

博士論文

津山中央病院で臨床分離された
MRSA の性状解析

平成 29 年 3 月

就実大学大学院医療薬学研究科
疾病治療薬学専攻 最適薬物療法学分野
和田 朋子

目次	1
略語	2
第1章 序論	
第1節 はじめに	4
第2節 ブドウ球菌	6
第3節 MRSA	7
第4節 ブドウ球菌とバイオフィルム	9
第5節 市中感染型 MRSA	11
第6節 MRSA の判定	13
第7節 MRSA の分子疫学的解析法	15
第8節 MRSA 感染症の治療薬	20
第2章 POT 法による MRSA の型の判定とバイオフィルム形成能	
第1節 要旨	25
第2節 緒言	25
第3節 材料と方法	26
第4節 結果と考察	28
第3章 臨床分離される MRSA の動向の変化	
第1節 要旨	43
第2節 緒言	43
第3節 材料と方法	44
第4節 結果と考察	44
第4章 総括と展望	50
参考文献	54

略語

AUC	area under the (blood concentration time) curve
BHI	Brain Heart Infusion
BIVR	β -lactam antibiotic induced-vancomycin resistant MRSA
CA-MRSA	community-acquired MRSA
CC	clonal complex
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cmax	maximum drug concentration
CNS	coagulase-negative staphylococci
CPK	creatine phosphokinase
CRBSI	catheter-related bloodstream infection
CRE	carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i>
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
HA-MRSA	hospital-acquired MRSA
ICT	infection control team
ICU	intensive care unit
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IWG-SCC	International Working Group on the Classification on Staphylococcal Cassette Chromosome Elements
JANIS	Japan Nosocomial Infections Surveillance
MDRA	multidrug-resistant <i>Acinetobacter spp.</i>
MDRP	multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MIC	minimum inhibitory concentration
MLST	multilocus sequence typing
mRNA	messenger RNA
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

MSSA	methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NICU	neonatal intensive care unit
O.D.	optical density
ORF	open reading flame
PAE	postantibiotic effect
PBP	penicillin binding protein
PCR	polymerase chain reaction
PD	pharmacodynamics
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PK	pharmacokinetics
POT	phage open reading flame typing
PRSP	penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PVL	panton-valentine leucocidin
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
SCC _{mec}	staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
SSI	surgical site infection
SSSS	staphylococcal scalded skin syndrome
SSTI	skin and soft tissue infection
TDM	therapeutic drug monitoring
tRNA	transfer RNA
TSS	toxic shock syndrome
TSST-1	toxic shock syndrome toxin-1
VISA	vancomycin-intermediated-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	vancomycin-resistant Enterococci
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization

第1章 序論

第1節 はじめに

ヒトと微生物の関わり合いはヒトの起源にまでさかのぼる。微生物は、地球が誕生してから7~8億年後の約37~38億年前にはすでに存在していたと言われており、微生物の歴史はヒトの歴史よりもはるかに古いものである。14世紀から15世紀にかけて天然痘やペストの大流行がヨーロッパを襲い、大量の死者を生み出す結果となった。当時、ヒトは見えざる敵である微生物に対して打つ手立てもなく、感染症はヒトにとって脅威であった。しかし、1674年オランダのAntony van Leeuwenhoekによる微生物の発見以降、フランスのLouis PasteurやドイツのRobert Kochらによって、殺菌方法や培養法などの様々な微生物学的研究手法が開発され、微生物学は目覚ましい発展を遂げた。

今日の化学療法はドイツのPaul Ehrlichが化学療法の概念を提唱したことに始まる。1910年、Ehrlichと秦佐八郎は梅毒治療薬となるサルバルサン(salvarsan)を発見した。これは、ヒトにはほとんど害を与えることなく病原微生物に選択的に作用する世界で初めての合成化学療法薬であり、当初は「魔法の弾丸」と呼ばれた。その後、1929年イギリスのAlexander Flemingが*Penicillium notatum*からペニシリン(penicillin)を発見し、Howard Walter FloreyとErnst Boris Chainの努力などにより、ペニシリンの発見から10年以上後になる1942年にペニシリンGとして実用化された。さらに1935年、ドイツのGerhardt Domagkはサルファ薬の原点となる合成染料のプロントジル(prontosil)に抗菌活性があることを見出し、1943年にはSelman A. Waksmanが*Streptomyces griseus*からストレプトマイシン(streptomycin)を発見した。これらの出来事を契機にテトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質などの優れた抗菌薬が次々に開発され、臨床応用された。こうした経緯から、細菌感染症はかつてのように恐れられることがなくなり、制圧されたかのように思えた。

しかし、抗菌薬の広範囲な使用により抗菌薬に耐性を示す菌、すなわち薬剤耐性菌が出現してきた。ペニシリンの実用化の数年後にはペニシリンを分解する酵素であるペニシリナーゼ(penicillinase)を産生する菌が分離された。これに対

し、ペニシリンに安定なメチシリン(methicillin)が開発されたが、その翌年にはメチシリンに耐性を示す菌が出現した。これがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA)の誕生である。近年では複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌が出現している。臨床現場で分離される代表的な多剤耐性菌には MRSA の他、バンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant Enterococci : VRE)、ペニシリン耐性肺炎球菌(penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* : PRSP)、多剤耐性緑膿菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP)などが挙げられる。さらに、近年では多剤耐性アシネトバクター(multidrug-resistant *Acinetobacter spp.* : MDRA) やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* : CRE)が日本を含め世界各国で次々に報告されており、多剤耐性菌感染症による死亡例も出ている。特に、2013年に米国疾病予防管理センター(Centers for Disease Control and Prevention : CDC)が CRE を「悪魔の耐性菌」と大きく取り上げたことは記憶に新しい。多剤耐性菌の出現により、細菌感染症は再び脅威となってきた。2014年4月7日の World Health Day に世界保健機関(World Health Organization : WHO)は「Antimicrobial resistance : global report on surveillance 2014」を発表し、2015年5月の WHO 総会では薬剤耐性に対する Global Action Plan が採択されるなど、薬剤耐性への世界規模での対策が講じられるようになってきている。

このような状況下、米国感染症学会(Infectious Diseases Society of America : IDSA)は薬剤耐性菌に立ち向かうために重要な4つの手段として①感染症の予防、耐性菌の広がりを防ぐ、②耐性菌状況の把握、③抗菌薬の適正使用、④新しい薬あるいは検査法の開発、の重要性を示している。特に④に対しては「2020年までに耐性菌に有効な抗菌薬を10剤開発する」という具体的な目標を掲げて対策に取り組んでいる。わが国では、日本学術会議が2013年のG8サミットにおいて「病原微生物の薬剤耐性菌問題：人類への脅威」という共同声明を発表した。同時期に日本化学療法学会を中心とする関連6学会が「新規抗菌薬の開発に向けた6学会提言 - 耐性菌の現状と抗菌薬の開発の必要性を知っていただくために」を発表し、新規抗菌薬開発に向けた産官学連携の重要性を訴えている。それから3年後の2016年4月、わが国は日本版アクションプランを発表し、伊

勢志摩サミットでは議長国として国際協力を推進した。

ところが、新規抗菌薬は年々減少している。その背景には製薬企業が抗菌薬開発に消極的であること、副作用の問題で開発が断念されていること、日本には高度多剤耐性菌がほとんどなく臨床試験を実施できないこと、などがある。これらの問題を解決するための仕組みを国レベルで作成する必要があるが、たとえ新規抗菌薬が開発されたとしても薬剤耐性菌問題を完全に解決することは困難であり、薬剤耐性菌対策には抗菌薬の適正使用やサーベイランスが非常に重要であると考えられる。

そこで、本研究は薬剤耐性菌による院内感染防止を目的とした抗菌薬適正使用推進のため、薬剤耐性菌の代表である **MRSA** の性状を解析することにより薬剤耐性菌の動向を把握し、臨床現場での院内感染対策を検討することにした。

第2節 ブドウ球菌

ブドウ球菌(*Staphylococci*)は通性嫌気性のグラム陽性球菌である。ブドウ球菌の名前の由来は顕微鏡で観察するとブドウの房状に見えることである。ブドウ球菌は36菌種に分類されており、自然界にも広く存在しているが、臨床的に問題となるのは黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)および腐生ブドウ球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)などである。

ブドウ球菌はヒトの皮膚や粘膜に存在する常在菌であり、健常人に対して病原性を示すことはほとんどないが、免疫力の低下した患者に対し日和見感染を引き起こす。特に、黄色ブドウ球菌はブドウ球菌属の中で最も病原性が高く、細菌感染症の原因菌として臨床現場では高頻度に分離されている。

黄色ブドウ球菌による感染症は、創傷や外科手術による皮膚障害、中心静脈カテーテルやペースメーカー、人工関節等の人工物の挿入、免疫不全状態、のような様々な要因が発症に関わっている。黄色ブドウ球菌関連の感染症の発症は、元々定着していた菌が体内に侵入する場合が大半であるが、菌の産生する毒素が影響する場合もある。黄色ブドウ球菌は、種々の酵素や毒素を産生しており、様々な病気を引き起こす。

(1) 毒素性ショック症候群(toxic shock syndrome : TSS)

黄色ブドウ球菌の産生する毒素 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)が発症に関連しており、この毒素のもつスーパー抗原活性によるものとされている。急激に発症して全身性紅斑、嘔吐、下痢などの症状から血圧低下および多臓器障害を引き起こし、時に致死的となる。

(2) ブドウ球菌性皮膚剥離症候群(staphylococcal scalded skin syndrome : SSSS)

表皮剥離生毒素(exfoliative toxin)が表皮顆粒層の細胞間接着に作用して皮膚表面に水疱を作り、上皮の著しい剥離を引き起こす。乳幼児に特有の疾患であり、新生児では ritter 病と呼ばれる。

(3) 食中毒

食物がブドウ球菌で汚染され、菌が産生した腸管毒素(staphylococcal enterotoxin)によって吐き気を中心とした食中毒が起こる。この毒素は耐熱性であるため、加熱処理は無効である。

(4) 化膿性炎症

ブドウ球菌は代表的な化膿菌であり、皮膚に節(furuncle)、癰(carbuncle)、膿痂疹、蜂巣織炎、毛囊炎などをきたす。また、膿瘍を作りやすいことから、骨髄炎や心内膜炎などの深部局所性感染を引き起こすこともある。

第3節 MRSA

MRSA は 1961 年にイギリスで初めて分離されて以来、現在もなお世界的に広く分離されている薬剤耐性菌である。日本では 1980 年代後半より各医療機関で分離されるようになった。現在では、日本のほとんどの医療機関で分離される代表的な院内感染の原因菌である。日本の感染症法では、MRSA 感染症は 5 類感染症基幹定点把握疾患に定められている疾患であり、基幹定点より月ごとの発生状況が報告されている。

MRSA は、黄色ブドウ球菌が通常保有している 4 種類のペニシリン結合タンパク質(penicillin binding protein : PBP)に加え、PBP2a というβ-ラクタム薬への親和性が著しく低い細胞壁ペプチドグリカン合成酵素を産生する。PBP2a をコードする遺伝子 *mecA* は Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)上に存在している。SCC*mec* は外来性の DNA 断片であり、染色体 DNA に挿入されている。さらに、SCC*mec* には *tetM* や *ermA* などの抗菌薬耐性遺伝子も存在しており、多剤耐性を担っている(1)。International Working Group on the Classification on Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC)の分類によると、SCC*mec* は現在までに I 型から VIII 型までの 8 つの型が報告されており、日本で分離されるのは主に I 型から V 型である(2-4)。

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(Japan Nosocomial Infections Surveillance : JANIS)のサーベイランス 2014 年報より算出した MRSA の分離率を図 1-1 に示した。分離された黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合は年々減少傾向にある。PRSP や VRE、MDRP など、他の薬剤耐性菌の割合も年々減少傾向にあることから、院内における薬剤耐性菌対策は効を奏していると言える。しかし、集中治療室(intensive care unit : ICU)部門におけるカテーテル関連血流感染症(catheter-related bloodstream infection : CRBSI)の原因菌は黄色ブドウ球菌だけで 13.0%、うち MRSA はその半数以上の 6.7%を占めていること、新生児集中治療室(neonatal intensive care unit : NICU)における感染症の原因菌の第 1 位も MRSA (11.8%)である。MRSA は減少傾向にあるものの、現在もなお高い分離率を示しており、院内感染対策は今後も重要であると考えられる。

