

【原著・基礎】

化学発光および呈色試薬を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に
対する linezolid の抗菌活性の評価小松 充孝¹⁾・田島 裕²⁾・伊藤 輝代^{2,3)}・山城雄一郎¹⁾・平松 啓一^{2,3)}¹⁾順天堂大学医学部小児科学教室*²⁾順天堂大学大学院医学研究科感染制御科学科³⁾順天堂大学医学部細菌学教室

(平成 17 年 9 月 7 日受付・平成 18 年 1 月 10 日受理)

Vancomycin (VCM) に対して感受性が低下した methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離株が増加している現在、その対策は急務である。われわれは多剤耐性グラム陽性菌に対処する抗菌薬として開発されたオキサゾリジノン系薬である linezolid (LZD) の VCM 低感受性株に対する効力を、従来の微量液体希釈法による MIC の測定に加えて、化学発光および呈色試薬を用いた菌の代謝活性を測定する方法で評価した。微量液体希釈法で測定した LZD の MIC は、既知の LZD 低感受性株を除き VCM に対する耐性度 (MIC = 0.5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) にかかわらずすべて 0.5~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であった。化学発光法を用いて菌の代謝活性を測定した場合、薬剤濃度の上昇に伴って化学発光強度の急峻な低下がみられ、LZD は短時間で菌の代謝活性を抑制する効果をもつことが確認された。LZD の殺菌力は弱く、作用はほとんど静菌性と判断されたが、呈色試薬 alamaBlue[®]を用いた実験では、代謝抑制の時間経過がほぼ VCM と同様であり、初期効果としては遜色ないと思われた。以上の結果より、LZD は MRSA に対して強力な抗菌活性を有しており、VCM を用いた治療に抵抗する MRSA 感染症に対しても効果が期待できると思われた。

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, chemiluminescence assay, antimicrobial susceptibility test, vancomycin, linezolid

近年、臨床分離される methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 株は、 β -ラクタム系薬のみならず多くの抗菌薬に対して高度に耐性化しており、院内感染の起菌菌として最も重要な地位を占めるにいたっている¹⁾。最近では、市中感染でも MRSA の分離頻度が上昇しており²⁾、その対策が急務となっている。

現在、MRSA 感染症に対する治療薬の選択の幅はますます狭まり、vancomycin (VCM) や teicoplanin (TEIC) などのグリコペプチド系薬および arbekacin が使用されるが、中でも VCM が使用されることが多い。しかし、その“最後の砦”と目されていた VCM による治療無効例が報告されて、それらの例から VCM に対して感受性の低下した菌が分離され、さらに 2002 年には腸球菌のもつバンコマイシン耐性トランスポゾンをもつ VCM-resistant *S. aureus* (VRSA) も臨床分離されるにいたっている³⁻⁵⁾。そのため多剤耐性 MRSA に対処しうる薬剤、とりわけ VCM が有効でない症例へ対処しうる薬剤の開発が臨床現場では期待されている。

2001 年に抗 VCM-resistant Enterococci (VRE) 薬として承認された linezolid (LZD) はオキサゾリジノン骨格を基本構造

にもち、その作用部位も既存抗菌薬とは異なる新しいカテゴリーの合成抗菌薬である⁶⁾。現在は VRE 感染症に対処する薬剤として使用されているが、欧米では MRSA 感染症に対する治療薬として使用されている^{7,8)}。

そこで、われわれは VCM に対して感受性の低下した菌を主な対象として LZD の効力を検討した。抗菌力の測定法として一般的に用いられている最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、薬剤の作用による菌の増殖阻止を“菌集団”として判定するため、耐性度の変化がわずかであったり、菌集団の一部のみが高い耐性を示すような場合には、それらを正しく捉えることが困難である。近年、呈色試薬や化学発光法を応用して、薬剤が菌の代謝に及ぼす影響を測定する高感度の薬剤感受性試験法が開発されている。これらの方法を用いれば、MIC 測定法では判定できない種々の薬剤の効果、例えば、“短時間での抗菌活性”や“菌の代謝抑制に対する効力”などを精度高く評価することが可能である^{9,10)}。

今回、われわれは MRSA 株に対する LZD の抗菌活性を化学発光および呈色試薬を用いた高感度測定法で評価する機会を得たので、得られた知見を従来の微量液体法の結果と併せ

*東京都文京区本郷 2-1-1

て報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

VCM に対する耐性度の異なる *S. aureus* 65 株を供試菌株とした。CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 旧 NCCLS) の判定基準¹¹⁾に従って VCM に対する耐性度の違いで区分された菌株は以下のとおりである。VCM-susceptible *S. aureus* (VSSA, MIC が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下), 32 株; VCM ヘテロ耐性株 (VCM = $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の BHI 寒天平板上で 10^6 CFU に 1 個以上の頻度で生残を認めるもの: heterogeneously VCM-intermediate *S. aureus* (hVISA)), 6 株; VISA (MIC が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ を超えるもの), 25 株; VRSA (*vanA* 遺伝子をもつ VCM 耐性株, MIC が $16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上), 2 株。なお, VISA 株については, 報告時点での MIC が $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の値を示したものを使用したが¹²⁾, 保存中に耐性度が低下し, 今回測定した場合に $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC を示さないものが認められた (Table 1)。しかし, 本研究では VCM で選択するなどの操作は行わずにそのまま用いた。

