

## 多剤耐性 *Staphylococcus aureus* のマウス実験感染治療における $\alpha$ -hemolysin toxoid の有効性と各種抗菌剤との併用効果

小沢 義行・炭山 嘉伸・鶴見 清彦

東邦大学医学部第三外科教室

小川 正俊・五島 遊智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 61 年 9 月 8 日受付)

Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、米国では 1960 年頃より問題視されていたが近年我が国においても、その分離報告が増加している。本菌は、多くの常用抗菌薬に耐性である株が多いため臨床治療上の重要な課題となっている。本菌の感染に対応するためには、有効な抗菌薬の研究開発とともに免疫療法の可能性が考えられる。その一方法として多くの常用抗菌薬に耐性の MRSA より調製した  $\alpha$ -hemolysin toxoid によって *in vivo* における感染治療の効果を検討するとともに、抗菌薬との併用効果を検討した。多剤耐性の *S. aureus* より得られた  $\alpha$ -hemolysin をホルマリン処理により toxoid を調製し、これを感染の 1~11 日前にマウスに投与したところ、無投与群と比べ、多剤耐性 *S. aureus* 感染に対し有効な防御効果が得られた。

この toxoid の前投与は、多剤耐性 *S. aureus* 感染に対し有効であったが、他菌種による感染には無効であった。

また  $\alpha$ -hemolysin toxoid と各種の抗菌薬との併用は、 $\alpha$ -hemolysin toxoid および抗菌薬のそれぞれ単独治療より良好な結果が得られた。

従来、欧米において Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (以下 MRSA と略す) による感染症の治療は化学療法における重要な課題であったが、近年本邦においても緑膿菌などの opportunistic infection とともに病院内感染としても無視できない問題となってきた<sup>1,2)</sup>。

外科領域でもこの種の細菌が、基礎疾患をもつ感染防御能の低下した患者などの術後感染症を誘発し、治療を困難にしている症例が多い。

特に欧米では、*S. aureus* 感染症の治療に各種の penicillin 系抗菌薬が使用され、MRSA が治療に抵抗し問題化した。本邦では第 1 世代 cephem 系抗菌薬が応用され、それらが十分な抗 *S. aureus* 活性を示したために、当時 MRSA は、諸外国ほど注目されてはいなかった<sup>1,3)</sup>。

しかし、MRSA が penicillinase などの不活化酵素の産生能の獲得のほかに、penicillin-binding-protein の変化、第 3 世代 cephem 剤に低感受性であることのため、耐性菌として選択され多種の抗菌薬に対しても耐性を示すようになった<sup>4,5)</sup>。MRSA に対しては、有効な

抗菌薬の開発による対処と、一方では患者の感染防御能を高める方法が考えられるが、後者の方法として本邦では細谷-孫田ら<sup>7,8)</sup>により、*S. aureus* 産生の  $\alpha$ -hemolysin 由来 toxoid を臨床使用した報告がある<sup>9-11)</sup>。

われわれはマウス実験感染に対する  $\alpha$ -hemolysin toxoid の感染防御効果を検討し、さらに抗菌薬との併用による有用性を評価した。

### I. 材料と方法

#### 1) 使用菌株

昭和 60 年に東邦大学大橋病院で各種臨床材料から分離された *S. aureus* 146 株を用いた。

なお MRSA 株は、日本化学療法学会標準法<sup>12)</sup>に従い MIC 測定 (37°C) を行ない、Methicillin に対して 12.5  $\mu$ g/ml 以上の MIC を示した菌株とした。

#### 2) 薬剤感受性の測定

日本化学療法学会標準法<sup>12)</sup>により各薬剤の MIC を測定した。接種菌量は  $10^6$  cells/ml を使用した。使用薬剤は下記の通りである。

Methicillin (DMPPC 833  $\mu$ g/mg, 萬有製薬)

Cloxacillin (MCIPC 904  $\mu$ g/mg, 明治製薬)

