

## Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の迅速検出法

本田 寿子 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任：金子 克教授)

[ 受付：1989年2月20日 ]

抄録：臨床材料から分離した *Staphylococcus aureus* 206株と ATCC 29213を被検菌として、triphenyltetrazolium chloride (TTC) の還元を利用した methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の迅速検出法を検討した。わが国で現在、広く用いられている日本化学療法学会標準法(化療法)と NCCLS 標準法(NCCLS法)による MIC(化療 MIC, NCCLS MIC)を比較検討したところ、MRSAの基準を化療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上と対応させて考えてよいという結果を得た。

つぎに化療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の *S. aureus* 分離株を MRSA として迅速に検出する条件を検討して次の結果を得た。1. 感受性測定用ブイヨンに最終濃度2%に NaClを加えた培地を用いる。2. Methicillinの添加量は20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。3. 被検菌の接種菌量は  $3 \times 10^8 \text{CFU}/\text{ml}$ , 35°C, 4時間振盪培養した後、2%TTCを0.1ml添加して30分間振盪後に判定する。以上の条件でMRSAの検出を試みたところ、臨床材料より分離した *S. aureus* 206株からMRSA25株(12.1%)を検出できた。

**Key words** : methicillin resistant-*Staphylococcus aureus*, rapid detection, reduction of triphenyltetrazolium chloride.

### 緒 言

*Staphylococcus aureus* は敗血症、骨髄炎、肺炎、中耳炎、皮膚、軟組織の化膿性疾患など広範な感染症を引き起こす临床上重要な病原菌の一つである。特に methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は methicillinのみならず、cephem系薬剤にも多剤耐性を示し<sup>1,2)</sup>、治療上大きな問題となっており対応の仕方が求められているが、その第一歩はMRSAの迅速な検出である。現在わが国ではディスク法<sup>3-5)</sup>、微量液体希釈法<sup>3,6)</sup>などを用いてMRSAを検出しているが、まだ統一された方法のないのが現状である。

最近、Hansenら<sup>7)</sup>は *S. aureus* が triphenyltetrazolium chloride を還元すると triphenylformazan (赤色の不溶性沈澱物) となることを指標にして、培養から5時間30分ののちにはMRSAを判定できるという簡便、迅速な broth screening method を発表した。著者らはこの方法をわが国の実状にあわせて使用できるかどうか検討したので報告する。

### 方 法

#### 1. 被検菌

耳漏、膿汁など種々の患者材料 (Table 7) よりマンニット食塩培地 (ニッスイ) で分離したグラム陽性球菌について、coagulase産生性、

Method of rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Hisako HONDA and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 14 : 26-35, 1989

acetoin 産生性, maltose 分解能などを調べ, *S. aureus* と同定した206株と対照として *S. aureus* ATCC 29213を用いた。

2. 使用薬剤

Methicillin (万有製薬), oxacillin (万有製薬)

3. Methicillin, oxacillin にたいする感受性測定

日本化学療法学会標準法 (化療法)<sup>1)</sup> と National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 法)<sup>2)</sup> により minimum inhibitory concentration (MIC) を比較するため, それぞれの方法にしたがって薬剤感受性測定を行った。測定には化療法では感受性測定用寒天培地 (ニッスイ), NCCLS 法による MIC 測定には感受性測定用ブイヨン (ニッスイ) を用いて35°C, 48時間培養で行った。

4. Triphenyltetrazolium chloride の還元による MRSA の検出法

1) 使用培地

Hansenら<sup>7)</sup>の方法にしたがって, 感受性測

定用ブイヨン (ニッスイ) に Ca<sup>2+</sup>50mg/ml, Mg<sup>2+</sup>25mg/l, NaCl 15.75g/lを加えた培地を2倍の濃度に作製し, これに methicillin を加え, NaCl 濃度は接種菌液を生理食塩水で調整することを考慮して最終濃度を2%とした。

2) 供試菌株

*S. aureus* 分離株の化療 MIC法 100 µg/ml 1株, 化療法 MIC 50 µg/ml 1株, 化療法 MIC 25 µg/ml 1株, 化療法 MIC 12.5 µg/ml 5株, 化療法 MIC 6.25 µg/ml 2株, 化療法 MIC 3.13 µg/ml 2株, 化療法 MIC 1.56 µg/ml 3株の合計15株を使用した。

