

東邦大学審査学位論文（博士）

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の
daptomycin に対する感受性変化に関する
細菌学的要因の解析

東邦大学大学院理学研究科 生物分子科学専攻

金坂 伊須萌

目次

1. 緒言	1
2. 材料および方法	10
2.1 試験菌株	10
2.2 抗菌薬感受性試験	10
2.3 <i>In vitro</i> における感受性復帰株の作製	11
2.4 Pulsed-field gel electrophoresis 解析	11
2.5 <i>mprF</i> 遺伝子解析	12
2.6 透過型電子顕微鏡による細胞壁の測定	13
2.7 Population Analysis	15
2.8 DAP に対する耐性化頻度の測定	15
3. 結果	17
3.1 抗菌薬感受性試験	17
3.2 Pulsed-field gel electrophoresis 解析	17
3.3 <i>mprF</i> 遺伝子変異	18
3.4 DAP に対する感受性変化による MRSA 細胞壁厚さの比較	18

3.5 <u>Population Analysis</u> による耐性細胞集団の変化	19
3.6 <u>DAP</u> に対する <i>In vitro</i> 感受性復帰株の耐性化頻度	20
4. 考察	22
5. 結語	30
謝辞	31
参考文献	32
発表論文および学会発表	45
Figure	50
Table	57

1. 緒言

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は医療関連感染を起こす代表的な菌であり、院内で分離される多剤耐性菌として最も分離頻度が高い多剤耐性菌である[1]。MRSA は細胞壁合成阻害薬であるペニシリンの実用化から始まる長期間の抗菌薬使用により生み出された多剤耐性菌であり、その歴史は古い。1940年代に臨床でペニシリンが使用されると、*S. aureus* はすぐにペニシリン分解酵素をコードするプラスミド性のペニシリナーゼ遺伝子 (*bla*) を獲得し、ペニシリンに耐性を示すようになった。現在、臨床において分離される MRSA を含む大部分の *S. aureus* がペニシリンに耐性を示している[1]。さらに、1960年代にはペニシリンに耐性化した *S. aureus* の治療薬として開発されたペニシリナーゼに難分解性のβ-ラクタム系抗菌薬であるメチシリン等が使用されたが、ペニシリン低親和性のペニシリン結合タンパク (PBP2') をコードする *mecA* 遺伝子を含む SCC*mec* (Staphylococcal cassette chromosome *mec*) を獲得し、翌1961年にイギリスで初めてメチシリンにも耐性を示す MRSA が出現した[2]。世界で初めて MRSA が報告されてから既に50年以上経過しているものの、依然として世界各国に分布、蔓延しており、2013年に Centers for

Disease Control and Prevention (CDC) は抗菌薬耐性菌に関する報告書を公開し、人の健康に対する微生物の脅威を Urgent Threats, Serious Threats, Concerning Threats の 3 つのカテゴリーに分類し、MRSA を Serious Threats とした[3]。さらに、2017 年には World Health Organization (WHO) も人類の健康に最も大きな影響を与えるとして、新規抗菌薬が緊急に必要な抗菌薬耐性菌として MRSA を挙げ警鐘を鳴らしている[4]。

現在、日本国内において MRSA 感染症治療に使用できる抗 MRSA 薬はグリコペプチド系抗菌薬であるバンコマイシン (vancomycin ; VCM) およびテイコプラニン (teicoplanin ; TEIC) 、アミノグリコシド系抗菌薬であるアルベカシン (arbakacin ; ABK) 、オキサゾリジノン系抗菌薬であるリネゾリド (Linezolid ; LZD) 、環状リポペプチド系抗菌薬であるダプトマイシン (daptomycin ; DAP) の 5 薬剤である[5]。これら抗 MRSA 薬は各系統で様々な作用機序を持ち、MRSA 感染症に対する治療薬として使用されているが、既に国内外において各々の抗 MRSA 薬に耐性を示す MRSA が出現している[6-8]。MRSA 感染症に対する特効薬であった VCM においても、1996 年に日本において VCM に中等度耐性を示す vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) が報

告された[9]。当該株は、耐性遺伝子を外部から獲得したものではなかったが、2002年にはVCM耐性 *Enterococcus* sp.が保有する耐性遺伝子 *vanA* をプラスミドの形で保有する vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) が検出されている[10]。また、*S. aureus* は他の抗MRSA薬に対しても様々な方法で耐性を獲得している。ABKは細胞質内のリボソームに作用するが、細胞質に不活性化酵素を出現させることにより細胞内に取り込まれたABKを不活化し、リボソームとの結合を阻害することで耐性化することが明らかとなっている[11]。LZDではリボソーム内で70S開始複合体の形成を阻害することで抗菌力を発揮するが、70S開始複合体の形成に関与する23S rRNA遺伝子のドメインV領域に変異が生じることにより耐性化することが報告されている[12]。これらMRSAの抗MRSA薬に対する耐性化により、当該薬において十分な治療効果が得られないことから、治療に難渋することが報告されており[13]、臨床上極めて深刻な問題となっている。

DAPは *Streptomyces roseosporas* の発酵産物から分離された天然抗菌物質であり[14]、グラム陽性菌に対して強い活性を持つ[15]。本薬剤は新しく開発されたユニークな作用機序を有する環状リポペプチド系抗菌薬であり、国内で使

用できる抗 MRSA 薬としては最も新しい薬剤である。作用機序は既存の抗菌薬と異なり、 Ca^{2+} 濃度依存的に細胞膜に結合してミセル体を形成し、細胞膜を貫通することによって脱分極を惹起し、抗菌活性を発現すると考えられている

(Figure 1) [16]。本作用機序を持つ DAP は細胞壁を破壊せずに細菌を死滅させることから、発熱物質であるタイコ酸やペプチドグリカン等が抗菌薬投与後に生体内に大量に放出されることがなく、MRSA 菌血症患者に対する治療には大きな利点となる。さらに、当該薬に対する耐性菌の出現率は既存の抗菌薬と比較して極めて低いことが報告されている[17]。

DAP は 2003 年に米国でグラム陽性菌による複雑性皮膚軟部組織感染症を適応症として承認を取得し、2006 年には MRSA を含む *S. aureus* による菌血症および心内膜炎の適応でも承認された[18]。日本においては、2011 年に MRSA による敗血症、感染性心内膜炎、深在性皮膚感染症等の適応にて承認を取得し、これまで使用可能であった抗 MRSA 薬は 3 系統 4 薬剤から 4 系統 5 薬剤となった。2009 年に池田らが報告した日本全国の医療機関で採取された血液および皮膚組織から分離された MRSA 300 株における DAP および他の抗 MRSA 薬に対する感受性成績において、測定した菌株集団のうち 50%の菌株が発育を阻止さ

れる DAP の minimum inhibitory concentration ; MIC₅₀ は 0.5 µg/ml を示し測定した抗菌薬において最も低く、測定した菌株集団のうち 90%の菌株が発育を阻止される MIC₉₀ は 1 µg/ml で VCM を除き他の抗菌薬よりも低値であった[19]。また、すべての株は CLSI が定めている判定基準[20]である MIC ≤1 µg/ml (Susceptible : S) を示し、MIC >1 µg/ml (non-Susceptible : NS) は検出されなかった。しかし、現在 VCM と同様に皮膚・軟部組織感染症や菌血症の第一選択薬として推奨されているが[5]、当該薬に対する耐性菌は世界各国、さらには国内での報告が確認されていることから、臨床における MRSA の DAP 耐性化に注意が必要である[21-23]。

DAP 非感受性 MRSA (以下、DAP-NS MRSA) においても、他の抗 MRSA 薬耐性 MRSA と同様に多様な耐性機構を獲得している。MRSA を含む *S. aureus* の DAP に対する耐性機構には多くの研究報告があるものの、特定の要因による耐性因子は不明であり、β-lactam 系抗菌薬のように抗菌薬自身の不活化される等の耐性機構は報告されていない。現在、*S. aureus* の DAP 耐性機構に関与する主な遺伝子の中で、*mprF* (multiple peptide resistance factor) 遺伝子の突然変異は、DAP 耐性化と関連していることが報告されている[24-26]。*mprF* 遺

伝子は、細胞膜において陰性に荷電しているホスファチジルグリセロール (PG) に Lysyl-tRNA を使用しリシル化し、PG にリジンがエステル結合した陽性荷電を持つリジルホスファチジルグリセロール (L-PG) を産生、さらに L-PG をフリッパーゼにより細胞膜内層から細胞膜外層へ移送する二機能性酵素をコードしている。本遺伝子に変異が生じると、陽性に荷電した L-PG が増加し細胞膜外へ移送される。その結果、細胞膜上の表面電荷が本来の陰性から陽性電荷に変化することで、DAP が細胞膜に結合する作用を阻害していると考えられている [27]。これまでに DAP-NS *S. aureus* における *mprF* 遺伝子の変異は、少なくとも 10 箇所異なる位置で報告されている (**Figure 2**) [28]。しかし、これら各変異の DAP 耐性化に関する役割は明らかとなっていない。Ernst らは MprF が 14 個の細胞膜貫通ドメインと細胞質ドメインから構成されていることを示しており、最初の 8 個の N 末端ドメインセグメントは L-PG のフリッパーゼ活性、C 末端ドメインは Lysyl-tRNA の活性化に関与し、タンパク質の中心におけるセントラルドメインはこれら両方の役割を果たすことを報告している [29]。これまでに確認された DAP-NS *S. aureus* における *mprF* の変異箇所は、主に hot spot と呼ばれるセントラルドメインに局在しており、本変異が DAP に

