



Risk factors for anti-MRSA drug resistance

Abe, Yasuhisa

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6037号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006037>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Risk factors for anti-MRSA drug resistance

抗 MRSA 薬耐性の危険因子

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

総合内科学

(指導教員：平田 健一教授)

阿部 泰尚

抗 MRSA 薬耐性の危険因子

1 背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*; 以下 MRSA) は代表的な多剤耐性菌である。院内感染の原因として知られていたが、最近では市中感染の原因菌としても知られている。院内感染と市中感染の原因菌としての MRSA では、それぞれ抗 MRSA 薬に対する感受性が異なっている。抗 MRSA 薬としては、バンコマイシン (vancomycin; 以下 VCM) があるが、VCM 以外にもリネゾリド (linezolid; 以下 LZD)、アルベカシン (arbekacin; 以下 ABK)、テイコプラニン (teicoplanin; 以下 TEIC)、ダプトマイシン (daptomycin; 以下 DPC) などが抗 MRSA 薬として知られている。VCM の代わりにこれらの薬剤を使用できれば、VCM の使用頻度を減らすことができる。院内感染の原因菌としての MRSA のうち、VCM に対する感受性が低下している株では、軟部組織感染症においては VCM より LZD の効果が高い。LZD は肺や軟部組織への移行性で VCM よりも優れているとされる。

MRSA 感染症の危険因子として、抗 MRSA 薬への曝露のみならず、MRSA 患者を扱う病棟や医療サービスへの曝露が重要と報告されている。しかしこれまで、抗 MRSA 薬低感受性株の危険因子についての報告は少なく、この情報は抗 MRSA 薬耐性株の拡大を防ぐのに役立つと考えられる。MRSA 感染症患者の背景として、免疫抑制剤使用中、術後などの免疫抑制状態が挙げられる。このような MRSA 感染患者の患者背景の正しい評価を行うことが、患者を適切に治療するために必要である。

本研究では、神戸大学医学部附属病院で 1 年間 (2009 年 1 月～12 月) に検出された MRSA について、臨床的な危険因子と、抗 MRSA 薬に対する感受性の相関について検討した。

2 方法

2-1 細菌分離株

2009 年 1 月から 12 月の 1 年間に神戸大学医学部附属病院で MRSA が検出され、評価可能な 44 例を対象とした。MRSA 感染の定義は、発熱を含む感染徴候、尿での MRSA $\geq 10^5$ /CFU (colony forming unit)、血液、鼻腔の検体では ≥ 1 CFU/plate とした。Micro Scan WalkAway40 system (Siments, Munich, Germany) を用い MRSA と同定された株を対象とした。

2-2 感受性検査

感受性検査は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010 年度版) により推奨された微量液体希釈法を用いた。抗菌薬に対する感受性の評価には最小発育阻止濃度 (MIC) を用いた。LZD、quinupristin/dalfopristin (Q/D)、ABK、VCM、TEIC、DAP の MIC を調べ、CLSI のカテゴリーを用いて感受性を評価した。DAP の感受性検

査は E test を用いた。MRSA ATCC 29213 株をコントロールとした。

2-3 抗 MRSA 薬低感受性の危険因子

抗 MRSA 薬低感受性の危険因子として、MRSA が分離されるまでの入院期間、透析、中心静脈カテーテル、糖尿病、人工呼吸器、尿道留置カテーテル、過去 6 カ月以内のカルバペネム系抗菌薬、カルバペネム系以外の抗菌薬の使用歴などを挙げ、これらの危険因子と抗 MRSA 薬の MIC の相関について調べた。

2-4 DNA の抽出と DNA 濃度の測定

菌株をトリプシン大豆寒天で 18 時間培養し、Lysogeny broth medium で 8 時間培養した。DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いた。菌量を一定にした MRSA 菌株から抽出された DNA 濃度を plate reader を用いて DNA 濃度を測定した。

