

## 【総説】

*Staphylococcus aureus* の vancomycin および methicillin 耐性

伊藤 輝代・花木 秀明・平松 啓一

順天堂大学医学部細菌学教室\*

(平成 11 年 10 月 12 日受付・平成 11 年 12 月 3 日受理)

1996 年にわれわれが vancomycin 耐性 MRSA, Mu 50 を報告して以降, 世界各地から vancomycin による治療の失敗例から vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) が相次いで分離報告されている。VRSA の vancomycin に対する MIC は, vancomycin 耐性腸球菌の場合と比べた場合, 相対的に低く, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の基準では, 耐性 (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上) と感受性 (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下) の中間 (8 および 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であるため, Vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) あるいは glycopeptide intermediate *S. aureus* (GISA) とも呼ばれている。ヘテロ VRSA の MIC は 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下で MIC の上では感受性を示す。しかし vancomycin に対する耐性度が細胞集団のなかで不均一 (heterogeneous) であるため,  $10^6\sim 10^7$  の菌のなかには vancomycin 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を含む平板上に生育する菌細胞が存在する。この vancomycin 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  平板上に生育した菌はポピュレーション解析で VRSA, Mu 50 と同程度の耐性を示す。そのため, 患者背景によりヘテロ VRSA も, VRSA 同様に vancomycin による治療が困難となる場合がある。これら, VRSA およびヘテロ VRSA の出現は, MRSA の化学療法および院内感染対策上の大きな問題を提起する。

**Key words:** vancomycin, teicoplanin, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, hetero-VRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

I. はじめに: *mecA* の由来と MRSA の clonotype  
staphylococci は人, 動物の皮膚, 粘膜などの常在菌である。staphylococci には 30 菌種以上が知られているが, なかでも種々の毒素を産生する *Staphylococcus aureus* が, もっとも病原性が高く, 院内感染および市中感染の原因菌として問題とされてきた。*S. aureus* はまた, 開発された化学療法剤に対して, 常に, いち早く耐性を獲得してきた。1960 年にペニシリンに分解されない半合成 penicillin, methicillin が実用化されると, その翌年の 1961 年に早くもこの methicillin に対して耐性を示す *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) が英国が報告された<sup>1)</sup>。1970 年代には, アメリカでも MRSA が出現し, 1975 年には 2% であった MRSA の分離頻度は 1996 年には 35% と上昇し, 急速に蔓延した<sup>2)</sup>。日本で MRSA が問題とされるようになったのは 1980 年代の初頭からである<sup>3)</sup>。その後 1992 年から 1993 年にかけての MRSA のサーベイランスの結果では, 臨床分離 *S. aureus* 株の約 60% が MRSA であると報告され, 十年あまりの期間に急速に全国の病院に蔓延していったことが示されている<sup>3)</sup>。

MRSA とは *mecA* を持ち, かつ methicillin あるいは oxacillin に耐性を示す *S. aureus* である<sup>4,5)</sup>。NCCLS では, oxacillin に対して 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の MIC を示すものを MRSA と規定している。*mecA* は methicillin 耐性

の発現に必須なペニシリン結合蛋白 PBP 2' の構造遺伝子である。この PBP 2' は methicillin やセフェム系薬剤に対する結合親和性が非常に低いため, MRSA は PBP 2' の働きにより, これら薬剤の存在下でも, その細胞壁合成が阻害されることなく菌は増殖することができる<sup>6-8)</sup>。*mecA* 遺伝子は染色体上の大きな外来遺伝子領域上に存在することが報告され, この領域は *mecDNA* と呼ばれてきた<sup>9-11)</sup>。preMRSA 株 N 315 (後述) の持つ *mecDNA* をクローニングし, その全塩基配列を決定した結果, N 315 の *mecDNA* は両端に 27 bp の逆向きの塩基配列を持ち, 約 52 kb の大きさであること, *mecDNA* のなかには, *mecA* およびその制御遺伝子群 *mecI*, *mecR 1* に加えて, 部位特異的組み替えに関与する 2 つの ORF が存在することが明らかとなった (Fig. 1)<sup>12)</sup>。われわれは *mecDNA* はこの 2 つの ORF の働きにより, 染色体上から切り出され, また挿入される一種の動く遺伝子であることを示し, この *mecDNA* を Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) あるいは *Staphylococcus resistant island mec* (SRI *mec*) と呼ぶことを提唱している<sup>13)</sup>。

SCC*mec* には少なくとも 3 つの相異なるタイプ (I, II, III) が存在している (Fig. 1)。また SCC*mec* の挿入された染色体 DNA のリボタイプを調べると, MSSA は多くのリボタイプに分類することができるが, そのう

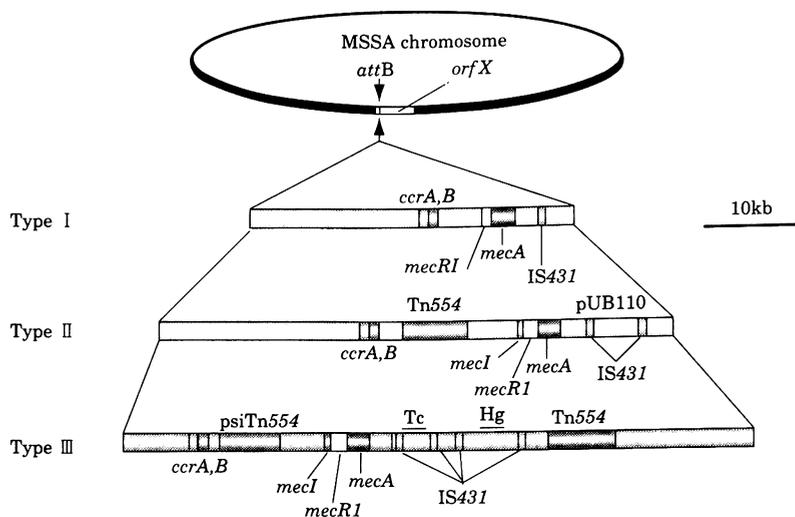


Fig. 1. Three types of SCCmec. The genes *mecA*, *ccrA*, *ccrB*, IS 431, and a portion of *mecR1* (the 3'-portion and entire *mecI* are deleted in Type-I SCCmec) are present in all the types of SCCmec. Tc, tetracycline resistance gene; Hg, mercury resistance gene. The integration site (*attB*) is common for all three SCCmec.

ち MRSA には主要な 3 つのリボタイプのグループ (A, B, C) が見いだされる。この SCCmec のタイピングと SCCmec の挿入される MSSA の染色体 DNA のタイピングとを組み合わせると、世界各地から分離された MRSA は 5 つのタイプ (Clonotype) に分類された (I-A, II-A, III-A, II-B, ii-C)<sup>14,15</sup>。ある clonotype が特定の地域に広まっていることがこれまでに得られたデータから推測されている。たとえば、clonotype II-A は日本、およびアメリカで主に分離されているが、clonotype III-A は歴史的、あるいは地域的にイギリスと関係の深い国々、マレーシア、香港、ニュージーランド、サウジアラビア、ヨーロッパ各国で分離されている。一方、同じ地域であっても、おそらく使用される抗生物質の種類の変化を反映してであろうが、clonotype の経年的変化が見られる。日本において 1980 年代初期に分離された MRSA の clonotype は II-B が主流であったが、この clonotype の MRSA は imipenem, cefmetazole, flomoxef などの抗菌力の強い  $\beta$ -ラクタム系薬の使用により消滅し、1980 年代の後半より現在のタイプに置き変わっている。1990 年代には日本で分離された MRSA の約 70% は、ほとんどすべての  $\beta$ -ラクタム系薬に高度耐性を示す clonotype II-A であり<sup>14,16</sup>、最初の VRSA 株 Mu 50 もこの clonotype II-A に属している<sup>17</sup>。

## II. staphylococci における グライコペプチド 耐性菌出現の歴史

### 1. Teicoplanin 耐性 Coagulase negative-staphylococci (C-NS) の出現

NCCLS の基準では、teicoplanin の場合、MIC 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下が感受性、16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  が中間、32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上

が耐性である。2 つのグライコペプチドの抗菌力を測定した 1980 年代の初期の報告では、この 2 薬剤は、ほとんど *S. aureus* および *S. epidermidis* 臨床分離株に対して有効であったとされている<sup>18-20</sup>。しかし 1983 年には teicoplanin に対する MIC が 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (vancomycin の MIC は 3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下) の *S. epidermidis* の存在が Fainstein らによる報告されている<sup>21</sup>。1986 年には、teicoplanin の MIC が 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である methicillin 耐性 *S. haemolyticus* (MRS. *haemolyticus*) が teicoplanin 予防投与下の心臓手術後 8 日目にペースメーカーの金属線先端から分離された<sup>22</sup>。Arioli と Pallanza の報告によれば、29 株中 11 株の *S. haemolyticus* は teicoplanin 中等度耐性以上 (MIC, 16~32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であったが、*S. haemolyticus* 以外の他の C-NS の場合、MIC は 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下であった<sup>23</sup>。同様に Del Bene もまた MRS. *haemolyticus* のなかに teicoplanin 耐性を示すものが多いことを報告している<sup>24</sup>。このように見てくるとブドウ球菌属のなかでは MRS. *haemolyticus* が最初に teicoplanin 耐性を獲得したと思われる。Teicoplanin 中等度耐性 *S. epidermidis* (MIC, 12.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; vancomycin MIC, 1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) は CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis; 持続性自己管理腹膜透析) 腹膜炎の患者から 1986 年に、分離されている<sup>25</sup>。患者はこの株の分離以前に vancomycin の腹腔内投与を受けている。Vancomycin の投与により、腹膜炎の治療は成功したものの、感染症の原因菌として、グライコペプチド耐性菌が分離されたのは、この例が最初である。また、これら teicoplanin 耐性 C-NS が分離されたいずれの患者も teicoplanin の投与を受けてはいなかった。1988 年に Moore と Speller は過去 5

年間の心内膜炎患者より分離された C-NS の 58% 以上が teicoplanin 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でも増殖したと報告している<sup>26)</sup>。Maugein らは 1988 年から 1989 年にかけて 80 人の好中球減少症患者から分離した 185 株に対する vancomycin と teicoplanin の抗菌力を検討した。それによれば、vancomycin に対しては、すべて MIC 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下で感受性であったが、teicoplanin の MIC は 0.5 ~ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  あり、その感受性は低下していた<sup>27)</sup>。これら teicoplanin に対して耐性あるいは中等度耐性を示すものの 86.5% は *S. epidermidis* であった。この場合には、グライコペプチドの使用と耐性菌の出現が明らかに相関し、vancomycin, teicoplanin それぞれ単独、あるいは両者の投与を受けた患者から分離された菌株の 49.2% は teicoplanin の MIC が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上であったのに対し、いずれの薬剤の投与も受けていない患者から分離された菌株の場合のこれらの菌の出現率は 20% であった<sup>27)</sup>。

