

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) におけるペニシリナーゼ産生性の検討

—エンテロトキシン型別分類を用いて—

竹末 芳生・横山 隆¹⁾・児玉 節・山東 敬弘
中光 篤志・村上 義昭・今村 祐司・宮本 勝也
沖田 光昭・津村 裕昭・平田 敏明・松浦雄一郎
板羽 秀之²⁾

広島大学第一外科*, ¹⁾同 総合診療部, ²⁾同 中央検査部

(平成4年3月9日受付・平成4年4月16日受理)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の耐性機序はペニシリナーゼによるものではなくペニシリン結合蛋白の変化と考えられているが、最近ペニシリナーゼプラスミドが MRSA になんらかの関与をしていることがわかってきた。そこで当科で分離された MRSA 138 株のペニシリナーゼ産生性をアシドメトリーディスク法で測定し、さらに従来行われてきたコアグララーゼ型別以外の MRSA の分類法としてエンテロトキシン型別分類を用い検討を行った。ペニシリナーゼ高度産生株はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) では 55.6%, MRSA では 10.1% と有意の差を認め ($p < 0.01$), ペニシリン結合蛋白の変化が耐性機序とされている MRSA においてペニシリナーゼの重要性が低下していると推察された。コアグララーゼ型では IV 型は 79.2%, II 型は 36.7% の株がペニシリナーゼを中等度以上産生しており差を認め ($p < 0.01$), さらにペニシリナーゼ高度産生株は II 型ではみられず、最近の MRSA の流行株である II 型株においてペニシリナーゼ産生性が低いことが証明された。またこのコアグララーゼ II 型株をエンテロトキシン型別に分類して検討すると、エンテロトキシン C 単独産生株はほとんどがペニシリナーゼを産生していたが、B 産生株, A, C 同時産生株はそれぞれ 20.6%, 0.0% と有意に低率であった ($p < 0.01$)。以上より同じコアグララーゼ II 型でもエンテロトキシン型で異なった性質を有していることが推察され、今後 MRSA の検討を行っていくうえでエンテロトキシン型による分類も有用と考えた。

Key words: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), ペニシリナーゼ, エンテロトキシン, コアグララーゼ型別分類, 院内感染

今日、内科系、外科系を問わず臨床上 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が深刻な問題となっている。MRSA は β -ラクタム剤に対する親和性の低下した新しい架橋形成酵素 (penicillin binding protein-2, PBP-2') を生産することより耐性化したとされており¹⁻⁴⁾、他の多くの細菌における耐性化機序として重要な役割を果たしている β -ラクタマーゼは MRSA では直接の関与は少ないと考えられていた⁵⁾。しかし、近年 MRSA における遺伝子レベルでの研究がすすみ、PBP-2' の産生遺伝子である *mecA* とペニシリナーゼ遺伝子の関連性が指摘されるにいたり^{6,7)}、MRSA においてもペニシリナーゼがなんらかの関与をしていることがわかってきた。

一方、多くの MRSA における疫学的検討でコアグララーゼ型が用いられ、現在コアグララーゼ II 型が全国的に流行しているとの報告が多いが^{8,9)}、さらに詳細な検討をする上でもはやコアグララーゼ型では不十分との意見も多く、我々は MRSA の産生する staphylococcal enterotoxin (SE) により MRSA を分類し検討してきた¹⁰⁾。そこでこの分類を用い今まであまり眼が向けられていなかった MRSA のペニシリナーゼ産生性につき検討を行ったので文献的考察を加え報告する。

I. 材料と方法

1) 対象とした菌株

昭和 58 年から平成 2 年の間に当科において分離さ

* 広島市南区霞 1-2-3

れた MRSA (methicillin, 最小発育阻止濃度 ≥ 12.5 $\mu\text{g/ml}$) 138 株を対象とした (1 症例 1 株)。コアグラーゼ型分類では II 型 109 株, IV 型 24 株, III 型 3 株, VII 型 2 株であった。病棟分離株の由来は腹腔ドレーン 95 株, 喀痰 19 株, 便 11 株, 皮膚軟部組織 9 株, 血液 4 株であった。最小発育阻止濃度は日本化学療法学会標準法¹¹⁾に従い測定した。