2-5 POT 法 (Phage ORF typing 法)

菌株の MIC 上昇の遺伝子学的な原因精査のため、迅速遺伝子型決定法で Suzuki らにより確立された POT 法を実施した³⁾。上記の方法で抽出した PCR 産物を、Cica Geneus Staph POT Kit (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) を用いて遺伝子解析を行った。

2-6 統計解析

統計解析には、統計解析ソフトの JSTAT を用い、unpaired t-test と chi-square tests を行った。p ≤ 0.05 を統計学的に有意とした。

3 結果

3-1 患者背景

44 症例について検討を行った。患者背景を Table1 に示した。検体は血液培養 23 件、尿培養 12 件、鼻腔分泌物 9 例であった。

Table1 本研究の患者背景

患者背景	n
年齢(才)[中央値]	64.5 (0-95)
性別	
男性	29
女性	15
培養物質	
血液	23
尿	12
鼻腔分泌物	9
部署	
小児	11
心臓血管外科	8
泌尿器科	7
その他	18

3-2 感受性試験

抗 MRSA 薬を含む感受性結果は Table2 に示すとおりである。其々の薬剤は LZD 1-8 μg/ml (median 2 μg/ml)、Q/D 0.25-1 μg/ml (median 0.5 μg/ml)、ABK 0.5-4 μg/ml (median 1 μg/ml)、VCM 0.5-2 μg/ml (median 2 μg/ml)、TEIC 0.5-8 μg/ml (median 1 μg/ml)、DAP 0.125-0.5 μg/ml (median 0.25 μg/ml) であった。CLSI の分類で、全ての株が Q/D、ABK、VCM、TEIC、DAP に対して感受性があった。LZD に対して高い MIC を持つ株が 1 株あった (Table 2)。

Table2 MRSA 分離株の抗菌薬感受性

抗菌薬	LZD	Q/D	ABK	VCM	TEIC	DAP
MIC の中央値	2	0.5	1	2	1	0.25
感受性株 (n=44) ^a	43/44	43/43 ^b	44/44	44/44	44/44	44/44

LZD, linezolid; Q/D, quinupristin/dalfopristin; ABK, arbekacin; VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin; DAP, daptomycin

^a 耐性株は Clinical and Laboratory Standards Institute に従って分類

^b Q/D の MIC のデータは 43 株のみ

3-3 POT 解析

LZD に対して高い MIC を持つ株について POT 法を用いた遺伝子学的解析を行ったところ、POT1 の値が 93 で SCCmec type II a の株であることが判明した³⁾。

3-4 MRSA の DNA 濃度

MRSA の最近 DNA 濃度は 11-381.2 ng/μl (median 109.5 ng/μl) であった。

3-5 危険因子と抗 MRSA 薬の MIC との関係

統計学的解析の結果、MRSA DNA 濃度は LZD (p=0.0058) と ABK (p=0.0003) の MIC と、担癌患者は Q/D (p=0.05) と ABK (p=0.0133) の MIC と、人工呼吸器使用は Q/D (p=0.0198) と VCM (p=0.0036) の MIC と逆相関していた (Table 3)。

