

MRSA 菌血症血液分離株の多様性とグリコペプチド系抗菌薬に対する治療効果との関連

宮崎 元康

福岡大学筑紫病院薬剤部, 818-8502福岡県筑紫野市俗明院一丁目1番1号

Relationship between Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from the Blood and Sensitivity to Glycopeptides

Motoyasu Miyazaki

Department of Pharmacy, Fukuoka University Chikushi Hospital,
1-1, Zokumyoin 1-chome, Chikushino-shi, Fukuoka, 818-8502 Japan.

Abstract

Vancomycin has been the drug of choice for the treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections for over five decades worldwide. However, in recent years, many clinicians question the utility of vancomycin for MRSA infections, because of the issues of resistance, slow bactericidal activity, and the interaction with the accessory gene regulator (*agr*) system. In this study, we investigated whether the *in vitro* bactericidal activity of vancomycin, a polymorphism at *agr* locus, and expression of heterogeneous vancomycin-intermediate resistance (hVISA) and β -lactam antibiotic-induced vancomycin resistance (BIVR) phenotypes, impact the mortality associated with MRSA bacteremia. Vancomycin bactericidal assays were performed over 72 h as reported by Sakoulas *et al.*, using a vancomycin concentration of 16 $\mu\text{g/ml}$ against MRSA at an initial inoculum of approximately 10^8 CFU/ml. hVISA was detected by Macro Etest and population analysis, and BIVR was identified using the BIVR detection method, as previously described. The clinical data were extracted from patients' medical records, and the clinical outcome was assessed by 30-day all-cause mortality, defined as death that occurred within 30 days after the onset of bacteremia. A Hill-type mathematical model identified a very close relationship between vancomycin bactericidal activity and mortality in patients with MRSA bacteremia ($r^2=0.983$). In addition, a multivariate logistic regression analysis showed that hVISA (+)/BIVR (+) (odds ratio (OR) 7.66, 95% confidence interval (CI) 1.28-45.6; $p=0.025$), APACHE II score (OR 1.16, 95% CI 1.05-1.27; $p=0.003$), and the presence of shock (OR 6.63, 95% CI 1.42-30.9; $p=0.016$), were predictors of mortality in patients with MRSA bacteremia. Vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC), *agr* group, and *agr* function were not significantly associated with the mortality. In conclusions, the *in vitro* bactericidal activity of vancomycin and the combined phenotype of hVISA and BIVR are likely to be powerful predictors of a higher probability of mortality in patients with MRSA bacteremia. Further studies are warranted in the clinical microbiology setting to evaluate the relevance of lower vancomycin bactericidal activity, hVISA, and BIVR phenotype, and to determine the optimal treatment for those patients whose isolates show the lower bactericidal activity or combined phenotype of hVISA and BIVR.

Keywords: MRSA, bacteremia, vancomycin bactericidal activity, heterogeneous vancomycin-intermediate resist-

【緒言】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、未だに施設内での分離率および耐性率が高く、医療現場において非常に重要な菌種である。MRSA の感染拡大の防止には、標準予防策に加えて接触予防策の実施および感染経路の調査が重要である。個々の菌株を区別する方法として、近年、DNA 配列に基づいた分子疫学的解析が注目されている。その中でも、世界的にゴールドスタンダードとして用いられているのが、染色体DNA の制限酵素切断断片を電気泳動により分離し、その分離パターンを比較するパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法である¹⁾。その他、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) による特定の遺伝子増幅パターンの比較や、メチシリン耐性遺伝子 *mecA* を含む可動性DNA 断片である SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) の遺伝子タイピング、病原因子を調節する遺伝子群である *agr* (accessory gene regulator) の遺伝子タイピング、変異の少ない基礎代謝系に関与した数種の遺伝子の塩基配列のバリエーション (sequence type: ST) を比較する MLST (multilocus sequence typing)、及び染色体上に存在する多数の非コード反復配列を分離して、その増幅パターンを比較する Rep-PCR (repetitive sequenced-based PCR) 法など、さまざまな手法が分子疫学的解析に用いられている²⁻⁶⁾。

