

## *Enterococcus faecalis* その他の D 群連鎖球菌の分離材料別溶血性、 プロテアーゼ活性および各種抗菌剤感受性の比較

小林 寅詰・宮崎 修一・西田 実・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

手塚 孝一・草野 朱美・佐藤 弓枝・鈴木 美幸・高橋かおる

バイオス臨床検査センター

(昭和 61 年 8 月 11 日受付)

D 群連鎖球菌の病原性に関する因子の検索を目的として、臨床材料からの分離株と健常者糞便由来株の各菌種の分離状況を検討した。また各検査材料より分離された *E. faecalis* および *E. faecium* の溶血性およびプロテアーゼ活性の陽性率、さらにこれらの菌種の薬剤感受性を材料別に比較した。

血液および尿などの病原材料由来株は、その大部分が *E. faecalis* および *E. faecium* で、健常者の糞便由来からはこれら菌種以外に多くの菌種が認められた。

*E. faecalis* では血液、尿、胆汁などの病原材料由来株の溶血性を示す株は糞便由来の株に比較して高率であった。またプロテアーゼ活性についても同様に血液、尿および胆汁由来株は糞便由来株よりも陽性株が多く存在した。病原材料由来株では糞便由来株に比べ両活性共に陽性の株が高率に認められた。

*E. faecium* では、多数の菌株の検討が可能であった尿および糞便由来株を比較すると、前者の株の方に溶血性およびプロテアーゼ活性ともに陽性を示す株がより高率に認められた。

薬剤感受性においては *E. faecalis* の場合糞便由来株は血液および尿由来株に比べ、試験したすべての薬剤に感受性の株が多く認められた。また *E. faecium* でも糞便由来株は尿および胆汁由来株よりもより感受性であった。

*Enterococcus faecalis* を含む D 群連鎖球菌は、ヒトの正常腸内菌叢を構成する常在菌で一般に非病原性とみなされてきた。近年、この種の細菌が尿路感染症に複数菌感染に関与して分離されることが報告されてきた<sup>1-6)</sup>。

また高齢者または compromised host における敗血症例から分離され、本菌種の病原性が問題視されるようになった。この菌種の病原性については今日までそれほど多くの検討はなく、その実体は十分に明らかにされていない。

我々は一般にグラム陽性菌の病原性に関するかと推定される溶血性およびプロテアーゼ活性を分離材料別および菌種別に検討し、さらにこれらの菌種の代表的な抗菌剤、4 種に対する感受性を測定し、興味ある知見を得た。

### I. 実験材料および実験方法

#### 1. 試験菌株

1985 年～1986 年に、国内の各医療施設において健康人正常糞便および感染症が疑われる患者の血液、尿、胆汁中より分離され、当教室保存中の *E. faecalis* 306 株お

よび、*E. faecium* 152 株を含む D 群連鎖球菌を試験菌として用いた。

また、血液由来株については、東京都老人医療センターで分離され、分与頂いた *E. faecalis* 23 株を試験菌として用いた。

#### 2. 使用抗菌剤

Penicillin G (PCG 萬有製薬)  
Ampicillin (ABPC 明治製薬)  
Cefazolin (CEZ 藤沢薬品)  
Cefotaxime (CTX ヘキスト)  
Gentamicin (GM 塩野義製薬)  
Amikacin (AMK 萬有製薬)  
Erythromycin (EM 塩野義製薬)  
Minocycline (MINO 日本レダリー)

以上、8 薬剤を用いた。

#### 3. 薬剤感受性測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は、化学療法学会標準法で測定した。各菌株は、Mueller Hinton broth (Difco) にて 35°C で一夜培養し、各薬剤ごとにその希釈系列濃度

を含む Mueller Hinton medium (Difco) に、 $10^6$  CFU/ml の菌液を 1 スポット接種し、 $35^{\circ}\text{C}$ 、18 時間培養後に判定した。

#### 4. 溶血性およびプロテアーゼ活性測定

溶血性は、5% 馬脱繊維血液加寒天培地 (Blood agar base No. 2, Oxoid) に各菌株とも割線接種し、 $35^{\circ}\text{C}$ 、48 時間培養後判定した。

接種した周囲が透明なものを  $\beta$  型、深緑を  $\alpha$  型、周囲が全く変化の認められないものを  $\gamma$  型とした。

プロテアーゼ活性は、5% スキムミルク加 Nutrient agar (Difco) を用い、各菌株それぞれ画線接種し、 $35^{\circ}\text{C}$ 、48 時間～2 週間培養を行ない、透明帯や白濁帯を形成するものを陽性とした。

