

研究経過報告書

1. 研究課題名 栄養要求性変異株 (Small-Colony Variants) に対する薬剤感受性試験方法の確立
2. 研究代表者氏名 上條 途夢
3. 研究発表

なし

4. 研究実績

【はじめに】

栄養要求性変異株 (Small-Colony Variants ; SCVs) は発育が遅く、特定の栄養素を発育に必要とする変異株の総称である。様々な栄養を要求する SCVs が世界中で報告されているものの、国内の施設で長期間にわたって集計された報告はなく、検出される SCVs の菌種や要求する栄養素の傾向は不明である。また、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が既定する方法で薬剤感受性試験を実施する場合、SCVs は発育不良となることが多く、薬剤耐性菌の判定も困難である。

本研究では 2015 年から 2022 年の間に臨床検体から分離され、培地へ非典型的な発育を示した 88 株を対象とし、SCVs の菌種と要求する栄養素を調べ、*Staphylococcus* 属のヘミン要求性株に対する薬剤感受性試験方法を検討した。

【要求する栄養素の特定】

MALDI Biotyper (ブルカー・ジャパン) を用いて 88 株の菌種を同定した。栄養要求性試験では、菌液を塗布したミュラー・ヒントン培地に 10 mg/mL のチミジン、10 mg/mL のヘミン、1 mg/mL のメナジオン、100 mg/mL のオレイン酸を 10 μ L を染み込ませたブランクディスクを設置し、35°C、好気条件で培養した。一晚培養後、ディスク周囲に発育の増強を認めたものを要求する栄養素とした。CO₂ 要求性に関してはミュラー・ヒントン寒天培地に摂取した菌株を 5% CO₂ 条件と好気条件で一晩培養し、発育性の相違を観察した。

図 1 に示す通り、88 株の菌種の内訳は、*Staphylococcus aureus* が 30 株 (34.1%)、*Enterococcus* 属が 27 株 (30.7%)、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) が 22 株 (25.0%)、*E. coli* が 6 株 (6.8%) だった。また、要求する栄養素の内訳は、チミジンが 25 株 (28.4%)、CO₂ が 14 株 (15.9%)、オレイン酸が 8 株 (9.1%)、ヘミンが 4 株 (4.5%) だったが、29 株 (33.0%) については要求する栄養素を特定できなかった。

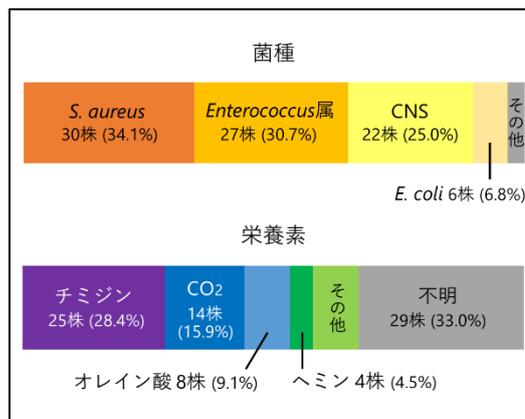


図 1 対象 88 株の菌種と要求する栄養素の割合

【ヘミン要求性株における感受性試験方法の確立】

栄養要求性試験で特定されたヘミン要求性株は *Staphylococcus epidermidis* SH6450、*S. epidermidis* SH6557、*Staphylococcus lugdunensis* SH6894、*S. epidermidis* SH6903 の 4 株だった。この 4 株はいずれも *Staphylococcus* 属であり、CLSI が既定する薬剤感受性試験方法は同一であるが、既定に従った培地を用いる場合、発育不良になることが予想され、測定値が正しい薬剤耐性を反映しているか不明である。そこで、*Staphylococcus* 属のヘミン要求性株における薬剤感受性試験方法の確立のため、さらなる検討を

行った。

はじめに、ヘミン要求性株の発育が増強される最適なヘミン濃度を検討した。ヘミンを 0、0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$ 添加したミュラー・ヒントンプロスに菌液を加え、 35°C で振盪培養を行い、その濁度変化を増殖曲線として描出した (図 2)。野生株として使用した *S. aureus* ATCC 25923 は、添加したヘミン濃度が高いと増殖速度が低下したことから、高濃度のヘミンは発育を阻害すると予想された。ヘミン未添加の場合、いずれのヘミン要求性株も *S. aureus* ATCC 25923 と比較して増殖速度は著しく遅かった。しかし、*S. epidermidis* SH6450、*S. lugdunensis* SH6894、*S. epidermidis* SH6903 はヘミン 0.1 $\mu\text{g/mL}$ または 1 $\mu\text{g/mL}$ の添加により増殖速度の改善を認めた。一方、ヘミンを 10 $\mu\text{g/mL}$ 添加した場合、*S. epidermidis* SH6450、*S. epidermidis* SH6557、*S. epidermidis* SH6903 はほとんど発育しなかった。

