

産婦人科領域において得られた黄色ブドウ球菌の薬剤耐性について

東京大学医学部産婦人科学教室

野 末 順

Drug Resistance of Staphylococcus Aureus in the Field
of Obstetrics and Gynecology

Jun NOZUE

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo University School of Medicine, Tokyo

(Director : Prof. Masahiko Mizuno)

概要 産婦人科領域において得られた病巣由来の材料の細菌学的検査が大学付属病院中央検査室で行われた。その結果を他病院の総合的結果と比較検討すると、グラム陽性球菌の分離頻度の高いことが判明した。その中で、とくに、Staphylococcus aureus を選び薬剤耐性を調査した。 β -Lactam 剤耐性株の多いことが注目されたが、メチシリン耐性株 (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus : MRSA) も多く認められ、今後の診療および疫学上、注目すべき課題と思われた。MRSA の耐性機構はペニシリン分解酵素の産生によるものではなく、新しいペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein : PBP) の産生によることが結論された。MRSA 出現の理由について検討し、その対策を述べた。

Synopsis Clinical isolates of bacteria from Department of Obstetrics and Gynecology were collected and their microbiological properties were investigated. The isolation frequencies of bacteria from this Department were almost similar to those from other hospitals, indicating the high isolation frequencies of gram-positive cocci. The drug resistance to various chemotherapeutic agents of Staphylococcus aureus including beta-lactam antibiotics was studied. It should be noted that the bacteria resistant to beta-lactam antibiotics were most often isolated and the resistance was due to the production of penicillinase. Methicillin-resistant strains of S. aureus were isolated from this Department at a high frequency. It was found that these strains are also resistant to many penicillins and cepheims including methicillin. Methicillin resistance of these strains was found to be not due to the production of penicillinase. Examination of the penicillin-binding proteins (PBPs) revealed that a new PBP-2' was produced in a large amount, suggesting that the mechanism of methicillin-resistance was due to the production of the new PBP-2' as reported previously⁸⁾⁹⁾, not to the production of beta-lactamase. The increased isolation of methicillin-resistant strains may be due to the introduction and the overuse of beta-lactamase resistant antibiotics.

Key words : Staphylococcus aureus • Penicillin-binding protein • Drug resistance

緒 言

化学療法剤の術後又は予防的投与等によつて医療面での化学療法剤は画期的進歩を遂げた。しかし、その反面、感染症において主役を演じた菌種の変動や薬剤耐性菌の出現で、化学療法時代の一つの大きな変化が現れてきた。そのため、病巣材料の臨床細菌学的検査、薬剤耐性菌の検査、病棟内における細菌の疫学的調査等が、今後必須の研究テーマとなつてきた。また、院内感染の問題も極めて重大となりつつある。本報では、東大病院産婦人科での臨床検査成績をこれまで得られた疫学的データとして比較し、その中で S. aureus を

代表的菌種として選びその解析を行つた。

実験方法

1. 材料

東大病院産婦人科において得られた検査材料 (膿、創部浸出液、組織片、尿等) より分離された細菌 (昭和57年~昭和62年) を集菌し実験材料に用いた。他病院の細菌又は他病院の中央検査室のデータは各病院の好意によつて提供を受けた。なお、他病院の一部のデータは薬剤感受性情報より編者の許可を得て利用した。

2. 薬剤

PCG (penicillin G), ABPC (ampicillin),

DMPPC (methicillin), MIPIC (oxacillin), MCIPC (cloxacillin), MDIPC (dicloxacillin), PIPC (piperacillin), CET (cephalothin), CER (cephaloridine), CEZ (cefazolin), CPZ (cefoperazone), CTM (cefotiam), CTX (cefotaxime), CZX (ceftizoxime), CMX (cefmenoxime), CAZ (ceftazidime), CFX (cefoxitin), CMZ (cefmetazole), CEG (cephaloglycin), CEX (cephalexin), CCL (cefaclor), LMOX (latamoxef), CMD (cefamandole), IPM (imipenem).

β -Lactam 剤以外の化学療法剤としては, GM (gentamicin), TC (tetracycline), MINO (minocycline), NFLX (norfloxacin), OFLX (ofloxacin) を使用した.

3. 標準菌株

標準菌株は群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設で保存のものをを用いた.

