

# 新鮮分離黄色ブドウ球菌に対する、15 抗菌剤の MIC 分布

—微量液体希釈法を用いた成績—

出口 浩一・横田のぞみ・古口 昌美・中根 豊

深山 成美・西村由紀子・小田 清次

東京総合臨床検査センター研究部\*

(昭和 63 年 9 月 24 日受付)

1987 年 7 月以降に分離した *Staphylococcus aureus* 300 株に対する、各種抗菌性物質の MIC を測定した。300 株のうちわけは、methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 149 株、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 151 株である。これら 300 株に対する  $\beta$ -ラクタム系 8 剤、その他 7 剤、合計 15 薬剤の MIC を微量液体希釈法にて測定し、次の結論を得た。

1. 微量液体希釈法によって得られた MIC 値は、いずれの薬剤においても、寒天平板希釈法と比較して 2~4 倍高い値を示した。これら両測定法によって生ずる MIC 値の差は、使用培地・細菌の発育状態の観察方法などの違いから生ずる必然的な差であることを指摘し、両測定法の活用の仕方を論じた。

2. MSSA は QLS 耐性が増加する傾向を示した。

3. MRSA に対する CEPs 7 剤の MIC を、薬剤感受性パターンとして捉える手法で分析すると、CEPs の 7 剤は各々特有の MIC 分布を示した。

4. MRSA に対する CEPs の抗菌力の評価には MSSA も含む抗菌力の強弱、penicillin binding protein 2' を誘導する性状の見極めが大切な基準のひとつであることを述べた。

**Key words:** 新鮮分離 *Staphylococcus aureus* 300 株、15 抗菌剤の MIC 分布、微量液体希釈法の活用法

近年我が国の多くの病院分離菌においては、臨床分離 *Staphylococcus aureus* の methicillin 耐性株 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA) が増加傾向を示しており、それらに関する数多くの検討報告がみられる。

著者らは 1980 年以降、MRSA に関する検討を行なっていて、MRSA は、ペニシリン系薬剤に加え、セフェム系薬剤にも耐性を示す性質すなわち methicillin-, cephem-resistant *Staphylococcus aureus* であること<sup>1)</sup>、さらに MRSA はもう一方の性質である多剤耐性菌であることを報告してきた<sup>2)</sup>。

その後、1987 年以降に登場してきた複数のセフェム系薬剤が MRSA に抗菌力を示すという報告があり<sup>3,4)</sup>、その一方では、MRSA のニューキノロン耐性菌が新たに問題となってきた<sup>5)</sup>。

私たちは、1987 年 7 月以降に分離した *S. aureus* の

新鮮分離株を用いて、新規に登場してきたセフェム系薬剤、アミノグリコシド系薬剤、そしてニューキノロン系薬剤を加えた合計 15 薬剤の *S. aureus* に対する MIC 分布を検討した。MIC の測定は、微量液体希釈法を用いた。

## I. 検討方法

1987 年 7 月~1988 年 2 月に当センター研究部において、各種感染症採取患者材料 (検体) から検出した *S. aureus* のうち、methicillin (DMPPC) の一濃度ディスク (昭和) に感性を示した株 150 株、同じく耐性もしくは低感性と判定された 150 株を無作為に選び、検討に供した。

なお、株の集積にあたっては、同一施設、同一患者、採取された検体が重複しないようにつとめた。

## 2. 供試薬剤

methicillin(DMPPC: 萬有製薬), cephalothin(CET:

\* 東京都足立区千住仲町 14-4

塩野義製薬), cefazolin (CEZ: 藤沢薬品工業), cefotiam (CTM: 武田薬品工業), cefamandole (CMD: 塩野義製薬), cefmetazole (CMZ: 三共), ceftazidime (CZON: 日本レダリー), flomoxef (FMOX: 塩野義製薬), minocycline (MINO: 日本レダリー), gentamicin (GM: エッセクス日本), tobramycin (TOB: 塩野義製薬), arbekacin (HBK: 明治製菓), ofloxacin (OFLX: 第一製薬), norfloxacin (NFLX: 杏林製薬), NY-198 (北陸製薬), 以上 15 薬剤の標準原末を使用した。

3. MIC の測定法

MIC-2000 system (Dinatech, USA) を用いた微量液体希釈法 (microdilution broth method), Mueller-Hinton broth (Difco) にカルシウム, マグネシウムの規定量を添加した液体培地を用いて, 上記 15 薬剤の 100~0.05 µg/ml の 2 段階希釈系列を作製しこれらに, 上記 1 の 300 株の規定菌量液を接種し, 37°C, 20 時間培養後に MIC を測定した。なお, DMPPC の各希釈系

