

[原 著]

微量液体希釈法による *Staphylococcus* 属菌の Clindamycin 誘導耐性検出の比較検討

佐野加代子¹⁾・瀧澤かすみ¹⁾・黒沢貴之¹⁾・平野 智¹⁾・佐藤泰之¹⁾
佐藤芳美¹⁾・住友みどり¹⁾・荏原 茂¹⁾・渡邊眞一郎¹⁾・満田年宏²⁾

¹⁾ 公立大学法人横浜市立大学附属病院臨床検査部

²⁾ 公立大学法人横浜市立大学附属病院感染制御部

(平成 24 年 10 月 4 日受付, 平成 25 年 1 月 16 日受理)

臨床検査実務における *Staphylococcus* 属菌に対する Clindamycin (CLDM) 誘導耐性の検出方法には, ディスク拡散法を応用した D ゾーンテスト法と微量液体希釈法がある。これまで多くの施設では CLDM 誘導耐性試験を D ゾーンテスト法により検出されていた。Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) では M100-S18 以降, 微量液体希釈法で CLDM 誘導耐性を検出する場合は 4 µg/mL の Erythromycin (EM) および 0.5 µg/mL の CLDM の両抗菌薬を含むウェルにおける菌の発育の有無を判定することが標準化された。今回我々は D ゾーンテスト法を対照として CLDM ならびに EM の 2 薬剤が共存固相された感受性試験プレートをを用い *Staphylococcus* 属菌の国内臨床分離菌株に対して, CLDM 誘導耐性の検査に用いられるこの 2 薬剤の濃度の組み合わせが検出に及ぼす影響を検討した。その結果, D ゾーンテスト法を対照とした場合の感度と特異度は共に 100% であった。さらに EM 濃度が 2~8 µg/mL で, かつ CLDM 濃度が 0.25~1 µg/mL での範囲の組み合わせの時に, 最も適切に誘導耐性が判定可能であることが判明し, CLSI 準拠検査法の妥当性が確認された。

Key words: *Staphylococcus* spp., D-zone test, macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS_B) resistance, microdilution method inducible clindamycin-resistant

序 文

Staphylococcus 属菌は皮膚・軟部組織感染症では全体の 68% を占める。内訳は Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 35.3%, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 12.0%, coagulase-negative staphylococci (CNS) 20.7% である¹⁾。欧米では現在, Panton-Valentine leukocidin (PVL) 陽性市中感染型 MRSA による重症皮膚軟部組織感染症における治療薬の選択が課題となっている^{2)~4)}。米国感染症学会の皮膚軟部組織感染症診療ガイドラインでは, MRSA による軽症の皮膚軟部組織感染症の治療において, Clindamycin (CLDM) が薬剤感受性試

験で感性の場合 CLDM はペニシリンアレルギーの患者における有力な治療の選択肢となることが示されている⁵⁾⁶⁾。しかし CLDM が感性にもかかわらず, CLDM による治療が失敗する事例が報告されている。1956 年に治療に Erythromycin (EM) が導入されて以降 *Staphylococcus* 属菌による EM 耐性が出現した。この耐性は Macrolide-lincosamide- and type B streptogramin (MLS_B) resistance と呼ばれ抗生物質によるリボゾームターゲットのメチル化がその耐性機序とされ, Erythromycin ribosome methylase (*erm*) 遺伝子によってコードされている。初めて *Staphylococcus* 属菌の EM 耐性株は 1959 年にイギリスと 1967 年に北アメリカで報告されている⁷⁾。*Staphylococcus* 属菌の EM 耐性に関与する代表的な遺伝子には, *erm* 遺伝子のほかに Macrolide streptogramin resistance (*msrA*) 遺伝子がある。EM 耐性で CLDM 耐性の場合, *erm* 遺伝子による MLS_B 耐性因子構成型である。EM 耐性で CLDM 感性の場合には EM 耐性機構

著者連絡先: (〒236-0004) 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9
公立大学法人横浜市立大学附属病院臨床検査部
佐野加代子
TEL: 045-787-2800

