遺伝子は、配列に多様性がみられ、系統によって異なる抗原性を有することが示唆された。

*selx* が 486 株すべてから検出された。*S. aureus* の *selx* 塩基配列を加えて系統解析を実施したところ、*S. argenteus* の *selx* 塩基配列でクラスタを形成したことから、*selx*

は *S. argenteus* として *S. aureus* から分化した際にすでにゲノムに保持されていたと考えられた。一方で、*selx* 以外の SE については、その多くが各 BAPS に特徴的に検出されるアクセサリ遺伝子であり、*Staphylococcus aureus* pathogenicity island や genomic island 等にコードされた SE 遺伝子を水平伝播によって獲得したと考えられた。

薬剤耐性に関する遺伝子を探索したところ、ペニシリン耐性に寄与する *blaZ* が複数の株で検出された。*blaZ* はプラスミドレプリコンタイプ rep5a あるいは rep16 と同時に検出されたことから、これらのレプリコンを有するプラスミドがペニシリン耐性獲得に関与していると考えられた。*in-silico* の SCCmec 型別を実施したところ、同じ BAPS の中でも複数の SCCmec 型が検出され、進化系統とは無関係にゲノムに挿入されたことが示唆された。

## 総括

- *S. argenteus* は市販鶏肉や調理人の手指から分離され、食中毒の際には原材料あるいは手指から食品が本菌に汚染されると考えられた。
- *S. argenteus* 国内分離株の MLST および薬剤感受性試験の結果は、国外分離株とは異なる傾向が見られた。
- *S. argenteus* の全ゲノムに占めるコア遺伝子の割合は *S. aureus* のそれと比較して高く、多くの遺伝子が共通に保存されている一方で、SE 遺伝子や薬剤耐性遺伝子は可動性遺伝因子上にコードされており、多様性が認められた。

## 審査結果の要旨

*Staphylococcus argenteus* は、2015 年に登録された新種のコアグラーゼ陽性ブドウ球菌で、遺伝系統学的に *S. aureus* および *S. schweitzeri* と近縁種であることから *Staphylococcus aureus* complex (SAC) の 1 つとして取り扱われる。*S. argenteus* は 2015 年以降、皮膚軟部組織感染症や敗血症の原因菌として世界各国で分離され、今では *S. aureus* と同様にヒトや動物に対する病原菌として認識されている。中でも一部の菌株はブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を産生して食中毒を引き起こすことから、食中毒原因細菌として認知され始めているが、これまでに食品衛生学領域における本菌の分離報告は海外からの 2 報しかなく、国内における分布状況に至っては全く不明であった。そこで本研究では *S. argenteus* の食品汚染、環境汚染の実態調査を実施し、さらに分離菌株の性状を分子遺伝学的手法で解析することで、本菌の国内における分布状況と細菌学的・疫学的性状の解明を試みた。また、*S. argenteus* 国内分離株の全ゲノム配列を解読し、国外分離株と合わせたパンゲノム比較解析を実施して、国内分離株の地域生態学的特徴の解明も試みた。

第 1 章ではまず国内市販食品の *S. argenteus* 汚染実態調査を実施した。鶏肉、豚肉、

牛肉、魚介類、野菜類の計 642 検体の生鮮食品を調査した結果、鶏肉のみから *S. argenteus* が分離された。そこで食鳥処理場を調査したところ、解体後のと体の一部から本菌が分離されたものの、羽や糞便からは分離されず、むしろチラー水、包丁柄およびまな板などの環境検体から本菌が多数分離された。鶏肉由来 21 株と食鳥処理場由来 14 株の全ゲノム配列を解読し、コアゲノム上の single nucleotide variants (SNVs) に基づく系統解析を実施した。食鳥処理場由来 13 株の pairwise-SNV は 0 から 17 の範囲内にあり、これら菌株は同一クローンと判断され、特定の *S. argenteus* 株が食鳥処理場内に長期間定着している状況が示唆された。また市販鶏肉由来 1 株も上記食鳥処理場由来株と同一クローンと判断されたことから、本菌が食鳥処理場内施設から市販鶏肉へと汚染を広げる可能性が疑われた。別に調理者手指、調理環境、加工食品から分離されたコアグラゼ陽性ブドウ球菌 191 株について再検査し、*S. argenteus* と同定された 14 株 (7.3%) を全ゲノム解読とコアゲノム SNV に基づく系統解析に供したところ、同じ施設の調理者手指から調理器具の汚染が発生している状況が示唆された。さらに大阪府の衛生研究所で食中毒検体や食品から分離されたブドウ球菌 1,190 株を再検査したところ、2009 年から 2020 年に分離された 67 株 (5.7%) が *S. argenteus* と同定され、少なくとも 2009 年から通常の検査で本菌は *S. aureus* と誤同定されている実態が伺われた。

第 2 章では、本研究により得られた国内分離 *S. argenteus* 株 95 株について、Multi-Locus Sequencing Typing (MLST) による遺伝子型別と、SE 遺伝子の探索等を実施した。95 株は 13 種類の Sequence Type (ST) に型別され、うち ST2250 に型別された株は全体の約 3 割あった。国外分離株では ST2250 が全体の 8 割を超えると複数の文献により報告されており、日本の *S. argenteus* 株は多様な ST 型を特徴とすることが明らかになった。また、調べた 26 種の SE 遺伝子のうち 17 種類がいずれかの株に検出され、株により保有遺伝子の数と種類は多様であった。さらに、*S. aureus* 分離株 16 種類と合わせて薬剤感受性試験を実施したところ、*S. argenteus* は *S. aureus* と比較して薬剤耐性化が進んでおらず、例えばセフォキシチン耐性株、メチシリン耐性株は調べた *S. argenteus* 株には見つからなかった。この結果は、遺伝学的近縁種でありながら、*S. argenteus* は *S. aureus* とは異なる生態学的ニッチェに生息し、それにも関わらず類似の病態をヒトに示すことを示唆している。

第 3 章では 71 の国内分離株の全ゲノム配列を解読し、これにデータベースから得られた 415 株の同菌ゲノム配列を加えた、合計 486 株によるパンゲノム解析を実施した。コア遺伝子上の SNV に基づき系統解析を実施したところ、486 株は 8 つの Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) クラスターに型別された。うち 1 つの BAPS は日本の分離株のみから構成されていたことから、日本に特徴的な系統の存在が示唆された。病原性関連遺伝子のうち、宿主細胞接着、免疫逃避、鉄獲得などに関わる遺伝子はほぼすべての菌株が保有していた一方、SE 遺伝子は菌株ごとに保有状況が異なること、各 BAPS に特徴的な SE 遺伝子パターンを示すことが明らかになり、SE 遺伝子は水平伝播によって菌株間を移動して、*S. argenteus* 菌株に種内の多様性を与えていることが示唆された。

以上の結果は、新しい食中毒原因細菌 *S. argenteus* の重要な食品汚染源と汚染拡大の

諸要素を初めて明らかにし、加えてパンゲノム解析により国内分離 *S. argenteus* 株の遺伝学的特徴を明らかにして、外国株との生態学的・病原学的相違点を初めて明確に示したものである。黄色ブドウ球菌を含む SAC に対する世界規模での生態学的特徴と、そのヒトへの病原性を理解するための基盤情報を提供するものであり、成果は獣医学のみならず医学、食品微生物学の分野においても多大な貢献をされると考えられる。従って、本論文の審査及び最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。