

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* の高度耐性化野路 弓子¹⁾・小此木研二¹⁾・平松 啓一²⁾¹⁾ 武田薬品工業株式会社創薬第三研究所*²⁾ 順天堂大学医学部細菌学教室

(平成7年12月13日受付・平成8年2月29日受理)

Staphylococcus aureus N 315 はメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) の耐性発現を担う細胞壁合成酵素 penicillin-binding protein (PBP) 2' の構造遺伝子 *mecA* の上流に誘導因子遺伝子 *mecR1* およびリプレッサー遺伝子 *mecI* を有する preMRSA である。*S. aureus* N 315 から *mecI* と β -ラクタマーゼリプレッサー遺伝子 *blaI* を欠失させた変異株 (N 315-LR 5 P) は methicillin, imipenem (IPM) および ceftizoxime (CZX) に耐性化し, *mecI* 以外にも変異を有すると考えられる変異株 (N 315-HR 3 P) はこの3薬剤に加えて cefpirome (CPR) および cefepime (CFPM) に耐性化した, cefozopran (CZOP) に対しては親株 N 315 とほぼ同程度の感受性を示した。CZOP および CPR は *S. aureus* N 315 より得られた変異株 (N 315 P-ZR) の構成型産生 PBP 2' に対して CFPM および IPM より約 6 倍, CZX より 70 倍以上高い親和性を示した。また, CZOP は *S. aureus* N 315-HR 3 P に対して PBP 2' を阻害する濃度より低い 1 および 10 $\mu\text{g/ml}$ で静菌作用を, PBP 2' を阻害する濃度以上で殺菌作用を示した。これらの結果から, preMRSA は *mecI* の変異で PBP 2' の産生が構成型になることによって PBP 2' に低親和性の薬剤に耐性化するが, PBP 2' にある程度の親和性を持つ薬剤に対する耐性化には他の変異も必要であると考えられた。

Key words: preMRSA, MRSA, PBP 2', *mecI*, cefozopran

わが国においてメチシリン・セフェム耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) による院内感染が問題視されはじめてからすでに 10 年以上が経過した。この間 MRSA における耐性の主な原因が, 感受性 *S. aureus* にはみられない新たなペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein), PBP 2' の産生にあることが明らかにされ¹⁻⁴⁾, この PBP 2' の構造遺伝子 *mecA* がクローン化されて分子レベルでの解明も進められている⁵⁻⁹⁾。しかしながら, 医療側の種々な対策にもかかわらず臨床検体から MRSA は依然として高頻度に分離されており, 厚生省の全国調査によると 1995 年上期における MRSA の全分離株中に占める割合は 12.6%, *S. aureus* 中に占める割合は 61.0% である¹⁰⁾。MRSA 感染症における大きな問題の一つは比較的感受性であった MRSA が治療に使用した β -ラクタム薬によって高度耐性 MRSA となり, β -ラクタム薬による治療が困難な感染症となることである。MRSA の耐性発現を担う PBP 2' 産生の制御, すなわち *mecA* 遺伝子の制御は PBP 2' および β -ラクタマーゼ産生の抑制遺伝子である *mecI* および *blaI* によって行われているが¹¹⁻¹⁶⁾, β -ラクタム薬によってこの抑制が解除されるかこれらの遺伝子に変異が生じて PBP 2' が多量に産生されるようになると耐性化する^{11,13-15)}。高度耐性化にはさらにプラス α の変異が関与すると考えられる^{17,18)}。

