

[短 報]

*Staphylococcus aureus* に対する *Enterococcus faecalis* の溶血阻害に関する検討

葛西 淳・竹村子竜

独立行政法人国立病院機構仙台西多賀病院臨床検査科

(平成 29 年 12 月 12 日受付, 平成 30 年 3 月 13 日受理)

CAMP テストの陰性コントロールに用いた臨床分離株の *Enterococcus faecalis* が,  $\beta$ -hemolysin の供給源である *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血を阻害した。 *S. aureus* が産生する hemolysin には,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  があり,  $\beta$ -hemolysin は 37°C で  $\beta$  溶血を示さず,  $\gamma$ -hemolysin は寒天で阻害されるため, *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血は  $\alpha$  または  $\delta$ -hemolysin によるものと思われた。そこで, 表現型による判別法を基に,  $\alpha$  または  $\delta$ -hemolysin を単独で産生する *S. aureus* を 1 株ずつ収集し, *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血を阻害する *E. faecalis* 8 株を溶血阻害試験に供した。その結果, 8 株全てが  $\delta$ -hemolysin の溶血を阻害した。 *E. faecalis* の中には, 抗菌作用を示す Enterocin 産生株が存在する。これら 8 株の Enterocin 活性をみたところ,  $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する抗菌作用は認められなかった。よって, *E. faecalis* の溶血阻害機構は, 抗菌作用に伴う  $\delta$ -hemolysin の量的減少ではないと考えられた。

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*,  $\delta$ -hemolysin, 溶血阻害

序 文

病原細菌が産生する種々の細菌性蛋白質毒素には, 宿主細胞を障害する細胞毒素がある。なかでも赤血球に高い親和性を持つものは溶血毒と呼ばれ, *Staphylococcus aureus* の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -hemolysin, *Streptococcus pyogenes* の Streptolysin O および Streptolysin S, *Escherichia coli* の  $\alpha$ -hemolysin などが知られている。また, 微生物検査には, これら溶血毒の性質を利用した検査法がある。例えば *Streptococcus agalactiae* は, *S. aureus* が産生する  $\beta$ -hemolysin の存在下でヒツジ赤血球の溶血を増強させ, 鎌状の  $\beta$  溶血帯を形成する。この現象は, Christie, Atkins, Munch-Petersen によって見出され<sup>1)</sup>, CAMP テストとして *S. agalactiae* の同定検査に利用されている。

ある時, CAMP テストの陰性コントロールに用いた臨床分離株の *Enterococcus faecalis* が,  $\beta$ -hemolysin の供給源である *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血を阻害した。 *S. aureus* の  $\beta$ -hemolysin は, 37°C で培養後, 4°C に置かなければ  $\beta$  溶血を示さず<sup>2)</sup>,  $\gamma$ -hemolysin は寒天により阻害されるため<sup>3)</sup>, 血液寒天培地でその溶血性は観察されない。以上より, *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血は,  $\alpha$  または  $\delta$ -hemolysin によって起きていることが推測され, *E. faecalis* は何れかの溶血を阻害するのではないかと考えられたため, 検討することにした。

材料と方法

1. *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血阻害株と非阻害株の収集

ヒツジ血液寒天培地(極東製薬)に *S. aureus* ATCC 25923 (関東化学)を直線状に画線し, それと直角になるよう被検株の *E. faecalis* を接種する。35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で 24 時間培養後, *S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血を阻害した株は Inhibiting strain (IS), 非阻害株は Non inhibiting strain (NIS) として各々 8 株収集した (図 1)。

著者連絡先: (〒982-8555) 宮城県仙台市太白区鉤取本町 2 丁目 11 番 11 号  
独立行政法人国立病院機構仙台西多賀病院臨床検査科  
葛西 淳  
TEL: 022-245-2111 (内線 4301)  
FAX: 022-243-2530