Ampicillin (ABPC 904  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 藤沢薬品工業)  
 Piperacillin (PIPC 915  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 富山化学工業)  
 Ticarcillin (TIPC 831  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 藤沢薬品工業)  
 Cephaloridine (CER 977  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 塩野義製薬)  
 Cefazolin (CEZ 964  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 藤沢薬品工業)  
 Cefotiam (CTM 820  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 武田薬品工業)  
 Cefmetazole (CMZ 935  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 三共)  
 Cefotetan (CTT 937  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 山之内製薬)  
 Cefmenoxime (CMX 945  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 武田薬品工業)  
 Ceftazidime (CAZ 845  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 新日本製薬)  
 Latamoxef (LMOX 939  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 塩野義製薬)  
 Gentamicin (GM 585  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 日本エネックス)  
 Tetracycline (TC 990  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 台糖ファイザー)  
 Minocycline (MINO 864  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 日本レダグリー)  
 Erythromycin (EM 943  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 塩野義製薬)  
 Lincomycin (LCM 849  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 日本アップジョン)  
 Ofloxacin (OFLX 1,000  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 第一製薬)

### 3) $\alpha$ -hemolysin 産生能の検討

MRSA 96株と Methicillin sensitive *S. aureus*(MSSA) 50株を用い、5% ヒツジ、ウサギおよびヒト赤血球加普通寒天培地に塗抹接種、37°C 24時間培養後の溶血の有無を判定した。ヒツジ、ウサギ血球を溶血し、ヒト血球を溶血しない株を  $\alpha$ -hemolysin 産生株とした。

### 4) $\alpha$ -hemolysin toxoid の調製法

臨床分離の *S. aureus* TMS 288 株を軟寒天培地 [beef extract (Difco) 0.3%, NaCl (和光純薬) 0.5%, polypeptone 1.0%, protease peptone No. 3 (Difco) 1.0%, agar (Difco) 0.4%, pH 7.4~7.6] で、37°C 48時間静置培養を行なった。ガーゼにて培地成分を除去し培養上清液を、細谷-浜田らの外毒素部分濃縮法に従い、上清液の4倍量の冷メタノール液を添加し沈殿を採取した。沈殿に蒸留水を少量加えて溶解し、ミリポアフィルターにて濾過滅菌を行なった。無菌濾液にホルマリンを0.04% (v/v) となるように添加し37°C 7日間静置後、無毒化して、 $\alpha$ -hemolysin toxoid を調製した。

### 5) 実験感染マウスに対する $\alpha$ -hemolysin toxoid の防御効果

① 使用動物: ICR系、4週齢マウス、雄、体重19±1gを1群5匹として使用した。

② 感染菌株: *S. aureus* TMS 288, *Streptococcus pyogenes* B6, *Streptococcus pneumoniae* 101, *Escherichia coli* C11, *Klebsiella pneumoniae* 3K25, *Serratia marcescens* 2, *Pseudomonas aeruginosa* E7のそれぞれ一夜培養菌を5% mucinを添加した生理食塩水に懸濁しマウス腹腔内に接種した。

③ toxoidの前投与方法:  $\alpha$ -hemolysin toxoid を、0.1

mg protein/mouse を1日前投与したマウス生残率により効果の判定を行なった。さらに等量の  $\alpha$ -hemolysin toxoid を11, 8, 3, 1日、および18, 12, 6, 0時間前投与し、その後 *S. aureus* TMS 288 を接種、効果判定を行なった。

④ 抗菌薬と  $\alpha$ -hemolysin toxoid の併用効果: マウスに、 $\alpha$ -hemolysin toxoid, 0.025 mg protein/mouse を1日前投与したマウスに *S. aureus* TMS 288 を接種し、感染1時間後に Methicillin, Cloxacillin, Cephalothin, Cefmetazole, Cefazolin のいずれかを20 mg/mouse, Gentamicin, Minocycline および Ofloxacin ではこれらのおいずれかを2 mg/mouse 投与した。なお、Minocycline, Ofloxacin は経口投与、他は皮下投与とした。

