

バンコマイシンとテイコプラニンに低感受性を示す多剤耐性黄色ブドウ球菌による院内感染（山形県；2004年5月—2005年6月）

¹⁾ 山形県立新庄病院薬剤部, ²⁾ 山形県衛生研究所微生物部

村田 敏夫¹⁾ 大谷 勝実²⁾

(平成18年10月10日受付)

(平成18年12月18日受理)

Key words: MRSA, vancomycin, teicoplanin, nosocomial infection, drug resistance

要 旨

2004年5月から2005年6月の間に山形県内の一基幹病院においてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による院内感染が発生した。メチシリン耐性表皮ブドウ球菌(MRSE)2株を含む合計8株について、パルスフィールド電気泳動(PFGE)による遺伝子解析および薬剤感受性試験、エンテロトキシン型別等の細菌学的性状試験を行った。その結果、本事例は同一の多剤耐性MRSAによる院内感染であったと考えられた。また、これら8株はバンコマイシン(VCM)とテイコプラニン(TEIC)に低感受性を示していた。PCR法により*vanA*, *vanB*, *vanC* 遺伝子の検索を行った結果、すべての株において遺伝子は検出されなかった。透過型電子顕微鏡で食中毒由来の感受性株と細胞壁を比較したところ、細胞壁の肥厚が観察された。グリコペプチド系薬剤に対する耐性菌は、VCMまたはTEIC治療の過程で出現することが指摘されており、今後も監視が必要であると考えられた。

[感染症誌 81:183~188, 2007]

序 文

MRSAや多剤耐性緑膿菌などによる院内感染は、医療現場をはじめ大きな社会問題の一つになっている。MRSAは院内感染のみならず、いわゆる市中感染型のMRSAとして小児や青年層を中心に拡がりを見せている。しかもコラーゲン結合タンパクやPanton-Valentine leukocidin (PVL)を発現する強毒性の市中感染型MRSAによる死亡事例も報告されており¹⁾、その感染拡大が懸念されている。また、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)から耐性遺伝子を獲得したVRSA(バンコマイシン耐性MRSA)の出現にも留意する必要がある²⁾。基礎疾患を有する入院患者のうち免疫能が低下した易感染者では、敗血症や肺炎を併発し死亡に至るケースも少なくない。山形県内の一基幹病院におけるMRSAの院内感染が疑われた菌株について分子遺伝学的、細菌学的性状を調査した。また、本研究で分離された菌株はVCM、TEICに低感受性を示していたことから、耐性遺伝子の検索および電子顕微鏡による細胞壁の観察を行ったので報告する。

材料と方法

1. 材料

2004年5月から2005年6月の間に病院で分離された6株のMRSAと、2株のMRSEを材料とした(Table 1)。菌株No2, 3, 4, 5, 6, 8がMRSA, No1, 7がMRSEである。患者の年齢は13歳から80歳で比較的高齢者が多かった。菌株の由来は血液、喀痰、便、人工透析の廃液等であった。病院で行った微量液体希釈法によるVCMおよびTEICに対するMIC値は、すべての株において各々2μg/mL, 16μg/mLであり、中低度耐性を示した。電子顕微鏡観察は、菌株No5のMRSA1株と過去の食中毒事例から分離されたメチシリン感受性株(MSSA)1株を材料とした。

2. 方法

1) PFGEによる遺伝子解析

制限酵素はSmaI (TaKaRa)を、電気泳動装置はGene Path System (BIO-RAD)を使用した。泳動条件はスイッチタイム5.3秒~34.9秒、泳動時間20時間とした。

