

MRSA に対する β -ラクタム剤と塩化リゾチームの併用投与効果加藤 研一・奥田 和之¹⁾・上殿 泰成

石倉 宏恭・武山 直志・田中 孝也

関西医科大学救命救急センター*

¹⁾ 同 中央検査部

(平成5年5月26日受付・平成5年10月4日受理)

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する β -ラクタム剤と塩化リゾチームの併用効果, および鼻腔定着 MRSA に対する塩化リゾチームの有用性について検討を行った。

① 臨床分離された MRSA と methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) を用い, 塩化リゾチームと cefazolin, ceftizoxime (CZX), latamoxef, flomoxef との併用効果を checkerboard 法により比較検討を行ったところ, MRSA に強い相乗効果を認めた。

② リゾチームの MRSA に対する定着阻止効果を, マンニット食塩寒天培地に CZX 単独添加培地と, CZX と塩化リゾチームの併用添加培地を作成し, 集中治療室内の落下細菌として定着する MRSA 菌株数で比較した。併用添加培地では MRSA の検出は半数以下であり, β -lactam 剤が投与されている患者でリゾチームの MRSA 定着阻止効果が示唆された。

③ 臨床症例において塩化リゾチームの噴霧により, 鼻腔前庭では8例中7例において減少もしくは消失が認められたが, 口腔では減少は認められなかった。MRSA 以外の菌種で, 塩化リゾチームの噴霧により減少を認めたのは, CNSで6例中2例, *Pseudomonas* で5例中1例のみであり, リゾチームの効果は MRSA に特異的であることが示されたが, 投与抗菌剤との併用効果だけでなく, 生体では他の免疫機構との協力作用なども考えられた。

Key words: MRSA, リゾチーム, 併用効果, 感染予防, 院内感染

リゾチームは1922年にFlemingにより発見されたムコ多糖分解酵素で, 細胞膜にムコ多糖類を有するグラム陽性球菌の *Micrococcus lysodeikticus* などに対して加水分解による溶菌作用を持つ。体内においては鼻汁・喀痰・涙液・唾液に高濃度に存在し, 血漿・好中球・単球などにも広く分布しており, 生体防御機構のひとつと考えられている。近年, 単独では *Staphylococcus aureus* に溶菌作用を示さないリゾチームが β -lactam 剤の併用により MRSA に抗菌力を示すことが *in vitro* で報告されるようになった^{1,2)}。

そこで塩化リゾチームと β -lactam 剤の併用による, MRSA の鼻粘膜などへの定着阻止効果と, 臨床において β -lactam 剤の投与症例に定着した MRSA に対する塩化リゾチームの投与効果の面より検討したので報告する。

I. 対象と方法

1. 併用効果

1992年5月に当施設の集中治療患者の鼻前庭から分離された MRSA 3株, MSSA 2株に対して, 微量

液体希釈法による checkerboard 法で最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC), および fractional inhibitory concentration index (FIC-index) の検討を行った。使用薬剤は力価の明らかな塩化リゾチームと cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), flomoxef (FMOX), aztreonam (AZT) を用いた。

2. 定着予防効果

MRSA の選択的迅速検出が可能な CZX 25 μ g/ml, NaCl 3%, マンニット, プロムクレゾールパープル (BPC) 添加寒天培地³⁾ (CZX 単独培地) と, これに塩化リゾチーム 200 μ g/ml を加えた培地 (リゾチーム併用培地) を1組として, MRSA 保菌症例 (鼻前庭2名, 吸引痰1名, 熱傷創部1名から培養陽性) の在室している集中治療室内の11か所に6時間設置し, 落下細菌として培地に定着した MRSA 株数を検討した。

*大阪府守口市文園町1番地

3. 定着 MRSA に対する除菌効果

塩化リゾチーム補充の有効性の検討を行うため、1992年の5月～8月に7日間以上気管内挿管もしくは気管切開による呼吸管理が施行され、MRSAが鼻腔前庭から検出された8症例において、1,000 $\mu\text{g/ml}$ の塩化リゾチームを4症例は口腔、鼻腔内に1時間間隔で2日間噴霧し、他の4症例は鼻腔のみに3時間間隔で2日間、その前後での検出菌とその菌量の検討を行った。なお抗菌剤は1例を除き β -lactam剤がいずれの症例にも投与されていた。

II. 結 果

1. 併用効果 (Table 1)

MRSA 3株 (A株, B株, C株) では β -lactam剤単独でのMICは128～512 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株であった。塩化リゾチーム単独では発育阻止に2株で6,400 $\mu\text{g/ml}$ 以上、1株で3,200 $\mu\text{g/ml}$ 必要で、3

