

学位論文

「Characterization of  $\beta$ -lactam antibiotic-induced VCM-resistant MRSA (BIVR) in patient with septicemia during long-term vancomycin administration」

(バンコマイシンが長期にわたり投与された敗血症患者における  $\beta$ -ラクタム薬によってバンコマイシン耐性が誘導される MRSA (BIVR) の特性について)

指導教授名 北里 英郎

申請者氏名 山口 禎夫

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 学位論文要旨

【背景と目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の中には、 $\beta$ -lactam 薬によってバンコマイシン (VCM) 耐性が誘導される株が存在する。このような性質を有す MRSA は  $\beta$ -lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) と呼ばれている。BIVR の検出は、 $\beta$ -lactam 薬による VCM の耐性の誘導を確認する必要があるため、一般の細菌検査室で検出することは困難であった。しかし、我々は BIVR を簡単に検出できる方法を開発したため、その疫学から検出された BIVR を用いた耐性機序の解明を行ってきた。

【耐性機序】分離された BIVR を用いて誘導耐性機序の解明を行った。VCM は細胞壁合成阻害の結果として、peptidoglycan (PG) 前駆物質の murein monomer precursor が蓄積する。この蓄積が  $\beta$ -ラクタム薬の ceftizoxime によって減少し、かつ VCM によって止まっていた PG 合成系が再稼働することを  $^{14}\text{C}$ -N-acetyl Glucosamine の取り込みによって確認した。この研究によって、 $\beta$ -lactam 薬が VCM の細胞壁合成阻害を妨害していることが判明した。

【疫学】同一施設の血液分離 MRSA から分離された BIVR は、1980 年初頭には 2% 程度だったが、2010 年以降は 15% と経年的な増加が確認されていた。しかし、最新のデータによれば 6% 前後で安定しているようであるが、施設による差が大きく 0%~30% もの差が確認されている。

【症例報告の菌株解析】以上の基礎研究によって BIVR の概要が確立したため、臨床での危険性を考慮して症例を検索した。その結果、気管切開下で人工呼吸管理をしていた症例に行き着いた。本症例は 39°C 台の発熱から肺炎の診断を下され、 $\beta$ -lactam 系抗菌薬の SBT/ABPC を 5 日間投与されていた。その後、

血液から MRSA が継続的に分離（菌株 No.1 と No.2）されたため、MRSA 敗血症の診断で VCM の投与が投与されて改善した。しかし、断続的に血液から MRSA が検出され続け（菌株 No.3）、結果として再燃を繰り返した時点で血液から分離された MRSA が BIVR となっていた（菌株 No.4）。さらに、引き続いて分離された MRSA（菌株 No.5）は BIVR よりも VCM 耐性度が強い MRSA（VCM low-sensitive *Staphylococcus aureus*）に進化していた。この結果から、抗菌薬を fosfomycin と arbekacin の併用に切り替え、速やかに解熱して臨床症状は改善した。MRSA 感染者に  $\beta$ -lactam 薬と VCM が併用され、その MRSA が BIVR となった症例は、すでに北里大学病院の高山らによって報告されている。本症例の No.1、2、3、4 は遺伝学的な同一性が確認されており、No.5 とは異なっていた。つまり、VCM 単剤投与中に VCM 感性 MRSA（菌株 No.1、2、3）が除菌されて抵抗性を有す MRSA（BIVR : No.4）に置き換わり（adaptation resistance）、さらに VCM の継続的な投与により BIVR よりも VCM 耐性度が強い VCM low sensitive *Staphylococcus aureus*（No.5）になった世界初の症例報告であり、BIVR の院内伝播が危惧される症例であった。さらに、耐性度が強い BIVR となった MRSA の  $\beta$ -lactam 薬感受性は回復しており、これは世界的に検出されている VISA 株と同様の現象であった。

【結論】以上の結果から、VCM 感性 MRSA を VCM で治療している最中でも、VCM に抵抗性を有す、いわゆる菌交代症をおこすことが実証された。特に、VCM 感性 MRSA であっても VCM 治療に難渋する症例では、BIVR への進化や、BIVR への菌交代症、さらに耐性度の強い BIVR への進化等を考慮する必要性を提示することができたと考える。

## 目次

1. 序論	1
2. BIV 検出方法の確立と疫学調査	3
2-1. 方法	3
2-1-1. BIVR 株に対する薬剤併用効果の検討	3
2-1-2. BIVR 株検出方法の検討	3
2-1-3. 多施設間における BIVR 検出率の調査	5
2-1-4. 同一施設における BIVR 検出率の経年的調査と薬剤感受性の測定	5
2-2. 結果	5
2-3. 考察	7
3. BIVR の VCM 耐性機序の検討	10
3-1. 方法	10
3-1-1. $^{14}\text{C}$ -N-Acetyl-D-glucosamine の取り込み試験	10
3-1-2. UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys による耐性誘導	10
3-2. 結果	11
3-3. 考察	12
4. BIVR 感染の臨床症例に関する検討	14
4-1. 患者背景と方法	14
4-1-1. 患者背景	15
4-1-2. BIVR の検出と薬剤感受性の測定	15
4-1-3. Pulsed-field gel electrophoresis を用いた遺伝型別	15
4-2. 結果	16
4-3. 考察	17
5. 総括	20
6. 今後の課題	21
7. 謝辞	22
8. 引用文献	23

9. 業績目録	27
10. 図表	35

## 1.序論

黄色ブドウ球菌は各種抗菌薬に耐性を獲得しやすい病原菌である。現在では、 $\beta$ -lactam, Macrolide, Tetracycline, Quinolone 系の一般的に汎用されている抗菌薬のほとんどの耐性を獲得している(Fig.1)。

黄色ブドウ球菌感染症に対する魔法の弾丸と言われた Penicillin は、1941 年に Howard Walter Florey と E.B. Chain によって臨床応用されたが、その翌年の 1941 年には、Penicillinase 産生遺伝子を獲得した黄色ブドウ球菌が出現している。この菌に対抗するために、Penicillinase に安定な半合成体の Methicillin が開発された。しかし、その翌年の 1961 年には Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌がイギリスで出現し、この株を Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)と命名した。その後、MRSA は全世界に急速に拡散していった。

MRSA には、通常の黄色ブドウ球菌(Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* : MSSA)で認められない細胞壁合成酵素の Penicillin binding protein (PBP) 2'が存在する<sup>1)</sup>。この PBP2'は  $\beta$ -lactam に低親和性のため、他の 4 種類の PBPs が  $\beta$ -lactam で阻害されても、それらの機能を代替することで生存する事ができる。PBP2'を司る遺伝子は *mecA* と命名され、抑制遺伝子を含む *mecI-mecR-mecA* で構成されている。さらに、これらの遺伝子を含む特異領域は staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)とよばれ、外来遺伝子を獲得する装置として、現在までに 11 種類が発見されている<sup>2)</sup>。これらの SCCmec type の特徴的な cassette は院内感染対策や疫学調査に利用されている<sup>3)</sup>。

抗 MRSA 薬として vancomycin (VCM)が 1981 年に上市され、現在でも第一線で使用され続けている。VCM の作用機序は、PBPs の基質である Lipid-P-N-acetylglucosamyl-N-acetylmuramyl-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-(5Gly)-D-Ala-D-Ala (Lipid II)の末端部位の D-Ala-D-Ala に結合する事で、Lipid II-VCM 複合体が形成され、PBPs が基質として認識できなくなって細胞壁合成

が止まる事である<sup>4)</sup>。つまり、PBPs と VCM は Lipid II を取り合っている事になる(Fig. 2)。

MRSA に対する VCM 耐性菌の出現率は極めて低い。これは VCM が上下逆さまの 2 量体を形成して作用しているためと考えられている(Fig. 3)。この 2 量体形成によって本来の transpeptidation 阻害ばかりか、transglycosylation までもが阻害される事で耐性菌出現率が抑えられている<sup>5)</sup>。

しかし、1997 年に世界で初めて VCM 中等度耐性 MRSA が本邦で報告された<sup>6)</sup>。この MRSA(Mu50 株)の VCM に対する最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)は 8 µg/ml であり、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の基準では intermediate に分類されるため、vancomycin-intermediated *S. aureus* (VISA)と呼ばれている<sup>7)</sup>。European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)では耐性に分類されているため vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)となる<sup>8)</sup>。さらに、VCM に対してヘテロ耐性を示す MRSA(Mu3 株)が報告された。このヘテロ VISA は、10<sup>6</sup>個に対して 1 個以上の VISA 細胞を含むことと定義づけされている<sup>9)</sup>。これらの発見後、全世界から同様の報告が相次ぎ、VCM 治療失敗例との関連が大きく取り扱われている<sup>10)</sup>。

また Mu3 株はヘテロ VISA であるが、同時に β-lactam 薬によって VCM 耐性が誘導される MRSA でもある。花木らは、β-lactam 薬によって VCM 耐性が誘導される MRSA をヘテロ VISA と区別する目的で β-lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA(BIVR)と命名した<sup>11)</sup>。

本研究では、先行研究で開発された BIVR の検出方法を用いて、市販されている β-lactam の VCM 耐性の誘導について検討すると同時に、疫学調査、耐性の誘導機序ならびに BIVR 感染者の症例検討を行った。

## 2. BIVR 検出方法の確立と疫学調査

### 2-1. 方法

#### 2-1-1. BIVR 株に対する薬剤併用効果の検討

Clinical and Laboratory Standards Institute ; CLSI (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards ; NCCLS) に準拠した寒天平板希釈法<sup>11)</sup>による checker - board method で BIVR 株に対する VCM(VCM) と各種薬剤の MIC を測定して併用効果を検討した。試験菌株は BIVR 株の Fu10<sup>12)</sup>と、比較対象として MSSA 株の FDA209P と ATCC29213 を用いた。試験菌株を Tryptic soy broth (TSB) (BBL, MD, USA) で 35°C、一夜培養後、新鮮 TSB で 578 nm における濁度が 0.3 となるように調製した。10 倍希釈した菌液をマイクロプランター(佐久間製作所、東京、日本)で、(i) VCM と sulbactam / ampicillin (AMPC/SBT)、(ii) VCM と cefazolin(CEZ)、(iii)VCM と ceftizoxime (CZX)、(iv) VCM と cefpirome(CPR)、(v) VCM と imipenem (IPM)を含有する Mueller-Hinton 寒天培地(MHA) (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)に接種した。MHA に含有する各薬剤濃度は、0.0313～128 µg/ml の 2 倍希釈系列で作製した。菌液を接種した薬剤含有 MHA は、37°C、20 時間培養後、試験菌株の発育の有無を目視で確認し、MIC を決定した。VCM と各種薬剤の併用効果は下記に示した計算式より FIC index を算出し評価を行った<sup>13)</sup>。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{併用時のMIC(薬剤A)}}{\text{単剤時のMIC(薬剤A)}} + \frac{\text{併用時のMIC(薬剤B)}}{\text{単剤時のMIC(薬剤B)}}$$

#### 2-1-2. BIVR 検出方法の検討

BIVR株のFu10を用いて、簡便なBIVR検出方法の検討を行った。Fu10をTSBで35°C、一夜培養後、新鮮TSBで578 nmにおける濁度が0.3となるように調製

