

メチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌に対する
 β -ラクタム系薬剤の抗菌力測定時における培養温度の影響

山下 直子・生方 公子・松下 真理・紺野 昌俊

帝京大学医学部臨床病理

増田 真理子・野々口 律子

帝京大学医学部附属溝口病院小児科

(昭和 60 年 3 月 14 日受付)

臨床検査材料より分離したメチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌 50 株を対象とし、培養温度を違えて β -ラクタム剤の MIC と殺菌効果とを測定して、下記のような成績を得た。

1. 9 種類の β -ラクタム剤に対する MIC は、1) 10^6 /ml の接種菌量で 30°C 培養、2) 10^8 /ml の接種菌量で 30°C 培養、3) 10^6 /ml の接種菌量で 37°C 培養、4) 10^8 /ml の接種菌量で 37°C 培養、の四通りについて測定した。その結果は、接種菌量が同じであっても培養温度が異なると、MIC は大きく変動することが明らかにされた。つまり、 30°C の培養条件における MIC に比較すると、 37°C のそれは 8~32 倍感性側へ shift する傾向が認められた。

2. MIC 測定時の菌の培養と同一条件にして MRSA に対する β -ラクタム剤の殺菌効果を測定すると、 30°C の培養では殺菌効果の認められなかった薬剤濃度の添加によっても、 37°C の培養時には明らかな殺菌効果が認められた。

3. 培養温度によって殺菌効果に差異のあることは、位相差顕微鏡による薬剤作用後の菌の形態観察によっても確かめられた。すなわち、菌はほぼ同じ低い薬剤濃度から隔壁形成を阻害された膨化細胞を形成するが、 30°C の培養条件では薬剤濃度をかなり高めても容易には溶菌細胞が見出されないのに対し、 37°C の培養条件では、比較的低い薬剤濃度から膨化細胞に混じって溶菌細胞が観察された。

4. 培養温度の違いによって MIC 値と殺菌効果に差が認められるという成績は、PCase plasmid を脱落させ、メチシリン・セフェム耐性の残った変異株においても同じように観察された。

5. このような現象は、メチシリン・セフェム耐性に関与している penicillin binding protein-2¹⁾ が温度感受性であるため、その至適産生温度が 37°C ではなく 30°C にあるためであることを考察した。

本邦においては、いわゆる第 3 世代セフェム系薬剤 (セフェム剤) の臨床への導入と時期を同じくして、臨床検査材料からの分離菌の菌種に変動がみられ、その中でも、黄色ブドウ球菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、D 群連鎖球菌、酵母様真菌といった、セフェム剤の抗菌力が劣る菌種において分離頻度の増加傾向が認められる¹⁾。このような分離菌種の変遷に伴い、ブドウ球菌の薬剤耐性が再び重要な課題となりつつあるが、これらのブドウ球菌は、従来の薬剤耐性に加えて、Gentamicin を含む多くのアミノ配糖体薬 (AGs 剤) と、Methicillin を始めとするペニシリン・セフェム耐性合成ペニシリンやセフェム剤に耐性を示すという特徴を有している^{2,3)}。ブドウ球菌が示すこれらの薬剤耐性のうち、AGs 剤耐性の

実態については、既に私達が発表してきたいくつかの論文により明らかになってきたと考えているが⁴⁾、メチシリン・セフェム系薬剤耐性については、世界的レベルにおいても必ずしもその本態が明らかにされているとはいえない。しかし、今までに明らかにされてきた主要な点について言及すれば、これらのメチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、欧米においては本邦に比べてかなり早い時期から分離されており⁵⁾、その耐性機構は不活化酵素によらない耐性であり⁶⁾、 β -ラクタム剤の標的である penicillin binding proteins (PBPs) に対する β -ラクタム剤の親和性の低下がその主因であるとする成績が多い⁷⁻⁹⁾。しかしながら、ある種の β -ラクタム剤で見出される "double zone 現象"^{10,11)} から

は、MRSA における耐性機構が今までに報告されている PBP の親和性の低下という現象だけでは説明不可能とも思われ、むしろ、菌が薬剤に触れることによって発現してくるいわゆる誘導による耐性機構の存在する可能性が示唆されていると私は考えたのである。

この想定に基づき、私は β -ラクタム剤を inducer として MRSA を培養し、膜画分を採取して PBP を解析した結果、 β -ラクタム剤によって誘導される PBP のあることを見出した。そして、その詳細は既に報告¹³⁾した通りであるが、その要点は、 β -ラクタム剤によって誘導される新たな PBP-2' は、臨床分離の MRSA から PCase plasmid を脱落させ、メチシリン・セフェム耐性のみがみられる変異株においては、構成的に産生されることが判明した。この PBP-2' は、横田ら^{13,14)}が PCase plasmid の脱落株を用いて指摘している PBP-2' と同一のものであると推定されたが、彼らも指摘しているように、この PBP-2' そのものの性質が易熱性であり、37°C に放置すると酵素活性は低下し、さらに 43°C にすると極めて短時間で失活するという性状を有している。そのため、この PBP-2' の誘導産生も被験菌の培養温度によって大きく左右され、37°C よりも 30°C において多量に産生されるのである¹⁵⁾。このことは、被験菌の培養を 37°C で繰り返すと、PBP-2' の産生は極端に抑制され、薬剤感受性の測定に際しても、本来感性である菌との区別が明確でなくなってくることが予想された。そのようなことから、私は、MRSA として収集した菌株について、培養温度を正確に設定した上で、 β -ラクタム剤の感受性測定と殺菌効果とについて再検討を行ない、培養温度の重要性を再確認したのでその成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

メチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌 (MRSA) として収集した菌株は、1983 年 1 月から約 1 年の期間中に、帝京大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室で扱われた臨床検査材料の中から分離された黄色ブドウ球菌のうち、日常業務で実施しているディスクによる感受性測定において、Cloxacillin, Cefazolin, Cefmetazole, Ceftizoxime に耐性を示すと判定された 50 株である。また、TK 784 E, TK 388 E とした菌株は、それぞれの親株である MRSA の TK 784, TK 388 株を高温培養 (43.5°C, 24 時間) し、前者はメチシリン・セフェム耐性を、後者は PCase plasmid を脱落させた変異株であり、これらの菌株の各種 β -ラクタム剤に対する MIC は先の論文¹⁵⁾に記した通りである。

2. 薬剤感受性の測定

各種 β -ラクタム剤に対する MIC は、日本化学療法学

会の標準法¹⁶⁾による、1) 10^6 CFU/ml の被験菌接種後 37°C で培養した成績の他に、培養温度の影響をみるために、2) 被験菌を原液接種後 37°C 培養、3) 10^6 CFU/ml の接種後 30°C の培養、および 4) 原液接種後 30°C 培養の四つの方法について同時に測定した。また、これらの収集した MRSA は、この実験に先立ち、先ず Ceftizoxime 10 μ g/ml を含む感受性 broth (栄研) に接種して 30°C で 24 時間培養した後、薬剤無含有の感受性 broth にて 30°C で 3 回継代培養した。この後、各菌株をそれぞれ感受性 broth 2 本ずつに植え継ぎ、その各々を 30°C と 37°C とで別々に培養した後、MIC 測定に供した。被験薬剤は、Methicillin (DMPPC), Cloxacillin (MCIPC), Dicloxacillin (MDIPC), Cephalothin (CET), Cephaloridine (CER), Cefazolin (CEZ), Cefmetazole (CMZ), Ceftizoxime (CZX), Latamoxef (LMOX) の計 9 薬剤であり、感受性測定に際しては、感受性測定用培地 (栄研) を使用した。

3. 生菌数の測定

被験菌に β -ラクタム剤を作用させた後の経時的生菌数の変化は、培養温度を 30°C と 37°C とに設定した際の二つの方法について測定した。実験には MRSA の TK 388, TK 388 E 株およびメチシリン・セフェム感性 (MSSA) の TK 784 E 株を使用した。これらの菌株は、30°C で 3 代継代培養した後、前培養時から 30°C と 37°C とに分けてそれぞれ 1 時間の前培養を行ない、薬剤を添加して実験を行なった。生菌数は、薬剤添加後 3, 6, 9 および 24 時間後に測定した。使用した薬剤は、MCIPC, CET, CEZ, CZX の 4 薬剤である。

4. 位相差顕微鏡による形態変化の観察

2 の項に示した薬剤感受性測定時と同じ条件によって継代してきた被験菌を、30°C と 37°C とで 1 時間前培養した後、後述する薬剤含有の薄層寒天培地上へ 1 白金耳ずつ接種した。薄層寒天培地は、2 の項で用いた薬剤含有の感受性測定用培地 200 μ l をスライドガラス上に滴下し、4 cm² 程度に広げて固化して作製した。被験菌接種後はカバーガラスで封じ、30°C と 37°C のフラスコで 6 時間培養後、位相差顕微鏡にて菌の形態変化を観察した。

II. 結 果

1. 培養温度の違いによる MIC の変動

1) 臨床分離株

被験菌を、方法の 2 の項に従い、30°C と 37°C との培養によって感受性を測定した成績を Table 1 および Table 2 に示す。これらの菌株は、 10^6 /ml の接種菌量と 30°C の培養条件下では、DMPPC とセフェム剤に対して、全株 12.5 μ g/ml 以上の MIC を示し、いわゆるメ

Table 1 Susceptibility distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains against β -lactam antibiotics

Antibiotics	Inoculum size ^{a)}	Temperature ^{b)}	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)										
			≤ 0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
Methicillin	10 ⁶	30 37					5	5	11	7	2 6	3 2	45 14
	10 ⁸	30 37							1	5	5	1 3	49 36
Cloxacillin	10 ⁶	30 37		3 14	5 4	6 5	3 6	1	3 6	9 3		1 2	19 4
	10 ⁸	30 37			4	2	9	3	2	9	1 2		47 15
Dicloxacillin	10 ⁶	30 37	2 18	10 7	7 4	2 4	3 4	4 1	6 5		4		12 4
	10 ⁸	30 37		5	5	7	6	6	1	1	1 2	1 2	46 15

