

{ Jpn. J. Hosp. Pharm. }  
 資 料  
 { 19(1) 92 - 98 (1993) }

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（臨床分離株）の生物学的性状および  
 消毒剤・抗菌剤に対する感受性の検討

吉岡史郎†<sup>1</sup>, 澤 赫代†<sup>2</sup>, 高木 肇†<sup>3</sup>, 久野由恵†<sup>3</sup>, 森 俊二†<sup>3</sup>, 片桐義博†<sup>1</sup>  
 岐阜大学医学部附属病院薬剤部†<sup>1</sup>, 同中央検査部†<sup>2</sup>, 同皮膚科†<sup>3</sup>

**Biological Properties of Clinically Isolated Methicillin-Resistant  
*Staphylococcus aureus* and Its Susceptibility to Disinfectants  
 and Antibiotics**

SHIRO YOSHIOKA†<sup>1</sup>, KAKUYO SAWA†<sup>2</sup>, HAJIME TAKAGI†<sup>3</sup>,  
 YOSHIE KUNO†<sup>3</sup>, SHUNJI MORI†<sup>3</sup> and YOSHIHIRO KATAGIRI†<sup>1</sup>

Department of Pharmacy†<sup>1</sup>, Department of Clinical Laboratory†<sup>2</sup> and Department of  
 Dermatology†<sup>3</sup>, Gifu University Hospital, Gifu University School of Medicine

(Received July 14, 1992  
 Accepted September 28, 1992)

A strain of *Staphylococcus aureus* was isolated from clinical material of an inpatient. The biological properties of the clinical isolate of *S. aureus* and its susceptibility to disinfectants and antibiotics were investigated. The clinical isolate of *S. aureus* was  $\beta$ -lactamase-positive and coagulase type-II strain, and the strain was found to produce penicillin-binding protein-2' and *mecA* gene, which are associated with bacterial resistance. Therefore, the clinical isolate was identified as the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Povidone-iodine was most rapidly bactericidal *in vitro* against the clinical isolate of *S. aureus* which was less susceptible to the other disinfectants. The clinical isolate of *S. aureus* was susceptible to OFLX and VCM. However, this strain was resistant to most of the antibiotics such as CMD, FOM or FMOX. *In vitro* antibacterial activity of the combinations of various antibiotics was evaluated by checkerboard dilution method. The fractional inhibitory concentration indices of FMOX+CMD, FMOX+FOM, FMOX+IPM, FOM+CMZ and FOM+MINO were 0.51, 0.75, 0.63, 0.95 and 1.25, respectively. The effect of combination of FMOX+CMD was superior to that of the other combinations against the clinical isolate of *S. aureus*. This finding suggests that combination therapy of FMOX and CMD may be useful for MRSA infections at the clinical dose.

**Keywords**—MRSA; penicillin-binding protein; disinfectants; antibiotics; susceptibility; combination therapy

緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-  
 †<sup>1-3</sup> 岐阜市司町40番地; 40, Tsukasa-machi, Gifu,  
 500 Japan

resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) はメチシリンだけでなく $\beta$ -ラクタム系抗生物質をはじめとする多くの薬剤に耐性を示し、臨床上大きな問題となってきた。MRSAの中にはグルコン酸クロルヘキシジンなどの日常使用している消

毒剤にもかなり強い抵抗性をもっている菌株があり、繁用されている消毒剤では容易に殺菌されないことも多い。また、MRSAは全身状態の悪い患者に感染を起こしやすく、これに対して有効な、あるいは決め手となる抗菌剤が少ないのが現実である。

著者らは、すでに本院におけるMRSAの分離状況と抗生物質の使用状況を調査し、その関連性について報告した<sup>1)</sup>。今回、MRSA感染症と診断された患者の臨床材料から分離した黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) について、その生物学的性状、消毒剤の殺菌効果、薬剤感受性および薬剤の併用効果を検討したので報告する。

## 方 法

### 1. 供試検体

扁平上皮癌と診断された患者の、右腋窩に再発した腫瘍の潰瘍化し二次感染をともなった皮膚感染病巣から膿を採取した。採取した膿をトリプトソイ寒天培地 (BBL) により 37°C で24時間の純培養を行った。形成されたコロニーを生理食塩液に浮遊させて菌液を調製した。なお、標準株として *S. aureus* ATCC 25923 を用いた。