列には, 2% NaCl を添加した他, MIC 値の判定は, MIC-2000 system の使用説明書に従った。

MRSA に対する 15 薬剤の MIC 分布については, Table 1 に示した「S. I. R の分類基準」を独自につくり, それによる感受性パターンを捉える手法を用いた。なお, 「S. I. R の分類基準」についての説明は, 考察で述べる。

II. 成績

Figs. 1, 2 に MSSA, Figs. 3, 4 に MRSA に対する MIC 分布とその累積曲線を β-ラクタム系剤, その他抗菌剤 (MINO, アミノグリコシド・ニューキノロン系) に分けて示した。

Table 2 に, MRSA に対する 15 薬剤の MIC 分布を「S. I. R の分類基準」に基づいて集計した成績 (感受性パターン) を示した。

なお, DMPPC の一濃度ディスク法で MSSA としてスクリーニングされた 150 株のうちの 1 株が, MIC 測

Table 1. S.I.R. ranges of various drugs against MRSA

Drug	Susceptible (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
DMPPC	≤6.25 µg/ml	12.5 ~25 µg/ml	≥50 µg/ml
CEPs	≤3.13 µg/ml	6.25~25 µg/ml	≥50 µg/ml
MINO	≤3.13 µg/ml	6.25~12.5 µg/ml	≥25 µg/ml
AGs	≤3.13 µg/ml	6.25~12.5 µg/ml	≥25 µg/ml
QLs	≤3.13 µg/ml	6.25~12.5 µg/ml	≥25 µg/ml