## II. 実験成績

### 1) MRSA 96 株の各種抗菌薬感受性

MRSA に対し MIC が12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上を耐性とした場合 penicillin 系抗菌薬は高頻度(約85%)に耐性を示した。cephem 系抗菌薬では CER が約50%の耐性を示したが、その他の薬剤の耐性株の出現頻度は約70%以上であった。特に第3世代 cephem 系薬剤 (CPZ, CAZ, LMOX) に対しては90%以上の株が耐性であった。その他の薬剤のうち MINO, OFLX に対して、耐性株は少なく耐性の出現頻度は3%、0%であった。

Fig. 1 Incidence of resistant strains to various antimicrobial agents among methicillin resistant *S. aureus* 96 strains

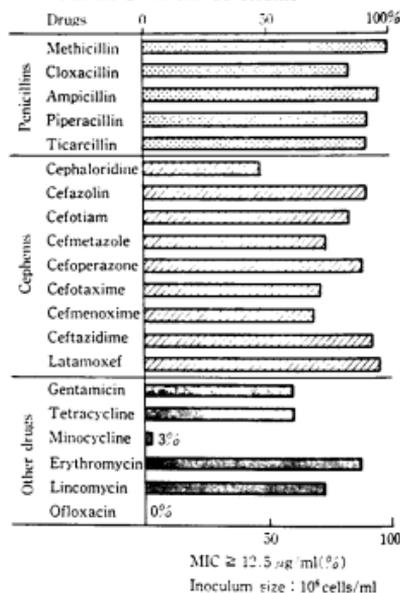


Fig. 2 Protective effect of  $\alpha$ -hemolysin toxoid on systemic infection in mice due to MRSA

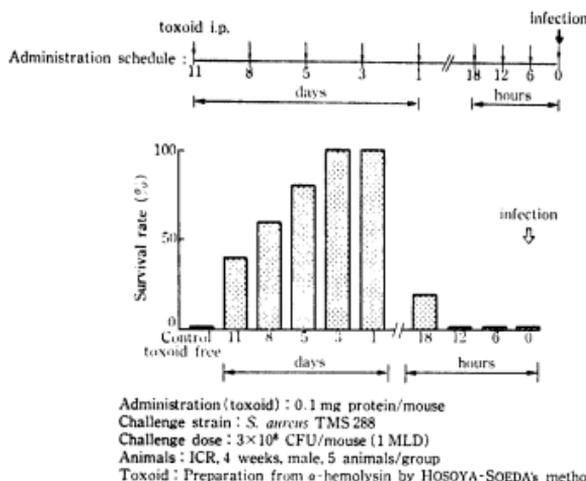


Table 1 Protective effect of  $\alpha$ -hemolysin toxoid against bacterial infections in mice

Species	$\alpha$ -hemolysin toxoid survival rate (%)	Control toxoid free survival rate (%)	Challenge dose (CFU/mouse)
<i>S. aureus</i> TMS 288	100	0	$3 \times 10^8$ (1 MLD)
<i>S. pyogenes</i> B 6	0	0	$3 \times 10^7$ (3 MLD)
<i>S. pneumoniae</i> 101	0	0	$2 \times 10^7$ (2 MLD)
<i>E. coli</i> C 11	0	0	$8 \times 10^7$ (8 MLD)
<i>K. pneumoniae</i> 3K25	0	0	$1 \times 10^8$ (1 MLD)
<i>S. marcescens</i> 2	0	0	$7 \times 10^7$ (7 MLD)
<i>P. aeruginosa</i> E 7	0	0	$1 \times 10^8$ (2 MLD)

Administration : Toxoid was administrated at 1 day before infection.

Dose :  $\alpha$ -hemolysin toxoid 0.1 mg protein/mouse.