3) 接種菌量

滅菌生理食塩水で McFarland 1 (3 × 10<sup>8</sup> CFU/ml) 濃度に調整したものをを用いた。

4) 検出方法

Hansenら<sup>7)</sup>の方法にしたがい, 試験管に入れた培地 1 mlに菌液 1 ml (3 × 10<sup>8</sup> CFU/ml) を接種して35°C, 5時間振盪培養したのち, 2%, 3%, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, 和光) 溶液を0.1 ml 加え, 30分間振盪

Table 1 Suceptibility of 206 *staphylococcus aureus* to methicillin and oxacillin with 2 standard methods (Japan Society of Chemotherapy Standards and National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Methicillin				Oxacillin			
JSCS <sup>1)</sup>		NCCLS <sup>2)</sup>		JSCS		NCCLS	
MIC <sup>3)</sup>	No. of tested strains	MIC	No. of tested strains	MIC	No. of tested strains	MIC	No. of tested strains
100	10	128	10	50	10	64	10
50	2	64	2	25	2	32	2
25	13	32	13	12.5	3	16	3
12.5	6	16	6	6.25	6	8	6
6.25	71	8	69	3.13	63	4	63
		4	2				
3.13	100	4	98	1.56	103	2	101
		2	2			1	2
1.56	4	2	4	0.78	5	1	5
				0.39	14	0.5	14

(Inoculum size : 3 × 10<sup>6</sup> CFU/ml)

<sup>1)</sup> Japan Society of Chemotherapy Standards.

<sup>2)</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards.

<sup>3)</sup> µg/ml

して赤く発色したものを陽性 (MRSA) とし、変化のないものを陰性 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA) と判定した。

以上を原法として接種菌量, 培地中の methicillin 含有量, 培養時間, NaCl, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> の添加量などについて検討した。

結 果

1. *S. aureus* 206 株の methicillin, oxacillin に対する感受性

MRSA の判定基準の基礎として *S. aureus* の

methicillin, oxacillin に対する MIC を使用培地や希釈法の異なる化療法と NCCLS 法で測定し比較検討した (Table 1)。

1) Methicillin に対する感受性

日本化学療法学会標準法 (寒天平板希釈法) で MIC (化療 MIC) 100 μg/ml であった 10 株は NCCLS 法 (broth dilution method) の MIC (NCCLS MIC) では 128 μg/ml であった。化療 MIC 50 μg/ml の 2 株は NCCLS MIC では 64 μg/ml であり, 化療 MIC 25 μg/ml の 13 株は NCCLS MIC では 32 μg/ml であった。化

Table 2 Results of screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* incubated for 5 hours in two inoculated bacterial size.

Tested strains	Inoculum size Methicillin (μg/ml) MIC <sup>1)</sup>	3 × 10 <sup>8</sup> /ml			3 × 10 <sup>6</sup> /ml		
		8	16	32	8	16	32
		SAZ-296	100	+ <sup>2)</sup>	+	+	+
SA87-8	50	+	+	+	+	-(+)	-(+)
SA86-2	25	+	+	+	+	-(+)	-
SAZ-250	12.5	+	+	+	-(+)	-	-
SA85-76		+	+	+	-(+)	-	-
SA86-6		+	+	+	-(+)	-	-
SA86-50		+	+	+	-(+)	-	-
SA86-54		+	+	+	-(+)	-	-
SA86-19	6.25	+	+	-	-	-	-
SA86-22		+	-	-	-	-	-
SA85-82	3.13	+	-	-	-	-	-
SA86-12		+	-	-	-	-	-
SA86-17	1.56	-	-	-	-	-	-
SA86-44		-	-	-	-	-	-
SA86-68		-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> Japan Society of Chemotherapy Standards (μg/ml).

<sup>2)</sup> Coloring red with triphenyltetrazolium chloride was reduced by growth of *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*).

<sup>3)</sup> Colorless (Methicillin-susceptible *S. aureus*).

<sup>4)</sup> Results obtained with incubate for 6 hours.