Vedel は 1989 年に分離された C-NS における teicoplanin 耐性菌の占める割合は 25.6% であると報告している<sup>28)</sup>。

このように C-NS の臨床分離株において teicoplanin 耐性菌が vancomycin 耐性菌よりも先に出現した事実は、感受性株を用いた *in vitro* の実験において、teicoplanin 耐性菌は容易に分離することができるが、vancomycin 耐性菌を分離することは非常に困難であるとする報告とよく一致している<sup>29-31)</sup>。Watanakunakorn は vancomycin の作用部位が一樣ではなく、vancomycin の主な作用は細胞壁合成阻害であるが、この他に細胞膜の透過性を変化させ、あるいは RNA 合成を阻害する働きを持つことを報告し、これらの異なる作用部位を持つために耐性菌を生じにくいのではないかと考えている<sup>32)</sup>。Chomarat らは 4 株の teicoplanin に中等度耐性あるいは耐性 C-NS (*S. epidermidis* 2 株と *S. haemolyticus* 2 株; teicoplanin MIC, 16~32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , vancomycin MIC, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) が、vancomycin の MBC (2~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と比較した場合、teicoplanin に対しては非常に高い MBC (32~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示すことを報告している<sup>33)</sup>。これは teicoplanin が vancomycin の殺菌活性とは無関係に C-NS に対しては殺菌活性を失いやすいことを示している非常に興味深い報告である。

歴史的にみると vancomycin の実用化は 1956 年であり、teicoplanin の実用化 (1978 年) よりも 20 年さきだっている<sup>34,35)</sup>。したがって世界中の staphylococci は teicoplanin が導入される以前に vancomycin にすでに長期間接触していると考えられる。この期間になんらかのグライコペプチド耐性に関与する変異が、すでにこれらの菌株のなかで起こり、vancomycin を使用した場合にはまったくその変化は検出されないが、teicoplanin が導入されたときに、はじめて teicoplanin 耐性として

検出された可能性が 1 つの仮説として考えられる。そしてこの仮説を裏づける事実は、われわれの研究結果からも得られている。われわれは teicoplanin がまだ臨床使用されていなかった時代 (1994~1997 年) に分離された *S. epidermidis* 122 株中 27 株は teicoplanin の MIC が 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上であること、また、この 27 株中 8 株は vancomycin 感受性 ( $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) であることを確認している<sup>36)</sup>。これまでに述べてきた事実は、歴史的にみると、グライコペプチド耐性は staphylococci においては、vancomycin 耐性にさきだって、最初に teicoplanin 耐性菌が出現したことを明確に示している。

## 2. C-NS における vancomycin 耐性

1987 年に、Schwalbe らは、vancomycin 耐性 MRS. *haemolyticus* の分離された CAPD 腹膜炎の臨床例を報告した<sup>37)</sup>。Vancomycin による治療 (腹水中の vancomycin 濃度は 10 から 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を行っている間に腹水から数株の *S. haemolyticus* が継続して分離されたが、これらの菌株の vancomycin に対する耐性度は MIC で 2 から 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MBC では 4 から 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  へと、段階的に上昇していった。さらに彼らは、MIC では 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の値を示す菌株の場合でも、 $10^{-7}$  以上の割合で 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の vancomycin を含む平板上に生育することを報告している。MIC 値は接種菌量によって変化し、接種菌量が増加すると MIC も上昇した。この場合ポピュレーション解析の手法こそ使用していないが、MIC 値では感受性と判断される菌株の場合でも、ヘテロ VRSA である Mu 3 の場合と同じように、vancomycin に対してヘテロ耐性を示す菌株が存在することを明確に示している。

さらに、Schwalbe らは、臨床分離の MRS. *haemolyticus* の多くは vancomycin に耐性を示すサブポピュレーションを含むが、MSSA, MRSA, *S. epidermidis*, *S. hominis* および methicillin に感受性である *S. haemolyticus* の場合には vancomycin に耐性を示すサブポピュレーションはほとんど存在しないと報告している<sup>38)</sup>。同じ 1987 年に Froggatt は臨床分離 MRC-NS のなかに、vancomycin 耐性 (vancomycin MIC, 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , teicoplanin MIC, 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す菌株が存在することを報告している<sup>42)</sup>。1990 年には Veach らが、vancomycin 耐性 MRS. *haemolyticus* (MIC, 8~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) により引き起こされた菌血症の例を報告した<sup>43)</sup>。これは好中球減少症患者に対して長期間 vancomycin の投与を行った結果患者の咽頭に定着していた *S. haemolyticus* が感受性 (MIC, 1~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) から耐性に変化したためとされている<sup>43)</sup>。1991 年に、Sanyal らは、vancomycin による治療 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を腹腔内投与) が有効ではなかった CAPD 腹膜炎患者から vancomycin 耐性 *S. epidermidis* (vancomycin MIC 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , teicoplanin MIC 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上) を分離した<sup>44)</sup>。この患

者は過去3年間に、C-NSによる腹膜炎を発症した経歴が10回あり、vancomycinの腹腔内投与を受けていた。

### 3. Teicoplanin 耐性 *S. aureus*

Kaatzらは心内膜炎患者のteicoplanin治療開始以前および投与開始から死亡するまでの10日間に合わせて4株の*S. aureus*を分離し、teicoplaninおよびvancomycinに対する耐性度を調べた。Teicoplaninの場合MICは段階的に上昇し(1, 2, 6, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、最終段階ではMICが8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の値を示す株が分離された<sup>42)</sup>。しかしvancomycinのMICはほとんど変化なく(0.6, 1.0, 1.2, 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、感受性であった。また、最初のvancomycin感受性である分離株を8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のteicoplaninで選択すると $1.4 \times 10^{-9}$ と非常に低い頻度ではあるが1段階でteicoplanin耐性株を分離することができた。この最初の感受性である*S. aureus* (MIC, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を使用してウサギに実験的心内膜炎を起こさせ、これをteicoplaninで治療した場合にも、同様に耐性株が得られることを確認している。

この結果はteicoplaninに感受性である*S. aureus*感染症の場合でも、薬剤投与により耐性度の上昇した菌が速やかに出現し、その結果患者が死亡したことを明白に示している。また、この結果は、原因菌が病原性菌であり、かつヘテロ耐性菌の可能性を持つ場合にはMIC値では治療効果を予測できない場合があることを示している。

ヘテロ耐性は他の多くの抗菌薬に対して低度耐性を示す細菌一般に共通に見られる重要な問題であり、後に詳しく述べる。

またShlaesらは、teicoplanin耐性株12873をさらに高濃度で選択すると高度耐性変異株12873-10 (teicoplanin MIC, 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を $6.7 \times 10^{-10}$ の頻度で得ることができ、これらの株のvancomycinに対する耐性度も同時に上昇していること(MIC, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、しかしこのようなvancomycin耐性*S. aureus*はvancomycinで選択した場合には得られなかった( $< 5 \times 10^{-11}$ )ことを報告している<sup>43)</sup>。このようにteicoplaninがvancomycin耐性を選択するという考えは、頻度の点だけを考えると一見矛盾しているように思われる。1つの細胞集団のなかで変異が生じて耐性菌が生じると考えるなら、その頻度は同一であるはずであるのに、なぜteicoplaninで選択した場合に $6.7 \times 10^{10}$ に1個の割合で得られるvancomycin耐性株が、vancomycinで選択した場合には、その10倍近い $5 \times 10^{11}$ の中から1個も得られないのであろうか。この一見した矛盾は、teicoplaninの場合はvancomycinよりも、より長時間菌が増殖しつづけると仮定し、最終的にはteicoplaninによる選択の場合の生菌数がvancomycinによるそれよりも多くなるためと考えれば解決されるのではないだろうか。実際この2つのグライコペプチドの殺菌活性は、いずれも弱い

が、teicoplaninの殺菌活性のほうがさらに弱いと報告されている<sup>44)</sup>。もう1つの別の可能性はteicoplanin自体が変異を誘発しやすく、耐性菌を生じやすいとするものである。

いずれにせよ、Shlaesらの報告は、vancomycinに比べてteicoplaninの耐性度の高い*S. aureus* (vancomycin MIC, 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , teicoplanin MIC, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )から、teicoplaninによる1段階の選択でvancomycin耐性株を得ることができるとするわれわれの2段階耐性獲得仮説を支持するものである。Serzinらもこの仮説を支持する結果を報告している<sup>45)</sup>。Vancomycinには感受性(MIC, 2~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )であるが、teicoplaninの耐性は上昇している*S. aureus* (MIC, 8~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の存在が2つのグループから報告されている<sup>46,47)</sup>。Mainardiらはこの*S. aureus*の得られた6症例のなかで、4名の患者にはvancomycinが投与されていたことを報告している<sup>47)</sup>。したがってここでもまたvancomycinの投与により、vancomycin耐性菌が出現しない場合でも、Teicoplanin耐性菌が出現することが確認される。Teicoplanin耐性*S. aureus*の治療に際し、薬剤をteicoplaninからvancomycinに切り替えることによって治療に成功した例も報告されている<sup>46,47)</sup>。

### 4. Vancomycin 耐性 *S. aureus* の出現

Vancomycinに対するMICが8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である最初のVRSA, Mu 50は肺動脈閉鎖症のためバイパス手術を施行した生後4か月の男児から分離された<sup>48)</sup>。その臨床経過をTable 1に示す。

この患者はMRSAによる術後感染を起したため、抗MRSA薬としてvancomycinが単剤で29日間投与された。しかしvancomycin投与により最初の1週間でやや解熱したものの胸骨上の正中切開部からの膿の分泌は続き、CRPも4.1~5.1と4 mg/dL以下には低下しなかった。そこでarbakacin (MRSAによって産生されるほとんどのアミノ糖修飾酵素に作用されないアミノ糖系抗生物質)を併用した。併用開始後6日間でCRPが5.1 mg/dLから0.9 mg/dLに低下し、切開瘡が閉じたため、併用開始後12日目で2剤とも投与を終了した。その10日後、再び39°Cの発熱と膿の分泌がみられ、CRPが3.5 mg/dLに上昇したため、sulbactam/ampicillin (300 mg/day)とarbakacin (30 mg/day)を投与したところ、解熱し、CRPも0.3~1.0 mg/dLまで低下した。胸骨上の皮下膿瘍を切除した後、15日間sulbactam/ampicillinを投与し、この患者を退院させることができた。

Mu 50はこの切除膿から分離された株である。しかしこのMu 50とまったく同じ耐性度とgenotypeを示す株Mu 45がvancomycin投与後7日目の胸骨上の正中切開部膿瘍の膿汁から分離されている。アメリカのVRSAは数か月にわたる長期間vancomycinを投与した

患者から分離されたのに比べてこの場合は対照的に投与期間が短い<sup>17)</sup>。そのため、この患者の MRSA が薬剤投与中に vancomycin 耐性株に変化したのではなく、vancomycin の長期投与を受けた他の患者の MRSA が vancomycin 耐性となり、それがこの生後 4 か月の男児に院内感染した可能性が考えられる。