しかし、GM、TC に対しては約 60%、EM および LCM では約 70% 以上が耐性であった (Fig. 1)。

2)  $\alpha$ -hemolysin toxoid の MRSA 感染マウスに対する防御効果

$\alpha$ -hemolysin toxoid の感染防御効果を *S. aureus* TMS 288 (MRSA) を用いて検討した。 $\alpha$ -hemolysin toxoid の投与条件の内、感染 11 日目の投与においても 40% の生残率が得られた。3 日および 1 日目の投与では 100% と完全な感染防御効果が得られた。18 時間前の投与では、感染防御効果は著しく低下し、生残率は 20% であり、12 時間前、6 時間前投与では無効であった (Fig. 2)。

3) 各種の細菌感染マウスに対する  $\alpha$ -hemolysin toxoid の効果

$\alpha$ -hemolysin toxoid の 1 日前投与で *S. aureus* TMS 288 (MRSA) 感染に対して 100% のマウス救命率が得られたが、他の菌種 (*S. pyogenes* B 6, *S. pneumoniae* 101, *E. coli* C 11, *K. pneumoniae* 3K 25, *S. marcescens* 2, *P. aeruginosa* E 7) による感染に対しては全く防御効果を示さなかった (Table 1)。

4) *S. aureus* における  $\alpha$ -hemolysin 産生率

MRSA および Methicillin sensitive *S. aureus* (以下 MSSR) における  $\alpha$ -hemolysin 産生株の分離頻度を比較した。両者とも 96% を示し、MRSA (96 株) と MSSA (50

株)との間に  $\alpha$ -hemolysin 産生には差が認められなかった (Fig. 3)。

- 5)  $\alpha$ -hemolysin 産生株および非産生株による感染マウスに対する  $\alpha$ -hemolysin toxoid の感染防御効果

$\alpha$ -hemolysin toxoid を1日前に投与したマウスに、 $\alpha$ -hemolysin 産生株の *S. aureus* TMS 3, *S. aureus* TMS 4, *S. aureus* TMS 20, *S. aureus* TMS 288 を感染とした場合、生存率は60%~100%を示した。 $\alpha$ -hemolysin 非産生株である *S. aureus* TMS 19, *S. aureus* TMS 73 による感染の生存率は20%であり、 $\alpha$ -hemolysin toxoid は  $\alpha$ -hemolysin 産生株の感染に対し、良好な救命率を示した。しかし、 $\alpha$ -hemolysin 非産生株の感染に対する防御効果は弱かった (Fig. 4)。

- 6)  $\alpha$ -hemolysin toxoid と抗菌薬の併用における感染防御効果

Fig. 3 Isolation frequency of  $\alpha$ -hemolysin-producing strains in clinical isolates of *S. aureus*

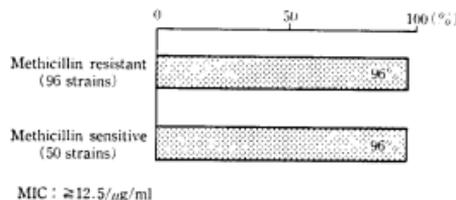
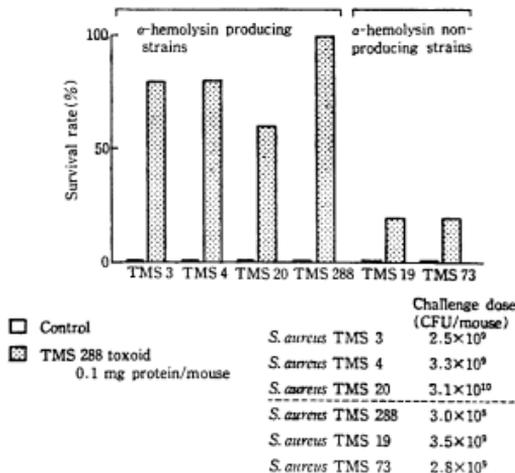


