

[原 著]

抗菌薬治療経過中に遊離型コアグララーゼの産生能が低下した MRSA の解析

古垣内美智子¹⁾・三澤慶樹³⁾・吉田 敦⁴⁾⁵⁾・奥住捷子⁴⁾・田原由子¹⁾

戸田宏文¹⁾・宇都宮孝治¹⁾・松浦宏美¹⁾・上裕俊法²⁾

¹⁾ 近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部

²⁾ 近畿大学医学部附属病院臨床検査医学

³⁾ 東京大学医学部附属病院感染制御部

⁴⁾ 獨協医科大学病院感染制御センター

⁵⁾ 獨協医科大学感染制御・臨床検査医学講座

(平成 26 年 10 月 2 日受付, 平成 27 年 2 月 10 日受理)

敗血症を起こした 66 歳男性の血液培養から抗菌薬治療前と治療経過中に methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を分離した。

分離した MRSA は, ウサギプラズマ '栄研' (栄研化学) による結合型コアグララーゼはともに陰性, 遊離型コアグララーゼは治療前の MRSA では陽性であったが, 治療経過中の MRSA では陰性となった。しかし, 治療経過中の MRSA はパールコアトリプトソイブイオン '栄研' などで溶解したウサギプラズマ '栄研' の遊離型コアグララーゼは 24 時間で陽性を示した。コアグララーゼ力価は治療前の MRSA では 2 MCD/hr, 一方治療経過中の MRSA では <1 MCD/hr と低下していた。ラテックス凝集試薬では分離した MRSA 2 株はともに, PS ラテックス '栄研' (栄研化学) とスタフィロ LA「生研」(デンカ生研) は陰性, Pastorex スタッフプラス (BIO-RAD) とドライスポットスタフィテクトプラス (関東化学) は陽性であった。また, MRSA 2 株は POT 型 93-217-107, SCCmec type IIa と一致した遺伝子型を示し, コアグララーゼを除いて, コロニー性状, マンニト分解, DNase 産生, 同定検査 (VITEK2, MALDI Biotyper (BRUKER), Multiplex PCR) は *S. aureus* と一致した。

抗菌薬治療経過中に遊離型コアグララーゼの産生能が低下した MRSA は初報告である。遊離型コアグララーゼの産生能が低下した MRSA の同定は, coagulase-negative staphylococci と誤同定しないために注意が必要である。

Key words: コアグララーゼ産生低下 MRSA, コアグララーゼ試験, MRSA 敗血症, ウサギプラズマ, 遊離型コアグララーゼ

序 文

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) は院内で分離される耐性菌として最も分離頻度が高

く, 病院感染の起炎菌として重要である¹⁾。

S. aureus の同定は, 多くの検査室では自動分析機での同定ではなく, コロニーの性状や, カタラーゼ試験, マンニト分解, コアグララーゼ試験などの生化学性状を併せて簡易同定していることが多い。特にコアグララーゼ試験は, *S. aureus* と coagulase-negative staphylococci (以下 CNS) との鑑別に重要である。

現在, コアグララーゼ試験の標準法はウサギプラズマを用いた結合型コアグララーゼ (スライド法) と遊離型コアグララーゼ (試験管法) の確認である。市販されているコアグララーゼ試験には, ウサギプラズマ '栄研'

著者連絡先: (〒589-8511) 大阪府大阪狭山市大野東 377-2
近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部細菌検査室
古垣内美智子
TEL: 072-366-0221 (内線 2193)
FAX: 072-366-0206
E-mail: michiko.furugaito@sayama.med.kindai.ac.jp

(栄研化学)(以下ウサギプラズマ)がある。しかし、ウサギプラズマでの遊離型コアグララーゼ試験は判定に3時間以上要する。一方、*S. aureus*の迅速同定法には結合型コアグララーゼとプロテインAを検出するラテックス凝集試薬としてPSラテックス‘栄研’(栄研化学)(以下PSラテックス)や、スタフィロLA「生研」(デンカ生研)(以下スタフィロLA)などがある。しかし、MRSAはmethicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)と比較してラテックス凝集試薬に偽陰性を示すことが報告されている^{2)~5)}。その理由として、細胞壁上の莢膜多糖体が細胞壁に存在する結合型コアグララーゼやプロテインAを覆い隠して試薬と反応できなくなるためと考えられている。そのため、Pastorex スタッフプラス (BIO-RAD) やドライスポットスタフィテクトプラス (関東化学)(以下ドライスポット)では、結合型コアグララーゼ、プロテインAに加えて莢膜多糖体やポリサッカライドを標的とすることでこの問題点を補っている。