株とも塩化リゾチームに感受性を示さなかった。もっとも強い併用効果の得られた塩化リゾチームの濃度は400～1,600 $\mu\text{g/ml}$ で、 β -lactam剤のMICが16～64 $\mu\text{g/ml}$ と2～5管以上の低下を認めた。FIC-indexはほとんどの併用で0.5以下の相乗効果が認められたが、C株とLMOXとFMOXの併用は相加効果にとどまった。

MSSA 2株 (D株, E株) ではMRSAと同様に塩化リゾチーム単独のMICは6,400 $\mu\text{g/ml}$ 以上であったが、併用による低下はCEZで100 $\mu\text{g/ml}$ ともっとも強い効果が認められたが、その他の併用では低下は軽度で、まったく効果を示さない併用も認められた。また β -lactam剤の併用によるMICの低下はほとんど認められなかった。FIC-indexはすべて0.5以上で相乗効果は認められなかった。

黄色ブドウ球菌に感受性のないAZTはMRSA,

Table 1. Efficacy of concomitant administration of lysozyme chloride and β -lactam antibiotics on MRSA and MSSA

	Drug		Strains				
			A	MRSA		MSSA	
				B	C	D	E
MIC	lysozyme	alone	$\geq 6,400$	$\geq 6,400$	3,200	$\geq 6,400$	$\geq 6,400$
MIC	cefazolin	alone	256	256	128	0.5	0.5
		combination	32	64	16	0.25	0.25
	lysozyme	combination	800	400	400	100	100
FIC-index			0.250	0.375	0.250	0.516	0.516
MIC	ceftizoxime	alone	256	≥ 512	256	8	8
		combination	32	64	64	4	4
	lysozyme	combination	800	800	800	200	1,600
FIC-index			0.250	0.500	0.250	0.531	0.750
MIC	latamoxef	alone	256	≥ 512	≥ 512	64	64
		combination	32	64	32	32	64
	lysozyme	combination	1,600	800	1,600	3,200	$\geq 6,400$
FIC-index			0.185	0.500	0.625	1.000	2.000
MIC	flomoxef	alone	≥ 512	≥ 512	≥ 512	4	4
		combination	32	32	16	2	2
	lysozyme	combination	800	800	1,600	3,200	1,600
FIC-index			0.250	0.375	0.625	1.000	0.750
MIC	aztreonam	alone	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512
		combination	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512
	lysozyme	combination	$\geq 6,400$	$\geq 6,400$	3,200	$\geq 6,400$	$\geq 6,400$
FIC-index			-	-	-	-	-

MIC: minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)

FIC-index: fractional inhibitory concentration index

MSSA とともに今回設定した濃度への感受性への低下は認められなかった。

2. 定着予防効果

CZX 単独培地では落下細菌として定着し検出された MRSA は 21.5 株/m²/h であったが、リゾチーム併用培地では 9.5 株/m²/h と検出は半数以下であった。

3. 定着 MRSA に対する除菌効果

MRSA の定着を認めた症例の鼻腔への塩化リゾチームの噴霧により鼻腔前庭では 8 例中 7 例において MRSA の菌量の減少もしくは消失が認められた。抗生物質の投与されていない症例や、*S. aureus* に感受性のない AZT 投与症例においても減少が認められた。口腔では全例に菌量の変化は認められなかった (Table 2)。

鼻腔前庭より検出された MRSA 以外の菌種は、Coagulase Negative Staphylococci (CNS) が 6 例、*Pseudomonas sp.* が 5 例に認められた。これらに塩化リゾチームの投与を行ったが、菌量の減少を認めた

のは、CNS で 2 例、*Pseudomonas sp.* で 1 例のみであり、他の菌種では不変もしくは増加が認められた (Table 3)。

III. 考 案

MRSA に対する塩化リゾチームと β -lactam 剤との併用効果の作用機序として、 β -lactam 剤により誘導され、MRSA に特徴的な penicillin-binding protein 2' (PBP 2') により構成された細胞壁のペプチドグリカンに、リゾチームの溶菌作用を受けやすいことに起因すると考えられている¹⁾。今回の checker-board 法を用いた MIC および FIC-index の検討でも、さきの報告と同様に著明な併用効果が認められた。しかし *S. aureus* に対するリゾチームの β -lactam 剤との併用効果は、今日 MRSA が問題となる以前にすでに報告されており²⁾、今回も PBP 2' を産生しない MSSA において CEZ の併用によりリゾチームの MIC が 100 μ g/ml まで低下を認めたことから、その作用機序が単純でないことが推察された。