Table 1 に示すこの患者の臨床経過は、感受性が低下した菌に対しては vancomycin の治療は有効でなく、他の抗菌薬の治療がむしろ有効であったことを示している。この Mu 50 は NCCLS の基準では耐性 (32 µg/mL 以上) と感受性 (4 µg/mL 以下) の中間 (8~16 µg/mL) であるため、vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) あるいは glycopeptide intermediate *S. aureus* (GISA) と呼ばれている<sup>49)</sup>。しかし、現在合計 10 株の VRSA が米国 (4 株)、フランス (2 株)、韓国 (1 株)、日本 (1 株)、スコットランド (2 株) から報告されており、そのうち感染症を起こした 7 株はいずれも vancomycin の治療が奏功しなかった症例から分離されている。これらの菌株の MIC はいずれも 8 µg/mL であったこと<sup>50-53)</sup>は、この MIC 値の株は明確に臨床的には耐性であることを示している。また同じく MIC が 8 および 16 µg/mL の C-NS による vancomycin 治療失敗例は 1987 年以来数例報告されている。このことは、NCCLS の耐性基準 (ブレイクポイント) が非現実的に高すぎることを示している。これが、われわれが Mu 50 を VISA と呼ばず、VRSA と呼んでいる理由である。

Mu 50 の分離前に、われわれは、ヘテロ VRSA (heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, hetero-VRSA) と呼ぶ、別のカテゴリーの vancomycin に対する感受性の低下した株を、肺癌 (primary lung cancer) の男性から分離した<sup>17)</sup>。この患者の臨床経過を Table 2 に示す。術後 3 日目の胸部 X 線では肺炎の陰影を示し、膿性痰からは MRSA が分離された。喀痰の塗抹標本をグラム染色したところ、好中球に貪食されたグラム陽性球菌が多数観察され、喀痰の培養からは MRSA が純培養状に 10<sup>7</sup>CFU/mL 以上の濃度で検出された。Vancomycin による治療を開始したところ、はじめの 1 週間は臨床症状、検査所見ともに改善が見られたが、9~12 日目には同様の vancomycin の治療にもかかわらず、再び肺炎像は悪化した。担当医は薬剤を piperacillin に変更したが、この間肺炎像は急激に悪化し続けた。Mu 3 が分離されたのはこの時期の喀痰からである。この時点で sulbactam/ampicillin と arbekacin を併用して投与し、治療することができた。この例に見られるような、最初は vancomycin 投与が効を奏すが、しばらくして奏効しなくなるという治療の経過は Fig. 2 に示す *in vitro* での Mu 3 の time-killing curve と非常によく符合している。Fig. 2 に示すように Mu 3 の場合、その MIC が 2 µg/mL であるにもかかわらず、10<sup>6</sup> CFU/mL の菌の増殖を完全に押さえるには 10 µg/mL の濃度の vancomycin が必要である。他方 MIC が 1 µg/mL の vancomycin 感受性 87/20 の場合は 1.25 µg/

Table 1. Time course of the case from whom Mu 50 was isolated

| Patient: 4 months old, male, pulmonary atresia, operation (May 14, 1996) |  |
|--|--|
| June 1-10:   | fever (38-39°C), CRP raised to 11.0 mg/dL, pus from the incision site grew MRSA  |
| June 10-July 9:  | vancomycin (45 mg/kg per day)<br>low grade fever (37-38°C), CRP 4.1-5.1, purulent discharge persisted                                  |
| July 10-July 21:   | vancomycin plus arbekacin (30 mg per day)<br>fever subsided, CRP 5.1-0.9, the wound healed   |
| July 31-Aug 3:   | fever (39°C), CRP 3.5, pus discharge resumed   |
| Aug 4-Sept 21:   | sulbactam/ampicillin (300 mg per day) and arbekacin (30 mg per day)<br>fever subsided in 6 days, CRP between <0.3 to 1.0, wound healed |
| Sept 6:  | debridement of the abscess; CRP, <0.3 after debridement  |

Table 2. Time course of the case from whom Mu 3 was isolated

| Patient: 64 years old, male, primary lung cancer, operation (December 12, 1995) |   |
|---|---|
| Dec 15-19:  | shadow in chest X-ray film, fever (~38°C), CRP 15.7 mg/dL, purulent sputa yielded MRSA  |
| Dec 20-31:  | vancomycin (2 g per day)<br>chest X-ray improved until Dec 27; fever ~37°C, CRP 15.7 to 3.0 (Dec 27)  |
| Dec 28-31:  | chest X-ray exacerbated; fever ~39°C, CRP 3.0 to 6.1  |
| Dec 30-Jan 4:   | piperacillin (2 g per day)<br>chest X-ray film further exacerbated (consolidation), fever ~39°C, CRP up to 12.2                             |
| Jan 5-16:   | arbekacin (200 mg per day) plus sulbactam/ampicillin (6 g per day)<br>fever subsided in two days, chest X-ray film cleared, CRP 12.2 to 0.4 |

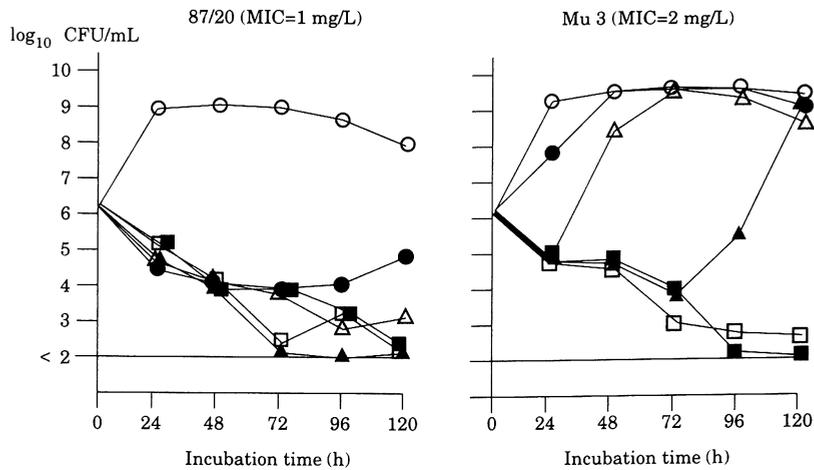


Fig. 2. Hetero-VRSA Mu 3 contains a vancomycin-resistant subpopulation. The strains were cultivated in Mueller-Hinton broth containing no vancomycin (open circle), or with 1.25 mg/L (closed circle), 2.5 mg/L (open triangle), 5 mg/L (closed triangle), 10 mg/L (open square), or 20 mg/L (closed square) concentrations of vancomycin. Periodically, a portion of each culture was taken and the numbers of viable cells were counted.

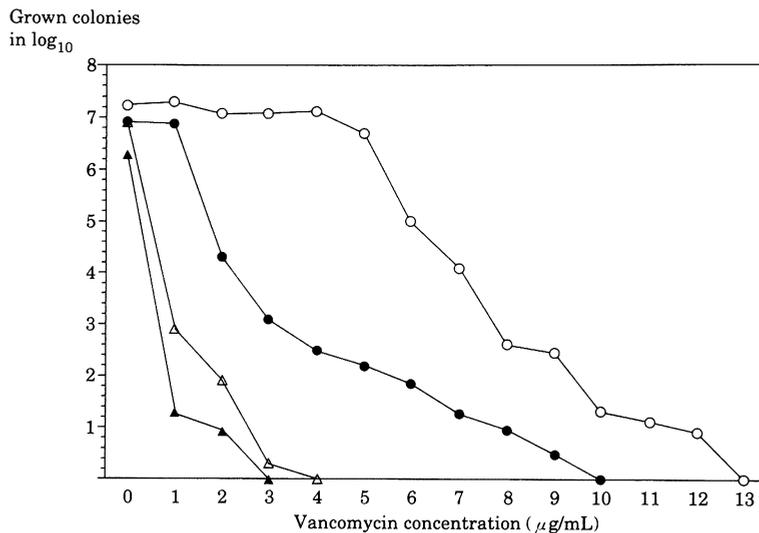


Fig. 3. Population analysis of VRSA and hetero-VRSA. The population curves of VRSA Mu 50 (open circle) and hetero-VRSA Mu 3 (closed circle) were compared with those of two VSSA strains, H 1 (methicillin-resistant; open triangle) and FDA 209 P (methicillin-susceptible; closed triangle).

mLでその増殖が阻止される。Mu 3の場合5  $\mu\text{g/mL}$ の vancomycin 存在下でも3日間は増殖が阻止されるが、その後菌は再び増殖する。Mu 3のポピュレーション解析の結果を Fig. 3に示す。Vancomycin の治療が奏効した MRSA 肺炎の患者から分離された MRSA, H 1 と比べると、明らかに Mu 3 の場合は5~9  $\mu\text{g/mL}$  の vancomycin の存在下でも増殖できる耐性のサブポピュレーションをもっていることがわかる。5~9  $\mu\text{g/mL}$  に vancomycin を含む平板上に生育した菌をとり、その菌のポピュレーション解析を行うと、そのパターンは Mu 50 とほぼ同程度となる。Mu 3 と Mu 50 はまったく同

じ PFGE のバンドのパターンを示し<sup>17)</sup>、さらに *gyrA* および *gria* 遺伝子の同じ場所にポイントミューテーションがある<sup>54)</sup>。このようにヘテロ VRSA は VRSA の前駆細胞であると同時に、感染した組織のなかで高頻度に VRSA を生み出し、vancomycin の治療が奏効しない感染症を引き起こす。

### III. 耐性における heterogeneity

#### 1. heterogeneity とは

薬剤耐性における heterogeneity (辞書では異種、不均一と訳されている)の問題は興味深い問題であり、とりわけ MRSA の研究者の間では1つの主要な研究テ

マであった。ヘテロ耐性は、ポピュレーション解析あるいはプレーティングの効率から定義される<sup>55,56</sup>が、ヘテロ耐性の概念が構築された最初の段階では、1960年代に分離された MRSA が、methicillin に対して安定なヘテロ耐性を示すという報告が、その概念に「安定性」という性質を誤って付与することになった<sup>57</sup>。すなわち 1960年代のヘテロ MRSA を methicillin により選択した耐性株は、methicillin を含まない培地で培養し続けると、またもとのヘテロ MRSA にもどりやすいと報告されている<sup>57</sup>。しかし、最近の研究では、すべてのヘテロ MRSA がヘテロ耐性の状態を安定して継続するものではなく、いくつかのヘテロ MRSA からは安定な高度耐性あるいはホモ耐性 MRSA が生まれることが明らかとなっている<sup>58,59</sup>。そのもっともよい例が preMRSA N 315 (pre MRSA とは *mecA* を持つが、methicillin に対しては感受性 [MIC,  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ ] を示す菌株をいう) の場合である<sup>60</sup>。N 315 は *mecA* およびその制御遺伝子 *mecI*, *mecR 1* を完全な形で持つので、*mecA* の発現が *mecI* により非常に強く抑制されており<sup>61,62</sup>、そのために methicillin 感受性を示す MRSA の最初の形と考えられるクロノタイプ II-A に属する *S. aureus* である<sup>17</sup>。