2) 薬剤感受性試験

ドライプレート‘栄研’DP22を用い、添付文書に

別刷請求先：(〒996-0025) 山形県新庄市若葉町12-55

山形県立新庄病院薬剤部

村田 敏夫

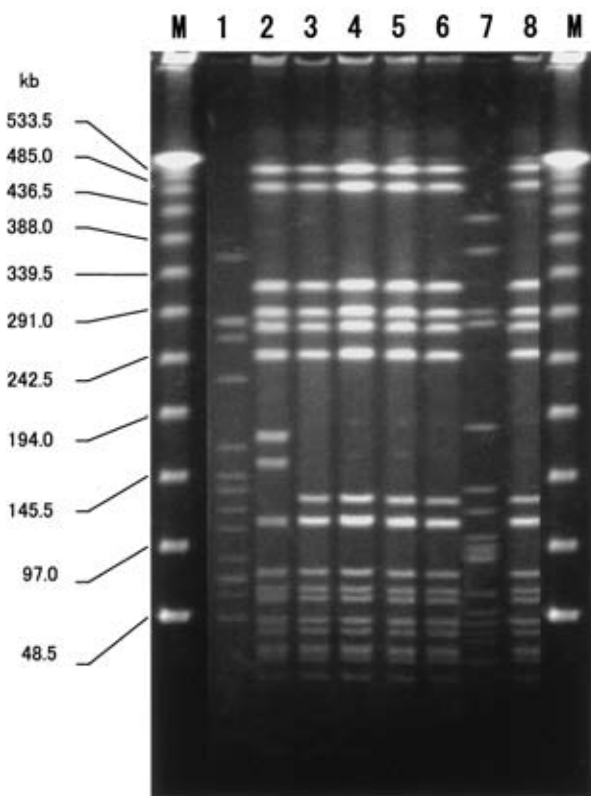
Table 1 6 MRSA and 2 MRSE isolates during hospitalization

Strain No *	Isolation day/mo/yr	MIC of VCM ** μg/mL	MIC of TEIC ** μg/mL	Gender	Age (years)	Specimen
1	26/5/2004	2	16	F	56	blood
2	28/2/2005	2	16	F	80	sputum
3	9/3/2005	2	16	F	69	drainage catheter
4	14/3/2005	2	16	M	57	stool
5	25/3/2005	2	16	M	77	sputum
6	25/3/2005	2	16	F	77	stool
7	23/5/2005	2	16	M	13	CAPD dialysate
8	20/6/2005	2	16	M	55	sputum

* Strains 2, 3, 4, 5, 6, 8 are MRSA and Strain 1, 7 are MRSE

** VCM and TEIC MIC is tested by microliquid dilution at a hospital laboratory

Fig. 1 Comparison of PFGE patterns of Sma I Digested DNA among MRSA and MRSE isolates. Lane M: Lambda Ladder molecular size marker. Other lanes: See Table 1 for clinical isolates.



準拠して微量液体希釈法で MIC を測定した。

3) 薬剤耐性遺伝子の検索

mecA 遺伝子³⁾および *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2,3* 遺伝子⁴⁾の検索は既報に準じて PCR 法で行った。

4) 細菌学的性状検査

Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) の検出, エンテロトキシン型別およびコアグララーゼ型別は, 各々デンカ生研キット TST-RPLA「生研」, SET-RPLA「生研」, ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」を用い添付文書に準拠して行った。β-ラクタマーゼの産生はニトロセフィン法で行った。試薬は OX-

OID 社製のニトロセフィン (SR0112C) を用いた。PVL 遺伝子の確認は既報⁵⁾に準じて PCR 法で行った。

5) ヘテロ VISA (VCM intermediated-resistant *Staphylococcus aureus*) の検索

ヘテロ VISA の検索は花木らの方法⁶⁾にしたがい, Mu3 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行った。

6) 電子顕微鏡による形態観察

分離平板上のコロニーを LB 培地 (Difco) で 18 時間培養後, 滅菌 PBS で 1 回洗浄した。1% リンタングステン酸で陰性染色し, 透過型電子顕微鏡 (JEM-100 CX: 日本電子) で 3 万倍で観察した。