に対する耐性獲得と関係していると考えられている[30]。

また、いくつかの研究により *S. aureus* における DAP 耐性化と VCM 耐性化との関連が示唆されている[31, 32]。CLSI は *S. aureus* に対する VCM の MIC が $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ を Susceptible (S)、 $4-8 \mu\text{g/ml}$ を Intermediate (I)、 $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ を Resistant (R) と分類しており、Patel らは、*S. aureus* に対する VCM の MIC が $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (S) を示す株のうち、DAP の MIC が $>1 \mu\text{g/ml}$ (NS) を示した株は 3% (30/812) であったのに対し、VCM MIC : $4 \mu\text{g/ml}$ (Intermediate : I) を示す株では 80% (43/54)、VCM MIC : $8-16 \mu\text{g/ml}$ (I および Resistant : R) を示す株では 93% (15/16) の DAP MIC が $>1 \mu\text{g/ml}$ (NS) であり、より耐性化傾向を示すことを報告している[33]。このことから、vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) と判定される株は DAP に対しても NS を示す可能性が高く、本要因について Cui らは、VISA に特徴的な細胞壁の肥厚が DAP の MIC 上昇と相関することを報告している[31]。DAP および VCM の作用機序は異なるが、DAP は分子量が大きく (1,620.67)、VCM (1,485.7) と比較しても同等のサイズであることから、VISA における耐性機構と同様に肥厚した細胞壁にトラップされることにより、細胞膜に到達できず抗菌作用が発揮できなくなると考えられている。

一方、DAP 耐性機構に関する研究が進展する中で、DAP に一度耐性化した MRSA が、臨床および *in vitro* において同薬に感受性化（感受性復帰）する例が報告されている。*In vitro* における研究では、抗菌薬を含まない Mueller-Hinton broth (MHB) で 10 日間連続継代することで DAP に対し感受性化することを報告しており [34]、さらに Capone らは臨床において、DAP 投与により生じた DAP-NS MRSA が同薬投与終了後に感受性化したことを報告している [35]。この生体内で生じた DAP 感受性復帰株は、*mprF* 遺伝子に変異は検出されなかったものの、DAP 非存在下において *mprF* の遺伝子発現レベルが変化する autoregulated phenomenon を示すことが報告されている [35]。DAP-NS MRSA の感受性化について Iwata らは、DAP-NS MRSA は生体内において DAP 投与中止により感受性に戻る能力を有する可能性を指摘しており、DAP 投与により *vraSR*、*ycyG*、*graS* などの二成分制御系 (TCS) および細胞壁生合成関連遺伝子がアップレギュレーションすることで、細胞壁の組成および厚さに変化が生じ DAP に耐性化すること、また DAP 投与が中止されることでこれら遺伝子の発現レベルが低下し、DAP-NS から DAP-S MRSA へ可逆的に感受性化する機構を報告している (**Figure 3**) [36]。また、興味深いことに DAP-NS MRSA で

検出された *mprF* 遺伝子の SNP (L826F) は、感受性復帰株においても検出されていた。現時点で、*mprF* 遺伝子の変異は感受性化した DAP-S MRSA においても認められたことから、DAP-NS から DAP-S への感受性復帰機構における *mprF* 遺伝子の役割は不明である [36]。

本研究は、臨床より分離された DAP-NS MRSA、DAP-S MRSA および *in vitro* において感受性化した感受性復帰株に対する細菌学的解析により、臨床における DAP-NS MRSA の同薬感受性化に関わる機構の解明を試みた。

2. 材料および方法

2.1 試験菌株

2013年から2014年に東邦大学医療センター佐倉病院において、MRSA感染症の治療目的のためDAPが使用された27例のうち、4例にDAPに対する耐性が認められた[37]。これら4例より分離された、DAP治療開始前後に分離されたDAP-S MRSA 4株 (A1, B1, C1, D1) およびDAP治療後に分離されたDAP-NS MRSA 4株 (A2, B2, C4, D2) を試験菌株として用いた (**Figure 4**)。これらの分離株は、マイクロバンク (Iwaki) を使用して -75°C にて保存した。菌株をMueller-Hinton agar (BD) に接種し、 35°C 、18~20時間、好気下にて培養し発育を確認後、独立集落から純培養したものを使用した。

2.2 抗菌薬感受性試験

薬剤感受性試験はCLSI M7-A9[38]に従い微量液体希釈法にて実施した。DAPについては Ca^{2+} 濃度 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調製したMueller-Hinton broth (BD) を用い、0.12, 0.19, 0.25, 0.38, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 および $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で微量液体希釈法および同濃度範囲となるように設計したドライプレート栄

研（栄研化学）で実施した。CLSI M100-S26[20]の判定基準に従い、DAP の MIC が 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下を Susceptible (S)、 $>1 \mu\text{g/ml}$ を Non-Susceptible (NS) とした。VCM においては、MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下を S、4-8 $\mu\text{g/ml}$ が I、16 $\mu\text{g/ml}$ 以上を R とした (**Table 1**)。

2.3 *In vitro* における感受性復帰株の作製

抗菌薬非含有培地 (MHA) に DAP-NS MRSA 4 株 (A2, B2, C4, D2) を塗布し、35°C、18~20 時間、好気下にて培養し発育を確認後、独立集落から同条件で MHA への継代培養を 20 日間実施した[34]。MHA を用いた継代を繰り返し、DAP および VCM の MIC を 5 日毎に測定した。継代培養によって得られたこれらの分離株は、*In vitro* DAP-S MRSA : A2-S revertant、B2-S revertant、C4-S revertant および D2-S revertant として使用した。なお、DAP の MIC は微量液体希釈法による測定を 3 回行い決定した。

2.4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析

DAP-NS および *In vitro* DAP-S MRSA のクローナリティーを確認するため、

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)を実施した[39]。試験菌株の染色体 DNA をアガロースブロックで調製し、*Sma* I (Takara Bio) で切断した。6 V / cm、パルス時間 1.0-40 秒で 18 時間、CHEF-DRII (Bio-Rad) にて電気泳動を行い、DNA 断片を分離した。Tenover らの分類基準[39]に従い、PFGE パターンが同じバンド数および大きさの場合、試験菌株は同一であると判定した。

2.5 *mprF* 遺伝子解析

臨床より分離された MRSA 8 株 (DAP-S : 4 株, DAP-NS : 4 株) および *In vitro* DAP-S MRSA 4 株について、*mprF* 遺伝子のシーケンス解析を実施した。DNA の抽出は InstaGene matrix (BioRad) を用いた。*mprF* 領域を Quinn ら[40]の方法を参考に PCR 法により増幅した (Table 2)。PCR は TaKaRa Taq (TaKaRa) を用い、Applied Biosystems 2720 Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) 上で増幅反応を行った。反応条件は、熱変性が 94°C で 5 分、その後、94°C で 30 秒、アニーリング 55°C で 30 秒、伸長反応 72°C で 1 分を 35 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C で 7 分を基本とし、2% agarose 電気泳動で PCR 産物の確認を行なった。PCR 増幅した PCR 産物のシーケンス解析は

シグマアルドリッチジャパン (SAJ) に委託した。塩基配列は Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 (MEGA7)[41]を用いて解読し、得られた配列を GenBank に登録されているデータベースとホモロジーサーチを行い比較した。

2.6 透過型電子顕微鏡による細胞壁の測定

DAP に対する MRSA の薬剤感受性変化と細胞壁の厚さの関係を明らかにするため、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、DAP-S、DAP-NS および *In vitro* DAP-S MRSA の細胞壁の厚さを測定した。TEM 用の試料作製は Seto ら[42]の方法を参考に以下のようにして実施した。0.05 M カコジル酸 buffer (EM サイエンス) 5 ml に菌体を懸濁し均一に分散させ、3,000 rpm, 10 分で遠心分離を行った。上清を捨て、3%グルタルアルデヒド (EM サイエンス) 5 ml に入れ、4°C下にて一夜静置した。3,000 rpm, 10 分にて遠心分離後、沈渣を 0.1 M カコジル酸 buffer 5 ml にて洗浄し、これを 3 回繰り返した。その後、1%オスミウム酸 (日新 EM) 5 ml で二重固定した。脱水作業として 50%エタノール 5 ml に均等に分散し、冷蔵にて 15 分静置後、3,000 rpm, 10 分で遠心分離した。本作

業を各濃度（50, 70, 90, 95, 100%）において各 2 回実施した。無水エタノール：QY1（日新 EM）の混合液を（4:1, 1:1, 1:4）の組成で作製し 3 ml に懸濁後、室温にて 15 分静置した。その後、2,000 rpm, 10 分にて遠心分離し、各濃度において 1 回実施した。QY1：Agar low viscosity resin（Agar Scientific Ltd.）の混合液を（4:1, 1:1, 1:4, 0:5）の組成で作製し、3 ml に懸濁後、減圧下で 30 分置換（原液：60 分）させ、その後 2,000 rpm, 10 分で遠心分離した。本工程を各濃度において 1 回実施した。樹脂に包埋した菌体をゼラチンカプセル（Lilly Co.）に入れ、減圧下で 15 分間静置した。樹脂の入ったゼラチンカプセルは恒温器で 60°C、24 時間静置して、樹脂を完全に固化した。固化した樹脂は RMC MT-X ultramicrotome（RMC Products）を用い、15～25 個の超薄切片（60～80 nm）を作製し、切片を TI-blue（日新 EM）および鉛染色溶液（Sigma-Aldrich）で二重染色した。試料は日立 HT7700 透過電子顕微鏡（日立）を用いて加速電圧 80 kV で細菌細胞断面を観察した。最終倍率 12,000 倍で撮影した画像を用いて細胞壁の計測を行った。計測は各試験菌株の 1 細胞につき 16 箇所の細胞壁を測定し、その平均値を 1 細胞の細胞壁の厚さとした。これら 10 細胞の平均値±SEM を試験菌株の細胞壁の厚さとした。統計的有意差は t 検定（two-sided Student's

t-Test) を用いた。

2.7 Population Analysis

同一細胞集団内に含まれる感受性の異なる個々の細菌細胞の分布を解析するため、DAP に対する各試験菌株の Population Analysis (PA) [43]を実施した。DAP 含有 MHA は Ca^{2+} 濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調製し、各々0.5, 1, 1.5, 2, 3 および $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の DAP 濃度範囲で作製した。試験菌株を滅菌した生理食塩液に浮遊させ、標準菌濁度液：マクファーランド 0.5 に調製し接種用菌液とした。菌液を 10^2 , 10^4 , 10^6 倍に希釈し、各菌液を DAP 含有 MHA 半分画に $50 \mu\text{l}$ 滴下、コンラージ棒で塗布後、 35°C 、24 時間、好気下にて培養を行った。発育したコロニー数をカウント後、さらに 24 時間同条件で培養を行ない、再度発育したコロニー数をカウントした。3 回の実験から得られた平均 $\log \text{CFU}/\text{ml}$ を計測値とした。

