



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

分子疫学的手法を用いた食中毒原性黄色ブドウ球菌  
の遺伝学的解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-02-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 祐介 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/50399">http://hdl.handle.net/20.500.12099/50399</a>

分子疫学的手法を用いた  
食中毒原性黄色ブドウ球菌の遺伝学的解析

2014 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岩手大学)

佐藤祐介

## 目次

略語一覧	5
緒言	9
第1章 黄色ブドウ球菌の新規遺伝学的解析手法の確立	13
1-1. 序論	13
1-2. 材料および方法	14
1-2-1. 使用菌株と培養条件	14
1-2-2. Genomic elements 解析用 LA-PCR プライマーの設計と 増幅産物の予測	14
1-2-3. Genomic DNA の精製と LA-PCR	15
1-2-4. LA-PCR 増幅産物の解析	16
1-2-4-1. 制限酵素切断長多型解析	16
1-2-4-2. サザンハイブリダイゼーション	16
1-2-4-3. 塩基配列の決定	17
1-2-5. Accession number	18
1-2-6. 実験承認番号	19
1-3. 結果	19
1-3-1. 標準菌株を用いた SaPIs の増幅の確認	19
1-3-2. 臨床分離株における SaPI プロファイル解析	19
1-3-3. エンテロトキシン遺伝子関連 genomic elements の解析	20
1-4. 考察	22

第 2 章 日本における食中毒原性クローンの同定	.....	45
2-1.	序論	..... 45
2-2.	材料および方法	..... 46
2-2-1.	供試菌株、培養条件ならびに DNA 抽出	..... 46
2-2-2.	黄色ブドウ球菌の genotyping	..... 46
2-2-3.	SEA の産生量測定	..... 48
2-2-3-1.	リコンビナント SEA 精製	..... 48
2-2-3-2.	ELISA 用ポリクローナル抗体の精製と標識	..... 48
2-2-3-3.	SEA 特異的 sandwich ELISA	..... 50
2-2-4.	Genomic elements の解析	..... 51
2-2-5.	実験承認番号	..... 52
2-3.	結果	..... 52
2-3-1.	各種分離株の Coa 型別	..... 52
2-3-2.	各種分離株の SE/SEI 保有状況	..... 52
2-3-3.	各種分離株の MLST 解析と比較	..... 53
2-3-4.	各種 CC の SEA 産生量	..... 54
2-3-5.	CC81 の遺伝学的解析	..... 54
2-4.	考察	..... 55

総括	.....	72
和文要約	.....	75
英文要約 (Summary)	.....	78
謝辞	.....	82
引用文献	.....	83

## 略語一覧

att: attachment sequence 付着配列

BHI: Brain heart infusion 脳心臓抽出液

CC: Clonal complex

Coa: Coagulase コアグララーゼ

DNA: Deoxyribonucleic acid デオキシリボ核酸

DDBJ: DNA Data Bank of Japan 日本 DNA データバンク

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸

*egc*: enterotoxin gene cluster

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

EMBL: European Molecular Biology Laboratory ヨーロッパ分子生物学研究所

EtBr: Ethidium Bromide エチジウムブロマイド

GS4B: Glutathione Sepharose 4B グルタチオンセファロース 4B

GST: Glutathione S-transferase グルタチオン-S-トランスフェラーゼ

LA-PCR: Long-accurate Polymerase chain reaction 長鎖正確性 PCR 反応

LB: Luria bertany LB (培地)

MHC: Major histocompatibility complex 主要組織複合体

MLST: Multi locus sequence typing

MRSA: Methicilline-resistant *Staphylococcus aureus* メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

MSSA: Methicilline-susceptible *Staphylococcus aureus* メチシリン感受性黄色ブドウ球菌

NRS: Normal rabbit serum 正常ウサギ血清

NTP: Nucleotide tri-phosphate ヌクレオチド3リン酸

O.D.: Optical density 光学密度

ORF: Open reading frame

PBS: Phosphate buffered saline リン酸緩衝食塩水

PCR: Polymerase chain reaction

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus* 黄色ブドウ球菌

φ Sa3C: φ Sa3 Center region

φ Sa3L: φ Sa3 Left region

φ Sa3R: φ Sa3 Right region

SaPI: *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 黄色ブドウ球菌病原遺伝子島

SCC*mec*: Staphylococcal chromosome cassette *mec*

SDS: Sodium dodecyl sulfate ラウリル硫酸ナトリウム

SE: Staphylococcal enterotoxin ブドウ球菌エンテロトキシン/ブドウ球菌腸管毒

SEA: Staphylococcal enterotoxin serotype A ブドウ球菌エンテロトキシン A/ブドウ球菌腸管毒 A

SEB: Staphylococcal enterotoxin serotype B ブドウ球菌エンテロトキシン B/ブドウ球菌腸管毒 B

SEC: Staphylococcal enterotoxin serotype C ブドウ球菌エンテロトキシン C/ブドウ球菌腸管毒 C

SED: Staphylococcal enterotoxin serotype D ブドウ球菌エンテロトキシン D/ブドウ球菌腸管毒 D

SEE: Staphylococcal enterotoxin serotype E ブドウ球菌エンテロトキシン E/ブドウ球菌腸管毒 E

SEG: Staphylococcal enterotoxin serotype G ブドウ球菌エンテロトキシン G/ブドウ  
球菌腸管毒 G

SEH: Staphylococcal enterotoxin serotype H ブドウ球菌エンテロトキシン H/ブドウ  
球菌腸管毒 H

SEI: Staphylococcal enterotoxin serotype I ブドウ球菌エンテロトキシン I/ブドウ球  
菌腸管毒 I

SEK: Staphylococcal enterotoxin serotype K ブドウ球菌エンテロトキシン K/ブドウ  
球菌腸管毒 K

SEL: Staphylococcal enterotoxin serotype L ブドウ球菌エンテロトキシン L/ブドウ球  
菌腸管毒 L

SEM: Staphylococcal enterotoxin serotype M ブドウ球菌エンテロトキシン M/ブドウ  
球菌腸管毒 M

SEN: Staphylococcal enterotoxin serotype N ブドウ球菌エンテロトキシン N/ブドウ  
球菌腸管毒 N

SEO: Staphylococcal enterotoxin serotype O ブドウ球菌エンテロトキシン O/ブドウ  
球菌腸管毒 O

SEP: Staphylococcal enterotoxin serotype P ブドウ球菌エンテロトキシン P/ブドウ球  
菌腸管毒 P

SEQ: Staphylococcal enterotoxin serotype Q ブドウ球菌エンテロトキシン Q/ブドウ  
球菌腸管毒 Q

SER: Staphylococcal enterotoxin serotype R ブドウ球菌エンテロトキシン R/ブドウ球  
菌腸管毒 R



SEI: Staphylococcal enterotoxin like toxin ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素/ブドウ球菌腸管毒様毒素

SEIJ: Staphylococcal enterotoxin like toxin serotype J ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 J/ブドウ球菌腸管毒様毒素 J

SEIX: Staphylococcal enterotoxin like toxin serotype X ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 X/ブドウ球菌腸管毒様毒素 X

SFP: Staphylococcal food poisoning ブドウ球菌食中毒

SSC: Saline sodium citrate クエン酸緩衝食塩水

ST: Sequence type

TAE buffer: Tris acetate ethylenediaminetetraacetic acid buffer トリス/酢酸/EDTA 緩衝液

TBE: Tris-boric acid-EDTA buffer トリスホウ酸 EDTA 緩衝液

TET buffer: Tris-EDTA-Triton buffer トリス EDTA トライトン緩衝液

TST-1: Toxic shock syndrome toxin-1 毒素性ショック症候群毒素

UV: Ultraviolet: 紫外線

VRSA: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌

## 緒言

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性球菌で、動物やヒトの皮膚や頭皮、鼻咽頭粘膜などに常在する。本菌は、化膿性疾患(せつ、よう、蜂巣炎)や食中毒のような軽度の疾病から敗血症や心内膜炎、壊死性肺炎、毒素性ショック症候群などの重篤で致死的な疾病まで、様々な疾病の起因菌である(24, 48)。加えて、近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicilline-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)やバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)などの薬剤耐性黄色ブドウ球菌による感染症が、ヒト医療で問題となっている(31, 53)。また、獣医学領域においても、黄色ブドウ球菌は牛の乳房炎や家禽の関節炎などの起因菌として重要視されている(23, 91)。

黄色ブドウ球菌に起因する疾病のうち食中毒は、食品中で本菌がブドウ球菌エンテロトキシン(ブドウ球菌腸管毒、Staphylococcal enterotoxins, SEs)を産生し、SEsに汚染された食品を摂取することにより発生する。本食中毒の主症状は嘔吐や悪心である(1, 4, 29, 40)。SEsは分子量22~29kDaの単純タンパク質で、ヒトをはじめとする霊長類やジャコウネズミに嘔吐活性を示す。TSST-1を含めたSEsスーパーファミリーは耐熱性を示すとともにトリプシンやペプシンといった種々のタンパク質分解酵素に対しても抵抗性を示す(4, 7, 42)。また、SEsはスーパー抗原活性を有し、MHC classII分子とTCR分子を架橋し、多数のT細胞を活性化する。その結果、T細胞からの過剰なサイトカイン産生を誘発することで毒素性ショック症候群の発症にも関与する(4, 7, 9, 80)。SEsはその抗原性により型別され、Classical SEsとしてSEA、SEB、SEC、SED、SEEの5種が知られてきたが、近年になって多数の新型SEおよび新型SEIs(ブドウ球菌腸管毒様毒素、Staphylococcal enterotoxin like toxins)が報告され、現在までに5種

類の classical SEs に加え、18 種類の新型 SEs/SEIs (SEG~SEIX) の存在が明らかになっている(1, 4, 7, 40, 41, 57, 59, 61, 76, 87)。

ブドウ球菌食中毒は世界中で発生している食品衛生上重要な食中毒である。厚生労働省の食中毒統計によると、近年、日本では年間数十件の事例数と数百人の患者が発生し、2000年には関西地方を中心に低脂肪乳を原因とした13,400人に被害が及んだ大規模食中毒が発生した(3)。このように本食中毒は食の安全を脅かす危害因子の一つである。20世紀中盤以降は衛生環境の向上に伴い本食中毒は一時期減少傾向にあったが、この20年間は患者数、事件数ともに横ばいに推移しており、現在の一般衛生対策では本食中毒の完全な抑止は困難であることが示唆されている。

黄色ブドウ球菌に起因する他の疾病、特に MRSA 感染症では分子疫学解析技術の進展に伴い病原性解析やサーベイランスが盛んに行われているが(16, 43, 53)、食中毒に関連する黄色ブドウ球菌の遺伝学的背景やその性状解析は未だ行われていないのが現状である。細菌の疫学解析の手法は多様であるが、細菌学分野では、薬剤感受性試験やフェージ感受性試験などが古くから使用されている(74)。また、1984年に細菌の全ゲノムを制限酵素で切断して電気泳動パターンを解析するパルスフィールド電気泳動法が報告されて以降、細菌学の領域では本手法が広く用いられている(69)。さらに近年では、疫学解析の中に分子生物学的手法を組み込んだ分子疫学解析が、細菌学の分野で盛んに行われている(27, 73)。このような分子疫学解析として、PCR やシーケンシングにより菌ゲノムの一部領域を解析する手法や、最近では次世代シーケンサーを用いて菌ゲノムを網羅的に解析する手法が知られており、これらは黄色ブドウ球菌においても一部応用され始めている(14, 66)。

2001年に初めて黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列が報告されて以降(39)、世界中で様々な疾病から分離された黄色ブドウ球菌のゲノム配列が決定されている。2013年1

月現在、43 株の完全なゲノム配列がデータベース上に登録され、ドラフト配列を含めると数百株にのぼるゲノム配列が報告されている。このような黄色ブドウ球菌のゲノミクス解析により、本菌のゲノムは 3 つの構成要素、すなわちコアゲノム、コアバリエブルおよび **genomic elements** により構成されることが明らかになった (43, 44)。コアゲノムは、ほぼ全ての株で共通する本菌の生命維持や基本的生化学的性状を形作る遺伝子群である。コアバリエブルは、黄色ブドウ球菌集団のうち特定のグループが保有する遺伝子群のことである。**genomic elements** はプロファージや **Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec)** などの外来性遺伝子群を指し、本菌が外から自身のゲノムに取り込んだ遺伝子群である。黄色ブドウ球菌の病原因子は、 $\alpha$  毒素や  $\beta$  ロイコシジン、コアグラーゼなどのコアゲノムやコアバリエブル上に存在するものもあるが、多くの毒素や薬剤耐性遺伝子は **genomic elements** 上に存在する (38, 43)。このため、**genomic elements** が株間を移動しゲノムに取り込まれることが、本菌の病原因子の獲得に関与すると考えられている (43, 50)。また、本菌の感染症分離株の分子疫学解析により、特定のゲノム構成 (コアゲノム+コアバリエブル+**genomic elements**) の集団 (クローン) が特定の疾病と関連が深いことが知られている (18)。特に、MRSA の解析では、コアゲノムを解析する **multi locus sequence typing (MLST)** (20) と **genomic elements** の一つである **SCCmec** 型別 (11, 79) を併用した分子疫学解析によるクローン同定とその解析が盛んに行われている。MLST は本菌のハウスキーピング遺伝子の解析であり、MRSA とメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (**Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)**) のどちらでも使用可能である (20)。しかし、**SCCmec** は本菌のメチシリン耐性に関わる可動性遺伝子領域であり (71)、MSSA ではこれを保有していない。過去の報告において、食中毒分離株の多くは MSSA であることが知られており、本分離株を MRSA と同じ分子疫

学的手法によってクローン同定を行うことは不可能であった (2, 13)。このため *SCCmec* 型別に代わる新たな解析手法の確立が必要である。

本学位論文では、今なお完全な抑止が困難なブドウ球菌食中毒について、食中毒事例分離黄色ブドウ球菌の分子疫学解析が本食中毒の発生抑止やサーベイランスに有用と考え、第 1 章では *SCCmec* に代わる新規の遺伝学的解析手法の確立、第 2 章では日本における食中毒原性クローンの探索と遺伝学的特徴の解明を行った。

## 第 1 章

### 黄色ブドウ球菌の新規遺伝学的解析手法の確立

#### 1-1. 序論

*S. aureus* pathogenicity islands (SaPIs) は 1998 年に Lindsay ら (46) により初めて報告された可動性遺伝因子であり、食中毒の原因毒素である SEs や他の毒素、薬剤耐性遺伝子、付着因子などの遺伝子が存在する (54, 85, 89)。SaPIs は黄色ブドウ球菌のゲノム上の特定領域に挿入され、これまで 6 領域の SaPIs 挿入領域 (黄色ブドウ球菌のゲノム上 8', 9', 18', 19', 44', 49' 領域) が報告されている。SaPIs の全長は 13~17kbp でその両端には挿入部位特異的な繰り返し配列が存在し、SaPIs のゲノムへの組み込みや複製あるいはファージ様粒子への組み込みなど SaPIs 自身の維持や菌株間の移動に関与する遺伝子から構成されている。また、MRSA と MSSA はどちらも SaPIs を保有するため、SaPIs を中心とした genomic elements の解析は、SCC*mec* 型別には不可能である黄色ブドウ球菌集団全体を対象とした網羅的な解析法として有効と考えられる。

本章では黄色ブドウ球菌における SaPIs を中心とした genomic elements の解析法 (genomic elements-scanning 法) の新規確立を行うとともに、その有効性を検証するために未知の病原因子を含む SaPIs の同定を試みた。また、食中毒由来株の遺伝学的特徴を把握するためにはエンテロトシキン遺伝子の保有状況の全貌を把握する必要があるため、SaPIs 上以外の SEs 関連 genomic elements (1, 4, 29, 40)、ファージ、 $\nu$  Sa  $\beta$  上の enterotoxin gene cluster (*egc*)、truncated-トランスポゾンの解析手法の確立を試みた。

## 1-2. 材料および方法

### 1-2-1. 使用菌株と培養条件

表 1-1 に示す黄色ブドウ球菌の標準菌株 3 株および臨床分離 10 株を用いた。N315 株と MW2 株はゲノムの全塩基配列が報告されている標準菌株 (5, 39) であり、243 は全ゲノム配列の登録はないがパルスフィールド電気泳動法より SaPI3 を保有することが推定される標準菌株 (7) である。臨床分離株としては、食中毒由来株 4 株、鼻腔由来株 4 株、ヒト患者由来株を 2 株の計 10 株を使用した。各株はそれぞれ異なる食中毒事例、健常ヒト鼻腔、患者より分離された株である。J11 を除く各臨床分離株の参考文献は表 1-1 の通りであり、J11 は女子栄養大学より分与していただいた。黄色ブドウ球菌の培養には全て BHI 寒天培地 (Difco) と BHI broth (Difco) を用い、気相、37°C で一晩培養を行った。

### 1-2-2. Genomic elements 解析用 LA-PCR プライマーの設計と増幅産物の予測

Genomic elements の領域を増幅するために、6 領域の SaPIs、*seh* 関連トランスポゾン、*egc*、 $\phi$  Sa3 の挿入領域近傍の保存性の高い領域に LA-PCR プライマーを設計した。Genomic elements 周辺の保存性の高い領域の同定には、CLUSTAL W (77) と *in silico* MolecularCloning (*in silico* biology) を用い、データベース上に登録されている N315 (BA000018)、MW2 (BA000033)、COL (NC\_002951)、USA300 (NC\_007793)、RF122 (AJ938182)、MRSA252 (BX571856) および MSSA476 (BX571857) ゲノムの全塩基配列について解析した。Genomic elements のうち、SaPIs、*seh* 関連トランスポゾンおよび *egc* は、挿入領域近傍に設計したプライマー 1 セットでの増幅を行えるように、同定した保存性の高い領域にプライマーを設計した。 $\phi$  Sa3 の全長は 40-50kbp と SaPIs などと比較すると長いため、プロフェージ内の保存性が高い領域を 3 分割し、そ

それぞれの部分に対応する 3 種のプライマーセットを用意して増幅を試みた (図 1-1)。表 1-2 に本章で使用したプライマー配列を示した。これらのプライマーを用いた増幅産物の *in silico* 推定には、*in silico* MolecularCloning を用いた。

### 1-2-3. Genomic DNA の精製と long-accurate (LA) -PCR

37°Cで一晩振盪培養した菌液を遠心して菌体を回収し、TET buffer (10mM Tris-HCl pH7.5、1mM EDTA、2.4% TritonX-100、Lysostaphin (Sigma) 5  $\mu$  g/ml 添加) で懸濁後、37°Cで 30 分加温した細胞壁破壊液を用いて、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) による genomic DNA の精製を行った。精製した genomic DNA の純度確認は、1x トリス/酢酸/EDTA バッファー (TAE buffer) -1% アガロースゲルと 1xTAE buffer を用いた電気泳動法により行った。アガロースゲルには SeaKem GTG Agarose (Lonza)、1xTAE buffer の作成には 50xTAE (Bio-Rad) を用いた。

LA-PCR には LA-*taq* HS (TAKARA) を使用し、0.5  $\mu$  M dNTP、0.5pM 各プライマー、2.5U LA-*taq* を加えた 1x LA-*taq* buffer (49 $\mu$ l) と genomic DNA (1 $\mu$ l) を混合した 50 $\mu$ l 反応液を作成した。PCR 反応は MyCycler™ パーソナルサーマルサイクラー (Bio-Rad) もしくは Veriti サーマルサイクラー (Applied biosystems) により実施し、96°C・1 分の熱変性の後、98°C・10 秒ならびに 68°C・20 分を 1 サイクルとする工程を 28 回繰り返す、68°C・10 分の最終伸長を行った。増幅産物は、1% precast ready gel 64well (Bio-Rad) と 1xTAE-0.5  $\mu$  g/ml Ethidium Bromide (EtBr)-buffer を用いて電気泳動により確認した。1xTAE-0.5  $\mu$  g/ml EtBr buffer の調製には、50xTAE (Bio-Rad) と Ethidium Bromide (Bio-Rad) を用いた。得られた増幅産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。



#### 1-2-4. LA-PCR 増幅産物の解析

##### 1-2-4-1. 制限酵素切断長多型解析

制限酵素切断長多型解析は、2U の HindIII (New England Biolabs, NEB) または HaeIII (NEB) を用いて、37°C・30 分の条件で実施した。消化した DNA 鎖の確認は、1% precast ready gel 20well (Bio-Rad) と 1xTAE-0.5  $\mu$ g/ml EtBr-buffer を用いた電気泳動により行った。

##### 1-2-4-2. サザンハイブリダイゼーション

*sec* プローブの作成と標識には、*sec* 遺伝子断片をクローニングベクターである pGEM-3zf (+) に組み込んだ pKOC3 (北里大学 胡東良博士より分与) を大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO) に 42°C、45 秒間のヒートショックによりプラスミド導入した。次いで、100 $\mu$ g/ml アンピシリン (Wako) 添加 LB agar (Sigma) で選択後、得られた形質転換体を 100 $\mu$ g/ml アンピシリン添加 LB broth (Sigma) にて、37°Cで一晩振盪培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を精製した。精製した pKOC3 は BamH I (NEB) および EcoR I (NEB) を用いて切断後、1x TAE-0.9%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。さらに、目的の DNA 断片を含むゲルを回収後、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて *sec* 特異的 DNA プローブを精製し、ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (Amersham Bioscience) により標識した。

LA-PCR 増幅産物中の目的遺伝子の検出のために、精製後の増幅産物 (0.5~1 $\mu$ g) を HindIIIにより切断し、1x TAE-0.9% agarose gel、1xTAE buffer、Sub-Cell GT (Bio-Rad)ならびに PowerPac Basic (Bio-Rad) を用いて 15V の定電圧で一晩電気泳動を行った。その後、泳動後のゲルに長鎖 DNA の加水分解処理 (350mM HCl・10 分間)、2 本

鎖 DNA の denaturing 処理 (0.5M NaOH/ 1.5M NaCl · 25 分間) を行った後、ゲルの中和処理 (0.5M Tris-HCl/ 1.25M NaCl · 15 分間) を 2 回行い、室温で一晩転写後、UV cross linker により DNA を固定した。なお、転写は、バッファーとして 20xSSC (Bio-Rad) を希釈した 10x SSC、メンブレンとして Hybond-N+ (Amersham Bioscience) を使用し、DNA 固定は TL-2000 Ultraviolet Translinker (UVP) を用い、中波長で行った。DNA 固定後のメンブレンに対して、42°C · 1 時間以上のプレハイブリダイゼーション後、標識した *sec* 特異的プローブを用いて、42°C · 一晩のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーは、ECL™ gold hybridization buffer (Amersham Bioscience) に 0.1M NaCl (Nacali Tesuque) と付属の Blocking reagent を加え 1 時間攪拌後、42°C で加熱し作成した。ハイブリダイゼーション後は、第一洗浄液 (6M 尿素 (Nacalai tesque)、0.1x SSC (pH=7.0)、0.4% SDS (Life technology) · 20 分) を用いて 42°C で 2 回洗浄を繰り返し、次いで第二洗浄液 (2x SSC · 5 分) を用いて室温で 2 回洗浄を繰り返した。最後に ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (Amersham Bioscience) と Chemidoc XRS (Bio-Rad) を用いて、増幅産物中における *sec* の確認を行った。