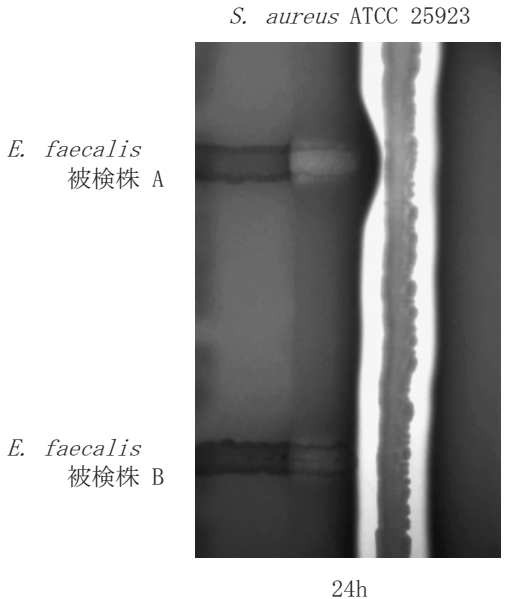


図1. *S. aureus* ATCC 25923 の $\beta$ 溶血阻害株と非阻害株の収集  
被検株AをInhibiting strain (IS), 被検株BをNon inhibiting strain (NIS)として各々8株収集した。

## 2. 表現型による *S. aureus* の hemolysin 産生性の確認

Traber ら<sup>4)</sup>の方法を一部改変して行った。まず、表現型から $\beta$ -hemolysinを単独で産生していると考えられた臨床分離株の *S. aureus* ( $\beta$ -hemolysin 単独産生株)を、ヒツジ血液寒天培地に直線状に画線し、それと直角になるよう被検株の *S. aureus* を接種する。35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養後、Elek&Levy<sup>5)</sup>の報告を基に、被検株の $\beta$ 溶血が $\beta$ -hemolysinで阻害された場合は $\alpha$ -hemolysin 単独産生株、増強された場合は $\delta$ -hemolysin 単独産生株として各々1株収集した。また、被検株の $\beta$ 溶血に阻害と増強の両方が認められた場合は、 $\alpha$ -hemolysinと $\delta$ -hemolysinを同時に産生していると判断し、収集株から除外した(図2)。

## 3. $\alpha$ および $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する溶血阻害試験

ヒツジ血液寒天培地に $\alpha$ または $\delta$ -hemolysin 単独産生株を直線状に画線し、それと直角になるようISまたはNISを接種する。35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で24~48時間培養後、ISとNISの溶血阻害について観察した。

## 4. ウマ血液寒天培地を用いた溶血阻害試験

ウマ血液寒天培地(極東製薬)に $\delta$ -hemolysin 単独産生株を直線状に画線し、それと直角になるようISを接種する。35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で24~48時間培養後、ISの溶血阻害について観察した。

## 5. $\beta$ -hemolysin 存在下における溶血阻害試験

方法2で使用した $\beta$ -hemolysin 単独産生株を、ヒツジ血液寒天培地に直線状に画線し、35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で48時間培養する。次に、発育した $\beta$ -hemolysin 単独産生株に対して、 $\delta$ -hemolysin 単独産生株は平行に、ISは $\delta$ -hemolysin 単独産生株と直角になるよう接種する。35°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で24~48時間培養後、ISの溶血阻害について観察した。

## 6. ISのEnterocin 産生スクリーニング

Ogaki ら<sup>6)</sup>とHARRIS ら<sup>7)</sup>の方法を一部改変して行った。すなわち、トリプチケースソイ寒天培地(日本BD)にISを接種し、35°C, 好気条件下で24時間培養後、培地を安全キャビネット(日本医化)内に移動させる。次に、逆にした培地の蓋に1mLのクロロホルム(和光純薬)を入れて20分間密閉後、残ったクロロホルムは蓋を開けて蒸発させる。さらに、0.8%軟質トリプチケースソイ寒天培地(自家調整)8mLに、マクファーランドNo. 0.5に調整した $\delta$ -hemolysin 単独産生株の菌液を8 $\mu$ L入れて混和後、ISを発育させたトリプチケースソイ寒天培地に重層する。35°C, 好気条件下で24時間培養後、ISによる発育阻止円の形成について観察した。