4. 最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC)

MIC は日本化学療法学会感受性測定法¹⁾に従った. すなわち, 被検菌を感受性測定ブイヨン (日水製薬) で30℃, 18時間培養した. 30℃で培養する目的は菌数を一定化 (約 10^8 cells/ml) するためである. この菌液を 10^6 cells/ml になるようにBSG (buffered saline with gelatin) で希釈し, その約5 μ l をマイクロプランター (佐久間製作所, 東京) を用いて2倍段階に希釈した薬剤含有寒天に接種した. 37℃, 18時間培養の後, 被検菌の発育を観察し, その発育が肉眼で認められない薬剤の最小濃度をもってMICと判定した.

5. 被検菌

東大病院産婦人科から中央検査室に送られた材料 (昭和57年~昭和62年) より分離された *S. aureus* 150株を用いた.

6. β -Lactamase

β -Lactamase の測定はスペクトロホトメーターを使用する方法を用いた⁴⁾⁵⁾.

反応系は30℃に加温し, 50mM の $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.0) を用い, 1 ユニット (U) の酵素活性は1 μ M の基質を1分で分解する酵素量を用いて表わした⁴⁾¹⁰⁾. また, 酵素活性の低い場

合はマイクロヨード法を用いた⁶⁾.

7. ペニシリン結合蛋白 (PBP)

まず, *S. aureus* から膜成分を分離した. 新鮮なL-ブイヨンに37℃, 18時間培養後, 菌体を遠心で集め, 10mM の MgCl_2 を含む50mM の磷酸バッファーに浮かべ, 30分間, 0℃下で超音波で破碎後, $100,000\times g$, 30分間, 4℃下で遠心し, メンブラン分画を上記のバッファーの少量に浮かべた. 蛋白量は8mg/ml の濃度に調整した. *S. aureus* のPBPはSprattの原法⁷⁾を修飾した方法⁸⁾⁹⁾を用いた.

結 果

病巣材料より得られた菌の分離とその分離頻度を図1に示した²⁾³⁾. 中規模以上の病院のデータと, 開業医・小規模病院のデータとは, 当然, 差があるものと思われる.

P. aeruginosa > *S. aureus* > *E. faecalis* > *E. coli* の順で分離されているが, *P. aeruginosa* の分離頻度が高いことは当然である. *Staphylococci*, *E. faecalis* 等の分離頻度の高いことが注目される. *K. pneumoniae*, *H. influenzae* について *E. cloacae*, *S. marcescens* の分離頻度が高いことも注目される.

次に産婦人科病巣材料より検出された菌の分離

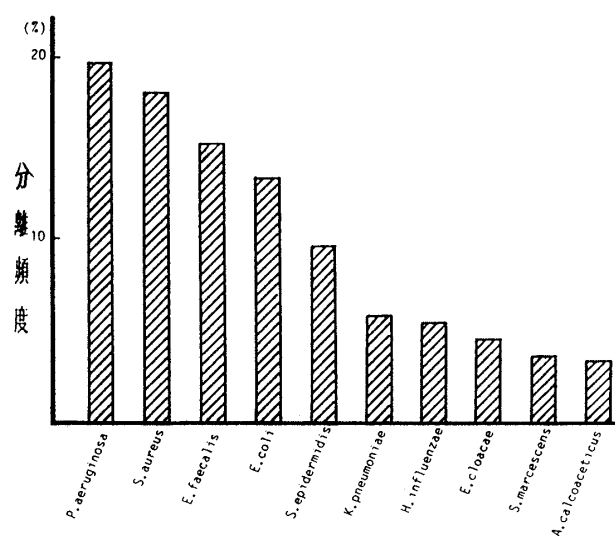


図1 病巣材料よりの菌分離頻度. 全国各病院 (病床数200以上) の中央検査室で得られた結果を集計した (10施設). 1985年の検査結果で総菌株数65,000 (上位10菌種)⁸⁾⁹⁾.

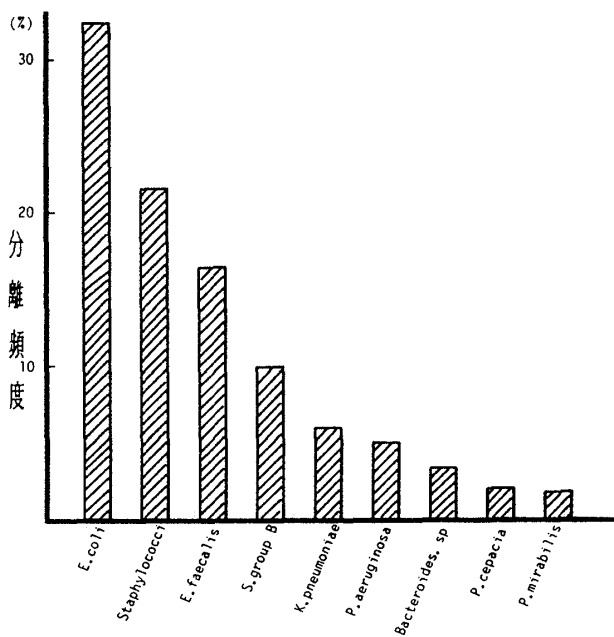


図2 産婦人科より送られた病巣材料よりの菌分離頻度。全国各病院（病床数200以上）の中央検査室で得られた結果を集計した（8施設）。1985年の検査結果で総菌株数1,700株（上位9菌種）。嫌気性菌と *N. gonorrhoeae* は記載のない施設があつたので省略した。

