

[原 著]

好気性培養で発育遅延となり Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci と誤同定された Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*山本雅枝¹⁾・川畑大輔¹⁾・塚原みゆき¹⁾・梅林直美¹⁾・永野貞明¹⁾高橋一郎²⁾・後藤美江子³⁾・奥住捷子⁴⁾・大石 毅²⁾¹⁾ 東京医科大学霞ヶ浦病院 MBC 検査室²⁾ 同・感染症科³⁾ 東京大学医科学研究所先端医療センター 感染症分野⁴⁾ 獨協医科大学病院・医療安全管理部・感染防止対策部

(平成 17 年 3 月 28 日受付, 平成 17 年 8 月 22 日受理)

我々は、好気性培養で発育遅延する Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 株を 5 症例から 7 株分離した。いずれの菌株も臨床材料からの初代分離培養時に、35°C、5%炭酸ガス一夜培養でヒツジ血液寒天培地上に *Staphylococcus aureus* 様の典型的集落を形成した。しかし、自動機器を用いた結果は、24 時間では発育が認められず 42 時間後に Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* (MR-S. *capitis*) と表示された。このため、結果乖離の原因は培養条件の違いと考え、好気性培養と 5%炭酸ガス培養の条件下で比較した。本菌株の集落形成には好気性培養で 96 時間、炭酸ガス培養で 24 時間を要し、発育速度が異なった。これらの菌株の培養条件による発育速度の差が、好気性培養で実施する同定検査および Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 準拠法による薬剤感受性試験をも誤判定を招く結果となった。なお、今回分離された 7 菌株は、グラム陽性球菌、カタラーゼ陽性、7.5%食塩耐性、マンニト分解能など従来法による生化学的性状と *spa* 遺伝子の保有を確認し *Staphylococcus aureus* と同定した。さらに *mecA* 遺伝子を保有しており、遺伝子学的に MRSA と確認された。今後、本 MRSA のように炭酸ガス培養が必須となる菌株の存在にも配慮し、好気性培養の重大なピットフォールとして広く認識されることを期待する。

Key words: MRSA, 炭酸ガス培養, 好気性培養, 発育遅延, CNS, ピットフォール

序 文

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) はわが国では 1980 年代から増加し始め、現在に至っても院内感染の起因菌として重要である^{1,2)}。一方、1940 年代ペニシリン G が医療現場に登場して以来、現在に至るまで新規抗菌薬の繁用とそれに対する耐性菌の出現が繰り返されてきている²⁾。MRSA は特

に形質獲得能力に優れており、最近では日常的検査において見逃されやすいものも報告されている^{3,4)}。

今回我々は、好気性培養で発育が遅延するため自動機器 (Microscan WalkAway40, DADE BEHRING) で Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* (MR-S. *capitis*) と同定された MRSA を経験した。さらに、3 カ月間に同一病棟より提出された臨床検体から同様の結果となった MRSA を 5 症例から 7 菌株を分離した。これら 7 株に対する Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による遺伝子解析の結果は同一パターンであり、交差感染の可能性が示唆された^{5,6)}。今回、分離培養条件を変えて生化学的性状や発育速度を比較した。「見逃されやすい MRSA」の一つとして、検査上の問題点と臨床の重要度について検討を加えて

著者連絡先: (〒300-0395) 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-20-1
東京医科大学霞ヶ浦病院 MBC 検査室
山本雅枝
TEL: 029-887-1161 (内線 1782)
FAX: 029-840-2503
E-mail: masaeyam@tokyo-med.ac.jp

報告する。

I. 対象と方法

1. 好気性培養で発育が遅延する MRSA の発見の経緯

今回、我々が好気性条件で発育遅延する MRSA を同定するに至った経緯を表 1 に示す。当院の喀痰の初代分離培養は、ヒツジ血液寒天培地 (BA, 日本ベクトンディッキンソン: BD), チョコレート寒天培地 (BD) を用いて、35°C 5%炭酸ガス培養フラン器 (ヤマト科学) で一夜培養している。本症例で得られた BA 上のコロニー所見は典型的な *S. aureus* 様であったが、自動機器では MR-*S. capitis* と同定された。同定結果が検者の予想に反したことから、コアグラゼ試験を実施したところ陽性であった。また好気性培養下の接種菌液のサブカルチャーは発育が認められず、炭酸ガス培養下の初代分離菌の発育状態と乖離した。以上のことから、好気性培養にて定型的発育を示さない *S. aureus* を疑うに至った。その後の精査で MRSA と同定された。