#### 1-2-4-3. 塩基配列の決定

制限酵素処理により新規 genomic elements の存在が示唆された増幅産物については、その塩基配列を決定するため、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてシーケンス用テンプレートの精製を行った。精製したテンプレートの純度確認は 1x TAE-0.9% agarose gel と 1x TAE buffer による電気泳動により行い、Quant-it dsDNA Assay Kit BR (Invitrogen) を用いて濃度を測定した。次いで、精製 DNA、BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) と BigDye® Terminator

v3.1 5x Cycle sequencing Buffer (Applied Biosystems) を用いて、サイクルシーケンシング (96°C 1 分の後、96°C・10 秒、50°C・5 秒、60°C・4 分の行程を 25 サイクル) を行った。反応産物は 10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、10 分の 1 量の 125mM EDTA (pH7.5)、2.5 倍量の 100%エタノールを用いてエタノール沈殿を行い、上清除去後 3.5 倍量の 70%エタノールで洗浄し乾燥させ、-20°Cで保存した。保存サンプルを Hi-Di formamide (Applied Biosystems) を用いて再溶解し、95°Cで 2 分間加熱後に氷中で 2 分間冷却し、オートシーケンサー (ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)) を用いて塩基配列決定を行った。得られた塩基配列を ATGC6 software Ver. 10 (GENETYX) を用いて整列させ、これから新たに設計したプライマーを用いたプライマーウォーキング法<sup>1)</sup>による塩基配列の決定を行った Open reading frame (ORF) の抽出には ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) と in silico MolecularCloning software を用いて行った。また、National Center for Biotechnology Information の BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性検索により、各 ORF の機能推定を行った。

#### 1-2-5. Accession number

本章で同定された新規 genomic elements の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank に登録された。

Accession number : AB704539 (IVM60)、AB704540 (HHMS2)、AB704541 (J11)、AB716349 (IVM10)、AB716350 (Ishikawa11)、AB716351 (No. 10)、AB716352 (Hirosaki4)

### 1-2-6. 実験承認番号

本研究のうち、遺伝子組換えに係るものは岩手大学遺伝子組換え生物安全実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号: B201016)。

## 1-3. 結果

### 1-3-1. 標準菌株を用いた SaPIs の増幅の確認

図 1-2 に N315 株における LA-PCR による SaPIs 解析の結果を示す。N315 株に 6 領域の SaPI 挿入可能領域が保存されているが、そのうち SaPI<sub>n1</sub> (約 15kb) が挿入される 44'領域 (39) では 20Kbp 弱のバンドが検出された(図 1-2A)。一方、SaPI 挿入配列 (attC) は存在するが SaPI の挿入がない 8'、9'、18'、19'、49' 領域では 4kbp 以下の増幅産物が得られた。44' 領域の増幅産物の HindIII 消化後の泳動像(図 1-2B) では、in silico 予測と一致する 3 種類のサイズの HindIII 消化断片 (8,225bp、6,473bp、1,700bp) が確認された。in silico 解析より 6,473bp の消化断片には *sec* が存在することが予測され、特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション解析により本断片中に *sec* が検出された(図 1-2C)。

### 1-3-2. 臨床分離株における SaPI プロファイル解析

表 1-1 に示した 243 株および 10 株の臨床分離株を用い、SaPI 用のプライマーセットによる LA-PCR を行うことで、全ての領域で何らかの増幅産物が得られた(図 1-3)。これらのうち SaPI の存在が示唆される 10kbp 以上の増幅産物は 22 個存在していた。さらに、増幅産物を HindIII で消化した結果、8'領域と 49'領域ではそれぞれ 1 種類、9'領域、18'領域および 44'領域ではそれぞれ 2 種類、19'領域では 4 種類の泳動像を示した(図 1-4)。これらのうち、No.1 株、No.10 株、Ishikawa11 株、Nagasaki 株、IVM60

株、HHMS2 株、J11 株由来の 9' 領域の増幅産物は MW2 のゲノム上 9' 領域に存在する非 SaPIs 性 genomic elements の HindIII 消化断片の予測 (6,745bp、2,936bp、1,940bp、428bp) (5) と一致した。しかし、それ以外の 6 領域全 9 種類の増幅産物の HindIII 消化断片の泳動像はデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上に一致するものが存在しなかった (2011 年 9 月時点)。次いで、増幅産物中の新規 SaPIs の塩基配列を決定するために、シーケンシング後、SaPIs の抽出、Open reading frame (ORF) の抽出ならびに annotation を行ない、7 種の新規 SaPIs を同定した。図 1-5 に新規 SaPIs の模式図を示し、その詳細を表 1-3~1-9 に示す。新規 SaPIs の命名は Novick らの提唱 (55) に従い、SaPI + 株名で行った (SaPIivm10、SaPIishikawa11、SaPIivm60、SaPIhhms2、SaPIj11、SaPIino10 および SaPIhirosaki4)。各 SaPIs の挿入領域は、SaPIivm10 で 8'、SaPIishikawa11 で 18'、SaPIivm60、SaPIhhms2 および SaPIj11 で 19'、SaPIino10 および SaPIhirosaki4 で 44'であり、これらの全てにおいて SaPI の基本骨格である両端のダイレクトリピート (attL および attR)、*int*、*stl*、*str*、*rep*、*ter* を保有していた。一方、SaPIishikawa11 では *pri* および *cp* が欠損していた。さらに、これらの SaPIs では基本骨格の間に病原因子として SE 遺伝子や薬剤耐性遺伝子を保有していた。すなわち、SaPIivm10 株、SaPIishikawa11 株、SaPIivm60 株、SaPIino10 株および SaPIhirosaki4 株では SE 遺伝子として *seb* を、SaPIj11 株では *sek* と *seq* を保有していた。また、SaPIivm10 株、SaPIishikawa11 株、SaPIivm60 株、SaPIhhms2 株、SaPIino10 株および SaPIhirosaki4 株では薬剤耐性遺伝子として、アンピシリン耐性遺伝子のホモログである *ear* を保有していた。

### 1-3-3. エンテロトキシン遺伝子関連 genomic elements の解析

標準菌株である N315 株および MW2 株が保有する SEs 関連 genomic elements を増幅し、制限酵素処理を行った結果を図 1-6 に示す。また in silico での断片長予測を表 1-10 に示す。MW2 株が保有する *seh* 関連トランスポゾンを増幅し HindIII で切断すると、5,000bp 付近にバンドが得られた (図 1-6A)。この結果は in silico での断片長予測 (5,000bp 付近に 2 つの DNA 断片) と一致した。N315 株が保有する *egc* についても増副産物の制限酵素処理を行うと 2,500bp 付近と 750bp 付近にバンドが得られ (図 1-6B)、in silico での断片長予測 (約 2,500bp に 3 つの DNA 断片と約 750bp に 1 つの DNA 断片) と一致していた。N315 株と MW2 株が保有する  $\phi$  Sa3 領域に存在するファージの 3 領域の解析領域 (Left、Center、Right) の HaeIII による制限酵素消化パターンは互いに異なっており (図 1-6C~E)、この結果も in silico で予測された DNA 断片パターンの予測と一致していた。

トランスポゾンの解析において、食中毒由来 4 株全てと感染症由来 2 株全ては MW2 株が保有するものと同じの泳動パターンを示す増幅産物が得られた (図 1-7A, 図 1-8A)。その他の株では、トランスポゾンを含むと考えられる増幅産物が得られなかった。同様に、鼻腔由来の 3 株で N315 と同一型の *egc* を含むと考えられる増幅産物が確認された (図 1-7B, 図 1-8B)。その他の 7 株では増幅が確認されなかった。さらに  $\phi$  Sa3 領域のプロファージを解析すると、食中毒由来 3 株と感染症由来 2 株で増幅が確認された。食中毒由来株 3 株と HHMS2 株由来の増幅産物は MW2 由来の増幅産物と泳動像が一致した (図 1-7C~E, 図 1-8C~E)。残りの感染症由来株 (J11 株) の保有するファージの 3 領域の DNA 切断断片の泳動パターンはデータベース上に一致するものが存在しなかった (2012 年 4 月時点)。一方、他の 6 株ではファージの挿入が確認されなかった。

臨床分離株の SaPI とエンテロトキシン関連 genomic elements の保有状況は表 1-11 の通りであり、今回使用した全ての臨床分離株でそのプロファイル解析と新規 genomic elements の同定が可能であった。

#### 1-4. 考察

黄色ブドウ球菌のゲノムを構成する 3 種類の構成要素 (コアゲノム、コアバリエーション、genomic elements) のうち、本菌の病原因子の多くは genomic elements 上に存在しており、食中毒の原因毒素である SEs の遺伝子は SEIX を除き全て genomic elements 上に存在することが知られている (1, 4, 29, 40, 87)。これら SEs 遺伝子関連 genomic elements の獲得は、本菌が SEs を産生し食中毒を引き起こすために必須の過程であり、SEs 関連 genomic elements の保有状況を解析することは食中毒分離株の遺伝学的背景を理解する上で重要である。

通常の PCR で正確に 10kbp を越える長鎖 DNA の増幅産物を得る PCR 反応液やサーマルサイクラーのプロトコールに関する情報は限られている。加えて、今回設計したプライマーセットは、MW2 株や MSSA476 株 (ともに MLST により sequence type 1、ST1)、N315 株 (同 ST5)、USA300 株 (同 ST8)、MRSA252 株 (同 ST36)、RF122 株 (同 ST151)、COL 株 (同 ST250) などの異なる系統の菌株 (5, 19, 26, 30, 32, 39) の塩基配列をもとに設計した。しかし、黄色ブドウ球菌のゲノム上の保存性の高い領域でも塩基多型が存在するため、標準菌株と同様に、臨床分離株においても増幅を確認する必要があった。ゲノムの全塩基配列が解読され、44'に SaPI<sub>n</sub>1 を保有することが知られている標準菌株である N315 株を用いて、正確な SaPI 全長の増幅を確認した。今回設計した 6 種の SaPIs 用プライマーセットと PCR 酵素 (LA-taq)、さらに 2 ステップ PCR 法を用いることで、20kbp 弱の SaPI<sub>n</sub>1 を含む増幅産物が得られた。この増幅産物を

*Hind*III 消化した所見は *in silico* での断片長予測結果と一致し、サザンハイブリダイゼーションでも SaPI<sub>n</sub>1 が保有する *sec* が確認された (図 1-2)。3 種の非 SaPI 性 genomic elements においても同様に N315 株と MW2 株が保有する genomic elements を正確に解析できることが確認され (図 1-6)、本 LA-PCR が標準菌株の解析に応用可能であると考えられた。さらに、ゲノム配列が不明な 10 株の臨床分離株でも、標準株と同様に SaPIs を含めた genomic elements の正確な増幅が確認され (図 1-3)、加えて、従来報告がなかった新規の SaPIs も 7 種類同定された (図 1-5)。さらに、SEs 関連非 genomic elements のうち  $\phi$ Sa3 上に存在する新規のファージと予測される新規 genomic element の同定も可能であった (図 1-8)。

本研究で新たに同定された全ての SaPIs には、SaPI の基本構造が保存されていた。SaPI の両端にはダイレクトリピートが存在しており、その配列はこれまで報告されている配列と同一か類似するものであり、挿入領域も既報と一致していた (表 1-3~1-9)。さらに、SaPI のゲノムへの挿入に関わる領域特異的インテグレースをコードする *int* は *att* と対応することが知られており、本研究でも過去の報告 (54) 通り対応が見られた。この他、SaPI の遺伝子制御に関わる *stl* と *str*、自身のゲノムからの切り出しに関わる *xis*、自身の複製に関わる *rep*、ファージ干渉に関わる *pif*、ファージ様粒子へのゲノム挿入に関わる *ter* (51, 54, 63, 81-83) を全ての株が保有していた (表 1-3~表 1-9)。また、SaPI<sub>ishikawa11</sub> 株以外の SaPI ではプライマー合成に関わる *pri* とファージ用粒子の形成に関わる *cp* 複合体を保有していた。これら 2 遺伝子は MW2 株が保有する SaPI<sub>mw2</sub> では欠けていることが報告されており、SaPIs に必須の遺伝子ではないと推定される (5, 54)。SaPIs の基本骨格を作る遺伝子群は、SaPIs 自身が菌株間を伝播し、ゲノムに挿入される際に必要な遺伝子群であるが、この基本骨格が保存されていることから、本研究



で同定した SaPIs は水平伝播し黄色ブドウ球菌の SEs 遺伝子獲得に関わっていると考えられた。

黄色ブドウ球菌が保有する genomic elements には多様性があることが知られている。例えば、SEs 関連 genomic elements を例にすると *sec* は SaPIs 上に存在するが、牛乳房炎由来株 (RF122 株) であればゲノム上の 9' に挿入される SaPI<sub>bov1</sub> を、USA400 株 (市中獲得型 MRSA) クローンである MW2 であれば 18' 領域に存在する SaPI<sub>mw2</sub> を、N315 株や Mu50 などの医療施設関連型 MRSA クローンの一種であれば SaPI<sub>n1/m1</sub> を保有することが知られており、同じ遺伝子でも由来ごとに異なる SaPIs が異なる領域に存在している (5, 30, 39)。これまでには *seb* 関連 SaPIs として 19' 領域に挿入される SaPI<sub>3</sub> のみが報告されていた (26, 90)。本研究では、*seb* 関連 SaPIs として新たに 8' 領域に挿入される SaPI<sub>ivm10</sub>、18' 領域に挿入される SaPI<sub>ishikawa11</sub>、19' 領域に挿入される SaPI<sub>ivm60</sub> および 44' 領域に挿入される SaPI<sub>no10</sub> と SaPI<sub>hirosaki4</sub> の 5 種を同定した。*sec* 関連 SaPIs と同様に *seb* 関連 SaPIs もゲノム上の多様な領域に存在することが明らかになった。また、SaPI<sub>3</sub> は *seb* の他に *sek*、*seq* 遺伝子を SaPI 上に保有するが、今回同定した全ての *seb* 関連 SaPI は SEs 遺伝子として *seb* を単独で保有していた。さらに、本研究では *sek/seq* 関連 SaPI、SaPI<sub>j11</sub> を同定した。*sek/seq* 関連 SaPIs として、前述の SaPI<sub>3</sub> の他に SaPI<sub>1</sub> と SaPI<sub>5</sub> が報告されており (19, 46)、さらにこれらの 2 つの遺伝子は SaPIs 上だけではなく  $\phi$ Sa<sub>3mw2</sub> などのファージ上に存在することが報告されている (5, 32, 49)。

SaPIs だけではなく、他の SEs 遺伝子関連 genomic elements についても多様性があることが知られている。McCathey らの黄色ブドウ球菌ファージの解析によると複数の *sea* 関連ファージが報告されている (49)。同様に *egc* はそのタイプにより 1~4 型まで型別できることが知られている (12)。*seh* 関連トランスポゾンに関する多様性は、現在ま

で報告されていない。本研究では、食中毒由来 3 株と感染症由来 1 株が *sea*、*sek*、*seq* 関連ファージである  $\phi$  Sa3mw2 を保有しており、鼻腔由来 3 株が N315 株型の *egc* (1 型) を保有していた。一方、J11 株では未知のファージの存在が推定され、さらに食中毒由来株 4 株において *seh* 関連トランスポゾンの検出が確認された。このように、本手法により未知/既知の SEs 関連 genomic elements の解析が可能であった。

表1-1 供試菌株

株	由来	引用文献
MW2	標準菌株	5
N315	標準菌株	39
243	標準菌株	7
No.1	食中毒	58
No.10	食中毒	58
Nagasaki	食中毒	58
Ishikawa11	食中毒	58
IVM10	鼻腔	58
IVM60	鼻腔	58
Hirosaki4	鼻腔	58
Hirosaki11	鼻腔	58
HHMS2	ヒト感染症	33
J11	ヒト感染症	本研究

表1-2. 使用プライマー

プライマー	塩基配列 (5' to 3')	増幅領域	Priming位置 (株)
SaPI4S	ATGGCAGGTGGACCAAGAAGAGGGCGGACGTCGTCG	8'SaPI	412747-412781 (N315)
SaPI4AS	CATTCTAGTAGACACCTCTGTCGTTTAAACATAAG	8'SaPI	416278-416312 (N315)
SaPIbovS	GTTATGGGAGACTACCGTACGTATGATCACACAG	9'SaPI	435843-435876 (N315)
SaPIbovAS	GTTGCTATTTATGGTGGCCTTTCAAGCAATATTAG	9'SaPI	439465-439499 (N315)
SaPImw2S	CATCATGTTGGTTGTTTATCACTTTTCATGATGC	18'SaPI	844043-844076 (N315)
SaPImw2AS	GAAAGAAAAGAAAAGCAAAAAGATGACGACCACAG	18'SaPI	845724-845759 (N315)
SaPI3externalS	GCTGTAGAAAGTGCGAAAGATAATCCTTATGC	19'SaPI	877986-878017 (N315)
SaPI3externalAS	GCGAAATAGATTCATCATTA ACTTGAGGGAG	19'SaPI	878357-878387 (N315)
SaPI2S	AAATTACCGCTACACTAAAGGACAAATTTATC	44'SaPI	2056106-2056137 (N315)
SaPI2AS	GGTATCGTTGATCCA ACTAAAGTAACACGCTCAGC	44'SaPI	2072459-2072493 (N315)
etdS	CGTTGTGAAAGATAATGAATCGGTTTGGGCTG	49'SaPI	2275743-2275774 (N315)
etdAS	CTAAAGTGGCAGTAACAAATGATTTTAGTTTC	49'SaPI	2278259-2278290 (N315)
SEH exS	ACTAATGTCTCCATTGGTTGTTCTCTATTAAAAGCGCGAT	Transposon	60574-60614 (MW2)
SEH exAS	ATATCGTCTTTCGACACGTTGTAAGTGAAGCAGCTAGA	Transposon	70511-70548 (MW2)
egcS	TCTTAGAAGAGGATGGCTTCGAAACATTTACAGCG	<i>egc</i>	1883029-1883063 (N315)
egcAS	GGTGGTATTGCGATCCCATTA AAAAGATATTGAAGATTTAGA	<i>egc</i>	1874827-1874867 (N315)
Sa3RS	GTGAGTTTCGTGATTTCAAAGGTTGGACTAAGATG	φSa3 left	2018126-2018160 (N315)
Sa3RAS	GACAATAGTGCCAAAGCCGAATCTAAGAAAGATGAT	φSa3 left	2005236-2005271 (N315)
Sa3CS	ATCTATCCACTCTTTCTCATCCATATCAATAGGTTTACG	φSa3 center	2017613-2017651 (N315)
Sa3CAS	TACGCGTTTAAGCGAGTACAGAGAAAAGAAAACAATAGA	φSa3 center	2035055-2035093 (N315)
Sa3LS	GAATCTTCAGATTGTGTATGTGTACCGATAACGT	φSa3 right	2049941-2049974 (N315)
Sa3LAS	AACCCGTTGTATCCTTTAGTTTAACTACTTCATCAAG	φSa3 right	2032829-2032866 (N315)

表1-3. SaPIivm10のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
		aaagaagaacaataatataatttattgtcaaaccccgtagg	1-43	43	
1		Hypothetical protein	197-1027 (complement)	831	No similar protein on database
2		Hypothetical protein	1046-1513 (complement)	468	No similar protein on database
3	<i>int</i>	Integrase	1510-2727 (complement)	1218	Similar to SAA6008_00346 ( <i>S. aureus</i> JKD6008)
4	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	2753-3616 (complement)	864	No similar protein on database
5	<i>str</i>	Transcriptional regulator	4022-4234	213	Similar to SAT0131_00379 ( <i>S. aureus</i> T0131)
6	<i>xis</i>	excisionase	4235-4507	273	Similar to SAA6008_00349 ( <i>S. aureus</i> JKD6008)
7		Hypothetical protein	4519-4692	174	Similar to SAT0131_00381 ( <i>S. aureus</i> T0131)
8		Hypothetical protein	4659-4862	204	Similar to SAT0131_00859 ( <i>S. aureus</i> T0131)
9		Hypothetical protein	4864-5247	384	Similar to SAT0131_00382 ( <i>S. aureus</i> T0131)
10		Hypothetical protein	5248-5568	321	Similar to SAV0789 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
11	<i>pri</i>	Primase	5634-6503	870	Similar to SAV0790 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
12	<i>rep</i>	Replication initiator	6520-7989	1470	Similar to SAV0791 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
13	<i>pif</i>	Interference with phage growth	8268-8630	363	Similar to SAV0792 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
14		Hypothetical protein	8632-8895	264	Similar to SAA6008_00357 ( <i>S. aureus</i> JKD6008)
15		Hypothetical protein	8897-9538	642	Similar to SAV2019 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
16	<i>cp1</i>	Genome packaging	10074-10415	342	Similar to SAV0795 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
17	<i>cp2</i>	Genome packaging	10446-11099	654	Similar to SAT0131_00867 ( <i>S. aureus</i> T0131)
18	<i>cp3</i>	Genome packaging	11152-11679	528	Similar to SAV0798 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
19	<i>cp4</i>	Genome packaging	11682-12023	342	Similar to SAT0131_00392 ( <i>S. aureus</i> T0131)
20	<i>ter</i>	Terminase small subunit	12020-12589	570	Similar to SAV0796 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
21	<i>seb</i>	Enterotoxin type B	12897-13697	801	Similar to SA21266_1666 ( <i>S. aureus</i> 21266)
22	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	13468-14025 (complement)	558	Similar to SA21266_1665 ( <i>S. aureus</i> 21266)
		aaagaagaacaataatataatttattgtcaaaccccgtagg	15735-15751	17	

表1-4. SaPIIshikawa11のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
	<i>attL</i>	tcccgcgctccat	1-15	15	
1	<i>int</i>	Integrase	348-1463 (complement)	1116	Similar to MW0745 ( <i>S. aureus</i> MW2)
2	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	1469-2206 (complement)	738	Similar to MW0746 ( <i>S. aureus</i> MW2)
3	<i>str</i>	Transcriptional regulator	2358-2576	219	Similar to MW0747 ( <i>S. aureus</i> MW2)
4	<i>xis</i>	excisionase	2588-2734	147	Similar to MW0748 ( <i>S. aureus</i> MW2)
5		Hypothetical protein	2727-2951	225	Similar to MW0749 ( <i>S. aureus</i> MW2)
6		Hypothetical protein	2952-3251	300	Similar to MW0750 ( <i>S. aureus</i> MW2)
7	<i>rep</i>	Replication initiator	3344-5716	2373	Similar to MW0751 ( <i>S. aureus</i> MW2)
8	<i>pif</i>	Interference with phage growth	6404-6748	345	Similar to MW0752 ( <i>S. aureus</i> MW2)
9		Hypothetical protein	6973-7179	207	Similar to MW0753 ( <i>S. aureus</i> MW2)
10		Hypothetical protein	7166-8224	1059	Similar to MW0754 ( <i>S. aureus</i> MW2)
11	<i>ter</i>	Terminase small subunit	8402-8893	492	Similar to MW0755 ( <i>S. aureus</i> MW2)
12		Hypothetical protein	9322-10290	969	Similar to SAV0801 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
13		Hypothetical protein	10515-10709	195	Similar to SAV0802 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
14	<i>seb</i>	Enterotoxin type B	11447-112247	801	Similar to SA21266_1666 ( <i>S. aureus</i> 21266)
15	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	12325-12882 (complement)	558	Similar to SA21266_1665 ( <i>S. aureus</i> 21266)
	<i>attR</i>	tcccgcgctccat	13463-13447	15	

