

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の院内定着株と非定着株との間に細菌学的な性状の違いはない

北目文郎

山形大学医学部看護学科臨床看護学講座
(平成19年3月22日受理)

要 旨

病院内に長期間定着し、多くの患者から分離されるMRSAの定着株とそうではない非定着株が存在する理由を解明する目的で、両株の細菌学的性状を比較した。1995年9月から1999年7月までの間に山形大学医学部附属病院の5つの診療科で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の中から、院内定着株 (院内に長期間定着し、10名以上の患者から分離された同一DNA型の株) と非定着株 (院内に長期間定着せず、1～2名の患者からのみ分離された株) を任意に選び、両株の細菌学的性状を調べた。その結果、定着株と非定着株との間で、抗生物質感受性、消毒剤感受性、乾燥に対する抵抗性、組織培養細胞への吸着能およびバイオフィーム形成能に顕著な違いは認められなかった。

院内に長期間定着する株とそうでない株が存在する理由は分離株の表現型の違いに基づくのではなく、遺伝型の違いに基づいているのではないかと考えられた。

キーワード : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、定着、細菌学的性状

緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による院内感染は多くの医療施設が抱える解決すべき最も重要な課題の一つとなっている¹⁾。院内感染を根絶するためには、感染源の隔離と起因菌の伝播経路の遮断が最も有効であるとされ、そのためには当該起因菌の細菌学的性状と細菌分離の疫学的背景を各医療施設ごとに解析し、感染源と伝播経路を明らかにすることが必須とされている²⁾。

我々は、これまでに山形大学医学部附属病院における院内感染発生の有無や拡散規模の把握および感染経路の解明等を目的として、同病院検査部で分離されたMRSAの染色体DNAの型別解析を中心とした種々の解析を行い、MRSAの中には、同一クローンが10人以上の患者から長期間分離される定着株と、1～2人の患者から短期間しか分離されない非定着株が存在することを報告した³⁾。

MRSAの定着株と非定着株の細菌学的性状の違いや、それらの株が分離された疫学的な背景の違いを解析し、MRSAが院内に定着する要因

を明らかにできれば、MRSAの定着と拡散を最小限におさえる方策が見い出されるものと考えられる。

本研究は、MRSAの定着株と非定着株が存在する理由を解明する目的で、両株における抗生物質感受性、消毒剤感受性、乾燥に対する抵抗性、組織培養細胞への吸着能およびバイオフィーム形成能を比較検討したものである。

対象と方法

1. 被験菌と培養

1995年9月から1999年7月までの約4年間に山形大学医学部附属病院の5つの診療科の検査材料から分離された215株のMRSAの染色体

DNAの型別解析の結果に基づいて、定着株と判定した5種のDNA型に属する合計19株と、16種のDNA型の非定着株の中から任意に選んだ20株(表1)の凍結保存菌体を3mlの普通ブイヨン(日水製薬社)に接種し、37℃で20時間培養(90ストローク/分)した。

2. 抗生物質感受性試験

3濃度法⁴⁾を用いた。上記培養菌液を普通ブイヨンで1/1,000に調整した細菌浮遊液の6mlを60mlの2% NaCl加ミューラーヒントンS寒天培地(栄研化学社)と混釈して作成した含菌平板培地の表面に、各種薬剤をそれぞれ高、中、低濃度で含ませたトリディスク(栄研化学社)を載せ、37℃で20時間培養後、ディスク周囲に生じた発育阻止円の有無により、被験菌の抗生

表1. 対象MRSAのDNA型とコアグララーゼ血清型

定 着 株			非 定 着 株		
株 番 号	DNA型	Coagulase型	株 番 号	DNA型	Coagulase型
1	A1	II	20	A3	II
2	A1	II	21	A3	II
3	A1	II	22	A5	II
4	A1	II	23	A8	II
5	A2	II	24	B4	II
6	A2	II	25	B4	II
7	A2	II	26	B5	I
8	A2	II	27	B5	I
9	A4	II	28	B6	II
10	A4	II	29	B7	II
11	A4	II	30	C2	II
12	A4	II	31	C3	II
13	B1	II	32	C4	II
14	B1	II	33	C5	II
15	B1	II	34	C7	II
16	D1	II	35	C8	II
17	D1	II	36	D3	II
18	D1	II	37	D5	III
19	D1	II	38	D5	III
			39	D6	II