した。続いて、滅菌綿棒に菌液を染み込ませ、4 µg/ml VCMを含有する Mu3寒天培地(Becton, Dickinson and Company)の全面に塗布した。別途調製した penicillinG (PCG)、CEZ、CZX、latamoxef(LMOX)、cefmetazole(CMZ)を含有する直径8 mmのペーパーディスクをMu3寒天培地上に置き、37°C、24～48時間培養し、生育円の形成を観察した。さらに、一般に薬剤感受性試験に使用される市販のβ-lactam薬含有ディスク46種(Becton, Dickinson and Company)を用いて同様の方法で検討を行った。検討した薬剤名とディスク内の含有量を下記に示す。benzylpenicillin(10 µg/disc)、oxacillin(1 µg/disc)、ampicillin(10 µg/disc)、amoxicillin (25 µg/disc)、mezlocillin (75 µg/disc)、piperacillin (100 µg/disc)、ticarcillin (75 µg/disc)、carbenicillin (100 µg/disc)、sulbenicillin (30 µg/disc)、ampicillin/sulbactam (20 µg/disc)、amoxicillin/clavulanic acid (30 µg/disc)、Tticarcillin/clavulanic acid(85 µg/disc)、cefaclor (30 µg/disc)、cephalothin(30 µg/disc)、cefoxitin(30 µg/disc)、cefamandole (30 µg/disc)、cefixime(5 µg/disc)、cefteram(10 µg/disc)、cefpodoxime(10 µg/disc)、ceftibuten(30 µg/disc)、ceftamet(10 µg/disc)、cefdinir(5 µg/disc)、cefuroxime(30 µg/disc)、cefsulodin(30 µg/disc)、cefotiam(30 µg/disc)、cefmetazole (30 µg/disc)、cefmenoxime(30 µg/disc)、cefotetan(30 µg/disc)、cefminox(30 µg/disc) 、CZX(30 µg/disc)、cefotaxime(30 µg/disc)、cefoperazone(75 µg/disc)、cefbuperazone(75 µg/disc)、ceftriaxone(30 µg/disc)、cefodizime(30 µg/disc)、ceftazidime(30 µg/disc)、cefepime(30 µg/disc)、CPR(30 µg/disc)、cefpiramide(75 µg/disc)、cefoperazone/sulbactam(75/30 µg/disc)、LMOX(30 µg/disc)、flomoxef(30 µg/disc)、carumonam(30 µg/disc)、IPM(10 µg/disc)、panipenem(10 µg/disc)、meropenem(10 µg/disc)。

### 2-1-3. 多施設間における BIVR 検出率の調査

日本における BIVR 株の検出率を調査する為、1999～2002 年に地域の異なる 14 施設から収集した 986 株の MRSA を用いて BIVR 検出検査を実施した。試験菌株を TSB で 35°C、一夜培養後、新鮮 TSB で 578 nm における濁度が 0.3 となるように調製した。続いて、滅菌綿棒に菌液を染み込ませ、Mu3 寒天培地の全面に塗布した。0.1、1、10 µg/ml の CZX を含有する直径 8 mm のペーパーディスク 3 枚を Mu3 寒天培地上に置き、37°C で培養し、生育円の形成を 48 時間後に観察した。

### 2-1-4. 同一施設における BIVR 検出率の経年的調査と薬剤感受性の測定

同一施設内で 1978 年から 1999 年までに血液から分離された 188 株の MRSA を試験菌株として用いた。BIVR 検出検査は、2-1-3 で示した方法で実施した。さらに、抗 MRSA 薬である VCM、teicoplanin(TEIC)、arbakacin(ABK)の MIC を NCCLS に準拠した寒天平板希釈法で測定した<sup>11)</sup>。

## 2-2. 結果

典型的な BIVR 株である Fu10 を用いて、β-lactam 薬による VCM 耐性誘導作用を確認する為に、checker - board method を用いて VCM と各種 β-lactam 薬との併用効果について評価を行った。Fu10 株に対する VCM、AMPC/SBT、CEZ、CZX、CMX、IPM の単剤時の MIC はそれぞれ、2、64、>128、>128、128、128 µg/ml であった。比較対象とした MSSA 株の FDA209P では、VCM、AMPC/SBT、CEZ、CZX、CMX、IPM の単剤時の MIC はそれぞれ、0.5、0.25、0.25、8、0.5、0.0625 µg/ml であり、ATCC29213 では同様に、1、0.25、0.25、8、0.5、0.0625 µg/ml であった。VCM と AMPC/SBT、

VCM と CEZ、VCM と CZX、VCM と CMX、VCM と IPM の併用による FIC index は、Fu10 においてはそれぞれ 2.5、>2、>2、2.06、2.02 であった。同様に、FDA209P ではそれぞれ 0.75、0.625、0.625、0.375、0.25、ATCC29213 では 0.5、0.5、0.625、0.375、0.25 であった。Fu10 における FIC index はすべての組み合わせで、>2 を示し拮抗作用が認められた。一方、FDA209P と ATCC29213 ではすべての組み合わせで FIC index が $\leq 1$  であることから相加・相乗効果が認められた。

checker - board method を用いることにより BIVR との判定は可能であるが、操作が煩雑であることから、より簡便な検出方法を確認すべく検討を行った。基礎培地には 4  $\mu\text{g/ml}$  の VCM を含有する Mu3 寒天培地を用いることで、通常の VCM 感性 MRSA はこの培地では発育することができない。しかし、 $\beta$ -lactam 薬を含有するディスクを Mu3 寒天培地上に置くことで、BIVR 株では  $\beta$ -lactam 薬によって VCM 耐性が誘導されるため、その領域で菌の発育が促進することが予想される。そこで、まず 5 種の  $\beta$ -lactam 薬を用いて Mu3 寒天培地上での  $\beta$ -lactam 薬による VCM 耐性の誘導を確認すべく、Fu10 を Mu3 寒天培地に塗布後、10  $\mu\text{g/ml}$  の PCG, CEZ, CZX と 10 及び 100  $\mu\text{g/ml}$  の CMZ、100  $\mu\text{g/ml}$  の LMOX を含有したディスクを用いて 48 時間培養した。その結果、試験を行ったすべての  $\beta$ -lactam 薬においてディスク周囲に菌の生育円の形成が確認された(Fig. 4)。さらに、市販されている 46 種の  $\beta$ -lactam 薬含有ディスクを用いて同様に試験した結果、Cephalothin, Cefsulodin, Cefotiam, Cefpiramide, Cefoperazone, Cefoperazone/Sulbactam の 6 種の薬剤において生育円の形成が認められなかったが、その他の 40 種はすべて生育円が形成された(Table 1)。これら 6 種の  $\beta$ -lactam 薬については、薬剤濃度を 0.1、1、10  $\mu\text{g/ml}$  としたディスクを自家調製して再試験した結果、6 種すべて

の薬剤において、いずれかの濃度の薬剤を含有するディスク周囲に生育円の形成が認められた。これらの検討結果より、検討した  $\beta$ -lactam 薬の中で CZX が最も BIVR 生育円形成の安定性に優れていた為、以降の BIVR 検出検査には CZX を用いることとした。また、薬剤濃度としては 0.1、1、10  $\mu\text{g/ml}$  を含有した 3 種のディスクを作製して試験を行う事とした。

確立した BIVR 検出方法を用いて、1999 年～2002 年に地域の異なる 14 施設より収集した 986 株の MRSA を用いて、BIVR の検出率の測定を実施した。その結果、986 株中 54 株が BIVR であり検出率は 5.5%であった。さらに、菌株の由来材料を血液とそれ以外に区分すると、血液分離株は 81 株、非血液分離株は 905 株となり、血液分離株の内 12 株(14.8%)が BIVR であった。非血液分離株においては 42 株(4.6%)が BIVR であった。これら由来材料別による BIVR 検出率について  $\chi^2$  二乗検定を用いて解析した結果、 $p < 0.001$  となり統計学的有意差が認められた(Table 2)。さらに、同一施設内で 1978 年から 1999 年までに血液から分離された 188 株の MRSA を用いて抗 MRSA 薬に対する感受性と BIVR 検出率の変動の調査を行った。VCM、TEIC、ABK の年代別薬剤感受性の推移を Fig. 5 に示す。1978～1984 年(45 株)、1985～1989 年(45 株)、1990～1994 年(49 株)、1995～1999 年(49 株)における VCM の  $\text{MIC}_{50}$  と  $\text{MIC}_{90}$  は 1、1、1、1 と 2、2、2、1 であり、TEIC は 1、1、1、1 と 2、1、1、2、ABK は 2、0.5、0.5、0.5 と 8、8、1、1 であった(Fig. 5)。また、BIVR の検出率は 1978～1984 年、1985～1989 年、1990～1994 年、1995～1999 年で 2.2、2.2、6.1、10.4%であった(Fig. 6)。

### 2-3. 考察

一般的に、2 種の抗菌薬による拮抗や耐性の誘導を確認する場合に

checker - board method が用いられる。本研究では、BIVR 株である Fu10 と non-BIVR で MSSA 株の FDA209P と ATCC29213 を用いて、VCM と AMPC/SBT、CEZ、CZX、CMX、IPM 併用時での評価を行った。その結果、BIVR 株の Fu10 のみで拮抗作用が認められ、FDA209P や ATCC29213 では逆の相加・相乗効果が認められた。つまり、従来法の checker - board method でも BIVR を検出する事は可能であるが、その操作方法は煩雑で細菌検査室での実施は困難であると考えられた。

そこで、Brain-Heart infusion (BHI) agar を基礎培地として、細胞壁合成系成分(Resting medium)を添加した Mu3 培地を用いた簡易検出法を試みた。この Mu3 培地には VCM が 4 µg/ml 添加されており、通常の MRSA は生育できない。VCM 耐性を誘導する  $\beta$ -lactam 薬として、Penicillin 系の PCG を、Cephem 系の CEZ と CZX を、Cephamycin 系の CMZ と LMOX を用いたが、いずれの系統も VCM 耐性の誘導が確認された。これらの結果、 $\beta$ -lactam 薬の基本骨格に関わりなく VCM 耐性が誘導される事が分かった。

さらに、Carbapenem 系や Monobactam 系の  $\beta$ -lactam 薬にまで拡大し、かつ市販の全ての  $\beta$ -lactam 薬についての耐性誘導を確認した。結果として、調査した 46 種類全ての  $\beta$ -lactam 薬が VCM 耐性を誘導しており、その誘導には至的誘導能が存在する事が明らかとなっている (Table 1, Fig. 4)<sup>14,15)</sup>。また、幅広い濃度域で安定に VCM 耐性を誘導する  $\beta$ -lactam 薬として CZX が適当と判断され、以降の VCM 耐性の誘導薬として CZX を用いる事とした。

CZX を用いて、まず血液分離株と非血液分離株での BIVR の検出率の比較を行った。その結果、血液分離株からは 14.8%、非血液分離株からは 4.6%と、有意に血液分離株からの検出率が高かった。これは、血液分離株の方が VCM や Carbapenem を含む  $\beta$ -lactam 薬との暴露が大きく、抗菌薬プレッシャーに

よって BIVR の性質を表現しやすくなっているためと考えられる。

次に、BIVR の出現時期と年次的増加の有無を確認するために、同一施設で 1978 年から 1999 年まで血液分離された MRSA を用いて、BIVR の検出を行った。Fig. 6 に示すように、1978 年に分離された MRSA が日本初の MRSA であるが、この株が BIVR の性質を示した。VCM が抗 MRSA 薬として使用され始めたのは 1981 年以降であるため、この株は VCM に暴露されていない。当研究室の別のグループによる研究では、 $\beta$ -lactam 薬との接触によっても BIVR の性質を発現しやすくなる結果を得ているため(Fig. 7)、この株は VCM による影響ではなく  $\beta$ -lactam 薬による影響で BIVR の性質を獲得したと考えられた。また、1989 年まで 2%程度だった分離率が 1990 年～1994 年間では 6%と 3 倍に増加している。これは VCM 使用量の増加と同時に、当時、相加相乗効果を期待して推奨されていた VCM と  $\beta$ -lactam 薬の併用率が急激に高まったためと考えられる。さらに、1995 年から 1999 年までの他施設での分離率は 10%までに達しており、この原因も上記併用の普及と思われた。

### 3. BIVR の VCM 耐性機序の検討

#### 3-1. 方法

##### 3-1-1. $^{14}\text{C}$ - N-Acetyl-D-glucosamine の取り込み試験

TSB で 37°C、一夜培養した Fu10 の菌液 1.25 ml を 25 ml の新鮮 TSB に植菌し、578 nm における濁度が 0.7 に達するまで 37°C で振とう培養を行った。遠心分離により菌体を回収後、25 ml の Resting medium<sup>16)</sup> (1mM glycine, 1mM glutamic acid, 0.2mM D-alaninyl-D-alanine, 0.2mM L-lysine, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.18mM Uracil, 8.2uM nicotinamide, 80mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3uM thiamine, and 28.5mM glucose) に懸濁した。再度、同条件の遠心洗浄を実施し、菌体を 25 ml の Resting medium に懸濁した。調製した菌液の 8 ml に、1.85 MBq/ml の  $^{14}\text{C}$ - N-Acetyl-D-glucosamine ( $^{14}\text{C}$ -GlcNAc) (Amersham, IL, USA) 16  $\mu\text{l}$  と VCM を最終濃度 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加した。続いて、37°C で 15、30、60、120 分間培養し、各培養時間で 0.5 ml ずつ採取し、 $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込みを阻害する目的で 10,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の非標識 GlcNAc 30  $\mu\text{l}$  を添加した。さらに、細胞壁表層に付着した  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc を取り除く為に菌体を 4% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Chemical Company, Missouri, USA) で 2 回洗浄を行った後、菌体に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の放射活性を測定した。同様の方法を用いて、VCM と CZX 存在下における  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc 取り込みについても検討を行った。CZX は、最終濃度 0.1、1、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように VCM と  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc 添加時と同時に加えた。

