

Staphylococcus epidermidis の産生する slime に関する研究

濱田 育男 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)

横田 光正

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座* (主任: 藤岡幸雄教授)

[受付: 1984年9月26日]

抄録: *Staphylococcus epidermidis* は通常、莢膜はなく, slime を産生しない菌とされている。

我々は, *S. epidermidis* の産生する elastase を採取するために Brain heart infusion agar に Dialysis membrane technique (DMT) を用いて培養したところ, 多量の slime を産生することを見いだした。そこで, ブドウ球菌属の12菌種12株と口腔より分離した *S. epidermidis* 10株をDMT培養したところ, *S. epidermidis* と *S. xyloso* が slime を産生した。しかし, 莢膜形成はいずれの株においても見られなかった。

S. epidermidis の slime 産生は5~10%炭酸ガス濃度に依存し, 好気, 嫌気培養では, 菌の発育が十分であるにもかかわらず認められなかった。さらに Trypticase soy agar, 1% glucose 加 Trypticase soy agar, Mannitol salt agar などの培地を用いたDMT培養では slime 産生が見られず, Brain heart infusion や肉エキスを多く含む培地において slime 産生が認められた。

S. epidermidis の slime 中にはDNAが6.1%(W/W), 蛋白6.3%(W/W)そして糖が約10%(W/W)含まれていた。また, 粘度測定の結果, 硫酸プロタミン処理後に著明な粘度の低下が見られることから, DNAが slime の粘性に関与する物質であることが示唆された。

0.8% Agarose gel electrophoresis で *S. xyloso*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* そして *S. sciuri* にDNAが検出された。また, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis の結果では, *S. epidermidis* の slime 中には通常の液体培養では見られない分子量 24,000~24,500 の糖蛋白が多量に見られ, DNA以外の物質も相互に関連して粘性を増強しているものと推察された。

Key words : *Staphylococcus epidermidis*, slime production, viscosity, DNA, glycoprotein

緒 言

Staphylococcus epidermidis などの Coagulase-negative staphylococci (C-NS) は元来, 病原性のない菌であると考えられて来た。最近, 日和見感染の病原として認識されるとともに, 尿路感染症^{1,2)}, 心内膜炎³⁾などの患者か

ら分離され, さらに高カロリー輸液時の静脈内留置カテーテル⁴⁾の使用や心臓人工弁の使用⁵⁾, 脳脊髄液シャント⁶⁾などの体内留置医療器具の使用に伴って起こる C-NS 感染症が報告され, 問題となっている。

また, Christensen ら⁷⁾は脈管内カテーテル使用時に, *S. epidermidis* が原因と思われる

Study on the slime from *Staphylococcus epidermidis*

Ikuo HAMADA and Masaru KANEKO

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

Mitumasa YOKOTA

(Department of Oral Surgery 1, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通り1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 9 : 168-178, 1984

菌血症の症例から, slime を産生する *S. epidermidis* を高率に分離し, slime 産生によって引き起こされる医療器具平滑面への付着 (adherence) は, *S. epidermidis* 感染症の成立において重要な因子であると報告している。

我々は *S. epidermidis* の病原性を検討する上で, *S. epidermidis* の産生するエラスチン分解酵素 (elastase) に注目し研究を進めて来たが⁹⁾, この elastase は通常行われる液体培地や寒天平板培地を用いての培養では得られず, Murphy ら^{9,10)} が報告した Dialysis membrane technique (DMT) 培養でのみ分離することが可能であった。また, この方法で *S. epidermidis* を培養すると多量の slime が産生されることが観察された。我々は, この slime は Christensen ら⁷⁾ が報告したものと同様に, *S. epidermidis* 感染時の医療器具の平滑面に対する adherence factor ではないかと考え, *S. epidermidis* から slime を分離し, 粘性の本体を明らかにすることを目的として, 検討を加えたので報告する。

材料と方法

(1) 使用菌株

供試菌株の中で CN-S は *S. xylosum* ATCC 29971, *S. cohnii* ATCC 29974, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. warneri* ATCC 27836, *S. simulans* ATCC 27848, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. sciuri* ATCC 29062, *S. lentus* ATCC 29070, *S. capitis* ATCC 27840の10株とヒト口腔内より分離した *S. epidermidis* 10株合計20株である。

また, Coagulase-positive staphylococci (C-PS) は *S. aureus* ATCC 25923, *S. hyicus* ATCC 11249の2株である。

(2) 使用培地と培養方法

培地は Brain heart infusion agar, broth (BHI agar, broth ; ニッスイ, BBL), Trypticase soy agar, broth (TS agar, broth ; BBL), Mannitol salt agar (MS agar ; ニッ

スイ), Nutrient agar (NA), Heart infusion agar (HI agar ; ニッスイ) を用いた。

培養は Murphy ら^{9,10)} の Dialysis membrane technique (DMT) に従った。使用した培地は BHI agar, TS agar, 1% glucose 加 TS agar (TSG agar), NA, MS agar, HI agar である。これらを 121°C, 15分間, 高压滅菌し, 60mlを滅菌1号角シャーレ (栄研) に入れ, かためた。そして, 高压滅菌 (121°C, 15分間) 処理した Dialysis membrane スペクトラポア 3 (Spectrum) を培地上に敷き, コンラージ棒で十分拡げ, 培地と膜の間に気泡が入らない様にした。つぎに BHI broth で 37°C, 18時間培養した菌液 0.1ml (1×10^9 ケ/ml) を Dialysis membrane 上に接種し, 37°C で 48時間, 5%, 10% 炭酸ガス濃度で, 炭酸ガス培養器 IC-200 (サクラ精機) を使用し, 培養した。また, 嫌気培養は Gas Pak (BBL) 法で行った。

