

原著論文

津山中央病院で臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 の抗菌薬感受性と性状に関する経年分析

三宅悠太¹⁾, 山田陽一¹⁾*, 杉本(和田)朋子²⁾, 筆保智子³⁾, 杉山哲大²⁾, 塩田澄子¹⁾

¹⁾ 就実大学薬学部分子生物学研究室, ²⁾ 津山中央病院薬剤部, ³⁾ 同・臨床検査部

The characteristics and over time analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinically isolated at Tsuyama Chuo Hospital

Yuta Miyake¹⁾, Yoichi Yamada¹⁾*, Tomoko Wada-Sugimoto²⁾, Tomoko Fudeyasu³⁾,
Tetsuhiro Sugiyama²⁾, Sumiko Shiota¹⁾

¹⁾ Department of Molecular Biology, School of Pharmacy, Shujitsu University

²⁾ Department of Pharmacy, Tsuyama Chuo Hospital

³⁾ Department of Clinical Laboratory, Tsuyama Chuo Hospital

(Received 31 October 2022; accepted 8 January 2023)

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the causative bacteria of nosocomial infections. In order to investigate the changes in MRSA over time, we collected strains at Tsuyama Chuo Hospital from May of 2011 to November of 2012 (period 1), in 2015 (period 2), and 2018 (period 3). In this study, MRSA strains isolated in periods 1 and 3 were used and these strains were divided as hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) and community-acquired MRSA (CA-MRSA), respectively. Antimicrobial susceptibility to clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX) and cefcapene pivoxil (CFPN-PI) was measured using MIC. All HA-MRSA strains were resistant to these antibiotics in both period 1 and 3. On the other hand, for CA-MRSA, the number of strains that showed a high resistance to CAM or LVFX increased in period 3. In period 1, the main strains isolated in the hospital were HA-MRSA, but in the period 3, they were replaced by CA-MRSA. It was found that CA-MRSA isolated in period 3 had a high biofilm (BF) formation rate (BF value). When the growth rate of CA-MRSA strains isolated in period 3 that showed high or low BF value were measured, there was no difference in the growth rate among these strains. These results suggest that BF value contributed to the establishment of CA-MRSA in hospitals rather than the growth rate.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, antimicrobial susceptibility, biofilm formation_

緒言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)は、院内に

において、易感染者に菌交代症や日和見感染症を引き起こす主な起因菌であり、多くの抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌である。MRSA の β -ラクタム系抗菌薬への耐性は、黄色ブドウ球菌が遺伝子 (*mecA*) を含む可動性遺伝因子である DNA 断片 (*SCCmec*) を獲得することで生み出される。*SCCmec* 型は院内感染型 MRSA (HA-MRSA) では、II型が主要な型であり、ほとんどが多剤耐性株として分離されている。市中感染型 MRSA (CA-MRSA) の *SCCmec* 型ではIV型が主要であり、 β -ラクタム系薬以外の抗菌薬には比較的感受性を示す。主に若年者や小児に感染者が多く、皮膚や軟部組織に感染することが報告されている¹⁾。

MRSA の菌株を同定する方法に、Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析や PCR-based Open Reading Frame Typing (POT) 法がある。MLST 解析では 7 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列の多型を利用する。得られた塩基配列は MLST のデータベースと照合し、ST 型を決める²⁾。国内の病院では ST5 かつ *SCCmec* II型が大多数を占めていた。また近年、問題となっている CA-MRSA は ST8 かつ *SCCmec* IV型が多い。POT 法とは菌株ごとに保有状態が異なる Open Reading Frame の保有パターンを PCR で検出し、菌株の遺伝子型を決定する遺伝子解析法である。同一菌株では POT1-POT2-POT3 のすべての数値が一致する。また POT 法では *SCCmec* 上の遺伝子を検出することにより、*SCCmec* 型も推定できる³⁾。

本研究室では、1期 (2011年5月~2012月11月)、2期 (2015年) に津山中央病院で臨床分離された MRSA 株を用いて、臨床現場における CA-MRSA の増加とバイオフィーム形成能の関連を検討し、報告している⁴⁾。

