

[原 著]

Oxacillin の MIC が 0.5~2 µg/mL の Coagulase negative *Staphylococcus* における
mecA 遺伝子保有判定法についての検討

中里恵梨香・木村由美子・佐々木一雅・阿部文憲
自治医科大学附属病院臨床検査部

(令和4年5月5日受付, 令和4年9月5日受理)

2020年に勧告されたCLSIのM100-30th Editionでは,*Staphylococcus* spp. は oxacillin (MIPIC) および cefoxitin (CFX) の測定条件により4グループに分類され記載されている。その中で Other *Staphylococcus* spp. の MIPIC の MIC 値 0.5~2 µg/mL では, methicillin 耐性を過剰に判定する可能性があり, 重症感染症では PCR 検査による *mecA* 遺伝子もしくは Penicillin binding protein2' (PBP2') の確認が必要であるとコメント欄に記されている。当院で分離された Other *Staphylococcus* spp. のうち MIPIC の MIC 値が 0.5~2 µg/mL であった30株を用いて *mecA* 遺伝子および PBP2' の検出を行った。その結果, いずれも陰性が17株(56.7%)であり, 半数以上が methicillin 耐性を過剰に判定していることがわかった。*mecA* 遺伝子の検出とラテックス法による PBP2' の検出結果に乖離はほとんどみられなかったことから, PBP2' の検出を行うことでより簡便に methicillin 耐性を判定することができ, より適切な早期治療薬の選択が可能と考える。

Key words: PBP2', *mecA* 遺伝子, Other *Staphylococcus* spp., oxacillin

序 文

Coagulase negative *staphylococcus* (CNS) は皮膚の常在菌として存在し, 免疫能の低下した患者や人工物が挿入されている患者に, カテーテル関連血流感染症, 感染性心内膜炎などの感染症を引き起こすことで知られている¹⁾。また血液培養などの無菌材料から検出された場合には原因菌となりうるため治療薬の選択が重要であり, そのためには methicillin 耐性を正確に判定することが重要である。

CLSI の M100-30th Edition では, *Staphylococcus* spp. の oxacillin (MIPIC) および cefoxitin (CFX) の微量液体希釈法およびディスク拡散法による測定条件により, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pseudointermedius* and *Staphylococcus schleiferi*, Other *Staphylococcus* spp. の4グループに分けて記載されている。Other *Staphylococcus* spp. の MIPIC の MIC 値 0.5~2 µg/mL の中には *mecA* 遺伝子を保有していない株も存在するため, 重症感染症においては PCR 検査による *mecA* 遺伝子もしくは PBP2' の確認が必要であると記されている²⁾。当院で分離された MIPIC の MIC 値が 0.5~2 µg/mL の Other *Staphylococcus* spp. 30株について, *mecA* 遺伝子および PBP2' の検出を行い, 若干の知見が得られたので報告する。

材料と方法

1. 対象菌株

当院において2018年1月から2021年9月までの期間に血液培養および他の検査材料から分離された Other *Staphylococcus* spp. 菌株30株を表1に示す。同定は VITEK2 (バイオメリュー・ジャパン) および MALDI bionalyzer (ブルカー・ジャパン), 薬剤感受性試験は VITEK2 および Etest (バイオメリュー・ジャパン) で行った。MIPIC の MIC 値 0.5 µg/mL である *Staphylococcus capitis* (4株), *Staphylococcus hominis* (3株), *Staphylococcus haemolyticus* (2株), *Staphylococcus pettenkoferi* (2株), *Staphylococcus saprophyticus* (1株), *Staphylococcus condimenti* (1株), 1 µg/mL である *Staphylococcus hominis* (7株), *Staphylococcus caprae* (1株), *Staphylococcus senciuri* (2株), 2 µg/mL である *Staphylococcus haemolyticus* (2株), *Staphylococcus saprophyticus* (3株), *Staphylococcus pettenkoferi* (2株), の合計30株を対象とした。

2. ラテックス凝集法による PBP2' の検出

CNS の PBP2' は産生量が少ない場合があるため^{3)~6)}, MIPIC や ceftizoxime (CZX) で誘導してから検査を行う必要があり, 今回は MIPIC を用いて誘導を行った^{7)~11)}。まず, ヒツジ血液寒天培地(日水製薬)に35℃, 5%CO₂湿潤下で18時間培養した菌株を MacFarland0.5 に調整し, ミューラーヒントン寒天培地(栄研化学)に塗布した。そこに MIPIC KB ディスク(栄研化学)を置き, 35℃18時間培養し PBP2' 産生能を誘導した。MIPIC ディスク周辺の発育したコロニーを用いて, プドウ球菌用キット MRSA-LA「生研」(デンカ株式会社)で PBP2' の検出をし, 凝集の強さにより +~3+ で判定を行った。凝集の判定では弱い凝集が見られることがあり判定が困難なことがあるため, 被検菌の対照以外に