(3) slime 産生と莢膜の確認方法

DMT 培養における slime 産生の確認は, 培地上に発育したコロニーを白金耳でとり 2 cm 以上糸を引いたものを陽性とした (図 1)。

また, 液体培養における slime 産生は Christensen ら⁷⁾ の方法で確認した。すなわち, 0.25% (W/W) 濃度に glucose を含んだ TS broth と glucose を含まない TS broth 5.0ml の入った小試験管 (ガラス製) に菌を1白金耳接種し, 37°C, 20時間培養後, 菌液をピペットで取り除いた試験管に 0.1% (W/W) Trypan blue 液を約 5 ml 入れ, 60秒間おいて, ガラス管壁に付着した物質が青く濃染されたものを陽性とした。

莢膜の確認は Duguid¹¹⁾ の wet-film India ink 法を用い, スライドガラス上で菌液と市販の墨汁を混和して, カバーガラスを圧着した後, 鏡検 (1, 250倍) した。そして菌体の周囲に透明な層 (halo) が見られた場合, 莢膜陽性と判定した。

(4) slime の分離と分画

S. epidermidis ATCC 14990 を DMT で

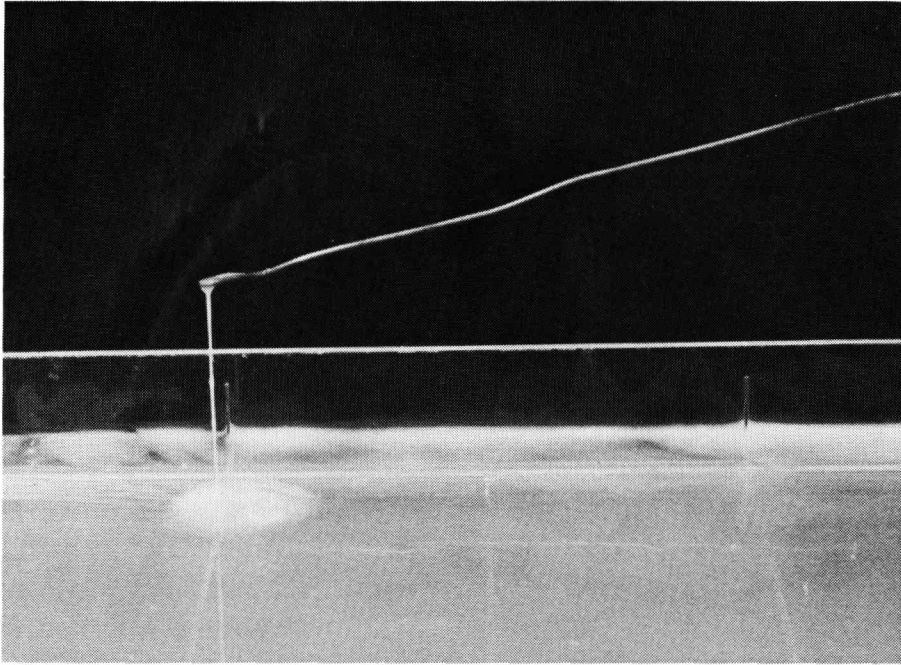


図1 DMT 培養における *S. epidermidis* の slime 産生

培養 (plate 数10枚) 後, plate 1枚あたり 2 mlの0.05M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液で菌体および菌体外物質を集め, 10,000rpm, 4°C, 30分間遠心分離し, 菌体と上清に分けた。上清約10mlをミリポアフィルター (0.45 μ m) で濾過後 (Crude fraction), 硫酸プロタミン30mgを加え, 4°Cに2時間放置した。これを 3,000 rpm, 15分間遠心分離して, 沈澱物に溶媒飽和フェノール 2.0mlと0.05M Tris-HCl (pH7.0) 緩衝液 1.0mlとを混和し核酸を抽出した (Fr. I)。また, 遠心上清に10%トリクロル酢酸 (TCA) 5.0mlを加え, 生じた沈澱物を0.01N NaOH 0.5mlに溶解して, 0.1N酢酸で中和後, 0.05M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液 1,000mlに16時間透析し, 凍結乾燥品とした (Fr. II)。TCA 上清は蒸溜水1,000mlに透析後, 10mlに減圧濃縮し, 95%エタノール30mlを加え, 沈澱物を回収した (Fr. III)。蛋白は牛血清アルブミン (BSA ; Amour) を標準物質として Lowry-Folin 法¹²⁾で定量した。糖の定量は glucose を標準物質としてフェノール硫酸法¹³⁾で行った。DNA の定量はジフェニルアミン法, RNA の

定量は Meijbaum 法¹⁴⁾で行った。また, その他の C-NS および C-PS も同様に DMT 培養後, 分画した。

(5) Staphylococci の産生する slime および菌体外物質の粘度測定方法

i) 試料

試料は DMT 培養した Staphylococci の産生する slime (Crude fraction) および菌体外物質と *S. epidermidis* の slime をプロタミン処理後, 遠心分離した上清を用いた。

ii) 毛細管による測定方法

内径 9 mm のガラス管を図 2 の様に加工した。リザーバー部分に測定する試料 1.0ml 入れ, 下

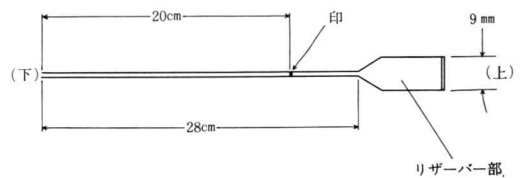


図2 粘度測定に使用する毛細管, リザーバー部分に 1.0ml の試料を入れ, 下端から最初の一滴滴した時から, 試料が最終的に 20cm 目盛りまで来た時までの時間を計測する。

表1 VISCONIC ELD の各回転数における換算乗数

回転数N (rpm)	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	50
Kn	12.00	6.00	2.40	1.2	0.6	0.3	0.12

粘度 (cP) = $\theta \times Kn$ (θ : 回転数Nにおける指度, Kn: 換算乗数)

端から最初の一滴が落ちた時点から試料が最後に20cm目盛に到達した時点までの時間を計測した。毛細管は測定後、1 N NaOH と 1 N HCl をそれぞれ 3 ml ずつ流し、蒸溜水で良く洗浄後、濾紙で水分を取り使用した。なお、測定温度は 27°C で行った。

iii) 粘度計による測定方法

測定に使用した粘度測定装置は、コーン・プレート式の VISCONIC ELD 粘度計 (東京計器) と外部循環式恒温槽 VISCOMATE VM-150 (東機産業) からなり、Sample cup 内に試料 1.0 ml を入れ、標準コーン (1°34' の円錐ローター) を定速回転させて、指度目盛読取値から粘度を算出した。すなわち、 $cP = \theta \times Kn$ (cP: 粘度, θ : 指度目盛, Kn: 回転数Nに関する定数) の式を用いた¹⁵⁾ (表1)。

(6) 0.8% Agarose gel 電気泳動による Staphylococci の産生する slime 中の DNA の確認

支持体は Sea Kem HGT agarose (Marine colloids) を使い、0.04 M Tris-酢酸, 0.02 M 酢酸ナトリウム, 0.02 M EDTA (pH 7.8) 緩衝液で 0.8% (W/W) 濃度に加熱溶解した。泳動槽は電気泳動装置 K S-8420 (マリソル) を使い、試料は DMT 培養した Staphylococci の Crude fraction 20 μ l (DNA量として 0.5 μ g ~ 50 μ g) を、50 V, 10 mA, 10 時間泳動した。また、分子量マーカーは DNA-molecular weight marker [II] (Boehringer Mannheim) と λ phage DNA (ニッポンジーン) を用いた。電気泳動後、ゲルは Ethidium bromide (0.5 μ g/ml) 液で染色し、トランスイルミネーター TM-36 (フナコジ) で検出した。

(7) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動分析 (SDS-PAGE)

DMT 培養における slime の SDS-PAGE 用試料は Crude fraction 0.5 ml と Sample buffer (Na₂HPO₄ : 1.02 g, NaH₂PO₄ : 0.34 g, SDS : 1.0 g, 2-Mercaptoethanol : 1.0 ml, Bromocresol green (BCG) dye : 0.0015 g, Urea : 36 g を 100 ml の蒸留水に溶かしたもの) 1.0 ml とを混和し、100°C, 10 分間加熱して調製した。また、液体培養における菌体外物質の試料は、BHI broth 透析培地 5.0 ml で、37°C, 48 時間、菌を培養し、培養液の遠心上清 (3,000 rpm, 15 分間遠心分離) を 0.5 ml に CONCENTRATOR (トミー精工) で濃縮し、Sample buffer 1.0 ml と混和し、100°C, 10 分間加熱して調製した。泳動用緩衝液は Weber ら¹⁶⁾ のリン酸緩衝液を用い、ゲルの濃度は 10%, 泳動槽は DISC 電気泳動装置 CD-12 F (Toyo), 泳動用カラムは内径 7 mm, 長さ 120 mm のガラス管を用いた。電源はオートマチック定電流定電圧装置 PAV-200 (常光) を用いた。通電はカラム 1 本あたり 5 mA とし、試料中に含まれる BCG がカラム上端から 8 cm 移動した時 (8 時間) に停止した。電気泳動後、ゲルは、10% TCA 溶液で 16 時間固定した。蛋白の染色は Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 で、糖蛋白は Zacharius ら¹⁷⁾ の PAS 染色法で染色した。これらのゲルは DENSITRON PAN-802 (常光) を用いて、フィルター波長 540 nm, 試料速度 50 mm/分, 記録紙速度 100 mm/分, O. D. range 1.0 で測定した。また、分子量は SDS-molecular weight marker VI (Sigma) の標準蛋白質の移動距離から算出した。

結 果

(1) *S. epidermidis* の DMT 培養での slime 産生条件

DMT 培養における *S. epidermidis* の slime 産生は 5 ~ 10% の炭酸ガスを必要とし、好気培養、嫌気培養では菌の発育が十分であるにもか

表2 *S. epidermidis* の slime 産生と培地および培養条件との関係

培地 培養条件	BHI ¹ agar	BHI ² agar	HI agar	TS ³ agar	TSG ⁴ agar	NA	MS agar
好気	-	-	-	-	-	-	-
嫌気	-	-	-	-	-	-	-
5%CO ₂	+	+	-	-	-	+	-
10%CO ₂	+	+	+	-	-	+	-

BHI¹: (BBL), BHI²: (ニッスイ), TS³: (glucose 無添加), TSG⁴: (1% glucose 添加)

表3 BHI agar を用いた DMT および TS broth 培養における slime 産生と莢膜

菌種名	DMT		TS broth	
	slime	莢膜	slime	莢膜
<i>S. xyloso</i>	+	-	-	± ^b
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	-	± ^a	±
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	±
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	±	-
<i>S. simulans</i>	-	-	-	-
<i>S. hyicus</i>	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	±	-
<i>S. sciuri</i>	-	-	±	-
<i>S. lentus</i>	-	-	-	+
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-

±^a: 微量産生で判定が困難であったもの。
±^b: halo が不明瞭で判定不能。

かわらず slime は産生されなかった。さらに培地のちがいによってその産生に差があり、BHI agar, HI agar, NAなど動物組織浸出液を含む培地では slime 産生が見られたが、これを含まない TSG agar, TS agar では認められなかった。このことは *S. epidermidis* の slime 産生が glucose 依存性ではないことを示している。さらにブドウ球菌の選択培地として広く用いられている MS agar においては肉エキスが 0.1% (W/W) 含まれているにもかかわらず slime は産生されなかった (表2)。
(2) 培地, 培養条件のちがいによる slime 産生と莢膜の有無

slime 産生は BHI agar を使用した DMT 培養で, *S. epidermidis* と *S. xyloso* が陽性であった。また, 口腔内より分離した *S. epi-*

表4 DMT 培養における *S. epidermidis* の slime の収量と蛋白質, 糖, 核酸の含量

分画	収量 (mg)	蛋白質 (mg)	糖 (mg)	DNA (mg)	RNA (mg)
Crude-Fr.	98*	-	-	-	-
Fr. I	18	1.3	1.2	5.8	1.2
Fr. II	9	4.5	1.1	0.05	-
Fr. III	13	0.3	7.5	0.05	-

*: DMT 培養プレート10枚から回収した10mlを凍結乾燥したものの。
-: 測定せず。

表5 Staphylococci の産生する slime および菌体外物質の粘度測定

菌種名	毛細管法 落下時間 (秒/ml)	E型粘度計 粘 (cP)*
<i>S. xyloso</i>	54.0	28.3
<i>S. cohnii</i>	47.2	20.4
<i>S. epidermidis</i>	101.2	42.1
<i>S. haemolyticus</i>	40.6	13.5
<i>S. warneri</i>	38.2	15.5
<i>S. aureus</i>	35.6	15.0
<i>S. simulans</i>	36.4	13.3
<i>S. hyicus</i>	37.2	13.4
<i>S. saprophyticus</i>	36.8	14.0
<i>S. sciuri</i>	36.2	17.0
<i>S. lentus</i>	54.8	29.0
<i>S. capitis</i>	37.0	16.9

*: コーンの回転数: 20rpm, 温度: 20°Cで測定。

dermidis 10株全てが, slime 産生陽性であった (表3)。一方, Christensen ら⁷⁾の方法で slime 産生を検討したところ *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* そして *S. sciuri* が Trypan blue 液で微弱に染色されたが, 判定が困難であった。

M λ 1 2 3 4 5 6 M λ 7 8 9 10 11 12 M λ

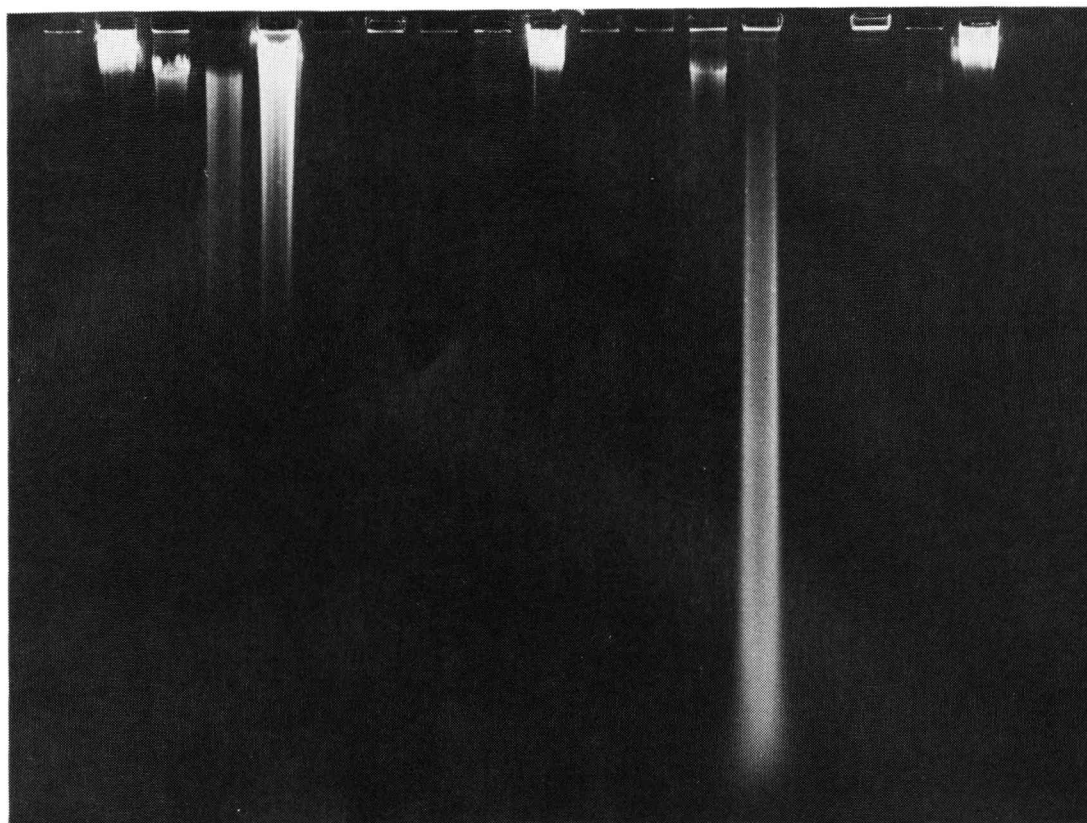


図3 Staphylococci の slime および菌体外物質中に含まれる DNA の0.8% Agarose gel 電気泳動分析

M : Dalton Marker, λ : λ phage 番号は下記の菌種の菌体外物質を示す。

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| 1. <i>S. xylosus</i> | 7. <i>S. simulans</i> |
| 2. <i>S. cohnii</i> | 8. <i>S. hyicus</i> |
| 3. <i>S. epidermidis</i> | 9. <i>S. saprophyticus</i> |
| 4. <i>S. haemolyticus</i> | 10. <i>S. sciuri</i> |
| 5. <i>S. warneri</i> | 11. <i>S. lentus</i> |
| 6. <i>S. aureus</i> | 12. <i>S. capitis</i> |

Duguid¹¹⁾の wet-film India ink 法を用いて、DMT およびTS broth 培養での荚膜を観察したが、DMT 培養ではいずれの菌株も荚膜は見られなかった。一方、TS broth 培養では glucose の有無にかかわらず *S. lentus* が荚膜陽性であり、*S. xylosus*, *S. haemolyticus* は halo が不明瞭で判定不能であった(表3)。

(3) *S. epidermidis* の slime に含まれる物質

S. epidermidis から分離した slime の収量と蛋白、核酸、糖の含量を表4に示す。この

slime 中には蛋白 6.3%(W/W), DNA 6.1%(W/W), 糖は約10%(W/W) 含まれていた。

表6 *S. epidermidis* の Crude fraction と プロタミン処理後の遠心上清の粘度測定

測定方法 分 画	毛 細 管 法 (sec/ml)	E 型粘度計 (cP)*
Crude fraction	101.2	42.1
遠 心 上 清	35.6	13.3

* : 標準コーン(1°34')を使用、コーンの回転数 : 20rpm, 20°Cで測定した。

(4) 粘度測定の結果

毛細管および粘度計を用いた粘度測定の結果(表5), *S. epidermidis* の slime が最も高い値を示し, 続いて *S. lentus*, *S. xylosum*, *S. cohnii* の順であった。さらに, *S. epidermidis* の Crude fraction に硫酸プロタミンを加えた後の遠心上清の粘度が42.1cPから13.3cPに低下した。このことは slime の粘性の中心的物質がDNAであることを示している(表6)。

(5) 0.8% Agarose gel 電気泳動による slime 中のDNAの確認

0.8% Agarose gel 電気泳動分析において *S. xylosum*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* にDNAが認められたが, その他の菌種には認められず, *S. epidermidis* が高分子のDNAを最も多量に含んでいた。また, *S. sciuri* のDNAは大部分が低分子であった(図3)。

(6) slime の SDS-PAGE とデンストメトリー

S. epidermidis の slime の SDS-PAGE における泳動パターンとデンストメトリーを図4, 5に示す。図4はDMT培養の slime で a は PAS 染色, b は CBBR-250で染色したものである。染色したゲルの中央部に特徴的な糖蛋白のバンドが見られ, SDS-molecular weight marker VI に含まれる各蛋白質の移動距離から分子量を算出したところこの物質の分子量は24,000~24,500 dalton であった。また, この物質は PAS 陽性物質中の59%であった。図5は BHI broth 透析培地で培養したもので, DMT 培養のそれと比較すると全く異ったパターンを示し, 分子量24,000~24,500の糖蛋白は痕跡程度しか認められなかった。さらにこの糖蛋白は *S. epidermidis* のほか, *S. lentus* にも認められた。

考 察

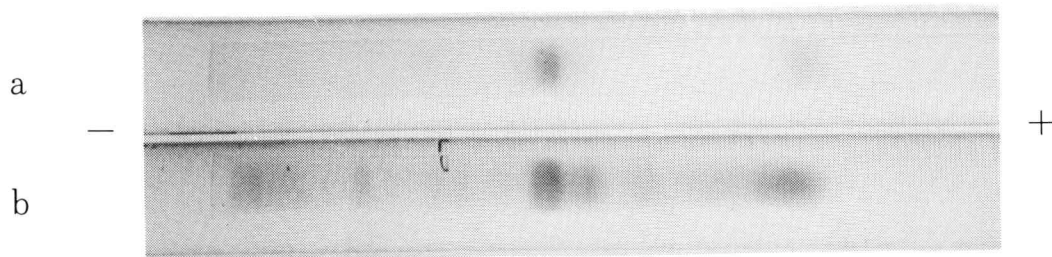
ある種の細菌が培養条件の変化, すなわち栄養物質, 酸素, pH あるいは特異的な発育阻害因

子の存在下で形態的变化が生じることは以前から知られており, 肺炎球菌などの莢膜形成がその菌の毒力と因果関係が強いといわれている。

ブドウ球菌属の中で化膿性疾患の原因菌である *S. aureus* は coagulase, protease, enterotoxin, exfoliative toxin, α -toxin, DNase などの菌体外活性物質を多量に産生¹⁸⁾, これらの毒素や酵素が *S. aureus* の病原性の本質であると考えられている。しかしながら C-NS は上記の毒素や酵素は産生しないが, phosphatase, urease, gelatinase, caseinase, collagenase, hemolysin などの菌体外活性物質を産生することが知られており, これらは virulence factor と呼ばれ, C-NS の病原性と関係が深いといわれている¹⁹⁾。また, C-NS の中で莢膜を有し, slime を産生する菌種は, マクロファージや多核白血球などの貪食細胞に抵抗することなどから, 菌の侵襲性が強いことが知られている^{20, 21)}。

今回, 我々が使用した *S. epidermidis* ATCC 14990は Christensen ら²²⁾の報告している *S. epidermidis* RP-12とちがいが, 莢膜は形成しない。さらに, 0.25% glucose 加TS broth での slime 産生も微量であった。しかし, DMT 培養での slime 産生は著明であり, 使用した菌株中で最も粘度が高かった。この現象は, DMT 培養という特殊な条件が *S. epidermidis* の一般的な性質を変化させるために起こるものと考えられる。すなわち, 透析膜を介しての水分, 栄養分の吸収, 5~10%炭酸ガス濃度などの条件が気道粘膜や毛包内での環境と類似しているため *S. epidermidis* が本来の *in vivo* での形質を発現し, slime や菌体外活性物質を産生するものではないかと推測される。このことから, DMT における培養が *in vivo* の *S. epidermidis* の生息状態を表わしていると仮定するならばC-NS, C-PS の virulence factor を検討する場合, 通常の液体培養ではなく, BHI agar や HI agar を用いての DMT 培養を行えば, 今まで知られていない virulence factor を見つけ出すことができる

(I)



(II)

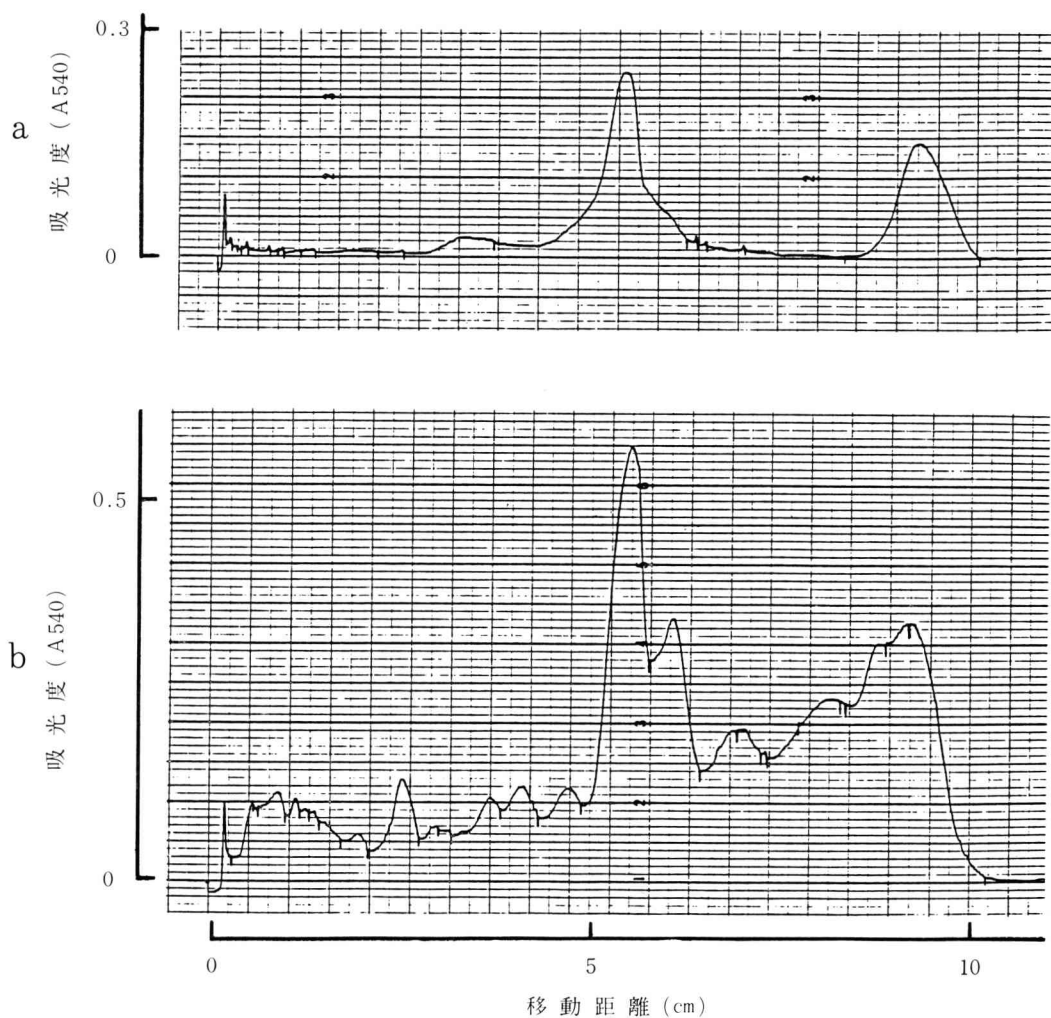


図4 DMT 培養した *S.epidermidis* の slime の SDS-PAGE。(I) aは PAS 染色, bは CBBR-250で染色した。(II)はそれぞれのデンストメトリー。

(I)



(II)