### 2. 生物学的性状

トリプトソイ寒天培地上のコロニーについてニトロセフィンディスク (セフィナーゼ, BBL) を用いて  $\beta$ -lactamase の産生を確認した。

被検菌をハートインフュージョン培地 (栄研) で 37°C 3日間培養した後、3,000 rpm で30分間遠心した。得られた上清について、コアグラゼ型別用免疫血清 (生研) を用いてコアグラゼ型を判定した。

対数増殖期の菌細胞を集め、超音波処理により菌体を破碎した。3,000×gで20分間冷却遠心した上清をさらに100,000×gで30分間超遠心して膜画分を集め、蛋白質濃度が 10mg/ml になるように膜画分浮遊液を調製した。膜画分浮遊液 30  $\mu$ l に非放射性ペニシリン G (PCG) を終末濃度が 5  $\mu$ g/ml になるように加え、30°C で10分間反応させた後、放射性ペニシリン G (<sup>14</sup>C-PCG, 373  $\mu$ g/50 Ci/ml; Amersham) 溶液を 30  $\mu$ l 加えて、さら

に 30°C で10分間反応させた。Sarkosyl および PCG を加え反応を止めた後、100,000×g で30分間遠心して不溶性画分を除いた。上清全量に bromophenol blue-glycerol 加 SDS buffer (pH 6.8) 15  $\mu$ l および  $\beta$ -mercaptoethanol 5  $\mu$ l を加え 100°C で2分間加熱した後、全量を 8% acrylamide および 0.06% bis-acrylamide の平板ゲルにより電気泳動した。メタノールと酢酸により蛋白を固定し、2,5-diphenyloxazole による増感処理を行った後、減圧下で乾燥し蛍光オートラジオグラフィによりペニシリン結合蛋白質 (Penicillin-Binding Protein; PBP) を検出した。

被検菌のコロニーから DNA を抽出した後、PBP-2' 産生遺伝子 (*mecA* 遺伝子) に対応した合成プライマーを用いたアガロースゲル電気泳動 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 法<sup>2)</sup> によって *mecA* 遺伝子を検出した。

### 3. 消毒剤の殺菌効果

消毒剤として、グルコン酸クロルヘキシジン (ヒビテン・グルコネート; ICI ファーマ)、塩化ベンザルコニウム (オスパン; 武田)、クレゾール石鹼液 (吉田) およびポビドンヨード (イソジン; 明治製菓) を滅菌蒸留水にて 0.1w/v% に希釈したものを用いた。中和剤としてグルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウムおよびクレゾール石鹼液に対してはルプロール、レシチン、ポリソルベート80をそれぞれ 5, 2.5, 5w/v% 含む溶液を用い、またポビドンヨードに対しては 1w/v% チオ硫酸ナトリウム溶液を用いた。

各消毒剤 0.5ml に 4×10<sup>7</sup>個/ml に調製した菌浮遊液 0.5ml を加え 37°C において、15秒、30秒、1分および2分間それぞれ接触させた後、その 0.1ml に各中和剤 0.9ml を作用させた。中和した菌液 0.1ml をトリプトソイ寒天培地に塗布し、37°C において 48時間培養した。コロニーの生育が認められない最短接触時間を殺菌時間とした。

### 4. 薬剤感受性試験および *in vitro* における併用効果

臨床分離株および標準株について日本化学療法

学会標準法<sup>2)</sup>に準じて、ミューラーヒントン培地 (Difco) を用いた微量液体希釈法によって、各種抗菌剤に対する最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を測定した。抗菌剤として、ampicillin (ABPC), cefamandole (CMD), ceftizoxime (CZX), cefuzonam (CZON), cefmetazole (CMZ), flomoxef (FMOX), imipenem (IPM), gentamicin (GM), tobramycin (TOB), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), minocycline (MINO), vancomycin (VCM), fosfomycin (FOM), ofloxacin (OFLX) の15種類を用いた。さらに、FMOX と CMD, FMOX と FOM, FMOX と IPM, FOM と CMZ および FOM と MINO の組合せについて、各薬剤の単独時および併用時の MIC 値より Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index をチェッカーボード法<sup>3)</sup>によって求めた。なお、FIC index  $\leq 0.5$  の場合を相乗効果、 $0.5 < \text{FIC index} \leq 1$  の場合を相加効果、 $1 < \text{FIC index} \leq 2$  の場合を弱い相加効果、FIC index  $> 2$  の場合を拮抗効果と判定した。