^{a)} CFU/ml, ^{b)} incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$).Table 2 Susceptibility distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains against β -lactam antibiotics

Antibiotics	Inoculum size ^{a)}	Temperature	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)										
			≤ 0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
Cephaloridine	10 ⁶	30 37		1	8	4		3	2 9	3 9	8 8	26 6	11 2
	10 ⁸	30 37				1		2	4	7	2 13	18 20	30 3
Cephalothin	10 ⁶	30 37			7	4	3	4	1 6	2 5	9 12	18 6	20 3
	10 ⁸	30 37				1	1		6	6	2 13	8 17	40 6
Cefazolin	10 ⁶	30 37			1	1	8	2	1	4	1 10	13 18	36 5
	10 ⁸	30 37						1		1		2 16	48 26
Cefmetazole	10 ⁶	30 37					6	12	1 11	2 13	18 2	17 5	12 1
	10 ⁸	30 37						2	9	1 7	1 18	20 9	28 5
Ceftizoxime	10 ⁶	30 37									3	6	50 41
	10 ⁸	30 37											50 50
Latamoxef	10 ⁶	30 37							9	9	14	3 5	47 13
	10 ⁸	30 37							1	5	8	4	50 32

^{a)} CFU/ml, ^{b)} incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$).

Fig.1 Susceptibility distribution of cloxacillin against methicillin-resistant staphylococci

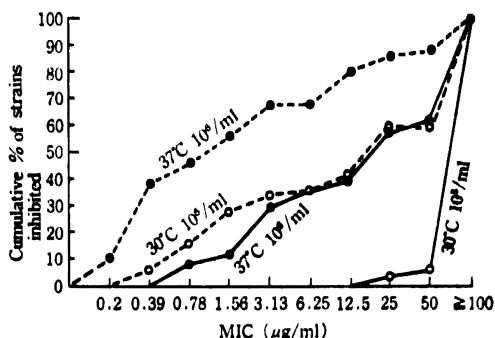


Fig.2 Susceptibility distribution of cephalothin against methicillin-resistant staphylococci

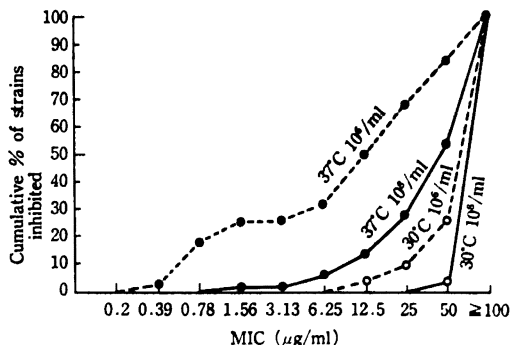
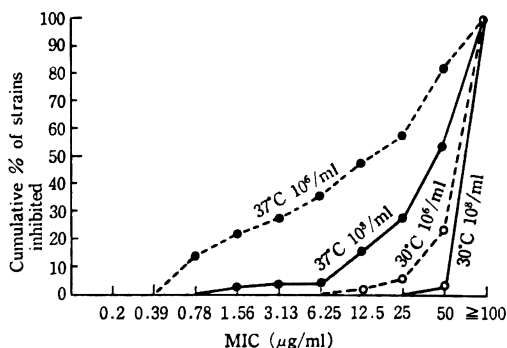


Fig.3 Susceptibility distribution of cephaloridine against methicillin-resistant staphylococci



チシリン・セフェム耐性菌とみなされた。しかしながら 37°C の培養条件下では、約 1/5 の菌株が 12.5 µg/ml 以下の MIC を示すようになり、MIC 値は感性側へ移動してくる現象が認められた。被験菌株の 10⁸/ml 接種時の DMPPC とセフェム剤の成績においても、30°C での成績に比べ、37°C では MIC が 10⁸/ml の菌接種時と同

じように感性側へ shift する傾向が認められた。

しかしながら、ペニシラーゼ耐性合成ペニシリン (PCase 耐性 PC) のうちの MCIPC や MDIPC においては、30°C の培養条件下での原液接種では大部分の株が 25 µg/ml 以上の MIC を示しているにもかかわらず、10⁴/ml の菌液接種にすると、0.39~0.78 µg/ml の MIC を示す株が約 1/3 程度認められ、37°C の培養では MIC がさらに感性側へ変動し、本来これらの薬剤に感性を示す菌との間で MIC 上での区別がみられなくなる株が多く見られた。

これらの β-ラクタム剤に対する MIC が、培養温度と接種菌量とによってどの程度変動するかを、累積分布曲線として Fig.1~3 に示した。Fig.1 には MCIPC、Fig.2 には CET、Fig.3 には CER の成績をそれぞれ示したが、図からも明らかなように、10⁶/ml の接種菌量時における MIC に限ってみても、被験菌の培養温度を前培養の 1 回と本培養の 1 回の 2 回を 30°C と 37°C とに変更しただけで、試験管で 3~5 管の差が出現し、MIC に換算すると 8~32 倍の差がみられるようになった。このことから、被験菌の培養温度によっては、MRSA は耐性菌ではなく感性菌と判定される可能性も存在していることが判明した。

