

慢性中耳炎術後感染の起因菌として検出された ヘテロ VRSA に関する検討

海江田 哲 高橋 晴雄

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 病態解析・制御学講座 耳鼻咽喉病態制御学領域

Isolation and Detection of The Heterogeneously Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Strain from The Patient with Post-operative Infection of Chronic Otitis Media

Satoru KAIEDA, Haruo TAKAHASHI

Department of otorhinolaryngology, Graduate school of life and medical sciences,
Nagasaki university

Two strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA-1, and -2) were isolated from otorrhea in the clinical course of the patient with post-operative infection of chronic otitis media. The first isolated strain, MRSA-1, was susceptible ($1 \mu\text{g/mL}$) to vancomycin (VCM). However, the later isolated strain, MRSA-2, was decreased their susceptibility ($4 \mu\text{g/mL}$) to VCM. The clonal relatedness of these two strains was confirmed by pulsed-field gel electrophoresis analysis. The paper-disk and agar selection experiment revealed that the resistance to VCM of the first isolated strain, MRSA-1, was induced *in vitro* with three β -lactam antibiotics, Amoxicillin, cefditren (CDTR) and cefaclor, and also with VCM. These results indicated that the strain MRSA-1 was heterogeneously resistance to VCM and its resistance had been induced *in vivo* with the orally administrated antibiotics (CDTR). Certainly, clinical significance of heterogeneously VCM resistance *S. aureus* (hetero-VRSA) is now under discussion. However, as previously reported, the incidence of hetero-VRSA was about from 1 to 10% among clinical isolates of MRSA. And furthermore, their resistance to VCM can be induced with β -lactam antibiotics and VCM. So, to prevent the spread of VCM resistance isolate among clinical isolate of MRSA, it is important to consider the presence of hetero-VRSA on the treatment of MRSA infection.

はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 感染症に対する第一選択薬であるバ

ンコマイシン (VCM) は、その化学構造および作用機序から耐性菌のつき難い薬剤と考えられていた。しかし、近年欧米を中心として VCM 耐性腸球菌 (VRE) が増加し問題となっ

ている¹⁾。また MRSA においても、1996 年に VCM に対し $8\mu\text{g}/\text{mL}$ と低感受性を示す菌株 (Vanncomycin intermediate *S. aureus*: VISA) が本邦で分離された²⁾のかわきりに、世界各国から同様の報告が相次ぎその動向が危惧された^{3,4)}。しかし、現時点において VISA が蔓延し臨床問題になっているという事実は否定的である。

一方、ヘテロ耐性とは多くの感受性細胞集団の中に、少数の低感受性を示す細胞が存在するという概念である⁵⁾。現在臨床分離される MRSA の約 10%程度が VCM に対しヘテロ耐性を示す菌株 (ヘテロ VRSA) であるとの報告もあり注意を要する⁵⁾。このヘテロ VRSA の最大の特徴は、VCM や β -ラクタム薬などの細胞壁合成阻害薬との接触によって、容易に VCM に対する耐性が誘導される点である。

今回、慢性中耳炎術後感染症例において、その臨床経過よりヘテロ VRSA と思われる菌株が分離された。この症例を提示し、ヘテロ VRSA の検出方法およびその臨床的意義について考察する。

症 例

13 歳、男性。両慢性中耳炎に対し、平成 14 年 1 月 4 日、従来法による鼓膜形成術施行。術後感染予防薬として、ピペラシリン (PIPC)、アモキシシリン (AMPC) を投与するも術後 10 日目より左耳漏出現、翌日には鼓膜に再穿孔を認めた。耳漏の細菌培養を行い、セフトレン (CDTR) 内服とピオクタニンによる耳洗浄を併用した。培養の結果 MRSA が分離されたが耳漏が減少傾向にあったため、CDTR を計 8 日間継続し術後 17 日目には耳漏は停止した。しかし、術後 26 日目に再度耳漏出現、培養の結果再び MRSA が分離されたため、この時点で VCM の投与を考慮したが、VCM に対する感受性が $4\mu\text{g}/\text{mL}$ と低下していたため、 $\leq 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ と感受性を示したミノマイシン (MINO) を投与し耳漏は停止した。現在、鼓膜穿孔は残存するが耳漏は認めていない。(Fig. 1)

このように本症例では、経過中に 2 株の MRSA (MRSA-1, -2) が分離され、その臨床経過およびグリコペプチド系薬に対する感受性からヘテロ VRSA である可能性が疑われた。