成 績

1. PFGE による遺伝子解析と薬剤感受性試験

PFGE の結果を Fig. 1 に示した。MRSA である No3, No4, No5, No6, No8 の PFGE パターンは同一であり, No2 の MRSA も, これらの 5 株と近似の関係にあった。MRSE である No1 と No7 の PFGE パターンは 6 株の MRSA とは異なっており, 2 株間で比較しても異なっていた。

薬剤感受性試験の結果を Table 2 に示した。6 株の MRSA の薬剤感受性パターンはすべて一致した。感受性を示したのはアルベカシン (ABK), ミノマイシン (MINO) および ST 合剤 (ST) のみであり, それ以外の薬剤には耐性を示す多剤耐性菌であった。2 株の MRSE は大部分の薬剤に対して感受性を示していたが, 薬剤感受性パターンは異なっていた。特にエリスロマイシン (EM) とホスホマイシン (FOM) に対する MIC 値で大きく乖離していた。VCM に対する MIC 値は 8 株とも 2 μg/mL であり, TEIC に対する MIC 値は No1 が 8 μg/mL でその他の株はすべて 16 μg/mL であった。

2. 薬剤耐性遺伝子の検索, 細菌学的性状検査およびヘテロ VISA の検索

薬剤耐性遺伝子の検索, 細菌学的性状検査およびヘテロ VISA の検索結果を Table 3 に示した。*mecA* 遺

Table 2 Antimicrobial susceptibility of MRSA and MRSE isolates

Strain No *	MIC (µg/mL)																		
	PCG	ABPC	CEZ	CTM	CCL	FMOX	IPM	GM	MPIPC	ABK	MINO	EM	CLDM	VCM	TEIC	FOM	LVFX	ST	
1	> 0.25	4	2	2	2	2	0.12	> 0.5	> 2	0.5	> 0.5	> 0.25	> 0.12	> 2	8	8	> 0.5	> 9.5/0.5	>
2	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>
3	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>
4	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>
5	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>
6	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>
7	> 0.25	8	2	2	4	4	0.5	> 0.5	> 4	0.5	> 0.5	> 8	0.12	> 2	16	32	0.5	> 9.5/0.5	>
8	> 0.25	> 16	> 32	> 32	> 32	> 32	> 16	> 16	> 4	> 4	0.5	> 8	> 4	2	16	> 32	> 8	9.5/0.5	>

* The strain No is the same as for Table 1

PCG : benzylpenicillin, ABPC : ampicillin, CEZ : cefazolin, CTM : cefotiam, CCL : cefaclor, FMOX : flomoxef, IPM : imipenem, GM : gentamicin, MPIPC : oxacillin, ABK : arbekacin, MINO : minocycline, EM : erythromycin, CLDM : clindamycin, VCM : vancomycin, TEIC : teicoplanin, FOM : fosfomycin, LVFX : levofloxacin, ST : sulfamethoxazole : trimethoprim = 76 : 4

Table 3 MRSA and MRSE isolate features

Strain No *	<i>mecA</i>	<i>van</i>	Production of TSST-1	Enterotoxine	Coagulase	Production of β-lactamase	Panton-Valentine leukocidin (PVL)	Hetero-VISA
1	+	-	-	-	-	+	-	-
2	+	-	+	C	II	-	-	-
3	+	-	+	C	II	-	-	-
4	+	-	+	C	II	-	-	-
5	+	-	+	C	II	-	-	-
6	+	-	+	C	II	-	-	-
7	+	-	-	-	-	+	-	-
8	+	-	+	C	II	-	-	-

* The strain No is the same as for Table 1

伝子および *vanA*, *vanB*, *vanC*₁, *vanC*_{2,3} 遺伝子の検索を行った結果, *mecA* 遺伝子は 8 株すべてから検出されたが, *van* 遺伝子はいずれも検出されなかった. 6 株の MRSA はいずれも TSST-1 陽性であり, エンテロトキシン型は Type C であった. また, コアグラーゼ型は type II であったが, β-ラクタマーゼの産生は認められなかった. 一方, 2 株の MRSE は β-ラクタマーゼを産生していたが, TSST-1, エンテロトキシン, コアグラーゼは陰性であった. PVL 遺伝子およびヘテロ VISA はいずれの株からも検出されなかった.