我々は *mecI* および *blaI* を有し, 多くの β -ラクタム薬に

感受性を示す preMRSA¹⁹⁾, N 315 およびその変異株を用い, 各種 β -ラクタム抗生物質に対する高度耐性化の機構を検討した。

I. 材料および方法

1. 薬剤

Cefozopran (CZOP), cefpirome (CPR) および cefepime (CFPM) は武田薬品工業株式会社創薬研究所で合成された標品を, ampicillin (ABPC, 藤沢薬品工業株式会社), benzylpenicillin (PCG, 明治製菓株式会社), methicillin (DMPPC, 萬有製薬株式会社), imipenem/cilastatin (IPM/CS, 萬有製薬株式会社), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業株式会社) および cefoxitin (CFX, 第一製薬株式会社) は市販品を用いた。[¹⁴C] PCG はアマシャム株式会社より購入した。なお, 実験には IPM/CS を用いたが, 以後の記述での濃度は imipenem (IPM) の濃度を指し, 表記も単に IPM とした。

2. 菌株

S. aureus N 315 は MRSA の耐性発現を担う PBP 2' の構造遺伝子 *mecA* の上流に誘導因子蛋白 *MecR1* およびリプレッサー蛋白 *MecI* をそれぞれコードする *mecR1* および *mecI* を有している preMRSA である^{13,15,18)}。また, 本株は β -ラクタマーゼプラスミドを

有しており^{18, 19)}, プラスミド上には β -ラクタマーゼの構造遺伝子 *blaZ* の上流に誘導因子蛋白 BlaR1 およびリプレッサー蛋白 BlaI をそれぞれコードする *blaR1* および *blaI* が存在し¹⁰⁾, この *mecl* および *blaI* がともに PBP 2' と β -ラクタマーゼ両方の産生を抑制している¹⁹⁻²⁰⁾。DMPPC をはじめ多くの β -ラクタム薬に感受性を示す preMRSA である N 315^{13, 15, 18)}, その *mecl* 変異株 N 315-LR 5 および N 315-HR 3, また, これらの株より β -ラクタマーゼプラスミドを除去した N 315 P, N 315-LR 5 P および N 315-HR 3 P を用いた。N 315-LR 5 および N 315-HR 3 は N 315 の *mecl* 遺伝子にそれぞれ欠失および点変異をもつ株であるが, N 315-HR 3 は *mecl* 遺伝子以外にも変異を有すると考えられる。PBP 2' の検出には β -ラクタマーゼ非産生で PBP 2' を構成的に産生する N 315 P-ZR¹⁰⁾ を用いた。

3. 耐性菌の出現頻度

耐性菌の出現頻度を population 分析により調べた。菌株を Trypticase soy broth (TSB, BBL Microbiology Systems) で 37 °C, 一夜培養後同新鮮培地で適宜希釈して 2 倍希釈濃度系列の薬剤を含む Trypticase soy agar (TSA, BBL Microbiology Systems) プレート上に接種し, 37 °C で 40 時間培養後コロニー数を測定した。

4. MIC の測定

日本化学療法学会標準法²⁰⁾ に準じて測定した。各菌株を TSB で 37 °C, 一夜培養後同新鮮培地で約 10⁶ CFU/ml に希釈した。ただし, ABPC に対しては β -ラクタマーゼの影響を明確にするために約 10⁸ CFU/ml に希釈した菌液を用いた。この菌液の約 5 μ l を 2 倍希釈濃度系列の薬剤を含む TSA プレート上に接種し, 37 °C で 20 時間培養後肉眼判定により最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

5. 殺菌作用

37 °C, 一夜培養菌液を新鮮 TSB に約 10⁶ CFU/ml に

なるように接種し, 37 °C で 1 時間振盪培養後薬剤を添加した。経時的に培養液の一部を採取し適宜希釈して TSA を用いて混釈培養した。37 °C で 40 時間培養後コロニー数を測定し生菌数を求めた。

6. PBP の検出および結合親和性の測定

対数増殖期まで TSB 培地を用いて 30 °C で振盪培養した菌から常法に従って膜面分を調製し, [¹⁴C] PCG で 10 分間標識後, SDS-PAGE に続くフルオログラフィーで PBP を検出した¹⁰⁾。PBP に対する薬剤の結合親和性は, [¹⁴C] PCG との反応前に膜面分を薬剤と 30 °C で 10 分間反応させ, PBP への [¹⁴C] PCG の結合を 50 % 阻害する薬剤濃度 (IC₅₀) を測定して求めた。