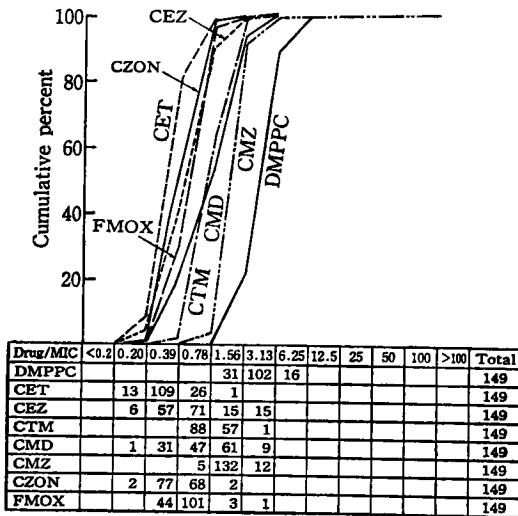


Fig. 1. Distribution of MICs of β-lactam antibiotics against MSSA

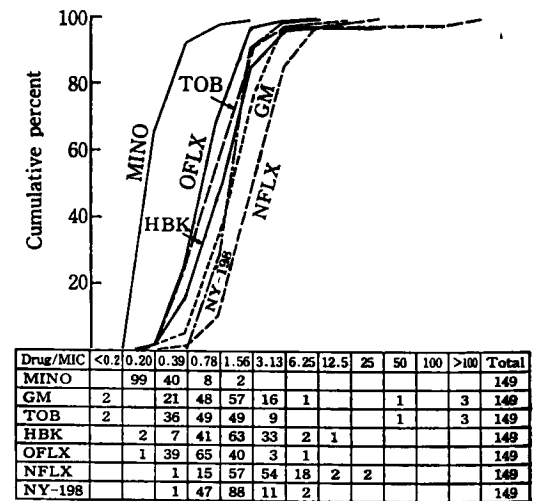


Fig. 2. Distribution of MICs of other antibiotics against MSSA

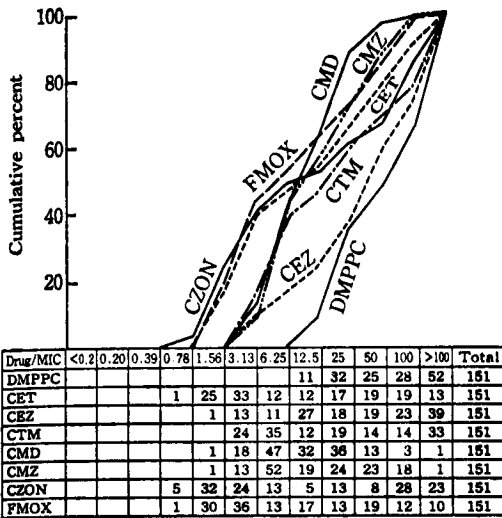


Fig. 3. Distribution of MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA

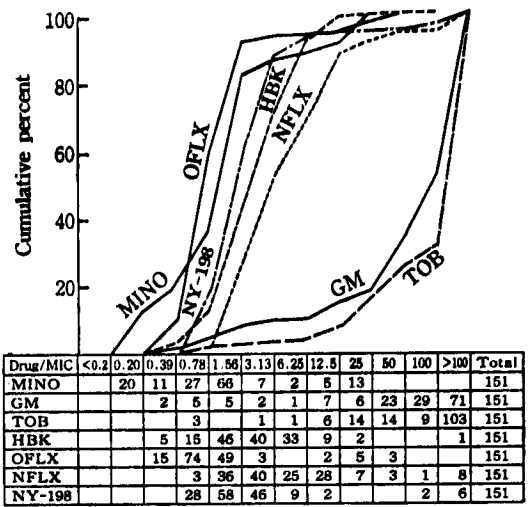


Fig. 4. Distribution of MICs of other antibiotics against MRSA

Table 2. Sensitivity patterns of 15 drugs against 151 strains of MRSA

Drug \ Class	S	I	R
DMPPC	0 %	30.5%	69.5%
CET	39.0	27.2	33.8
CEZ	9.3	37.1	53.6
CTM	15.9	43.7	40.4
CMD	12.6	76.2	11.2
CMZ	9.3	62.9	27.8
CZON	40.4	20.5	39.1
FMOX	44.4	28.5	27.1
MINO	86.8	4.6	8.6
GM	9.3	5.3	85.4
TOB	2.7	4.6	92.7
HBK	70.2	27.8	2.0
OFLX	93.4	1.3	5.3
NFLX	52.3	35.1	12.6
NY-198	87.4	7.3	5.3

定成績では MRSA と考えられたので、本検討における MSSA は 149 株、MRSA は 151 株となった。

1. 微量液体希釈法によって得られた MIC 値の特徴  
今回の検討で MIC 測定に用いた微量液体希釈法によ

って得られた MIC 値は、過去に我々が検討した寒天平板希釈法によって得た MIC 値と比較すると、いずれの薬剤も 2~4 倍高い値を示す傾向がみられた。これらについては考察でさらに述べる。

## 2. MSSA と MRSA の区分

DMPPC 一濃度ディスク法で MSSA とスクリーニングされた 149 株に対する DMPPC の MIC 分布は 89.3% (133 株) が  $\leq 3.13 \mu\text{g/ml}$ , 10.7% (16 株) が  $6.25 \mu\text{g/ml}$  を示した。そして、これら 149 株に対する CEPs 7 剤の MIC 分布はいずれの薬剤も 149 株のすべてに  $\leq 3.13 \mu\text{g/ml}$  を示し、DMPPC の MIC 分布と CEPs の MIC 分布は、強い相関を示したことから、これらの 149 株を、MSSA と判定した。

一方、一濃度ディスク法で MRSA としてスクリーニングされた 150 株と、MSSA と推定されていた 1 株を加えた 151 株に対する DMPPC の MIC 分布は、151 株のすべてに対して、 $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$  を示した。

さらに CEPs の 7 剤はそのうちのいずれかまたはすべてが  $\geq 6.25 \mu\text{g/ml}$  の MIC 分布を示すことから、これらの 151 株を、MRSA と判定した。

## 3. MSSA に対する 15 薬剤の MIC 分布

MSSA に対する DMPPC, CEPs 7 剤の MIC 分布は前述した通りであるが、耐性株は、CM, TOB, NFLX に散在している他、NFLX の MIC 分布は Table 1 に示した分類基準「I」に相当する MIC 値の占める割合が 13.4% (20 株) と比較的高かった。MSSA の MINO 耐性株はなかった。

なお、QLs とは、quinolones, すなわちキノロン母核を持つピリドンカルボン酸系合成抗菌剤を、「ニューキノロン系剤」とも呼称することから、OFLX, NFLX, NY-198 の 3 剤を便宜上 QLs とした。

## 4. MRSA に対する DMPPC, CEPs の MIC 分布

MRSA 151 株に対する DMPPC の MIC 分布は、Table 1 に示した分類の「I」に相当するのが 30.5% (46 株)、同じく「R」に相当するのは 69.5% (105 株) であり、「R」の占める割合が高い。

