原 著

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌と感受性黄色 ブドウ球菌の細胞形態の比較

山 村 正 次 野 田 充 宏 伊 藤 卯 一
高 瀬 市 将 浅 井 昭 士 郎 中 西 正 樹*
大 澤 二 郎* 篠 田 正 昭* 並 河 勇

朝日大学歯学部口腔細菌学講座（主任：並河 勇教授）

* 朝日大学歯学部外科学講座（主任：篠田正昭教授）

〔受付：平成4年7月20日受付〕

A comparison of the cell morphology of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus and -susceptible *Staphylococcus aureus*

Masatsugu Yamamura, Mitsuhiro Noda, Uichi Ito, Ichio Takase, Shojiro Asai,
Masaki Nakanishi*, Jiro Ohsawa*, Masaaki Shinoda*, Isamu Namikawa

Department of Oral Microbiology
(Chief : Prof. Isamu Namikawa)

Department of Surgery
(Chief : Prof. Masaaki Shinoda)
School of Dentistry, Asahi University 1851
Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02, Japan

〔Accepted for publication : July 20, 1992〕

Key word : MRSA/MSSA/Mutant strains/Cell wall/Coccal size

Abstract : It has been reported that methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) were slightly larger in coccal size than that of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). However, the data in these reports were not exact because the observations by using microscope or transmission electron microscope on ultrathin sections were inadequate for measuring the coccal size.

The coccal size was examined by using a scanning electron microscope. In addition, the width of cell walls was examined by using a transmission electron microscope on the ultrathin sections. Both mutant MSSA strains lost methicillin-resistance from MRSA strain and MRSA strains selected as heterogeneous strains from MSSA were used for measuring the morphological size compared with clinical strains of MRSA and MSSA.

There were no significant differences in the coccal size and the width of the cell walls of MRSA, MSSA and mutant MRSA strains.

However, the width of the cell walls of the MRSA strain selected from MSSA was about 85% larger than that of the parent MRSA strain. The effect might be influenced by the used antibiotics. These results revealed that the differences between MRSA and MSSA strains were not significantly

in coccal size.

緒 言

メチシリン (DMPPC) 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は DMPPC 感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) と比べて、菌体がやや大きく¹⁾、その増殖が遅い²⁾。また、細胞表層の構造の違い^{3,4)}などが報告されている。

しかし、菌体が確かにやや大きいかどうか、また、黄色ブドウ球菌のどの部分が大きいのかなどがいまだ、明らかにされていない。

本研究では、両菌種間の細胞形態の相違を明確にする目的で、まず、各種 MRSA および MSSA 株の菌体の直径を走査型電子顕微鏡で精密に測定し比較した。また、ブドウ球菌の細胞膜は、細胞壁の内面と密着し、電子密度の高い層を作っているため、その単位膜構造を見ることは難しい⁵⁾。そのため、細胞膜の厚さは測定が困難なので、細胞壁の厚さだけを透過型電子顕微鏡で測定した。

しかし、MRSA や MSSA に対するこれらの測定結果が、DMPPC 耐性菌と感受性菌間の菌体直径や細胞壁の厚さの相違ではなく、単なる両菌種の菌体固有の性質である可能性もある。そこで、*in vitro* で MRSA を培養して、その DMPPC 耐性を脱落させた変異 MSSA 株を調製し、親株と比較検討した。また、MSSA をオキサシリン (MPIPC) 含有平板寒天培地で培養し、heterogeneity として混在すると考えられている MSSA 菌集落の中の MRSA を選択し、得られた MRSA 株についても検討した⁶⁾。

