

血液培養から分離されたメチシリン耐性ブドウ球菌について

—菌の疫学的特徴と β -ラクタム系薬によるペニシリン結合蛋白-2'の誘導—

野々口 律子

帝京大学医学部臨床病理*

(指導教授: 紺野 昌俊)

(平成元年9月16日受付・平成元年10月4日受理)

1. 臨床検査材料から検出される methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離頻度を 1980 年から 1988 年にわたって調べた。MRSA の割合は 1980 年代の始めから急速に高まった。この時期は新しい抗緑膿菌用 penicillin や第 2・第 3 世代のセフェム系薬が登場した時期と一致していた。

2. 同一期間内における血液培養からの分離菌の変遷を調べると、グラム陽性球菌では *S. aureus* の分離率の上昇が著明であったのに対し、グラム陰性桿菌のそれはほとんど変動していないか、菌種によってはむしろ減少傾向にあった。

3. 過去 5 年間に血液培養から分離された MRSA は、疫学的に主として 3 つの群に分けることが可能であった。すなわち、第 1 の群とした gentamicin (GM) 耐性を伴う GM^r-MRSA はファージ型 I 群、コアグラゼ IV 型、エンテロトキシン A あるいは B を産生し、*mecA* 遺伝子を encode する DNA は 4.0 kb の *Hind* III fragment であった。第 2 の群とした tobramycin (TOB) 耐性を伴う TOB^r-MRSA はファージ型 III 群、コアグラゼ II 型、TSST-1 単独あるいは TSST-1 とエンテロトキシン C を産生し、*mecA* 遺伝子を encode する DNA は 4.3 kb の *Hind* III fragment であった。第 3 の群とした GM^r+TOB^r-MRSA は疫学的には 2 群の菌とほぼ同じであった。これらの菌は 1 群から 2 群次いで 3 群の菌へと急速に変遷してきていることが示された。

4. この各群に属する MRSA の β -ラクタム系薬による PBP-2' の誘導状況を検討すると、I 群とした GM^r-MRSA では cefazolin や flomoxef sodium 等でその誘導の程度が低かった。しかしながら、他の群の MRSA ではすべての被験薬によって PBP-2' の誘導がみられた。

5. 以上の成績は、使用される抗菌薬の変遷に伴って、その環境により一層適応した MRSA に変わりつつあることを示していると考えられた。

Key words : MRSA, Penicillin-binding protein-2', Blood culture, Epidemiology

今日、本邦の臨床における感染症領域では、methicillin (DMPPC) をはじめとする大部分の β -ラクタム系薬に耐性を示す *Staphylococcus aureus* (MRSA) が大きな問題となっている。本菌の特徴は、 β -ラクタム系薬のみならず、ブドウ球菌に対して抗菌力を示すアミノ配糖体系薬 (AGs) やマクロライド系薬 (MLs) 等の多くの抗生物質に耐性を示すことにあり¹⁻⁴⁾、臨床上使用可能な抗生物質がほとんどないという難題をかかえている。そのため、本菌によってひとたび発症すると、予後不良の経過をたどる可能性を有している^{5,6)}。

このような MRSA における薬剤耐性機構は、菌が本来有している細胞壁合成酵素に関わる 4 種類の penicillin-binding protein (PBP) 以外に、新たな PBP-2' と呼ばれる酵素を産生することによるものである^{7,8)}。しかも、この酵素蛋白は菌が β -ラクタム系薬に触れるとその産生量が増加してくる誘導型であることに特徴がある^{7,9)}。つまり、MRSA は耐性遺伝子 (*mecA*^{10,11)}) を有していても、 β -ラクタム系薬に触れない限りは PBP-2' の産生はごくわずかであるため、 β -ラクタム系薬に対して一見 DMPPC 感性の *S. aureus* (MSSA) とにかよった感受性を

示す MRSA がみられるのはこのためである。すなわち、このような MRSA の β -ラクタム系薬に対する感受性値は、菌が以前に β -ラクタム系薬に接触していたか否かということ¹²⁾、その菌の penicillinase の産生量¹³⁾あるいは培養温度¹⁴⁾等によって大きく影響されることが判ってきている。

一方、著者らのグループによる MRSA に関する今までの疫学的検討^{1, 5, 15)}によると、これらの MRSA の中には薬剤耐性型、ファージ型、トキシソ型、あるいはコアグラエ型等からみて、疫学的に異なった菌株が含まれることが判明している。

本編においては、血液培養から分離された MRSA について、上述した疫学的に異なるタイプの MRSA について、その年次的分離率の推移を検討し、あわせてそれらの異なったタイプの MRSA が変遷してきた原因を知る目的で、耐性の本態である PBP-2' の産生性とその遺伝子とを検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 疫学的調査対象

1980年1月から1988年12月までの9年間に、帝京大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室で扱った検査材料から分離された *S. aureus* を対象とした。ただし、血液培養については、*S. aureus* 検出例との比較のために、分離されたすべての細菌を調査の対象とした。血液培養の集計に際しては、同一患者より同じ薬剤耐性型を示す同一菌種が2回以上にわたって検出された場合には、1症例1検体のみを集計の対象とした。

1984年1月から1988年12月までの期間に血液培養から分離された *S. aureus* は、単離後すべて凍結乾燥して保存した。これらの菌株を実験に用いる際は感受性測定用 broth (*S. broth*: 栄研) にて再培養した。検討した *S. aureus* は188株である。

2. 薬剤感受性の測定

上記の *S. aureus* は、*S. broth* にて3回継代培養 (32°C) した後、薬剤感受性を測定した。測定時の接種菌量、培地等は日本化学療法学会の標準法¹⁶⁾に従ったが、菌接種後の培養温度は32°Cとした。

対象とした被験抗菌薬は benzylpenicillin (PCG), DMPPC, cloxacillin (MCIPC), cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX), flomoxef (FMOX), cefpiramide (CPM), imipenem (IPM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), kanamycin (KM), lividomycin (LVDM), gentamicin (GM), amikacin (AMK) および tobramycin (TOB) の計16薬剤である。