今回われわれは、敗血症の抗菌薬治療前に結合型コアグララーゼ陰性のMRSAを分離し、抗菌薬治療経過中に結合型コアグララーゼ陰性かつ遊離型コアグララーゼの産生低下を示したMRSAを分離した。このMRSA 2株について解析を行ったので報告する。

症 例

患者：66歳，男性。

既往歴：平成14年 高血圧性心疾患，平成16年 狭心症，逆流性食道炎，平成21年 憩室炎，平成23年 発作性上室頻拍

現病歴：他院で糖尿病，慢性腎不全のため10年前より維持透析を受けていた。20XX年4月19日に白内障の手術目的で当院眼科に入院された。入院前より右下肢の閉塞性動脈硬化症(ASO)による皮膚潰瘍と右下肢痛を訴えていた。

臨床経過 (Fig.1)：入院初日(第1病日)に39℃の発熱を認め、非ステロイド性抗炎症薬で経過観察された。翌日、血液培養が2セット提出されたが陰性であった。第3病日には白内障の手術が行われた。第4病日の夜間より意味不明な言動があり、第5病日には38.6℃の発熱と幻覚症状も出現した。第6病日には脳炎を疑って神経内科が、閉塞性動脈硬化症については循環器内科が併診となり、血液培養2セットと髄液検査が施行された後、meropenem (MEPM)の投与が開始された(0.5 g/day)。ただし髄液所見には異常を認めず、細菌培養も陰性であった。第7病日に中央臨床検査部から血液培養2セットすべてで *Staphylococ-*

cus 属を疑うグラム陽性球菌(以下GPC)が検出された報告を受け、linezolid (LZD) 1200 mg/dayが追加され、DICに対する治療も開始された。なお、このGPCは結合型コアグララーゼが陰性であったため、他の生化学性状を待つこととなり、通常より1日遅れの第10病日にMRSAとの最終結果を得た。

その後、第12病日までの経過でLZDの効果が乏しいと判断されたため、同日からvancomycin (VCM)へ変更となった。この時点で経胸壁心臓超音波検査では疣贅は認められなかったものの、大量の下血を認めるなど全身状態は不良であり、第13病日に採取した血液培養2セットからも *Staphylococcus* 属を疑うGPCが検出され、MRSAが疑われた。一方、MRSAの感染巣と考えられた右下肢の壊死部については、デブリードメントや切断が検討されたが状態が悪いため見送られた。壊死部の培養検体は第14病日に初めて提出されたが、抗菌薬投与中であったこともあり菌は検出されなかった。第14病日からはdaptomycin (DAP)の投与を行った。

第13病日の血液培養から検出されたGPCは、結合型コアグララーゼだけでなく遊離型コアグララーゼも陰性であり、第6病日よりも非典型的な性状を示した。しかし他の性状を踏まえ、総合して前回検出したMRSAと同一菌と考え、第17病日にMRSAと結論した。患者は、第19病日に血圧の低下と心室細動を起こし永眠された。

細菌学的検査

1. 方法

1) 塗抹検査

陽性となった第6、13病日に採取した血液培養ボトル(シスメックス・ビオメリュー)(各2セット採取)はすべてBacT/ALERT 3D(シスメックス・ビオメリュー)において12~24時間の培養後、陽性反応が認められた。ボトル内容液の塗抹検査には、バーミー法(武藤化学)によるグラム染色を用いた。

2) 分離培養

好気ボトルからのサブカルチャーは、羊血液寒天培地(日水製薬)、チョコレート寒天培地EXII(日水製薬)にて炭酸ガス培養と、BTB寒天培地(コージンバイオ)にて好気培養を行った。嫌気ボトルからのサブカルチャーは、さらにウサギ血液加ブルセラHK寒天培地(極東製薬工業)を追加し嫌気培養した。また、methicillin耐性の推定のために血液寒天培地上にceftizoxime (CZX)(KBディスク‘栄研’)を置いた。