DNA型はMRSAの分与を受けた病院の感染制御部会の分類に基づく。コアグララーゼ血清型はブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研社)を用いて判定。

物質感受性を判定した。

本研究では、全ての濃度か、または高、中濃度で増殖が阻止された場合を感受性とし、全ての濃度か、または中、低濃度で増殖が阻止されなかった場合を耐性と判定した。なお、用いた抗生物質はオキサシリン (MPIPC)、アンピシリン (ABPC)、セフトジジム (CAZ)、ゲンタマイシン (GM)、トブラマイシン (TOB)、アミカシン (AMK)、アルベカシン (ABK)、エリスロマイシン (EM)、クリンダマイシン (CLM)、ミノサイクリン (MINO)、バンコマイシン (VCM)、シプロフロキサシン (CPFX) およびレボフロキサシン (LVFX) の13種類である。

3. 消毒剤感受性試験

Sasatuら⁵⁶⁾の方法に準じた。用いた消毒剤は、グルコン酸クロルヘキシジン液 (Chlorhexidine gluconate: CHG)、塩化ベンザルコニウム液 (Benzalkonium chloride: BAC)、クレゾール石鹼液 (Saponated cresol: SAC)、およびポビドンヨード液 (Povidon iodine: PVP-I) の4種類である。

(1) MIC (最小発育阻止濃度) 法

- ① 液体培地希釈法によるCHGとBACに対する感受性試験；ハートインヒュージョンブイオン (HIブイオン；日水製薬社) で各種濃度に調整した消毒剤を含むマイクロプレートの各wellに、上記培養菌液をHIブイオンで1/500に希釈した細菌浮遊液の10 μ lを滴下し、消毒剤と混和した。その後37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、被験菌の増殖の有無を肉眼で判定した。

- ② 寒天培地希釈法によるSACに対する感受性試験；消毒剤含有寒天平板培地を作成した後、これに上記細菌浮遊液を2 μ lずつ接種した。その後37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、被験菌の増殖の有無を肉眼で判定した。

(2) MBC (最小殺菌濃度) 法

滅菌生理食塩水で各種濃度に調整したPVP-I溶液の195 μ lを含むマイクロプレートの各well

に、上記培養菌液を滅菌生理食塩水で1/30に希釈した細菌浮遊液を5 μ lずつ滴下し、30秒間被験菌と消毒剤を接触させた後、その5 μ lを195 μ lの新鮮HIブイオン (PVP-Iの中和剤であるNa₂S₂O₃を0.0025%含有) を含むマイクロプレートの各wellへ添加した後、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、被験菌の増殖の有無を肉眼で判定した。

4. 乾燥に対する抵抗性

対象MRSAの中から任意に選んだ定着株 (株番号：1、6、16) と非定着株 (株番号：27、32、38) を用いた。上記培養液を1/1,000に希釈し、白衣 (ポリエステル65%、綿35%) を直径2 cmにくりぬいた布片1枚に20 μ lずつ滴下したものを1株あたり22枚用意し、室温下に静置した。その当日を0日とし、以後10日間毎日、各株あたり2枚の布片上の生存菌数を測定した。9 mlのHIブイオンに布片を入れ1分間攪拌した後、その100 μ lをマンニット食塩平板培地に塗り広げ、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、生じたコロニー数を布片上での生存菌数とした。布片上の生存菌数の検出限界は90 cells/布片であった。