2.8 DAP に対する耐性化頻度の測定

臨床より分離された DAP-S MRSA と *In vitro* DAP-S MRSA における DAP

に対する耐性化頻度[44]を測定した。対照株として *S. aureus* ATCC25923 を用いた。DAP 含有 MHA は Ca^{2+} 濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調製し、各々 $0.5, 1, 2$ および $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の DAP 濃度範囲で作製した。試験菌株を滅菌した生理食塩液に浮遊させ、標準菌濁度液：マクファーランド 0.5 に調製し接種用菌液とした。菌液を $10^2, 10^4, 10^6$ 倍に希釈し、各菌液を DAP 含有 MHA 半分画に $100 \mu\text{l}$ 滴下し、コンラージ棒で塗布後、 35°C 、48 時間、好気下にて培養した。First step である $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の DAP 含有 MHA に発育したコロニーを無作為に釣菌し、同様の操作を 2nd : $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 3rd : $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, 4th : $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ および 5th : $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の DAP 含有 MHA に段階的に継代培養を行い、各培地に発育したコロニー数から耐性化頻度を求めた。また、各濃度段階において得られた株の MIC は微量液体希釈法にて測定した。本実験は 3 回の実験から得られた平均 $\log \text{CFU}/\text{ml}$ を計測値とした。なお、本実験の単一コロニーの検出限界は $10 \text{CFU}/\text{ml}$ 未満である。

3. 結果

3.1 抗菌薬感受性試験

DAP 投与中に分離された DAP-S MRSA 4 株、DAP-NS MRSA 4 株、*In vitro* DAP-S MRSA 4 株に対する DAP および VCM の MIC を **Table 3** に示した。

DAP-NS MRSA (A2、B2、C4、D2) に対する DAP の MIC はすべての株で 2 µg/ml を示した。*In vitro* DAP-S MRSA (A2-S revertant、B2-S revertant、C4-S revertant、D2-S revertant) に対する DAP の MIC はすべての株で 0.5 µg/ml を示した。DAP-NS MRSA (A2、B2、C4、D2) に対する VCM の MIC はそれぞれ 1 µg/ml, 2 µg/ml, 2 µg/ml および 1.5 µg/ml を示し、*In vitro* DAP-S MRSA (A2-S revertant、B2-S revertant、C4-S revertant、D2-S revertant) に対しては、それぞれ 1 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1.5 µg/ml および 0.75 µg/ml を示した。

3.2 Pulsed-field gel electrophoresis 解析

DAP-NS MRSA および *In vitro* DAP-S MRSA 計 8 株の PFGE パターンを **Figure 5** に示した。全ての *In vitro* DAP-S 株 (A2-S revertant、B2-S revertant、

C4-S revertant、D2-S revertant) は、それらが由来するとする親株 (A2, B2, C4, D2) と類似した PFGE パターンを示した。

3.3 *mprF* 遺伝子変異

DAP-S MRSA 4 株、DAP-NS MRSA 4 株および *In vitro* DAP-S MRSA 4 株に対する *mprF* 遺伝子解析の結果を **Table 4** に示した。臨床より分離された DAP-S MRSA 4 株において *mprF* 遺伝子に変異は認められなかったが、DAP-NS MRSA 4 株のうち 3 株においてアミノ酸置換 (A2 : T345I, B2 : L776S, D2 : L826F) の原因となる塩基置換が確認され、残り 1 株においてアミノ酸欠失を引き起こす *mprF* 遺伝子内の塩基欠失 (deletion) が認められた。*In vitro* DAP-S MRSA 4 株においては、それらが親株とする DAP-NS MRSA に認められた遺伝子変異と同様の塩基置換および塩基欠失はそのまま残存していた。

3.4 DAP に対する感受性変化による MRSA 細胞壁厚さの比較

臨床より分離された DAP-S MRSA、DAP-NS MRSA および *In vitro* DAP-S MRSA の 3 株 4 sets を対象に細胞壁の厚さを比較した。DAP 投与後に分離され

た DAP-NS MRSA 4 株のうち 3 株において、DAP-S MRSA と比較し細胞壁が肥厚していた ($p<0.01$; A1 vs A2, B1 vs B2, D1 vs D2)。また、これら DAP-NS MRSA 3 株は *in vitro* における感受性化後、細胞壁の厚さは肥厚前の DAP-S MRSA と同じレベルまで減少した。しかし、1 set (C1 vs C4 および C4 vs *In vitro* C4-S revertant) において細胞壁の厚さに有意な差は認められなかった (Figure 6)。

3.5 Population Analysis による耐性細胞集団の変化

臨床より分離された DAP-S MRSA、DAP-NS MRSA および *In vitro* DAP-S MRSA の 3 株 4 sets を対象に PA を実施した。DAP-S MRSA 4 株は、C1 を除くすべての株において DAP : 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地で検出限界未満であった。一方、DAP-NS MRSA 4 株は、すべての株において DAP : 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地で発育を認め、C4 においては DAP : 3 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地にて平均 47 CFU/ml の発育を認めた。DAP-NS MRSA と *In vitro* DAP-S MRSA の population を比較した結果、24 h 判定においては 4 株中 3 株において DAP : 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地での生菌数に差が認められたが ($p<0.05$; A2 vs A2-S revertant, C4 vs C4-S revertant

および D2 vs D2-S revertant)、残りの 1 株においては population に有意な差は認められなかった。48 h 判定においては 4 株中 2 株において DAP : 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地での生菌数に差が認められた ($p < 0.05$; C4 vs C4-S revertant, D2 vs D2-S revertant) (Figure 7)。

3.6 DAP に対する *In vitro* 感受性復帰株の耐性化頻度

DAP に感受性を示す 8 株の DAP-S および *In vitro* DAP-S MRSA を対象に DAP に対する耐性化頻度を求めた。臨床より分離された DAP-S MRSA (A1, B1, C1 および D1) は、DAP : 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地上で $1.3 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-7}$ の頻度で耐性化が生じたが、3rd step である DAP : 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地上においてはすべての株において発育を認めず耐性化は生じなかった。一方、*In vitro* DAP-S MRSA (A2-S revertant, B2-S revertant, C4-S revertant および D2-S revertant) は 3rd step である DAP : 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地上において $8.0 \times 10^{-8} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ の頻度で耐性化が見られ、すべての株において 5th step である DAP : 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地まで発育を認めた。また、DAP 含有培地における連続継代により臨床分離 DAP-S MRSA に対する DAP の MIC は、すべての株において ≤ 0.38

$\mu\text{g/ml}$ から $1 \mu\text{g/ml}$ まで上昇したのに対し、*In vitro* DAP-S MRSA においては
 $0.5 \mu\text{g/ml}$ から $\geq 3 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した (**Table 5**)。

考察

S. aureus における DAP に対する耐性機構は、細胞膜および細胞壁の変化に関連することが報告されている[45, 46]。主な耐性機構は、*mprF* 遺伝子に変異が生じることにより細胞表面電荷が陰性から陽性に変化することにより、DAP-Ca²⁺複合体が細胞膜に貫通するのを防ぐ機構と推測されている[45]。また、*mprF* 遺伝子変異による耐性機構以外に、細胞壁肥厚の関与が報告されており、VISA 株に特徴的な細胞壁の肥厚は DAP の MIC 上昇と相関するとされている[47]。近年、DAP に対する *S. aureus* の耐性化は multiple genetic mechanisms が関与するという概念が確立されており、同一由来株を除き、DAP-NS *S. aureus* において同一の遺伝子変異を認めた株は一つも無かったことが報告されている[48]。本報告は *S. aureus* が複雑な分子変化 (the complex changes) により進化し、複数の方法で DAP に耐性を示していることを示唆している。すなわち、これらの *S. aureus* における DAP 耐性機構は多様で非常に複雑であり、未だに完全に解明されていない。

2013 年 11 月から 2014 年 5 月までの期間において、DAP 投与中の 4 名の患者より同薬に耐性化した MRSA が分離された。これら全ての例で DAP は 7 日

間以上継続して投与されており、同薬投与を契機として MRSA が耐性化したものと考えられた。これら 4 例のうち 2 例（症例 B および症例 C）において、DAP 投与により同薬に耐性化した MRSA が、DAP 投与中止後に感受性化した現象を報告した[37]。本研究では、臨床において DAP に一度耐性化した MRSA が同薬に感受性化（感受性復帰）する現象を明らかにするため、*in vitro* において感受性化した株を対象に細菌学および遺伝学的変化について解析を行ない、また、これらの株に対する DAP 再投与による耐性獲得について検討を行った。

DAP 投与により得られた DAP-NS MRSA を、*in vitro* において感受性化した 4 株（A2-S revertant, B2-S revertant, C4-S revertant, D2-S revertant）には *mprF* 変異が残存していた。このことは、DAP-NS MRSA は感受性復帰過程において、*mprF* 変異を有したまま感受性株に戻る能力を持つ可能性が示唆された。本概念は、臨床より分離された DAP-S MRSA において *mprF* 変異が検出された報告を支持するものであった[36, 49]。Bayer らは *mprF* 変異を保持したまま DAP に感受性を示す株においては、その変異箇所が hot spot 外（I498N および Q692E）に位置しており、これらの SNP は *mprF* の機能に直接的な影響を与えていない可能性があることを報告している[49]。しかし今回、A2-S revertant

で残存していた *mprF* 遺伝子内の変異箇所は、*mprF* の機能である L-PG 産生および細胞膜内層から外層への移送の増強に関与する hot spot に位置していた (T345I)[50]。よって、*mprF* 内の Bi-functional domain である hot spot に変異が保持されていても、感受性を示すことが明らかとなった。この事実から *mprF* 変異に依存しない感受性化の要因を明らかにするため、DAP 耐性化との関連が報告されている細胞壁の厚さを測定した。その結果、1 set (C1, C4, C4-S revertant) を除く 3 sets (A, B, D) において、耐性化に伴う細胞壁肥厚および感受性化に伴う細胞壁の薄化が確認された。DAP 耐性化に伴い細胞壁が肥厚した株は、感受性化する過程で細胞壁が薄化することにより DAP に感受性を示すことが明らかとなった。よって、感受性化においては細胞壁の可逆的な変化が大きく影響していると考えられた。しかし、C の set のように耐性化および感受性復帰過程において、細胞壁の変化が認められない例も確認された。C4 および C4-S revertant は *mprF* 内に 24 塩基の deletion が起こっており、他の株とは異なる *mprF* 変異を保有していた。細胞壁の厚さと *mprF* 変異の関係についてはまだ明らかになっていないが、*mprF* の L826F SNP は細胞壁の肥厚に関与する可能性が報告されている[51]。しかし、*mprF* 内の deletion に関する報告は殆