頻度を図2に示した²⁾³⁾。

E. coli の分離頻度が高いことは予想通りであるが、Staphylococci, *E. faecalis*, S. group B等のグラム陽性球菌の分離頻度の高いことが特徴的である。*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*等のグループのほかに *Bacteroides. sp* が分離されるのも産婦人科の特徴である。

東大病院産婦人科病巣材料よりの菌の分離頻度を表1に示した。*E. coli* のほかにグラム陽性球菌である Staphylococci, *E. faecalis*, S. group Bの分離頻度の高いことが注目される。

K. pneumoniae, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* の分離頻度も高い。したがって、これらの菌の薬剤耐性状況を十分に把握することは、診療上、非常に重要である。当然のことながら、嫌気性の *Bacteroides. sp* の分離頻度も高い。

当科で分離された *S. aureus* の β -Lactam 剤に対する感受性分布を図3a および図3bに示した。分離菌の80%の発育を阻止する濃度（MIC₈₀）が6.25 μ g/ml以上の薬剤はCEZ, CMD, CMZ, DMPPC, ABPC, PIPC, CAZ等で、これらの結

表1 東大病院産婦人科より送られた病巣材料よりの菌の分離頻度（上位10菌株）。総菌株数1,911株1984年7月から1986年12月までに得られた結果を示した。

菌 種	分離株数(%)
Staphylococci	224(11.7)
<i>E. faecalis</i>	200(10.5)
<i>E. coli</i>	194(10.2)
<i>Bacteroides. sp</i>	88(4.6)
S. group B	78(4.1)
<i>N. gonorrhoeae</i>	59(3.1)
<i>K. pneumoniae</i>	56(2.9)
<i>P. aeruginosa</i>	38(2.0)
<i>E. cloacae</i>	32(1.7)
<i>H. influenzae</i>	9(0.5)