5. 組織培養細胞への吸着能⁷⁾

培養細胞 (CV-1 Cell) の調整；24穴の組織培養用のプレートに抗生物質非添加のDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で10⁵cells/wellになるように測定の24時間前に接種し、炭酸ガス培養装置 (5%CO₂、100%相対湿度、37 $^{\circ}$ C) 中で1夜培養後、測定直前に培地を0.5 mlの血清非添加DMEM培地で置換した。

被検菌液の調整；普通ブイオン中で37 $^{\circ}$ C、20時間培養した定着株 (株番号：1、6、10、16) および非定着株 (株番号：27、28、32、33) それぞれ4株の菌体を温DMEMで洗浄し、同培地で希釈した。

吸着能の測定；単層 CV-1 Cell 上にMOI が約1~10になるように細菌浮遊液を加え、炭酸ガス培養装置 (5%CO₂、100%相対湿度、37 $^{\circ}$ C) 中で2時間培養後、未吸着の細菌細胞を1 mlの

DMEMで洗浄除去した。1 mlの氷冷蒸留水を加えて、4℃で15分間放置することでCV-1 Cellを溶解し、吸着した細菌細胞をCV-1 Cellの破壊物と共に回収した。回収液の10倍階段希釈液をマンニット食塩平板培地に接種し、37℃で24時間培養後、細胞に吸着した細菌数を求めた。

6. バイオフィーム形成能

バイオフィームを形成した細菌細胞はプラスチックに吸着するという性質を利用したMackらの方法⁸⁾に準拠して行った。Trypticase soy broth (TSB; Becton Dickinson社) 培地中で37℃、20時間培養した定着株 (19株) および非定着株 (20株) の培養菌液を新鮮TSB培地 (1% グルーコース添加) で1/100に希釈し、その0.15 mlを96穴のポリスチレン製平底マイクロプレート (IWAKI社) に接種し、37℃で24時間培養した。培養液を静かに吸引除去し、ウェル内を0.2 mlの生理食塩水で3回洗浄後、吸着した細胞を0.2 mlのゲンチアナバイオレット染色液で5分間染色した。過剰の染色液を流水で洗浄除去し、室温で10分間放置して乾燥させた後、0.2 mlのアルコールで色素を溶出し、600 nmにおける吸光度をEID Reader (Bio-Rad社、model

2550) で測定した。

結 果

1. 抗生物質と消毒剤に対する感受性

抗生物質感受性 (表2) では、アミノ配糖体のGM、TOB、AMKおよびABKに対する非定着株の耐性率が定着株よりやや高い (両者の差: 21.5~26.3%) という傾向が認められたが、その他の抗生物質に対する両株間の耐性率の差は、0.5~13.2%にとどまっていた。また、消毒剤感受性 (表3) では、両株間に有意な差は認められなかった。

2. 乾燥に対する抵抗性

ヒトの体外に排出され、白衣等に付着したMRSAの生存期間に定着株と非定着株間で違いがあるのか否かを知る目的で、白衣をくり抜いた布片に付着させたMRSAの生存菌数を経日的に調べ、生存日数を求めた (表4)。

その結果、定着株と非定着株を問わず、分離株ごとに異なる生存日数を示したが、定着株と非定着株それぞれの平均生存日数は定着株が

表2. 定着株と非定着株の抗生物質感受性

MRSA (株数)	平均耐性率 (%)													
	MPIPC	ABPC	CAZ	GM	TOB	AMK	ABK	EM	CLDM	MINO	VCM	COFX	LVFX	
定着株 (19)	100	95	100	47	100	68	0	90	84	11	0	68	58	
非定着株 (20)	100	90	500	80	100	95	0	100	100	15	0	50	50	

トリディスク (栄研化学社) を用いて判定。略号で示した抗生物質名は対象と方法に記載。

表3. 定着株と非定着株の消毒剤感受性

MRSA (株数)	平均MIC値 (μ g/ml)			平均MBC値 (μ g/ml)
	CHG	BAC	SAC	PVP-I
定着株 (19)	3.9	5.0	1105.3	707.4
非定着株 (20)	3.4	3.6	1043.8	469.0