II. 結 果

1. *S. aureus* N 315 P からの耐性菌出現頻度

多くの β -ラクタム薬に感受性を示す *S. aureus* N 315 P (Table 1) からの CZOP, IPM, CPR および CFPM 耐性菌の出現頻度を調べた (Fig. 1)。

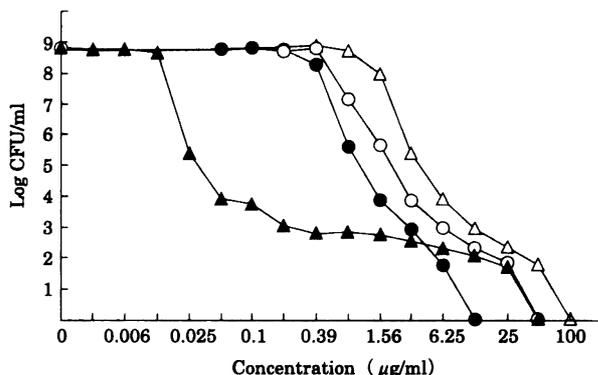


Fig. 1. Emergence of clones resistant to cefozopran (CZOP), imipenem (IPM), ceftiofime (CPR) and cefepime (CFPM) from preMRSA N 315 P. *Staphylococcus aureus* N 315 P was inoculated on agar plates containing serial two-fold dilutions of CZOP (●), IPM (▲), CPR (○), and CFPM (△). The MICs of CZOP, IPM, CPR, and CFPM for *S. aureus* N 315 P were 1.56, 0.025, 1.56 and 3.13 μ g/ml, respectively.

Table 1. Sensitivity of preMRSA N 315 and its derivatives to β -lactam antibiotics

Strain	MIC (μ g/ml) ^{a)}						
	ABPC	DMPPC	CZOP	CPR	CFPM	IPM	CZX
N 315	12.5	1.56	1.56	3.13	6.25	0.05	1.56
N 315 P	≤1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	0.025	1.56
N 315-LR 5	200	12.5	1.56	3.13	12.5	0.39	50
N 315-LR 5 P	6.25	12.5	0.78	3.13	12.5	0.39	1,600
N 315-HR 3	800	100	6.25	50	200	12.5	>1,600
N 315-HR 3 P	12.5	400	3.13	50	200	12.5	>1,600
N 315 P-ZR	12.5	400	3.13	50	200	12.5	>1,600

^{a)} MICs were determined by the agar dilution method using Trypticase soy agar.

Inoculum size was 10⁶ CFU/spot except for the assay of ABPC MIC which was determined at 10⁸ CFU/spot.

ABPC: ampicillin, DMPPC: methicillin, CZOP: cefozopran, CPR: ceftiofime, CFPM: cefepime, IPM: imipenem, CZX: ceftizoxime

S. aureus N 315 P は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) の CZOP 含有培地にはほぼ 100 % 生育し, 0.78, 1.56, 3.13 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地にはそれぞれ 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} および 10^{-7} の頻度でコロニーが出現したが, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (8 MIC) の CZOP 含有培地にはコロニーが出現しなかった。一方, IPM は 0.025 $\mu\text{g/ml}$ (1 MIC) 以上でコロニー形成を抑制したが完全阻止には 50 $\mu\text{g/ml}$ (2,048 MIC) を要した。また, CPR を 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (8 MIC) 含有する培地に 10^{-6} の頻度で, 25 $\mu\text{g/ml}$ (16 MIC) 含有培地に 10^{-7} の頻度でコロニーが出現した。CFPM では 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (4 MIC) 含有培地に 10^{-6} の頻度で, 25 および 50 $\mu\text{g/ml}$ (8 および 16 MIC) 含有培地に 10^{-7} の頻度でコロニーが出現した。