3. エンテロトキシン型とコアグラエ型の測定

エンテロトキシン型の測定には、ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キットと TSST-1 検出用キット (デンカ生研) とを用い、逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA 法) により実施した。コアグラエ型はブドウ球菌コアグラエ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い、中和反応により実施した。

4. ファージ型別

ファージ型別用標準ファージ液は、-80°C に保存しておいたファージ原液から新たなファージ液を作成し、1 RTD に調整して型別を行なった。型別不能 (NT) と判定された株については、100RTD のファージ液を用いて再測定した。型別用ファージの内訳は、I 群が5種類 (29, 52, 52A, 79, 80), II 群が4種類 (3A, 3C, 55, 71), III 群が9種類 (6, 42E, 47, 53, 54, 77, 83A, 84, 85), 雑群が4種類 (81, 94, 95, 96) である。

5. アミノ配糖体修飾酵素の測定

被験菌を10ml の *S. broth* にて37°C、一夜培養し、遠心して集菌した後、超音波破碎して粗酵素液を作成した^{17, 18)}。そして、1) 3'-リン酸転移酵素 (3'-APH), 2) 2'-リン酸転移酵素 (2'-APH) と 6'-アセチル転移酵素 (6'-AAC) の両機能を有する双頭酵素, 3) 4', 4''-アデニリル転移酵素 (4', 4''-AAD) の各 AGs 修飾酵素に対する抗血清を用いて OUCHTERLONY 法¹⁹⁾により、形成された沈降線の有無から被験菌が産生する酵素の種類を判定した。

6. β -ラクタム系薬による penicillin-binding protein-2' の誘導

MRSA における β -ラクタム系薬添加後の PBP-2' の誘導産生は以下に述べる方法によって測定した。被験菌の TK388 株, TK2566 株, TK577 株および比較のために用いた米国由来の 85/2215 株は、*S. broth* にて32°Cで一夜前培養した。多数用意した500ml の *S. broth* 入り三角コルベンに被験菌を10ml ずつ接種し、32°Cで1時間振盪培養した。次いで各種の β -ラクタム系抗菌薬を、最終濃度がそれぞれ0.2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 25 μ g/ml となるように添加し、さらに6時間培養を行なった。3,000 rpm, 4°C, 10分間の遠心により菌を回収した後、それらを超音波破碎した。そして、さきに述べた方法²⁾により膜画分を採取した。得られた膜画分は BRADFORD の方法²⁰⁾により蛋白量を測定し、すべての検体が同じ蛋白量となるように調整した。そして、各検体は50 μ l ずつをエッペンチューブに分注し、5 μ l の sodium lauryl sarcosinate (20% wt/vol) を加えて20分

間室温にて蛋白を溶解させた。次いで、12,000 rpm, 4°C, 30分間の遠心を行なった後、上清部分 50 μ l ずつを別のエッペンチューブに採取した。2-メルカプトエタノール 10 μ l と SDS-buffer 25 μ l とを加えた後、ただちに 100°C 2分間の熱処理を行なって蛋白を変性させた。これらの膜画分は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分画した。ただしランニングゲルは acrylamide 7.4% (wt/vol), bisacrylamide 0.06% (wt/vol) の濃度とした。SDS-PAGE 終了後のゲル板は Coomassie 染色した後、PBP-2' に相当する部位の濃度をクロモスキャナー (JOYCE-LOEBEL) により測定した。各薬剤による PBP-2' の誘導量は最も産生量の多かった検体のものを 100% とし、その総体量で表わした。

7. ハイブリダイゼーションによる薬剤耐性遺伝子, *mecA* の検索

プローブとして用いた DNA は、PBP-2' の産生を支配する遺伝子, *mecA* の存在する 4.3Kb *Hind* III DNA 断片である。この DNA 断片は、MRSA の TK784 株からすでに vector plasmid pUC19 へクローン化²¹⁾されているものを精製して用いた。ハイブリダイゼーションは、すでに述べられている方法²²⁾に従ったが、DNA の標識には [³⁵S]-dCTP を使用した。

一方、検索したい菌株の DNA は、さきに述べた方法²¹⁾に従って抽出、精製した。そして、それらの DNA は制限酵素の *Hind* III で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分画した。次いで、ゲル中の DNA はメンブレンフィルターへ転写し、固定化後、前述の標識プローブとハイブリダイズした。そして、このメンブレンフィルターについて、オートラジオグラフィを行なった。

II. 結 果

1. 血液培養から検出される MRSA の年次的推移
1980年1月から1988年12月までの9年間にわたって帝京大学医学部附属病院中央検査部細菌検査室で扱った全検査材料中に占める MRSA の分離率の年次的推移は Fig. 1 に示す。この成績は、日常業務で用いている薬剤感受性ディスクのうち、CEZ (5 μ g/ml 含有), MCIPC (2 μ g/ml) あるいは CMZ (5 μ g/ml) に耐性と判定された菌株を MRSA として集計したものである。図の下方には、1980年以降に臨床へ登場した主な β -ラクタム系薬を記したが、MRSA の急速な増加は抗緑膿菌用の PIPC および第2・第3世代の β -ラクタム系薬が臨床の場に多数登場した1980年代の初期に一致している。それ以降、少なくとも昨年までは分離率の上昇が認められた。

このような背景を踏まえて、血液培養から分離される各種細菌の動向を検索した成績を Fig. 2 に示す。菌検出陽性例 (■) は調査開始時の1980年には12.0%であったが、1984年までは急速に増え続け、以後、横ばいとなりながらも30%台の陽性率が継続している。これらの検出された菌をグラム陽性菌 (GPC: ●) とグラム陰性桿菌 (GNB: □) とに分け、その年次推移を見ると、GPCの分離は1987年までほぼ一貫して上昇傾向にあったが、1988年にはやや頭うちとなったようである。9年間の分離成績についての相関計数は $\gamma=0.8682$ と高かった。特に注目されたのは、1982年にGPCの分離率がGNBの分離率を上回り、以後、この状態が現在も続いていることである。これに対し、GNBでは相関計数は $\gamma=0.2346$ であり、検出率はほぼ横ばい、言い換えれば10%台の分離率が継続していることが示された。この内訳はここには示さなかったが、*Escherichia coli* では $\gamma=$