##### 3-1-2. UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys による耐性誘導

Fu10 を TSB で 35°C、一夜培養後、新鮮 TSB で 578 nm における濁度が 0.3 となるように調製した。続いて、滅菌綿棒に菌液を染み込ませ、Mu3 寒天

培地の全面に塗布した。別途調製した uridine-diphosphate-N-acetyl-glucosamyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-lysine(UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys)の 10、100、1000  $\mu\text{g/ml}$  を含有する直径 8 mm のペーパーディスクを Mu3 寒天培地上に置き、37°C, 48 時間培養し、生育円の形成を観察した。比較対象として、non-BIVR 株の MRSA 及び MSSA 各 1 株を用いて同様に行った。

### 3-2. 結果

Peptidoglycan の構成成分である GlcNAc の放射性標識体( $^{14}\text{C}$ -GlcNAc)を用いて、BIVR 株である Fu10 における VCM 単剤時および VCM と  $\beta$ -lactam 薬の CZX 併用時における  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の細胞内への取り込み量の変化について検討を行った。その結果、4  $\mu\text{g/ml}$  の VCM 単剤時は、コントロールと比較して  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込み量は 30%程度まで低下したが、10  $\mu\text{g/ml}$  の CZX を併用することで、 $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込み量は 64%まで回復した。この現象は CZX の濃度に依存していた (Fig. 8)。

さらに、Peptidoglycan 合成の前駆体である UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys を用いて、BIVR 株である Fu10 における VCM 耐性機序の検討を行った。10、100、1,000  $\mu\text{g/ml}$  の UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys 含有ディスクを Fu10 塗抹後の Mu3 寒天培地上に置き培養した結果、100 及び 1,000  $\mu\text{g/ml}$  の UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys 含有ディスク周囲に菌の発育が確認され、その発育円径は 1,000  $\mu\text{g/ml}$  の方が大きかった (Fig. 9)。同時に nonBIVR 株の MRSA 及び MSSA 各 1 株で試験した結果、生育円の形成は認められなかった (data not shown)。

### 3-3. 考察

黄色ブドウ球菌における GlcNAc の 98%以上が peptidoglycan と teichoic acid の細胞壁に取り込まれる事が明らかとなっている<sup>17)</sup>。この性質を利用して、VCM による細胞壁合成系の阻害と、 $\beta$ -lactam 薬の CZX 併用時の細胞壁合成系の活動を調べた。なお、1,000  $\mu\text{g/ml}$  の CZX 単剤で、 $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込みが阻害される事はなかった ( $\text{MIC} > 3,200 \mu\text{g/ml}$ )。Fig.11 に示すように、4  $\mu\text{g/ml}$  の VCM によって  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込みは 30%まで低下したが、1 もしくは 10  $\mu\text{g/ml}$  の CZX によって、阻害されていた取り込みは 60%程度まで回復した。この結果から、CZX 等の  $\beta$ -lactam 薬は、VCM による細胞壁合成経路の阻害を妨害して、VCM の効果をなくすと考えられた。

この機序を、 $\beta$ -lactam 薬  $\rightarrow$  autolysin  $\rightarrow$  peptidoglycan debris (PD)  $\rightarrow$  菌体内取り込み  $\rightarrow$  peptidoglycan 合成に再利用  $\rightarrow$  本来の合成系と再利用による合成系で VCM の target である Lipid II が過剰に産生される結果、VCM 耐性になると考えた。この推論に基づき、Lipid II の前駆体となる UDP-GlcNAc-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys を  $\beta$ -lactam 薬と同様の現象が起きるか否かを確認した結果、CZX と比べて VCM 耐性の誘導現象は弱いものの、100 と 1,000  $\mu\text{g/ml}$  で確認された。これは上記推論を指示するデータと考えられた。

その後、本研究は当教室によって継続的に研究され、VCM による  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc の取り込み阻害と CZX による回復の再現性確認、ならびに peptidoglycan 前駆物質である murein-monomer precursor が VCM の阻害によって蓄積される現象と CZX によって回復される現象(Fig. 10)、さらに菌体外放出 peptidoglycan debris 量の VCM による低下と CZX による大幅な促進が確認されている(MSSA や non-BIVR:通常の MRSA ではほとんど放出されない)(Fig. 11)。さらに、この peptidoglycan debris を分離し構造決定まで成功している(Fig. 12)。この

muropeptide A は CZX や IPM と同様に用量依存的に VCM の効果を減弱する事も確認されている(Fig. 13, 14)。

つまり、BIVR の耐性機序、 $\beta$ -lactam 薬による VCM 耐性の誘導は、先に推論した、 $\beta$ -lactam 薬  $\rightarrow$  autolysin  $\rightarrow$  peptidoglycan debris  $\rightarrow$  菌体内取り込み  $\rightarrow$  peptidoglycan 合成に再利用  $\rightarrow$  本来の合成系と再利用による合成系で VCM の target である Lipid II が過剰に産生される結果、VCM 耐性になると考えられる。要点は、VCM 存在下でも  $\beta$ -lactam 薬によって peptidoglycan debris が放出されるか、さらに、この物質によって VCM 耐性が誘導されるか否かであったが、peptidoglycan debris は muropeptide A と C で証明され、かつ、この物質が  $\beta$ -lactam 薬と同様に VCM 耐性を誘導する結果から、今では上記仮説による耐性誘導と考えられている(Fig. 15)。

## 4. BIVR 感染の臨床症例に関する検討

### 4-1. 患者背景と方法

#### 4-1-1. 患者背景

臨床経過をFig. 16に示す。患者は64歳男性。2003年に腓胆管合流異常症に対し手術を施行し、2004年に僧帽弁閉鎖不全症に対し僧帽弁置換術を行った。2007年1月に脳出血を認め、開頭血腫除去術を施行し、入院管理となった。術後呼吸不全のため、同月に気管切開を行い、以降人工呼吸管理となった。慢性の肺炎で、非発熱時でもCRPは10前後で推移していた。2007年7/5、39℃台の発熱を認め、肺炎の再燃と診断した。抗菌薬として $\beta$ -lactam系薬のSBT/ABPCの投与を開始後2日間で解熱し、計5日間の投与で抗菌薬を中止した。7/5の血液培養よりMRSAが検出された。7/19、再び発熱を認め、肺炎の再燃を認めた。7/19の血液培養より再度MRSAが検出されたため、敗血症と診断し、VCMの投与を開始した。VCM投与2日後に解熱し、計7日間の投与でVCMを中止した。以降、MRSAは痰から持続的に検出され、保菌状態と考えられた。同年9/30より38℃台の発熱を認め、MRSA肺炎と診断し、10/1より再び抗菌薬VCMを開始した。10/2の血液培養よりMRSAが検出された。VCM投与5日目の10/5より解熱し、VCMは14日間の投与で中止した。VCM中止3日後の10/17に再び発熱し、10/18よりVCM投与を再開するも解熱傾向なく経過した。10/18、22の血液培養よりMRSAが検出された。炎症反応が10/18の10.44から10/22の29.93に悪化していたが、10/22のVCMトラフ濃度は10.2 $\mu$ g/mLと治療域に達していた。VCMは臨床的に無効と考えられ、10/27よりVCMを中止し、抗菌薬をFOM+ABKに変更した。変更2日後より解熱し、計18日間で投与を中止した。

#### 4-1-2. BIVRの検出と薬剤感受性の測定

抗菌薬投与前のNo.1株(7/5分離)、10日前に $\beta$ -lactam系薬5日間の投与歴があったNo.2株(7/19分離)、約3ヶ月前にVCM 1週間の投与歴があったNo.3株(10/2分離)、VCM2週間投与後のNo.4株(10/18分離)、VCM4日間投与後No.5株(10/22分離)のMRSA株からBIVRの検出を試みた。さらに、上記5株について、 $\beta$ -lactam薬であるOXA、IPM、抗MRSA薬であるアミノグリコシド系薬のABK、グリコペプチド系のVCMとTEICのMIC測定を行った。

#### 4-1-3. Pulsed-field gel electrophoresis を用いた遺伝型別

制限酵素 *Sma* I を用いて、Bannerman ら<sup>18)</sup>の方法に従って Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)を実施し、各菌株の遺伝子型別を行った。被検菌 1 コロニーを MHB 培地 4mL に接種し、35℃好気的条件下で一夜震盪培養した。培養液の 100 $\mu$ L を遠心分離し、沈殿した菌体を 100 $\mu$ L の PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH8.0) に浮遊後、100 $\mu$ L の 2%低融点アガロース (InCert<sup>®</sup> agarose; タカラバイオ、日本) を加え、プラグモールドに流し込んで 4℃で固化した。このアガロースブロックを、500 $\mu$ L の溶菌液 lysis buffer (LB; 1M NaCl, 6mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM EDTA, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate, 1mg の lysozyme, 10 $\mu$ g の lysostaphin) に加え 37℃で 1 時間反応した。その後、室温にて 1mL の TE buffer (TE; 10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) で洗浄したのち、200 $\mu$ g の Proteinase K (タカラバイオ、日本) 含有 500 $\mu$ L の LB 中にて 50℃で一夜放置して溶菌した。溶菌後のアガロースブロックを、室温にて 1mL の TE buffer 中で 30 分 x 4 回の洗浄を行った後、アガロースブロックを 4 分の 1 の大きさにカットし、170 $\mu$ L の *Sma* I buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM KCl, 7mM

2-mercaptoethanol、0.01% BSA、1 $\mu$ L(10U/sample)の制限酵素 *Sma* I (タカラバイオ,日本)) を加え 25°C で 4 時間反応した。

制限酵素処理後のアガロースブロックを、1% agarose ゲル (Pulsed-Field Certified Agarose; Bio-Rad Laboratories, USA) に埋め込み、2L の泳動バッファー (0.5 $\times$ TBE; 44.5mM Tris, 44.5mM boric acid, 1mM EDTA) 中で泳動した。泳動システムは CHEF-DR®III System (Bio-Rad, USA) を用い、initial pulse 5.3 秒、final pulse 34.9 秒、電圧 6V/cm、電場角度 120°、水温 14°C の泳動条件で 20 時間の泳動を行った。また同時に分子量マーカー (Lambda ladder standard; Bio-Rad Laboratories) も泳動した。泳動後、エチジウムブロマイド溶液 (1mg/mL Ethidium Bromide and dropper; GenePath, Gel Kit, Bio-Rad, Maenes-la-Coquette, France) 中で 30 分震盪染色した後、蒸留水中で 30 分脱色を行った後、312nm の UV 下で写真撮影を行い、分離されたバンドパターンを肉眼的に評価した。

#### 4-2. 結果

5 株の分離株を用いて BIVR の検出を試みた結果、菌株 No.1~3 は反応がなく non-BIVR、菌株 No.4 は CZX 1 $\mu$ g/ml 含有 paper disc 周辺に生育円を認めたため BIVR と判定した。菌株 No.5 は、BIVR よりもさらに耐性度の強い株に進化していた(Fig. 17)。さらに抗菌薬感受性結果を表 1 に示す。菌株 No.1~4 は各薬剤において同一の MIC を示した。No.5 株は、 $\beta$ -lactam 系薬の OXA と IPM で、MIC が >128 $\rightarrow$ 32 と 32 $\rightarrow$ 1  $\mu$ g/ml と著しい感敏化が認められ、アミノグリコシド系薬である ABK は 1 $\rightarrow$ 0.5  $\mu$ g/ml と軽度の感敏化が認められた。一方、グリコペプチド系薬である VCM と TEIC は 1 $\rightarrow$ 2 と 1 $\rightarrow$ 4  $\mu$ g/ml と若干の耐性化を認めた。

