

## コアグラーゼ陰性ブドウ球菌の産生する elastin 分解酵素の研究

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)

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：1987年10月15日]

抄録：日和見感染の病原菌である coagulase-negative staphylococci (C-NS) を感染症患者と対照群の健常者から157株を分離し、細菌学的諸性状を検索した。その結果、分離同定した菌種は大部分が *Staphylococcus epidermidis* (89.8%) であった。また病原因子の一つと考えられ、elastin 分解酵素産生菌の検出率は68.8%であった。さらに、この菌について Sephadex G-100 gel chromatography, CM-Toyopearl ion exchange chromatography を用いて、elastin 分解酵素の分離・精製を行い、酵素活性と生化学的性状を検討した結果、① porcine elastin ならびに Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA を水解し、②分子量：22,500、③等電点：9.4~9.5、④ thiol protease 様酵素であることなど、他の elastase とは異なる性質を有することが判明した。さらに、この酵素はモルレット背部皮内への投与により、皮膚に深い潰瘍と膿瘍を形成したことから、*S. epidermidis* の病原性に重要な役割を演じていることが確認された。

**Key words** : coagulase-negative staphylococci, identification, partial purification, elastolytic enzyme, ulcer, abscess.

### 緒 言

近年、医療技術の進歩や高齢者人口の増加に伴い、種々の基礎疾患を有する患者が多くなり、ステロイド剤や抗癌剤の投与、放射線療法などによる免疫抑制や抗菌剤の連用、あるいは臨床検査や術後のカテーテル留置などによる易感染性や耐性菌の出現が指摘されている<sup>1)</sup>。特に最近は日和見感染の報告<sup>2-9)</sup>が多くみられるようになり、その感染機序や病原性が問題となっている。

特に、口腔感染症や尿路感染症の患者からは coagulase-negative staphylococci (C-NS) が頻りに検出され、いわゆる日和見感染の病原菌として注目されてきた<sup>9-13)</sup>。しかし、その病原性についてはいまだ不明な点が多い。

Varadi ら<sup>14)</sup> は *Staphylococcus epidermidis* による皮膚病変について、Murphy<sup>15)</sup> と Harman ら<sup>16)</sup> は、*S. epidermidis* の病原性に関与するといわれている elastase 産生について報告しているが、精製酵素の性状や病原性については、著者が文献を渉猟した限りでは報告されてい

Study on elastolytic enzyme of coagulase-negative staphylococci.

Mitsumasa YOKOTA

(Department of Oral Surgery I and 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. 12 : 289-302, 1987

い。そこで、著者は種々の感染症より C-NS の分離と、その病原性の一因と考えられる elastin 分解酵素の産生能を調べ、さらに酵素の分離・精製を試み、生化学的性状と病原性につき検討し、興味ある知見を得たので報告する。

## 実験方法

### 1. 材料

盛岡赤十字病院の感染症の入院患者（乳幼児から成人206名）の口腔およびその他の部位（主に泌尿・生殖器など）からの分泌液あるいは膿汁、尿を主な材料とした。また対照群として健康者（岩手医科大学歯学部学生）93名を選び、その咽頭拭い液と、上腕内側皮膚面より滅菌生理食塩水に浸した滅菌綿棒で拭い採取した材料を用いた。

### 2. ブドウ球菌の分離培養

材料をブドウ球菌培地（ニッスイ）に塗抹し、37°C、48時間培養した。発育したコロニーについてグラム染色でグラム陽性球菌であることを確かめた後、catalase test を行い、陽性的のものについて GF 培地<sup>17)</sup>を用いてブドウ糖発酵試験を行った。その結果に基づいて陽性菌を *Staphylococcus* 属、陰性菌を *Micrococcus* 属と同定した。つぎに *Staphylococcus* 属について coagulase 産生の有無をスライドグラス法と試験管法によって、C-NS の判別を行った。さらにブドウ球菌同定キット ID テスト・SP-18（ニッスイ）を用い、その菌種を同定した。

### 3. 供試菌株

材料より分離した C-NS 157株と *Staphylococcus* 属の基準株12株（*S. xylosus* ATCC 22971, *S. cohnii* ATCC 29974, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. warneri* ATCC 27836, *S. hyicus* ATCC 11249, *S. simulans* ATCC 27848, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. sciuri* ATCC 29062, *S. lentus* ATCC 29070, *S. capitic* ATCC 27840）の計169株を用いた。

### 4. Elastin 分解酵素産生試験

Elastin 分解酵素産生試験は、Brain heart infusion (BHI, ニッスイ) broth 2.0ml で 37°C 一夜培養した菌液 (10<sup>6</sup> cells/ml) を用い、マイクロプランター（佐久間）にて、elastin 平板培地 (0.25~0.5% elastin (Sigma), BHI agar) に接種した。37°C, 好気, 嫌気 (Gaspak, BBL), CO<sub>2</sub> (5, 10, 15%) 存在下で24時間培養（桜精機製 CO<sub>2</sub> 培養孵卵器）を行い、その後、37°C, 4°C, 室温の3方法で4日間観察して最良の条件を検討した。判定は colony 周囲に elastin を溶解し透明帯がみられたものを、elastin 分解酵素 (elastolytic enzyme) 産生陽性とした。

### 5. Elastin 分解酵素の分離・精製

扁桃周囲膿瘍患者より分離同定した elastin 分解酵素産生能の著しく高い *S. epidermidis* T41 と、基準株 *S. epidermidis* ATCC 14990 の2株を用いて、elastin 分解酵素の分離・精製を試みた。

#### ① 分離方法

Hartman ら<sup>16)</sup> の dialysis membrane technique (DMT) に準じ、Spectrapor membrane tubing (Spectra/por 3, 家田貿易) を用いた。筒状膜は切り開いてシート状とし、蒸留水で十分洗浄の後、115°C, 15分間高圧滅菌して BHI agar の角シャーレ（栄研1号）上に membrane を広げて密着させた。つぎに BHI broth で一夜培養した菌液 (10<sup>6</sup> cells/ml) 1.0ml を membrane 上に滴下し、コンラージ棒で均一に塗抹して、37°C, 10% CO<sub>2</sub> 下で48時間培養した。次いで、培地を24時間4°C冷所に保管した後、角シャーレ1枚毎に0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 1.0 ml を加えて菌混合液を回収した。菌混合液は4°Cで12,000rpm, 30分間遠心して菌体を除去し、上清に4°C, 60%飽和になるように硫酸アンモニウム（和光）を加え十分に攪拌した後、4°Cで24時間静置した。さらに4°C, 10,000rpm, 30分間遠心し、沈澱物を0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 約10ml で可溶化した。これを Millipore filter (0.45 μm) にて濾過滅菌し、粗酵素標品とした。