Table3 抗 MRSA 薬の MIC と各危険因子との相関

危険因子	数値もしくは件数	P 値 ^a					
		LZD	Q/D	ABK	VCM	TEIC	DAP
DNA 濃度 (ng/μl) [median (range)]	109.5 (11-381.2)	0.0058	0.0700	0.0003	0.8385	0.7533	0.3550
MRSA が検出されるまでの日数 (days) [median (range)]	14 (0-501)	0.6224	0.1825	0.6077	0.6030	0.0987	0.0984
透析	6/44	0.0117 ^b	0.0508	0.8411	0.8703	0.0746	0.6602
糖尿病	5/44	0.0176 ^b	0.2411	0.1941	0.9898	0.4550	0.1070
術後	18/44	0.3542	0.4761	0.3033	0.7323	0.3373	0.1443
悪性腫瘍	12/44	0.0799	0.0500	0.0133	0.5892	0.3803	0.7756
中心静脈カテーテル	19/44	0.6526	0.3875	0.4882	0.2310	0.3765	0.8413
人工呼吸器の使用	10/44	0.1845	0.0198	0.5282	0.0036	0.4777	0.1129
尿道留置カテーテル	11/44	0.7314	0.6464	0.3151	0.2599	0.0636	0.6139
カルバペネム系使用歴	6/44	0.0186 ^b	0.2417	0.6095	0.7491	0.5947	0.8603
カルバペネム系以外の使用歴	29/44	0.0049	0.0980	0.9521	0.5806	0.5901	0.3087

MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; LZD, linezolid; Q/D, quinupristin/dalfopristin; ABK, arbekacin; VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin; DAP, daptomycin; MIC, minimal inhibitory concentration

^a 文字は統計学的有意差のあるもの (p ≤ 0.05)

^b 透析、糖尿病とカルバペネム系の抗菌薬使用歴と LZD の MIC との相関

4 考察

MRSA 関連感染症の診断もしくは保菌の検出は、MRSA の拡大防止に重要である。MRSA 関連感染症は免疫能が低下した患者に多く、治療も奏功しにくい、重症化しやすく致命的にもなりやすい。適切な診断が重要で、診断の遅れや原因菌の同定の遅れ、

不適切な抗菌薬の選択は、患者の状態の悪化、入院期間の延長、コスト増を招く⁴⁾。さらには、抗菌薬使用と不適切な抗菌薬使用に伴う、抗菌薬使用圧の上昇はさらなるスペクトラムへの耐性を獲得した MRSA の出現、より重篤な感染症の発生を招く⁵⁾。

MRSA 関連感染症に使用可能な抗菌薬は限られており、グラム陽性球菌に対して活性を持つ新たな抗菌薬が新規に認可されており、かつ近年 DAP など新たに優れた抗 MRSA 薬が開発されてきている。神戸大学医学部附属病院ではまだ検出されていないが、世界的には VCM 耐性菌は既に報告されており、DAP のような新たな抗 MRSA 薬は現状では VCM 耐性菌や VCM 低度感受性菌 MRSA への究極の武器と考えられている。

MRSA の遺伝子分析により、LZD に対する MIC が高い株は SCC *mec type II a* の株であった。SCC *mec type II a* の株は、日本で入院患者によく見られる株であるが、これまでの報告では 100% が LZD 感受性株であった⁶⁾。今回の症例は SCC *mec type II a* にも関わらず LZD 耐性であった稀な例と考えるが、今後新たに注意を払うべきと考えられた。

Ernst らは院内発症の MRSA 菌血症の危険因子を調査し、MRSA 群ではメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin sensitive Staphylococcus aureus* MSSA) 群に比べフルオロキノロンの投与歴を持つことが多く、フルオロキノロンの平均投与日数が長かったと報告している⁷⁾。これはカルバペネム系抗菌薬以外の抗菌薬の使用歴と LZD の MIC と相関した今回の我々のデータを支持するものである。

Bae らは年齢、感染性心内膜炎、心臓内の疣贅、うっ血性心不全、持続性菌血症、MRSA による感染性心内膜炎におけるバンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌 (*heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) 出現の危険因子であることを示した⁸⁾。我々の結果では、人工呼吸器の使用のみが、血液、尿、鼻腔分泌液における VCM に対する MIC が高いことと相関していた。本研究は他の研究と比較しても調査期間が 1 年間と短く、MRSA の検出と抗 MRSA 薬の使用、抗 MRSA 薬の感受性の傾向は、1 年間のうちに大きく変わらなかった。今回の検討は、逆に期間が長くなることによるこれらの変化を取り除いた検討ともいえる。