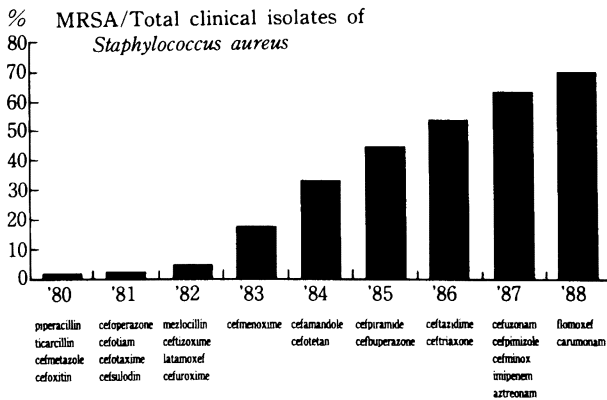


Fig. 1. Yearly changes in MRSA isolated from clinical materials at the Teikyo University Hospital

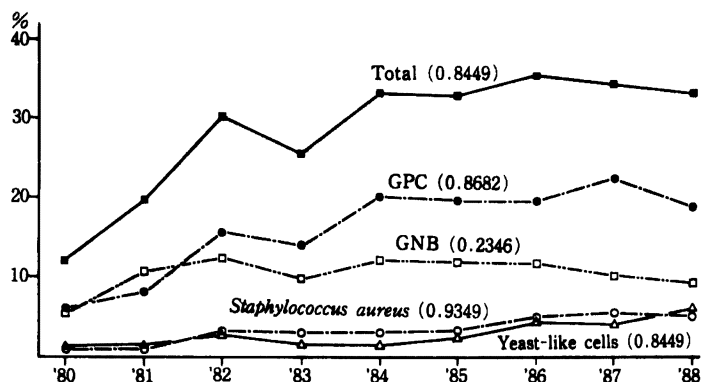


Fig. 2. Yearly changes in bacteria from blood cultures at the Teikyo University Hospital

Table 1. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures

| Group | Resistant pattern* | No. of strains (%) |
|--|--------------------------|--------------------|
| I) GM ^r -MRSA | PCG DMPPC EM KM GM | 27 |
| | PCG DMPPC KM GM | 2 32 (17.0%) |
| | PCG DMPPC GM | 3 |
| II) TOB ^r -MRSA | PCG DMPPC EM KM TOB | 21 |
| | PCG DMPPC EM TOB | 33 54 (28.7%) |
| III) GM ^r +TOB ^r -MRSA | PCG DMPPC EM KM GM TOB | 14 |
| | PCG DMPPC EM GM TOB | 25 39 (20.7%) |
| IV) Other resistant MRSA | PCG DMPPC (EM) (KM) | 4 (2.1%) |
| V) MSSA | PCG (EM) (KM) (GM) (TOB) | 59 (31.4%) |
| Total | | 188 |

* Antibiotic resistance : PCG, penicillinase positive ; DMPPC, methicillin and other β -lactams ; EM, macrolides and lincosylins ; KM, producing a 3'-phosphotransferase ; GM, producing a dual enzyme having 6'-acetyltransferase and 2"-phosphotransferase ; TOB, producing a 4', 4"-adenyltransferase.

GM : gentamicin, TOB : tobramycin, PCG : benzylpenicillin, DMPPC : methicillin, EM : erythromycin, KM : kanamycin

0.6178, *Klebsiella* spp. では $\gamma=0.8327$ であったが, *Serratia marcescens* では $\gamma=-0.7539$, *Pseudomonas aeruginosa* では $\gamma=-0.5845$ と明らかに減少傾向にあることが示された。

一方, 分離率の上昇した GPC の内訳をみると, 連鎖球菌等の分離率には著明な変化はなく, 増加したのは *S. aureus* とコアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) であった。図中には *S. aureus* (○) の成績のみを示したが, 1980 年から 1981 年にかけては 0.6% 台であった分離率が, 1982 年には 3% 台へと上昇し, 以後その状態が続き, さらに 1986, 1987 年には 5% 台まで上昇したが, 1988 年以後はやや頭うちの傾向が見られている。9 年間の *S. aureus* の分離率は, 相関計

数 $\gamma=0.9349$ と非常に高い上昇率を示している。

なお, *Candida* を含む真菌類の分離状況も図中に示したが, これも相関計数は $\gamma=0.8449$ と高く, 特に 1986 年以降急上昇してきている点が注目された。1988 年には *S. aureus* よりも分離率が上回っており, 今後の傾向を注目の必要があろう。

2. 血液培養から分離された *S. aureus* の薬剤耐性型

Table 1 には, 1984 年 1 月から 1988 年 12 月までの 5 年間に血液培養から分離された *S. aureus* についての薬剤耐性型の成績を示す。これらの耐性型は, 方法の 2) 項に記した薬剤に対する感受性を測定し, 同じ耐性機構に基づく薬剤群の耐性については, その代

表的薬剤名で表記した。その中の AGs に対する耐性については、薬剤感受性の他に、方法の 5) 項に従って修飾酵素の検索を行ない、耐性機構を確認した。

表記した耐性は、1) penicillinase による耐性：PCG, 2) PBP-2' の産生による β -ラクタム系薬耐性：DMPPC, 3) MLs 系および CLD 系薬耐性：EM, 4) 3'-APH 産生による耐性：KM, 5) 双頭酵素産生による耐性：GM, 6) 4', 4''-AAD 産生による耐性：TOB である。

さらに AGs 耐性の特徴から、i) GM^r-MRSA 群, ii) TOB^r-MRSA 群, iii) GM^r+TOB^r-MRSA 群, iv) その他の MRSA 群, v) DMPPC 感性の *S. aureus* 群の 5 群に分けた。MRSA の中で最も高い検出率を示したのは、TOB^r-MRSA であり、総計 188 株中 54 株 (28.7%) と約 3 割を占めていた。次いで GM^r+TOB^r-MRSA が 39 株 (20.7%), GM^r-MRSA