N 315 は Tomasz らの分類を当てはめると type-I のヘテロ耐性 (MIC が  $2\sim 4 \mu\text{g/mL}$  で MSSA に分類される<sup>63</sup>) を示すが、低濃度の methicillin ( $3 \mu\text{g/mL}$  程度) で選択すると、非常に高い頻度 ( $10^{-5}\sim 10^{-4}$ ) で type-III のヘテロ耐性 (MIC,  $50\sim 200 \mu\text{g/mL}$ ) を示す株が生まれてくる。これらの株の *mecI* 遺伝子に変異を起こしていることが確認させている<sup>64</sup>。N 315 から実験的に *mecI* を欠落させた株も同様に type-III のヘテロ耐性株へと変化する<sup>60</sup>。このことは MRSA において、methicillin の耐性度がさらに上昇した株が生まれる場合には、多くの場合遺伝子の変異を伴っていることを示している。そして、このヘテロ耐性株を再度 methicillin で選択すると高度耐性を示すホモ耐性株が生まれてくる

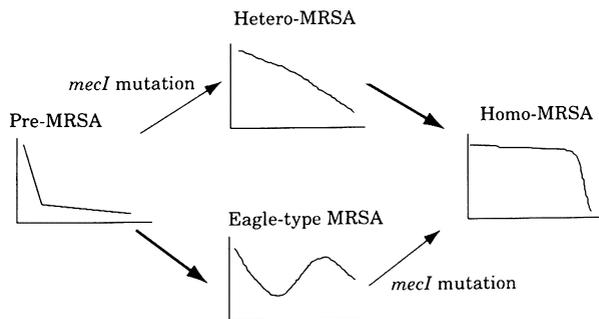


Fig. 4. Two pathways for pre-MRSA to evolve into homo-MRSA. In the N 315 (clonotype II-A) lineage of MRSA, two genetic events, *mecI* inactivation and another mutation indicated by thick arrows, are required for pre-MRSA to become homo-resistant to methicillin.

(Fig. 4).

2. heterogeneity は広く一般的に見られる現象である

耐性発現における heterogeneity は *S. aureus* における methicillin 耐性および vancomycin 耐性に限った問題ではなく、他の菌種と他の抗菌薬の組み合わせの場合にも広く見られる。

たとえば MRSA の治療薬として使用されている arbekacin に対してある種の菌株はヘテロ耐性を示すが、MIC の上では感受性と判断されている。

Fig. 5 A に Mu 3 株を例に示すが、この株は arbekacin に対してはヘテロ耐性であるが、同時に調べた sulbac-

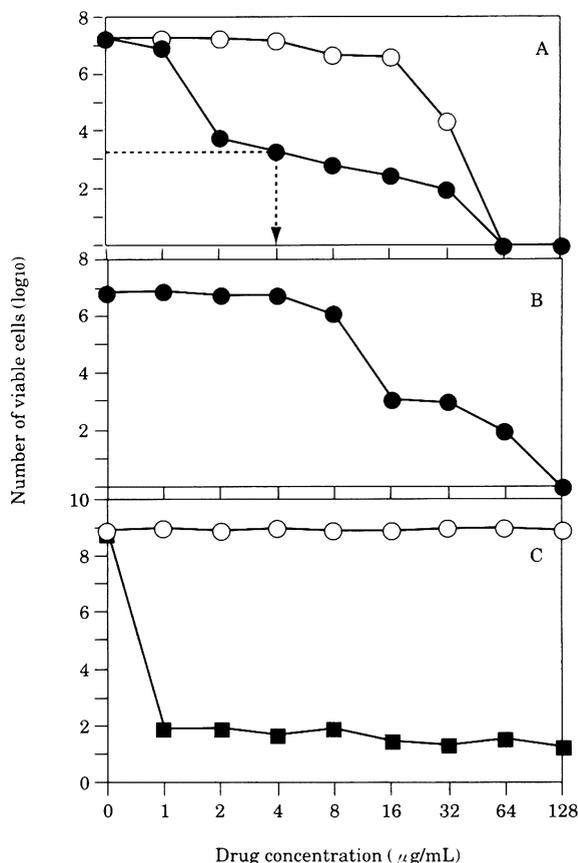


Fig. 5. Population analysis with three organism-antibiotic combinations. (A) *Staphylococcus aureus* strain Mu 3 vs arbekacin and sulbactam/ampicillin. Symbols: closed circle, arbekacin; open circle, sulbactam/ampicillin. Mu 3 has a heterogeneous-type population curve for arbekacin, and a homogeneous-type curve for sulbactam/ampicillin. Dotted line and arrow indicate the operation to find MIC value of arbekacin from population curve. MIC is defined as the minimum concentration of the drug inhibitory to 99.99% of the population. MIC is found to be  $4 \mu\text{g/mL}$ . (B) Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical strain A 4284 (*vanB*) vs vancomycin. (C) *S. aureus* strains Mu 3 vs rifampin. Note that the population contains rifampin-resistant mutants, presumably with a single mutation in the RNA polymerase, The L-shaped population can be discriminated from heterogeneous-type curves.

tam/ampicillin に対してはホモの感受性パターンを示す。いくつかの *vanB* タイプの VRE の場合、MIC は感受性から中等度耐性まで広い範囲にわたっている<sup>65)</sup>。Fig. 5 B には *vanB* 遺伝子をもつ *Enterococcus faecium* A 4282 のポピュレーション解析を示す。この株の MIC は  $12.5 \mu\text{g/mL}$  であるが、典型的な heterogeneous なパターンを示していることがわかる。比較のために *S. aureus* の rifampicin に対するポピュレーション解析を示す (Fig. 5 C)。この場合はヘテロの場合と異なり特徴的な L 字型のポピュレーション曲線を示している。

MIC を測定する場合、 $10^7/\text{mL}$  (NCCLS) あるいは  $10^6/\text{ml}$  (日本化学療法学会) に調整した菌液をマイクロプランターにて平板上に接種するが、この場合接種される菌液の量はおよそ  $3\sim 5 \mu\text{L}$  であるので、 $3\sim 5 \times 10^4$  あるいは  $3\sim 5 \times 10^3$  個の菌を接種したことになる。したがって接種した菌数  $3\sim 5 \times 10^4$  のなかに 1 個未満の耐性菌が存在する場合、その耐性サブポピュレーションに関しては検出できない。NCCLS により推奨されている  $6 \mu\text{g/mL}$  に vancomycin を含む平板上に  $10^6$  の菌を接種する VRE のスクリーニング法は、接種菌量を多くしてあるため、理論的にヘテロ耐性菌をも検出する方法となっている<sup>66)</sup>。

以上述べたように、耐性における heterogeneity は、多くの薬剤と菌との組み合わせで一般的に見られる現象である。薬剤感受性試験として、MIC 測定に加えてポピュレーション解析(およびその簡略型)を実施すれば、化学療法薬の有効性を判断する上での試験成績の信頼性

をより高めることができるであろう。

### 3. ヘテロ VRSA の定義とその重要性

われわれは以上述べてきたヘテロ耐性の考え方をもとに、次のような性質を合わせ持つ菌をヘテロ VRSA と呼んでいる。

(1) MIC は  $4 \mu\text{g/mL}$  以下で、現在の NCCLS の基準では MIC の値からは感受性と判定される。

(2) Vancomycin に対し異なる耐性度を持った細胞が細胞集団の中に生じるため、 $10^6\sim 10^7$  の菌のなかには vancomycin  $4 \mu\text{g/mL}$  (あるいはそれ以上の濃度) を含む平板上に生育する細胞サブポピュレーションが検出される。

(3) Vancomycin  $4 \mu\text{g/mL}$  (あるいはそれ以上の濃度) を含む平板上に生育した菌 (直接あるいは数回バンコマイシン  $4 \mu\text{g/mL}$  を含む平板で継代後) のポピュレーション解析を行うと、その耐性度は Mu 50 と同じ程度である。

当教室で実際に用いているポピュレーション解析の方法を以下に述べる (Fig. 6)。

Step 1: 薬剤の希釈系列を調製する (一般的には 2 倍段階希釈の希釈系列で 10 倍濃度の薬剤液を調製するが、vancomycin の場合は  $1 \mu\text{g}$  刻みでの希釈系列を用いている)。

Step 2: 薬剤含有平板を作製する。最初に平板に薬剤液各  $1 \text{ mL}$  を加える。

次に  $55^\circ\text{C}$  に保温した BHI 寒天  $9 \text{ mL}$  を加えよく混合する。

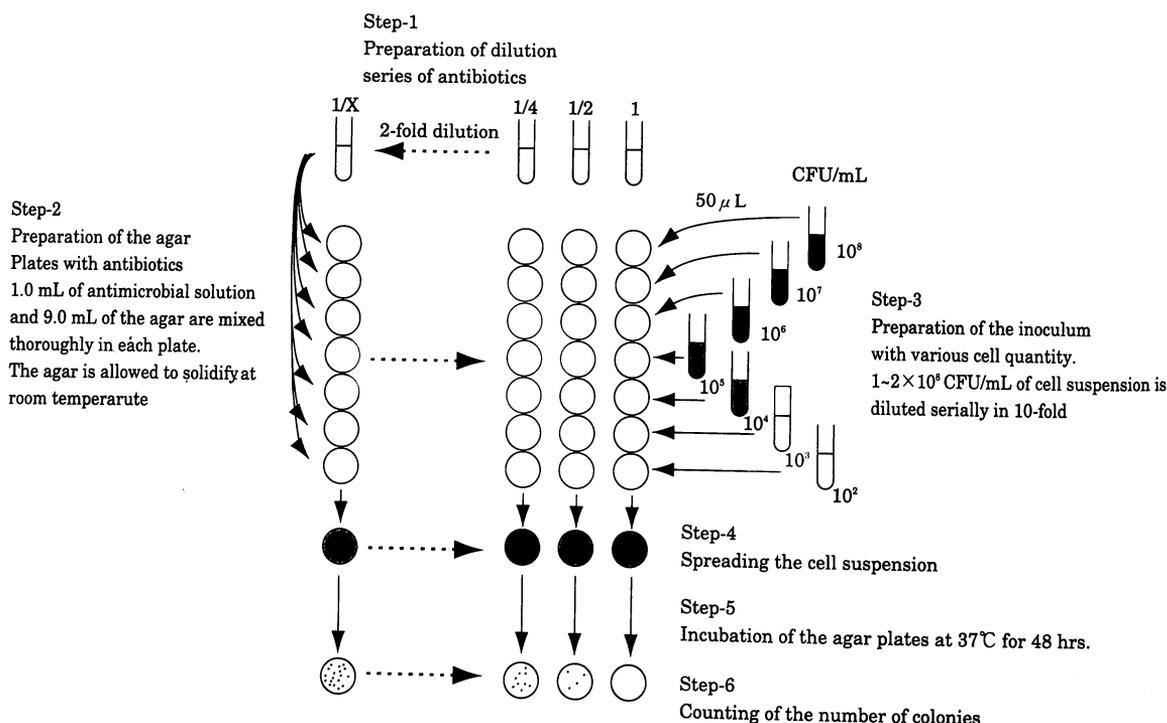


Fig. 6. Method of population analysis. For explanation, see text.