2. 検出材料および患者背景と塗抹所見 (表 2)

表 2 に示したように、本 MRSA は 2003 年 12 月から 2004 年 2 月までに 5 症例から 7 菌株を分離し、初回検出例は症例 A であった。

3. MRSA の同定および薬剤感受性試験

上記の 7 株に対して、我々が日常実施している同定および薬剤感受性試験を好気性培養と 5%炭酸ガス培養の双方で行い、発育性状と結果を比較した。

(1) 従来法による性状確認

グラム陽性球菌, カタラーゼ陽性菌であることを確認し、コアグラゼ試験はウサギブラスマ“栄研”(栄研化学), 食塩耐性とマンニット分解性はマンニット食塩培地 (栄研化学), DNase 産生は DNA 寒天培地 (日水製薬), オキサシリン感受性試験は生培地の

MRSA スクリーン寒天培地 (BD) を使用した。検査法は使用説明書に従った。

(2) 自動機器による同定・薬剤感受性試験

同定, 薬剤感受性は MicroScan Pos Combo41J (PC41J) パネル (DADE BEHRING) を使用した。菌液の調製は, メーカーの説明書に従ってプロンプト法を採用した。同一の調製菌液を 2 枚の 41J パネルに分注し, 1 枚は WalkAway40 で培養し, 自動読み取りに従った。もう 1 枚は 35°C, 5%炭酸ガス培養フラン器 (ヤマト科学) で 24 時間培養し, MicroScan auto-SCAN4 (DADE BHRING) で読み取った。

(3) ディスク拡散法による薬剤感受性試験

Mueller-Hinton 寒天培地 (BD) を用いて, CLSI 法に準拠して行った。培養条件は好気, 炭酸ガス下共に 35°C で 24 時間培養とした。薬剤ディスクはセンシディスク (BD) を用い, oxacillin (MIPIC), ampicillin (ABPC), cefotiam (CTM), imipenem (IPM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), fosfomycin (FOM), levofloxacin (LVFX), gentamicin (GM), arbekacin (ABK), minocycline (MINO), vancomycin (VCM) の 12 薬剤を対象とした。判定は CLSI 法に準拠し阻止円直径を測定した。

4. PCR 法による *mecA* 遺伝子および *spa* 遺伝子の検出

MRSA の遺伝子的確認のため, PCR 法による *mecA* および *spa* 遺伝子の検出を行った。試験菌の染色体 DNA はジーンカラー *mecA*-*spa* 用検体処理試薬 (湧永製薬) によって抽出し, さらに *mecA* 遺伝子および *spa* 遺伝子の検出はジーンカラー *mecA*-*spa* (湧永製薬) を用いて行った。

5. 疫学的検討 (コアグラゼ型別, エンテロトキシン産生型および TSST-1 毒素産生能)

コアグラゼ型別は黄色ブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い, エンテロトキシン

表 1 好気性培養で発育が遅延する MRSA (表 2, 症例 A) の発見の経緯

- ① BA にて分離培養 (CO₂ 条件) し, コロニー所見より *S. aureus* と推定
- ↓
- ② 自動機器によって CNS と同定 (好気性培養)
- ↓
- ③ ②のサブカルチャーにてコアグラゼ試験実施できず
- ↓
- ④ ①のコロニーからコアグラゼ試験を実施し陽性
- ↓
- ⑤ 好気性培養発育不良の *S. aureus* を疑う
- ↓
- ⑥ CO₂ 条件での同定検査で MRSA と同定

