研究成果報告書

1．研究課題名：本邦における *mec* 遺伝子陰性メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の薬剤耐性機序解明

2．研究代表者氏名：名取 達矢

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

＜論文発表＞

Natori T, Nagano Y, Denda T, Higuma Y, Matsumoto T, Ishimine N, Uehara T, Nagano N. Genetic and clinical landscape of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates lacking the *mec* gene, in Japan. *JAC Antimicrob Resist.* 2026 Jan 28;8(1):dlag008.
doi: 10.1093/jacamr/dlag008. PMID: 41614000; PMCID: PMC12848829.

＜学会発表＞

名取達矢．臨床検査でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と判定される *mec* 遺伝子欠損株の遺伝的・臨床的背景．第 37 回日本臨床微生物学会・学術集会, Meet the Expert6（招待講演）, 2026 年 2 月, 千葉.

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【研究背景】

mec 遺伝子を保有していないにもかかわらずメチシリン耐性を示す *Staphylococcus aureus* が存在し、これらは MRLM（Methicillin-Resistant lacking *mec*）と総称される。MRLM においては *pbp* 遺伝子変異による PBP の親和性低下や、*pbp4* プロモーター領域の変異、PBP とは直接関係しない cyclic-di-AMP の代謝に関与する *gdpP* 遺伝子の変異といった因子が薬剤耐性に関係していると報告されている。しかしながら、MRLM におけるメチシリン耐性の詳細な分子機構や、各種 β-ラクタム系抗菌薬に対する薬剤感受性の実態については未だ明らかにされていない。

【研究目的及び実施概要】

本研究は、自施設にて分離された臨床分離 MRLM 株を対象に、薬剤感受性特性および分子レベルでの耐性機序を解明することを目的とした。

【研究対象】

信州大学医学部附属病院における臨床検査材料由来の MRLM 13 菌株を研究対象とした。

これらは全ゲノム解析を実施済みであり、薬剤耐性に関与する遺伝子変異の情報についても取得済みである。

【研究内容】

＜β-ラクタム系抗菌薬感受性試験及び Etest による詳細 MIC 値の測定＞

日常検査においてはメチシリン耐性の判定に用いられるオキサシリン・セフォキシチンの MIC 測定レンジが狭く、詳細な MIC 値が不明であることや、MRLM の先行研究において第 5 世代セファロスポリン系抗菌薬への耐性を示すものがあるため、対象株の微量液体希釈法及び Etest による詳細な薬剤感受性試験を実施した。

＜PBP4 発現量解析・GdpP 代謝産物である細胞内 cyclic-di-AMP の測定＞

PBP4 および *pbp4* プロモーターの変異による PBP4 発現の関与や、gdpP 遺伝子変異に起因する細胞内 cyclic-di-AMP の蓄積がメチシリン耐性に関与するという先行研究があるため、リアルタイム PCR による PBP4 の発現量解析と、ELISA 法による cyclic-di-AMP の定量を行った。

【研究成果】

＜β-ラクタム系抗菌薬感受性試験及び Etest による詳細 MIC 値の測定＞

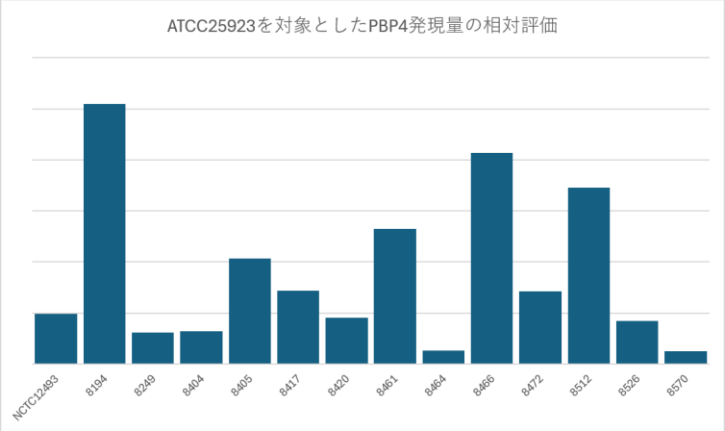
	MICs（μg/mL）									
	PCG	ABPC	ABPC/SBT	AMPC/CVA	CEZ	CTRX	CFPM	IPM	MEPM	BPRL
SH8194	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	8	≦1	≦1	0.5
SH8249	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.25
SH8404	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.25
SH8405	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	8	≦1	≦1	0.5
SH8417	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	8	≦1	≦1	0.25
SH8420	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	8	≦1	≦1	0.5
SH8461	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.5
SH8464	8	8	≦8	≦2	≦2	≦4	8	≦1	≦1	≦0.12
SH8466	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.5
SH8472	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.25
SH8512	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	≦2	≦1	≦1	0.25
SH8526	≦0.12	≦2	≦8	≦2	≦2	≦4	4	≦1	≦1	0.5
SH8570	>8	>8	≦8	≦2	≦2	≦4	≦2	≦1	≦1	0.25