## 結 果

臨床分離株は、MRSAスクリーン寒天培地 (オキサシリン 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有, BBL) を用い、McFarland 0.5 の被検菌を接種し 35°C 24時間培養した結果、培地上に菌の発育が認められた。さらにメチシリン1濃度ディスク (30  $\mu\text{g}/\text{disc}$ , 昭和) に耐性を示したことから MRSA と判定した。

生物学的性状を調べた結果、本菌は  $\beta$ -lactamase 産生株であり、コアグラマーゼ型別では II 型であった。<sup>14</sup>C-PCG を用いたポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動によって PBP の検索を行った結果を Fig. 1 に示した。膜画分の蛋白質濃度が10および 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のいずれの場合も、標準株では *S. aureus* において通常検出される PBP-1, 2, 3 および 4 の4種類の PBP が検出された。これに対し臨床分離株では PBP-2 のごくわずかに上の位置、すなわち PBP-2 よりもやや分子量の大きい位置に PBP-2' が検出された。また、Fig. 2 に示すようにアガロースゲル電気泳

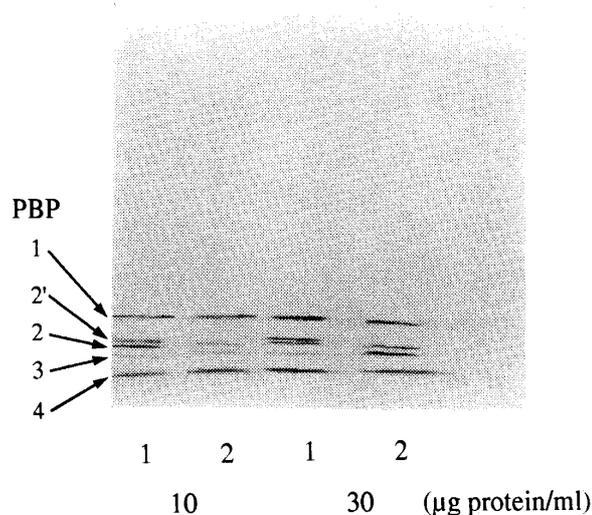


Fig. 1. Penicillin-binding Proteins of Clinical Isolate and Standard Strain of *Staphylococcus aureus*  
1: Clinical isolate  
2: *S. aureus* ATCC25923

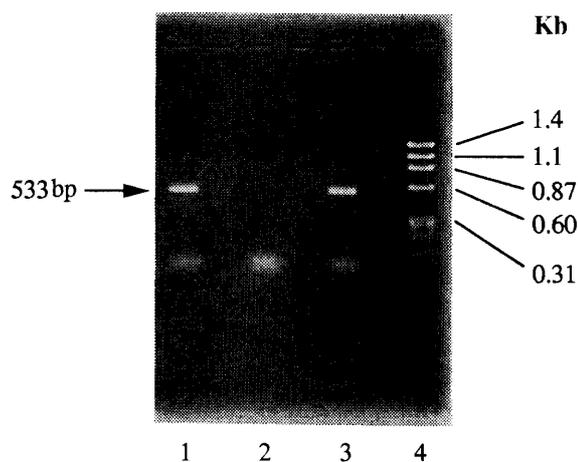


Fig. 2. Detection of *mecA* Gene by Polymerase Chain Reaction Method  
1: Positive control  
2: *S. aureus* ATCC25923  
3: Clinical isolate  
4: Marker

動法によって 533bp に *mecA* 遺伝子が検出された。

Table 1 に標準株と臨床分離株に対する各種消毒剤の殺菌時間を示した。標準株に対してはグルコン酸クロルヘキシジンでは2分、塩化ベンザルコニウムでは30秒、またポビドンヨードでは15秒の殺菌時間を要した。臨床分離株に対してはグル

