

原 著

新たに分離されたりネゾリド耐性MRSA株の分子遺伝学的解析

水野秀一^{1, 2)}

山口大学大学院医学系研究科ゲノム・機能分子解析学分野(微生物学)¹⁾ 宇部市南小串1丁目1-1(〒755-8505)
山口大学医学部附属病院検査部²⁾ 宇部市南小串1丁目1-1(〒755-8505)

Key words : リネゾリド, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, 耐性株

和文抄録

山口大学医学部附属病院において, 世界的に見ても報告が少ないリネゾリド (linezolid; LZD) に耐性を示すMRSAが分離された. 患者は急性骨髄性白血病の既往をもち, 造血幹細胞移植後にMRSAによる感染症を繰り返していた. LZD耐性MRSAはLZDの投与合計103日後の糞便から検出され, その最小発育阻止濃度は $32 \mu\text{g/ml}$ であった. 臨床分離株において, LZD耐性菌が誘発されることを証明した報告はこれまでに見あたらない. そこで, LZD投与中に分離されたLZD耐性株と, LZD投与以前および投与中止後に同患者より分離されたMRSA株を分子遺伝学的に比較し検討した.

異なる時期に分離されたMRSAの3株について, 薬剤感受性の比較 (antibiogram), *S. aureus*に特異的なspa遺伝子の配列の比較 (spa typing) およびパルスフィールド電気泳動 (PFGE) によりクロナリティーを解析した. その結果, LZD投与中の耐性株とLZD投与以前の株は同一クローンであり, この初期株が合計103日間のLZD長期投与により耐性化したと考えられた. また, LZD投与中止後に検出された株は別クローンであることから, LZD治療中に新たなMRSA株による感染も起こしていたことが判明した. 次にLZD耐性株の変異領域を調べるために, 23S rRNA domain Vの塩基配列解析を行い, 耐性株がG2576T変異を持つことを見い

だした. さらに分離したLZD耐性株の増殖速度は感受性株と比較して劣り, 薬剤感受性試験の際の推奨された培養時間内では判定に注意を要し, 培養期間の延長が必要なことが明らかとなった.

これらのことから, LZD耐性株を誘発する危険性があるLZDの長期投与は謹むべきであり, その耐性株の薬剤感受性の判定には, 十分な発育を確認した後の注意深い判定が必要と考えられた.

緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は, 分離率および分離数が多く, 医療関連施設における施設内感染の主要な原因菌として位置づけられている. さらに, MRSAは多くの薬剤に耐性を示すために使用できる治療薬が少なく, 有効な薬剤はバンコマイシン (vancomycin; VCM), LZDなど一部の薬剤に限られ, これらに耐性を生じることは臨床の現場において深刻な状況を意味する.

LZDはオキサゾリジノン系抗菌薬に属し, その作用機序はタンパク合成開始時の50S, 30S-mRNAおよびfMet-tRNAによる70S開始複合体の形成阻害である¹⁾. 主にグラム陽性菌に抗菌活性を有し, 国内におけるVRE感染症 (Vancomycin-resistant *Enterococci*; VRE) あるいはMRSA感染症の重要な治療薬に位置づけられている.

LZD耐性菌は, *Enterococcus*属において, バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecium*

(Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*; VREF) が, 2000年に米国で初めて臨床の現場より分離された²⁾. 以後, VREのLZD耐性株は, 世界各所で報告されている³⁾. 一方 *S. aureus* においては, 2001年に最初のLZD耐性菌が報告されたが⁴⁾, その後, 国内外で数例の報告⁵⁻⁸⁾ があるに過ぎない.

LZDに耐性化を生じる機序は, LZDの標的部位である23S rRNA domain Vに存在する中央ループ付近の点突然変異であり, 実験的に *Enterococcus* についてG2576T, C2512T, G2513T, C2610G, G2505A変異が確認されている⁹⁾. しかし, 実際に臨床分離株で報告される変異は限られており, VREとMRSAともにG2576Tがほとんどを占め³⁾, MRSAではT2500Aが別に報告されているだけである¹⁰⁾. 本研究において検出されたLZD耐性株は, これまでに報告された中では最も頻度が高いG2576T変異であったが, LZD長期投与によって, LZD耐性MRSAが誘発されることを臨床分離株において初めて見出した. また, LZD耐性株の増殖速度は感受性株と比較して劣るため, 薬剤感受性試験における通常の培養時間内では, 判定に注意を要することが明らかとなった.