表2 検出材料および患者背景と塗抹所見

症例	年齢, 性	菌株番号	検体提出日	材料	病名, 基礎疾患	使用抗菌薬	塗抹
A	82M	No. 1	2003/12/1	喀痰	S 状結腸癌, 糖尿病, 急性腎不全	CTM, IPM/CS VCM, MEPM SBTPC	Geckler3 GPC2+ (貪食有)
B	75M	No. 2	2003/12/24	喀痰	食欲不振, パーキンソン 症候群	PIPC, MEPM, CLDM, TEIC	Geckler3 GPC3+ (貪食有)
C	75M	No. 3	2004/1/21	尿	脱水, 食欲不 振, パーキンソン 症候群, 脳梗 塞後遺症	CLDM, PIPC, CFPM, CFPX, VCM	GPC3+ WBC1+
		No. 4	2004/1/30	喀痰			Geckler5 GPC1+ (貪食有)
D	72F	No. 5	2004/1/30	開放性膿 仙骨部①	急性胆嚢炎, 慢性関節リュ ウマチ, 肺炎, 仙骨部褥瘡	MEPM, CLDM CFPX, PIPC, VCM, CEZ, CTM	GPC 極少 WBC2+
		No. 6	2004/1/30	開放性膿 仙骨部②			GPC 極少 WBC2+
E	87M	No. 7	2004/2/6	尿	食欲不振, 肝硬変, 糖尿病	CTM, PIPC, CEZ, VCM, TEIC	GPC 極少 WBC 極少

CTM: cefotiam, IPM/CS: imipenem/cilastatin sodium, VCM: vancomycin, MEPM: meropenem, SBTPC: sultamicillin, PIPC: piperacillin, CLDM: clindamycin, TEIC: teicoplanin, CFPM: cefepime, CFPX: ciprofloxacin, CEZ: cefazolin, GPC: Gram-positive cocci

ン産生型は SET-RPLA (デンカ生研) を用いて実施した。さらに, TSST-1 毒素産生能は TST-RPLA (デンカ生研) にて実施した。

6. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による各 MRSA の相同性の確認

7 株の MRSA はすべて同一病棟から提出されたものであったため, 同一起源である可能性を疑い, Tenover らの分類基準⁷⁾に従って, 菌株の PFGE^{8,9)} によるパターンを分類した。制限酵素は *smaI* を使用した。

7. 培養条件の違いによる発育状況の比較

7 株の MRSA それぞれの発育特性を調べるため, 好気性培養, 5%炭酸ガス培養, 微好気性培養 (アネロパック・キャンピロ, 三菱ガス化学)¹⁰⁾, 嫌気培養 (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学) を実施し, 24 時間後の発育状況を観察した。菌株は BA で一夜炭酸ガス培養し, 菌液濃度 McF #0.5 に調製後, その菌液 10 μ l を BA に塗布した。温度および湿度は, 35°C, 85~89% に条件を統一した。

8. 好気性培養における発育速度の観察

7 の好気性培養で用いた BA を一定条件のもと 96 時間継続培養し, 集落の経時的变化を観察した。

II. 成 績

1. 好気性培養および炭酸ガス培養における同定結果の比較

(1) 従来法による性状確認の結果

好気性培養および炭酸ガス培養における MRSA 7 株の生化学的性状の比較を表 3 に示す。好気性培養における生化学的性状は, No. 5 株以外はコアグラーゼテスト陽性であった。また, マンニット食塩培地, DNA 寒天培地, MRSA スクリーン寒天培地の 3 種の培地に発育を認めず, したがってマンニット分解性, DNase 産生能および MRSA スクリーン寒天培地でのオキサシリン感受性試験は判定できなかった。

炭酸ガス培養においては, 7 株のすべてがコアグラーゼテスト陽性であった。また, マンニット食塩培地上に集落を形成し, マンニット分解性であった。DNase 産生性も全菌株陽性であった。MRSA スクリーン寒天培地は全菌株発育し, オキサシリン耐性であった。

(2) MicroScan Pos Combo41J パネルによる同定成績

好気性培養下 (WalkAway 40) では, 7 株とも 18

時間でコントロールウエルの菌濃度（濁度）が判定基準に達せず、培養延長となり、42 時間後に同定された菌名表示は MR-*S. capitis* であった。一方、炭酸ガス培養のパネルは、24 時間後の読み取りで 7 株すべてが MRSA と同定された。各性状試験の詳細比較は好気性培養においてインドキシルフォスファターゼ、ミクロコッカススクリーン、Voges-Proskauer 反応、尿素分解能にばらつきが見られたが、他の性状項目は全て一致していた。炭酸ガス培養下では、No. 2 の尿素以外の性状はすべて一致していた。