これらの方法を用いて、両菌種間の菌体サイズおよび細胞壁の厚さを精密に比較検討した。

材料および方法

1. 菌 株

1) MRSA 株として名古屋大学医学部付属病院検査部より分与された H103, H310, M145 および M118 を用いた。

2) MSSA 株として *Staphylococcus aureus* IID

975 (Cowan I) および *S. aureus* ATCC 29213 を用いた。

3) メチシリン (DMPPC) 耐性を脱落させた MSSA 変異株は、MRSA の M145 を卵黄含有 Mannitol Salt (MS) 寒天培地で 32°C, 44回44日間培養し、MSSA に変異したものを MRSA の N24 株として使用した。また、別に MRSA の H103 株を 44°C, pH 5.1 の Trypticase Soy broth (TSB, 4% NaCl 含有) 液体培地で35回35日間培養し、耐性を脱落して MSSA となったものを N28 株として使用した。いずれも、最初にペニシリナーゼプラスミドを除去するため 44°C で一夜培養した。処理菌がペニシリナーゼを産生しているか否かはニトセフィン (BBL) で調べた⁷⁾。

4) MSSA 菌集落よりオキサシリン (MPIPC) で選択された MRSA 株は、MSSA の *S. aureus* ATCC 29213 を MRSA スクリーニング寒天培地 (MPIPC 6 µg/ml 含有, BBL) で6日間 32°C, 培養し、形成した単一集落より得、選択された MRSA を N39株とした。

2. 培養方法

TSB 寒天培地に、各種菌株を接種し、18時間 37°C で培養した。次に、培養した菌株を3回蒸留水で洗浄し、遠心し集菌したものを電子顕微鏡標本作成試料とした。

3. 供試抗生物質

DMPPC (905 µg/mg 力価, シグマ), MPIPC (892 µg/mg, シグマ), ゲンタマイシン (GM, 618 µg/mg, シエリング・ブラウ), バンコマイシン (VCM, 1,124 µg/mg, 塩野義製薬), アンピシリン (ABPC, 913 µg/mg, 藤沢薬品工業) およびセファゾリン (CEZ, 936 µg/mg, 藤沢薬品工業) の原末を使用した。また、クロラムフェニコール (CP, 1,000 µg, 三共) の市販品も使用した。

4. MRSA の判定

微量液体希釈法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、日本化学療法学会標準法に準じ、DMPPC の MIC 値 12.5 µg/ml 以上のものを MRSA と判定した⁸⁾。すなわち、128 µg/ml より2倍数

Table 1 Antibiotic susceptibilities of MRSA and MSSA strains

Strain	Microdilution broth method					
	DMPPC ^{a)}	MPIPC	GM	VCM	ABPC	CEZ
MIC(μ g/ml)						
Strains lost methicillin-resistance						
N24 (from MRSA M145)	1	0.125	128	1	N.D. ^{b)}	32
N28 (from MRSA H103)	1	0.125	1	0.25	0.5	0.25
MRSA selected from MSSA						
N39 (from <i>S. aureus</i> ATCC 29213)	32	32	128	0.5	8	64
MSSA						
<i>S. aureus</i> IID975	1	0.125	1	0.25	2	0.25
<i>S. aureus</i> ATCC29213	2	0.25	2	0.5	4	0.25
MRSA						
M145	64	64	128	0.5	64	64
M118	64	64	128	0.5	128	64
H103	>128	>128	>128	8	128	>128
H310	>128	>128	64	4	64	>128

^{a)} DMPPC, methicillin ; MPIPC, oxacillin ; GM, gentamicin ; VCM, vancomycin ; ABPC, ampicillin ; CEZ, cefazolin

^{b)} N.D. not done

系列希釈の各供試抗生物質を含む TSB に、37°C で静置培養した菌を最終濃度約 10^6 cells/ml になるように調製して接種し、32°C で24時間静置培養後に、肉眼的に発育が阻止された最終濃度を MIC 値とした。また、DMPPC および MPIPC の薬剤に対しては、同様の操作で TBS の NaCl 濃度 2% という培養条件下での MIC 値も測定した。

処理株が MRSA および MSSA に確実にそれぞれ、選択されたかあるいは変異したか否かの判定には 2 度、MIC 値を調べ、確認した。

5. 菌体直径の測定

各培養菌について、通法に従い⁹⁾、グルタルアルデヒドおよびオスミック酸でそれぞれ、2 時間固定後、アルコール系による脱水を施し電顕標本を作製した。その後、酢酸イソアミルで置換して、臨界点乾燥した。さらに、ゴールドコーティングし、走査電顕 (JSM-35, JEOL) にて標本観察し、写真撮影したプリント上で菌体の直径をノギスで30個測定した。

