

# メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の 増殖を抑制するブドウ球菌の性状

*Characteristics of Staphylococcus sp. Inhibitive Growth of Methicillin Resistant  
Staphylococcus aureus (MRSA)*

古畑 勝則<sup>1</sup>, 堂ヶ崎知格<sup>1</sup>, 原 元宣<sup>2</sup>, 福山 正文<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 麻布大学・環境保健学部, <sup>2</sup> 麻布大学・獣医学部  
〒 229-8501 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

Katsunori FURUHATA<sup>1</sup>, Chikaku DOGASAKI<sup>1</sup>, Motonobu HARA<sup>2</sup>, and Masafumi FUKUYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Environmental Health, Azabu University and <sup>2</sup> School of Veterinary Medicine,  
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

**Abstract.** As a result of screening 380 strains of *Staphylococcus* spp. isolated from the nasal cavity for growth inhibition of MRSA, two strains were shown to inhibit the growth of MRSA. The biochemical properties of these strains were investigated. The API codes of the strains were 266022210 and 166032210, and both were identified to be *S.epidermidis*. Both strains showed alkaline phosphatase and  $\alpha$ -glucosidase activities, but no constitutive enzymes specific to MRSA growth-inhibiting bacteria were detected. In a susceptibility test of 15 drugs for MRSA growth-inhibiting bacteria, neither bacterium showed marked resistance to any of the drugs, showing that these MRSA growth-inhibiting bacteria are not resistant strains. MRSA was inoculated into the filtrate of the MRSA growth-inhibiting bacteria, and the time-course MRSA counts largely differed depending on the inoculation count, and the filtrate of the MRSA growth-inhibiting bacteria had antibacterial effects on MRSA at low bacteria concentration.

**Key words:** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Growth inhibitory action, *Staphylococcus epidermidis*

## 緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)は,  $\beta$ -ラクタム系薬の作用点であるペニシリン結合蛋白(PBP)が変化し, 新しいPBP2'が出現して耐性化したものであり, そのうえ, 複数の修飾酵素によって多剤耐性となることが少なくない<sup>1)</sup>。

近年, MRSAは院内感染の原因菌として社会的に

も注目されており, 各病院では種々の対策を講じている<sup>2,3)</sup>。しかし, その感染源や感染経路を特定することは困難であり, 対応に苦慮しているのが実情である。

MRSAの感染防止には消毒が重要であり, 消毒剤の適正な使用によってMRSAを蔓延させないことが対策の第一歩と考えられていることから, MRSAに対する各種消毒剤の殺菌効果に関する報告が多数なされている<sup>4,5)</sup>。しかしながら, 微生物を化学物質で

封じ込めようとする対策では抗生物質と同様に MRSA が耐性化する可能性が危惧される。

これらのことから、久保ら<sup>6)</sup>は化学療法とはまったく異なる微生物作用の観点から MRSA の増殖抑制菌を分離して抗菌活性物質の検索を行い、ブドウ球菌が産生するバクテリオシンであろうと考えている。著者らも MRSA 増殖抑制菌を利用した MRSA 感染症対策を講ずることを最終目的として、健康な人の鼻腔から分離したブドウ球菌を用いて MRSA に対する増殖抑制能を検討したところ、MRSA に対する増殖抑制菌が分離されたので、その菌株の性状について報告する。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

MRSA は東京都立衛生研究所から分与していただいた患者由来株 10 株 (TEME331A, 336B, 339C, 340D, 343E, 352F, 357G, 368H, 373I, 382J 株) を用いた。MRSA 増殖抑制試験は、1999 年 9 月から 12 月にかけて健康な人の鼻腔から分離し、一次同定<sup>7)</sup>によりブドウ球菌と同定した 380 株について行った。また、理化学研究所から分与された標準株 *S. epidermidis* JCM2414 株を性状比較のために使用した。