(3) 薬剤感受性試験の結果

微量液体希釈法を応用した PC41J パネルの好気および炭酸ガス条件下の成績の比較は、IPM, EM, FOM 以外の薬剤では 7 株すべてが同様の感受性を示していた。

ディスク拡散法では、好気性培養では菌の発育が見られず判定不能であったが、炭酸ガス培養では菌は発

育し定法に従った阻止円の計測が可能であった（図 1）。炭酸ガス培養下での供試薬剤 12 薬剤の薬剤感受性成績は、GM, ABK, MINO, VCM について 7 菌株すべてが S（感性）を示した。他の試験薬剤すべてが R（耐性）を示した。

2. PCR 法による *mecA* 遺伝子および *spa* 遺伝子の検出

7 株とも *mecA* 遺伝子、*spa* 遺伝子を保有していた（表 4）。

3. 疫学的検討

エンテロトキシン産生型はすべての株が C 型、コアグラゼ型別は No. 5 株を除く 6 株が II 型であった。TSST-1 毒素産生能試験においても No. 5 株を除く 6 株は陽性であった（表 4）。

4. PFGE による各 MRSA の相同性の確認

PFGE（図 2）において、No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 7 株が同一のパターンを呈し、No. 5, No. 6 株が同

表 3 従来法による性状確認と MRSA スクリーン寒天培地におけるオキサシリン感受性試験

菌株番号	コアグラゼ テスト		マンニット食塩培地 (マンニット分解)		DNA 寒天培地 (Dnase 産生)		MRSA スクリーン 寒天培地	
	好気	炭酸	好気	炭酸	好気	炭酸	好気	炭酸
No. 1	+	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 2	+	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 3	+	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 4	+	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 5	-	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 6	+	+	NG	+	NG	+	NG	+
No. 7	+	+	NG	+	NG	+	NG	+

NG: no growth (発育なし)

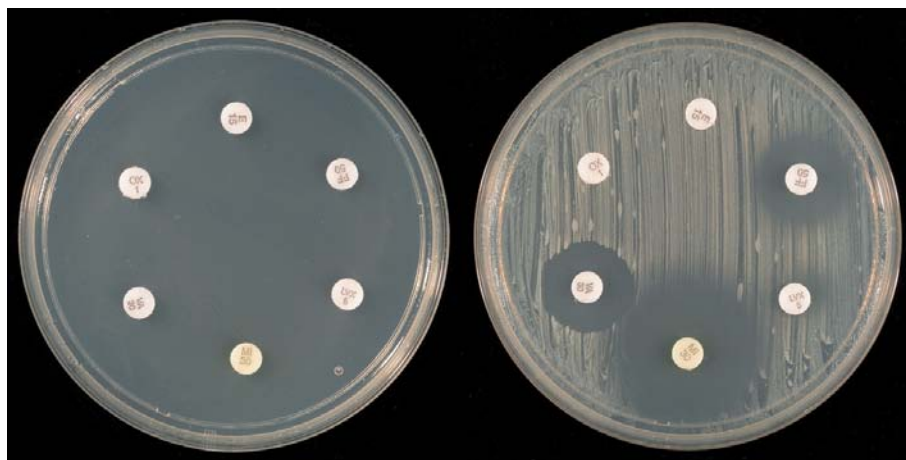


図 1 好気性培養と炭酸ガス培養下のディスク拡散法の比較

一のパターンを呈していた (表 4)。

Tenover らの分類基準に従って、菌株の PFGE によるパターンを分類した結果、No. 5, 6 は、他株と 80% 以上のパターンの一致が見られ、すべて同一由来の菌株であることが確認された。

5. 各種培養条件の違いによる発育状況の比較: 24 時間: No. 1 の菌株 (図 3)

No. 1 株を用いた各培養条件における発育状況を示す。好気性培養では菌の発育が認められなかったのに対し、炭酸ガス培養と微好気性培養では直径約 2 mm の β 溶血を示す典型的な白色コロニーが認められ、嫌気培養では直径 1 mm の β 溶血コロニーを認めた。7

