

臨床由来マクロライド耐性ブドウ球菌の顕微科学的解析

Ultrastructural Analysis of Macrolide-Resistant Staphylococci Isolated from Patients with Transmission Electron Microscopy

兵 行義^a, 山田 作夫^{b, c}, 原田 保^a

Yukiyoshi Hyo, Sakuo Yamada and Tamotsu Harada

^a 川崎医科大学耳鼻咽喉科^b 川崎医科大学微生物学^c 川崎医療福祉大臨床栄養学科

要 旨 14 員環マクロライド系抗菌薬（マクロライド）は臨床的に広く用いられる抗菌薬であるが、近年、抗療療法以外の少量長期療法にも頻用されていることから、マクロライド耐性菌の増加が危惧されている。我々は、慢性副鼻腔炎の患者から分離したマクロライド耐性 *Staphylococcus capitis* および臨床由来マクロライド耐性表皮ブドウ球菌を対象に超微形態的に観察したところ、これらの耐性株が細胞壁肥厚という特徴を有していることを見出すことができた。さらに、マクロライド耐性 *S. capitis* は従来報告されている 4 種のマクロライド耐性遺伝子のいずれをも保有せず、またマクロライド耐性表皮ブドウ球菌においても、4 種のいずれの耐性遺伝子を保有しても同程度の細胞壁肥厚という形態的特徴を呈することが判明し、細胞壁肥厚に関連する新たなマクロライド耐性メカニズムの存在することが示唆された。

キーワード：マクロライド、ブドウ球菌、超微形態、抗菌薬耐性

1. はじめに

エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどを初めとする 14 員環マクロライド系抗菌薬（マクロライド）は主にグラム陽性球菌に対して抗菌作用を有し、さらにクラミジア感染やマイコプラズマ感染による非定型肺炎や非結核性好酸菌症などの治療薬として現在広く使われている。しかしながら、マクロライドは現在では抗菌薬としての作用だけでなく、宿主に対する別の作用を発揮することが明らかになってきた¹⁾。1984 年、工藤ら²⁾ が慢性汎細気管支炎患者に対しエリスロマイシン投与により症状の改善がもたらされたことを報告したのを初めとし、さらに洲崎ら³⁾ は慢性副鼻腔炎患者にもマクロライド少量療法が有効であることを明らかにした。このような事例に基づいて、慢性副鼻腔炎の治療におけるマクロライド少量長期療法が確立され副鼻腔炎の診療の手引き⁴⁾ にも掲載されるに至っている。このようにマクロライドの使用頻度が高まっているだけでなく、使用期間の長期化も伴うことからマクロライドに対する細菌の耐性化率は増加している⁵⁾ のが現状で、治療も含めマクロライド耐性菌の細菌学的性状について注目が集まっている。

近年我々は、慢性副鼻腔炎治療として 3 か月間マクロライド少量長期療法を施行し、症状の改善が認められなかった患者から、手術施行時にマクロライド耐性ブドウ球菌を分離することができたことから、本分離菌の細菌学的性状を明らかにすることを最終目的に顕微科学的に解析を試みたところ、超微形態的な特徴を有することを明らかにすることができた。本稿では本分離菌も含めて臨床由来マクロライド耐性表皮ブドウ球菌についても主に顕微科学的に解析した成績について紹介する。

2. 材料と方法

2.1 材料

慢性副鼻腔炎患者に対して、内視鏡下副鼻腔手術を施行した際上顎洞内の膿汁を採取、クラリスロマイシン（2 μg/ml）を含有したブレインハートインフュージョン寒天平板培地（日水）にて 18 時間 37°C 培養した。その結果、生じたコロニーを純培養後、Api-staph（BioMerieux, France）で鑑別したところ、*Staphylococcus capitis* と同定できたことから、本菌株を *S. capitis* NH 株とした。また、標準株として岐阜大学から譲渡された *S. capitis* GTC287 株、さらに臨床由来マクロライド感受性 *S. capitis* として本学附属病院中央検査部から譲渡された CKW 株を実験に供した。一方、表皮ブドウ球菌については本学附属病院中央検査部から分与された外来患者由来の 48 菌株を実験対象とした。

¹ 〒 701-0192 倉敷市松島 577

TEL: 086-462-1111

E-mail: yuki-hyo@med.kawasaki-m.ac.jp

2010 年 8 月 26 日受付

2.2 最小発育阻止濃度の測定

各種抗菌薬の対象菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC: minimal inhibitory concentration) は日本化学療法学会の標準法に準じて求めた。