ど無く、*mprF*内の **deletion** は細胞壁肥厚とは無関係である可能性が示唆された。

このような株に対する感受性化の要因を解明するために、PA を用いて同一細胞集団内における感受性の異なる個々の細胞を検出することで、耐性細胞数の変化を検証した。臨床検査として実施される薬剤感受性という概念から、同一細胞集団内に極めて少数の耐性細胞が含まれていても、大多数の感受性細胞が高い割合を占めている場合は臨床検査ガイドラインである CLSI の基準において DAP-S: $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ として判定される。hetero-VISA 株の場合、耐性細胞の数は 10^6 に 1 個程度とされており [52]、MIC 測定に用いる接種菌量である 10^4 CFU/spot or well に含まれない可能性が高い。これは、微量液体希釈法を含む MIC 測定法では、同一細胞集団内に含まれる少数の耐性細胞を検出することができないことを示している。DAP-NS MRSA 4 株は DAP-NS として判定される $>1 \mu\text{g/ml}$ の濃度域においても生育する耐性細胞が確認され、C4 においては $3 \mu\text{g/ml}$ においても発育可能な耐性細胞が認められた。これらの DAP-NS MRSA と *In vitro* DAP-S MRSA を比較した結果、24 h 判定において 4 sets 中 3 sets (A2-S revertant, C4-S revertant, D2-S revertant)、48 h 判定で 4sets 中 2sets

(C4-S revertant, D2-S revertant)で DAP-NS : >1 µg/ml に分類される DAP : 1.5 µg/ml に発育する耐性細胞の割合が減少する例が確認された。本結果から、*in vitro* における感受性化に伴い耐性細胞の割合が減少し、感受性細胞が優位になることにより MIC が低下 (感受性化) したと考えられ、非選択圧下における継代培養は耐性細胞を減少または消失させる可能性が示唆された。Roch らは DAP-NS *S. aureus* が感受性化する要因について、*mprF* 変異による高いフィットネス・コスト (high biological fitness cost) が関与している事を報告しており [53]、*mprF* 変異を保有する DAP-NS MRSA は適応度が低く、抗菌薬による選択圧が無くなった場合に感受性化が起こり得るとしている。抗菌薬に対する耐性化は、生存のためには本来必要の無い遺伝子変異等を生じる必要があり、抗菌薬非選択圧下では不要であったエネルギーを消費する。そのため、感受性株と比較し耐性株は病原性の減弱や増殖速度の低下が起こることが報告されている [54, 55]。本研究に用いた DAP-NS MRSA は全ての株において *mprF* 変異を保有しており、さらに一部の株を除き細胞壁が肥厚していた。細胞壁肥厚は細胞壁構成成分であるペプチドグリカンを通常より大量に合成することで構築されており、このような細胞壁形態の大きな変化には高いフィットネス・コスト

を必要とする。そのため、DAP-NS MRSA と判定された株においても、特に同一細胞集団内に感受性の異なる耐性細胞が多く含まれる株では、耐性細胞の高いフィットネス・コストによる影響のため耐性度が不安定であり、抗菌薬非選択圧下において同薬に感受性化し易いものと考えられた。

また Roch らは、DAP 感受性復帰株に対し再度 DAP による治療が行われた場合の耐性獲得の可能性は不明であると報告している[53]。そこで、DAP-S MRSA と *In vitro* DAP-S MRSA の 4 sets (A1 vs A2-S revertant, B2 vs B2-S revertant, C1 vs C4-S revertant, D1 vs D2-S revertant) を対象に、*in vitro* における耐性化頻度を求めた。その結果、*mprF* 変異を保持する *In vitro* DAP-S MRSA は、*mprF* 変異を持たない DAP-S MRSA と比較し耐性化頻度は高く、0.5 から 4 µg/ml までの段階的な DAP 含有培地での継代培養により、すべての株が MIC: ≥ 3 µg/ml (NS) への上昇を示したことから、DAP の再投与により容易に耐性化する可能性が示唆された。今回、生体内における耐性化の可能性は明らかになってはいないものの、臨床における DAP-NS MRSA の感受性化を認めた患者に対する DAP 再投与では、本事象と同様に耐性菌が再出現する可能性を念頭に、同薬の使用に関しては細心の注意が必要である。

さらに、著者らは DAP-NS MRSA の同薬感受性化における遺伝学的変化を明らかにするために、Whole genome sequencing (WGS) を用いた解析を実施した結果、すべての *In vitro* DAP-NS MRSA において *mprF* 遺伝子内に変異が残存しており、親株 (DAP-NS MRSA) に存在しない他の遺伝子および遺伝子間領域において新たな突然変異 : A2-S revertant (*ppnK*, *prfC*, *moaB*, *lipA*, *kdpB2*) , B2-S revertant (*atl*, *sodA*, *argC*, *ahpF*) , C4-S revertant (*aadD* および遺伝子間領域における 1 point mutation) , D2-S revertant (遺伝子間領域における 1 point mutation) が存在することを報告した (Table 6) [56]。A2-S revertant において検出された *kdpB2* は細胞膜輸送系の膜貫通タンパクである potassium-transporting ATPase の β サブユニットをコードする遺伝子であり、DAP 暴露により高度に誘導されることが報告されている [57]。また、B2-S revertant において検出された *atl* 遺伝子は Bi-functional autolysin であり、ペプチドグリカン加水分解活性を持つと共に細胞壁の代謝回転等 (cell wall turnover, cell separation, cell division and antibiotic-induced autolysis) に関与する [58]。*atl* 遺伝子の発現量低下は、細胞壁自己溶解酵素 (autolysins) を減少させることから、VISA の細胞壁肥厚による耐性化において重要な役割を果た

すことが報告されている[59]。本研究において、これらの遺伝子変異が DAP 感受性に与える影響は明らかになっていないが、DAP に対する感受性変化に関与している可能性は否定できないものと考えられた。しかし、これら複数の遺伝子変異と DAP 耐性化との関連に関する研究報告は殆ど無く、今後 *kdpB2* や *atl* 変異を含めた遺伝子変異と DAP-NS MRSA の DAP 感受性化との関係について、今後さらなる研究が必要である。

5. 結語

In vitro における DAP 感受性化は *mprF* 変異に必ずしも依存せず、細胞壁の可逆的変化が感受性化の一要因である可能性が示唆された。しかし、一部の株では耐性化および感受性化に関与する一貫した特定の細菌学的要因が認められなかったことから、今後、その他の耐性機構および感受性復帰機構の解明が必要である。また、臨床においては DAP 再投与による耐性化のリスクを考慮し、DAP による MRSA 感染症に対する治療に際し、感受性測定によるモニタリングを実施し、慎重に投与する必要がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東邦大学大学院理学研究科生物分子科学専攻藤崎真吾教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜りました。同 岸本利彦教授、同 永田喜三郎教授には副査をご担当いただきました。東邦大学看護学部感染制御学研究室 小林寅喆教授には研究の進め方、実験方法、実験手技の取得、データの解釈など多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。同研究室 勝瀬明子講師には実験方法、実験手技の取得など多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。自治医科大学医学部感染・免疫講座細菌学部門 崔龍洙教授、渡邊真弥准教授、相羽由詞助教には WGS による遺伝子解析を実施していただき、結果の解釈を含めたご指導および助言を頂きました。東邦大学看護学部感染制御学研究室 三川隆博士には透過型電子顕微鏡を用いた研究の進め方、実験方法、実験手技の取得など多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。同研究室 大学院生の方々には実験の補助をして頂きました。東邦大学理学部臨床検査医学教室 伊藤展枝先生には多大なる御理解、御指導を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

参考文献

1. 厚生労働省：院内感染対策サーベイランス 検査部門公開情報（2017年報）.
2. Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J 1961;1:124-5.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the united states, 2013:77.
4. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017.
5. MRSA 感染症の治療ガイドライン作成委員会：MRSA 感染症の治療ガイドラインー2017年改訂版ー.
6. Fujimura S, Tokue Y, Takahashi H, Nukiwa T, Hisamichi K, Mikami T, et al : A newly recognized acetylated metabolite of arbekacin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1998;41:495-7.
7. Mainardi JL, Shlaes DM, Goering RV, Shlaes JH, Acar JF, Goldstein FW. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains

- of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1995;171:1646-50.
8. Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1684-92.
 9. 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;350:1670-73.
 10. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 2002;51:565-7.
 11. Kondo S, Tamura A, Gomi S, Ikeda Y, Takeuchi T, Mitsuhashi S. Structures of enzymatically modified products of arbekacin by methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*. *J Antibiotics* 1993;46:310-5.
 12. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*

2012;56:603-12.

13. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2006;12:16-23.
14. Tally FP, DeBruin MF. Development of daptomycin for Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother 2000;46:523-6.
15. Hawkey PM. Pre-clinical experience with daptomycin. J Antimicrob Chemother 2008;62:iii7-14.
16. Miller WR, Bayer AS, Arias CA. Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. Cold Spring Harb Perspect Med 2016;6:a026997.
17. Tally FP, Zeckel M, Wasilewski MM, Carini C, Berman CL, Drusano GL, et al. Daptomycin : a novel agent for Gram-positive infection. Exp Opin Investig Drugs 1999;8:1223-38.
18. Rybak MJ. The efficacy and safety of daptomycin : first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. Clin Microbiol Infect

2006;12:24-32.