対照として標準株である FDA209P 株および NRS127 (LZD-resistant *S. aureus* [LRSA], LZD に耐性を示す株で NARSA [Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*; Herndon, USA] より購入したもの) を使用した。

2. 薬剤・培地

VCM は, Sigma-Aldrich 社 (St Louis, USA) より購入した。LZD はファイザー製薬より供与されたもので, いずれも力価の明らかなものである。化学発光用の培地は, 栄研化学 (東京) より入手した。他の培地は, Difco 社 (Michigan, USA) の製品である。呈色試薬 alamaBlue[®] は, Serotec 社 (Westlake, U.K.) より購入した。

3. 薬剤感受性試験

1) 微量液体希釈法

微量液体希釈法による MIC の測定は, CLSI の標準法に準拠した¹³⁾。ただし, 種菌量は 5×10^4 CFU/well であるが, より精密に MIC を測定するために薬剤濃度は 0, 0.5, 1, 2, …, 9, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ として (すべての操作で共通), 24 時間と 48 時間後に MIC を判定した。なお, 被検菌は, すべてミューラーヒントン (MH) 寒天培地上に生育したコロニーを採取し, MH ブロスで OD_{578nm} が 0.3 以上 (OD 0.3 $\approx 10^8$ CFU/mL) になるまで前培養を行った。

2) 殺菌活性の測定

10^5 CFU/mL となるように調整した菌液に薬剤 (0~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を混ぜ, 一定時間が経過するごとに少量の検体を採取し, 適宜希釈して MH 寒天平板上に菌液 (100 μL) を塗布した。24 時間培養後, コロニー数を計測して殺菌曲線を作成した。

3) 化学発光を用いた薬剤感受性試験

菌の代謝過程で生じた還元性物質を基に, 膜透過性の 1 電子酸化還元体を介して過酸化水素を発生させ, それを化学発光で捉える反応を基本原理としている。前培養した菌を, 化学発光専用培地に, 終濃度で 1.1×10^6 CFU/mL となるように調整し, その 45 μL を, さまざまな濃度の抗菌薬 5 μL をあらかじめ分注しておいたマイクロタイタープレートの各ウエルに入れ, 37°C で 3 時間培養した (種菌量 = 5×10^4 CFU/well)。5 μL のメナジオン液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を全ウエルに添加した後, さらに 1 時間培養を続け, アルカリールシゲニン法で化学発光強度を測定した^{9,10)}。

測定には Lucy 2 (Rosys-Anthos, Hombrechtikon, Switzerland) を用い, アルカリ化バッファー (0.8M NaHCO₃-0.86M KOH, 50 μL) の添加直後にルシゲニン液 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL) を加え, 0.1 秒間測光した。

結果の評価のために, ①ED₅₀: 化学発光強度が, コントロール値 (LZD 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での発光値) の 50% になるような抗菌薬濃度, ②ED₂₅: 同じく 25% になる濃度, ③AUC (area under the chemiluminescence curve): 化学発光値のグラフが囲む曲線下の面積, の 3 つのパラメータをグラフより算出した。

4. 呈色試薬を用いた代謝活性の測定

alamaBlue[®] は, 生細胞中でのみ還元を受け, 色調が青 (酸化型) から赤 (還元型) へと変化するが, その吸光度変化は cell viability とよく相関することが知られている¹⁴⁾。

まず, 前培養した菌を適当に希釈して 1.1×10^7 CFU/mL の菌液を作成し, この菌液 90 μL を, さまざまな濃度の抗菌薬 10 μL をあらかじめ分注しておいたマイクロタイタープレートの各ウエルに入れ, 37°C で培養した (種菌量 = 10^6 CFU/well)。薬剤添加後の代謝活性の変化は 10 μL の alamaBlue[®] を経時的にウエルに添加し, さらに 2 時間培養を続けた後の吸光度 (570 nm および 600 nm) を測定して求めた。測定した OD 値と alamaBlue[®] のモル吸光度係数から, 酸化型・還元型の色素濃度を求め, 抗菌薬なしの状態で得られる還元型色素濃度を 100% として代謝活性を評価した。

II. 結果

1. 微量液体希釈法を用いた感受性試験

1) VCM

VSSA 32 株, hVISA 6 株, VISA 25 株, VRSA 2 株を用いて, 微量液体希釈法により MIC を測定した結果を Table 1 に示す。VSSA 32 株に対する VCM の MIC はいずれも 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, その多くは 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。hVISA 6 株の MIC も同様に低く 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*vanA* を保有する VRSA 2 株の MIC はいずれも 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であったが, VISA 25 株の場合は, 2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかし, (常法ではないが) さらに培養を継続し, 48 時間後に判定した場合, VISA の場合は,

Table 1. Comparison of MIC and effective dose (ED) for *S. aureus* strains with different susceptibility to linezolid and vancomycin