2) β -ラクタマーゼ判定試験

アシドメトリーディスク法にて行った¹²⁾。すなわちペニシリン G, セファゾリンおよびフロキシムを基質とした β -ラクタマーゼ検出用ディスク (日本生物材料センター製) を用い, それぞれのディスク上に pH 7.0, 0.01 モル磷酸塩緩衝液 30 μl を滴下したのち, 検体から分離培養された被検菌のコロニーを塗布し, 黄色に変化したディスクにより β -ラクタマーゼをペニシリナーゼ, セファロスポリナーゼ, セフロキシマーゼのいずれかに判別した。ここでディスクの変色が菌塗布後 15 分で認められた株を β -ラクタマーゼ高度産生株, 2 時間で認められた株を中等度産生株とした。反応中ディスクが乾燥すると判定困難となるため湿潤箱にいれ行った。

3) MRSA における SE 産生性

被検菌をハートインフュージョンブイヨンに接種し 37°C で 20 時間振とう培養を行い, 培養液を 3,000 rpm, 20 分間遠心し, 上清を検体とした。精製エンテロトキシン A-D をウサギに免疫して得た各 SE に対する免疫グロブリンをアフィニティクロマトグラフィーで精製シラテックス粒子に感作したブドウ球菌検出用キット (デンカ生研) を用い, 逆受身ラテックス凝集反応で各 SE 産生性を判定した¹³⁾。

II. 結果

1) MRSA と methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) における β -ラクタマーゼ産生性

S. aureus の産生する β -ラクタマーゼはすべてペニシリナーゼであった。MSSA のペニシリナーゼ産生性は 66.7% が中等度以上産生株であり, 55.6% が高度産生株であった。一方 MRSA においてはそれぞれ 42.7%, 10.1% であった。高度産生株ならびに中等度以上産生株双方において MSSA の方が MRSA より有意に高率であった ($p < 0.01$) (Fig. 1)。

2) MRSA におけるコアグラーゼ型によるペニシリナーゼ産生性

コアグラーゼ II 型ではペニシリナーゼ高度産生株はみられず中等度産生株は 36.7% であり, コアグラーゼ IV 型の高度産生株 60.9%, 中等度以上産生株 79.2% と比較し有意にペニシリナーゼ産生性は低率であつ

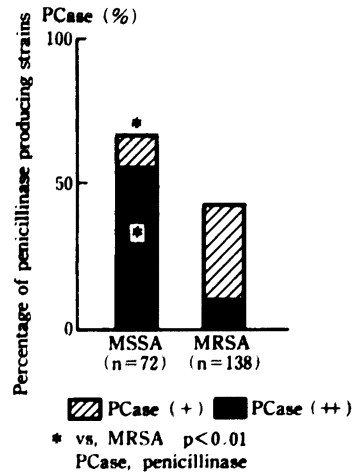


Fig. 1. Penicillinase-producing strains of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

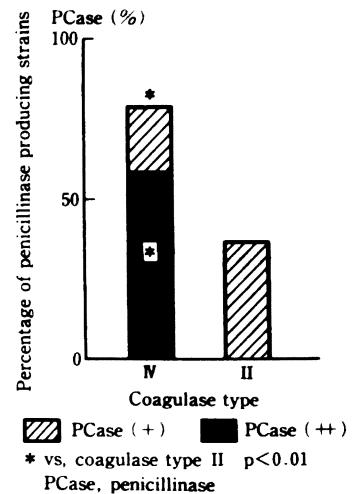


Fig. 2. Isolation rates of penicillinase-producing strains of coagulase type IV and type II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

た ($p < 0.01$) (Fig. 2)。

3) MRSA におけるコアグラーゼ型による SE 産生性

コアグラーゼ IV 型においては SEA 産生株 (A 型) 95.8%, SE 非産生株 4.2% であり, コアグラーゼ II 型では SEB 産生株 (B 型) 31.2%, SEC 産生株 (C 型) 28.4%, SEB, C 同時産生株 (BC 型) 11.9%, SEA, C 同時産生株 (AC 型) 23.9%, SE 非産生株

3.6%であった。

4) MRSA における SE 型によるペニシリナーゼ産生性

SEA 型においては高度ペニシリナーゼ産生株は 61.0%を占め、非または低度産生株は 17.4%であった。コアグララーゼ II 型 (SEB 型, SEC 型, SEBC 型, SEAC 型) ではペニシリナーゼ高度産生株は認めなかったが、中等度産生株は各 SE 型により頻度が異なり、SEC では 83.9%と高率であったが、SEB, SEAC ではそれぞれ 20.6%, 0.0%と SEC と比較し有意に低率であった ($p < 0.01$) (Fig. 3)。