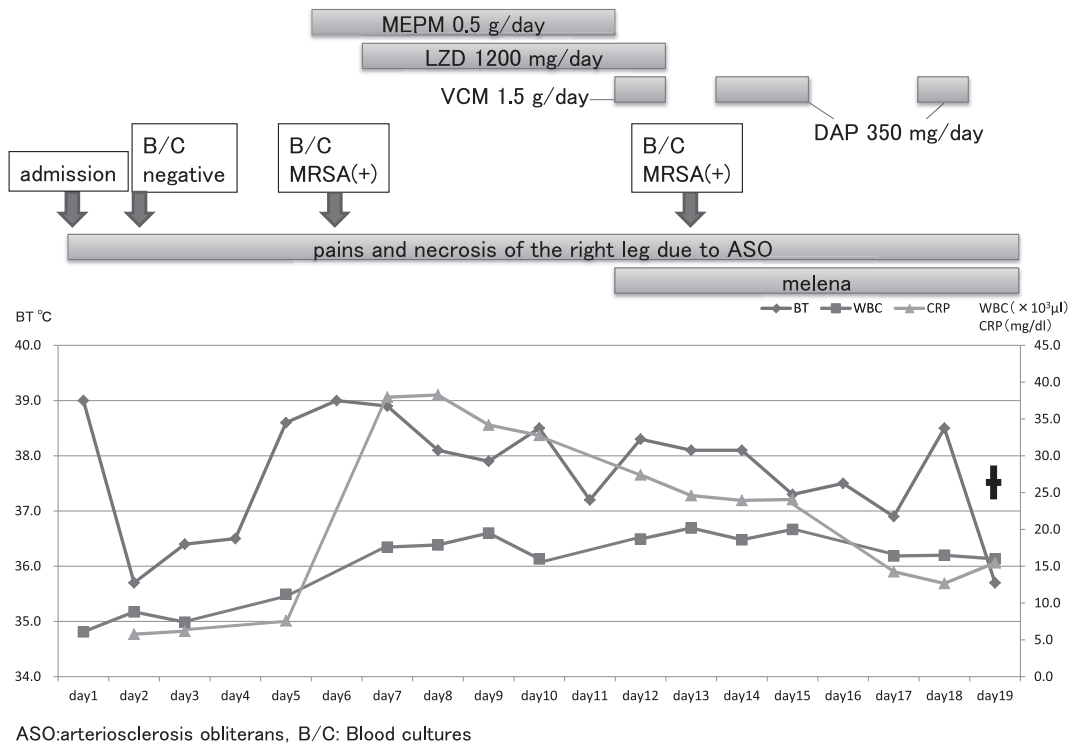


Fig. 1. Clinical course

3) 同定検査

(1) 生化学性状およびコアグラエゼ試験

生化学性状の確認は、カタラーゼ試験の実施と、パールコアマンニット食塩培地「栄研」（栄研化学）（以下マンニット食塩培地）、MRSA スクリーニング培地の CHROMagar MRSA 培地（関東化学）、DNase の確認のために DNA 培地「栄研」（栄研化学）への接種で行った。

コアグラエゼ試験は、ウサギプラズマでは結合型コアグラエゼ（スライド法）、遊離型コアグラエゼ試験（試験管法）を実施した。遊離型コアグラエゼ試験の判定は3時間で行い、陰性の場合には24時間まで観察した。判定方法は臨床微生物検査ハンドブック<第4版>⁶⁾を参考にし、-, 1+, 2+, 3+で表した。

コアグラエゼ試験の他法での評価としては、*S. aureus* の迅速同定法のラテックス凝集試薬である PS ラテックス、スタフィロ LA、Pastorex スタッフプラスおよびドライスポットを用いて行った。

また、ウサギプラズマを添付書に記載されている滅菌生理食塩水7mlの代わりに、パールコアトリプトソイブイオン「栄研」（栄研化学）（以下 TSB）および

ブレインハートインヒュージョンブイオン「ニッスイ」（日水製薬）（以下 BHI）、ハートインヒュージョンブイオン「ニッスイ」（日水製薬）（以下 HIB）をそれぞれ7mlで溶解してコアグラエゼ試験を行った。陽性対照としては、ウサギプラズマでのコアグラエゼ試験、および各迅速同定法は *S. aureus* ATCC29213 と既同定の臨床分離 MRSA 株を用いた。なお、ルーチン検査では上記生化学性状の確認、ウサギプラズマでの遊離型コアグラエゼ試験および PS ラテックスを実施した。PS ラテックス以外の *S. aureus* の迅速同定法、TSB などのプロスで溶解した遊離型コアグラエゼ試験、以下のコアグラエゼ力価については後日追加検討した。