Table 1. Profile of strains tested

Species	MIPIC susceptibility	origin of isolates		
		N	Ward N	Outpatients N
<i>Staphylococcus aureus</i>	susceptible	61	27	34
	resistant	21	5	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	susceptible	4	2	2
	resistant	44	4	40
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	susceptible	0	0	0
	resistant	5	0	5
<i>Staphylococcus capitis</i>	susceptible	2	0	2
	resistant	0	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	susceptible	1	0	1
	resistant	1	0	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	susceptible	2	0	2
	resistant	0	0	0
Sub-total		60	6	53
Total		141	38	103

CNS: coagulase-negative staphylococci

が2通りあり1つ目は、*erm* 遺伝子のメチラーゼ産生による活性化誘導の MLS_B 誘導型である。2つ目は、*msrA* 遺伝子による薬剤排出機構 (efflux pump) に関与するマクロライド耐性である。EM 耐性で CLDM 感性の場合にはこれらを区別する必要がある⁸⁾。MLS_B 耐性因子誘導型の場合は薬剤感受性試験の結果を CLDM 耐性と報告をする。従って、市中感染型 *Staphylococcus* 属菌が MLS_B 耐性因子誘導型かどうかの識別が治療薬の選択上重要となる。EM 耐性で CLDM 感性の時 MLS_B 耐性因子誘導型の有無を確認する検査法として、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) では M100-S14 よりディスク拡散法による D ゾーンテストを行い *erm* 遺伝子による誘導耐性検出の検査を実施することが推奨された⁹⁾。さらに CLSI M100-S18 からは、微量液体希釈法による *Staphylococcus* 属菌の CLDM 誘導耐性検査が併記された。この方法では、EM 4 µg/mL と CLDM 0.5 µg/mL の両薬剤を含むウェルの発育から CLDM 誘導耐性の有無を判定することになっている¹⁰⁾。本研究では、国内臨床分離 *Staphylococcus* 属菌を対象とし、D ゾーンテストとの比較検討、MLS_B 耐性関連遺伝子 (*msrA*, *ermA*, *ermC*,) を調査し、EM と CLDM が共存固相された薬剤感受性プレートをを用いて至適濃度の検討を行い、微量液体希釈法による MLS_B 誘導型 CLDM 耐性検出能の有用性を評価したので報告する。

材料と方法

1. 臨床分離株

2009年1月から12月の間に当院で臨床分離された *Staphylococcus* 属菌のうち、微量液体希釈法 (CLSI: M100-S18¹⁰⁾ 準拠) で EM 耐性 (R: ≥ 8 µg/mL) かつ CLDM 感性 (S: ≤ 0.5 µg/mL) の MSSA 61株 (外来27株, 入院34株), MRSA 21株 (外来5株, 入院16株), および CNS 59株 (外来6株, 入院57株), 合計141株を本検討の対象とした (Table 1)。また、同一患者からの分離株は1株とした。

2. D ゾーンテスト (D-zone test) の確認

ディスク拡散法 (CLSI: M100-S18¹⁰⁾ 準拠) は、EM の Kirby-Bauer (KB) ディスク (15 µg) と CLDM の KB ディスク (2 µg) を 15 mm 離して Mueller-Hinton 寒天培地上に静置して 35°C で 18 時間培養後、CLDM 誘導耐性株か否かを判定した。判定方法は CLDM 阻止円の EM 側が平坦 (つまり D 形状) になった場合を D ゾーンテスト陽性とし、平坦にならなかったものを D ゾーンテスト陰性とした (Fig. 1 A, Fig. 1B)。コントロールには陰性標準株 *S. aureus* ATCC BAA-976, 陽性標準株 *S. aureus* ATCC BAA-977 を用いた¹¹⁾。

3. 微量液体希釈法

各ウェルに 0.03125~16 µg/mL の CLDM および 0.25~16 µg/mL の EM が固相化された薬剤感受性試験研究用ドライプレートを使用した。本プレートを cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) で、

