

Staphylococcus epidermidis 精製 slime protease のマウスにおける病原性について

佐々木 実 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5月31日]

抄録 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime protease の病原因子としての役割を明らかにする目的で、精製 slime protease のマウスにおける *S. epidermidis* 感染時の影響、および好中球の貪食殺菌活性におよぼす影響について検討した。*S. epidermidis* の slime 産生株は slime 非産生株にくらべ、マウスに対する致死性が強いが、菌体外物質を除去することにより、致死性は減弱した。これに対して、slime 非産生株のマウスに対する致死性は、*S. epidermidis* の精製 slime protease を注射することにより増強され、注射48時間後の生存菌数も多かった。なお、精製 slime protease は *in vitro* における好中球の貪食殺菌活性を阻害した。これらのことは、slime protease がマウスにおける *S. epidermidis* 病原性発現の一因子となっている可能性を示唆している。

Key words : *Staphylococcus epidermidis*, slime protease, experimental infection, pathogenicity.

緒 言

一般に微生物の産生する菌体外毒素や酵素は、微生物の病原性発現の重要な因子の一つである¹⁻³⁾。なかでも、医療技術の進歩にともなって生じた compromised host での *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoacticus* などの弱毒菌による感染は、日和見感染であることが多く⁴⁾、その病原性発現の本態は、菌体外毒素あるいは酵素などに依存していると考えられている^{2,5,6)}。

著者ら^{7,8)}は、先に *S. epidermidis* の slime 産生性と slime protease 活性とのあいだに相関のあることを報告した。今回、*S. epidermidis* の産生する slime protease の病原因子として

の役割を明らかにする目的で、マウスにおける *S. epidermidis* 感染時の精製 slime protease の影響と好中球貪食殺菌活性におよぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 使用菌株 : 口腔内より分離した slime 非産生 *S. epidermidis* STE-5 株と slime 産生 STE-19 株を用いた。
2. *S. epidermidis* の産生する slime protease の精製 : 著者らの方法⁹⁾に従い、DEAE-Sepharcel (Pharmacia) および Hydroxylapatite (生化学工業) カラムクロマトグラフィーにより crude slime から protease を分画し、単一に精製した。

Pathogenicity of slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis* in experimental infection of mice.

Minoru SASAKI 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 : 100-106, 1989

3. マウス感染実験 :

1) Slime 産生 *S.epidermidis* STE-19株あるいは非産生 *S.epidermidis* STE-5 株接種マウスの生存率 : ddY 系マウス (4週齢, 雄) を1群10匹用い, 一匹あたり *S.epidermidis* の 10^9 CFU/0.5ml を腹腔内に接種し, 各々の実験群におけるマウスの生死を7日間観察した。

2) Slime 産生 *S.epidermidis* 菌体の洗浄によるマウス生存率の変化 : Slime 産生 *S.epidermidis* を brain heart infusion broth で 37°C , 24時間培養後に集菌して, 滅菌生理食塩水で5回洗浄した洗浄菌と非洗浄菌のそれぞれを ddY 系マウス (4週齢, 雄, 1群10匹) に一匹あたり, 10^9 cells/0.5ml を腹腔内に接種し, マウスの生死を7日間観察した。

3) Slime 非産生 *S.epidermidis* STE-5 株接種マウスの生存率におよぼす精製 slime protease の影響 : 精製 protease の 0.1mg をマウスの尾静脈内に注射した後, ただちに slime 非産生の *S.epidermidis* (10^9 CFU/0.5ml) を腹腔内に接種して, *S.epidermidis* 感染成立に対する精製 slime protease の作用を検討した。