データは示していないが DMPPC, CZX および CFX についても調べたところ, 400 $\mu\text{g/ml}$ (256 MIC) の DMPPC, 200 $\mu\text{g/ml}$ (128 MIC) の CZX および 200 $\mu\text{g/ml}$ (64 MIC) の CFX 含有培地に 10^{-7} の頻度でコロニーが出現した。

2. *S. aureus* N 315 およびその変異株の薬剤感受性 *mecI* および *blaI* を保有する *S. aureus* N 315, N 315 よりプラスミドの脱落により *blaZ* とともに *blaI* を除去した N 315 P, *blaI* および *blaZ* は保有しているが *mecI* が変異した N 315-LR 5 および N 315-HR 3, *mecI*, *blaI* および *blaZ* が変異または欠失した N 315-LR 5 P および N 315-HR 3 P の β -ラクタム薬感受性を調べた (Table 1)。

S. aureus N 315 から *blaI* および *blaZ* が存在する β -ラクタマーゼプラスミドを除去しても (N 315 P), ABPC 以外の薬剤に対する感受性は変化しなかった。N 315 の *mecI* に変異がおこると (N 315-LR 5), DMPPC および IPM に 8 倍, CZX に 32 倍耐性化し, この株から β -ラクタマーゼプラスミドを除去すると (N 315-LR 5 P), CZX にさらに 32 倍耐性化した。しかし, *mecI* だけの変異では CZOP および CPR には耐性化せず, CFPM に対する耐性化もわずかであった。一方, *mecI* 以外にも変異を有すると考えられる N 315-HR 3 は親株より IPM および CZX に 200 倍以上, DMPPC, CPR および CFPM に 16~64 倍耐性であったが, CZOP に対しては比較的高い感受性を示した。

3. *S. aureus* N 315 P および N 315-HR 3 P に対する CZOP および IPM の殺菌作用

S. aureus N 315 P および N 315-HR 3 P の発育に対する CZOP および IPM の影響を調べた (Fig. 2)。

S. aureus N 315 P に対して 1 $\mu\text{g/ml}$ の CZOP は生育抑制作用を, 10 $\mu\text{g/ml}$ で強い殺菌作用を示した。本菌は 1 および 10 $\mu\text{g/ml}$ の IPM で強く殺菌されたが 24 時間後に 10^6 CFU/ml 以上に再増殖した。一方, *S. aureus* N 315-HR 3 P の発育に対して 1 および 10

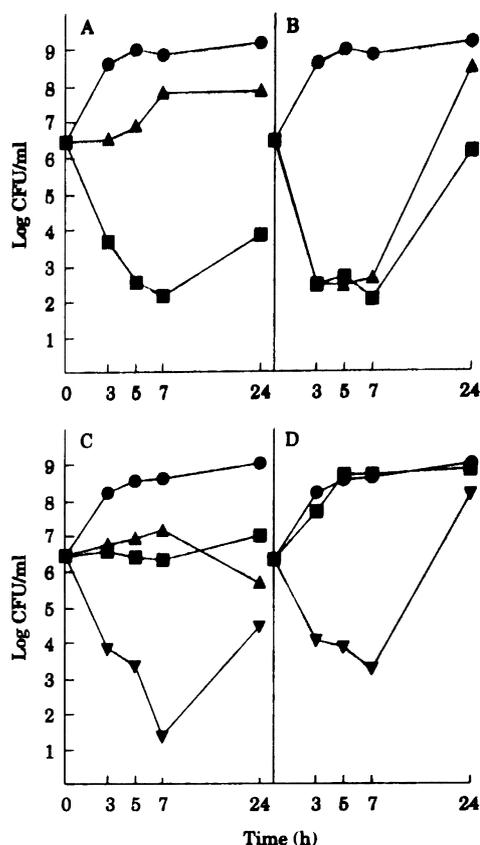


Fig. 2. Effect of cefozopran and imipenem on the growth of *Staphylococcus aureus* N 315 P and N 315-HR 3 P. *S. aureus* N 315 P (A and B) and N 315-HR 3 P (C and D) were grown in the presence of cefozopran (A and C) or imipenem (B and D) in TSB at 37°C. The antibiotic was added at 0 h. ●, control; ▲, 1 $\mu\text{g/ml}$; ■, 10 $\mu\text{g/ml}$; ▼, 100 $\mu\text{g/ml}$.