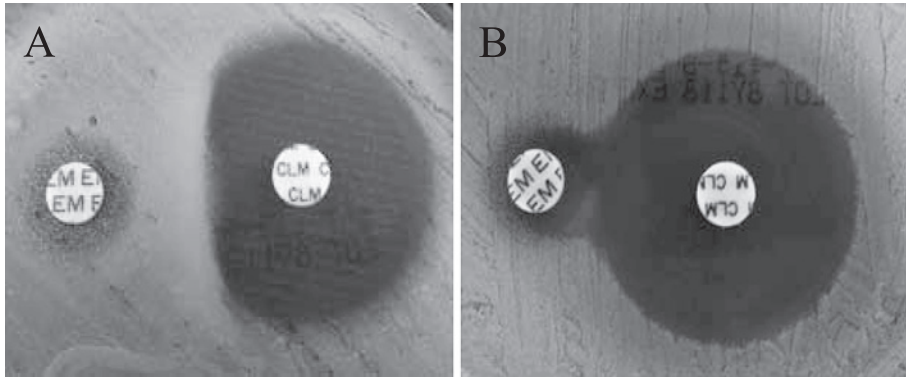


Fig. 1. The figures observed during clindamycin induction testing of *S.aureus* by disk diffusion. EM: erythromycin disk (15 µg) CLM: clindamycin disk (2 µg)
(A): D-Zone test: positive (B): D-Zone test: negative

全自動細菌検査装置ライサス「ニッスイ」(日本製薬東京)を用いて最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。本検討では、発育を示す吸光度が1 Abs.以上を示したものを発育、1 Abs.未満のものを非発育として自動判定した。コントロールには陰性標準株 *S. aureus* ATCC BAA-976、陽性標準株 *S. aureus* ATCC BAA-977を用いた¹¹⁾。

4. PCR法による誘導耐性関連遺伝子の検出

検討対象の141株についてKhanらの方法¹²⁾¹³⁾に従い、MLS_B耐性の関連遺伝子(*ermA*, *ermC*, *msrA*)の存在をPCRで同定した。PCRに使用したプライマー⁸⁾は、*ermA* (forward: 5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3', reverse: 5'-GGATCAGGAAAA GGACATTTTAC-3'), *ermC* (forward: 5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3', reverse: 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3'), *msrA* (forward: 5'-GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG-3', reverse: 5'-AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT-3')である。

PCRの陽性対照として、*ermA*は *S. aureus* ATCC BAA-977、*ermC*は *S. aureus* ATCC BAA-1556、*msrA*は *S. aureus* ATCC BAA-976を用いた。

5. 感度、特異度、正確度

感度についてはDゾーンテスト陽性の111株を陽性対照とし、EMとCLDMの両薬剤の入ったコンビネーションウェルで「発育した」と判定された株数をDゾーン陽性株数111で割った数値とした。特異度については、Dゾーンテスト陰性の30株を陰性対照として、各コンビネーションウェルで「非発育」と判定された株数をDゾーンテスト陰性株数30で割った数

値とした。正確度についてはEM耐性 ($R: \geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$)かつCLDM感性 ($S: \leq 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)の全菌株141株を対象とし、感度を求めた時にコンビネーションウェルで発育したと判定された株数と特異度を求めた時で非発育と判定した株数の和を全菌株数141で割った数値とした。

結 果

1. Dゾーンテスト法と微量液体希釈法の相関

M100-S18に準拠した2種類のCLDM誘導耐性株検出法(Dゾーンテスト法と微量液体希釈法)の相関について国内分離株を対象として検討した結果をTable 2に示す。*S. aureus* 82株のうちDゾーンテスト、微量液体希釈法ともに陽性であったものが80株、ともに陰性であったものが2株であり、両者の一致率は100%であった。CNS 59株の結果も同様で、共に陽性が31株、共に陰性が28株であり一致率は100%と相関は良好であった。

2. 薬剤耐性遺伝子の検出

検討対象の141株の内、Dゾーンテスト陰性の30株全てにおいて*ermA*、*ermC*遺伝子は検出されず、*msrA*遺伝子のみを保有することが確認された。一方、Dゾーンテスト陽性の111株の内訳はMSSAでは*ermA*遺伝子のみ保有が48株、*ermC*遺伝子のみ保有が11株、*ermA*+*ermC*遺伝子を保有が1株であった。MRSAは*ermA*遺伝子のみ保有が18株、*ermC*遺伝子のみ保有が2株であった。CNSは*ermA*遺伝子のみ保有が3株、*ermC*遺伝子のみ保有が24株、*ermC*+*msrA*遺伝子を保有が1株であった(Table 3)。