4) *S.epidermidis* 接種48時間後における血液, 腎臓中の生存菌数の測定 : Slime 産生 *S.epidermidis* STE-19株あるいは slime 非産生 *S.epidermidis* STE-5 株を接種した ddY 系マウス (4週齢, 雄) をそれぞれ1群4匹ずつ用いた。すなわち, *S.epidermidis* 精製 slime protease を, 腹腔内には 0.5mg/mouse, 尾静脈内へは 0.1mg/mouse を注射した48時間後に, 心臓穿刺により採血した血液あるいは無菌的に摘出した腎臓を, 0.1M の滅菌 phosphate buffered saline (pH7.0) 中でホモジナイズして得たホモジネートのそれぞれを10倍階段希釈し, マニット食塩培地 (ニッスイ) に 0.1ml 接種して, 37°C , 48時間培養し, 生菌数を算定した。

4. 好中球の分離 : ヘパリン加ヒト血液の 20ml に 5% dextran-saline を 5ml 加え, 室温に 30分間静置して得られた血漿層をセパレート L (武藤化学) に重層し, 1,400g, 30分間遠心して, 好中球を分離した。

5. *in vitro* における好中球貪食殺菌活性におよぼす *S.epidermidis* 精製 slime protease の影響 : Hanks' BSS 中に 1ml の好中球浮遊液 (10^6 cells/ml) と *S.epidermidis* STE-5 株 (10^6 CFU/ml) 1ml, ヒト血清 0.2ml および精製 slime protease (1mg/ml) の 20 μ l を滅菌試験管に入れ, 37°C でインキュベートした。そして 60分および 120分後にインキュベーションメディアウム中から 0.1ml をとり, それぞれをマニット食塩培地に接種し, 37°C , 48時間培養後に生菌数を算定した。対照には精製 slime protease の代わりに Tris-HCl buffer (pH 7.4) 20 μ l を加えたものを使用した。

結 果

1. Slime 産生 *S.epidermidis* および slime 非産生 *S.epidermidis* 接種マウスの生存率 :

S.epidermidis の slime 産生 STE-19株および slime 非産生 STE-5 株のそれぞれをマウス腹腔内に接種したときの生存曲線を Fig.1 に示した。slime 非産生株では接種1日後の生存率は 90% であり, 2日目以降死亡するマウスは認められ

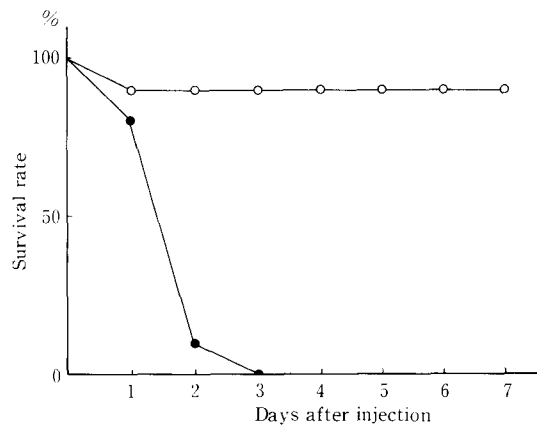


Fig.1 Survival rates of mice after injection of slime producing *Staphylococcus epidermidis* STE-19 or slime non-producing *Staphylococcus epidermidis* STE-5.

Each organism (10^9 cells) was injected intraperitoneally into the mice. Each group consists of 10 ddY mice. ●—● slime producing strain, ○—○ slime non-producing strain

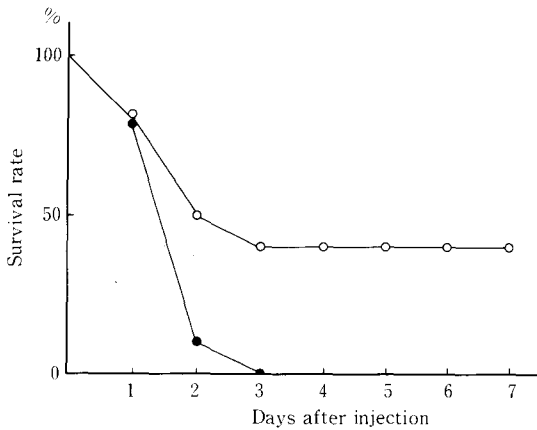


Fig.2 Survival rates of mice after injection of washed or non-washed cells of *Staphylococcus epidermidis* STE-19. Each organism (10^9 cells) was injected intraperitoneally into the mice. The cell was washed five times in sterilized physiological saline. Each group consists of 10 ddY mice.
○—○ washed cell, ●—● non-washed cell