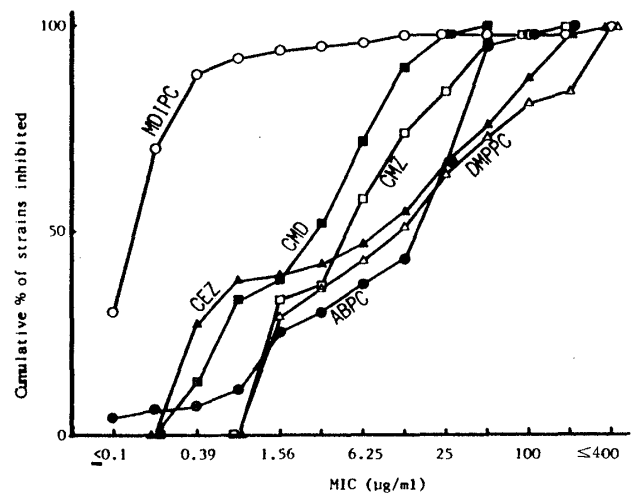


図3a 各種 β -Lactam 剤の *S. aureus* に対する抗菌作用。東大病院産婦人科より得られた *S. aureus* 150株を用いた。

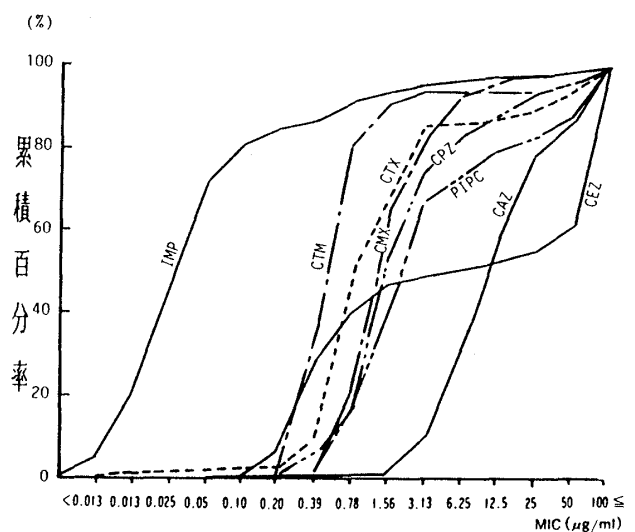


図3b 各種 β -Lactam 剤の *S. aureus* に対する抗菌作用。図3aの脚注参照。

果は β -Lactam 剤耐性菌の多いことを示している。また、表示しなかつたが新しいキノロン剤、中でも OFLX の抗菌作用は優れていた。

ブドウ球菌は Cephalosporinase (CSase) は産生しないが、Penicillinase (PCase) を産生するものが多い。したがってペニシリン系薬剤は MDIPC のように PCase に強い薬剤以外はブドウ球菌に無効のことが多い。また、抗菌スペクトラムが拡大し緑膿菌を含むグラム陰性桿菌に有効なセフェム系薬剤の中にはグラム陽性球菌に対して抗菌力の低いものが多い。耐性菌の多いブドウ球菌に対してカルバペネム系薬剤である IPM が優れた抗菌作用を示したことが注目される。

PCase に強い薬剤として DMPPC がグラム陽性球菌に多く使用されたが、前述したように DMPPC の MIC_{50} は $12.5\mu\text{g/ml}$ 、 MIC_{80} は $100\mu\text{g/ml}$ 以上で、近年、DMPPC 耐性菌の増加が注目されている。そこで、当科で分離された黄色ブドウ球菌における DMPPC 耐性菌の調査を試みた。DMPPC に対して $MIC 6.25\mu\text{g/ml}$ 以上の菌をメチシリン耐性菌 (MRSA) とすると黄色ブドウ球菌の約45%は MRSA であつた。

MRSA 60株を用いて β -Lactam 剤の感受性分布を調査した(図4)。DMPPC はもちろん、CEZ, CTX, CZX すべてに耐性であつた。CMZ の MIC_{50} は $6.25\mu\text{g/ml}$ で耐性菌がその半分以上を占めていることになる。MDIPC, MCIPC のような PCase に強い薬剤がやや有効ではあるが、10~20%に耐性菌の出現がみられる。注目すべきは、IPM, OFLX が極めて優れた抗菌力を示す点である。アミノ配糖体も MRSA に比較的優れた抗菌活性を示す。したがって MRSA は DMPPC のみならず広くセフェム系薬剤に交叉耐性を示す点で注目される。

黄色ブドウ球菌はかなり高率(約50~60%)に PCase を産生し、それらの菌は PCG, ABPC に耐性である。そこで当科で分離された黄色ブドウ球菌の中で PCG 耐性で DMPPC 耐性の菌2株、PCG 耐性で DMPPC 感受性1株を選び、それらが産生する PCase の活性と基質特異性を調査した(表2)。

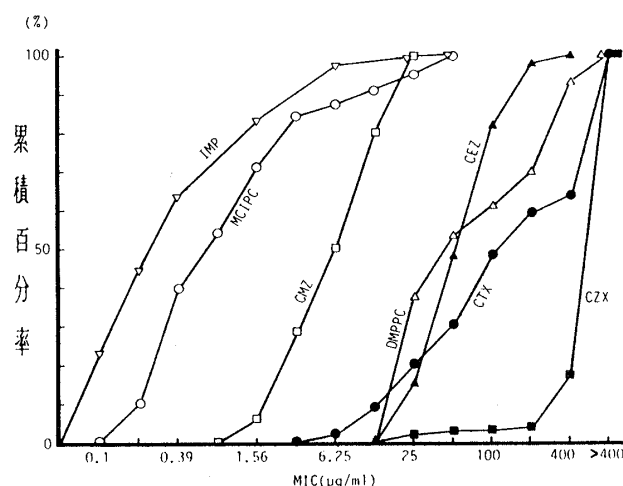


図4 DMPPC 耐性 *S. aureus* (MRSA) に対する β -Lactam 剤の抗菌作用。MRSA 60株を用いた。

表2 PCG 耐性 *S. aureus* のペニシリナーゼ活性。酵素活性は PCG の加水分解 (V_{max}) を100とした相対加水分解率で表わした。測定はマイクロヨード法を用いた。NM-2, NM-12, NM-26は PCG 耐性。NM-2, NM-12は DMPPC 耐性。($MIC 100\mu\text{g/ml}$) NM-26は DMPPC 感受性。