Table 2. Correlation between D-Zone test and microdilution method
S. aureus (n = 82)

		D-Zone test		
		positive	negative	total
microdilution method	positive	80	0	80
	negative	0	2	2
	total	80	2	82
sensitivity		100% (80/80)		
specificity		100% (2/2)		
accuracy		100% (82/82)		

		D-Zone test		
		positive	negative	total
microdilution method	positive	31	0	31
	negative	0	28	28
	total	31	28	59
sensitivity		100% (31/31)		
specificity		100% (28/28)		
accuracy		100% (59/59)		

CNS: coagulase-negative staphylococci

Table 3. Distribution of *erm*, *msrA* genes among *staphylococcus* spp. isolates

Species ^a (no.of isolates)	Ward or Outpatients (no.of isolates)	No. (%) of strain with genotype:						
		<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA</i> <i>ermC</i>	<i>ermA</i> <i>msrA</i>	<i>ermC</i> <i>msrA</i>	<i>msrA</i>	No gene
D-zone positive								
MSSA (55)	Ward (34)	29 (85)	4 (12)	1 (3)	0	0	0	0
	Outpatients (26)	19 (73)	7 (27)	0	0	0	0	0
MRSA (20)	Ward (15)	15 (100)	0	0	0	0	0	0
	Outpatients (5)	3 (60)	2 (40)	0	0	0	0	0
CNS ^b (31)	Ward (28)	3 (11)	21 (75)	0	0	3 (11)	0	1 (3)
	Outpatients (3)	0	3 (100)	0	0	0	0	0
D-zone negative								
MSSA (1)	Outpatients (1)	0	0	0	0	0	1 (100)	0
MRSA (3)	Ward (1)	0	0	0	0	0	1 (100)	0
CNS (28)	Ward (25)	0	0	0	0	0	25 ^c (100)	0
	Outpatients (3)	0	0	0	0	0	3 (100)	0

^aMSSA, methicillin-susceptible *staphylococcus aureus*; MRSA, methicillin-resistant *staphylococcus aureus*; CNS, coagulase-negative staphylococci.^b31 isolates of methicillin-resistant *staphylococcus epidermidis*^cOne methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolate, two *Staphylococcus capitis* isolates, four *Staphylococcus epidermidis* isolates, 13 isolates of methicillin-resistant *staphylococcus epidermidis*, five methicillin-resistant *staphylococcus haemolyticus* isolates, one *staphylococcus hominis* isolate, one methicillin-resistant *staphylococcus hominis* isolate, two *staphylococcus warneri* isolates

Table 4. Comparison of sensitivity for inducible clindamycin resistance by broth microdilution using a single well containing a combination of erythromycin and clindamycin for D-zone test positive isolates

		CLDM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									
		16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
EM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	16	57%	80%	88%	96%	99%	100%	100%	100%	99%	100%
	8	52%	70%	86%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	44%	53%	77%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	41%	44%	50%	81%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	1	41%	41%	44%	50%	82%	100%	100%	100%	100%	100%
	0.5	41%	41%	41%	44%	53%	97%	100%	100%	100%	100%
	0.25	40%	41%	41%	41%	44%	76%	100%	100%	100%	100%

(n = 111)

Table 5. Comparison of specificity for inducible clindamycin resistance by broth microdilution using a single well containing a combination of erythromycin and clindamycin for D-zone test negative isolates

		CLDM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									
		16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
EM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	16	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	57%
	8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	30%
	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	90%	20%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87%	3%
	1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	87%	3%
	0.5	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	87%	3%
	0.25	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	83%	3%

(n = 30)