方 法

1. 患者の治療経過とLZD耐性MRSA株の分離

患者は急性骨髄性白血病を基礎疾患にもつ38歳女性. 2004年に発症し, 繰り返し再発を認め, 3回目

の再発後の2006年4月に造血幹細胞移植を施行されたが, 非寛解のままとなっていた. 2006年4月よりMRSAによる気道感染を繰り返し, さらに同菌による副鼻腔炎, 眼内炎およびカテーテル関連菌血症を併発した. 2006年5月よりVCMの薬疹のため, LZDによる治療 (1,200mg/day) が選択された. LZD投与合計103日目の糞便よりLZD耐性MRSAが分離された. このためLZD投与は中止となり, VCM, アルベカシン (arbecacin; ABK) 治療へ変更された. LZD投与中止2ヵ月後の糞便から再びMRSAが分離された. 患者はその後転院し, 2008年8月に永眠された.

図1に2006年4月以降の気道感染, 副鼻腔炎, 眼内炎およびカテーテル関連菌血症における各種検査材料からのMRSA検出状況を示す. 検査材料は, 喀痰, 鼻汁, 角膜分泌物, 糞便, IVHカテーテル, 血液と多種に及んだ. このMRSAに対してLZD治療 (1,200mg/day) が選択され, 図1の上部に示すLZDの経静脈投与あるいは経口投与が断続的に行われた. このLZD治療開始から投与合計103日目にLZD耐性MRSA (March. 3. 2008株) が糞便より分離された. この時点でLZD投与は中止され, VCM, ABK治療に変更された後は, しばらくの間MRSAは検出されなかった. しかしLZD投与中止から2ヵ月後に再び糞便からMRSAが分離された. この時の株はLZD感受性であった (May. 8. 2008株). そこでLZD投与以前に血液より分離されたMRSA株 (May. 4. 2006株) を含めた3株を用いて以下の解析を行った.

2. 使用菌株

患者にLZDが投与される以前の血液培養分離株: May. 4. 2006株, LZD投与中の糞便培養分離株: March. 3. 2008株, LZD投与中止2ヵ月後の糞便培養分離株: May. 8. 2008株について検討した. *S. aureus* 標準菌株: ATCC29213を対象菌株として使用した.

3. 薬剤感受性試験 (antibiogram)

薬剤感受性試験は, LZD, VCM, ABK, テイコプラニン (teicoplanin; TEIC), ミノサイクリン (minocycline; MINO), スルファメトキサゾール/トリメトプリム (trimethoprim-sulfamethoxazole

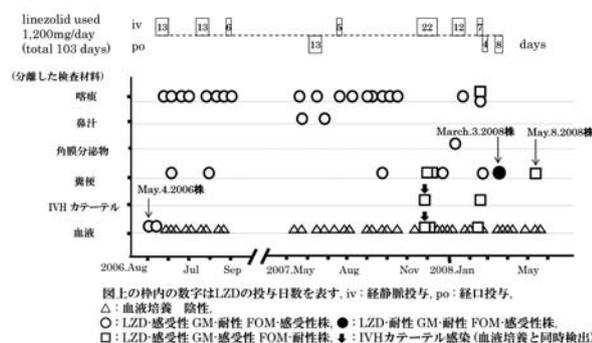


図1 患者のLZD投薬期間と各種検査材料より分離されたMRSAの薬剤感受性パターン

患者のLZD投薬期間 (上) と各種検査材料からのMRSA分離結果 (下) を示す. 患者から検出された全てのMRSAは, 薬剤感受性結果よりGM耐性FOM感受性の○●群とGM感受性FOM耐性の□群の2群に分類された. 矢印は今回検討した3株を採取した時点を示す.