(2) コアグラエゼ力価の測定

コアグラエゼの力価の確認は、善養寺らの方法⁷⁾とデンカ生研のブドウ球菌コアグラエゼ型別用免疫血清「生研」の添付文書を参考にプロトコールを作成し測定した。まず、BHI 5ml に1コロニーを接種し37°C 好気条件下で1晩静置培養した。次にこの培養液を3000 rpm 30分遠心分離し、その上清をコアグラエゼ原液とした。このコアグラエゼ原液をブドウ球菌コア



Fig. 2. Colonies of MRSA on 5% sheep blood agar after overnight culture at 36°C under 5%CO₂

グララーゼ型別用試薬「生研」の希釈液（デンカ生研）（以下希釈液）で原液（1倍）から64倍まで試験管に2倍段階希釈系列を最終量100μlになるように作成した。希釈系列を作成時にはコアグララーゼ原液のキャリアオーバーを回避するために1管毎にチップを交換した。これに希釈液で20倍希釈したブドウ球菌コアグララーゼ型別用試薬「生研」の正常ウサギ血清（デンカ生研）を各200μl加え、ボルテックスで混和後、37°C 1時間フラン器で反応させた。続いて希釈液で5倍希釈したブドウ球菌コアグララーゼ型別用試薬「生研」のウサギ血漿（デンカ生研）を各200μl加えボルテックスで混和後、37°Cのフラン器で1時間、3時間、24時間反応させた後、試験管内の凝固を確認した。判定は遊離型コアグララーゼの試験管法と同様、-, 1+, 2+, 3+で表現し、2+以上の凝固を示した最高希釈倍数をコアグララーゼ力価とし、minimal clotting dose (MCD/hr) で表現した。参考として対照に *S. aureus* ATCC29213 と既同定の臨床分離 MRSA 株を使用した。

(3) 自動分析機による同定

ルーチン検査の自動分析機による同定は、VITEK2（シスメックス・ピオメリュール）の GP カードで行った。後日、質量分析法の MALDI Biotyper (BRUKER) で同定を行った。

(4) 遺伝子検査

S. aureus の同定として、コアグララーゼ陽性ブドウ球菌の *nuc* gene を標的とした Multiplex PCR⁸⁾ を行った。さらに、耐熱性 DNase をコードする *nuc* 遺伝子⁹⁾ および Pantone-Valentine ロイコシジン (PVL) をコードする PVL 遺伝子¹⁰⁾ を確認した。また、MRSA の判定として methicillin 耐性獲得に関与する PBP2² をコードする *mec A* 遺伝子¹¹⁾ を確認した。

菌株の遺伝的同一性の確認のために、シカジーニアス分子疫学解析 POT キット（黄色ブドウ球菌用）（関東化学）を用いてタイピングを行うとともに、SCC*mec*¹²⁾¹³⁾型を決定した。POT 法は、Multiplex PCR により増幅した遺伝子の増幅バンドの有無から POT 型を算出するが、POT1-POT2-POT3 の3つの数値が一致した場合、同一株の可能性が高いと判断した¹⁴⁾。なお、これらの遺伝子検査はルーチン検査では行っておらず、後日実施した。

4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は VITEK2 の AST-P596 カードを使用した。

2. 結果

1) 塗抹検査

陽性となった第6, 13病日に採取した血液培養ボトル内溶液のグラム染色所見は、クラスターを形成した GPC であり *Staphylococcus* 属を疑った。

2) 分離培養 (Fig. 2)

一晚培養した羊血液寒天培地上では、第6病日に採取した血液培養ボトルから分離された GPC（以下、第6病日 GPC）は β-溶血環のある *S. aureus* 様のコロニーを形成した。一方、第13病日に採取した血液培養ボトルから分離された GPC（以下、第13病日 GPC）は *S. aureus* 様のコロニーであったものの、β-溶血環は認めなかった。第6, 13病日 GPC は CZX の阻止円が形成されていなかったため、MRSA を疑った。