Strain ^a	vancomycin			linezolid			Source ^h		
	24h	MIC ^c (μ g/mL)	48h	ED ₂₅ ^e (μ g/mL)	24h	MIC ^c (μ g/mL)		48h	ED ₂₅ ^e (μ g/mL)
VSSA ^b									
H1	1		1	0.69	2		2	1.01	A
N315	0.5		1	0.38	1		2	0.99	A
NCTC8325 [*]	1		2	0.86	2		2	1.42	A
JCSC 108	1		1	0.94	2		3	0.82	B
JCSC 119	1		1	1.23	2		2	0.94	B
JCSC 134	1		1	0.94	2		2	1.55	B
JCSC 170	1		2	0.94	2		3	0.96	B
JCSC 199	1		1	0.91	2		2	0.51	B
JCSC 221	1		1	0.94	2		3	0.92	B
JCSC 227	1		1	0.85	2		2	0.82	B
JCSC 248	1		1	0.91	1		2	0.50	B
JCSC 276	1		1	0.88	3		3	1.47	B
JCSC 311	1		1	1	2		2	0.97	B
JCSC 343	1		1	0.91	2		2	0.64	B
JCSC 431	1		2	0.85	2		3	0.89	B
JCSC 1168	1		2	0.91	2		2	0.71	B
JCSC 1452	1		1	0.92	3		3	1.27	B
JCSC 1453	0.5		1	0.51	2		2	0.93	B
JCSC 1454	0.5		1	0.48	2		2	1.04	B
JCSC 1455	1		1	0.91	2		2	1.27	B
JCSC 1462	1		2	0.94	2		2	0.85	B
JCSC 1463	1		1	0.94	2		2	1.34	B
JCSC 1470	1		1	0.94	2		2	1.39	B
JCSC 1572	2		2	0.91	2		2	1.14	B
JCSC 1715	1		1	0.94	2		3	1.19	B
JCSC 1718	1		1	0.92	3		3	1.47	B
JCSC 2153	0.5		1	0.91	2		2	1.19	B
JCSC 2167	1		1	0.91	2		2	1.49	B
JCSC 2172	0.5		1	0.53	2		2	1.47	B
JCSC 3613	0.5		1	0.91	1		1	1.65	B
JCSC 3624	1		2	0.91	2		2	1.62	B
JCSC 4409	1		1	0.88	2		2	1.32	B
hVISA ^c									
Mu3	2		3	1.4	2		2	0.82	A
JCSC 157	1		2	1.35	2		2	0.69	B
JCSC 165	2		2	1.52	2		2	0.74	B
JCSC 226	2		2	1.35	1		1	0.87	B
JCSC 237	2		2	0.94	1		2	0.87	B
JCSC 238	2		3	1.52	1		1	0.41	B
VISA ^d									
Mu50	6		7	3.03	1		1	0.84	A
AMC11094	4		6	3.94	1		1	0.79	A
BR1	4		6	2.16	2		2	0.75	A
BR2	4		6	2.8	1		1	0.80	A
BR3	6		8	7.22	1		1	0.79	A
BR4	3		4	3.1	2		2	0.84	A
BR5	5		6	1.63	2		2	0.69	A
IL	5		8	3.94	1		1	1.14	A
LIM2	3		6	4.08	1		1	0.59	A
MI	8		9	5.41	0.5		1	0.66	A
NJ	6		8	4.81	1		1	0.71	A
PC	5		5	3.53	2		2	0.97	A
99/3759-V	3		3	1.93	1		1	0.46	A
99/3700-W	3		3	3.97	1		1	0.71	A
26160	2		3	2.69	1		2	0.80	A
98141	2		2	2.8	1		1	0.66	A
1834	4		7	3.33	2		2	0.79	C
4264	4		4	3.03	1		2	0.88	D
NRS 14	5		6	2.05	2		2	0.82	E
NRS 17	5		6	6.81	1		2	0.82	E
NRS 65	2		3	1.7	0.5		1	0.42	E
NRS 73	5		8	5.65	2		2	0.61	E
NRS 74	5		5	4.6	2		3	1.19	E
NRS 118	6		7	3.97	1		1	0.54	E
NRS 119	2		2	1.83	2		2	0.87	E
VRSA ^e									
VR1	> 10		> 10	> 10	2		2	1.06	C
VR2	> 10		> 10	> 10	2		2	1.04	C
reference strain									C
FDA209P ^g	0.5		0.5	0.38	1		2	0.88	A
NRS 127	1		1	0.91	7		8	3.37	E

^aStrains with asterisk* are methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). All other strains are MRSA^bVCM MICs were all $\leq 2 \mu$ g/mL^cEach strain formed colonies on BHI agar plate, containing VCM = 4μ g/mL at frequencies greater than 10^{-6} , which was confirmed by population analysis (data not shown)^dVCM MICs were reported as 8μ g/mL^eVCM MICs were reported as 32μ g/mL (*vanA* positive)^fResults of duplicate determination (n = 2)^gResults of quadruplicate determination (n = 4)^hSources of bacterial strains: A = listed in our previous report¹²⁾ and Ref. 5

B = Japan Collection of Staphylococcus Cultures (JCSC) in our Department

C = Center for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, USA)

D = National Taiwan University Hospital (Taipei, Republic of China)

E = Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA; Herndon, USA)

MIC の上昇が高率に認められた。MIC の上昇がみられたものが VSSA においては 12/32 (38%) であるのに比べて、18/25 (72%) とその差は明らかであり、MIC が 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上と判定された株が 17/25 (68%) に上った。

2) LZD

同様の被検株を用いて LZD の MIC を測定した結果を Table 1 に示す。VCM の場合と異なり、すべて 0.5~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の MIC を示した。VSSA 32 株に対する LZD の MIC は 1~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 株; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 26 株; 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 株) であり、hVISA 6 株の MIC も同様に低く、1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 株; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 株) であった。VISA 25 株の MIC についても、0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 株; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 14 株; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 9 株) と低値を示し、VRSA 2 株にも MIC は 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と LZD は高い抗菌効果を示した。標準株として使用した FDA209P の MIC は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、米国で分離されたりネゾリド耐性株 NRS127 の MIC が 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったことは、本 MIC 測定が妥当であることを示している。