6. 細胞壁の厚さの測定

前述のアルコール脱水後の試料の一部をエポキ

シ樹脂 (Epon 812) で包埋した。その後、ウルトラミクロトーム (LKB 8800) で超薄切片を作成し、さらに、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色を施した。試料を透過電顕 (JEM 1200X, JEOL) で観察、写真撮影したプリント上で細胞壁の厚さを30個の細胞についてノギスで正確に測定した。その際、菌体の中心付近で切片が作られているものにするため、測定するのは $0.5 \mu\text{m}$ 以上の直径を有する菌体に限定した。

7. CP 処理菌株の調製

抗生物質処理による細胞壁肥厚を調べるために、*S. aureus* ATCC 29213 を、18時間 TSB 寒天培地で培養し、集菌した。さらに、CP (最終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$) を含む TSB 液体培地で、37°C 4 時間培養した^{10,11)}。この培養菌について、前述した細胞壁の厚さの測定と同様な処理を施し、電顕標本を作成した。

結 果

1. 供試菌の薬剤感受性検査

各種菌株の薬剤感受性は Table 1 に示した。

Fig. 1 Scanning electron micrographs of *S. aureus* ATCC 29213, MRSA selected from MSSA, and M118.

(A) MSSA *S. aureus* ATCC 29213, (B) MRSA N39 (from *S. aureus* ATCC 29213), (C) MRSA M118.

微量液体希釈法による薬剤感受性試験では、DMPPC 耐性を脱落させたN24とN28株とも、MPIPCのMIC値は0.125、また、DMPPCのMIC値は1であり、日本化学療法学会の判定基準(DMPPC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上をMRSAと判定)以下であったのでMSSAと判定した⁸⁾。また、米国臨床検査標準委員会(NCCLS)の判定基準(MPIPC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上をMRSAと判定)にも準拠していた¹²⁾。

逆に、MSSAの*S. aureus* ATCC 29213菌集落から選択的に培養し、得られたMRSAのN39株では両薬剤ともMIC値は32であったで、MRSAと判定した。また、供試臨床株MSSA 2株とMRSA 4株はいずれも、上記の判定基準に準拠し、それぞれ、MRSAとMSSAであることが判明した。MRSAのM145、H103ともGM、ABPCおよびCEZのいずれの薬剤にもMIC値64以上の値を示した。一方、H103からDMPPC耐性を脱落させたN28株は、親株のH103が多剤耐性であったにもかかわらず、3剤ともMIC値0.5以

下の値であり多剤耐性も脱落し各種薬剤に感受性を示した。しかし、M145からの耐性脱落N24株はそれらに対し、MIC値32以上の値を示し、多剤耐性は脱落していなかった。

VCMに対しては、いずれの菌株も感受性菌であった。

2. 菌体直径の測定

走査電顕写真(Fig. 1)の判定により得られた測定結果をTable 2に示した。MSSAの*S. aureus* ATCC 29213は $0.63 \pm 0.04 \mu\text{m}$ であり、このMSSA菌集団から選択培養されたMRSAのN39株は $0.69 \pm 0.05 \mu\text{m}$ を示した。さらに、MRSAのM118は $0.62 \pm 0.04 \mu\text{m}$ であった。

また、*in vitro*で耐性を脱落させ、MSSAとなったN28株は $0.73 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、その親株MRSAのH103は $0.68 \pm 0.04 \mu\text{m}$ を示した。

3. 細胞壁の厚さの測定

透過電顕写真上(Fig. 2)から細胞壁の厚さのサイズを測定し、得られた結果をTable 2に示した。供試したMRSA株の細胞壁の厚さは26.5

Table 2 Comparison of the diameter of cells and the width of cell walls in MRSA and MSSA strains.