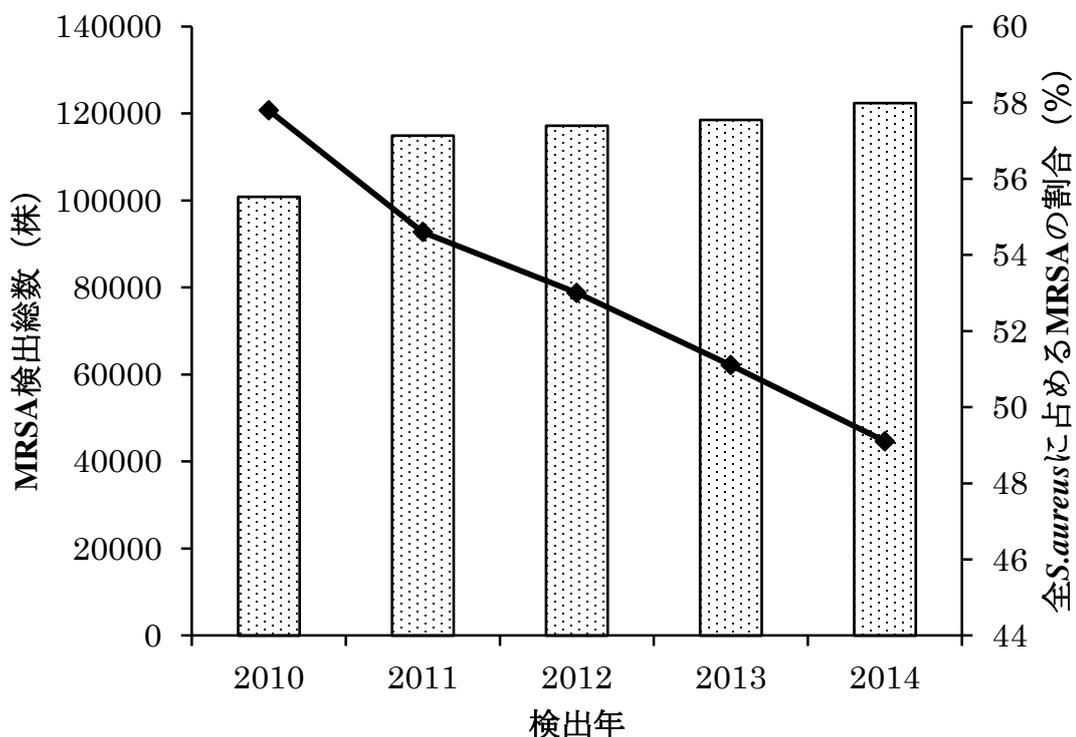


図 1-1 MRSA 検出総数および黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合
 JANIS サーベイランス 2014 年報より作成

第 4 節 ブドウ球菌とバイオフィルム

バイオフィルムとは、細菌が菌体外に分泌した多糖体、タンパク質などの粘液質を介した細菌同士あるいは細菌と固体表面、気液界面に形成する構造体である。バイオフィルムはカテーテルやペースメーカー、人工関節などの医療デバイスに形成されるほか、心内膜や尿路などの宿主組織にも形成される。バイオフィルムは菌体外多糖を介する間接的な付着であるため、宿主の免疫応答を回避する(5, 6)。また、バイオフィルム内に存在する細菌は増殖速度が遅いため、抗菌薬のターゲットとなる細胞壁合成やタンパク質合成が低下している(7)。これによりバイオフィルムを形成した細菌には抗菌薬は効きにくいとされている。

ブドウ球菌は血流感染症の代表的な原因菌である。最も多いのは表皮ブドウ球菌に代表されるコアグララーゼ陰性ブドウ球菌(coagulase-negative staphylococci : CNS)、次いで黄色ブドウ球菌となり、ブドウ球菌属だけで半数以上を占める(図

1-2)。特に、血管内留置カテーテル挿入患者は CRBSI をきたす恐れがあり、注意が必要である。黄色ブドウ球菌によって引き起こされる CRBSI のうち、60%以上が MRSA である (8)。

CRBSI を引き起こす経路として以下の3つの経路がある。

- (1) カテーテル外表面を介する経路：カテーテル刺入部から微生物が侵入する
- (2) カテーテル内腔を介する経路：輸液ライン、輸液バッグから微生物がカテーテル内腔を通して侵入する経路
- (3) 他の感染部位から血液を介する経路

CRBSI はカテーテル局所の感染にとどまらず、全身の血液感染症に発展することがある。CRBSI 予防の観点から、「血管内留置カテーテル由来感染の予防のための CDC ガイドライン 2011」が策定されている。

CRBSI とバイオフィルム形成の関連を示す直接的なデータはないが、細菌感染症の 80%以上にバイオフィルムが関与していると言われており、カテーテルの刺入部や内外腔におけるバイオフィルム形成も疑われる(9)。したがって、バイオフィルムを形成しやすい MRSA は CRBSI を引き起こすリスクが高いとされている。

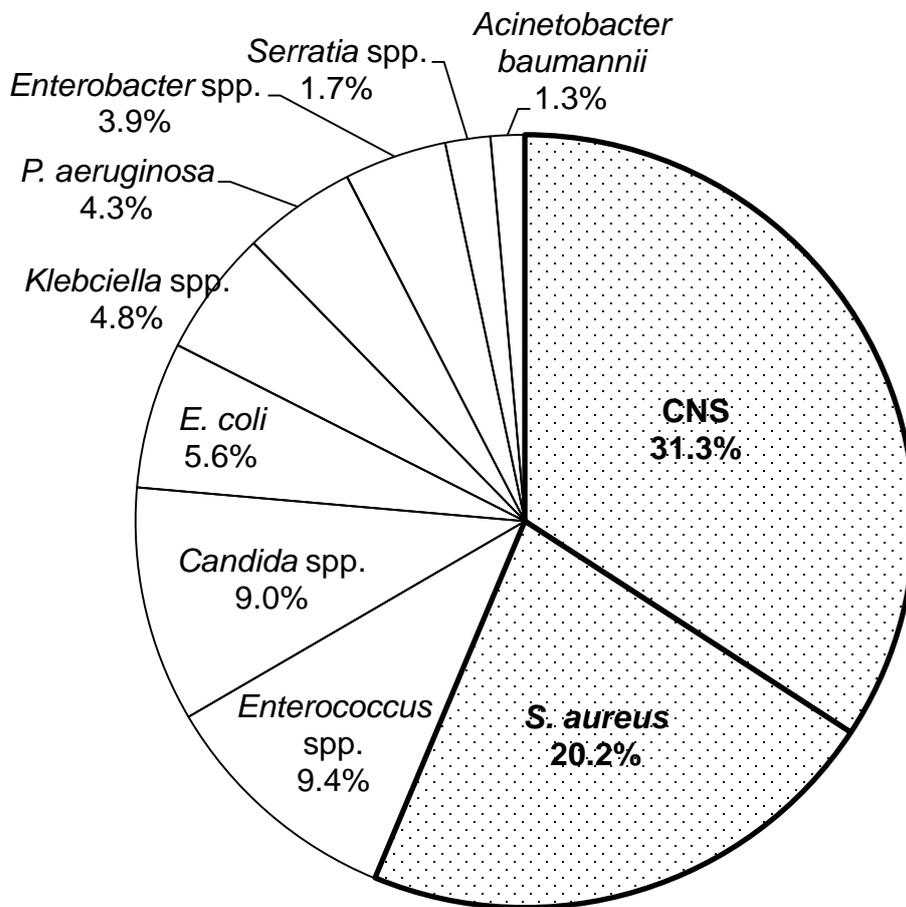


図 1-2 血流感染症の原因菌
 グラフは参考文献 10 をもとに作成

第 5 節 市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA : CA-MRSA)

近年、市中感染型 MRSA (community-acquired MRSA : CA-MRSA) の分離率の増加が報告されている。CA-MRSA は「従来の院内感染型 MRSA のリスク因子が該当しない患者から分離された MRSA」と定義され、過去 1 年以内に入院歴がない外来患者から分離された MRSA を言う。入院患者の場合は入院後 48 時間以内に分離された MRSA が対象となる。CA-MRSA の出現により、これまで院内で分離されていた MRSA は CA-MRSA と区別して院内感染型 MRSA (hospital-

acquired MRSA : HA-MRSA)と呼ばれるようになった。HA-MRSA 感染リスク因子は研究者によって定義づけが異なるが、①入院あるいは手術、②長期療養施設への長期入所、③透析、④カテーテル等の医療デバイスの留置、⑤MRSA 陽性の既往であり、50 歳以上の易感染者が感染を起こしやすいとされてきた(11-13)。ところが、CA-MRSA は、感染者の多くが感染のリスク因子を持たないような小児から青年層である。CA-MRSA は皮膚接触により重篤な皮膚軟部組織感染症(skin and soft tissue infections : SSTI)を引き起こし、時に致死的な感染症を引き起こすことが報告されている(14)。CA-MRSA 感染リスクが高い場所は、①大学、学校、託児所、②陸軍、海軍、③レスリングなどの競技チーム、④刑務所、⑤男性同性愛者、⑥地域原住民、⑦感染者のいる家庭、⑧薬物使用、⑨入れ墨、⑩災害非難住民等、皮膚接触の多い環境である。

CA-MRSA は主に SCCmec IV 型または V 型を有しており、HA-MRSA の II 型の SCCmec よりもサイズが比較的小さい。また、SCCmec 内に他の薬剤耐性遺伝子を保有しない場合が多いため、 β -ラクタム薬以外の抗菌薬への感受性は比較的保たれている場合が多い。CA-MRSA の多くが白血球破壊毒素の一部である Panton-Valentine leukocidin (PVL)を産生することが知られている(12)。米国で分離される PVL 陽性の CA-MRSA は USA300 と呼ばれている。日本の CA-MRSA の PVL 産生株は少ないが、増加傾向にある(15-17)。また、PVL 陰性の CA-MRSA も報告されている(18)。

表 1-1 に HA-MRSA と CA-MRSA の特徴を示した。

表 1-1 CA-MRSA と HA-MRSA の比較

	HA-MRSA	CA-MRSA
定義	入院後 48 時間以後に分離された MRSA	従来 of MRSA 感染のリスク因子が該当せず、過去 1 年以内に入院歴がない外来患者から分離された MRSA
流行の場所	主に病院や長期療養施設	市中 (学校、幼稚園、家庭など)
薬剤感受性	多剤耐性	比較的多くの抗菌薬に感性
主な SCCmec 型	II 型	IV 型や V 型
主なクローン	New York/ Japan clone	USA300
毒素	種々の毒素	PVL が特徴的
感染者の年齢	高齢者	主に若年者、小児
感染部位	種々の臓器	主に皮膚、軟部組織
治療経過	難治性	良好

MRSA 感染症の治療ガイドラインより引用・改変

第 6 節 MRSA の判定

MRSA の判定には、薬剤感受性に基づく判定と PBP2a を検出する方法、*mecA* を検出する方法の 3 種類がある。以下に各種判定方法の特徴をまとめた。

(1) 薬剤感受性に基づく判定

薬剤感受性を測定する方法は、ディスク拡散法、微量液体希釈法、選択培地などがある。ディスク拡散法と微量液体希釈法はオキサシリンへの耐性度を評価する方法である。一方、選択培地による方法はオキサシリン含有培地上での菌の生育状況を判定する方法である。

薬剤感受性に基づく MRSA の判定基準の薬剤には当初メチシリンが用いられてきたが、薬剤の安定性からオキサシリンが用いられるようになった。1990 年

頃より、*mecA* を保有しているにもかかわらずオキサシリンによる薬剤感受性試験では MRSA と判定できない Low-level MRSA や borderline MRSA が報告され始めた(19, 20)。これに対し、米国臨床検査標準委員会(National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute : NCCLS、現在の Clinical Laboratory and Standards Institute : CLSI)は 2004 年にセファマイシン系抗菌薬であるセフォキシチンの使用を提唱した。セフォキシチンは、PBP2a 産生能を誘導してオキサシリン耐性を検出できるとされている(21)。

表 1-2 MRSA の判定基準

	ディスク拡散法		微量液体希釈法	
	阻止円(mm)		MIC* (µg/mL)	
オキサシリン	≥13	S	≤2	S
	11-12	I	≥4	R
	≤10	R		
セフォキシチン	≥22	S	≤4	S
	≤21	R	≥8	R

* MIC : Minimum Inhibitory Concentration, CLSI M100-S25 をもとに作成

(2) PBP2a を検出する方法

PBP2a を検出する方法にはラテックス凝集法がある。これはラテックス粒子に感作された PBP2a に対するモノクローナル抗体が、PBP2a を抗原として抗原抗体反応を起こし凝集塊を形成することを利用したスライドラテックス凝集法を測定原理としている。MRSA-LA「生研」[®]という試薬がデンカ生研株式会社より販売されている。

(3) *mecA* を検出する方法

黄色ブドウ球菌から抽出した DNA を polymerase chain reaction (PCR)法などの各種核酸増幅検査法を用いて *mecA* を増幅し、電気泳動で分離して *mecA* のバンドを確認する方法である。

表 1-3 MRSA の判定方法

検出法	測定法	使用薬剤	MRSA 判定基準
薬剤感受性 試験法	ディスク拡散法	オキサシリン	阻止円直径 ≤10 mm
		セフォキシチン	≤21 mm
	微量液体希釈法		MIC
		オキサシリン	4 µg/mL
		セフォキシチン	8 µg/mL
	選択培地	オキサシリン	発育(+)
PBP2a 検出法	ラテックス凝集法	市販試薬	凝集(+)
<i>mecA</i> 検出法	PCR 法など	市販試薬	<i>mecA</i> (+)

Journal of Healthcare-associated Infection, 7(1), 32-35, 2014 より抜粋・改変

従来、MRSA の判定にどの方法を用いるかは各医療機関に委ねられてきた。主に、*mecA* の検出と PBP2a の検出がゴールドスタンダードとされてきた(22, 23)。しかし、このような分子生物学的手法を用いた検出方法を日常的に実施している施設は少なく、医療機関における細菌検査室の多くは薬剤感受性試験のみで判定を行っている。

2010年1月、CLSIによって感受性検査基準の改定が提示され、MRSA の定義が提唱された。MRSA は「*mecA* 遺伝子の発現もしくはオキサシリンに対する PBP2a の親和性の変化によるメチシリン耐性メカニズムを示す菌株(modified *S. aureus*)」と定義され、MRSA は *mecA* を保有する *S. aureus* もしくはオキサシリンの MIC ≥ 4 µg/mL の *S. aureus* とされている。また、「セフォキシチンおよびオキサシリンの両方を試験した場合は、どちらか一方の薬剤が耐性であった場合にはオキサシリン耐性と報告する」と規定されたため、オキサシリンに感性であってもセフォキシチンに耐性の場合はオキサシリン耐性と判定する。