;ST), フォスフォマイシン (fosfomycin; FOM), ゲンタマイシン (gentamicin; GM), エリスロマイシン (erythromycin; EM), クリンダマイシン (clindamycin; CLDM), レボフロキサシン (levofloxacin; LVFX), クロラムフェニコール (chloramphenicol; CP) およびオキサシリン (oxacillin; MPIPC) を対象として施行した. いずれの薬剤も Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドライン¹¹⁾ に従い微量液体希釈法にて測定し, *S. aureus*標準菌株: ATCC29213を同時接種して精度管理を行った. LZDは, 微量液体希釈法と平行してE-test (Sysmex bioMerieux) を用いたディスク拡散法による最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) の測定¹²⁾ を行った.

4. protein A遺伝子X領域の塩基配列解析 (spa typing)

*S. aureus*の特異的タンパク質であるprotein Aをコードするspa遺伝子のX領域を, primer 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') と1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3') (GenBank accession no. J01786) にてPCR増幅した. DNA増幅断片は3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用して塩基配列解析後, spa typingデータベース (<http://www.ridom.de/spaserver/>) によりspa typingを行った^{13, 14)}.

5. パルスフィールド電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)

最初にlow-melting-agarose (Bio-Rad) で作製した培養菌のアガロースプラグを制限酵素Sma Iにより消化した¹⁵⁾. その後CHEF DR II システム (Bio-Rad Laboratories) を使用して11~14°C, 5.3~49.9secパルス時間, 200V, 24時間の条件で電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色後に紫外線照射下で撮影を行った.

6. 増殖速度の比較

McFarland 0.5濁度 (*E. coli*で 1.5×10^8 cfu/mlに相当する) に調整した菌液を羊血液寒天培地 (BBL) に塗抹し, 35°C, 18時間の好気培養後に発育したコロニーの形態を観察した.

7. 23S rRNA domain VのPCR増幅と塩基配列解析

*S. aureus*の23S rRNA domain V (*Escherichia coli* numbering) の2,280~2,699bpを増幅した. primerは 5'-GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3' (*S. aureus*の23S rRNA geneの2280~2297baseに相同するupper primer; GenBank accession no. X68425) と5'-ATCCCGGTCCTCTCGTACTA-3' (*S. aureus*の23S rRNA geneの2680~2699baseに相同し, 相補的なlower primer; GenBank accession no. X68425) を用いた¹⁰⁾.

PCR条件は, 94°C 5分のDNA一本鎖化の後, denaturation94°C 30秒, annealing55°C 30秒, extension72°C 1分を32cyclesの後にfinal extension 72°C 10分を行った. 増幅産物は3% agarose gelで電気泳動し419bpの増幅産物を分離した¹⁰⁾.

増幅産物は精製の後, 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) で塩基配列解析を行い, *E. coli*の配列アライメントにより変異位置を決定した¹⁶⁾.

結 果

1. 薬剤感受性試験 (antibiogram)

LZD投与前に血液より分離したMay. 4. 2006株, LZD投与中に糞便より分離したMarch. 3. 2008株, LZD投与中止2ヵ月後に糞便より分離したMay. 8. 2008株のMICを表1に示す. 3株のMPIPCのMICは $> 2 \mu\text{g/ml}$ であり, *S. aureus*の同定結果と併せてMRSAであることが確認された.

この3株のうちのMarch. 3. 2008株は, LZDに対するMICが $32 \mu\text{g/ml}$ であった. 一方でMay. 4. 2006株とMay. 8. 2008株のLZDに対するMICは, いずれも $2 \mu\text{g/ml}$ であった (図2). LZD耐性のMarch. 3. 2008株において, 微量液体希釈法の判定は18時間培養後の発育が不良であるため, 発育が十分となる48時間後に行った. ディスク拡散法の判定においても, 寒天培地上に不明瞭な発育域 (trailing region) を生じたため, 48時間培養後の判定を採用した. 次に, この3株の薬剤感受性パターン (antibiogram) をGMとFOMの2薬剤に注目し比較した. LZD耐性のMarch. 3. 2008株とLZD投与前のMay. 4. 2006感受性株のantibiogramはGM (R), FOM (S) と一致し, 同一クローンであると考えられた. 一方で, 投与後のMay. 8. 2008感受性株はGM (S), FOM (R)