## II. 実験結果

### 1. D 群連鎖球菌の検査材料別分離状況

Table 1 Isolation pattern of D group streptococci from different specimens in human (%)

Specimens	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. durans</i>	<i>S. bovis</i>
Blood ( 27)	92.6 ( 25)	7.4 ( 2)	0 ( 0)	0 (0)	0 (0)
Urine (700)	80.0 (560)	19.0 (133)	1.0 ( 7)	0 (0)	0 (0)
Bile ( 12)	16.7 ( 2)	58.3 ( 7)	25.0 ( 3)	0 (0)	0 (0)
Feces (280)*	28.2 ( 79)	31.1 ( 87)	36.1 (101)	1.8 (5)	0.7 (2)

( ): Number of strains.

\*: 6 strains are other DGS.

血液、尿、胆汁などの臨床材料および健常者の糞便より分離された D 群連鎖球菌の分離状況を Table 1 に示した。血液 (27 株)、尿 (700 株) からそれぞれ 92.6% および 80% が *E. faecalis* で、*E. faecium* は 7.4% および 19% と両病原材料由来株はほとんど上記 2 菌種であった。胆汁由来の 12 株では上記の菌種が 75% を占め、これに加えて *E. avium* が 25% 検出された。

一方、健常者糞便由来株 (280 株) は、*E. faecalis*、*E. faecium* および *E. avium* が各々 28.2%、31.1%、36.1% となり、これ以外に病原材料からは検出されなかった少数の *E. durans*、*S. bovis* および同定不能なその他の D 群連鎖球菌が認められた。

少なくとも血液および尿からの分離菌種のパターンは、健常者の糞便のそれとはかなりの相違が認められた。

Table 2 Haemolytic and protease activities of *E. faecalis* from different specimens

#### a) Haemolytic activity (%)

Specimens	Type of haemolysis		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Blood ( 25)	0	24	76
Urine (200)	2	25	73
Bile ( 2)	0	50	50
Feces ( 79)	10	14	76

( ): Number of strains.

Medium: Blood agar base No. 2 supplemented with 5% horse blood.

Incubation:  $35^{\circ}\text{C}$ , 48hr.

#### b) Protease activity (%)

Specimens	Protease activity	
	Positive	Negative
Blood ( 25)	96	4
Urine (200)	88	12
Bile ( 2)	100	0
Feces ( 79)	82	18

( ): Number of strains.

Medium: Nutrient agar supplemented with 5% skim milk.

Incubation:  $35^{\circ}\text{C}$ , 2weeks.

2. *E. faecalis* の溶血性およびプロテアーゼ活性

次に上記の各種材料由来の *E. faecalis* の溶血性およびプロテアーゼ活性の有無について検討した。

まず溶血性では、Table 2-a) に示すとおり、血液、尿および胆汁などの病原材料由来株ではβ溶血を示す菌株がそれぞれ 24%、25% および 50% 存在し、糞便由来株の 14% に対し、高率であることが認められた。この成績から病原材料由来株と溶血性との間にある程度の関連性が推測された。

次にプロテアーゼ活性の陽性率では血液および胆汁由来株がそれぞれ 96% および 100% 陽性で、尿由来株では 88%、糞便由来株では 82% と、前二者が比較的高率で糞便由来株が最も低率であった [Table 2-b)]。

溶血性およびプロテアーゼ活性がともに陽性の菌株の比率を比較したところ (Table 3)、この種の菌株は胆汁由来株で 50% と高率で、血液および尿由来株ではそれ

ぞれ 20% および 19% で、糞便由来株の 10% と比較すると約 2 倍高率であった。

3. *E. faecium* の溶血性およびプロテアーゼ活性

*E. faecium* について同様な比較検討を行なった。本菌株の場合、*E. faecalis* とは全く異なった溶血性を示した。すなわち分離材料とは無関係に大部分の菌株はγ溶血を示した。ただ尿由来株の 14%、糞便由来株の 10% がα溶血を示したが両群間にそれほど顕著な差異はみられなかった。またβ溶血を示す株は尿由来株のみに 4% みられ他由来では全く認められなかった。血液由来株は 2 株のみのため溶血性の傾向は判断できなかった [Table 4-a)]。

またプロテアーゼ活性は血液由来 2 株とも陽性であり、尿および糞便由来株では 94~96% でいずれの間にも大差は認められなかった [Table 4-b)]。

ただ Table 5 に示すとおり溶血性およびプロテアー

Table 3 Isolation percent of *E. faecalis* strains having both haemolytic and protease activities

Specimens	Haemolytic and protease activities	
	both positive	both negative
Blood ( 25)	20	0
Urine (200)	19	6
Bile ( 2)	50	0
Feces ( 79)	9	6

( ) : Number of strains.