第7節 MRSA の分子疫学的解析法

MRSA は接触によって容易に伝播する。MRSA の院内伝播を防止するために

はサーベイランスが非常に重要である。感染源の特定や感染経路の把握には、分子疫学的解析が必須であり、MRSA の分子疫学的解析の方法には様々な手法が用いられている。MRSA が出現した当初、ファージ型やコアグララーゼ型が用いられてきたが、これらの手法はインターネットが普及し、遺伝子解析が進歩した現在ではほとんど用いられていない。現在行われている代表的な分子疫学的解析法にパルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis : PFGE)、multilocus sequence typing (MLST)、*spa* typing、SCC*mec* typing などがある。いずれも PCR を基本とする手法である。表 1-4 に特徴をまとめた。

表 1-4 代表的な MRSA の分子疫学的解析法

解析手法	特徴
PFGE	ゲノム DNA 全体を制限酵素で切断し、電気泳動パターンから遺伝子型を決定する
MLST	7 か所のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定し、MLST のデータベースを照合する
<i>spa</i> typing	Staphylococcal protein A の遺伝子(<i>spa</i>)の多変領域 polymorphic region X の塩基配列を決定し、データベースを照合する
SCC <i>mec</i> typing	PCR によって <i>mec</i> 領域と <i>ccr</i> 領域を増幅し、遺伝子多型を検出する方法である

日本臨床微生物学雑誌, 17(3), 159-165, 2007 をもとに作成

PFGE は狭い範囲での解析に適しているが、実験操作が煩雑であり再現性に乏しい、特殊な装置が必要である、時間とコストがかかるなどの問題点がある。MLST や *spa* typing は国際間の比較や昔の株との比較など広範囲での解析が可能であるが、ゲノムの塩基配列を決定しデータベースとの照合が必要であること、それによって時間とコストがかかるなどの問題点がある。これらのことより、PFGE や MLST、*spa* typing を実際の臨床現場において日常的に実施するのは困難である。その一方で、SCC*mec* typing は通常 multiplex PCR や real time PCR を用いて行われる。SCC*mec* 型は 3 つの *mec* 領域と 4 つの *ccr* 領域の組み合わせで決定され、塩基配列の決定や大掛かりな装置は不要であり、比較的簡単かつ低

コストで型別を判定できる。

Phage Open Reading Frame Typing (POT)法は愛知県衛生研究所の鈴木匡弘らが開発した方法であり、PFGE法と同等の菌株識別能力を有し、簡便かつ迅速に解析ができるという利点を有している(24-27)。シカジーニアス[®]分子疫学解析 POT キットとして関東化学株式会社より販売されている。現在、黄色ブドウ球菌用の他に緑膿菌用、大腸菌用、アシネトバクター属用がある。

POT法は菌株毎に保有状態が異なる Open Reading Frame (ORF)の保有パターンを multiplex PCR で検出することで菌株の遺伝子型を決定する方法である。以下に検出する ORF の特徴を示す。

(1) genomic islet

菌株毎に保有状態の異なる小領域である。黄色ブドウ球菌では genomic islet の保有パターンが MLST 解析によって得られる clonal complex (CC)と対応している(24)。

(2) genomic island

外来性に獲得された毒素遺伝子などがコードされている。

(3) prophage

溶原化したファージ遺伝子である。

ゲノム DNA を PCR で増幅して検出する方法であるが、他の手法と異なるのはシカジーニアス[®]DNA 抽出試薬を使用することで簡単にテンプレート DNA が作成できること、シカジーニアス[®]分子疫学解析 POT キットを使用することで、プライマーの設計が不要かつ PCR 反応液の調製に必要な試薬が全てそろっており、試薬を混合するだけで良いという利点がある。解析は目的バンドの有無を判定するのみである。欠点は複雑な multiplex PCR であるため PCR 反応チューブと PCR 装置の相性によって増幅効率が変わってくること、電気泳動に使用する 4%アガロースゲルの調製に慣れが必要であること、などである。

表 1-5 検出 ORF の種類とその増幅産物サイズ

	POT No.	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域	POT 係数
Reaction mixture 1	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> positive control	
	POT1-1	530	<i>mecA</i>	64
	POT1-2	449	<i>mec</i> gene complex class B	32
	POT1-3	355	SCC <i>mec</i> type II a specific	16
	POT2-1	304	Tn544	128
	POT2-2	271	prophage	64
	POT2-3	228	prophage	32
	POT2-4	197	prophage	16
	POT2-5	161	prophage	8
	POT2-6	131	prophage	4
	POT2-7	104	prophage	2
	POT2-8	81	prophage	1
Reaction mixture 2	<i>femA</i>	601	<i>S. aureus</i> positive control	
	POT1-4	477	cassette chromosome recombinase A2	8
	POT1-5	388	genomic islet	4
	POT1-6	320	genomic islet	2
	POT1-7	273	<i>mec</i> gene complex class A	1
	POT3-1	243	prophage	64
	POT3-2	197	prophage	32
	POT3-3	171	prophage	16
	POT3-4	140	prophage	8
	POT3-5	115	prophage	4
	POT3-6	95	prophage	2
	POT3-7	78	prophage	1

シカジーニクス®分子疫学的解析 POT キット（黄色ブドウ球菌用）取扱説明書より抜粋

電気泳動パターンから目的バンドの有無を判断し、POT 1、POT 2、POT 3 ごとに POT 係数を合計して POT 型を判定する。POT 型は POT 1 値-POT 2 値-POT 3 値で表現される。同一菌株の場合、POT 型が全て一致する。

また、POT 1 の値が SCCmec 関連遺伝子と genomic islet の保有パターンの組み合わせから算出され、MRSA のクローンが推定できる(表 1-6)。

表 1-6 日本で分離される主な MRSA の POT1 による分類

POT1	CC	SCCmec	備考
64	59	V	PVL 産生菌が多い。他に CC89 の SCCmec type IV
65	89	不明	壊れた SCCmec type II b 保有株の可能性
70	121	V	ETA 産生菌が多い
73	89	II b	小児流行クローン。ETB 産生株が多い
77	5	II ut	SCCmec type II, subtype 不明
85	5	不明	壊れた SCCmec type II a 保有株の可能性
93	5	II a	院内感染型 MRSA (NewYork/Japan clone)
98	8	I	
104	多数	IV	CC12, CC59, CC72, CC89 などの SCCmec type IV
106	8	IV	他に CC1 の SCCmec type IV USA300 の多くは 106-77-113
108	5	IV	
110	30	IV	PVL 産生株が多い
10 以下の偶数			MSSA が多いとされている。

参考文献 28 より引用し、改変

POT 法は、分子疫学的解析法としては新しい方法であり、解析実績が少なく、今後は性能の検証やデータの蓄積が必要になってくる、と開発者である鈴木匡弘は述べている。POT 法は狭い範囲かつ短期間に分離された株の解析に適している。POT キット発売以来、大学病院や研究機関で利用され始めており、日本

では POT 法による解析報告が上がってきている(29-31)。

そこで、本研究では簡便に分子疫学的解析を実施できる POT 法を用いて、臨床分離された MRSA について解析することにした。

第 8 節 MRSA 感染症の治療薬

臨床分離される MRSA はその多くが複数の抗菌薬に耐性を示すことから、MRSA 感染症の治療薬は限られている。現在、日本で承認されている抗 MRSA 薬はグリコペプチド系抗菌薬のバンコマイシン、テイコプラニンとアミノグリコシド系抗菌薬のアルベカシン、オキサゾリジノン系抗菌薬のリネゾリドに加え、環状リポペプチド系抗菌薬のダプトマイシンの 5 種類である。表 1-7 に CLSI および European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) が規定している抗 MRSA 薬の感受性基準を示した。

表 1-7 抗 MRSA 薬のブレイクポイント

	CLSI			EUCAST	
	S	I	R	S	R
VCM	≤ 2	4, 8	≥ 16	≤ 2	> 2
TEIC	≤ 8	16	≥ 32	≤ 2	> 2
LZD	≤ 4	-	≥ 8	≤ 4	> 4
DAP	≤ 1	-	-	≤ 1	> 1
GM (ABK)	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	> 1

S : susceptibility, I : intermediate, R : resistance. VCM : vancomycin, TEIC : teicoplanin, LZD : linezolid, DAP : daptomycin, ABK : arbekacin, GM : gentamicin. CLSI : M100-S25, EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0, valid from 2015-01-01. ABK は breakpoint の規定がないため、GM で代用。CLSI M100-S25 および EUCAST Clinical Breakpoint Tables v.7.0 を参考に改変

また、ムピロシン軟膏は鼻腔内 MRSA が内因性の感染源となること、または交叉感染源となり入院患者、医療従事者の間で伝播し周術期の患者や免疫機能の低下した患者に MRSA 感染症を引き起こすこと、などに着目し開発された MRSA 除菌剤である。

以下に抗 MRSA 薬およびムピロシン軟膏の特徴について示す。

(1) バンコマイシン

細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン前駆体の D-alanyl-D-alanine に水素結合して細胞壁合成を阻害し、殺菌的に作用する。また、細菌の細胞壁の透過性に変化を与え、RNA 合成を阻害する。

バンコマイシンは水溶性のため腸管からの吸収が悪く、経口薬は MRSA や *Clostridium difficile* による腸管感染症に適応が限られ、一般的な感染症には注射薬が用いられる。抗菌作用は血中濃度-時間曲線下面積(area under the curve : AUC)/ MIC に依存すると言われており、 $AUC/MIC \geq 400$ が有効域の指標とされている(32)。しかし、実臨床では AUC の評価は推奨されず、トラフ値で代用している(33)。

バンコマイシンの代表的な副作用に、腎機能障害や第 8 脳神経障害などがある。これらの副作用は血中濃度高値の状態が続くと頻度が上昇する。有効性の確保と副作用発現防止を目的として、4 日以上の治療を行う場合には治療薬物モニタリング(therapeutic drug monitoring : TDM)が必要である。抗菌薬 TDM ガイドラインでは、一般的な感染症に対する目標トラフ値は 10~15 $\mu\text{g/mL}$ であるが、心内膜炎や人工関節感染などの深部感染症に対してはトラフ値 15~20 $\mu\text{g/mL}$ が推奨されている。また、バンコマイシンの急速静注によりヒスタミンが遊離し、全身紅斑や血圧低下を生じる red man syndrome をきたすおそれがあることから、60 分以上かけて投与することが規定されている。

近年ではバンコマイシンの MIC が徐々に上昇する減少(MIC creep)が報告されている(34, 35)。その一方で MIC creep がないとの報告もされている(36, 37)。MIC が 2 $\mu\text{g/mL}$ を示す低感受性株に対してバンコマイシンを使用する場合、 $AUC/MIC \geq 400$ を得るためにはトラフ値 20 $\mu\text{g/mL}$ が必要となり、副作用発現のリスクが高くなるためバンコマイシンを使用しにくくなっている(38, 39)。MIC の上昇にはバンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌 (vancomycin intermediated-resistant *Staphylococcus aureus* : hVISA)が関与しているという報告もある(40, 41)。また、 β -ラクタム薬でバンコマイシン耐性が誘導されるとの報告もある(β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA : BIVR) (42, 43)。

米国ではバンコマイシン耐性 MRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: VRSA)が分離されている(44, 45)。国内においても MIC が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバンコマイシン低感受性 MRSA (VISA)が報告されている。

(2) テイコプラニン

作用機序はバンコマイシンと同様である。半減期が長いことから、投与初期の目標血中濃度を得るための負荷投与が必要であるが、その後は通常 1 日 1 回の投与で作用が持続する。バンコマイシンと同様に臨床現場ではトラフの血中濃度が 10~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう TDM を実施する必要がある。バンコマイシンと同様の副作用が報告されているが、テイコプラニンの方が安全性に優れていると考えられている。しかし、米国では使用されていないため、臨床データがバンコマイシンと比較して少ない。

(3) アルベカシン

アミノグリコシド系抗菌薬の中で唯一 MRSA に適応を持つ薬剤である。通常、アミノグリコシド系抗菌薬を黄色ブドウ球菌や腸球菌に用いる場合は、 β -ラクタム薬を併用するが、アルベカシンは MRSA に対して単剤で投与することができる。

細菌の 70S リボソームの 30S サブユニットに結合し、mRNA のミスリーディングを引き起こすことでタンパク質合成を不可逆的に阻害し、殺菌的に作用する。抗菌作用は濃度依存的であり、Pharmacokinetics (PK)- Pharmacodynamics (PD) パラメータは最高血中濃度 maximum drug concentration (Cmax)/MIC および AUC/MIC とされている。

アミノグリコシド系抗菌薬は、水溶性であるため消化管からはほとんど吸収されないため、投与方法は筋注か点滴静注である。一般的には 1 日 150~200 mg を 1 日 1 回必要時 1 日 2 回投与することとされている。アミノグリコシド系抗菌薬は post-antibiotic effect (PAE)を有するため、血中濃度が MIC 以下になっても抗菌作用が持続する。