3. 電子顕微鏡による形態観察

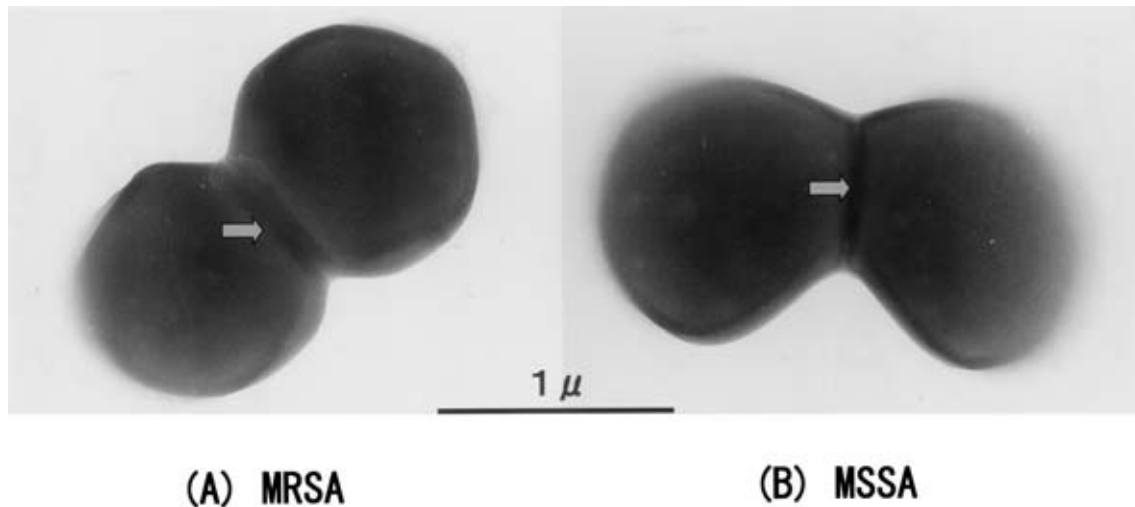
本事例の MRSA と食中毒事例から分離された MSSA の細胞壁を電子顕微鏡で比較した結果を Fig. 2 に示した. 矢印で示した隔壁部分の厚さを測定したところ, MRSA が 57nm, MSSA が 28nm であり MRSA の細胞壁は MSSA のおよそ 2 倍であった.

考 察

院内感染を引き起こしている MRSA には, 数年にわたり主流となって流行を繰り返す株と遺伝的に多様性を示す株が混在しており, 市中感染型の MRSA や医療従事者から分離された MRSA と入院患者から分離された株と遺伝学的に一致したという報告があ

る⁷⁻¹⁰⁾. したがって, 院内感染の感染経路は複雑であることが推測され, 細菌学的性状試験や PFGE 解析を行うことは感染経路を推定するための有力な手段であると考えられる. 当病院で通常分離されている MRSA の VCM と TEIC に対する MIC は各々 0.5µg/mL 以下であるが, 今回分離された MRSA の MIC は 2µg/mL (VCM) および 16µg/mL (TEIC) であり, 通常とは明らかに異なっていた. MRSA 分離例においては, 感染症の原因菌が単なるコロニゼーションかしばしば問題になる. MRSA が分離された 6 名の患者のうち, 主治医により 4 名が本菌による感染症と診断された. しかし, いずれの株も院内感染型 MRSA のリスクファクターであるカテーテル留置や長期入院患者の喀痰等から分離されている. また, PFGE 解析と薬剤感受性試験の結果から, 一定期間に複数の患者から同一の株が分離されていることや, いずれの株も入院後 48 時間以降に分離されていることなどから, 本事例は同一の MRSA による院内感染であった可能性が高い. 一方, 通常分離されている MRSE の VCM と TEIC に対する MIC は 2µg/mL (VCM) および 8µg/mL (TEIC) であるが, この期間中に VCM と TEIC に対して MRSA と同様の MIC を示す 2 株の MRSE が分離されたため, この株についても同時に