今回は新たに 3 期として、2018 年の一年間に臨床分離された MRSA を POT 法により決定し、HA-MRSA と CA-MRSA に分類した。2016 年に、薬剤耐性菌 (AMR) アクションプランが示された⁵⁾。アクションプランでは、経口セファロsporin 系薬、フルオロキノロン系薬、マクロライド系

薬の使用量削減が成果指標として示されている。このことから、1期と3期の MRSA について、それぞれの系からセフカペンピボキシル (CFPN-PI)、レボフロキサシン (LVFX) 及びクラリスロマイシン (CAM) を選び、それら抗菌薬に対する薬剤感受性を測定し比較した。次に MRSA はバイオフィーム (BF) を形成し、院内における医療器具関連感染症等引き起こすことが知られていることから⁶⁾、病原因子の一つである BF の形成能 (BF 値) を測定し、1期と3期で比較した。また、MRSA の院内への定着に関して、BF 値以外に MRSA の生育速度が関わると考え MRSA の世代時間を測定した。以上の結果を薬剤感受性及び性状の経年分析として報告する。

方法

1. 菌株

津山中央病院で 1 期 (2011 年 5 月~2012 月 11 月) に臨床分離された MRSA の 89 株と 3 期 (2018 年) に臨床分離された 88 株のうち、POT 法で識別できた *SCCmec* II 型を HA-MRSA、*SCCmec* IV 型を CA-MRSA として分類した。標準株として MRSAN315 (HA-MRSA) 株を用いた。

2. 抗菌薬の最小生育阻止濃度 (MIC) の測定

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) に準じて、CAM および LVFX、CFPN-PI の MIC を測定した。本論文では、抗菌薬の耐性度について、MIC 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を感受性、MIC 4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を低度耐性、MIC 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を高度耐性とした。

3. PCR 法による *erm* 遺伝子の保有状況の調査

1 期および 3 期の臨床分離株において、同一の POT 型をもつ MRSA のうち、CAM の MIC が大きく異なる菌株 (1 期:A32, N5, 3 期:1823, 18279) を対象菌株に選定した。調査対象遺伝子はマクロライド系抗菌薬の主たる耐性遺伝子 *ermA*、*ermC* とし、コロニー PCR 法を用いて検出を行った。

4. バイオフィーム形成能 (BF 値) の測定

1% グルコース含有 Brain Heart Infusion (BHI) 培地にプレカルチャーした MRSA を添加した。こ

の混合液を 96 穴平底プレートに分注し、37°Cで 24 時間培養後、培養上清を除き、洗浄し、0.1%クリスタルバイオレットで 5 分間の染色を行い、洗浄後、乾燥した。30%酢酸でクリスタルバイオレットを溶出させ、波長 570 nm で吸光度を測定した。BF 値(%)は、標準株である MRSA N315 の吸光度に対する被験菌の吸光度の百分率で算出し、N315 の BF 値(%)=100 として比較を行った。

5. Growth 測定

SCCmecIV型 (CA-MRSA) の BF 値上位の株及び下位の株各々3 株と SCCmecII型 (HA-MRSA) の BF 値下位 3 株に対して測定を行った。MRSA を、Mueller Hinton Broth(MHB)培地を用いて O.D.₆₆₀≒0.7 まで培養した。この菌液を Ca²⁺, Mg²⁺含有 MHB 培地で 1000 倍希釈した。小型振盪培養装置 TVS062CA で培養・測定した。

6. 統計学的解析

統計解析ソフト easy-to-use (EZR)⁷⁾を用いて、各群の世代時間に差があるのかを調べるために、Tukey test による 3 群間比較検定を行った。

表 1 臨床分離された MRSA の型別

	分離総数	院内型/ 市中型	SCC mec 型	全体に占める割合 (%)
1 期	89 株	HA-MRSA	II型	62.9
		CA-MRSA	IV型	33.7
3 期	88 株	HA-MRSA	II型	9.1
		CA-MRSA	IV型	84.1