## 結 果

### 1. $\alpha$ および $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する溶血阻害試験

IS No. 1~8は、 $\alpha$ -hemolysinの溶血を阻害せず、不明瞭であったが、48時間培養後には $\delta$ -hemolysinの溶血を阻害した。一方、NIS No. 1~8は、何れの溶血も阻害しなかった(図3)。

### 2. ウマ血液寒天培地を用いた溶血阻害試験

IS No. 1~8の全てにおいて、24時間培養後には $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する溶血阻害が明瞭に認められた(図4)。

### 3. $\beta$ -hemolysin 存在下における溶血阻害試験

IS No. 1~8の全てにおいて、24時間培養後には $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する溶血阻害が明瞭に認められた(図5)。

### 4. ISのEnterocin 産生スクリーニング

IS No. 1~8の周囲に、 $\delta$ -hemolysin 単独産生株に対する発育阻止円は認められなかった(図6)。

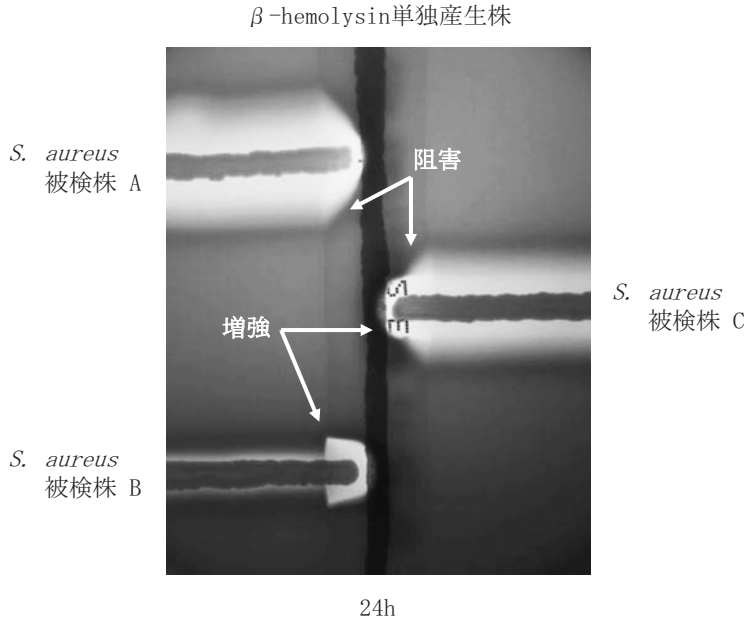


図2. 表現型による *S. aureus* の hemolysin 産生性の確認

β-hemolysin により、被検株 A の β 溶血は阻害され、被検株 B の β 溶血は増強した。よって、被検株 A を α-hemolysin 単独産生株、被検株 B を δ-hemolysin 単独産生株とした。また、被検株 C は阻害と増強の両方を認めたことから、α & δ-hemolysin 産生株と判断した。