療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 6 株は NCCLS MIC では 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。化療 MIC 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 71 株のうち 69 株は NCCLS MIC が 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2 株 (2.8%) が 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。化療 MIC 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  100 株のうち, NCCL MIC では 98 株 (98%) が MIC 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2 株 (2%) が MIC 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。化療 MIC 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 4 株はすべて NCCLS MIC 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

2) Oxacillin に対する感受性

化療 MIC 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 10 株は NCCLS MIC では 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で, 化療 MIC 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 2

株は NCCLS MIC で 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。化療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 3 株は NCCLS MIC で 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 化療 MIC 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 6 株は NCCLS MIC で 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 化療 MIC 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 63 株は NCCLS MIC で 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 化療 MIC 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 5 株は NCCLS MIC 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で, 化療 MIC 0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 14 株は NCCLS MIC で 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とすべて対応していたが, 化療 MIC 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 103 株のうち 101 株 (98.1%) は NCCLS MIC 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で, 2 株 (1.9%) は 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

以上の結果から培地, 希釈倍数の違いはあっ

Table 3 Results of screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in various volume of methicillin.

Tested strains	MIC <sup>1)</sup>	Methicillin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
		16	18	19	20	24	32
SAZ-296	100	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+
SA87-8	50	+	+	+	+	+	+
SA86-2	25	+	+	+	+	+	+
SAZ-250	12.5	+	+	+	+	+	+
SA85-76		+	+	+	+	+	+
SA86-6		+	+	+	+	+	+
SA86-50		+	+	+	+	+	+
SA86-54		+	+	+	+	+	+
SA86-19		6.25	+	+	+	-	-
SA86-22	+		+	-	-	-	-
SA85-82	3.13	- <sup>3)</sup>	-	-	-	-	-
SA86-12		-	-	-	-	-	-
SA86-17	1.56	-	-	-	-	-	-
SA86-44		-	-	-	-	-	-
SA86-68		-	-	-	-	-	-

(Inoculum size  $3 \times 10^8$  CFU/ml)

<sup>1)</sup> Japan Society of Chemotherapy Standards ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

<sup>2)</sup> Coloring red with triphenyltetrazolium chloride was reduced by growth of *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*).

<sup>3)</sup> Colorless (Methicillin-susceptible *S. aureus*).

でも化療 MIC と NCCLS MIC を対応させて比較することに問題はないと考えられる。

## 2. 2% TTC 添加による発色と *S. aureus* 菌量の検討

MRSA が 2% TTC を還元して triphenylformazan (赤色の不溶性沈澱物) とする *S. aureus* 菌量を検討したところ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml では発色は見られず,  $3 \times 10^8$  CFU/ml でわずかに赤い発色が始まり,  $6 \times 10^8$  CFU/ml では赤色は明瞭になった。

## 3. 接種菌量と methicillin 量の検討

### 1) 接種菌量

2% TTC 添加で発色のみられない *S. aureus* の接種菌量は  $3 \times 10^8$  CFU/ml 以下であり, 5 時間振盪培養で  $6 \times 10^8$  CFU/ml に達する菌量が発色に必要なである。そこで化療法での接種菌量  $10^6$  CFU/ml と同じオーダーの  $3 \times 10^6$  CFU/ml と原法の  $3 \times 10^8$  CFU/ml での MRSA の検出を検討した。接種菌量  $3 \times 10^8$  CFU/ml (Table 2) では methicillin 32  $\mu$ g/ml の量で, 化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上の菌株をすべて MRSA として検出できたが, 接種菌量  $3 \times 10^6$  CFU/ml 5 時間培養では化療 MIC 25  $\mu$ g/ml 以上の菌株でわずかに発色が見られ, 培養時間を 6 時間に延長しなければ化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上の菌株を MRSA として検出できなかった。したがって 5 時間以内で発色するに要する菌量を得るためには  $3 \times 10^8$  CFU/ml の接種菌量が必要であった。

### 2) 培地に添加する methicillin 量

接種菌量を  $3 \times 10^8$  CFU/ml とし, 化療

MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上を MRSA として検出できる methicillin 量を検討した (Table 2)。培地に添加する methicillin 量 8  $\mu$ g/ml で, 化療 MIC 3.13  $\mu$ g/ml 以上の被検菌が発色し, methicillin 量 16  $\mu$ g/ml では化療 MIC 6.25  $\mu$ g/ml の被検菌が発色した。さらに methicillin 量 32  $\mu$ g/ml で化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上の被検菌のすべてが発色した。化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上の被検菌を MRSA として検出できる methicillin 量は 16  $\mu$ g/ml と 32  $\mu$ g/ml の間にあることが推察できた。さらに 16~32  $\mu$ g/ml の methicillin 量を検討したところ (Table 3), methicillin 量 16.18  $\mu$ g/ml で化療 MIC 6.25  $\mu$ g/ml の被検菌 2 株が発色し methicillin 量 19  $\mu$ g/ml では化療 MIC 6.25  $\mu$ g/ml の被検菌 2 株のうち 1 株が発色した。methicillin 量 20  $\mu$ g/ml では化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上の被検菌のすべてが発色し, 24, 32  $\mu$ g/ml では methicillin 20  $\mu$ g/ml と同じ結果が得られたので化療 MIC 12.5  $\mu$ g/ml 以上を MRSA として検出できる methicillin 量は, 20  $\mu$ g/ml が適量であることが分かった。