結果

1. 第3期に分離された MRSA の型別

POT 型から SCCmecII型または SCCmecIV型と分類された MRSA について、1 期と 3 期で全体に占める分離率を比較したところ、HA-MRSA の分離率は 62.9%から 9.1%へ大きく減少し、一方で、CA-MRSA の分離率は 33.7%から 84.1%と増加し、主流になっていた (表 1)。また、図 1 に示すように、POT 型ごとに 1 期と 3 期を比較した。CA-MRSA の A で示す POT 型 106-9-2 は 1 期及び 3 期でそれぞれ 10 株と 9 株となり、長期にわたり検出されていた。この型を持つ株は本邦では他施設でも報告されている⁸⁾。一方、POT 型で菌株を同定し、経年的に比較することで、3 期の CA-MRSA では、1 期では検出されなかった POT 型をもつ株が多く検出された。

2. MIC 測定

POT 型に基づき分類した 1 期 MRSA の 86 株 (SCCmecII型とIV型) 及び 3 期 MRSA の 82 株 (SCCmecII型とIV型) を対象に抗菌薬感受性の解析を行った。CFPN-PI については、調べた全株が MIC ≧ 128 µg/mL と高度耐性を示した。HA-MRSA では、CAM に対しては 1 期、3 期ともに高度耐性を示し、LVFX では 1 期、3 期ともに低度または高度耐性を示した (図 2 及び図 4)。一方、CA-MRSA では、CAM, LVFX ともに 3 期では 1 期に比べ感受性株が減少し、高度耐性株が増加していた (図 3 及び図 5)。特に、CAM に対しては、感受性株と高度耐性株に 2 分化されたが、LVFX では CAM のような両極化は認められな

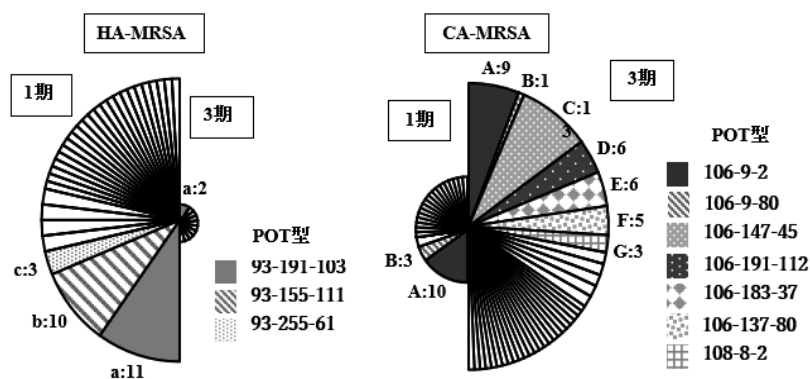


図 1. 1 期と 3 期で複数分離された POT 型ごとの菌株数と HA-MRSA と CA-MRSA の比較

1) 円の直径は各期の総分離数を反映している。
2) a,b,c または A ~G は同じ POT 型をもつ菌株が複数検出されたグループを示し、数字はその菌株数を示している。