5) MRSA における SE 型による抗生剤感受性

メチシリンに対する耐性度は SEAC, SEC, SEBC, SEB, SEA の順に高度であった。特に SEAC においては全株メチシリンにおける MIC > 100 $\mu\text{g/ml}$ であった。SEC 型はゲンタマイシン, ミノサイクリン, オフロキサシン感受性であり, SEB 型はミノサイクリン感受性であったが, SEAC 型はミノサイクリン耐性, クリンドマイシン感受性の傾向を認めた (Fig. 4)。

III. 考 察

MRSA における耐性機序は PBP 2' によるとされており, MRSA の約 80%の株はペニシリナーゼをコードしたプラスミドを除去した後も耐性を持続すると

されている⁹⁾。このようにペニシリナーゼは実際の耐性化には大きな影響を与えないが, 最近基礎的な研究により MRSA においてペニシリナーゼがなんらかの関与をしていることがわかってきた。PBP 2' 産生遺

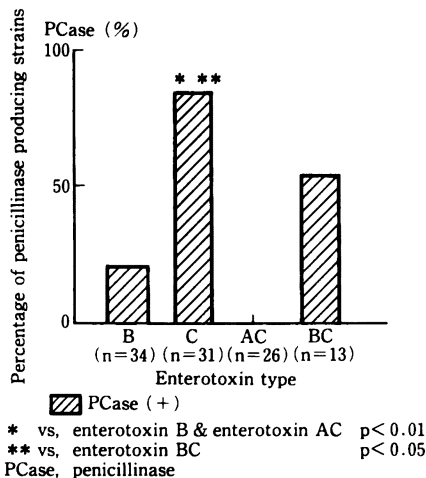


Fig. 3. Comparison of the rate of penicillinase-producing strains by enterotoxin type in coagulase type II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

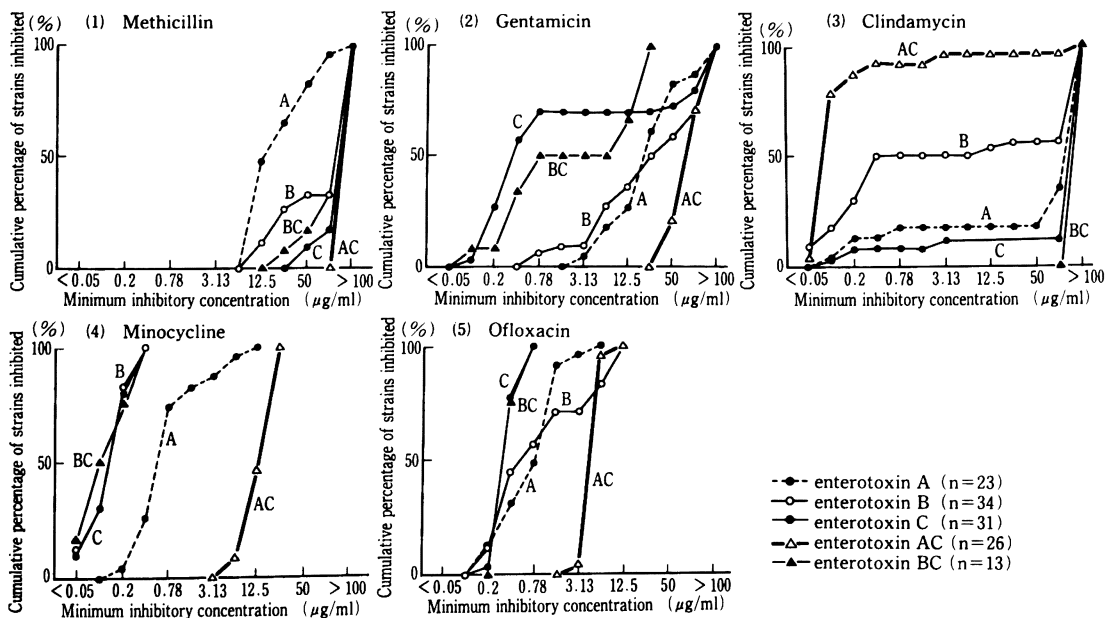


Fig. 4. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing type A, B, C, BC, or AC enterotoxin.