は 32 株 (17.0%) であった。アミノ配糖体系薬耐性を伴わない MRSA はわずか 4 株 (2.1%) に過ぎなかった。これらの MRSA を合計すると 129 株 (68.6%) となり、血液培養から検出された *S. aureus* の 7 割は MRSA で、MSSA は 59 株 (31.4%) に過ぎないという成績であった。

Fig. 3 には各薬剤耐性型の菌株の年次の推移を分離菌株数で示した。MSSA の分離については 5 年間を通して著明な変動はみられていないが、各グループに分けた MRSA は年次によって著明に変化してきていることがうかがえた。すなわち、検索を開始した 1984 年から 1985 年にかけては GM^r-MRSA の占める割合が高かったが、1986 年以降になるとこの耐性型の菌は急速に減少し、変わって TOB^r-MRSA の割合が急速に増加してきた。そして 1988 年代には、徐々に増えつつあった GM^r+TOB^r-MRSA が、それに

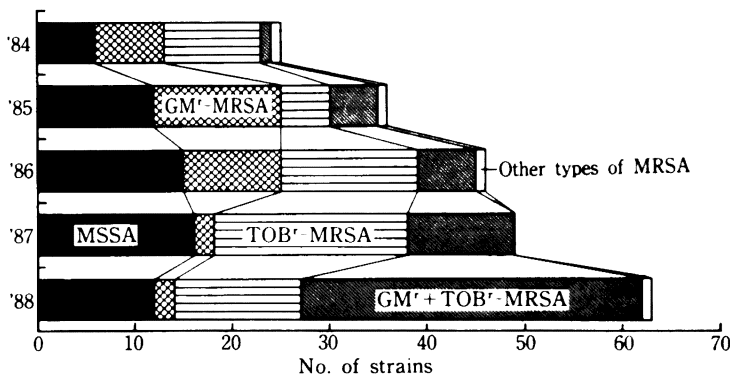


Fig. 3. Yearly changes of different resistant-type MRSA from blood cultures

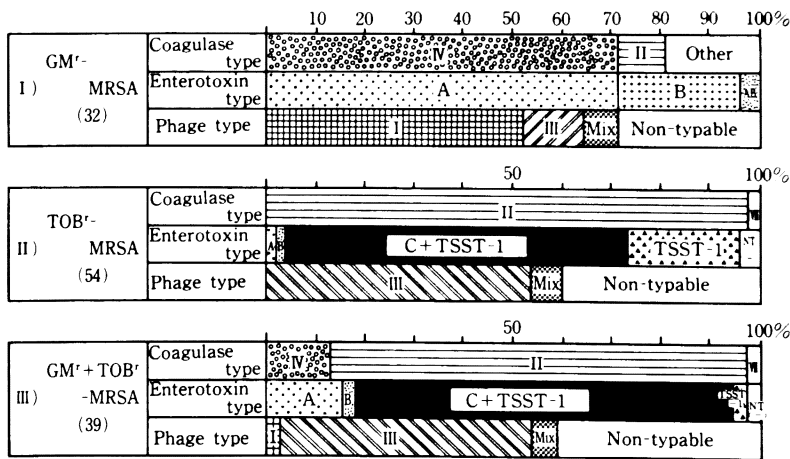


Fig. 4. Coagulase, enterotoxin, and phage types of MRSA isolated from blood cultures

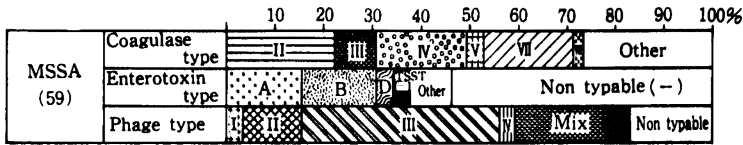
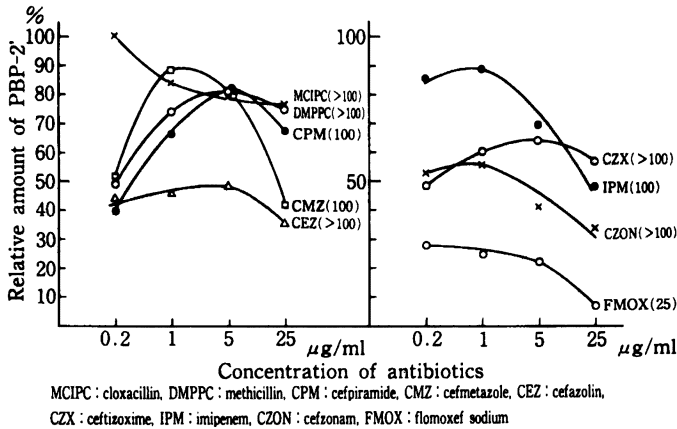


Fig. 5. Coagulase, enterotoxin, and phage types of MSSA isolated from blood cultures



MCIPC: cloxacillin, DMPPC: methicillin, CPM: cefpiramide, CMZ: cefmetazole, CEZ: cefazolin, CZX: ceftiozime, IPM: imipenem, CZON: cefzonam, FMOX: flomoxef sodium

Fig. 6. Induction of PBP-2' by β -lactams in *Staphylococcus aureus* TK388 strains (GM^r-MRSA)

わって増加してきた。

3. コアグララーゼ型, エンテロトキシン型, およびファージ型と薬剤耐性型との関係

上述した MRSA 3 群におけるコアグララーゼ型, エンテロトキシン型およびファージ型に関する成績は Fig. 4 に示す。なお, MSSA のそれは比較のために Fig. 5 に示した。各群の MRSA には疫学的に明瞭な相違が認められた。すなわち, GM^r-MRSA では 70%以上の株がコアグララーゼIV型で, エンテロトキシン A 産生, ファージ型別では I 群に属するものが多かったのに対し, TOB^r-MRSA ではコアグララーゼ II 型でトキシックショックシンドロームトキシン 1 (TSST-1) とエンテロトキシン C との両毒素を同時に産生する株か, あるいは TSST-1 のみを産生する株の両者で 90%以上を占めていた。ファージ型も III 群が 50%台で, その他は大部分が型別不能株という成績であった。