Table 1. Susceptibility of Various Disinfectants against Standard Strain and Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus*

| Strain                        | Disinfectant                       | Contact time (sec.) |    |    |    |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------|----|----|----|
|                               |                                    | 120                 | 60 | 30 | 15 |
| <i>S. aureus</i><br>ATCC25923 | 0.1 W/V% Chlorhexidine gluconate   | -                   | +  | +  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Benzalkonium chloride     | -                   | -  | -  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Saponated cresol solution | +                   | +  | +  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Povidone iodine           | -                   | -  | -  | -  |
| Clinical<br>isolate           | 0.1 W/V% Chlorhexidine gluconate   | -                   | +  | +  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Benzalkonium chloride     | -                   | +  | +  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Saponated cresol solution | +                   | +  | +  | +  |
|                               | 0.1 W/V% Povidone iodine           | -                   | -  | -  | +  |

+: grown

-: not grown

Table 2. MICs of Various Antibiotics against Standard Strain and Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus*

| Antibiotics | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )   |                  |
|-------------|----------------------------|------------------|
|             | <i>S. aureus</i> ATCC25923 | Clinical isolate |
| ABPC        | 1.56                       | 100              |
| CMD         | 1.56                       | 25               |
| CZX         | 6.25                       | 100              |
| CZON        | 0.78                       | 50               |
| CMZ         | 6.25                       | 50               |
| FMOX        | 0.78                       | 100              |
| IPM         | 0.10                       | 50               |
| GM          | 0.10                       | 25               |
| TOB         | 0.20                       | 100              |
| EM          | 0.20                       | 100              |
| CLDM        | 0.10                       | 100              |
| MINO        | 0.10                       | 12.5             |
| VCM         | 0.39                       | 1.56             |
| FOM         | 12.50                      | >400             |
| OFLX        | 0.39                       | 1.56             |

コン酸クロルヘキシジンでは標準株と同様に2分、塩化ベンザルコニウムでは2分、またポビドンヨードでは30秒の殺菌時間を要した。クレゾール石鹼液は標準株および臨床分離株のいずれに対しても2分の接触時間では殺菌できなかった。

標準株および臨床分離株に対する各抗菌剤のMICをTable 2に示した。標準株ではすべての抗菌剤に対して感受性を示した。臨床分離株に最

も優れた抗菌力を示したのはOFLXおよびVCMであった。また、MINOに対しては軽度耐性を示した。しかし、CMD、CMZ、CZON、IPMおよびGMには中等度耐性 ( $50\mu\text{g/ml}$  MIC  $25\mu\text{g/ml}$ )、ABPC、CZX、FMOX、TOB、EM、CLDMおよびFOMには高度耐性 (MIC  $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ) であった。

臨床分離株に対するFMOXとCMDの併用

|             |      |      |      |      |      |      |      |    |    |     |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|----|----|-----|
| CMD         | 200  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -  | -  | -   |
|             | 100  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -  | -  | -   |
|             | 50   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -  | -  | -   |
|             | 25   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -  | -  | -   |
|             | 12.5 | +    | +    | +    | ⊖    | -    | -    | -  | -  | -   |
|             | 6.25 | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | +  | -   |
|             | 3.13 | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | +  | -   |
|             | 1.56 | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | +  | -   |
|             | 0.78 | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | +  | -   |
|             | 0    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +  | +  | -   |
| MIC (μg/ml) | 0    | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 |
|             | FMOX |      |      |      |      |      |      |    |    |     |

Fig. 3. Combination Effect of FMOX and CMD against Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus*

Table 3. *In vitro* Combination Effects of Various Antibiotics against Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus*

| Combination | FIC index |
|-------------|-----------|
| FMOX + CMD  | 0.51      |
| FMOX + FOM  | 0.75      |
| FMOX + IPM  | 0.63      |
| FOM + CMZ   | 0.95      |
| FOM + MINO  | 1.25      |

効果を Fig. 3 のチェッカーボードに示した. この MRSA に対して CMD 単独の MIC は 25μg/ml, FMOX 単独の MIC は 100μg/ml であり, 感受性は認められなかった. しかし, Fig. 3 に示すように, FMOX と CMD の併用により MIC はそれぞれ 1.56μg/ml および 12.5μg/ml となり, 菌の発育を阻止し得た. この点での FIC index は 0.51 であり, 相加効果が認められた. また, 他の抗菌剤の組合せによる FIC index を Table 3 に示した. FMOX と FOM, FMOX と IPM, FOM と CMZ および FOM と MINO 併用時の FIC index はそれぞれ, 0.75, 0.63, 0.95 および 1.25 であり, 相加効果あるいは弱い相加効果が認められた.