なかった。一方, slime 産生株を接種したマウスの生存率は, 接種1日目で80%, 2日後で10%, 3日後には全てのマウスが死亡し, slime 産生株は slime 非産生株にくらべ, マウスに対する致死性が高かった。

2. Slime 産生 *S.epidermidis* の洗浄菌および非洗浄菌接種マウスの生存率:

S.epidermidis の非洗浄菌では, 菌体を接種後3日目で全てのマウスが死亡した。これに対して洗浄菌では, 接種3日目で40%が生存しており, その後死亡するマウスは認められなかった (Fig.2)。

3. Slime 非産生 *S.epidermidis* 接種マウスの生存率におよぼす精製 slime protease の影響: 精製 slime protease を注射したマウスでは菌体のみを接種した群にくらべ, 明らかな生存率の低下が観察された (Fig.3)。

4. *S.epidermidis* 接種マウスにおよぼす精製 slime protease の影響:

slime 産生の *S.epidermidis* STE-19 株あるいは slime 非産生 *S.epidermidis* STE-5 株をマウス腹腔内に接種した群 (1群4匹) および *S.*

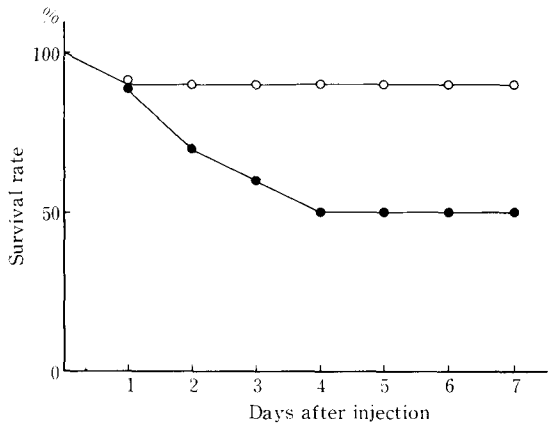


Fig.3 Survival rates of mice after injection of slime non-producing *Staphylococcus epidermidis* STE-5 and that of injection of slime non-producing *Staphylococcus epidermidis* STE-5 after treatment with a slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis*. The organism (10^9 cells) was injected intraperitoneally into the mice. The purified slime protease was given intravenously at the dose of 0.1mg/mouse. Each group consists of 10 ddY mice.
○—○ cell, ●—● cells + protease

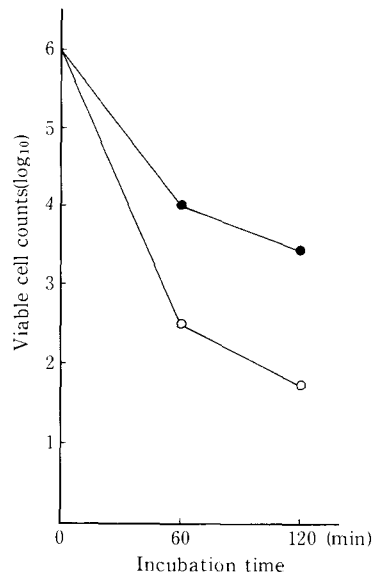


Fig.4 Effect of slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis* on the bactericidal activity of neutrophil *in vitro*.
●—● in the presence of protease
○—○ in the absence of protease

Table 1 Effect of the treatment with slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis* on viable cell counts in blood and kidney of mice intraperitoneally injected cells.

Strains	Slime protease production	Protease injection	Viable cell counts (mean)	
			Blood (CFU/ml)	Kidney (CFU/kidney)
STE-19	+	-	9.0×10^7	6.0×10^7
STE-5	-	-	1.3×10^4	5.0×10^4
STE-5	-	+ (ip)	2.1×10^5	2.7×10^4
STE-5	-	+ (iv)	3.6×10^4	5.6×10^5

The organisms (10^9 cells) were injected intraperitoneally into the mice. The purified slime protease was given to each mouse at the dosage of 0.1 and 0.5mg intravenously (iv) or intraperitoneally (ip). Mice were sacrificed 48 hr after treatment.