アミノグリコシド系抗菌薬の代表的な副作用には、腎毒性と耳毒性がある。腎毒性はアミノグリコシド系抗菌薬が糸球体でろ過され、近位尿細管細胞のラ

イソゾーム内に高濃度に蓄積し、近位尿細管細胞の壊死を引き起こすことで生じる。腎毒性は3日以上投与でリスクが増大する。耳毒性として知られる第8脳神経障害は9日以上投与でリスクが増大し、いったん内耳の外有毛細胞が破壊され始めると非可逆的な聴力低下を引き起こす。特に高音域の聴力低下がみられる。

アミノグリコシド系抗菌薬の効果を十分に得るためには、最高血中濃度はできるだけ高く、副作用回避のために最低血中濃度はできるだけ低く設定することが必要であり、TDMによる血中濃度の管理が必要である。

(4) リネゾリド

細菌のリボソーム 50S サブユニットに結合し、翻訳初期段階の 70S 開始複合体の形成を阻害することで細菌のタンパク質合成を阻害する。抗 MRSA の中で唯一静菌的に作用する。PK-PD パラメータは AUC/MIC とされている。腎機能による用量調節や TDM が不要で、1 回 600mg、1 日 2 回投与する。

バイオアベイラビリティが約 100% と高いため、経口薬としても使用されている。バンコマイシンと比較して組織移行性が優れており、特に中枢神経系や呼吸器系組織への移行性が高い。一方、IDSA の MRSA 治療ガイドラインでは血流感染症や感染性心内膜炎に対しては治療中に耐性化が起こり治療成績不良の報告があることから、推奨されていない(46)。リネゾリド耐性メカニズムは 70S 開始複合体形成に関わる 50S リボソーム亜粒子の 23S rRNA のメチル化を起こす *cfr* 遺伝子の獲得が報告されており、国内においてもリネゾリド耐性 MRSA が報告されている(47)。

(5) ダプトマイシン

ダプトマイシンは既存の抗 MRSA 薬とは全く異なる作用機序を有する抗菌薬として開発され、2003 年 9 月に米国で、2006 年 1 月に欧州で複雑性皮膚・軟部組織感染症を適応として承認された。菌血症に対しては 2006 年 5 月に米国で、2007 年 8 月に欧州で承認されている。日本では 2011 年 7 月に、皮膚・軟部組織感染症には 4 mg/kg、菌血症・感染性心内膜炎や骨髄炎には 6 mg/kg の用量で承認された。2012 年 8 月現在、世界 84 カ国で承認されている。

ダプトマイシンは、カルシウムイオン濃度依存的に細菌の細胞膜に結合して膜中に挿入され、細胞膜中でオリゴマーを形成して膜電位の脱分極を起し、細胞内カリウムイオンを流出させることで殺菌的に作用する。その結果、細菌のタンパク質合成や DNA、RNA 合成を阻害する。また、抗菌作用は濃度依存的である。

ダプトマイシンはバイオフィルム内の細菌にも有効であるため、カテーテル関連血流感染症や感染性心内膜炎、骨・関節のインプラント関連感染症等、治療が長期に及ぶ疾患の治療に有効性が期待されている。その一方で、肺胞表面のサーファクタントで不活化されることから、肺炎などの呼吸器感染症には通常使用することができない。さらに、長期投与によるクレアチンフォスホキナーゼ(creatine phosphokinase : CPK)上昇や好酸球性肺炎などの副作用に注意が必要であり、添付文書では週に 1 回以上 CPK を測定するよう記載されている。

海外では難治性感染症に対し、8 mg/kg や 10 mg/kg の高用量の投与で良好な治療成績が得られたとの報告がある(48, 49)。日本においても、承認されていないが難治性 MRSA 感染症に対し、リファンピシン併用の高用量ダプトマイシン投与で治療成功した例が挙げられている(50)。

(6) ムピロシン軟膏

細菌のイソロイシル-tRNA 合成酵素を競合的に阻害することにより、細菌のタンパク質合成を阻害し、抗菌活性を示す。手術前の使用により、MRSA による手術部位感染症(surgical site infection : SSI)や術後の MRSA 感染症の発症を予防する効果が認められている(51-53)。

第2章 POT法によるMRSAの型の判定とバイオフィルム形成能

第1節 要旨

MRSAは代表的な院内感染の原因菌の一つである。MRSAはヒトの常在菌であり、接触によって容易に感染することから、院内感染対策が非常に重要である。

臨床分離されるMRSAの性状は国や地域によってさまざまであり、施設ごとの傾向を把握することで院内感染対策に役立つ情報が得られると考えられる。特に津山中央病院（以下、当院）は岡山県北の基幹病院であることから、病院のみならず地域のMRSAの性状に関する情報が得られる可能性がある。

本研究では、当院で分離されたMRSAを対象として性状解析を行った。SCCmec型の判定にはPOT法を用いた。一般的には、SCCmec II型をHA-MRSA、SCCmec IV型もしくはV型をCA-MRSAとされていることから、本研究においても主にHA-MRSAとCA-MRSAに分けて解析を行うことにした。

当院で分離されたMRSA 138株についてPOT法を用いてSCCmec型を判定した結果、HA-MRSAであるII型は31株(22%)、CA-MRSAであるIV型が54株(39%)、V型が5株(4%)であり、CA-MRSAの分離率が高かった。また、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: MSSA)と判定された株も37株(27%)あった。

CA-MRSAとHA-MRSAの起因率に差はなかったが、HA-MRSAと比較してCA-MRSAは有意にバイオフィルム形成能が高かった($p < 0.001$)。

各種抗菌薬に対する薬剤感受性を比較検討すると、HA-MRSAと比較してCA-MRSAおよびMSSAはセファゾリン、クリンダマイシン、ミノサイクリンに感受性を示す菌株が多かった。一方、レボフロキサシンはHA-MRSAだけでなくCA-MRSA、MSSAにおいても感受性を示す菌株は少ないことがわかった。

第2節 諸言

近年、多剤耐性菌による感染症が臨床現場で問題となっている。代表的な多

剤耐性菌として MRSA、VRE、MDRP などが挙げられるが、近年は MDRA や CRE も紙面を賑わせており、多剤耐性菌はますます脅威となっている。これらの菌は健常人に対して感染症を引き起こすことはほとんどないが、高齢者や免疫機能の低下した患者に日和見感染を引き起こす。多剤耐性菌による感染症の場合、治療に使用できる抗菌薬が限られるため、治療が困難となり、時には死に至ることもある。さらに、黄色ブドウ球菌や緑膿菌、アシネトバクター、腸内細菌などはヒトや環境中に常在する菌であることから、臨床現場で一例発生しただけでも患者家族や医療従事者を介して広まり、アウトブレイクを引き起こす可能性があり、感染症発生時には適切な対応が必要となる。

多剤耐性菌によるアウトブレイクを防止するためには感染源や感染経路を特定することが重要であり、分子疫学的解析法を用いたサーベイランスが非常に重要となる。当院では MDRA の報告はなく、VRE や MDRP、CRE の報告は稀である。

そこで本研究では、当院でも分離率が高く、院内感染対策の成否の指標にもなる MRSA を対象として、性状解析を行うことにした。

第3節 材料と方法

【対象】

2015年1月から2016年3月の期間に当院で臨床分離された MRSA 138 株を対象とした。なお、MRSA の判定は、当院の臨床検査部で使用している自動菌種・薬剤感受性測定装置である SIEMENS 社の MicroScan WalkAway 40 plus System により自動で行われている。

【POT 法による分類】

POT 法は、関東化学株式会社より販売されているシカジーニクス[®]分子疫学的解析キット（黄色ブドウ球菌用）を用い、標準プロトコールに従って実施した。DNA の抽出は、シカジーニクス[®]DNA 抽出試薬を用い、取扱説明書に従ってテンプレート DNA の作成を行った。

【バイオフィーム形成能の測定】

Nurtient 培地で一晩振とう培養した MRSA を、Brain Heart Infusion (BHI)培地で O.D.₆₅₀≒0.7 まで培養した。この培養液を 1 %グルコース添加 BHI 培地で 100 分の 1 に希釈した後、96 穴平底プレートに分注し、37℃で 48 時間静置培養した。培養液を除去した後、付着細胞を 0.1 %クリスタルバイオレット溶液で染色し dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解させた。さらに DMSO で3分の1に希釈し、別の 96 穴平底プレートに移した後、Multiskan Ascent (Thermo LabSystems)を用いて 570 nm の吸光度を測定した。1 株につき、3 点もしくは 4 点ずつ同じ条件のウェルを作成した。

バイオフィーム形成能は、標準株である *S. aureus* N315 株(MRSA)のバイオフィームを 100 %とした場合の N315 株に対する比を算出し、比較を行った。

【起因率の算出】

患者カルテより、①抗 MRSA 薬を使用した場合、②起因菌として治療の旨をカルテに明記している場合、③血液や髄液など通常無菌的であるべき組織から検体が得られた場合、のいずれかに該当する場合は起因菌とし、起因率を算出した。

【統計学的解析】

統計学的解析は JSTAT を用いて行った。F 検定により有意水準 5 %で母分散が等しい場合に Student's t-test により、母分散が等しいとみなせない場合 Welch's t-test で検定した。p 値は両側検定によって算出し、有意水準は $p<0.05$ とした。

【薬剤感受性】

当院の臨床検査部で使用している自動菌種・薬剤感受性測定装置である SIEMENS 社の MicroScan WalkAway 40 plus System によって測定された結果を患者カルテより調査した。薬剤感受性は CLSI の判定基準 M100-S22 のブレイクポイントを用いて行っている。なお、MRSA スクリーニングのための検体採取の場合は薬剤感受性を測定しないため、薬剤感受性試験を実施している菌株のみを対象とした。薬剤感受性は susceptible を S、intermediate を I、resistant を R で

示した。

【倫理的配慮】

本研究は、当院と就実大学の倫理委員会より承認を得て実施している。また、カルテより得られる情報は患者個人を特定できないよう匿名化した。

第4節 結果と考察

1) POT 法による解析

当院で臨床分離された MRSA について POT 法を行った。図 2-1 に電気泳動パターン、図 2-2 に POT 型への変換の表を示した。図に示すように電気泳動パターンから目的バンドの有無を読み取り、POT1、POT2、POT3 ごとに POT 係数を合計し、POT 型を判定した。

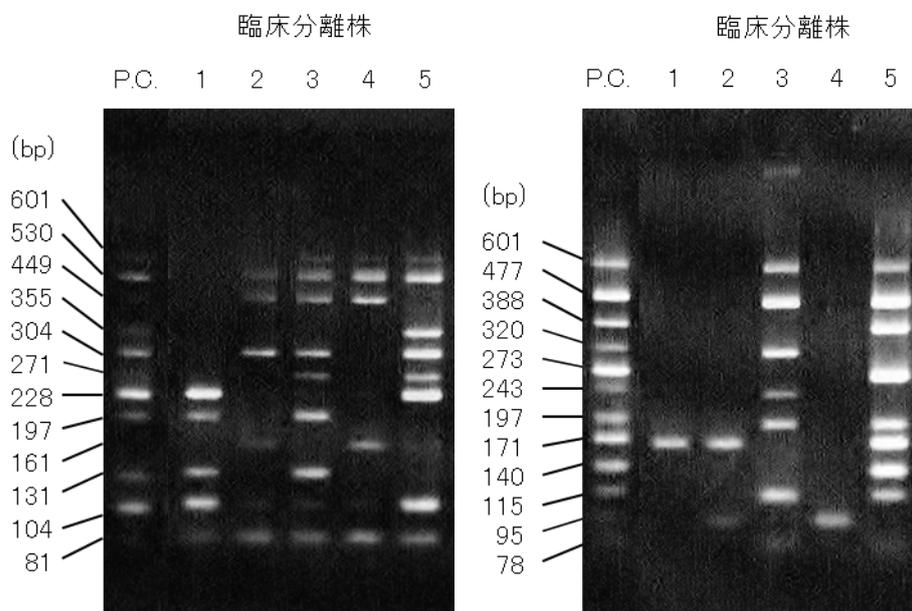


図 2-1 代表的な臨床分離株 POT 法の電気泳動パターン

P.C.: positive control

		bp	POT 係数	1	2	3	4	5
Reaction mixture 1	<i>femA</i>	601	-		1	1	1	1
	POT1-1	530	64		1	1	1	1
	POT1-2	449	32		1	1	1	
	POT1-3	355	16					1
	POT2-1	304	128	1	1	1		1
	POT2-2	271	64			1		1
	POT2-3	228	32	1				1
	POT2-4	197	16	1		1		
	POT2-5	161	8	1	1		1	1
	POT2-6	131	4	1		1		
	POT2-7	104	2	1				1
	POT2-8	84	1	1	1	1	1	1
Reaction mixture 2	<i>femA</i>	601	-	1	1	1	1	1
	POT1-4	477	8	1	1	1	1	1
	POT1-5	388	4					1
	POT1-6	320	2	1	1	1	1	
	POT1-7	273	1					1
	POT3-1	243	64	1	1	1		
	POT3-2	197	32	1	1	1		1
	POT3-3	171	16	1	1			1
	POT3-4	140	8					1
	POT3-5	115	4			1		1
	POT3-6	95	2		1		1	
	POT3-7	78	1			1		1

POT1	10	106	106	106	93
POT2	191	137	213	9	235
POT3	112	114	101	2	61

図 2-2 電気泳動パターンから POT 型への変換

その結果、臨床分離株 1 の POT 型は 10-191-112 であり MSSA、臨床分離株 2

の POT 型は 106-137-114 で SCCmec IV 型、臨床分離株 3 の POT 型は 106-213-101 で SCCmec IV 型、臨床分離株 4 の POT 型は 106-9-2 で SCCmec IV 型、臨床分離株 5 の POT 型は 93-235-61 で SCCmec II 型と判定できた。