加えて、細菌の DNA 濃度が LZD と ABK の MIC と逆相関していることを示した。基本的には細菌の抗菌薬に対する耐性は、抗 MRSA 薬に対する高い MIC を証明することが必要とされている⁹⁾。今回の結果では DNA 濃度が高い株で LZD や ABK の MIC が上昇していた。このことにはいくつかの仮説が考えられる。細菌の不均一性の理論¹⁰⁾に基づいて考えると、DNA の濃度が高いほど、多様な表現型を有する可能性が高くなる、もしくは DNA 濃度が高いこと自体が MIC を上昇させる要因になっていると考えられた。

最後にこの論文の limitation について述べておきたい。まず、症例、菌株数が十分でなく、今回の結果を結論づけるにはさらなる症例と菌株の上乗せが必要である。透析患者や、既に報告されている過去の抗菌薬使用歴と LZD の MIC の相関を導き出せなかったのは症例数が不足していたことに起因していたかもしれない。しかし、検討期間が 1 年間と短く、長い期間での感受性の変化には触れられなかった。今後耐性に関連するブ

ラスミドの検出や遺伝子の PCR などを行っていくことで解決できるかもしれない。

結論としては、DNA 濃度、悪性腫瘍、人工呼吸器の使用などが、MRSA の抗 MRSA 薬に対する低感受性の危険因子となり、1 つの株では LZD に対して高い耐性を示した。抗 MRSA 薬に対して高い MIC を持つ MRSA の新たな表現型の出現には注意を払うべきであると同時に MRSA のサーベイランスは重要で、それにより患者への適切な医療の提供と感染の拡大を止めることができるかもしれない。

(参考文献)

- 1) Baraboutis IJ, Tsagalou EP, Papakonstantinou I, et al. Length of exposure to the hospital environment is more important than antibiotic exposure in health care associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparative study. *Braz J Infect Dis* 2011;15:426-35.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- 3) Suzuki M, Tawada Y, Kato M, 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* 2006;101:938-47.
- 4) Shorr AE, Sakoulas G, et al. Morbidity and cost burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in early onset ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2006;10:R97.
- 5) Eguia JM, Liu C, et al. Low colonization prevalence of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility among patients undergoing hemodialysis in the San Francisco Bay area. *Clin Infect Dis* 2005;40:1617-24.
- 6) Yanagihara K, Araki N, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of 857 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 116 medical centers in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72:253-7.
- 7) Ernst EJ, Raley G, et al. Importance of control group selection for evaluating antimicrobial use as a risk factor for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:634-7.
- 8) Watanabe Y, Cui L, et al. Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2011;49:2680-4.
- 9) Hiramatsu K, Aritaka H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of 336 strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350:1670-3.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2416 号	氏 名	阿部 泰尚
論文題目 Title of Dissertation	Risk factors for anti-MRSA drug resistance 抗 MRSA 薬耐性の危険因子		
審査委員 Examiner	主 査 西村 善博 Chief Examiner 副 査 河川 利朗 Vice-examiner 副 査 中井 みゆり Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は代表的な多剤耐性菌であり、最近では市中感染の原因菌としても知られている。抗 MRSA 薬としては、バンコマイシン (VCM)、リネゾリド (LZD)、アルベカシン (ABK)、テイコプラニン (TEIC)、ダプトマイシン (DPC) などがある。抗 MRSA 薬にはそれぞれ特徴があるが、抗 MRSA 薬に対する低感受性株の危険因子についての報告は少なく、この情報は抗 MRSA 薬耐性株の拡大を防ぐのに役立つと考えられる。本研究者は、神戸大学医学部附属病院で1年間 (2009年1月～12月) に検出された MRSA について、臨床的な危険因子と、抗 MRSA 薬に対する感受性の相関について検討した。