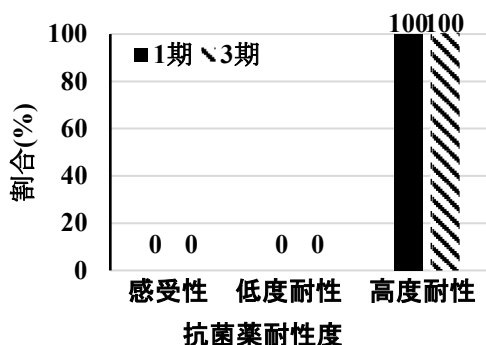


図 2. HA-MRSA(SCCmecII型)の CAM に対する

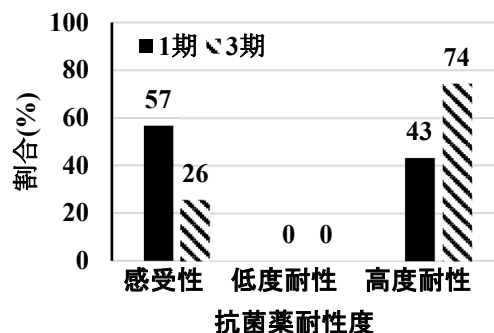


図 3. CA-MRSA(SCCmecIV型)の CAM に対する

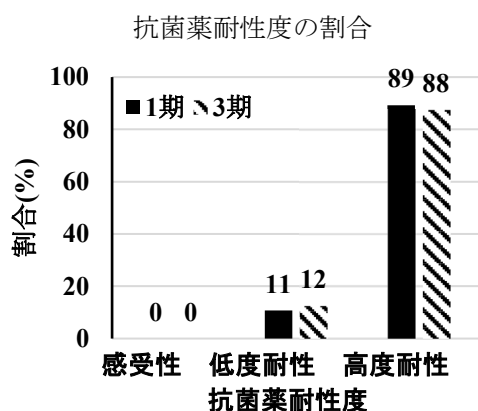


図 4. HA-MRSA(SCCmecII型)の LVFX に対する

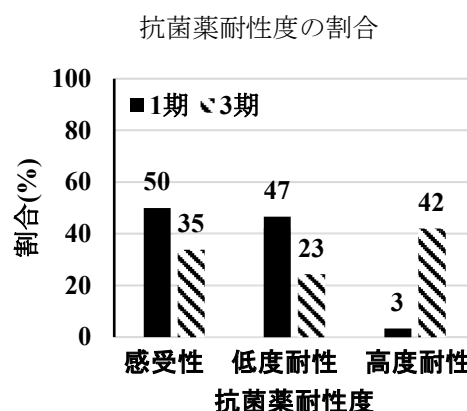


図 5. CA-MRSA (SCCmecIV型)の LVFX に対する

抗菌薬耐性度の割合

抗菌薬耐性度の割合

かった。

3. PCR 法による遺伝子の保有状況の調査

CA-MRSA では、1 期から 3 期への CAM に対する高度耐性化は、低度耐性を経ることなく起きていることが示された。そこで、CAM 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の高度耐性を示した菌株 1 期、3 期それぞれ 2 株について、マクロライド系抗菌薬の耐性遺伝子である *ermA* および *ermC* の保有状況を調べた。4 株とも *ermA* か *ermC* のどちらかを保有していた (表 2)。

表 2. *erm* 遺伝子の保有状況

分離時期	株名	POT 型	SCCmec 型	CAM の MIC	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>
1 期	A32	106-9-2	IV	$\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$	+	-
	N5	106-9-2	IV	$\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$	-	+
3 期	1823	106-9-2	IV	$\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$	-	+
	18279	108-8-2	IV	$\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$	-	+

4. BF 測定

3 期 MRSA の 82 株 (SCCmecII 型と IV 型) を対象に BF 値 (%) の解析を行った。SCCmecIV 型 (CA-MRSA) の菌株の全体に占める割合が高く、ほとんどの菌株が、標準株の N315 (BF 値=100%) の BF 値を上回った (図 6)。また、3 期の HA-MRSA の BF 値は平均 $95.2 \pm 20.7\%$ 、CA-MRSA では平均 $149.5 \pm 36.2\%$ と、1 期と同様に CA-MRSA のバイオフィルム形成能の方が有意に高かった ($p < 0.001$) (表 3)。

表3. バイオフィーム値の比較

	HA-MRSA BF 値(%)	CA-MRSA BF 値(%)	p 値
1 期	28.0±14.9*	90.0±31.6*	<0.001
3 期	95.2±20.7	149.5±36.2	<0.001

*1 期の BF 値は参考文献 4) から引用
 ※MRSA N315 株の BF 値=100%としたときの比 (Student's t-test): 平均値±標準偏差で示した。

5. Growth 測定

3 期の MRSA の BF 値と生育速度の関係性を調べるために、CA-MRSA の BF 値上位 3 株、同 BF 値下位 3 株及び HA-MRSA の BF 値下位 3 株の世代時間を測定した。母集団を等分散と仮定した。Tukey test による 3 群間比較において、世代時間について、各群間で有意差はなかった (表 4)。

考察

臨床分離された MRSA を HA-MRSA と CA-MRSA に分けて、POT 型ごとに分離状況の経年的な変化を比較した。複数株が検出された POT 型について調べたところ、3 期の CA-MRSA には、1 期では見られなかった POT 型が多く検出された。この結果から、新たな POT 型をもつ CA-MRSA が市中から院内に流入していること