3. 抗菌薬各濃度の組み合わせでの感度、特異度、正確性の検討

Dゾーンテストの結果を対照としてCLDMとEMの両薬剤について、各コンビネーション濃度におけるCLDM誘導耐性株の検出感度をTable 4に示す。CLDM濃度が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の場合ではDゾーンテスト陽性の株でも菌の発育が抑制され、誘導耐性株の検出感度が低下した。さらにCLDM濃度 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下でEM濃度が低くても検出感度が低下傾向であった。従って、良好な誘導耐性株の検出感度を示すCLDM濃度は、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることが分かった。各抗菌薬のコンビネーション濃度におけるDゾーンテストを対照とした、誘導耐性株検出における特異度をTable 5に示す。CLDM濃度が $0.0625 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の場合にはDゾーンテスト陰性の株でも発育し特異度が低下した。また、CLDM濃度が $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の範囲で良好な特異度を示した。最終的にCLDMの濃度が $0.25 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、かつEMの濃度が $2 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の組み合わせの時に、最も適切に誘導耐性が判定可能であることが判明した (Table 6)。

考 察

今回我々は上記2薬剤が共存固相された薬剤感受性プレートを用い、CLDM誘導耐性検出における上記2薬剤の濃度での組み合わせの有効性について国内の臨床分離株を用いて検証をした。比較対象としたDゾーンテストと微量液体希釈法は感度・特異度ともに良好の成績を修めた。Steward¹⁴⁾らの研究では、ディスク拡散法の方が優れていたと評価している。我々の検討ではディスク拡散法と微量液体希釈法に有意差を認めなかった。CLSIの微量液体希釈法の基準ではEM $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ とCLDM $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の組み合わせとなっているが、Stewardらの研究ではCLSIによる微量液体希釈法の基準の濃度で検討を行っておらず至適濃度ではなかったためディスク拡散法の方が優位であったと考えられる。Dゾーン陽性株におけるCLDM濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下でEM濃度 $0.25 \sim 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ の感度をみると $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ は76%、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ は97%、 $1 \sim 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ は100%であった。これによりCLDM誘導耐性にEM低濃度で誘導がかかる株とEM濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上必要な株があることが分かった。CLDM至適

Table 6. Comparison of Accuracy for inducible clindamycin resistance by broth microdilution using a single well containing a combination of erythromycin and clindamycin for all isolates tested

	CLDM ($\mu\text{g/mL}$)										
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	
EM ($\mu\text{g/mL}$)	16	66%	84%	91%	97%	99%	100%	100%	100%	99%	91%
	8	62%	77%	89%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	85%
	4	56%	63%	82%	99%	100%	100%	100%	99%	98%	83%
	2	54%	56%	60%	85%	100%	100%	100%	100%	97%	79%
	1	54%	54%	56%	61%	86%	100%	100%	99%	97%	79%
	0.5	53%	54%	54%	56%	63%	98%	100%	99%	97%	79%
	0.25	52%	53%	54%	54%	56%	81%	100%	99%	96%	79%

(n = 141)

濃度についても検証を行った結果、EM 濃度 $4 \mu\text{g/mL}$ 存在下で CLDM 濃度 $0\sim 16 \mu\text{g/mL}$ の幅で添加したウェルを用いてインキュベーション後の吸光度を測定したところ、CLDM 濃度 $0.125 \mu\text{g/mL}$ で D ゾーン陰性株が発育をし、偽陽性となった株があった。さらに、CLDM 濃度 $2 \mu\text{g/mL}$ で D ゾーン陽性株の発育が抑制され、偽陰性を示した株があった。これにより CLDM 至適濃度は、 $0.25\sim 1 \mu\text{g/mL}$ であることが分かった。以上により CLDM 誘導耐性検出における上記 2 薬剤の濃度の組み合わせによる有効性については、CLDM 濃度が $0.25\sim 1 \mu\text{g/mL}$ 、かつ EM 濃度が $2\sim 8 \mu\text{g/mL}$ の範囲の時に正確度が 100% となり、この範囲での両薬剤の濃度の組み合わせが誘導耐性の検出に適することが確認された。CLSI 準拠の EM $4 \mu\text{g/mL}$ と CLDM $0.5 \mu\text{g/mL}$ はこの範囲のちょうど中央値に位置しており CLSI に準拠した検査法の妥当性が確認された。また、Swenson¹⁵⁾らの研究では、CLDM/EM コンビネーション希釈濃度段階の検討は 4 濃度のみである。この 4 つを比較して CLDM $0.5 \mu\text{g/mL}$ と EM $4 \mu\text{g/mL}$ が良好とされている。本検討ではさらに広い薬剤濃度による比較解析結果が得られており、Swenson らの導き出した CLDM $0.5 \mu\text{g/mL}$ と EM $4 \mu\text{g/mL}$ の組み合わせが至適濃度の組み合わせであったと証明できたと考える。