2.3 PCR 法による既知の耐性遺伝子の保有の有無

既にブドウ球菌によるマクロライドに対する耐性機構は、標的リボゾームの変異をもたらす *erm A*, *erm B* および *erm C* の3遺伝子と、さらに薬剤排出ポンプの亢進をもたらす *msr A* の計4種の遺伝子が知られている⁷⁾。そこで、今回対象とした *S. capitis* の3菌株がいかなる耐性機構を有するかを明らかにするために、これら菌株におけるマクロライド耐性遺伝子保有の有無について、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法により検出した。また、表皮ブドウ球菌についても同様にPCR法にて耐性遺伝子について検索した。

2.4 菌体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察ならびに細胞壁厚さの測定

37°Cで18時間以上培養した菌体を集菌 (1,250×g, 15分) し、同条件でPBS(-)を用いて二回遠心洗浄して得られた菌体を、2.5%グルタルアルデヒド並びに1% OsO₄ で固定後、洗浄してエタノール脱水し、Spurr樹脂にて包埋した。得られたブロックを対象にウルトラミクロトームにて超薄切片を作製し、TEM (JEM2000EXII) にて観察した。観察後得られたネガフィルム (×25000) を用いて、赤道面で切片化されている菌体を20菌体を選び、一つの菌体につき3方向で細胞壁厚さを測定し、集計してその菌株の細胞壁厚さとした。

3. 結果

3.1 *S. capitis* の抗菌薬感受性

S. capitis 3菌株の各種抗菌薬感受性をMICを求めて検索したところ、今回分離できたNH株に対するマクロライドの一つであるエリスロマイシンのMICは128 μg/mL以上と高

度耐性であることが確認でき、他の抗菌薬に関しては感受性を示すことが明らかとなった。*S. capitis* GTC287株およびCKWの両菌株はマクロライドに感受性であった。

3.2 *S. capitis* のマクロライド耐性遺伝子保有の有無

耐性遺伝子保有の有無について検討した結果、NH株、CKW株、GTC287株の3菌株ともに16S rRNAは確認できたが、従来報告されているマクロライド耐性耐性遺伝子についてはいずれも保有していないことが認められた。

3.3 *S. capitis* の超微形態構造

今回対象とした3菌株をTEM観察した結果、マクロライド耐性株であるNH株ではマクロライド感受性株GTC287株およびCKW株よりも細胞壁が肥厚しているという特徴ある超微形態像を観察することができた (図1)。そこで細胞壁厚さを測定して集計した結果、NH株の細胞壁は41.16 ± 7.04 nm であるのに対し、GTC287株は19.85 ± 2.85 nmで、CKW株は19.42 ± 4.20 nmを示し、マクロライド耐性NH株はマクロライド感受性菌株よりも有意に ($p < 0.001$) 細胞壁が肥厚していることが判明した。

3.4 臨床由来表皮ブドウ球菌48菌株の抗菌薬感受性

臨床由来表皮ブドウ球菌に対するマクロライドのMICを測定した結果、マクロライド耐性株は48菌株中34菌株で、感受性を示したのは14菌株であることが認められた。

3.5 臨床由来表皮ブドウ球菌48菌株におけるマクロライド耐性遺伝子保有

表1に示すように、耐性株34菌株中 *erm C* を保有する株が17菌株と最も多く (50%)、次いで *msr A*, *erm A* の順で保有する菌株が多いことが判明した。また、全く既知の耐性遺伝子を保有しないものが7菌株 (20.5%) 認められた。なお1つの菌株が *erm C* と *msr A* の両方を保有していた。一方、マクロライド感受性菌株では14菌株中13菌株は耐性遺伝子を保有していないことが確かめられたが、1菌株だけ *erm C* を保有している菌株が存在した。