平板が固まったのち表面を乾燥する。

Step 3: 接種する菌液を調製する。前培養（前日に被検菌株を BHI-broth [4 mL] に植菌し, 37°C で一夜振盪培養する）した菌液の吸光度を測定し, BHI-broth にて  $1\sim 2 \times 10^6$  CFU/mL の菌液を調製する（当教室では 578 nm の吸光度が 0.3 になるように調製している）。次に生理食塩水を用いて順次 10 倍段階希釈を行い,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  CFU/mL の菌液を調製する。

Step 4: 菌液 (50  $\mu$ L) を平板に加え, コンラージ棒を用いて均一に塗布する。

Step 5: 平板を 37°C で 2 日間培養する。

Step 6: それぞれの平板上に生育したコロニーの数を数えグラフにプロットする。

Fig. 6 に図示した平板の数は模式的に書いたものである。あらかじめそれぞれの平板に生育する菌量を推定しておけば, 菌液を塗布する平板の枚数を最低限にすることができ, 実際に使用する平板の枚数を節約することができる。

ポピュレーション解析の簡便法としては vancomycin 4  $\mu$ g/mL 含有 BHI 寒天平板上に  $10^6$  CFU の菌液を塗布して生育するコロニーの割合を算定する方法が用いられている。

実際にヘテロ VRSA である Mu 3 を各種濃度に vancomycin を含む BHI 寒天平板に接種すると, 種々の MIC を示す菌が生じてくる。これらの菌の MIC は多くの場合, 使用した vancomycin 濃度に比例してくる<sup>17)</sup>。Mu 3 を 4  $\mu$ g/ml あるいはそれ以上の濃度の vancomycin を含む平板に接種するとおよそ  $10^{-6}$  の頻度で vancomycin 耐性菌が生じる<sup>17)</sup>。このように, ヘテロ VRSA は高頻度に自然に VRSA を作り出す能力のある菌株（いわば前駆細胞株）であることが, まず第一の重要な点である。1997 年当時順天堂医院から分離した MRSA のおよそ 20% は Mu 3 と同様なヘテロ VRSA であった (Fig. 7)。ヘテロ VRSA の臨床分離株は米国, 英国, トルコ, フランス, スペイン, 香港, 韓国, ドイツでも検出されている。バンコマイシンによる治療が奏効しなかったデトロイトの患者から分離されたヘテロ VRSA 42493 は Mu 3 とよく似たポピュレーション曲線を示している<sup>67)</sup>。この株からも Mu 3 と同様に *in vitro* で vancomycin 耐性菌をつくることのできる (Hiramatsu K, 未発表データ)。第 2 の重要な点は, 第 1 の点とも密接に関連しているが, ヘテロ VRSA それ自体が vancomycin の治療が奏効しない感染症の原因となり得る点である。Fig. 7 に示すヘテロ VRSA はすべて MRSA 肺炎の患者から分離された株である。図中の白抜きで示した Mu 3, Mu 27, Mu 36 はすべて vancomycin が有効でなかった症例からの分離株であり, 黒塗りで示した Mu 6, Mu 17, Mu 22, および H 1 は vancomycin が有効

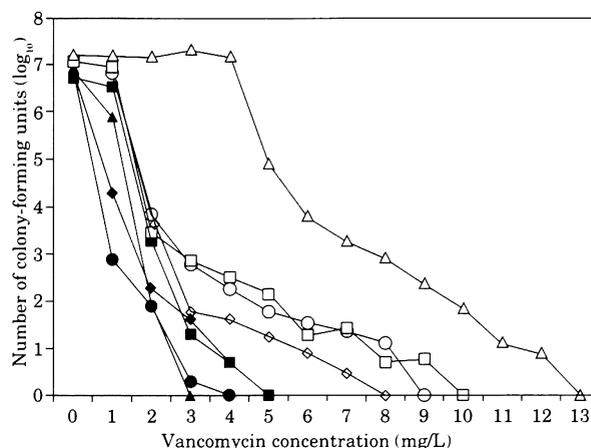


Fig. 7. Population analysis of VRSA (Mu50) and hetero-VRSA strains. Symbols: open triangle, Mu 50; open square, Mu 27; open circle, Mu 3; open diamond, Mu 36; closed square, Mu 6; closed diamond, Mu 22; closed triangle, Mu 17; closed circle, H 1. The strains depicted with open symbols were associated with vancomycin therapeutic failure.

であった症例からの分離株である。

この結果は Mu 3 と同等, あるいはそれ以上のヘテロ耐性を示す株による MRSA 肺炎では, vancomycin 単独では治療できない場合が多いことを示唆している。

このヘテロ VRSA は通常の MIC の測定では VSSA と区別できない。Fig. 7 で示した Mu 3 も Mu 6 もその MIC は 2  $\mu$ g/mL であり, これまでに分離したヘテロ VRSA の MIC はすべて 4  $\mu$ g/mL 以下である。したがって NCCLS の基準をあてはめると MIC の上ではヘテロ VRSA はすべて感受性である。これがヘテロ VRSA の第 3 の重要性である。すなわち MIC では感受性でありながら薬剤が有効に作用しない菌, すなわちヘテロ耐性菌の存在自体が, 薬剤の臨床的有効性を判断する場合での MIC 値の信頼性を低下させる原因となっている。

#### IV. Vancomycin 耐性菌はなぜ vancomycin 治療に對抗できるか

VRE と比較した場合, VRSA の MIC は 8  $\mu$ g/mL と非常に低い。しかし, 実際にこれら VRSA による感染症を vancomycin で治療するのは困難である。この理由として, 1) vancomycin の組織移行性が低いこと, 2) staphylococci に対する殺菌活性が低いこと, 3) 効率の悪い作用機序, が挙げられる。以下順に vancomycin の治療に影響をあたえるこれらのファクターについて述べる。

##### 1. Vancomycin の組織内濃度

Vancomycin 0.5 g を静脈内に単回投与した場合の患者の喀痰中の vancomycin 濃度は 2.46~2.49  $\mu$ g/ml あるいはそれ以下と報告されている<sup>68,69)</sup>。1995 年に日本で MRSA 肺炎に対する vancomycin の効果についてサーベイランスを行った結果では, vancomycin の治療の有効率は 78.2% であったことが報告されている<sup>70)</sup>。同時

に調査した症例の64.2%しか vancomycin の治療後除菌に成功していない。この十分とはいえない vancomycin の治療効果は、vancomycin の喀痰中への移行の限界を反映している。

膿瘍の場合では、1日に2gの vancomycin を数回にわけて投与した場合に、5 $\mu$ g/mLの vancomycin 濃度となることが報告されている<sup>71)</sup>。Fig. 3に示す Mu 50 のポピュレーション曲線から判断すると、Mu 50の1%はこのような条件下(5 $\mu$ g/mLの vancomycin 濃度)でも生存できる。

喀痰や膿瘍中の vancomycin 濃度が非常に低いのに比べて、尿、腹腔などの場合には、非常に高い濃度となることが報告されている。

尿中には、vancomycin は活性型で排出されるが、0.5gの vancomycin を静脈内投与した場合に200 $\mu$ g/ml以上の濃度が12時間まで継続する<sup>72)</sup>。CAPD 腹膜炎の場合には、透析液に注入することにより1,000 $\mu$ g/mlの濃度まで vancomycin 濃度を上げることができる<sup>73)</sup>。このように vancomycin が高濃度に保持されると、もはや菌は、そのような状況下で生存できなくなると思われるが、実際には、腹膜炎などの場合に、vancomycin を多量に投与しても staphylococci を除去できなかった例が報告されている<sup>41,49)</sup>。これはおそらく vancomycin に対するトレランスが発現した菌によるためか、あるいは炎症を起こしている組織や白血球の中に菌が入り、vancomycin の作用を免れたためと推測されている<sup>74)</sup>。

## 2. Vancomycin の殺菌活性

院内感染が問題となる患者は多くの場合、術後、低栄養状態など抵抗力が落ちた状態にあり、また他の基礎疾患を持っている。このような患者にとって望ましい薬剤は宿主の免疫系の助けを借りなくとも起因菌を殺すことができる強力な殺菌力をもった薬剤である。しかし残念なことに、vancomycin による *S. aureus* の殺菌速度は大変遅い<sup>75,76)</sup>。vancomycin に感受性 (MIC < 1 $\mu$ g/mL) の日本で分離された MRSA を殺菌するのに、10<sup>5</sup>の菌を殺菌するのに24時間以上を要する<sup>76)</sup>。Chambers はウサギで MRSA による心内膜炎を起させ、それを治療する実験を行って抗菌薬の治療成績を比較し、vancomycin (および teicoplanin) はあまり有効でないこと<sup>77)</sup>、むしろ $\beta$ -ラクタム系薬剤のほうがしばしば vancomycin よりも勝っていたことを報告している<sup>78)</sup>。臨床例においても、MRSA による心内膜炎の治療に vancomycin を投与した場合に、効果があらわれるまでに非常に長期間を要したことが報告されている<sup>78)</sup>。もう1つの臨床例の報告は、Gopal らによってなされたが、vancomycin 治療失敗例から分離された *S. aureus* は MIC では 0.78 $\mu$ g/mL であったが、MBC は 25 $\mu$ g/mL であった<sup>79)</sup>。この場合、この *S. aureus* に対し、vancomycin の殺菌力がおよばないこと (トレランス) が治療失敗の大きな

原因と考えられた。

## 3. Vancomycin の作用部位

Vancomycin および他のグライコペプチドの作用機作は他の抗菌薬と著しく異なっている。たとえば $\beta$ -ラクタム系抗生物質の場合、その標的はペニシリン結合蛋白 (PBP) であり、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質は PBP に結合することによりペプチドグリカンの架橋 (transpeptidation) を阻害する<sup>80)</sup>。1つの細胞のなかで細胞質に存在する PBP の数は大腸菌の場合ではそれぞれの PBP がおよそ100~800存在し<sup>81)</sup>、*S. aureus* の場合には4個の PBP がそれぞれ200~800存在すると報告されている (Pucci, M., personal communication)。