No.1～5 の株の遺伝型を PFGE によって確認した。No.1～4 の菌株は同一の泳動パターンを示したため、同一の遺伝子型と判断した。しかし、No.5 は低分子領域で 1 バンドの欠失が認められたが、PFGE の判断基準<sup>19)</sup>からは同一株と判断された(Fig. 18)。

#### 4-3. 考察

菌株No.1～4のVCMに対するMICは1  $\mu\text{g/ml}$ 、No.5の株が2  $\mu\text{g/ml}$ であったが CLSIの基準ではいずれも感性に分類される<sup>20)</sup>。現在、VCMのMICが2  $\mu\text{g/ml}$  の株に対してVCMの治療効果は及ばない事が明らかになってきている<sup>21)</sup>。20年前のVCMのMICの中央値は0.5  $\mu\text{g/ml}$ であったが、現在は1  $\mu\text{g/ml}$ となり、MICが2  $\mu\text{g/ml}$ の株も10%程度検出されている。このような極僅かのMICの上昇をMIC Creepと呼んで臨床では警戒を強めている<sup>22)</sup>。

CLSIではVCMのMICが2  $\mu\text{g/ml}$ の株は感性に分類されているにも関わらず、同様の Infectious Diseases Society of America (IDSA) Guidelines<sup>23)</sup> でも European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Guidelines<sup>24)</sup> でもPK・PD理論<sup>25)</sup>からも効かないと説明されている。したがって、No.5の株に対してVCMの治療効果が及ばなかった結果は理解できるが、No.4のVCMのMICが1  $\mu\text{g/ml}$ の株が効かなかった理由は不明であったが、この株がBIVRの性質を有す事が明らかになった。その結果、BIVRの性質を有すMRSAには、たとえVCMのMICが1  $\mu\text{g/ml}$ であっても十分なVCM濃度が確保されていても臨床効果は得られないと考えられた。

通常のMRSA、non-BIVRであるNo.2とNo.3の株のVCM MICはBIVR株であるNo.4と同様に1  $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、これらの株に対してVCMは解熱作用を示しており、臨床的な改善が認められていた(Fig. 16)。あきらかに、No.4

の株とは異なった臨床効果を示している事実から、やはりBIVRの性質を有す株に対してVCMの治療効果は低下していると判断せざるを得ないと思われた。

また、BIVRは $\beta$ -lactam薬によってVCM耐性が誘導されるMRSAであるにもかかわらず、本症例のBIVRが検出される2週間以上前でも $\beta$ -lactam薬の投与はなかった。この期間はVCMのみが投与され続けており、本来はBIVRが出現する環境ではないが、この期間でMRSA(No.3株)がBIVRの性質を獲得した、もしくはMRSA(No.3株)中に内在されていた細胞壁合成系が活発なBIVR細胞を選択した結果、出現したと考えられる。さらに、PFGEではNo.1-4は完全に同一の泳動パターンを示しているため、これらは同一株と判断される。VCMのMICがあがったNo.5は低分子のバンドが1本欠損しているが、PFGEの理論から、この株も先の4株と同一株と判断できる(Fig. 17)。しかし、欠損バンドがVCMの感受性に関わっている可能性が高いため、今後は遺伝学的に明らかにしたいと考えている。また、このBIVRの出現から約10日間でさらにVCM耐性の強い株に進化している現象は(Fig. 18)、原賀らの報告した臨床例と酷似している<sup>26)</sup>。

さらに、No.5株と同様にVCM耐性のあがった株の多くが、 $\beta$ -lactam薬に感化している現象が報告されている<sup>27)</sup>。この理由は未だに不明であるが、VCM耐性化とpenicillin binding protein 2'の機能異常とは何らかの関連があると推測される。

本症例は、MRSAによる感染と保菌を繰り返しながら、長期間MRSAを保有し、かつVCMが断続的に投与された患者であった。この患者から分離されたMRSAがVCMに暴露される環境で徐々に耐性を獲得し(adaptation resistance)、MRSAからBIVRへ、さらにBIVRよりも耐性度の強い株へと同一患者内で耐性が確認された極めて貴重な症例と考える。

## 5. 総括

$\beta$ -lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR)の出現は、一部のMRSAが持っている細胞壁合成系の亢進と密接に関わっていると考えられる。このBIVRの性質は1978年分離株(日本初のMRSA)で認められている。この株にVCMの暴露はなく、当時は $\beta$ -lactam薬が汎用されていた。この $\beta$ -lactam薬に耐性を有す為にmec遺伝子が導入され、 $\beta$ -lactam薬に親和性の低いPBP2'が産生され、かろうじて細胞壁合成が行われていたと考えられる。このPBP2'は正常のPBP1-4の機能を1つの酵素で賄われればならず、PBP2'の基質であるLipid IIの大量供給で補っていたと考えられる。Lipid IIはVCMのターゲットであり、これが増えれば増えるほどVCM耐性となる。さらに、 $\beta$ -lactam薬は自己融解酵素(autolysine)を誘導することで既存のpeptidoglycanを消化し大量の断片を生じる。これをpeptidoglycan合成に再利用することで、Lipid IIも大量に作られ、結果としてVCM耐性に導かれる。現在は、この耐性メカニズムによってBIVRが生じていると考えられる。

このBIVRにしる、ヘテロVISAにしるVCMのMICが2  $\mu\text{g/ml}$ のMRSAにしる、その耐性度は極わずかである。臨床では、1  $\mu\text{g/ml}$ のMICでは効くが2  $\mu\text{g/ml}$ では効かなくなる症例が多数報告されている。この点が理解されないと上記耐性菌の耐性菌たる所以が理解されない。MICが2  $\mu\text{g/ml}$ の株を治療するには、VCMは1g $\times$ 4回/日を投与しなければならない。Troughは30  $\mu\text{g/ml}$ に達するので除菌は出来るだろうが、腎不全を患者に強いらなければならない。当然、このような状態でVCMに固執する理由はなく他の抗MRSAを選択すれば良い。

問題は、このような症例が詳細に研究されていない事である。現在までに、原賀ら<sup>26)</sup>、高山ら<sup>28,29)</sup>、高田ら<sup>30)</sup>の報告が出てきているが、本症例もこのような問題を解決する糸口になると考える。

## 6. 今後の課題

BIVR の生化学的耐性機構は先行研究によってほぼ解明されたと考えられる。今後は遺伝子について調査し、BIVR たる所以を解明したいと考えている。すでに、VISA 株については、*vra* 遺伝子、*glu* 遺伝子、*rpob* 遺伝子、*warlk* 遺伝子等の細胞壁合成に関わる遺伝子群の変異が報告されているため (Fig.19)<sup>31~33</sup>、これらの変異点を中心に研究を進める予定である。

さらに、臨床学的影響をより詳細に解明する目的で、臨床例を増やす研究をさらに積極的に行う予定である。

## 7. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多大なる御教授を賜りました北里大学大学院 医療系研究科の北里英郎教授と北里大学 北里生命科学研究所 抗感染症薬研究センター及び感染防御学講座の花木秀明教授に謹んで深謝申し上げます。さらに貴重なご助言と御指導を賜りました、北里大学 感染制御研究機構の砂川慶介教授、北里大学 北里生命科学研究所 抗感染症薬研究センターの崔龍洙副センター長と松井秀仁研究員に厚く御礼申し上げます。また、今回の論文作成に対し、多大なる御尽力を頂きました抗感染症薬研究センターの茨田一成研究員、酒井芙美子研究員、壇辻百合香研究員、柳澤千恵研究員、鈴木由美子研究員に厚く感謝申し上げます。

## 8. 引用文献

- 1) Georgopapadakou NH, Smith SA, Bonner DP: Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Jul;22(1):172-5.
- 2) van der Zee A, Roorda L, Hendriks WD, Ossewaarde JM, Buitenwerf J: Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their inclusion in PCR based screening. *BMC Res Notes.* 2011;26:4:150. doi:10.1186/1756-0500-4-150.
- 3) Diana Espadinha, Nuno A. Faria, Maria Miragaia, Luís Marques Lito, José Melo-Cristino, Hermínia de Lencastre, et al. Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. *PLoS One.* 2013; 8(4): e59960. Published online 2013 April 3. doi: 10.1371/journal.pone.0059960
- 4) Reynolds PE, Somner EA: Comparison of the target sites and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs Exp Clin Res.* 1990;16(8):385-9.
- 5) Cegelski L, Kim SJ, Hing AW, Studelska DR, O'Connor RD, Mehta AK, et al: Rotational-echo double resonance characterization of the effects of vancomycin on cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 2002 Oct 29;41(43):13053-8.
- 6) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997; 350: 1668-71
- 7) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin--United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1997 Aug 22;46(33):765-6.

- 8) EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version. 3.0, January 2013. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- 9) Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, et al; Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group: Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis*. 2003 Feb 15;36(4):429-39.
- 10) 花木秀明、山口禎夫:  $\beta$ -ラクタム薬誘導性バンコマイシン耐性 MRSA 株の疫学調査. *感染症学雑誌* 2003;77(7):499-504.
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard M7-A3, 13 no. 25. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1993.
- 12) Haraga I, Nomura S, Nagayama A. The effects of vancomycin and  $\beta$ -lactam antibiotics on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999;18:1624.
- 13) Elion GB, Singer S, Hitchings GH.: Antagonists of nucleic acid derivatives. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* 1954;208:477-88.
- 14) Hanaki H, Yamaguchi Y, Nomura S, Haraga I, Nagayama A, Sunakawa K: Method of detecting beta-lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR). *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23(1):1-5.
- 15) 花木秀明、稲葉陽子、佐々木和美、平松啓一: バンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌の検出方法. *Jpn. J. Antibiotics* 1998 ;51: 521-30.
- 16) Shockman GD, Conover MJ, Kolb JJ, Riley LS, Toennies G.

NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR BACTERIAL CELL WALL SYNTHESIS. J Bacteriol. 1961;81(1):44-50.

- 17) Gilpin RW, Narrod S, Wong W, Young FE, Chatterjee AN. Autolysis in *Staphylococcus aureus*: preferential release of old cell walls. J Bacteriol. 1974 ;119(3):672-6.
- 18) Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995;33:551-5.
- 19) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995;33: 2233-39.
- 20) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Vol. 31. M100-S21. Wayne, Pennsylvania: 2011, CLSI.
- 21) Takesue Y, K. Nakajima, Y. Takahashi, K. Ichiki, M. Ishihara, Y. Wada et al. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 mug/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. J Infect Chemother 2011;17:52-57.
- 22)Steinkraus G, White R, Friedrich L.:Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. J Antimicrob Chemother. 2007;60(4):788-94.
- 23) Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, Raad II, Rolston KV, Young JA, Wingard JR, Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis. 2011;15:52(4):e56-93.

- 24) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 2012. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (21st August 2012, date last accessed)
- 25) 福原 慶, 猪川和朗, 池田佳代, 森川則文, 中土井恵美, 高谷紀子 PK-PD 理論に基づ vancomycin の TDM 支援ソフトウェア (VCM-PKPD) の開発. 2007;24 (4):185-192.
- 26) Haraga I, Nomura S, Fukamachi S, Ohjimi H, Hanaki H, Hiramatsu K, et al: Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn patient-importance of low-level resistance to vancomycin. Int J Infect Dis. 2002;6(4):302-8.
- 27) Hanaki H, Hososaka Y, Yanagisawa C, Otsuka Y, Nagasawa Z, Nakae T, Sunakawa K. Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Infect Chemother. 2007 ;13(2):118-21.
- 28) 高山陽子、吉田一成、山口禎夫、野々山勝人、遠藤忠雄、砂川慶介: Vancomycin が奏効しなかった Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* による感染性心内膜炎の細菌学的検討: 感染症誌 2001;75:473-479.
- 29) Takayama, Y, Hanaki H, Irinoda I, Kokubun H, Yoshida K, Sunakawa K: Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing diminished susceptibility isolated from a patient with infective endocarditis. Int. J. Antimicrob. Agents 2004;22: 567-73.
- 30) Takata T, Miyazaki M, Futo M, Hara S, Shiotsuka S, Kamimura H, et al: Presence of both heterogeneous vancomycin-intermediate resistance and  $\beta$ -lactam antibiotic-induced vancomycin resistance phenotypes is associated with the outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. Scand J Infect Dis. 2013;45(3):203-12.