伝子である *mecA* 遺伝子配列は一部ペニシリナーゼ遺伝子と高い相同性があるとされており⁷⁾, 松橋ら⁸⁾は PBP 2' は普通の PBP 遺伝子とペニシリナーゼの遺伝子の融合でできたものと想定している。Hiramatsu ら¹⁴⁾は MRSA においてペニシリナーゼプラスミドを脱落させると、耐性パターンが均一な (homogeneous) MRSA からはメチシリンに感受性化したクローンが得られ、その多くは *mecA* 遺伝子を失ったと報告し、MRSA における *mecA* の安定した保持にペニシリナーゼプラスミドは重要な役割を果たしていることを証明した。また PBP 2' の誘導にプラスミドは関与しているとの報告もあり^{15,16)}, ペニシリナーゼプラスミドは MRSA においていくつかの重要な役割を果たしている。

MRSA は疫学的に多くはペニシリナーゼ産生株であるとの報告が多いが¹⁴⁾, 今回の結果では約 40% と低率であった。その理由としてメチシリン感受性 *S. aureus* (methicillin-sensitive *S. aureus*, MSSA) と MRSA 両者の耐性化におけるペニシリナーゼの役割の違いを調べる目的で、やや感度が鋭敏すぎるニトロセフィン法より β -ラクタマーゼ高度産生株の判定に適し、より臨床的とされているアシドメトリーディスク法を用いたことがあげられる¹⁷⁾。そのため PBP 2' 産生遺伝子をもたず β -ラクタム剤に対する防御機構としてペニシリナーゼが重要な役割を果たしている MSSA において、PBP 2' で耐性化している MRSA より有意に高率にペニシリナーゼ高度産生株が存在することが証明可能となった。一方アシドメトリーディスク法を用いたため陰性でも低度ペニシリナーゼを産生している可能性があり、ペニシリナーゼ非産生株の同定はできなかったが、ペニシリナーゼ遺伝子は存在しても^{6,7)} ペニシリナーゼの産生効率の悪い菌株の存在も否定できない。

MRSA の疫学的調査に従来コアグララーゼ型別分類が用いられてきた。全国的な傾向として以前コアグララーゼ IV 型が流行していたが、最近病院で検出される MRSA はほとんどコアグララーゼ II 型に移行しており^{8,9)}, さらに詳細な疫学的調査を行う上でもはやコアグララーゼ型別分類では不十分であるとの意見も多い。我々はコアグララーゼ II 型株を腸炎を惹起する毒素である SE によりさらに SEB 型, SEC 型, SEBC 型 (SEC 型に性質が類似する), SEAC 型の 4 タイプに分類し、それぞれ異なる性質を有することを報告した¹⁰⁾。この SE 型によるペニシリナーゼ産生性をみると、全株メチシリンに高度耐性であった SEAC 型はすべてペニシリナーゼ非または低度産生株であった。

ここでコアグララーゼ II 型株は IV 型株と比較しメチシリンに高度耐性の株が多いとされているが¹⁸⁾, ペニシリナーゼにおいては IV 型の方が高い産生性を示した。これらのことと MSSA より MRSA が低いペニシリナーゼ産生性を示したことを考慮すると、MRSA においてセフェム剤耐性が高まればペニシリナーゼ産生性が低下する傾向があることが想定される。これは PBP 2' による耐性が高度になればなるほど耐性化においてペニシリナーゼが不用となったと考えれば理解される。しかし例外的にメチシリンに対する耐性度が SEAC に次ぐ SEC ではペニシリナーゼを高率に産生しており単にセフェム剤に対する耐性度が高ければペニシリナーゼ産生性が低くなるだけでないことがわかる。

同じコアグララーゼ II 型でも各 SE 型でペニシリナーゼ産生性、抗生剤感受性が異なっており、また他の報告で我々の病棟で発生した MRSA 腸炎は多くは SEAC 型であり、SEC を産生する株 (SEC 型, SEBC 型, SEAC 型) は TSST-1 を同時に産生していた¹⁰⁾。このように SE 型により菌のもつ性格がそれぞれ異なった特徴を有しており、今後 MRSA の検討を行っていくうえで SE 型による分類の有用性を強調したい。