Table 2 Effect of the treatment with slime protease purified from *Staphylococcus epidermidis* on viable cell counts in blood and kidney of mice intravenously injected cells.

Strains	Slime protease production	Protease injection	Viable cell counts (mean)	
			Blood (CFU/ml)	Kidney (CFU/kidney)
STE-19	+	-	5.0×10^3	2.2×10^4
STE-5	-	-	9.8×10^2	2.5×10^3
STE-5	-	+ (ip)	2.1×10^2	2.7×10^2
STE-5	-	+ (iv)	1.0×10^3	6.7×10^4

The organisms (10^9 cells) were injected intravenously into the mice. The purified slime protease was given to each mouse at the dosage of 0.1 and 0.5mg intravenously (iv) or intraperitoneally (ip). Mice were sacrificed 48 hr after treatment.

epidermidis 精製 slime protease を腹腔内および静脈内に注射した後、ただちに *S.epidermidis* を腹腔内に接種した群 (1群4匹) の48時間後の血液と腎臓中の残存生菌数の平均値を Table 1 に示した。slime 産生株では血液で 9×10^7 CFU/ml, 腎臓で 6×10^7 CFU/ml であった。これに対し, slime 非産生株では, 血液で 1.3×10^4 CFU/ml, 腎臓で 5.0×10^4 CFU/ml であった。一方, 精製 slime protease を腹腔内に注射した場合, slime 非産生株の残存生菌数は血液で 2.1×10^5 CFU/ml, 腎臓で 2.7×10^4 CFU/ml, また精製 slime protease 0.1mg を静脈内注射した場合, 残存生菌数は血液で 3.6×10^4 CFU/ml, 腎臓で 5.6×10^5 CFU/ml であった。

Table 2 は slime 産生株および slime 非産生株をマウス尾静脈内に接種した群 (1群4匹) と精製 slime protease を腹腔内あるいは静脈内注射した後, ただちに *S.epidermidis* を静脈内に接種した群 (1群4匹) の48時間後の血液と腎臓中の残存生菌数の平均値を示したものである。slime 産生株では残存生菌数が血液で 5.0×10^3 CFU/ml, 腎臓で 2.2×10^4 CFU/ml であった。slime 非産生株では残存生菌数が血液で 9.8×10^2 CFU/ml, 腎臓で 2.5×10^3 CFU/ml であり, slime 産生株および slime 非産生株の間に差は認められなかった。一方, slime 非産生株を接種したマウスに, 精製 slime protease の0.5mg を腹腔内に注射した時の残存生菌数は,

血液で 2.1×10^2 CFU/ml, 腎臓で 2.7×10^3 CFU/mlであった。また, 精製 slime protease 0.1 mgを静脈内注射した時の残存生菌数は, 血液で 1.0×10^3 CFU/ml, 腎臓で 6.7×10^4 CFU/mlであり, 残存生菌数の増加が観察された。

5. *in vitro*における精製 slime proteaseの好中球貪食殺菌活性におよぼす影響: 精製 slime proteaseを好中球浮遊液中に添加することにより, 好中球の殺菌活性 (Fig.4)は60分後には明らかに阻害され, 120分後の生存菌数は対照の約100倍高い値を示した。

考 察

細菌や真菌が菌体外に産生する protease は, 病原因子の一つであり, 微生物の感染成立に重要な役割を演じていると考えられ, 近年, 常在性の弱毒菌でも問題になっている^{10,11)}。近藤ら^{12,13)}は, *Candida albicans*の protease 産生株が protease 非産生株にくらべマウスに対する病原性が強く, また発育鶏卵においても侵襲性が強いと報告している。また, *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴⁾, *Enterococcus faecalis*¹⁵⁾, *Serratia marcescens*¹⁶⁾などの日和見感染をおこす細菌においても, その病原性に菌体の産生する protease が深い関わりをもっていると考えられている。日和見感染をおこす細菌といわれている *S.epidermidis* は, 临床上, 敗血症¹⁷⁾, 心内膜炎¹⁸⁾の患者などからしばしば分離され, 特に compromised host¹⁾において *S.epidermidis* による感染は深刻な問題となっている。