アミノ糖系抗生物質、マクロライド系薬剤やテトラサイクリン系薬剤のような蛋白合成阻害剤の場合には、リボゾームに結合してその蛋白合成を阻害する。1つの細胞あたりのリボゾームの数はその細胞の増殖速度によって異なるが、大腸菌 B/r の場合ではおよそ  $6.8 \times 10^3 \sim 7.2 \times 10^4$  である。これらの抗生物質が、細菌の生体高分子の合成に関与する酵素やその器官に結合して作用をおよぼすのに対して、vancomycin の場合は、逆に、酵素の基質に結合することにより、酵素反応を阻害している。すなわち vancomycin は transglycosylase の基質に結合することにより transglycosylation (細胞膜の外側に転座したムレインモノマー前駆体—Lipid II 複合体からムレインモノマーが新しいペプチドグリカン鎖に付加される反応) を阻害する (Fig. 8)。Vancomycin の作用部位はムレインモノマー末端の D-アラニル-D-アラニンである (Fig. 9)。ここで問題となるのはこの D-アラニル-D-アラニンがすでに合成された細胞壁中に多数存在していることである<sup>82)</sup>。細胞壁合成過程で、transpeptidase 酵素による架橋反応においては、この末端の D-アラニル-D-アラニンから末端の D-アラニンが除去され2番目の残りの D-アラニンがペンタグリシンと結合して架橋が形成されるため、必然的に D-アラニル-D-アラニンの数が減少する。*S. aureus* の細胞壁はこの架橋形成が行われた結果、多くの架橋が形成されるのであるが、それでもなお20~30%のペプチドグリカンサブユニット (disaccharide-peptide) は末端に D-アラニル-D-アラニンをもっていると報告されている<sup>81)</sup>。もしも20%のペプチドグリカンサブユニットが架橋されていないとすれば、それぞれの *S. aureus* の細胞はおよそ  $6 \times 10^6$  の vancomycin 結合部位を持っていることになる (Labischinski H, personal communication)。このように考えると、10<sup>8</sup>個の *S. aureus* には1.44 $\mu$ gの vancomycin (MW, 1,449.27) が結合する計算になる。このように vancomycin が結合できる非常に多くの、いわば「副次的」な作用部位が、vancomycin が本来の作用部位に到達する途上に存在することになり、非常に多くの vancomycin 分子が殺菌活性を発揮す

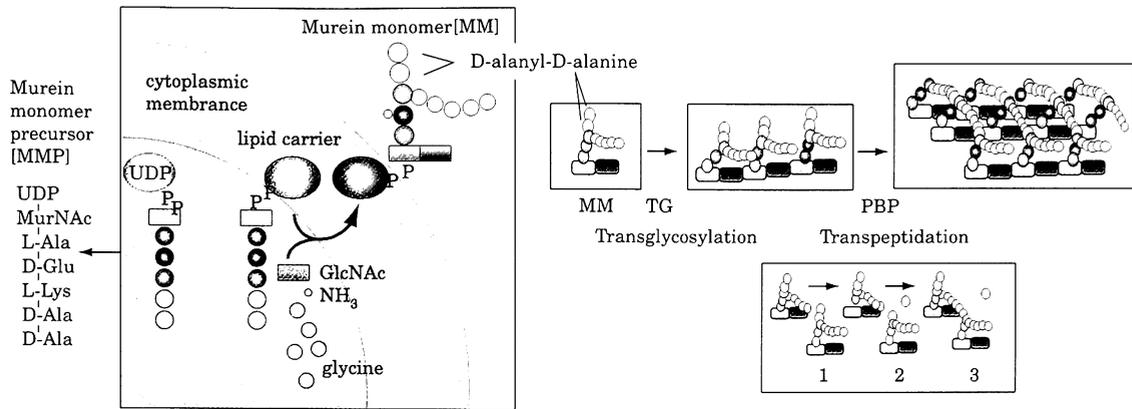


Fig. 8. Schematic illustration of cell-wall synthesis pathway: L-Ala, L-alanine; D-Glu, D-glutamic acid; L-Lys, L-Lysine; D-Ala, D-alanine; TG, transglycosylase. For explanation, see text.

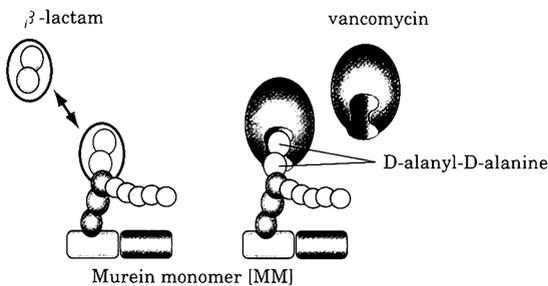


Fig. 9. Schematic illustration of interrelationship among  $\beta$ -lactam antibiotics, vancomycin and MM. Vancomycin forms complexes with murein monomer and prevents incorporation of murein monomer into the cell wall, whereas  $\beta$ -lactams interact with cell-wall biosynthetic enzymes and prevent their action.

ることなく、細胞壁のなかで消費されてしまうのである。Vancomycin の殺菌活性の本当の標的部位の数は、対数増殖期にある大腸菌の Lipid II 前駆体の数が 1,000~2,000 であるというデータから類推することができるが、この「副次的」な作用部位は、その 2~3 オーダー高い<sup>82)</sup>。

この「副次的」な作用部位の存在が、*in vitro* および *in vitro* での vancomycin の活性にさまざまな影響を与えている。グライコペプチド一般に当てはまることであるが、いくつかの考えられる問題点を以下に述べる。

(a) 患者の感染部位に多くの細菌がいた場合、細胞壁中の「副次的」な作用部位の数の増加により、vancomycin の消費量が増加した結果、作用部位に到達する vancomycin の量が減少し、その抗菌力は低下する。(b) もしもある菌の細胞が細胞壁の中により多くの D-アラニル-D-アラニン末端を持つようになれば、その菌を殺菌するためにはより多くの vancomycin が必要となる。(c) 接種菌量が多いと、より多くの vancomycin が消費されるので、感受性試験のときには、接種菌量に十分注意する必要がある<sup>83)</sup>。このうち (b) が現在問題となっている VRSA の耐性機構と関連している。

## V. Vancomycin 耐性の機構

Mu 50 株においても Mu 3 株においても、enterococci における vancomycin 耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*, および *vanC*) などのペプチドグリカンにおける D-アラニル-D-アラニン残基数を減少させるような遺伝子群は存在しない<sup>84)</sup>。これらの株のペプチドグリカンを精製し、精製したペプチドグリカンの vancomycin 結合能を比較してみると (これは、ペプチドグリカンにおける D-アラニル-D-アラニン残基数の数を反映する)、Mu 50 の精製ペプチドグリカンの 1 mg への vancomycin の結合量は FDA 209 P や H 1 などの VSSA 株と比較した場合 1.6~2.4 倍多い<sup>84)</sup> (Fig. 10)。Mu 3 は VRSA と VSSA の中間の値を示す。細胞壁の構成を HPLC により分析すると、Mu 50 のペプチドグリカンにおいては架橋数が著しく減少している。すなわち、細胞壁の D-アラニル-D-アラニンの増加が vancomycin の結合能を上昇させている結果とよく相関している<sup>84)</sup>。

Mu 50 の透過型電子顕微鏡像からは Mu 50 の細胞壁が VSSA と比較して少なくとも 2 倍は厚いことが観察される (Fig. 11)。この細胞壁の肥厚は Mu 3 の場合には顕著ではない。厚い細胞壁が観察されることは、Mu 50 では細胞壁合成が活性化されていることを示唆している。Mu 50 の場合でも Mu 3 の場合でも N-アセチルグリコサミン (細胞壁中のペプチドグリカンの主要な構成成分の 1 つ) の細胞内への取り込みが増加することが確認される。さらに Mu 50 の場合、グルコースの細胞壁への取り込みも著しく亢進している (Cui et al. submitted)。同様に細胞質におけるムレインモノマー前駆体量は、両菌株の場合とも増加することが認められている<sup>84)</sup>。これらのことは、細胞壁合成の促進が 2 つの株とともにみられるが、その程度は Mu 50 の場合の方がさらに大きいことを示している。

両菌株の PBP 2 および PBP 2' の産生量は VSSA 株と比較した場合 3~8 倍増加していた<sup>85)</sup>。しかしこれら

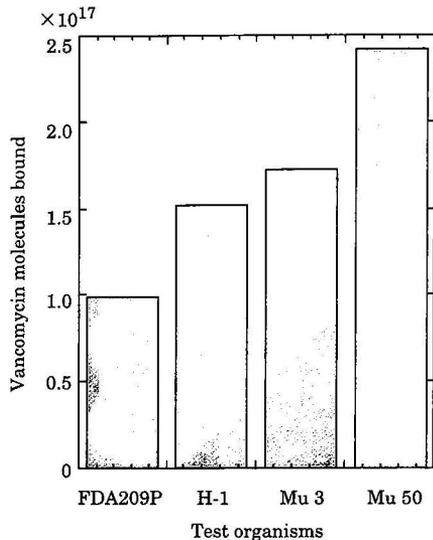


Fig. 10. Vancomycin-binding capacity of purified peptidoglycan. The number of vancomycin molecules adsorbed to 1 mg of purified peptidoglycan was compared among Mu 50, Mu 3, H 1, and FDA 209 P (from Hanaki H, et al., 1998 b).

の株が *mecA* を失っても vancomycin 耐性は変化しないことから PBP 2' の過剰産生は, vancomycin 耐性に寄与していないと考えられた<sup>85)</sup>。反対に PBP 2 の場合は, vancomycin, teicoplanin 耐性の上昇に大きく関与しており, 特に teicoplanin 耐性への貢献度が大きい<sup>85)</sup>。

以上の結果より, Mu 50 はペプチドグリカン合成の速度をあげ, 細胞壁の肥厚を起し細胞壁成分を増量させることにより vancomycin 耐性を獲得したと考えることができる。すなわち VRSA, Mu 50 は細胞壁合成システムに変異を起こした結果, 肥厚した細胞壁(細胞壁成分全体の増加と架橋数の減少にもとづいて増加した D-アラニル-D-アラニン残基を持つ異常な細胞壁)を形成し, その結果細胞壁中の vancomycin の結合部位が増加し, vancomycin がその真の作用部位まで到達するのを妨げることにより耐性を発現したと考えられる。われわれは, このメカニズムを vancomycin の affinity trapping メカニズムと呼ぶことを提唱している<sup>86)</sup>。

このような Mu 50 の細胞によって供給される増加したムレインモノマー末端の D-アラニル-D-アラニン残基に消費されてもなお細胞壁合成阻害作用を発揮するためには, 数倍の vancomycin 濃度が必要であることになる。

諸外国で分離されたいくつかの VRSA 株を Mu 50 と比較した場合, まったく同一の性質ではないことがすでに明らかとなっている。Michigan 株 (CDC, 1997 b, c) の場合, 細胞壁の肥厚と架橋の減少は Mu 50 および Mu 3 と同様に見られるが, PBP 2 量は増加せず, その自己溶菌酵素の活性は Mu 50 と比べてはるかに低い (Kuwahara K, 未発表データ)。このことは同じ MIC を示す vancomycin 耐性菌の場合でも, vancomycin 耐性の機

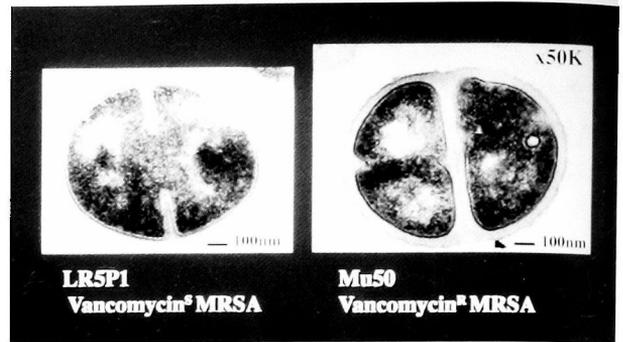


Fig. 11. Transmission electron microscopy of Mu 50 (VRSA) in comparison with LR 5 P 1 (VSSA strain). The cell wall of Mu 50 is twice as thick as that of LR 5 P 1.