3) 同定検査

(1) 生化学性状およびコアグララーゼ試験

第6, 13病日 GPC はともに、カタラーゼ試験は陽性、マンニト食塩培地には発育かつマンニト分解能を示した。CHROMagar MRSA 培地には発育かつ

Table 1. Coagulase test results

Product name	Manufacturer	Target substance	Judgment time	Day6 MRSA	Day13 MRSA	<i>S. aureus</i> ATCC29213	Clinical isolate MRSA
RABBIT PLASMA 'Eiken' (dissolved with sterile physiological saline)	Eiken	bound coagulase		-	-	+	+
		free coagulase	3 hours	2+	-	3+	3+
		24 hours		-			
bound coagulase			-	-	+	+	
free coagulase		3 hours	3+	-	3+	3+	
		24 hours		1+			
bound coagulase			-	-	+	+	
free coagulase		3 hours	2+	-	3+	3+	
		24 hours		2+			
bound coagulase			-	-	+	+	
free coagulase	3 hours	3+	-	3+	3+		
	24 hours		2+				
PS LATEX 'Eiken'	Eiken	bound coagulase, proteinA		-	-	+	+
STAPHYLO LA "SEIKEN"	Denka Seiken	bound coagulase, proteinA		-	-	+	+
PASTOREX STAPH PLUS	Bio-Rad	bound coagulase, proteinA capsular antigens serotype 5,8		+	+	+	+
DRYSPOT STAPHYTECT PLUS	Kanto Kagaku	bound coagulase, proteinA polysaccharide		+	+	+	+

紫色のコロニーを示し、DNaseは陽性であった。

ウサギプラズマでのコアグラゼ試験は、第6病日GPCは結合型コアグラゼが陰性、遊離型コアグラゼは3時間で陽性(2+)であったが、第13病日GPCは結合型、遊離型コアグラゼがともに陰性(-)であった。

コアグラゼ試験の他法での評価として、第6、13病日GPCはともにPSラテックス、スタフィロLAは陰性、Pastorex スタッフプラスおよびドライスポットは陽性であった。

また、ウサギプラズマをTSB、BHI、およびHIBで溶解して遊離型コアグラゼ試験を行った結果、第6病日GPCでは3時間で陽性(2+~3+)であった。一方、第13病日GPCは3時間では陰性(-)であったが、24時間では陽性(1+~2+)を確認できた(Table 1)。

(2) コアグラゼ力価の測定

コアグラゼ力価は、第6病日GPCは2MCD/hrであったが、第13病日GPCは24時間で1+の凝固であったため、48時間まで延長したが2+以上の凝固は見られず<1MCD/hrであった。このため第13病日GPCの遊離型コアグラゼの産生量は明らかに低

下していた(Table 2)。

(3) 自動分析機による同定

自動分析機での同定は、第6、13病日GPCはともにVITEK2では同定確率98%、MALDI BiotyperではSCORE VALUE 2.461で*S. aureus*と同定された。ルーチン検査では、コロニー性状、コアグラゼ以外の生化学性状、VITEK2の同定結果から総合して*S. aureus*と同定した。

(4) 遺伝子検査

Multiplex PCRでは、第6、13病日GPCはともに*S. aureus*と同定された。また、*nuc* 遺伝子および*mecA* 遺伝子を保有していたが、*PVL* 遺伝子は保有していなかった。これらの結果は、ルーチン法で結論付けた*S. aureus*の同定結果と一致した。

POTキットおよびSCC*mec*でのタイピングでは、第6、13病日に採取した血液培養ボトルから分離されたMRSA(以下、第6病日MRSA、第13病日MRSA)はともにPOT型93-217-107、SCC*mec* type IIaであり同一株である可能性が示唆された。

4) 薬剤感受性試験 (Table 3)

第6、13病日MRSAの薬剤感受性試験は、cefoxitinスクリーニングが陽性かつoxacillinに耐性であっ

Table 2. Coagulase titers

Strain	Reaction time (hour)	Serial two-fold dilutions of culture supernate						
		1	2	4	8	16	32	64
Day6 MRSA	1	3+	3+ ^a	-	-	-	-	-
	3	3+	3+	3+	2+	-	-	-
	24	3+	3+	3+	3+	3+	-	-
Day13 MRSA ^b	1	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	24	1+	-	-	-	-	-	-
	48	1+	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC29213*	1	3+	3+ ^a	-	-	-	-	-
	3	3+	3+	2+	-	-	-	-
	24	3+	3+	3+	3+	2+	-	-
MRSA Clinical isolate*	1	3+	3+ ^a	-	-	-	-	-
	3	3+	3+	3+	2+	-	-	-
	24	3+	3+	3+	3+	3+	-	-