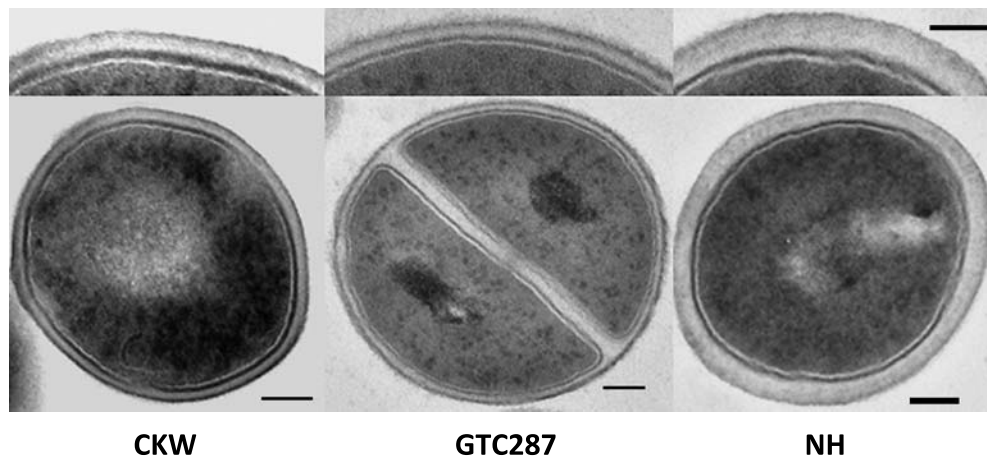
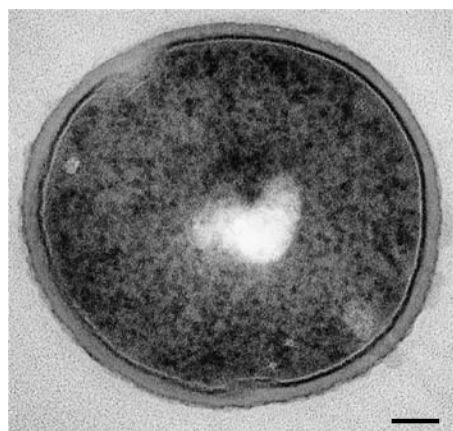


図1 臨床由来 *S. capitis* におけるマクロライド耐性株 (NH) およびマクロライド感受性株 (CKW株およびGTC287株) のTEM観察像 (バー: 100 nm, 文献⁹⁾)

表1 臨床由来表皮ブドウ球菌 48 菌株における既知のマクロライド耐性遺伝子保有分布

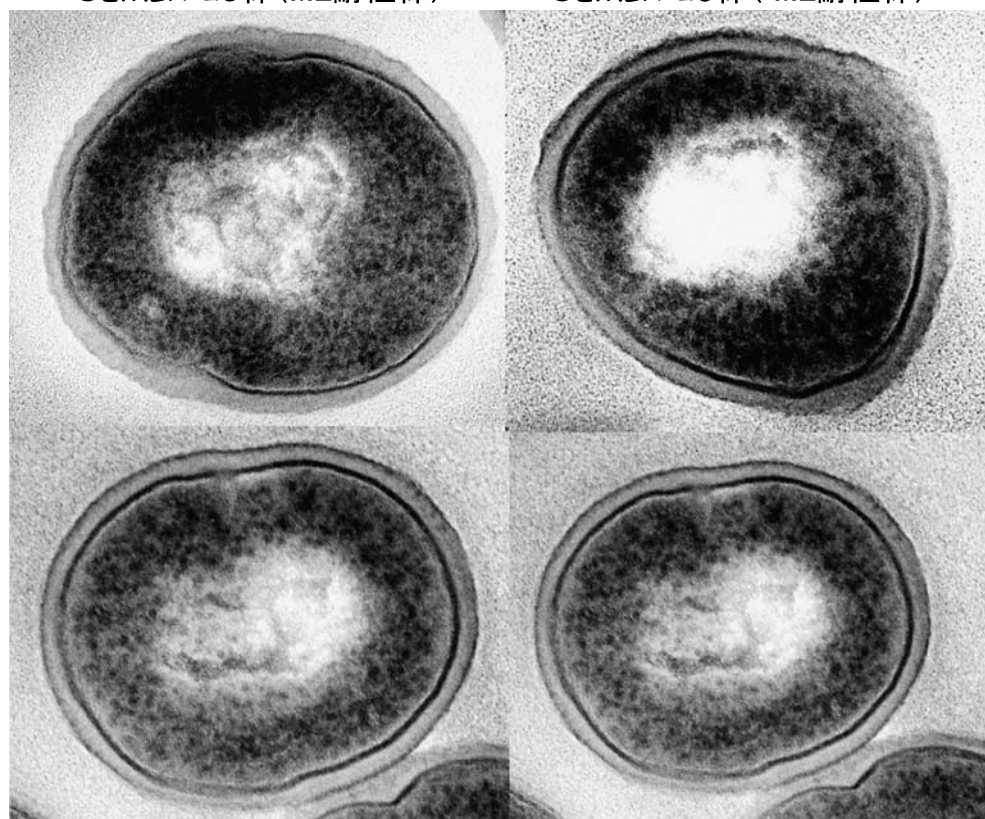
	<i>erm A</i>	<i>erm B</i>	<i>erm C</i>	<i>msr A</i>	未検出
マクロライド耐性株 (34 菌株)	5 菌株 (14.7%)	0 菌株 (0.0%)	17 菌株 (50.0%)	6 菌株 (17.6%)	7 菌株 (20.5%)
マクロライド感受性株 (14 菌株)	0 菌株 (0.0%)	0 菌株 (0.0%)	1 菌株 (7.1%)	0 菌株 (0.0%)	13 菌株 (92.9%)