Fig. 4 Protecting effect of  $\alpha$ -hemolysin toxoid on infection in mice due to  $\alpha$ -hemolysin-producing and non-producing *S. aureus*



$\alpha$ -hemolysin toxoid および各種の抗菌薬の単独投与群と併用群の感染防御効果を比較した。Cloxacillin, Cefmetazole, および Minocycline を除く各種薬剤の単独投与では *S. aureus* TMS 288 (MRSA) に対する感染防御効果は弱かった。toxoid (0.025% mg protein/mouse) の単独投与では20%の感染防御効果を示した。単独で100%の感染防御効果を示した Minocycline の場合を除き、各薬剤と toxoid の併用は単独投与群と比較して明らかに優れた感染防御効果を示した (Fig. 5)。

- 7) Minocycline 耐性 *S. aureus* 感染に対する  $\alpha$ -hemolysin toxoid の感染防御効果

Fig. 5 の実験に使用した MRSA は、Minocycline に高い感受性を示し、本剤と toxoid の併用効果を評価することが不可能であった。臨床分離株のなかで、Minocycline に耐性 (MIC;  $12.5 \mu\text{g/ml}$ ) を示す菌株 *S. aureus* TMS 2 による感染マウスに対する Minocycline 単独の感染防御効果を toxoid 併用群と比較した。Minocycline 単独投与群の生存率は20%であったが、併用群では60%となり明らかに併用による防御効果の増強が認められた (Fig. 6)。

### III. 考 察

Penicillin 耐性 *S. aureus* に対する化学療法剤として Methicillin が開発されて以来、欧米では、1960年代から本剤が臨床的に多用されてきた<sup>13,14)</sup>。1963年 JEVONS ら<sup>15)</sup>の報告によると MRSA の出現頻度は0.48%に過ぎなかった。しかし、1975~1977年における GRIEBLE

Fig 5 Combined effects of antibiotics and  $\alpha$ -hemolysin toxoid on infection in mice due to MRSA

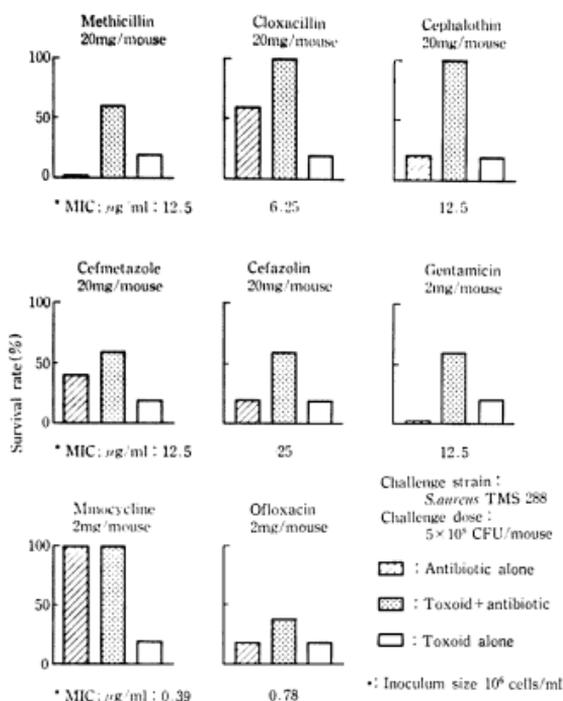
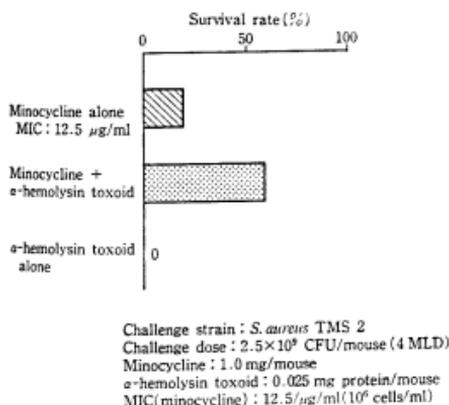