## ② 精製

Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) を column (1.5×100cm) に充填し, 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を用い, 粗酵素約2.0ml を chromatochamber 内 (15°C) にて各 fraction 約3ml ずつに分画した。ついで0.05 M Tris-HCl 緩衝液にて調整した0.5% elastin 加0.8% agarose (Seakem) 平板上に直径9 mm の穴をあけ, 各 fraction の200 μl を注入した。この平板法で活性を確認し, elastase 活性のある fraction を Spectrapor membrane tubing に注入し, ポリエチレングリコール 20,000 (和光) にて, 一夜濃縮した。その後, CM-Toyopearl ion exchange chromatography (東洋曹達, column 1.5×7.5cm) にて0.3 M NaCl (0.05M Tris-HCl 緩衝液溶解) で展開し, linear gradient により溶出した。さらに得られた活性のある fraction を同様に濃縮し, 精製標品とした。

## ③ 分子量および等電点

Weber ら<sup>10)</sup> の方法に準じて, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて分子量を測定した。同様に等電点は SDS-PAGE 等電点電気泳動法により決定した。

## ④ 含有蛋白量の測定

Spectrophotometer (Simadzu) を用い, 280 nm の波長で吸光度 (A 280nm) を測定し, bovine serum albumin (BSA, 半井) を等倍希釈して得られた検量線より試料の含有蛋白量を相対的に計算した。なお, 分離時の試料は核酸を含むため 260nm の吸光度による測定を行い, kalcker 法 ( $A_{280nm} \div A_{260nm} < 1.5$  の場合は, 次の式にて補正した。protein (mg/ml) =  $1.45 \times A_{280nm} - 0.74 \times A_{260nm}$ ) にて計算補正した。

## ⑤ 回収率

精製過程における合成基質水解能 (amidolytic activity) を当初の総水解能で除した値を回収率とした。

## 6. Elastin 分解酵素の活性測定法と生化学的性状

## ① 活性測定法

Orcein-elastin (Sigma), 合成基質 Succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanyl-p-Nitroanilide (Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA, 半井) を用い, 精製標品の活性を測定した。

## a. Orcein-elastin 法

0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 2.0ml に orcein-elastin を11.2mg 混合し, 精製酵素 20 μl を加えた。37°C, 30 分間攪拌した後, 3,000rpm, 15分間遠心し, その上清を Spectrophotometer にて590nm の吸光度を測定した。

b. Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA法

Bieth ら<sup>10)</sup> の方法に準じ, 125mM Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA を N-methylpyrrolidone (東京化成) 1.0 ml に溶解し合成基質溶液とした。精製酵素200 μl と合成基質溶液20 μl を混合し, さらに 2-mercaptoethanol (2-ME, 半井) を20 μl 加え, 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) で最終容量を2.0ml とした。良く攪拌した後, 3,000 rpm 15分間遠心して上清を分離し, 37°C, 3 時間から 9 時間にわたり反応させた。吸光度は 410nm にて測定した。

## ② 生化学的性状

## a. 至適 pH の測定

Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 系において, 溶媒を下記に調整した各緩衝液を用いて精製酵素の至適 pH を測定した。すなわち, pH 5.0, 5.5 は 0.05 M クエン酸緩衝液, pH 6.0, 6.5 は 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.0, 8.0, 8.5 は 0.05M Tris-HCl 緩衝液を用いた。

## b. 耐熱性

精製酵素200 μl に0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 725 μl と反応速度を上げるために, 10倍希釈 2-ME 75 μl を加え, Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 20 μl と混合し37°C, 4 時間で反応させた後, 吸光度 (A 410nm) を測定した。精製酵素は前もってヒートブロック (HF21, Yamato) で60°C, 5 分間隔で処理したものと, 100°C 沸騰水中にて同様に処理したものをを用いた。

## c. 酵素単位ならびに比活性

1 分間に  $1 \mu\text{M}$  の Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA を  $1 \mu\text{M}$  の nitroanilide に水解する酵素量を 1 Unit とし、その活性単位 (U) を酵素に含まれるタンパク質 (mg) で除した値を酵素の比活性 (U/mg) とした。吸光度係数は Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA の水解産物である nitroanilide の分子吸光度係数  $E^{1\text{M}}_{410\text{nm}} = 8,800$  を用いて換算した。

#### d. Elastin 分解酵素の活性増強および抑制因子

MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na-citrate, EDTA, CaCl<sub>2</sub> の各イオンを  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  の濃度にて pH8.0 の Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 系に加え、酵素と反応させた後に 3,000rpm, 15 分間遠心し、3 時間にわたり 410nm で吸光度を測定した。また Trypsin (Sigma), 2-ME, elastatinal (半井),  $\alpha_1$ -antitrypsin (Sigma) についても同様の系で反応させ、増強、抑制作用の程度を判定した。

e. 各種 proteinase inhibitor による阻害実験  
phenylmethane sulfonylfluoride (PMSF), N-ethylmaleimide (NEM), E-64, phosphoramidon, pepstatin A (以上、ペプチド研究所, 大阪), diisopropylfluorophosphate (DFP, Sigma) の各 proteinase inhibitor を  $10^{-2}$ ~ $10^{-6}\text{M}$  の濃度になるように Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 系に加え、37°C, 3 時間まで吸光度 (A 410nm) を測定し、elastin 分解酵素の阻害実験を行った。

#### 7. Elastin 分解酵素の投与による病理学的実験

Hartley 種, 6 週齢の雄性モルモット (約 350 g) の背部皮膚の体毛を脱毛クリームにて除去した後、*S. epidermidis* T41 の精製した elastin 分解酵素と pancreas elastase (porcine elastase, エーザイ kk.) を滅菌生理食塩水, 滅菌 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) に各々溶解し、200  $\mu\text{l}$  (58  $\mu\text{g}$ ) を皮内投与した。対照として滅菌生理食塩水と滅菌 Tris-HCl 緩衝液を各々、皮内投与した。