著者連絡先: (〒329-0498) 栃木県下野市薬師寺 3311-1
自治医科大学附属病院臨床検査部
中里恵梨香
TEL: 0285-58-7174
E-mail: erika-naka1104@jichi.ac.jp

表 1. 対象菌株

Oxacillin (μg/mL)	菌名	材料
0.5	<i>Staphylococcus capitis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus capitis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus capitis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus capitis</i>	腹水
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	咽頭
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	尿
	<i>Staphylococcus condimentii</i>	血液培養
1	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus hominis</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus caprae</i>	尿
	<i>Staphylococcus suciuri</i>	尿
	<i>Staphylococcus suciuri</i>	血液培養
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	尿
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	生殖器系分泌物
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	血液培養
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	血液培養

MSSA を陰性対照として用い判定の際の指標とした (図 1)。

3. PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出

ヒツジ血液寒天培地 (日水製薬) に 35℃, 5%CO₂ 湿潤下で 18 時間培養した菌株を用いて, シカジーニマス[®]分子疫学解析 POT キット (黄色ブドウ球菌用) (関東化学) で *mecA* 遺伝子の検出を行った。本キットは *S. aureus* の分子疫学解析を行うための遺伝子型キットで, 目的サイズのバンドの有無を判定することで遺伝子型を決定することができる。今回は対象が CNS であるが, *S. aureus* 同様 *mecA* 遺伝子の 530 bp の個所のバンドの有無で判定を行った (図 2)。

4. CFX ディスク拡散法

ヒツジ血液寒天培地 (日水製薬) に 35℃, 5%CO₂ 湿潤下で 18 時間培養した菌株を MacFarland 0.5 に調整し, ミューラーヒントン寒天培地 (栄研化学) に塗布した。そこに CFX KB ディスク (栄研化学) を置き, 35℃ 24 時間培養しディスクの阻止円径を計測し, ≤24 mm を耐性, ≥25 mm を感受性と判定した。

5. セフィナーゼテスト

対象菌株 30 株について *mecA* 遺伝子保有および PBP2' 産生以外による MPIPC の耐性機序を調べるため, セフィナーゼディスクを用いたニトロセフィン法でペニシリン耐性確認試験を実施した。

結 果

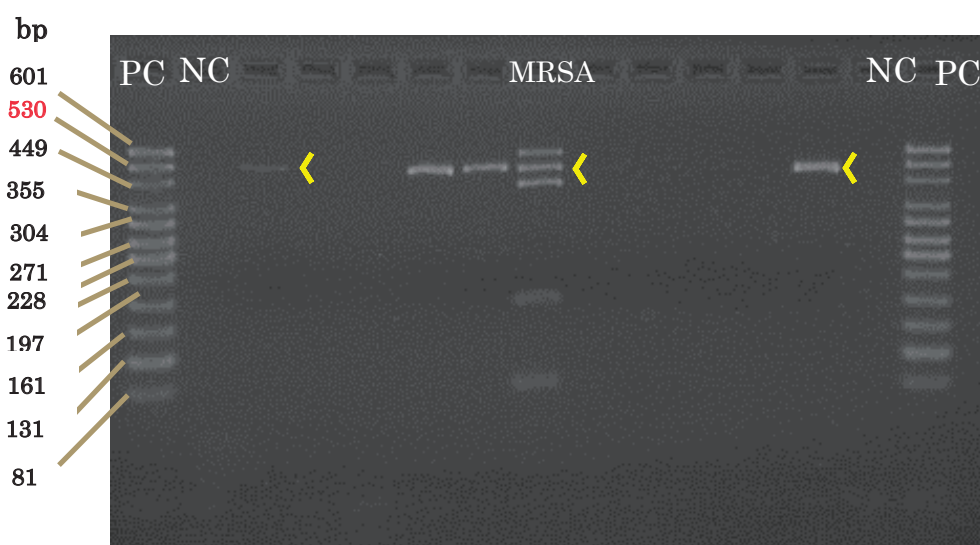
MPIPC の MIC が 0.5 μg/mL の 13 株で *mecA* 遺伝子および PBP2' が検出されたものは *S. hominis* が 3 株, いずれも検出されなかったものは *S. capitis* 4 株, *S. haemolyticus* 2 株, *S. pettenkoferi* 2 株, *S. saprophyticus* 1 株, *S. condimentii* 1 株であった。1 μg/mL の 10 株でいずれも検出されたものは *S. hominis* 6 株, *S. caprae* 1 株の計 7 株, いずれも検出されなかったものは *S. suciuri* 2 株, *S. hominis* の 1 株は *mecA* 遺伝子は検出されたが PBP2' が検出されなかった。