なお、表には示さなかったものの、β-ラクタム剤との比較のために、Tetracycline, Amikacin, Gentamicin の MIC を同じ条件で測定したが、これらの薬剤では上述したような MIC の変動は認められなかった。

2. PCase plasmid を脱落させた変異株

臨床分離の MRSA における培養温度を違えた際の MIC の変動は、恐らく MRSA 特有の現象であろうと推定されたが、それらの大部分の株は PCase plasmid 保有株であり、被験薬によっては菌の産生する PCase によって水解され、培地中の薬剤力価が減少するものもあることから、PCase の影響を排除し、本質的なメチシリン・セフェム耐性菌における培養温度の影響をみるために、臨床分離の MRSA から PCase plasmid を脱落させた変異株を選択し、培養温度によって親株と同じような MIC の変動がみられるか否かを検討した。Table 3 には、親株である TK 388 株とその変異株である TK 388 E 株の成績を示したが、変異株においても、親株と同様に培養温度によって MIC の変動が観察された。

2. 培養温度の相違による殺菌効果

1) 臨床分離株

臨床分離の MRSA に対して、30°C および 37°C の培養条件において各種 β-ラクタム剤を作用させた際の経時的殺菌効果を比較検討した。Fig.4 と Fig.5 には、

Table 3 Minimum inhibitory concentrations of MRSA TK388 and the derivative TK388E against β -lactam antibiotics

Strain	β -lactamase	Inoculum size ^{a)}	Temperature ^{b)}	Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$)						
				MCIPC	CET	CER	CEZ	CMZ	CZX	LMOX
TK388	+	10^6	30	100	>100	25	>100	100	>100	>100
			37	25	100	6.25	25	12.5	>100	>100
		10^8	30	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100
			37	>100	>100	25	100	100	>100	>100
TK388E	-	10^6	30	6.25	50	25	100	50	>100	100
			37	3.13	3.13	6.25	6.25	12.5	100	50
		10^8	30	100	100	25	>100	100	>100	>100
			37	12.5	6.25	25	100	50	>100	>100

^{a)} CFU/ml, ^{b)} incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$).

Fig. 4 Time-kill curves of MRSA TK 388 strain in the presence of cloxacillin

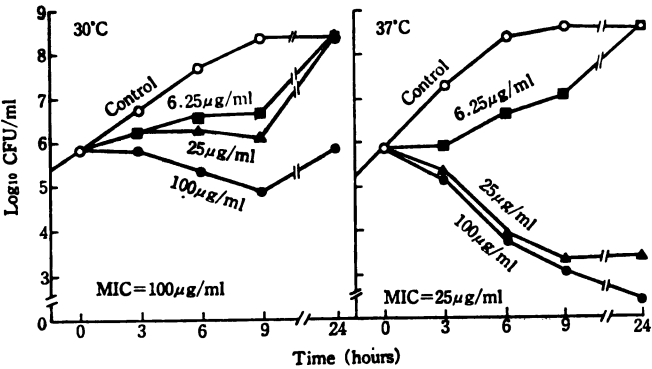
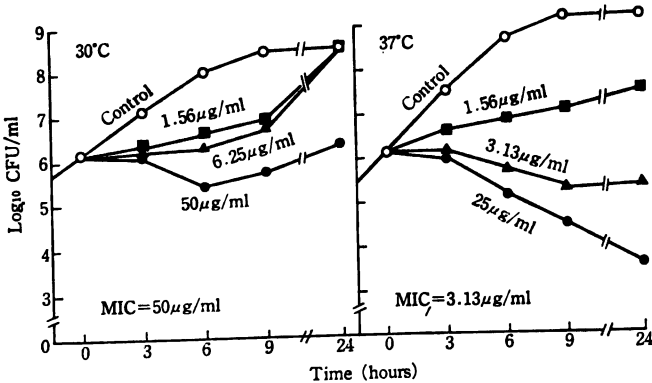


Fig. 5 Time-kill curves of MRSA TK 388 strain in the presence of cephalothin



検討した MCIPC, CET, CEZ, CZX の薬剤のうち、MRSA である TK 388 株に対する MCIPC と CET の $10^6/\text{ml}$ の菌接種時における成績をそれぞれ示してある。30 $^{\circ}\text{C}$ の培養条件下において MIC 以下の薬剤濃度を作用させると、薬剤無添加のコントロールに比べてはい

ずれも緩慢な生菌数の上昇を示し、薬剤添加後も、徐々にではあるが生菌数が増加してくることが認められた。これに対し、37 $^{\circ}\text{C}$ の培養条件下では、30 $^{\circ}\text{C}$ では生菌数の減少が認められなかった薬剤濃度でも生菌数の明らかな減少がみられ、薬剤の殺菌効果に関しても、培養温度