Strain	Diameter of cells ^{a)} (μm)	Width of cell walls ^{a)} (nm)
MRSA		
H310	N.D. ^{b)}	27.0 $\pm$ 7.0
H103	0.68 $\pm$ 0.04	N.D.
M145	N.D.	26.5 $\pm$ 5.5
M118	0.62 $\pm$ 0.04	32.1 $\pm$ 8.2
MSSA		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.63 $\pm$ 0.04	21.4 $\pm$ 3.0
<i>S. aureus</i> 11D975	N.D.	27.6 $\pm$ 5.9
MRSA selected from MSSA		
N39 (from <i>S. aureus</i> 29213)	0.69 $\pm$ 0.05	39.7 $\pm$ 12.1
Strains lost methicillin-resistance		
N28 (from MRSA H103)	0.73 $\pm$ 0.04	32.7 $\pm$ 6.8
N24 (from MRSA M145)	N.D.	28.0 $\pm$ 4.7
Chloramphenicol-treated strains		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	N.D.	28.4 $\pm$ 5.7
N39 (from <i>S. aureus</i> ATCC 29213)	N.D.	50.7 $\pm$ 7.8
M118	N.D.	30.5 $\pm$ 3.5
M145	N.D.	35.0 $\pm$ 5.3

^{a)} Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (N=30)

^{b)} N.D. not done.

^{c)} $p < 0.05$ by t test.

^{d)} $p < 0.05$ by t test.

± 5.5 nm から 32.1 ± 8.2 nm の範囲にあった。一方、MSSA 株として、*S. aureus* ATCC 29213 は 21.4 ± 3.0 nm および *S. aureus* IID 975 は 27.6 ± 5.9 nm を示した。*in vitro* 調製菌株では、MRSA の *S. aureus* ATCC 29213 より選択培養された N39 株は 39.7 ± 12.1 nm であった。本菌は親株の MSSA *S. aureus* ATCC 29213 のその厚さと比較して有意 ($p < 0.05$) の差があり、約85%肥厚した。また、N39 株を CP 処理すると、 50.7 ± 7.8 nm を示し、さらに約28% ($p < 0.05$) 肥厚した。一方、MRSA の M145 は 26.5 ± 5.5 nm、CP 処理で 35.0 ± 5.3 nm を示した。また、MRSA の M118 は、 32.1 ± 8.2 nm のサイズが CP 処理で 30.5 ± 3.5 nm となり、有意の差はなかった。*S. aureus* ATCC 29213 は 21.4 ± 3.0 nm が CP 処理で 28.4 ± 5.7 nm となった。CP 処理で、さらに、細胞壁の肥厚現象が進行したことが認められた。

考 察

従来、MRSA は MSSA と比較して細胞形態がやや大きいと報告されてきた。しかし、以前のこれらの直径サイズに関する報告は、顕微鏡写真による測定のため細胞壁境界が明瞭に観察できないので精密に測定できなかった^{13,14)}。また、超薄切片を用いた透過電顕写真による菌体直径サイズの測定の報告では、細胞が菌体中心付近で切片がすべて作られているわけではないので、菌体サイズが実際よりも小さいものも混入し、その際のデータは正確ではなかった¹⁵⁾。しかし、本実験で用いた走査電顕写真による測定では、菌体直径については顕微鏡観察による場合より、菌体の外壁が明瞭であるため、正確に測定できた。従来、MRSA と MSSA の細胞壁の厚さのサイズについて報告はされていなかったが本研究で初めて精密に比較検

Fig. 2 Transmission electron micrographs of MSSA, MRSA selected from MSSA, and chloramphenicol-treated MRSA.

- (A) MSSA *S. aureus* ATCC 29213
- (B) N39 (from *S. aureus* ATCC 29213)
- (C) MRSA N39 treated with chloramphenicol (20 μ g/ml) for 4 hr of incubation.
- (D) MRSA M145
- (E) MRSA M145 treated with chloramphenicol (20 μ g/ml) for 4 hr of incubation.