考 察

最近, 医療機関内における MRSA の検出頻度が増加する傾向にあり<sup>1)</sup>, これによる感染症が発症すると有効な抗菌剤がきわめて少ないために,

治療が困難な場合が多く臨床上の大きな問題となっている. MRSA は多剤耐性であり, その感染の予防あるいは治療には適切な消毒剤あるいは抗菌剤の適切な選択が必要である. 今回, 著者らは, 本院の入院患者から分離した *S. aureus* について, MRSA であるか否かを確認するためその生物学的性状を, さらに消毒剤の効果および各種抗菌剤の感受性を検討した.

臨床分離株は, 本院の MRSA 判定法であるスクリーン寒天培地およびディスク法によって MRSA と判定された. MRSA のうち多くの菌株は β-lactamase の産生株が多いことが知られており<sup>5)</sup>, また, コアグララーゼ型別では II 型が最も多いことも知られている<sup>6)</sup>. 今回の臨床分離株も β-lactamase 産生株であり, コアグララーゼ II 型であった. コアグララーゼ II 型の MRSA は主に入院患者から分離され, その頻度は増加傾向にある<sup>7)</sup>.

また, この菌株からは MRSA に特有の PBP-2' が検出され, さらに PBP-2' 産生遺伝子である *mecA* 遺伝子が検出されたことにより, MRSA であることが確認された. MRSA は PBP-2' の産生性あるいは *mecA* 遺伝子の存在をもって決定することが望ましいが, 臨床における日常検査では現在のところは不可能である. このためオキサシリンなどの適当な抗菌剤に対する感受性から予測するのが一般的である. しかし, MIC 値によって感受性菌と判定された菌株のなかにも MRSA である場合もあり, MRSA の判定を正確に行う

ことが必要である。 *mecA* 遺伝子の有無による MRSA の判定は、従来の薬剤感受性にに基づく方法に比べてより正確性が高いことが知られており、最近では分子生物学的に DNA を増幅する方法<sup>3)</sup>により直接検体から *mecA* 遺伝子を捕らえることができるようになった。今後、MRSA の判定をする場合にはこの方法を取り入れることも必要であると考えられる。

一般に *S. aureus* は汎用されている消毒剤を短時間作用させることにより殺菌することができるが、グルコン酸クロルヘキシジンあるいは塩化ベンザルコニウムなどの消毒剤では殺菌できない菌株が存在することが知られている<sup>8)</sup>。今回検討した濃度において、グルコン酸クロルヘキシジンは標準株あるいは臨床分離株のいずれに対しても2分の殺菌時間を必要とし *S. aureus* には有効であるとはいえなかった。塩化ベンザルコニウムは標準株に対しては30秒で殺菌できたが、臨床分離した MRSA に対してはグルコン酸クロルヘキシジンの場合と同様に2分の殺菌時間を必要とした。*S. aureus* に対して 70v/v% 以上のエタノールは十分な殺菌力を有していることが知られている<sup>9)</sup>。また、グルコン酸クロルヘキシジンあるいは塩化ベンザルコニウムなどの消毒剤に抵抗性を示す MRSA に対しても、エタノールを添加することによりこれらの消毒剤は十分な殺菌力を示す<sup>10,11)</sup>。したがって、これらの消毒剤を用いる場合はエタノール溶液として用いる必要があると考えられる。今回の検討でポビドンヨードは、標準株及び臨床分離株のいずれの菌株に対しても30秒で殺菌でき、人体に使用できるものとして最も有効であると考えられる。今回の試験濃度においては各消毒剤の殺菌時間は、塩化ベンザルコニウムの場合が標準株において若干短いこと以外はほぼ同様の傾向を示し、標準株と臨床分離した MRSA との間で殺菌時間に大きな差は認められなかった。すなわち *S. aureus* はメチシリンに対する抵抗性とは関係なく消毒剤に対して抵抗性を示すものがあると考えられる。