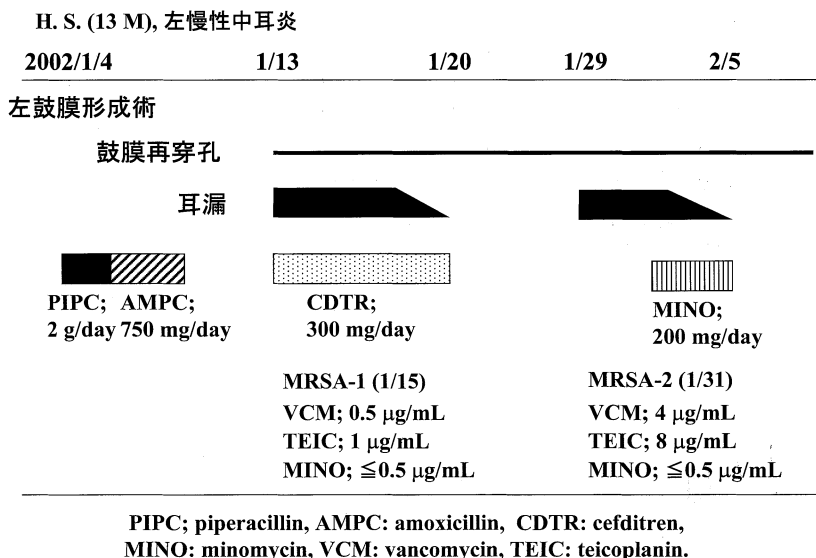


Fig. 1 Clinical course.

そこで、この 2 株を用いて次の検討を行った。

材料および方法

(使用菌株)

本症例より分離された MRSA 2 株 (MRSA-1, -2) を用いた。

(菌株の同一性に関する検討)

両菌株より染色体 DNA を抽出し、制限酵素 (SmaI, XbaI) にて切断後、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) により菌株の同一性を検討した。

(VCM 耐性誘導に関する検討)

1) 薬剤含有 paper disk による耐性誘導

花木らの報告⁶⁾に従い、MRSA-1 を Tryptic soy 液体培地にて一夜培養し、その菌液を VCM 3 μg/mL を含有する Mu3 寒天培地上に塗布後、AMPC, CDTR, セファクロル (CCL) をそれぞれ 1 μg 含有する濾紙を置き、35°Cにて 48 時間培養した。

2) VCM 含有培地による耐性誘導

VCM 4 μg/mL を含有する BHI 寒天培地上に、一夜培養した菌液を塗布し、35°Cにて 48 時間培養。発育してきたコロニーを釣菌し、微量液体希釈法にて VCM およびテイコプラニン (TEIC) に対する感受性を測定した。

結果および考察

本症例より検出された MRSA 2 株の染色体 DNA は、PFGE にて同じ泳動パターンを示し、分子遺伝学的に同一菌株であることが証明された (Fig. 2)。また、初回分離菌株 (MRSA-1) における VCM 耐性誘導の検討では、Mu3 寒天培地上で β-ラクタム薬を含有する paper disk の周囲に局限したコロニーの発育を認め (Fig. 3)、この菌株における VCM 耐性がこれらの β-ラクタム薬によって誘導されることが証明された。更に、この菌株を VCM 4 μg/mL を含有する培地上で 48 時間培養し、発育を認めた 7 個のコロニーの中から任意に選択した 2

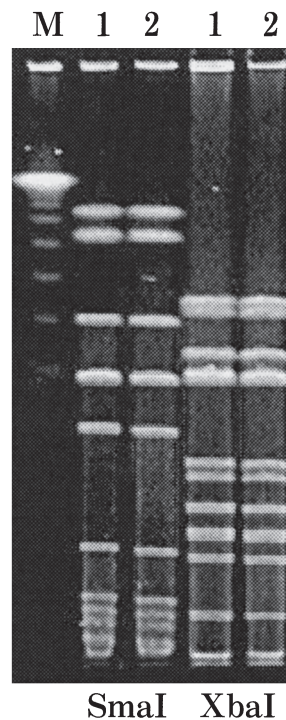


Fig. 2 Pulsed field gel electrophoresis analysis of two strains of MRSA (MRSA-1, -2).

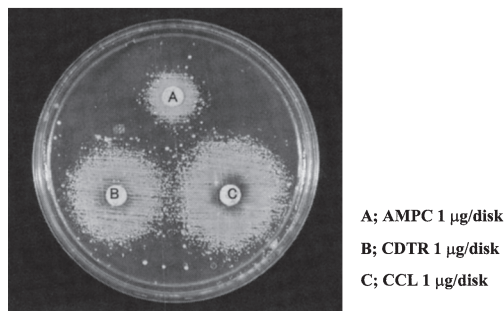


Fig. 3 Antagonism effect between vancomycin and β-lactam antibiotics against a hetro-VRSA strain of MRSA-1 by paper-disk method.