同様に、当院で臨床分離された MRSA 138 株すべてについて POT 法を用いて解析を行った結果を表 2-1 に示した。SCCmec 型別に分類すると、SCCmec I 型が 2 株(1%)、SCCmec II 型が 31 株(22%)、SCCmec IV 型が 54 株(39%)、SCCmec V 型が 5 株(4%)、MSSA と判定された株が 37 株(27%)、不明のものが 9 株(7%)であった。SCCmec II 型の株はすべて POT 1 の値が 93 であり、院内感染型の New York / Japan clone であった。また、SCCmec IV 型の株の分離数が II 型の分離数よりも多かった。SCCmec IV 型の分離数が多かった点については第 3 章にて考察する。

臨床分離株 138 株の POT 型の詳細を SCCmec 型別に表 2-2 から表 2-6 に示した。

表 2-1 POT1 の値による MRSA の分類

POT1 値から判定される SCCmec 型	分離数	全体に占める割合 (%)
I 型	2	1
II 型	31	22
IV 型	54	39
V 型	5	4
MSSA	37	27
不明*	9	7
合計	138	

* POT1 の値により表 1-6 に記載のある clone に当てはまらない株

表 2-2 SCCmec II 型と判定された株の POT 型

POT 型	分離数	POT 型	分離数
93-191-103	5	93-155-125	1
93-235-61	4	93-157-61	1
93-136-7	2	93-179-111	1
93-155-111	2	93-183-61	1
93-159-111	2	93-187-56	1
93-115-111	1	93-191-125	1
93-129-3	1	93-221-125	1
93-136-103	1	93-234-75	1
93-137-103	1	93-249-59	1
93-138-103	1	93-255-61	1
93-147-109	1		

(n=31)

SCCmec II 型の株は、期間を通じて POT 型 93-191-103 の株が 5 株、POT 型 93-235-61 の株が 4 株、POT 型 93-136-7 の株が 2 株、POT 型 93-155-111 の株が 2 株、POT 型 93-159-111 の株が 2 株あり、5 種類の菌株が期間を通じて複数分離されていた。これらの菌株のうち、POT 型 93-136-7 の株は同一病棟より数日違いで分離されており、かついずれも入院後 48 時間以上経過してから分離されているため院内伝播の可能性が考えられた。

表 2-3 SCCmec IV 型と判定された株の POT 型

POT 型	分離数	POT 型	分離数
106-9-2	8	106-11-80	1
106-137-80	5	106-17-36	1
106-147-45	5	106-129-0	1
108-8-2	5	106-137-15	1
106-213-101	4	106-137-85	1
106-9-80	3	106-155-124	1
106-153-115	3	106-159-94	1
106-137-114	2	106-179-32	1
106-191-112	2	106-183-32	1
104-15-99	1	106-219-113	1
104-202-55	1	108-0-0	1
106-1-32	1	108-36-112	1
106-11-2	1	不明*	1

(n=54)

* POT 1 の値は 108 で SCCmec IV 型に分類されるが POT 3 の値が決定できなかった株

SCCmec IV 型の株は、POT 型 106-9-2 の株が 8 株、POT 型 106-137-80 の株が 5 株、POT 型 106-147-45 の株が 5 株、POT 型 108-8-2 の株が 5 株、POT 型 106-213-101 の株が 4 株、POT 型 106-9-80 の株が 3 株、POT 型 106-153-115 の株が 3 株、POT 型 106-137-114 の株が 2 株、POT 型 106-191-112 の株が 2 株あり、9 種類の菌株が期間を通じて複数分離されていた。これら菌株のうち、POT 型 106-147-45 の 5 株中 2 株は同一病棟での 1 週間以内での分離であり、院内伝播が疑われた。さらに、POT 型 106-153-115 の 3 株は、検体採取日に数か月のタイムラグがあるが、全て同一病棟からの分離であり、入院 48 時間以上経過後の分離であるため、院内での水平伝播が疑われた。3 株すべてが新生児 1 名を含む小児患者からの分離であることから、もともと MRSA を保菌していた可能性は成人ほど高くなく、病棟内の環境中に存在する MRSA が、接触感染した可能性や医療従事者を介した感染が考えられた。

表 2-4 SCCmec V 型と判定された株の POT 型

POT 型	分離数	POT 型	分離数
70-18-81	2	70-18-17	1
64-17-33	1	70-18-121	1

(n=5)

SCCmec V 型は POT 型 70-18-81 の株が対象期間中に 2 株分離されたが、検体採取日が離れていることから、院内伝播の可能性はないと考えられた。

表 2-5 MSSA と判定された株の POT 型

POT 型	分離数	POT 型	分離数
10-191-112	5	4-59-0	1
4-47-112	2	4-59-88	1
10-19-112	2	6-18-81	1
10-183-112	2	6-154-35	1
0-1-1	1	10-51-112	1
0-8-80	1	10-55-45	1
0-51-9	1	10-59-112	1
0-131-1	1	10-121-88	1
2-1-0	1	10-147-109	1
2-1-33	1	10-187-112	1
2-17-64	1	10-187-115	1
4-9-120	1	10-191-113	1
4-26-32	1	14-191-112	1
4-28-0	1	不明*	3

(n=37)

* 全て異なる株。POT 1 の値が 0 または 4 で MSSA と判定されるが POT 型の詳細を決定できなかった株

MSSA と判定された株は、POT 型 10-191-112 の株が 5 株、POT 型 4-47-112 の株が 2 株、POT 型 10-19-112 の株が 2 株、POT 型 10-183-112 の株が 2 株あり、4 種類の菌株が期間を通じて複数分離されていた。POT 型 4-47-112 の 2 株は検体

採取日が 1 か月ほど空いているが同一病棟より検出されており、いずれも院内発生と考えられることから、環境や医療従事者を介した感染を否定できない。

また、この結果より、WalkAway で MRSA と判定された MRSA を POT 法で解析すると MSSA と判定される株が存在していることが明らかになった。序論で述べたように、黄色ブドウ球菌は *mecA* を有する、あるいはオキサシリンの MIC が 4 µg/mL 以下またはセフォキシチンの MIC が 8 µg/mL 以下のいずれか一方でも満たせば MRSA と判定される。POT 法では *mecA* の有無の確認が可能であり、*femA* の有無を確認することによって黄色ブドウ球菌であることの確認が可能である。したがって *femA* を有し、かつ *mecA* を含む領域である reaction mixture 1 の 530 bp のバンドを確認できない場合は *mecA* を持たない *S. aureus*、すなわち MSSA と判定される場合が多いとされている。POT 法で MSSA と判定された株は、β-ラクタム薬のうち少なくともオキサシリンもしくはセフォキシチンあるいはその両方に耐性を示すことから、*mecA* の保有以外の薬剤耐性機構を有していると考えられる。

表 2-6 SCC*mec* 型不明の MRSA の POT 型

POT 型	分離数	POT 型	分離数
68-47-112	3	66-3-33	1
68-47-116	2	POT 型不明	1
92-235-61	2		

(n=9)

SCC*mec* 型不明の株は、POT 型 68-47-112 の株が 3 株、POT 型 68-47-116 の株が 2 株、POT 型 92-235-61 の株が 2 株あり、3 種類の菌株が期間を通じて複数分離されていた。POT 型 92-235-61 の 2 株は短期間の中に同一病棟から分離されており、院内伝播の可能性が示唆された。POT 型 68-47-112 の 3 株中 2 株は検体採取日が近く、院内発生と思われる株であり、薬剤感受性パターンも一致するが、病棟、診療科、患者住所などが一致しないことから、院内伝播の可能性は低いと考えられた。

また、電気泳動パターンをみると、これらの株は全て *femA* および *mecA* のバ

ンドは存在することから、MRSA の定義に該当する。さらに POT 型 92-235-61 の株は SCCmec IIa 特異的なバンドを有することから、SCCmec 型は II 型であることが推測できる。

今回は大規模な院内感染は起こっていないが、アウトブレイクが疑われる場合に、原因となっている菌株の迅速な同定を可能とする POT 法は、感染源や感染経路の特定に寄与し、最適な院内感染対策の実施に大きく貢献することが期待できる。

2) 患者年齢と起因率の比較

POT 法によって臨床分離された MRSA を SCCmec 型別に分類し、SCCmec II 型を HA-MRSA、SCCmec IV 型および IV 型を CA-MRSA として取り扱った。

HA-MRSA と CA-MRSA の患者年齢および起因率を比較した結果を表 2-7 に示した。患者年齢は HA-MRSA が 74.7 ± 17.2 歳、CA-MRSA が 62.0 ± 29.5 歳であり、CA-MRSA は HA-MRSA と比較して有意に年齢の低い患者から分離されていた ($p < 0.05$)。なお、HA-MRSA と CA-MRSA で起因率に差はなかった。

本研究で対象とした MRSA の起因菌数が少ないことから、患者年齢と起因率の関係について結論付けることはできない。今後は、解析対象を増やして解析を行う必要がある。

表 2-7 HA-MRSA と CA-MRSA の患者年齢と起因率の比較

	患者年齢	起因率
HA-MRSA	74.7 ± 17.2	12/31 (38.7%)
CA-MRSA	62.0 ± 29.5	17/59 (28.8%)
<i>p</i> -value	<0.05	>0.05

n=90, HA-MRSA: n=31, CA-MRSA: n=59

年齢は平均値±標準偏差で示した。*p* 値は Welch's t-test により算出した。

起因率は起因菌数/分離数で示し、() 内に割合を示した。

3) HA-MRSA および CA-MRSA のバイオフィルム形成能の比較

HA-MRSA および CA-MRSA のバイオフィルム形成能を比較した結果を図 2-3 に示した。また、図 2-4 にバイオフィルム形成能を示した。

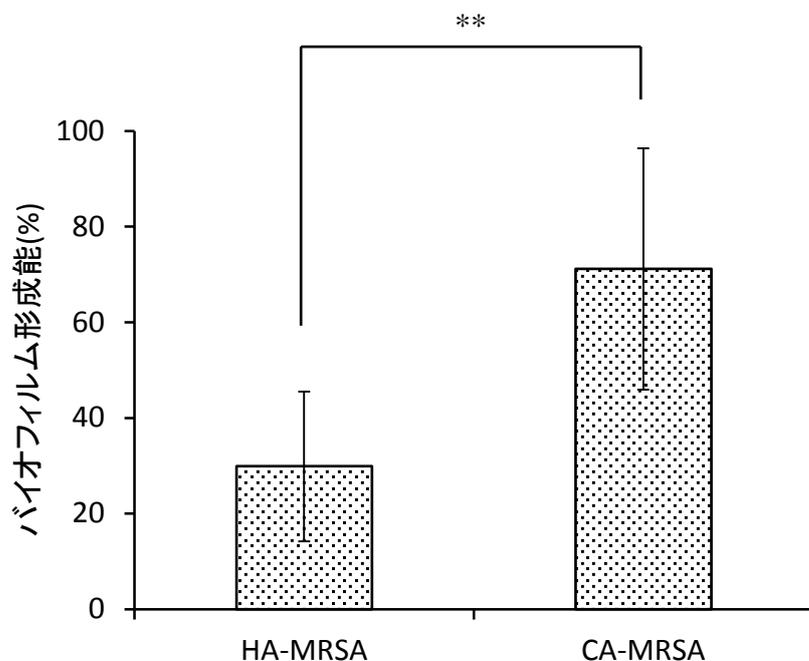


図 2-3 HA-MRSA と CA-MRSA のバイオフィルム形成能の比較

S. aureus N315 株のバイオフィルム形成能を 100%とした場合の比で表す
HA-MRSA (n=31)は 29.9±15.6%、CA-MRSA (n=59)は 71.1±25.2%であった
数値は平均値±標準偏差で示した。(p<0.001: Student's t-test)

HA-MRSA のバイオフィルム形成能は 29.9±15.6%、CA-MRSA は 71.1% ± 25.2%であった。Student's t-test による検定を行ったところ、CA-MRSA のバイオフィルム形成能は HA-MRSA のバイオフィルム形成能と比較し、有意に高かった。

た($p<0.001$)。

バイオフィルムは、**MRSA** の重要な病原因子の一つであり、患者および院内への長期定着に関わっている。特に、バイオフィルム形成能が高い **MRSA** は、院内に長期に定着することで他の患者への感染拡大につながる恐れがあるのに加え、バイオフィルム内の菌は抗菌薬が効きにくいことから、バイオフィルム関連感染症が起こると治療は難渋化する傾向にある。また、**MRSA** はカテーテルやペースメーカーなどの医療デバイスに容易にバイオフィルムを形成し、持続感染を引き起こすことから、臨床現場で分離される **MRSA** のバイオフィルム形成能を把握しておくことは、バイオフィルム関連感染症の予防に重要であると考えられる。

本研究で、現在、臨床現場で増加傾向にある **CA-MRSA** のバイオフィルム形成能が高いことを見出したことは、今後の院内感染対策の構築に寄与することにつながる。さらに、**CA-MRSA** は比較的年齢の低い患者から分離されていることから、学校や家庭、スポーツチームなど皮膚接触の多い環境で伝播しやすい。伝播した **CA-MRSA** が患者や環境中にバイオフィルムを形成すると長期生存しやすく、そこからさらなる感染拡大が懸念される。