構は異なっている可能性が強い。しかし, 米国由来の株と Mu 50 に共通に見られる特徴は, 肥厚した細胞壁とその架橋の減少であり, これが affinity trapping による vancomycin 耐性の共通のメカニズムである可能性が強い。この2つの特徴を引き起こす細胞壁合成系の変異には2通りの異なる種類があることがわかってきている (Cui et al., in preparation)。

#### VI. Teicoplanin 耐性との相関

Mu 50 および Mu 3 はともに teicoplanin に耐性を示し, その MIC は 8~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である。これらの株は VSSA と比較して 3~5 倍量の PBP を産生する<sup>85)</sup>。PBP 2 の過剰産生は, teicoplanin 耐性に関しての寄与は大きい, vancomycin 耐性への寄与は小さい<sup>85)</sup>。PBP 2 遺伝子をコピー数の多いプラスミドにクローニングし, *S. aureus* にエレクトロポレーションにより挿入し PBP 2 の産生量を増加させる実験を行ったところ, teicoplanin に対する MIC は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に増加したが, vancomycin に対する MIC は単に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に増加したのみであった。したがって, この2つの薬剤は構造上同じグライコペプチドに分類され, その作用機作も同じと考えられているが, このように, 実際には両者に明白な違いがある。前述したように, 歴史的にも, teicoplanin 耐性は, vancomycin 耐性にさきだって出現している。

#### VII. Methicillin 耐性との相関

日本において, MRSA が広く分離されるようになったのは 1980 年代の初期のことである (Tanaka, et al., 1995)。しかしその MRSA の治療薬として vancomycin の注射剤が使用されるようになったのは 1991 年であり, arbekacin の実用化は 1990 年のことであった。したがって, この2つの薬剤が使用される以前の MRSA の治療は, 日本では抗菌力の強い imipenem, flomoxef, cefmetazole などを使用されてきた。その結果クロナイプ II-A のヘテロタイプ MRSA は, 数年を経ずして, 1990 年代には, そのほとんどがホモタイプの MRSA となっている<sup>87)</sup>。これが現在日本で分離されるもっとも数

の多い MRSA のタイプであり、1994 年分離 MRSA の 70% 以上を占める<sup>89)</sup>。非常に興味深いことに、clonotype II-A のヘテロ MRSA を imipenem, flomoxef, cefmetazole などの強力な  $\beta$ -ラクタム系薬で選択してホモ耐性になった株の 5~10% は、vancomycin に対する耐性も上昇している (Takahashi J, 未発表データ)。ポピュレーション解析で測定した耐性の程度は、ヘテロ VRSA と同等であった。この  $\beta$ -ラクタム系薬選択実験におけるヘテロ VRSA の出現頻度はおよそ  $10^6$  に 1 個の割合であった。このことは、日本においては  $\beta$ -ラクタム系薬の選択がかかった 1980 年代の後半から、ヘテロ VRSA が出現してきた可能性を示唆している。実際に 1980 年代後半の分離株から、ヘテロ VRSA がかなりの頻度で分離されている (Hiramatsu K, 未発表)。

Sieradzki と Tomasz (1996) は、vancomycin 耐性菌を得るために MRSA, COL 株を、繰り返し vancomycin 平板上に塗布した場合、methicillin に対する耐性度が極度に減少した株が得られると報告した<sup>88)</sup>。この変異株の細胞壁の架橋度は著しく減少していた。一般に、細胞壁の架橋度が極端に減少した場合には、 $\beta$ -ラクタム系薬はより強い殺菌効果を示すと考えられる。しかし、臨床分離株である Mu 3 および Mu 50 の場合には、細胞壁の架橋度が減少しているにもかかわらず、methicillin には高度耐性を示す (MIC は  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上である)。日本の MRSA は、1980 年代に使用頻度の高かったカルバペネム、セフェムなど  $\beta$ -ラクタム系薬の選択を常に受け methicillin 高度耐性化した MRSA であり、そのなかから vancomycin 耐性株が出現してきたという歴史的経緯を忘れてはならない。

### VIII. $\beta$ -ラクタム系薬との拮抗

日本では、vancomycin は、MRSA 感染症の治療に、また緑膿菌などが混合感染している場合には特に  $\beta$ -ラクタム系薬と併用されてきた。vancomycin と  $\beta$ -ラクタム系薬との併用効果を検討した場合、Mu 50 の場合には相加効果が見られた (vancomycin と cefpirome の FIC index は 0.375 であり、vancomycin と sulbactam/ampicillin の FIC index は 0.5 である) (Hiramatsu K, 未発表)。しかし、ヘテロ VRSA である Mu 3 の場合には、vancomycin と cefpirome の FIC index は 2.004 であり、vancomycin と sulbactam/ampicillin の FIC index は 2.016 と明らかに拮抗が見られた<sup>89)</sup>。

Fig. 12 は  $\beta$ -ラクタム系薬含有 paper disk を用いた Mu 3 に対する vancomycin と  $\beta$ -ラクタム系薬の併用効果を見たものである。disk 周辺に菌が生育し、両薬剤の効果が拮抗しているのがわかる。この現象はヘテロ VRSA, Mu 3 だけではなく、日本で分離された多くのヘテロ VRSA 株に共通して見られたので、この原理を応用し、ヘテロ VRSA の簡易検出法として Mu 3 培地が開発された<sup>90)</sup>。

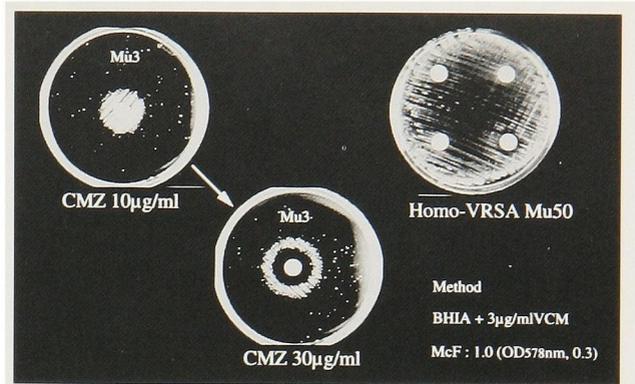


Fig. 12. Antagonism of vancomycin and  $\beta$ -lactam combination for hetero-VRSA strain. Mu 3 cells were spread on BHI agar plate containing  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  of vancomycin, and disks containing  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$  of cefmetazole were placed on the plate, and the plate was incubated 48 h at  $37^\circ\text{C}$ .

さきに述べたようなヘテロ VRSA の定義にもとづくと、理論的に確実なヘテロ VRSA の検出法はポピュレーション解析 (およびその簡便法) であるが、細菌検査室で行うにはやや煩雑すぎる欠点がある。そのために、検査室でも対応可能なヘテロ VRSA の検出方法として Mu 3 培地は有用な検出法の 1 つである。

### IX. おわりに

現在、世界中で MRSA の治療薬として vancomycin の使用量が増加している。Vancomycin の大量使用は、VRE の蔓延を招くばかりでなく、今後さらに多くの VRSA およびヘテロ VRSA を生み出す危険性をはらんでいる。いったん vancomycin 耐性菌が生じると、その次に考えられるステップはそのなかでもっとも病院内の環境に適した菌株が選択され、院内感染の起因菌となることである。そのような状況の出現を避けるため、少なくとも遅らせるために、MRSA 感染症への  $\beta$ -ラクタム系薬の使用を避け、vancomycin の適正使用に心がけ、感染症治療以外 (たとえば、退院時の除菌のためなど) には使用しないようにすることが求められている<sup>91,92)</sup>。

### 文 献

- 1) Jevons M P: "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Medical Journal*. 1: 124~125, 1961
- 2) Edmond M B, Wenzel R P, Paxculle A W: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Perspectives on measures needed for control. *Annals of Int. Med.* 124: 329~334, 1996
- 3) Tanaka T, Okuzumi K, Iwamoto A, et al.: A retrospective study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains in Tokyo University Hospital. *J. Infect. Chemother.* 1: 40~49, 1995
- 4) Matsushashi M, Song M D, Ishino F, et al.: Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 167: 975~980, 1986