株とも同様の発育性を呈していた。

6. 好気性培養における発育速度の観察

24 時間後では菌の発育が観察されなかったが、48 時間後に微小コロニーが僅か出現し、72 時間後には直径 1~1.5 mm 前後のコロニー 1+ と肉眼でかすかに確認できる程度の微小コロニーが 3+ 混在で観察された。96 時間後には、大小不同のコロニーが培地全面に認められた。7 株とも同様の結果であった (図 4)。

III. 考 察

今回我々は、好気性培養で発育が遅延するため見逃されやすい MRSA を経験した。特に、症例 A, B, C においては臨床上重要であるにもかかわらず、自動機器では MRSA を *S. capitis* と誤同定されており、常在菌と判断される可能性があった。

臨床検体からの培養方法は、付帯設備の違いから各検査室によって異なるのが現状である。当初、当検査室における日常検査では、尿は好気性培養で行っていた。症例 C, No. 3 (表 2) は、分離培地に菌の発育が全く認められず、塗抹所見と培養結果が不一致となったことから、速やかに炭酸ガス培養による再検査を行ったことで発見された。塗抹陽性、培養陰性となる事象に遭遇した場合には、通常は死菌や嫌気性菌と考えがちであるが、今回のような事例も考慮し炭酸ガス培養下での再培養も検討すべきである。

本 MRSA は、35°C 24 時間の好気性培養では発育が微弱であるために、同定検査において各判定基準を満たす菌量に達せず誤同定となったと考えられる。薬剤感受性試験においても、同様の理由により MIC が低く測定される危険があった。より正確に近い同定結果を得るには炭酸ガス培養を行い、薬剤感受性結果の参考値を得るには、変法となるが炭酸ガス培養下での微量液体希釈法またはディスク拡散法で実施する必要があると思われる。

また、本 MRSA は同一病棟から検出され、5 症例に

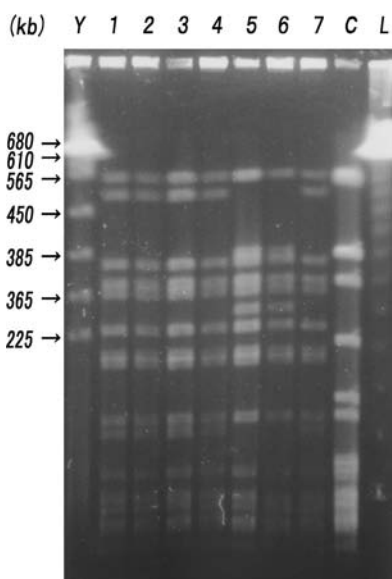


図 2 PFGE 型 (*Sma*I 消化)
レーン 1~7: 菌株 No. 1~7 を示す。
Y: Yeast chromosomes, *Saccharomyces cerevisiae*
C: コントロール株

表 4 遺伝子学的成績, 疫学的成績

検体番号	<i>mecA</i> 遺伝子	<i>spa</i> 遺伝子	コアグラマーゼ 型別	エンテロトキシン 産生型別	TSST-1 毒素産生能	PFGE
No. 1	+	+	II 型	C 型	+	A
No. 2	+	+	II 型	C 型	+	A
No. 3	+	+	II 型	C 型	+	A
No. 4	+	+	II 型	C 型	+	A
No. 5	+	+	型別不能	C 型	-	A'
No. 6	+	+	II 型	C 型	+	A'
No. 7	+	+	II 型	C 型	+	A