表1-5. SaPlivm60のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
	<i>attL</i>	ttattcctgctaaataa	1-17	17	
1	<i>int</i>	Integrase	160-1404 (complement)	1245	Similar to SA21266_1686 ( <i>S. aureus</i> 21266)
2		SAP domain protein	1394-2782 (complement)	1389	Similar to SA21266_1685 ( <i>S. aureus</i> 21266)
3	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	2809-3381 (complement)	573	Similar to SA21266_1683/1684 ( <i>S. aureus</i> 21266)
4		Hypothetical protein	4404-4787	384	Similar to SA21266_1678 ( <i>S. aureus</i> 21266)
5		Hypothetical protein	4788-5105	318	Similar to SA21266_1677 ( <i>S. aureus</i> 21266)
6	<i>pri</i>	Primase	5172-5981	810	Similar to SA21266_1676 ( <i>S. aureus</i> 21266)
7	<i>rep</i>	Replication initiator	6054-7763	1710	Similar to SA21266_1675 ( <i>S. aureus</i> 21266)
8	<i>pif</i>	Interference with phage growth	8093-8473	381	Similar to SA21266_1674 ( <i>S. aureus</i> 21266)
9		Hypothetical protein	8470-9111	642	Similar to SA21266_1673 ( <i>S. aureus</i> 21266)
10	<i>cp1</i>	Genome packaging	9627-9968	342	Similar to SA21266_1672 ( <i>S. aureus</i> 21266)
11	<i>cp2</i>	Genome packaging	9980-10558	579	Similar to SA21266_1671 ( <i>S. aureus</i> 21266)
12	<i>cp3</i>	Genome packaging	10576-10794	219	Similar to SA21266_1670 ( <i>S. aureus</i> 21266)
13		Genome packaging	10797-11372	576	Similar to SA21266_1669 ( <i>S. aureus</i> 21266)
14		Genome packaging	11375-11716	342	Similar to SA21266_1668 ( <i>S. aureus</i> 21266)
15	<i>ter</i>	Terminase small subunit	11713-12282	570	Similar to SA21266_1667 ( <i>S. aureus</i> 21266)
16	<i>seb</i>	Enterotoxin type B	12590-13390	801	Similar to SA21266_1666 ( <i>S. aureus</i> 21266)
17	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	13468-14025 (complement)	558	Similar to SA21266_1665 ( <i>S. aureus</i> 21266)
	<i>attR</i>	ttattcctgctaaataa	15375-15391	17	

表1-6. SaPIhms2のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
	<i>attL</i>	ttattcctgctaaataa	1-17	17	
1	<i>int</i>	Integrase	160-1404 (complement)	1245	Similar to SA21266_1686 ( <i>S. aureus</i> 21266)
2		SAP domain protein	1394-2782 (complement)	1389	Similar to SA21266_1685 ( <i>S. aureus</i> 21266)
3	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	2809-3381 (complement)	573	Similar to SA21266_1683/1684 ( <i>S. aureus</i> 21266)
4		Hypothetical protein	4404-4787	384	Similar to SA21266_1678 ( <i>S. aureus</i> 21266)
5		Hypothetical protein	4788-5105	318	Similar to SA21266_1677 ( <i>S. aureus</i> 21266)
6	<i>pri</i>	Primase	5172-6041	870	Similar to SA21266_1676 ( <i>S. aureus</i> 21266)
7	<i>rep</i>	Replication initiator	6055-7764	1710	Similar to SA21266_1675 ( <i>S. aureus</i> 21266)
8	<i>pif</i>	Interference with phage growth	8103-8483	381	Similar to SA21266_1674 ( <i>S. aureus</i> 21266)
9		Hypothetical protein	8480-9121	642	Similar to SA21266_1673 ( <i>S. aureus</i> 21266)
10	<i>cp1</i>	Genome packaging	9638-9979	342	Similar to SA21266_1672 ( <i>S. aureus</i> 21266)
11	<i>cp2</i>	Genome packaging	9991-10569	579	Similar to SA21266_1671 ( <i>S. aureus</i> 21266)
12	<i>cp3</i>	Genome packaging	10587-10805	219	Similar to SA21266_1670 ( <i>S. aureus</i> 21266)
13		Genome packaging	10808-11383	576	Similar to SA21266_1669 ( <i>S. aureus</i> 21266)
14		Genome packaging	11386-11727	342	Similar to SA21266_1668 ( <i>S. aureus</i> 21266)
15	<i>ter</i>	Terminase small subunit	11724-12293	570	Similar to SA21266_1667 ( <i>S. aureus</i> 21266)
16		Phage abortive infection	12685-13896	1212	Low homology with <i>Tepidanaerobacter</i> sp. Abi family protein
17	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	14111-14665 (complement)	558	Similar to SAUSA300_0815 ( <i>S. aureus</i> USA300_FRI3757)
	<i>attR</i>	ttattcctgctaaataa	16017-16033	17	



表1-7. SaPIj11のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
		ttattcctgctaaataa	1-17	17	
1	<i>int</i>	Integrase	160-1380 (complement)	1221	Similar to SAUSA300_0799 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
2	<i>sek</i>	Enterotoxin-like type K	1468-2196 (complement)	729	Similar to SAUSA300_0800 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
3	<i>seq</i>	Enterotoxin-like type Q	2220-2954 (complement)	735	Similar to SAUSA300_0801 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
4		Toxin-antitoxin system	2966-3424 (complement)	459	Similar to SAUSA300_0802 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
5	<i>stl</i>	Cro/CI family transcriptional regulator	3436-3768 (complement)	318	Similar to SAUSA300_0803 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
6	<i>str</i>	Transcriptional regulator	3982-4224	243	Similar to SAUSA300_0804 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
7	<i>xis</i>	excisionase	4217-4489	273	Similar to SAUSA300_0805 ( <i>S. aureus</i> USA300_FPR3757)
8		Hypothetical protein	4845-5213	369	Similar to SAAV_0792 ( <i>S. aureus</i> ED98)
9		Hypothetical protein	5214-5534	321	Similar to SAAV_0795 ( <i>S. aureus</i> ED98)
10	<i>pri</i>	Primase	5601-6470	870	Similar to SAV0790 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
11	<i>rep</i>	Replication initiator	6487-7956	1437	Similar to SAV0791 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
12	<i>pif</i>	Interference with phage growth	8209-8604	396	Similar to SAV0792 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
13		Hypothetical protein	8597-8890	294	Similar to SAV0793 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
14		Hypothetical protein	8887-9528	642	Similar to SAV2019/2020 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
15		Hypothetical protein	10238-10582	345	Similar to SA21200_0582 ( <i>S. aureus</i> 21200)
16		Hypothetical protein	10617-11012	396	Similar to SA21200_0581 ( <i>S. aureus</i> 21200)
17	<i>cp2</i>	Genome packaging	11423-11950	528	Similar to HMPREF0769_10096 ( <i>S. aureus</i> MN8)
18	<i>cp3</i>	Genome packaging	11953-12294	342	Similar to SAB1895c ( <i>S. aureus</i> RF122)
19	<i>ter</i>	Terminase small subunit	12291-12860	570	Similar to SA21193_1849 ( <i>S. aureus</i> 2119)
20		Hypothetical protein	12993-13814	774	Low homology with <i>Bacillus cereus</i> hypothetical protein ( <i>B. cereus</i> 03BB102 strain, BCA_4773, 35% of maximum identity)
21		Hypothetical protein	14082-14639	558	Low homology with <i>Penibacillus curdlanolyticus</i> hypothetical protein ( <i>P. curdlanolyticus</i> YK9 strain, PaecuDRAFT_3564, 29% of maximum identity)
22		Hypothetical protein	14990-15505	516	Similar to SAAV_0810 ( <i>S. aureus</i> ED98)
		ttattcctgctaaataa	15735-15751	17	

表1-8. SaPI<sub>no10</sub>のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
	<i>attL</i>	ttttacatcattcc	1-14	14	
1	<i>int</i>	Integrase	81-1253 (complement)	1173	Similar to SAB1912 ( <i>S. aureus</i> RF122)
2	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	1267-1974 (complement)	708	Similar to SAB1911 ( <i>S. aureus</i> RF122)
3	<i>str</i>	Transcriptional regulator	2160-2348	189	Similar to SAB1910c ( <i>S. aureus</i> RF122)
4	<i>xis</i>	excisionase	2352-2669	318	Similar to SAB1909c ( <i>S. aureus</i> RF122)
5		Hypothetical protein	3017-3334	318	Similar to SAV0789 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
6	<i>pri</i>	Primase	3401-4270	870	Similar to SAV0790 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
7	<i>rep</i>	Replication initiator	4287-5756	1470	Similar to SAV0791 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
8	<i>pif</i>	Interference with phage growth	5958-6404	447	Similar to SAV0792 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
9		Hypothetical protein	6406-6690	285	Similar to SAV0793 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
10		Hypothetical protein	6687-7328	642	Similar to SAV0794 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
11	<i>cp1</i>	Genome packaging	7866-8207	342	Similar to SAV0795 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
12	<i>cp2</i>	Genome packaging	8220-8798	579	Similar to SAV0796 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
13	<i>cp3</i>	Genome packaging	8816-9034	219	Similar to SAV0797 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
14	<i>cp4</i>	Genome packaging	9085-9612	528	Similar to SAV0798 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
15	<i>cp5</i>	Genome packaging	9615-9956	342	Similar to SAV0799 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
16	<i>ter</i>	Terminase small subunit	9953-10522	570	Similar to SAV0800 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
17		Hypothetical protein	10799-11767	969	Similar to SAV0801 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
18		Hypothetical protein	11992-12186	195	Similar to SAV0802 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
19	<i>seb</i>	Enterotoxin type B	12925-13725	801	Similar to SA21266_1666 ( <i>S. aureus</i> 21266)
20	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	13803-14360 (complement)	558	Similar to SA21266_1665 ( <i>S. aureus</i> 21266)
	<i>attR</i>	ttttacatcattcc	15735-15751	17	

表1-9. SaPIhirosaki4のORFマップ

ORF No.	Gene	Annotation or function	Location (bp)	length (bps)	Comments
	<i>attR</i>	ttttacatcattccggcat	1-19	19	
1	<i>int</i>	Integrase	86-1258 (complement)	1173	Similar to SAT0131_02174 ( <i>S. aureus</i> T0131)
2	<i>stl</i>	Helix-turn-helix XRE family protein	1272-1946 (complement)	675	Similar to SAT0131_02173 ( <i>S. aureus</i> T0131)
3	<i>str</i>	Transcriptional regulator	2119-2337	219	Similar to SAT0131_02172 ( <i>S. aureus</i> T0131)
4	<i>xis</i>	excisionase	2342-2659	318	Similar to SAV2025 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
5		Hypothetical protein	3007-3324	318	Similar to SaPI2 ORF7 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
6	<i>pri</i>	Primase	3388-4257	870	Similar to SaPI2 ORF8 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
7	<i>rep</i>	Replication initiator	4271-5971	1701	Similar to SaPI2 ORF9 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
8	<i>pif</i>	Interference with phage growth	6301-6681	381	Similar to SaPI2 ORF10 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
9		Hypothetical protein	6678-7319	642	Similar to SaPI2 ORF11 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
10	<i>cp1</i>	Genome packaging	7881-8222	342	Similar to SAV0795 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
11	<i>cp2</i>	Genome packaging	8234-8812	579	Similar to SAV0796 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
12	<i>cp3</i>	Genome packaging	8830-9048	219	Similar to SAV0797 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
13		Genome packaging	9099-9626	528	Similar to SAV0798 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
14		Genome packaging	9629-9970	342	Similar to SaPI2 ORF17 ( <i>S. aureus</i> RN3984)
15	<i>ter</i>	Terminase small subunit	9967-10536	570	Similar to SAV0800 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
16		Hypothetical protein	10813-11781	969	Similar to SAV0801 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
17		Hypothetical protein	12006-12200	195	Similar to SAV0802 ( <i>S. aureus</i> Mu50)
18	<i>seb</i>	Enterotoxin type B	12938-13738	801	Similar to SA21266_1666 ( <i>S. aureus</i> 21266)
19	<i>ear</i>	Penicillin binding protein	13816-14373 (complement)	558	Similar to SA21266_1665 ( <i>S. aureus</i> 21266)
	<i>attR</i>	ttttacatcattccggcat	15115-15134	19	

表1-10. N315株およびN315株における各増幅genomic elementsの消化DNA断片長 (bp)

増幅産物 (株)	制限酵素	消化断片1	消化断片2	消化断片3	消化断片4	消化断片5	消化断片6	消化断片7	消化断片8	消化断片9	消化断片10	消化断片11
<i>seh</i> -トランスポゾン (MW2)	HindIII	5,032 (bp)	4,634	243	79	-	-	-	-	-	-	-
<i>egc</i> (N315)	HindIII	2,594	2,561	2,349	747	-	-	-	-	-	-	-
Sa3L* (MW2)	HaeIII	5,237	3,351	1,587	1,049	847	-	-	-	-	-	-
Sa3L* (N315)	HaeIII	8,730	3,351	842	-	-	-	-	-	-	-	-
Sa3C** (MW2)	HaeIII	4,039	3,036	2,380	2,059	1,571	1,193	854	845	722	707	137
Sa3C** (N315)	HaeIII	13,858	3,645	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sa3R*** (MW2)	HaeIII	7,310	4,419	1,792	1,545	232	-	-	-	-	-	-
Sa3R*** (N315)	HaeIII	14,592	3,645	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Sa3L: Sa3 Left, \*\*Sa3C: Sa3 Center, \*\*\*Sa3R: Sa3 Right

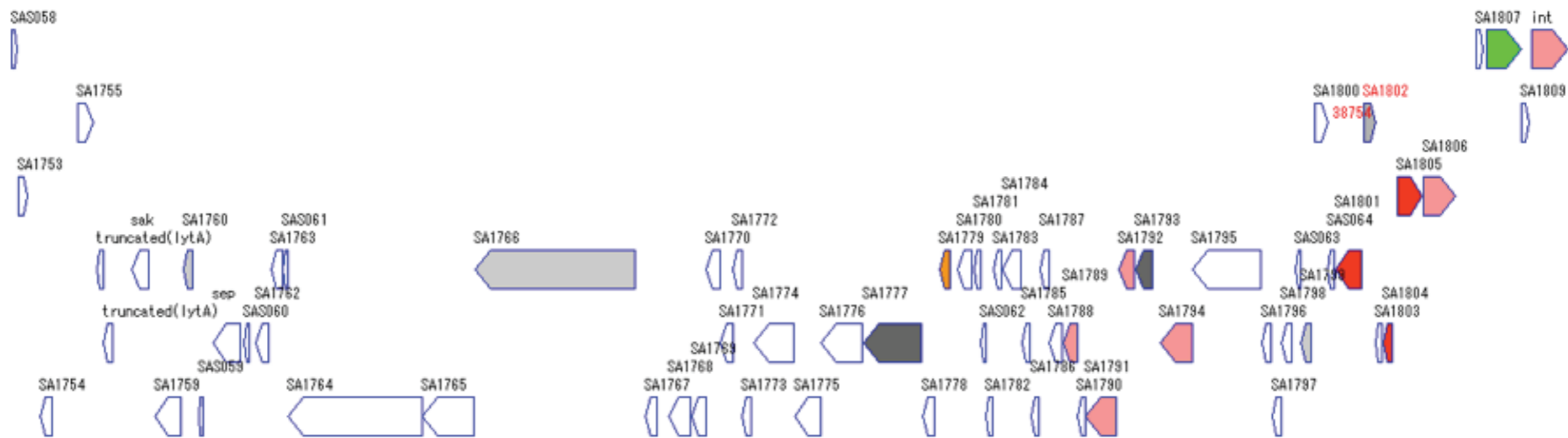
表1-11. 本章で使用した株のgenomic elementsプロファイリング

株	由来	8'	9'	18'	19'	44'	49'	トランスポゾン	<i>egc</i>	φSa3
No. 1	食中毒	-	GE TypeA (MW2)	SaPIishikawa11	-	-	-	○ (MW2)	-	-
No. 10	食中毒	-	GE TypeA	-	-	SaPIno10	-	○	-	φSa3mw2
Ishikawa11	食中毒	-	GE TypeA	SaPIishikawa11	-	-	-	○	-	φSa3mw2
Nagasaki	食中毒	-	GE TypeA	SaPIishikawa11	-	-	-	○	-	φSa3mw2
IVM10	鼻腔	SaPIivm10	-	-	-	-	GE	-	○ (N315)	-
IVM60	鼻腔	-	GE TypeA	-	SaPIivm60	-	-	-	-	-
Hirosaki4	鼻腔	-	GE TypeB	-	-	SaPIhirosaki4	-	-	○	-
Hirosaki11	鼻腔	SaPIivm10	GE TypeB	-	-	-	GE	-	○	-
HHMS2	感染症	-	GE TypeA	-	SaPIhhms2	-	-	○	-	φSa3mw2
J11	感染症	-	GE TypeA	-	SaPIj11	-	-	○	-	unknown phage

GE: genomic elements

図1-1

# φSa3n (from N315)



Sa3 Left

Sa3 Center

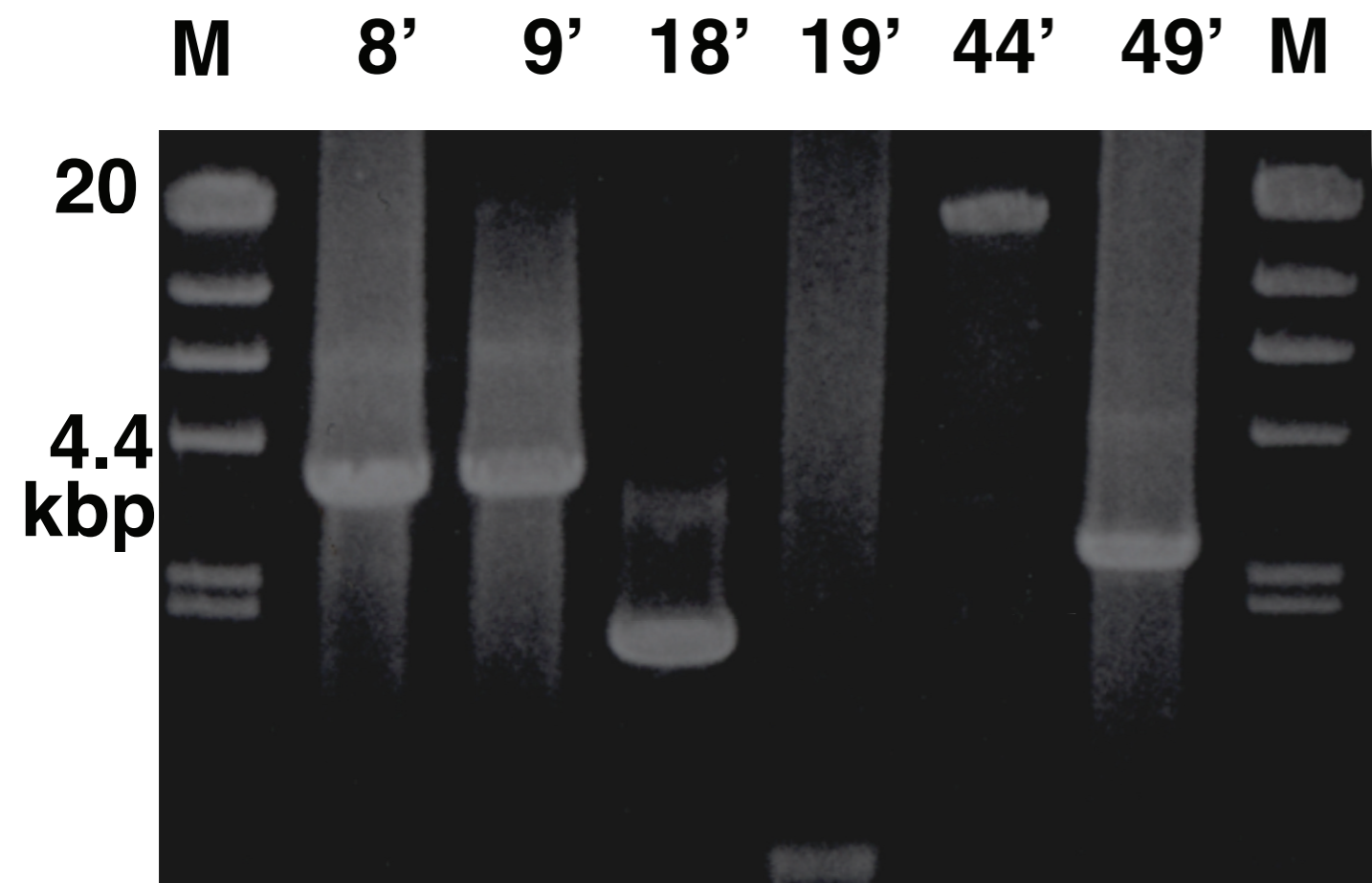
Sa3 Right

10Kbp

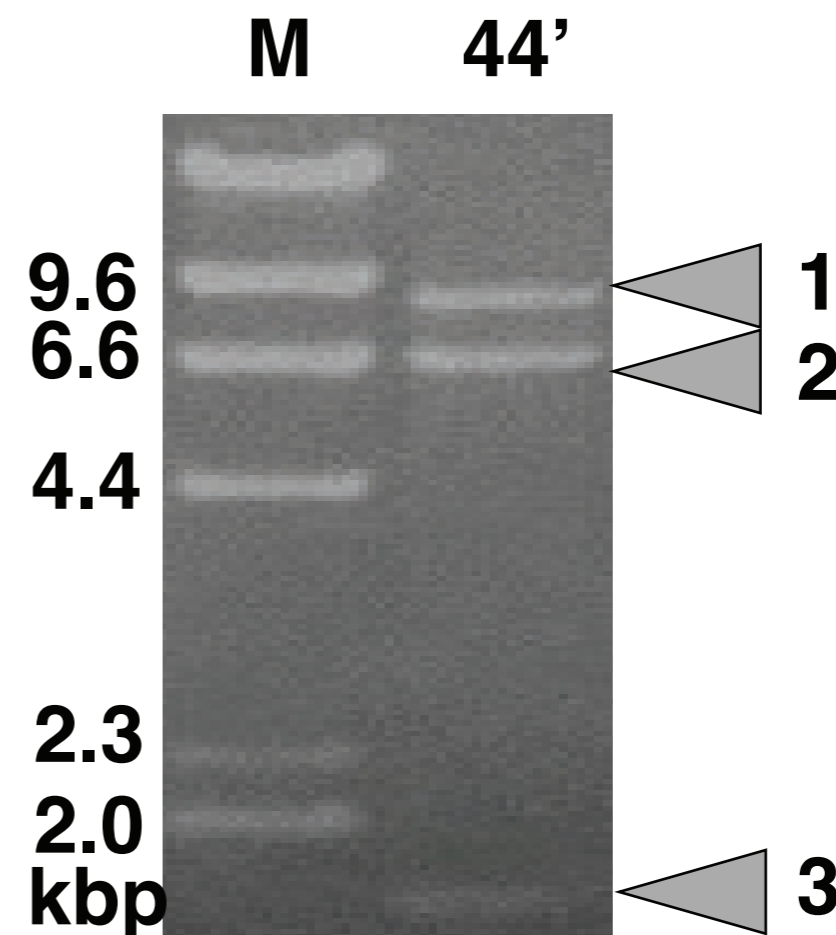
図1-1. φSa3領域ファージのLA-PCRでの増幅領域。Left、Center、Rightは各プライマーセットでの増幅領域を示す。図の作成には、データベース上のN315株のゲノム配列 (BA000018) より、φSa3nの配列を抽出し、In Silico MolecularCloning を使用してファージマップを作成した。

