

【短 報】

本邦において 1990 年から 2006 年の間に分離された methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の抗菌薬感受性の経年的変化三國谷 雄・加藤 佳久・小林 (武藤) 祐子・三本木祐美子
清水 敦之・平石 徹・井田 孝志・前橋 一紀

明治製菓株式会社医薬総合研究所応用薬理研究所*

(平成 20 年 10 月 3 日受付・平成 20 年 11 月 28 日受理)

本邦で分離された MRSA 228 株 (分離期間 1990 年から 1993 年: 47 株, 1998 年から 2001 年: 100 株, 2005 年から 2006 年: 81 株) の arbekacin (ABK), vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC) ならびに linezolid (LZD) に対する経年的な感受性の変化を検討した。調査期間中, いずれの薬剤も MRSA に対する抗菌力に大きな変動は認められず, 2005 年から 2006 年分離 MRSA に対する MIC は, それぞれ ABK (MIC₅₀: 0.5 μg/mL, MIC₉₀: 2 μg/mL), VCM (1, 1), TEIC (1, 2), LZD (2, 2) であった。2005 年から 2006 年分離 MRSA のうちアミノ配糖体修飾酵素 AAC (6')/APH (2'') をコードする *aac* (6')/*aph* (2'') 遺伝子保有株の割合は 55.6% であり, 2001 年以降, 僅かに増加した。また, TEIC の MIC が 8 μg/mL を示した MRSA 6 株はすべて *vraS* 遺伝子内にアミノ酸置換を伴う I5N (5Ile→Asn) 変異を有していた。

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, clinical isolate, surveillance, drug susceptibility

1960 年に methicillin の実用化が始まった翌年, 早くもイギリスで最初の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が出現し, MRSA は今や世界的に拡散している。1997 年には vancomycin (VCM) に低感受性を獲得した VISA が日本で出現し, 2002 年には VCM に高度耐性を獲得した VRSA がアメリカで報告された。日本, 香港, シンガポールなどは MRSA の検出率が 50% を超えており, 北欧の一部の国を除いて, MRSA はほとんどの国で検出され¹⁾, 院内感染で最も問題となっている原因菌である。また, 2000 年前後から SCCmec VI 型あるいは V 型を保有し, 白血球破壊毒素 (Panton-Valentine-leukocidin) を産生する MRSA (市中感染型 MRSA) が出現し, 新たな脅威となっている。

本邦で承認されている抗 MRSA 薬は arbekacin (ABK), VCM, teicoplanin (TEIC), linezolid (LZD) の 4 薬剤である。今回, 1990 年から 2006 年の間に分離された 228 株の MRSA に対する ABK, VCM, TEIC, LZD の MIC を測定し, MRSA の経年的な感受性変化を検討した。

本検討では oxacillin (MIPIC) の MIC が 4 μg/mL 以上を示し, PCR 法²⁾により *mecA* 遺伝子が確認された臨床分離 MRSA を用い, 3 つの分離期間に分けた。即ち, 1990 年から 1993 年に 18 都道府県の 25 施設から分離された 47 株 (喀痰 51%, 血液 13%, 膿・創部 21%, 便 2%,

その他 2%, 不明 11%), 1998 年から 2001 年に 36 都道府県の 97 施設から分離された 100 株 (喀痰 47%, 血液 2%, 膿・創部 17%, 鼻腔・咽頭 12%, 尿 6%, 便 2%, その他 10%, 不明 4%), 2005 年から 2006 年に 25 都道府県の 63 施設から分離された 81 株 (喀痰 53%, 血液 23%, 膿・創部 10%, 鼻腔・咽頭 4%, 尿 4%, 便 1%, その他 4%, 不明 1%) について検討した。同一施設からは最大 2 株とし, その際も分離時期が 1 カ月以上離れた株を用いて, 菌株の重複を回避した。薬剤感受性は CLSI³⁾ に準じた寒天平板希釈法にて MIC を測定した。測定薬剤は, ABK (明治製菓), VCM (シグマアルドリッチ), TEIC (アペンティスファーマ), LZD (ファイザー), gentamicin (GM, シグマアルドリッチ) を用いた。MIC 測定に加え, 3 種類のアミノグリコシド修飾酵素, aminoglycoside-3'-O-phosphotransferase III [*aph* (3')-III], aminoglycoside-4'-O-adenyltransferase I [*aad* (4')-I], aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase / 2''-O-phosphotransferase [*aac* (6')/*aph* (2'')] の遺伝子を PCR で検出し⁴⁾, さらに, グリコペプチド低感受性に関与していると報告されている 2 成分制御系センサーの一つ, *vraS* 遺伝子シークエンスを行い⁵⁾, 薬剤感受性との関係を検討した。