### 2. MRSA 増殖抑制試験

各 MRSA 株を Heart Infusion Broth (HIB, Difco) で 37℃, 24 時間培養後、Heart Infusion Agar (HIA, Difco) にそれぞれ 300  $\mu$ l ずつ滴下し、コンラージ棒で角形平板培地全面に塗抹した。この平板上に滅菌した薬剤感受性試験用ペーパーディスク (直径 8 mm, 厚さ 1.5 mm, アドバンテック東洋(株)) をのせ、これに HIB で 37℃, 24 時間培養した各供試菌液を 50  $\mu$ l ずつ滴下し、37℃で 48 時間培養後、ディスク周囲を観察して阻止円の有無を判定した。

### 3. MRSA 増殖抑制菌の性状試験

#### 1) 生化学的性状試験

MRSA に対する増殖抑制を認めた菌株の生化学的性状試験は、ID32 スタフアピ (日本ビオメリュー(株)) を用い、使用書に準じて行った。この成績をもとにアピラボソフトによってコード解析を行い同定した。

#### 2) 構成酵素試験

構成酵素活性試験はアピザイム (日本ビオメリュー(株)) を用い、使用書に準じて行った。判定は試薬の発色度合いにより -, 1+, 2+, 3+ の 4 段階とした。

#### 3) 薬剤感受性試験

日本化学療法学会標準法<sup>8)</sup>に準じた寒天平板希釈法により MIC 値を測定した。供試薬剤は、オキサシリン (MPIPC, SIGMA), アンピシリン (ABPC, SIGMA), セファロリジン (CER, SIGMA), セフチゾキシム (CZX, 藤沢薬品工業(株)), セフメタゾール (CMZ, 三共(株)), ラタモキシフ (LMOX, 塩野義製薬(株)), ストレプトマイシン (SM, 和光純薬工業(株)), カナマイシン (KM, SIGMA), ゲンタマイシン (GM, シェリング・プラウ(株)), エリスロマイシン (EM, 和光純薬工業(株)), リンコマイシン (LCM, SIGMA), テトラサイクリン (TC, 和光純薬工業(株)), クロラムフェニコール (CP, SIGMA), バンコマイシン (VCM, SIGMA), ノルフロキサシン (NFLX, SIGMA) の計 15 薬剤である。

#### 4. MRSA 増殖抑制菌の培養ろ液における MRSA の消長

供試した培養ろ液は、MRSA 増殖抑制菌を 1,000ml の HIB で 37℃, 24 時間培養し、この培養液をポアサイズ 0.22  $\mu$ m, 直径 47 mm のメンブランフィルター (日本ミリポア(株)) でろ過滅菌して作製した。また、接種菌液は MRSA を HIA で 37℃, 24 時間培養後、菌苔をかき取って滅菌生理食塩水に入れ、McFarland No.1 (約  $10^8$  CFU/ml) 相当に調製した。この菌液を適宜希釈後、MRSA 増殖抑制菌のろ液の中に  $10^3$  CFU/ml あるいは  $10^5$  CFU/ml になるように接種した。これを 37℃に放置し、24 時間および 48 時間経過後に試料を取って適宜希釈後、0.1 ml を HIA に滴下して培地全面に塗抹してから 37℃で 24 時間培養後、MRSA の菌数を測定した。