^a, 2 MCD/hr ^b, <1 MCD/hr

*, positive control

Table 3. Antimicrobial susceptibilities of MRSA

Antimicrobial agents	MIC (µg/ml)		Antimicrobial agents	MIC (µg/ml)	
	Day6	Day13		Day6	Day13
Cefoxitin screening	+	+	Levofloxacin	≥8 R	≥8 R
PenicillinG	≥0.5 R	≥0.5 R	Erythromycin	≥8 R	≥8 R
Oxacillin	≥4 R	≥4 R	Clindamycin	≥8 R	≥8 R
Cefazolin	≥64 R	≥64 R	Linezolid	1 S	1 S
Cefmetazole	≥64 R	≥64 R	Teicoplanin	≤0.5 S	≤0.5 S
Imipenem	≥16 R	≥16 R	Vancomycin	≤0.5 S	1 S
Amikacin	≤2 S	4 S	Minocycline	≥16 R	≥16 R
Gentamicin	≥16 R	≥16 R	Fosfomycin	32	64
Arbekacin	≤1	≤1	Sulfamethoxazole-trimethoprim	≤0.5/9.5 S	≤0.5/9.5 S

S: susceptible, R: resistant

た。また, erythromycin, clindamycin, levofloxacin, minocycline に耐性を示した。第6, 13 病日 MRSA の薬剤感受性はほぼ同様の結果であった。

考 察

MRSA は肺炎や菌血症, 皮膚・軟部組織などの感染症を起こし¹⁾, MRSA 敗血症の死亡率は30% と言われている¹⁵⁾。そのため血液培養から *Staphylococcus* 属を疑う GPC が検出された場合 *S. aureus* であるか, 特に MRSA か CNS であるかは, 主治医にとって起炎菌の判定や今後の治療方針決定のために非常に重要である。当院では, 血液培養ボトルからサブカル

チャーの際に CZX のディスクを用い methicillin 耐性を鑑別している。さらに一晩培養後のコロニーからウサギプラズマでの結合コアグララーゼもしくは PS ラテックスを実施し, 推定菌名として MRSA と報告している。しかしながら第6, 第13 病日の GPC はウサギプラズマによる結合型コアグララーゼ, PS ラテックスともに陰性で, 通常 *S. aureus* の同定には使用しない VITEK2 での同定結果を得てからの報告となり, 通常より MRSA との報告が1日遅れた。

ヒト由来の *S. aureus* の約97% が結合型と遊離型コアグララーゼの両方を, また約95% がプロテイン A を有していると言われている¹⁶⁾。結合型コアグララーゼ

とプロテイン A は *S. aureus* の細胞壁に存在し、遊離型コアグララーゼは菌体内で産生され、増殖する過程で菌体外に分泌される物質である。結合型コアグララーゼはフィブリノーゲンや血小板と結合することで、血栓や傷害を受けた内皮細胞上への *S. aureus* の付着を促進する⁴⁾。また、プロテイン A は免疫グロブリン G の Fc 部分に結合することで¹⁶⁾、莢膜多糖体は白血球からの貪食を妨げることで¹⁷⁾宿主免疫に抵抗すると考えられている。

今回、*S. aureus* 迅速同定法のラテックス凝集試薬では、第 6, 13 病日 MRSA はともに、結合型コアグララーゼとプロテイン A を標的とした PS ラテックスとスタフィロ LA で陰性を示した。一方、結合型コアグララーゼ、プロテイン A に加えて莢膜多糖体やポリサッカライドを標的とした Pastorex スタッフプラスとドライスポットでは陽性を示した。この結果の乖離は、これまでの報告⁴⁾¹⁸⁾に基づく、MRSA の菌体周囲に高度に莢膜多糖体が形成され、細胞壁に存在する結合型コアグララーゼとプロテイン A が覆い隠されることで、抗原抗体反応が阻害され偽陰性を示したものと考えられた。また、*S. aureus* の莢膜保有株は非保有株に比べ遊離型コアグララーゼの産生能が低下し、陰性を示すこともあるとの報告¹⁸⁾や、VCM の存在下により莢膜産生に関与する遺伝子の発現量が亢進した報告もある¹⁹⁾。そのため、第 13 病日 MRSA の遊離型コアグララーゼ産生量が低下した理由は、第 6, 13 病日 MRSA は同一株と推測されることから、敗血症の治療に用いた VCM の投与が莢膜の産生を促進したためではないかと考える¹⁹⁾。抗菌薬治療中に遊離型コアグララーゼ産生量が低下した MRSA は本症例が初報告である。このような性状を示す MRSA は CNS との誤同定に繋がるのみならず、莢膜の産生亢進が白血球などの貪食作用や抗菌薬耐性¹⁹⁾²⁰⁾に関与する可能性もあるため、重要な報告であると考えられる。

