

## —症例報告—

Enzymatic detection of polymerase chain reaction による遺伝子検索が  
早期診断に有用であった術後 MRSA 腸炎の 1 例

花谷 勇治<sup>1)</sup>・蓮見 直彦<sup>1)</sup>・浅越 辰男<sup>1)</sup>・三 吉 博<sup>1)</sup>  
大塚 美幸<sup>1)</sup>・関 根 勝<sup>1)</sup>・高見 博<sup>1)</sup>・小平 進<sup>1)</sup>  
川上小夜子<sup>2)</sup>・生方 公子<sup>3)</sup>・紺野 昌俊<sup>3)</sup>

帝京大学医学部第一外科<sup>1)</sup>、中検<sup>2)</sup>、臨床病理<sup>3)</sup>

(平成 4 年 5 月 7 日受付・平成 4 年 6 月 24 日受理)

Enzymatic detection of polymerase chain reaction (ED-PCR) による遺伝子検索が早期診断に有用であった methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による術後感染性腸炎を経験したので報告する。症例は 40 歳の男性で、食道異物(義歯)を観血的に摘出した。術後 2 日目より 38°C 台の発熱を認め、術後 4 日目より頻回の水様下痢が発来した。下痢便中の *Clostridium difficile* toxin は陰性で、鏡検ではグラム陽性球菌が多数認められた。下痢便上清を用いて ED-PCR による遺伝子検索を行った結果、*mecA* 遺伝子、*tst* 遺伝子がともに陽性で、toxic shock syndrome toxin (TSST)-1 産生性の MRSA と診断した。Vancomycin, ofloxacin および minocycline 併用治療を開始したところ、翌日には下痢が止まり解熱を認めた。MRSA の診断は従来の培養方法では少なくとも 48 時間を要するが、ED-PCR によれば 3 時間で診断が可能であり、その臨床的意義は大きいと考えられた。

**Key words:** MRSA, ED-PCR, 早期診断, 感染性腸炎, 術後感染症

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による感染性腸炎は胃切除術をはじめとする消化管手術後に好発し、コレラ様の激しい下痢をきたすことで知られている。早期に適切な治療を行えば症状の改善が得られるが、診断が遅れると急速に多臓器障害(ショック, 急性腎不全, 呼吸不全, 播種性血液内凝固症候群など)に陥り、死亡例もまれではない<sup>1,2)</sup>。我々は enzymatic detection of polymerase chain reaction (ED-PCR) による *mecA* 遺伝子と *tst* 遺伝子の検索<sup>3,4)</sup> が早期診断に有用であった MRSA 腸炎の 1 例を経験したので報告する。

Methicillin 耐性の本態である penicillin-binding protein (PBP) 2' をコードしている *mecA* 遺伝子と toxic shock syndrome toxin (TSST)-1 をコードしている *tst* 遺伝子の検索は、PCR によりそれぞれの遺伝子の一部を増幅した後、酵素抗体法を応用して検出した。

検体採取から判定までの手技はすでに述べた通りである<sup>1)</sup>。すなわち、下痢便あるいは血液培養液を 1,500 rpm で 3 分間遠心し、その上清を採取した。上清はさらに 10,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた沈渣を菌液とした。

溶菌操作の後 biotin と dinitrophenyl (DNP) で標識した一対の primer および Tth polymerase を添加し、PCR を 30 サイクル行った。PCR 産物を streptavidin を固定化したマイクロプレートに注入し、さらにアルカリフォスファターゼ標識抗 DNP 抗体を添加した。洗浄用 buffer で 3 回洗浄後発色基質液と反応させ、405 nm における吸光度を読み取った。吸光度 0.20 以上(肉眼的に黄色を呈する)を陽性と判定した。以上の手技は約 3 時間ですべて完了した。

## I. 症 例

患者: 40 歳, 男性。

主訴: 咽頭痛。

既往歴: 会社の検診で高血圧を指摘されたが放置していた。

家族歴: 特記することなし。

現病歴: 1991 年 11 月 21 日起床時に咽頭痛があり、義歯の欠落に気付いた。近医にて食道異物と診断され、当院耳鼻科を紹介された。全身麻酔下での内視鏡的摘出が不能のため外科転科となった。