投与後 3 日目に屠殺し、当該部の皮膚を切除した後、10%ホルマリンにて固定した。その後、

通法に従ってパラフィン薄切標本を作製し、hematoxylin eosin 染色を施し鏡検した。

## 結 果

### 1. コアグラゼ陰性ブドウ球菌の分離

臨床材料 (206名) ならびに対照群 (93名) よりグラム陽性球菌 315 株を分離し、*Micrococaceae* 307 株を得た。そのうち *Micrococcus* 属と同定されたものは 62 株 (20.2%) で *Staphylococcus* 属と同定したものは 245 株 (79.8%) であった。さらに *Staphylococcus* 属 245 株のうち、coagulase-positive staphylococcus (C-PS) が 88 株 (35.9%), C-NS は 157 株 (64.1%) であった (Fig. 1)。また、対照群と感染症群における C-PS と C-NS の分離率は、対照群では C-NS が C-PS に較べて 2 倍の高率で、口腔からの分離率がやや高かった。一方、感染症群では、C-NS が C-PS の約 1.6 倍の分離率で、口腔と泌尿・生殖器からの分離が高い値を示した。

分離した C-NS 157 株の菌種について同定した結果、Table 1 のごとく *S. epidermidis* が 106 株で大部分を占め、*S. xylosus* 4 株、*S. hominis* 3 株、*S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* 各々 2 株ずつであり、*S. sciuri* が 1 株であった。残りの 37 株はブドウ球菌同定キット ID テスト・SP-18 では同定不能であった。実験群別にみると、対照群は *S. epidermidis* 45 株 (64.3%), *S. warneri*, *S. capitis* が各々 2 株 (2.9%) であり、感染症群は *S. epidermidis* 61 株 (70.1%), *S. xylosus* 4 株 (4.6%), *S. hominis* 3 株 (3.4%), *S. haemolyticus* 2 株 (2.3%), *S. sciuri* 1 株 (1.1%) の割合であった。

### 2. Elastin 分解酵素産生試験

Elastin 分解酵素産生条件の検討では 10% の CO<sub>2</sub> 存在下での培養が最良であり、判定が容易な elastin の濃度は 0.5% が最適であった。また判定までの保管方法は 4°C が雑菌の混入もなく良好であった。以上の条件の下で、分離した C-NS 157 株の elastin 分解酵素産生試験の結果は、elastin 分解酵素産生株は 108 株 (68.8%)、

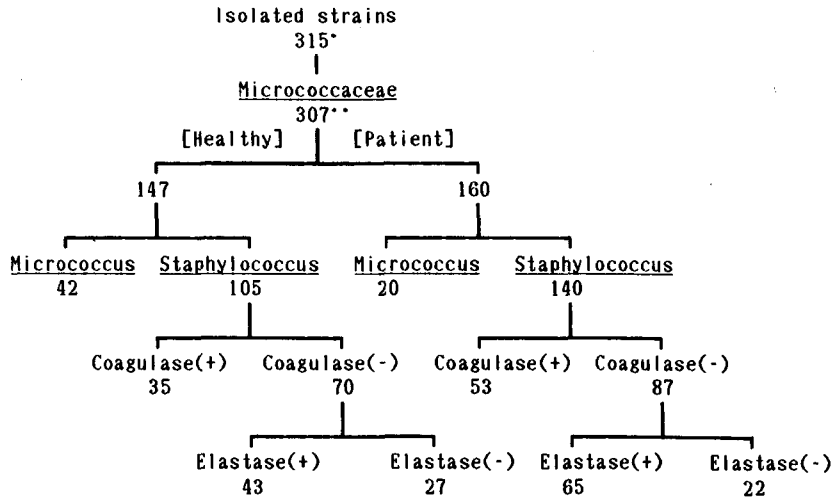


Fig.1 Identification from 315 strains.

\* : from healthy 93 persons and patient 206 persons.

\*\* : No. of strains.

Table 1 Source and classification of coagulase-negative staphylococci 157 strains

	Healthy (53 Persons)		Patient (87 Persons)		Total
Oral cavity	<i>S. epidermidis</i>	30	<i>S. epidermidis</i>	18	67
	<i>S. warneri</i>	2	<i>S. hominis</i>	2	
	<i>S. capitis</i>	1	unknown	4	
	unknown	10			
Others	<i>S. epidermidis</i>	15	<i>S. epidermidis</i>	43	90
	<i>S. capitis</i>	1	<i>S. xylosum</i>	4	
	unknown	11	<i>S. haemolyticus</i>	2	
			<i>S. hominis</i>	1	
			<i>S. sciuri</i>	1	
		unknown	12		
Total (strains)		70		87	157

elastin 分解酵素非産生株は49株 (31.2%) であった。

Elastin 分解酵素産生108株についてこの由来を検討すると、Table 2のごとく大部分が *S. epidermidis* であった。これを感染症群で見ると口腔と泌尿・生殖器が各々18株、眼と鼻が各々6株、その他9株で、対照群では口腔26株、皮膚14株であった。両群を合わせると *S. epidermidis* は97株 (89.8%) で、そのうち62株 (63.9%) が口腔ならびに泌尿・生殖器に集

中していた。

一方、*Staphylococcus* 基準株の12株について elastin 分解酵素産生試験を行ったところ、*S. epidermidis* ATCC 14990についてのみ elastin 分解酵素産生が認められた。

### 3. Elastin 分解酵素の分離・精製

DMTにより得られた *S. epidermidis* の slime (粘液性物質) は粘液性に富み、12,000 rpm, 30分間の遠心でも菌体との分離が困難であり、分離した後も、slime は millipore

Table 2 Source and classification of 108 elastolytic enzyme production strains in coagulase-negative staphylococci

	Oral	Skin	Nasal	Eye	Ear	Wound	Uro.*	Milk	Liquid	Total
Healthy										
<i>S. epidermidis</i>	26	14	—	—	—	—	—	—	—	40
<i>S. warneri</i>	6	—	—	—	—	—	—	—	—	2
unknown	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
Patient										
<i>S. epidermidis</i>	18	—	6	6	3	3	18	2	1	57
<i>S. hominis</i>	2	—	1	—	—	—	—	—	—	3
<i>S. haemolyticus</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
<i>S. xylosum</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
<i>S. sciuri</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
unknown	—	—	—	1	—	—	1	—	—	2

\* : urogenital organs.