さらに培養を継続し、48 時間後に判定した場合でも、LZD の MIC の上昇は、VCM の場合と比較して低く、MIC の上昇した株の割合は、VSSA において 7/32 (22%)、VISA において 6/25 (24%) であり、いずれの場合でも 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。

2. 化学発光法を用いた感受性試験

1) VCM

VCM の効力を、化学発光法を用いて測定した全菌株について、結果の評価のための 3 つのパラメータ ED_{50} 、 ED_{25} 、AUC を算出し、微量液体希釈法で測定した MIC との相関図を作成した。その結果、3 つのパラメータのうち、 ED_{25} が最も MIC と相関性が高く (相関係数=0.86)、この指標を用いれば VISA 株が高い精度で識別可能であった。すなわち、 ED_{25} が 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えれば感度 97%・特異度 100% で hVISA あるいは VISA であり、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えれば 100% の感度・特異度で VISA であった (Table 1)。

2) LZD

全菌株について、LZD の効力を化学発光法で測定し ED_{50} 、 ED_{25} 、AUC と微量液体希釈法の MIC との相関図を作成したところ、相関係数は順に 0.67、0.76、0.69 であり、VCM の場合と同様に ED_{25} が最も MIC と高い相関性を示した (Table 1)。さらに培養時間を 48 時間に延長しても同様の結果であった。VSSA (H1)、hVISA (Mu3)、VISA (Mu50, NJ, MI)、VRSA (VR1, VR2)、および対照として用いた FDA209P と LRSa (NRS127) の各菌株について、化学発光強度のグラフを Fig. 1 に示した。いずれも、LZD 濃度の上昇とともに、化学発光強度が急峻に減衰していることが示された。LZD の濃度が高い領域では、リネゾリド耐性株 NRS127 でも化学発光

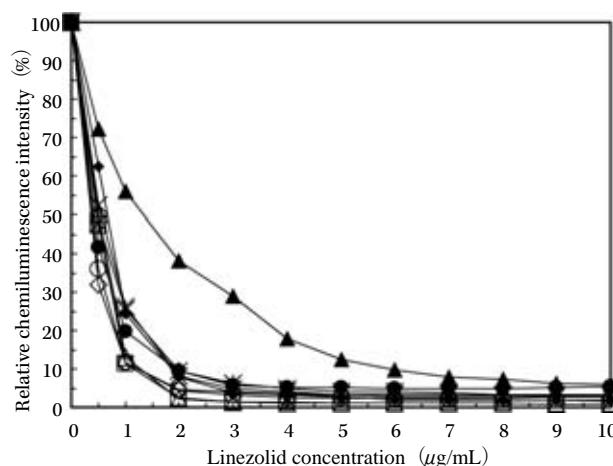


Fig. 1. Chemiluminescence-based linezolid susceptibility test for *S. aureus* strains.

Chemiluminescence intensity measured in a drug-free medium was used as a control (100%). Each curve is drawn on a mean of quadruplicate measurements ($n = 4$). Results of representative strains are shown here. Symbols are as follows: ◆ VSSA H1; □ hVISA Mu3; △ VISA Mu50; ○ VISA NJ; ◇ VISA MI; × VRSA VR1; * VRSA VR2; ● FDA209P; ▲ NRS127.

強度が減衰していた。

3. 殺菌曲線

Mu3, Mu50, VR1, FDA209P の 4 株を用いて得られた、VCM と LZD の殺菌曲線の比較を Fig. 2 に示す。VCM の場合には、VRSA 以外はその濃度を増加させれば、緩い傾きをもつ直線状のグラフが得られた。これは、その初期殺菌能は緩徐なものであり、十分な時間が経過しないと殺菌力が発揮されないことを示唆していると判断された。VRSA は VCM が 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合でも、まったく殺菌されず、さらに高濃度が必要であることを示唆していた。これに対して Mu3 の場合は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、Mu50 の場合は、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で完全に右下がりのグラフが得られた。

LZD の場合は、殺菌曲線の傾きが VCM の場合よりさらに穏やかであった。4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で菌の増殖は抑えられ、殺菌され始めるものの、その殺菌の程度は低いものであった。さらに濃度を上げて殺菌される菌量の増加はあまりみられず、16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LZD の存在下で 24 時間培養しても、生菌数の低下は 1/10~1/100 程度であった。

4. 呈色試薬を用いた代謝抑制効果の評価

各種の予備実験を行った結果、抗菌薬の作用は、概ね 1~2 時間ほどで現れることが判明した。また alamaBlue[®] と菌を長時間接触させると非特異的な還元反応が起こってしまうため、添加後 2 時間で測定するのがよいと判断した (Data 未提示)。そこで実験条件としては、菌液に LZD を加え、alamaBlue[®] を同時に加えたもの、ある