$\mu\text{g/ml}$ の CZOP は 24 時間後まで静菌的に作用し, 100 $\mu\text{g/ml}$ では強い殺菌作用を示した。IPM は本菌に 100 $\mu\text{g/ml}$ で一時的に殺菌作用を示したが, 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度ではまったく影響をおよぼさなかった。

4. *S. aureus* N 315 P および N 315 P-ZR の PBP に対する β -ラクタム薬の親和性

S. aureus N 315 P の膜画分を用いて PBP 1, 2, 3 および 4 に対する CZOP, CPR, CFPM, IPM および CZX の親和性を, β -ラクタマーゼを欠失し PBP 2' を構成的に産生する *S. aureus* N 315 P-ZR の膜画分を用いて PBP 2' に対する親和性を調べた (Table 2)。

CZOP および CPR は PBP 1 にもっとも高く, 続いて PBP 2, 3 の順に高い親和性を示し, PBP 2' に対しては CFPM および IPM より 6~7 倍, CZX より 70 倍以上高い親和性を示した。CFPM は CZOP および CPR に類似した PBP 親和性のパターンを示したが, CZX は PBP 2' 以外にも特異性の高い親和性を示し, IPM は PBP 2' 以外の PBP に CZOP および CPR より高い親和性を示した。なお, PBP 4 に対しては CZOP は CPR および CFPM より 10 倍以上高い親和性を示した。

Table 2. Binding affinity of β -lactam antibiotics for PBPs of *Staphylococcus aureus*

Antibiotic	IC ₅₀ (μ g/ml) for PBP ^a ;				
	1	2'	2	3	4
Cefozopran	0.0419	43.1	0.102	0.820	4.24
Cefpirome	0.0363	34.0	0.215	1.31	60.4
Cefepime	0.108	241	0.178	13.7	>68
Imipenem	<0.03	246	0.0786	<0.03	<0.01
Ceftizoxime	7.85	>3,000	0.908	8.31	>100

^a Concentration required to inhibit [¹⁴C] benzylpenicillin binding by 50%.

The membrane fractions used were from N 315 P for the assay of PBPs 1, 2, 3 and 4 and from N 315 P-ZR for the assay of PBP 2'.

III. 考 察

S. aureus N315 は MRSA の耐性発現に必要な PBP 2' の構造遺伝子 *mecA* を有しているにもかかわらず多くの β -ラクタム抗生物質に比較的高い感受性を示す¹⁰⁾。本株の耐性発現は PBP 2' のリプレッサー蛋白 *MecI* と β -ラクタマーゼのリプレッサー蛋白 *BlaI* によって抑制されていると考えられ、CFX 等のインデューサーであらかじめ菌を処理すると抑制が解除されて DMPPC に耐性化する¹⁰⁾。DMPPC, IPM および CZX の MIC が *mecI* の変異のみで上昇したことから、これらの薬剤に対する耐性発現の少なくとも一部は *mecI* で抑制されていることが明らかであり、*mecI* の変異に加えて *blaI* の除去により MIC が 50 μ g/ml から 1,600 μ g/ml に上昇した CZX の場合は、*blaI* によっても耐性発現が抑制されていると考えられる。また、 β -ラクタマーゼおよびそのリプレッサーを除去した N 315 P が β -ラクタマーゼに不安定な ABPC 以外の薬剤に N 315 と同じ感受性を示したことから、*BlaI* より *MecI* の方が強く PBP 2' の発現を抑制していると考えられる。