19. 池田文昭, 松崎薫, 天野綾子, 長谷川美幸, 横川瑠璃子 : 血液および皮膚感染症由来 MRSA 臨床分離株のダプトマイシンに対する感受性. 化学療法の領域. 2011;27:2315-21.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; 26th informational supplement. Document M100-S26. Wayne PA;CLSI:2016.
21. Julian K, Kosowska-Shick K, Whitener C, Roos M, Labischinski H, Rubio A, et al. Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in a patient with endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3445-8.
22. Van Hal SJ, Paterson DL, Gosbell IB. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient -a review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30:603-10.
23. Tsukimori A, Nakamura I, Okamura S, Sato A, Fukushima S, Mizuno Y,

- et al. First case report of vancomycin-intermediate sequence type 72 *Staphylococcus aureus* with nonsusceptibility to daptomycin. BMC Infectious Diseases 2014;14:459.
24. Yang SJ, Mishra NN, Rubio A, Bayer AS. Causal role of single nucleotide polymorphisms within the *mprF* gene of *Staphylococcus aureus* in daptomycin resistance. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:5658-64.
25. Rubio A, Moore J, Varoglu M, Conrad M, Chu M, Shaw W, et al. LC-MS/MS characterization of phospholipid content in daptomycin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* with mutations in *mprF*. Mol Membr Biol 2012;29:1-8.
26. Mishra NN, Bayer AS, Weidenmaier C, Grau T, Wanner S, Stefani S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains : relative roles of *mprF* and *dlt* operons. PLoS One 2014;9:e107426.
27. Tran TT, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of drug resistance :

- daptomycin resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2015;1354:32-53.
28. Bayer AS, Mishra NN, Chen L, Kreiswirth BN, Rubio A, Yang SJ. Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4930-7.
29. Ernst CM, Staubitz P, Mishra NN, Yang SJ, Hornig G, Kalbacher H, et al. The bacterial defensin resistance protein *mprF* consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathogens* 2009;5:e1000660.
30. Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus* : role of the cell membrane and cell wall. *Ann NY Acad Sci* 2013;1277:139-58.
31. Cui L, Tominaga E, Neoh H, Hiramatsu K. Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*

Chemother 2006;50:1079-82.

32. Julian K, Kosowska-Shick K, Whitener C, Roos M, Labischinski H, Rubio A, et al. Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in a patient with endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3445-8.
33. Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC. An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2006;42:1652-3.
34. Camargo IL, Neoh HM, Cui L, Hiramatsu K. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. Antimicrob Agents Chemother 2008;12:4289-99.
35. Capone A, Cafiso V, Campanile F, Parisi G, Mariani B, Petrosillo N, et al. *In vivo* development of daptomycin resistance in vancomycin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* severe infections previously

- treated with glycopeptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:625-31.
36. Iwata Y, Satou K, Tsuzuku H, Furuichi K, Senda Y, Sakai-Takemori Y, et al. Down-regulation of the two-component system and cell-wall biosynthesis-related genes was associated with the reversion to daptomycin susceptibility in daptomycin non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:1839-45.
37. 金坂伊須萌, 金山明子, 宍戸律子, 内野卯津樹, 長島誠, 藤崎真吾, 他 :
Daptomycin 投与後に分離された同薬低感受性 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の検討. *感染症誌* 2016;90:493-8.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard ninth edition. M7-A9, Wayne, PA, 2012.
39. 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;33:2233-9.
40. Quinn B, Hussain S, Malik M, Drlica K, Zhao X. Daptomycin inoculum effects and mutant prevention concentration with *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2007;60:1380-3.
41. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7 : Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
42. Seto K, Degawa Y. *Pendulichytrium sphaericum* gen. et sp. nov. (Chytridiales, Chytriomycetaceae), a new chytrid parasitic on the diatom, *Aulacoseira granulate*. Mycoscience 2018;59:59-66.
43. Yang SJ, Nast CC, Mishra NN, Yeaman MR, Fey PD, Bayer AS. Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus* : evidence for multiple resistance mechanisms. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:3079-85.

44. Noguchi N, Tamura M, Narui K, Wakasugi K, Sasatsu M. Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. *Biol. Pharm. Bull* 2002;25:1129-32.
45. Jones T, Yeaman MR, Sakoulas G, Yang S, Proctor RA, Sahl H, et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, Membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:269-78.
46. Bertsche U, Weidenmaier C, Kuehner D, Yang S, Baur S, Wanner S, et al. Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-Alanylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3922-8.
47. Gaupp R, Lei S, Reed JM, Peisker H, Vavra SB, Bayer AS, et al. *Staphylococcus aureus* metabolic adaptations during the transition from a daptomycin susceptibility phenotype to a daptomycin nonsusceptibility

- phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4226-38.
48. Ma Z, Lasek-Nesselquist E, Lu J, Schneider R, Shan R, Oliva G, et al. Characterization of genetic changes associated with daptomycin nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Plos One* 2018;13:e0198366.
49. Bayer AS, Mishra NN, Sakoulas P, Nonejuie P, Nast CC, Pogliano J, et al. Heterogeneity of *mprF* sequence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates: role in cross-resistance between daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:7462-7.
50. Humphries RM, Pollett S, Sakoulas G. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:759-80.
51. Mehta S, Cuirolo AX, Plata KB, Riosa S, Silverman JA, Rubio A, et al. *VraSR* two-component regulatory system contributes to *mprF*-mediated decreased susceptibility to daptomycin in *in vivo*-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*

- Chemother 2012;56:92-102.
52. Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Aiba Y, Saito M, Hishinuma T, et al. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. J Global Antimicrob Resist 2014;2:213-24.
53. Roch M, Gagetti P, Davis J, Ceriana P, Errecalde L, Corso A, et al. Daptomycin resistance in clinical MRSA strains is associated with a high biological fitness cost. Front Microbiol 2017;8:2303.
54. Lacey RW, Chopra I. Effect of plasmid carriage on the virulence of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 1975;8:137-47.
55. Pfeltz RF, Singh VK, Schmidt JL, Batten MA, Baranyk CS, Nadakavukaren MJ, et al. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:294-303.
56. Kanosaka I, Fujisaki S, Aiba Y, Watanabe S, Mikawa T, Kanayama Katsuse A, et al. Characterization of compensatory mutations associated with restoration of daptomycin-susceptibility in daptomycin

non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the role of *mprF* mutations. *J Infect Chemother* 2019;25:1-5.

57. Muthaiyan A, Silverman JA, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:980-90.

58. Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Gotz F. Activity of the major staphylococcal autolysin *Atl*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;259:260-8.

59. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Campanile F, Pietro CD, et al. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *Plos One* 2012;7:e29573.

発表論文

1. 金坂伊須萌, 金山明子, 宍戸律子, 内野卯津樹, 長島誠, 藤崎真吾, 小林寅
詰: Daptomycin 投与後に分離された同薬低感受性 Methicillin-resistant
Staphylococcus aureus の検討. 感染症誌, 2016;90:493-8.
2. Kanesaka I, Fujisaki S, Aiba Y, Watanabe S, Mikawa T, Kanayama
Katsuse A, Takahashi H, Cui L, Kobayashi I : Characterization of
compensatory mutations associated with restoration of
daptomycin-susceptibility in daptomycin non-susceptible
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the role *mprF*
mutations. J Infect Chemother, 2019;25:1-5.

学会発表（国内）

1. 金坂伊須萌, 宍戸律子, 内野卯津樹, 金山明子, 小林寅喆 : Daptomycin 投与後に同薬低感受性 MRSA が分離された 4 例. 第 26 回日本臨床微生物学会総会, 東京, 2015 年 1 月.
2. 金坂伊須萌, 内野卯津樹, 寺井幸子, 門田昌子, 佃晶子, 増田雅行, 長島誠 : 皮膚軟部組織感染領域より分離された Daptomycin 低感受性 MRSA の 4 症例について. 第 30 回日本環境感染学会総会・学術集会, 神戸, 2015 年 2 月.
3. 金坂伊須萌, 内野卯津樹, 長島誠, 金山明子, 小林寅喆 : Daptomycin 低感受性 MRSA が分離された皮膚軟部組織感染の 4 例. 第 89 回日本感染症学会総会, 京都, 2015 年 4 月.
4. 金坂伊須萌, 藤崎真吾, 内野卯津樹, 長島誠, 中西康太, 金子明寛, 金山明子, 小林寅喆 : Daptomycin 投与後に分離された同薬低感受性 MRSA の細菌学的解析. 第 64 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 62 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 札幌, 2015 年 10 月.
5. 金坂伊須萌 : Daptomycin に耐性化した *Staphylococcus aureus* の特性. 東京難治性感染症研究会（特別講演）, 東京, 2016 年 6 月.

6. 金坂伊須萌 : Daptomycin に耐性化した *Staphylococcus aureus* の特性についてー生体内および試験管内での検討からー. 第 30 回日本バイオフィルム学会学術集会 (シンポジスト), 東京, 2016 年 7 月.

学会発表（国際）

1. I. Kanesaka, S. Fujisaki, U. Uchino, M. Nagashima, Y. Nakanishi, A. Kaneko, A. Kanayama, H. Takahashi, I. Kobayashi : Bacteriological properties of MRSA with reduced susceptibility to daptomycin recovered from patients undergoing daptomycin treatment. ICAAC, San Diego, U.S.A., Sep.19, 2015.
2. I. Kanesaka, S. Fujisaki, A. Kanayama, A. Kaneko, H. Takahashi, I. Kobayashi : Survival of Daptomycin Resistant MRSA under different conditions. ASM microbe2016, Boston, U.S.A., Jun.19, 2016.
3. I. Kanesaka, T. Ishikawa, A. Katsuse Kanayama, H. Takahashi, S. Fujisaki, I. Kobayashi : Analysis of daptomycin-resistant MRSA isolates with reduced MICs following passage in non-selective medium. ASM microbe2017, New Orleans, U.S.A., Jun.3, 2017.
4. I. Kanesaka, S. Fujisaki, Y. Aiba, S. Watanabe, A. Katsuse Kanayama, H. Takahashi, L. Cui, I. Kobayashi : Bacteriological analysis of daptomycin-resistant MRSA isolates and after *in-vitro* conversion to

daptomycin-susceptible. ASM microbe2018, Atlanta, U.S.A., Jun.8, 2018.