# 図1-2

## A



## B



## C

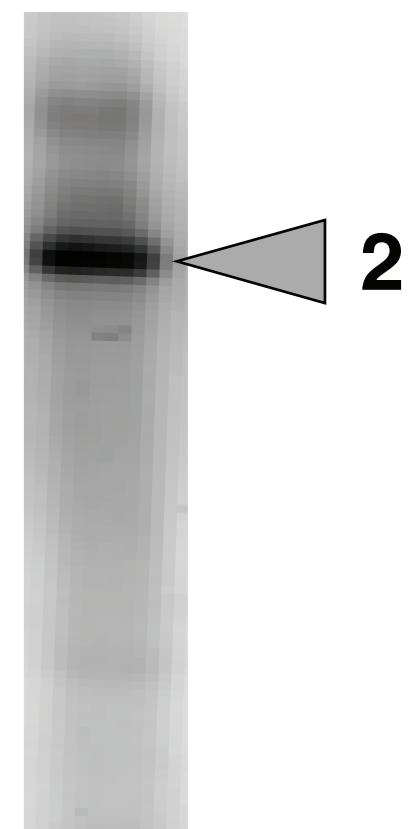


図1-2. N315株におけるSaPIs解析。A: 全6カ所のSaPIs挿入領域の解析。8'、9'、18'、19'、44'、49'はそれぞれSaPIs挿入領域の8'、9'、18'、19'、44'、49'を示す。M: マーカー ( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))。B. 44'領域増幅産物のHindIII消化断片の泳動像。矢頭1-3は消化断片1-3を示す。M: マーカー ( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))。C. *sec* 特異的DNAプローブを用いたSouthern hybridization。矢頭2は消化断片2を示す。

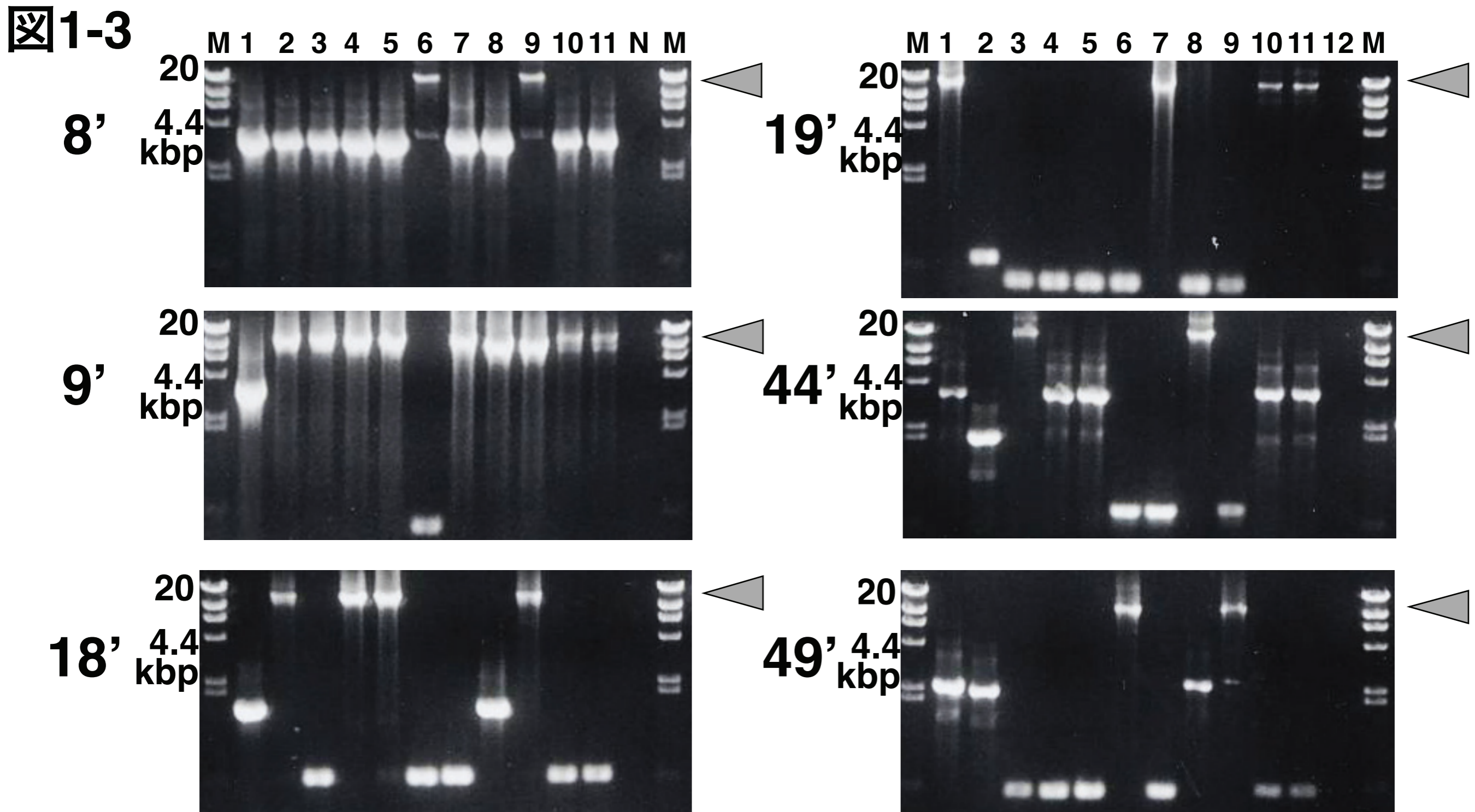


図1-3. 臨床分離株10株のSaPIs解析。M: 分子量マーカー ( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))、1: 243. 2: No. 1、3: No. 10、4: Nagasaki、5: Ishikawa11、6: IVM10、7: IVM60、8: Hirosaki4、9: Hirosaki11、10: HHMS2、11: J11、N: No DNA (超純水) 矢頭: SaPIsが含まれていると考えられる増幅産物。



# 図1-4

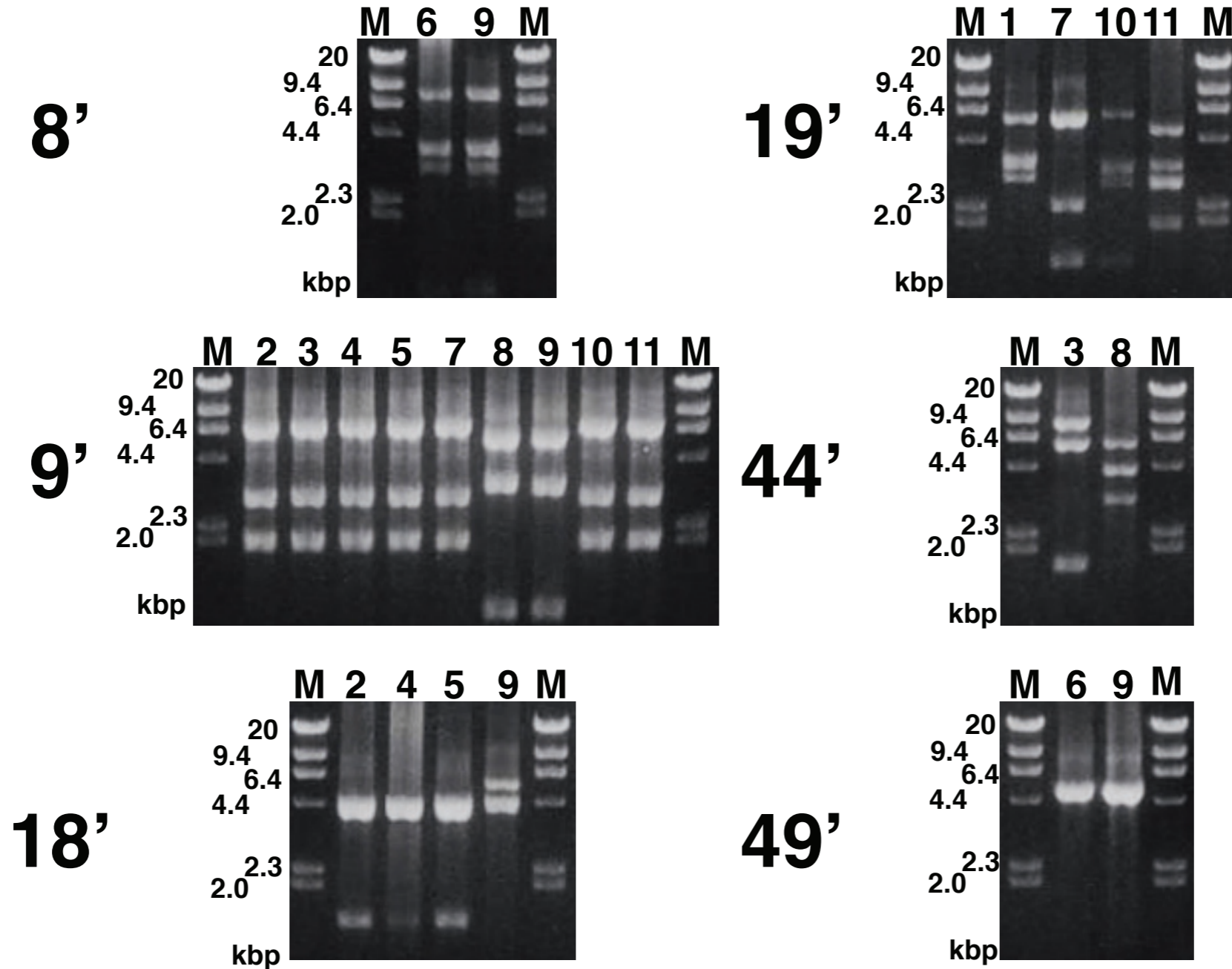


図1-4. SaPIsが存在すると考えられる増幅産物のHindIII処理。M: 分子量マーカー ( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))、1: 243. 2: No. 1、3: No. 10、4: Nagasaki、5: Ishikawa11、6: IVM10、7: IVM60、8: Hirosaki4、9: Hirosaki11、10: HHMS2、11: J11。500bp以下のDNA断片は確認困難

# 図1-5

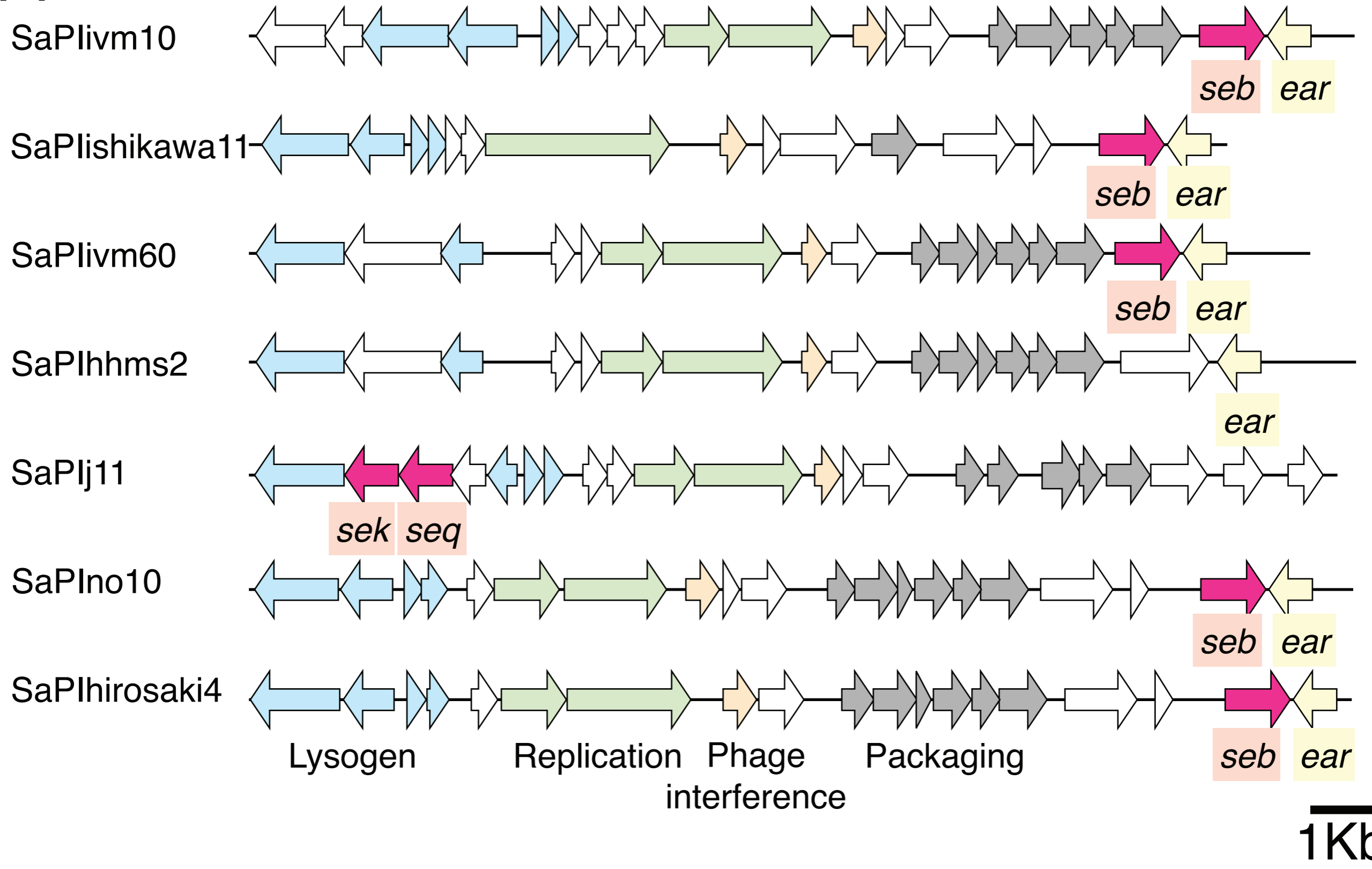
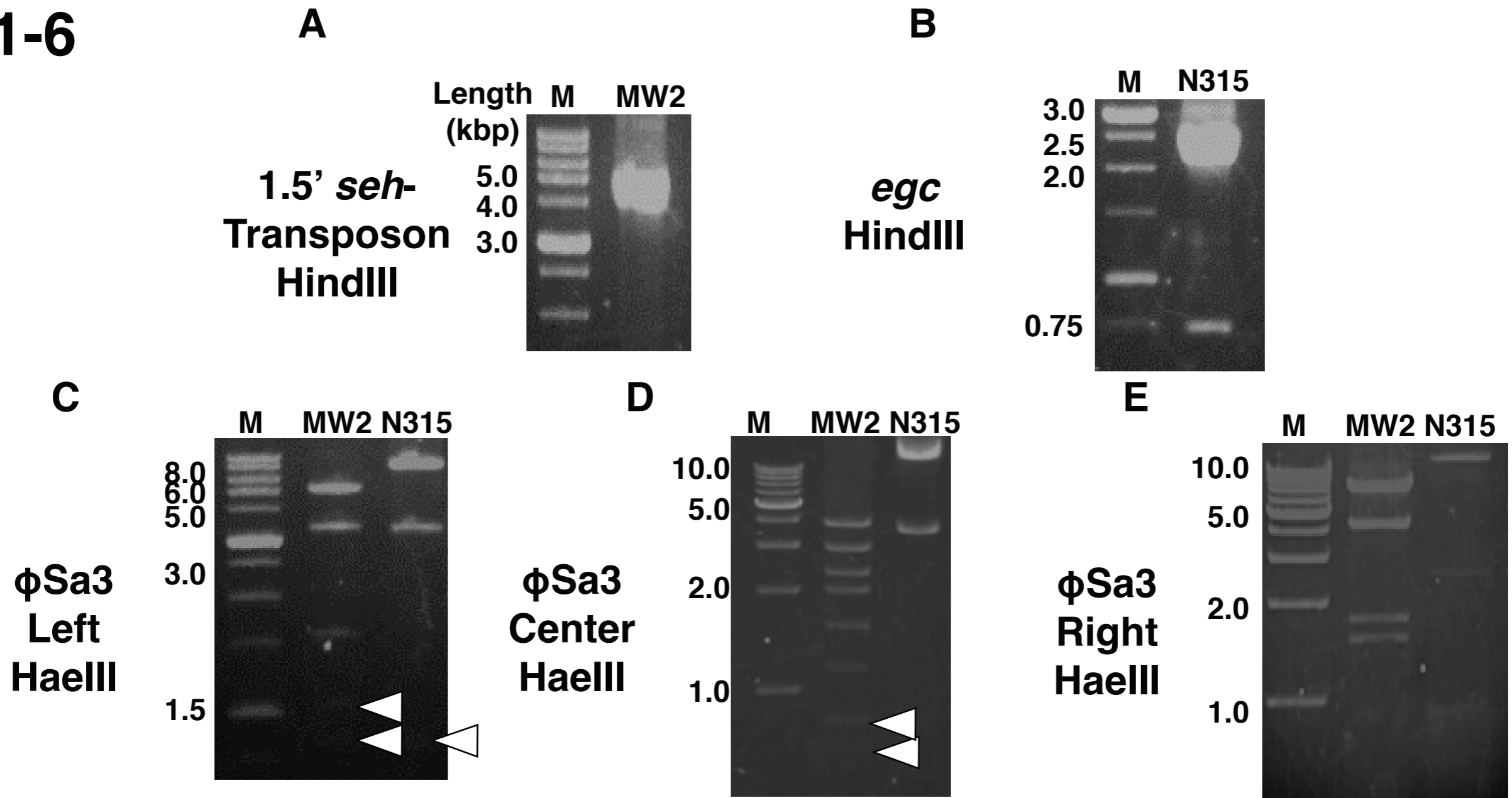


図1-5. 本研究で同定した7種の新規SaPIs。青矢印: 溶原化、遺伝子制御に関わる遺伝子。緑矢印: 複製に関わる遺伝子、橙矢印: ファージ干渉に関わる遺伝子。灰矢印: ファージ様粒子へのパッケージングに関わる遺伝子、赤矢印: スーパー抗原遺伝子、黄矢印: 薬剤耐性遺伝子

# 図1-6



◁:不明瞭なバンド

図1-6. N315株およびN315株における3種のgenomic elements挿入領域における増幅産物の制限酵素処理。A. トランスポゾン (MW2)、B. *egc* (N315)、C.  $\phi$ Sa3 Left (MW2とN315)、D.  $\phi$ Sa3 Center (MW2とN315)、E.  $\phi$ Sa3 Right (MW2とN315)。M: 1kbp Ladder。白矢頭: 不明瞭なDNA断片。500bp以下のDNA断片は確認困難。

# 図1-7

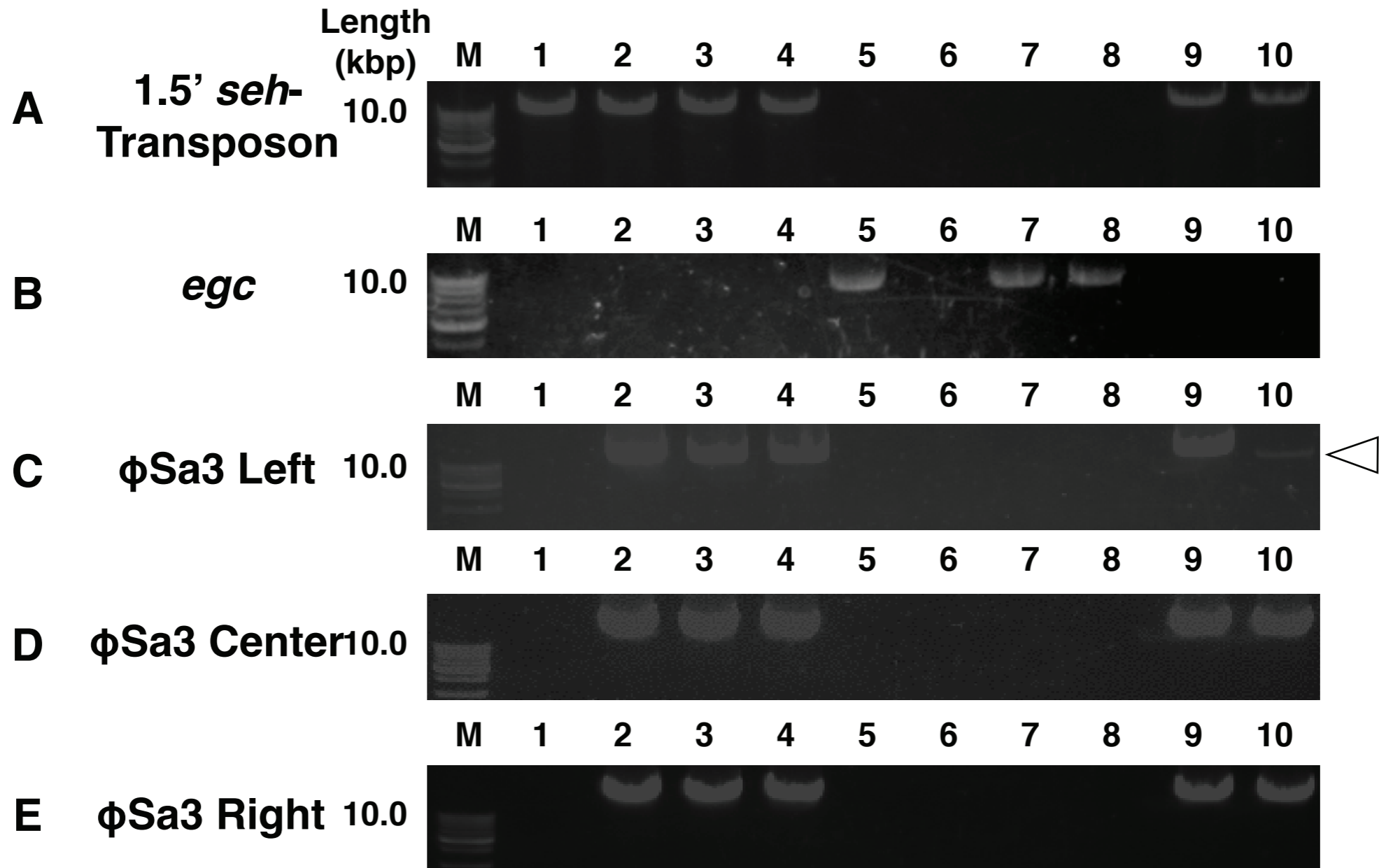


図1-7. 臨床分離株のSEs関連genomic elementsの解析。 M: 1kbp Ladder。 1: No. 1、 2: No. 10、 3: Nagasaki、 4: Ishikawa11、 5: IVM10、 6: IVM60、 7: Hirosaki4、 8: Hirosaki11、 9: HHMS2、 10: J11。 白矢頭: 不明瞭なPCR産物。