## 結 果

### 1. MRSA の増殖を抑制するブドウ球菌

健康な人の鼻腔から分離したブドウ球菌 380 株について MRSA に対する増殖抑制能を検討した。Fig. 1

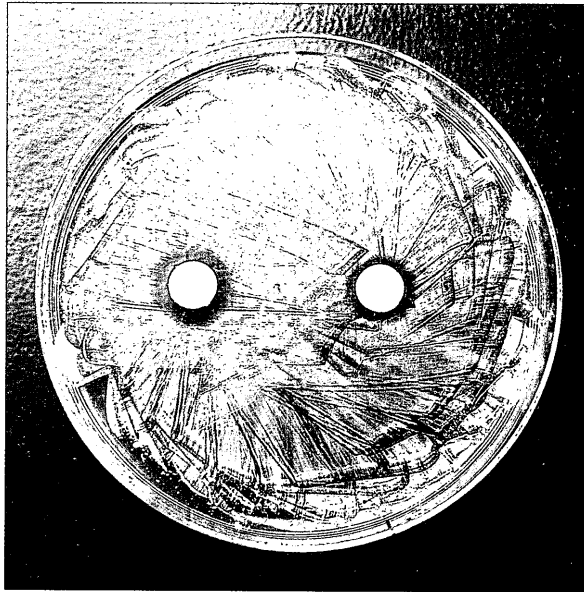


Fig. 1. Growth inhibitive action of *Staphylococcus* sp. against MRSA (TEME368H)

Left: YMNN2030 strain, Right: YMNN2034 strain

に示したように YMNN2030 株と YMNN2034 株の 2 株が MRSA の TEME368H 株に対し、ディスク周囲に明らかな阻止円が認められ、両菌株は MRSA の増殖を抑制することが判明した。

また、Table 1 には両株の MRSA 10 株に対する増殖抑制能を阻止円の大きさを示した。YMNN2030 株は供試した 10 株中 7 株に対して阻止円を形成し、なかでも TEME339C と TEME368H に対して形成した阻止円が最も大きく、13 mm であった。YMNN2034 株は供試した 10 株中 5 株に対して阻止円の形成がみられたが、YMNN2030 株に比べやや阻止率が低く、また最大阻止円も 12 mm と小さかった。

## 2. MRSA 増殖抑制菌の性状

### 1) 生化学的性状による同定

MRSA の増殖を抑制するブドウ球菌を同定するために同定用キットを用いて 26 項目の生化学的性状試験を行った結果を Table 2 に示した。分離株 YMNN2030 と YMNN2034 ではウレアーゼ、アルギニンジヒドロラーゼ、硝酸塩還元の 3 項目で性状が異なったものの、同定コードはそれぞれ 266022210、166032210 であり、いずれも *S.epidermidis* と同定され

Table 1. Growth inhibitive action of *Staphylococcus* sp. against MRSA

MRSA No.	Isolated strains	
	YMNN2030	YMNN2034
TEME 331A	11* <sup>1</sup>	11
336B	10	10
339C	13	12
340D	—* <sup>2</sup>	—
343E	—	—
352F	10	—
357G	12	11
368H	13	12
373I	—	—
382J	10	—

\*1: Size of the inhibition zones (mm)

\*2: No forming the inhibition zones

た。また、同時に試験した標準株 *S.epidermidis* JCM 2414 株の性状と比較しても、YMNN2030 株ではウレアーゼと硝酸塩還元が、YMNN2034 株ではアルギニンジヒドロラーゼの性状が異なったに過ぎなかった。

### 2) 構成酵素活性

MRSA 増殖抑制菌と増殖抑制能を持たない標準株 *S.epidermidis* JCM 2414 株について 18 種類の構成酵素活性を比較した結果を Table 3 に示した。

分離株の YMNN2030 株と YMNN2034 株が活性を示した構成酵素は、18 種類中アルカリホスファターゼ、エステラーゼリパーゼ、酸性ホスファターゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの 4 種類であり、ホスホアミダーゼは YMNN2034 株のみが活性を示した。これらはいずれも 2 + (遊離基質量約 20 mol) 以下の弱い活性であった。同時に試験した標準株 *S.epidermidis* JCM 2414 株の活性もこれらの増殖抑制菌とまったく同一であり、MRSA 増殖抑制菌特有の構成酵素活性はみられなかった。

### 3) 薬剤感受性

MRSA 増殖抑制菌の薬剤感受性を検討するために 15 薬剤を用いて両菌株の MIC 値を測定し、その結果を Table 4 に示した。

供試した YMNN2030 株と YMNN2034 株の両菌株はいずれの薬剤に対しても耐性は認められなかった。最も感受性が低かったのはラタモキセフで MIC 値はそれぞれ 6.25 と 3.13 であった。また、最も感受性が