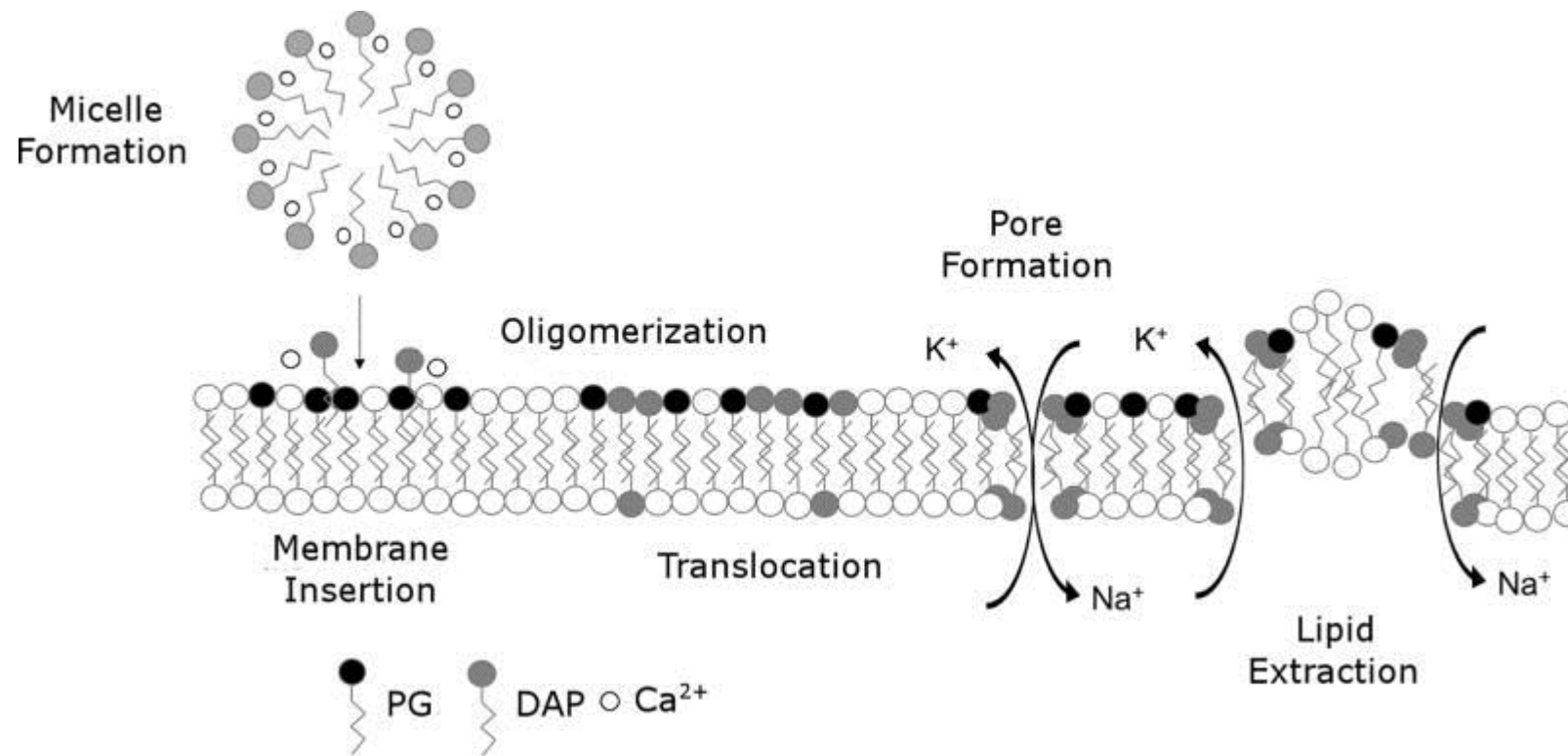


Figure 1 Daptomycinの作用機序

※Cold Spring Harb Perspect Med 2016;6:a026997.より引用

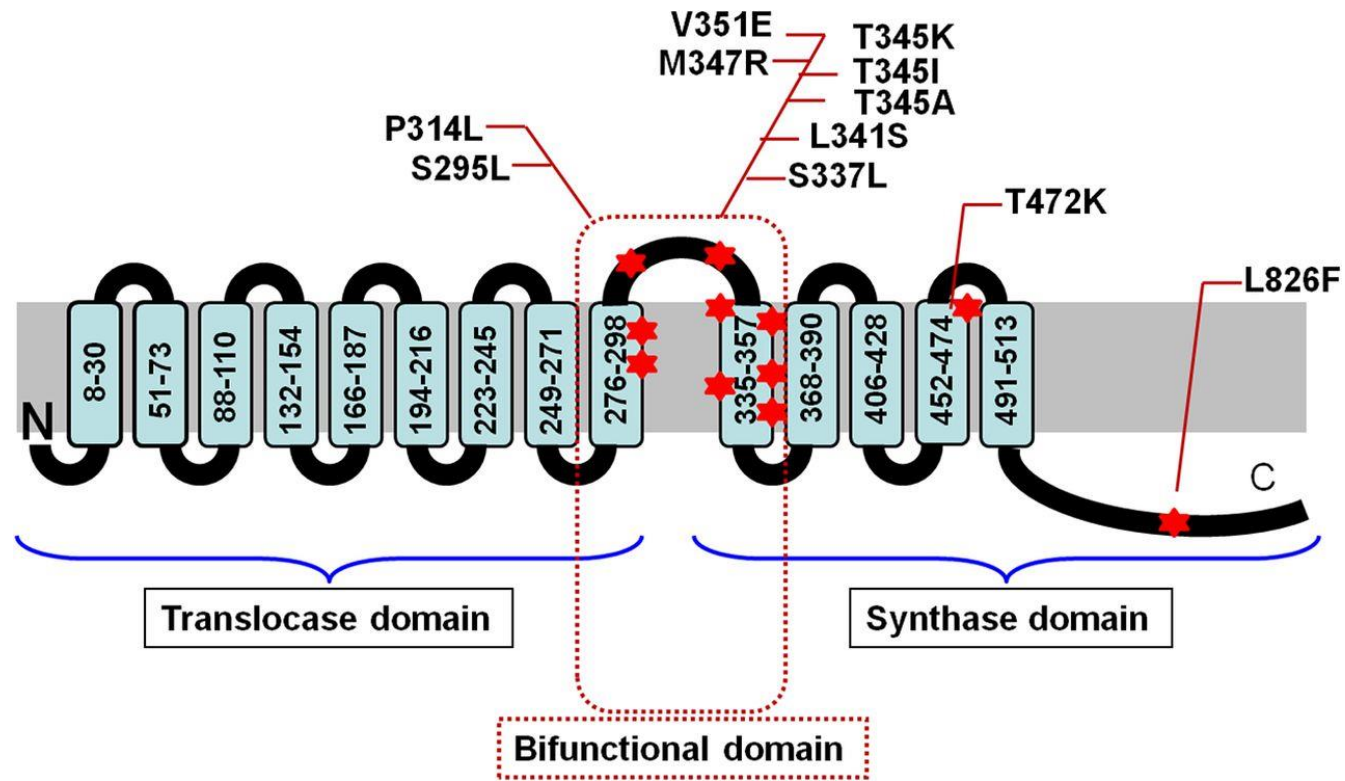


Figure 2 MprFタンパク質内の突然変異位置

※Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:4930-7.より引用

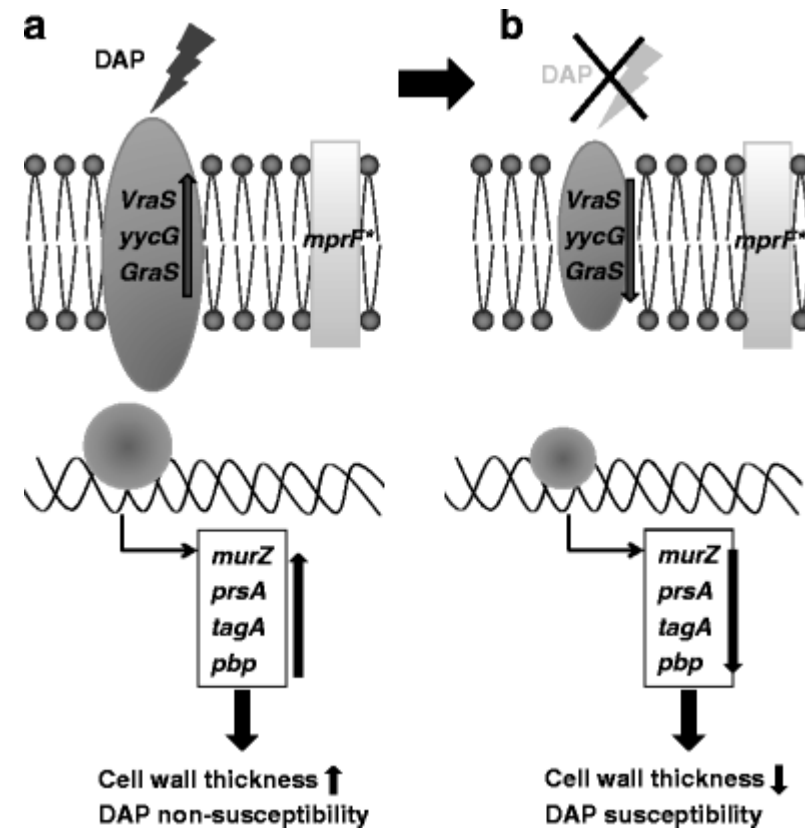


Figure 3 Daptomycinに対する感受性復帰の推定機構

※Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36:1839-45より引用