- 31) Cui L, Neoh HM, Shoji M, Hiramatsu K: Contribution of vraSR and graSR point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1231-34.
- 32) Cui L, Neoh HM, Shoji M, Hiramatsu K: An rpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:5222-33.
- 33) Shoji M, Cui L, Iizuka R, Komoto A, Neoh HM, Watanabe Y, et al. : walK and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2011;55: 3870-81.

## 9. 業績目録

### 【原著論文】

1. Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K; Japanese IPD Study Group (Okada K, Nakano T, Akeda H, Habu M, Yamaguchi E, Komiya K, Kido S, Niizuma T, Arao M, Ishiwada F, Kubota M, Furuno K, Yamaguchi Y, Obinata K, Yoshioka M, Naito T) : Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 2013;21;31(5):845-9..
2. Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Watanabe M, Kamayachi K, Kodama K, Nabetani M, Ikemiyagi M, Yamaguchi Y , Sawaura N: Serum and cerebrospinal fluid S100B, neuron-specific enolase, and total tau protein in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion: A diagnostic validity. *Pediatrics International* 2012;54(1):52-5.
3. 福田哲也、高橋恭久、佐藤利香、黒柳展子、原かおり、井戸彩恵子、山口禎夫:病院薬剤師と看護師における接触感染予防策の意識調査. *日本環境感染学会誌* 2012;27 (3),215-219.
4. Sugaya N, Shinjoh M, Mitamura K, Takahashi T. Keio University Paediatric Influenza Research Group <Yamaguchi Y, et.al>: Very low pandemic influenza A (H1N1) 2009 mortality associated with early

neuraminidase inhibitor treatment in Japan: Analysis of 1000 hospitalized children: J Infect. 2011;63(4):288-94.

5. Yamaguchi Y, Hanaki H, Yanagisawa C, Ikeda-Dantsuji Y, Hashimoto T, Yazaki H, Sugahara K, Yanagisawa T, Kawajiri H, Sato S, Ishizaki A, Tachihara-Sato R, Takahashi Y, Ono T, Kageyama Y, Kawaguchi T, Tamura A, Hagane K, Sunakawa K: Characterization of  $\beta$ -lactam antibiotic-induced VCM-resistant MRSA (BIVR) in a patient with septicemia during long-term vancomycin administration. J Infect Chemother. 2009;15(5):274-8.
6. 菅原恵子、矢崎晴識、佐藤志律江、河尻公樹、柳澤隆司、長田裕次、猪原玉富、山口禎夫： 当院の耐性菌の現状. 臨床検査栃木 2009;4(2):12-7.
7. Barada K, Hanaki H, Yamaguchi Y, Ikeda S, Akama H, Nakae T, Inamatsu T, Sunakawa K : Trends of beta-lactam antibiotic susceptibility in blood-borne methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and their linkage to the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type. J Infect Chemother. 2007;13(4):213-8.
8. Barada K, Hanaki H, Ikeda S, Yamaguchi Y, Akama H, Nakae T, Inamatsu T, Sunakawa K : Trends in the gentamicin and arbekacin

susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *J Infect Chemother.* 2007;13(2):74-8.

9. Hanaki H, Yamaguchi Y, Yanagisawa C, Uehara K, Matsui H, Yamaguchi Y, Hososaka Y, Barada K, Sakai F, Itabashi Y, Ikeda S, Atsuda K, Tanaka H, Inamatsu T, Nagayama A, Sunakawa K: Investigation of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR). *J Infect Chemother.* 2005;11(2):104-6.
10. Hanaki H, Yamaguchi Y, Nomura S, Nagayama A, Sunakawa K: Rapid detection and differentiation method of VanA, VanB and VanC phenotypes in vancomycin-resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23(5):502-5.
11. Hanaki H, Yamaguchi Y, Nomura S, Haraga I, Nagayama A, Sunakawa K: Method of detecting beta-lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR). *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(1):1-5.
12. Hanaki H, Yamaguchi Y, Barata K, Sakai H, Sunakawa K: Improved method of detection of beta-lactam antibiotic-induced VCM-resistant MRSA (BIVR). *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(3):311-3.

13. 山口禎夫、花木秀明、茨田一成、砂川慶介、稲松孝思:VCM と  $\beta$ -lactam 薬が拮抗する MRSA の疫学調査. 感染症学雑誌 2003;77(9):661-666.
14. 花木秀明、山口禎夫: $\beta$ -lactam 薬誘導性 VCM 耐性 MRSA 株の疫学調査. 感染症学雑誌 2003;77(7):499-504.
15. 砂川慶介、野々山勝人、高山陽子、山口禎夫、大石智洋、岩田敏、秋田博伸、佐藤吉壮、生方公子、千葉菜穂子、長谷川恵子. 本邦における 1997 年 7 月以降 3 年間の小児化膿性髄膜炎の動向. 感染症学雑誌 2001;75(11):931-939.
16. 高山陽子、山口禎夫、野々山勝人、遠藤忠雄、砂川慶介、吉田一成. Vancomycin が奏功しなかった Methicillin Resistant Staphylococcus aureus による感染性心内膜炎の細菌学的検討. 感染症学雑誌 2001;75(6):473-479.
17. Yamaguchi Y, Awazu M, Matsuoka S, Maeda J, Tokumura M, Kojima Y, Matsuo N. White coat hypertension in two adolescents. Pediatr Nephrol. 1999;13(1):60-2.

【総説】

1. 山口禎夫 : 伝染性紅斑. 今日の治療指針 2014 (in press) .
2. 宮田一平、佐藤薫、高橋章仁、西尾寿乗、山口禎夫 : 抗インフルエンザ

薬をどう使い分ける?. 小児科臨床 66(3):2013 ; 514-8.

3. 大橋正博、 清益功浩、山口禎夫、津下充 、松原啓太：小児尿路感染症の管理. 小児科臨床 2012 ; 65(3) : 514-18.
4. 山口禎夫、花木秀明、砂川慶介:耐性菌に対する投与計画（耐性化防止を含めて）. 化学療法の領域 2003;9(4):539 - 43.
5. 山口 禎夫、花木 秀明、砂川 慶介： ブドウ球菌食中毒. 臨床検査 2003;47(5)467 - 73.
6. 山口禎夫、花木秀明、砂川慶介:抗菌薬の特徴と使い方のコツ 経口セファロスポリン系薬 .2002;JIM 12(11):1016-19.
7. 花木秀明、山口禎夫、砂川慶介: Topics 注目される MRSA (BIVR) 株と抗 MRSA 治療薬の使用法. 治療 2002;84(9):2459-64.
8. 山口禎夫、野々山勝人、砂川慶介： 話題の感染症肺炎球菌感染症. モダンメディア. 2001;47(50):123-8.

#### 【症例報告・その他】

1. 山口禎夫、花木秀明、岩田敏、砂川慶介:抗緑膿菌活性を有する抗菌薬の継代培養を用いて評価した他系統薬に対する薬剤感受性に及ぼす影響について. 緑膿菌感染症研究会誌 2012;46;90-95.

1. 山口禎夫、花木秀明、福田哲也、小池麻友美、矢崎晴識、佐藤志律江、河尻公樹、柳澤隆司、菅原恵子、森澤雄司、砂川慶介：カルバペネム系抗菌薬を曝露した緑膿菌のフルオロキノロン系、アミノグリコリシド系抗菌薬感受性に対する影響について．緑膿菌感染症研究会誌 2010；44；80-83.
2. 植田恵介、北原望、山口禎夫、石井徹、山口禎夫、黒崎元之：ステロイド投与で改善した薬剤耐性．マイコプラズマ感染症の一例．小児科診療 2010；73(7)：1237-41.
3. 山口禎夫、植田恵介、北原望、石井徹、森澤雄司、花木秀明、砂川慶介：脳梁膨大部に一過性病変を認めた新型インフルエンザ脳症の1例について－栃木県．国立感染研究所感染症情報センター IASR 2009；30(10)：268-269.  
<<http://idsc.nih.go.jp/iasr/rapid/pr3561.html>>
5. 矢崎晴識、山口禎夫、佐藤志律江、柳澤隆司、河尻公樹、菅原恵子、長田祐次、猪原玉富、佐藤利香、大竹恵子、金隆根、植田恵介、塚本絵美、杉森光子、石井徹、谷口洋子、東出正人、泉谷秀昌、花木秀明、砂川慶介：*Yersinia enterocolitica* group の鑑別に苦慮し、治療が遷延したエルシニア腸炎の1例．臨床と微生物 2009；36(4)：95-9.
6. 柳澤隆司、菅原恵子、佐藤志律江、矢崎晴識、浅里功、大貫経一、山口禎夫：環境検査としての *Bacillus Cereus* の汚染調査．臨床検査学会雑誌 栃木 2008；3(2)：63-8.

7. 西村修、辻紘子、舛本暢生、菊地正晃、山口禎夫、桑島成子：先天性サイトメガロウイルス感染症の一症例. 栃木県産婦人科医報 2006;32(2):165-8.
8. 宮崎久義、河野文夫、辻里美、飛世克之、網島優、掛水智子、品川雅明、櫻井芳明、菊池喜博、菊池ひで子、進藤政臣、森哲夫、竹下昌利、橋本浩子、木田寛、吉尾伸之、西原寿代、山崎晋、山口禎夫、三沢美知代、大田壽城、鈴木奈緒子、八木哲也、日比裕子、廣島和夫、白阪琢磨、柏崎正樹、西村美樹、中川義信、岩井朝幸、入江和子、齋藤大治、守分正、小林裕子、古賀満明、山浦幸子、村田淳子、林眞夫、富永薫：院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究 院内感染事例の解析と対策、院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究 平成 17 年度総括研究報告 2006;29-31, 33-7.
9. 宮崎久義、飛世克之、網島優、掛水智子、品川雅明、櫻井芳明、菊池喜洋、菊池ひで子、進藤政臣、森哲夫、清水紀臣、保里直美、木田寛、吉尾伸之、西原寿代、長谷川壽彦、山口禎夫、三沢美知代、大田壽城、鈴木奈緒子、八木哲也、日比裕子、廣島和夫、白阪琢磨、柏崎正樹、西村美樹、中川義信、岩井朝幸、入江和子、齋藤大治、守分正、小林裕子、古賀満明、山浦幸子、村田淳子、林眞夫、富永薫：院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究 院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究 平成 16 年度 総括研究報告書 2005;29-36.

10. 倉辻忠俊、切替照雄、川名明彦、照屋勝治、枝元良広、国方徹也、山西文子、市橋富子、江口八千代、小野瀬友子、黒田恵美、堀井久美、吉田メイ子、佐々口博子、鈴木多美子、斉藤京子、中村正美、鈴木美和、濱敏弘、此崎寿美、宮崎久義、辻里美、飛世克之、網島優、掛水智子、品川雅明、櫻井芳明、菊池喜洋、菊池ひで子、進藤政臣、森哲夫、清水紀臣、橋本浩子、保里直美、木田寛、吉尾伸之、西原寿代、長谷川壽彦、山口禎夫、三沢美知代：院内感染の発症リスクの評価及び効果的対策の開発に関する研究 院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究 平成 16 年度総括研究報告書 2005；15-21, 23.