CEPs の MRSA に対する MIC 分布は、上述の DMPPC が示す MIC 分布の「I」と「R」に位置する株によって異なる。

「S, I, R の分類基準」に CEPs 7 剤の MIC 分布を「S」「I」「R」の枠に入れてみたのが Table 2 である。これで見ると CEPs で「S」の割合が比較的高率なのは FMOX, CZON, CET の 3 剤であるが、これらの薬剤が「S」の MIC を示したのは、前述の DMPPC 「I」の大部分と「R」に分類される株のうち、 $50 \mu\text{g/ml}$  の MIC 値を示した株の一部を合わせた 71 株 (47%) に示した成績だった。

一方「I」の割合が高率なのは、CMD, CMZ であるが、これらの 2 剤は DMPPC の「R」に分類される株に対しても、「I」の MIC 分布を示した。

## 5. MRSA に対する MINO, AGs, QLs の MIC 分布

MRSA に対するこれらの薬剤の MIC 分布を、前述と同様の方法で「S, I, R」の枠に入れてみると、「S」の割合が高いのは、OFLX, NY-198, MINO そして HBK である。TOB, GM は「R」の占める割合が極端に高い。「I」の占める割合が高いのは NFLX, HBK であるが、特に NFLX は、「I」と「R」を合わせると 47.7% となる。

MINO, OFLX, NY-198 の 3 剤は「I」「R」ともに比較的低率であるが、後述で考察を加える。

## III. 考 察

今回の検討は、1987 年 7 月以降の臨床分離 *S. aureus* を、MSSA, MRSA に区分し、それらに対する MIC 分布を検討したものである。

微量液体希釈法 (microdilution broth method) で得られた MIC 値は、いずれの薬剤においても、諸家の報告<sup>6,7)</sup>や自験例<sup>1,2)</sup>と比較すると、寒天平板希釈法によって得られる値よりも、2~4 倍高い値を示したが、この理由は、次の様に考えられた。

両測定法の第一の相違点は、寒天培地と液体培地にあるが、この場合、*S. aureus* の産生するペニシナーゼは菌体外に放出されるために、前者に比較して後者のほうが、ペニシナーゼの影響を受ける度合いは大きくなり、それらがペニシリン系薬剤やセフェム系薬剤の MIC 値に反映することが考えられる。

第二の相違点は、最小発育阻止濃度としての MIC 値を、どこの希釈系列の発育状態で判定するかという、観察上の違いである。実際の判定にあたっては、コロニーの発育状態の微妙な違いを観察し、取捨選択は判定者の思考も含めて、値を決めているのが実情である。寒天平板希釈法においては、発育した細菌はコロニーをつくるために、薬剤含有希釈系列毎の発育状態、コロニー数などの微妙な差を観察するのに適しているが、微量液体希釈法は、薬剤希釈系列毎の濁度を判定するため、これはまた、判定者の思考に左右されて微妙な差を観察するにはあまり適していない。

上述したような相違点をもつ両測定法によって得られる MIC 値は、寒天平板希釈法の値はむしろ静菌的作用に近い範囲であるのに対し、微量液体希釈法の値は殺菌的作用も含む範囲、すなわち MBC に接近した値と解釈することもできよう。このため、両測定法によって得られる MIC 値の差は、使用培地、細菌の発育状態の観察方法などの相違から必然的に生じる差といえよう。

今回の検討は、1987 年以降に登場した新規のセフェム系 2 剤、開発中の 2 剤 (HBK, NY-198) を加えて合

計 15 薬剤の *S. aureus* に対する MIC を同時測定したわけであるが、各々の MRSA に対する MIC 分布の分析には「S. I. R の分類基準」を独自につくり、それによる感受性パターンを捉える手法を用いた。

WHO の勧告および規格による各薬剤毎の薬剤感受性の分類基準は、susceptible (S. 感性), resistant (R. 耐性) に大別しているが一部の薬剤では intermediate (I. 中間) を入れている薬剤もある<sup>9)</sup>。

Intermediate とは、技術では充分にコントロールできない値、感性と耐性の中間に位置する値、緩衝帯 (buffer zone) を意味する。しかし、MIC 値としては「低感性」もしくは「中等度耐性」と解釈することもできる<sup>9)</sup>。これらの「S. I. R の基準」を参考にして、MRSA に対する各薬剤の MIC 分布を分析するために、独自に作製したのが、Table 1 に示した基準である。この基準は、各薬剤の MRSA に示す MIC 分布を、薬剤感受性パターンとして捉えるための便宜上の「基準」であって、それ以外の目的をもつものではない。基準に示した枠内の MIC 値は、各々の薬剤の示す感性株に対する MIC 値と血中濃度などを参考にして決めた。