略号で示した消毒剤名は対象と方法に記載。CHG、BACおよびPVP-Iに対する感受性は液体培地希釈法で、SACに対する感受性は寒天培地希釈法で測定。

MRSAの定着株と非定着株の細菌学的性状

5.8日、非定着株が6.5日であり、定着株の方が非定着株より生存期間が長いという傾向は認められなかった。

3. 組織培養細胞への吸着能

定着および非定着株それぞれ4株のCV-1細胞への吸着能を調べた結果を表5に示した。定着株と非定着株それぞれの平均吸着率は8.5%と5.4%であり、両株間で顕著な違いは認められなかった。

表4. 乾燥に対する抵抗性

MRSA		生存日数 (日)
株	分離株番号	
定着	1	5.5
	6	4.0
	16	8.0
	27	6.0
非定着	32	6.0
	38	7.5

布片に付着させた定着株と非定着株の生存菌数を経日的に10日間観察。

4. バイオフィーム形成能

定着株 (19株) と非定着株 (20株) のバイオフィーム形成能を調べた結果を図1に示した。定着株と非定着株それぞれの600 nmにおける吸光度の平均値は0.74と0.69であり、両株間で顕著な違いは認められなかった。

考 察

表5. 定着株と非定着株の組織培養細胞への吸着能

MRSA		接種菌数 (×10 ⁵)	吸着菌数 (×10 ⁵)	吸着率 (%)
株	株番号			
定着	1	17.0	1.8	10.6
	6	18.0	1.3	7.2
	10	15.0	1.9	12.7
	16	18.0	0.6	3.3
	27	39.0	2.2	5.6
非定着	28	18.0	1.8	10.0
	32	17.0	1.0	5.9
	33	7.4	0.01	0.1

単層CV-1CellにMOIが約1~10になるように細菌浮遊液を加え、2時間吸着させた。吸着した細菌数をマンニット食塩平板培地を用いて測定。

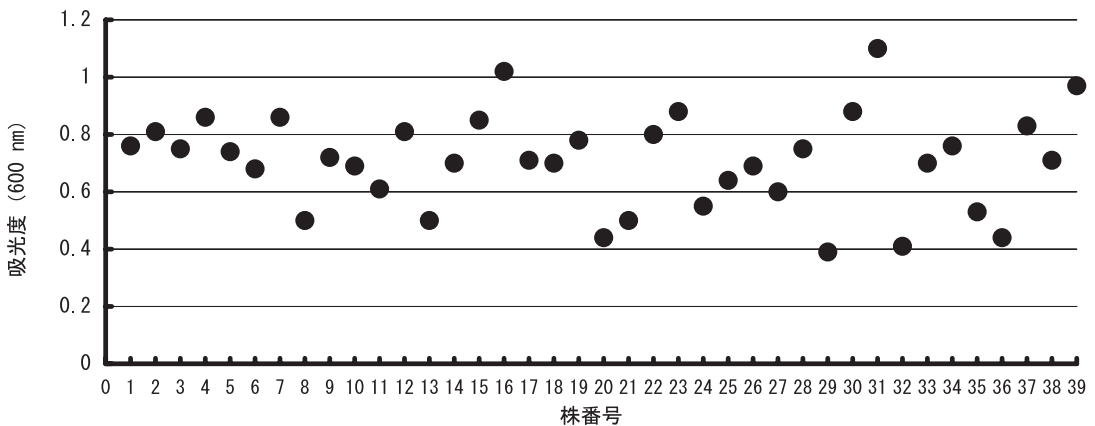


図1. 定着株と非定着株のバイオフィーム形成能

MRSAを96穴のポリスチレン製平底マイクロプレート (IWAKI社) のウエル中で培養後、ウエルの内壁に吸着した細胞をゲンチアナバイオレットで染色。細菌細胞から色素をアルコールで溶出し、吸光度を測定。