一方, GM^r+TOB^r-MRSA に属する菌株は, そのほとんどが TOB^r-MRSA と同じコアグララーゼ II 型, エンテロトキシン C と TSST-1 産生, ファージ型は III 群か型別不能であったが, その中に 10%程 GM^r-MRSA に近いコアグララーゼ IV 型, エンテロトキシン A の菌株が認められた。

これに対し, MSSA では, コアグララーゼ型は II, III, IV, V, VIIへほぼ均一に分布しており, エンテロ

トキシンも A あるいは B 産生株が合わせて 30%程度, その他はエンテロトキシン非産生株であった。ファージ型も, II 群, III 群, 混合群, 型別不能といった各群に幅広く分布するという成績であった。

4. MRSA における PBP-2' の誘導状況

Fig. 6 から Fig. 9 にかけては, 疫学的に異なると思われる 3 つの群の MRSA の中から, 代表的な菌株を選び, 各種の β -ラクタム系薬によって誘導した後の PBP-2' の産生状況を検討した成績を示す。

Fig. 6 に示した GM^r-MRSA の TK 388 株では 0.2 μ g/ml の MCIPC に接触した場合に PBP-2' の産生量が最も高く, この産生量を 100%として他薬剤による誘導時の成績を比較すると, DMPPC, CPM, CMZ, IPM 等は 1~5 μ g/ml 程度の濃度で PBP-2' を最も誘導しやすく, その産生量は相対量として 60%~80%程度であった。

これに対し, CEZ, CZON, FMOX 等は, PBP-2' を誘導することは明らかであるが, その産生量はやや少なかった。特に FMOX では 0.2~5 μ g/ml の濃度においても PBP-2' の産生量は 20%台であり, 他薬剤とは多少異なっていることが示された。

一方, Fig. 7 に示した TOB^r-MRSA では, いずれの β -ラクタム系薬によっても PBP-2' は相対的に高く誘導され, CEZ, CZON および FMOX においても 1~5 μ g/ml の濃度域で 50%以上の産生量となっ

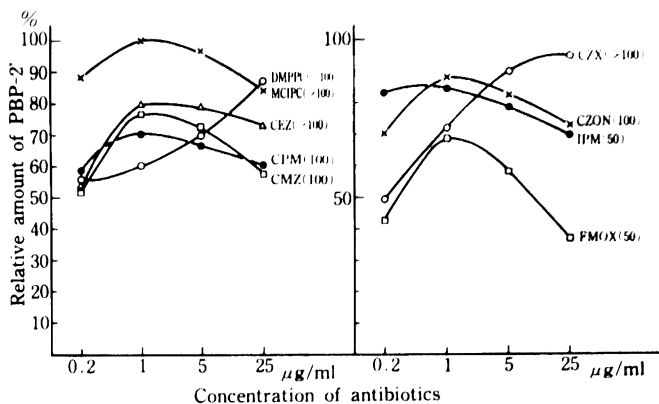


Fig. 7. Induction of PBP-2' by β -lactams in *Staphylococcus aureus* TK 2566 strain (TOB^r-MRSA)

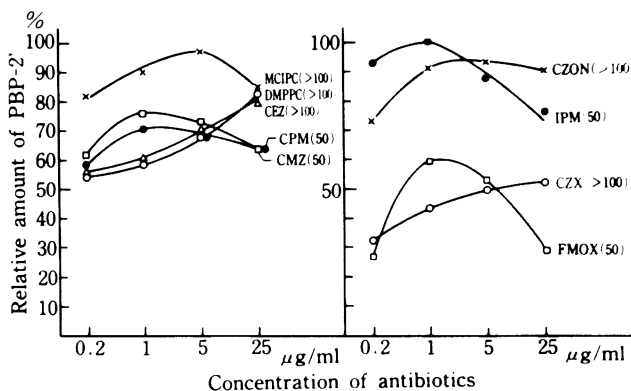


Fig. 8. Induction of PBP-2' by β -lactams in *Staphylococcus aureus* 85/2215 (TOB^r-MRSA) from the USA

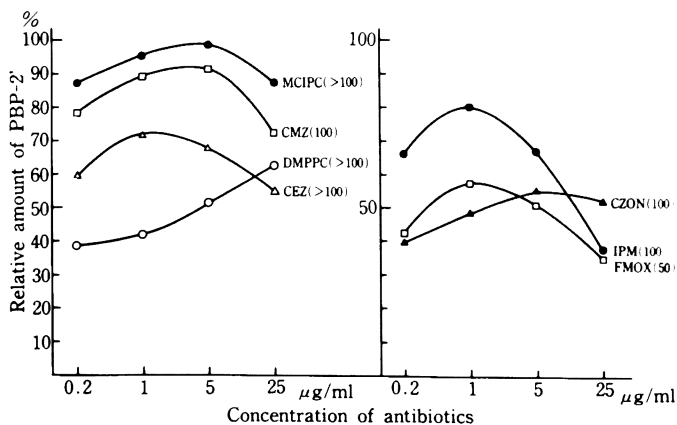


Fig. 9. Induction of PBP-2' by β -lactams in *Staphylococcus aureus* TK 577 strain (GM^r+TOB^r-MRSA)

ていた。本菌に対する β -ラクタム系薬の MIC も相対的に高い傾向が認められた。

なお、比較のために米国由来の TOB^r-MRSA の 85/2215 株における PBP-2' の誘導状況を Fig. 8 に示したが、この菌株においても各 β -ラクタム系薬の誘導による PBP-2' の産生量は相対的に高かった。

Fig. 9 には、GM^r+TOB^r-MRSA における各 β -ラクタム系薬における誘導後の PBP-2' の相対的産生状況を示した。MCIPC の 5 μ g/ml の濃度によって最も高い PBP-2' の誘導がみられた。これに比しては、CEZ や FMOX, CZON などではやや低い産生量ではあったが、1~5 μ g/ml の濃度域において、いずれも相対量で 50% 以上の PBP-2' 産生が認められ、これらの薬剤によっても PBP-2' が誘導されることは明らかであった。