Table 1 に各種抗 MRSA 薬の抗菌活性を分離年ごとに示した。ABK, VCM では MIC₅₀, MIC₉₀ とも分離期間による変動は認められなかったが, LZD, TEIC の MIC₉₀

*神奈川県横浜市港北区師岡町 760

Table 1. Annual changes in susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to arbekacin, vancomycin, teicoplanin, linezolid, gentamicin and oxacillin

Drug	Period	MIC ($\mu\text{g/mL}$)/No. of isolates														Range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
		0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	> 512				
ABK	1990-1993		2	29	11	3	1	1									0.25-8	0.5	2
	1998-2001		7	60	19	10	3	1									0.25-8	0.5	2
	2005-2006	1	10	38	23	5	4										0.12-4	0.5	2
VCM	1990-1993			2	43	2											0.5-2	1	1
	1998-2001			12	85	3											0.5-2	1	1
	2005-2006		1	12	67	1											0.25-2	1	1
TEIC	1990-1993			6	29	5	3	4									0.5-8	1	4
	1998-2001			3	10	71	14	1	1								0.25-8	1	2
	2005-2006	2	2	14	49	9	4	1									0.12-8	1	2
LZD	1990-1993				2	45											1-2	2	2
	1998-2001				4	85	11										1-4	2	4
	2005-2006				3	75	3										1-4	2	2
GM	1990-1993			2	21			1	1	4	11	5				2	0.25-> 512	8	128
	1998-2001	1	23	23	1		1	5	3	7	19	10	4	3			0.12-512	8	128
	2005-2006	1	15	19	1			1	2	12	18	7	2	3			0.12-512	32	128
MIPIC	1990-1993									2	2	8	23	12			32-512	256	512
	1998-2001						1				3	12	66	17	1		4-> 512	256	512
	2005-2006									4	3	5	52	16	1		32-> 512	256	512

No. of strains. 1990 — 1993: 47 strains; 1998 — 2001: 100 strains; 2005 — 2006: 81 strains

Table 2. Trends in distribution of aminoglycoside-modifying enzyme production and susceptibility to arbekacin/gentamicin

Aminoglycoside-modifying enzyme gene	Strain No.	% of gene present in each period			ABK ($\mu\text{g/mL}$)			GM ($\mu\text{g/mL}$)		
		1990-1993	1998-2001	2005-2006	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range
<i>aac</i> (6')/ <i>aph</i> (2'')	120	51.1	51.0	55.6	1	2	0.25-8	64	256	8-> 512
<i>aac</i> (6')/ <i>aph</i> (2'')	18	2.1	11.0	7.4	0.5	2	0.25-4	32	256	8-512
<i>aac</i> (6')/ <i>aph</i> (2'')	6	6.4	1.0	2.5	-	-	0.5-2	-	-	32-256
+ <i>aph</i> (3')-III										
<i>aac</i> (6')/ <i>aph</i> (2'')	94	38.3	39.0	45.7	1	2	0.25-8	64	256	8-> 512
+ <i>aad</i> (4')-I										
<i>aac</i> (6')/ <i>aph</i> (2'')	2	4.3	0.0	0.0	-	-	1-2	-	-	128
+ <i>aph</i> (3')-III + <i>aad</i> (4')-I										
<i>aad</i> (4')-I	101	48.9	46.0	39.5	0.5	0.5	0.12-2	0.5	0.5	0.12-4
<i>aph</i> (3')-III	1	0.0	0.0	1.2	-	-	0.5	-	-	0.5
none	6	0.0	3.0	3.7	-	-	0.25-0.5	-	-	0.25-0.5