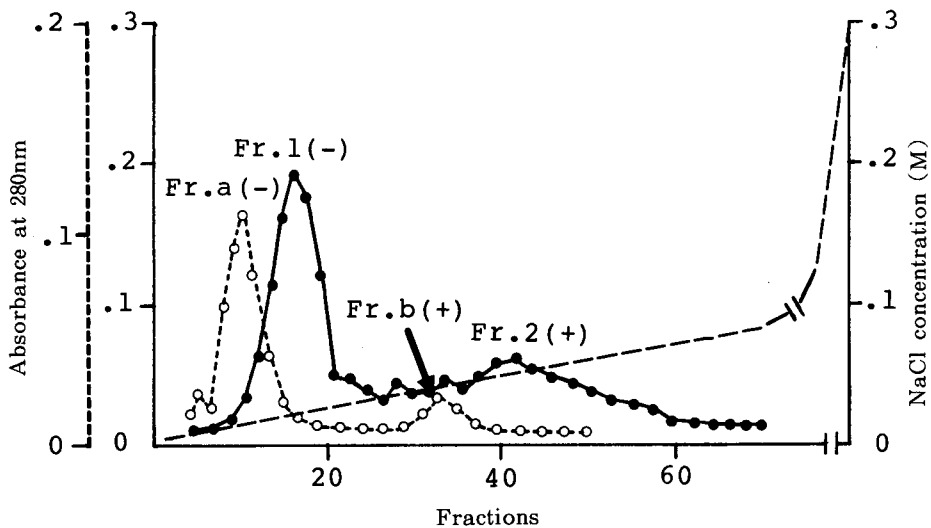


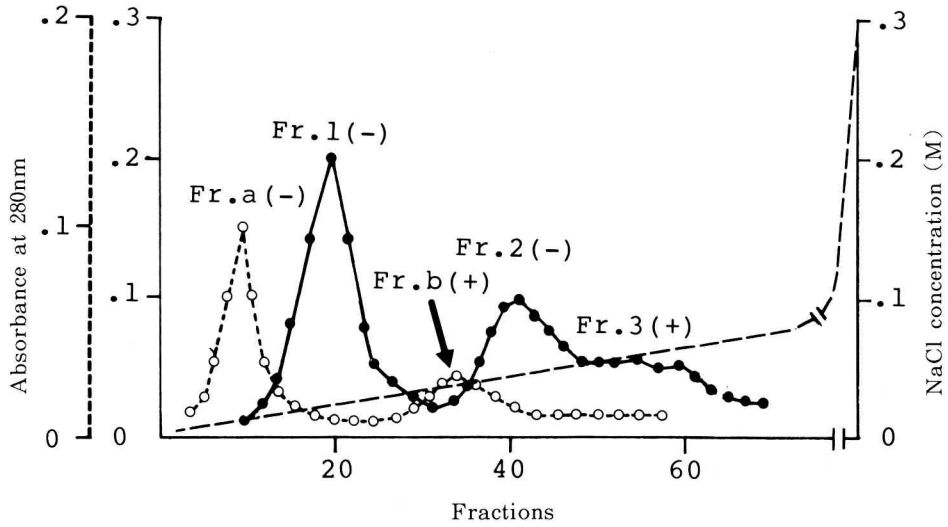
Fig.2 Sephadex G-100 gel and CM-Toyopearl ion exchange chromatography of *S. epidermidis* ATCC 14990.

Solid line : elution of Sephadex G-100. A column with 1.5×100cm was used. Dotted line : elution of CM-Toyopearl of Fr.2. A column with 1.5×7.5cm was used. (±) : elastolytic activity.

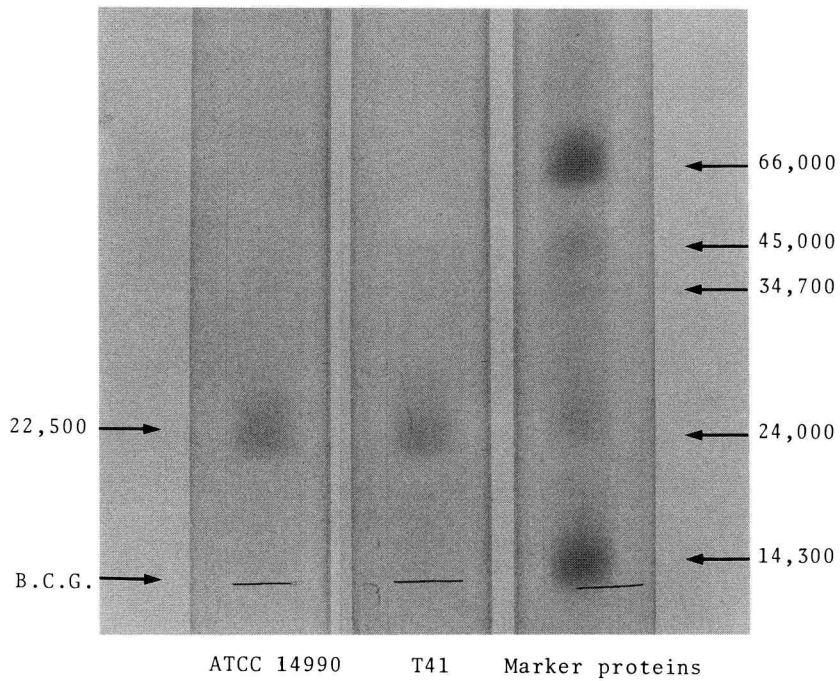
filter (0.45 μm) にて濾過滅菌することができなかつたため、硫酸アンモニウム塩析後に濾過滅菌を行った。

Sephadex G-100 を用いた chromatography では、*S. epidermidis* ATCC 14990 は Fig. 2 の実線のごとく、約 4 つのピークに別れ、大きな

2 つ目のピーク (Fr. No.40 付近) にのみ、elastin 分解酵素活性が認められた。また、CM-Toyopearl ion exchange chromatography を用いた精製では、破線のごとく 3 つのピークに別れ、最後のピーク (Fr. b) に elastin 分解酵素活性が認められた。そのときの NaCl 濃度は



**Fig.3** Sephadex G-100 gel and CM-Toyopearl ion exchange chromatography of *S.epidermidis* T41. Solid line : elution of Sephadex G-100. A column with 1.5×100cm was used. Dotted line : elution of CM-Toyopearl of Fr.3. A column with 1.5×7.5cm was used. (±) : elastolytic activity.