5. ハイブリダイゼーションによる *mecA* 耐性遺伝子の比較

前述した疫学的に異なる 3 つの群の MRSA の中から、無作為に菌株を選び、耐性遺伝子を検索した成績を Fig. 10 に示す。それぞれの菌株からの DNA は、制限酵素の *Hind* III で切断した後、プローブとした TOB^r-MRSA TK784 株由来の *mecA* 遺伝子 DNA 断片 (4.3 kb) とハイブリダイズした。すべての MRSA 由来の DNA において、4.4 kb のマーカー付近にプローブとハイブリダイズした DNA 断片が検出された。しかしながら、MRSA から *mecA* 遺伝子が脱落した変異株の TK784E 株においては、ハイブリダイズする DNA 断片は認められなかった。なお、TOB^r-MRSA と GM^r+TOB^r-MRSA で検出された DNA 断片は、GM^r-MRSA のそれに比べ 0.3 kb 程長かったが、この部分の DNA は *mecA* 遺伝子には関

連のないことが判っている。なお、ここには示していないが、外国由来の MRSA についても同様の検索を行ない、それらにおいても *mecA* 遺伝子ののった DNA 断片に同様の違いを認められている²⁴⁾。

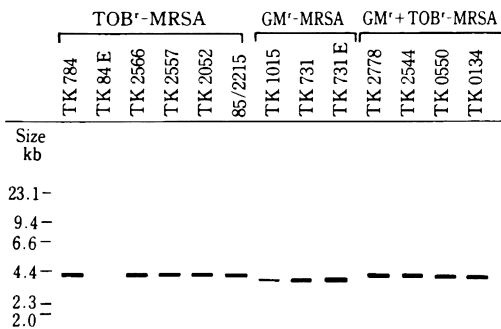
III. 考 察

MRSA の出現は古く、DMPPC が開発された翌年の 1961 年にはすでに報告²³⁾が見られる。当時の菌は英国 Central Public Health Laboratory に保存されており、我々はその分与を受けて遺伝学的解析を試みた。そして、今日問題となっている MRSA の本態である PBP-2' を支配する *mecA* 遺伝子をすでに有している菌株であったことを明らかにしている²⁴⁾。このような菌が出現の初期には欧州に分布し、次いで米国で急速に分離され、院内感染の原因菌として問題となっていた²⁵⁻³¹⁾。本邦では 1980 年代の初頭から特に大きな病院で急速に分離され始め、院内感染として深刻な問題となってきたのは何故であろうか？ それ以降、増加した後の MRSA に対する疫学的調査^{1,2,32)}や薬剤感受性¹⁻⁴⁾に関する成績は多数みられるが、どのような理由によって増えてきたのかという点に関しては、患者の背景因子あるいは使用抗生剤との関連で総合的に解析した大成の報告⁵⁾があるのみである。

本論ではその成績を継いで、その後の MRSA の動向をも含めて、過去 9 年間にわたる MRSA の疫学的検討をまとめたものである。

今日問題となっている MRSA が急速に広がり始めたのは、1980 年代の始めからである¹⁵⁾が、その分離状況の変化を Figs. 1, 2 に示したように、抗生物質の開発状況と重ね合わせると、大変に興味深い。すなわち、MRSA の増加は、従来使用されていた抗緑膿菌用 penicillin とは異なったタイプの piperacillin や cefoperazone が開発され、さらには第 2・第 3 世代のセフェム系薬が次々と登場してきた時期と一致する。つまり、これらの薬剤の急激な使用量の増加が、グラム陰性桿菌、ことに緑膿菌の検出率を減少させた反面、グラム陽性球菌の中でもとりわけ MRSA を増加させたということが言えよう。

血液培養から検出された *S. aureus* に限ってではあるが、MRSA の諸性状を調べてみると、著者らが従来から指摘している通り^{1,5)}、疫学的には主として性状の異なる 3 つの群に分けることができる。すなわち、第 1 の群は薬剤耐性型の上からは GM^r-MRSA とした菌群で、ファージ型は主として I 群、コアグラゼ型は IV 型、エンテロトキシン A あるいは B を産生する菌である。第 2 の群は、TOB^r-MRSA とした菌群で、ファージ型は主として III 群、コアグラゼ型



TK 784 E: variant of MSSA: 85/2215, MRSA from USA:
TK 731 E: variant of PCase negative and methicillin^r

Fig. 10. Southern blot hybridization

はII群, TSST 1を単独あるいはエンテロトキシンCと共に産生する菌である。第3の群は, GM^r+TOB^r-MRSAとした菌群で, 第1群と第2群の混合型とでも言うべき菌群であり, ファージ型はIII群あるいは型別不能, コアグラーゼ型はII群, TSST 1を単独あるいはエンテロトキシンCと共に産生する菌である。しかも, これらの菌群は, 1群の菌から2群の菌, さらに3群の菌へと急速に変遷していることが注目される。

PHLCから分与を受けた, 1985年から1986年にかけて欧米各地で分離されたMRSAから推測する限り, 最も多いMRSAの耐性型は著者らの分類でいう1群に属するタイプであり, その他に本邦ではさらに古い耐性型に属するKM耐性³³⁾かあるいはそれすらも伴っていない, 1970年代に見られていた古い耐性型の菌にDMPPC耐性が付加されたものである。2群に属する菌株は, 分与菌株中にはわずかに米国由来の2株だけに過ぎず, 3群に属する菌株は1株も見出されていない(未発表)。しかも, 欧米においてはこれらのMRSAが院内感染の原因菌として問題となることがあったとしても, 全体的に眺めるとMRSAの検出率は10%台であると言われる。本邦においてのみMRSAは急速に増加し, しかも新しい耐性型のMRSAが次々と出現しつつあるといえる。その原因としては, 大成⁵⁾が指摘したように, 第2・第3世代のセフェム系薬が臨床で使用され始めたことが直接的な引金になったことは否めないが, 紺野³⁴⁾はそれよりも以前に, 寝た切り老人においてGM^r-MRSAがかなりの頻度で定着しつつあったことが, さらにその温床となっていたと指摘している。問題はこのGM^r-MRSAがなぜ急速にTOB^r-MRSAあるいはGM^r+TOB^r-MRSAに変わっていったのかということである。