\* 東京都板橋区加賀 2-11-1

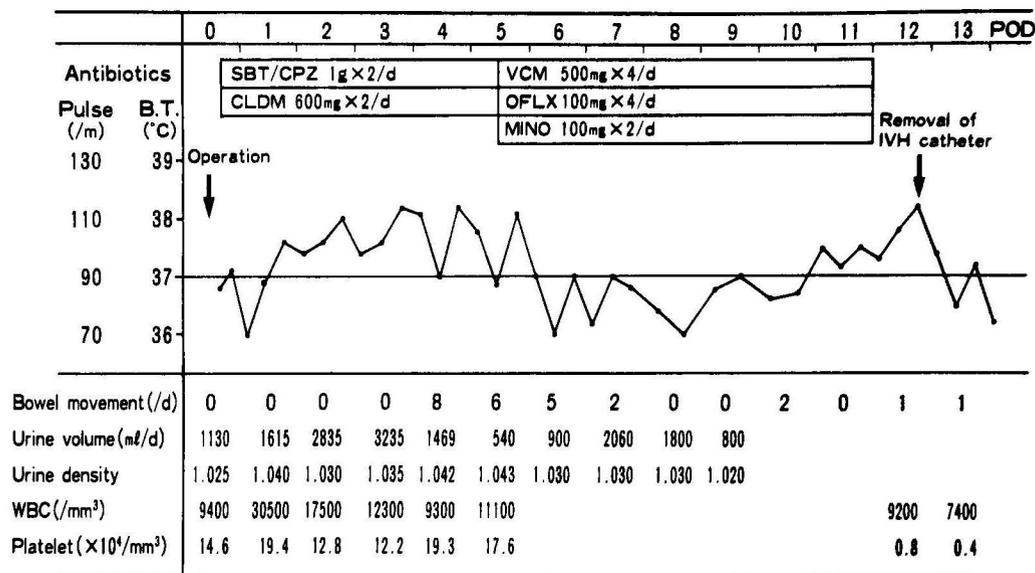


Fig. 1. Clinical course of the patient (male, 40 y.o.).

SBT/CPZ, sulbactam/cefoperazone; CLDM, clindamycin; VCM, vancomycin; OFLX, ofloxacin; MINO, minocycline

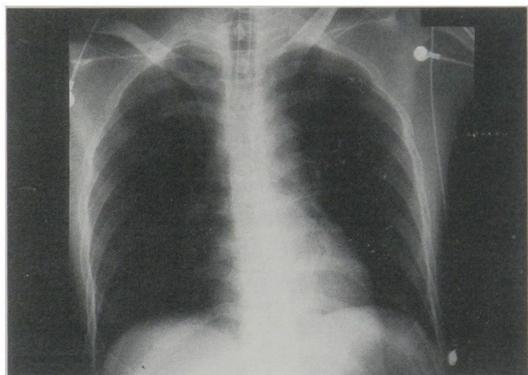


Fig. 2. Chest X-ray photo on transfer shows the foreign body at the tracheal bifurcation.

転科後経過 (Fig. 1): 胸部単純 X 線像にて気管分岐部付近に異物を認めため (Fig. 2), 右開胸下に食道を切開し異物を摘出した。術野の汚染を認めため、術後感染予防の目的で sulbactam/cefoperazone 2g×2/日および clindamycin 600mg×2/日を投与した。

術後 2 日目より 38°C 台の発熱を認め、術後 4 日目より茶褐色の水様下痢 (8 回/日) が発来した。腹部は膨隆し、腹部単純 X 線像では小腸ガスの増加を認



Fig. 3. Abdominal X-ray photo on the 4th POD shows an increase in small intestinal gas.

めたが (Fig. 3), 腸雑音はむしろ減弱しており、炎症による腸管麻痺と判断した。患者は一時的に高比重尿 (1.043) を呈したが、輸液量の増加により頻脈や血圧低下は認めなかった。翌術後 5 日目も水様下痢が

Table 1. Results of bacteriological examination

a) Detection of *mecA* and *tst* gene by ED-PCR

| No | Material    | Date  | <i>mecA</i>             | <i>tst</i> |
|----|-------------|-------|-------------------------|------------|
| 1. | stool       | 11.26 | + (0.787)* <sup>1</sup> | + (0.468)  |
| 2. | blood (A)** | 12.3  | + (1.568)               | - (0.005)  |
| 3. | blood (N)** | 12.3  | + (1.475)               | + (1.081)  |

\*<sup>1</sup> positive; O.D.>0.20, \*\* aerobic culture bottle, \*\* anaerobic culture bottle