Fig 6 Combined effect of  $\alpha$ -hemolysin toxoid and minocycline on minocycline-resistant strain of *S. aureus*



ら<sup>10</sup>の報告によればその検出率が16.7%と増加し、1981年におけるSARAVOLATZら<sup>17)</sup>の報告では38%と高率にMRSAが分離されるに至った。

本邦におけるMRSAの出現頻度の変遷をみると、1964年五島<sup>18)</sup>、中沢ら<sup>19)</sup>の報告では0.8%であったが、1979年橋本ら<sup>20)</sup>の1.0%、1984年における松本らの報告では34.0%と増加している。

欧米においては、penicillin耐性*S. aureus*に対しMethicillinが使用されたが、本邦ではこれら耐性*S. aureus*に、第1世代のcephem系薬剤が多く臨床使用されていた。したがって欧米におけるほど*S. aureus*の感染症の治療上MRSAが問題とならなかった<sup>1-3)</sup>。多剤耐性*S. aureus*のpenicillinaseやアミノ配糖体その他の種々の薬剤に対する不活化酵素産生能の獲得、PBPの変化などによる耐性機作の変化とともに、臨床的に多用される第3世代cephem系薬剤の*S. aureus*に対する抗菌力が弱い事実などから1980年代から本邦でもMRSAが基礎、臨床の両面で問題視されてきた。特にMRSAの多くの菌株が臨床使用される常用抗菌薬に対して高度

に耐性を示すため、臨床治療の上で重要な課題となっている。

われわれは各種抗菌薬に対する MRSA の感受性を検討した結果、使用した抗菌薬のうち MRSA に対し有効な抗菌薬は Ofloxacin, Minocycline であった。しかし、Minocycline に対し MRSA はすでに 3% の耐性株が認められ、また Ofloxacin は経口投与のみで、小児への投与には制約がある。

*S. aureus* 感染に対し、1960 年代までは本邦では  $\alpha$ -hemolysin に対する toxoid が臨床使用されており、作用機作の解明は不十分ながらも一応の効果が認められていた。われわれは、未発表であるが免疫能の検討として、補体活性  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $CH_{50}$ , および好中球 superoxide 産生能の比較を toxoid 前投与群と無投与群について検討したが、有意差は認められなかった。

$\alpha$ -hemolysin toxoid はマウス実験感染における防御効果が  $\alpha$ -hemolysin 産生 *S. aureus* 感染に対しては著効を示した。しかし、それ以外の菌種の感染に無効であること、また、感染前投与による効果が、きわめて短時間であることなどから、*S. aureus* に対する特異性はありながらも、それが toxoid 接種により産生された防御抗体とは別な免疫系への作用が考えられた。さらに、このことは  $\alpha$ -hemolysin toxoid と各種の抗菌薬との併用によって単剤では MRSA に対し十分な効果をもたない抗菌薬でも防御効果の増強が認められた事実からも推測される。本稿では、まだその機作の解明には至っていないが、今後の検討結果には臨床応用への可能性が考えられよう。

#### 文 献

- 1) 横田 健:メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)。医学のあゆみ 131: 951~956, 1984
- 2) 松本慶蔵, 工藤和治, 宇塚良夫, 渡辺貴和雄, 永武毅, 力富直人, 高橋 淳, 鈴木 寛:本邦における最近の病原性の明確な黄色ブドウ球菌 第一報  $\beta$ -lactam 剤感受性について。Chemotherapy 32: 344~353, 1984
- 3) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 上条仁子, 佐々木宗男, 畠山 勲, 稲松孝思, 浦山京子:セフェムを含む多剤耐性黄色ブドウ球菌の分離状況と 41 抗菌薬に対する感受性。Chemotherapy 31: 835~841, 1983
- 4) 五島登智子, 辻 明良: $\beta$ -ラクタム系抗生物質と  $\beta$ -ラクタマーゼ。検査と技術 9: 464~471, 1981
- 5) 横田 健:ペニシリン系抗生物質・インヒビター。