討した。また、臨床分離株の MRSA と基準株の MSSA 株で比較した場合には、これらの測定結果が菌株の単なる固有の性質としてのサイズである可能性もある^{16,17)}。そこで、*in vitro* で MRSA および MSSA をそれぞれ選択培養および変異させた菌株を比較検討することで、DMPPC 耐性菌と感受性菌株間でその直径および細胞壁の厚さのサイズに本質的な差があるか否かを検討した。

MRSA 株の H103 および M118 と MSSA 株の *S. aureus* ATCC 29213 をその菌体サイズで比較してみると有意の差は認められなかった。また、MSSA の *S. aureus* ATCC 29213 から MRSA を選択培養した株と、逆に、MRSA の H103 株を耐性を脱落させた MSSA 変異株でも両者に有意の差はなかった。

臨床分離株間だけでなく、*in vitro* で変異 およ

び選択させた菌株間でもこれらのサイズに有意の差がないことが示されたことから、MRSA と MSSA の両菌種間では、菌体直径に有意の差がないことが示唆された。

細胞壁の厚さのサイズでは、臨床分離株の MRSA と MSSA 菌種間および耐性脱落株の MSSA 変異株では有意の差はなく、細胞壁の肥厚現象は認められなかった。

しかし、*S. aureus* ATCC 29213 は *in vitro* で得られた選択株の MRSA の N39株と比べて有意の差 ($p < 0.05$) があった。そのため、細胞壁の厚さが親株の MSSA と比較して、約85%有意に肥厚していることが認められた。

この現象は、変異株では抗生物質に実験終了まで、接触していたため、その抗生物質によって細胞壁の肥厚現象が起きたと考えられる。この観察は使用した薬剤の作用点は異なるが、CP 処理による *S. aureus* の細胞壁肥厚に関する以前の報告と関連しているかもしれない¹⁸⁻²⁰⁾。

CP 処理した N39株は親株と比べて、約28%増大 ($p < 0.05$) したので、細胞壁の肥厚現象は本実験でも認められた。しかし、臨床分離 MSSA 株では、過去に、抗生物質との接触があったため、細胞壁の肥厚が観察されなかったと考えられた。

選択された N39 株は、親株 (MSSA *S. aureus* ATCC 29213) と比べて、菌体直径は有意の差がないのに、細胞壁に約85%の肥厚が認められた。しかし、この肥厚現象はこれらの菌株の菌体直径サイズの差として示されなかった。この理由は、菌体直径のサイズ測定には μm の単位、細胞壁の厚さの測定には nm を用い、それぞれ透過および走査電顕写真上で判定したので細胞壁の厚さの単位は微小になり、菌体直径サイズの測定の際には誤差範囲となったためである。

In vitro で MSSA 菌集落から選択された N39 株の調製は、薬剤感受性試験の MIC 値測定で日本化学療法学会の判定基準値 (DMPPC 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で MRSA と判定)、また、NCCLS の判定基準値 (MIPIC 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で MRSA と判定) を示し、明確に MRSA と判定できた。また、GM および CEZ にも耐性を示し、多剤耐性菌

に変異していた。

一方、供試 MRSA 株の耐性を脱落させた株の 2 菌株 N24 と N28 は、MSSA と判定できたが、N28 株は多剤耐性を同時に脱落し、感受性菌となっていた。しかし、N24 株は多剤耐性を脱落していなかった。この現象は調製方法の相違によると考えられる。すなわち、N28 株を調製した液体培地 (pH 5.6) の方が寒地培地 (pH 7.2) よりも多剤耐性の脱落に適していたと思われる。

本実験では供試菌について *mec A* 遺伝子の検出は行っていないが、日本化学療法学会の判定基準で判定された MRSA は、いままでも調べられた菌株についてすべて *mec A* 遺伝子を有していたと報告されている¹⁶⁾。しかし、標準法で MSSA と判定された菌株の中に、*mec A* 遺伝子を持つものがあることが判明している²¹⁾。加えて、MRSA は *mec A* 遺伝子が外来より MSSA に取り込まれて DMPPC 耐性株になるのであって、MSSA に *mec A* 遺伝子が薬剤処理で突然変異的に誘導されるのではないと考えられている²²⁾。

