[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
21(1) 43-47 (1995)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌における消毒剤耐性株の分布

笹津備規^{†1}, 清水慶一^{†1}, 野口雅久^{†1}, 出口浩一^{†2}, 河野 恵^{†1}

東京薬科大学第二微生物学教室^{†1}

東京総合臨床検査センター研究部^{†2}

Distribution of Antiseptic-resistant Strains in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MASANORI SASATSU^{†1}, KEIICHI SHIMIZU^{†1}, NORIHISA NOGUCHI^{†1},

KOICHI DEGUCHI^{†2} and MEGUMI KONO^{†1}

Department of Microbiology, Tokyo College of Pharmacy^{†1}

Section of Studies, Tokyo Clinical Research Center^{†2}

(Received August 3, 1994
Accepted October 20, 1994)

One-hundred strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from hospitals located in different areas in Japan were tested for antiseptic-resistance and the possession of transferrable antiseptic-resistant plasmid. The coagulase types of MRSA strains were type II (74%), type IV (11%), type VII (8%), type III (2%) and non-type (5%). Sixty-one strains were penicillinase-producing and 39 were non-producing. Antiseptic-resistant MRSA strains were isolated from 50 hospitals in different areas in Japan. The transferrable gentamicin-resistant plasmids were detected from 23 of the harboured strains. The antiseptic-resistant determinant was located on the transferrable gentamicin-resistant plasmid in 12 of the 23 strains. These 12 strains harbouring the transferrable antiseptic-resistant plasmid were isolated from all areas of Japan except for Hokkaido and Okinawa. The antiseptic-resistant strain and the strains harbouring the transferrable antiseptic-resistant plasmid were found not to exist in any specific hospital or area in Japan.

Keywords—methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, antiseptic-resistance, transferrable plasmid, antiseptic-resistant plasmid, distribution

緒 論

わが国における、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による院内感染は依然として大きな医療問題の一つである。その原因として、MRSA は病院内の環境に長期間生存できること¹⁾, 多くの抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌であることなど

が報告されている^{2,3)}。また、我々はMRSAの中には消毒剤にも耐性を示す菌株が存在することを報告し⁴⁾, このような消毒剤耐性機構について検討を行ってきた。その結果、消毒剤耐性遺伝子 *ebr* は伝達性プラスミド上に存在する比較的小さな遺伝子 (596塩基) であり、107アミノ酸からなる分子量11,700の蛋白質をコードしている⁵⁾。両端にインバーテットリピート配列を持つトランスポゾン様構造をしており、耐性機構は細胞からの薬物の排出である⁶⁾。遺伝子の重複により高度耐性化するなどの性質を示す⁶⁾ *ebr* 遺伝子を持つ

^{†1} 東京都八王子市堀之内 1432-1; 1432-1, Horino-uchi, Hachioji-shi, Tokyo, 192-03 Japan

^{†2} 東京都足立区千住仲町 14-4; 14-4, Senju-Nakamachi, Adachi-ku, Tokyo, 120 Japan

MRSA 株は各種消毒剤、色素系薬剤、防腐剤などに幅広く耐性を示し、カルシウムチャンネルブロッカー、カルモジュリン阻害剤により、消毒剤耐性は阻害されることなどが明らかになった⁷⁾。さらに、このような消毒剤耐性株を用いた各種消毒剤の評価についても報告してきた^{8,9)}。

消毒剤耐性 MRSA の存在は、医療の現場では重要な問題である。しかし、このような消毒剤耐性 MRSA 株はある限られた地域に存在するのか、あるいは全国的に分布しているのかは未だ明らかでない。そこで本論文ではわが国における消毒剤耐性 MRSA 株の分布、並びに伝達性消毒剤耐性プラスミドの分布について全国的な調査を行った。

実験材料および方法

1. 使用菌株

実験に使用したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 株は東京総合臨床検査センターで分離された菌株であり、北海道から沖縄まで分離された地域、および病院がかたよらない 100 株を選択した。消毒剤耐性の標準株として用いた消毒剤高度耐性 N20 株は 1989 年に分離され、伝達性プラスミド pTZ22 上に消毒剤耐性遺伝子を持っている⁶⁾。消毒剤低度耐性株 L20A は 1985 年分離され、伝達性プラスミド pTZ20 上に消毒剤耐性遺伝子を持っている⁴⁾。RN2677 株は修飾および制限マイナスのノボビオシンおよびリファンピシン耐性株であり、伝達実験の受容菌として用いられた^{4,6)}。

2. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性は日本化学療法学会標準法に従い寒天平板希釈法により測定した¹⁰⁾。培地は Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) を用いた。使用した抗菌剤はメチシリン (DMPPC)、オキサシリン (MPIPC)、ベンジルペニシリン (PCG)、セファゾリン (CEZ)、セフメタゾール (CMZ)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、トブラマイシン (TOB)、ノルフロキサシン (NFLX)、エリスロマイシン (EM)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイク

リン (TC) である。また、消毒剤感受性測定の指標として、エチジウムブロマイド (EB)、および塩化ベンゼトニウム (BT) を用いた。

3. 接合伝達実験

プラスミドの接合伝達実験は Schaberg ら (1982) の方法に準じ、フィルターメイティング法により行った¹¹⁾。伝達株の選択には GM 5 μ g/ml, ノボビオシン (NB) 5 μ g/ml, リファンピシン (RFP) 5 μ g/ml 含有のトリプトソイ寒天培地 (榮研化学, 東京) を用いた。

4. プラスミド DNA の検出

プラスミド DNA の抽出には Promega 社の MagicTM Minipreps DNA Purification System を用いた。プラスミド DNA の検出は通常のアガロースゲル電気泳動法により行った。

5. コアグラーゼ型とペニシリナーゼ産生

コアグラーゼ型はデンカ生研のコアグラーゼ型別キットを用いた。また、ペニシリナーゼ産生の有無はファイザー製薬株式会社より分与された β ラクタマーゼ検出用ディスク「 β -check」を用いた。

結果と考察

実験に使用した MRSA 株の背景を調べるために全菌株のコアグラーゼ型、ペニシリナーゼ産生能、および薬剤感受性について検討した。

1. コアグラーゼ型とペニシリナーゼ産生

実験に使用した MRSA 株のコアグラーゼ型を Fig. 1 に、ペニシリナーゼ産生を Fig. 2 に示した。コアグラーゼ型はⅡ型が 74%、Ⅳ型が 11%、Ⅶ型が 8%、Ⅲ型が 2% であり型別不能株が 5% であり、これまで報告されている結果と一致していた³⁾。また、ペニシリナーゼに関しては 61% が産生株であり、39% が非産生株であった。コアグラーゼ型とペニシリナーゼ産生株について地域的なかたよりは認められなかった。

2. 薬剤感受性

実験に使用した MRSA 100 株の MIC 値の分布を Fig. 3 に示した。測定した抗菌剤のうち、CP, TC を除く全ての薬剤に対し 80% 以上の菌株が耐性を示した。これらの菌株は各種抗生剤に対

Fig. 1. Coagulase Types of the 100 Strains of MRSA

Fig. 2. Ratio of Penicillinase-producing Strains and Non-producing Strains of the 100 Strains of MRSA
Penicillinase, PCase.

し耐性を示す多剤耐性株であった。また、60%以上の株がニューキノロン剤にも100 μ g/ml以上の高度耐性を示した。かつて非常に多かったクロラムフェニコール耐性株は10%しか検出されなかった。クロラムフェニコール耐性株が分離されたのは秋田、栃木、群馬(2株)、千葉、静岡、愛知、広島、鳥取、徳島であった。ブドウ球菌感染症に対し、使われなくなったクロラムフェニコールに対する耐性株が、これらの地域にどのような理由で現在まで存在しているのか興味をもたれる。また、消毒剤耐性の指標であるエチジウムブロマイドに対し約50%の株が25 μ g/ml以上の耐性を示した。このような消毒剤耐性株が検出された地域

は北海道から沖縄まで全国的に分布していた。しかし、首都圏(都内、千葉、埼玉、神奈川)から分離された菌株が比較的消毒剤耐性を示す割合が高いことが特徴的であった。

3. 伝達性プラスミド

伝達性について調べると結果は Table 1 のごとく、23株よりゲンタマイシン耐性の伝達性プラスミドが検出された。これらの菌株からは L20A 株から分離された pTZ20 とほぼ同じ大きさのプラスミド DNA が検出された。このうち、12株からは消毒剤耐性も伝達した。また1株は消毒剤高度耐性であった。伝達性プラスミドを保有している株のコアグラゼ型はⅡ型が17株(74%)、Ⅲ型とⅦ型が各2株(9%)、Ⅳ型と型別不能株が各1株(4%)であり、全体の菌株のコアグラゼ型の分布と一致しており、特定コアグラゼ型の菌株が伝達性プラスミドを所有しているわけではなかった。またペニシリナーゼに関しては、伝達性プラスミド保有株の78%がペニシリナーゼ産生株であったが、同時伝達は認められなかった。オーストラリアではペニシリナーゼ産生遺伝子が伝達性プラスミドに移行した菌株が報告されているが¹²⁾、わが国では現在まで報告されていない。

MRSA の伝達性 GM 耐性プラスミドは沖縄から東北地方にかけて広く分布しており、特定の菌株や地域に関係なく全国的に分布していた。消毒剤耐性を持っている伝達性プラスミドについても、九州地方より4株、東北地方より3株、関東地方より2株、中部、中国、四国地方より各1株分離された。北海道と沖縄を除く、全ての地域に分布しているものと思われる。