は分離期間によって若干変動した。VCMのMICが4 $\mu\text{g/mL}$ 以上を示すVCM耐性菌、あるいは、LZDのMICが16 $\mu\text{g/mL}$ 以上を示すLZD耐性菌は分離されなかった。山口らは、2006年臨床分離MRSA 91株に対する抗MRSA薬のMIC₅₀、MIC₉₀は、それぞれABK (MIC₅₀: 1 $\mu\text{g/mL}$, MIC₉₀: 2 $\mu\text{g/mL}$), VCM (1, 1), TEIC (1, 2), LZD (2, 4)と報告しており、本検討でもほぼ同様の結果が得られた⁶⁾。

3種類のアミノグリコシド修飾酵素の経年的な保有状況の推移をTable 2に示した。1990年から1993年、1998年から2001年に分離されたMRSAの*aac* (6')/*aph* (2'')遺伝子陽性株の割合は51%であり、先の報告と一致していた。即ち、Hottaらは、*aac* (6')/*aph* (2'')遺伝子陽性株の割合は1980年以降徐々に減少し、1990年以降、2000

年まではほぼ50%程度であることを報告しており⁷⁾、また、Hanakiらも2000年から2002年に分離されたMRSA 30株のうち(*aac* (6')/*aph* (2'') + *aph* (3')-III遺伝子), (*aac* (6')/*aph* (2'') + *aad* (4', 4'')遺伝子)を保有している株は、それぞれ3.3%, 40.0%と報告している⁸⁾。一方で、2005年から2006年に分離された*aac* (6')/*aph* (2'')遺伝子陽性のMRSAは55.6%と若干の上昇が認められ、この期間のGMのMRSAに対するMIC₅₀は32 $\mu\text{g/mL}$ に上昇した。本検討に供した228株のうち、*aac* (6')/*aph* (2'')遺伝子陽性120株に対するGMのMICは幾何平均で62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、陰性108株では0.39 $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、ABKの*aac* (6')/*aph* (2'')遺伝子陽性株に対するMICの幾何平均は0.93 $\mu\text{g/mL}$ 、陰性株で0.47 $\mu\text{g/mL}$ であることから、先の報告⁹⁾と同様の結果が

得られ、ABK は AAC (6') /APH (2'') による修飾を受けにくいことが示唆された。Hanaki らは *aac* (6') /*aph* (2'') と *aph* (3') -III 遺伝子を共発現している 45 株の MRSA は ABK に対する感受性が低下することを報告している一方、近年このタイプの MRSA の分離頻度は大きな減少傾向にあることを示した⁸⁾。われわれの検討では、これらの菌株の分離頻度は 2.6% (6 株) と少なかったが、ABK の MIC (range) は 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と感性であり、2 遺伝子の共発現と ABK の感受性との関係は不明であった (Table 2)。本検討では、ABK 耐性菌の増加傾向は認められず、調査期間中で ABK の MIC が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した株は 2 株のみであった。

また、TEIC の MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 14 株について、グリコペプチド低感受性に関与していると報告されている 2 成分制御系センサーの一つ、*vraS* 遺伝子のシーケンスを行った。その結果、TEIC の MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 8 株中 2 株、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 株中 6 株が、vancomycin-intermediate *S. aureus* (Mu50) でも認められている I5N (5Ile→Asn) 変異を有していた。TEIC 低感受性は I5N 変異のみでは十分説明できないが、このような変異を有する株の動向には注意が必要である。ABK ならびに LZD の抗菌力はこの変異の影響を受けず、I5N 変異を有する 8 株 (うち *aac* (6') /*aph* (2'') 遺伝子陽性株は 7 株) に対する ABK ならびに LZD の MIC の幾何平均は、それぞれ 1.09 ならびに 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*VraS* の変異は VCM の低感受性にも関与していると報告されているが、今回 I5N 変異を有する 8 株に対する VCM の MIC の幾何平均は 1.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、I5N 変異を有する MRSA に対する VCM の MIC₁₀₀ が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったという先の報告と一致していた⁹⁾。一般に VCM は遺伝子変異の蓄積により段階的に耐性化すると考えられているため、*vraS* 遺伝子の変異のみでは大きな影響を受けないと推察される。