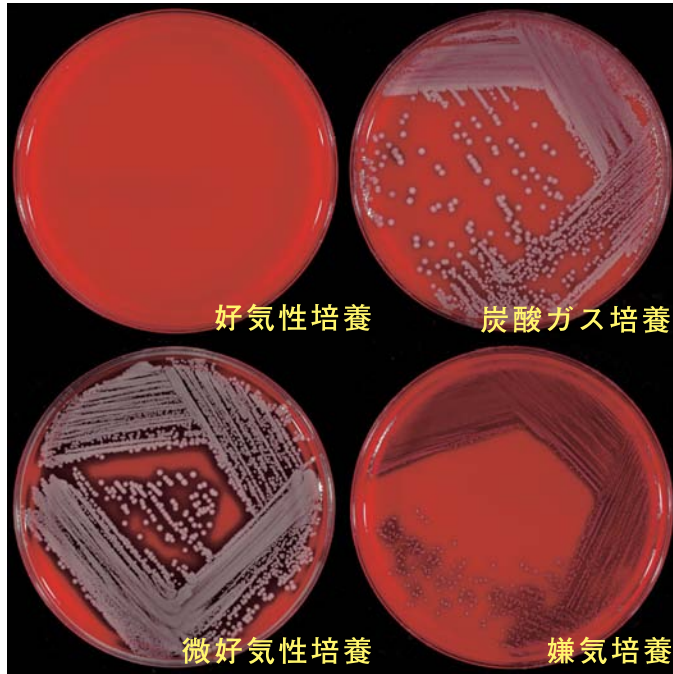


図3 培養条件の違いによる発育状況の比較

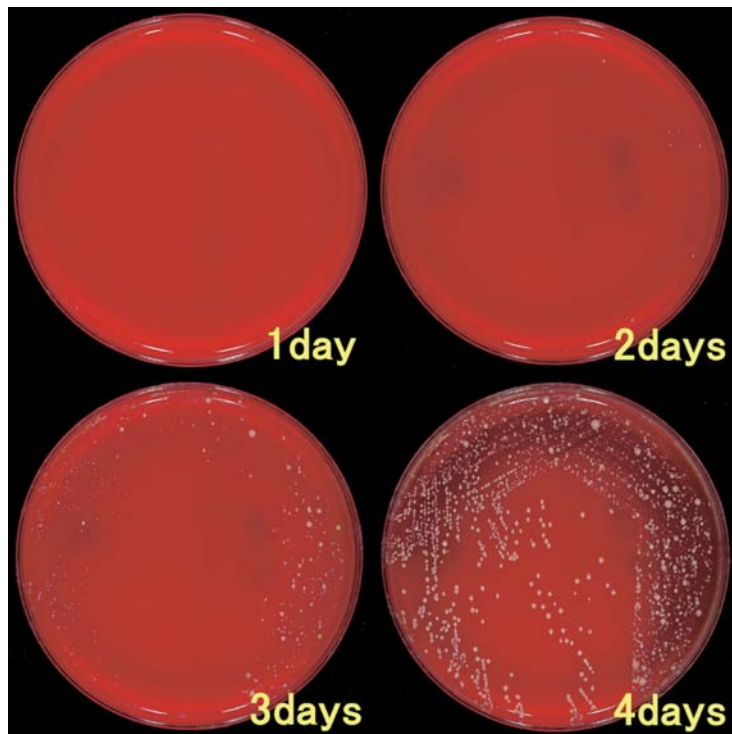


図4 好気性培養における発育速度

については PFGE^{5)~7)}にて遺伝子学的に同一起源と証明された。このことは、本 MRSA が院内感染起因菌¹⁾として今後注目していく必要性を示唆するものである。

本 MRSA の培養条件の違いによる発育状況の比較や好気性培養における発育速度の観察では、詳細なメカニズムは不明であった。今後解析を進めていく必要があるが、少なくとも Acar らの報告したチミジンまたはメナジオン要求性の small colony variant (SCV)³⁾や、岩川らの報告した ST 合剤による突然変異株⁴⁾にはこのような特性は述べられておらず、炭酸ガス培養が必要となる別の突然変異が生じている可能性が考えられた。

今回検出された MRSA は、7 菌株中 6 株が本邦において多く検出されるコアグラゼ II 型の MRSA であった^{11,12)}。このことから、本 MRSA は一般的に認められる MRSA から派生した可能性があると考えられ、当院だけではなく他施設でも検出されている可能性があり、今後注目していく必要があると思われる。

我々は日常の細菌検査において同定キットや自動機器による同定感受性試験を実施しているが、これらから得られた判定に頼るだけでなく、塗抹検査や菌の発育状況を合わせた技師の総合判断が重要であることを再確認した。また、本 MRSA 株の発見が好気性培養のみで検査を行う上でのピットフォールとして認識され、炭酸培養の重要性が再び広く認識されるきっかけとなれば幸いである。