しかし、本研究に用いられた供試菌および *in vitro* 調製菌株の耐性判定は、すべて日本化学療法学会の判定基準の MIC 値を指標にしているので、本実験結果は DMPPC 耐性現象と菌体および細胞壁の厚さのサイズの関係を示唆していると考えられる。

結 論

MRSA、MSSA、MRSA より耐性を脱落させた変異 MSSA 株および MSSA 菌集落から選択した MRSA 株を用いて、菌体の直径および細胞壁の厚さのサイズを、それぞれ、走査電顕および透過電顕で精密に測定し、次の結果を得た。

1. 菌体の直径は、MRSA の H103株 は $0.68 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、M118株は $0.62 \pm 0.04 \mu\text{m}$ であった。一方、MSSA の *S. aureus* ATCC 29213 株は $0.63 \pm 0.04 \mu\text{m}$ であった。選択培養させた MRSA の N39 株では、その菌体直径は $0.69 \pm 0.05 \mu\text{m}$ 、MRSA の H103株を MSSA に変異させた N28 株では、 $0.73 \pm 0.04 \mu\text{m}$ であった。また、これらの結果は MRSA と MSSA 株間で統計的な有意差

を示さなかった。

2. 菌体細胞壁の厚さは、MRSA の H310 株、 27.0 ± 7.0 nm, M145株、 26.5 ± 5.5 nm, M118株、 32.1 ± 8.2 nm であった。一方、MSSA の *S. aureus* ATCC 29213株 21.4 ± 3.0 nm, *S. aureus* IID 975株 27.5 ± 5.9 nm であった。また、N39 株では 39.7 ± 12.1 nm であった。N39株の細胞壁はその親株と比べて約85% ($p < 0.05$) 肥厚した。

3. PC (20 μ g/ml) で4時間処理した N39 株は、細胞壁の厚さが約28%肥厚した。

以上の結果により、MRSA は MSSA と比べて、その菌体直径がやや大きいということはなかった。また、*in vitro* 調製の変異株 および選択株でも直径に差がなかったことから、単なる菌株固

有の性質というより、MRSA と MSSA の菌株間で菌体直径に差がないことを示唆した。

細胞壁の厚さは、臨床分離株で有意差はなかったが、MSSA 菌集落から MRSA を選択培養した菌株では、前者の分離株とは異なって標本調製直前まで、抗生物質に接触していたので、その作用のために、肥厚したと考えられる。これらの現象は作用機序は異なるが、タンパク質合成阻害剤である CP で菌株を処理すると細胞壁肥厚現象が起きることが報告されていること、また、本実験でも同様の結果が得られたことから、このような抗生物質による肥厚現象を支持していると思われる。

抄録：MRSA は、その細胞形態が MSSA と比較して、やや大きいと以前から報告されている。本研究では、MRSA と MSSA の相違を明確にする目的で従来報告されていない精密な測定方法を用い、菌体の直径および細胞壁の厚さのサイズを、それぞれ、走査電顕および透過電顕で精密に測定した。これらの現象をさらに、MRSA, MSSA, MRSA より耐性を脱落させた変異株および MSSA 菌集落から選択的に MRSA を分離した菌株を用いて比較検討した。その結果、MRSA 株と MSSA 株間ではその菌体直径および細胞壁の厚さのサイズに差がないことが示唆された。また、これらの現象はそれぞれの変異株および選択株でも変化がなかった。親株とその変異株でも同様に有意差がなかったことは、単に供試した菌株の性質ではなく、MRSA 株と MSSA 株でこれらのサイズに差がないことを示している。しかし、選択菌株では、その細胞壁の厚さが約85%肥厚した。これらの現象は、臨床分離株と異なって培養直前まで抗生物質に接していたために、肥厚現象が起こったと推定された。

