

【原著・基礎】

MRSA 臨床分離菌株の vancomycin 感受性に関する検討

志関 雅幸・松井 由香・菊池 賢・戸塚 恭一

東京女子医科大学病院中央検査部感染対策科*

(平成 11 年 2 月 26 日受付・平成 11 年 4 月 19 日受理)

Vancomycin (VCM) は, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症に有効な数少ない抗菌薬として重要であるが, 近年, 臨床分離 MRSA 菌株中に VCM hetero resistant MRSA の存在が示され, その臨床上の意義が論じられている。そこで, 当院入院患者から分離された MRSA の VCM 感受性について, MIC 測定および population 解析による検討を行った。使用した菌株は 1996 年 8 月から 97 年 5 月の 10 か月間に分離された MRSA 80 菌株 (MRSA-A 群), MRSA 感染症に対して VCM の点滴静注による全身投与が可能となる以前の 1990 年の 1 年間に分離された MRSA 16 菌株 (MRSA-B 群), および 1996 年 8 月から 97 年 5 月の 10 か月間に分離された methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) 20 菌株 (MSSA 群) の合計 116 菌株である。MRSA 96 菌株に対する VCM の MIC は, 全菌株で 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であった。MRSA-A 群の菌株は MRSA-B 群の菌株に比べて MIC が高い値に分布する傾向を認め, VCM に対する感受性低下の可能性が示唆された。VCM 感受性に関する population 解析では, 4 ないし 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の VCM を含有する Mueller-Hinton 寒天培地上に, MRSA-A 群では, 80 菌株中それぞれ 71 菌株 (88.8%) および 12 菌株 (15%), MRSA-B 群では, 16 菌株中それぞれ 15 菌株 (93.8%) および 4 菌株 (25%), MSSA 群では, 20 菌株中それぞれ, 19 菌株 (95%) および 6 菌株 (30%) でコロニー形成を認めた。3 群とも MIC 以上の濃度の VCM 存在下で発育しうるサブクローンを含む菌株が存在することが示されたが, MRSA-A 群では形成されるコロニー数がより多い傾向があり, VCM に対する感受性低下の可能性が示唆された。

Key words: vancomycin, MRSA, population 解析

Vancomycin (VCM) は, 1991 年に点滴静注による全身投与が可能となって以来, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症の治療薬として使用されている。しかし, 一方で時として, 安易に使用される傾向があることは否めない。VCM は MRSA 感染症に有効な数少ない抗菌薬の 1 つであり, VCM 耐性菌の出現は大きな脅威である。欧米では, 1980 年代後半から VCM 耐性腸球菌 (VRE) が出現し, 院内感染の起炎菌として特に免疫能低下患者に難治性感染症を惹起し, 大きな問題となっている¹⁻³⁾。VRE の出現は VCM の使用頻度の増加と関連することが示唆されている。ブドウ球菌属においては, VCM および同じグリコペプチド系抗菌薬である teicoplanin に対する感受性の低下した coagulase-negative staphylococci (CNS) 臨床分離菌株が報告されている^{4,5)}。さらに *in vitro* の系においては, VCM による選択の結果 VCM 耐性の CNS さらには *S. aureus* の変異株が得られることが示されている⁶⁻⁸⁾。以上のような報告をもとに VCM 耐性 MRSA 臨床分離菌株出現の可能性が論じられてきたが, 最近, VCM の MIC が 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の臨床分離 MRSA 菌株, および population 解析法により検出される VCM hetero-resistant MRSA の存在が報告され注目されている^{9,10)}。今回, 当院入院患者由来の臨床分離 MRSA 菌

株の VCM に対する感受性を調べることを目的に, 1996 年 8 月から 1997 年 5 月の 10 か月間に分離された MRSA 菌株について VCM の MIC 測定および population 解析を行った。また, VCM の点滴静注による全身投与が可能となる以前に分離された MRSA 菌株, および methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) についても同様の解析を行い比較検討した。