著者ら⁷⁻⁹⁾は, 先に *S.epidermidis* の産生する slime 中に protease が存在することを見出し, この protease が *S.epidermidis* 感染で病原因子としての役割を果たしている可能性のあることを示唆した。本研究では, この slime protease がマウス感染モデルにおいてどのような役割を果たし, かつ生体防御因子の一つである好中球の殺菌活性におよぼす影響について検討した。

S.epidermidis slime 産生株は, slime 非産生株にくらべマウスに対する致死性が明らかに高

かった。また, 滅菌生理食塩水で菌体を洗浄することにより, 菌体外物質を除去した場合, マウスに対する致死性が低下したことから, 菌体外 slime の病原性発現への関与が示唆された。さらに, slime 非産生株を接種したマウスに精製 protease を追加注射した場合, 菌体単独の接種にくらべマウスの生存率が低下した。また, slime 非産生の *S.epidermidis* を腹腔内に接種した後, 精製 slime protease を静脈内注射した時には, 生存菌数の増加が顕著であり, Fig.3におけるマウス生存率の結果を反映するものであった。このようなことから, *S.epidermidis* slime 中の protease はマウスにおける *S.epidermidis* 感染においては病原因子として働き, 感染を増強させるものと考えられる。

P.aeruginosa の alkaline protease や elastase は, 生体の感染防御因子である好中球, 血清タンパク, リンパ球に対して種々の抑制作用を示し, *P.aeruginosa* の感染を増強あるいは成立させる可能性のあることが示唆されている¹⁹⁻²¹⁾。本研究において *S.epidermidis* slime protease の貪食殺菌活性におよぼす影響を検討したところ, 精製 slime protease が好中球の貪食殺菌活性を阻害することが示された。また, 著者ら⁹⁾は, 先に *S.epidermidis* 精製 slime protease がヒト血清中の IgG を分解することを報告した。

以上のことから, *S.epidermidis* slime protease は生体内において, 好中球の補食殺菌過程に対して抑制作用を示すことにより, *S.epidermidis* 感染における病原性発現の一因子となっていることが示唆される。

結 語

1. *S.epidermidis* slime 産生株では slime 非産生株にくらべマウスに対する致死性が高く, *S.epidermidis* slime 産生株の菌体外物質を除去することにより, マウスに対する致死性は低下した。
2. *S.epidermidis* slime 非産生株のマウスに対する致死性は精製 slime protease を追加注

射することにより増強され、48時間後における生存菌数が増加した。

3. *S. epidermidis* 精製 slime protease は *in vitro* において好中球の貪食殺菌活性を阻害し

た。

論文の要旨は第63回日本感染症学会総会（盛岡，平成元年4月19日）で発表した。

Abstract : To determine the action of the slime protease as a pathogenic factor in *Staphylococcus epidermidis* infection, the effects of purified slime protease obtained from *S. epidermidis* on experimental infection in mice and on bactericidal activity of neutrophil *in vitro* were examined. A slime producing strain of *S. epidermidis* was more virulent than a slime non-producing strain. The virulence of slime producing *S. epidermidis* was reduced by washing. The lethality of slime non-producing *S. epidermidis* was intensified by treatment of mice with purified slime protease of *S. epidermidis* in mice, and the viable cell count in mice after 48 hr treatment with purified slime protease was higher than that in mice untreated with the enzyme. Furthermore, purified slime protease from *S. epidermidis* inhibited the bactericidal activity of neutrophil *in vitro*. These results suggest that *S. epidermidis* slime protease may be one of the pathogenic factors involved in *S. epidermidis* infection.

文 献

- 1) Scheifele, D.W., Bjornson, G.L., Dyer, R.A. and Dimmick, J.E. : Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun.* 55 : 2268-2273, 1987.
- 2) Gemmell, C.G. : Exo-proteins of coagulase-negative staphylococci as possible virulence factor. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. suppl.* 16 : 93-102, 1987.
- 3) Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, H.F., Klapetek, K., Mueller-Eckhardt, C. and Roka, L. : Staphylococcal α toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J. Exp. Med.* 168 : 527-542, 1988.
- 4) Verhoef, J. : Infections caused by coagulase-negative staphylococci in the immunocompromised host. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. suppl.* 16 : 209-214, 1987.
- 5) Blackwood, L.L., Stone, R.M., Iglewski, H. and Pennington, J.E. : Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infect. Immun.* 39 : 198-201, 1983.
- 6) Obana, Y. : Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*. : Analysis of experimental infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 30 : 645-657, 1986.
- 7) 佐々木実, 金子克 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime とその病原性について, 岩医大歯誌, 13 : 10-17, 1988.
- 8) 佐々木実, 金子克 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime の病原性と protease 活性との関連について, 岩医大歯誌, 13 : 206-211, 1988.
- 9) 佐々木実, 金子克 : *Staphylococcus epidermidis* の産生する slime 中にみとめられる protease の精製とその性状について, 岩医大歯誌, 14 : 17-25, 1989.
- 10) Rüchel, R. : A variety of proteinase and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A* 257 : 266-274, 1984.
- 11) 宮崎修一, 宇治達哉, 青木泰子, 小林寅喆, 五島瑳智子 : *Enterococcus faecalis* の病原性に関する基礎的検討, : マウスに対する菌力と産生物質の関連性, 感染症誌, 61 : 318-324, 1986.
- 12) 近藤譲, 清水克美, 田中健治 : *Candida albicans* の protease 産生と発育鶏卵胚漿尿膜への侵襲, 日細菌誌, 40 : 267, 1985.
- 13) 近藤譲, 清水克美, 田中健治 : *Candida albicans* の産生能とマウスに対する病原性, 日細菌誌, 41 : 380, 1986.
- 14) Kharazmi, A., Eriskien, H.O., Döring, G. and Høiby, N. : Effect of *Pseudomonas aeruginosa* proteases on human leucocyte phagocytosis and bactericidal activity. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C*, 94 : 175-179, 1986.
- 15) Montgomerie, J.Z., Kalmanson, G.M. and Guze, L.B. : Virulence of enterococci in experimental pyelonephritis. *Urol. Res.* 5 :

- 99-102, 1977.
- 16) Matsumoto, K., Yamamoto, T., Kamata, R. and Maeda, H. : Pathogenesis of serratal infection. : Activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratal protease. *J. Biochem.* 96 : 739-749, 1984.
- 17) Ishak, M.A., Gröschel, D.H.M., Mandell, G.L. and Wenzel, R.P. : Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative Staphylococci causing nosocomial septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 1025-1029, 1985.
- 18) Marples, R.R., Richardoson, J.F. and Saxe, M.J. : Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocarditis caused by coagulase-negative staphylococci. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. suppl.* 14: 463-468, 1985.
- 19) Morihana, K., Tsuzuki, H. and Oda, K. : Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa* : Inactivation of human plasma α_1 -proteinase inhibitor. *Infect. Immun.* 24 : 188-193, 1979.
- 20) Kharazmi, A., Döring, G., Høiby, N. and Valerius, N.H. : Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and elastase with human polymorphonuclear leucocytes *in vitro*. *Infect. Immun.* 43 : 161-165, 1984.
- 21) Theandar, T.G., Kharazmi, A., Pedersen, B.K., Christensen, L.D., Tvede, N., Poulsen, L.K., Ødum, N., Svenson, M. and Bendtzen, K. : Inhibition of human leucocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Infect. Immun.* 56 : 1673-1677, 1988.