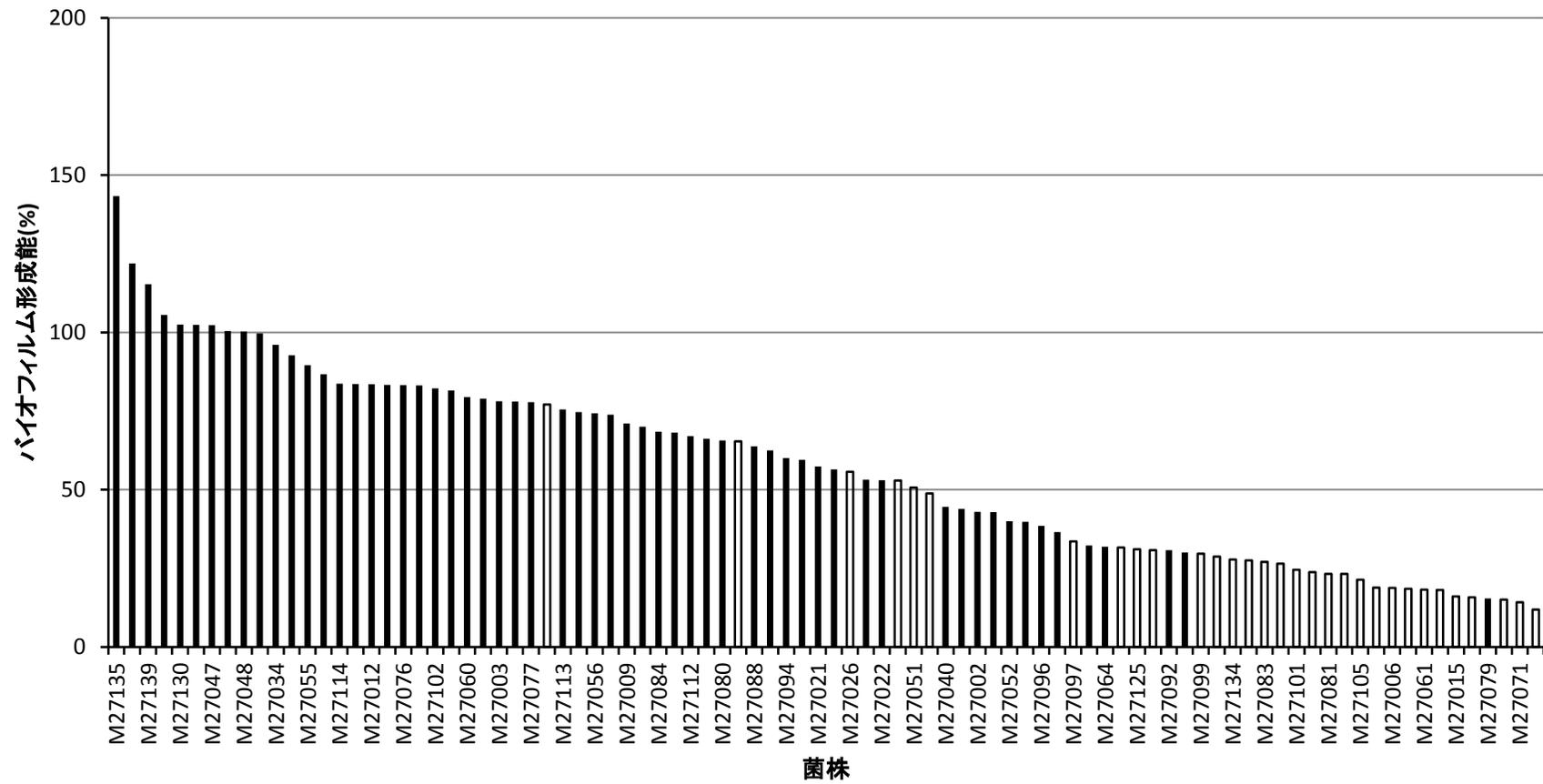


図 2-4 HA-MRSA と CA-MRSA のバイオフィルム形成能
S. aureus N315 株を 100% としたときの比で示した
 □ HA-MRSA ■ CA-MRSA

4) 薬剤感受性の比較

POT 法により *SCCmec* 型別に分類した後、HA-MRSA、CA-MRSA、および MSSA に分けて薬剤感受性を比較検討した。MRSA スクリーニングのための検体採取の場合は薬剤感受性を測定しないため、薬剤感受性試験を実施している菌株のみを対象とした。CLSI M100-S22 の基準によると、 β -ラクタム薬のうちアンピシリン(ampicillin : ABPC)に対してはいずれの菌株も耐性であった。また、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(sulfamethoxazole / trimethoprim : ST) 合剤および当院に採用のないアルベカシンを除く抗 MRSA 薬に対してはすべての菌株が感性であった。その他の抗菌薬の感受性を比較した結果を表 2-8 に示した。

ゲンタマイシンを除くと HA-MRSA と比較して CA-MRSA および MSSA の抗菌薬感受性は比較的保たれている傾向があることがわかった。

特に MSSA と判定された株のセファゾリンの感受性率は比較的高いが、WalkAway で MRSA と判定された株のセファゾリンの感受性はすべて R で報告している。MSSA の菌血症に対してバンコマイシンは β -ラクタム薬よりも治療効果が劣るとの報告があり、抗 MRSA 薬使用の必要がない場合が想定される(54-57)。その一方で、CA-MRSA もセファゾリンの感受性率は比較的高いが、 β -ラクタム薬の使用により容易に高度耐性化することが知られており、ガイドラインに定められているように CA-MRSA に対して β -ラクタム薬を使用するべきではない(57)。薬剤感受性だけをみると CA-MRSA も MSSA も抗菌薬の感受性パターンが似ているため、CA-MRSA と MSSA の区別はできず、治療に β -ラクタム薬を用いるのは危険を伴う。しかし、POT 法で MSSA と判定すれば治療の選択肢に β -ラクタム薬が増える可能性もある。

ゲンタマイシンやレボフロキサシン(levofloxacin : LVFX)に対して、HA-MRSA は感受性が低いのは当然と言えるが、CA-MRSA、MSSA でも感受性が低いものが多く存在している。特にレボフロキサシンは 1 日 1 回の投与で良く、バイオアベイラビリティが良好で経口薬としても使用できることから、外来での治療によく使用される薬剤である。薬剤感受性を確認しないまま使用すると、治療失敗の可能性があるので注意が必要と考えられる。

CA-MRSA と MSSA のクリンダマイシン(clindamycin : CLDM)やミノサイクリン(minocycline : MINO)の感受性は比較的良好である。特に、CA-MRSA のクリンダマイシンの感受性が保たれていることは、CA-MRSA が小児でも分離率が高く、感染症発症時の治療の選択肢に安全性の高いマクロライド系抗菌薬が使用できる可能性があるのは有意義である。

表 2-8 各抗菌薬の薬剤感受性の比較

		S	I	R
CEZ	HA-MRSA	1/17 (6)	-	16/17 (94)
	CA-MRSA	33/39 (85)	5/39 (13)	1/39 (2)
	MSSA	27/29 (94)	1/29 (3)	1/29 (3)
GM	HA-MRSA	4/17 (44)	-	13/17 (76)
	CA-MRSA	17/39 (44)	1/39 (3)	21/39 (53)
	MSSA	13/29 (45)	1/29 (3)	15/29 (52)
LVFX	HA-MRSA	1/17 (6)	-	16/17 (94)
	CA-MRSA	15/39 (38)	1/39 (3)	23/39 (59)
	MSSA	7/29 (24)	1/29 (3)	21/29 (73)
CLDM	HA-MRSA	3/17 (18)	-	14/17 (82)
	CA-MRSA	28/39 (72)	-	14/39 (36)
	MSSA	21/29 (72)	-	8/29 (28)
MINO	HA-MRSA	8/17 (47)	4/17 (24)	5/17 (29)
	CA-MRSA	31/39 (79)	5/39 (13)	3/39 (8)
	MSSA	29/29 (100)	-	-

S : susceptible, I : intermediate, R : resistant. CEZ : cefazolin, GM : gentamicin, LVFX: levofloxacin,

CLDM : clindamycin, MINO : minocycline

分離数/全数で示し、()内に割合を示した。

本章では、近年津山中央病院で分離されている MRSA の性状について調べた。POT 法を用いて SCCmec 型で HA-MRSA と CA-MRSA に分類し、それぞれの特徴を比較した。調査対象施設とした津山中央病院は、岡山県北の基幹病院であ

ることから、津山中央病院で分離される MRSA の性状を調べることで、周辺地域の MRSA の性状に関する情報を把握につながると考えられる。

平成 22 年度診療報酬改定で感染防止対策加算が新設され、平成 24 年度診療報酬改定では加算の算定要件と診療報酬点数が大きく変更された。この感染防止対策加算は、マイナー改訂はあるものの、平成 28 年度の診療報酬改定まで診療報酬点数が減ることなく残っている。このことから、臨床現場における感染防止対策の重要性は高まっていると言える。津山中央病院は「感染防止対策加算 1」を算定している施設であり、「感染対策防止加算 2」を算定している施設と年 4 回、定期的に感染防止対策に関する合同カンファレンスを実施している。

本章で、津山中央病院で分離される MRSA の性状が明らかとなったが、解析対象とした菌株数が少なく、津山地域全体の MRSA の性状を把握したと結論付けることはできない。今後、合同カンファレンス参加施設と協力し、可能な限り多くの施設から分離される MRSA を解析対象とすることで、津山地域の MRSA の性状を明らかにすることが必要となってくる。解析した MRSA の性状は各施設と情報共有し、地域全体で感染防止対策を実施する必要があると考えられた。

第3章 臨床分離される MRSA の動向の変化

第1節 要旨

当院で臨床分離された MRSA について、POT法を用いて SCC_{mec}型を判定し、HA-MRSA と CA-MRSA に分類して比較検討した結果、第2章で示したように近年臨床分離される MRSA は CA-MRSA が主流になっており、CA-MRSA はバイオフィーム形成能が高いことが示された。

私たちの研究室では、過去にも MRSA の性状解析を行っており、CA-MRSA が比較的年齢の低い患者から分離されていることやバイオフィーム形成能が高いことを見出している。

本章では、過去に臨床分離された MRSA と今回臨床分離された MRSA の解析結果を比較することにより、臨床現場での問題点を検討することにした。なお、本章では HA-MRSA と CA-MRSA のみを対象とする。2011年5月から2012年11月を第1期、2015年1月から2016年3月を第2期とし、臨床分離された MRSA の解析結果を比較検討した。その結果、第2期では CA-MRSA の分離率が大幅に増加していた。また、第1期、第2期のいずれの期間においても CA-MRSA は比較的年齢の若い患者から分離されていること、バイオフィーム形成能が高いことがわかった。さらに、同一菌株が継続して分離されていることもわかった。このことから、CA-MRSA に対する感染対策を講じる必要があると考えられた。

第2節 諸言

MRSA は院内感染の代表的な原因菌である。MRSA はヒトの皮膚や鼻腔などに常在している菌であり、健常人に対して病原性を示すことはほとんどないが、高齢者や免疫機能の低下した患者に日和見感染を引き起こす。しかし近年、年齢の低い健常人に対して強い毒性を示す MRSA の出現が報告されている。これらの菌は従来の院内感染原因菌としての MRSA の定義に当てはまらず、市中感染型 MRSA (CA-MRSA)として取り上げられている。

第2章で、臨床分離された MRSA を POT 法で解析し、SCC*mec* 型ごとに分類した結果、SCC*mec* IV型がII型より多く分離されていることが明らかとなった。そこで、当院で分離される MRSA の動向を以前の MRSA と比較検討することにした。

第3節 材料と方法

【対象】

2011年5月から2012年11月(第1期)に分離された MRSA 89株および2015年1月から2016年3月(第2期)に分離された MRSA 138株のうち、II型31株、IV型54株、V型5株の合計90株を解析の対象とした。

【HA-MRSA と CA-MRSA の分類】

POT法を用いて POT 型を判定し SCC*mec* 型を決定した。POT法で SCC*mec* II型と判定された菌株を HA-MRSA、SCC*mec* IV型もしくはV型と判定された菌株を CA-MRSA とした。

【バイオフィルム形成能】

第2章と同様に測定した。

【起因率の判定】

第2章と同様に算定した。

第4節 結果と考察

1) 各期間における HA-MRSA と CA-MRSA の分離率および起因率の比較

各期間における HA-MRSA と CA-MRSA の分離率および起因率を表3-1に示した。第1期は HA-MRSA が56株(63%)、CA-MRSA が33株(37%)であり、主流な MRSA は HA-MRSA であった。第2期は HA-MRSA が31株(34%)、CA-MRSA

が 59 株(66%)であり、主流な MRSA は CA-MRSA であった。第 1 期と第 2 期における HA-MRSA と CA-MRSA の分離率が逆転しており、約 3 年のうちに主流な MRSA が HA-MRSA から CA-MRSA に置き換わっていることがわかった。特に、第 2 期ではこれまで院内感染の原因となっていた New York / Japan clone を中心とする SCCmec II 型の株の分離率は大幅に減少していた。その一方で、CA-MRSA の分離率は大幅に増加していることが明らかになった。全国的に MRSA 全体の分離数、分離率は減少しているにもかかわらず、CA-MRSA の分離率のみが増加しているのは、従来の院内感染対策で HA-MRSA が排除されつつあるのに対し、CA-MRSA が排除できずに生き残り、相対的に分離率が増加したものと考えられる。