と前2株と明確に異なり、別クローンであると考えられた(表1)。

2. protein A遺伝子X領域の塩基配列解析 (spa typing)

薬剤感受性パターン (antibiogram) で示唆されたクロナリティーの結果を、さらに遺伝子レベルで確認するためにspa typingを実施した。spa typingは*S. aureus*に特異的タンパク質であるprotein Aをコードするspa遺伝子X領域を塩基配列解析して、24bpの繰り返し挿入配列の回数と配列を比較することで菌株のクロナリティーを確認する方法である^{13, 14)}。この方法を用いた結果では、投薬前のMay. 4. 2006感受性株とMarch. 3. 2008耐性株の挿入配列は2回繰り返しのt118 typeで同一クローンであった。また投与後のMay. 8. 2008感受性株は10回繰り返しのt002typeで別クローンであった。この結果は、前述のantibiogramの結果と一致した(表2)。

3. パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

次に、クロナリティーを確認する上で現在の

Gold StandardとされているPFGE分析を行った¹⁵⁾。*S. aureus*の染色体DNAを切断する制限酵素*Sma* Iは、他の酵素(*Kpn* I, *Eco*RI, *Xho* I, *Bam*HI, *Not* I)よりも30~1,500bpの範囲で識別能力は優れるため、今回はこれを使用した¹⁵⁾。結果は、May. 4. 2006感受性株(レーン1)とMarch. 3. 2008耐性株(レーン2)とは、相似値(% similarity) 100%の同一クローンであった。この2株と比較して、May. 8. 2008感受性株(レーン3)との相似値は30%以下であり別クローンであることが示唆された(図3)。この結果は、前述のantibiogramおよびspa typingの結果と一致した。

4. 増殖速度の比較

細菌の増殖を規定する因子には、pHや温度、酸素濃度、湿度、水圧、浸透圧、放射線などの物理的因子と、炭素、窒素、硫黄、リン酸、微量元素、ビタミンなどの生化学的因子が存在する。今回これらの因子は同じ条件として、羊血液寒天培地に同時接種、35°C 18時間培養後の発育コロニーの形態観察を行った。結果、別クローンが示唆されたMay. 4.

表1 MRSA 3株の薬剤感受性

antimicrobial agent MIC (μg/ml)	May.4.2006株	March.3.2008株	May.8.2008株
linezolid	2 (S)	32 (R)	2 (S)
gentamicin	> 8 (R)	> 8 (R)	≤ 2 (S)
fosfomycin	4 (S)	≤ 2 (S)	> 16 (R)
vancomycin	1 (S)	1 (S)	≤ 0.5 (S)
teicoplanin	≤ 0.5 (S)	≤ 0.5 (S)	≤ 0.5 (S)
arbekacin	2 (S)	2 (S)	≤ 0.5 (S)
minocycline	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)
trimethoprim / sulfamethoxazole	≤ 40 (S)	≤ 40 (S)	≤ 40 (S)
erythromycin	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)
clindamycin	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)
levofloxacin	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)
chloramphenicol	4 (S)	8 (S)	> 16 (R)
oxacillin	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)

S: 感受性 R: 耐性
 March.3.2008株のLZDのMICは32μg/ml(耐性)であったがVCM, ABK, TEICなどの抗MRSA薬には感受性を示した。3株はGM, FOXIの薬剤感受性の違いにより2群に分類され、May.4.2006株とMarch.3.2008株は同一群に属した。