Fig.1

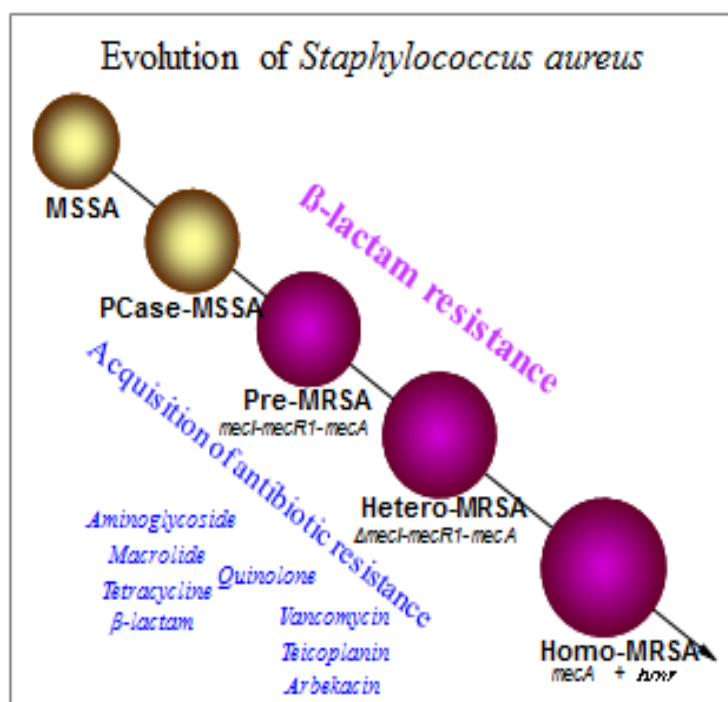


Fig.1. A Schema of evolution of *Staphylococcus aureus* toward acquisition of antibiotic resistance.

注釈: Hetero耐性とは様々な耐性度を有す細胞集団多くは、大多数の感性細胞中に極少数の耐性細胞が存在する。どのような耐性菌であれ、高度耐性化の前期階に必ず出現する。

Fig.2

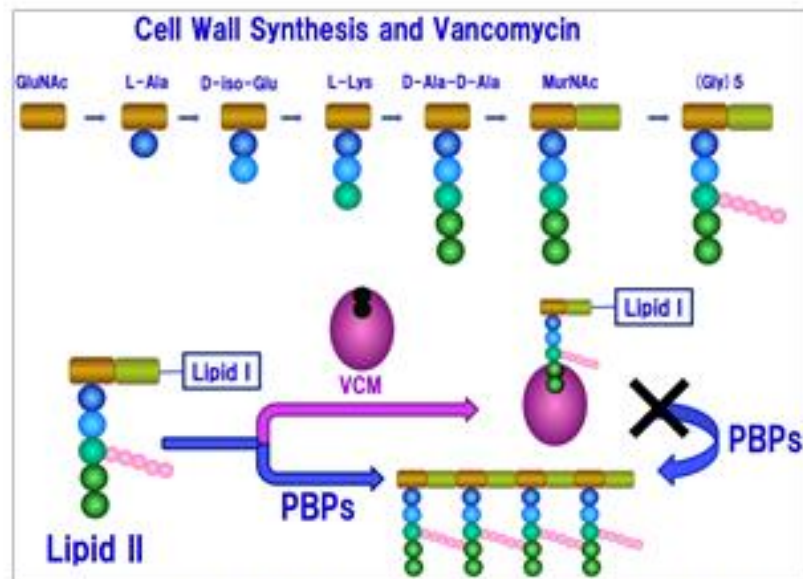


Fig.2. Schematic diagram of cell wall synthesis of *Staphylococcus aureus* and action of vancomycin. Vancomycin binds to D-Ala-D-Ala residues of peptidoglycan, to prevent them from interacting properly with the cell wall cross-linking enzyme.

Fig.3

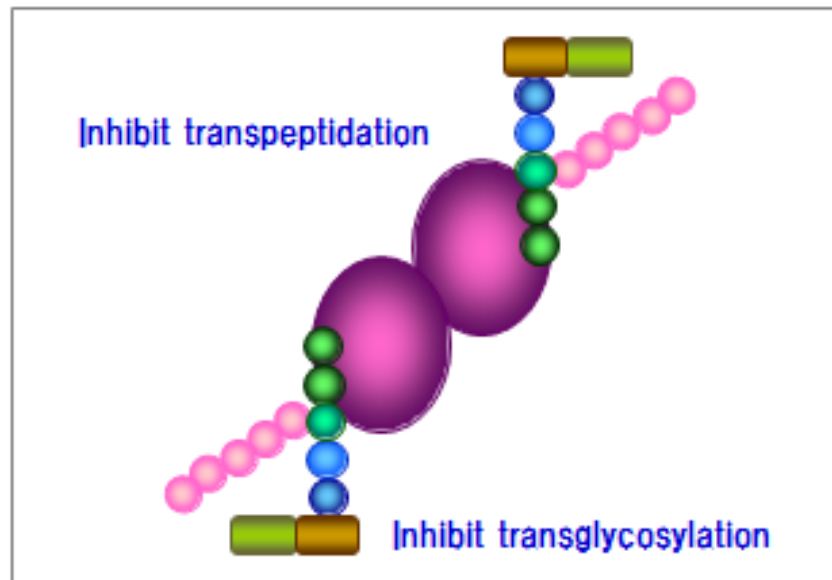


Fig.3. Action mod of vancomycin dimer. Dimerization of vancomycin is believed to promote antimicrobial action because the binding of one monomer to the bacterial cell wall brings a second monomer into proximity with other peptidoglycan ligands, leading to the formation of a chelate with the peptidoglycan, which is believed to inhibit either transglycosylation and transpeptidation reactions.

Fig.4

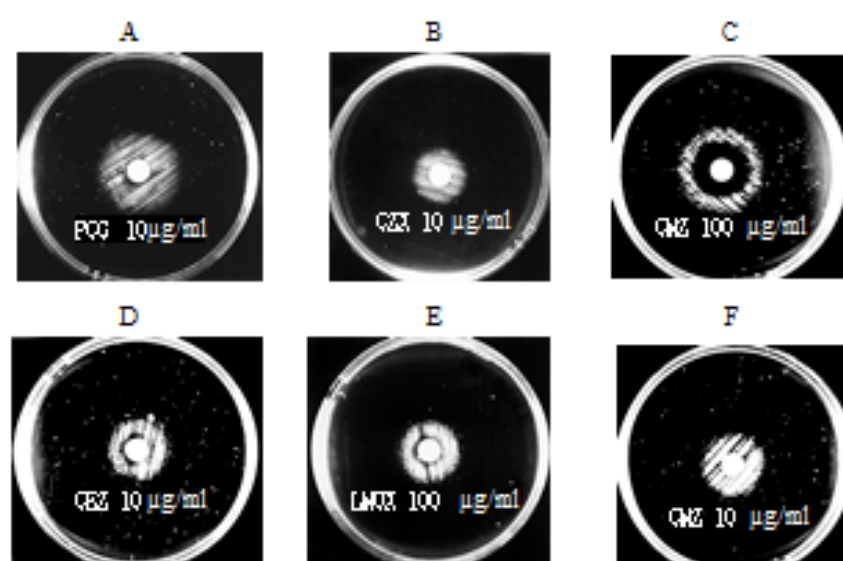


Fig. 4. BIVR strain Fu10 showed a growth around the paper disc which contained beta-lactams. Paper disc contains A) 10 µg/ml of penicillin G (PCG); B) 10 µg/ml of ceftizoxime (CZX); C) 100 µg/ml cefmetazole (CMZ); D) 10 µg/ml cefazolin (CEZ); E) 100 µg/ml of latamoxef (LMOX), and F) 10 µg/ml of cefmetazole (CMZ), respectively. At a high concentration of cefmetazole (100 µg/ml), the growth zone formed a ring surrounding the paper disc.

Fig.5

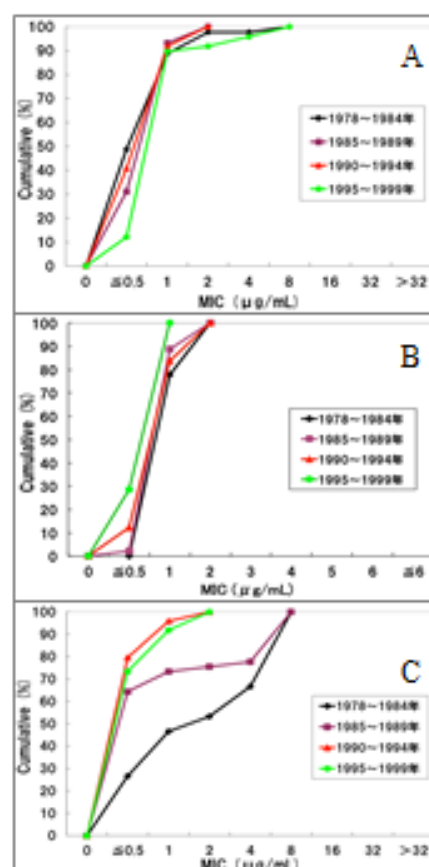


Fig. 5. Cumulative distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) of anti-MRSA drugs according to chronological transition. A, B and C showed accumulation curves of VCM, TEIC, and ABK, respectively. The all tested MRSA strains were isolated from the same institution.

Fig.6

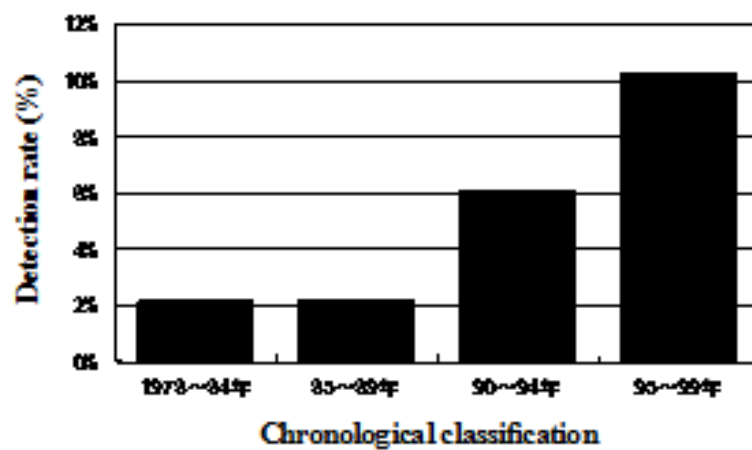


Fig. 6. Detection rate of BIVR among the MRSA over years from 1978 to 1999. The tested MRSA strains from the period of 1978—1999 were isolated in one institution.

Fig.7

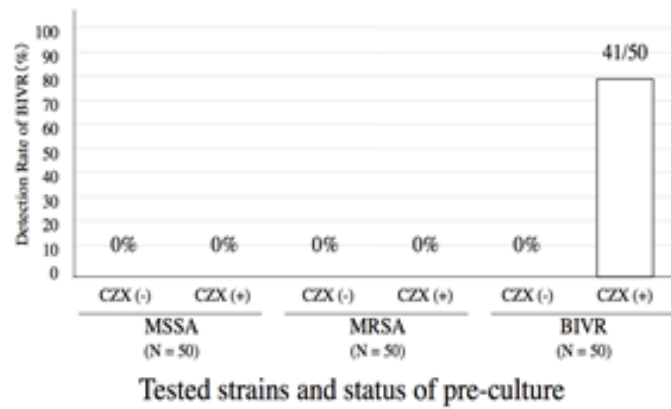


Fig. 7. BIVR phenotype only presented when bacteria were pre-cultured in the presence of low-level  $\beta$ -lactam in some BIVR strain. 50 colonies of each tested strains of MSSA, MRSA and BIVR were pre-cultured in BHI broth with or without 10  $\mu$ g/ml ceftizoxime (CZX), then applied to test BIVR phenotype on Mu3 agar

Fig.8

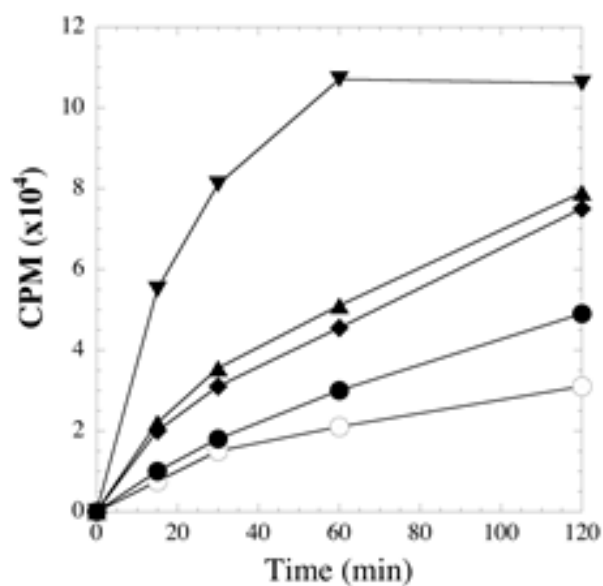


Fig. 8. Effect of ceftizoxime on incorporation of  $^{14}\text{C}$ -N-acetylglucosamin into BIVR strain F10 in the presence of vancomycin. Symbols: ▼, Control (without antibiotics); ○, 4  $\mu\text{g/ml}$  of vancomycin; ●, 4  $\mu\text{g/ml}$  of vancomycin and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  of ceftizoxime; ◆, 4  $\mu\text{g/ml}$  of vancomycin and 1.0  $\mu\text{g/ml}$  of ceftizoxime; ▲, 4  $\mu\text{g/ml}$  of vancomycin and 10  $\mu\text{g/ml}$  of ceftizoxime.