MRSA 感染症は、多剤耐性菌による日和見感染症であり、その病態として、肺炎に代表される呼吸器感染症、熱傷や褥創に伴う創傷感染、重度の下痢症状を伴う腸炎などが挙げられる。バンコマイシン (vancomycin: VCM) は、MRSA 感染症に対して50年以上前から世界中で使用されている標準的治療薬であり、日本においても1991年より臨床の現場で使用されるようになった。しかしながら、近年、VCM 低感受性株の出現や殺菌作用の発現が遅いことで、その臨床的な有効性に疑問が生じ始めている。VCM はMRSA を含む多くのグラム陽性菌に対して殺菌的に作用する薬剤であるが、ブドウ球菌に対する殺菌作用は、*in vitro* において β -ラクタム系抗菌薬と比較して殺菌作用の発現が遅いと言われている⁷⁾。MRSA 菌血症においては、MRSA に対するVCM の *in vitro* での殺菌作用の低下が臨床的効果の低下や菌消失までの時間の遅延と関連していると言われている⁸⁻¹⁰⁾。また、VCM のMRSA に対する最少発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) が米国臨床検査標準委員会 (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) 基準で感性的 ($\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$) と判定される株であっても、VCM に対して低感受性を示すVCMヘテロ耐性黄色ブドウ球菌 (heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus*: hVISA) や、 β -ラクタム系抗菌薬の存在下においてVCM耐性が誘導されるMRSA (β -lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA: BIVR) の存在が確認されており、それらの菌株に対しては、VCMによる治療効果が得られない、もしくは治療失敗と関連するという報告も散見されている¹¹⁻¹⁴⁾。

MRSA 感染症の中でも、菌血症や心内膜炎などの血流感染症は死亡率20%以上とも報告されており、極めて重篤な疾患である¹⁵⁾。したがって、MRSA 血液分離株の分子疫学的解析や、MRSA 菌血症患者における臨床的予後と関連する因子について研究することは、MRSA 菌血症治療を行っていく上でも非常に重要であると考えられる。本研究では、まずMRSA 臨床血液分離株の遺伝子多型について調べた。次に、MRSA 菌血症におけるVCM殺菌活性と生命予後との関連性について調べた。最後に、MRSA 菌血症におけるVCM低感受性株 (hVISA および BIVR) の臨床的意義について検討した。

1. MRSA 菌血症血液分離株の遺伝子型および遺伝的近縁性

MRSA 血液分離株に特化して様々な分子疫学的解析を行った報告は少なく、MRSA 菌血症治療を行う上で非常に重要であると考えられる。そこで、1987年から2004年までの18年間に、福岡大学病院腫瘍・血液・感染症内科および救命救急センター(当院)の入院患者血液から分離されたMRSA 137株を対象に、様々な分子疫学的解析を行った。

【実験方法】

SCCmec および agr の遺伝子タイピング

PCR法を用いて、個々のMRSA 血液分離株のSCCmec および agr の遺伝子型を決定した。

Rep-PCR 法

非コード反復配列をターゲットとするプライマーを用いてPCRを行い、増幅されたそれらの配列をDiversiLab systemを用いて蛍光強度と移動時間に基づきサイズと強度(量)により分離し、Microfluidics Labchip with an Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, Calif)により検出を行った。検出されたバンドパターンにより菌株を分類した。

【結果及び考察】

MRSA 137株中、91株(67%)がSCCmec II型を示した。次いで、IV型(26%)、I型(5%)の順に分離頻度が高かった(Fig. 1-1A)。SCCmec型の変遷についてFig. 1-1Bに示す。1980年代～1990年代初めにかけては、臨床現場において血液培養を施行する習慣が定着しておらず、血液分離株数が少なかったと考えられる。しかし、遺伝子型は経年的に顕著な変遷を遂げており、1990年代前半より、現在の院内感染型MRSAに特徴的なSCCmec II型が増加傾向を示し、近年では、80～90%が同型を示した。当院では、MRSA感染症に対する第一選択薬としてVCMが1992年より臨床現場に導入されており、新規の抗菌薬の臨床への導入により、MRSAに対して薬剤耐性や遺伝子変異など何らかの影響を与えた可能性が考えられる。agr型は、SCCmec型と非常に相関しており、SCCmec型と同様にagr II型が全体の61%(137株中84株)と高い割合を占めていた(Fig. 1-2A)。また、その変遷についてもSCCmec型と同様に、1990年代前半より、agr II型が増加傾向を示した(Fig. 1-2B)。