Fig. 2 Electron micrography of MRSA and MSSA with transmission electron microscope. Bar: 1 μ m. Magnification: $\times 30,000$ (negative stain). Arrows indicate cell walls of (A) MRSA and (B) MSSA



解析した。その結果、2株の PFGE パターンおよび薬剤感受性パターンは異なっており、患者自身がそれぞれ保菌していた株であったことが推測された。MRSA に関する CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; 旧 NCCLS) の判定基準によれば、VCM に対して 2 μ g/mL 以下は感受性、4~8 μ g/mL を VISA、16 μ g/mL 以上を VRSA としている。また、TEIC に対しては、8 μ g/mL 以下は感受性、16 μ g/mL を中等度耐性、32 μ g/mL 以上を耐性としている。今回分離された MRSA の VCM と TEIC に対する MIC は、それぞれ 2 μ g/mL、16 μ g/mL であり TEIC 中等度耐性であった。したがって、本事例はグリコペプチド系薬剤に対して低感受性を示す多剤耐性 MRSA による院内感染であったと考えられた。

VCM 耐性腸球菌 (VRE) がプラスミド上に保有している *vanA*, *vanB* 遺伝子が MRSA に伝達された VRSA が出現する可能性が指摘されている^{2(11)~13)}。*mecA* 遺伝子および *vanA*, *vanB* 遺伝子等の検索を行った結果、*mecA* 遺伝子は 8 株すべてから検出されたが、*van* 遺伝子はいずれも検出されなかった。細菌学的性状については 6 株の MRSA すべて TSST-1 陽性であり、エンテロトキシン型は Type C であった。また、コアグラーゼ型は type II であったが、 β -ラクタマーゼの産生は認められなかった。一方、MRSE 2 株は β -ラクタマーゼを産生していたが、TSST-1、エンテロトキシン、コアグラーゼは陰性であった。PVL 遺伝子はすべての株で検出されず、強毒株ではないと考えられた。また、ヘテロ VISA の検索を行ったが、いずれの株からもバンコマイシン耐性株は検出されなかった。

Hiramatsu らは、細胞壁の肥厚により VCM に中等度耐性を示す Mu50 株 (MIC 8 μ g/mL) とヘテロ耐性

株 Mu3 株 (MIC 3 μ g/mL) を報告している¹⁴⁾¹⁵⁾。また、米国イリノイ州において約 8 カ月間 VCM を投与され続けた 63 歳の人工透析患者から VISA が分離されている¹⁶⁾。VISA は外来性の耐性遺伝子を獲得せず、低濃度の VCM に順応した株が選択されて分離されることが推測されている。VRE における VCM の耐性機構は、ペプチドグリカン単体のペンタペプチド鎖の 5 番目の D-alanine が、セリンまたは乳酸に置換することによる。人為的に長期間 VCM に暴露して作成した高度耐性株においてペプチドグリカンの合成および分解過程に何らかの変化が起きていることや、TEIC 耐性 MRSA は PBP2 を過剰に産生するという報告がある¹⁷⁾¹⁸⁾。さらに、Maki らは *tcaA* 遺伝子の変異が *S. aureus* のグリコペプチド系薬剤に対する耐性を上昇させること報告している¹⁹⁾。しかし TEIC の耐性機構には未だに不明な点が多い。本事例の MRSA と食中毒事例から分離された感受性株の細胞壁を電子顕微鏡で比較したところ、MRSA の細胞壁の肥厚が観察された。グリコペプチド系薬剤は他の抗生物質に比べ分子量が大きいという特徴があり、その耐性機構のひとつとして細胞壁にトラップされることが推測される。グリコペプチド系薬剤に対する耐性菌は、VCM または TEIC 長期治療の過程で出現することが指摘されており、今後も監視が必要であると考えられた。

謝辞：本研究を遂行するに当たり分離菌株および患者情報を頂いた病院検査課の皆様へ深謝いたします。

文 献

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997—1999. Morbidity and Mortality Weekly Report 1999; 48: 707—10.