I. 材料と方法

1. 菌株

当院入院患者 116 名から分離された MRSA および MSSA 菌株合計 116 菌株を検討に用いた。その内訳は, 1) 1996 年 8 月から 1997 年 5 月の 10 か月間に 80 名の患者から分離された MRSA 80 菌株 (MRSA-A 群), 2) MRSA 感染症に対して VCM の全身投与が可能となる以前の 1990 年 1 年間に 16 名の入院患者から分離された MRSA 16 菌株 (MRSA-B 群), 3) 1996 年 8 月から 1997 年 5 月の間に 20 名の入院患者から分離された MSSA 20 菌株 (MSSA 群) である。それぞれの菌株は解析までの間, 10% スキムミルクおよび 10% グリセロールを含有する菌株保存液中に懸濁し, -80°C で保存した。

2. MIC

MRSA 96 菌株に対する VCM の MIC を Etest (AB BIODISK, Sweden) によって測定した。測定は添付文書に従って行った。各菌株を Mueller-Hinton (MH) 寒天培地 (Difco) 上に接種し 37°C で培養した。16 時間後に形成されたコロニーを生理的食塩水中に懸濁し、0.5 McFarland となるよう調整した。調整した菌懸濁液を綿棒で MH 寒天培地上に接種した後、strip を寒天培地上に静置し、35°C で培養した。18 時間後に増殖阻止帯を目視で観察し MIC の判定を行った。MRSA-A 群、MRSA-B 群両群菌株の MIC 分布の差について、Mann-Whitney test により統計学的検定を行った。

3. population 解析

各菌株を MH 寒天培地上に接種し 37°C で培養した。形成された各菌株のコロニーを MH 液体培地 (Difco) 中に懸濁して、37°C で 16 時間培養し、約 1×10^8 CFU/ml の濃度の菌懸濁液を調整した。

3 つの群のそれぞれ 3 菌株 (MRSA-A 群の TJ-Ku, TJ-32, TJ-62, MRSA-B 群の TJ-102, TJ-106, TJ-116, および MSSA 群の TJ-201, TJ-204, TJ-206), 計 9 菌株について、菌懸濁液を段階希釈して 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ g/ml の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上に塗布し、37°C で 48 時間培養した。培地上に形成されたコロニー数をカウントし、VCM 濃度と形成されたコロニー数の関連を示す population curve を描いた。

残りの菌株については約 1×10^8 CFU/ml に調整した菌懸濁液 100 μ l を段階希釈は行わず各濃度の VCM を含有する MH 寒天培地に塗布し、48 時間培養後に培地上に形成されたコロニー数をカウントした。

II. 結 果

1. MIC

MRSA 96 菌株に対する VCM の MIC は、1 μ g/ml から 3 μ g/ml の間に分布した (Fig. 1)。1.5 あるいは 2 μ g

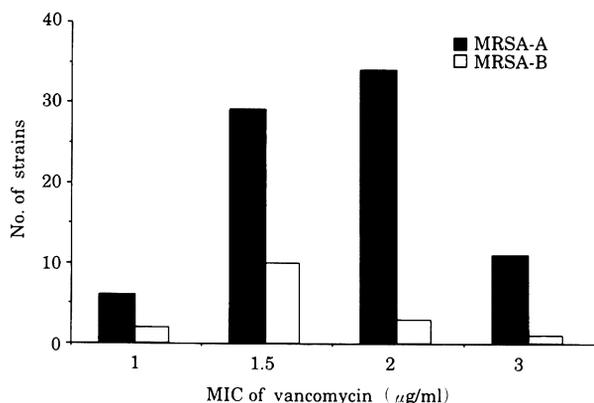


Fig. 1. Distribution of the MICs of vancomycin for the 96 MRSA strains.