つぎに MRSA 検出にさいし境界領域にある化療 MIC 6.25  $\mu$ g/ml の 71 株を被検菌として, これら菌株のすべてが MSSA と判定できる methicillin 量を検討した (Table 4)。methicillin 量 16, 18, 19  $\mu$ g/ml では発色して, MRSA と判定した菌株がそれぞれ 4 株, 2 株, 1 株ずつあったが, methicillin 量 20  $\mu$ g/ml ではすべての菌株が発色せず MSSA と判定できた。

Table 4 Results of screening of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of 71 tested strains in 4 degrees of methicillin.

Methicillin ( $\mu$ g/ml)			
16	18	19	20
67/71*	69/71	70/71	71/71
(94.4%)	(97.2%)	(98.6%)	(100%)

\* No. of methicillin-susceptible *S. aureus*. / No. of tested strains has Japan Society of Chemotherapy Standards MIC (6.25  $\mu$ g/ml).

4. MRSA 検出に要する振盪培養時間

35°Cで3時間, 4時間, 5時間振盪培養し, 2% TTCを0.1ml添加して20分間と30分間振盪したのち判定した (Table 5)。

3時間振盪培養では, 2% TTCを添加したのちの時間に関係なく, 化療 MIC 12.5 µg/ml の5株のうち3株が発色せず MSSA と判定した。4時間振盪培養したのち, 2% TTCを添加して, 20分間振盪したのちの判定では, 化療 MIC 12.5 µg/ml 以上の菌株で発色が不明のものが5株のうち2株あったが, 30分間振盪し

たのちの判定では化療 MIC 12.5 µg/ml 以上の菌株はすべて発色して, MRSA と判定できた。また, 5時間振盪培養では2% TTCを添加したのちの判定時間の長短に関係なく, 化療 MIC 12.5 µg/ml 以上の菌株をすべて検出できた。

5. MRSA 検出に用いる培地への NaCl, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>添加の影響

NCCLS 法では MRSA の感受性検査には, 感受性測定用ブイヨンに NaCl 20g/l, Ca<sup>2+</sup> 50 mg/l, Mg<sup>2+</sup> 25mg/l を添加することが記載

Table 5 Results of screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in various incubation time.

Tested strains	MIC <sup>1)</sup>	Incubation time					
		3H <sup>2)</sup> ・2 <sup>3)</sup>	3H-3	4H-2	4H-3	5H-2	5H-3
SAZ-296	100	+ <sup>4)</sup>	+	+	+	+	+
SA87-8	50	+	+	+	+	+	+
SA86-2	25	+	+	+	+	+	+
SAZ-250	12.5	- <sup>5)</sup>	-	+	+	+	+
SA85-76		+	+	+	+	+	+
SA86-6		-	-	± <sup>6)</sup>	+	+	+
SA86-50		-	-	±	+	+	+
SA86-54		+	+	+	+	+	+
SA86-19		6.25	-	-	-	-	-
SA86-22	-		-	-	-	-	-
SA85-82	3.13	-	-	-	-	-	-
SA86-12		-	-	-	-	-	-
SA86-17	1.56	-	-	-	-	-	-
SA86-44		-	-	-	-	-	-
SA86-68		-	-	-	-	-	-

(Inoculum size 3 × 10<sup>8</sup> CFU/ml)

<sup>1)</sup> Japan Society of Chemotherapy Standards (µg/ml).

<sup>2)</sup> Incubation time (hours).

<sup>3)</sup> Response times with triphenyltetrazolium chloride (minutes).

<sup>4)</sup> Coloring red with triphenyltetrazolium chloride was reduced by growth of *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*).

<sup>5)</sup> Colorless (Methicillin-susceptible *S. aureus*).

<sup>6)</sup> Borderline.

Table 6 Results of screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in medium added NaCl, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>.