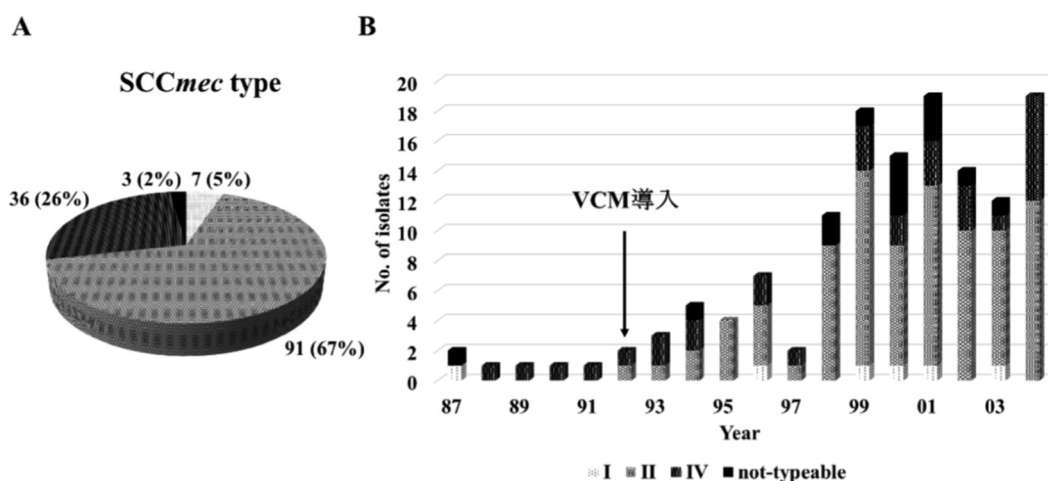


Figure 1-1. Distribution (A) and shift (B) of SCCmec type

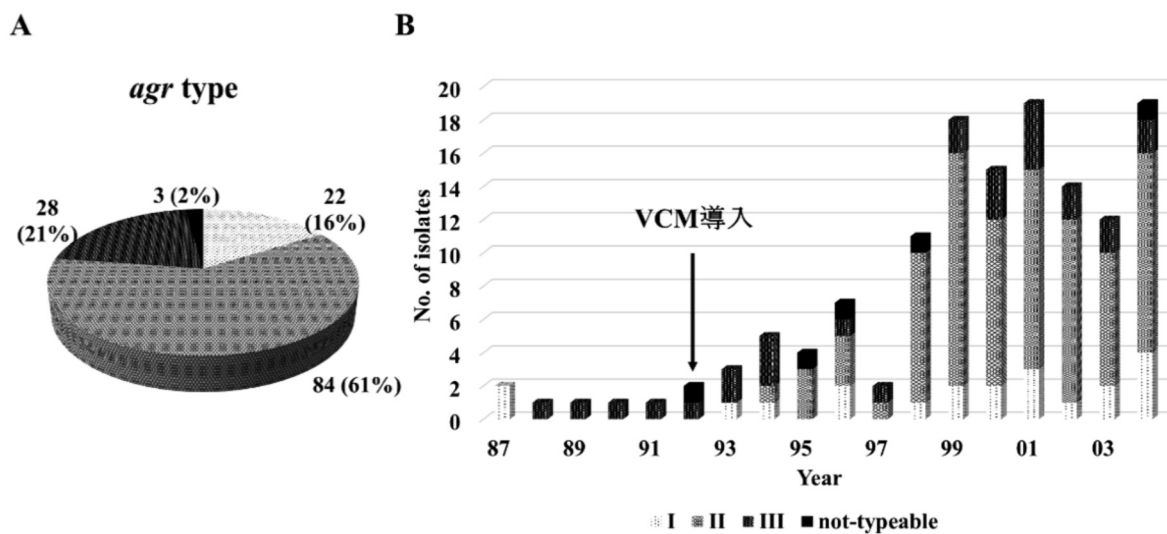


Figure 1-2. Distribution (A) and shift (B) of *agr* type

Rep-PCR法によりMRSAの遺伝的近縁性を検討したところ、多数のクローンが確認されたが、その中でも分離頻度の高い主要なクローン(Rep-PCR type 6)の存在が明らかになった(Fig. 1-3)。最も分離頻度の高かったクローンは全体の約20%を占めており、現在の日本における院内感染型MRSAの細菌学的特徴でもあるSCCmec II型/*agr* II型であった。これらの分子疫学的解析により、当院におけるMRSA臨床血液分離株の遺伝型が、日本で多数報告されている遺伝型と一致していることが明らかとなった¹⁶⁾。