1. 抗生物質と消毒剤に対する感受性について

MRSAの中で、抗生物質に抵抗力のある株は感染予防対策に打ち勝ち定着株となり、抵抗力の弱い株は容易に駆逐され非定着株となるのではないかと考えられたが、抗生物質に抵抗性の株が定着株となるわけではないということが示唆された。4種のアミノ配糖体抗生物質に対する耐性率では、非定着株の方が定着株より高い傾向を示したが、この理由については今後、対象株数を増やして検証する必要がある。

また、消毒剤に抵抗性の株ほど除菌されにくく、院内に定着しやすいのではないかと考えられたが、両株間に有意な差は認められず、消毒剤感受性がMRSAの定着拡大には関与していないことが示唆された。このことから、MRSAの定着拡大を阻止するためには、手指消毒を中心とした現行の院内感染防止対策をより確実に実行することが重要であると思われる。

2. 乾燥に対する抵抗性について

乾燥条件下で長期間生存できる株の方がそうでない株より院内に定着しやすいのではないかと考えられたが、定着株の方が非定着株より乾燥条件下で長期間生存するという傾向は認められなかった。しかし、生存日数が株ごとにかなり幅があることが判明したので、対象株数を増やしてさらに検証する必要がある。

3. 組織培養細胞への吸着能について

細胞への親和性が高い株ほどヒトからヒトへの伝播がたやすいのではないかと考えたが、定着株の方が非定着株より組織培養細胞への親和性が高いという傾向は認められなかった。しかし、細胞への侵入の段階で両株間に違いがあるのか否かについては今後の課題である。

4. バイオフィーム形成能について

バイオフィーム形成能が高い株は宿主の感染防御機構を免れて、宿主の体内に長期間定着し、院内におけるMRSAの供給源となっているのではないかと考えられたが、定着株の方が非定着株よりバイオフィーム形成能が高いという傾向は認められなかった。

5. 定着株と非定着株が存在する理由

臨床の現場で分離されるMRSAに定着株と非定着株が存在する理由としては、MRSAを取り巻く環境因子（各診療科で使用する消毒剤の種類や繁用されている抗生物質の違い、並びにMRSAが分離された疫学的な背景）とMRSA側の因子（表現型や遺伝型の違い）のいずれか、またはそれらの両方に基づくのではないかと考えられる。

各診療科で使用する消毒剤の種類や繁用されている抗生物質、並びにMRSAが分離された疫学的な背景が全く同一ではないにも拘わらず、いずれの診療科においても定着株と非定着株が存在し、両株の分離頻度に極端な違いが認められない³⁾ことは定着株と非定着株が存在する理由を環境因子に求めることは困難である。

本研究では、MRSA側の因子として表現型の違いに焦点を絞り、両株間における細菌学的な性状の違いを比較したが、少なくとも定着または比定着と関連づけられる細菌学的性状の明確な違いを見出すことができなかった。

MRSAはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌にmec DNAが挿入されたものであるが、mec DNAには種々の変異による複数のタイプが存在するので⁹⁾、挿入されたmec DNAのタイプによっては生じたMRSAの安定性が影響を受けるのではないかと考えられる。すなわち、挿入されるmec DNAの安定性がMRSAの安定性を規定し、遺伝子の構造上安定なMRSAは定着株として長期間存在するが、不安定なMRSAは一時期検出はされるものの、その後消失するので、非定着株として認識されるのではないかと考えられるので、今後の研究課題としたい。

なお、MRSAが分離された疫学的な背景の違いが定着株と非定着株をもたらしている可能性を検証する目的で、患者の性別、年齢、原疾患、分離材料および入院期間に関する情報を診療記録に基づいて比較したが、両株それぞれに特徴的な関連因子は見あたらなかった（未発表）。

謝 辞

看護学科の卒業研究として、実験の一部を担当して下さいました宇都宮マチ子氏、菊地菜穂子氏および新井寿子氏に深謝すると共に、本研究をまとめるにあたりご指導とご協力を賜りました本学部の教職員各位に深謝します。