# 図1-8

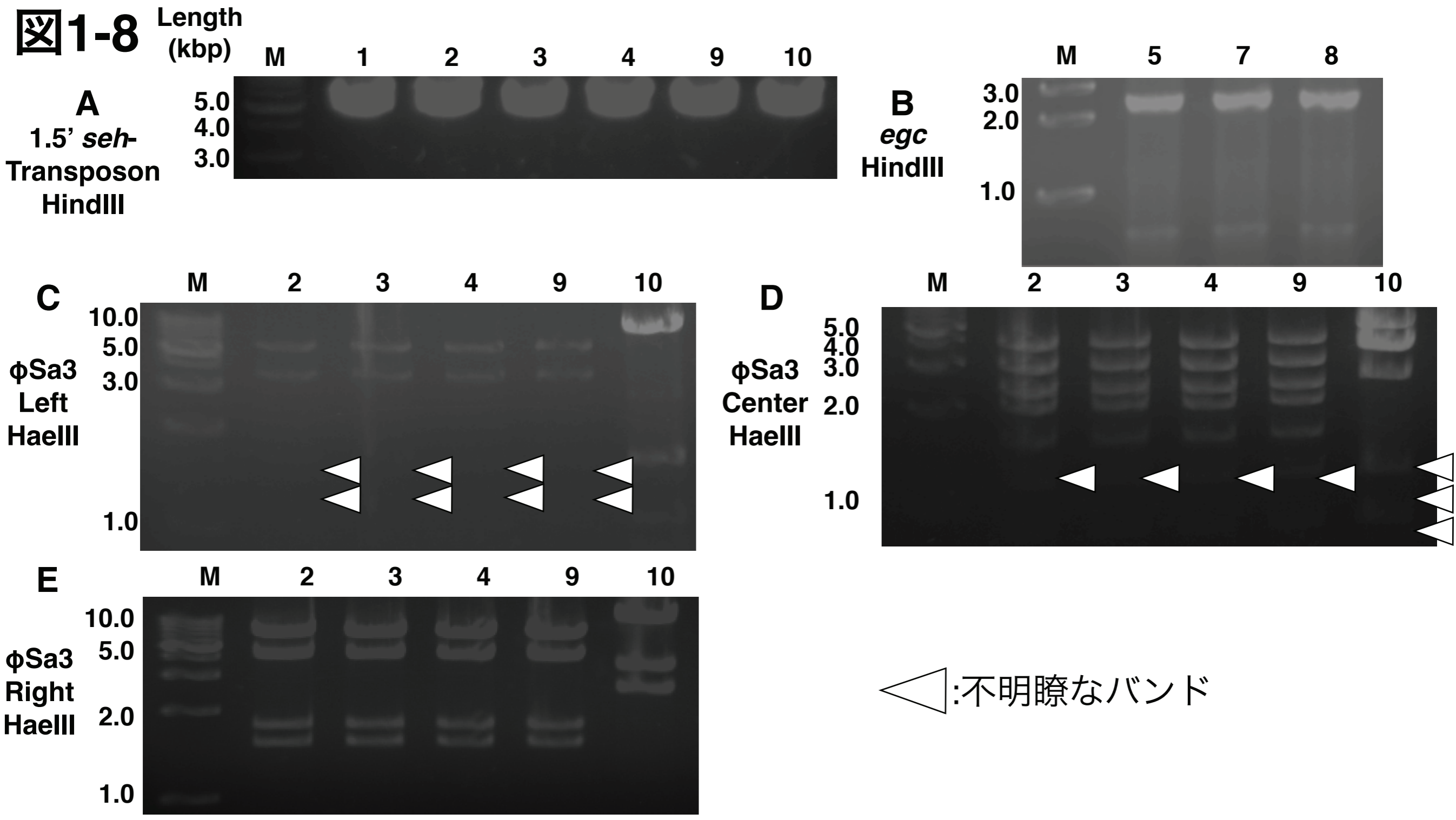


図1-8. 臨床分離株のSEs関連genomic elementsの解析。A. トランスポゾン、B. *egc*、C.  $\phi$ Sa3 Left、D.  $\phi$ Sa3 Center、E.  $\phi$ Sa3 Right。M: 1kbp Ladder。1: No. 1、2: No. 10、3: Nagasaki、4: Ishikawa11、5: IVM10、6: IVM60、7: Hirosaki4、8: Hirosaki11、9: HHMS2、10: J11。白矢頭: 不明瞭なDNA断片。500bp以下のDNA断片は確認困難。

## 第2章 日本における食中毒原性クローンの同定

### 2-1. 序論

黄色ブドウ球菌の分子疫学解析では、本菌のその解析対象に着目すると大きく *mobile genetic elements* とコアゲノムを解析する手法に分類することができる。前章での *genomic elements-scanning* 法は、*SCCmec* 型別と同様に、*genomic elements* 解析に当たる。その他、コアゲノムを解析する手法として *MLST* やコアグラゼ (*Coa*) 型別などが知られている。*MLST* は本菌が保有する生命維持に不可欠な7つのハウスキーピング遺伝子の変異パターンから菌の系統解析を行う方法であり (20)、現在 *MRSA* 感染症等の各種感染症由来株の解析に汎用されている。*Coa* 型別は、本菌が産生する *Coa* と呼ばれるフィブリン凝固に関与するタンパクの抗原性に基づく分類法である (92)。かつては各 *Coa* 型に対する抗体による抑制試験が行われてきたが、近年、より正確性の高い *PCR* での分類法が確立された (68)。*Coa* 型別は日本において食中毒分離株の検査に汎用されており、食中毒由来株は特定の血清型 (*II* 型/*III* 型/*IV* 型/*VII* 型) に集積することが知られている (36, 56, 68, 75)。

黄色ブドウ球菌のうち *MRSA* による感染症では、*MLST* と *SCCmec* 型別を組み合わせた解析が盛んに行われ、複数の遺伝学的に近縁なクローンが報告されている。古典的な *MRSA* クローンとして、*ST250* (*CC30*)/*SCCmecI* が知られている (18, 21)。その後、多様なクローンが報告され、医療施設関連型の *MRSA* クローンとして日本や北米では *CC5*/*SCCmecII* の *New York/Japan* クローンが、ヨーロッパでは *CC5*/*SCCmecI* の *EMRSA16/pediatric* クローンの病院内での感染が問題となっている (18)。一方、1990年代以降、日本を含めた世界中で、医療施設外での *MRSA* 感染 (市中感染型 *MRSA*) が問題視されている (16)。特に北米では *ST8*/*SCCmecVI* の *USA300* クローンの存在が深刻な問題になっており、近年では医療施設においても分離例が報告されてい

る (62)。このように感染症からの分離株ではその詳細な遺伝学的背景が解析され、経時的かつ地理的なサーベイランスによって、感染症抑止のための基礎情報が確立されている。本章では、食中毒発生抑止のための科学的基盤の形成を目的として、未だ報告のない食中毒原性クローンの同定と遺伝学的特徴の解析を試みた。

## 2-2. 材料および方法

### 2-2-1. 供試菌株、培養条件ならびに DNA 抽出

本章では日本で分離された 506 株の黄色ブドウ球菌を使用した。このうち 42 株は 1990-2010 年に発生した食中毒事例分離株であり、全て異なる食中毒事例から分離された。329 株は 2005-2010 年にかけて異なる健常者の鼻腔からの分離株である。85 株は 1990 年以降に発生した各種黄色ブドウ球菌疾患 (敗血症、伝染性膿痂疹、ブドウ球菌性皮膚熱傷様症候群、アトピー性皮膚炎など) の患者からの分離株である。また、残りは 2007 年に大阪のスーパーマーケットの買い物かごから分離された環境分離株 50 株 (52) を使用した。各分離株の分離地域を図 2-1 に示す。本研究では便宜的に行政区分ではなく、地理的な分断がある島毎での分離数を示す。また本研究で使用した株には、離島で分離されたものは存在しない。なお、黄色ブドウ球菌の培養と DNA 抽出は第 1 章に記載した方法と同様に行った。

### 2-2-2. 黄色ブドウ球菌の genotyping

本研究では、Coa 型別、SE/SEI 型および MLST を genotyping 法として行った。使用したプライマーセットを表 2-1 に示す。Coa 型別は Sakai ら (68) が報告したプライマーセットを用いて行った。本法では 2 種類のプライマーセットがあり、セット A とセット B にはそれぞれ CoaIII、CoaIV、CoaVII、CoaVIII と CoaI、CoaII、CoaV、

CoaVI を特異的に増幅できるプライマーが含まれている。PCR 反応は QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて、反応液はメーカーのプロトコールに準拠し、MyCycler™ パーソナルサーマルサイクラー (Bio-Rad) を用いて行った。反応条件は 95°C・15 分の後、35 回の増幅 (94°C・30 秒、57°C・30 秒、72°C・90 秒) を行い、最後に 72°C・10 分で最終伸張を行った。増幅産物は 3% NuSieve 3:1 Agarose Gel (Cambrex Bio Science Rockland) と 0.5 × Tris-boric acid-EDTA (TBE) buffer を用いて電気泳動を行い、0.5µg/ml EtBr と UV トランスイルミネーターを用いて可視化、確認した。0.5×TBE は 10x トリス/ホウ酸/EDTA (TBE) (Bio-Rad) を希釈して作成した。

SE/SEI の遺伝子型別は、Omoe ら (58) が報告したプライマーセットを用いて行った。SEA-SER 遺伝子と TSST-1 遺伝子の特異的に増幅する事ができる 4 種のプライマーセット (セット 1: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *femB*, セット 2: *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *sep*, *femA*, セット 3: *sek*, *sem*, *seo*, *tst-1*, *femA*, セット 4: *sel*, *sen*, *ser*, *seq*, *femB*) を用いて増幅した。PCR 条件および増幅産物の確認は Coa 型別と同様である。増幅産物は上述の Coa 型別と同様に、電気泳動により確認した。

MLST は、Enright ら (20) が報告したプライマーセットを用いて行った。黄色ブドウ球菌の 7 種類のハウスキーピング遺伝子 (*arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiI*) のそれぞれの遺伝子内に存在する保存性の高い領域に設計されたプライマーセットを用いて、その間に存在する可変領域の塩基配列の比較解析を行った。始めに TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (Takara) と 0.4 µ M の up- and dn-プライマーを用いて各遺伝子の増幅を行った。反応条件は 95°C・5 分の後、30 回の増幅反応 (95°C・60 秒、55°C・60 秒、72°C・60 秒) を行い、最後に 72°C・5 分で最終伸張を行った。反応液の組成はメーカーのプロトコールに準拠し PCR 反応には MyCycler™ パーソナルサーマルサイクラー (Bio-Rad) を用いて行った。増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit



(QIAGEN) を用いて精製した。精製した DNA 断片の塩基配列決定は、第 1 章と同様の方法で行った。得られた塩基配列を MLST データベース(<http://saureus.mlst.net/>) を用いて、各遺伝子の Allele number を決定し、その組み合わせより各株の sequence types (STs) を同定した。さらに近縁の ST は Clonal complexes (CCs) としてまとめた。MLST を用いた黄色ブドウ球菌集団の模式図は、PHYLOViZ 1.0 (<http://www.phyloviz.net/wiki/>) を用いて描画した。

### 2-2-3. SEA の産生量測定

#### 2-2-3-1. リコンビナント SEA 精製

黄色ブドウ球菌が産生する SEA の定量は Sandwich ELISA を用いて行った。まず、Hu et al. ら (34) の方法に準拠し、特異抗体の作成と ELISA の検量線に使用するリコンビナント SEA の精製を行った。SEA の発現と精製には pGEX GST system (Pharmacia Bioscience) を用いた。Ampicillin Sodium (Wako) を終濃度 100  $\mu$ g/ml になるように添加した 2x YT MicrobialMedium (Sigma) (以下 2x YT/Amp と略) 100 ml に、タンパク質発現用プラスミド pKAX (34) を導入した大腸菌 BL21 (Novagen) を接種し、37°C、16~18 時間、振盪培養した。次いで、菌液 50 ml を 2x YT/Amp (950 ml) に加え、30°C で O.D. 600 が 0.6~0.8 になるまで振盪培養した。O.D の測定には SmartSpec Plus スペクトロフォトメーター (Bio-Rad) を使用した。GST 融合リコンビナント SEA 発現誘導のため、Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside (Sigma) を終濃度 1.0 mM になるように添加し、37°C、3 時間振盪培養した。培養後の菌液を遠心し、得られた菌体を 1 mM dithiothreitol 添加 Bug Buster<sup>®</sup> Protein Extraction Reagent (Novagen) を加えて菌体を破壊し、遠心分離後の上清 (可溶性画分) を回収した。可溶性画分に 50%濃度に調整した Glutathione Sepharose<sup>™</sup> 4B (GS4B、Amersham

Bioscience) を加え、氷中で 1 時間静置し、GST 融合 rSEA と結合させ、5 倍量の Dulbecco's Phosphate buffered saline (-) (PBS) で 3 回洗浄した。Glutathione Elution Buffer (50 mM Tris-HCl、pH8.0/ 10 mM L-glutathione reduced (Sigma)) を GS4B と同量加えて GS4B から GST 融合 rSEA を解離させ、遠心して上清 (GST 融合 rSEA 画分) を回収した。この行程を 3 回繰り返した後、PD-10 columns (GE Healthcare) で上清を PreScission<sup>TM</sup> Protease buffer (50 mM Tris-HCl、pH7.0/ 150 mM NaCl/ 1 mM EDTA/ 1 mM dithiothreitol) に buffer 交換し、PreScission<sup>TM</sup> Protease (Amersham Bioscience) を GST 融合 rSEA 100  $\mu$ g あたり 2 U 加えて 4°C、一晩静置し、GST と rSEA を切断した。GST 融合 SEA を結合した際と同量の 50%GS4B を加え、氷中で 1 時間静置して遊離 GST を吸着させ、Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad) で濾過して GS4B を分離し、精製 rSEA を回収した。

#### 2-2-3-2. ELISA 用ポリクローナル抗体の精製と標識

精製した rSEA を用いてウサギの免疫を行った。Shinagawa らの方法 (70) に準じて免疫を行った。全採血後、室温で血液を凝固させ、その後 4°C で試験管を立て、1 日静置し、血餅を除去後、遠心して上清を回収し、-20°C で保存した。血清の IgG 分画の精製は MabTrap<sup>TM</sup> Kit (Amersham Biosciences) および HiTrap<sup>TM</sup> Protein G HP (Amersham Biosciences) を用いた。血清 1~3 ml を遠心し、上清を MabTrap<sup>TM</sup> Kit の付属の 1x PBS で 2 倍希釈し、0.22  $\mu$  m フィルター (Millex GP<sup>®</sup> 0.22  $\mu$  m、Millipore) で濾過処理してサンプルとした。1x PBS で平衡化した HiTrap<sup>TM</sup> Protein G HP にサンプル溶液を 2 ml 送液して IgG 分画を結合させ、再び 1x PBS で平衡化した。次いで、付属の 0.1 M glycine-HCl (pH3.0) で IgG 分画を溶出し、溶出液 1 ml に対し Neutralizing Buffer 70  $\mu$  l を混和し、溶出液を中和した。送液には PERISTA<sup>®</sup> BIO-

MINIPUMP (ATTO) を使用した。特異抗体の精製には HiTrap<sup>TM</sup> NHS-activated HP (Amersham Biosciences) を用いて rSEA カップリングカラムを作製し、rSEA 特異抗体を精製した。カップリングバッファー (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>、0.5 M NaCl、pH8.3) にバッファー交換・濃縮した各 rSEA 2~3 mg を、1 mM HCl により活性化した HiTrap<sup>TM</sup> NHS-activated HP に送液し、室温で 30 分静置し、抗原のカップリングを行った。カラムに Buffer A (0.5 M ethanolamine、0.5 M NaCl、pH8.3) および Buffer B (0.1 M acetate、0.5 M NaCl、pH4.0) を交互に 6 ml 送液し、それを 3 回繰り返してブロッキングを行った。1x PBS を 2 ml 流して pH 調整を行い、各 rSEA カップリングカラムを作製した。送液には PERISTA<sup>®</sup> BIO-MINIPUMP を使用した。各血清を遠心後、1x PBS で 2 倍希釈し、0.22 μm フィルター (Millex GP<sup>®</sup>0.22 μm、Millipore) で濾過してサンプルとした。得られた抗 SEA ウサギ特異抗体は Horseradish Peroxidase (HRP) 標識に供した。HRP 標識抗体の作製には、EZ-Link<sup>TM</sup> Plus activated Peroxidase Kit (PIERCE) を用いた。得られた特異抗体溶液を超純水に透析し、-80℃で凍結後、真空凍結乾燥機 (LABCONCO) で凍結乾燥した。凍結乾燥後の特異抗体を上記のキットプロトコールに準拠し、標識を行った。

### 2-2-3-3 SEA 特異的 sandwich ELISA

Omoe ら (59) の方法に準じ、ELISA 用の黄色ブドウ球菌培養上清を回収した。すなわち、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth 60ml に、一晚 37℃で培養した菌液を初期菌数  $10^3$  CFU/ml となるよう接種し、300ml 坂口フラスコ (旭硝子) で振盪培養した (37℃、48 時間)。培養液を 14,000 rpm、20 分遠心して菌体を沈殿させ、上清を回収して 0.22 μm フィルター (Millex GP<sup>R</sup> 0.22 μm、Millipore) で濾過した。上清中の Protein A を除去するために、Normal rabbit serum (NRS) (Amersham) を等量

(vol/vol) 混合し、4°Cで一晩反応させた。この反応液を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO、Tokyo、Japan) で 100~10,000 希釈し、ELISA サンプルとした。ELISA の検量線には、精製 rSEA を PBS に透析し最終濃度が 0.1% (w/vol) になるように BSA を添加したスタンダード溶液を用いた。Sandwich ELISA の固相抗体には上述の IgG 分画 2 $\mu$ g/ml を、標識抗体には同じく上述の HRP 標識抗体を 20000 倍希釈して、100 $\mu$ l ずつ用いた。ELISA のプレートには、F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate (Nunc)、Blocking には Starting Block<sup>TM</sup> (PBS) Blocking Buffer (PIERCE)、標識抗体の希釈には、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO)、ELISA の基質には SuperSignal<sup>®</sup> ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)、測定には Wallac 1420 ARVO MX/Light (PerkinElmer) もしくは Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いた。また、NRS による protein A の非特異反応の除去を確認するため、ネガティブコントロールとして NRS から精製した正常ウサギ IgG 分画を固層した各 Sandwich ELISA で同一サンプルを測定し、非特異な反応がブランクと同等まで低下することを確認した。サンプルの希釈倍率と発光回数と検量線の発光回数から培養液中の SEA 産生量を算出した。

#### 2-2-4. Genomic elements の解析

黄色ブドウ球菌のゲノム上に存在する genomic elements の解析は、第 1 章で確立した genomic elements-scanning 法により実施した。

#### 2-2-5. 実験承認番号

本研究のうち、遺伝子組換えに係るものは岩手大学遺伝子組換え生物安全実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号: B201015 および B201016)。また動物実験に係るものは岩手大学動物実験委員会の承認を受けて実施した(承認番号: A201065)。

### 2-3. 結果

#### 2-3-1. 各種分離株の Coa 型別

Multiplex PCR を用いた 2 つプライマーセットでの PCR による Coa 型別の結果を表 2-2 に示す。70%以上の食中毒由来株が食中毒で重要視されている CoaVII 型を示したが、その他の由来株では 35%以下の存在頻度であった。一方、食中毒由来で多いとされている CoaII 型に分類される株の存在頻度は、食中毒由来株よりも感染症由来株で高かった。同様に食中毒で重要とされている CoaIII 型を示す株の存在頻度は、全ての由来でほぼ同等であった。それ以外の Coa 型では、CoaI、CoaVI、CoaVIII を示す食中毒由来株は見られず、IV 型や VI 型では全ての由来で同程度に検出されていた。

#### 2-3-2. 各種分離株の SE/SEI 保有状況

Multiplex PCR を用い、SEA-SER 遺伝子と TSST-1 遺伝子の保有状況を解析した結果を表 2-3 に示す。食中毒由来株において、解析した 20 の遺伝子のうち *sea*、*seb*、*seh*、*sek*、*seq* は他の由来株と比較し約 3~20 倍高い陽性率を示した。一方、*sec*、*seg*、*sei*、*sel*、*sem*、*sen*、*seo*、*tst1* では、食中毒よりも他の由来株、特に感染症由来株で高い陽性率を示し、*sep* では鼻腔由来で最も高い陽性率を示した。*see* では、今回解析した株の中に陽性株は存在しなかった。SE/SEI 遺伝子の組み合わせ(表 2-4)では、食中毒由来株において *sea*、*seb*、*seh*、*sek*、*seq* (28.6%)、*sea*、*seh*、*sek*、*seq* (19.0%)、

*sea* のみ (9.5%) の順に多く認められた。一方、鼻腔由来で最も多く認められた SEs/SEIs 型は *seg, sei, sem, sen, seo* (18.8%) であり、食中毒で多い 3 種の遺伝子型の存在頻度は低かった (*sea, seb, seh, sek, seq*: 0.6%、*sea, seh, sek, seq*: 0.6%、*sea*: 3.0%)。同様に、感染症由来と環境由来では、それぞれ *sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, tst1* (17.6%) と *seg, sei, sem, sen, seo* (10.0%) の SEs/SEIs 型の株が最も多く、食中毒由来株で高頻度に見られた 3 種の SEs/SEIs 型についても感染症由来株において *sea, seb, seh, sek, seq* (1.2%) と *sea* のみ (3.5%) が認められるだけであり、食中毒由来株とそれ以外の株では、SEs/SEIs 型において異なる遺伝学的特徴が認められた。

### 2-3-3. 各種分離株の MLST 解析と比較

各分離株における主な Clonal complex (CC) の存在頻度を表 2-5 に示す。MLST により菌株の由来ごとに構成する CC の特徴が明らかになった。すなわち食中毒分離株では CC81 が最も多く、次いで CC508、CC8 の順に存在頻度が高かった。同様に、鼻腔では CC508、CC15、CC188 の順、感染症由来では CC5、CC509、CC121 の順、環境では CC188、CC12、CC15 の順で存在頻度が高かった。これら CCs のうち、食中毒分離株において CC81 の存在頻度が、傑出して高いことが判明した。食中毒における他の CCs、すなわち CC6 や CC8、CC12 などでは他の由来と同等の陽性率を示すのに対して、CC81 は食中毒由来株では 50%以上の陽性率を占めたが、その他の由来株では 3%以下の陽性率であった（鼻腔 2.7%: 329 株中 9 株、感染症 1.1%: 85 株中 1 株、2.0%: 鼻腔 50 株中 1 株）。

この CC81 に分類された株の Coa 型および SEs/SEIs 型分布を図 2-2 に示す。これら CC81 に分類された株の Coa 型と SEs/SEIs 型は、食中毒由来では全て CoaVII 型であり、SEs/SEIs 型は *sea, seb, seh, sek, seq*、*sea, seh, sek, seq* あるいは *seb, seh* のいずれ

れかの遺伝子型であった。感染症由来ではこれら 3 種の遺伝子型 (CoaVII/*sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq* または *sea*, *seh*, *sek*, *seq* または *seb*, *seh*) のうち CoaVII/*sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq* の遺伝子型を示す株が 1 株存在していた。一方、鼻腔由来株では、食中毒由来株の 3 種の遺伝子型に加えて、CoaVI/*sec*, *seg*, *sei*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo* あるいは *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* の SEs/SEIs 型を示す株が各 1 株存在していた。環境由来株では、食中毒由来株と同一の遺伝子型の株はなく、CoaVII/*seh* のみ陽性の株が存在していた。CC81 の存在頻度は食中毒由来株で有意に高かった ( $p < 1.0E-35$ ,  $\chi^2$  検定)。

#### 2-3-4 各種 CC の SEA 産生量

各 *sea* 陽性 CCs の Yeast Extract 添加 BHI、37°C 48 時間培養上清中の SEA の産生量を図 2-3 に示す。CC81 の SEA の産生量 ( $6.65 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ ) は他の CCs ( $2.5 \mu\text{g/ml}$  以下) と比較し、3 倍以上の高値を示した。