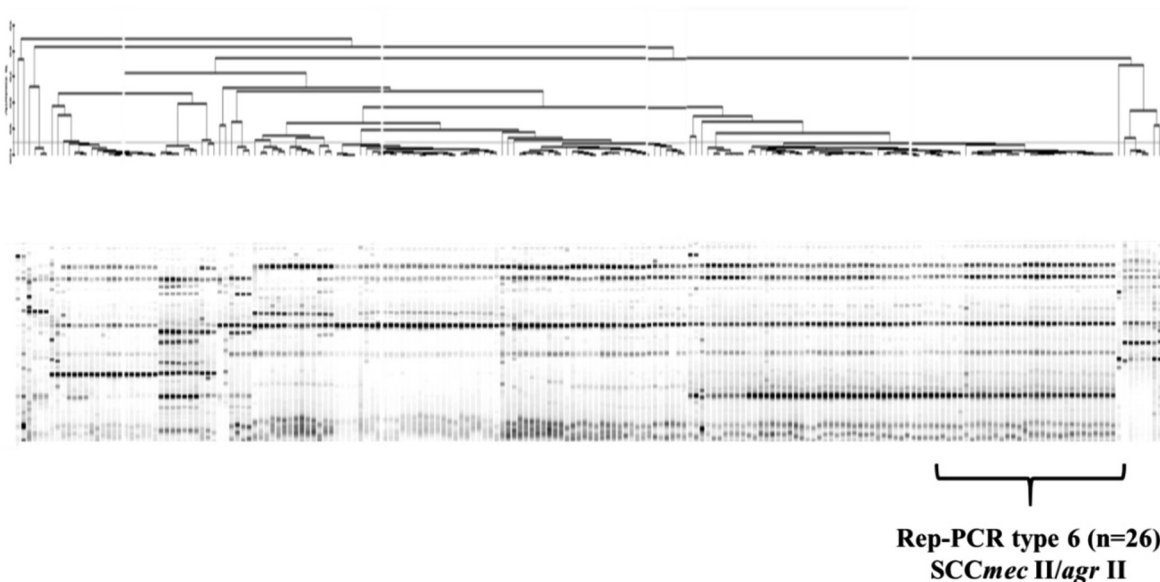


Figure 1-3. Dendrogram and virtual gel images of MRSA blood isolates by Rep-PCR

2. MRSA 菌血症における VCM 殺菌活性と生命予後との関連性

MRSA による菌血症や心内膜炎などの血流感染症の治療には抗菌薬の殺菌力及び初期治療が重要であることが知られている。1. で分子疫学的解析を行った137株のMRSAのうち、菌血症に対する初期治療としてグリコペプチド系抗菌薬(VCMおよびテイコプラニン(TEIC))を投与された66例の患者より分離された66株のMRSAに焦点を絞り、*in vitro*におけるVCM殺菌活性を測定し、患者生命予後との関連性について調べた。

【実験方法】

VCM 殺菌活性

Mueller Hinton Broth で37℃、一晚培養したMRSAを、初期濃度 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mLとなるように調製した。同懸濁液にVCM溶液を加え、VCM濃度が16 μ g/mLとなるよう調整した。37℃、100rpmで培養し、接種菌液(0時間)及びVCM添加72時間後に培養液100 μ LをTryptic Soy Agarに希釈培養し、それぞれ24時間後にコロニー数を測定した。接種菌数の対数値とVCM添加72時間後の菌数の対数値の差(\log_{10} CFU/mL at 0h - \log_{10} CFU/mL at 72h)をVCM殺菌活性として評価した。