MRSAにおけるDMPPC耐性の本態は, PBP-2'^{7,8)}, PBP-2a^{9,36)}あるいはMRSA-PBP¹¹⁾と呼ばれるペプチドグリカン合成に関わる代替酵素の出現にあるというのが定説となってきているが, この新たな酵素の産生機構が通常誘導型である⁷⁾という点に特徴がある反面, 多くの問題をも有している。つまり, MRSAはβ-ラクタム薬に触れない限り, PBP-2'の産生はわずかであり, β-ラクタム薬に触れるとその産生が著しく高まるのである^{7,12,37,38)}。このPBP-2'の誘導は, penicillinaseの誘導と連動した誘導機構によるものであることがpenicillinase plasmidの脱落実験⁷⁾, クローン化した*mecA*遺伝子のMSSAにおける発現実験²¹⁾等によって確認された。当然のことな

がら, *mecA*遺伝子はMRSAにのみ見いだされ, MSSAとなった変異株中には見いだされていない³⁹⁾。加えて, 本邦で最初に見いだされたタイプのGM^r-MRSAでは, *mecA*遺伝子は一様に4.0kbのHind III DNA断片上に存在するが, 他のタイプでは4.3kbのHind III DNA上に乗っており, これら耐性型の異なるタイプのMRSAが疫学的に異なったものであることを裏付ける結果となった。しかしながら, PBP-2'の構造遺伝子である*mecA*遺伝子そのものには現在のところ相違点は見いだされていない。しかし, GM^r MRSAにおいては, CEZ, FMOXあるいは本編には示さなかったが, cephalothin等でPBP-2'の誘導能は低い³⁷⁾。PBP 2'の誘導能が極めて低く, なおかつ菌本来のPBP, すなわちβ-ラクタム系薬の作用標的であるPBPに対する親和性が高ければ, PBP-2'の誘導が起こる以前に菌は溶菌してしまうということは理論的にはあり得る。その代表がFMOXである³⁹⁾。

一方, TOB^r-MRSAあるいはGM^r+TOB^r-MRSAにおいては, FMOXによっても明らかにPBP-2'の誘導が生じており, MICも確実に劣ってきている。このようにMRSA中にPBP-2'の誘導能の異なる菌株が存在することが, MRSAがGM^r-MRSAからTOB^r-MRSA, さらにGM^r+TOB^r-MRSAへと急速に変化してきた最も大きな理由であろうと考える。その証拠に, 今日第2・第3世代のセフェム系薬や抗緑膿菌用piperacillin系統, あるいはimipenem等が繁用されている病院ほど, 臨床検査材料から分離されるMRSAはコアグラーゼII型の菌であることが指摘されており, それらの菌は本編で述べたTOB^r-MRSAか, もしくはGM^r+TOB^r-MRSAであると推測される。したがって, 現実問題としては, 重症のMRSA感染症に対しては, β-ラクタム系薬単独ではもはや対処不可能であろう。加えて, 大部分のMRSAがTSST-1の産生菌であることから, このトキシンによると考えられる急激な下痢症も散見され始めている⁴⁰⁻⁴²⁾。憂慮すべき問題である。

本邦における現行の医療体制下では, 環境に適応でき得る耐性型をもった菌がいち早く選択され, 病院内に広まることを如実に物語っているものである。

著者がここに示した3つの耐性型の異なるMRSAにおいて, なぜβ-ラクタム系薬によるPBP-2'の誘導に差が生ずるのかという原因については, まだ明確な解答を得られていない。しかし, これらの菌群において, 誘導能に相違のあることはまぎれもない事実であり, 今後の解析が必要であろう。

稿を終えるに臨み、ご指導を賜った紺野昌俊教授に深謝致します。また、菌株の収集にご協力頂いた本学附属病院中央検査部細菌検査室の皆様ならびに本学臨床病理の生方公子講師に感謝致します。

なお、一部は第 37 回日本化学療法学会総会の会長講演として、紺野が発表している。

文 献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子, 山下直子, 松下真理, 増田真理子, 野々口律子: 薬剤耐性型とファージ型からみたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌について。感染症学雑誌 59:1029~1040, 1985
- 2) 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 抗菌剤に対する感受性。Chemotherapy 31: 835~840, 1983
- 3) 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 1 報: β -lactam 剤感受性について。Chemotherapy 32: 344~353, 1984
- 4) 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 2 報: β -lactam 剤以外の抗生物質感受性および多剤耐性菌の現況と治療への考察。Chemotherapy 32: 517~533, 1984
- 5) 大成 滋: 血液培養より検出されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌について。-菌の性状と患者の背景因子-。感染症学雑誌 62: 564~589, 1988
- 6) 島田 馨, 岡 慎一, 鈴木宏男, 稲松孝思, 浦山京子: 黄色ブドウ球菌敗血症の研究。第 1 報。メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌敗血症について。感染症学雑誌 59: 459~463, 1985
- 7) UBUKATA K, YAMASHITA N, KONNO M: Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 27: 851~857, 1985
- 8) UTSUI Y, YOKOTA T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 28: 397~403, 1985
- 9) ROSSI L, TONIN E, CHENG Y R, FONTANA R: Regulation of penicillin-binding protein activity: description of a methicillin-inducible penicillin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 27: 828~831, 1985
- 10) MATSUHASHI M, SONG M D, ISHINO F, WACHI M, DOI M, INOUE M, UBUKATA K, YAMASHITA N, KONNO M: Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 167: 975~980, 1986
- 11) SONG M D, WACHI M, DOI M, ISHINO F, MATSUHASHI M: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett 221: 167~171, 1987
- 12) 岩田 敏, 他(6施設): メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による感染性心内膜炎の 1 幼児例。-治療経過と検出菌の薬剤感受性の解析-。感染症学雑誌 61: 178~187, 1987
- 13) KONO M, SASATSU M, O'HARA K, SHIOMI Y, HAYASAKA T: Mechanism of resistance to some cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 23: 938~940, 1983
- 14) 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 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。Chemotherapy 33: 743~752, 1985
- 15) 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
- 16) 三橋 進, 他: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 17) UBUKATA K, YAMASHITA N, GOTOH A, KONNO M: Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 25: 754~759, 1984
- 18) 後藤 朗: ブドウ球菌の産生するアミノ配糖体修飾酵素の現況について。Chemotherapy 33: 12~23, 1985
- 19) OUCHTERLONY O: Antigen-antibody reaction in gels. Acta Pathol Microbiol Scand 26: 507~515, 1949
- 20) BRADFORD M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248~254, 1976
- 21) UBUKATA K, NONOGUCHI R, MATSUHASHI M, KONNO M: Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. J. Bacteriol 171: 2882~2885, 1989
- 22) MANIATIS T, FRITSCH E F, SAMBROOK J: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 23) JEVONS M P: "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. Brit Med J 1: 124~125, 1961