文 献

1. Guiguet M, Rekacewicz C, Leclereq B, Brun Y, Escudeir B, Andreumont A: Effectiveness of simple measures to control and outbreak of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990; 11: 23-26
2. Garner j S: The CDC hospital infection control practices advisory committee. *Am J Infect Control* 1993; 21: 160-162
3. 大堀直美, 北目文郎: 大学病院におけるメチリン耐性黄色ブドウ球菌による院内感染の細菌学的ならびに疫学的解析. *環境感染* 2000; 15: 295-305
4. 五島瑛智子: 感受性ディスクー3濃度法の理論と読み取り方ー. *臨床と細菌* 1976; 3: 287-290
5. Sasatsu M, Shimizu K, Noguchi N, Kono M: Evaluation of antiseptics by the modified phenol coefficient method; sensitivity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 136-138
6. Sasatsu M, Shimizu K, Noguchi N, Kono M: Substrates and inhibitors of antiseptic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 163-165
7. Jadoun J, Ozeri V, Burstein E, Skutelsky E, Hanski E, Sela S: Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into Epithelial cells. *J Infectious Diseases* 1998; 178: 147-158
8. Mack D, Siemssen N, Laufs R: Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* 1992; 60: 2048-2057
9. 近藤典子, 伊藤輝代, 平松啓一: MRSAの分子疫学の遺伝学的基礎. *日本細菌学雑誌* 1997; 52: 417-434

There is no difference of bacteriological natures between colonized and noncolonized strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital

Fumio Kitame

*Division of Clinical Nursing, Department of Nursing,
Yamagata University School of Medicine, Yamagata, 990-9585, Japan*

ABSTRACT

To elucidate the reason why the colonized and non-colonized strain exist in MRSA isolated in the hospital, bacteriological natures of the both strains were compared.

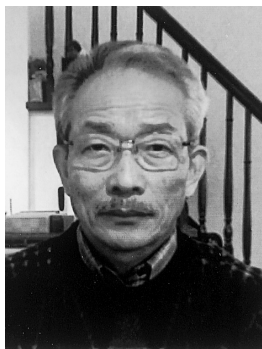
The colonized (strain that colonized in the hospital for a long term, and strain of same DNA type isolated from ten patients or more) and non-colonized (strain that was not colonized in the hospital for a long term, and isolated only from one or two patient) strain were arbitrarily chosen from among MRSA that had been isolated from September, 1995 to July, 1999 by five diagnosis and treatment departments of Yamagata university hospital.

As a result, a remarkable difference was not seen in susceptibility to antibiotics and to disinfectants, resistance to dryness on cloth, ability of adhesion to tissue culture cell, and ability of biofilm formation on plastic plate between the colonized and non-colonized strain.

As for the reason where a strain colonized in the hospital for a long term and a strain not so existed, it was not based on the difference of the phenotype of the MRSA but was thought based on the difference of the genotype.

Key words : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Colonaization, Bacteriological nature

看護学科臨床看護学講座



北目文郎 教授

略 歴

- | | |
|----------|-------------------|
| 1941年 5月 | 宮城県仙台市に生まれる |
| 1960年 3月 | 宮城県仙台第一高等学校卒業 |
| 1961年 4月 | 東北大学医学部薬学科入学 |
| 1965年 3月 | 東北大学医学部薬学科卒業 |
| 1965年 4月 | 帝国臓器製薬（株）研究部入社 |
| 1970年 2月 | 東北大学医学部細菌学講座 研究従事 |
| 1970年 4月 | 東北大学医学部研究生 |
| 1970年12月 | 東北大学医学部教務補佐員 |
| 1971年 6月 | 東北大学医学部細菌学講座助手 |
| 1978年 9月 | 山形大学医学部細菌学講座助教授 |
| 1983年 1月 | 米国CDC研究所留学 |
| 1994年 7月 | 山形大学医学部看護学科教授 |
| 2007年 3月 | 山形大学医学部看護学科教授定年退職 |