2 μg/mL の 7 株でいずれも検出されたものは *S. haemolyticus* 2 株, いずれも検出されなかったのは, *S. pettenkoferi* 2 株, *S. saprophyticus* 3 株の計 5 株であった。

従って, 対象 30 株中 *mecA* 遺伝子および PBP2' がいずれも検出されたものは 12 株 (40%), 検出されなかったものは 17 株 (56.7%) であり, *mecA* 遺伝子は検出されたが PBP2' は陰性であったものは 1 株 (3.3%) であった (表 2)。また, CFX ディスクの結果においては *mecA* 遺伝子および PBP2' 陽性, CFX 耐性が 11 株 (36.7%), *mecA* 遺伝子および PBP2' 陰性, CFX 感受性が 14 株 (46.7%), *mecA* 遺伝子および PBP2' 陽性, CFX 感受性が 1 株 (3.3%), *mecA* 遺伝子および PBP2' 陰性, CFX 耐性が 3 株 (10%), *mecA* 遺伝子陽性 PBP2' 陰性, CFX 耐性が 1 株 (3.3%) であった (表 3)。



図1. ラテックス凝集法による PBP2' 検出

図2. PCR 法による *mecA* の検出

以上のことより、PCR 法に対し PBP2' の感度は 92%、特異度は 100% であり、CFX の感度は 92%、特異度は 82% であった。

表 4 より、セフィナーゼ試験陽性が 30 株中 17 株、陰性が 13 株であった。いずれも陽性が 9 株 (30%)、*mecA* 遺伝子および PBP2' が陽性、セフィナーゼ試験陰性のものが 3 株 (10%)、*mecA* 遺伝子およびセフィナーゼ試験が陽性、PBP2' が陰性のものが 1 株 (3.3%)、*mecA* 遺伝子および PBP2' が陰性、セフィナーゼ試験陽性のものが 7 株 (23.3%)、いずれも陰性が 10 株 (33.3%) であった。

考 察

CNS が血液培養から検出された場合、陽性になった本数や検出時間、また患者の状態によってはコンタミネーションの可能性もあるが、易感染の状態にある患者には真の菌血症の原因となることが多い。

今回 MPIPC の MIC が 0.5~2 µg/mL の範囲の菌株を用いて *mecA* 遺伝子や PBP2' の検討を行った結果、30 株中 17 株 (56.7%) が *mecA* 遺伝子および PBP2' 陰性という結果であった。*S. aureus* をはじめとした *Staphylococcus* 属の *me-*

thicillin 耐性のそのほとんどは *mecA* 遺伝子によるものであり、遺伝子の発現により PBP2' を産生し、ペニシリン系抗菌薬をはじめとした多くの β ラクタム系薬に耐性を示すことが知られている。*mecA* 遺伝子の保有または PBP2' の産生が methicillin 耐性と密接に関連していることを考えると、今回の検討結果より、半数以上 (56.7%) は methicillin 耐性株ではなかったと推察される。*mecA* 遺伝子や PBP2' の結果に乖離がみられた 1 株については、PBP2' の産生量が乏しく検出感度に達していなかったことがその要因と考えられる。今回 MPIPC を用いて PBP2' の誘導を行った結果、1 株を除き PCR 法を用いた *mecA* 遺伝子との結果に相違は認められなかったことから、ラテックス凝集法を用いた PBP2' の検出は感度、特異度共に PCR 法に劣らないことが推察された。CNS の凝集塊の判定には難渋することがあるため、被検菌を用いた陰性対象とは別に MSSA を対象に置くことにより、弱い凝集が観られた場合でもそれと比較することで判定を容易に行うことが可能となった。

表 3 より *mecA* 遺伝子および PBP2' と CFX ディスクの結果を比較すると、すべての結果が一致したものは 25 株 (83.3%)、結果が乖離したものが 5 株 (16.7%) あった。結