Note that incorporation of  $^{14}\text{C}$ -N-acetylglucosamine into BIVR cell was increased in the co-existence of ceftizoxime and vancomycin in dose dependent manner compared to that of in the presence of vancomycin alone.

Fig.9

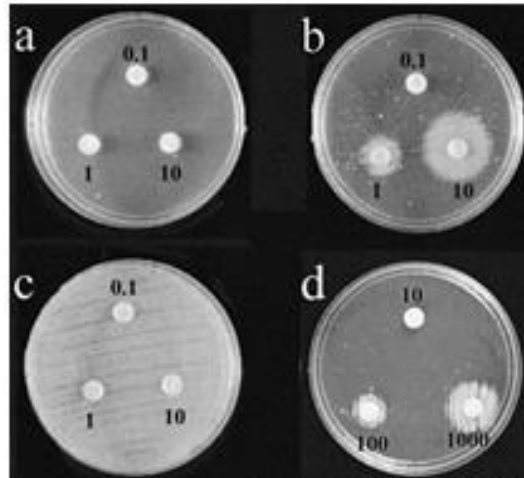


Fig 9. Vancomycin resistance was induced by UDP-GlcNAc-L-Ala-D-iso-Glu-L-Lys. Paper discs: a–c, impregnated with 0.1, 1.0, and 10 µg/ml of ceftizoxime; d, impregnated with 10, 100, and 1000 µg/ml of uridine-diphosphate-N-acetylglucosamyl-l-alanyl-d-isoglutamyl-l-lysine.

MRSA strain that was not BIVR did not grow on Mfu3 agar (a), but BIVR grew around the paper discs impregnated with 0.1, 1.0, and 10 µg/ml of ceftizoxime (b). MRSA with a high resistance to vancomycin grew anywhere on the surface of the Mfu3 agar (c), but, in short incubation periods (about 12–15 h), almost all of these strains also showed growth around the paper disc. The use of uridine-diphosphate-N-acetylglucosamyl-l-alanyl-d-isoglutamyl-l-lysine instead of the  $\beta$ -lactam antibiotic produced the same results as the  $\beta$ -lactam antibiotic (d). These results are evidence that the induced resistance mechanism in BIVR occurs by its recycling of mucopeptides as the peptidoglycan material of *S. aureus*.

Fig.10

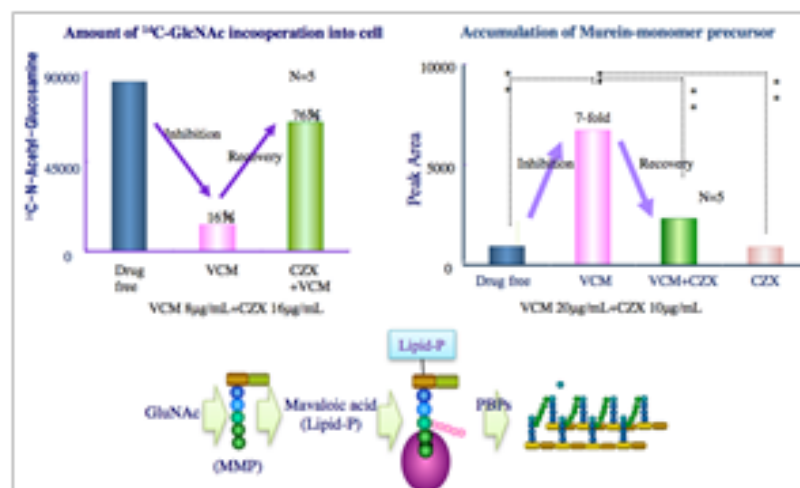


Fig.10. Inhibitory effect of vancomycin on the cell wall synthesis and ability of cell wall synthesis can be recovered by  $\beta$ -lactam induction.

Fig.11

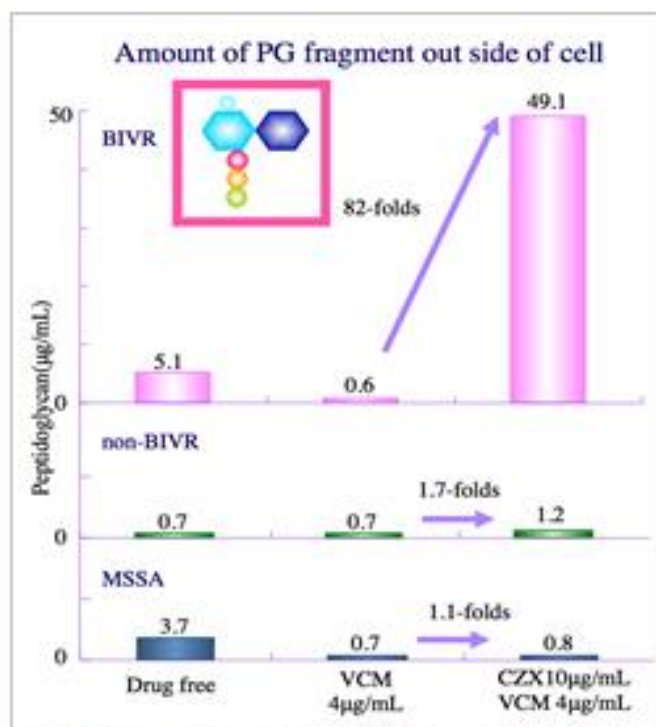


Fig 11. Release of peptidoglycan(PG) from cells to medium was significantly increased by adding 1/256MIC of ceftizoxime in BIVR strain.

Fig.12

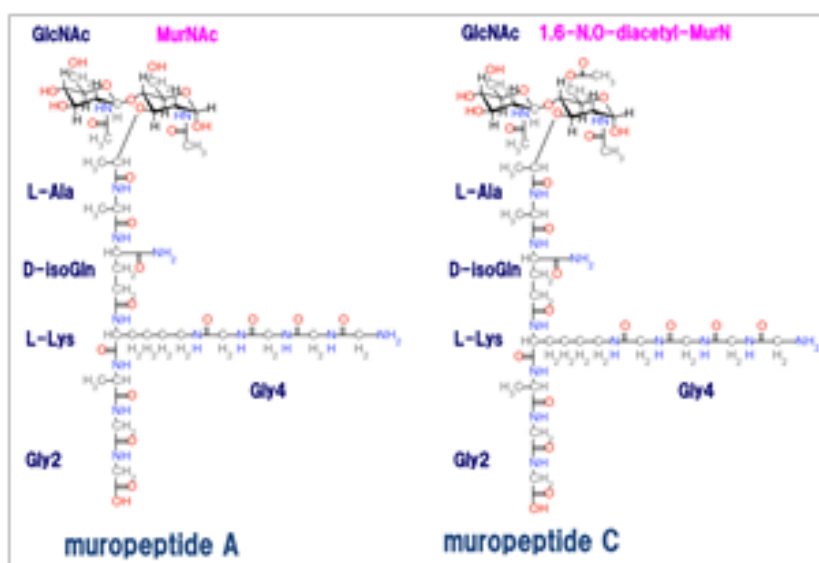


Fig 12. Representative peptidoglycan fragments which can induce vancomycin resistance (Ref xxx)

Fig.13

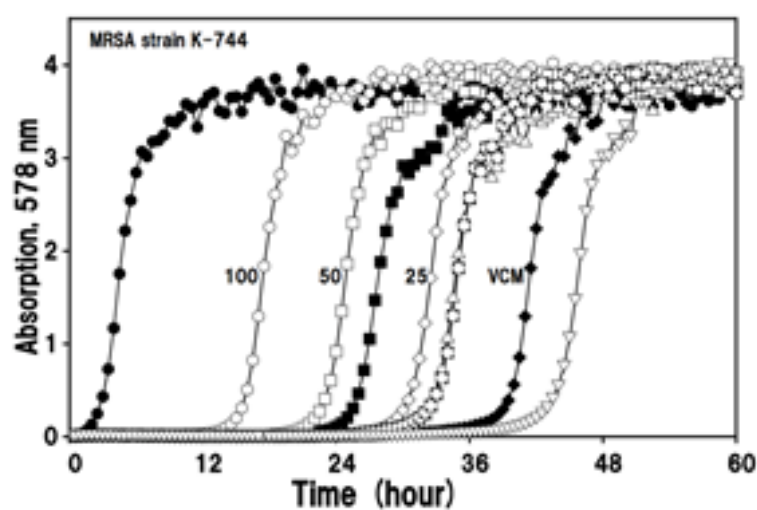


Fig.13. Muropeptide A induced vancomycin resistance. The time for starting re-growth in the BHI medium which contains vancomycin became shortening (indicates resistance) by adding muropeptide A in a dose dependent manner.

Fig.14

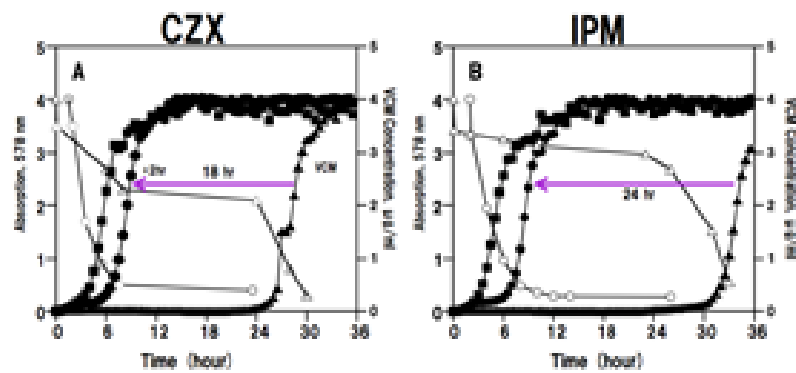


Fig.14. Rapid depletion of free vancomycin in medium in the presence of beta-lactam antibiotics, which allows cell regrowth in BIVR.

Fig.15

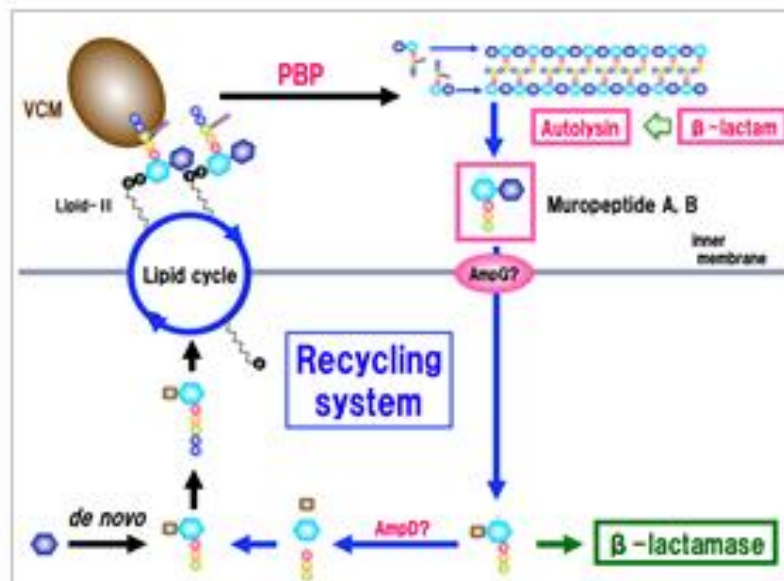


Fig.15. Model schema of beta-lactam-inducing vancomycin resistance in BIVR strain.