標準IFO3762株
(ML感受性株)

***erm A*保有**
SEMLR-25株 (ML耐性株)

***erm C*保有**
SEMLR-26株 (ML耐性株)



***msr A*保有**
SEMLR-45株 (ML耐性株)

***erm C*および*msr A*保有**
SEMLR-34株 (ML耐性株)

図2 臨床由来表皮ブドウ球菌におけるマクロライド感受性株と耐性株のTEM像 (ML: マクロライド, バー: 100 nm)

3.6 マクロライド耐性表皮ブドウ球菌の超微形態

臨床由来マクロライド耐性表皮ブドウ球菌の超微形態像を観察するために、*erm A*, *erm C*, *msr A*, *erm C* および *msr A* を保有している菌株からそれぞれ1菌株選び、それら4菌株を対象に、超微形態観察を遂行した。その結果、表皮ブドウ球菌の標準株であるマクロライド感受性 IFO3762 株に比べて、マクロライド耐性4菌株はいずれも細胞壁肥厚という超微形態的特徴を有することが観察できた(図2)。そこで細胞壁の厚さを測定した結果、感受性菌である IFO3762 株の細胞壁の厚さは 20.60 ± 5.47 nm であるのに比べ、マクロライド耐性表皮ブドウ球菌では、*erm A* 保有 SEMLR-25 株で 36.40 ± 5.61 nm, *erm C* 保有 SEMLR-26 株で 35.22 ± 8.33 nm, *msr A* 保有 SEMLR-45 株で 40.32 ± 8.51 nm, *erm C* および *msr A* 保有 SEMLR-34 株で 37.55 ± 14.49 nm の細胞壁の厚さを示し、マクロライド耐性株は感受性株に比べ有意に ($p < 0.001$) 細胞壁が厚いことが判明した(図3)。

4. 考 察

従来より薬剤耐性菌と薬剤感受性菌の間には形態学的に大きな違いはないとされてきた。しかしながら、1997年に Hiramatsu ら⁸⁾ がバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌の細胞壁が肥厚していることを示唆して以来細菌における細胞壁について注目が集まっている。

これまで、薬剤耐性菌において細胞壁肥厚という特徴を呈することが報告された例は、前述のバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌⁹⁾ の他にモエノマイシン耐性黄色ブドウ球菌¹⁰⁾ についてであり、さらに消毒薬であるアクリフラビン耐性黄色ブドウ球菌¹¹⁾ でも同様に細胞壁肥厚が示されている。我々は、慢性副鼻腔炎の患者から分離した *S. capitis* において細胞壁が肥厚するという超微形態的特徴を有することを見出し報告した⁶⁾。さらに、臨床由来表皮ブドウ球菌においてもマクロライド耐性株がマクロライド感受性株に比べ有意に細胞壁が厚いことが明らかにすることができ、マクロライド耐性

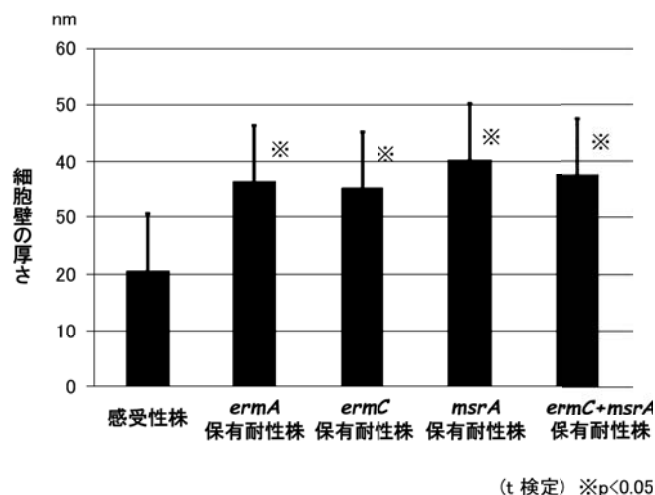


図3 臨床由来表皮ブドウ球菌のマクロライド感受性株とマクロライド耐性株の間の細胞壁の厚さの比較

ブドウ球菌では細胞壁肥厚という特性を有することが強く示唆されている。

一方、試験管内実験においてマクロライドで処理した黄色ブドウ球菌は細胞壁肥厚という形態変化を呈することが示されていた¹²⁾が、今回我々は、臨床材料においてマクロライド耐性 *S. capitis* および表皮ブドウ球菌が細胞壁肥厚という超微形態的特徴を有することを明らかにした。