/ml の MIC を示す株が多数を占め、96 菌株中 76 菌株 (79.2%) がこの中に含まれた。3 μ g/ml の MIC を示す菌株は 12 菌株 (12.5%) あった。MRSA-A 群と MRSA-B 群の MIC 分布を比較してみると前者は 1.5 μ g/ml を示す菌株が 80 菌株中 34 菌株 (42.5%) ともっとも多く、後者は 1 μ g/ml を示す菌株が 16 菌株中 10 菌株 (62.5%) ともっとも多かった。また、3 μ g/ml を示す菌株は、前者で 11 菌株 (13.8%) あったのに対し、後者は 1 菌株 (6.3%) であった。MRSA-A 群の菌株の MIC は MRSA-B 群の菌株と比較して高い値に分布する傾向が認められたが、統計学的には有意な差は認められなかった (P value = 0.058)。

2. population 解析

MRSA-A 群の 3 菌株 (TJ-Ku, TJ-32, TJ-62), MRSA-B 群の 3 菌株 (TJ-102, TJ-106, TJ-116) および MSSA 群の 3 菌株 (TJ-201, TJ-204, TJ-206) の population curve を示す (Fig. 2)。各 MRSA 菌株に対する VCM の MIC は MRSA-A 群の TJ-Ku が 2 μ g/ml, TJ-32 が 2 μ g/ml, TJ-62 が 1.5 μ g/ml, MRSA-B 群の TJ-102 が 2 μ g/ml, TJ-106 が 2 μ g/ml, TJ-116 が 1.5 μ g/ml, MSSA 群の TJ-201 が 1 μ g/ml, TJ-204 が 1.5 μ g/ml, TJ-206 が 1.5 μ g/ml であった。3 μ g/ml 以上の MIC を示すものはなかったが、9 菌株中 8 菌株で、4 μ g/ml の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上に、 1×10^4 から 1×10^8 CFU のコロニー形成を認めた。8 μ g/ml の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上では 1 菌株 (TJ-Ku) のみでコロニー形成を認めた。

その他の菌株を含めた MRSA-A 群 80 菌株, MRSA-B 群 16 菌株, MSSA 群 20 菌株について、簡略法として、各濃度の VCM をそれぞれ含有する MH 寒天培地上に 1×10^8 CFU/ml の濃度の菌懸濁液を 100 μ l 塗布した。2 μ g/ml 以下の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上にはすべての菌株でコロニーの形成を認めた。また 16 μ g/ml 以上の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上にコロニーを形成した菌株は存在しなかった。4 ないし 8 μ g/ml の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上には、MRSA-A 群の 80 菌株中それぞれ 71 菌株 (88.8%) および 12 菌株 (15%), MRSA-B 群の 16 菌株中それぞれ 15 菌株 (93.8%) および 4 菌株 (25%), MSSA 群の 20 菌株中それぞれ、19 菌株 (95%) および 6 菌株 (30%) でコロニー形成を認めた。各群の菌株に関して、4 ないし 8 μ g/ml の濃度の VCM を含有する MH 寒天培地上にコロニーを形成する菌株数と形成されたコロニー数を Fig. 3 に示す。4 μ g/ml の VCM を含有する MH 寒天培地上に、MSSA 群では 41 個以上のコロニーを形成した菌株は存在しなかったのに対して、MRSA-A および-B 群では 100 個以上のコロニー形成を認める菌株がそれぞれ 12 菌株 (15%) および 1 菌株 (6.3%) 存在した。

III. 考 察

近年、VCM 耐性 MRSA 出現の可能性が論じられていたが、1997 年に Hiramatsu らは MIC が $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の臨床分離 MRSA 菌株が存在すること、また population 解析の結果 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の VCM を含有する寒天培地上に 10^{-6} の頻度でコロニーを形成しうる hetero-resistant VRSA が存在することを報告している^{9,10}。そこで、当院入院患者臨床分離 MRSA 菌株の VCM 感受性について、MIC 測定および population 解析を行った。

今回検討を行った MRSA 菌株中に VCM の MIC が $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるいわゆる VCM 耐性 MRSA (VRSA) は認められなかった。MRSA-A 群の 80 菌株は MRSA-B 群の 16 菌株と比較して統計学的な有意差はないものの、高い MIC を示す傾向が認められた。両群の間で、分離された症例の臨床的背景の相違等が存在する可能性はあるが、近年、臨床検体から分離される MRSA の VCM に対する感受性の低下を示唆している可能性は考