Fig. 6 Time-kill curves of MRSA TK 388 E strain in the presence of cephalothin

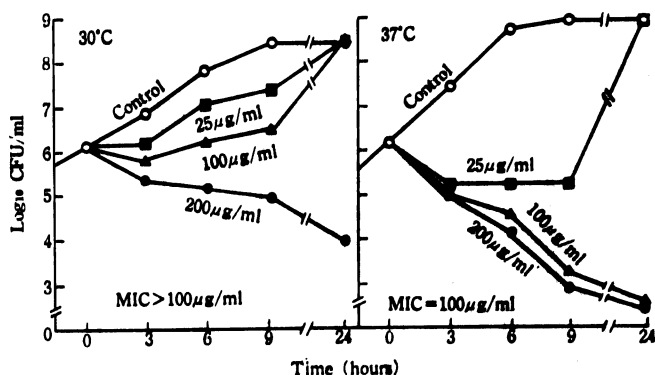
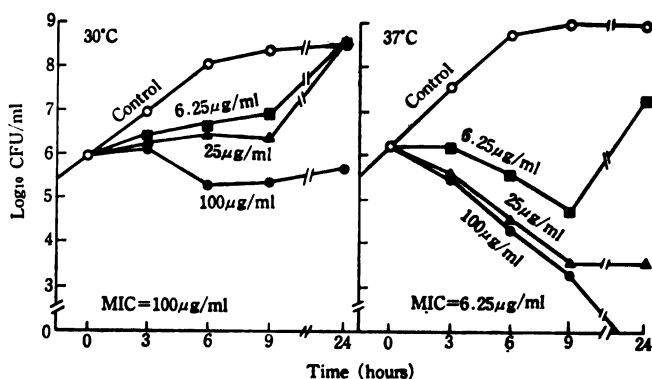


Fig. 7 Time-kill curves of MRSA TK 388 E strain in the presence of cefazolin



によって著しい違いのあることが判明した。このような殺菌効果の変動は、CEZ や CZX でも同様に認められた。

また、生菌数測定時に培地中の薬剤力価も測定しているが、CEZ では、薬剤添加後6時間頃より明らかな薬剤力価の低下が認められたものの、MCIPC や CZX では、少なくとも薬剤作用後9時間までの間には力価の減少は認められず、CET はその中間の値を示した。

2) PCase plasmid を脱落させた変異株

PCase plasmid を保有する臨床分離の MRSA 株においては、培養が長時間になるに従って、菌の産生する PCase によって培地中の β -ラクタム剤が水解し、CEZ などでは培地中の力価が減少する。そのようなことから、PCase plasmid を脱落させた変異株の TK 388 E 株を用いて、培養温度を違えた際の殺菌効果を比較した。

検討した薬剤のうち、Fig. 6 には CET, Fig. 7 には CEZ の成績をそれぞれ示したが、30°C の培養条件下においては、MIC の薬剤添加によっても生菌数はほとんど減少せず、静菌的作用であるのに対し、37°C での培養に

よっては、明らかな生菌数の減少が認められるという際立った特徴がみられた。つまり、PCase の影響を受けない菌株においても、 β -ラクタム剤の殺菌効果は、培養温度によって著しく左右されるという結果であった。

なお、TK 784 E 株を用いた実験においては、 β -ラクタム剤作用後の殺菌効果に培養温度の影響はみられていない。

3. 薬剤作用後の菌の形態変化

上述した、1. および 2. の成績から、30°C と 37°C の培養条件下においては、薬剤を作用させた際の菌の形態変化にも差異のあることが想定されたことから、位相差顕微鏡によりその形態変化を観察した。Fig. 8 には、TK 388 株に MCIPC を作用させた際の成績を示してある。図中 a ~ e には 30°C での培養時、f ~ j には 37°C での培養時における菌の形態変化を示したが、上段に示した 30°C での培養においては、菌の影画像のみが低濃度域から認められ、溶菌像は e に示した 100 μ g/ml の濃度での処理において漸く見出され始めるのに対し、37°C の培養では、h に示した 6.25 μ g/ml の濃度か

Fig. 8 Morphological changes of MRSA TK 388 strain grown on agar containing cloxacillin for 6 hrs at 30°C and 37°C. a through e, incubation at 30°C : a, no addition ; b, 0.39 μ g/ml (1/256 MIC) ; c, 6.25 μ g/ml (1/16 MIC) ; d, 25 μ g/ml (1/4 MIC) ; e, 100 μ g/ml (MIC). f through j, incubation at 37°C : f, no addition ; g, 0.39 μ g/ml (1/64 MIC) ; h, 6.25 μ g/ml (1/4 MIC) ; i, 25 μ g/ml (MIC) ; j, 100 μ g/ml (4 MIC). Arrows indicate lysis cells.