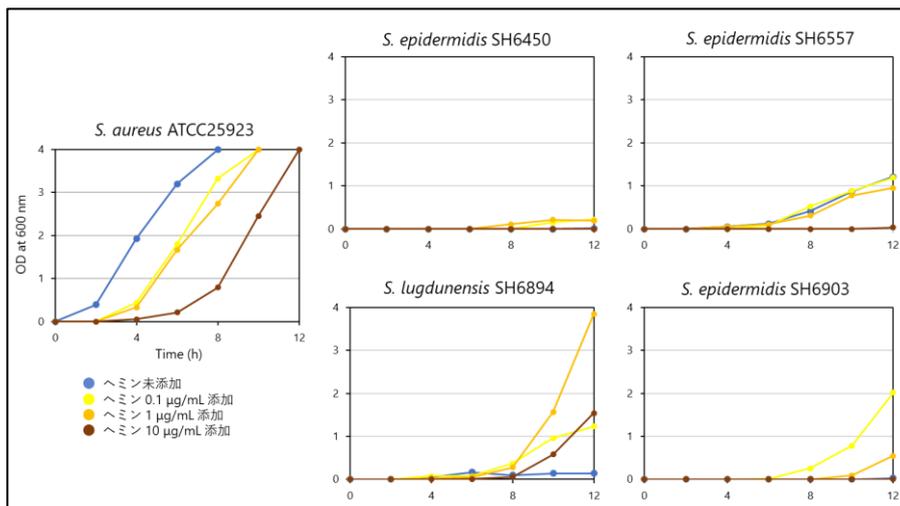


図 2 ヘミン要求性株の増殖曲線

この結果を踏まえ、*Staphylococcus* 属のヘミン要求性株に対する薬剤感受性試験方法を検討した。微量液体希釈法による薬剤感受性試験はマイクロスキャン Pos MIC 1J (ベックマン・コールター) を用いて実施し、ヘミンを 0.1 $\mu\text{g/mL}$ または 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加した際の MIC の変化を調べた。得られた薬剤感受性試験の結果を表 1 にまとめ、CLSI の判定基準で感性和判定される測定値の背景を青、耐性と判定される測定値を赤で表した。*S. epidermidis* SH6450 はヘミン未添加時には発育せず、ヘミン 0.1 $\mu\text{g/mL}$ または 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加時には発育を認めた。*S. lugdunensis* SH6894 はヘミン添加による MIC の変化は無かったが、*S. epidermidis* SH6557 と *S. epidermidis* SH6903 はヘミンの添加によりエリスロマイシンの MIC が増加した。なお、野生株として用いた *S. aureus* ATCC 25923 はヘミン添加による MIC の変化は無かった。

表 1 ヘミン要求性株の薬剤感受性試験結果

添加ヘミン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>S. epidermidis</i> SH6450			<i>S. epidermidis</i> SH6557			<i>S. lugdunensis</i> SH6894			<i>S. epidermidis</i> SH6903		
	0	0.1	1	0	0.1	1	0	0.1	1	0	0.1	1
薬剤	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
ペニシリンG	非発育	<=0.12	<=0.12	8	8	8	>8	>8	>8	8	4	8
アンピシリン	非発育	<=2	<=2	8	8	8	>8	>8	>8	8	8	8
セファゾリン	非発育	<=2	<=2	8	8	8	>16	>16	>16	4	<=2	<=2
エリスロマイシン	非発育	<=0.25	<=0.25	<=0.25	2	>4	>4	>4	>4	<=0.25	<=0.25	>4
クリンダマイシン	非発育	<=0.25	<=0.25	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
バンコマイシン	非発育	1	1	<=0.5	<=0.5	2	<=0.5	1	1	<=0.5	<=0.5	1
オキサリリン	非発育	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	>2	>2	>2	>2	<=0.25	2	>2
メチシリン耐性 or 感性	判定不可	感性	感性	感性	感性	耐性	耐性	耐性	耐性	耐性	耐性	耐性
<i>mecA</i> 遺伝子の保有		+			+			+			+	

Staphylococcus 属はメチシリン耐性であるか否かが臨床的に重要である。*mecA* 遺伝子を保有している場合にメチシリン耐性となるが、ルーチン検査では CLSI の基準を用いて薬剤感受性試験でオキサシリンに耐性を示した場合にメチシリン耐性と判定する。今回の 4 株は特異プライマーを用いた PCR 法で *mecA* 遺伝子を検出したため、メチシリン耐性株である。*S. epidermidis* SH6557 と *S. epidermidis* SH6903 はヘミン未添加時にはメチシリン感性和と判定されたが、前者はヘミン 1 µg/mL、後者はヘミン 0.1 µg/mL 添加によってメチシリン耐性と正しく判定された。しかし、*S. epidermidis* SH6450 はヘミン 1 µg/mL 添加時もメチシリン感性和と誤判定された。

【今後の展望】

申請者の所属する検査室には、さらに 4 株の *Staphylococcus* 属のヘミン要求性株が保存されている。これらの株についてもヘミンを添加した薬剤感受性試験を実施し、得られた測定結果が妥当であるか確認する。さらに、次世代シーケンスを用いたゲノム解析を実施し、薬剤耐性遺伝子の保有状況と薬剤感受性試験の結果が一致するか確認することで、*Staphylococcus* 属のヘミン要求性株における薬剤感受性方法を確立したい。また、ゲノム解析で得られた情報から、ヘミン代謝に関連する遺伝子の変異を確認することで、ヘミン要求性 SCVs が生じるメカニズムを明らかにしたい。

本研究ではヘミン要求性株の薬剤感受性試験方法を検討したが、CO₂ 要求性株とオレイン酸要求性株に関する薬剤感受性試験方法も確立されていない。そのため、今回用いた手法を応用し、これらの株に対する検討を進めたい。また、要求する栄養素を検討した 88 株のうち 29 株は要求する栄養素を特定できなかった。これまでに報告されている主要な栄養素は検証したため、これまでに報告のない新規の栄養素を要求する可能性も考慮し、さらなる解析を進めたい。