MRSA 菌血症患者の臨床的背景

MRSA 菌血症に対して初期治療にグリコペプチド系薬(VCMまたはTEIC)が投与された66例について、その臨床的背景をカルテにより調査した。患者生命予後は、MRSA血液分離後30日以内の全原因死亡(30-day mortality)を用いて評価し、VCM殺菌活性と患者生命予後について後方視的に検討した。

【結果及び考察】

MRSA に対する *in vitro* における VCM 殺菌活性の低下と 30-day mortality との間に有意な相関関係があることが明らかとなった($r^2=0.983$) (Fig. 2-1)。これまでに、MRSA 菌血症における VCM 殺菌活性と臨床的予後との関連性については、*in vitro* における VCM 殺菌活性が高い株ほど治療開始から菌消失までに要する時間が短く VCM 治療効果が高いことは知られているが⁹⁾、本研究のように生命予後との有意な相

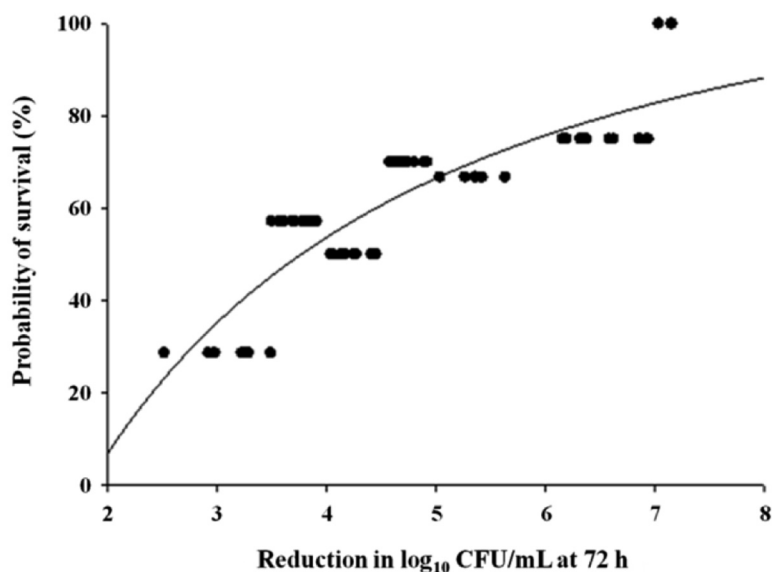


Figure 2-1. VCM pharmacodynamics showing the relationship between the probability of survival and bactericidal activity, which was fit to a Hill-type mathematical model ($r^2=0.983$).

関を示したものは過去に報告が無く、MRSA菌血症における薬剤の有効性を考える上で極めて重要な所見である。

3. MRSA菌血症におけるVCM低感受性株(hVISA, BIVR)の分離頻度およびその生命予後への影響

VCM低感受性株として知られているhVISAやBIVRについては、各々MRSA菌血症における治療失敗や再発との関連性についての報告が散見されているが¹¹⁻¹⁴⁾、明確な臨床的意義は未だ明らかとなっておらず、また2つのphenotypeについて同時に臨床的予後との関連性について検討した報告はない。そこで、2.と同様に菌血症に対する初期治療としてグリコペプチド系抗菌薬を投与された患者に焦点を絞り、VCM低感受性株であるhVISAおよびBIVRのphenotypeの組み合わせも考慮し、その臨床的意義について検討した。

【実験方法】

hVISAの検出

Macro Etest法でスクリーニングを行い、hVISA陽性を示したMRSAに対して、ポピュレーション解析により確認した¹²⁾。本研究では、ポピュレーション解析によりhVISAと同定されたMRSAをhVISAと定義した。

BIVRの検出

羊血液寒天培地で35℃、18時間培養したMRSAの純粋なコロニーを使用し、McFarland Standard 1の濁度に調整した。同懸濁液をVCM濃度4μg/mLを含有する培地(Mu3寒天培地)に均一に塗布し、中央にβ-ラクタム系抗菌薬(アズトレオナム)の感受性ディスクを置き、35℃、24～48時間培養した¹⁴⁾。感受性ディスク周辺に明らかなリング状の菌の誘導発育帯が認められた場合およびMu3寒天培地全面に菌の発育を認めた場合をBIVRと判定した。