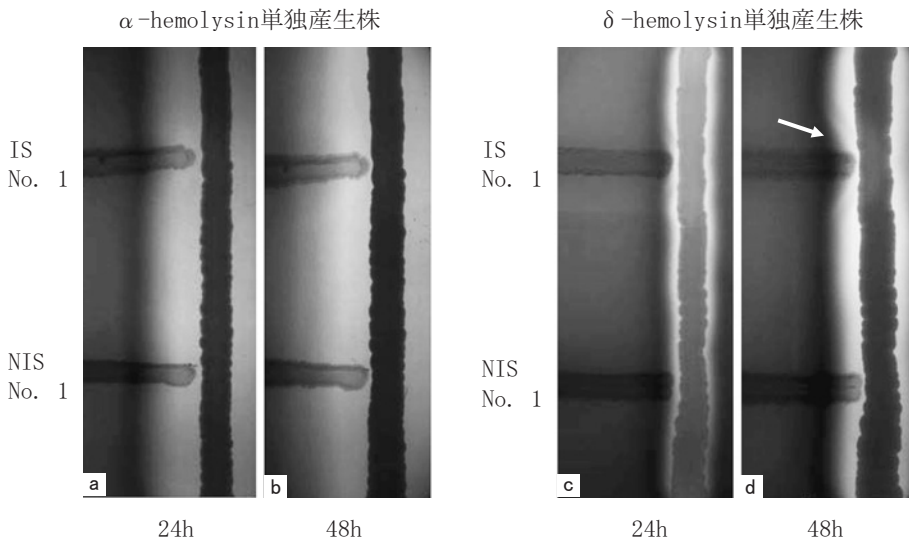


図3. α および δ-hemolysin 単独産生株に対する溶血阻害試験

例として、IS No. 1 と NIS No. 1 の結果を示す。IS No. 1 は、α-hemolysin の溶血を阻害せず、不明瞭であったが、48 時間培養後には δ-hemolysin の溶血を阻害した (図 d の矢印)。一方、NIS No. 1 は、何れの溶血も阻害しなかった。

### 考 察

*S. aureus* は、皮膚・軟部組織、骨・関節、呼吸器、血管内など人体の様々な場所で感染症を引き起こす。

また、その病因は、組織への付着を媒介する表面タンパク質の産生、細胞外毒素の分泌、隣接組織に感染を拡散させる酵素の産生など<sup>8)</sup>に由来する。細胞外毒素

の一種である  $\delta$ -hemolysin は、26 個のアミノ酸からなるペプチドで<sup>9)</sup>、様々な動物の赤血球を破壊する<sup>10)</sup>。さらに近年、Nakamura らは  $\delta$ -hemolysin がマスト細

胞の脱顆粒を誘導し、マウスのアレルギー性皮膚疾患を促進させた<sup>11)</sup>と報告しており、病因論における  $\delta$ -hemolysin の重要性が示されている。

*S. aureus* に対する溶血阻害について Vitkova は、*E. faecalis* の一部の株が *S. aureus* の  $\beta$ -hemolysin による溶血を阻害した<sup>12)</sup>と報告しているが、本検討では新たに IS が  $\delta$ -hemolysin の溶血を阻害することが明らかとなった (図 3)。また、この結果は、*S. aureus* ATCC 25923 の  $\beta$  溶血が  $\delta$ -hemolysin によって起きていることを示唆する。しかし、共に  $\delta$ -hemolysin を産生しているにもかかわらず、*S. aureus* ATCC 25923 と  $\delta$ -hemolysin 単独産生株では、IS による溶血阻害に差が認められた。特に  $\delta$ -hemolysin 単独産生株では、*S. aureus* ATCC 25923 (図 1) に比べ、溶血阻害を認めるまでに時間を要し、さらにそれは不明瞭であった (図 3)。当初、このような差を生む要因については不明であったが、 $\delta$ -hemolysin はヒツジ赤血球よりも、ウマ、ウサギ、ヒト赤血球に対して溶血活性が高い<sup>10)</sup>という知見を得て、溶血阻害試験にウマ血液寒天培地を用いた。その結果、 $\delta$ -hemolysin 単独産生株の溶血環は拡大し、さらに 24 時間培養後には IS の溶血阻害が明瞭に認められた (図 4)。また、たとえヒツジ血液寒天培地であっても、 $\beta$ -hemolysin で溶血活性を増強させると、 $\delta$ -hemolysin 単独産生株は幅広いクリアな溶血環を形成し、そこで認められる IS の溶血阻害