Fig.16

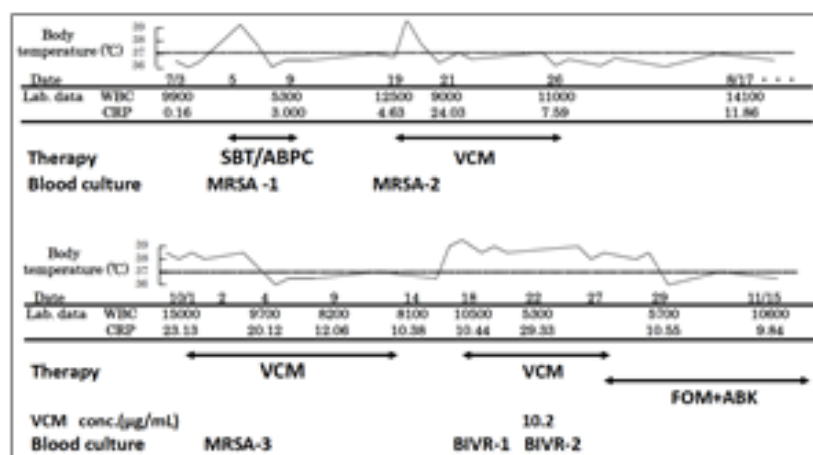


Fig. 16. Clinical course of a patient with BIVR infection. MRSA-1 and MRSA-2 were isolated before the first VCM administration. MRSA-3 was obtained during the first VCM therapy, and the MRSA-4 (BIVR-1) was taken between the first and second VCM therapies. The MRSA-5 (BIVR-2) was isolated during the second VCM administration.

Abbreviation: SBT/ABPC, sulbactam/ampicillin; VCM, vancomycin; FOM, fosfomycin; ABK, arbekacin; WBC, White blood cell; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; BIVR,  $\beta$ -lactam antibiotic-induced VCM-resistant MRSA.

Fig.17

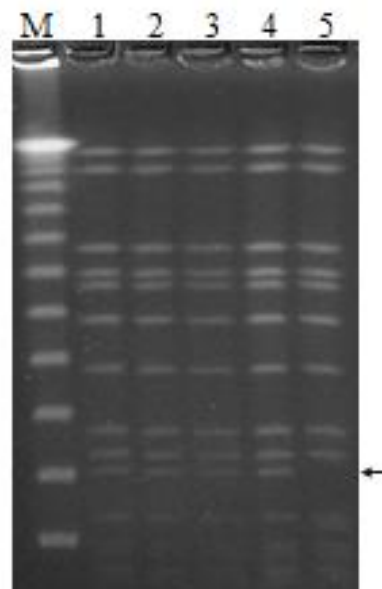


Fig. 18. Pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA from patient's MRSA isolates after *Sma*I digestion. Lane 1, Molecular marker. Lane 2-4, strains MRSA-1 to MRSA-3. Lanes 5 to 6, strains MRSA-4 (BIVR-1) and MRSA-5 (BIVR-2). Note that all strains showed identical band pattern, except for BIVR-2 strain that had one band missing as indicated by an arrow.

Fig.18

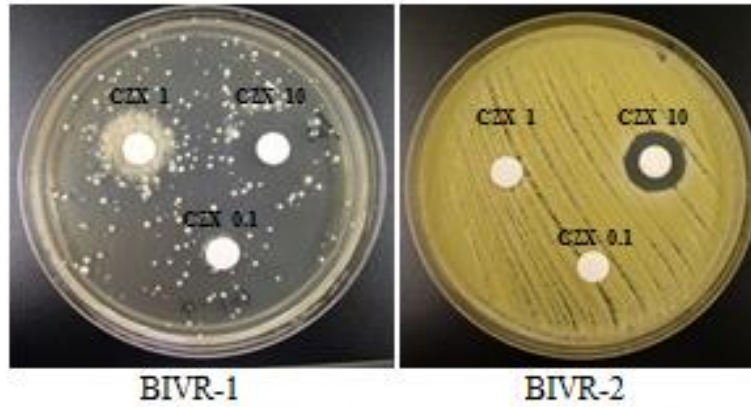


Fig. 17. BIVR phenotypic test with Mu3 agar plate for BIVR-1 and BIVR-2 strains. Note that BIVR-1 strain showed typical BIVR phenotype (growing round ceftizoxime disk), while BIVR-2 showed full growth on Mu3 agar). When the vancomycin concentration on Mu3 agar increased to 5  $\mu\text{g/ml}$  instead of 4  $\mu\text{g/ml}$ , it showed BIVR phenotype (data not shown) as similar to BIVR-1 strain on Mu3 agar plate with 4  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin.

Fig.19

Mutation prevalences of *vraSR*, *graRS*, *walRK*, *rpoB* and *clpP* among the worldwide VISA

Mutation prevalence of <i>vraSR</i> , <i>graRS</i> , <i>walRK</i> , and <i>clpP</i> among the worldwide clinical VISA isolates											
Strains	Year	Country	VISA MIC (mg/L)	Nonsynonymous mutations							
				<i>RpoB</i> (Watanabe)	<i>VraS</i>	<i>VraR</i>	<i>GraR</i>	<i>GraS</i>	<i>ClpP</i>	<i>WalR</i>	<i>WalK</i>
Ma20	1996	Japan	8	H401Y	ISN	-	N375S	-	-	-	-
MI (H0P5827)	1997	USA	8	R140S	-	-	-	-	-	-	V494L
NZ (H0P5836)	1997	USA	8	H401Y	A280V	-	S79F	-	-	-	I287Y, I301V
PC (H0P6297)	1998	USA	8	Q468L	-	-	-	-	-	-	A367D
IL	2001	USA	8	H401R	-	-	-	-	-	-	D496N
AMC1094	1997	Korea	8	-	-	A117V	-	-	-	-	-
903799-V	1999	UK	8	H401N, S529L	-	-	-	-	M1V	-	V156Q
903700-W	1999	UK	8	-	-	-	-	-	-	-	R122K, V366M, A400T
LIM2	1995	France	8	H401N, S529L	-	-	-	-	-	-	-
90340	1998	France	8	H401N, S529L	-	-	-	-	-	-	-
20300	1998	South Africa	8	H401N, S529L	-	-	-	-	-	-	-
BR.1	1998	Brazil	8	H401N, I527M	-	-	-	-	-	-	R122K, A400T
BR.2	1998	Brazil	8	H401N, I527M	-	-	-	-	-	-	R122K, A400T
BR.3	1998	Brazil	8	H401N, I527M	-	-	-	-	-	-	R122K, A400T
BR.4	1998	Brazil	8	H401N, I527M	-	-	-	-	-	-	R122K, A400T
BR.5-1	1998	Brazil	8	H401N, I527M	-	-	-	-	-	-	R122K, A400T
SAMR.56	1999	France	8	-	-	-	-	-	-	-	-
H0P6654	1998	USA	4	-	-	-	-	-	-	-	T492K
H0P7920	1998	USA	4	R484H	-	-	-	-	H03R	-	-
H0P7930	1999	USA	4	D120N	GV	-	-	-	-	-	-
H0P8926	2000	USA	4	-	-	-	-	-	-	-	R122K, T492K
H0P9643	2000	USA	4	-	-	-	-	-	-	-	-
H0P9513	2000	USA	4	-	P127S	-	-	-	R152H	-	L10F, S407T
H0P9643	2000	USA	4	D120N	GV	-	-	-	-	-	V145G
H0P9662	2000	USA	4	D471N, S486L	-	-	-	-	-	-	Ins. A159N, A160Y
H0P9735	2000	USA	4	Y137F	-	-	-	-	-	-	A400T
H0P9740	2000	USA	6	H401D	-	-	-	-	-	-	V388I
H0P9737	2000	USA	4	H401D	-	-	-	-	-	-	G275V
LY-1999-01	1998	Oman	4	R406S	-	-	-	-	-	-	N48K, R122K, A400T
LY-1999-05	1998	Oman	4	-	-	-	-	-	-	-	N48K, R122K, A400T
H0P10540	2000	USA	8	V135A, A477V	-	-	-	-	-	-	-
H0P10267	2000	USA	4	D471V, A473S, A473S, E478D	-	-	T11A	-	-	-	-
C2000001227	2000	USA	8	-	A104V	-	-	-	-	-	A240T
NKS 118	2002	USA	4	H401N, S529L	-	-	-	-	-	-	F338S
NKS126	2000	USA	4	H401N	-	-	-	-	-	-	-
P1V44	1999	Belgium	16	H401N, S529L	-	-	-	-	-	-	-
H0P12864	2003	USA	8	P519L	-	-	-	-	-	-	-
H0P13057	2004	USA	8	H401Y	-	-	E15K	-	-	-	R292C
H0P13036	2004	USA	8	-	T104A	-	-	-	-	-	-
KSCT19571199	2007	Thailand	4	H401N, S529L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KSCT19571221	2007	Thailand	4	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KSCT20371223	2007	Thailand	4	H401N, S529L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

The results: 71.1, 61.5, 7.7, 10.3, and 20.5% of VISA strains harbored mutations in *rpoB*, *walRK*, *clpP*, *graRS* and *vraSR*, respectively, and 35 out of 38 VISA strains (92.1%) carried at least one of these mutations.

Note: There are 3 VISA strains that do not carry mutation in above four genes

Table 1. Detection of growth zone of BIVR strain F10 around antibiotic disk on M3 agar using 46 commercialized antibiotic disks\*

Antibiotic ( $\mu\text{g/disk}$ )	24 h	48 h	Antibiotic ( $\mu\text{g/disk}$ )	24 h	48 h
Benzylpenicillin (10)	-	+	Cefaclor (30)	+	+
Oxacillin (1)	+	+	Cefixime (5)	+	+
Ampicillin (10)	+	+	Cefixim (10)	+	+
Amoxicillin (25)	+	+	Cefepodoxime (10)	+	+
Meclocillin (75)	-	+	Cefibuten (30)	+	+
Pipercillin (100)	-	+	Cefixim (10)	+	+
Ticarcillin (75)	-	+	Cefixim (5)	+	+
Carbenicillin (100)	-	+	Cephalexin (30)	-	-
Sulbenicillin (30)	+	+	Cefuroxim (30)	-	-
Ampicillin /Sulbactam (20)	+	+	Cefuroxim (30)	-	+
Amoxicillin/Clavulanic acid (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Ticarcillin/Clavulanic acid (35)	-	+	Cefixim (30)	+	+
Cefixime (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Ceftriaxole (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Cefotax (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Cefixim (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Cefepoxime (75)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Lamoxef (30)	+	+	Cefixim (75)	-	-
Flemoxef (30)	-	+	Cefixim (30)	+	+
Carumonam (30)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Imipenem (10)	+	+	Cefixim (30)	+	+
Penicillin (10)	+	+	Cefiximide (75)	-	-
Meropenem (10)	+	+	Cefepoxime/Sulbactam(75/30)	-	-

+, Bacteria growth zone was seen around antibiotic disk; -, No growth zone appeared.

Table 2. The detection rate of BIVR from clinical isolated MRSA

	Number of strain	Number of BIVR (%)	P values
Total	986	54 (5.5)	
Blood	81	12 (14.8)	< 0.001
Non-blood*	905	42 (4.6)	< 0.001

\*. Details of non-blood: Catheter (central venous line) 1/13 (7.6%); Respiratory system 28/585 (4.9%); Urinary system 2/45 (4.4%); Stool 1/51 (2.0%); Skin or wound 1/52 (1.9%); Pus 8/125 (6.4%); Others 1/34 (2.9%).

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics for MRSA isolated from the patient

Strain	Isolation date (m/d)	MIC ( $\mu$ g/ml)*				
		OXA	IPM	ABK	VCM	TEIC
MRSA-1	7/5	> 128	32	1	1	1
MRSA-2	7/19	> 128	32	1	1	1
MRSA-3	10/2	> 128	32	1	1	1
BIVR-1	10/18	> 128	32	1	2	1
BIVR-2	10/22	32	1	0.5	4	4

\*: OXA, oxacillin; IPM, imipenem; ABK, aztreonam; VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin.