

サイトカイン誘導能よりみた消化器外科術後 MRSA 腸炎起炎菌の実験的検討

広島大学医学部第1外科, 同 総合診療部*

山東 敬弘 横山 隆* 児玉 節 竹末 芳生
檜山 英三* 村上 義昭 今村 祐司 新原 主計
津村 裕昭 松浦雄一郎

当科病棟で最近13年間に分離された Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (以下, MRSA) を Coagulase 型と enterotoxin 型で分類し, MRSA 腸炎の起炎菌を検討した。起炎菌は, 第1例目が coagulase II 型, enterotoxin C, TSST-1産生株 (IICT 型株) で, 他は27例が coagulase II 型, enterotoxin AC, TSST-1産生株 (IIACT 型株) で, これら2種の型の株に限られていた。ヒト末梢血単核球に各種 MRSA 培養上澄を加えた際の tumor necrosis factor α (以下, TNF α), interleukin-2 (以下, IL-2) 産生を測定した結果, IIACT 型株で最も多くの TNF α , IL-2産生が認められ, この系に methylprednisolone またはヒト免疫グロブリン添加すると有意に産生が抑制された。以上より, MRSA 腸炎の治療におけるステロイドやヒト免疫グロブリンの有用性が示唆された。

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enterocolitis, staphylococcal enterotoxin, toxic shock syndrome toxin-1, inflammatory cytokines

目 的

術後メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: 以下, MRSA) 腸炎は時に極めて激しい症状を呈し, 多臓器不全に移行することもあり, 消化器外科術後の大きな問題である。最近その予防, 治療についての知見も増え¹⁾²⁾, やや鎮静化した感があるが, 今なお MRSA が完全に駆逐されていない現状では, 今後も注意すべき合併症であることには変わりはない。MRSA には種々の coagulase 型 enterotoxin 型が存在し, ひとくちに MRSA といっても単一ではない。われわれは当科病棟における年次別の MRSA 流行株の coagulase 型, enterotoxin 型の変遷について報告してきたが³⁾, 今回, 自験術後 MRSA 腸炎症例におけるこれらの型を検討し, 本症における起炎菌についてブドウ球菌産生毒素の面から検討したので報告する。

方 法

1983年1月から1995年12月までに当科で入院加療し

<1997年2月12日受理>別刷請求先: 山東 敬弘
〒730 広島市中区本川町1-4-3 広島記念病院
外科

た症例について, 術後に下痢, 腹部膨満, 発熱などの腸炎症状を有し, 便より MRSA が検出された症例を術後 MRSA 腸炎症例とした。

また同時期における当科病棟分離 MRSA 株について, 1症例1株とし coagulase 型をデンカ生研製キットにて判定し, 逆受身ラテックス凝集反応⁴⁾による toxic shock syndrome toxin-1 (以下, TSST-1) および enterotoxin A~D の産生能をデンカ生研製キットにて判定した。また, これらの全 MRSA 株について, 寒天平板希釈法により 37°C 18時間培養での cefmetazole (以下, CMZ) の最小発育阻止濃度 (以下, MIC) を測定した。

MRSA 腸炎症例の便から分離された MRSA 株についても, 同様の方法で coagulase 型, TSST-1産生性, enterotoxin 型を判定し, さらに判定結果が確実でないものについては polymerase chain reaction を用いて既報の方法により⁵⁾TSST-1遺伝子, enterotoxin A~D 遺伝子の有無を判定し, 逆受身ラテックス凝集反応の結果とあわせて MRSA 腸炎起炎株の型分けを正確に行った。

比重遠沈法にて採取した健康人末梢血単核球をイス

Fig. 1 Number of isolated various type of MRSA classified by coagulase type and the production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1.

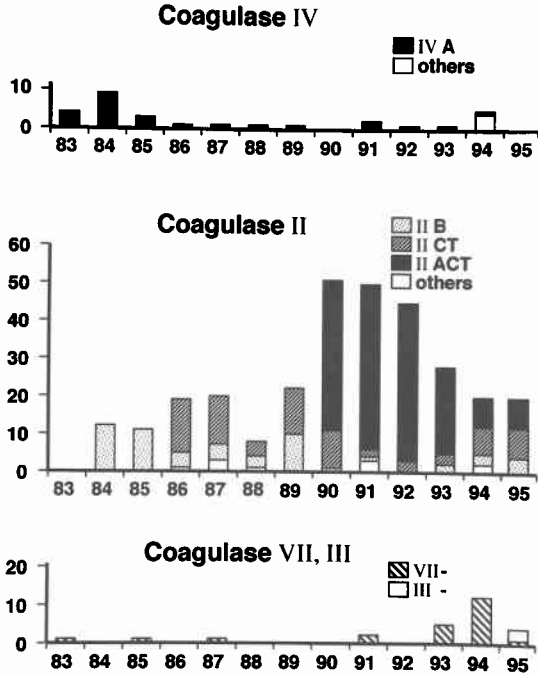
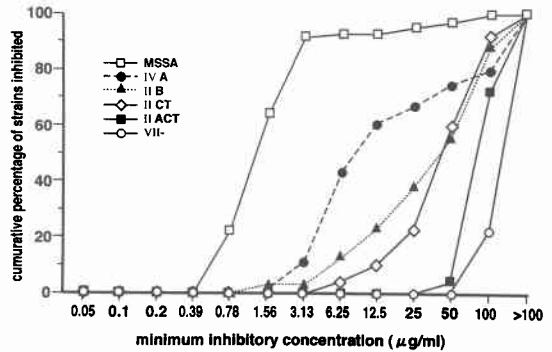


Table 1 Number of the case of MRSA enterocolitis and causative MRSA strains classified by coagulase type and the production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1. (1983~1995)

Year	No. of cases	Causative strains
1990	7	IICT1, IIACT6
1991	9	IIACT9
1992	7	IIACT7
1993	5	IIACT5

Fig. 2 Susceptibility for cefmetazole (CMZ) of each type of MRSA.



コフ培地に 5×10^5 /ml 浮遊させ、これにイスコフ培地にて24時間培養した当科病棟分離各種MRSA (coagulase IV型 enterotoxin A 産生株：以下IVA型株と略記, coagulase II型 enterotoxin B 産生株：以下IIB型株, coagulase II型 enterotoxin C TSST-1産生株：以下IICT型株, coagulase II型 enterotoxin AC TSST-1産生株：以下IIACT型株, coagulase VII型 toxin非産生株：以下VII-型株) 培養上清 $10 \mu\text{l}$ /mlを加え 37°C 24時間 incubate した上澄中の tumor necrosis factor α (以下, $\text{TNF}\alpha$), interleukin-2 (以下, IL-2) をELISA法にて測定した。

さらに $\text{TNF}\alpha$, IL-2産生に対する薬剤の効果を見るため coagulase II型 enterotoxin AC TSST-1産生株上澄で刺激した同様の系に incubate 直前に, おのおの methylprednisolone 0.25, 0.5, 2.5mg/ml またはヒト免疫グロブリン製剤0.63, 1.3, 6.3mg/mlを加え, 添加薬剤は洗浄せずそのまま 37°C 24時間 incubate した場合の上澄中の $\text{TNF}\alpha$, IL-2を同様にELISA法にて測定した。統計処理には対応のある t 検定を用い, 危険率5%以下 ($p < 0.05$) をもって有意差ありとした。

成 績

1983年1月から1994年12月までの当科病棟分離

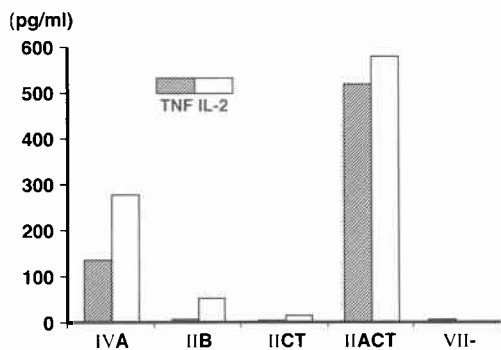
MRSA株のcoagulase型, toxin産生性型により分類した各タイプMRSAの分離数の年次別推移を示した (Fig. 1)。初期はIVA型株が流行の主流であったが, 順次IIB型株, IICT型株と移行し, 1990年よりIIACT型株が大流行したが, 1994年には新たにVII-型株がやや増加し種々のタイプが検出され1種類のタイプの流行傾向はなくなった。

MRSA腸炎症例の年次別発症数, 起炎MRSAのタイプを示した (Table 1)。1990年の第1例がIICT型株によるものであったが他の27例はすべてIIACT型株であった。1994年以降はMRSA腸炎発症を認めていない。症例の内訳は胃腫瘍切除後10例, 結腸腫瘍切除後6例, 膵頭十二指腸切除後3例, その他術後9例であった。

各タイプMRSAのCMZのMIC分布を示した (Fig. 2)。年次別の流行が後に起こったMRSA株ほどMICが高い傾向を示した。

予備実験として, 各タイプMRSAをイスコフ培地にて24時間培養した上澄をイスコフ培地に浮遊させたヒト末梢血単核球に加え24時間 incubate した上澄中の $\text{TNF}\alpha$, IL-2産生量を示した (Fig. 3)。図には2名の健康成人より採取した末梢血単核球を用いた結果を

Fig. 3 TNF α and IL-2 production from human peripheral blood mononuclear cell incubated with culture supernatant of various types of MRSA strains (n=2).



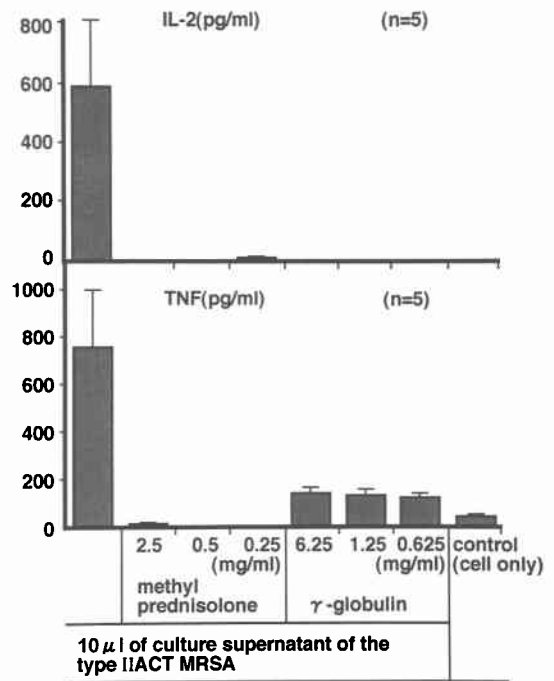
示したが、IIACT 型株培養上澄についてのみ5名の末梢血単核球で TNF α 、IL-2産生を測定した。その結果は TNF α が 750 ± 429 pg/ml、IL-2が 587 ± 253 pg/ml (Mean \pm SD) であった。この実験に用いた各タイプ MRSA の toxin 産生量を、デンカ生研キットで検出できた培養上澄の最大希釈倍率で示すと、IVA 型株は enterotoxin A が $\times 16$ 倍、IIB 型株は enterotoxin B が $\times 32$ 倍、IICT 型株は enterotoxin C が $\times 1$ 倍で TSST-1が $\times 16$ 倍、IIACT 型株は enterotoxin A が $\times 128$ 倍 enterotoxin C が $\times 1$ 倍で TSST-1が $\times 16$ 倍であった。IIACT 型株培養上澄で刺激した際に TNF α 、IL-2産生が多くみられたが、enterotoxin A を産生しない株では TNF α 産生はほとんど認められなかった。

次いで TNF α 、IL-2産生が最も多くみられた IIACT 型株培養上澄でヒト末梢血単核球を刺激した系に阻害物質として methylprednisolone、ヒト免疫グロブリン製剤を加えた場合の TNF α 、IL-2産生を示した (Fig. 4)。Methylprednisolone を加えると TNF α 産生はほぼ完全に阻害され、ヒト免疫グロブリン製剤ではわずかに TNF α 産生がみられたが、すべて有意に抑制作用がみられた ($p < 0.05$)。また IL-2 では methylprednisolone、ヒト免疫グロブリン製剤ともに有意差をもってほぼ完全に産生を阻害した ($p < 0.01$)。

考 察

MRSA 腸炎は時に極めて激しい症状を呈し消化器外科術後の重大な問題であるが、最近やや鎮静化した感がある⁶⁾。しかし、MRSA は今なお完全には駆逐されておらず、現在までに経験した教訓をふまえて今後

Fig. 4 TNF α and IL-2 production from human peripheral blood mononuclear cell incubated with culture supernatant of IIACT type of MRSA strain with or without methylprednisolone or human immunoglobulin (Mean \pm SE). Methylprednisolone or human immunoglobulin significantly reduced the TNF α and IL-2 production in the cultures ($p < 0.05$).



も監視を続けていく必要がある。

MRSA には種々の coagulase 型 enterotoxin 型が存在し、これらにより MRSA を分類することでより詳細な疫学的検討が可能である。

当科における病棟分離 MRSA の変遷をみると、1980年代前半の coagulase IV 型から II 型への変化に伴い順次 IIB 型株、IICT 型株、IIACT 型株と流行株が推移し、1994年には新たに VII-型株が出現し種々のタイプの株が検出され全体の検出数も減少している。MRSA 腸炎は IICT 型株、IIACT 型株で起こっており、全国的には IICT 型株の報告が多いが¹⁾、IIACT 型株の報告もある⁷⁾。当科ではほとんどが IIACT 型株であり、この株は TSST-1、enterotoxin A を高力価に産生している。MRSA 腸炎の原因としてなんらかの toxin によるものが推定されており、TSST-1がその病因として推定されているが⁸⁾、enterotoxin A の関与も否定できないと思われる。

当科では1987年頃より保菌者の隔離や医療従事者の手指消毒の徹底などの対策を施行したがMRSAの減少は一時的であった。IICT型株はminocycline(以下、MINO)に感受性があったためこれを多用していたところ1990年にMINO耐性のIIACT型株が大流行しMRSA腸炎が多発した。1992年頃より抗生剤の短期投与を徹底し、これにつれMRSA腸炎、MRSA検出数が減少してきたように思われる。1994年に増加したVII型株はtoxinを産生せず、MRSA腸炎という面からは有利なように思われるが、先にCMZのMIC分布で示したように高度耐性化しており、我々の検討ではarbakacinの感受性も他の型よりやや低く、除菌という面からはますます不利となっていると考えられる。現在のところ、当科ではこのVII型株はclindamycinの感受性が高く、また術後肺炎を起こす率が高いような印象を受けているがまだはっきりとした結論は得られていない。今後、この株の動向にも注意が必要である。また、当科では現在でもIIACT型株がかなり検出されており、MRSA腸炎の減少の要因として、抗生剤の短期投与の徹底化により菌交代の機会の減少が関与しているのか、IIACT型株自体の何らかの変化が関与しているのか不明であるため、今後も厳重な監視と対策が必要である。

TSST-1やenterotoxinはsuper antigenとして単核球よりのcytokine産生を誘導し⁹⁾¹⁰⁾、これがtoxic shock syndromeの原因であると考えられており、MRSA腸炎においてもこのような病因が推定されている⁸⁾。イスコフ培地に浮遊させたヒト末梢血単核球に各タイプのMRSA株培養上澄を加えてincubateした際のTNF α 、IL-2産生量では、enterotoxin Aを産生する株の培養上澄を加えたものでTNF α 、IL-2産生量が多い傾向があった。意外にもTSST-1を産生するIICT型株でTNF α 産生が低かったが、今回使用したIICT型株のTSST-1産生能が比較的良かったことにも起因するのかもしれない。今までの報告ではMRSA腸炎を起こしたIICT型株ではTSST-1産生能がかなり高く¹¹⁾、今回使用したIICT型株に比べ病原性は高いと考えられる。

MRSA腸炎発症の要因として、増殖したMRSA菌数、MRSAのtoxin産生能、患者のtoxinに対する抗体価、患者単核球のtoxinに対するcytokine産生能など種々の要素がからんでおり、単一の要因では説明できない。MRSA腸炎患者の単核球が健康人に比べtoxinに対してのcytokine産生能が高いという報告

は見うけられないが、MRSA腸炎の激しい症状より推測すると、toxinにより大量のcytokineが産生されているものと思われる。MRSA腸炎の治療においてはこのcytokineに対する対策が重要である。今回の実験的検討で、IIACT型株培養上澄による単核球よりのTNF α 、IL-2産生を、ステロイド、ヒト免疫グロブリン製剤が抑制することが示唆された。ステロイドは前投与によりcytokineの転写やtranslationを抑制するとされており¹²⁾、今回の実験でもステロイドは前添加にてcytokine産生を抑制した。toxinと同時に添加しない後での添加では、添加時期が遅くなるほどcytokine産生抑制作用は弱くなるものと思われる。また、ヒト免疫グロブリン製剤はtoxinに対する抗体作用によりcytokine産生抑制作用を現していると考えられるため、toxin投与後での添加では抑制作用は発揮されないと考えられた。なお今回同様にinterleukin-1 β についても少数であるが測定し、ステロイド、ヒト免疫グロブリン製剤による産生抑制はやや弱いもののほぼ同様の傾向が認められた。

われわれはMRSA腸炎の際の重篤な全身症状の対策の一つとして、cytokine産生抑制の面からステロイド¹³⁾、抗TSST-1抗体の効果期待してヒト免疫グロブリン製剤の投与¹⁴⁾をvancomycinの胃管注入に併用してよく行った。これらはcytokine産生の起こる前に投与することが効果的と考えられるため早期投与が原則である。とくにステロイドは感染防御の面で長期の投与は好ましくないため、われわれは早期1~2回のみの投与にとどめており、ときに奏功する例をみている¹⁵⁾。