Table 5 Isolation percent of *E. faecium* strains having both haemolytic and protease activities

Specimens	Haemolytic and protease activities	
	both positive	both negative
Blood ( 2)	0	0
Urine (70)	16	1
Bile (10)	0	0
Feces (70)	6	1

( ) : Number of strains.

Table 4 Haemolytic and protease activities of *E. faecium* from different specimens

a) Haemolytic activity (%)

Specimens	Type of haemolysis		
	α	β	γ
Blood ( 2)	0	0	100
Urine (70)	14	4	82
Bile (10)	0	0	100
Feces (70)	10	0	90

( ) : Number of strains.

Medium : Blood agar base No. 2 supplemented with 5% horse blood.

Incubation : 35 °C, 48hr.

b) Protease activity (%)

Specimens	Protease activity	
	Positive	Negative
Blood ( 2)	100	0
Urine (70)	96	4
Bile (10)	90	10
Feces (70)	94	6

( ) : Number of strains.

Medium : Nutrient agar supplemented with 5% skim milk.

Incubation : 35 °C, 2 weeks.

Fig. 1 Antibiotic susceptibility of *E. faecalis* from different specimens

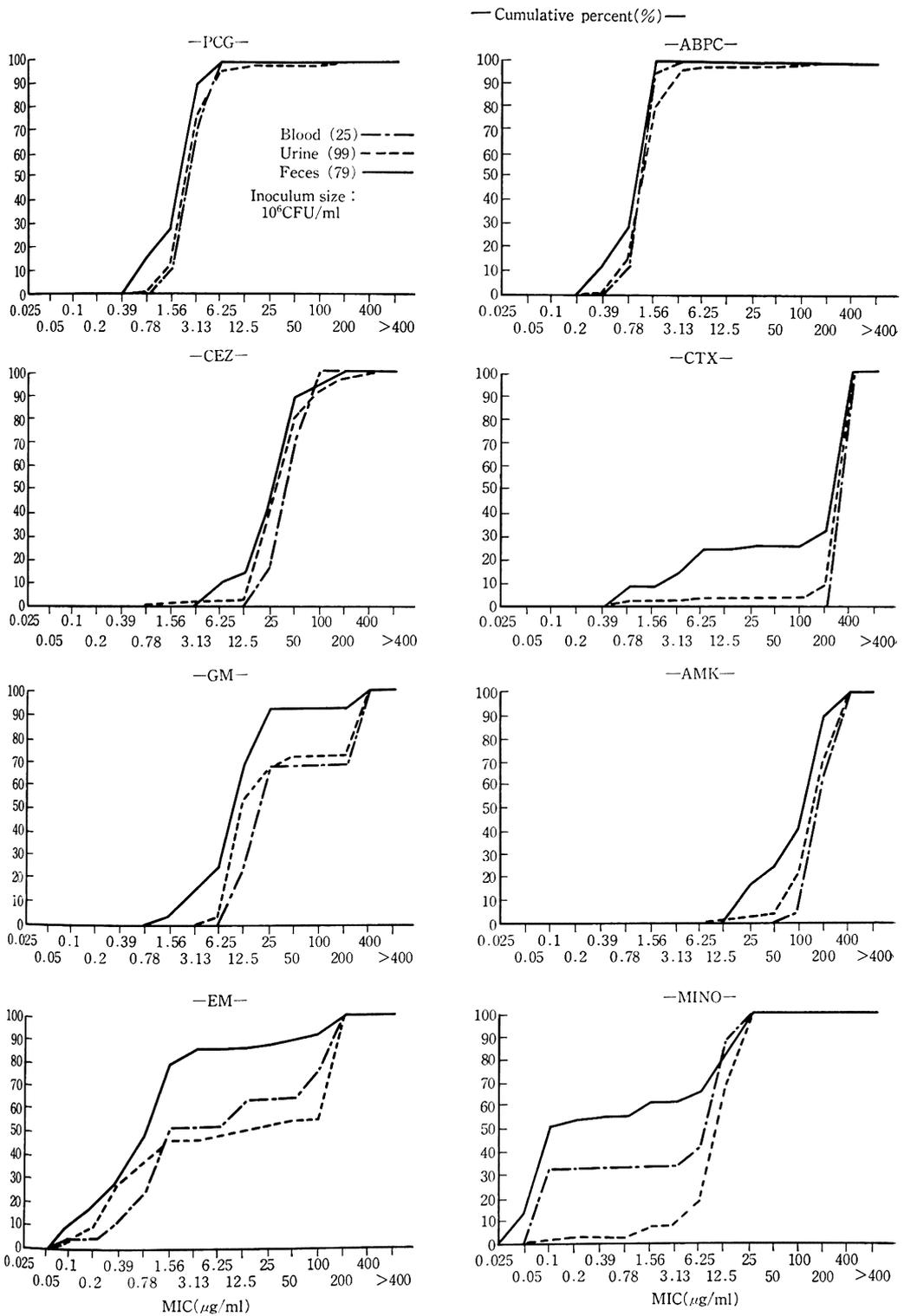
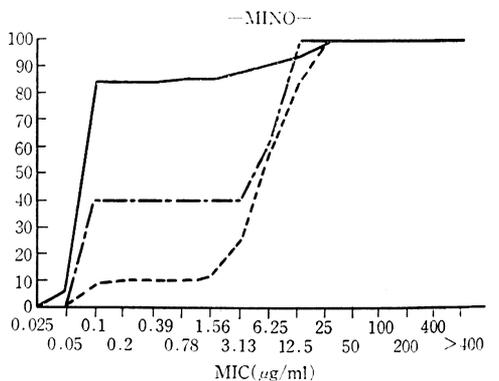
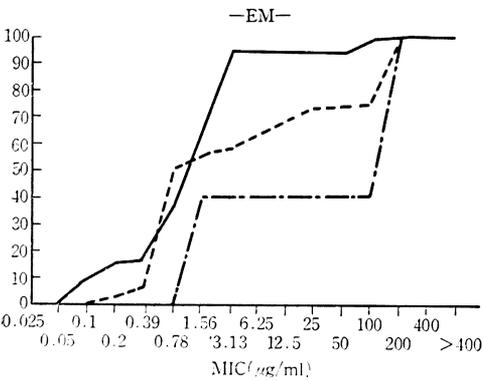
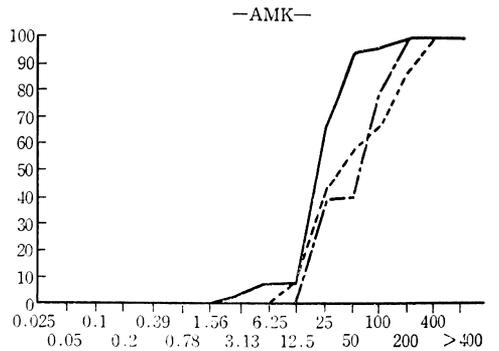
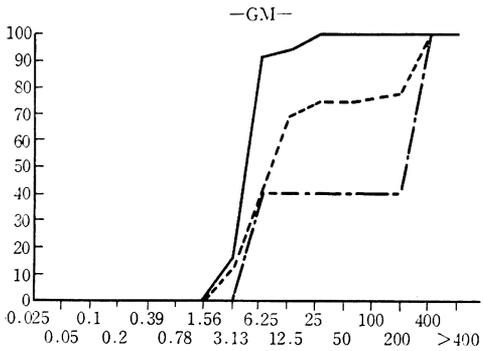
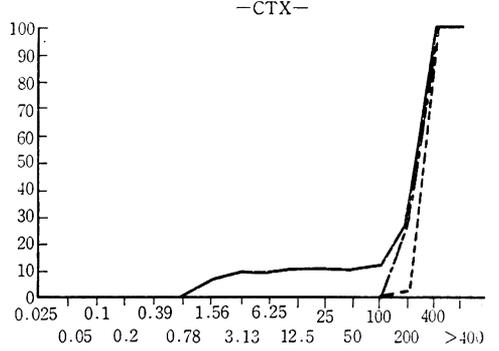
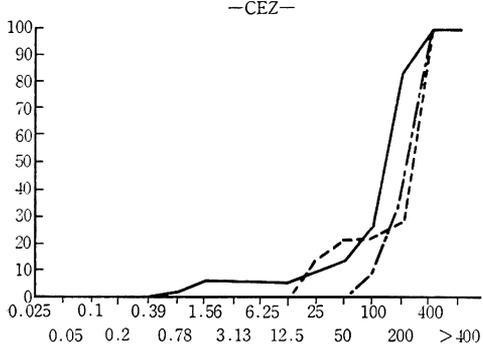
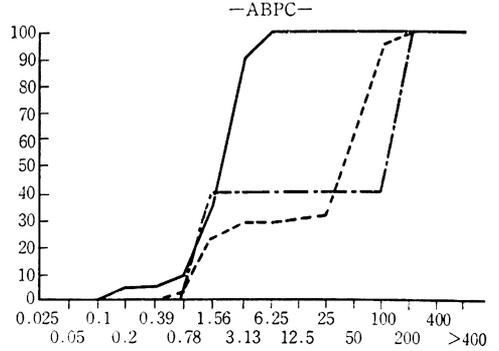
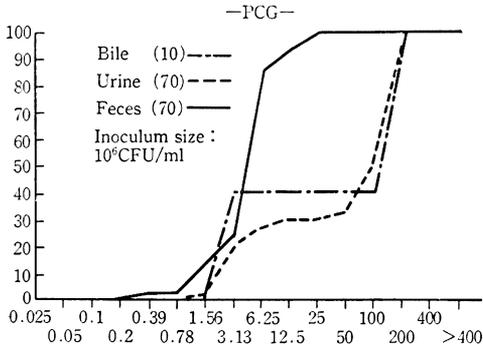