2009年1月から12月の1年間に神戸大学医学部附属病院で MRSA が検出され、評価可能な44例を対象とした。MRSA 感染の定義は、発熱を含む感染徴候、尿での MRSA $\geq 10^5$ /CFU、血液、鼻腔の検体では ≥ 1 CFU/plate とした。

感受性検査は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010年度版) により推奨された微量液体希釈法を用いた。抗菌薬に対する感受性の評価には最小発育阻止濃度 (MIC) を用いた。LZD、quinupristin/dalfopristin (Q/D)、ABK、VCM、TEIC、DAP の MIC を調べ、CLSI のカテゴリーを用いて感受性を評価した。

抗 MRSA 薬低感受性の危険因子として、MRSA が分離されるまでの入院期間、透析、中心静脈カテーテル、糖尿病、人工呼吸器、尿道留置カテーテル、過去6カ月以内のカルバペネム系抗菌薬、カルバペネム系以外の抗菌薬の使用歴などを挙げ、これらの危険因子と抗 MRSA 薬の MIC の相関について調べた。

菌株をトリプシン大豆寒天で18時間培養し、Lysogeny broth medium で8時間培養した。DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いた。菌量を一定にした MRSA 菌株から抽出された DNA 濃度を plate reader を用いて DNA 濃度を測定した。

計44症例について検討を行った。検体は血液23件、尿12件、鼻腔分泌物9例であった。抗 MRSA 薬を含む感受性については、LZD に対して高い MIC を持つ株が1株あった。LZD に対して高い MIC を持った株について POT 法を用いた遺伝子学的解析を行ったところ、SCCmec type IIa の株であることが判明した。

統計学的解析の結果、MRSA の DNA 濃度は LZD ($p=0.0058$) と ABK ($p=0.0003$) の MIC と、担癌患者は Q/D ($p=0.05$) と ABK ($p=0.0133$) の MIC と、人工呼吸器使用は Q/D ($p=0.0198$) と VCM ($p=0.0036$) の MIC と逆相関していた。

MRSA の遺伝子分析により、LZD に対する MIC が高い株は SCC mec type IIa の株であった。SCC mec type IIa の株は、日本で入院患者によく見られる株であるが、これまでの報告では100%が LZD 感受性株であった。今回の症例は SCC mec type IIa にも関わら

ず LZD 耐性であった稀な例と考えるが、今後新たに注意を払うべきと考えられた。

今回の結果では、人工呼吸器の使用のみが、血液、尿、鼻腔分泌液における VCM に対する MIC が高いことと相関していた。本研究は他の研究と比較しても調査期間が 1 年間で短く、MRSA の検出と抗 MRSA 薬の使用、抗 MRSA 薬の感受性の傾向は、1 年間のうちに大きく変わらなかった。今回の検討は、逆に期間が長くなることによるこれらの変化を取り除いた検討ともいえる。

また、MRSA の DNA 濃度が LZD と ABK の MIC と逆相関していることが認められた。細菌の抗菌薬に対する耐性は、抗 MRSA 薬に対する高い MIC を証明することが必要とされている。本研究では DNA 濃度が高い株で LZD や ABK の MIC が上昇していた。DNA の濃度が高いほど、多様な表現型を有する、あるいは DNA 濃度が高いこと自体が MIC を上昇させる要因になるとことが原因として考えられた。

本研究により、DNA 濃度、悪性腫瘍、人工呼吸器の使用などが、MRSA の抗 MRSA 薬に対する低感受性の危険因子となり、1 つの株では LZD に対する高い耐性が示された。MRSA の MIC を用いた抗 MRSA 薬に対する耐性の疫学的要因についてはこれまで明らかでなかったが、本研究により、抗 MRSA 薬に対して高い MIC を持つ MRSA の新たな表現型の出現には注意を払うべきであると同時に MRSA のサーベイランスは重要で、それにより患者への適切な医療の提供と感染の拡大を止めることができる可能性を示す重要な知見を得るものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。