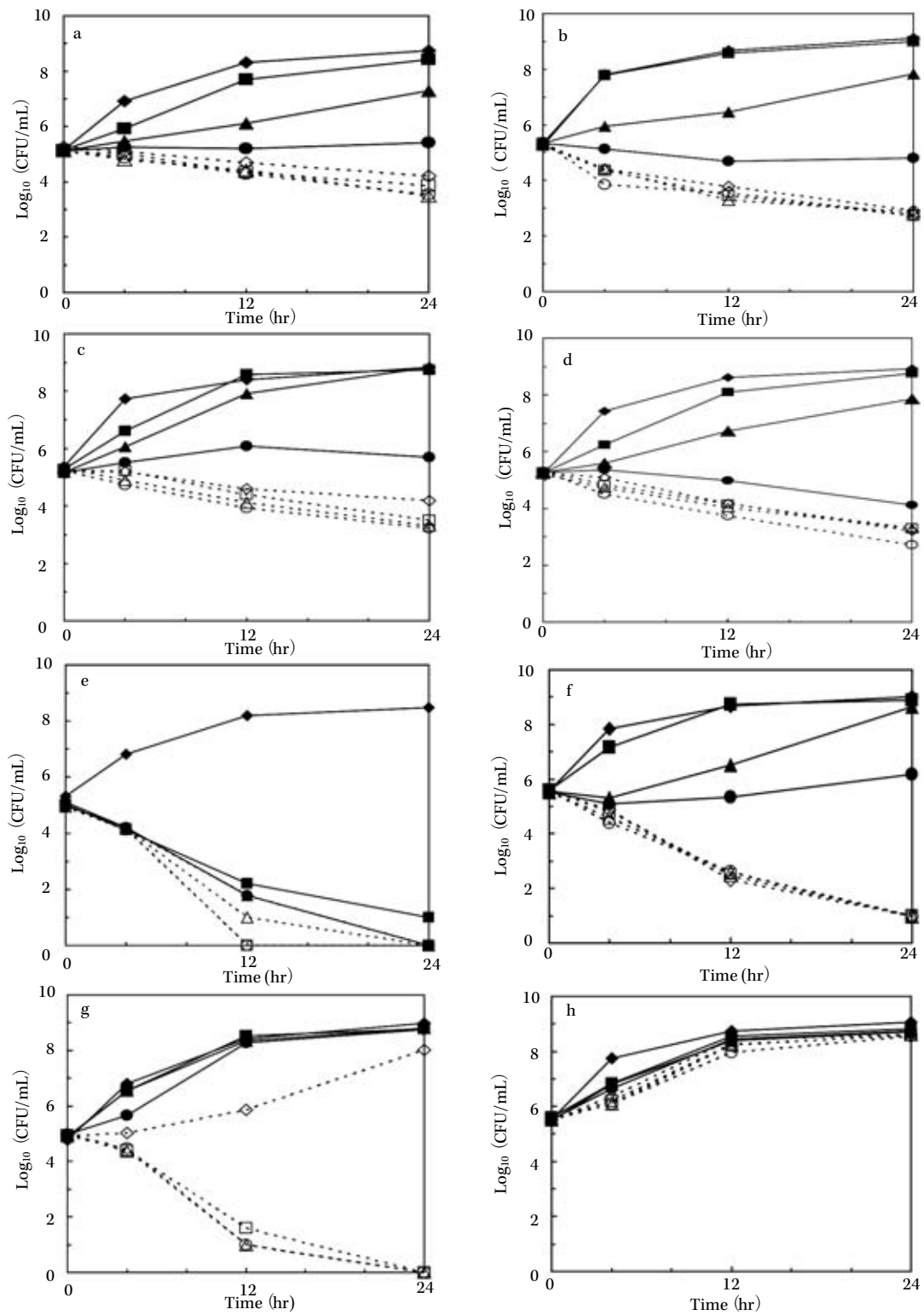


Fig. 2. Time-kill curves of LZD and VCM in 4 *S. aureus* strains.

Time-kill curves of LZD (a-d) and VCM (e-h) in 4 *S. aureus* strains are indicated. Tested strains were as follows: (a)/(e) = MSSA type strain FDA209P, (b)/(f) = hVISA strain Mu3, (c)/(g) = VISA strain Mu50, and (d) / (h) = VRSA strain VR1. Symbols for different concentrations of LZD or VCM are as follows: ◆ no drug; ■ 0.5 $\mu\text{g/mL}$; ▲ 1 $\mu\text{g/mL}$; ● 2 $\mu\text{g/mL}$; ◇ 4 $\mu\text{g/mL}$; □ 8 $\mu\text{g/mL}$; △ 16 $\mu\text{g/mL}$; ○ 32 $\mu\text{g/mL}$.