一方、*mecI* の変異のみでは上昇しないかわずかの上昇に留まった CPR および CFPM の MIC は *mecI* 以外の変異が加わることによって大幅に上昇したが (N 315-HR 3 P), PBP 4 に CPR より高く PBP 2' および PBP 4 に CFPM より高い親和性を示す CZOP の MIC の上昇はこの変異によってもわずかであった。PBP 2' を阻害する濃度以下で CZOP が N 315-HR 3 P の生育を抑制したことを考え合わせると、CZOP は PBP 2' および CPR, CFPM 耐性に必要な因子のほかにも作用標的を有している可能性が高く、このために CZOP に対する高度耐性菌が出現しなかったものと考えられる。

文 献

- Georgopapadakou N H, Smith S A, Bonner D P: Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 172~175, 1982
- Hartman B J, Tomasz A: Low-affinity penicillin-

binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513~516, 1984

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T: Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 600~604, 1990
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T: Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 298: 133~136, 1992
- 厚生省業務局安全課: 抗生物質感受性状況調査報告 1995 [上]. 業業時報社, 1995
- 平松啓一: MRSA の分子遺伝学. *日本臨床* 50: 938~944, 1992
- Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson J F, Hiramatsu K: Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1219~1226, 1993
- 平松啓一: MRSA の起源と耐性機構. *集中治療* 5: 1~11, 1992
- 生方公子: MRSA における *mecA* 遺伝子の特徴. *医学のあゆみ* 166: 249~252, 1993
- 平松啓一: *mec* 調節遺伝子とメチシリン耐性の制御. *医学のあゆみ* 166: 253~257, 1993
- Hackbarth C J, Chambers H F: *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1144~1149, 1993
- Murakami K, Tomasz A: Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*

- 171: 874~879, 1989
- 18) Hiramatsu K: Molecular evolution of MRSA. *Microbiol Immunol* 39: 531~543, 1995
- 19) Okonogi K, Noji Y, Kondo M, Imada A, Yokota T: Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 24: 637~645, 1989
- 20) MIC 測定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981

Emergence of highly resistant clones from preMRSA

Yumiko Noji¹⁾, Kenji Okonogi¹⁾ and Keiichi Hiramatsu²⁾

¹⁾ Pharmaceutical Research Laboratories III, Takeda Chemical Industries, Ltd., 2-17-85, Jusohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

²⁾ Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

Staphylococcus aureus N 315 is a preMRSA which is relatively sensitive to many β -lactam antibiotics owing to its possession of the *mec* regulator genes *mecR1* and *mecI*, which encode a signal transducer and repressor, respectively, upstream from *mecA*, which encodes penicillin-binding protein (PBP) 2'. This strain harbors a β -lactamase plasmid which contains *blaI* and *blaZ*, repressor and structural genes, respectively, of β -lactamase. *S. aureus* N 315-LR 5 P, a derivative of N 315, has a mutation in *mecI* and lacks *blaI* and *blaZ*. It was found to be resistant to methicillin (DMPPC), imipenem (IPM) and ceftizoxime (CZX). *S. aureus* N 315-HR 3 P, which has an additional unknown mutation, was resistant to ceftiofime (CPR) and cefepime (CFPM) as well as DMPPC, IPM and CZX. Both mutants, however, showed almost the same sensitivity to ceftazopran (CZOP) as N 315. CZOP inhibited [¹⁴C] benzylpenicillin binding to PBP 2' of *S. aureus* N 315 P-ZR, which lacks β -lactamase and produces PBP 2' constitutively; the IC₅₀ value was 43 μ g/ml. The affinity of CZOP for PBP 2' was equal to that of CPR, 6 times higher than that of CFPM and IPM, and more than 70 times higher than that of CZX. CZOP had a bacteriostatic effect on *S. aureus* N 315-HR 3 P at 1 and 10 μ g/ml, concentrations lower than the IC₅₀ for PBP 2', and was bactericidal at more than the IC₅₀. These findings suggest that preMRSA becomes resistant to β -lactam antibiotics with low affinity for PBP 2' by the *mecI* mutation converting the organism to a constitutive producer of PBP 2', and that additional mutations are necessary to become resistant to antibiotics with higher affinity for PBP 2'.