Tested strains	MIC <sup>1)</sup>	Supplement			
		NaCl Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	NaCl	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	None
SAZ-296	100	+ <sup>2)</sup>	+	+	+
SA87-8	50	+	+	+	+
SA86-2	25	+	+	+	+
SAZ-250	12.5	+	+	+	+
SA85-76		+	+	+	+
SA86-6		+	+	± <sup>4)</sup>	+
SA86-50		+	+	+	+
SA86-54		+	+	+	+
SA86-19	6.25	- <sup>3)</sup>	-	±	±
SA86-22		-	-	-	-
SA85-82	3.13	-	-	-	±
SA86-12		-	-	-	-
SA86-17	1.56	-	-	-	-
SA86-44		-	-	-	-
SA86-68		-	-	-	-

(Inoculum size  $3 \times 10^8$  CFU/ml)<sup>1)</sup> Japan Society of Chemotherapy Standards ( $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>2)</sup> Coloring red with triphenyltetrazolium chloride was reduced by growth of *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*).<sup>3)</sup> Colorless (Methicillin-susceptible *S. aureus*).<sup>4)</sup> Borderline.Table 7 Results of screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical materials.

Materials	Inpatient	Outpatient	Total
Otorrhoe.	0/1*	1/13	1/14
Pus	1/10	4/39	5/49
Sputum	5/26	1/9	6/35
Pharyngeal mucus	1/17	7/35	8/52
Vaginal secreta	0/0	1/9	1/9
Blood	0/5	0/0	0/5
Liquor	0/0	0/2	0/2
Urine	1/7	2/30	3/37
IVH	1/3	0/0	1/3
Total	9/69 (13.0%)	15/137 (10.9%)	25/206 (12.1%)

\* No. of methicillin-susceptible *S. aureus*. / No. of isolated strains.

されているので、その必要性の有無について検討した (Table 6)。

NCCLS法にしたがい NaCl,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ を加えた培地と2%濃度で NaClのみを加えた培地では、化療 MIC  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の8株 (MRSA) をすべて検出できた。NaClを加えず、 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ のみを加えた培地では、化療 MIC  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の菌株の一部で発色が不明のものがみられた。一方、NaCl,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ のいずれも添加しない培地では、化療 MIC  $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の菌株では発色が不明のものもあった。したがって、明瞭な発色反応のためには2% NaCl添加で十分であり、 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ の添加は不要なことが分かった。

#### 6. MRSA の検出結果

2% NaCl 加感受性測定用ブイヨンに methicillin  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  を加えた培地を用いて、菌量は  $3 \times 10^8 \text{ CFU}/\text{ml}$ , 4時間振盪培養したのち、2% TTCを0.1ml 添加して、30分間振盪したのちに発色したものを MRSA と判定した。その結果、*S. aureus* 臨床分離株206株のうち25株 (12.1%) の MRSA を検出した。この25株はすべて化療 MIC  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上であった。

Table 7 は入院、外来別臨床材料から分離した *S. aureus* の内訳である。MRSA は IVH から分離した3株のうち1株 (33%)、喀痰35株のうち6株 (17%)、咽頭粘液52株のうち8株 (15%) などに多くみられたが入院、外来別では入院のほうが13%と外来の10.9%に比してわずかに多かった。

### 考 察

MRSA 感染症が増加の一途をたどっている今日 MRSA 検出を迅速にそして確実に行うことが求められている。

現在、MRSA 検出に用いている broth micro-dilution<sup>10)</sup>, standard disk diffusion<sup>11)</sup> は培養時間、24時間を経なければ結果が得られず迅速さに欠ける。これに対し簡便さを求めた方法として、Jorgensen ら<sup>12)</sup> は automated test sys-

tem を用いて MRSA の基準を MIC  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上におき、MIC  $32 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の *S. aureus* 42株のうち41株 (97.6%) を MRSA として検出したが、MIC  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  あるいは MIC  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  の *S. aureus* 53株のうち MRSA として検出できたのは48株 (90.6%) と検出率が低くなったことを報告している。また、Park<sup>13)</sup> は100% MRSA を検出できる方法として Bioluminescence method を報告しているが、この方法には Biocounter が必要となりどこでもできるというわけにはいかない。

一方、わが国ではディスク法として methicillin  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  含有の一濃度ディスク<sup>3)</sup> が広く用いられている。