Table 2. Characteristics of *Staphylococcus* sp. inhibitive the Growth of MRSA

Test		Isolated strains		<i>S.epidermidis</i>
		YMNN2030	YMNN2034	JCM2414
Urease	URE	-	+	+
Arginine dihydrolase	ADH	+	-	+
Ornithine decarboxylase	ODC	-	-	-
Esculin	ESC	-	-	-
Glucose	GLU	+	+	+
Fructose	FRU	+	+	+
D-mannose	MNE	-	-	-
D-maltose	MAL	+	+	+
Lactose	LAC	+	+	+
Trehalose	TRE	-	-	-
D-mannitol	MAN	-	-	-
Raffinose	RAF	-	-	-
Nitrate	NIT	-	+	+
Acetoin	VP	+	+	+
$\beta$ -Galactosidase	$\beta$ GAL	-	-	-
Arginine arylamidase	ArgA	-	-	-
Phosphatase alkaline	PAL	+	+	+
Pyrolydonyl arylamidase	PyrA	-	-	-
Novobiocin	NOVO	-	-	-
Saccharose	SAC	+	+	+
N-acetylglucosamine	NAG	-	-	-
D-Turanose	TUR	+	+	+
L-Arabinose	ARA	-	-	-
$\beta$ -Glucuronidase	$\beta$ GUR	-	-	-
D-Ribose	RIB	-	-	-
D-Cellobiose	CEL	-	-	-
API code		266022210	166032210	366032210
Identification		<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>
% ID		98.6	93.0	98.0

高かったのはセファロリジンで MIC 値はそれぞれ 0.05 と 0.025 であった。これらの感受性を標準株 *S.epidermidis* JCM 2414 株の結果と比較したが大差はなく、MRSA 増殖抑制菌は耐性株でないことが明らかになった。

### 3. MRSA 増殖抑制菌の培養ろ液中に接種した MRSA の経時的消長

MRSA 増殖抑制菌 YMNN2030 株の培養ろ液中に MRSATEME339C, TEME357G および TEME368H の 3 株を接種したときの経時的消長を Fig. 2 に示した。初期接種菌量が  $10^3$  CFU/ml の低レベルでは、24 時間経過後には TEME339C 株と TEME368H 株は、それぞれ  $4.6 \times 10^2$  CFU/ml,  $3.0 \times 10^1$  CFU/ml に減少したが、TEME357G 株は  $5.8 \times 10^3$  CFU/ml でほとんど変

化はなかった。48 時間経過すると、TEME368H 株はさらに減少して検出されなくなった。また、TEME339C 株と TEME357G 株はそれぞれ  $1.5 \times 10^2$  CFU/ml,  $3.3 \times 10^3$  CFU/ml でわずかな減少傾向がみられた。ところが、初期接種菌量を  $10^5$  CFU/ml の高レベルにすると、24 時間経過後には TEME368H 株は  $2.5 \times 10^4$  CFU/ml に減少したが、TEME339C 株は  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml で変化はなく、TEME357G 株は  $4.6 \times 10^7$  CFU/ml に増加した。さらに 24 時間経過すると、TEME339C 株、TEME357G 株および EME368H 株はそれぞれ  $2.6 \times 10^8$  CFU/ml,  $2.9 \times 10^7$  CFU/ml,  $2.1 \times 10^8$  CFU/ml に増加した。

なお、MRSA 増殖抑制能を持たない *S.epidermidis* JCM 2414 標準株の培養ろ液を対照として各 MRSA 株を接種した場合、初期接種菌量の  $10^3$  CFU/ml は 24 時