- 2) Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, *et al.* : Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003 ; 302 : 1569—71.
- 3) Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH : Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 1768—72.
- 4) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P : Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 24—7.
- 5) Battouli Said-Salim, Barum Mathema, Kevin Braughton, Stacy Davis, Daniel Sinsimer, William Eisner, *et al.* : Differential distribution and expression of panton-valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 3373—9.
- 6) 山口禎夫, 花木秀明, 茨田一成, 稲松孝思, 砂川慶介 : バンコマイシンと β -lactam 薬が拮抗する MRSA の疫学調査. *感染症誌* 2003 ; 77 : 661—7.
- 7) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J : Genomic DNA Fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 2690—5.
- 8) 北元憲利, 加藤陽二, 甘庶志帆乃, 片井敦雄, 田中智之 : パルスフィールド核酸電気泳動法によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学調査. *感染症誌* 2005 ; 79 : 129—37.
- 9) 中村文子, 小栗豊子, 三澤成毅, 三宅紀子, 猪狩 淳 : teicoplanin, arbekacin, mupirocin 耐性 MRSA の薬剤感受性と PFGE 型. *感染症誌* 2002 ; 77 : 68—74.
- 10) O'Brein FG, Pearman JW, Gracy M, Riley TV, Grubb WB : Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 2858—62.
- 11) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2002 ; 51 : 565—7.
- 12) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*—pennsylvania. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2002 ; 51 : 902.
- 13) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—New York, 2004 : *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2004 ; 53 : 322—3.
- 14) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997 ; 40 : 135—6.
- 15) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, *et al.* : Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to Vancomycin. *Lancet* 1997 ; 350 : 1670—3.
- 16) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—Illinois, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2000 ; 48 : 1165—7.
- 17) Sieradzki K, Tomasz A : Inhibition of Cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997 ; 179 : 2557—66.
- 18) Shlaes DM, Shlaes JH, Vincent S, Etter L, Fey PD, Goering RV : Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 ; 37 : 2432—7.
- 19) Maki H, McCallum N, Bishoff M, Wada A, Berger-Bachi B : tcaA inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; 48 : 1953—9.

Nosocomial Infection Caused by Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin and Teicoplanin. —Yamagata prefecture, Japan ; May 2004—Jun 2005—

Toshio MURATA¹⁾ & Katsumi OTANI²⁾

¹⁾Department of Pharmacy, Yamagata Prefectural Shinjo Hospital,

²⁾Department of Microbiology, Yamagata Prefectural Institute of Public Health

Nosocomial infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) occurred at a major in Yamagata prefecture hospital between May 2004 and June 2005. We studied pulsed-field gel electrophoresis patterns, antimicrobial susceptibility patterns, and bacteriological features, such as coagulase type for eight isolates, including two of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Our results suggest that this case was caused by a single strain of multidrug-resistant *S. aureus*. These 8 clinical isolates indicated reduced susceptibility to vancomycin and teicoplanin. PCR assay results for detection of the staphylococcal *vanA*, *vanB*, and *vanC* gene were all negative as all isolates. In transmission electron microscopy, cell walls appeared thicker than those of a susceptible strain from food poisoning. MRSA with reduced susceptibility to glycopeptide antibiotics may not be treated successfully with vancomycin or teicoplanin, making it important to closely observe MRSA with reduced susceptibility to glycopeptide antibiotics.