**Fig.4** SDS-PAGE (polyacryamide gel electrophoresis) of purified elastolytic enzymes. B.C.G : B.C.G tracking dye.

0.03~0.04Mであった。

一方, *S. epidermidis* T41では Sephadex G-100 の chromatography で Fig. 3 の実線のごとく大きな2つのピークがあり, 最後のプラトー部(Fr. No.55 付近)に, elastin 分解酵素活性があった(Fr.3)。Fr. 3 を濃縮し, CM-Toyopearl ion exchange chromatography にかけた結果が破線である。Fr.b に elastin 分解酵素活性が認められ, その NaCl 濃度は, 0.03M 付近であった。

この酵素の分子量の計測を行ったところ, SDS-PAGE では, Fig. 4 のごとく, 21,000~24,000 付近に単一バンドを示した。そこで calibration line を作成し, 測定した結果, 分子量は22,500であった (Fig. 5)。SDS 等電点電気泳動による等電点は, 9.4~9.5であった。

酵素の回収は, 角シャール20枚から総蛋白質質量476mg (156.6U), Tris-HCl 緩衝液で溶解した分離液27mlを得た。その後, 硫酸アンモニウム塩析や Sephadex G-100, CM-Toyopearl の chromatography による分離によって,

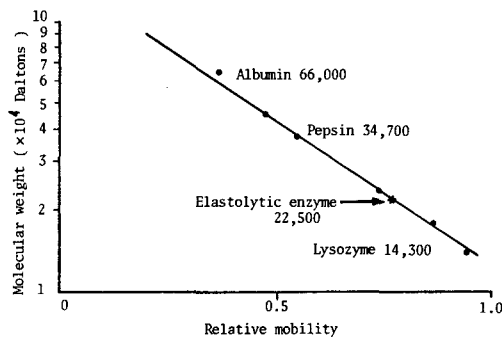


Fig. 5 Calibration line of marker proteins.

Table 3 Summary of *S. epidermidis* elastolytic enzyme purification

	Volume (ml)	Protein (mg)	Amidolytic activity(U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)
TBS <sup>a</sup> extract	27.0	476.0	156.6	0.33	100.0
60%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.5	121.1	37.1	0.31	24.0
G-100 <sup>b</sup>	16.9	48.3	32.0	0.66	20.0
CM-TP <sup>c</sup>	7.0	14.3	29.2	2.04	18.6

<sup>a</sup>: Tris-HCl buffer saline. <sup>b</sup>: Sephadex G-100 gel chromatography. <sup>c</sup>: CM-Toyopearl ion exchange chromatography.

Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA に対する活性 (amidolytic activity) が156.6U から29.2U に低下し, 反対に比活性は2.04U/mg まで上昇した。最終的に酵素は14.3mg が回収され, 回収率は18.6% であった (Table 3.)。また, 得られた酵素は凍結乾燥により失活しやすい性質であることが確認された。

#### 4. Elastin分解酵素の活性測定と生化学的性状

##### ① 活性測定法

Orcein-elastin に対する *S. epidermidis* T41 と *S. epidermidis* ATCC 14990 の elastin 分解酵素は24時間後でも明らかな基質の水解はみられず, また trypsin や 2-ME を加えた系で測定しても活性測定はできなかった。

Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 法では, 全体に反応速度が遅いので, 2-ME の添加による測定を採用した。2-ME の添加量は酵素62.5 μg/ml あたり 10 μl からさほど変化はみられず, 25 μl 以上では抑制的であったため, 各測定時に 2-ME を20 μl/ml 加えて測定した。

##### ② 生化学的性状

###### a. 至適 pH の測定

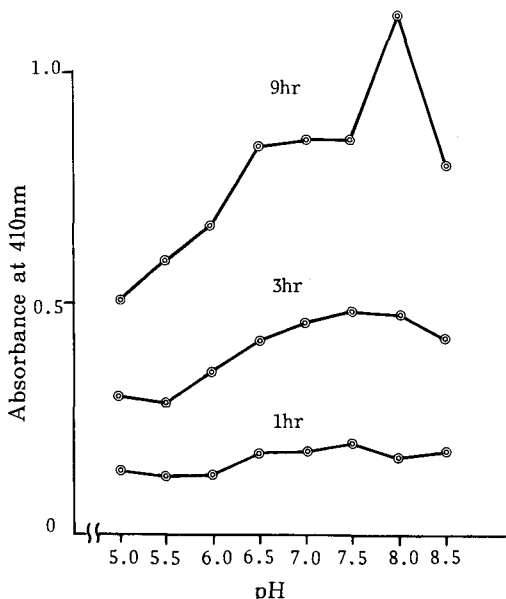
各 pH の緩衝液に Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA を溶解して反応を見た結果, 3時間まではあまり著明ではなかったが, 9時間経過した後, pH8.0 にピークがみられ, 至適 pH8.0 であった (Fig. 6)。

###### b. 耐熱性

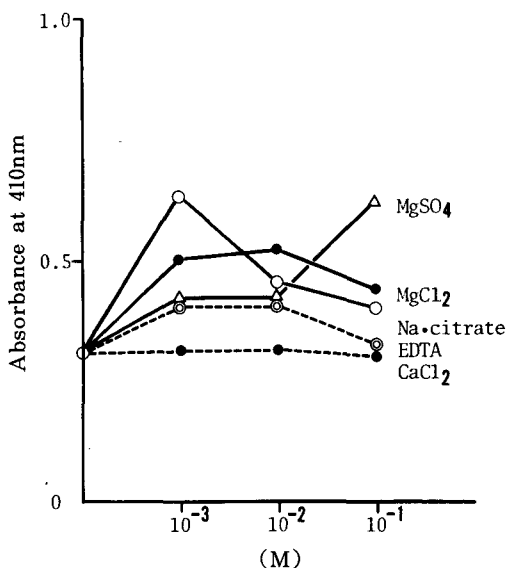
60°C 5分間では約80%が, 10分間では100%が失活した。

###### c. Elastin分解酵素の活性増強および抑制因子





**Fig.6** Optimum pH of elastolytic enzyme.  
 pH 5.0~5.5: 0.05 M citrate buffer solution.  
 pH 6.0~6.5: 0.05 M phosphate buffer solution.  
 pH 7.0~8.5: 0.05 M Tris-HCl buffer solution.  
 Concentration of enzyme 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and volume of 2-ME was 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$  at 37  $^{\circ}\text{C}$  respectively.



**Fig.7** Effect of each ions and EDTA. Elastolytic enzyme and Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA was kept on 3 hours at pH 8.0.