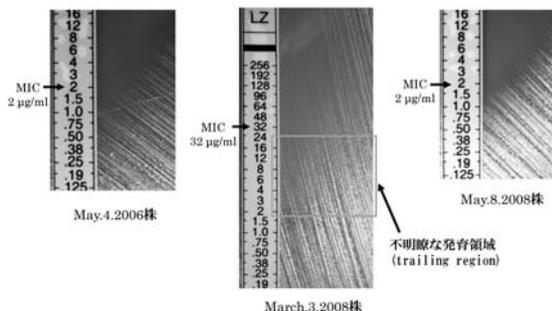


図2 ディスク拡散法 (E-test; Sysmex bioMerieux) によるLZDのMIC測定
 LZDのMIC: 32 μg/mlを示したMarch. 3. 2008株は、LZD耐性MRSAに特徴的な不明瞭な発育領域 (trailing region) を認めた。(培養温度35°C, 48時間培養)

表2 MRSA 3株のspa typing

	May.4.2006株 (LZD感受性)	March.3.2008株 (LZD耐性)	May.8.2008株 (LZD感受性)
sequence (repeat succession)	GGGAGAGCATTAAAGGCTTTCG ⁹⁽¹¹⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽²⁾	GGGAGAGCATTAAAGGCTTTCG ⁹⁽¹¹⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽²⁾	GGGAGAGCATTAAAGGCTTTCG ⁹⁽²⁰⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCG ⁹⁽²⁰⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽¹⁷⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽¹²⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽¹²⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽¹⁷⁾ AAGGAGATGCGAAMAAATTTGCT ⁹⁽¹⁶⁾
repeat succession	r11+r25	r11+r25	r26+r28+r17+r34+r17+r20+r17+r12+r17+r16
spa type	t118	t118	t002

spa typingの結果を示す。3株は薬剤感受性の結果と同様に、May.4.2006株とMarch.3.2008株が118, May.8.2008株は002に分類された。

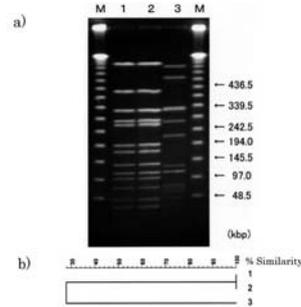


図3 MRSA 3株の*Sma* I 消化genomic DNAのPulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns
 a) PFGEの泳動像。b) May. 4. 2006株(レーン1)とMarch. 3. 2008株(レーン2)は、相似値(% similarity)が100%。この2株に対するMay. 8. 2008株(レーン3)の相似値は30%以下であり、別クローンが示唆された。

2006株とMay. 8. 2008株のLZD感受性株は同等の増殖速度であった。一方、May. 4. 2006株と同一クローンが示唆された March. 3. 2008LZD耐性株は、発育の遅れた小コロニーが散在した発育形態を呈し、増殖速度は前2株と比較して明らかに劣っていた(図4)。

考 察

今回、山口大学医学部附属病院において、世界的に見ても報告が少ないLZDに耐性を持つMRSAが分離された。そこでLZD耐性MRSA株について分子遺伝学的解析を行った。

5. 23S rRNA domain Vの塩基配列解析

染色体DNAの点突然変異によるLZD耐性機序の解明のために、LZD耐性菌において変異をよく認める23S rRNA geneのdomain V中央ループ付近のPCR増幅と塩基配列解析を行った。この結果と*E. coli*の同領域の配列アライメントにより、March. 3. 2008耐性株の2576位にG→T変異の存在を検出した(図5)。また、この変異とは別にMRSAで報告されているT2500Aの変異¹⁰⁾は存在しなかった。May. 4. 2006感受性株とMay. 8. 2008感受性株においては、いずれの変異も存在しなかった。

このLZD耐性MRSAについてMekらは、*S. aureus*に5～6箇所が存在する¹⁷⁾ 23S rRNAのそれぞれの変異位置をPCR法により特定している¹⁰⁾。われわれも今回の分離株についてMekらのprimerを用いてそれぞれの23S rRNA領域のPCR増幅を行い^{10, 18, 19)} 変異部位の特定を試みたが、全ての増幅産物を得ることができず特定には至らなかった。しかし図5に示す塩基配列解析におけるGおよびTのTotal量比がおおよそ1:1であることから推定すると、5～6箇所のうちの半分程度が変異していることが考えられた。