消毒剤耐性 MRSA 株の存在は、医療現場においては無視できない問題である。消毒剤耐性株は全国50%の病院から分離された。さらに消毒剤耐性遺伝子が伝達性プラスミド上に存在している菌株も全国12カ所の病院から分離されている。消毒剤耐性遺伝子を持った伝達性プラスミドが検出されない消毒剤耐性株においては、消毒剤耐性遺伝子が染色体上に存在し安定化しているものと思われる。消毒剤耐性伝達性プラスミドを持つ菌株の存在は、消毒剤の使用法に気を付けないと、選択

Fig. 3. Distribution of MICs of Antimicrobial Agents against MRSA Strain Tested in This Experiment.

- $\square$: $\leq 0.1 \mu\text{g/ml}$,
 $\square$ (diagonal lines) : $0.2 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$,
 $\square$ (cross-hatch) : $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$,
 $\square$ (horizontal lines) : $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$,
 $\square$ (vertical lines) : $25 \sim 50 \mu\text{g/ml}$,
 $\square$ (dotted) : $100 \mu\text{g/ml}$,
 $\blacksquare$: $\geq 200 \mu\text{g/ml}$

され消毒剤感受性株に消毒剤耐性遺伝子を伝達する危険性を示している。消毒剤耐性 MRSA 株の

存在は特定の地域、特定の病院だけの問題ではない。消毒剤の使用時には消毒剤耐性株が完全に殺

Table 1. Transfer of GM- and Antiseptics-Resistance from MRSA Strains

Strain	Resistance Marker Transferred				Coagulase Type	Penicillinase * ¹	Isolated from * ²
ST 4	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)** ³	II	—	Fukuoka
ST 5	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Saitama
ST 7	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Shizuoka
ST18	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Chiba
ST20	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Oita
ST24	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	—	Saga
ST25	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Kagawa
ST32	GM	KM	TOB		II	+	Nagasaki
ST33	GM	KM	TOB		II	+	Mie
ST36	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	VII	+	Akita
ST46	GM	KM	TOB	Antiseptics(H)** ⁴	II	+	Yamagata
ST51	GM	KM	TOB		III	+	Okinawa
ST52	GM	KM	TOB		IV	+	Wakayama
ST55	GM	KM	TOB		II	+	Tokyo
ST60	GM	KM	TOB		II	—	Fukuoka
ST63	GM	KM	TOB		II	+	Kanagawa
ST66	GM	KM	TOB		VII	+	Nagano
ST70	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	—	Miyagi
ST82	GM	KM	TOB		III	—	Chiba
ST84	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Hiroshima
ST85	GM	KM	TOB		II	+	Miyagi
ST90	GM	KM	TOB	Antiseptics(L)	II	+	Fukuoka
ST96	GM	KM	TOB		II	+	Akita

*¹: Penicillin-producing strain, + ; non-producing strain, —.

*²: Strains were isolated from each prefecture.

*³: Low-level resistance to antiseptics.

*⁴: High-level resistance to antiseptics.

菌される消毒剤の使用濃度，使用時間等の条件を十分に考慮しなければならない。

引用文献

- 1) M. Sasatsu, Y. Shibata, N. Noguchi, M. Nagata, M. Murata, Y. Ogata and M. Kono, *Microbios*, **75**, 17-21 (1993).
- 2) 紺野昌俊, “MRSA 感染症のすべて”, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1991, pp. 13-33.
- 3) 橋本 一, *Infection Control*, **1**, 10-15 (1992).
- 4) M. Sasatsu, Y. Shibata, S. Tamura and M. Kono, *Microbios Lett.*, **43**, 105-112 (1990).
- 5) M. Sasatsu, K. Shima, Y. Shibata and M. Kono, *Nucl. Acids Res.*, **17**, 10103 (1989).
- 6) M. Sasatsu, Y. Shibata, N. Noguchi and M. Kono, *FEMS Microbiol. Lett.*, **93**, 109-114 (1992).
- 7) M. Sasatsu, Y. Shibata, N. Noguchi and M. Kono, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 163-165 (1994).
- 8) M. Sasatsu, K. Shimizu, N. Noguchi and M. Kono, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 136-138 (1994).
- 9) 笹津備規, 白井裕二, 清水慶一, 野口雅久, 河野恵, *病院薬学*, **19**, 516-521 (1993).
- 10) Japan Society of Chemotherapy, *Chemotherapy*, **29**, 76-79 (1981).
- 11) D.R. Schaberg, D.B. Clewell and L. Glatzer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 204-207 (1982).
- 12) B. Lyon and R. Skurray, *Microbiol. Rev.*, **51**, 88-134 (1987).