## b) MICs of isolated organisms (autoSCAN 4)

| No | Species               | PCG | MPIPC | CEZ | CMZ | CTM | GM | EM | FOM | CLDM | OFLX |
|----|-----------------------|-----|-------|-----|-----|-----|----|----|-----|------|------|
| 1. | <i>S. aureus</i>      | 8   | >8    | >16 | >16 | >16 | >8 | >4 | >16 | >2   | >8   |
| 2. | <i>S. epidermidis</i> | >8  | >8    | >16 | >16 | >16 | >8 | >4 | >16 | >2   | <1   |
| 3. | <i>S. aureus</i>      | 8   | >8    | >16 | >16 | >16 | >8 | >4 | >16 | >2   | >8   |

( $\mu\text{g/ml}$ )

PCG, benzylpenicillin; MPIPC, oxacillin; CEZ, cefazolin; CMZ, cefmetazole; CTM, cefotiam; GM, gentamicin; EM, erythromycin; FOM, fosfomycin; CLDM, clindamycin; OFLX, ofloxacin.

続き (6 回/日), 下痢便の色調が緑色に変化した。過去の経験より MRSA 腸炎を疑い, 下痢便を細菌検査に提出するとともに患者を隔離した。

下痢便中の *Clostridium difficile* toxin は陰性で, 鏡検ではグラム陽性球菌が多数認められた。下痢便上清を直接使い, ED-PCR による遺伝子検索を行ったところ, *mecA* 遺伝子, *tst* 遺伝子がともに陽性で, 下痢便中に TSST-1 産生性の MRSA が存在することが確認された (Table 1)。

ただちに vancomycin (VCM, 500 mg $\times$ 4/日) および ofloxacin (OFLX, 100 mg $\times$ 4/日) の内服, minocycline (MINO, 100 mg $\times$ 2/日) の点滴静注を開始したところ, 翌日には下痢が止まり解熱を認めた。

後日検査室より報告された薬剤感受性試験成績では oxacillin (MPIPC) に対する MIC は 8  $\mu\text{g/ml}$  以上であり, MRSA と判定された。

その後, 術後 12 日目に *Staphylococcus epidermidis* および MRSA によるカテーテル菌血症を認めたが, カテーテル抜去により速やかに解熱した。この際, 血液培養からの検出菌についても ED-PCR による遺伝子検索を行った (Table 1)。好気性培養用ボトル中の菌は *mecA* 遺伝子陽性, *tst* 遺伝子陰性であったのに対し, 嫌気性培養用ボトル中の菌は *mecA* 遺伝子, *tst* 遺伝子がともに陽性であった。後日の報告では前者は *S. epidermidis*, 後者は MRSA と同定された。

また, 薬剤性と思われる血小板減少症 (最低

1,000/mm<sup>3</sup>) をきたし, 一過性の鼻出血を認めたが, すべての薬剤の投与を中止したところ徐々に回復し, 術後 35 日目に軽快退院した。

## II. 考 察

MRSA 感染症の早期診断は, 適切な治療を早期より開始できるばかりでなく, 患者隔離を含めた交差感染予防対策にとっても有用と思われる。従来の培養検査では診断確定までに少なくとも 48 時間を要したが, ED-PCR による遺伝子検索によれば 3 時間で診断が可能であり, その臨床的意義は大きいと考えられる。

今回遺伝子検索に用いた ED-PCR は, ラジオアイソトープを使用せず, しかも操作が簡略であることから, 検査室レベルでの応用が期待されている<sup>3,4)</sup>。また, *mecA* 遺伝子のみの検索では *S. epidermidis* との鑑別が問題となるが, *tst* 遺伝子が同時に陽性であれば TSST-1 産生性の MRSA と確定できるので, 両遺伝子を同時に検索することは有用と考えられる。

しかしながら, いかに検査法が優れていても, 臨床医が適確に検査のための材料を提供しなければ早期診断は不可能である。当科における最近 4 年間の消化器術後感染症を調査した結果, MRSA は 70 歳以上の高齢者, 性別は男性, 基礎疾患が悪性, 併存症 (肝硬変症, 糖尿病, 膠原病, 呼吸器疾患) を有する症例から有意に高率に検出された。また, 感染症別では腸炎, 腹腔内感染症, 呼吸器感染症の MRSA 検出率は有意に高率であった<sup>5)</sup>。したがって, このような場合には MRSA が関与していると積極的に疑うべきと考えら