黄色ブドウ球菌におけるマクロライド耐性のメカニズムは二つに大別され、一つは標的リボゾームの変異であり、これをコードする遺伝子として *erm A*, *erm B* および *erm C* が知られており、他方では薬剤排出系ポンプの亢進を促して耐性を惹起する *msr A* が知られている⁷⁾。そこで我々は、耐性メカニズムと細胞壁肥厚との間の関連性を追求するために、*S. capitis* NH 株ならびにマクロライド耐性表皮ブドウ球菌34菌株における耐性遺伝子保有の有無について検索したが、NH 株は従来報告されている耐性遺伝子を保有しておらず、またマクロライド耐性表皮ブドウ球菌耐性株4菌株においても図3に示すように、保有する耐性遺伝子が異なっても、4菌株とも同じ程度に細胞壁肥厚が観察でき、現在のところ細胞壁肥厚と耐性遺伝子との間に明瞭な相関関係は見いだせていない。さらにマクロライド耐性表皮ブドウ球菌においては既知の耐性遺伝子が検出されない菌株が7菌株あったことから、*S. capitis* NH 株を含めてこれらのマクロライド耐性株では新たな耐性メカニズムの存在することが示唆された。

一方、バンコマイシン低感受性黄色ブドウ球菌における細胞壁肥厚のメカニズムの一つとして、細胞壁を構築するペプチドグリカン中の D-Ala-D-Ala 分子の増加が原因と考えられているが、*S. capitis* NH 株はバンコマイシン感受性であることから、マクロライド耐性ブドウ球菌における細胞壁肥厚のメカニズムとバンコマイシン低感受性黄色ブドウ球菌における細胞壁肥厚のメカニズムとは異なるものと考えている。

5. おわりに

本稿では臨床材料由来のマクロライド耐性ブドウ球菌は細胞壁肥厚という超微形態的特徴について紹介してきた。現在のところ、マクロライド耐性遺伝子と細胞壁肥厚との間の関連性は明確になっていない。細胞壁肥厚のメカニズムについても、さらには細胞壁肥厚が細菌にとってどのように有利に働くのか、また宿主の防御システムにどんな影響を及ぼして感染に関与しているか興味がつきないところである。

6. 謝 辞

本研究は科学研究費補助金 (No. 21592183) ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 19-404M, No. 20-411I) の支援を得て遂行されたものである。

文 献

- 1) Matsune, S., Sun, D., Ohori, J., Nishimoto, K., Fukuiwa, T., Ushikai, M. and Kurono, Y.: *Laryngoscope*, 115, 1953-1956 (2005)

- 2) Kudoh, S., Azuma, A., Yamamoto, M., Izumi, T. and Ando, M.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **157**, 1829–1832 (1998)
- 3) 洲崎晴海：感染と抗菌薬，**2**，255–261 (1999)
- 4) 日本鼻科学会：副鼻腔診療の手引き，金原出版，東京 (2007)
- 5) 石松昌己，河口 豊，田村昌代，浜野政弘，村上悦子，黒川幸徳，通山薫：岡山医学検査，**46**，7–13 (2010)
- 6) Hyo, Y., Yamada, S. and Harada, T.: *Med. Mol. Morphol.*, **41**, 160–164 (2008)
- 7) Marineau, F., Picard, F.J., Lansac, N., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G.: *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **44**, 231–238 (2000)
- 8) Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. and Kobayashi, I.: *Lancet*, **350**, 1670–1673 (1997)
- 9) Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F.C., Mamizuka, E.M., Gemmell, C.G., Kim, M.N., Ploy, M.C., Solh, N.E., Ferraz, V. and Hiramatsu, K.: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5–14 (2003)
- 10) Nishi, H., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Fujiwara, T., Ohara, M., Ohta, K., Sugiyama, M., Ishikawa, T. and Sugai, M.: *Microbiol Immunol.*, **47**, 927–935 (2003)
- 11) Kawai, M., Yamada, S., Ishidoshiro, A., Oyamada, Y., Ito, H. and Yamagishi, J.: *J. Med. Microbiol.*, **58**, 331–336 (2008)
- 12) Nishino, T.: *Jpn. J. Microbiol.*, **19**, 53–63 (1975)