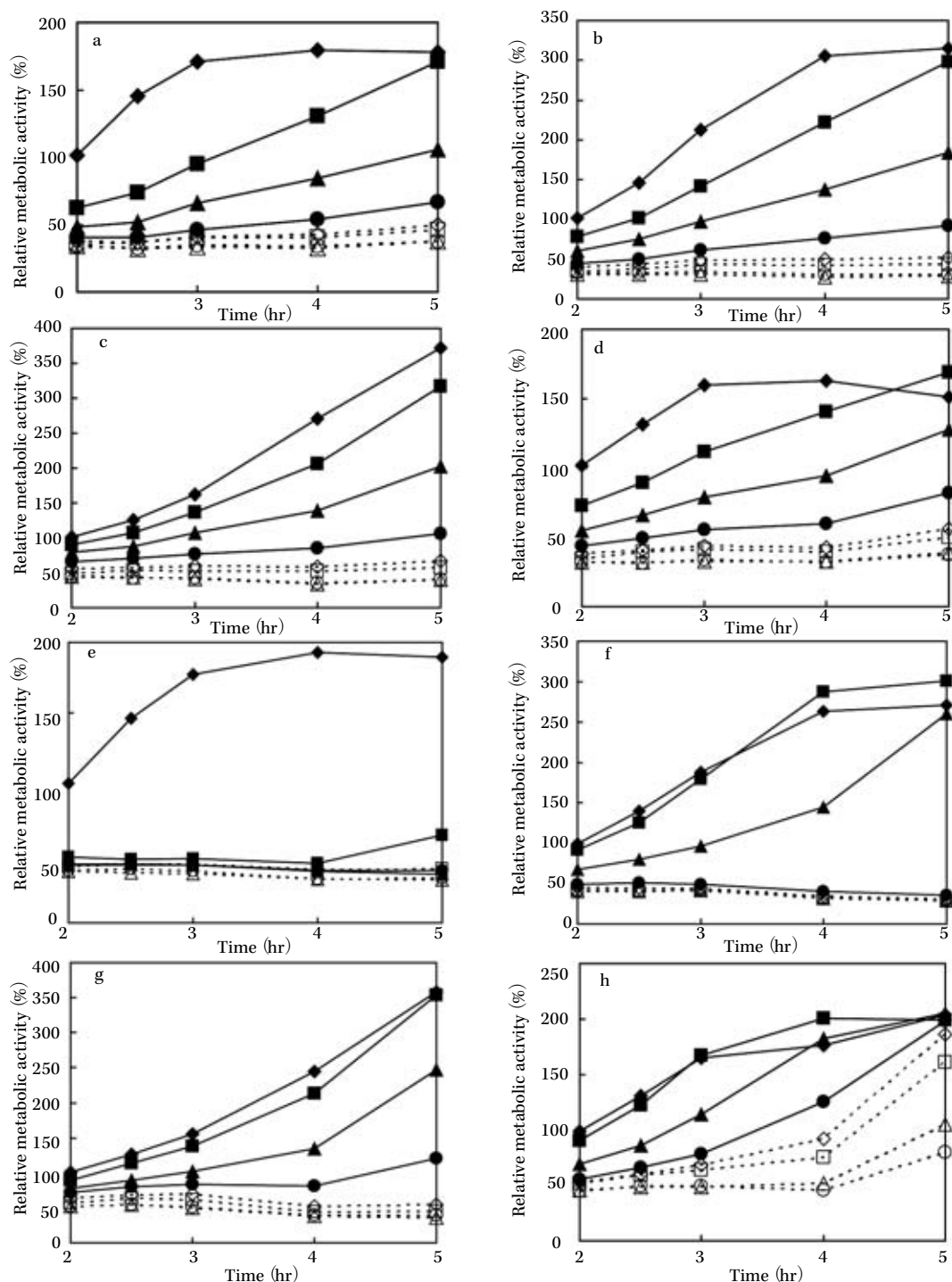


Fig. 3. Time-suppression curves of LZD and VCM in 4 *S. aureus* strains.

Time-suppression curves of LZD (a-d) and VCM (e-h) in 4 *S. aureus* strains are indicated. Each curve is drawn on a mean of absorbance measured in duplicates ($n = 2$). The abscissa indicates the incubation time after bacterial cells and antibacterial agents were mixed. To the mixture of culture and antibacterial agent, alamarBlue[®] was added prior to 2 hrs of assessment of reduction. Cells were further incubated for 2 hrs and cell growth assessed by measuring color change. Bacterial metabolic activity was expressed as the concentration of the reduced form of alamarBlue[®]: $6.868 \times OD_{570 \text{ nm}} - 4.722 \times OD_{600 \text{ nm}}$ (μM). Metabolic activity in drug-free medium was used as a control (100%). Tested strains were as follows: (a)/(e) = MSSA type strain FDA209P, (b)/(f) = hVISA strain Mu3, (c)/(g) = VISA strain Mu50, and (d)/(h) = VRSA strain VR1. Symbols for different concentrations of LZD or VCM are as follows: ◆ no drug; ■ 0.5 $\mu\text{g/mL}$; ▲ 1 $\mu\text{g/mL}$; ● 2 $\mu\text{g/mL}$; ◇ 4 $\mu\text{g/mL}$; □ 8 $\mu\text{g/mL}$; △ 16 $\mu\text{g/mL}$; ○ 32 $\mu\text{g/mL}$.

いは菌液に LZD を加えて培養開始後、0.5, 1, 2, 3 時間後に alamaBlue[®] を加えたものを、それぞれさらに 2 時間培養して吸光度を測定した。Mu3, Mu50, VR1, FDA 209P の 4 株を用いて、それぞれの菌の代謝抑制に対する VCM および LZD の効果を alamaBlue[®] を用いて測定した結果を Fig. 3 に示す。FDA209P 株を使用した場合、VCM では 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を添加すれば代謝活性の大幅な低下がみられたが、LZD では 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で代謝活性の低下がみられた。hVISA の場合、VCM 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で代謝活性は大幅に低下するが、VISA の場合は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で低下が認められるものの、その低下の程度は FDA209P および hVISA と比べてやや悪く、VRSA の場合は 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度であっても VCM 添加後 5 時間後には代謝活性の回復がみられた。これに対して LZD は hVISA, VISA, VRSA に同等に作用し、いずれも、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、その代謝活性を大幅に低下させていた。