各種抗菌剤に対する *in vitro* 感受性試験において、MRSA に最も優れた抗菌力を示したのは

OFLX および VCM のみであった。FMOX は抗ブドウ球菌作用が強いばかりでなく、他のβ-ラクタム剤とは異なり MRSA 特有の PBP-2' の誘導能が低いため MRSA に対して有効とされている<sup>12)</sup>。しかし、本臨床分離株に対するその MIC は 100μg/ml であり、感受性を示さなかった。また、FOM に対しても高度耐性 (MIC > 400μg/ml) であった。このように本臨床分離株は、これまでの多くの報告と同様に多くの抗菌剤に対しては多剤耐性であった。

MRSA 感染症では多剤耐性を示す場合が多くあり、抗菌剤の単剤による治療には限界があるため抗菌剤の併用が行われており、PBP-2' の産生を抑制する FOM と CEZ あるいは CMZ などのβ-ラクタム剤との併用療法が有効とされている<sup>13-15)</sup>。しかし、FOM に対する耐性度が MIC 200μg/ml 以下であれば、CMZ などとの併用効果が認められるが、FOM に対して高度耐性株では他剤との併用効果が認められない場合が多い。今回の臨床材料から分離した MRSA は FOM に対して高度耐性 (MIC > 400μg/ml) であったことから、FOM と他剤との併用療法の有用性は少ないものと考えられる。一方、MRSA に対して FMOX と CMD との併用は相乗効果を示し、FOM と他剤との併用より強い相乗効果を示すと報告されている<sup>16)</sup>。今回検討した組合せのうち、FMOX と CMD の組合せの FIC index が最も小さい値を示し、相加効果が認められ、それぞれの耐性度の強さに関係なく臨床上において十分有効な薬剤濃度、すなわち十分に治療可能な範囲に入ることが考えられる。

臨床材料から分離した MRSA に対して消毒剤の種類によっては効果が不十分であり、また多くの抗菌剤には耐性を示した。したがって、治療の決め手に乏しい耐性菌であるだけに、消毒剤あるいは抗菌剤の選択など、よりの確な臨床的対応が必要であると考えられる。

謝辞 PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出にご協力いただいた塩野義製薬株式会社バイオメディカル大阪ラボラトリー、南出和喜夫氏に深謝する。

## 引用文献

- 1) 吉岡史郎, 杉山 正, 澤 赫代, 水上勇三, 沢村治樹, 野間昭夫, 上野一恵, 化学療法の領域, **7**, 965-970 (1991).
- 2) 南出和喜夫, 和田浩司, 中村悦男, 村上和久, 寺岡 宏, 渡辺幸彦, 日環感, **6**, 105-106 (1991).
- 3) 抗菌薬感受性測定法検討委員会, *Chemotherapy*, **38**, 102-105 (1990).
- 4) C.W. Norden, H. Wentzel, E. Keleti, *J. Inf. Disease*, **140**, 629-633 (1979).
- 5) 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 今野 淳, 井田土郎, 西岡きよ, *Chemotherapy*, **35**, 699-708 (1987).
- 6) 小栗豊子, 佐藤米子, 臨床と微生物, **15**, 139-145 (1988).
- 7) 菅野治重, 臨泌, **44**, 659-667 (1990).
- 8) 小林寛伊, 都築正和, 細瀬和成, 手術部医学, **8**, 477-480 (1987).
- 9) 藤本 進, 月刊薬事, **20**, 1195-1203 (1978).
- 10) 早崎孝則, 森 健, 富田明夫, 浅沼春樹, 吉増幹生, 医学と薬学, **27**, 213-221 (1992).
- 11) 赤松 孝, 田端耕一, 広永道隆, 医薬ジャーナル, **27**, 1655-1662 (1991).
- 12) 村上和久, 野村和秀, 土肥正善, 吉田 正, *Chemotherapy*, **35** (S-1), 108-114 (1987).
- 13) 高橋公毅, 菅野治重, 陳 瑞明, *Chemotherapy*, **35**, 180-183 (1987).
- 14) 相原雅典, *Prog. Med.*, **6**, 3049-3055 (1986).
- 15) 菅野治重, 臨床と微生物, **15**, 168-173 (1988).
- 16) 小林義直, 園部直美, 土肥正善, 村上和久, 吉田正, *Chemotherapy*, **39**, 968-975 (1991).