Ca<sup>2+</sup>を除くほぼすべてのイオンは10<sup>-3</sup>Mから10<sup>-1</sup>Mまでの間では活性が増強的に作用したが、10<sup>-1</sup>MではMg<sup>2+</sup>がさらに活性を増強させた。Na<sup>+</sup>は10<sup>-3</sup>Mにて活性増強作用を示し、Ca<sup>2+</sup>は終始変化がみられなかった (Fig. 7)。

d. 各種 proteinase inhibitor による阻害実験

Proteinase inhibitorのelastin分解酵素の阻害結果は、Table 4に示したとおりであった。溶解度の関係もあり濃度は一様ではないが、thiol proteaseの阻害剤であるE-64により92.7%が阻害され、serine proteaseの阻害剤であるPMSFにより64.1%の阻害作用を受けた。また、elastinalにより64.0%が阻害された。

以上の結果より*S. epidermidis*の産生するelastin分解酵素は、thiol proteaseに近い性質を示した。

5. Elastin分解酵素の投与による病理学的実験成績

酵素投与群では投与部位に潰瘍が形成され、潰瘍面は痂皮により覆われていた (Fig. 8, 9)。潰瘍周辺にはび慢性の炎症性細胞浸潤が顕著であり、この炎症性細胞浸潤は筋層にまで達していた。また、潰瘍周囲の毛包部は広範にわたって破壊されていた。滅菌生理食塩水のみを投与した対照群では、投与部に著変は認められなかった。また、滅菌 Tris-HCl 緩衝液のみを投与したものは毛包間の結合組織の一部にごくわずかな小円形細胞浸潤をみるものもあったが、明かな炎症性病変を惹起したものはなかった。

一方、pancreas elastase 投与群では表皮の凝固壊死とその周囲に帯状の小円形細胞浸潤がみられたが、膿瘍形成をみたものはなかった。

考 察

旧来、C-NSの病原性については不明な点が多く、非病原菌として扱われてきた。しかし、1960年代以後、心内膜炎<sup>2)</sup>、術後感染症<sup>3)</sup>、皮膚化膿性疾患<sup>10)</sup>、女性の尿路感染症<sup>8,9)</sup>などの起炎菌あるいは病原菌としての報告がなされ、日和見感染の病原菌としてC-NSが注目されるようになった<sup>20,21)</sup>。

Table 4 Effect of proteinase inhibitors on *S. epidermidis* elastolytic enzyme

Inhibitor	Inhibitor concentration	Inhibition (%)
1. Class specifics		
Phosphoramidon	11.8 $\mu\text{g/ml}$	43.9
Pepstatin A	3.6 $\mu\text{g/ml}$	43.9
E-64	3.4mM	92.7
PMSF <sup>a</sup>	4.1mM	64.1
DFP <sup>b</sup>	1.0mM	48.1
NEM <sup>c</sup>	2.5 $\mu\text{g/ml}$	53.7
2. Others		
Elastatinal	53.0 $\mu\text{g/ml}$	64.0
$\alpha_1$ -antitrypsin	25.0 $\mu\text{g/ml}$	0 <sup>d</sup>

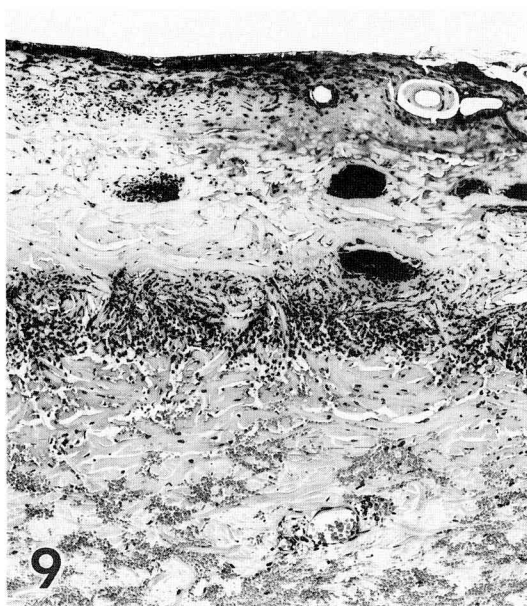
<sup>a</sup> : Phenylmethanesulfonyl fluoride. <sup>b</sup> : Diisopropylfluorophosphate.

<sup>c</sup> : N-ethylmaleimide. <sup>d</sup> : positive inhibition in elastin-plate method.

Examination was done under the condition of 2.5 mM Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA for 3 hours at 37°C, and enzyme volume was 200  $\mu\text{g/ml}$ .



**Fig.8** Histopathological finding of elastolytic enzyme-injected region. This shows deep ulcer, abscess and diffuse inflammatory cell infiltration.



**Fig.9** Histopathological finding of pancreatic elastase-injected region. This shows coagulation necrosis of skin and mononuclear cell infiltration.

平田ら<sup>10)</sup>は口腔の化膿性炎および歯周疾患の盲嚢から C-NS を 53.5% 分離し、小佐野ら<sup>20)</sup>は歯肉炎、歯石、軟化象牙質などより C-NS を 24% 分離したと報告している。

著者は口腔内から 67 株 (42.7%) 株の C-NS

を分離し、さらに *S. epidermidis* 48 株 (71.6%) を分離した。また C-NS の elastin 分解酵素産生菌は 48 株 (71.6%) であり、その大部分が *S. epidermidis* 44 株 (91.7%) であった。

一方、泌尿・生殖器に限定すると C-NS 28

株 (17.8%) が分離され, *S. epidermidis* 19株 (67.9%) が同定できた。C-NS の elastin 分解酵素産生菌は22株 (78.6%) であり, うち *S. epidermidis* 18株 (81.8%) が elastin 分解酵素産生菌であった。

以上のように, elastin 分解酵素を産生する C-NS の検出率, ならびに *S. epidermidis* の分離率が著しく高い結果となった。このことは, C-NS の関与する疾患において *S. epidermidis* と elastin 分解酵素産生が, 病因として重要な役割を演じていることを示唆しているものと思われる。

また, *Staphylococcus* 基準株 (12株) の elastin 分解酵素産生能について検討した結果, *S. epidermidis* ATCC 14990のみが elastin 分解酵素を産生することが確認された。

これらのことから, C-NS の elastin 分解酵素産生株は大部分が *S. epidermidis* で, 疾患の部位を問わず化膿性疾患および健常者の口腔より分離され, elastin 分解酵素の産生がその特徴的性状とみなすことができる。しかし, 著者の用いたブドウ球菌同定キット ID テスト・SP-18 (12菌種 2亜種分類可能) による菌種の同定では *S. epidermidis* 以外にも elastin 分解酵素を産生する菌種が存在し, Hartman ら<sup>16)</sup> の報告にもあるように, 著者の分離した *S. aureus* (2株) にも elastin 分解酵素の産生がみられた。