MRSA に対する CEPs 7 剤の MIC 分布が、前述の「S. I. R」に分布するかはすでに「成績」で述べた。これによると各々の CEPs が示す抗菌力を反映した MIC 分布の特徴を捉え易い。一方、FMOX, CZON は MRSA に抗菌力を示すとされている<sup>3,4)</sup>。事実、今回の検討でも、両剤の MIC 分布は「S」の占める割合が、他剤と比較して高い。

また、CMD, CMZ は従来から MRSA に抗菌力を示すとされているが<sup>2,6,10)</sup>、微量液体希釈法で測定した MIC 分布は、「I」の割合が高率としての特徴を示していた。

ここで、MRSA に対する CEPs の MIC を含む抗菌力の評価には、次のことが考えられよう。第一は、MRSA が起炎菌となった全身症状を伴う感染症に対しては、CEPs はいずれの薬剤も、単独投与では期待がもてそうもないことである。なぜなら前述したように CEPs に対して「I」と「R」に位置する MRSA は、いずれの CEPs も過半数を越えていること、加えて MRSA に示す MIC 分布が「S」の割合が比較的高い FMOX, CZON, CET が「S」の MIC 分布を発揮しうるのは、DMPPCN の MIC 値が  $\leq 50 \mu\text{g/ml}$  (中等度) の MRSA に限られる。さらに、CMD, CMZ の MRSA に対する MIC 分布は、前述したように「I」の範囲を越えないからである。

第二は、MRSA に対する CEPs の抗菌力を論ずる場合には、MRSA が出現した背景、すなわち MSSA に対

する CEPs の抗菌力も考慮に入れることが必要条件と思われる。いうまでもなく我が国の現状で、これほどまでに MRSA が増加した主因は、*S. aureus* に抗菌力が劣る CEPs の多用によって惹起された、MRSA の支配因子である penicillin-binding protein (PBPs) が変異した PBP-2' の人為的誘導である<sup>11-13)</sup>。

生方ら、横田によると、MRSA-PBP (PBP-2')<sup>11,12)</sup> は、 $\beta$ -ラクタム剤に接触すると、誘導的に大量に合成されるのが特徴であるとしている。そして、松橋らはその MRSA-PBP の遺伝子はほとんどの *S. aureus* に広がっていることが推察されると指摘している<sup>13)</sup>。

したがって MRSA に対する CEPs の抗菌力の評価は、MSSA も含む抗菌力の強弱、PBP-2' (MRSA-PBP) を誘導する程度の見極めが必要となる。換言するならば、今のところ MRSA に示す CEPs の抗菌力は、MRSA の持つ耐性機序の理論に即応して、それに打ち勝つだけの画期的な理論にささえられているとは考えられないこと<sup>14)</sup>、さらに MRSA を増加させた人為的要素と、MRSA の耐性機序を考えると MRSA に対する抗菌力の評価は、多元的探究が求められていると思える<sup>15)</sup>。

ところで、MRSA は多剤耐性菌であるが、MRSA の MINO 耐性は増加傾向にある。1984 年の自験例では、MINO の MIC 値が  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$  の MRSA は皆無であったが<sup>2)</sup>、今回の検討では、MINO の MIC 値が  $25 \mu\text{g/ml}$  の MRSA は 8.6% だった。QLs の OFLX, NY-198 は NFLX と比較して MRSA の耐性が低率であるが、両剤に対して「R」に位置する MRSA が 5.3% に確認されており、今後の動向が注目される。

本検討内容の要旨は、第 36 回日本化学療法学会総会 (1988 年 6 月, 神戸) において、共同著者の横田のぞみ が口演発表した。

## 文 献

- 1) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 深山成美, 西村由紀子, 村尾久子, 小田清次, 田中節子, 佐藤久美子, 加藤三枝子, 福本寅雄: 呼吸器由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の各種アミノ配糖体抗生物質に対する感受性. *Chemotherapy* 35: 476~481, 1987
- 2) 出口浩一, 深山成美, 西村由紀子, 横田のぞみ, 田中節子, 小田清次, 松本好弘, 池上亮祐, 佐藤久美子, 豊永義清, 黒須義字, 杉田守正, 堀誠, 保科定頼, 黒坂公生, 永井高史, 小坂 諭, 片山紀美代, 高橋孝行, 藤岡義丸: 多剤耐性黄色ブドウ球菌の薬剤感受性に関する検討. *Jap. J. Antibiotics* 38: 2163~2169, 1985
- 3) 疋田宗生, 三橋 進, 井上松久: L-105 の細菌学的評価. *Chemotherapy* 34 (S-3), 1~16, 1986
- 4) 五島達智子, 小川正俊, 金子康子, 宮崎修一, 辻