- 24) 前崎繁文, 宋 浪東, 松橋通生, 小此木研二, 今田 哲, 生方公子, 山十直子, 紺野昌俊: 黄色ブドウ球菌メチシリン耐性遺伝子の由来。Chemotherapy 36(6):445, 1988
- 25) BARRETT F F, MCGHEE R F, FINLAND M: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. N Engl J Med 279:441~448, 1968
- 26) PARKER M T, HEWITT J H: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet 1:800~804, 1970
- 27) KLIMEK J J, MARSIK F J, BARTLETT R C, WELB, SHEP P, QUINTILIANI R: Clinical, epidemiological and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. Am J Med 61:340~345, 1976
- 28) CROSSLEY K, LOESCH D, LANDESMAN B, MEAD K, CHERN M, STRATE R: An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. I. Clinical Studies J Infect Dis 139:273~279, 1979
- 29) SAPICO J F, MONTGOMERIE J Z, CANAWATI H N, AEILTS G D: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Med Sic 281:101~109, 1981
- 30) SCHAEFLER S, JONES D, PERRY W, RUVINSKAYA L, BARODET Y, MAYA E, WILSON M E: Emergence of gentamicin and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City Hospitals. J. Clin. Microbiol. 13:754~759, 1981
- 31) COLLINS J K, MADER J T, KELLY M T: Resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to third-generation cephalosporins. J Infect Dis 147:591~596, 1983
- 32) 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3報。コアグララーゼ型の分類における検体別, 地方別, 施設別検討及び薬剤感受性成績。Chemotherapy 32:527~533, 1984
- 33) 生方公子, 紺野昌俊, 沢井 稔, 斉藤洪太, 柳瀬 義男, 高橋洋子, 藤井良知: 最近の重症ブドウ球菌感染症に対する疫学的研究。第1編: 分離したブドウ球菌の各種抗生物質に対する感受性とその β -lactamaseについて。小児科臨床 30:865~876, 1977
- 34) 紺野昌俊: MRSA 感染症の問題点。感染症 18:137~144, 1988
- 35) UBUKATA K, NONOGUCHI R, MATSUHASHI M, SONG M D, KONNO M: Restriction maps of the regions coding for methicillin and tobramycin resistance on chromosomal DNA in methicillin-resistant *staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother. 33:1624~1626, 1989
- 36) HARTMAN B J, TOMASZ A: Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 158:513~516, 1984
- 37) 生方公子: 基礎の立場からみた耐性菌の諸問題。—グラム陽性球菌について—。臨床と微生物 13:183~192, 1986
- 38) MURAKAMI K, NOMURA K, DOI M, YOSHIDA T: Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 31:1307~1311, 1987
- 39) 村上和久, 野村和秀, 土肥正善, 吉田 正: Oxacephem系抗生物質 6315-S(Flomoxef)のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌作用。Chemotherapy 35(S-1):108~114, 1987
- 40) 片山隆市, 桜井健司, 西 満正: 胃癌手術後の多剤耐性黄色ブドウ球菌による下痢症。日本消化器外科学会雑誌 19:1333, 1986
- 41) 加藤一彦, 滝口 進, 片山憲持, 森 潔, 久代裕史, 趙 成坤, 高見 実, 志賀 巖, 五十嵐英夫: MRSAによる術後重症腸管感染症。日本臨床外科学会雑誌 48:1544, 1987
- 42) 高橋政弘, 成沢富雄, 佐藤泰彦, 水沢広和, 鹿嶋秋伍, 中込 治: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による staphylococcal enterocolitis の1例。臨床外科 42:1577~1579, 1987

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BLOOD CULTURE

EPIDEMIOLOGIC CHARACTERISTICS AND INDUCTION OF PENICILLIN-BINDING PROTEIN-2' BY β -LACTAMS

RITSUKO NONOGUCHI

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine,
(Director : Prof. KONNO M), 2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

1. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was investigated for its isolation frequency from clinical materials from 1980 to 1988. The rapid increase of MRSA from the beginning of 1980 coincided with the introduction into the market of new antipseudomonal penicillins and second- and third-generation cepheims.

2. The change in the rate of isolates obtained from blood culture in the aforementioned period showed that *S. aureus*, of gram-positive cocci, was evidently increasing, whereas the isolation rate of gram-negative bacilli changed little or, in some species, even showed a slight decrease.

3. MRSA strains isolated from blood culture during the past five years were epidemiologically classifiable into three major groups: gentamicin-resistant (GM^r) MRSA, group 1, was typed using bacteriophage group I and coagulase IV, which produced enterotoxin A or B. Chromosomal DNA encoding the *mecA* gene was a 4.0 kb *Hind* III fragment; tobramycin-resistant (TOB^r) MRSA, group 2, was typed using phage group III and coagulase II, which produced toxin shock syndrome toxin 1 (TSST-1) alone or TSST-1 and enterotoxin C. The DNA encoding the *mecA* gene was a 4.3 kb *Hind* III fragment; GM^r+TOB^r-MRSA, group 3, was similar to group 2 epidemiologically. These MRSA strains indicated rapid changes from group 1 to group 2, then to group 3.

4. Induction of penicillin-binding protein (PBP)-2' in MRSA of these three groups by β -lactam antibiotics was investigated. In group 1, GM^r-MRSA, the induction degree by cefazolin or flomoxef was low, whereas in the other MRSA groups, PBP-2' induction was prevalent with all the compounds tested.

5. From these results, it appears that MRSA are acquiring more adaptability to new environments along with the change in the use of antibiotics.