れた。

VCMは欧米ではMRSAに対する第一選択薬剤であり、現時点では耐性株はないとされている<sup>6)</sup>。VCMは経口投与では腸管からほとんど吸収されず、全身的副作用の発現の恐れはない。しかも、*C. difficile*による偽膜性腸炎にも有効であり、術後感染性腸炎を疑った症例に対し経口（腸管内）投与するのに適した薬剤であると考えられた。なお、病態が進展するとMRSAは腸管から血中へtranslocationするとされているので、全身的な化学療法も必要と考えられる。我々はVCMの経口投与にOFLX（経口）およびMINO（点滴静注）を併用している。しかし、MRSAのMINOおよびOFLXに対する耐性化はかなり進んでおり<sup>6)</sup>、今後はVCMの点滴静注の併用も考慮すべきであろう。

術後MRSA腸炎の全国アンケート調査によれば、発症前に投与していた薬剤のほとんどが第2・第3世代セフェムであったという<sup>1,2)</sup>。これらの薬剤はPBP-2'誘導能が高く、高度耐性のMRSAを招来するばかりでなく、常在細菌叢を強く抑制するためMRSA感染症の発生を助長すると考えられている<sup>7)</sup>。

本症例も術後に第3世代セフェムを投与しており、MRSA腸炎を誘発した可能性があると反省させられた。本症の発生を減少させるためには交差感染予防対

策とともに、術後に使用する抗生物質に対する配慮も不可欠と考えられる。

#### 文 献

- 1) 保里恵一, 由良二郎, 品川長夫, 桜井 敏, 真下啓二, 水野 章: 術後感染性腸炎, 特にMRSA腸炎の実態, 全国アンケート調査結果を中心に。感染症誌 63: 701~707, 1989
- 2) 岩井重富, 田中日出和, 阿久津昌久: 外科でのMRSAの感染症の実態。外科 53: 1008~1017, 1991
- 3) 生方公子, 紺野昌俊: Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いたメチシリン耐性ブドウ球菌の迅速判定を中心にして。臨床と微生物 19: 141~148, 1992
- 4) Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M: Rapid detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococci* by ED-PCR. J. Clin. Microb. : in press
- 5) 花谷勇治, 蓮見直彦, 浅越辰雄, 高見 博, 四方淳一: 消化器術後MRSA感染症とその臨床的背景因子の検討。環境感染 7: 9~13, 1992
- 6) 松本慶蔵, 高橋 淳, 穴戸晴美, 渡辺貴和雄, 力富直人, 鈴木 寛, 吉田俊昭: 本邦における病原性の明確な黄色ブドウ球菌—4年間の薬剤感受性とcoagulase型別の変化—。Chemotherapy 37: 549~562, 1989
- 7) 生方公子: MRSAの疫学的特徴とその耐性のメカニズム。最新医学 44: 2499~2509, 1989

A case report of postoperative MRSA enterocolitis: Enzymatic detection of polymerase chain reaction for early diagnosis of MRSA

Yuji Hanatani\*<sup>1</sup>, Tadahiko Hasumi\*<sup>1</sup>, Tatsuo Asagoe\*<sup>1</sup>, Hiroshi Miyoshi\*<sup>1</sup>, Miyuki Otsuka\*<sup>1</sup>, Masaru Sekine\*<sup>1</sup>, Hiroshi Takami\*<sup>1</sup>, Susumu Kodaira\*<sup>1</sup>, Sayoko Kawakami\*<sup>2</sup>, Kimiko Ubukata\*<sup>3</sup> and Masatoshi Konno\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> First Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

\*<sup>2</sup> Central Laboratory of Teikyo University Hospital

\*<sup>3</sup> Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine

We experienced a case of postoperative infectious enterocolitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Genetic analysis by enzymatic detection of polymerase chain reaction (ED-PCR) was useful for the early diagnosis of MRSA. A 40-year-old man was operated on for esophageal foreign body (an artificial tooth). He became feverish from the 2<sup>nd</sup> postoperative day, and frequently discharged watery diarrhea from the 4<sup>th</sup> postoperative day. The feces was negative for *Clostridium difficile* toxin, and numerous gram positive cocci were recognized. As a result of genetic analysis by ED-PCR, *mecA* and *tst* gene were both positive in the supernatant of stool. The patient, was diagnosed as having enterocolitis caused by toxic shock syndrome toxin (TSST)-1 producing MRSA. Diarrhea stopped and he became afebrile following combination chemotherapy with vancomycin (500 mg×4/day, p.o.), ofloxacin (100 mg×4/day, p.o.) and minocycline (100 mg×2/day, d.i.). Although it takes more than 48 hours to diagnose MRSA by the usual culture method, only 3 hours was required for the diagnosis of MRSA by ED-PCR.