CZX 単独培地を用いた集中治療室内の落下細菌の

Table 2. Changes in colony count in Cultures before and after lysozyme chloride inhalation

Time interval between lysozyme inhalations	Patient no.	Age and gender	Diagnosis	Antibiotics	MRSA in the nasal cavity		MRSA in the oral cavity	
					before	after	before	after
1 h	1	18/F	Injuries at various places	LMOX, CMD	⚡	+	+	+
	2	58/M	Subarachnoid hemorrhage	CEZ	⚡	+	-	-
	3	64/M	Cervical spine injury, respiratory failure	IPM/CS	⚡	+	⚡	⚡
	4	62/M	Chronic renal failure, respiratory failure	-	⚡	⊥	⊥	⊥
3 h	5	76/F	Uterine cancer, peritonitis	FMOX, OFLX	⚡	+		
	6	45/F	Myasthenia gravis	CAZ, OFLX	⚡	-		
	7	56/F	Chronic renal failure, pneumonia	ATZ	⚡	⚡		
	8	76/F	Subarachnoid hemorrhage	LMOX	+	+		

⚡: Very high counts ⚡: High counts +: Many

⊥: Low counts ⊥: Very low counts

LMOX: latamoxef, CMD: cefamandole, CEZ: cefazolin, IPM/CS: imipenem/cilastatin, FMOX: flomoxef, OFLX: ofloxacin, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam

Table 3. Changes after in colony count lysozyme inhalation

Strain	Disappeared	Decreased	No Change	Increased	Total
MRSA	1	6	1		8
CNS		2	4		6
α -Streptococcus			1		1
<i>Enterococcus sp.</i>			1		1
<i>Pseudomonas sp.</i>		1	4		5
<i>K. aerogenes</i>			2		2
<i>E. cloacae</i>				1	1

結果より、MRSA 感染もしくは保菌症例の在室により相当数の MRSA が飛沫や浮遊し落下していることが認められた。本来この培地は検体から直接 MRSA 迅速検出を目的に考案されたが⁹⁾、第3世代セフェム剤を投与された患者の粘膜や創部のモデルとも考えられ、コロニーを形成し検出された落下細菌は、付着から定着に至る MRSA を想定することができる。塩化リゾチームの併用では MRSA の検出が少なかったことより、 β -lactam 剤とリゾチームの併用が、鼻腔などに付着した MRSA が増殖し定着する段階での阻止に有用である可能性が示された。

リゾチームは涙液に 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 含まれるとされており、鼻腔・口腔へ噴霧した塩化リゾチームの 1,000 $\mu\text{g/ml}$ は高濃度とはいえないが、MRSA の定着した臨床例において鼻腔では効果が認められた。しかし、塩化リゾチーム単独では MRSA に対し溶菌効果は認められておらず^{1,2)}、同時期に臨床分離された3株の MRSA に対する MIC も最低で 3,200 $\mu\text{g/ml}$ で抗菌効果が認められないにもかかわらず、抗菌剤の投与されていない塩化リゾチーム単独投与の症例や、黄色ブドウ球菌に抗菌力がなく MRSA に対し有効な併用効果の認められなかった aztreonam の投与された症例においても MRSA の減少が認められたことより、実際に鼻腔粘膜に定着した MRSA に対する塩化リゾチームの効果は、*in vitro* での β -ラクタム剤との併用効果のみではないことが推察された。また、口腔において効果が認められなかったのは、その投与方法や投与量の問題も考えられるが、免疫溶菌作用に補体や抗体とリゾチームが関与すること⁶⁾、喀痰中への抗生物質の移行を塩化リゾチームが高めること⁷⁾ などから、唾液と鼻粘膜の補体や抗体の相違や、抗菌剤の移行性などに検討の余地があり、生体内での感染防御機構におけるリゾチームの果たす役割の複雑さが推察された。

MRSA の定着が感染へと移行するには非特異的感染防御機構の体液性防御因子 (リゾチーム、ラクトフェリン、トランスフェリン、分泌型 IgA、補体など)⁸⁾ が破綻した compromised host であることや、抗菌剤投与により他の細菌から選択を受け、鼻腔や咽頭の常在細菌叢の乱れがあることが要因となる。さらに気管内挿管や胃管の挿入された場合は肺炎や腸炎などの感染への進行も容易であり、さらなる院内感染源ともなる。鼻腔前庭に定着した MRSA を除菌のため、ポピドンヨードや mupirocin が用いられているが、感染の発症に至る以前の付着・定着の段階で、生

