

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461513

研究課題名(和文)バンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌の検出に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of detection method for Vancomycin intermediated-resistant Staphylococcus aureus

研究代表者

花木 秀明 (Hanaki, Hideaki)

北里大学・北里生命科学研究所・特任教授

研究者番号：60286747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は自然発生的に一定の割合で耐性細胞が出現する。この状態をヘテロ耐性をよぶ。一方で、バンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌(VISA)が検出されているが、それ以上にヘテロVISAが多い。ヘテロVISAはVISA細胞を含む細胞集団であり既存の方法では検出できない。このヘテロVISAをMICで検出するには0.012%以上のVISA細胞が必要であることから、MIC測定菌量としては通常の10倍量が必要であった。さらにVISA株特異的蛋白の存在をMALDI-TOFで確認している。

研究成果の概要(英文)：Antibiotic resistant cells emerge spontaneously at a certain frequency in the bacterial population that is termed as hetero-resistance. One of the most problematic antibiotic resistant bacteria in the clinical setting may be Staphylococcus aureus MRSA that exhibits resistance to structurally diverse multiple antibiotics including vancomycin. Among them, vancomycin intermediate resistant cells (VISA) appear in the population of vancomycin heteroresistant cells (hVISA). Therefore, detection of VISA cells in the hVISA population is difficult due to the fact that VISA appears at the frequency of 0.012% of hVISA. To detect VISA by the MIC method, over 10 times of cells are required compared with that of the conventional MIC determination. To overcome this difficulty, studies are on progress to detect VISA specific proteins by using MALDI-TOF-Mass spectroscopy.

研究分野：感染症学 細菌学

キーワード：バンコマイシン VISA ヘテロVISA 検出 混合培養

1. 研究開始当初の背景

(1)

抗 MRSA 薬であるバンコマイシンのブレイクポイント（感性か耐性かを定める MIC 値）は各国で異なっている。特にアメリカには二つの基準が存在する。我が国が広く使っている基準は、アメリカの Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI、臨床・検査標準協会）が作成したブレイクポイントである。これは $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ が感性 (S)、4 と $8 \mu\text{g/mL}$ が中程度 (I)、 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ が耐性 (R) となっている。一方で、アメリカでは別の組織として United States Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (USCAST) が立ち上がってきており、その基準は、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ が感性 (S)、 $> 2 \mu\text{g/mL}$ が耐性 (R) とヨーロッパの European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) と日本の耐性基準 (JSC) と一致している。世界的な流れとして、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ が感性 (S)、 $> 2 \mu\text{g/mL}$ の耐性 (R) が主流になってくると思われるが、現状では我が国で広く使われている CLSI 基準に則った耐性基準で「バンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌」の背景説明を行う。いずれの基準においても、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ は感性 (S) に分類されているが、この感性株の中にも耐性細胞 (MIC が 4 と $8 \mu\text{g/mL}$) を含む集団が存在する。CLSI 基準では 4 と $8 \mu\text{g/mL}$ の株は中程度 (I) に分類されるので、Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) となり、VISA 細胞をごく少数含む感性株 (MIC が $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) の表現はヘテロ VISA となる。

(2)

このヘテロ VISA は通常の MIC 検査では検出できないため、見逃されている可能性が大きい。しかし、ヘテロ VISA は VISA になる前段階の細胞集団であり、このヘテロ VISA を見逃して VCM で治療すると耐性に傾いた細胞集団のみになり最終的には VISA となる危険

性を含んでいる。

2. 研究の目的

ヘテロ VISA の見逃しは、より高度な耐性菌である VISA へとつながり、VCM による治療失敗や難治性に陥らせる危険性を含んでいる。そのため、VISA よりも感性を維持している耐性前段階のヘテロ VISA を、population 解析や MIC 測定方法によって検出する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)

ヘテロ VISA を検出する目的で、ヘテロ VISA 株として確立されている Mu3 株と、population 解析でヘテロ VISA 株と判断された 32 株を用いて比較検討した。

培地の検討を Brain Heart infusion (BHI) と Muller Hinton (MH) で比較した。 $4 \mu\text{g/mL}$ VCM 含有 BHI-agar と $2 \mu\text{g/mL}$ VCM 含有 MH-agar 上に一定量の菌を塗抹して生育するコロニー数での検出を試みた。この方法を「one point population」という。

(2)

ヘテロ VISA を検出する目的で、BHI-agar と MH-agar で population 解析を実施し、その AUC を求めた。この方法を「PA-AUC」という。

(3)

ヘテロ VISA の含有率がどの程度であれば、population や MIC 値に影響を及ぼすかを調べるために、VCM 感性である N315 と VISA 株である Mu50 株を一定量同士混ぜ合わせて意図的にヘテロ VISA を作り出した。Mu3 株と Mu50 株の細胞数の比率を変える事で population 解析と MIC 値の変動を測定し、それらに影響を与える Mu50 細胞の含有率を求めた。