えられた。

population 解析の結果では、MRSA-A 群の 80 菌株の中で、VCM の MIC が $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の菌株は認められなかったにもかかわらず、4 ないし $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の VCM を含有する MH 寒天培地上にコロニーの形成を認める菌株がそれぞれ 71 菌株 (88.8%) および 12 菌株 (15%) あった。各菌株の population 中に MIC 以上の濃度の VCM 存在下で増殖しうるサブクローンが存在することが示唆された。

一方、MRSA-B 群の 16 菌株および MSSA 群の 20 菌株に関する population 解析から、4 ないし $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の VCM の存在下でも MH 寒天培地上にコロニーを形成しうる菌株は、VCM の点滴静注による全身投与がまだ可能となっていなかった 1990 年に分離された MRSA 菌株、さらに MSSA 菌株にも存在しており、必ずしも最近分離された MRSA 菌株に特異的な現象ではない可能性が示唆された。しかし、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の VCM を含有す

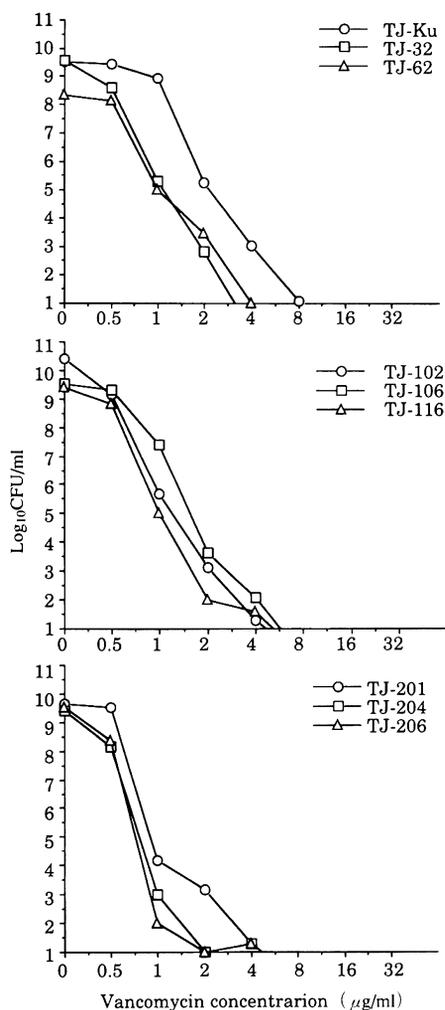


Fig. 2. Population analysis of nine strains in increasing concentration of vancomycin.