体が本来保有している防御因子であるリゾチームにより MRSA 感染発症が阻止できれば非常に合目的と考えられる。このことは MRSA が喀痰からしばしば分離されるものの、MRSA の急性気管支炎や肺炎と診断できる例がきわめて少ない原因として、喀痰中のリゾチームの作用が考えられるとの報告^{2,9)} から裏付けられる。

今回使用した塩化リゾチームは卵白から精製されたため、ヒトリゾチームとは一部構造が異なった異種タンパクである。そのため、内服投与は認められているが、その吸収や組織への移行性は疑問視されており、MRSA 感染発症後の病巣での塩化リゾチームと β -lactam 剤の併用効果、さらにその他の因子との協力作用などについては、今後、投与方法を含めた研究が必要と思われた。

文 献

- 1) 大野 章, 金子康子, 館田一博, 平瀧洋一, 宮崎修一, 辻 明良, 山口恵三, 五島燈智子: MRSA に対する lysozyme と β -lactam 剤併用効果の機序について。Chemotherapy 41: 306, 1993
- 2) Igarashi K, Matuyama T: Alternative activity of β -lactam antibiotics against methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus* in the presens of respiratory tract mucos. J. Infect. Dis. 161: 250~254, 1990
- 3) 中沢昭三, 山本郁夫, 横田芳武, 光武照之, 三好英司, 山階祥子: 細菌溶菌酵素 lysozyme の抗生作用に関する基礎的研究 第2報, アミノペンシルベニシリンとの併用効果。Jpn. J. Antibio. 21: 10~14, 1968
- 4) 増田 衛, 板倉英子, 小川 秀: Penicillin 系薬剤 (Amoxycillin) と溶菌酵素 (lysozyme) との併用効果について。Chemotherapy 21: 1793~1796, 1973
- 5) 大久保豊司, 岡本良一, 橋本 一, 井上松久: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の迅速検出法の検討。臨床と微生物 19: 122, 1992
- 6) 谷川 隆: 免疫溶菌現象におけるリゾチームの役割。大阪大学医学雑誌 11: 31~37, 1959
- 7) 穴戸晴美, 永井英明, 三宅修司, 内田和仁, 吉良枝郎, 松井泰夫, 折津 愈, 秋山 修, 宮原隆成, 石川智久: セフェム系抗生物質の喀痰中濃度におよぼす塩化リゾチームの併用効果。Chemotherapy 40: 1122~1127, 1992
- 8) 斎藤 厚: 感染症の成立と防御。感染症学 (島田馨, 斎藤 厚, 北原光夫編), p.1~12, 医学書院, 東京, 1991
- 9) 島田 馨: 日本における MRSA の問題点。MRSA (松本慶蔵編), p.27~30, 医薬ジャーナル出版, 東京, 1991

Lysozyme chloride and β -lactam antibiotics, efficacy of concomitant administration against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), a basic and clinical study

Kenichi Kato, Kazuyuki Okuda*, Masanari Uedono,
Hiroyasu Ishikura, Naosi Takeyama
and Takaya Tanaka

Department of Emergency and Critical Care Medicine, Bacteriological Section of
Central Clinical Laboratory*, Kansai Medical University,
Fumizono-cho 1, Moriguchi, Osaka, Japan

We investigated the *in vitro* efficacy of β -lactam antibiotics and lysozyme chloride against MRSA, and their *in vivo* value against MRSA existing in the nasal cavity.

1. Lysozyme chloride and cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), or flomoxef (FMOX) were added to separated cultures of MRSA and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). Using the checkerboard method, strong anti-MRSA synergism of the drugs was observed.

2. Lysozyme chloride's MRSA ability to prevent dispersion was examined by counting MRSA colonies of carriers in the ICU and inoculating them onto mannitol salt agar cultures infused with either lysozyme chloride plus CZX or CZX alone. Colony numbers on the lysozyme chloride plus CZX plates were less than half those on the CZX only plates, indicating that lysozyme prevents the colonization of MRSA in patients receiving β -lactam antibiotics.

3. The clinical efficacy of this combination therapy was investigated in 8 inpatients requiring respiratory tract control for more than 7 days and having MRSA in their nasal cavity. Lysozyme chloride was sprayed into the nasal and oral cavities. Colony numbers in cultures from the nasal cavity decreased or disappeared in 7 patients, although no changes occurred in cultures from the oral cavity. Coagulase negative Staphylococci (CNS) in 2 of 6 patients, and *Pseudomonas* sp. in 1 of 5 patients decreased. This suggested lysozyme was specifically highly efficacious for MRSA. However, the relationship between lysozyme and concomitantly administered antimicrobial agents was still unclear, and the possibility of conjoint effects with an *in vivo* immune mechanism exists.