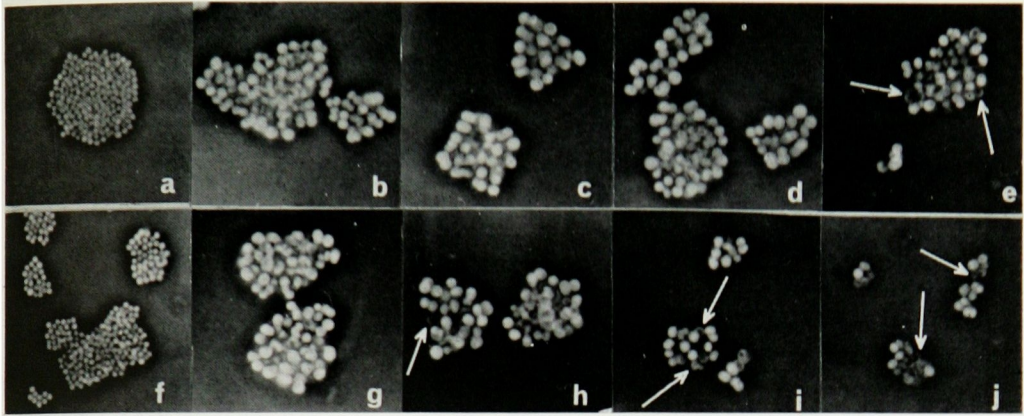
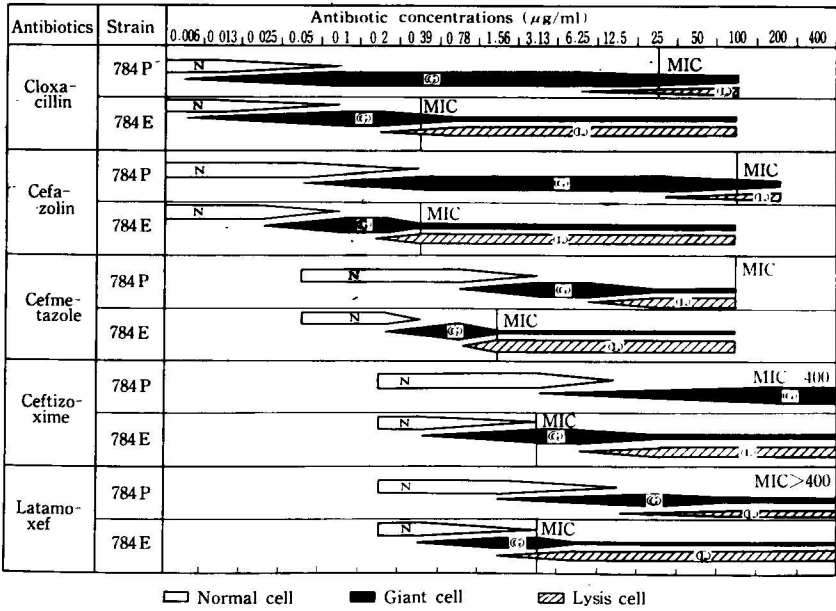


Fig. 9 Morphological changes of MRSA TK 784 and MSSA TK 784 E strains grown on agar containing various β -lactam antibiotics for 6 hrs at 30°C



ら巨大膨潤化した細胞に混じって溶菌像が出現し始めているのが観察された。このような形態変化の違いは、他の β -ラクタム剤を作用させた場合でもほぼ同様に観察された。

Fig. 9 は、臨床分離の MRSA TK 784 と MSSA TK 784 E について、30°C の培養条件下で調べた形態変化の結果をまとめたものである。興味あることは、臨床

分離の MRSA TK 784 株とメチシリン・セフェム耐性を脱落させた変異株 TK 784 E 株の両菌株において、実験に供したいずれの β -ラクタム剤を作用させても、図中に斜線で示した溶菌の出現し始める薬剤濃度が著しく異なるというだけで、図中に黒塗りで示した巨大膨潤像の出現し始める薬剤濃度には、ほとんど相違がないということであった。

III. 考 察

MRSA の出現が初めて報告されたのは 1961 年のことである⁹⁾ が、それ以来、欧米においては MRSA による臨床例の報告とともに、耐性に関する基礎的検討の報告も多数見られる。その初期の報告で注目されることは、MIC 値が菌の培養温度¹⁷⁻¹⁹⁾、培地の pH²⁰⁾ あるいは NaCl 濃度^{19,21)}によって大きく左右されるという現象である。これらの MIC が変動を示す菌に対して、“hetero resistance” という言葉を用いている論文^{19,22)} も認められるが、そのような MRSA の特徴から、米国においてはメチシリン・セフェムなどの薬剤感受性の測定は、35°C 以下の温度で実施することが望ましいということが提唱されている²³⁾。しかしながら、培養温度によって何故このように MIC 値が変動するのかということについては、必ずしも明確な意味付けがなされてきていたわけではない。

また、別の角度からによる研究においては、メチシリン耐性は PCase のような不活化酵素によるものではない⁹⁾ ことが明らかにされたことから、この耐性のメカニズムを β -ラクタム剤の標的である PBP と結び付けた研究がなされてきている。そして、今までの報告では、ブドウ球菌に見出される PBP のうち、分子量の大きい方から数えて PBP-2²³⁾ あるいは PBP-3^{7,9)} に対する β -ラクタム剤の親和性が MRSA では低下していること、あるいは PBP 全体に対する親和性が低下している⁹⁾ などの意見が述べられているが、必ずしも一致した見解が得られていたわけではない。