個のコロニー (MASR-1a, -1b) は、VCM および TEIC に対し MRSA-2 と同様の耐性を示した。しかし、これらの菌株のグリコペプチド薬に対する耐性は、薬剤を含有しない培地上での継代培養により、元株である MRSA-1 と同程度のレベルまで低下した (Table 1)。

Table 1 Changes in susceptibility patterns to glycopeptide antibiotics of MRSA-1 with exposure to VCM.

| Starins | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | |
|-----------|--------------------------|-------------|
| | vancomycin | teicoplanin |
| MRSA-1 | 0.5 | 1 |
| MRSA-1-a | 4 | 8 |
| MRSA-1-b | 4 | 8 |
| MRSA-1-a' | 0.5 | 1 |
| MRSA-1-b' | 0.5 | 1 |

MRSA-1-a, b; VCM $4\mu\text{g/mL}$ を含有する培地で選択
MRSA-1-a', b'; 薬剤を含有しない培地上で10回継代培養

このことはVCM含有培地にて選択された菌株のVCM耐性は構成的な耐性ではなく、VCMによって一時的に誘導された耐性であることを示唆する。以上の結果より、本症例より分離されたMRSAはヘテロVRSAであり、治療薬として投与されたCDTRによって、そのVCM耐性が*in vivo*で誘導された可能性が示唆された。

本来、ヘテロ耐性株の検出にはポピュレーション解析が有用とされてきた⁵⁾。しかし、その手技は繁雑であり多大な時間を要する。本検討で用いたpaper diskによる簡易検出法は花木らが推奨する方法であり、手技も容易で、通常の検査室でもヘテロ耐性株の検出が可能である。臨床経過からヘテロ耐性株を疑った場合、有用な検査法であると思われる。

現在、ヘテロVRSAの耐性機序は明らかで無く、実験室レベルでの検討も再現性に乏しい。そして何よりヘテロ耐性株による感染症が通常のMRSA感染症に比べて難治であることを示すevidenceがない等の理由から、その臨床的意義に関しては否定的な意見も多い⁷⁾。本症例では、実際にVCMを使用していないため、その意義に関して言及することはできない。しかし、耳鼻咽喉科領域は取り扱う疾患および部位の関係からMRSAの分離率が比較的高い領域である。特に、他の領域と異なり、外来患者か

らの分離率が高いことは大きな特徴である。VCMはMRSAに対する最後の砦的な薬剤である。ヘテロ耐性株のVCM耐性がVCMや各種 β -ラクタム薬によって容易に誘導される事実を認識し、今後VCM耐性株を蔓延させない為にも、耳洗浄など局所処置の併用により、薬剤の使用を制限することが重要と思われる。また、本症例では、薬剤感受性検査の結果で感受性を示したMINOを投与し、良好な結果が得られた。MRSAであっても、菌株によってはVCMなどの抗MRSA薬以外にも感受性を示す菌株が存在する。個々の症例あるいはエピソード毎に薬剤感受性検査を行い、VCMに偏らない薬剤の選択が望まれる。

ま と め

慢性中耳炎術後感染症例よりヘテロVRSAと思われる菌株を分離した。確かに、現時点ではヘテロ耐性株を含めたVCM耐性株の臨床的意義に関しては不確かな点が多い。しかし、耳鼻咽喉科領域はMRSAの分離率が比較的高い領域である。1980年代初頭に始まるMRSA蔓延の背景に抗菌薬とくに第3世代セフェム薬の濫用があったことを再認識し、今後VCM耐性株を蔓延させないためにも、ヘテロVRSAを念頭においた慎重な薬剤使用が望まれる。

参 考 文 献

- 1) Jones R.N., Sader H.S., Erwin M.E., et al.: Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates I: prevalence data from 97 medical center surveillance studies in the United States. *Diag Microbiol Infect Dis* 21: 85-93, 1995.
- 2) Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136, 1997.
- 3) Smith T.L., Pearson M.L., Wilcox K.R., et

- al.: Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 340: 493-501, 1999.
- 4) Sieradzki K., Roberts R. B., Haber S. W., et al.: The development of vancomycin in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. N Engl J Med 340: 517-523, 1999.
- 5) Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., et al.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1670-1673, 1997.
- 6) Hanaki H., Ohkawa S., Yoko Y., et al.: A novel method for detecting *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin (Hetero-VRSA). Jap J Antibiotics 51: 521-530, 1998.
- 7) 荒川宣親：薬剤耐性菌とその検出法に関する基本的な諸注意点. 化学療法の領域 16 (2) : 224-241, 2000.

連絡先：海江田 哲

〒852-8501

長崎県長崎市坂本 1-7-1

長崎大学 耳鼻咽喉科

TEL 095-849-7349 FAX 095-849-7352