なお、いずれの期間においても HA-MRSA と CA-MRSA で起因率に差はなかった。

表 3-1 HA-MRSA と CA-MRSA の分離数と起因菌数の比較

	第 1 期		第 2 期	
	分離数 分離率(%)	起因菌数 起因率*(%)	分離数 分離率(%)	起因菌数 起因率(%)
HA-MRSA	56 (63)	13 (23)	31 (34)	12 (39)
CA-MRSA	33 (37)	9 (27)	59 (66)	17 (29)
全数	89	22 (25)	90	29 (32)

* 各期間で HA-MRSA、CA-MRSA ごとの起因率を算出した

2) 各期間における HA-MRSA と CA-MRSA の分離された患者年齢の比較

HA-MRSA と CA-MRSA それぞれについて、分離された患者年齢を各期間で比較してみると、第 1 期は HA-MRSA が 75.1±15.1 歳、CA-MRSA が 61.6±29.6 歳であり、CA-MRSA は有意に年齢の低い患者から分離されていた($p<0.05$)。第

2期においても、HA-MRSAが74.7±17.2歳、CA-MRSAが62.0±29.5歳であり、CA-MRSAの方が有意に年齢の低い患者から分離されていた($p<0.05$)。

各期間において、HA-MRSAとCA-MRSAの起因率に差はなかったことから、CA-MRSAは比較的若年者にも感染症を引き起こすことが示された。米国ではPVL陽性CA-MRSAによる重篤な壊死性肺炎あるいは敗血症で小児の死亡例も報告されている(12, 58)。今回調べた中にはこのような強毒株は存在しなかった。しかし、日本においても報告数は少ないがPVLを産生する強毒性のCA-MRSAは報告があることから、このようなCA-MRSAが広がらないよう対策を施す必要がある(59)。

表 3-2 患者年齢の比較

	第1期 (歳)	第2期 (歳)
HA-MRSA	75.1±15.1	74.7±17.2
CA-MRSA	61.6±29.6	62.0±29.5
<i>p</i> -value	< 0.05	< 0.05

平均値±標準偏差で示した。*p*値はWelch's t-testにより算出した。

第1期のHA-MRSA: n=56, CA-MRSA: n=33、第2期のHA-MRSA: n=31, CA-MRSA: n=59

3) 各期間で共通して分離されるMRSAのPOT型

各期間に共通して分離されるMRSAのPOT型を表3-3に示した。HA-MRSAでは4種類、CA-MRSAでは2種類の菌株が各期間で共通して分離された。第1期と第2期では約3年経過しているにもかかわらず、POT型の一致する菌株が継続して分離される原因として①MRSA保菌状態にある患者が入退院を繰り返すことによって再び検出された、②MRSA保菌状態にある患者から他者に自宅や他の医療機関などで接触感染した、③バイオフィルムとして院内の環境中に存在し接触感染した、等が考えられる。

表 3-3 各期間で共通して分離される MRSA の POT 型とその菌株数

	POT 型	第 1 期	第 2 期
HA-MRSA	93-155-111	11	2
	93-191-103	10	5
	93-235-61	1	4
	93-255-61	3	1
CA-MRSA	106-9-2	10	8
	106-9-80	3	3

4) 各期間における同一 POT 型が分離された種類の数の比較

各期間で、複数の患者から同一 POT 型の MRSA が分離された場合の POT 型の種類の数を調べた。HA-MRSA の場合、第 1 期は 7 種類であるが、第 2 期になると 5 種類に減少していた。一方、CA-MRSA の場合、第 1 期では 3 種類であるのに対し、第 2 期では 9 種類に増加していた。

HA-MRSA は第 1 期から第 2 期の間に複数の患者から分離される菌株の種類が減少していたことから、HA-MRSA は従来の感染対策が功を奏し、排除されつつあることがわかった。一方、CA-MRSA は第 1 期から第 2 期の間に複数の患者から分離される菌株の種類が 3 種類から 9 種類に増加していた。CA-MRSA の分離数が増加している背景には、外来患者からの MRSA の持ち込みの割合が増加しているためと考えられる。しかし、複数の患者から同一菌株の分離される種類の数が増加していることは、持ち込まれた CA-MRSA が院内に長期に定着し、院内伝播が起こった可能性を示唆している。

表 3-4 同一 POT 型が複数分離された場合の POT 型の種類の数

	第 1 期	第 2 期
HA-MRSA	7	5
CA-MRSA	3	9

第 1 期の HA-MRSA: n=56, CA-MRSA: n=33、第 2 期の HA-MRSA: n=31, CA-MRSA: n=59

5) 各期間に分離された MRSA のバイオフィルム形成能の比較

各期間の MRSA のバイオフィルム形成能を比較した結果を表 3-4 に示した。いずれの期間においても、HA-MRSA と比較して CA-MRSA は有意にバイオフィルム形成能が高かった($p<0.001$)。このことから、CA-MRSA の分離率の高さは、院内に CA-MRSA がバイオフィルムを形成して長期に存在している可能性が示唆された。実際に、表 3-3 に示す長期間にわたって分離されている菌株のバイオフィルム形成能をみても、HA-MRSA のバイオフィルム形成能はそれほど高くないものの、CA-MRSA 2 種類のバイオフィルム形成能は比較的高かった。

表 3-5 各期間のバイオフィルム形成能の比較

	第 1 期	第 2 期
HA-MRSA	28.0±14.9	29.9±15.6
CA-MRSA	90.0±31.6	71.1±25.2
<i>p</i> -value	<0.001	<0.001

平均値±標準偏差で示した。*p* 値は Student's t-test により算出した。

第 1 期の HA-MRSA: n=56, CA-MRSA: n=33、第 2 期の HA-MRSA: n=31, CA-MRSA: n=59

MRSA を含む黄色ブドウ球菌は、ベッド柵やドアノブを介した接触感染が感染経路の一つとされている。MRSA がバイオフィルムを形成して環境中に長期に存在していることで、易感染状態にある患者に感染を引き起こす可能性がある。バイオフィルムは MRSA の病原因子の一つとされており、患者や院内環境への長期定着に関わっている。医療技術の進歩によりカテーテルやペースメーカー、人工関節などの医療デバイスが挿入されている患者の増加が増加している。黄色ブドウ球菌はもともと膿瘍を形成しやすく、これらの患者がバイオフィルム形成能の高い CA-MRSA に感染すると、医療デバイスにバイオフィルムを形成し、持続的感染を引き起こすリスクが高い。血管内留置カテーテルは通常抜去可能であるが、ペースメーカーや人工関節などは患者の身体の一部であり、抜去は容易でない。バイオフィルム内の菌は抗菌薬が効きにくいいため治療が難渋化し、患者への身体的負担や入院期間の延長、医療費の増大などの問題

点が生じてくる。

複数の患者から同一 POT 型の菌株が分離された場合には、院内伝播した可能性が否定できない。CA-MRSA の分離数が増加している背景には、外来患者からの MRSA の持ち込みの割合が増加しているためと考えられたが、複数の患者から同一菌株の分離される種類の数が増加していることは、持ち込まれた CA-MRSA が高いバイオフィルム形成能により院内に定着し、院内伝播が起こった可能性を示唆している。

また、市中における CA-MRSA の拡大も CA-MRSA 分離率の増加に関与していると考えられる。しかし、学校や家庭など院外においては、院内のような MRSA の接触感染予防対策は一般的に行われておらず、拡大防止は困難である。CA-MRSA も保菌状態では問題ないことから、感染症発症時に病院で適切な対応をすることが望まれる。そのため、今後はバイオフィルム形成能の高い CA-MRSA も視野に入れた院内感染対策が重要になってくると考えられる。

第4章 総括と展望

現在、薬剤耐性問題が国際的問題として大きく取り上げられている。2015年5月のWHO総会ではNational Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR) (2016-2020)が採択され、加盟各国は2年以内に薬剤耐性に関する国家行動計画の策定を求められた。これを受けて日本政府は2016年4月、日本版薬剤耐性対策アクションプランを発表した。アクションプランには大きく分けて①普及啓発・教育、②動向調査・監視、③感染予防・管理、④抗微生物薬の適正使用、⑤研究開発・創薬、⑥国際協力、の6つの分野での目標が定められている。しかし、新規抗菌薬の開発は鈍化している。さらに、抗菌薬と薬剤耐性菌はいわゆる“いたちごっこ”の関係にあり、新規抗菌薬を開発したとしてもすぐに薬剤耐性菌が出現することは明らかである。これらの理由から、新規抗菌薬の開発だけでは薬剤耐性問題に太刀打ちできないのが現状である。実際に薬剤耐性問題に直面し、対処しなければならないのは臨床現場である。すなわち、各医療機関での抗菌薬の適正使用や薬剤耐性菌による感染症の予防・管理が重要である。医療従事者がいかに薬剤耐性に対する危機意識をもって感染対策を実施するかにかかっているとと言える。

本研究では、院内感染の原因菌として最も分離率が高く、院内感染対策の成否の指標となり得るMRSAを対象として、MRSAの性状解析および発生動向について調べた。MRSAの分子疫学的解析には簡便に実施可能なPOT法を用いた。なお、解析を行うにあたりSCC*mec* II型のMRSAをHA-MRSA、SCC*mec* IV型とV型のMRSAをCA-MRSAとした。当院で臨床分離されたMRSA 138株をPOT法で解析するとCA-MRSAの分離率は全体の43%、HA-MRSAは全体の22%であり、CA-MRSAの分離率が大幅に高かった。HA-MRSAとCA-MRSAのみを対象とすると、CA-MRSAの分離率は66%となった。これを過去に分離されたMRSAの解析結果と比較すると、CA-MRSAの分離率がHA-MRSAの分離率を逆転しており、これまで院内感染の主流とされてきたNew York/ Japan クローンを中心とするHA-MRSAからCA-MRSAに置き換わっていることがわかった。同一POT型を示す菌株について患者カルテから入院日と検査日および検査時点での入院していた病棟など調査し、院内伝播の可能性を調べた結果、SCC*mec* II型

のうち POT 型 93-136-7 の菌株、SCCmec IV 型のうち POT 型 106-147-45 と POT 型 106-153-115 の菌株、MSSA のうち POT 型 4-47-112 の菌株の 4 種類は院内伝播の可能性が示唆された。これらの菌株はすべて院内発生と考えられ、院内の環境中もしくは医療従事者を介して接触感染した可能性が否定できない。医療従事者の保菌する MRSA を採取し、POT 法で解析して同一 POT 型であることを確認すれば医療従事者からの接触感染を強く疑うことが証明されるが、医療従事者から MRSA を採取するのは医療倫理の問題から簡単には実施できない。一方、院内の環境中に存在する MRSA を解析すれば、環境中から直接、あるいは医療従事者の保菌する MRSA が環境を介して間接的に患者に感染したかを推測することができるため、アウトブレイク時は当然のことながら定期的な環境菌の監視培養およびその菌株の解析も必要である。

また、CA-MRSA は HA-MRSA と比較して小児や比較的若年の成人からの分離が多く、年齢の低い患者から分離されていた。CA-MRSA と HA-MRSA の起因率に差はなかったことから、CA-MRSA は感染リスクの少ないとされる比較的若年者にも病原性を発揮し、感染を引き起こすことがわかった。CA-MRSA は対象期間中に複数の患者から分離される菌株の種類が増加していた。CA-MRSA の分離率が高い背景には外来患者からの MRSA の持ち込みの増加が考えられるが、同一菌株が対象期間中に複数患者から分離される理由として、持ち込まれた CA-MRSA が院内にバイオフィルムを形成して長期に継続して存在している可能性が考えられた。そこで、バイオフィルム形成能を調べた結果、異なる 2 つの期間のいずれにおいても CA-MRSA は HA-MRSA と比較してバイオフィルム形成能が高いことがわかった。このことから、CA-MRSA はバイオフィルムとして院内に長期に存在する可能性が示唆された。バイオフィルムは MRSA の病原因子の一つであり、患者や院内環境中への長期定着に関わる、臨床現場においては最も重要な病原因子と言える。MRSA がバイオフィルムを形成して長期に存在すると、易感染状態にある患者の多い院内では容易に感染拡大することが懸念される。さらに、医療技術の進歩によりカテーテルやペースメーカー、人工関節などの医療デバイス挿入患者が増加している。バイオフィルム内に存在する菌は抗菌薬が効きにくい。MRSA が医療デバイスにバイオフィルムを形成すると、持続的な感染を引き起こして治療が難渋化し、患者への身体的負担や入

院期間の延長、医療費の増大などの問題点が生じてくる。これらのことから、臨床現場で分離される MRSA のバイオフィーム形成能を把握しておくことは、院内感染対策を行う上で重要であると考えられる。本研究で、臨床現場で増加しつつある CA-MRSA のバイオフィーム形成能が高いことを見出したことは、新たな院内感染対策を見出す必要性が高くなったことを示している。