- 5) Song M D, Wachi M, Doi M, et al. : Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Letter. 221: 167~171, 1987
- 6) Hartman B J, Tomasz A: Low-affinity penicillin-binding protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 158: 513~516, 1984
- 7) Reynolds P E, Fuller C: Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. FEMS Microbiological Letter. 33: 251~254, 1986
- 8) Utsui Y, Yokota T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 28: 397~403, 1985
- 9) Beck W D, Berger-Bachi B, Kayser F H: Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. Journal of Bacteriology. 165: 373~378, 1986
- 10) Hiramatsu K: Molecular evolution of MRSA. Microbiology and Immunology. 39: 531~543, 1995
- 11) Ryffel C, Bucher R, Kayser F H, et al.: The *Staphylococcus aureus mec* determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for a gene product similar to the *Escherichia coli sn*-glycerophosphoryl diester phosphodiesterase. Journal of Bacteriology. 173: 7416~7422, 1991
- 12) Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K: Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N 315 Antimicrobial Agents and chemotherapy 43: 1449~1458, 1999
- 13) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: in preparation.
- 14) Hiramatsu K, Ito T, Kondo N: Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. Journal of Intection and Chemotherapy. 2: 117~129, 1996
- 15) Yoshida T, Kondo N, Abu Y et al. : Combined use of ribotyping, PFGE typing and IS 431 typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 41: 687~695, 1997
- 16) Hashimoto H, Inoue M, Hayashi I: A survey of *Staphylococcus aureus* for typing and drug-resistance in various areas of Japan during 1992 and 1993. Japanese Journal of Antibiotics. 47: 618~626, in Japanese, 1994
- 17) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. 350: 1668~1671, 1997
- 18) Pallanza R, Berti M B, Goldstein P, et al.: Teichomycin: in-vitro and in-vivo evaluation in comparison with other antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 11: 419~425, 1983
- 19) Tuazon C U, Miller H: Comparative in vitro activities of teichomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and aminoglycosides against staphylococci and enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 411~412, 1984
- 20) Verbist L, Tjandramaga B, Hendrickx B, et al.: In vitro activity and human pharmacokinetics of teicoplanin. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 881~886, 1984
- 21) Fainstein V, LeBlanc B, Bodey G P: Comparative in vitro study of teichomycin A 2. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 497~499, 1983
- 22) Wilson A P R, O'Hare M D, Felmingham D, et al.: Teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococcus. Lancet. ii: 973, 1986
- 23) Arioli V, Pallanza R: Teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. Lancet. ii: 39, 1987
- 24) Del Bene V E, John J F Jr, Twitty J A, et al.: Anti-staphylococcal activity of teicoplanin, vancomycin, and other antimicrobial agents: The significance of methicillin resistance. J. Infect. Dis. 154: 349~352, 1986
- 25) Grant A C, Lacey R, Brownjohn A M, et al.: Teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococcus. Lancet. 2: 1166~1167, 1986
- 26) Moore E P, Speller D C E: In vitro teicoplanin resistance in coagulase negative staphylococci from patients with endocarditis and from a cardiac surgery unit. J. Antimicrob. Chemother. 21: 417~424, 1988
- 27) Maugein J, Pellegrin J L, Brossard G, et al.: In vitro activities of vancomycin and teicoplanin against coagulase-negative staphylococci isolated from neutropenic patients. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 901~903, 1990
- 28) Vedel G, Leruez M, Lemann F, et al.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci with decreased sensitivity to glycopeptides as assessed by determination of MICs. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 820~822, 1990
- 29) Mouton R P, Mulders S L: LY 146032: activity and resistance development in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 20: 513~517, 1987
- 30) Watanakunakorn C: In vitro induction of resistance in coagulase-negative staphylococci to vancomycin and teicoplanin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 22: 321~324, 1988
- 31) Watanakunakorn C: In-vitro selection of resistance of *Staphylococcus aureus* to teicoplanin and vancomycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 25: 69~72, 1990
- 32) Watanakunakorn C: Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 14 (Suppl. D): 7~18, 1984
- 33) Chomarar M, Espinouse D, Flandrois J-P: Coagulase-negative staphylococci emerging during teicoplanin therapy and problems in the determination of their sensitivity. J. Antimicrob. Chemother. 27: 475~480, 1991
- 34) Parenti F, Beretta G, Berti M, et al.: Teichomycin, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyeticus*, nov. sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties. J. Antibiot. 31: 276~281, 1978
- 35) Griffith R S: Vancomycin use—an historical review. J. Antimicrob. Chemother. 14 (Suppl. D): 1~5,

- 1984
- 36) 加藤大典, 花木秀明, 雀 龍沫, 他: 臨床分離コアグラゼ陰性ブドウ球菌のグリコペチド耐性抗生物質に対する感受性についての検討。The Japanese Journal of antibiotics. 51: 735~745, 1998
- 37) Schwalbe R S, Stapleton J T, Gilligan P H: Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. New England Journal of Medicine. 316: 927~931, 1987
- 38) Schwalbe R S, Ritz W J, Verma P R, et al.: Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. J. Infect. Dis. 161: 45~51, 1990
- 39) Froggatt J W, Johnston J L, Galetto D W, et al.: Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 460~466, 1989
- 40) Veach L A, Pfaller M A, Barrett M, et al.: Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. Journal of Clinical Microbiology. 28: 2064~2068, 1990
- 41) Sanyal D, Johnson A P, George R C, et al.: Peritonitis due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Lancet. 337: 54, 1991
- 42) Kaatz G, Seo S M, Dorman N J, et al.: Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. J. Infect. Dis. 162: 103~108, 1990
- 43) Shlaes D, Shlaes D H: Teicoplanin selects for *Staphylococcus aureus* is resistant to vancomycin. Clinical Infectious Diseases. 20: 1071~1072, 1995
- 44) Bailey E M, Rybak M J, Kaatz G W: Comparative effect of protein binding on the killing activities of teicoplanin and vancomycin. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1089~1092, 1991
- 45) Serzin V, Mougeot C, Libert J M: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptides: in vitro selection of resistance. Path. Biol. 42: 323~327, 1994
- 46) Brunet G, Vedal G, Dreyfus F, et al.: Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicemia who recovered after administration of vancomycin. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 145~147, 1990
- 47) Mainardi J-L, Shlaes D M, Goering R V, et al.: Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 171: 1646~1650, 1995
- 48) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 40: 135~136, 1997
- 49) Tenover F C, Lancaster M V, Hill B C, et al.: Characterization of staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. Journal of Clinical Microbiology: in press.
- 50) CDC: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. Morbidity Mortality Weekly Report. 46: 765~766, 1997
- 51) CDC: Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. Morbidity Mortality Weekly Report. 46: 813~815, 1997
- 52) Smith T L, Pearson M L, Wilcox K R, et al.: Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. The New England Journal of Medicine 340: 493~501, 1999
- 53) Ploy M C, Grelaud C, Martin C, et al.: First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 351: 1212, 1998
- 54) Tanaka M, Wada N, Kurosaka S M, et al.: In-vitro activity of DU-6859 a against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduces susceptibilities to vancomycin. J. Antimicrob. Chemother. 42: 552~553, 1998
- 55) Barber M: Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci. J. Gen. Microbiol. 35: 183~190, 1964
- 56) Dyke K G H: Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in methicillin-resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 2: 261~278, 1969
- 57) Sabath L D, Wallace S J: Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Ann. New York Acad. Sci. 182: 258~266, 1971
- 58) Asada K, Inaba Y, Tateda-Suzuki E, et al.: Evolution and resistance expression of MRSA; evaluation of beta-lactam antibiotics against a set of isogenic strains with different types of phenotypic expression. Acta Biochimica Polonica. 42: 517~524, 1995
- 59) Ryffel C, Strassle A, Kayser F H, et al.: Mechanism of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 724~728, 1994
- 60) Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, et al.: Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40: 2680~2685, 1996
- 61) Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, et al.: Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). FEBS Letter. 298: 133~136, 1991
- 62) Tesch W, Ryffel C, Strassle A, et al.: Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1703~1706, 1990
- 63) Tomasz A, Nachman S, Leaf H: Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 124~129, 1991
- 64) Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, et al.: Methicillin resistance regulation of the prototype MRSA strain N 315., p.191~193. In Mollby R, Flock J-I, Nord C E, Christensson B (ed.), Staphylococci and

- Staphylococcal Infections. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994
- 65) Courvalin P: Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 34: 2291~2296, 1990
- 66) Swenson J M, Clark N C, Ferraro M J, et al.: Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1700~1704, 1994
- 67) Boyce J M, Medeiros A A, Hiramatsu K: Clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from the United States with subpopulations of cells with reduced susceptibility to vancomycin. 37th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. abstr. LB-15, 1997
- 68) Nakatani T: Pharmacokinetic study in respiratory infection. *Antibiot. Chemother.* 10: 425~432, 1994
- 69) Niitsuma K, Saito M: Vancomycin inhalation therapy—A pharmacokinetic and clinical study of vancomycin. *Antibiot. Chemother.* 12: 123~135, 1996
- 70) Shimada K, Kobayashi H, Sunakawa K, et al.: Clinical summary of intravenous use of vancomycin hydrochloride for severe infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemother.* 43: 1048~1061, 1995
- 71) Torres J R, Sanders C V, Lewis A C: Vancomycin concentration in human tissues: preliminary report. *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 475~477, 1979
- 72) Nakashima M, Katagiri K, Oguma T: Phase I studies on vancomycin hydrochloride for injection. *Chemother.* 40: 210~224, 1992
- 73) Milliken S P, Matzke G R, Keane W F: Antimicrobial treatment of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 11: 252~260, 1991
- 74) Buggy B P, Schaberg B P, Swatz R D: Intraleukocytic sequestration as a cause of persistent *Staphylococcus aureus* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Med.* 76: 1035~1040, 1984
- 75) Chambers H F: Parenteral antibiotics for the treatment of bacteremia and other serious Staphylococcal infections., p.583~601. In Crossley K B, Archer G L (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, 1996
- 76) Yoshida T, Hiramatsu K: Potent in vitro bactericidal activity of polymyxin B against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol. Immunol.* 37: 853~859, 1993
- 77) Chambers H F, Sande M A: Teicoplanin versus nafcillin and vancomycin in the treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 61~64, 1984
- 78) Levine D P, Fromm B S, Reddy B R: Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *An. Int. Med.* 115: 674~680, 1991
- 79) Gopal V, Bisno A L, Silverblatt F J: Failure of vancomycin treatment in *Staphylococcus aureus* endocarditis. *JAMA.* 236: 1604~1606, 1976
- 80) Spratt B G: Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 2999~3003, 1975
- 81) Dougherty T J, Kennedy K, Kessler R E, et al.: Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 6110~6117, 1996
- 82) Van Heijenoort J: Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit, p.39~54. In Ghuysen J-M, Hakenbeck R (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV, 1994
- 83) Greenwood D: Microbiological properties of teicoplanin. *J. Antimicrobiol Chemother* 21 (Suppl. A): 1~13, 1988
- 84) Hanaki H, Labischinski H, Inada Y, et al.: Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu 50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42:315~320, 1998
- 85) Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, et al.: Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu 3 and Mu 50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42: 199~209, 1998
- 86) Hiramatsu K, Hanaki H: Glycopeptide resistance in staphylococci. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 11: 653~658, 1998
- 87) Tanaka T, Okuzumi K, Iwamoto A, et al.: A retrospective study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains in Tokyo University Hospital. *Journal of Infection & Chemotherapy* 1: 40~49, 1995
- 88) Sieradzki K, Tomasz A: highly vancomycin-resistant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiological Letter.* 142: 161~166, 1996
- 89) 稲葉陽子, 花木秀明, 高橋順子, 他: Vancomycin に対する *Staphylococcus aureus* のヘテロ耐性のメカニズムと簡易検出法の検討. *日化療会誌* 47: 339~343, 1999
- 90) 花木秀明, 平松啓一: バンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌の検出方法. *Jap. J. Antibiot.* 51: 521~530, 1998
- 91) CDC: Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. *Morbidity Mortality Weekly Report* 46: 626~628, 635, 1997
- 92) Wenzel R P, Edmond M B: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. *Clinical Infectious Diseases* 27: 245~251, 1998

## Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

Teruyo Ito, Hideaki Hanaki and Keiichi Hiramatsu

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University,  
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

Recent emergence of vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) has posed a new threat to hospital infection control and antibiotic chemotherapy. The first vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain, Mu 50, was isolated in 1996. The level of resistance in VRSA, as judged by minimal-growth inhibitory concentration ( $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), is low compared to that of vancomycin-resistant enterococci (VRE). Hetero-VRSA strains exhibit vancomycin MIC levels equal to or less than  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ , but, they show a heterogeneous type of resistance to vancomycin. Exposure of hetero-VRSA to concentrations of vancomycin of  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  or higher reproducibly generates VRSA with a frequency of  $10^{-6}$  or higher. This article provides an historical overview of the emergence of glycopeptide resistance in staphylococci and considers its mechanism of resistance.