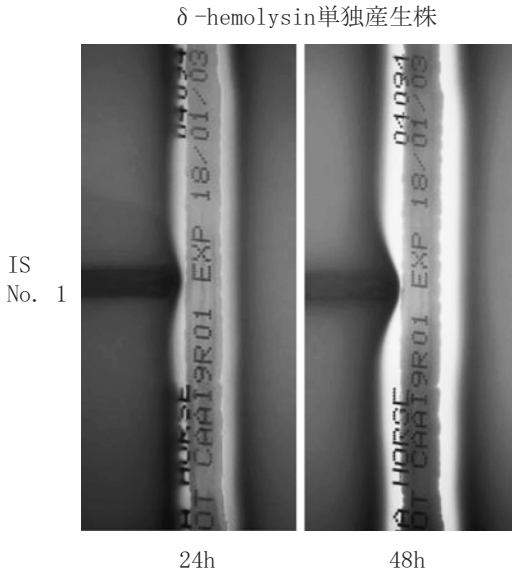


図 4. ウマ血液寒天培地を用いた溶血阻害試験例として、IS No. 1 の結果を示す。24 時間培養後には溶血阻害が明瞭に認められた。

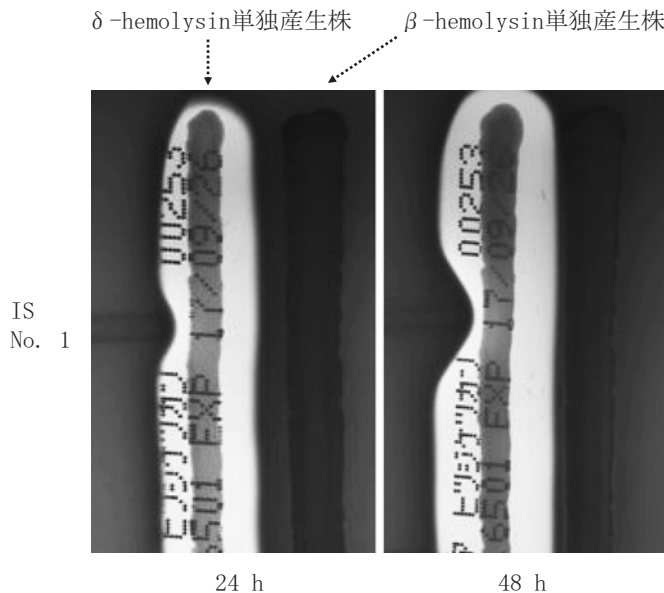


図 5.  $\beta$ -hemolysin 存在下における溶血阻害試験例として、IS No. 1 の結果を示す。24 時間培養後には溶血阻害が明瞭に認められた。