Roland⁷⁾らによると *Staphylococcus* 属菌に関与する *ermA* 遺伝子は主にメチシリン耐性株に伝播され *Tn554* に関与するトランスポゾンによって由来する。一方、*ermC* 遺伝子は主にメチシリン感受性株に伝播しプラスミドによって由来すると報告されている。Gerard⁸⁾の報告でも同様の結果であった。しかし、今回我々が行った結果では MSSA は *ermA* 遺伝子のみ保持しているものが 48 株、*ermC* 遺伝子を持つものが 11 株であった。入院と外来を比較しても、*ermA*

遺伝子が優位であった。これは彼らの結果とは異なった。日本においてはプラスミド由来の *ermC* 遺伝子による感染が欧米よりも少ないことが考えられる。また、*ermA* 遺伝子と *ermC* 遺伝子の両方を持つものが 1 株あった。これは天疱瘡が重症化し入院中に血液培養から検出された株であった。*ermA* 遺伝子と *ermC* 遺伝子を持つ耐性機構については不明である。この耐性機構についてはさらに詳しく調査する必要がある。MRSA では病棟から検出された 15 株全て *ermA* 遺伝子のみを保持していた。外来から検出された 5 株からは *ermA* 遺伝子を持つものが 3 株、*ermC* 遺伝子を持つものが 2 株だった。*ermC* 遺伝子が検出された検体はいずれも皮膚科から提出されており、治療においても悪化と改善を繰り返す難治性軟部組織感染症の症例であった。CNS では D ゾーン陽性 31 株全て MRSE であった。病棟で検出された 28 株のうち *ermA* 遺伝子のみを持つものが 3 株、*ermC* 遺伝子のみを持つものが 21 株となった。CNS については *ermC* 遺伝子が優位であり、Fiebelkorn¹³⁾の報告と同様であった。さらに、*ermC* 遺伝子と *msrA* 遺伝子を持つ株が 3 株あった。また、D ゾーン誘導耐性を示すのにも関わらず耐性遺伝子を持たないものが 1 株あった。これは *Staphylococcus* 属菌に関与する遺伝子は主に *ermA* 遺伝子と *ermC* 遺伝子となっている⁷⁾が *ermA* 遺伝子と *ermC* 遺伝子以外の耐性機構の関与が考えられる。Gerard⁸⁾の報告では *ermB* 遺伝子を保有する株が確認されているが MLS_B 誘導型で *ermB* 遺伝子を保有する株は検出されていない。外来については 3 株全てが *ermC* 遺伝子のみを持っていた。以上より本検討では国内臨床分離株において表現型と遺伝子型の試験で誘導耐性検出能が実証されたと考える。

米国において D ゾーンと微量液体希釈法ともに多

くの研究が報告されている^{13)~15)}。しかし本邦での CLDM 誘導耐性分離株に関する研究はほとんど行われていない。今後、本邦における CLDM 誘導耐性株の動向調査が重要であると考えられる。皮膚軟部組織感染症は市中感染症の1つである。特に MRSA による皮膚軟部組織感染症は時に重篤化するため、米国感染症学会が2010年に公開した皮膚軟部組織感染症診断と治療のためのガイドライン³⁾では Vancomycin, Linezolid に続き CLDM による治療法が推奨されている。CLDM の投与を考慮する場合には CLDM 誘導耐性の有無を検査学的に知ることにより妥当な治療薬の選択が可能となる。微量液体希釈法のプレートに EM 単剤, CLDM 単剤, EM と CLDM の両薬剤共存固相化ウェルを配置しておくことで、改めて D ゾーンテストを実施するより迅速に CLDM 誘導耐性の有無を評価することができる。従って特に皮膚軟部組織感染症が疑われる症例から分離した *Staphylococcus* 属菌の薬剤感受性試験を行う際には CLDM 誘導耐性検出検査を日常検査に取り入れて行くことが有用と考えられ、全自動細菌検査装置においても、その役割を十分果たすことが可能であると考えられる。