4. 研究成果

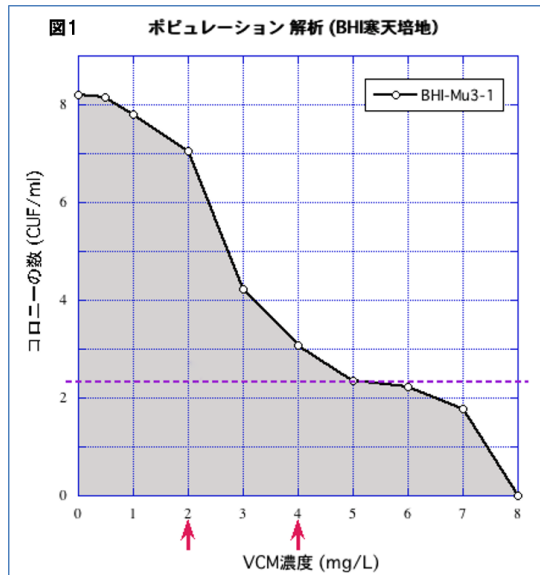
(1)

One point population では、BHI-agar でのコロニー数は 1 個から数千個となり、MH-agar では 20 個から数千個となった。生育するコロニー数のバラツキが大きかったため、この方法ではヘテロ VISA を確実に検出することはできなかった。

(2)

ヘテロ VISA の Mu3 株と臨床分離ヘテロ VISA の PA-AUC を比較した。BHI-agar における Mu3 株の AUC は 34~37 となり、臨床分離ヘテロ VISA 株で Mu3 をこえる株は 32 株中 7 株しかなかった。さらに MH-agar の Mu3 株の AUC は 20~23 になるが、これをこえる株も 7 株しかなかった。しかし、これらの 7 株は同一株であり、検出率は低い再現性は高い方法と結論付けられた。

Population 解析で横軸の濃度を縦軸に對数でコロニー数をプロットした図 1 を示す。



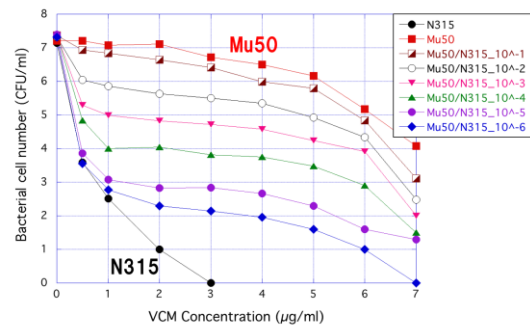
灰色の下部面積 (AUC) を算出して他の株と比較した。

(3)

N315 と VISA の Mu50 株を一定量同士混ぜ合わせて作成した population 解析を図 2 にしめす。Mu50 の添加量 (細胞数) が増えるに従い、VCM の高濃度域で生き残る (生育してく

る) 細胞が増えている。これが世界で最初に試みられた VSSA と VISA 細胞の混合培養によるヘテロ VISA の構築となる。臨床分離ヘテロ VISA と同様の population 形となっている。

図2. N315とMu50株のPopulation解析.



これらの混合培養における VCM の MIC の比較を各比率で行った。Mu50: N315 の比率が 1:10,000 以下の場合には N315 (0.5 µg/mL) よりもわずかに耐性側の 1.0 µg/mL の値を示す。しかし、1:1000 以上になると、その MIC は 10 倍以上の耐性となる事が分かった。さらに詳細に比率を振り分けると 1:16,384 では変化はなく、1:8,192 (0.012%) から 8 倍以上の耐性側の MIC を示す事が分かった。

(4)

ヘテロ VISA は VISA 細胞が 8,000 個に 1 個以上存在すれば、通常の MIC で判明する事が分かった。この比率から推測できることは、現状の寒天平板の接種菌量である 10⁷ 個/mL (実際の菌量は 10⁴ 個/spot) での検出は難しく、その 10 倍量の接種菌量が必要と推測できる。さらに、この比率が 10,000 個に 1 個以下と低い場合の検出は MIC では不可能と考えられる。

(5)

ヘテロ VISA の検出方法としては、接種菌量を 10 倍以上にする事で検出は可能と考えられる。しかし、どの程度の VISA 細胞が含まれた場合に臨床で影響が出るのか、耐性の VISA 細胞集団に容易に変わるのかを研究す

る必要がある。さらに、別の検出方法として、MALDI TFMS を用いた特異的蛋白の検出があげられる。これらについては既に新規蛋白を検出しているので、今後はその詳細を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 花木秀明. 中村竜也、菅野重治. 「VCM の MIC が $2\mu\text{g/mL}$ の株を考える」. 特別企画. 第 63 回日本化学療法学会総会. 2015 年 6 月 4 日. 新宿京王プラザホテル.
- (2) 花木秀明. 「人工的に作成した hetero-VISA の population 解析と MIC の相関」第 63 回日本化学療法学会総会. 2015 年 6 月 4 日. 新宿京王プラザホテル.
- (3) Longzhu Cui, Hidehito Matsui, Hideaki Hanaki A modified agar screening method for detection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Centre Conventions International Barcelona, Barcelona, Spain. 2014 年 5 月 13 日
- (4) 花木秀明. 「VISA とその前駆体であるヘテロ VISA を考える。」第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 57 回日本感染症学会中日本地方学術集会 第 84 回日本感染症学会西日本地方学術集会合同学会. 岡山コンベンションホール. 2014 年 10 月 24 日
- (5) 花木秀明. MRSA の基礎. 第 88 回日本感染症学会学術集会 第 62 回日本化学療法学会 合同学会 (招待講演). 2014 年 6 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花木 秀明 (HANAKI Hideaki)

北里大学北里生命科学研究所・特任教授
研究者番号：60286747

(2) 研究分担者

崔 龍沫 (Cui Longzhu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50306932