医学のあゆみ 111: 931, 1978

- 6) 三橋 進, 加藤たか子:抗菌薬耐性化機序とその対策。治療学 8(Suppl.): 193~203, 1982
- 7) 細谷省吾:病原細菌の毒素代謝物質並びに、毒素に関する私供の研究。東京医事新誌 3083: 1351~1369, 1938
- 8) 添田百枝:耐性ブドウ球菌に関する研究。日本細菌学雑誌 21: 332~335, 1966
- 9) 村田 勇, 前田昭治, 中川昭忠:耐性ブドウ球菌トキシノイドの臨床成績について。Chemotherapy 14: 105, 1966
- 10) 北原哲夫, 本田盛安, 萩原 治:耐性ブドウ球菌トキシノイドの治療効果判定に関する研究。日本細菌学雑誌 21: 329~331, 1966
- 11) 添田百枝:耐性ブドウ球菌トキシノイドの治療効果判定に関する研究。日本細菌学雑誌 21: 329~331, 1966
- 12) 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
- 13) ROBERT W. HALEY, ALLEN W. HIGHTOWER, RINNA F. KHABBAZ, CLYDE. THORNSBERRY, WILLIAM J. MARTONE, JAMES R. ALLEN, & JAMES M. HUGHES: The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in United States Hospitals. Annals of Internal Medicine 97: 297~308, 1982
- 14) ROBERT L. THOMPSON, RICHARD P. WENZEL: Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annals of Internal Medicine 97: 309~317, 1982
- 15) JEVONS, M. P.; A. W. COE & M. T. PARKER: Methicillin-resistance in *Staphylococci*. Lancet 1: 904~907, 1963
- 16) GRIEBLE, H. G.; S. L. KRAUSE, S. A. PAPPAS & M. B. DIANGO: The prevalence of *Staphylococci*. Medicine 60: 62~69, 1981
- 17) SARAVOLATZ, L. D. & L. M. ARKING: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus* infections. Annals of Internal Medicine 97: 325~329, 1982
- 18) 五島登智子, 丹羽千鶴子, 桑原章吾: Methyl isoxazolyl penicillin のブドウ球菌に対する抗菌作用。Chemotherapy 12(Suppl.): 2~3, 1964
- 19) 中沢 進, 岡 秀, 大石 久, 岩田正昭, 佐藤 馨, 新井藏吉, 小林富士男, 近岡秀次郎: Methyl chlorophenyl isoxazolyl penicillin の小児科領域に於ける臨床的検討。Chemotherapy 12 (Suppl.): 56~65, 1964
- 20) 橋本 一, 大久保豊司:耐性化が問題の細菌類その現状と今後 ブドウ球菌。日本臨床 42: 658~663, 1984

COMBINED EFFECTS OF ANTIBIOTICS AND  $\alpha$ -HEMOLYSIN  
TOXOID AGAINST MULTIPLE RESISTANT  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN  
EXPERIMENTAL INFECTION

YOSHIYUKI OZAWA, YOSHINOBU SUMIYAMA and KIYOHICO TSURUMI  
The Third Department of Surgery, School of Medicine, Toho University

MASATOSHI OGAWA and SACHIKO GOTO  
Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

Nosocomial infection caused by methicillin-resistant *S. aureus* (referred to as MRSA) have reached the epidemic level in Japanese hospitals. Then we studied the effects of combined use of antibiotics and toxoid made from MRSA. Toxoid was prepared by HOSOYA-SOEDA's method. Single use of the toxoid was effective against the septicemic mice with MRSA, but not effective against the infected mice with the other species.

The combined use of toxoid and antibiotics showed a higher survival rate than either single use of toxoid or antibiotics. The administration of toxoid to mice at 1 and 3 days prior to the infection showed the highest survival rate compared to the toxoid free group.

As a result, toxoid prepared from MRSA was effective against mice infected with MRSA.