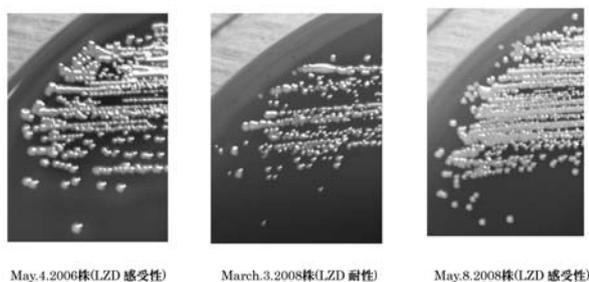


図4 MRSA 3株の増殖速度の比較 (羊血液寒天培地, 35°C 18時間培養後のコロニー形態) March. 3. 2008株 (LZD 耐性) の35°C 18時間培養後のコロニー形態は、発育の遅い小コロニーが散在し、他2株と比較して増殖速度は明らかに劣った。

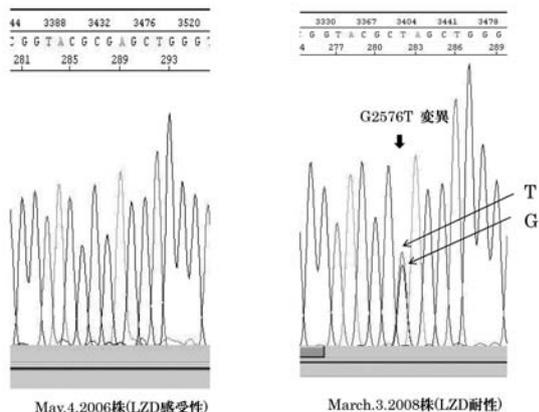


図5 t118クローンにおけるLZD感受性株とLZD耐性株の23S rRNA domain V変異領域付近の塩基配列解析結果 March. 3. 2008株 (LZD耐性) の2576位 (*E. coli* numbering) にG→T点突然変異が確認された。May. 4. 2006株 (LZD感受性) に変異は存在しなかった。

このLZD耐性の安定性について、PillaiらはMIC 64 μ g/mlの分離株を使用して抗菌剤の入らない培地上で15回の連続継代培養を行い、LZDのMICに変化を生じなかったことから、変異した23S rRNAが安定であることを報告している¹⁸⁾。しかしMekらは、同様の連続継代培養をさらに30回から60回行い、MICが16 μ g/ml (初代培養菌) →8 μ g/ml (30回) →2 μ g/ml (60回) と耐性から感受性に変化し、変異箇所の数も4→2→1箇所と減少したことを報告した⁵⁾。これはLZDの選択圧がなくなると感受性株が選択されてくることを示し、耐性菌が出現した際のLZD使用中止が、耐性菌の選択的増殖の抑制により効果的に働くことを示している。しかし反面、MIC16→8 μ g/mlに至る継代回数は30回と長く、60回の継代においても1箇所の変異が存在した。これは過去にLZD耐性菌を検出した患者あるいは長期投与を受けた患者が、耐性菌の再出現する素因をもつ菌株を保有しているキャリアーであることも意味している。以上のことよりLZD治療を行う際には、患者の過去のLZD治療歴、投与期間歴を確認することが肝要と思われた²⁰⁾。

今回LZD耐性MRSAが検出された患者は、急性骨髄性白血病による造血幹細胞移植を行い、その後非寛解のままMRSAによるさまざまな感染を繰り返して、合計103日のLZD長期投与の後にLZD耐性菌が検出された。この患者のLZD投与前に血液よ

り分離されたLZD感受性株とLZD耐性株のspa typingはt118で一致し、PFGE型別の相似値からも同一クローンであることが遺伝子レベルで確認された。さらに治療期間内に検出されたMRSAのすべての菌株についてantibiogramを比較したところ、全ての株が2つのグループに区別され、これにspa typingおよびPFGE型別の結果を加味すると以下のことが考察された。