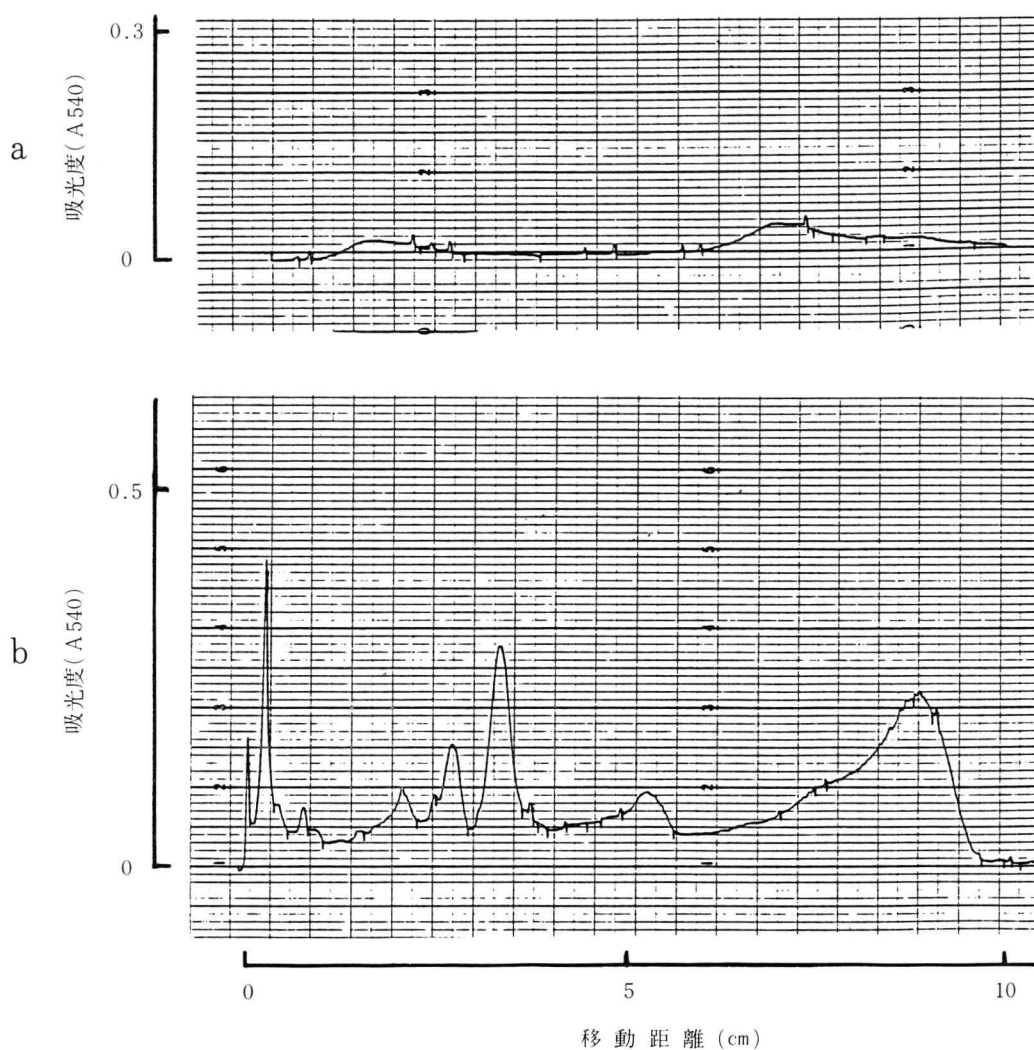


図5 BHI 透析培地で培養した *S. epidermidis* の培養液中の菌体外物質の SDS-PAGE。(I) aは PAS 染色, bは CBBR-250で染色した。(II)はそれぞれのデンシトメトリー。

かも知れない。

口腔内より分離した *S. epidermidis* 10株の全てにDMT培養で slime 産生が見られたことから, *S. epidermidis* の大部分はこの様な環境下でslimeを産生するものと考えられ, Christensen ら⁷⁾が報告した莢膜産生株という特別な菌株でなくとも, 同じ様に付着する能力をもつのではないかと推察される。

一般に細菌が平滑面や宿主細胞へ結合する機構は, 受身的な吸着と積極的な付着に分類されている。この付着機構の中で多糖類, 糖蛋白, レクチン様蛋白質, フィブロネクチンに対するレセプターなどが重要な物質とされている^{22, 23)}。今回, 我々はDMT培養したC-NSのいくつかにDNAを含むものを認めるとともに, *S. epidermidis* の slime 中のDNAが粘性に関与していることを見出したが, DNAが付着機構に関与しているという報告は未だない。さらに slime の SDS-PAGE での所見で, 糖蛋白の含量が極めて多くなることから, 双方の特異的, 非特異的な相互作用と, さらに菌体表面の物質を含めて強力な粘着力が生ずるものと考えられる。今後は C-NS の DMT 培養における virulence factor の変化を検討するとともに, slime 中に含まれる特異的あるいは非特異的な相互作用のメカニズムを調べる予定で

ある。

結 論

1. BHI agar を用いた DMT 培養で *S. epidermidis* が大量の slime を産生することが観察された。また, C-NS, C-PS の中で *S. epidermidis* と *S. xylosus* が slime 産生陽性であった。
2. *S. epidermidis* の slime 産生は 5 ~ 10 %炭酸ガスを必要とし, 好気, 嫌気状態での産生は見られなかった。また, 使用した培地の種類により slime を産生するもの, しないものが見られ, glucose よりも, 動物組織浸出液を多く含む培地で産生が認められた。
3. DMT 培養した *S. epidermidis* の slime 中には液体培養では見られない DNA と分子量 24,000 ~ 24,500 の糖蛋白が特徴的に見られ, DNA を除去すると粘度が著しく低下することから, これらの構成成分が相互に関連して粘性を増大させるものと考えられる。
4. *S. epidermidis* の莢膜が見られない株でも DMT 培養のような発育条件の下で slime を産生することは *in vivo* での *S. epidermidis* の生息状態を表わしているのではないかと推察された。

Abstract : *Staphylococcus epidermidis* has been thought to produce neither slime nor capsule, but we found that the organisms produced a large amount of slime when utilizing the dialysis membrane technique (DMT) applied for elastase purification.