過去の遊離型コアグララーゼ陰性 *S. aureus* 報告例^{21)~23)}では、 α -hemolysin が陰性²¹⁾や、非溶血性のコロニーを形成する²³⁾ことを除き、結合型コアグララーゼ、プロテイン A、DNase 産生などは *S. aureus* に典型的な性状を示していた。本症例では結合型・遊離型コアグララーゼが陰性であることと、コロニーが非溶血性である以外は *S. aureus* の性状に一致した²⁴⁾。

ウサギプラズマの添付書には、1 ml 乾燥ウサギプラズマを滅菌生理食塩水 7 ml で溶解する (14.3% ウサギプラズマ) ことが記載されている。しかし、PS ラテックスなどのラテックス凝集試薬で陰性を示した *S. aureus* について、BHI で溶解したウサギプラズマ

で供試すると滅菌生理食塩水よりも高率に陽性になるとの報告がある²⁵⁾。また、三澤ら²⁶⁾も滅菌生理食塩水よりも TSB で溶解したウサギプラズマのほうが 3+ のフィブリン塊を多く形成したと報告している。

今回、TSB, BHI, HIB の 3 種のブロスでウサギプラズマを溶解して試験管法を行ったところ、遊離型コアグララーゼが陽性 (1+~2+) となった。この理由は、遊離型コアグララーゼは菌が増殖時に菌体内から分泌されることや、ウサギ血漿中では *S. aureus* は増殖しないと言われていることから²¹⁾、これらのブロスは滅菌生理食塩水よりも *S. aureus* の発育を支持し遊離型コアグララーゼ産生を促すためではないかと考える。しかし、ウサギプラズマでの結合型コアグララーゼは陽性であるが、10% ウサギプラズマ加 BHI で遊離型コアグララーゼが 24 時間後も陰性であった症例も報告²²⁾されており、コアグララーゼ陰性化には様々な機序があると考えられた。

本症例は結合型・遊離型コアグララーゼ、コロニーの溶血性が陰性以外は、他の生化学性状、コロニー性状、同定検査はすべて *S. aureus* と矛盾しなかった。しかし、結合型コアグララーゼとプロテイン A を標的とするラテックス凝集試薬で陰性を示し、さらに抗菌薬治療経過中に遊離型コアグララーゼの産生能が低下した。ルーチン検査で本症例のような株に遭遇した場合は、TSB などのブロスで溶解したウサギプラズマでの遊離型コアグララーゼの確認や、莢膜多糖体やポリサッカライドを標的としたラテックス凝集試薬を用いたコアグララーゼの確認や、VITEK2 などの自動分析機での同定が CNS と誤同定されないために必要であると考えられる。

謝辞: 本論文の投稿にあたり、診療経過をご教示頂いた近畿大学医学部附属病院 神経内科の濱田征宏先生、油原佳子先生に感謝いたします。質量分析法による同定をして頂いた獨協医科大学病院の鈴木弘倫先生に感謝いたします。

利益相反: なし

文 献

- 1) 2013. MRSA の疫学と感受性. p.1-3, MRSA 感染症の治療ガイドライン, 日本化学療法学会, 日本感染症学会, 東京.
- 2) Ruane, P.J., M.A. Morgan, D.M. Citron, et al. 1986. Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 24: 490-492.