近年のMRSAに対する知見によりMRSA腸炎の対策も普及し、以前のような脅威はなくなってきつつある。しかし今なおMRSA腸炎を多発させた型のMRSA株が存在し、状況によってはMRSA腸炎が発症する可能性があり、今後も注意を怠ってはならないと考える。

文 献

- 1) 保里恵一, 由良二郎, 品川長夫ほか: 術後感染性腸炎, 特にMRSA腸炎の実態—全国アンケート調査結果を中心に—. 感染症誌 63: 701—707, 1989
- 2) 炭山嘉伸: MRSA腸炎. 外科診療 35: 1387—1393, 1993
- 3) Takesue Y, Yokoyama T, Kodama T et al: A study on postoperative enteritis caused by methicillin resistant Staphylococcus aureus. Surg Today 23: 4—8, 1993

- 4) Igarashi H, Fujikawa H, Shingaki M et al: Latex agglutination test for Staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. Clin Microbiol 23 : 509-512, 1986
- 5) 檜山英三, 山東敬弘, 横山 隆ほか: PCR を用いた黄色ブドウ球菌トキシン型別の検討. 日外感染症研 5 : 119-124, 1993
- 6) 仁科晴弘, 小西敏郎, 森 潔ほか: 胃切除術後 MRSA 腸炎. 日外感染症研 5 : 171-174, 1993
- 7) 加藤広行, 塚田勝彦, 塩島正之ほか: 消化器外科における MRSA 感染症の対策. 日外感染症研 5 : 213-217, 1993
- 8) 横山 隆, 児玉 節, 竹末芳生ほか: 術後 MRSA 腸炎. 外科 53 : 1034-1040, 1991
- 9) Uchiyama T, Kamagata Y, Yan XJ et al: Relative strength of the mitogenic and interleukin-2-production-inducing activities of staphylococcal exotoxins presumed to be causative exotoxins of toxic shock syndrome: toxic shock syndrome toxin-1 and enterotoxins. A, B and C to murine and human T cells. Clin Exp Immunol 75 : 239-244, 1989
- 10) Choi Y, Kotzin B, Herron L et al: Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. Proc Natl Acad Sci 86 : 8941-8945, 1989
- 11) 西村好晴, 竹中博昭, 岩瀬和裕ほか: 消化器外科術後メチシリンセフェム耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 腸炎症例の検討—重症例と軽症例の比較—. 日臨外医会誌 53 : 2569-2573, 1992
- 12) Beutler B, Krochin N, Milsark IW et al: Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanism of endotoxin resistance. Science 232 : 977-980, 1986
- 13) Parsonnet J, Hickman RK, Eardley DD et al: Induction of human interleukin-1 by toxic-shock-syndrome toxin-1. J Infect Dis 151 : 514-522, 1985
- 14) Chesney PJ: Toxic shock syndrome. Management and long-term sequelae. Ann Intern Med 96 : 847, 1982
- 15) 沖田光昭, 横山 隆, 児玉 節ほか: 胃癌術後 MRSA 感染症にて重篤化した 2 症例. 腹部救急診療の進歩 11 : 561-564, 1991

**The Experimental Study with the Induction of Cytokines by
Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causative
Strains of Postoperative Enterocolitis in
Gastroenterological Surgery**

Takahiro Santo, Takashi, Yokoyama*, Takashi Kodama, Yoshio Takesue,
Eiso Hiyama*, Yoshiaki Murakami, Yuji Imamura, Kanae Shinbara,
Hiroaki Tsumura and Yuichiro Matsuura
First Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine
*Department of General Medicine, Hiroshima University Hospital

In order to study the characteristics of the strains causing Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) enterocolitis, we investigated the coagulase type and the production of staphylococcal enterotoxin (SE) of MRSA strains isolated in our ward for the past 13 years. Among the 28 strains causing MRSA enterocolitis, the first one was a coagulase type II and SE C and TSST-1-producing strain (II CT type), and the remaining 27 strains were coagulase type II and SE C, SE A and TSST-1-producing strains (IIACT type). Tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-2 (IL-2) production from human peripheral blood mononuclear cells incubated with the culture supernatant of various types of MRSA was examined. TNF α and IL-2 production from human peripheral blood mononuclear cells incubated with the culture supernatant of the IIACT type of MRSA was the highest. Methylprednisolone or human immunoglobulin significantly reduced the TNF α and IL-2 production in the cultures ($p < 0.05$). These results suggest that methylprednisolone or human immunoglobulin is effective in the treatment of MRSA enterocolitis.

Reprint requests: Takahiro Santo Department of Surgery, Hiroshima Memorial Hospital
1-4-3 Honkawa-cho, Naka-ku, Hiroshima, 730 JAPAN