*Staphylococcus* 属は1983年に13菌種 4 亜種に分類<sup>20)</sup>され, 1987年現在では19菌種 4 亜種に分類<sup>21)</sup>されていることなどを考慮すれば, 同定キットについて今後さらに検討すべき点があるように思われる。

*Staphylococcus* 属で代表的病原菌種としてあげられる *S. aureus* は, enterotoxin,  $\alpha$ -toxin, exfoliative toxin, coagulase, protease, DNase 等各種の菌体外毒素および酵素を産生し, これらが *S. aureus* の病原性の本能であるとされている。一方, *S. epidermidis* は, 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はいるが, *S.*

*aureus* と同じ菌体外毒素ならびに酵素を産生せず, *S. aureus* に比べその病原性については不明な点が多い。

著者は, C-NS の病原性を考える上で日和見感染の病原菌の一つである *Pseudomonas aeruginosa* が exotoxin A, exoenzyme S, leucocidin, elastase, alkaline protease などの菌体外物質を産生し, これらが病原性の根源であるとされていることから<sup>22)</sup>, 同様な酵素である elastin 分解酵素に注目し, その産生能について検討してきた。著者の研究結果のごとく, C-NS 感染症の多くは *S. epidermidis* によるものであり, しかもその大部分が elastin 分解酵素産生株であることから, elastin 分解酵素が C-NS 感染症に関与していることが示唆された。さらに, *S. epidermidis* による elastin 分解酵素の産生は炭酸ガス培養と膜による培養時にその産生能が著明で, 通常の培養方法では elastin 分解酵素の産生がみられないことから, elastin 分解酵素産生能は, 生体組織類似の状態で培養された時にのみ発現される機能のように思われる。

次に, elastin 分解酵素の分離・精製では, 著者は elastin 分解酵素の分離に際し, まず液体培地からの分離や固形培地からの直接分離を試みたが, いずれの方法でも elastin 分解酵素の産生を確認することができなかった。

Elastin 分解酵素産生能は elastin を 0.5% 混合した培地において確認することができ, さらに elastin 分解酵素は Hartman ら<sup>16)</sup> が提唱する dialysis membrane technique により初めて回収可能であった。

*S. epidermidis* の産生する slime の本体は既に著者ら<sup>23)</sup> が報告したごとく, DNA 6.1% (w/w), protein 6.3% (w/w), ムコ多糖類 10% (w/w) であり, slime 存在下での elastin 分解酵素の分離操作は非常に困難であった。一方, 硫酸プロタミンやストレプトマイシン等による核酸沈澱を行うと, elastin 分解酵素も同時に沈澱し, 分離することが困難であった。

酵素活性の測定方法では, Hartman ら<sup>16)</sup>

が述べているように elastin で elastolytic activity (elastin 分解酵素産生能) の検討をすることが望ましいが, orcein-elastin 法に感受性がなく, elastin 平板法では拡散速度の問題があり定量が困難であった。従って, 合成基質を用いて amidolytic activity (Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA 水解能) の測定を行った。

Proteinase inhibitor の検討ではこの酵素が serine protease inhibitor である PMSF と DFP によって阻害されず, metalloprotease inhibitor である EDTA にも阻害されないこと, 2-ME によって活性化され, thiol protease inhibitor である E-64 によって阻害されることなどから, 通常の elastase とは異なる protease であることが示唆された。しかし, elastin や Suc-(Ala)<sub>3</sub>-PNA を水解し, elastin 平板法において elastatinal や  $\alpha_1$ -antitrypsin によって阻害され, elastolysis activity を有することなどから, 分子量の近接した 2 種類の elastin 分解酵素 (elastase) の可能性も考えられる。また, serine 基と thiol 基を持った全く新しい酵素が, 測定時に添加した 2-ME などにより active site が開裂し, thiol protease の性質を発現しているとも考えることができる。

Elastase は pancreas elastase に代表される serine protease と *P. aeruginosa*<sup>27)</sup> や, Macro-phage<sup>28)</sup> の elastase のような metalloprotease が, 知られているが, thiol protease はまだ報告されていない。以上のことから現段階では protease の分類は困難であった。

著者の精製した elastin 分解酵素をモルモットの背側皮膚に投与した結果, 投与部に壊死ならびに膿瘍を形成することが明らかになった。

一方, pancreas elastase を投与したものでは当該部の凝固壊死をみたが, 膿瘍形成をみたものはなかった。このことは pancreas elastase の作用が組織溶解性を主とするのに対して, *S. epidermidis* の elastin 分解酵素は化膿性炎症を惹起する作用が強いと考えられる。しかしながら, 炎症性細胞の chemotaxis に関し, elastin 分解酵素と, elastin 水解産物のいずれに起因

するものであるかは, 今回の研究結果からは言及できなかった。

## 結 論

1. 感染症患者 206 名と健常者 93 名より *Staphylococci* 245 株を分離し, C-NS 157 株 (64.1%) を得た。そのうち, *S. epidermidis* が 106 株 (67.5%) 同定され, elastin 分解酵素産生株は 108 株 (68.8%) であった。
2. 臨床材料より分離した *S. epidermidis* T41 と *S. epidermidis* ATCC 14990 の産生した elastin 分解酵素が精製された。その分子量は 22,500, 等電点は 9.4~9.5, 至適 pH は 8.0 であった。
3. 精製された elastin 分解酵素は thiol protease と似た阻害様式をもつ酵素であった。
4. Elastin 分解酵素はモルモット背部皮膚に潰瘍ならびに膿瘍を形成し, *S. epidermidis* の病原性に重要な役割を担っていることが確認された。

## 謝 辞

終わりに臨み指導を賜わり実験に際し多大の便宜を与えられた口腔微生物学講座 金子 克教授, ならびに本研究の機会を与えられた口腔外科学第一講座 藤岡幸雄教授に衷心より深謝いたします。なお病理学的指導を頂いた口腔病理学講座 武田泰典講師および有益な助言を頂いた口腔微生物学講座 濱田育男元助手に厚く謝意を表します。また, 材料採取にあたり盛岡赤十字病院細菌検査室のご協力を得たことを記して謝意を表します。

なお, 本論文の一部は昭和 58 年 10 月第 25 回歯科基礎医学会 (於: 福岡市), および昭和 59 年 10 月第 38 回日本細菌学会東北支部総会 (於: 山形市) において発表した。

**Abstract** : Coagulase-negative staphylococcus (C-NS) seems to be one of the pathogenic bacteria in opportunistic infections. Of 315 strains, 157 strains of C-NS were isolated from inpatients and from healthy persons used as controls to study on their bacteriological characteristics. *Staphylococcus epidermidis* was isolated from most of them (89.8%). It produced an elastolytic enzyme that seemed to be a pathogenic factor in their infections. Elastolytic enzyme was detected by a bacteriological and biochemical analysis, in 68.8% of *S. epidermidis*.