多変量ロジスティック回帰分析

1987年から2007年までの21年間における162例のMRSA菌血症患者のうち、初期治療としてグリコペプチド系抗菌薬が投与されていた93例を対象とした。患者の臨床的背景(年齢、性別、基礎疾患、共存疾患、中心静脈カテーテル挿入の有無、集中治療室への搬入の有無、菌血症発症時のacute physiology and chronic health evaluation II(APACHE II)スコア、ショックの有無、菌血症の侵入門戸、グリコペプチド系治療時のTDM施行の有無)と細菌学的特徴(SCCmec型、agr型、VCM MIC、TEIC MIC、hVISA、BIVR)を用いて、30-day mortalityと関連する因子について多変量ロジスティック回帰分析を行った。

【結果及び考察】

162株のMRSAのうち、30株(18.5%)がhVISA、39株(24.1%)がBIVRと同定された。BIVRは、β-ラクタム系抗菌薬存在下ではVCMに耐性を示すので、hVISAとBIVRの両方の性質を示す株はVCM耐性の相乗もしくは相加効果を示すことが考えられるため、hVISAとBIVRの組み合わせによりその検出率を検討した。162株中、18株(11.1%)がhVISAおよびBIVR両方の性質を示し[hVISA(+)/BIVR(+)]、12株(7.4%)がhVISAのみの性質を示し[hVISA(+)/BIVR(-)]、21株(13.0%)がBIVRのみの性質を示し[hVISA(-)/BIVR(+)]、111株(68.5%)がhVISAおよびBIVRのどちらの性質も示さなかった[hVISA(-)/BIVR(-)](Fig. 3-1)。

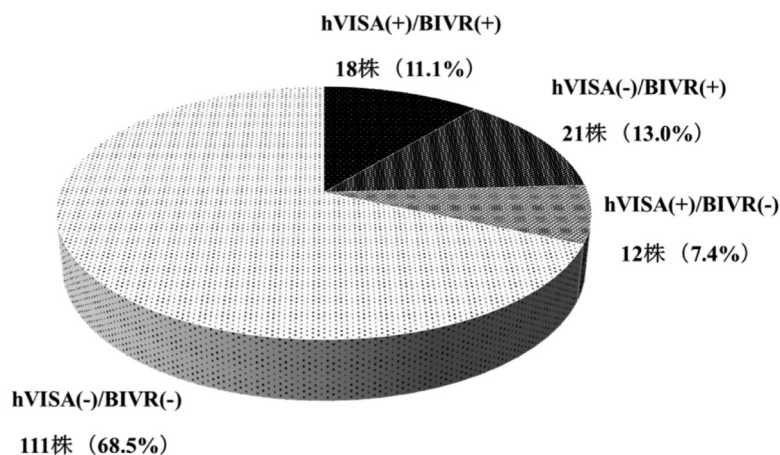


Figure 3-1. Distribution of isolates with hVISA and/or BIVR phenotype

高APACHE IIスコア ($p=0.003$), 菌血症時のショック ($p=0.016$), hVISA および BIVR の両 phenotype 陽性 (hVISA(+)/BIVR(+)) ($p=0.025$) の3つが独立した生命予後不良因子であった (Table 3-1)。また, hVISA(+)/BIVR(+)株について Rep-PCR 法により遺伝型を検討したところ, クローンは多岐にわたっていた (Fig. 3-2)。すなわち, 患者生命予後不良である原因は, ある特定のクローンによるものではなく, hVISA/BIVR の phenotype そのものが生命予後不良のリスク因子となっていることが示唆される。

Table 3-1. Logistic regression analysis of risk factors associated with 30-day mortality

	Odds ratio	95% confidence interval	p-value
APACHE II score	1.16	1.05-1.27	0.003
Shock	6.63	1.42-30.9	0.016
hVISA(+)/BIVR(+)	7.66	1.28-45.6	0.025