MRSA の菌株を分与して頂きました、名古屋大学医学部の太田美智男助教授および名古屋大学医学部付属病院検査部の一山智先生に感謝致します。

電子顕微鏡の観察に際し、技術的な指導を受けた朝日大学歯学部中央研究施設主任の森 春義および梅原則明氏に感謝致します。

本研究の一部は、平成3年度東海乳酸菌研究会(ヤクルト主催)(名古屋, 1992年)および第65回日本細菌学会総会(盛岡, 1992年)において発表した。

また、本研究の一部は、昭和63年度宮田研究奨励金(A)および平成3年度ヤクルト㈱の研究助成金で行った。

文 献

- 1) Sabath, L.D. and Wallace, S.J. : Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Ann. N.Y. Acad. Sci. **182**:258-266, 1971.
- 2) Sutherland, R. and Rolinson, G.N. : Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. J. Bacteriol. **87** : 887-899, 1964.
- 3) Wilkinson, B.J., Dorian, K.J. and Sabath, L.D. : Cell wall composition and associated properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Bacteriol. **136** : 976-982, 1978.
- 4) Sabath, L.D., Leaf, C.D., Gerstein, D.A. and Finland, M. : Altered cell walls of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. Nature **225** : 1074, 1970.
- 5) Suganuma, A. : Fine structure of staphylococci ; Electron Microscopy. in The staphylococci, Ed. J.O. Cohen, Wiley-Interscience, pp 21-40, N.Y., 1972.

- 6) 横田 健：MRSA の発生機序とその毒性 臨床消化器内科 **6**：615-627, 1991.
- 7) O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M. and Shingler, A.H. : Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents Chemother. **1** : 283-288, 1972.
- 8) 日本化学療法学会 抗菌薬感受性測定検討委員会報告：微量液体希釈による MIC 測定（微量液体希釈法）Chemotherapy **38** : 102-105, 1990.
- 9) 浅井昭士郎, 中村義則, 中谷至宏, 佐藤 勝, 並河 勇：口腔トリコモナスの生物学的性状—異物貪食作用, 低級脂肪酸産生および EB ウィルス抗原誘導能—。歯基礎誌 **33**:354-364, 1991.
- 10) Giesbrecht, P., Wecke, J. and Reinicke, B. : On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. Int. Rev. Cytol. **44** : 225-318, 1976.
- 11) Redai, I., Sebessy-Gonczy and Vaczi, L. : Effect of chloramphenicol on phospholipid synthesis in sensitive *Staphylococcus aureus* strains. Acta. microbiol. Acad. Sci. Hung. **19** : 187-193, 1972.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2nd ed. Approved Standard. NCCLS document M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Villanova, Pa.
- 13) Bulger, R.J. and Bulger, R.E. : Ultrastructure of small colony variants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **94** : 1244-1246, 1967.
- 14) Bulger, R.J., Collman, M. and Feigl, P. : A comparison of the ultrastructure of the small-colony variant and the parent strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis., **125** : 1-4, 1972.
- 15) Barber, M. : Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci. J. gen. Microbiol. **35** : 183-190, 1964.
- 16) 菅野治重：*mec A* 遺伝子の構造と機能。日本臨床 **50** : 1016-1019, 1992.
- 17) Hiramatsu, K., Kihara, H. and Yokota, T. : Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. **36** : 445-453, 1992.
- 18) Lorian, V., Atkinson, B., Waluschka, A. and Kim, Y. : Ultrastructure, *in vitro* and *in vivo*, of staphylococci exposed to antibiotics. Cur. Microbiol. **7** : 301-304, 1982.
- 19) Wale, L.J., Shelton, A.P. and Greenwood, D. : Scanning electron-microscopy of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* exposed to daptomycin. J. Med. Microbiol. **30** : 45-49, 1989.
- 20) Chambers, H.F., Hartman, B.J., and Tomasz, A. : Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. J. Clin. Invest. **76** : 325-331, 1985.
- 21) 庄司 聡, 菊池宏明, 渡辺 影, 本宮雅吉：MRSA の β -lactamase 産生能—MRSA と MSSA の比較—。日本臨床 **50** : 1049-1053, 1992.
- 22) 平松啓一：MRSA の分子遺伝学。日本臨床 **50** : 938-944, 1992.