- 3) Fournier, J.M., A. Boutonnier, A. Bouvet. 1989. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. J. Clin. Microbiol. 27: 1372-1374.
- 4) Risley, A.L., A. Loughman, C. Cywes-Bentley, et al. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. J. Infect. Dis. 196: 919-927.
- 5) 田澤庸子, 佐々木裕美, 古畑由紀江, 他. 2010. *Staphylococcus aureus* 検出ラテックス凝集キットドライスポット スタフィテクトプラスの結果に影響した培地と培養時間. 日臨微誌 20: 134-137.
- 6) 小栗豊子. 2011. *Staphylococcus aureus* のコアグララーゼ型別法. p. 138-139, 臨床微生物検査ハンドブック<第4版>, 三輪書店, 東京.
- 7) 善養寺浩, 寺山 武. 1966. ブドウ球菌コアグララーゼ型別法. モダンメディア 12: 500-508.
- 8) Sasaki, T., S. Tsubakishita, Y. Tanaka, et al. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 48: 765-769.
- 9) Brakstad, O.G., K. Aasbakk, J.A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J. Clin. Microbiol. 30: 1654-1660.
- 10) Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, et al. 1999. Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin Infect Dis 29: 1128-1132.
- 11) Okuma, K., K. Iwakawa, J.D. Turnidge, et al. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J. Clin. Microbiol. 40: 4289-4294.
- 12) 小栗豊子. 2011. SCCmec の検査法. p. 146-148, 臨床微生物検査ハンドブック<第4版>, 三輪書店, 東京.
- 13) Hisata, K., K. Kuwahara-Arai, M. Yamanoto, et al. 2005. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. J. Clin. Microbiol. 43: 3364-3372.
- 14) 鈴木匡弘. 2011. 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 No. 3: 16-21.
- 15) 花木秀明. 2012. MRSA 感染症. 診断と治療 100: 425-434.
- 16) Taussing, M.J. 1984. Processes in Pathology and Microbiology, 2nd Edn. p. 520-530, Blackwell, Oxford.
- 17) Thakker, M., J.S. Park, V. Carey, et al. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. Infect Immun 66: 5183-5189.
- 18) 一幡良利. 1996. ブドウ球菌莢膜の謎に迫る—感染とその防御機構について—. 日本細菌学雑誌 51: 601-611.
- 19) Awad, S., A.E. Alharbi, I. Alshami. 2013. Exposure of vancomycin-sensitive *Staphylococcus aureus* to subinhibitory levels of vancomycin leads to upregulated capsular gene expression. British Journal of Biomedical Science 70: 58-61.
- 20) Renzoni, A., C. Barras, P. Francois, et al. 2006. Transcriptomic and functional analysis of an autolysis-deficient, teicoplanin-resistant derivative of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 50: 3048-3061.
- 21) Vandenesch, F., C. Lebeau, M. Bes, et al. 1994. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects. J. Med. Microbiol. 40: 344-349.
- 22) 森 正司, 安形則雄, 野村 寛. 1983. コアグララーゼ陰性黄色ブドウ球菌による食中毒について. 名古屋市衛生研究所報 29: 43-45.
- 23) Fung, J.C., M.H. Kaplan, H. Hsieh, et al. 1984. Two coagulase-variant forms of *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 20: 115-117.
- 24) Versalovic, J. American Society for Microbiology Press. 2011. Manual of clinical microbiology, 10th ed. Washington, DC.
- 25) 山本幸代, 下口和雄, 山田ヒロ子, 他. 2002. ラテックス凝集反応陰性の *Staphylococcus aureus* の検出経験. 医学検査 51: 423. 抄録.
- 26) 三澤慶樹, 吉田 敦, 奥住捷子. 2015. コアグララーゼ試験およびラテックス凝集反応: *Staphylococcus* 属の鑑別におけるピットフォール. 日臨微誌 25: 19-25.

Reduced coagulase production in MRSA isolated from blood cultures during antimicrobial treatment

Michiko Furugaito¹⁾, Yoshiki Misawa³⁾, Atsushi Yoshida⁴⁾⁵⁾, Katsuko Okuzumi⁴⁾, Yuko Tahara¹⁾, Hirofumi Toda¹⁾, Koji Utsunomiya¹⁾, Hiromi Matsuura¹⁾, Toshinori Kamisako²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kinki University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Kinki University School of Medicine

³⁾Department of Infection Control and Prevention, the University of Tokyo Hospital

⁴⁾Division of Infection Control, Dokkyo Medical University Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Dokkyo Medical University Hospital

We isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from blood cultures of a 66-year-old man who had necrosis in his right lower extremity, before and during antimicrobial treatment. Both of the isolated MRSA were bound coagulase negative (RABBIT PLASMA 'Eiken'), whereas the tube coagulase test (free coagulase) was only positive in MRSA isolated before antimicrobial treatment, suggesting diminished/reduced coagulase production under the treatment. As for the MRSA under treatment, the tube coagulase test with RABBIT PLASMA 'Eiken' which dissolved in PEARLCORE TRYPTO-SOY BROTH 'Eiken' showed positive after 24 hours. Coagulase titer was 2 MCD/hr for the MRSA pretreatment and <1 MCD/hr for the MRSA under treatment. With the latex reagent, both MRSA were negative on PS LATEX 'Eiken' and STAPHYLO LA "SEIKEN" whereas both were positive on PASTOREX STAPH PLUS and DRYSPOT STAPHYTECT PLUS. Both of the MRSA were identical in POT (Phage Open-reading Frames Typing) method 93-217-107, SCC_{mec} type IIa, and biochemical characteristics except coagulase production. This is the first report that free coagulase reaction became negative against MRSA isolated during antimicrobial treatment. We should be careful not to misidentify MRSA with diminished/reduced coagulase production as coagulase-negative staphylococci.