#### 2-3-5. CC81 の遺伝学的解析

CC81 を含めた黄色ブドウ球菌集団の近縁関係の全体像を図 2-4 に示す。CC81 は、市中獲得型 MRSA である MW2 (USA400 クローン) や市中獲得型 MSSA である MSSA476 が存在する CC1 に近縁であった。さらに、この CC81 は genomic elements の保有状況と Coa 型により、大きく二つのタイプに分かれることが判明した (図 2-5 および表 2-6)。すなわち、サブタイプ 1 は CoaVII 型を示し、genomic elements の保有状況では *seh* 関連トランスポゾン を必ず保有した。一方、サブタイプ 2 は CoaVI 型を示し、genomic elements の保有状況では、*seh* トランスポゾン を保有せず、*egc* を必ず保有していた。さらに 9'領域に存在する genomic elements も図 2-6 のようにサブタイプ 1 はタイプ A、サブタイプ 2 はタイプ B と異なっていた。またサブタイプ 1 に分類され

る株の一部は *seb* 関連 SaPIs や *sea* 関連ファージを保有していたが、サブタイプ 2 では *sec* 関連 SaPIs を保有している株が存在していた。なお本章で使用した食中毒由来株は全てサブタイプ 1 に分類された (図 2-5、表 2-6)。

#### 2-4. 考察

これまでに黄色ブドウ球菌の多くの遺伝子、遺伝子群を対象とした遺伝学的解析が報告されている。本章では、この中でも Coa 型別、SEs/SEIs 型別、MLST、genomic elements-scanning の 4 手法を使用した。本章で使用した食中毒由来株の半数以上の株が Coa 型別により CoaVII 型、SEs/SEIs 型別により *sea* 陽性を示した。これら 2 種の手法を用いた解析において、食中毒由来株集団において、これらの遺伝子型の重要性が報告されている (4, 36, 56, 68, 75)。過去の研究報告と合致する結果より、本研究で使用した食中毒由来株集団は過去の文献で使用されたものと類似した典型的な食中毒由来株集団と考えられる。この典型的な食中毒由来株集団と非食中毒由来株集団を MLST と genomic elements-scanning を用いて解析し、CC81 サブタイプ 1 という食中毒に特徴的なクローンの存在が明らかになった。食中毒由来株での本クローンの存在頻度が 50% を越えており、本クローンの食中毒起因菌としての重要性が示唆される。

CCs はその宿主により、ヒト由来 CC と動物由来 CC に大別される。Lindsay ら (45) は、ヒト由来 CC は 8 種の主要な CCs と 3 種のマイナー CC に分類できることを報告している。一方、CC97、CC705、CC385、CC398 は動物由来 CC として知られ、CC97 と CC705 はウシの乳房炎のパンデミッククローン (28, 88)、CC385 は家禽由来クローン (47)、CC398 はブタ由来 MRSA クローン (72, 84) として知られている。これら CCs のうち、CC81 はヒトの主要 CC の一つである CC1 に近縁であり、図 2-4 の CC1 の中心にある ST1 の allele number は (*arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiI*) = (1, 1,



1、1、1、1、1) で表される。同様に CC81 の中心にある ST81 は (*arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil*) = (1, 1, 1, 9, 1, 1, 1) で表される single locus variant であり、これらの CCs は黄色ブドウ球菌集団の中でも近縁な集団であった。このことから本食中毒原性クローンは動物ではなくヒト由来黄色ブドウ球菌の系統である CC1 から派生したと考えられた。しかし、今回使用したヒトの鼻腔由来株、感染症由来株での存在頻度は低いことが明らかになった。ただし、本研究で使用した株は由来毎に分離地域に差があるため (図 2-1)、その地域性の違いは今後検討する必要があると考えられる。

Mizumachi ら (52) は、買い物籠のようなプラスチック製品にかから分離される集団はヒトの鼻腔などの常在菌とは異なる集団であること、さらにこの集団のうちある種の系統はバイオフィーム高産生傾向と SEB 産生性を示し、食中毒起因菌のソースとしての可能性を報告している。この一地域 (大阪) からの分離ではあるが典型的な環境からの分離集団の一つにおいても、本クローンの存在頻度は低値を示した。以上の結果より、本クローンの主要な汚染源は不明であった。

市中獲得型 MRSA である MW2 と市中獲得型 MSSA である MSSA476 はともに CC1 に型別され、CoaVII 型で、*seh* 関連トランスポゾン、*sea*, *sek*, *seq* 関連ファージ、9' の genomic element A を保有している (5, 32)。本研究で同定した CC81 サブタイプ 1 も同様に、CoaVII 型で同様に genomic elements を保有しており、上述の CC81 と CC1 の遺伝学的背景が近縁であることに加え、genomic elements も類似していることが判明した。McCarthy ら (49) は、特定のプロファージが特定の CC と関係が深く、さらに *sea*, *sek*, *seq* 関連ファージは CC1 に特異的に存在し、他の CC では認められないことを報告している。CC81 サブタイプ 1 と CC1 との間に認められる近縁な遺伝学的背景と共通の Coa 型ならびに genomic elements の保有はこれらのクローンが共通の祖先から派生したことを支持するものと考えられた。

*sea* が存在するファージの種類は菌の SEA 産生に影響を与えることが知られている (8)。Cao ら (10) は MW2 株が保有する  $\phi$  Sa3mw2 は SEA の高産生タイプであることを報告している。CC81 サブタイプ 1 は MW2 株と同様に  $\phi$  Sa3mw2 を保有することから、この系統は SEA を他の系統と比べて多量に産生できると考えられる。Hu ら (34) はジャコウネズミを使った投与実験により SEA が SEs の中でも最も高い嘔吐活性を保有することを報告し、Evenson (22) らは食中毒事例からの推計から SEA のヒトでの食中毒発症量を 144ng/ヒトと推計している。また SEB や SEC などの他の SEs ではクウォーラムセンシングの影響が報告されているが (6, 25, 65)、SEA は菌の増殖フェーズに依存せず持続的に mRNA 発現がおこることが知られており (17, 64)、クウォーラムセンシングの支配下でないことも報告されている (78)。また、この SEA の発現は培地中で食品中と比べ長期にわたり持続することも報告されている (86)。本クローンは、高 SEA 産生メカニズムを保有しているため菌が食品に付着した時点から多量の SEA を産生し、他の株と比べ短期間に発症毒素量の SEA を含む食品汚染を引き起こすことで、他の株と比べ高頻度に食中毒を引き起こしていると推測される。以上のことより、最も高い嘔吐活性を保有する SEA を多量に産生することが、本クローンの高い食中毒原性に関与していると考えられる。ただし、本クローンの SEA 高産生メカニズムにファージ以外の要因があるのかは不明であり、今後の検討が必要である。

本章において、CC81 サブタイプ 1 では SEs/SEIs の特徴として SEH を必ず保有することが明らかになった。SEA とは異なり、食中毒における SEH の役割は不明な点が多い。過去の嘔吐活性評価においても、SEH の嘔吐活性は他の SEs の嘔吐活性と比べ低いとされる (34, 57, 59, 61)。しかし、Omoe ら (60) は新型 SEs の中でも SEH の産生量は高いことを明らかにし、Sakai ら (67) は低水分活性条件での発現パターンから食中毒における SEH の重要性を示唆している。また 2000 年に発生した大規模食中毒事例にお

いても SEA とともに SEH が原因食品から検出されている (35)。食中毒原性クローンである CC81 サブタイプ 1 が *seh* を必ず保有していることから、今後、ブドウ球菌食中毒における SEH が果たす役割について明らかにする必要があると考えられる。

表2-1. 本章で使用したgenotyping用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	用途	参照
SEA3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	SEs/SEIs型別	58
SEA4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	SEs/SEIs型別	58
SEB1	TCGCATCAAACTGACAAAACG	SEs/SEIs型別	58
SEB4	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	SEs/SEIs型別	58
SEC3	CTCAAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG	SEs/SEIs型別	58
SEC4	TCAAAAATCGGATTAACATTATCC	SEs/SEIs型別	58
SED3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	SEs/SEIs型別	58
SED4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	SEs/SEIs型別	58
SEE2	TAACTTACCGTGGACCCCTTC	SEs/SEIs型別	58
SEE3	CAGTACCCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	SEs/SEIs型別	58
SEG1	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC	SEs/SEIs型別	58
SEG2	AGAACCATCAAACTCGTATAGC	SEs/SEIs型別	58
SEH1	GTCATATGGAGGTACAACACT	SEs/SEIs型別	58
SEH2	GACCTTTACTTATTTTCGCTGTC	SEs/SEIs型別	58
SEI1	GGTGATATTGGGTAGGTAAC	SEs/SEIs型別	58
SEI2	ATCCATAITCTTTGCCCTTTACCAG	SEs/SEIs型別	58
SEJ1	ATAGCATCAGAACTGTTGTTCCG	SEs/SEIs型別	58
SEJ2	CTTTCTGAATTTTACCACCAAAGG	SEs/SEIs型別	58
SEK1	TAGGTGTCTCTAATAATGCCA	SEs/SEIs型別	58
SEK2	CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC	SEs/SEIs型別	58
SEL1	TAACGGCGATGTAGGTCCAGG	SEs/SEIs型別	58
SEL2	CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC	SEs/SEIs型別	58
SEM1	GGATAATTCGACAGTAAACAG	SEs/SEIs型別	58
SEM2	TCCTGCATTAATCCAGAAC	SEs/SEIs型別	58
sen forward	GCTTATGAGATTGTTCTACATAGCTGC	SEs/SEIs型別	58
sen reverse	CATTAACGCCCTATAACTTCTCTTCATC	SEs/SEIs型別	58
SEO1	TGTGTAAAGAAAGTCAAGTGTAG	SEs/SEIs型別	58
SEO2	TCTTTAGAAATCGCTGATGA	SEs/SEIs型別	58
SEP3	TGATTTATTAGTAGACCTTGG	SEs/SEIs型別	58
SEP4	ATAACCAACCGAATCACCAG	SEs/SEIs型別	58
SEQ1	AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC	SEs/SEIs型別	58
SEQ2	TTGTATTTCGTTTTTGTAGGTATTTTCG	SEs/SEIs型別	58

表2-1 続き

SER1	GGATAAAGCGGTAATAGCAG	SEs/SEIs型別	58
SER4	GTATTCCAAACACATCTAAC	SEs/SEIs型別	58
femA1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	SEs/SEIs型別	58
femA2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	SEs/SEIs型別	58
femB3	CACATGGTTACGAGCATCAT	SEs/SEIs型別	58
femB4	TGTTTCGGGTGTTTTACCTT	SEs/SEIs型別	58
coa1F	GCATTGGATATTTTAGAGAC	Coa型別	68
coa1R	TCAAAACCTTCACTGTGATT	Coa型別	68
coa2F	AGAGGCACAATTTACTGGA	Coa型別	68
coa2R	CCATCTTTATCAAACCTGC	Coa型別	68
coa3F	GCTCTATATTAATTTGGAAGACT	Coa型別	68
coa3R	GAAAATCATCCAGTGCTCTC	Coa型別	68
coa4F	AAAGTGAAAATCCACATTCTAG	Coa型別	68
coa4R	TCTCTATTTTCAGGCTTATTA	Coa型別	68
coa5F	GAGAAAGATATTTAAAAGCTGG	Coa型別	68
coa5R	TTCCTTGTATCTTTAGGGCT	Coa型別	68
coa6F	TTACTTTTGGGGGAAAATCG	Coa型別	68
coa6R	CCATAGTTAGATTATATACAC	Coa型別	68
coa7F	TTCATTTACTGGATCAGC	Coa型別	68
coa7R	GTTAAATCGCCAAGATCG	Coa型別	68
coa8F	CACTTATTACTGGGGAGT	Coa型別	68
coa8R	CTTTTTTCGACTGTATATCATC	Coa型別	68
femAF	AAAAAAGCACATAACAAGCG	Coa型別	68
femAR	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	Coa型別	68
<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCGCGGTATTGTC	MLST	20
<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	MLST	20
<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTCACATTC	MLST	20
<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	MLST	20
<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	MLST	20
<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	MLST	20
<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	MLST	20
<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	MLST	20
<i>pta</i> -Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	MLST	20
<i>pta</i> -Dn	GACCCCTTTGTTGAAAAGCTTAA	MLST	20
<i>tpi</i> -Up	TCGTTCAITCTGAACGTCGTGAA	MLST	20
<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAAATTGTAC	MLST	20
<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCCATTGGC	MLST	20
<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	MLST	20

表2-2. 各種分離株におけるCoa型

Coa型	由来			
	食中毒 (n=42)	鼻腔 (n=329)	感染症 (n=85)	環境 (n=50)
CoaI	-	7 (2.1%)	13 (15.3%)	-
CoaII	3 (7.1%)	44 (13.4)	26 (30.6)	4 (8.0%)
CoaIII	4 (9.5)	32 (9.7)	8 (9.4)	4 (8.0)
CoaIV	3 (9.5)	23 (7.0)	13 (15.3)	4 (8.0)
CoaV	-	55 (16.7)	9 (10.6)	18 (36.0)
CoaVI	1 (2.4)	7 (2.1)	1 (1.2)	-
CoaVII	31 (73.8)	102(31.0)	5 (5.9)	13 (26.0)
CoaVIII	-	11 (3.3)	1 (1.2)	1 (2.0)
型別不能	-	48 (14.6)	9 (16.5)	6 (12.0)

表2-3. 各種分離株におけるSEs/SEIs型

		由来		
SEs/SEIs	食中毒	鼻腔	感染症	環境
遺伝子	(n=42)	(n=329)	(n=85)	(n=50)
<i>sea</i>	30 (71.4%)	34 (10.3%)	9 (10.6%)	2 (4.0%)
<i>seb</i>	19 (45.2)	39 (11.9)	9 (10.6)	6 (12.0)
<i>sec</i>	1 (2.4)	22 (6.7)	22 (25.9)	1 (2.0)
<i>sed</i>	1 (2.4)	12 (3.6)	2 (2.4)	-
<i>see</i>	-	-	-	-
<i>seg</i>	8 (19.0)	141 (42.9)	51 (60.0)	14 (28.0)
<i>seh</i>	23 (54.8)	8 (2.4)	1 (1.2)	1 (2.0)
<i>sei</i>	8 (19.0)	138 (41.9)	42 (49.4)	14 (28.0)
<i>selj</i>	3 (7.1)	12 (3.6)	2 (2.4)	-
<i>sek</i>	22 (52.4)	16 (4.9)	4 (4.7)	1 (2.0)
<i>sel</i>	1 (2.4)	22 (6.7)	23 (27.1)	1 (2.0)
<i>sem</i>	7 (16.6)	123 (37.4)	52 (51.8)	10 (20.0)
<i>sen</i>	8 (19.0)	143 (43.5)	51 (60.0)	13 (26.0)
<i>seo</i>	7 (16.7)	119 (36.2)	44 (51.8)	10 (20.0)
<i>sep</i>	4 (9.5)	58 (7.6)	12 (14.1)	10 (20.0)
<i>seq</i>	22 (52.4)	17 (5.2)	4 (4.7)	1 (2.0)
<i>ser</i>	3 (7.1)	12 (3.6)	2 (2.4)	-
<i>tst-1</i>	1 (2.4)	35 (10.6)	25 (29.4)	3 (6.0)

表2-4各種分離株のSEs/SEIs型

SEs/SEIs型	由来			
	食中毒 (n=42)	鼻腔 (n=329)	感染症 (n=85)	環境 (n=50)
sea	4 (9.5%)	10 (3.0%)	3 (3.5%)	-
sea, seb, seh, sek, seq	12 (28.6)	2 (0.6)	1 (1.2)	-
sea, seb, sek, seq	2 (4.8)	-	-	-
sea, sec, sel	1 (2.4)	1 (0.3)	1 (1.2)	-
sea, sec, sel, tst-1	-	3 (0.9)	-	-
sea, sed, selj, ser	1 (2.4)	-	-	-
sea, seg, sei, sek, sen, seq, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
sea, seg, sei, sek, sem, seo, seq	1 (2.4)	-	-	1 (2.0%)
sea, seg, sei, sek, sem, sen, seo	1 (2.4)	5 (1.5)	-	-
sea, seg, sei, sen, tst-1	-	2 (0.6)	2 (2.4)	1 (2.0)
sea, seg, sen	-	1 (0.3)	1 (1.2)	-
sea, seg, sek, sen, seq	-	-	1 (1.2)	-
sea, seg, sen, sep, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
sea, seg, sen, tst-1	-	2 (0.6)	-	-
sea, seh, sek, seq	8 (19.0)	3 (0.9)	-	-
sea, sei, sen, tst-1	-	2 (0.6)	-	-
sea, seq, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
seb	-	4 (1.2)	-	2 (4.0)
seb, seg, sei, sem, sen, seo	-	10 (3.0)	2 (2.4)	-
seb, seg, sei, sek, sem, sen, seo, seq	-	-	1 (1.2)	-
seb, seh	3 (7.1)	2 (0.6)	-	-
seb, sek, sep, seq	-	2 (0.6)	-	-
seb, sek, seq	-	3 (0.9)	1 (1.2)	-
seb, sep	2 (4.8)	16 (4.9)	3 (3.5)	4 (8.0)
sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo	-	6 (1.8)	-	1 (2.0)
sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, tst-1	-	10 (3.0)	15 (17.6)	-
sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, sep, tst-1	-	-	4 (4.7)-	-
sec, sel, sep, tst-1	-	1 (0.3)	1 (1.2)	-
sec, sel, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
sed, seg, sei, selj, sem, sen, seo, sep, ser	-	10 (3.0)	1 (1.2)	-
sed, seg, sei, selj, sem, sen, seo, ser	-	2 (0.6)	1 (1.2)	-
seg, sei, sek, sem, sen, seo, seq	-	1 (0.3)	-	-
seg, sei, selj, sem, sen, seo, ser	1 (2.4)	-	-	-
seg, sei, sek, sem, sen, seo, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
seg, sei, sel, sem, sen, seo, sep, tst-1	-	-	-	-
seg, sei, sem, seo	-	-	1 (1.2)	-
seg, sei, sem, sen	-	3 (0.9)	-	1 (2.0)
seg, sei, sem, sen, seo	3 (7.1)	62 (18.8)	8 (9.4)	-
seg, sei, sem, sen, seo, sep	2 (4.8)	6 (1.8)	5 (5.9)	5 (10.0)
seg, sei, sen	-	10 (3.0)	1 (1.2)	2 (4.0)
seg, sei, sen, seo	-	1 (0.3)	-	2 (4.0)
seg, sei, sen, tst-1	-	6 (1.8)	-	-
seg, tst-1	-	1 (0.3)	-	1 (2.0)
seg, sen	-	-	-	-
seg, sen, tst-1	-	-	7 (8.2)-	-
seh	-	-	1 (1.2)	1 (2.0)
seh, sen, seq, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
selj, ser	1 (2.4)	-	-	-
sek, seq	-	2 (0.6)	-	-
sek, sep, seq	-	1 (0.3)	-	-
sem	-	1 (0.3)	-	-
sem, seo	-	4 (1.2)	11 (12.9)	-
sen	-	1 (0.3)	-	-
sep	-	20 (6.1)	1 (1.2)	4 (8.0)
sep, tst-1	-	1 (0.3)	-	-
tst-1	-	3 (0.9)	-	-
SEs/SEIs遺伝子陽性株	42 (100)	226 (68.7)	73 (85.9)	26 (52)
SEs/SEIs遺伝子陰性株	-	103 (31.3)	12 (14.1)	24 (48)



表2-5. 各種分離株におけるCCsの存在頻度

CC	由来			環境
	食中毒 (n=42)	鼻腔 (n=329)	感染症 (n=85)	
CC5	3 (7.1%)	28 (8.5%)	24 (28.2)	1 (2.0%)
CC6	2 (4.8)	6 (1.8)	2 (2.4)	-
CC7	-	3 (0.9)	-	-
CC8	4 (9.5)	27 (8.2)	4 (4.7)	4 (8.0)
CC12	2 (4.8)	27 (8.2)	1 (1.2)	7 (14.0)
CC15	-	42 (12.8)	3 (3.5)	6 (12.0)
CC20	-	13 (4.0)	1 (1.2)	1 (2.0)
CC25	-	9 (2.7)	3 (3.5)	3 (2.0)
CC30	1 (2.4)	17 (5.2)	10 (11.8)	4 (8.0)
CC59	2 (4.8)	4 (1.2)	1 (1.2)	-
CC81	23 (54.8)	9 (2.7)	1 (1.2)	1 (2.0)
CC88	-	-	2 (2.4)	-
CC96	1 (2.4)	5 (1.5)	-	-
CC97	-	7 (2.1)	-	-
CC101	-	2 (0.6)	-	-
CC121	-	14 (4.3)	10 (11.8)	1 (2.0)
CC188	-	41 (12.5)	3 (3.5)	17 (34.0)
CC398	-	3 (0.9)	-	-
CC508	4 (9.5)	62 (18.8)	2 (2.4)	5 (10.0)
CC509	-	5 (1.5)	13 (15.3)	-
その他*	-	5 (1.5)	5 (5.9)	-

\*singleton

表2-6. CC81に存在する2つのサブタイプ

	サブタイプ1 (n=32)	サブタイプ2 (n=2)
由来	食中毒, 23; 鼻腔, 7 感染症, 1 環境, 1	鼻腔, 2
Coa型	VII	VI
<u>SEs/SEIs型</u>	<i>sea, seb, seh, sek, seq</i>	<i>sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo</i>
挿入部位	genomic elements	
1.5'	<i>seh</i> -Transposon	-
	+	-
	(30 陽性株/全30株)	
9'	genomic elements	Type B (No SEs/SEIs) (2/2)
18'	SaPIs	SaPIishikawa11 ( <i>seb</i> ) (13/32)
		Putative SaPIs ( <i>sec, sel</i> ) (1/2)
19'	SaPIs	SaPIhms2 (No SEs/SEIs) (2/32)
40'	<i>egc</i>	-
		+ ( <i>seg, sei, sem, sen, seo</i> ) (2/2)
44'	SaPIs	SaPIno10 ( <i>seb</i> ) (7/32)
44' (φSa3)	Prophage	φSa3mw2 ( <i>sea, sek, seq</i> ) (25/32)