	MPIPC			CFX		
	微量液体希釈法(μg/mL)	Etest(μg/mL)	Disk(mm)	微量液体希釈法(μg/mL)	Etest(μg/mL)	Disk(mm)
SH8194	2	3	20	>4	8	26
SH8249	1	0.75	16	>4	12	24
SH8404	1	1	19	>4	12	22
SH8405	2	1	21	>4	6	30
SH8417	2	1	26	≦4	6	24
SH8420	>2	0.75	26	>4	8	28
SH8461	1	2	18	>4	12	28
SH8464	>2	0.5	20	>4	4	26
SH8466	1	2	13	>4	8	23
SH8472	1	1.5	20	≦4	12	24
SH8512	≦0.25	1	21	≦4	6	27
SH8526	≦0.25	0.5	18	>4	8	22
SH8570	1	0.38	28	>4	6	27

・対象 13 株のβ-ラクタム系抗菌薬感受性は、第 5 世代セファロスポリン系であるセフトビプロールをはじめとするほとんどすべての抗菌薬に低 MIC 値を示し、良好な感受性を保持していることが示された。メチシリン耐性の判定に用いられるオキサシリン及びセフォキシチンに関しては微量液体希釈法で MIC 値の上昇がみられるが、Etest による精査によってその上昇が、境界域に留まるような低レベル上昇であることが明らかとなった。

・先行研究では、PBP4 変異と GdpP 変異の相乗効果によってβ-ラクタム系抗菌薬への耐性化が惹起されるとの報告があるが、研究対象株においては PBP4 と GdpP 変異が相乗的に作用していると考えられる株が存在しておらず、薬剤感受性の結果はその分子機構を裏付ける結果となった。

＜PBP4 発現量解析・GdpP 代謝産物である細胞内 cyclic-di-AMP の測定＞



・リアルタイム PCR による PBP4 発現量解析では、ATCC25923 株における発現量との相対評価を行った。対照株として *mec* 保有 MRSA である NCTC12493 株を用いた。

・MRLM13 株の PBP4 値は ATCC25923 株の 1.25 倍～25.46 倍と広範に分布し、多様な発現パターンを示した。

・本研究の対象株では *pbp4* プロモーター変異を有する株の PBP4 過剰発現は認めなかった。

・PBP4 のアミノ酸配列において E398A 単独置換を持つ多くの株で高い発現量が認められたことから、本変異が PBP4 の構造安定化あるいは高発現維持に関与している可能性が考えられる。

・PBP4 発現量が MSSA と同等レベルの低値である株においても、セフォキシチン耐性を示す株が存在しており、耐性化機構は PBP4 の単独変異ではなく、その他の因子との多角的・複合的な関係性によって形成されていることを裏付けるものである。

・ELISA 法による cyclic-di-AMP 測定では、低濃度域でのサンプル測定において技術的難易度が高く、一部の株で有意な測定を得るに至らなかった。

・GdpP 変異株において高い濃度が観察された一方で、変異を持たない株においても同等以上の高値を示す株も存在し、、変異の有無と ELISA 測定値の明確な相関は見出すことが出来なかった。

・*S. aureus* の cyclic-di-AMP 測定における ELISA 法は感度・再現性の面で限界が示唆された。先行研究と同様に LC-MS/MS を用いた再検証が必要である。