表4. 3 期の MRSA の BF 値と世代時間の比較

	BF 値(%)	世代時間(min)
CA-MRSA の BF 値上位 3 株	241.0 ± 24.6	24.2 ± 2.1
CA-MRSA の BF 値下位 3 株	81.0 ± 3.6	23.1 ± 3.1
HA-MRSA の BF 値下位 3 株	79.0 ± 6.1	24.9 ± 0.9

が分かった。

薬剤感受性の測定結果より、1 期から 3 期にかけて CA-MRSA は、CAM と LVFX に対する耐性化が進んでいた。また、CAM では感受性株と高度耐性株に明確に分かれたが、LVFX では CAM のような両極化は認められなかった。CAM に高度耐性化した株は全て *ermA* または *ermC* を保有していた。*erm* 遺伝子は erythromycin ribosomal methylase をコードしており、50S リボソームをメチル化して、マクロライド系抗菌薬の結合を阻害する耐性遺伝子である。後天的に *erm* 遺伝子を獲得することにより、CAM に対して、高度耐性化することが知られている⁹⁾。このことは、3 期において、感受性株が、低度耐性を経ることなく、高度耐性化した結果と一致する。また、同一 POT 型は同一の菌株とみなされるが、保有する耐性遺伝子

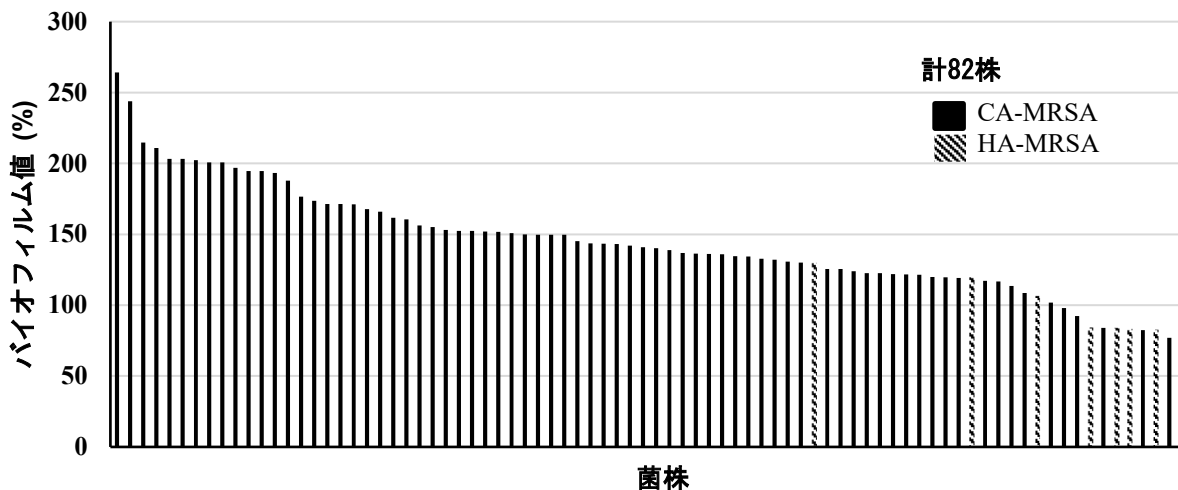


図6 3期MRSAのバイオフィーム形成能

が異なることが分かった。1期では、1年半の長期にわたって菌株を採取したことから、採取時期によって獲得する耐性遺伝子が異なると考えられた。以上のことから、CA-MRSAのCAMの耐性獲得には、*erm*のような薬剤耐性遺伝子の伝播が関与していると考えられ、院内への定着が長期化するほど高度耐性株の分離率が高くなることが示された。一方で、LVFXの耐性化は、抗菌薬の作用部位の変化だけでなく、多剤排出ポンプの関与も大きい¹⁰⁾。これにより、低度耐性株が比較的多くなる傾向にあると考えられる。