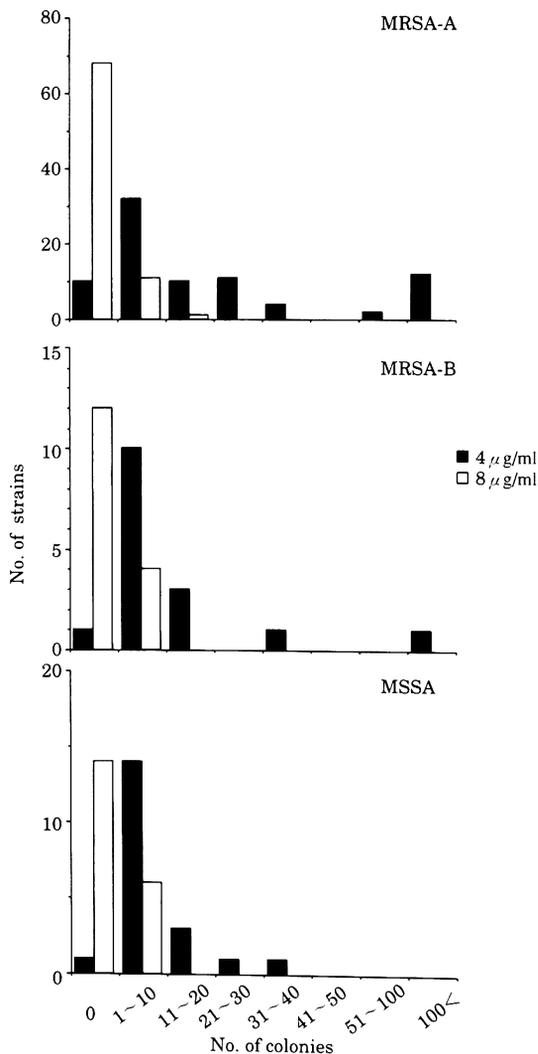


Fig. 3. Number of strains that form colonies on the agar plates containing 4 or $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ of vancomycin.

る MH 寒天培地上に形成されるコロニー数は MRSA-A 群の菌株でより多い傾向が認められ、VCM に対する感受性低下を示唆している可能性は考えられた。

population 中に存在する 4 ないし 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の VCM の存在下でも発育しうるクローンの臨床的な意義についてはまだ明らかではないが、VCM の効果が十分に得られない難治性 MRSA 感染症との関連が注目される。難治性 MRSA 感染症において VCM の効果が十分に得られない理由として、起炎菌株の VCM に対する感受性の他、VCM の組織移行性、宿主の防御能など多くの要因の関与が考えられる。今後、難治性 MRSA 感染症患者からの分離株に関して同様な検討を行うことにより次第にその意義が明らかになるとと思われる。

文 献

- 1) Uttley A H, Collins C H, Naidoo J, et al.: Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1: 57~58, 1988
- 2) Kalanfil L V, Murphy M, Josephson A, et al.: A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.* 13: 195~200, 1992
- 3) Handwerker S, Raucher B, Altarac D, et al.: Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. *Clin. Infect. Dis.* 16: 750~755, 1993
- 4) Schwalbe R S, Stapleton J T, Gilligan P H: Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.* 316: 927~931, 1987
- 5) Sanyal D, Johnson A P, George R C, et al.: In-vitro characteristics of glycopeptide resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients on CAPD. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 267~278, 1993
- 6) Biavasco F, Giovanetti E, Montanari M P, et al.: Development of in-vitro resistance to glycopeptide antibiotics: assesment in staphylococci of different species. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 71~79, 1991
- 7) Herwaldt L, Boyken L, Pfaller M: In vitro selection of resistance to vancomycin in blood stream of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 1007~1012, 1991
- 8) Daum R S, Gupta S, Sabbagh R, et al.: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J. Infect. Dis.* 166: 1066~1072, 1992
- 9) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 135~146, 1997
- 10) Hiramatsu K, Ariake N, Hanaki, H, et al.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350: 1670~1673, 1997

Susceptibility to vancomycin among the clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Masayuki Shiseki, Yuka Matsui, Ken Kikuchi
and Kyoichi Totsuka

Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University,
8-1, Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Recently, decreased susceptibility to vancomycin (VCM) among the clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been reported in Japan. To investigate VCM susceptibility among the clinical MRSA strains isolated in our hospital, we determined the MIC of VCM and performed a population analysis. A total of 116 strains, including 80 MRSA isolated from August 1996 to May 1997 (MRSA-A group), 16 MRSA isolated in 1990 when VCM was not available for MRSA infections (MRSA-B group), and 20 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) isolated August 1996 to May 1997 (MSSA group), were analyzed. The MIC of VCM in all 96 MRSA strains was less than 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The strains in the MRSA-A group tended to have a higher MIC than those in the MRSA-B group, although no statistically significant difference was seen. Population analysis revealed that 71 (88.8%) or 12 (15%) of 80 strains in the MRSA-A group, 15 (93.8%) or 4 (25%) of 16 strains in the MRSA-B group, and 19 (95%) or 6 (30%) of 20 strains in the MSSA group contained subclones that could grow on agar plates containing 4 or 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of VCM, respectively. The strains in the MRSA-A group tended to form more colonies on agar plates containing VCM compared with those in the other two groups. The results of the present study suggest decreased susceptibility to VCM among MRSA strains in our hospital in recent years.