この患者は、2006年5月ごろより当初コロナイゼーションしていたt118 cloneによる感染を繰り返し、この治療にLZDが長期に投薬された。

さらに患者は2007年11月にIVHカテーテル感染を引き起こし、このときのIVHカテーテル培養検査において、新たなt002 clone株が初めて20コロニーが分離された(図1)。その後は、定着した2つのクローンによる感染を繰り返し、2008年3月に検出されたLZD耐性株は、長期にLZDの選択圧が加わっていたt118 cloneであった。さらにLZDの投薬が中止された2ヵ月後に糞便より検出されたLZD感受性株は長期の選択圧を受けていないt002 cloneであった。LZD投薬中止後にt118 cloneが検出されなかった理由としては、LZD耐性化はタンパク質合成に関係する23S rRNAの変異であることから、発育に有利なt002 cloneがより優勢に培地に発育して釣菌に影響を与えたことが考えられた。さらに、LZDの投薬が中止された生体内では、t002 cloneの方がt118 cloneよりも環境への適応性が高いことも推定された。実際に今回検出された耐性株と感受性株の発育性を血液寒天培地上で比較したところ、耐性株の増殖速度の明らかな遅延が認められた(図4)。加えて、LZD耐性菌の増殖速度の遅延により、薬剤感受性試験を行った寒天培地上に不明瞭な発育域を生じた(図2)。ディスク拡散法によるLZD感受性測定は、CLSIドキュメント¹¹⁾では16~20時間培養後に発育域を透過光にて目視判定することが記載されている。しかし実際にわれわれが分離した耐性菌では、18時間判定よりも48時間後に判定した方が発育の終末点の判断が容易で優れていた。またCLSIでは、LZDの耐性が確認された場合はMIC法で確認することを推奨している。このため、われわれは微量液体希釈法によるMIC測定も同時に行ったが、この判定においても48時間後の判定が優れていた。判定時間の延長は、VCMのMIC測定において

も同様に有効であることが知られており、CLSIドキュメントにおけるブドウ球菌希釈法のVCMの判定時間は、規定の16~20時間ではなく延長された24時間が定められている¹¹⁾。VCM耐性は生育に必須な細胞壁の構成成分であるD-Ala-D-AlaをD-Ala-D-Lacにすることで獲得しているが、そのため生育の遅延がみられる。LZD耐性菌も生育に必須なタンパク質合成にかかわるrRNAに変異を持つことから、生育が遅延し、MIC等の判定にVCMと同様の処置が必要であることが考えられる。このためLZDの判定時間は、規定されている16~20時間判定ではなく、24時間までの延長と48時間後に十分な発育を確認する必要性が考えられた。

今回のLZD耐性MRSA臨床分離菌の分子遺伝学的解析により、臨床の現場でのMRSAのLZD耐性化が明らかとなった。今後、LZD耐性菌の出現を未然に防ぐためにも、LZD投与前にはLZD先行投与を確認し、投与期間は2週間以内に留めることが肝要と考えられた。加えてLZD耐性菌が検出された患者は、LZD耐性菌の保菌者として取り扱われることが必要である。またLZD投与期間中は、薬剤感受性試験によるMICの変化を常に監視することも必要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導頂きました山口大学大学院医学系研究科臨床検査・腫瘍学分野(臨床検査医学)日野田裕治教授、山口大学大学院医学系研究科病態制御内科学分野(内科学第三)谷澤幸生教授、同 有好浩一助教、北里大学生命科学研究科抗感染薬研究センター長花木秀明先生、山口大学大学院医学系研究科ゲノム・機能分子解析学分野(微生物学)白井陸則教授、ならびに同 長谷川明洋准教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) Livermore DM. Linezolid in vitro : mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* 2003 ; 51 (Suppl. S2) : ii9-ii16.
- 2) Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham

- MB, Kelkar S, DenBesten K, Quinn JP. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001 ; 357 : 1179.
- 3) Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 2004 ; 39 : 1010-1015.
- 4) Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering Jr RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001 ; 358 : 207-208.
- 5) Meka VG, Gold HS, Cooke A, Venkataraman L, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Jenkins SG. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2004 ; 54 : 818-820.
- 6) Peeters MJ, Sarria JC. Clinical Characteristics of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Med Sci* 2005 ; 330 : 102-104.
- 7) 小野由可, 菊池 賢, 平松啓一. Linezolid耐性MRSAの遺伝学的検討. 第83回日本感染症学会学術講演会抄録. 感染症学雑誌 2009 ; 83 : 200.
- 8) 壇辻百合香, 花木秀明, 竹末芳生, 賀来満夫, 朝野和典, 三嶋廣繁, 福地邦彦, 本田順一, 柳原克紀, 二木芳人. 同一施設の2症例から分離された耐性変異が異なる2株のLinezolid耐性MRSA. 第83回日本感染症学会学術講演会抄録. 感染症学雑誌 2009 ; 83 : 200.
- 9) Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. Resistance to linezolid : characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45 : 2154-2156.
- 10) Meka V G, Pillai S K, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami P C, Eliopoulos G M, Moellering Jr R C, Gold H S. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004 ; 190 : 311-317.
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Wayne, Pennsylvania, 2010 ; 60-68.
- 12) Huang MB, Baker CN, Banerjee S, Tenover FC. Accuracy of the E Test for Determining Antimicrobial Susceptibilities of *Staphylococci*, *Enterococci*, *Campylobacter jejuni*, and Gram-Negative Bacteria Resistant to Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 3243-3248.
- 13) Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 5442-5448.
- 14) Shopsis B, Gomez M, Montgomery S O, Smith D H, Waddington M, Dodge D E, Bost D A, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth B N. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 3556-3563.
- 15) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J. Genomic DNA Fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis as an Epidemiological Marker for Study of Nosocomial Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 2690-2695.
- 16) Leach K L, Swaney S M, Colca J R, McDonald W G, Blinn J R, Thomasco Lisa M, Gadwood R C, Shinabarger D, Xiong L, Mankin A S. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* 2007 ; 26 : 393-402.

- 17) Wada A, Ohta H, Kulthanan K, Hiramatsu K. Molecular cloning and mapping of 16S-23S rRNA gene complexes of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1993 ; 175 : 7483-7487.
- 18) Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Ferraro MJ, Gold HS. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* 2002 ; 186 : 1603-1607.
- 19) Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell DJ, Robbins M. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003 ; 51 : 186-191.
- 20) Pai M P, Rodvold K A, Schreckenberge P C, Gonzales R D, Petrolatti J M, Quinn J P. Risk Factors Associated with the Development of Infection with Linezolid and Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 2002 ; 35 : 1269-1272.

Molecular Genetic Analysis of Linezolid — and Methicillin — Resistant *Staphylococcus Aureus*

Hidekazu MIZUNO^{1, 2)}

1) Department of Microbiology (Genomics and infectious Disease Control and Prevention) , Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 2) Department of Clinical Laboratory, Yamaguchi University Hospital, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

A strain of linezolid-resistant MRSA was isolated from a patient with acute myeloid leukemia after hematopoietic stem cell transplantation in the third relapse. The MIC to linezolid of the MRSA isolate was 32 μ g/ml. PCR amplification and DNA sequence analysis of domain V region of 23S rRNA demonstrated a G2576T mutation in the linezolid-resistant MRSA isolate. Pulsed-field gel electrophoresis, spa typing and antibiogram analysis showed the genetical similarity of the linezolid-resistant MRSA isolate to the linezolid-susceptible strain isolated from the patient before linezolid therapy. These results indicate that linezolid-resistant MRSA was induced under the selective pressure of prolonged linezolid therapy in the linezolid-susceptible MRSA isolate. Moreover, the growth of the linezolid-resistant MRSA isolate was slower than that of the linezolid-susceptible MRSA isolate, and incubation took at least 48 hours for the susceptibility test of a linezolid-resistant MRSA isolate. These results indicate that long term linezolid therapy should be avoided and the susceptibility test of linezolid should be carefully performed.