**Table 3. Enzymatic activities of *Staphylococcus* sp. inhibitive the growth of MRSA**

Constitutive enzymes	Isolated strains		<i>S.epidermidis</i>
	YMNN2030	YMNN2034	JCM2414
Phosphatase alkaline	2 +*	2 +	2 +
Esterase Lipase	1 +	1 +	1 +
Lipase	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-
Valine arylamidase	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-
Trypsin	-	-	-
Chymotrypsin	-	-	-
Phosphatase acid	2 +	2 +	3 +
Phosphoamidase	-	1 +	-
$\alpha$ -Galactosidase	-	-	-
$\beta$ -Galactosidase	-	-	-
$\beta$ -Glucuronidase	-	-	-
$\alpha$ -Glucosidase	1 +	1 +	1 +
$\beta$ -Glucosidase	-	-	-
<i>N</i> -acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	-	-
$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-
$\alpha$ -Fucosidase	-	-	-

\*: Quantity of hydrolysed substrate; 3+: 40 nmol, 2+: 20 nmol, 1+: 5 nmol

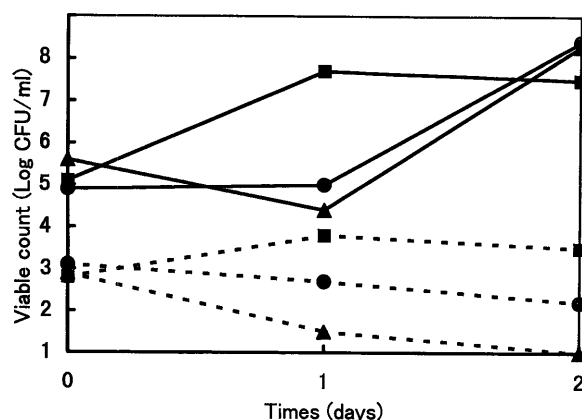
**Table 4. Drug susceptibilities of *Staphylococcus* sp. inhibitive the growth of MRSA**

Drugs	Isolated strains		<i>S.epidermidis</i>
	YMNN2030	YMNN2034	JCM2414
Oxacillin (MIPIC)	0.1*	0.2	0.2
Ampicillin (ABPC)	0.39	0.2	0.2
Cephaloridine (CER)	0.05	0.025	0.025
Ceftizoxime (CZX)	0.78	0.2	0.39
Cefmetazole (CMZ)	1.56	0.78	1.56
Latamoxef (LMOX)	6.25	3.13	6.25
Streptomycin (SM)	0.78	3.13	1.56
Kanamycin (KM)	0.39	0.78	0.39
Gentamicin (GM)	0.1	0.2	0.1
Erythromycin (EM)	1.56	1.56	1.56
Lincomycin (LCM)	0.39	0.39	0.39
Tetracycline (TC)	0.2	1.56	0.2
Chloramphenicol (CP)	3.13	3.13	3.13
Vancomycin (VCM)	0.78	0.78	0.78
Norfloxacin (NFLX)	1.56	1.56	1.56

\*: MIC values ( $\mu\text{g/ml}$ )

間経過後にはおよそ  $10^9$  CFU/ml に増加し、48 時間経過しても菌量に大きな変化はなかった。

以上のように、初期接種菌量によって MRSA の経時的消長は大きく異なったが、初期接種菌量が  $10^3$  CFU/ml のレベルをみる限りでは、MRSA 増殖抑制菌 YMNN2030 株の培養ろ液は MRSA に対して殺菌的あ

**Fig. 1. Change of MRSA counts in the filtrate of *S.epidermidis* YMNN2030 strain**

●: TEME339C strain, ■: TEME357G strain, ▲: TEME368H strain

るいは静菌的に作用することが明らかになった。

## 考 察

ブドウ球菌の微生物増殖抑制作用は、ブドウ球菌感染のコントロールに古くから利用され、その有効性が評価されている。

Shinefield ら<sup>9)</sup>は、1963年に比較的病原性の弱い *S. aureus* を用いて鼻粘膜や出産直後の臍帯で人工的にコロニーを形成させることによって、1960年代初頭に乳児施設において罹患率や致死率の高い疾病の原因となった病原性の強い *S. aureus* による感染から新生児を守ることができたと報告している。また、Speck ら<sup>10)</sup>は、1978年に新生児の臍帯や鼻咽頭について生後3日目、14日目、42日目に菌叢を調べたところ、*S. aureus* か *S. epidermidis* のどちらかですでにコロニーが形成されていれば、他のブドウ球菌の感染を防御できるとしている。これらの報告は非病原性ブドウ球菌でコロニー化しておけば MRSA による感染を阻止できる可能性を示唆しているものである。