The enzyme from *S. epidermidis* was partially purified by using two assays : Sephadex G-100 gel chromatography and CM-Toyopearl ion exchange chromatography. The results were ; (1) the elastolytic enzyme hydrolyzed porcine elastin and Suc-(Ala)<sub>8</sub>-PNA, (2) molecular weight was found to be 22,500, (3) the isoelectric point was between 9.4 and 9.5, (4) characteristics of the elastolytic enzyme indicated that there is a similarity to that of thiol protease, however, they were different from those of other elastases.

Four guinea pigs were given an intracutaneous injection of the elastolytic enzyme to detect the pathogenic mechanism of the enzyme. Deep ulceration and abscesses were observed in the skin of the back. These histopathological findings indicate that the enzyme is deeply associated with the pathogenicity of C-NS.

#### 文 献

- 1) 船田 久 : 日和見感染, 臨床検査, 27 : 1338-1347, 1983.
- 2) Keys, T. F. and Hewitt, W. L. : Endocarditis Due to Micrococci and *Staphylococcus epidermidis*. *Arch. Intern. Med.* 132 : 216-220, 1973.
- 3) Rubin, J., Redgers, W. A., Taylor, H. M., Everett, E. D., Prowant, B. F., Fruto, L. V. and Nolph, K. D. : Peritonitis during continuous ambulatory dialysis. *Ann. Intern. Med.* 92 : 7-13, 1980.
- 4) Joseph, F. J. Jr., Gramling, P. K. and O' dell, N. M. : Species identification of coagulase negative staphylococci from urinary tract isolates. *J. Clin. Microbiol.* 8 : 435-437, 1978.
- 5) Sherotha, T. L. and Darell, J. H. : Urinary infection with coagulase-negative staphylococci in a teaching hospital. *J. Clin. Pathol.* 32 : 299-302, 1979.
- 6) Jakubicz, p. and Borowski, J. : *Staphylococcus epidermidis* and Micrococci as an etiological agent in urinary tract infection. *Zbl. Bakt. Suppl.* 10 : 141-143, 1981.
- 7) Akatov, A. K., Witte, M. and Khatenever, M. L. : Differentiation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* strains isolation of coagulase negative staphylococci from urine. *Zbl. Bakt. Suppl.* 10 : 85-89, 1981.
- 8) Wallmark, G., Arremark, I. and Telander, B. : *Staphylococcus saprophyticus*; A frequent cause of acute urinary tract infection among outpatients. *J. Infect. Dis.* 138 : 791-797, 1978.
- 9) Bollgren, I, Nord, C. E. and Vaclavinkove V. : Characterization of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci in the periurethral flora of adult women, *Zbl. Bakt. Suppl.* 10 : 1005-1009, 1981.
- 10) 平田佳子, 本田寿子, 田近志保子, 金子 克 : 健康者および臨床材料から分離したコアグララーゼ陰性ブドウ球菌の性状について, 岩医大歯誌, 5 : 208, 1980.
- 11) Akatov, A. K., Khatenever, M. L. and Devriese, L. A. : Identification of coagulase negative staphylococci isolation from clinical sources. *Zbl. Bakt. Suppl.* 10 : 153-161, 1981.
- 12) Papapetropoulos, M., Pappas, A., Papavassilios, J. and Legakis, N. J. : Distribution of coagulase-negative staphylococci in human infections. *J. Infect.* 2 : 145-153, 1981.
- 13) Sewell, C. M., Clerridge, J. and Guthrie, R. K. : Clinical significance of coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 16 : 236-239, 1982.
- 14) Varadi, D. P. and Saqueton, A. C. : Perifollicular elastolysis. *Br. J. Derm.* 83 : 143-150, 1970.
- 15) Murphy, R. A. : Elastase production by oral staphylococci. *J. Dent. Res.* 88 : 745-757, 1974.
- 16) Hartman, D. P. and Murphy, R. A. : Production and detection of staphylococcal elastase. *Infect. Immunol.* 15 : 59-65, 1977.
- 17) 潮田 弘, 辻 明良, 小川正俊, 五島瑛智子, 坂井千三 : コアグララーゼ陰性ブドウ球菌とマイクロコ

- カスの鑑別のための簡便なブドウ糖発酵試験法の検討-GF培地の組成の設定と有用性について, 日細誌, 35 : 753-763, 1980.
- 18) 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.
  - 19) Beish, J., Spiess, B and Wermuth, C. G. : The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem. Med.* 11 : 350-357, 1974.
  - 20) Nicolle, L. E., Hoban, S. A. and Harding, G. K. M. : Characterization of coagulase-negative staphylococci from urinary tract specimens. *J. Clin. Microbiol.* 17 : 267-271, 1983.
  - 21) 奥田俊郎, 広沢千男, 遠藤宣子, 善養寺浩 : 尿路感染症の起炎菌として分離されたコアグララーゼ陰性ブドウ球菌の種の分類および薬剤感受性, 感染症誌, 57 : 964-970, 1985.
  - 22) 小佐野悦雄, 別所 優, 緒方正規, 田中東平, 江口博康, 日比栄子 : コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の口腔よりの検出とその酵素産生性, 愛院大歯誌, 21 : 694-701, 1983.
  - 23) 藪内英子, 江崎孝行 : 医学細菌の分類学—現状と問題点, 臨床検査 (臨時増刊), 27 : 1412-1422, 1983.
  - 24) 江崎孝行 : 微生物の新しい分類と命名 II—グラム陽性菌, 臨床と微生物, 14 : 14-27, 1987.
  - 25) 本間 遜 : 緑膿菌研究の歩み—とくに病原性について, 感染症, 14 : 161-167, 1984.
  - 26) 浜田育男, 金子 克, 横田光正 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する Slime に関する研究, 岩医大歯誌, 9 : 168-178, 1984.
  - 27) Morihara, Kazuyuki and Tsuzuku, Hiro-sige : *Pseudomonas aeruginosa* elastase ; Affinity chromatography and some properties as a Metallo-neutral proteinase. *Arg. Biol. Chem.* 39 : 1123-1128, 1975.
  - 28) Banda, M. J. and Werb, Z. : Mouse macrophage elastase, purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem. J.* 193 : 589-605, 1981.