本邦で使用可能な 4 薬剤の抗 MRSA 薬に対する MRSA の感受性は低下しておらず、良好な抗菌活性を維持していたが、MRSA は依然として临床上最も注意しなければならない病原微生物の一つである。MRSA の伝播ならびに耐性菌出現防止には、作用機序の違いによる各

種抗 MRSA 薬の使い分け、地域・施設ごとの耐性菌動向を加味した定期的な第 1 選択薬の見直し、ガイドラインの活用による適正使用、継続的なサーベイランスなどが必要と考えられる。

文 献

- 1) Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E: Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; 368: 874-85
- 2) 井上松久, 長曾部紀子, 野々山勝人, 井田孝志, 岡本了一: β -ラクタム剤耐性遺伝子の DNA による確認。川上正也 編, 医学の中の遺伝子工学, 国際医学出版, 東京, 1992; 113-35
- 3) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-Seventh edition. CLSI; M7-A7; 2006
- 4) Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M: Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3115-21
- 5) Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M, Shiotani J, et al: Microbiological and clinical study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying *VraS* mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 64-70
- 6) 山口恵三: Meropenem を含む各種注射用抗菌薬に対する 2006 年臨床分離株の感受性サーベイランス。 *Jpn J Antibiot* 2007; 60: 344-77
- 7) Tsuchizaki N, Ishino K, Saito F, Ishikawa J, Nakajima M, Hotta K: Trends of arbekacin-resistant MRSA strains in Japanese hospitals (1979 to 2000). *J Antibiot* 2006; 59: 229-33
- 8) Barada K, Hanaki H, Ikeda S, Yamaguchi Y, Akama H, Nakae T, et al: Trends in the gentamicin and arbekacin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *J Infect Chemother* 2007; 13: 74-8
- 9) Ishino K, Ishikawa J, Ikeda Y, Hotta K: Characterization of a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme with novel substrate specificity and its gene from a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high arbekacin resistance. *J Antibiot* 2004; 57: 679-86

Prevalence of drug resistant gene and changes in susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 1990 to 2006 in Japan to antimicrobial agents

Takeshi Mikuniya, Yoshihisa Kato, Yuko Muto-Kobayashi, Yumiko Sanbongi,
Atsuyuki Shimizu, Toru Hiraishi, Takashi Ida and Kazunori Maebashi

Applied Pharmacology Research Labs, Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
760 Morooka, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

We measured the MIC of arbekacin, vancomycin, teicoplanin and linezolid against 228 clinically isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), 47 isolates obtained from 1990 to 1993, 100 isolates from 1998 to 2001, and 81 isolates from 2005 to 2006 in Japan to determine susceptibility trends from 1990 to 2006. Anti-MRSA activity of all 4 agents was virtually constant during surveillance, and MIC₅₀ and MIC₉₀ against MRSA strains isolated in 2005 to 2006 were as follows: arbekacin, 0.5 μ g/mL and 2 μ g/mL; vancomycin, 1 μ g/mL and 1 μ g/mL; teicoplanin, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL; linezolid, 2 μ g/mL and 2 μ g/mL. Of MRSA isolated in 2005 and 2006, 55.6% possessed *aac* (6')/*aph* (2'') gene encoding for aminoglycoside acetyltransferase (6'')/phosphotransferase (2''), with a slight increase since 2001. Reduced susceptibility to teicoplanin related single amino acid substitutions (I5N) in VraS.