文 献

- 1) Brown F G, Reynolds R E: Intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. F. E. B. S. Lett. 122: 275~278, 1980
- 2) Georgopapadakou N H, Smith S A, Bonner P P: Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. Antimicrob. Agents. Chemother. 22: 172~175, 1982
- 3) Hartman B L, Yomazs A: Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 158: 513~516, 1984
- 4) Utsui Y, Yokota T: Role of an altered methicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 28: 397~403, 1985
- 5) 横田 健: メチシリン・セフェム耐性黄色ブドウ球菌。医学のあゆみ 131: 951~956, 1984
- 6) 松橋通生: β -ラクタム剤耐性機構—PBP を中心として—。化学療法の領域 1: 504~511, 1985
- 7) Song M D, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsuhashi M: Evaluation of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. F. E. B. S. Lett. 221: 167~171, 1987
- 8) 竹末芳生, 横山 隆, 児玉 節, 藤本三喜夫, 瀬分均, 村上義昭: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

(MRSA) におけるコアグラマーゼ型別と薬剤感受性に関する検討。日外会誌 90: 5~11, 1990

- 9) 生方公子: MRSA の疫学的特徴とその耐性メカニズム。最新医学 4: 2499~2509, 1989
- 10) 竹末芳生, 横山 隆, 児玉 節, 村上義昭, 板羽秀之: 広島大学医学部第一外科における MRSA 腸炎の検討。日本外科感染症研究 3: 214~219, 1991
- 11) 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
- 12) Rosenblatt J E, Neumann A M: Laboratory suggestions: a rapid slide test for penicillinase. A. J. C. P. 69: 351~354, 1978
- 13) Igarashi H, Fujikawa H, Usami H, Kawabata S, Morita T: Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* FRI 1169 and 587 toxic shock syndrome toxins. Infect. Immun. 44: 175~181, 1984
- 14) Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T: Role of penicillinase plasmids in the stability of the mec A-gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents, Chemother. 34: 600~604, 1990
- 15) Reynolds P E, Brown D F J: Penicillin-binding proteins of β -lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: effect of growth conditions. F. E. B. S. Lett. 192: 28~32, 1985
- 16) 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
- 17) Takesue Y, Yokoyama T, Kodama T, Murakami Y, Tsumura H, Matsuura Y: β -lactamase in Gram-negative rods: the relationship between penicillinase and R plasmids in Gram-negative rods. Hiroshima J. Med. Sci. 39: 65~69, 1990
- 18) Takesue Y, Yokoyama T, Kodama T, Fijimoto M, Okita M, Sewake H, Murakami Y, Imamura Y, Tsumura H: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infection in the surgical ward and operating room. Hiroshima J. Med. Sci. 38: 183~186, 1989
- 19) Takesue Y, Yokoyama T, Kodama T, Santou T, Nakamitsu A, Mirakami Y, Imamura Y, Miyamoto K, Okita M, Tsumura H, Itaha H, Matsuura Y: Toxin involvement in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) enteritis in gastroenterological surgery. Gastroenterologia Japonica 26: 716~720, 1991

Penicillinase production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,
with respect to staphylococcal enterotoxin types

Yoshio Takesue, Takashi Yokoyama*, Takashi Kodama,
Takahiro Santou, Atsushi Nakamitsu, Yoshiaki Murakami,
Yuuji Imamura, Katsunari Miyamoto, Mitsuaki Okita,
Hiroaki Tsumura, Toshiaki Hirata, Yuichiro Matsuura
and Hideyuki Itaha**

First Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine, *Department of
General Medicine and **Central Clinical Laboratory, Hiroshima University
Hospital, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

We investigated the production of penicillinase in 138 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in which the suggested mechanism of resistance was not the production of penicillinase but a change in penicillin-binding protein. The percentages of highly penicillinase producing strains of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA, 55.6%) were higher than those of MRSA (10.1%). In terms of coagulase types, 79.2% of the type IV MRSA strains were penicillinase-producing, whereas only 36.7% of the type II MRSA strains produced penicillinase ($p < 0.01$), and none of the type II strains was a high penicillinase-producing strain. Among coagulase type II, most staphylococcal enterotoxin (SE) type C strains produced penicillinase, although SE type B and type AC strains rarely produced penicillinase. From these results, it was considered critical for epidemiologic purposes to characterize isolates further by SE typing.