III. 考 察

新しいカテゴリーのオキサゾリジノン系薬である LZD は、その作用点が既存の蛋白合成阻害薬とも異なるため、既存の蛋白合成阻害薬に耐性を示す *S. aureus* にも非常に良好な抗菌活性を示すことが従来から報告されている⁶⁾。今回われわれは、LZD は VCM に感受性を示す VSSA のみならず、バンコマイシン治療が無効であった例から分離された VISA や VRSA に対しても十分な抗菌活性をもつことを MIC の比較に加えて、化学発光法および alamaBlue[®] を用いた代謝活性の測定により確認した。

MIC においては、米国で分離された LRSA を除き、すべての菌株が VCM に対する感受性とは無関係に 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の MIC であり、感受性と判断された。

LZD の殺菌作用を従来の方法で調べたところ、その作用は弱く、静菌性の抗菌薬であるとのこれまでの報告と同様の結果が確認された (Fig. 2)。しかし、その一方で LZD は静菌性薬剤ではあるものの、MRSA 感染症における臨床効果には優れたところがあると報告されている^{7,8)}。われわれは化学発光法および alamaBlue[®] を用いた代謝活性の測定により、VCM と LZD の作用を比較検討し、従来の検査法では測定できない側面からの抗菌薬の評価を試みた。

化学発光を利用した薬剤感受性試験は、短時間で薬剤の作用をみることができ、また連続した量として表示されるため、わずかな耐性度の変化も描出することが可能であるという長所がある。

MIC との関連においては、ED₂₅ が最もよく相関し、VCM の場合には hVISA と VISA を ED₂₅ が 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上と規定することにより 100% 近い精度で識別できることが判明した。これは微量液体法による MIC では感受性と判断されてしまう VISA も、この方法を用いれば、

短時間で検出できることを示している。LZD の場合でもこの指標が最もよく MIC と相関しており、耐性株の ED₂₅ が 3.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、それ以外の菌株に比べて高値であることから、LZD 耐性株に対しても ED₂₅ などを利用して判定指標を設けることは可能であると考えられる。

LZD の優れた抗菌活性は、化学発光のグラフの形状にもよく現れており、わずか 4 時間しか培養していないにもかかわらず、薬剤濃度の上昇に伴って化学発光強度が急峻に低下し、短時間で菌の代謝活性を抑制する効果が高いことが示された (Fig. 1)。また、LZD 耐性株に対しても MIC よりも十分に高い濃度であれば、LZD の抗菌作用が現れていた。このような LZD がもつ強い代謝抑制作用が、*in vivo* における有効性と関連があるのではないかと思われる。このような知見は、従来までの感受性試験では得ることができず、化学発光法のもつ利点の一つであると考えられた。

これまでの殺菌曲線を作成して抗菌薬の効果をみるという方法では、生菌数の低下に結びつかない抗菌作用を表現できないため、静菌性の抗菌薬の場合に抗菌作用の現れる時間経過が測定できないという問題点があった。しかし、細胞の生死を判定する色素として使用されている alamaBlue[®] を用いて、菌体内の代謝抑制を測定する方法を用いると抗菌薬の作用を経時的にみる事が可能となる。LZD と VCM の 2 時間後の代謝抑制効果はほぼ等しく、LZD は VCM に対して作用時間的な遜色はないと思われた。

LZD の代謝抑制作用は濃度を高めるとともに増強し、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で VRSA を含めた被検株で 50% 以上の代謝抑制がみられた。この濃度は LZD の MIC よりも高いものであったが、この検査法では、種菌量が通常の感受性試験の 20 倍ほど高く、その影響であろうと思われた (Fig. 3)。VCM を用いた実験では、グラフに右下がりの傾向がみられ、この点は、VCM が殺菌性の薬剤であることと関係しているものと推察され、VCM の作用は時間依存性で、なおかつ、緩徐なものであることが示唆された。

コロニーを計測する方法でも同様の結論が報告されており¹⁵⁾、Fig. 2 でもそれが確認されたが、手技がきわめて煩雑で時間が掛かる欠点があるので、日常検査では容易に行えない。しかし、alamaBlue[®] を用いた方法は、薬剤の作用様式を簡便に、しかも短時間で判定できる可能性があり、今後の応用が期待されよう。

なお、Fig. 1 では、LZD = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で (培養時間は 4 時間)、ほとんどの菌株について化学発光強度がほぼ 0 付近となっているのに対し、Fig. 3 では同等の培養時間でも、依然として相当の吸光度変化が認められる。この理由については、①化学発光強度が turnover の速い物質 (活性酸素) の産生量を反映していること、②細胞内の還元性物質のすべてが活性酸素に転換されるわけで

はなく、化学発光として捉えられるものは、その一部にすぎないこと、③細胞には酸化ストレスに対抗する仕組みがあり、発生した活性酸素を除去することができるので、測定される活性酸素は、発生した量の一部にすぎないこと、④alamaBlue[®]は細胞内に還元性物質が残っていれば変色するので、代謝を止めた細胞でも（内容が完全に枯渇するまで）過去の蓄積が反映されてしまうこと、および⑤種菌量が化学発光試験の20倍ほど高いことが考えられる。

常用量の LZD を1日2回使用すると、血中濃度のトラフ値が4 μ g/mL以上に保たれていること¹⁶⁾、および2時間ほどの postantibiotic effect が期待できること¹⁷⁾、の2点を考慮に入れても、NRS 127 株の示した MIC = 7 μ g/mL という値では治療に抗して体内で菌が増殖できる可能性があり、例えば、高齢者や糖尿病などの食細胞の機能が健在でない患者の場合には、LZD 単剤の治療が失敗する可能性がある。しかし、この菌株に関しては、VCM などの他の抗菌薬の感受性は良好であるので、現時点では深刻な脅威ではないと思われる。