	<i>S. aureus</i> NM-2	<i>S. aureus</i> NM-12	<i>S. aureus</i> NM-26
PCG	100	100	100
ABPC	108	105	110
PIPC	189	178	191
MCIPC	0.18	0.17	0.26
DMPPC	0.03	0.04	0.03
CCL	17	16	18
CER	0.91	0.87	0.93
CEZ	0.31	0.29	0.28
CMD	0.20	0.19	0.21
CMZ	<0.03	<0.02	<0.02
CTM	<0.02	<0.02	<0.02
CZX	<0.02	<0.02	<0.02

3株とも、PCG, ABPC, PIPC, CCL を分解するが、DMPPC や他のセフェム系薬剤の分解能は低い。

とくに DMPPC 耐性とは無関係に DMPPC の分解能は低い。したがって MRSA 耐性の本態は PCase によらないことを示している。

以上の結果より、当科で分離されたメチシリン耐性の *S. aureus* NM-2, NM-12とメチシリン感受性の *S. aureus* NM-26を選んでペニシリン結合蛋白 (PBP) の電気泳動による検出を行った。

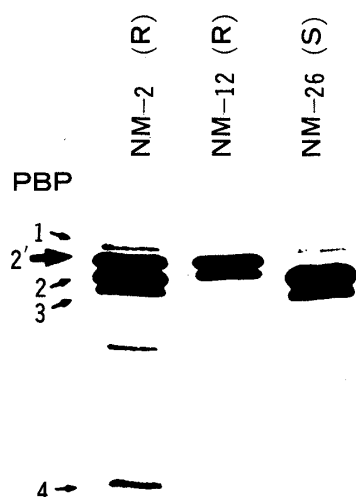


図5 ^{14}C -PCGを用いたペニシリン結合蛋白(PBP)の電気泳動による解析。NM-2, NM-12はDMPPC耐性。NM-26はDMPPC感受性。

MRSAのNM-2, NM-12にはPBPの1と2の間に新しいPBP分画が出現していることが証明された。これに対してメチシリン感受性のNM-26にはこの分画は証明されなかつた。この結果はPBP2'と命名された新しいPBP分画と報告された⁸⁾⁹⁾ものと一致する(図5)。

考 案

東大病院産婦人科病巣材料より分離された細菌はE. coliを除くとStaphylococci, E. faecalis, Streptococci等グラム陽性球菌がその上位を占め、嫌気性菌であるBacteroides. spも多く分離されることが特徴であつた。この傾向は他の施設の結果ともよく一致していた。S. aureusを選んで調査した結果、 β -Lactam剤耐性が多くPCase産生菌が目立つた。 β -Lactam剤の中ではペニシリン系薬剤とPCase阻害剤を混合した薬剤のPCase産生菌に対する効果が期待される。次にペニシリン系薬剤の中でPCase耐性のものの効果が期待される。PCase, CSaseに分解されにくく広域スペクトラムのセフェム系薬剤は抗菌力が緑膿菌を含めたグラム陰性桿菌にまで拡大されたが、ペニシリン系薬剤に比較してグラム陽性球菌に対する抗菌力が弱いことが弱点である。黄色ブドウ球菌には予想以上にアミノ配糖体耐性菌が多いが、新キノロン剤(OFLX等)はグラム陽性球菌にも優れた抗菌力を発揮する。しかし、産科領域

においてはキノロン剤の副作用に留意しなければならない。

当科においてもMRSAが高率に分離されることが明らかになったが、その第一の理由としてPCaseに抵抗性の第三世代セフェム剤の多用があげられる。第二にはMRSAの分離頻度が病床数の多い大病院に高いこととMRSAの分離頻度が著しく低い病院もあること等から病棟内伝播(nosocomial infection)によることが予想される。この対策としては、今後の薬剤使用の管理と衛生管理が期待されるものと思われる。

本研究にあたって帝京大学医学部付属病院中央検査室および群馬大学耐性菌実験施設の御指導をいただいたことに深謝申し上げます。

文 献

1. 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について, *Chemotherapy*, 29: 76, 1981.
2. 薬剤感受性情報1985, 医療情報システム開発センター.
3. 薬剤感受性情報1986, 医療情報システム開発センター.
4. Hirai, K., Iyobe, S. and Mitsuhashi, S.: Purification and properties of a new β -Lactamase from *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 17: 355, 1980.
5. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
6. Novik, R.P.: Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 33: 121, 1963.
7. Spratt, B.G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, 72: 341, 1977.
8. Ubukata, K., Yamashita, N. and Konno, M.: Occurrence of a β -Lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 27: 851, 1985.
9. Utsui, Y. and Yokota, T.: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 28: 397, 1985.
10. Walley, S.G.: A spectrophotometric assay of β -Lactamase action on penicillins. *Biochem. J.*, 139: 789, 1974.

(No. 6504 昭63・12・6受付)