表 2. oxacillin MIC 値別 *mecA* 遺伝子, PBP2', cefoxitin ディスク拡散法, セフィナーゼ試験結果一覧

Oxacillin (μg/mL)	菌名	<i>mecA</i>	PBP2'	cefoxitin	セフィナーゼ
0.5	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	—
	<i>Staphylococcus capitis</i>	—	—	S	+
	<i>Staphylococcus capitis</i>	—	—	S	+
	<i>Staphylococcus capitis</i>	—	—	S	+
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	—	—	S	+
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	—	—	S	+
	<i>Staphylococcus capitis</i>	—	—	S	—
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	—	—	R	—
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	—	—	S	—
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	—	—	S	—
1	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	2+	R	+
	<i>Staphylococcus caprae</i>	+	2+	S	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	R	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	2+	R	—
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	—	R	+
	<i>Staphylococcus suciuri</i>	—	—	S	—
	<i>Staphylococcus suciuri</i>	—	—	S	—
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	3+	R	+
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	3+	R	—
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	—	—	R	+
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	—	—	R	+
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	—	—	S	—
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	—	—	S	—
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	—	—	S	—

表 3. *mecA* 遺伝子, PBP2', cefoxitin ディスク拡散法一覧

<i>mecA</i>	PBP2'	cefoxitin	株数 (%)
+	+	R	11 (36.7)
+	+	S	1 (3.3)
+	—	R	1 (3.3)
—	—	R	3 (10)
—	—	S	14 (46.7)

表 4. *mecA* 遺伝子, PBP2', セフィナーゼ試験一覧

<i>mecA</i>	PBP2'	セフィナーゼ	株数 (%)
+	+	+	9 (30)
+	+	—	3 (10)
+	—	+	1 (3.3)
—	—	+	7 (23.3)
—	—	—	10 (33.3)

果が乖離したものなかで PBP2'のみが陰性であった株は、PBP2'の産生量が少ないために検出できなかったことによるものと推察し、CFXのみ感受性となった株は CFX ディスクの阻止円径が 25 mm と判定境界値であったため、計測誤差と考える。また、残りの 3 株はすべて *S. pettenkoferi* であり菌種に依存することが要因と推察される。そのため、判定境界値付近の阻止円径および菌種名が *S. pettenkoferi* の場合は *mecA* 遺伝子または PBP2'の検出を実施することが適切であると考え。

mecA 遺伝子, PBP2'およびセフィナーゼ試験の比較検討結果より、いずれも陽性となったものについては *mecA* 遺伝子保有と同時に、ペニシリン系も産生していることにより MPIPC の MIC 値が高値傾向になったと考え、*mecA* 遺

伝子および PBP2'陰性、セフィナーゼ試験陽性のものはペニシリン系産生により MPIPC の MIC 値が基準値よりも高値を示したと推察する。methicillin 耐性獲得 CNS は β ラクタム系薬全般に耐性を示すが、ペニシリン系産生株ではペニシリン系抗菌薬のみ耐性となるため、その場合はペニシリン系以外の抗菌薬を使用することが可能である。また、いずれも陰性としたのが 30 株中 10 株 (33%) あり、これらの MPIPC の MIC 値が基準値よりも高値を示した理由として測定機器の測定誤差や *mecA* 遺伝子を保有せず、PBP2'以外の他の PBP による耐性機構が関与していると推測でき興味深い¹²⁾。

当院にて 2018 年 1 月から 2021 年 9 月までの期間に血液培養から分離された *Staphylococcus* 属は 988 件で、Other

Staphylococcus spp. は 373 件 (37.8%) であった。そのうち今回の検討対象である MPIPC の MIC 値が 0.5~2 µg/mL に該当する株は 39 件であり, *Staphylococcus* 属全体の約 4% であった。実際我々は血液培養から *S. pettenkoferi* が検出され, MPIPC の MIC 値が 2 µg/mL であったため 1 度は MRCNS と報告したが, ラテックス凝集法による PBP2' の検出を実施した結果, 陰性であったことから MSCNS であることを報告し, cefazolin で治療を行い軽快退院となった症例を経験した。血液培養からの Other *Staphylococcus* spp. の分離数は決して多くはないが, 血液培養から分離された場合は原因菌の可能性があるので治療対象となることがある。今回の検討結果より, MRCNS を正しく報告することで β ラクタム系薬の中で狭域な薬剤での治療が可能となり, 患者の負担軽減とともに, CNS の methicillin 耐性獲得を防ぎ適切な抗菌薬の使用にもつながると考える。