腸球菌でも LZD の耐性株の事例が報告されているが^{18,19)}、そのメカニズムは、LZD が結合する付近の 23S rRNA が点変異を起こしたためと報告されている²⁰⁾。rRNA をコードする DNA 座は複数コピーあるが、変異を起こした遺伝子座の数が増すごとに LZD に対する耐性度が上昇するとされており²¹⁾、黄色ブドウ球菌についても類似の現象であることを示唆した報告がある²²⁾。それによると、変異が蓄積するたびに LZD の MIC が上昇して 128 μ g/mL にまで達するとされ、わずか40日ほどの期間があれば、耐性株が得られるとされる。このような菌株が数多く人為的に選択され、新薬である LZD の優れた効果を短期間で失うことがないように、抗菌薬の適正使用に関しては細心の注意が求められよう。

文 献

- 1) Lowy F D: *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339: 520~532, 1998
- 2) Centers for Disease Control and Prevention: Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morb Mortal Wkly Rep 48: 707~710, 1999
- 3) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 40: 135~136, 1997
- 4) Smith T L, Pearson M L, Wilcox K R, et al: Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 340: 493~501, 1999
- 5) Oliveira G A, Dell'Aquila A M, Masiero R L, et al: Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol 22: 443~448, 2001
- 6) Zurenko G E, Gibson J K, Shinabarger D L, et al: Oxazolidinones: a new class of antibacterials. Curr Opin Pharmacol 1: 470~476, 2001
- 7) Stevens D L, Herr D, Lampiris H, et al: Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 34: 1481~1490, 2002
- 8) Moise P A, Forrest A, Birmingham M C, et al: The efficacy and safety of linezolid as treatment for *Staphylococcus aureus* infections in compassionate use patients who are intolerant of, or who have failed to respond to, vancomycin. J Antimicrob Chemother 50: 1017~1026, 2002
- 9) Manome I, Ikedo M, Saito Y, et al: Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 41: 279~284, 2003
- 10) Yamashoji S, Manome I, Ikedo M: Menadiene-catalyzed O₂⁻ production by *Escherichia coli* cells: Application of rapid chemiluminescent assay to antimicrobial susceptibility testing. Microbiol Immunol 45: 333~340, 2001
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th Informational Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005
- 12) Cui L, Ma X, Sato K, et al: Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microb 41: 5~14, 2003
- 13) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved Standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2003
- 14) Shiloh M U, Ruan J, Nathan C: Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay. Infect Immun 65: 3193~3198, 1997
- 15) Löwdin E, Odenholt I, Cars O: *In vitro* studies of pharmacodynamic properties of vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 42: 2739~2744, 1998
- 16) Stalker D J, Jungbluth G L, Hopkins N K, et al: Pharmacokinetics and tolerance of single- and multiple-dose oral or intravenous linezolid, an oxazolidinone antibiotic, in healthy volunteers. J Antimicrob Chemother 51: 1239~1246, 2003
- 17) Munckhof W J, Giles C, Turnidge J D: Post-antibiotic growth suppression of linezolid against Gram-positive Bacteria. J Antimicrob Chemother 47: 879~883, 2001
- 18) Gonzales R D, Schreckenberger P C, Graham M B, et al: Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet 357: 1179, 2001
- 19) Auckland C, Teare L, Cooke F, et al: Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 50: 743~746, 2002

- 20) Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, et al: Resistant to linezolid: characterization of mutation in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2154~2156, 2001
- 21) Marshall S H, Donskey C J, Hutton-Thomas R, et al: Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3334~3336, 2002
- 22) Pillai S K, Sakoulas G, Wennersten C, et al: Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* 186: 1603~1607, 2002

Antibacterial effect of linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evaluated using colorimetry and chemiluminescence-based drug-susceptibility tests

Mitsutaka Komatsu¹⁾, Yutaka Tajima²⁾, Teruyo Ito^{2,3)}, Yuichiro Yamashiro¹⁾ and Keiichi Hiramatsu^{2,3)}

¹⁾Department of Pediatrics, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

²⁾Infection Control Sciences, Juntendo University

³⁾Department of Bacteriology, Juntendo University

The number of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates with reduced susceptibility to vancomycin (VCM) has been increasing, necessitating the development of measures against infections caused by such strains. We evaluated the antibacterial activity of a new agent, linezolid (LZD), in MRSA strains with varying VCM susceptibility. To do so, we used 3 methods—microbroth dilution to determine minimal growth inhibitory concentrations (MICs), chemiluminescence-based drug susceptibility testing, and the alamaBlue[®] reaction measuring bacterial metabolic activity. MICs of LZD ranged from 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and did not correlate with those of VCM, which ranged from 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Chemiluminescence assay showed that LZD significantly reduced chemiluminescence intensity linked to bacterial metabolic activity. As the LZD concentration increased, intensity decreased steeply, indicating that LZD strongly suppress bacterial metabolism in short incubation. Although time-kill assays showed that LZD is bacteriostatic, alamaBlue[®] reactions reflecting bacterial metabolic activity showed that LZD had a suppression time curve similar to VCM. This data suggests that the initial time required for LZD to affect bacterial cells was nearly equal to that for VCM. Our data suggests that LZD has a strong antibacterial activity against MRSA strains, including VRSA, and that this drug is a promising new antibiotic for treating MRSA infections.