また、MRSA が methicillin だけでなく cephem 系薬剤にも耐性を示す多剤耐性 *S. aureus* であるということから cephem 剤、なかでも pencillinase の分解を受けない CZX や LMOX ディスクを用いる方法<sup>4,5)</sup> もとられている。そして、微量液体希釈法<sup>11)</sup> や KB 法<sup>14)</sup> も推奨されている現状である。

著者らは Hansen ら<sup>7)</sup> の開発した *S. aureus* の triphenyltetrazolium chloride の還元による MRSA 検出法が簡便で迅速であると考え、NCCLS 法にしたがったこの方法を化療法を基準としているわが国の現状に即して使用できるよう検討し改良した。

MRSA の基準については NCCLS 法では MIC  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上<sup>9)</sup> としているが、化療法では MIC  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上<sup>4)</sup> としている。また NCCLS 法と化療法では使用培地、接種菌量、培養時間など異なる点がいくつかあり、抗菌剤の希釈系列も NCCLS 法では 0.5, 1, 2, 4…… ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、化療法では 100, 50, 25,  $12.5$ …… ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と数値が異なる。この2つの方法を対応させて考えることが可能かどうか検討したところ、化療法での MRSA の MIC  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上と、NCCLS 法での MRSA の MIC  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上が対応することが明らかになった。また、ディスク法の場合、NCCLS 法では methicillin ディスクよりも oxacillin ディスク<sup>11)</sup>



を推奨していることから、著者らは oxacillin についても化療法と NCCLS 法による MIC の対応を比較検討したが、両者を対応させてよいことがわかった。

Hansen ら<sup>7)</sup>は MRSA を MIC 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上とし、2% NaCl,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  添加 Mueller-Hinton broth に methicillin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , oxacillin 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加えた培地を用いて、接種菌量は  $3 \times 10^8$  CUF/ $\text{ml}$ , 35°C, 5時間振盪培養したのち、2% triphenyltetrazolium chloride を添加して30分間、振盪したのちに発色(赤色)の有無により MRSA を判定するという方法で行っている。この方法を改良する上で、*S. aureus* の TTC 還元による triphenylformazan の赤色沈澱をもって MRSA と判定するが、判定が肉眼で容易にできること。化療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の *S. aureus* を100% MRSA として検出できること。判定までの時間の短縮をはかる。という3点を指標に接種菌量、培地への methicillin 添加量、NaCl,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  の添加、培養時間について検討した。

*S. aureus* の TTC 還元による発色と *S. aureus* 菌量との関係を検討したところ、Hansen ら<sup>7)</sup>が接種菌量として用いた *S. aureus*  $3 \times 10^8$  CFU/ $\text{ml}$  では発色せず、発色に要する *S. aureus* 菌量は  $6 \times 10^8$  CFU/ $\text{ml}$  であり、5時間振盪培養で発色する接種菌量としては、化療法あるいは NCCLS 法の接種菌量をうわまわる  $3 \times 10^8$  CFU/ $\text{ml}$  が必要であることを実験的に裏づけた。

著者らの実験では化療法 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上を MRSA の基準とし、これを検出する methicillin 量は20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を要した。この場合の量的な差は接種菌量の違いと、培養時間(methicillin の作用時間)が短時間であることから生じたと考えられる。Hansen ら<sup>7)</sup>は methicillin の NCCLS MIC 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上を MRSA の基準とし、methicillin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と oxacillin 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を用いているが MRSA の oxacillin に対する感受性は 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上<sup>7,11)</sup>と低いことから oxacillin を使用した場合、薬

剤量は少なくなると考えられる。

また、使用培地については、市販されている感受性測定用ブイヨン(ニッスイ)には  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  が含まれていないので、その必要性の有無を検討したところ  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  の存在は MRSA 検出に影響しないことが分かった。 $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  の添加は aminoglycoside 系抗菌剤の感受性測定にさいし、MIC 低下の補正に必要であるといわれており<sup>9,15)</sup>, methicillin には影響しなかったと考えられる。

また、Hansen ら<sup>7)</sup>は MRSA 検出までに5時間30分を要すると報告しているが、著者らは迅速さを求めて培養時間の検討をした結果、1時間短縮し、4時間30分とした。