- 明良, 桑原章吾: 新オキサセフェム系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の細菌学的評価。Chemotherapy 35 (S-1), 1~12, 1987
- 5) 出口浩一: 各種感染症の起炎菌と各種抗菌性物質の薬剤感受性。日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌 6: 131~135, 1988
- 6) 神田佳代子, 横田 健: 細菌分離した高度メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の 13 薬剤に対する感受性。Chemotherapy 36: 289~293, 1988
- 7) 山下直子, 生方公子, 松下真理, 紺野昌俊, 増田真理子, 野々口律子: メチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌に対する  $\beta$ -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。Chemotherapy 33: 743~752, 1985
- 8) 菅野治重: WHO 勧告および NCCLS の実施基準に準拠した新しい濃度ディスク法について—KB ディスク“榮研”の使用法と考え方。モダンメディア 32: 161~181, 1986
- 9) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 中根 豊, 深山成美, 西村由紀子, 小田清次, 田中節子, 加藤三枝子, 佐藤久美子, 福本寅雄: 新鮮臨床分離株に対する Monobactams の抗菌力。Jap. J. Antibiotics 41: 1600~1622, 1988
- 10) 小松良英, 永田 弘, 西川 徹, 熊谷光千枝, 村上和久, 土肥正善: セフェム耐性黄色ブドウ球菌に対するセファマンドールの抗菌力。第 33 回日本感染症学会東日本地方総会。第 31 回日本化学療法学会東日本支部総会。p.76, NOV.28~29, 1984 (横浜)
- 11) UBUKATA K, et al.: Occurrence of a  $\beta$ -lactam inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. 1985. Antimicrob. Agent Chemother. 27: 851~857 1985
- 12) 横田 健: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌, 基礎編。感染・炎症・免疫 14: 87~97, 1984
- 13) 松橋通生, 宋 浜東, 前崎繁文: MRSA-PBP 遺伝子の構造と由来。(シンポジウム/特別発言)。第 36 回日本化学療法学会総会。p.52, June, 1988 (神戸)
- 14) 紺野昌俊: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する化学療法法の進歩と問題点。第 36 回日本感染症学会東日本地方総会。第 34 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会。会長講演要旨。Chemotherapy 36(6): 427~428, 1988
- 15) 横田 健, 松本慶蔵: 最近のブドウ球菌感染症をめぐる諸問題。(シンポジウム 1。司会のことば) 第 36 回日本化学療法学会総会。p.49, June, 1988 (神戸)

## SENSITIVITY DISTRIBUTION OF 15 ANTIBIOTICS AGAINST FRESHLY ISOLATED *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

—Test results using a microdilution broth method—

KOICHI DEGUCHI, NOZOMI YOKOTA, MASAMI KOGUCHI, YUTAKA NAKANE,  
SHIGEMI FUKAYAMA, YUKIKO NISHIMURA and SEIJI ODA  
Research Department, Tokyo Clinical Research Center

The sensitivity distribution of 15 antibiotics against 300 strains of *Staphylococcus aureus* isolated since July, 1987 were determined. The breakdown of the 300 strains was 149 methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and 151 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

The sensitivity distribution of a total of 15 antibiotics, 8  $\beta$ -lactams and others, was determined by means of a microdilution broth method.

1. The MIC values thus obtained were about 1-2 tubes higher than those obtained by an agar dilution method. We stress that the differences in MICs obtained by the two methods were natural ones due to the difference in mechanism, and discuss appropriate applications,

2. MSSA showed a trend towards increased quinolone (QLs) resistance.

3. As to drug resistance patterns, the antimicrobial activities of 7 cepheems showed sensitivity distributions specific to each of them.

4. For the evaluation of the antimicrobial activity of cepheems against MRSA, the important criteria are the antimicrobial activity, including that against MSSA, and the potential inducibility of penicillin-binding protein 2'.