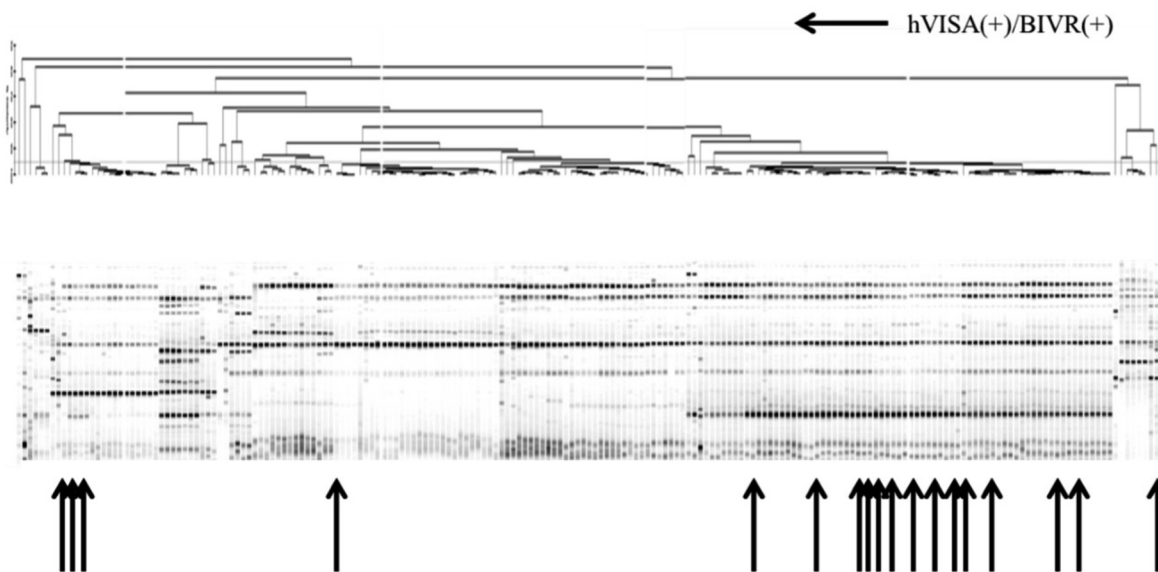


Figure 3-2. Dendrogram and virtual gel images of MRSA blood isolates by Rep-PCR Black arrows represent hVISA(+)/BIVR(+) isolates.

【総括】

MRSAは、世界で初めて報告されてから50年以上経過した現在でも臨床現場で大きな問題である。MRSAは新規抗菌薬の開発のたびに、より巧妙な機序を獲得し、耐性菌へと進化を遂げてきた。また、1990年代以降出現してきた市中感染型MRSAも、現在米国では深刻な問題であり、日本においても増加が危惧されている。日本では、すでに多様なクローンのMRSAが広く蔓延しており、その制御は極めて困難である。このような状況において、耐性メカニズムや病原性の解明、薬剤感受性サーベイランス、疫学調査などの基礎的研究から、診断・治療および予防・制御といった臨床的アプローチが求められている。本研究の成果によって、臨床現場における菌血症などの重篤なMRSA感染症に対する、適切かつ有効な治療の実施に貢献できるものと期待される。

【参考文献】

- 1) Ichihama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(12):2690-5.
- 2) Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, Hiramatsu K. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol.* 2014;1085:131-48.
- 3) Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1008-15.
- 4) Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70(2):631-41.
- 5) Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. Spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):792-9.
- 6) Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1187-92.
- 7) Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK Jr, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, Chu VH, Joyce MJ, Reller LB, Corey GR, Fowler VG Jr. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2007;44(2):190-6.
- 8) Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2398-402.
- 9) Moise PA, Sakoulas G, Forrest A, Schentag JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2582-6.
- 10) Sakoulas G, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1):S40-50.

- 11) Musta AC, Riederer K, Shemes S, Chase P, Jose J, Johnson LB, Khatib R. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. J Clin Microbiol. 2009;47(6):1640-4.
- 12) Rybak MJ, Leonard SN, Rossi KL, Cheung CM, Sader HS, Jones RN. Characterization of vancomycin-heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the metropolitan area of Detroit, Michigan, over a 22-year period (1986 to 2007). J Clin Microbiol. 2008;46(9):2950-4.
- 13) Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):99-139.
- 14) Hanaki H, Yamaguchi Y, Nomura S, Haraga I, Nagayama A, Sunakawa K. Method of detecting beta-lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR). Int J Antimicrob Agents. 2004;23(1):1-5.
- 15) van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):362-86.
- 16) Ohkura T, Yamada K, Okamoto A, Baba H, Ike Y, Arakawa Y, Hasegawa T, Ohta M. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese hospitals. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 10):1329-36.