図2-1

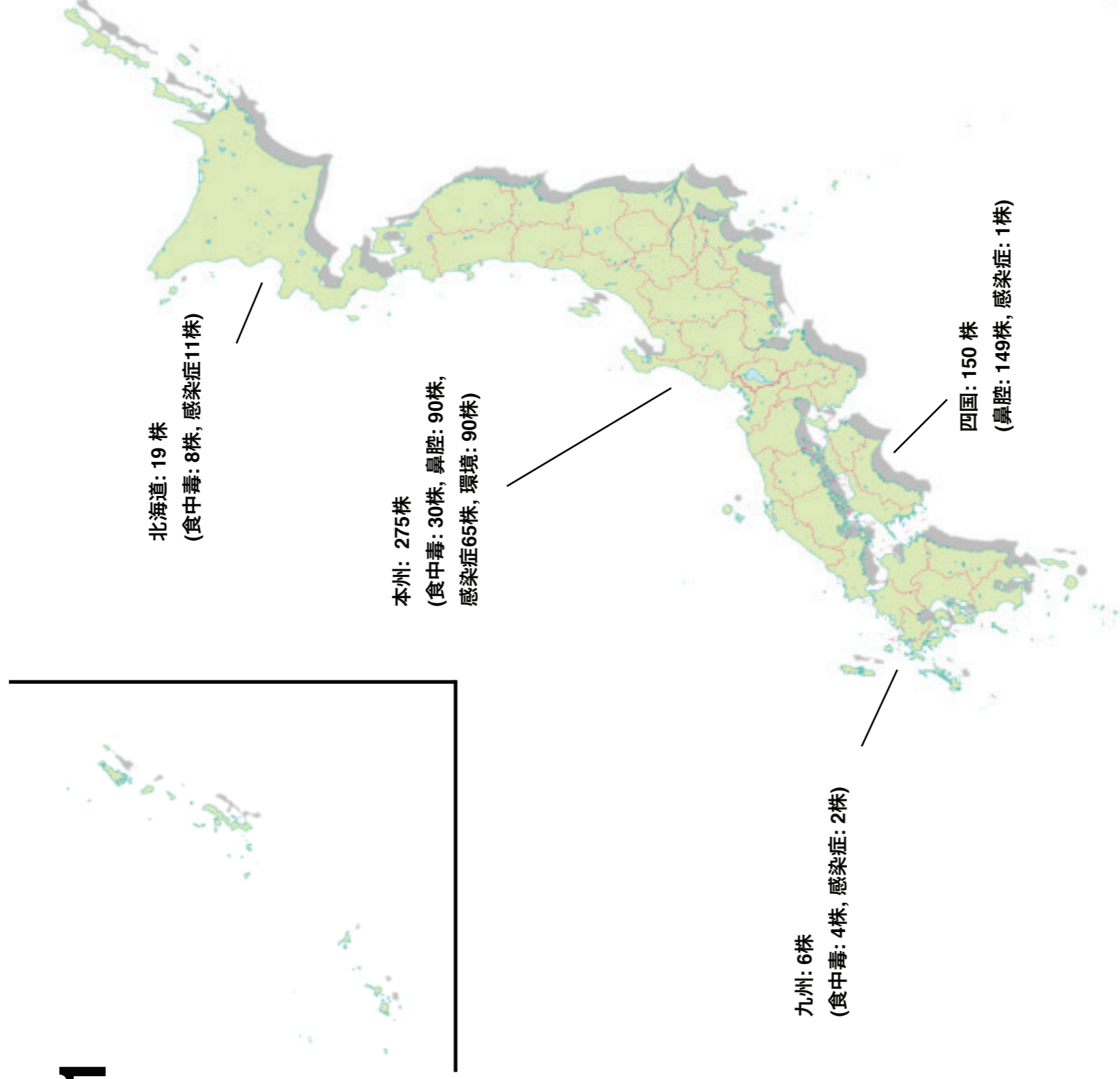


図2-1. 本研究で使用した菌株の分離地域。地理的な分断がある島毎の分離数を示す。感染症由来株のうち6株は分離地域不明である

図2-2

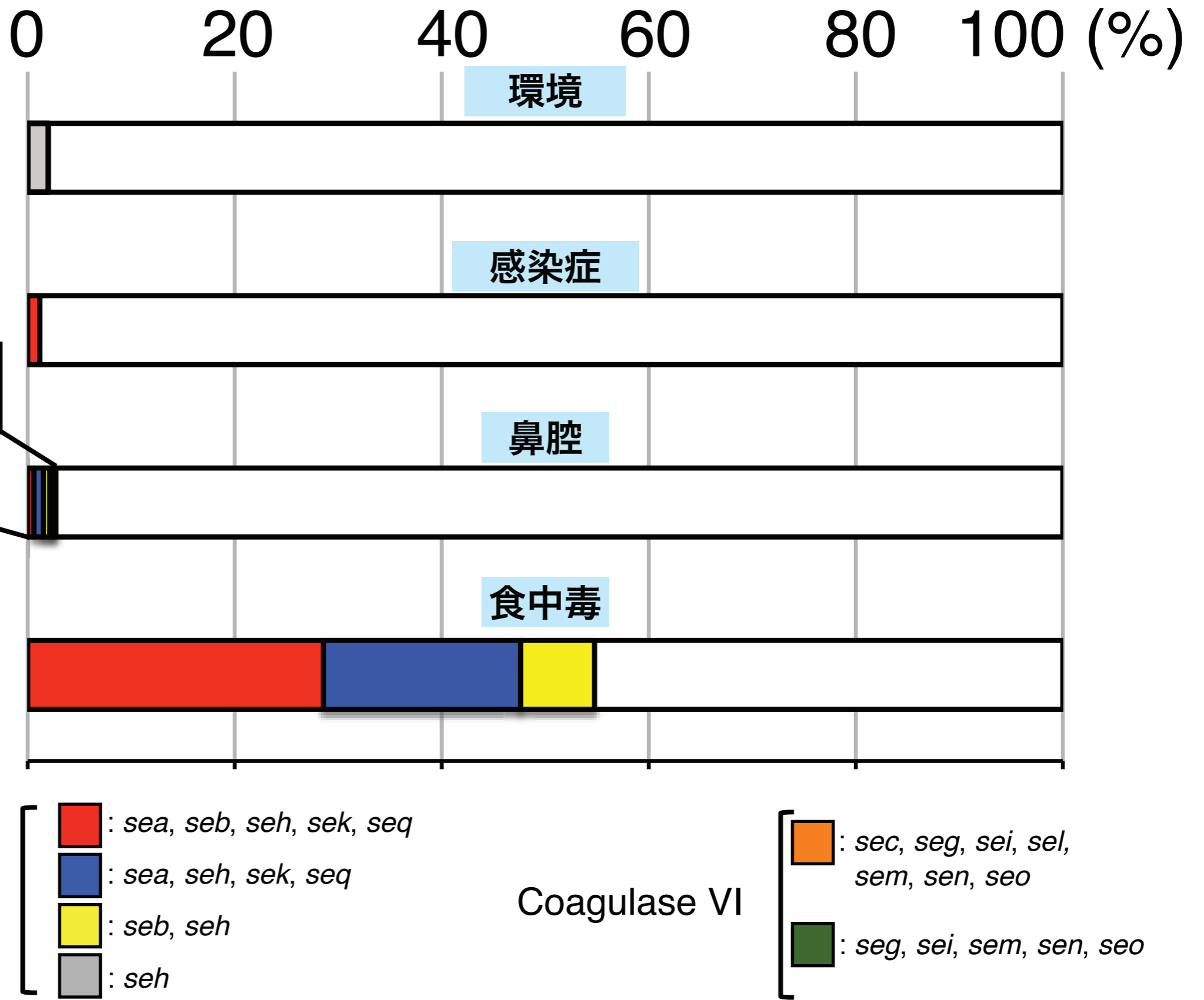


図2-2. CC81に分類された株のコアグララーゼ型/SE/SEI型。各分離株のCC81の存在頻度とCC81株の遺伝子型を示す。食中毒: n=42、鼻腔: n=329、感染症: n=85、環境: n=50

図2-3

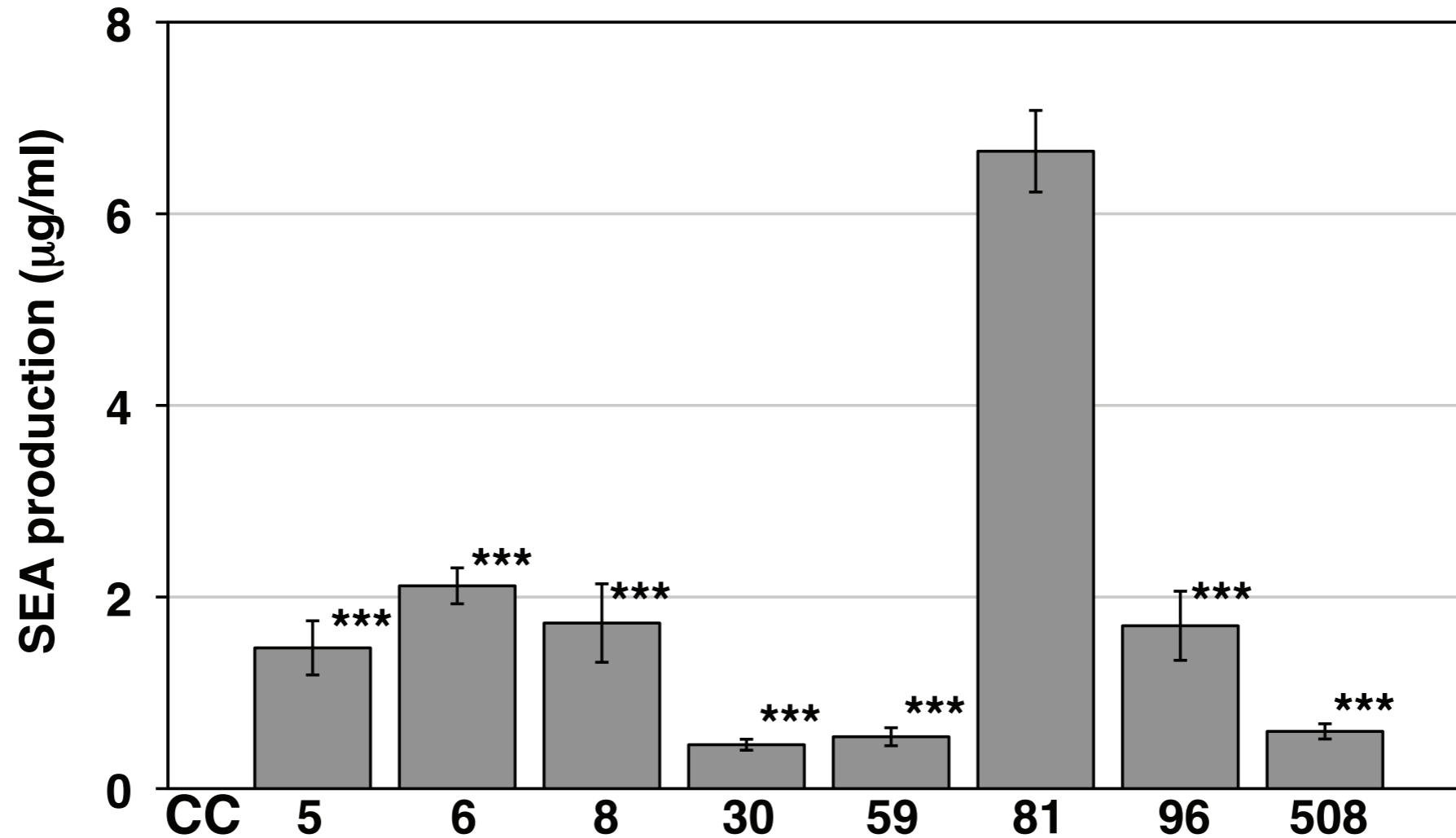


図2-3. 各CCsのsea陽性株におけるSEA産生量。各CCsの平均値と標準誤差を示す。CC81に分類される株は10株、その他のCCsについては2株の培養と測定を行った。培養は3回の独立した試行を行い、各培養上清サンプルについて、独立した3度の測定を行った。\*\*\*:  $p < 0.001$  (Student's t-test & Holm法)

図2-4

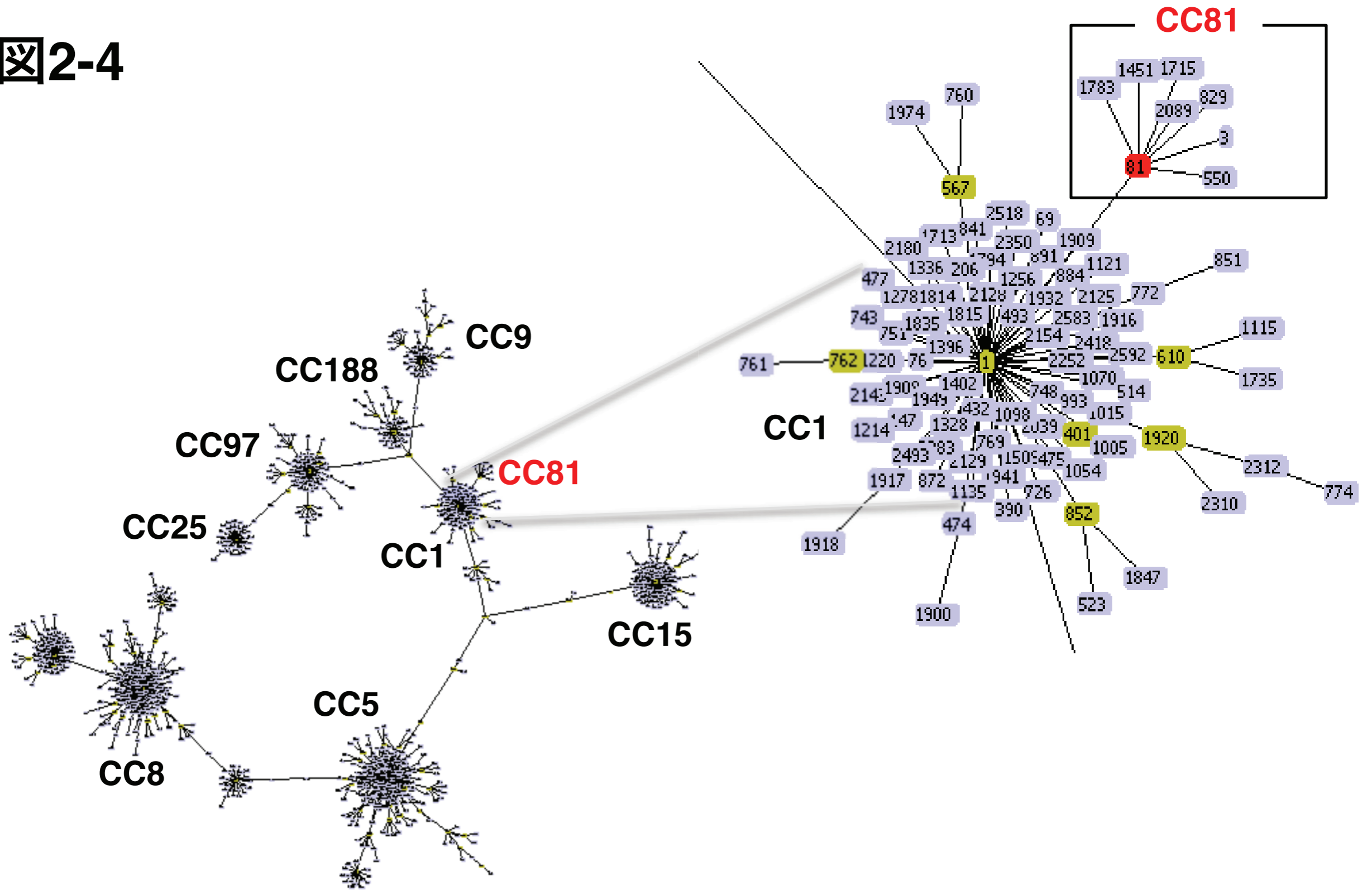


図2-4. MLSTを用いた黄色ブドウ球菌集団の近縁関係の全体像。本図はPHYLOViZ 1.0 (<http://www.phyloviz.net/wiki/>) を用い、MLSTデータベース (<http://saureus.mlst.net/>) 上にあるSTの全データを解析して描画を行った。

図2-5

CC81 サブタイプ1

CC81 サブタイプ2

(CoaVII)

(CoaVI)

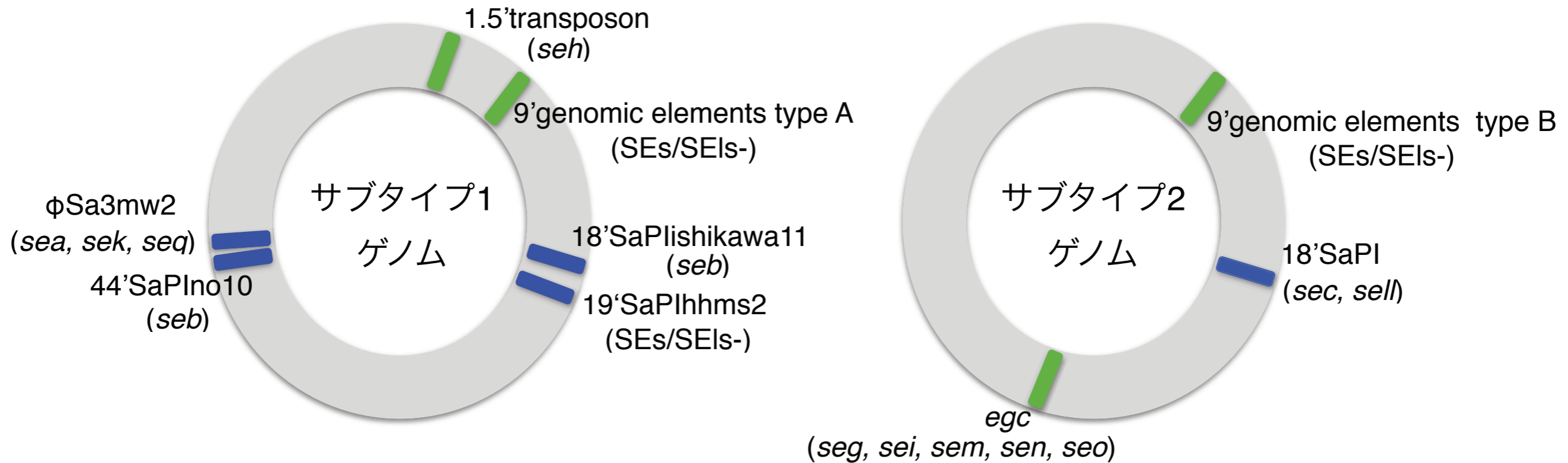
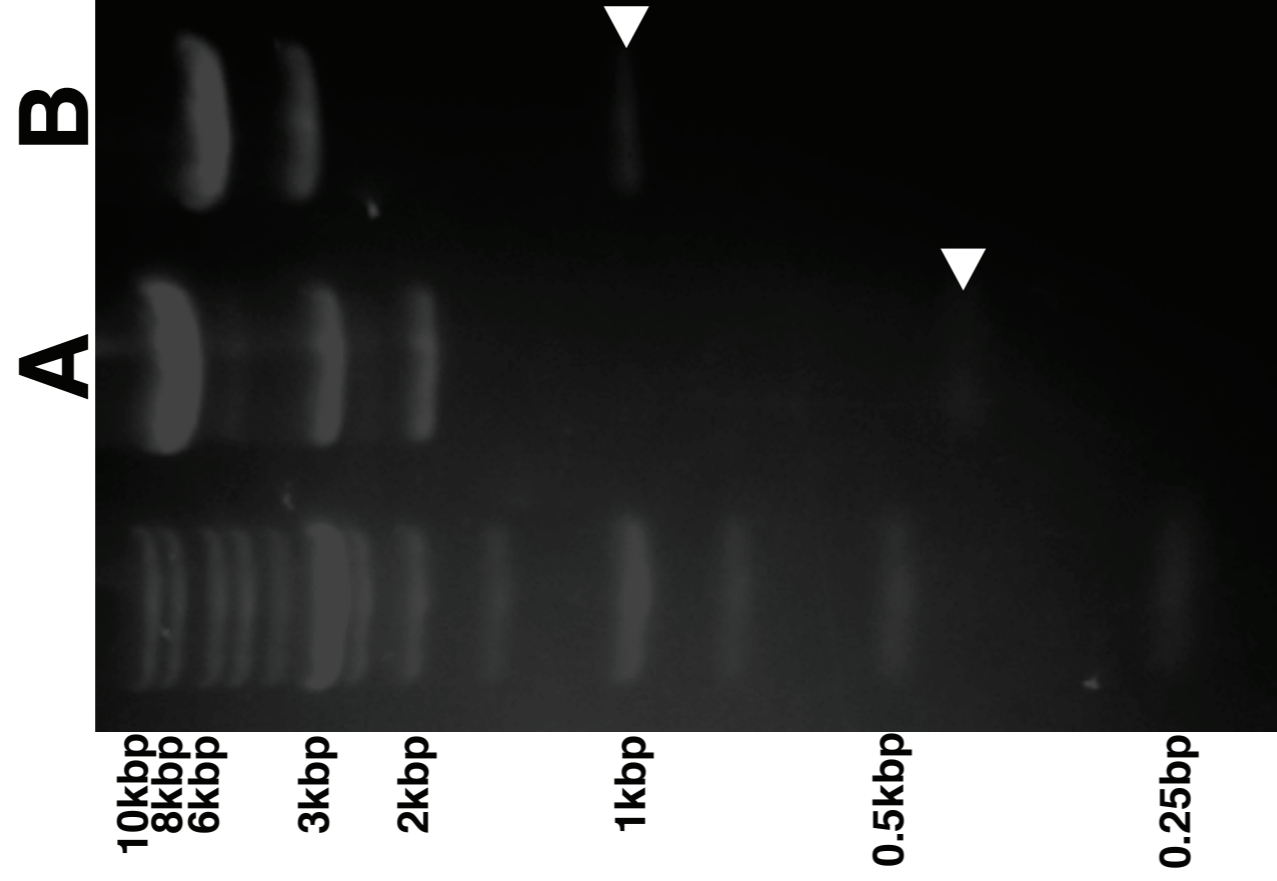


図2-5. CC81に分類される集団に存在する2種のサブタイプと各ゲノム構成。各サブタイプとそのゲノム上に存在するgenomic elementsを示す。サブタイプ1: n=32、サブタイプ2: n=2。緑: 各サブタイプに分類される株の全てが保有するgenomic elements、青: 各サブタイプに分類される株のうち一部の株が保有するgenomic elements。各genomic elements上SEs/SEIsを ( ) 内に示す。

図2-6



◁ 不明瞭なバンド

図2-6. CC81サブタイプ1とサブタイプ2における9'genomic elementsの違い。A: 9'genomic element type A、B: 9'genomic element type B、矢頭: 不明瞭なDNA断片。500bp以下のDNA断片は可視化不可。



## 総括

黄色ブドウ球菌はヒトや動物の常在菌でありながら、多様な疾病を引き起こす病原体としての性格も併せ持つことが知られている。本菌が産生する SEs が原因となるブドウ球菌食中毒は食品衛生上重要な細菌性食中毒の一つである。本食中毒による被害の規模は、他の細菌性食中毒と比較しても小さなものでなく、決して軽視することは出来ない。しかし、ブドウ球菌食中毒に関係する従来の研究は原因毒素 SEs/SEIs に関するものが主体であり、食中毒を引き起こす菌そのものに関する知見は限られていた。一方、近年の分子遺伝学的研究の進展に伴い、黄色ブドウ球菌集団の中に様々な疾病に対応したクローンの存在が明らかになりつつあるが (15, 21)、食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌に関する詳細は未だ不明である。本学位論文では、黄色ブドウ球菌の食中毒原性クローンの同定と解析を目的に以下の研究を行った。

第 1 章では、食中毒事例分離株の分子疫学解析に適した SCC*mec* 型別に代わる解析手法として、genomic elements 中の 9 領域に対応する計 11 セットのプライマーセットを用いた LA-PCR 法である genomic elements-scanning 法を確立した。本手法によって、黄色ブドウ球菌の食中毒標準菌株である N315 株と MW2 株が保有する解析対象となる genomic elements の全領域の増幅を確認した。また、臨床分離株においても、全 9 領域の genomic elements の解析が可能であり、さらに病原因子が存在する 7 種の新規 SaPIs が同定された。

第 2 章では、食中毒由来株の遺伝学的背景を明らかにし、食中毒原性クローンの同定を目的に、genomic elements-scanning 法に加えて複数の遺伝学的解析手法を行い、食中毒由来株と非食中毒由来株を解析・比較した。Coa 型別では、70%以上の食