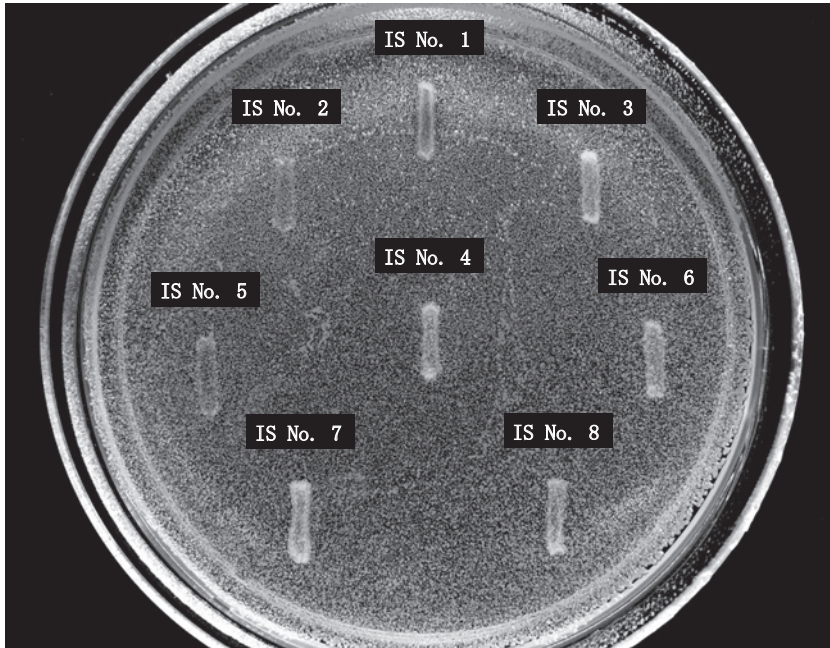


図6. ISのEnterocin産生スクリーニング  
IS No. 1～8の全てにおいて、発育阻止円は認められなかった。

(図5)は、*S. aureus* ATCC 25923に対する溶血阻害(図1)に匹敵した。つまり、ISの溶血阻害が明瞭に認められるかどうかは、対象となる $\delta$ -hemolysin産生株の溶血活性に依存しており、*S. aureus* ATCC 25923と $\delta$ -hemolysin単独産生株を比較した時、*S. aureus* ATCC 25923は自らが産生する $\beta$ -hemolysinで $\delta$ -hemolysinの溶血活性を増強させ、ヒツジ血液寒天培地であっても辺縁までクリアな溶血環を形成したためISの溶血阻害が明瞭となり(図1)、 $\delta$ -hemolysin単独産生株は $\delta$ -hemolysinのみで辺縁までクリアな溶血環を形成することができず、ISの溶血阻害が不明瞭になったと考えられる(図3)。一方、ISの溶血阻害機構に関しては、Enterocin産生スクリーニングの結果(図6)から、抗菌作用に伴う $\delta$ -hemolysinの量的減少ではないと考えられた。また、この結果は、ISの溶血阻害機構が $\delta$ -hemolysinに対する直接阻害あるいは $\delta$ -hemolysinの産生阻害であることを示唆している。今後、その点を踏まえ、*S. aureus*感染症の予防や治療の進展に寄与するためにも、ISの溶血阻害物質および溶血阻害機構を明らかにすることが課題である。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

## 文 献

- 1) Christie, R, N. E. Atkins, E. Munch-Petersen. 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22: 197-200.
- 2) Smyth, C. J., R. Möllby, T. Wadström. 1975. Phenomenon of hot-cold hemolysis: chelator-induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. *Infect. Immun.* 12: 1104-1111.
- 3) Möllby, R., T. Wadström. 1971. Separation of gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* Smith 5R. *Infect. Immun.* 3: 633-635.
- 4) Traber, K. E., E. Lee, S. Benson, et al. 2008. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154: 2265-2274.
- 5) Elek, S. D., E. Levy. 1950. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.* 62: 541-554.
- 6) Ogaki, M. B., K. R. Rocha, M. R. Terra, et al. 2016. Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in *Enterococcus Species*. *J. Mi-*

- crobiol. Biotechnol. 26: 1026-1034.
- 7) HARRIS, L. J., M. A. DAESCHEL, M. E. STILES, et al. 1989. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 52: 384-387.
- 8) Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.
- 9) Fitton, J. E., A. Dell, W. V. Shaw. 1980. The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. FEBS. Lett. 115: 209-212.
- 10) Kreger, A. S., K. S. Kim, F. Zaboretzky, et al. 1971. Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. Infect. Immun. 3: 449-465.
- 11) Nakamura, Y., J. Oscherwitz, K.B. Cease, et al. 2013. *Staphylococcus*  $\delta$ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. Nature 503: 397-401.
- 12) Vitkova, A., M Votava. 2005. Inhibition of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolysin by an exosubstance produced by some *Enterococcus faecalis* strains. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 54: 11-5.

## Hemolysis inhibition of *Enterococcus faecalis* against *Staphylococcus aureus*

Atsushi Kasai, Shiryu Takemura

Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Sendai Nishitaga Hospital

Clinical isolates of *Enterococcus faecalis* that were used as a negative control in a CAMP test inhibited  $\beta$ -hemolysis by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *S. aureus* produces  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hemolysin.  $\beta$ -hemolysin does not cause  $\beta$ -hemolysis at 37°C and  $\gamma$ -hemolysin is inhibited by agar, so  $\beta$ -hemolysis by *S. aureus* ATCC 25923 is presumably caused by  $\alpha$ - or  $\delta$ -hemolysin. Based on the results of phenotypic discrimination, a strain of *S. aureus* producing  $\alpha$ -hemolysin alone and a strain producing  $\delta$ -hemolysin alone were collected, and a hemolysis inhibition test was conducted with 8 strains of *E. faecalis* that inhibit  $\beta$ -hemolysis by *S. aureus* ATCC 25923. Results indicated that all 8 strains inhibited hemolysis by  $\delta$ -hemolysin. Some *E. faecalis* strains produce enterocin, which has antimicrobial action. A look at the enterocin activity of the 8 *E. faecalis* strains revealed that they had no antimicrobial action against the *S. aureus* strain producing  $\delta$ -hemolysin alone. Therefore, this study has indicated that the mechanism by which *E. faecalis* inhibits hemolysis does not involve a quantitative decrease in  $\delta$ -hemolysin due to antimicrobial action.