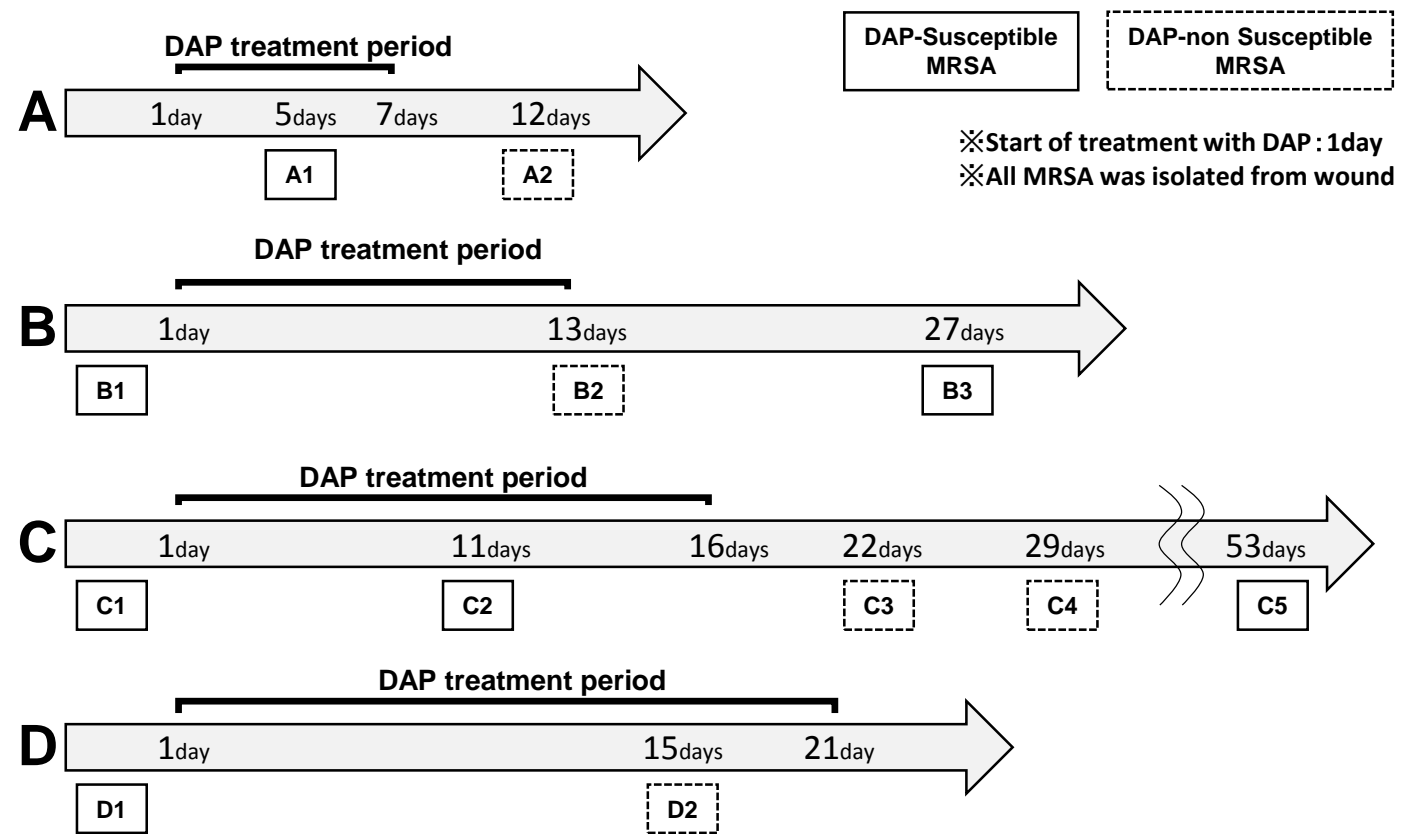


Figure 4 Daptomycin投与後に同薬耐性化が認められた4症例（2013年11月～2014年5月）

※.感染症誌 2016;90:493-8.より引用

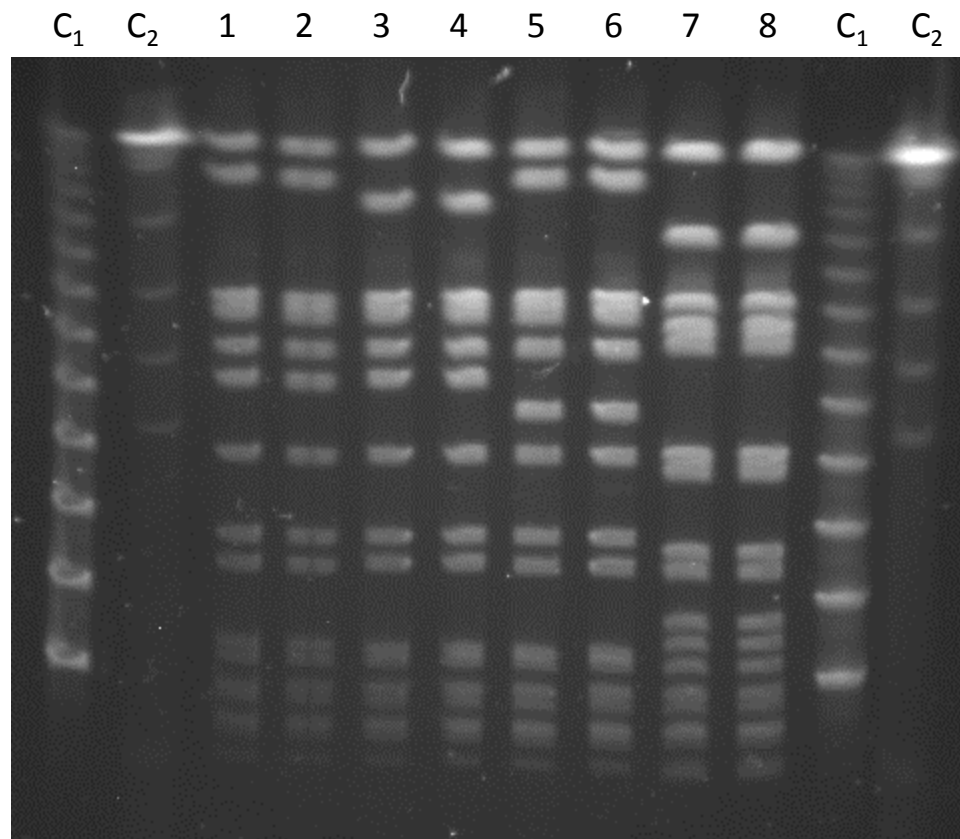


Figure 5 DAP-NS MRSAおよび*In vitro* DAP-S MRSAのPFGE結果

※A2およびA2-S revertant (lanes 1, 2)、B2およびB2-S revertant (lanes 3, 4)、C4およびC4-S revertant (lanes 5, 6)、D2およびD2-S revertant (lanes 7, 8). C1およびC2はλ ladderおよびyeast ladder.