Each Type strain of 12 staphylococcal species and ten of isolates of *S. epidermidis* from oral cavities were used for the examination of slime production. The strains that produced slime by the DMT, were *S. xylosus* and all of *S. epidermidis*, but no capsule was formed. Also *S. epidermidis* produced no slime either in aerobic conditions or in anaerobic, although the organisms grew well. Slime production was observed in the medium which included brain heart infusion or beef extract, but it was not observed in a medium such as trypticase soy agar, trypticase soy agar with 1% glucose or mannitol salt agar. The slime contained 6.1% (W/W) deoxyribonucleic acid, 6.3% (W/W) protein and 10% (W/W) carbohydrate. The viscosity of the slime decreased remarkably after protamine sulfate was added for DNA elimination. As a result of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, glycoprotein was found in the slime of *S. epidermidis*. The molecular weight was between 24,000 and 24,500 daltons.

From these result we infer that the viscous phenomenon was due to a relationship between nucleic acid and glycoprotein.

文 献

- 1) Maskel, R. : Importance of Coagulase-negative staphylococci as pathogen in the urinary tract. *Lancet*. 1 : 1155-1158, 1974.
- 2) Meers, P. D., Whyte, W. and Sandys, G. : Coagulase-negative staphylococci and micrococci in urinary tract infections. *J. Clin. Path.* 28 : 270-273, 1975.
- 3) Brandt, L. and Swahn, B. : Subacute bacterial endocarditis due to Coagulase-negative *Staphylococcus albus*. *Acta Med. Scand.* 166 : 125-132, 1960.
- 4) Peters, G., Locci, R. and Pulverer, G. : Adherence and growth of Coagulase-negative staphylococci on surfaces of infectious catheters. *J. Infect. Dis.* 146 : 479-482, 1982.
- 5) Amoury, R. A., Bowman, F. O. and Malm, J. R. : Endocarditis associated with intracardiac prostheses : Diagnosis, management, and prophylaxis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 51 : 36-47, 1966.
- 6) Schoenbaum, S. C., Gardner, P. and Shilito, J. : Infections in cerebrospinal fluid shunts : epidemiology, clinical manifestation and therapy. *J. Infect. Dis.* 131 : 543-552, 1975.
- 7) Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. and Beachey, E. H. : Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37 : 318-326, 1982.
- 8) 横田光正, 濱田育男, 本田寿子, 田近志保子, 金子 克 : コアグラゼ陰性ブドウ球菌の Elastase 産生とその分離精製, 歯基礎誌, 抄録集, 25 : 240, 1983.
- 9) Murphy, R. A. and Haque, R. : Large scale production of Staphylococcal delta hemolysin by the dialysis membrane technique. *Can. J. Microbiol.* 20 : 1061-1063, 1974.
- 10) Hartman, D. P. and Murphy, R. A. : Production and detection of staphylococcal elastase. *Infect. Immun.* 15 : 59-65, 1977.
- 11) Duguid, J. P. : The demonstration of bacterial capsules and slime. *J. Pathol. Bacteriol.* 63 : 673-685, 1951.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 256-275, 1951.
- 13) 福井作蔵 : 還元糖の定量法 ; 生物化学実験法 A 一般分析法 1, 東京大学出版会, 東京, 45-47, 1969.
- 14) 阿南功一 : 化学的分析 ; 基礎生化学実験法 5 化学的測定, 丸善, 東京, 193-204, 1976.
- 15) 浜野 光, 光泳サチ子 : 涙液の粘度測定, 日本眼科紀要, 24 : 435-444, 1973.
- 16) Weber, K. and Osborne, M. : The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 : 4406-4412, 1969.
- 17) Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. : Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30 : 148-152, 1969.
- 18) Arbuthnott, J. P. : Characterization of the epidemolytic toxins of *Staphylococcus aureus*. The staphylococci, Aberdeen University press, Aberdeen, 109-118, 1981.
- 19) Males, B. M., Roges, W. A. and Parisi, J. T. : Virulence factor of biotype of *Staphylococcus epidermidis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 1 : 256-261, 1975.
- 20) 吉田耕作 : 黄色ブドウ球菌の感染および免疫に対する一考察 : 特に実験のマウス感染における莢膜ならびに莢膜様物質の意義, 日細誌, 25 : 335-344, 1970.
- 21) Yoshida, K., Ichiman, Y. and Ohtomo, T. : Relation of antiphagocytic activity of strain of *Staphylococcus epidermidis* to the induction of resistance in mice. *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd., I Abt. Orig., Reihe B, suppl.* 5 : 819-825, 1976.
- 22) Davidson, S. K., Keller, K. F. and Doyle, R. J. : Differentiation of Coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by lectin and plant agglutinins. *J. Clin. Microbiol.* 15 : 547-553, 1982.
- 23) Switalski, L. M., Ryden, C., Rubin, K. and Ljungh, A. : Binding fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect. Immun.* 42 : 628-633, 1983.
- 24) Rosenberg, M. : Bacterial adherence to polystyrene : a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 375-377, 1982.