一方、上述した欧米の動向に対し、本邦でも、今まではほとんど問題となっていなかった MRSA が最近増加しつつあることから、この耐性が注目されるようになってきた。本邦において最初にこの MRSA に注目し、そのメカニズムを解析し始めたのは横田ら^{13,14)} である。彼らは、大部分の臨床分離の MRSA が PCase plasmid を保有し、¹⁴C-PCG を水解することから、PCase plasmid を脱落させた変異株を用いて PBP の解析を行ない、PBP-2 と呼称されている PBP よりも極くわずかに分子量の大きい新たな PBP-2' が存在することを報告した。また、この PBP-2' が他の PBP に比べ易熱性であり、なおかつ、この PBP に対する β -ラクタム剤の親和性が全般的に低いことから、メチシリン・セフェム耐性のメカニズムを説明するには、この PBP-2' が極めて有力であることを指摘したのである。この PBP-2' の存在は、私達も追試により確かめ得たのであるが、しかしながら、日常の中検業務において、メチシリン・セフェム耐性菌の薬剤感受性測定時に、ある種の β -ラクタム剤においてしばしば認める“double zone 現象”は、単に

PBP-2' の存在だけでは説明不可能のようにも考えたのである。つまり、この“double zone 現象”は、菌がある濃度の薬剤に触れることによって誘導される耐性ではないかということを想起させたのである。

このような情勢の中において、私達はその片側でブドウ球菌のアミノ配糖体薬の耐性機構の解析をしていたが、その際、偶然に 4',4''-アデニル転移酵素を産生するブドウ球菌が、その耐性と共にメチシリン・セフェム耐性をも同時に脱落することを見出した²⁴⁾。そして、この変異株と親株とに対して β -ラクタム剤を作用させ、菌の増殖を観察したところ、Chloramphenicol やマクロライドの誘導耐性に酷似した O. D. 曲線が得られることに気づき、その成績と“double zone 現象”とを併せて考えた時、メチシリン・セフェム耐性にも誘導耐性の関与があるのではないかという仮説を解析する必要性を痛感するに至った。それまでの私達の実験成績によると、MRSA では β -ラクタム剤を作用させても溶菌が生じにくいという現象があり、 β -ラクタム剤を作用させることにより、菌の側に β -ラクタム剤の標的である PBP が誘導されて産生され、その PBP に β -ラクタム剤が不可逆的に結合して消費されている可能性の高いことが示唆された。このことから、培地中に β -ラクタム剤を添加して MRSA を培養し、膜採取後に電気泳動を行なって coomassie 染色を施したところ、非誘導時に比べ、明らかに増量している膜蛋白が誘導時の膜画分中に見出された。結果的には、この誘導蛋白は横田らの指摘した PBP-2' と同じであったが、この PBP-2' の性状としていくつかの点が注目された。一部は既に報告¹³⁾ しているが、その要点は、1) PBP-2' は PCase plasmid 存在下では β -ラクタム剤を inducer として誘導産生されること、2) PCase plasmid を脱落させると PBP-2' は構成的に産生されること、3) PBP-2' そのものの性状からも推測されるように、37°C よりも 30°C が PBP-2' 産生の至適温度であること、4) 個々の β -ラクタム剤によって至適誘導濃度があることなどであった。

本論文で述べた成績では、培養温度の違いによって、MIC の変動と殺菌効果に著しい相違がみられ、特にブドウ球菌感染症に対して使用される可能性の高い MCI PC や MDIPC では 37°C の培養条件下では感性菌と耐性菌の区別が困難であると思われる成績であった。MRSA においては、その耐性発現に関わる PBP-2' の産生を左右する培養温度が極めて重要な因子であることが、より一層裏付けられたと考える。臨床的には、いずれの温度で感受性測定を実施するのが望ましいかといった問題は残ろうが、少なくとも、耐性菌と感性菌の判別を正しく行なうためには、中央検査部レベルにおいても β -