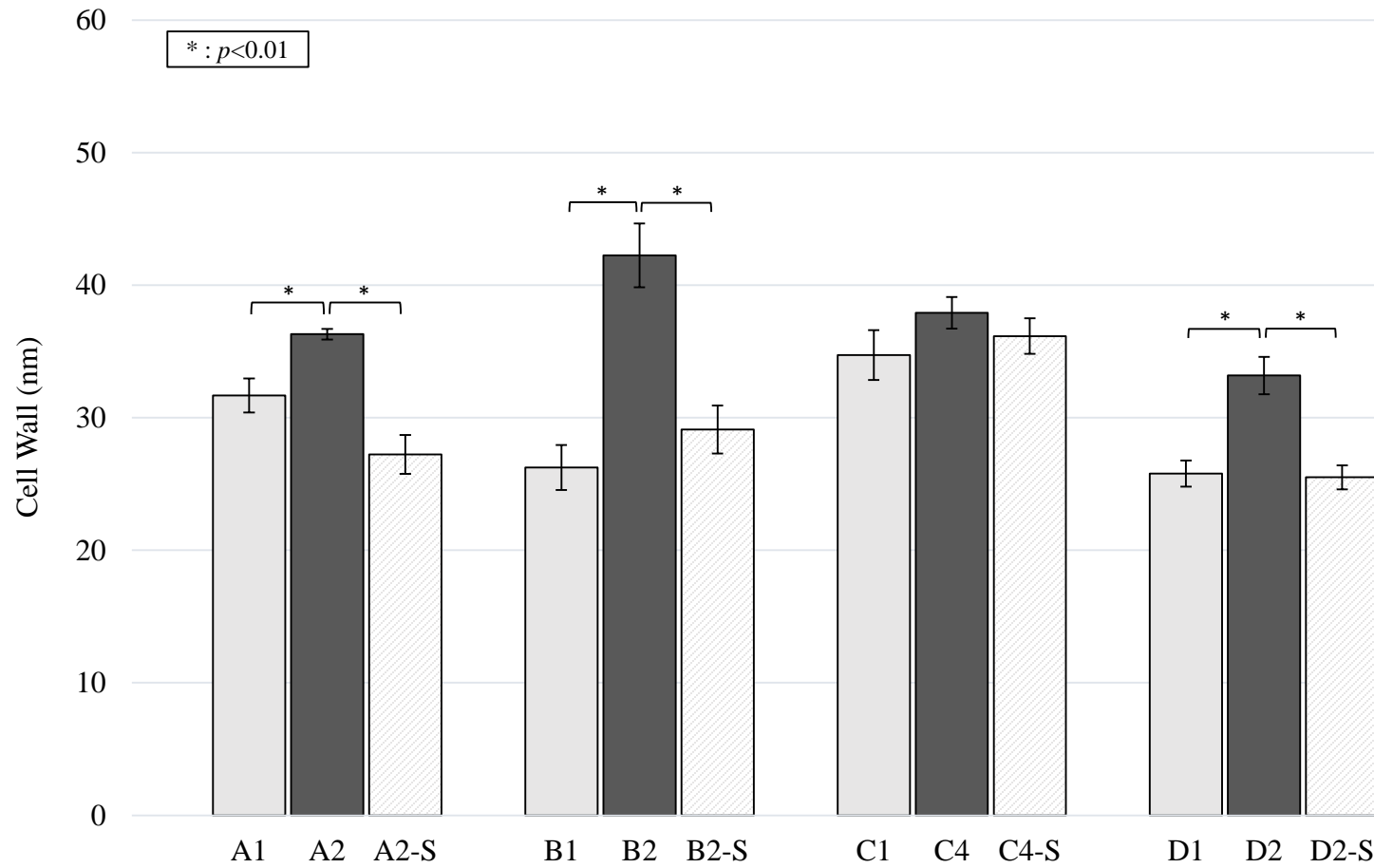


Figure 6 DAP-S, DAP-NSおよび*In vitro* DAP-S MRSAの細胞壁厚さ (Mean±SEM) の比較

※J Infect Chemother 2019;25:1-5.より引用

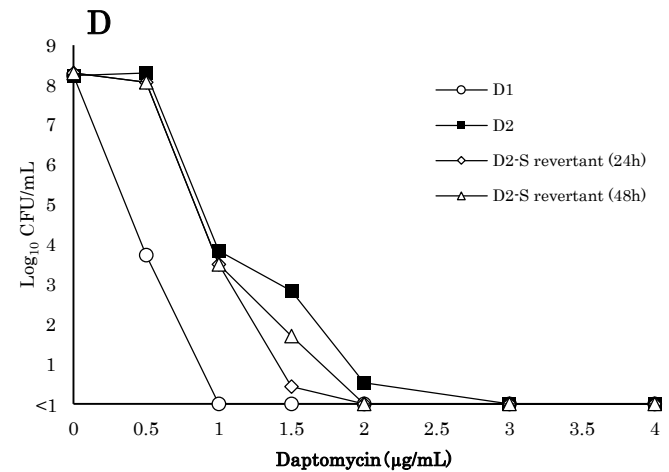
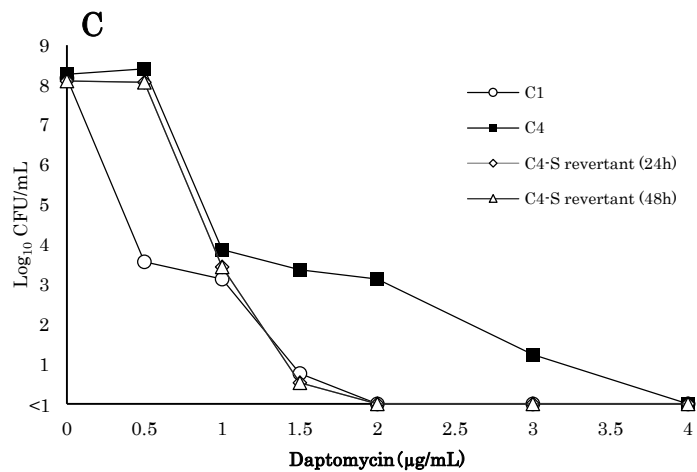
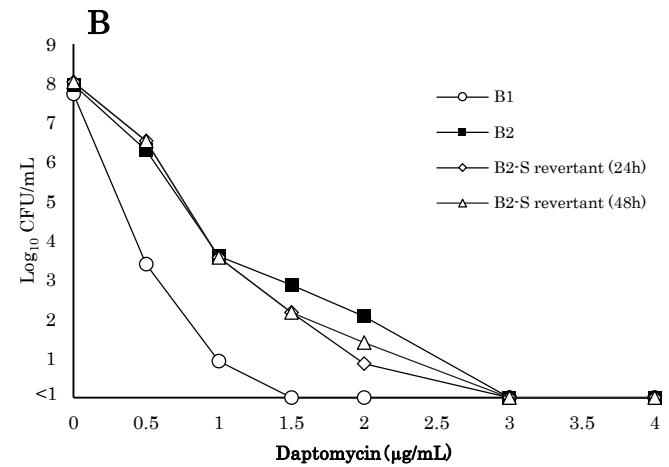
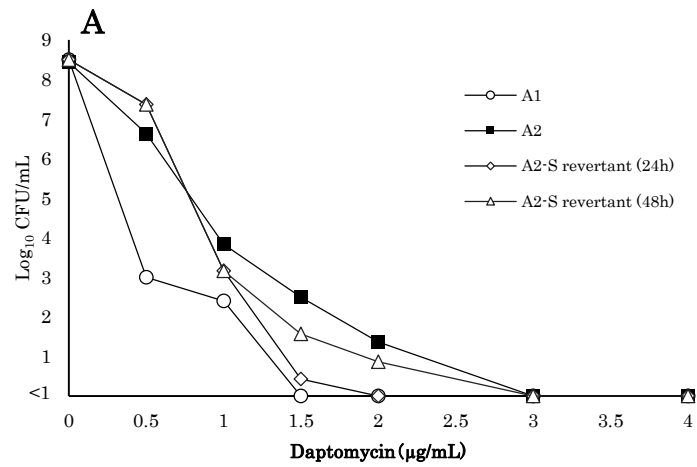


Figure 7 DAP-S, DAP-NSおよび*In vitro* DAP-S MRSAに対するPopulation Analysis

Table 1 *Staphylococcus aureus* に対する daptomycin および vancomycin のブレイクポイント

Antibiotic	Susceptibility ($\mu\text{g/ml}$)			
	Susceptible	NS*	Intermediate	Resistant
Daptomycin	≤ 1	> 1		
Vancomycin	≤ 2		4-8	≥ 16

*non-susceptible

※ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S26より引用

Table 2 本研究にて使用したプライマー

Target gene	Usage			Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>mprF</i>	PCR / sequencing	forward	F2	GTGGTTCTTGGAGATCCGTTAGGTGATGA	867
		reverse	R2	CCAAGCGCATCAGGCATAACTGTATAACC	
	sequencing	forward	S1	GCTTTATTCCTGGTGGTTTCGGCGCT	1003
		reverse	F2-R	TCATCACCTAACGGATCTCCAAGAACCAC	
		forward	S2	CGACTTGCAGGCCGTGTCTTTGAAC	

Table 3 試験菌株および抗菌薬感受性試験結果

Isolate source	Strain	MIC (μg/mL)		Source
		DAP	VCM	
Patient A ^a	A1	0.38	0.75	Post-DAP treatment clinical strain, Toho University Sakura medical center, 2013
	A2	2	1	Clinical DAP-NS strain, Toho University Sakura medical center, 2013
	A2-S revertant	0.5	1	<i>In vitro</i> revertant DAP-S
Patient B ^b	B1	0.38	1	Pre-DAP treatment clinical strain, Toho University Sakura medical center, 2013
	B2	2	2	Clinical DAP-NS strain, Toho University Sakura medical center, 2013
	B2-S revertant	0.5	0.75	<i>In vitro</i> revertant DAP-S
Patient C ^c	C1	0.38	0.75	Pre-DAP treatment clinical strain, Toho University Sakura medical center, 2014
	C4	2	2	Clinical DAP-NS strain, Toho University Sakura medical center, 2014
	C4-S revertant	0.5	1.5	<i>In vitro</i> revertant DAP-S
Patient D ^d	D1	0.25	1	Pre-DAP treatment clinical strain, Toho University Sakura medical center, 2014
	D2	2	1.5	Clinical DAP-NS strain, Toho University Sakura medical center, 2014
	D2-S revertant	0.5	0.75	<i>In vitro</i> revertant DAP-S

^a7days.daptomycin treatment, ^b13days.daptomycin treatment, ^c16days.daptomycin treatment, ^d21days.daptomycin treatment

※J Infect Chemother 2019;25:1-5.より引用改変

Table 4 *mprF* 遺伝子に対するシーケンス解析結果

Isolates	Gene mutation			
	Nucleotide change*	Codon change	Amino acid change	Deletion
A1	—	—	—	—
A2	C1034T	ACA→ATA	Thr345Ile	—
A2-S revertant	C1034T	ACA→ATA	Thr345Ile	—
B1	—	—	—	—
B2	T2327C	TTG→TCG	Leu776Ser	—
B2-S revertant	T2327C	TTG→TCG	Leu776Ser	—
C1	—	—	—	—
C4	1375_1398del	—	—	459-466del
C4-S revertant	1375_1398del	—	—	459-466del
D1	—	—	—	—
D2	C2476T	CTT→TTT	Leu826Phe	—
D2-S revertant	C2476T	CTT→TTT	Leu826Phe	—

*Position of nucleotide change within the *mprF* ORF.

Table 5 Daptomycinに対する耐性化頻度

Step	Concn of daptomycin (μg/mL)	A1		B1		C1		D1		ATCC25923	
		MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation
First	0.5	0.19	1.1×10^{-5}	0.38	4.2×10^{-6}	0.5	6.6×10^{-6}	0.38	1.7×10^{-6}	0.5	1.2×10^{-5}
2nd	1	1	1.3×10^{-8}	1	6.7×10^{-8}	1	2.5×10^{-7}	1	2.9×10^{-8}	0.5	1.3×10^{-7}
3rd	2	-	ND*	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
4th	2	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
5th	4	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND

Step	Concn of daptomycin (μg/mL)	A2-S (T345I)		B2-S (L776S)		C4-S (459-466del)		D2-S (L826F)	
		MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation	MIC (μg/mL)	Frequency of mutation
First	0.5	0.75	1.0×10^{-3}	0.5	1.5×10^{-3}	1	5.6×10^{-3}	1	1.9×10^{-3}
2nd	1	2	6.6×10^{-6}	1.5	2.0×10^{-4}	2	1.1×10^{-4}	1.5	5.6×10^{-6}
3rd	2	1	8.0×10^{-8}	1.5	2.0×10^{-5}	2	1.7×10^{-5}	1	1.5×10^{-6}
4th	2	1.5	4.3×10^{-7}	2	4.7×10^{-5}	2	1.3×10^{-5}	2	5.7×10^{-4}
5th	4	4	1.8×10^{-8}	3	4.5×10^{-6}	3	5.6×10^{-8}	3	2.4×10^{-7}

ND*:not detected

Table 6 Whole genome sequencingによる遺伝子解析結果

Strain	number of mutation	gene mutation											intergenic	
		<i>mprF</i>	<i>ppnK</i>	<i>prfC</i>	<i>moaB</i>	<i>lipA</i>	<i>kdpB2</i>	<i>atl</i>	<i>sodA</i>	<i>argC</i>	<i>ahpF</i>	<i>aadD</i>		
A1	Reference	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	1	T345I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2-S revertant	6	T345I	I183T	I349T	C121R	M92I	G481R	-	-	-	-	-	-	-
B1	Reference	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	3	L776S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 point mutation, 1 insertion
B2-S revertant	7	L776S	-	-	-	-	-	G876S	K154E	T161S	L188F	-	-	Same as B2
C1	Reference	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	1	459-466del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4-S revertant	3	459-466del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L179L*	-	1 point mutation
D1	Reference	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	3	L826F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 point mutations
D2-S revertant	4	L826F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Same as D2 + 1 point mutation

*synonymous mutation

※J Infect Chemother 2019;25:1-5より引用