今回、著者らが健康な人の鼻腔から分離した *S. epidermidis* は明らかに MRSA の増殖を抑制し、菌数のレベルによっては殺菌的に作用することが判明した。また、これらの分離株は汎用化学療法剤に感受性であることが明らかになった。これらのことから、今回分離した MRSA 増殖抑制菌がヒトに対して強い病原性がないことを再度確認した上で、将来的には MRSA 保菌者に接種して定着させることにより MRSA と置換し、非キャリアー化できる可能性があると考えられた。

久保らも同様の目的から MRSA 増殖抑制菌を分離同定したところ、*S. lugdunensis* と *S. warneri* であったと報告している<sup>6)</sup>。著者らは *S. epidermidis* に MRSA 増殖抑制能を見いだしていることから、MRSA の増殖を抑制する性質は菌種に特定されず、菌株レベルでの相互作用であることが考えられた。また、久保らは分離株が産生する抗菌性物質の検索を行い、溶菌活性があるバクテリオシンであろうと推察しているが、物質の特定までは至っていない。著者らが分離した MRSA 増殖抑制菌である *S. epidermidis* の培養液に殺菌または抗菌活性が認められたことから、菌体外物質が関与しているものと考えられ、久保らの報告<sup>6)</sup>と同様な物質を産生している可能性はあるが、この点については今後の検討を要する。

以上のように、今回、MRSA に対して増殖を抑制するブドウ球菌を分離することに成功した。今後は、増殖抑制に関与している物質の解明や保菌者からの MRSA の排除、あるいはブドウ球菌感染症による皮

膚疾患に応用して症状が改善されるか検討していく予定である。

## 結 語

MRSA に対して増殖抑制能を有する *S. epidermidis* 2株を分離した。両菌株の構成酵素活性を調べたが、増殖抑制菌特有の活性はみられなかった。また、両菌株の薬剤感受性試験では耐性はみられず、MRSA 増殖抑制菌は耐性株でないことがわかった。増殖抑制菌の培養液中に MRSA を接種して経時的に菌数変動を検討したところ、初期接種菌量によって MRSA の消長は大きく異なったが、低濃度菌量 ( $10^3$  CFU/ml) では MRSA は減少傾向を示した。

今後は、この MRSA 増殖抑制菌の皮膚への定着性や他の微生物との相互作用を検討しながら、MRSA 感染症対策への利用可能性を探っていきたい。

## 謝 辞

本研究に際し、臨床由来 MRSA 株を分与していただいた東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科、遠藤美代子主任研究員に深く感謝いたします。

なお、本研究の概要は日本防菌防黴学会第27回年次大会(東京)において発表した。

## 文 献

- 1) 紺野昌俊, 他: 感染症誌, **59**, 1029-1040 (1985).
- 2) 小林寛伊: 外科診療, **34**, 161-169 (1992).
- 3) 金子明寛, 他: 環境感染, **7**, 15-20 (1992).
- 4) 城野久美子: 防菌防黴, **19**, 67-78 (1991).
- 5) 国定孝夫, 他: 環境感染, **14**, 142-147 (1999).
- 6) 久保真利子, 名護 博: 臨床と微生物, **26**, 221-222 (1999).
- 7) 坂崎利一監訳: 医学細菌同定の手引き(第3版), 近代出版, 東京 (1993).
- 8) 日本化学療法学会: Chemotherapy, **29**, 76-79 (1981).
- 9) Shinefield, H.R., et al.: Am. J. Dis. Child., **105**, 646-682 (1963).
- 10) Speck, W.T., et al.: J. Clin. Pathol., **31**, 153-155 (1978).