ラクタム剤に関しては前培養を含めて 30°C から 32°C で施行する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 紺野昌俊, 野々口律子, 後藤 朗, 生方公子, 川上小夜子: 血液培養から検出される細菌の動向について。感染症学雑誌 58: 99~112, 1984
- 2) 野々口律子, 後藤 朗, 山下直子, 生方公子, 紺野昌俊, 川上小夜子: 4', 4''-アデニル転移酵素を産生する黄色ブドウ球菌の分離状況について。Chemotherapy 32: 89~98, 1984
- 3) 野々口律子: 本邦において分離され始めた 4', 4''-アデニル転移酵素を産生するコグラーゼ陰性ブドウ球菌の分離状況について。感染症学雑誌 58: 569~582, 1984
- 4) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA, A. GOTOH & M. KONNO: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 754~759, 1984
- 5) JEVONS, M. P.: "Celbenin"-resistant staphylococci. British Med. J. 1: 124~125, 1961
- 6) SELIGMAN, S. J.: Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature (London) 209: 994~996, 1966
- 7) HAYES, M. V.; N. A. C. CURTIS, A. W. WYKE & J. B. WARD: Decreased affinity of a penicillin-binding protein for β -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. FEMS Microbiol. Lett. 10: 119~122, 1981
- 8) HARTMAN, B. & A. TOMASZ: Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 726~735, 1981
- 9) GEORGOPAPADAKOU, N. H.; S. A. SMITH & D. P. BONNER: Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 22: 172~175, 1982
- 10) BLUMENTHAL, R. M.; R. RAEDER, C. D. TAKEMOTO & E. H. FREIMER: Occurrence and expression imipenem (*N*-formimidoyl thienamycin) resistance in clinical isolates of coagulase negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 24: 61~69, 1983
- 11) MCDUGAL, L. K. & C. THORNSBERRY: New recommendations for disc diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. J. Clin. Microbiol. 19: 482~488, 1984
- 12) 生方公子, 山下直子, 野々口律子, 後藤 朗, 紺野昌俊: 黄色ブドウ球菌のメチシリンおよびセフェム系抗生物質に対する耐性について 第2報 Chemotherapy 32: 926, 1984
- 13) 関口玲子, 奥村和夫, 横田 健: セフェム系薬剤耐性黄色ブドウ球菌のペニシリン結合タンパク質。Chemotherapy 30: 1510, 1982
- 14) 横田 健: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌。感染・炎症・免疫 14: 87~97, 1984
- 15) UBUKATA, K.; N. YAMASHITA & M. KONNO: Occurrence of a β -lactam inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 27: 851~857, 1985
- 16) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 17) ANNEAR, D. I.: The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics. Med. J. Aust. 1: 444~446, 1968
- 18) CANAWATI, H. N.; J. L. WITTE & F. L. SAPICO: Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to four different cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 173~175, 1982
- 19) DYKE, K. G. H.: Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in methicillin-resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 2: 261~278, 1968
- 20) SABATH, L. D.; S. J. WALLACE & D. A. GERSTEIN: Suppression of intrinsic resistance to methicillin and other penicillins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2: 350~355, 1972
- 21) BARBER, M.: Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci. J. Gen. Microbiol. 35: 183~190, 1964
- 22) THORNSBERRY, C.; J. Q. CARUTHERS & C. N. BAKER: Effect of temperature on the *in vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 263~269, 1973
- 23) WYKE, A. W.; J. B. WARD & M. V. HAYES: Synthesis of peptidoglycan *in vivo* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 127: 553~558, 1982
- 24) 山下直子, 生方公子, 野々口律子, 後藤 朗, 紺野昌俊: 黄色ブドウ球菌のメチシリンおよびセフェム系抗生物質に対する耐性について 第1報 Chemotherapy 32: 926, 1984

EFFECT OF INCUBATION TEMPERATURE ON MEASUREMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF β -LACTAM ANTIBIOTICS FOR METHICILLIN- AND CEPHEM-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

NAOKO YAMASHITA, KIMIKO UBUKATA, MARI MATSUSHITA,
and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine

MARIKO MASUDA and RITSUKO NONOGUCHI

Department of Pediatrics, Mizonokuchi Hospital,
Teikyo University School of Medicine

With 50 strains of methicillin- and cephem-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from clinical materials as test organism, the MIC and bactericidal effect of β -lactam antibiotics against MRSA cultured at varying temperature were determined. The results were as follows:

1. The MIC values of various β -lactam antibiotics were measured under the following conditions: 1) inoculum size 10^6 /ml, incubation temperature at 30°C , 2) inoculum size 10^6 /ml, incubation temperature at 30°C , 3) inoculum size 10^6 /ml, incubation temperature at 37°C , 4) inoculum size 10^6 /ml, incubation temperature at 37°C . The experiment revealed that MICs greatly varied with change of the incubation temperature, even if the inoculum size of MRSA was constant. Namely, compared with MICs at 30°C , MICs at 37°C generally shifted towards at a lower concentration range with 8- to 32-fold increase in sensitivity.

2. The bactericidal effect of each β -lactam antibiotic against MRSA was determined under the same conditions of culture as in the measurement of MICs. Some concentrations of antibiotics which showed no bactericidal effect at 30°C clearly recognized bactericidal effect at 37°C .

3. The fact that the bactericidal effect varied with change of incubation temperature was confirmed by the observation of morphological changes of MRSA through a phase-contrast microscope. When the organisms were exposed to the antibiotic, swollen cells inhibiting septal wall synthesis began to be observed at low concentrations. Whereas cell lysis was almost not detected even when the antibiotic concentration was increased considerably high in organisms cultured at 30°C , the cell lysis were observed together with swollen cells while the antibiotic concentration was still at a relatively low level in organisms cultured at 37°C .

4. The discrepancy of MICs and bactericidal effect through change of incubation temperature was observed in derivative strain eliminated PCase plasmid but retaining resistance to methicillin and cephem too.

5. It was investigated that the above phenomenon occurred because penicillin-binding protein-2^{*} itself is temperature sensitive, so the optimal temperature for its production was at 30°C than at 37°C .