MRSAの病原因子の一つであるBFは表面タンパク質や菌体外DNAなどによって形成される¹¹⁾。3期のCA-MRSAのBF値は1期に比べ高かった。一方で、Growth測定の結果は、BF値の変化にもかかわらず、世代時間は変化せず、CA-MRSAのBF値上位及び下位各々3株、及びHA-MRSAのBF値下位3株の3群間の世代時間に有意差がなかった。新たなPOT型を持つCA-MRSAの流入により、臨床分離株の多くがBF形成能の高いCA-MRSAに換わっていることを考えると、MRSAの院内定着の因子としては、生育速度よりも、バイオフィーム形成能の寄与の方が大きいことが示唆された。

近年、わが国で新生児集中治療管理室(NICU)における授乳行為を介したCA-MRSAの院内への持ち込み感染およびそのアウトブレイクが報告されている¹²⁾。本研究で、CAMとLVFXに対して、MRSAが高度耐性化していることが分かったが、このことから、小児科領域で汎用されるマクロライド系、ニューキノロン系抗菌薬に対して高度な耐性をもつMRSAの蔓延およびこれらの抗菌薬の無効化が懸念される。

また、今回、CA-MRSAにはBF値が高いMRSAが多数分離されたが、このことから、呼吸器外科や泌尿器科領域で、気管内チューブや尿道カテーテルを介した院内感染、特に術後や

高齢者など易感染者への感染症の重症化が懸念される。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの成果指標として設定されている薬剤(CAM, LVFX, CFPN-PI)に注目して、MRSAの性状解析を行った。アクションプランに沿って、抗菌薬適正使用は推進されているにもかかわらず、CA-MRSAのCAM, LVFXに対する高度耐性化が進んでいた。今回の結果は、今後も、両薬剤の耐性化率の経年的変化と使用量と比較していく上で、AMR対策の効果を評価するための基礎資料として重要となる。

一方、新たな性質を有するMRSAの院内への流入が判明したことから、高度耐性菌の出現を防ぐには、抗菌薬の使用量の削減だけでなく、MRSAの院内流入量および院内定着期間の最小化も重要になってくる。その対策として、さらなる抗菌薬適正使用に加え、病院来出者・入室者への適正な手指消毒の呼びかけ・徹底および、不特定多数が接触する箇所の巡回消毒、バイオフィーム高度形成菌を考慮した上での消毒薬濃度の点検・検討が挙げられる。

謝辞

本研究はJSPS科研費20K10459の助成により実施した。

引用文献

- 1) Hiramatsu K, Ito T, *et al.*: Genomic Basis for Methicillin Resistance in *S. aureus*. *Infect Chemother.* 45(2):117-136(2013).
- 2) Enright MC, Day NP, *et al.*: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38(3):1008-15 (2000).
- 3) Suzuki M, Tawada Y, *et al.*: Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* isolated in Japan by detecting phage_-derived open-reading frames. *J Appl Microbiol.* 101 (4):938-947(2006).
- 4) 和田朋子, 山田陽一, 他.: 臨床現場における市中感染型 MRSA の増加とバイオフィルム形成能の関連. *就実大学薬雑誌*4. 16-22(2017).
 - 5) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議.: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (2016-2020) 平成 28 年 4 月 5 日 <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujiouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>
 - 6) Iwata Y., Satou K., *et al.* : Collagen adhesion gene is associated with bloodstream infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Infect Dis.* 91 : 22-31(2020).
 - 7) Kanda Y.: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*,48(3) ,452-458.(2013).
 - 8) 小川将史, 奥田和之, 他.: 当院における外来由来 MRSA 株の POT 法による解析 について. *医学検査*.65:387-391(2016) .
 - 9) Otsuka T., Zaraket H. , *et al.* :Macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan . *Clin Microbiol Infect.* 13: 325–327(2007)
 - 10) Marchi E, Furi L, *et al.* : Novel insight into antimicrobial resistance and sensitivity phenotypes associated to *qac* and *norA* genotypes in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* , 170 : 184-194(2015).
 - 11) McCarthy H., Rudkin J. K., *et al.* : Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 5 : 1(2015).
 - 12) Kato H, Ide K, *et al.* : Polymerase chain reaction-based open reading frame typing (POT) method analysis for a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak through breast-feeding in the neonatal intensive care unit. *IDCases* ; 12 : 1-3(2018)