中毒由来株が CoaVII 型に分類されたが、非食中毒由来株で Coa VII 型に分類される株は 35%以下であった。SEs/SEIs 型別では食中毒由来株の *sea*、*seb*、*seh*、*sek*、*seq* の陽性率は 50%以上であったが、非食中毒由来株でのこれらの遺伝子の陽性率は 20%以下であった。MLST では半数以上の食中毒由来株は CC81 に分類されたが、非食中毒由来株では 3%以下の株が CC81 に分類された。これらの成績に genomic elements-scanning 法の解析結果を統合すると、食中毒に特徴的な CC81 は 2 つに分類された。そのうち、CC81 サブタイプ 1 は CoaVII 型、*sea* と *seb* の片方もしくは両方が陽性で、*seh* を必ず保有する食中毒由来株の特徴を有する遺伝子型を示した。食中毒由来株の CC81 は全てこの CC81 サブタイプ 1 に分類され、共通の *seh* 関連トランスポゾンを含め類似の genomic elements 保有パターンを示す遺伝学的に近縁なクローンであった。

以上、本研究によって食中毒原性クローンの同定が可能になり、その遺伝学的背景や特徴が明らかになった。今後、CC81 サブタイプ 1 の食品周囲における潜伏箇所、ヒトの鼻腔以外の体、食品の製造、輸送あるいは調理における存在部位を特定する必要があると考えられる。特に食品製造工場での本クローンの汚染領域積極的な清浄化は、2000 年に発生した大規模食中毒事例のような公衆衛生上大きな打撃を与える食中毒の防止に大きく貢献すると考えられる。通常、本食中毒が発生した際には SEA~SEE の検出に係る PCR や特異抗体を用いた検査が行われるが、食中毒事例から分離された株の一部はこれらの SEs 遺伝子がいずれも陰性であるため、SE 型別不明食中毒として処理されることも少なくない。SE 型別不明食中毒は、ヒトに対して嘔吐活性を有する他の新型 SEs の遺伝子を保有し毒素を産生するものと考えられる。また、近年、魚類の寄生虫である *Kudoa* spp. による嘔吐を主徴とする食中毒が報告さ

れており (37)、ブドウ球菌食中毒との鑑別が必要になってきた。したがって、本食中毒の正確な診断や原因の特定には、現在検査されていない毒素の検査は必須であり、特に CC81 サブタイプ 1 が特異的に産生する SEH の検出の重要性が高いと考えられる。さらに、本研究では CC81 サブタイプ 1 の食中毒事例に占める割合は半数であり、残りの約半数中に CC81 サブタイプ 1 とは異なる遺伝学的背景を保有するクローンが存在する可能性がある。したがって、これらのクローンの同定と SEs 産生に関する特徴を明らかにすることは、食中毒起因菌の全貌を明らかにする上で重要である。このように、本研究で得られた成績は今後の食中毒事例や食品を取り囲む環境中での黄色ブドウ球菌の分子疫学解析の基本情報となり、食中毒原性クローン研究の第一歩を踏み出すために有用である。

## 和文要約

ブドウ球菌食中毒は黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) によって引き起こされる食品内毒素型食中毒の一つである。本食中毒は世界中で発生している食品衛生および公衆衛生上重要な食中毒であるにも関わらず完全な抑止ができていない。日本においても、1990 年以降、毎年数十件の事例の発生と数百人の患者に被害が及んでおり、この数は同時期に発生した腸管出血性大腸菌よりも多い。また、2000 年には関西地方において低脂肪乳を原因とした被害者数 13,400 名に及ぶ世界最大のブドウ球菌食中毒事例も発生している。このようにブドウ球菌食中毒は重要な食品衛生上の危害因子の一つであるが、未だ十分な科学的知見が得られているとは言い難い。

2001 年に最初の黄色ブドウ球菌の完全なゲノム配列が報告されて以降、分子生物学的な手法を用いた分子疫学解析が急速に発展してきた。これにより、黄色ブドウ球菌に起因する多様な疾病は単一の菌株によるものではなく、特定疾病に対して遺伝学的に均一なクローンが多数存在することが明らかになった。特に黄色ブドウ球菌によるヒトの感染症では、各クローンの病原性解析が進展している。しかし、黄色ブドウ球菌による疾病の中でもブドウ球菌食中毒に関連するクローンの報告はなく、その病原性（食中毒原性）解析も行われていない。したがって、本学位論文では、ブドウ球菌食中毒の抑止に有用な科学的基盤を確立するために、食中毒原性クローンの同定とその特性解析を行った。

第 1 章では、食中毒分離株の分子疫学解析に有用な解析手法の確立を試みた。黄色ブドウ球菌のクローン解析に関わる疫学解析手法として *Staphylococcal chromosome cassette mec* (SCC*mec*) 型別が汎用されているが、この手法は本菌のメチシリン耐性

に関わる genomic elements の解析であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) にのみ適応可能な解析手法である。しかし、ブドウ球菌食中毒分離株のほとんどはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) であり、この手法を使用することができない。したがって、食中毒由来株でも応用可能な新規の genomic elements の解析手法として、MSSA/MRSA を問わずほとんどの黄色ブドウ球菌が保有する *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPIs) などを対象とした新規解析手法 (genomic elements-scanning 法) の確立を行った。本手法は SaPIs の他に食中毒の原因となる SEs 遺伝子が存在するファージやトランスポゾン、enterotoxin gene cluster (egc) も含め合計 9 領域について、長鎖 DNA の正確な増幅が可能な long-accurate polymerase chain reaction (LA-PCR)を行うものである。LA-PCR による genomic elements 全長の増幅を行うとともに、サザンハイブリダイゼーションやシーケンシング等の遺伝学的解析を行った。黄色ブドウ球菌の標準菌株である N315 株と MW2 株を用いた genomic elements-scanning 法では解析対象 9 領域の正確な増幅が確認され、臨床分離株 10 株を用いた解析でも標準株と同様にプロファイル解析が可能であった。また、本法によって新規 SaPIs として 7 種の SaPIs (SaPIivm10、SaPIishikawa11、SaPIivm60、SaPIj11、SaPIhhms2、SaPIino10、SaPIhirosaki4) が同定された。以上より、本章で新たに確立した genomic elements-scanning 法は黄色ブドウ球菌の遺伝学的解析に応用可能と考えられた。

第 2 章では、第 1 章で確立した genomic elements-scanning 法を用いた食中毒原性クローンの探索を目的として、我国で分離された黄色ブドウ球菌 506 株 (うち食中毒 42 株、ヒト鼻腔 329 株、ヒト感染症 85 株、環境 50 株) を解析した。これらの供試菌株は、Coa (Coa) 型別において食中毒由来株の 70%以上が CoaVII 型に分類され

たが、非食中毒由来株で CoaVII 型に分類された株の割合は 35%以下であった。SEs 型別において、食中毒では *sea* や *seb* が 50%以上の陽性率を示したが、非食中毒由来株では 20%以下であった。Multi locus sequence typing (MLST) において clonal complex 81 (CC81) に分類される株が食中毒由来で過半数 (54.8%) を占めたが、非食中毒由来株では 3%以下であった。次いで、genomic elements-scanning 法による解析において、CC81 には遺伝子型と genomic elements の保有状況の事なる 2 つのサブタイプが存在していた。サブタイプ 1 は CoaVII 型で、SEA と SEB の両方もしくは片方が陽性で、genomic elements として *seh* 関連トランスポゾン を必ず保有し、一部の株は *sea* 関連ファージ、*seb* 関連 SaPIs を保有していた。一方、サブタイプ 2 は CoaVI 型で *sea* と *seb* 陰性で、genomic elements として *egc* を必ず保有し、1 株は *sec* 関連 SaPIs を保有していた。これらのうち、食中毒由来 CC81 は全てサブタイプ 1 であった。また、*sea* を保有する複数の CCs におけるブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) 産生量は、CC81 サブタイプ 1 で有意に高いことが判明した。したがって、CC81 サブタイプ 1 は SEA 産生量が高い食中毒原性クローンであることが明らかになった

本研究により、近年の日本におけるブドウ球菌食中毒の原因となる食中毒原性クローンとして CC81 サブタイプ 1 が同定された。この所見は今後の食中毒事例分離株の疫学解析や食中毒防除を行う際の科学的情報として重要であり、食品を取り巻く環境中における本クローンの包括的調査が汚染源の摘発や食品への付着経路の解明に寄与すると考えられた。したがって、現在広く普及している一般的な衛生対策に加え、食中毒原性クローンである CC81 サブタイプ 1 を標的とした疫学解析を組み合わせた食品衛生対策の確立が、効果的な食中毒抑止に有用であると考えられる。

## 英文要約 (Summary)

### Molecular Epidemiological Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Food poisoning Outbreaks

Staphylococcal food poisoning (SFP) is caused by the intake of staphylococcal enterotoxins (SEs) produced by *Staphylococcus aureus*. SFP outbreaks occur worldwide, and *S. aureus* is one of the most commonly addressed agents in food safety and public health. According to the food poisoning statistics in Japan, there have been about fifty outbreaks of SFP involving several hundred patients per year since 1990; these numbers are clearly higher than those of food poisoning due to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In 2000, the largest outbreak of SFP worldwide was reported mainly in the Kansai district of Japan and involved 13,400 patients who complained of their poor health. Although these observations reveal that SFP is one of the most important risk factors in food safety, there is too little scientific information on SFP to develop effective methods for control and prevention of SFP outbreaks.

Since the first report of the complete genomic sequence of *S. aureus* in 2001, the molecular epidemiology of this microorganism using molecular biological methods has progressed extremely rapidly. *Staphylococcus aureus* is a causative bacterium of various diseases. Several recent studies showed evidence that these diseases are caused by several disease-specific clones of *S. aureus* with closely related genetic backgrounds. Pathogenetic analyses of each clone were recently developed in a study on *S. aureus*-induced infectious diseases. However, to our knowledge, no studies on SFP have attempted to identify SFP-related clones or analyze their

pathogenesis.

The first chapter described a study that was carried out to establish a novel method for molecular epidemiological analysis of SFP isolates. Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) typing is widely used for epidemiological analyses of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones and is the method used to classify the SCC*mec* responsible for methicillin resistance. It is the most suitable approach with which to analyze MRSA. However, this method is not applicable to SFP isolates because almost all of these isolates are reportedly methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). Therefore, this chapter describes the establishment of a new genomic analytic approach focusing on genomic elements (genomic elements-scanning method), mainly *S. aureus* pathogenicity islands (SaPIs) harbored in both the MSSA and MRSA genomes. This method is based on long-accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) and targeted nine regions of genomic elements including six SaPI sites, the  $\phi$  Sa3 prophage, transposon, and enterotoxin gene cluster (*egc*). Several selected *S. aureus* strains and isolates were subjected to the genomic elements-scanning method in conjunction with other genetic analyses, such as Southern hybridization and sequencing. The genomic elements-scanning method enabled accurate amplification of all 9 target regions of the genomic elements of 2 *S. aureus* reference strains (N315 and MW2) and 10 clinical isolates from SFP in Japan. In addition, this method revealed seven novel SaPIs (SaPIivm10, SaPIishikawa11, SaPIivm60, SaPIj11, SaPIhhms2, SaPIino10, and SaPIhirosaki4) in the clinical isolates. From these observations, it was concluded that the genomic elements-scanning method described herein is a feasible approach for the genetic analysis of *S. aureus*.



In the second chapter, 506 isolates of *S. aureus* (42 SFP isolates, 329 nasal swab isolates, 85 human infection isolates, and 50 environmental isolates) were analyzed using the genomic elements-scanning method established in the first chapter in conjunction with coagulase (Coa) typing, SE typing, and multilocus sequence typing (MLST). Coa typing revealed that >70% of SFP isolates were classified as Coa VII (others: <30%). SE typing showed that >50% of SFP isolates were positive for either *sea* or *seb* (others: <20%). MLST depicted that >50% of SFP isolates (54.8%) were classified into clonal complex 81 (CC81) (others: <3%). The genomic elements-scanning method subsequently revealed that two subtypes existed in CC81 according to the different profiles of the genomic elements and Coa and SE typings. Subtype 1 isolates exhibited Coa VII with positivity for either *sea* or *seb* or both. All subtype 1 isolates carried *seh*-related transposon, and some of the isolates had a *sea*-related phage and *seb*-related SaPIs. In contrast, subtype 2 isolates exhibited Coa VI with negativity for both *sea* and *seb*. All subtype 2 isolates carried *egc*, and only one of those isolates had a *sec*-related SaPI. Of these two subtypes, all CC81 isolates from SFP were classified as subtype 1. In addition, the CC81 subtype 1 isolates showed the greatest SEA production among the CCs with *sea*-positivity. From these observations, it was considered that CC81 is the SFP clone that produces the highest amount of SEA.

In summary, this thesis concludes that CC81 subtype 1 is the SFP clone involved in the recent food poisoning outbreaks in Japan. This evidence seems useful for establishment of the scientific basis of the epidemiology and prevention of SFP outbreaks. The identification of the source of contamination and elucidation

of the contamination pathway may contribute to eradication of this clone from the food environment. Therefore, we suggest that the general approach of food sanitation combined with a specific sanitary strategy to eliminate the CC81 subtype 1 of *S. aureus* will improve food hygiene and help to prevent SFP in Japan.

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました岩手大学教授 山岸則夫博士に心から感謝し、本稿作成にあたり有益な御助言と御校閲を頂きました岩手大学 鎌田洋一教授 帯広畜産大学 小川晴子教授、東京農工大学 藤川浩教授、岐阜大学 杉山誠教授、広島大学 菅井基行教授に甚大なる謝意を表します。本研究遂行にあたり 2012 年 9 月までご指導とご支援を頂きました岩手大学共同獣医学科食品安全学研究室 小野久弥博士（現弘前大学医学研究科感染生体防御学助教）をはじめ、研究室の大学院生・学生に深謝いたします。また、2012 年 10 月より委託研究の受け入れ、ご指導、ご支援を頂きました広島大学医歯薬保健学研究科細菌学講座 菅井基行教授をはじめ、久恒順三助教、鹿山鎮男助教、加藤文紀助教、鶴田恵子助教、講座の大学院生に深謝を表します。

さらに、研究全般に渡り貴重な御助言を頂きました弘前大学医学研究科感染生体防御学 中根明夫教授、北里大学獣医学部人獣共通感染症学 胡東良教授に拝謝いたします。本研究を行うにあたり菌株の提供を頂いた女子栄養大学衛生学教室 上田成子教授と全国の衛生研究所の皆様に深謝申し上げます。

最後に、私が学部学生として岩手大学農学部獣医学課程食品安全学研究室配属（2008 年 10 月）されてから 2012 年 5 月にお亡くなるまで、終止熱心な研究指導を賜りました岩手大学教授 故重茂克彦博士に万謝申し上げるとともご冥福を祈り申し上げます。

## 引用文献

1. Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2:1751-1773.
2. Arita T, Nakai M, Miyazaki M, Nasu T, Watanabe S, Okimura Y. 2010. A case of food poisoning caused by *Staphylococcus aureus* and study on contamination of soft serve ice cream. *Annual report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment* 29:40-42. (in Japanese)
3. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130:33-40.
4. Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1-10.
5. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 359:1819-1827.
6. Bayles KW, Iandolo JJ. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171:4799-4806.
7. Bergdoll MS. 1983. Enterotoxins. *Staphylococci and staphylococcal infections*, (Easton CSF & Adlam C, eds), pp. 559-598. Academic Press, London.
8. Borst DW, Betley MJ. 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infect. Immun.* 62:113-118.

9. Brosnahan AJ, Schlievert PM. 2011. Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome. *FEBS J.* 2011 278: 4649-4667.
10. Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Skandamis PN, Schelin J, Rådström P. 2012. Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 278:4942-4948.
11. Chen L, Mediavilla JR, Oliveira DC, Willey BM, de Lencastre H, Kreiswirth BN. 2009. Multiplex real-time PCR for rapid staphylococcal cassette chromosome *mec* typing. *J. Clin. Microbiol.* 47:3692–3706.
12. Collery MM, Smyth DS, Tumilty JJ, Twohig JM, Smyth CJ, 2009. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 58:13–25.
13. Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. 2012. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiol.* 32:202-205.
14. Croucher NJ, Harris SR, Grad YH, Hanage WP. 2013. Bacterial genomes in epidemiology--present and future. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368:20120202.
15. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. 2010. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:109-117.
16. David MZ, Daum RS. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging

- epidemic. Clin. Microbiol. Rev. 23:616-687.
17. Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiol. 26:896-904.
  18. Deurenberg RH, Stobberingh EE. 2009. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr. Mol. Med. 9:100-115.
  19. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 367:731-739.
  20. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38:1008-1015.
  21. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99: 7687-7692.
  22. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. food Microbiol. 7: 311-316.
  23. Fitzgerald JR. 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends Microbiol. 20:192-198.
  24. Franklin D. Lowy, M.D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. N. Engl. J. Med. 339:520-532
  25. Gaskill ME, Khan SA. 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 263:6276-6280.

26. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187:2426-2438.
27. Gilmour MW, Graham M, Reimer A, Van Domselaar G. 2013. Public health genomics and the new molecular epidemiology of bacterial pathogens. *Public Health Genomics.* 16:25-30.
28. Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M. 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48:2130-2139.
29. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:815-836.
30. Herron LL, Chakravarty R, Dwan C, Fitzgerald JR, Musser JM, Retzel E, Kapur V. 2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino Acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70:3978-3981.
31. Hiramatsu K. 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist. Updat.* 1:135-150.
32. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C,

- Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG, Parkhill J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101:9786-9791.
33. Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, Nakane A. 2011. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Tohoku J. Exp. Med. 225:161-169.
34. Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K. 2003. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). Infect. Immun. 71:567-570
35. Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol. 71:2793-2795.
36. Igarashi H. 1997. Gram-positive cocci: Staphylococcal food poisoning. Biocontrol. Sci. 25:549-557.
37. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. 2012. Clin. Infect. Dis. 2012. 54:1046-1052.
38. Kobayashi SD, DeLeo FR. 2009. An update on community-associated MRSA virulence. Curr. Opin. Pharmacol. 9:545-551.
39. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami



- H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357:1225-1240.
40. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63–76.
41. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 38-43.
42. Li SJ, Hu DL, Maina EK, Shinagawa K, Omoe K, Nakane A. 2011. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 110:729-736.
43. Lindsay JA. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:98-103.
44. Lindsay JA. 2014. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int. J. Med. Microbiol.* 304: 103-109.
45. Lindsay JA, Holden MTG. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* 6:186–201.
46. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 29:527-543.
47. Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway-Morris A, Cartwright RA, Simpson AJ, Rambaut A, Nübel U, Fitzgerald JR. 2009. Recent

- human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106:19545-19550.
48. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. 1998. N. Engl. J. Med. 339:520-532.
  49. McCarthy AJ, Witney AA, Lindsay JA. 2012. *Staphylococcus aureus* Temperate Bacteriophage: Carriage and Horizontal Gene Transfer is Lineage Associated. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:6.
  50. Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life. Sci. 67:3057-3071.
  51. Mir-Sanchis I, Martínez-Rubio R, Martí M, Chen J, Lasa Í, Novick RP, Tormo-Más MÁ, Penadés JR. 2012. Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. Mol. Microbiol. 85:833-845.
  52. Mizumachi E, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, Uehara Y, Seo H, Sugai M. 2011. Clonal distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* on handles of handheld shopping baskets in supermarkets. J. Appl. Microbiol. 110:562-567.
  53. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, Kauffman CA, Yu VL. 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am. J. Med. 94:313-28.
  54. Novick RP, Christie GE, Penadés JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8:541-551.
  55. Novick RP, Subedi A. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. Chem. Immunol. Allergy. 93:42-57
  56. Oda, T. 1998. A review of staphylococcal poisoning in Japan. J. Food Hyg. Soc. Japan. 39:J179–J185.

57. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71:6088-6094.
58. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2005. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 246:191-198.
59. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun.* 73:5540-5546.
60. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40:857-862.
61. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* 76: 4999-5005.
62. Otto M. 2013. Community-associated MRSA: what makes them special? *Int. J. Med. Microbiol.* 303:324-330.
63. Ram G, Chen J, Kumar K, Ross HF, Ubeda C, Damle PK, Lane KD, Penadés JR, Christie GE, Novick RP. 2012. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109:16300-16305.
64. Rasooly A, Rasooly RS. 1998. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. *Int. J. Food Microbiol.* 41:205-212.

65. Regassa LB, Couch JL, Betley MJ. 1991. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect. Immun.* 59:955-962.
66. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 18:20380.
67. Sakai F, Ihara H, Aoyama K, Igarashi H, Yanahira S, Ohkubo T, Asao T, Kozaki S. 2008. Characteristics of enterotoxin H-producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. *J. Food Prot.* 71:1855-1860.
68. Sakai F, Takemoto A, Watanabe S, Aoyama K, Ohkubo T, Yanahira S, Igarashi H, Kozaki S, Hiramatsu K, Ito T. 2008. Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase. *J. Microbiol. Methods.* 75:312-317.
69. Schwartz DC, Cantor CR. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37:67-75.
70. Shinagawa K, Kunita N, Sakaguchi G. 1975. Purification of staphylococcal enterotoxins A and C and preparation of anti-enterotoxin sera. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 30:683-692. (In Japanese)
71. Shore AC, Coleman DC. 2013. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recent advances and new insights. *Int. J. Med. Microbiol.* 303: 350-359.
72. Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Feßler AT, Gilbert FB, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G. 2012. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *PLoS One.* 7:e33967.

73. Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. 2004. *Microbes Infect.* 6:1043-1048.
74. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock R, Hebert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan ME, Pfaller MA. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32:407–415.
75. Terayama, T., Ushioda, H., Shingaki, M., Inaba, M., Kai, A. and Sakai, S. 1977. Coagulase types of *Staphylococcus aureus* from food poisoning outbreaks and a kind of incriminated foods. *Ann. Rep. Tokyo. Metrop. Res. Lab. Public Health* 28:1–4.
76. Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74: 4724-4734.
77. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
78. Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ. 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect. Immun.* 61: 356-359.
79. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. 2011. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*Sccmec*) classification and typing methods: an overview. *Pol. J. Microbiol.* 60:95-103.

80. Uchiyama T, Imanishi K, Miyoshi-Akiyama T, Kato H. 2006. Staphylococcal superantigens and the diseases they cause. Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 3rd ed. (Alouf JE & Popoof MR, eds), 30–43. Academic Press, Burlington.
81. Ubeda, C, Barry, P, Novick, RP, Penades, JR. Characterization of mutations defining SaPI functions and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. 2008. Mol. Microbiol. 67:493–503.
82. Ubeda C, Barry P, Penadés JR, Novick RP. 2007. A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 104:14182-14188.
83. Ubeda C, Olivarez NP, Barry P, Wang H, Kong X, Matthews A, Tallent SM, Christie GE, Novick RP. 2009. Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. Mol. Microbiol. 72:98-108.
84. Verkade E, Kluytmans J. 2014. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. Infect. Genet. Evol. 21:523-530.
85. Viana D, Blanco J, Tormo-Más MA, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa JM, Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. Mol. Microbiol. 77:1583-1594.
86. Wallin-Carlquist N, Márta D, Borch E, Rådström P. 2010. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. Int. J. Food Microbiol. 141:Suppl 1:S69-74.
87. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of

- community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog. 7:e1002271.
88. Wolf C, Kusch H, Monecke S, Albrecht D, Holtfreter S, von Eiff C, Petzl W, Rainard P, Bröker BM, Engelmann S. 2011. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. Proteomics. 11:2491-2502.
  89. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M. 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect. Immun. 70:5835-5845
  90. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J. Biol. Chem. 277:13138-13147.
  91. Zecconi A, Scali F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol. Lett. 150:12-22.
  92. Zen-Yoji H, Terayama T, Benoki M, Kuwahara S. Studies on staphylococcal coagulase. I. Antigenic difference of coagulase and distribution of the anticoagulase in human sera. 1961. Jap. J. Microbiol. 5:237.