ラテックス凝集法による PBP2' の検出は迅速かつ簡便であり低コストでもあるため, 検査室の状況に限られることなく使用できる。今回検討に用いたデンカ生研株式会社の販売している試薬では *S. aureus* のみを対象としている。今回 CNS で検討した結果をふまえると CNS でも PBP2' の検出に十分に用いることができると考えられる。その際, PBP2' の発現量が少ないことが懸念されるため MPIPC または CZX による誘導を実施することが重要である。実際, 海外で発売されている Oxoid Penicillin binding protein (PBP2') latex agglutination test (サーモフィッシャー社) は今回使用したブドウ球菌用キット MRSA-LA「生研」(デンカ株式会社) と同じ製品であり, 使用説明書には CNS も対象である旨が記載され, このキットを用いて検討を行った論文も出されている⁸⁾。また, ラテックス凝集法による PBP2' の検出は MPIPC の MIC 値および CFX のディスク拡散法と比較し, 感度, 特異度共に高いとの報告がある⁸⁾。以上のことより, MPIPC の MIC 値が 0.5~2 µg/mL の範囲で重症感染症の場合には CNS の PBP2' の検出により methicillin 耐性を確認するべきであると考え。CLSI の M100-31th Edition では MPIPC のブレイクポイントが 0.5 µg/mL から 1 µg/mL に変更になったが, 今回の検討結果より MIC 値が 0.5 µg/mL のなかに 3 株 methicillin 耐性株が含まれているため, very major error が起こる可能性があると考え。

今後菌株数を増やしさらに検討を進める予定である。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 大楠清文. 2021. First&Next Step 微生物検査サポートブック. 検査と技術 3月増刊号 49 (3): 2021.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 30th Edition 2020 62.
- 3) 紺野昌俊, 生方公子, 斧 康雄, 他. 1991. MRSA 感染症のすべて, p. 134-138. 医薬ジャーナル社.
- 4) Chambers, H.F. 1997. Methicillin Resistant *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clin. Microbiol. Rev. 10: 781-791.
- 5) Gerberding, J.L., Miick, C., Liu, H.H., et al. 1991. Comparison of Conventional Susceptibility Tests with Direct Detection of Penicillin-Binding Protein 2a in Borderline Oxacillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother 35: 2574-2579.
- 6) York, M.K., Gibbs, L., Chehab, F., et al. 1996. Comparison of PCR Detection of *mecA* with Standard Susceptibility Testing Methods To Determine Methicillin Resistance in Coagulase-Negative *Staphylococci*. J. Clin. Microbiol. 34: 249-253.
- 7) Sakoulas, G., Gold, H.S., Venkataraman, L., et al. 2001. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. J. Clin. Microbiol. 39 (11): 3946-3951.
- 8) Swenson, J.M., Tenover, F.C., and the Cefoxitin Disk Study Group. 2005. Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence Of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J. Clin. Microbiol. 43: 3818-3823.
- 9) 石井孝弘, 笹島通夫, 軽部章子, 他. 1996. MRSA における PBP-2' 誘導能と耐性化との関係. 日本化学療法学会雑誌 44: 829-834.
- 10) Hussain, Z., Stoakes, L., Garrow, S., et al. 2000. Rapid Detection of *mecA*-Positive and *mecA*-Negative Coagulase-Negative *Staphylococci* by Anti-Penicillin Binding Protein 2a Slide Latex Agglutination Test. J. Clin. Microbiol. 38: 2051-2054.
- 11) Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Rohde, H., et al. 2001. Rapid Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative *Staphylococci* by a Penicillin-Binding Protein 2a-Specific Latex Agglutination Test. J. Clin. Microbiol. 39: 3700-3702.
- 12) 鈴木映子, 平松啓一, 横田 健, 他. 1992. *mecA* 遺伝子を持たないメチシリン耐性 *staphylococci* における耐性メカニズムの検討. 第 39 回日本化学療法学会総会 368.

Investigation of the necessity of PBP2' detection in Coagulase negative *Staphylococcus* with Oxacillin MIC of 0.5 to 2 µg/mL

Erika Nakazato, Yumiko Kimura, Kazumasa Sasaki, Fuminori Abe
Department of Clinical Laboratory, Jichi Medical University Hospital

The CLSI M100-30th Edition recommended in 2020, *Staphylococcus* spp. are classified and described into four groups according to the conditions of oxacillin (MIPIC) and cefoxitin assay. Among them, MIPIC MIC values of 0.5 to 2 µg/mL for “Other *Staphylococcus* spp.” may over determine methicillin resistance, and in severe infections, detection of *mecA* gene or Penicillin binding protein2' is necessary.

We performed *mecA* PCR detection and PBP2' latex agglutination test using 30 strains of “Other *Staphylococcus* spp.” isolated at our hospital with MIC values of 0.5 to 2 µg/mL for MIPIC. The results showed that 17 isolates (56.7%) were negative for both tests, indicating that more than half of the isolates were over determined for methicillin resistance. Therefore, we believe that the detection of PBP2' by latex agglutination test can more conveniently determine methicillin resistance and enable more appropriate early selection of therapeutic agents.