文 献

- 1) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 他. 1989. 本邦における多剤耐性黄色ブドウ球菌の現状. CHEMOTHERAPY 37: 1334-1341.
- 2) 伊藤輝代, 平松啓一. 1997. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の耐性遺伝子とその多様性. 日本臨床 55(5): 188-193.
- 3) Acar, J. F., F. W. Goldstein., P. Lagrange. 1987. Human infections caused by thiamine- or menadione requiring *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 8: 142-147.
- 4) 岩川こずゑ, 奥住捷子. 2002. 血液寒天培地上に透明微小集落を形成し, Mueller-Hinton に発育不良な MRSA について. 日本臨床微生物学雑誌 12: 128-134.
- 5) 倉本あかね, 松村雅世, 高橋夕子, 他. 2002. 2 診療科の共有病棟における MRSA 感染のパルスフィールド電気泳動を用いた解析. 日本臨床微生物学雑誌 12: 9-13.
- 6) 満田年宏. 2002. 疫学調査実践対策. p. 86-98, 感染対策のための分子学入門. メディカ出版, 大阪.
- 7) Tenover, F. C., R. D. Arbeit R. V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.
- 8) Bannerman, T. L., G. A. Hancock, F. C. Tenover, et al. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 33: 551-555.
- 9) 一山 智. 1996. パルスフィールド・ゲル電気泳動法 原理と方法. 臨床と微生物 23: 621-625.
- 10) 是永陽子, 三澤成毅, 小栗豊子, 他. 2000. 炭酸ガス培養 4 法の比較検討. 日本臨床微生物学雑誌 10: 79-84.
- 11) 満田年宏. 2002. 接触感染 (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌. p. 100-116, 感染対策のための分子学入門. メディカ出版, 大阪.
- 12) 小栗豊子. IV 細菌の疫学マーカー. p. 103-111, 臨床微生物検査ハンドブック (第 2 版). 三輪書店, 東京.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Was Incorrectly Identified as Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci Due to Retarded Growth during Aerobic Incubation.

Masae Yamamoto,¹⁾ Daisuke Kawahata,¹⁾ Miyuki Tsukahara,¹⁾
Naomi Umebayashi,¹⁾ Sadaaki Nagano,¹⁾ Ichiro Takahashi,²⁾
Mieko Goto,³⁾ Katsuko Okuzumi,⁴⁾ Tsuyoshi Oishi²⁾

¹⁾ Mitsubishi-Kagaku BCL in Tokyo Medical University Kasumigaura Hospital

²⁾ Department of Infectious Disease, Tokyo Medical University Kasumigaura Hospital

³⁾ Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Center, Institute of Medical Science

⁴⁾ Dokkyo University School of Medicine, Hospital Department of Medical Safety Administration Division of Infection Control

We isolated 7 strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) characterized with retarded growth by aerobic culture from 5 patients. During the incubation for the primary separation, all of the isolated strains formed typical colonies suggestive of *Staphylococcus aureus* on sheep blood agar medium by incubation under 5% CO₂ gas at 35°C overnight. However, the test results obtained by automatic instruments for 24 hours failed to demonstrate any growth and 42 hours later, the instruments recognized the tested organism as Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* (MR-S. *capitis*). Accordingly, given that different incubation conditions might be responsible for such an inconsistency, we compared the results obtained under aerobic culture with those under 5% CO₂ gas. Formation of colonies of this bacterium required 96 hours under aerobic incubation and 24 hours under CO₂ gas incubation, indicating different growth rates. Differences in growth rates of this bacterium under incubation conditions were associated with incorrect judgment even in both the identification test to be performed under aerobic culture and the drug sensitivity test according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method. As for the currently isolated 7 strains, biochemical characteristics including Gram-positive-cocci, catalase positive features, 7.5% salt resistance and mannitol degrading ability, as well as possession of *spa* gene were confirmed, whereby they were identified as *Staphylococcus aureus*. Furthermore, possession of *mecA* gene permitted us to verify MRSA genetically. In light of existence of the special strains like the present MRSA requiring CO₂ gas incubation, we hope that this would be regarded as an important pitfall upon aerobic incubation in future.