POT 法は PFGE などの分子疫学的解析法と比較して簡便に実施できるが、大学病院などの研究機関と異なり市中病院はハード面、ソフト面ともに厳しい状況にあり日常的に実施するのは難しい。しかし、MRSA のアウトブレイク時には効果的な院内感染対策をとる必要があり、そのためには分子疫学的解析が必要である。本研究により、POT 法で CA-MRSA と判定した菌株と MSSA と判定した菌株の薬剤感受性試験の結果は類似していることがわかった。POT 法で MSSA と判定されるのは *mecA* を持っていないためであるが、薬剤感受性試験ではオキサシリンの MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上もしくはセフォキシチンの MIC が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれかもしくは両方を満たしているため CLSI の定義により“MRSA”と判定される。POT 法で MSSA と判定される“*mecA* を持たない MRSA”のオキサシリンおよびセフォキシチン耐性機構を解明すればセファゾリンなどの第一世代セフェム系抗菌薬を使用できる可能性があり、医療費の削減につながる。例えば、バンコマイシンを通常の用法・用量で投与する場合、塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5g が 1 日あたり 4 バイアル必要であり、10,244 円かかる。一方、セファゾリンの場合、1 回 2g を 1 日 3 回投与することが多く（保険適応外）、その場合セファメジン[®] α 注射用 2g が 1 日あたり 3 バイアル必要となり、2,256 円となる。セファゾリンが使用できる場合、バンコマイシンを投与する場合と比較して 1 日あたり 7,988 円もの差が出てくる。そのため POT 法により MRSA を SCC*mec* 型別に判定することは、治療効果は当然のことながら医療経済の面からも適切な抗菌薬の選択に貢献できると考えられる。

また、今回は調べてないが、CA-MRSA の分離率の高さに患者背景も関連している可能性がある。患者住所、医療機関の入院歴や施設への入所歴、小児であれば保育園や学校、図書館や公民館等の公共施設の利用頻度など院内外で MRSA と接触するリスク因子などについては検討する必要がある。特に、院外における MRSA 感染リスク因子が見つければ、津山中央病院だけの問題ではな

くなり、岡山県北地域をあげての対策を行う必要が出てくる。平成 28 年度診療報酬改定において感染防止対策加算は点数が減ることなく残っている背景には、世界規模での薬剤耐性菌対策の必要性が論じられている状況下、我が国においても感染防止対策をより重視するようになったことが挙げられる。MRSA をはじめとする薬剤耐性菌問題を解決するには、個々の医療機関によって行われる従来の院内感染対策だけでは不十分であり、地域ぐるみでの対策の積み重ねが重要と言える。

全国的に MRSA の分離率は減少しており、分離される全黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合も減少している。この背景には、院内感染対策によりこれまで院内感染の主流とされてきた HA-MRSA が排除されつつあることを示している。その一方で、CA-MRSA 分離率は増加しており、これまで行ってきた院内感染対策では CA-MRSA は排除できないことが示唆された。CA-MRSA は外来からの持ち込みの場合も多く、院内における感染対策を実施するだけでは持ち込み株に対処ができない。さらに、CA-MRSA はバイオフィーム形成能が高く、従来の院内感染対策では排除できないことから、CA-MRSA の拡大防止のためにはバイオフィームを形成した MRSA の排除を視野に入れた院内感染対策を構築することが必要である。院内感染対策チーム(infection control team: ICT)における薬剤師の役割も、抗菌薬の適正使用に関する調査にとどまることなく、分離される菌株の細菌学的特徴の把握、患者の病態の総合的評価、外来患者からの持ち込み株に対する感染拡大防止のための環境整備にも積極的に関わっていく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, et al.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet, 357(9264), 1225-1240, 2001.
- 2) International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Collaborators (23), Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements, Antimicrob Agents Chemother, 53(12), 4961-4967, 2009.
- 3) Motoshima M, Yanagihara K, Morinaga Y, Matsuda J, Sugahara K, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S.: Genetic diagnosis of community-acquired MRSA: a multiplex real-time PCR method for Staphylococcal cassette chromosome *mec* typing and detecting toxin genes, Tohoku J Exp Med, 220(2), 165-170, 2010.
- 4) Baranovich T, Zaraket H, Shabana II, Nevzorova V, Turcutyuicov V, Suzuki H.: Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia, Clin Microbiol Infect, 16(6), 575-582, 2010.
- 5) Paharik AE, Horswill AR.: The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response, Microbiol Spectr, 4(2), 2016.
- 6) Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G 3rd, Goldmann DA, Pier GB.: Immunochemical properties of the staphylococcal poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide, Infect Immun, 70(8), 4433-4440, 2002.
- 7) Stewart PS.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms, Int J Med Microbiol, 292(2), 107-113, 2002.
- 8) Burton DC, Edwards JR, Horan TC, Jernigan JA, Fridkin SK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. JAMA, 301(7):727-736, 2009
- 9) Soi V, Moore CL, Kumbar L, Yee J.: Prevention of catheter-related bloodstream infections in patients on hemodialysis: challenges and management strategies, Int J Nephrol Renovasc Dis, 9, 95-103, 2016.

- 10) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study, *Clin Infect Dis*, 39(3), 309-317, 2004.
- 11) Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, et al.: Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *JAMA*, 290(22), 2976-2984, 2003.
- 12) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, et al.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, 9(8), 978-984, 2003.
- 13) Blot S, Vandewoude K, Colardyn F.: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(27), 2025-2026, 1998.
- 14) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 48(32), 707-10, 1999.
- 15) Isobe H, Takano T, Nishiyama A, Hung WC, Kuniyuki S, Shibuya Y, Reva I, Yabe S, Iwao Y, Higuchi W, et al. : Evolution and virulence of Panton-Valentine leucocidin -positive ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the past 30 years in Japan. *Biomed Res*, 33(2), 97-109, 2012.
- 16) Yamaguchi T, Nakamura I, Chiba K, Matsumoto T.: Epidemiological and microbiological analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a Japanese hospital. *Jpn J Infect Dis*, 65(2), 175-178, 2012.
- 17) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T, Yamamoto T.: A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan, *J Clin Microbiol*,

- 43(7), 3356-3363, 2005.
- 18) O'Brien FG, Lim TT, Chong FN, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA, Monk A, Saïd-Salim B, Kreiswirth BN, Grubb WB.: Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol*, 42(7), 3185-3190, 2004.
 - 19) Chen FJ, Huang IW, Wang CH, Chen PC, Wang HY, Lai JF, Shiau YR, Lauderdale TL; TSAR Hospitals.: *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan, *J Clin Microbiol*. 50(5), 1679-1683, 2012.
 - 20) Witte W, Pasemann B, Cuny C.: Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, *Clin Microbiol Infect*, 13(4), 408-412, 2007.
 - 21) Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I.: Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test, *J Clin Microbiol*, 40(8), 2766-2771, 2002.
 - 22) Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE.: Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 38(6), 2170-2173, 2000.
 - 23) Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains, *J Clin Microbiol*, 39(11), 3946-3951, 2001.
 - 24) Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, 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.
 - 25) Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Hayakawa Y, Minagawa H.: Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets, *J Appl Microbiol*, 107(4), 1367-1374, 2009.

- 26) Nada T, Yagi T, Ohkura T, Morishita Y, Baba H, Ohta M, Suzuki M.: Usefulness of phage open-reading frame typing method in an epidemiological study of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, Jpn J Infect Dis, 62(5), 386-389, 2009.
- 27) O'Sullivan MV, Kong F, Sintchenko V, Gilbert GL.: Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission in hospitals by use of phage-derived open reading frame typing enhanced by multiplex PCR and reverse line blot assay, J Clin Microbiol, 48(8), 2741-2748, 2010.
- 28) 鈴木匡弘: Cica Geneus Staph POT Kit の原理とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学, THE CHEMICAL TIMES, 3, 16-21, 2011.
- 29) Takahashi H, Seki M, Yamamoto N, Hamaguchi S, Ojima M, Hirose T, Yoshiya K, Toyokawa M, Nishi I, Ogura H, et al.: Validation of a phage-open reading frame typing kit for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) transmission in a tertiary hospital, Infect Drug Resist, 8, 107-111, 2015.
- 30) 森山英彦, 松田親史, 柴田宏, 西村信弘, 廣瀬昌博, 長井篤: MRSA の院内伝播制御に有用な POT 法を用いた分子疫学的解析, 感染症学雑誌, 86(2), 115-120, 2012.
- 31) Maeda T, Saga T, Miyazaki T, Kouyama Y, Harada S, Iwata M, Yoshizawa S, Kimura S, Ishii Y, Urita Y, et al.: Genotyping of skin and soft tissue infection (SSTI)-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains among outpatients in a teaching hospital in Japan: application of a phage-open reading frame typing (POT) kit, J Infect Chemother, 18(6), 906-914, 2012.
- 32) Kullar R, Davis SL, Levine DP, Rybak MJ.: Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. Clin Infect Dis, 52(8), 975-981, 2011.
- 33) 日本化学療法学会, 抗菌薬 TDM ガイドライン 2015 executive summary, http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/tdm_executive-summary.pdf (2016.11.26)
- 34) Steinkraus G, White R, Friedrich L.: Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical

- methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05, *J Antimicrob Chemother*, 60(4), 788-794, 2007.
- 35) Wang G, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA.: Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period, *J Clin Microbiol*, 44(11), 3883-3886, 2006.
 - 36) Goldman JL, Harrison CJ, Myers AL, Jackson MA, Selvarangan R.: No evidence of vancomycin minimal inhibitory concentration creep or heteroresistance identified in pediatric *Staphylococcus aureus* blood isolates, *Pediatr Infect Dis J*, 33(2), 216-218. 2014.
 - 37) Alós JI, García-Cañas A, García-Hierro P, Rodríguez-Salvanés F.: Vancomycin MICs did not creep in *Staphylococcus aureus* isolates from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage, *J Antimicrob Chemother*, 62(4), 773-775, 2008.
 - 38) Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, Stellrecht K.: Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin, *Antimicrob Agents Chemother*, 52(9), 3315-3320, 2008.
 - 39) Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, Alamo D, Ortega M, Lopez J, Mensa J.: Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Clin Infect Dis*, 46(2), 193-200, 2008.
 - 40) 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*, 47(6), 1640-1644, 2009.
 - 41) 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*, 46(9), 2950-2954
 - 42) Yanagisawa C, Hanaki H, Matsui H, Ikeda S, Nakae T, Sunakawa K.: Rapid

- depletion of free vancomycin in medium in the presence of beta-lactam antibiotics and growth restoration in *Staphylococcus aureus* strains with beta-lactam-induced vancomycin resistance, *Antimicrob Agents Chemother*, 53(1), 63-68, 2009.
- 43) Hirao Y, Ikeda-Dantsuji Y, Matsui H, Yoshida M, Hori S, Sunakawa K, Nakae T, Hanaki H.: Low level β -lactamase production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with β -lactam antibiotics-induced vancomycin resistance. *BMC Microbiol*, 12, 69, 2012.
- 44) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(26), 565-567, 2002.
- 45) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(40), 902, 2002.
- 46) Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, et al.: Infectious Diseases Society of America.: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children, *Clin Infect Dis*, 52(3), 285-292, 2011.
- 47) Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Nakae T, Takesue Y, Tomono K, Honda J, Yanagihara K, Mikamo H, Fukuchi K, Kaku M, et al.: Emergence of linezolid-resistant mutants in a susceptible-cell population of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 2466–2468, 2011.
- 48) Smith JR, Claeys KC, Barber KE, Rybak MJ.: High-dose daptomycin therapy for staphylococcal endocarditis and when to apply it, *Curr Infect Dis Rep*, 16(10), 429, 2014.
- 49) Kullar R, Casapao AM, Davis SL, Levine DP, Zhao JJ, Crank CW, Segreti J, Sakoulas G, Cosgrove SE, Rybak MJ.: A multicentre evaluation of the effectiveness and safety of high-dose daptomycin for the treatment of infective endocarditis, *J Antimicrob Chemother*, 68(12), 2921-2926, 2013.
- 50) Hagiya H, Terasaka T, Kimura K, Satou A, Asano K, Waseda K, Hanayama Y,

- Otsuka F.: Successful treatment of persistent MRSA bacteremia using high-dose daptomycin combined with rifampicin, *Intern Med*, 53(18), 2159-2163, 2014.
- 51) Phillips M, Rosenberg A, Shopsin B, Cuff G, Skeete F, Foti A, Kraemer K, Inglima K, Press R, Bosco J.: Preventing surgical site infections: a randomized, open-label trial of nasal mupirocin ointment and nasal povidone-iodine solution, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 35(7), 826-832, 2014.
- 52) Levy PY, Ollivier M, Drancourt M, Raoult D, Argenson JN.: Relation between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infection in orthopedic surgery: the role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis, *Orthop Traumatol Surg Res*, 99(6), 645-651, 2013.
- 53) Mehta S, Hadley S, Hutzler L, Slover J, Phillips M, Bosco JA 3rd.: Impact of preoperative MRSA screening and decolonization on hospital-acquired MRSA burden, *Clin Orthop Relat Res*, 471(7), 2367-2371, 2013.
- 54) McDanel JS, Perencevich EN, Diekema DJ, Herwaldt LA, Smith TC, Chrischilles EA, Dawson JD, Jiang L, Goto M, Schweizer ML.: Comparative effectiveness of beta-lactams versus vancomycin for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections among 122 hospitals, *Clin Infect Dis*, 61(3), 361-367, 2015.
- 55) Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK Jr, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, Chu VH, Joyce MJ, Reller LB, Corey GR, et al.: Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Clin Infect Dis*, 44(2):190-196, 2007.
- 56) Schweizer ML, Furuno JP, Harris AD, Johnson JK, Shardell MD, McGregor JC, Thom KA, Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN.: Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC Infect Dis*, 11, 279, 2011.
- 57) Chambers HF, Hackbarth CJ.: Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 31(12), 1982-1988, 1987.

- 58) Centers for Disease Control and Prevention.: Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999, *Morb. Mortal. Wkly. Rep*, 48, 707-710, 1999.
- 59) 富田 雄介, 河野 修, 一安 秀範, 福島 敬和, 福田浩一郎, 杉本 峯晴, 興梠 博次: 市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による壊死性肺炎の 2 例, *日呼吸会誌*, 46(5), 395-403, 2008.