なお、本論文の要旨は第57回日本化学療法学会(2010年, 東京)において発表した。

利益相反: 公立大学法人横浜市立大学における研究費の取り扱いに関する規程に基づき、日水製薬株式会社からの奨学寄付金(プロジェクト番号: 0970300059)による助成を受けた。

文 献

- 渡辺晋一. 2011. 8. 皮膚・軟部組織感染症の治療. 特集1 各種感染症への抗菌薬選択と使用の今日的留意点. 化学療法の領域 27: 83-90.
- Karamatsu, ML, AW Thorp, L Brown. 2012. Changes in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections Presenting to the Pediatric Emergency Department: Comparing 2003 to 2008. *Pediatric emergency care* 28: 131-135.
- Odell, CA. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) skin infections. *Current opinion in pediatrics* 22: 273-277.
- Stevens, DL, AL Bisno, HF Chambers, et al. 2005. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clinical infectious diseases* 41: 1373-1406.
- David, MZ, RS Daum. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews* 23: 616-687.
- Liu, C, A Bayer, SE Cosgrove, et al. 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clinical infectious diseases* 52: 285-292.
- Leclercq, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin infect Dis* 34: 482-492.
- Lina, G, A Quaglia, ME Reverdy, et al. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1062-1066.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement, M100-S14, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement, M100-S18, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Zelazny, AM, MJ Ferraro, A Glennen, et al. 2005. Selection of strain for quality assessment of disk induction method for detection of inducible clindamycin resistant in *Staphylococci*: a CLSI collaborative study. *J Clin Microbiol* 43: 2613-2615.
- Khan, SA, MS Nawaz, AA Khan, et al. 1999. Simultaneous detection of erythromycin-resistant methylase genes *ermA* and *ermC* from *Staphylococcus* spp. by multiplex-PCR. *Molecular and cellular probes* 13: 381-387.
- Fiebelkorn, KR, SA Crawford, ML McElmeel, et al. 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of clinical microbiology* 41: 4740-4744.
- Steward, CD, PM Raney, AK Morrell, et al. 2005. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 1716-1721.
- Swenson, JM, WB Brasso, et al. 2007. Detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci by

broth microdilution using erythromycin-clindamycin

combination wells. J Clin Microbiol 45: 3954-3957.

Analysis of *Staphylococcus* spp. inducible clindamycin resistance by microdilution method

Kayoko Sano¹⁾, Kasumi Takizawa¹⁾, Takayuki Kurosawa¹⁾, Tomo Hirano¹⁾, Yasuyuki Sato¹⁾,
Yoshimi Sato¹⁾, Midori Sumitomo¹⁾, Sigeru Ehara¹⁾, Shinitirou Watanabe¹⁾, Toshihiro Mituda²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Yokohama University Hospital

²⁾Department of Infectious Diseases, Yokohama University Hospital

Since Clinical Laboratory Institute (CLSI) released M100-S18 in 2008, *Staphylococcus* spp. strains are recommended to be tested for inducible clindamycin resistance by D-zone test using Kirby-Bauer disks or microdilution method. For microdilution method to test inducible clindamycin-resistance, CLSI recommends the combination of erythromycin (EM): 4 µg/mL plus clindamycin (CLDM): 0.5 µg/mL in a well. We evaluated microdilution method for testing inducible clindamycin-resistance with domestic *Staphylococcus* spp. strains across a wide variety of concentration combinations. As a result, drug concentrations ranging between EM: 2-8 µg/mL with combinations of CLDM: 0.25-1 µg/mL were identified as optimal concentrations to detect inducible clindamycin-resistant strains (i.e., CLSI optimal concentration exist in the middle of each concentration range).