Hansen ら<sup>7)</sup>は MRSA 129株を用いて検討した結果、125株(96.9%)を MRSA と判定したが、4株(3.1%)は TTC による方法では検出できない性質をもった例外的な菌株であろうと述べている。著者らの改良した方法では、MRSA (化療 MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の25株)を100%検出できたとはいえ、対象とした MRSA の菌株数が十分とは言えず、今後、菌株数を増してさらに検討し、すべての MRSA を確実に検出できる方法として確立していきたいと考えている。

## 結 語

MRSA の迅速検出を検討して、次の結果を得た。

1. MRSA の基準を化療法で MIC 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上とした場合、NCCLS 法の MIC 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上と対応させることができる。
2. *S. aureus* の 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride の還元を利用して、MRSA を迅速に検出する条件は
  - 1) 培地は最終濃度2%に NaCl を加えた感受性ブイヨンを使用する。
  - 2) Methicillin 量は20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  が適量である。
  - 3) 接種菌量は  $3 \times 10^8$  CFU/ $\text{ml}$  である。
  - 4) 35°C, 4時間振盪培養したのち、2% triphenyltetrazolium chloride を0.1ml 添加して

30分間振盪したのちに, triphenylformazan による発色 (赤色) を指標に判定する。

論文の要旨は第42回日本細菌学会東北支部総会 (盛岡, 昭和63年8月26日) で発表した。

**Abstract** : We studied a method for rapid detection of methicillin resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) on a 206 *Staphylococcus. aueus*.

Triphenyltetrazolium chloride (TTC) was reduced by MRSA, and the MRSA was colored red, so the MRSA could be easily detected.

We developed a rapid and reliable method. The procedure was as follows : the methicillin 20  $\mu\text{g}$  per ml was added to a prepared medium (Mueller-Hinton broth) with 2 % NaCl. The inoculation was  $3 \times 10^8$  CFU per ml. Then, after incubating for 4 hours at 35  $^{\circ}\text{C}$ , 2 % TTC was added to the *S. aureus*. the sample were detected after 30 minutes response.

We tested 206 *S. aureus* isolates and found 25 strains of MRSA (minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq 12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), MIC  $\geq 12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  from the Japan Society of Chemotherapy Standards was considered to be equal to with MIC  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{ml}$  from the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

#### 文 献

- 1) 紺野昌俊 : メチシリン耐性ブドウ球菌, メディアサークル, 31 : 257-270, 1986.
- 2) 渡辺正治, 久保勢津子, 石山尚子, 島山靖子, 斉藤知子, 高橋公毅, 菅野治重, 陳瑞明 : 千葉大学附属病院における Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離状況—最近5年間の観察—, *Chemotherapy*, 35 : 467-475, 1987.
- 3) 渡辺正治 : MRSA, 検査と技術, 16 : 452-453, 1988.
- 4) 金澤 裕 : MRSA の一濃度ディスクでの判定について, *Medical Technology*, 16 : 441-443, 1988.
- 5) 横田 健 : MRSA 感染症, 臨床検査, 32 : 770-775, 1988.
- 6) 菅野治重 : 薬剤感受性測定法の種類と原理, 検査と技術, 13 : 889-894, 1985.
- 7) Hansen, S. L. and Pope, W. A. : Screening method for rapid detection of methicillin-resistant (heteroresistant) *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 886-887, 1985.
- 8) 五島嵯智子, 徐慶一郎, 河喜多竜祥, 小酒井望, 三橋 進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改定について, *Chemotherapy*, 29 : 76-79, 1981.
- 9) Natinal Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference methods for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial agents with bacteria that grow aerobically : broth microdilution, broth macrodilution, and agar dilution methods. Approved standard M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1985.
- 10) Thornsberry, C. and McDougal, L.K. : Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 18 : 1084-1091, 1983.
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards. : Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-M3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1984.
- 12) Jorgensen, J. H., Redding, J., Johnson, J. E., Holloway, V. and Almedia, R.J. : Rapid recognition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by use of automated test sysetms. *J. Clin. Microbiol.* 20 : 430-433, 1984.
- 13) Park, C. H., Hixon, D. L., Mclaughlin, C. M. and Cook, J.F. : Rapid detection (4h) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a bioluminescence method. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1223-1224, 1988.
- 14) Bauer, A.W., Kirby, W.N.M., Sherris, J.C. and Turck, M. : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method *Am. J. Clin. Pathol.* 36 : 493-496, 1966.
- 15) WHO Expert Committee on Biological Stadardization : Technical report series 610, 98-102, WHO, Geneva, 1977.