Fig. 2 Antibiotic susceptibility of *E. faecium* from different specimens

— Cumulative percent (%) —



活性がともに陽性の菌株は尿由来株で 16%、糞由来株では 6% と低率ながら一応の差異が認められた。

#### 4. 薬剤感受性

$\beta$ -ラクタム剤から *E. faecalis* に高い感受性を示す PCG, ABPC, 中等度耐性の CEZ, 高度耐性の CTX, アミノ配糖体として GM, AMK, マクロライドおよびテトラサイクリン系として EM および MINO を用いた。Fig. 1 に示すとおり、PCG および ABPC は全般に由来株に高い感受性を示し、その中でも糞由来株が若干感性側に分布したが特別な差異は認められなかった。CEZ では中等度感受性ながら、糞由来株に比べ、血液由来株ではやや耐性側に分布する傾向がみられた。また CTX では血液および尿由来株に比較して糞由来株は感受性を示す菌株が明らかに多かった。

GM および AMK においても同様な傾向が認められ、特に GM の MIC<sub>90</sub> では著明な差が認められた。さらに EM および MINO においても糞便と他の材料とは明らかに糞由来株が感受性を示した。

次に *E. faecium* について糞便、尿および胆汁由来株について上記 8 薬剤に対する感受性を比較した (Fig. 2)。*E. faecium* の場合、PCG および ABPC に対する感受性は材料別で大きな相違が認められ、糞由来株は感受性株で大部分を占め、尿および胆汁由来株では耐性傾向が認められた。PCG および ABPC ほど著明ではないが CEZ においてもある程度、糞由来株では感受性側に分布した。CTX には全般に耐性を示したが一部の糞由来株には感受性を示す菌株が認められた。GM および AMK についても PCG, ABPC に類似した傾向が認められたが GM に比べ AMK に対する感受性の差が少なかった。EM および MINO に対しても糞由来株は尿および胆汁由来株に比較して明らかに感受性を示すものが多数存在した。

### III. 考 察

D 群連鎖球菌が病原性をもつかどうか、この病原因子の本質は何かという問題の解明は興味ある問題であるが、本菌種がヒトの腸内フローラを構成し、常在菌である事実から明確な結論を導くことは容易ではない。しかし、わが国における臨床症例からの分離報告とともに<sup>6)</sup>、諸外国でも D 群連鎖球菌の臨床材料よりの分離についての報告が珍しくない。近年、P. E. COUDON ら<sup>7)</sup> は基礎疾患をもった未熟児における *E. faecium* に原因する敗血症および髄膜炎の発生例を報告している。また R. R. FACKLAM<sup>8)</sup> は、臨床材料よりの総計 262 株の D 群連鎖球菌を分析し、血液培養より 142 株が得られ、そのうち 96 株は亜急性細菌性心内膜炎の症例から分離されている。これらの D 群連鎖球菌のうち 171 株は *E. fae-*

*calis*, *E. faecium* が 27 株と両菌種が大部分を占めている。

我々の実験結果においても、健常者の糞便からは *E. faecalis* および *E. faecium* 以外に各種の菌種が分離されたが、血液および尿など臨床材料より分離される菌種は *E. faecalis* および *E. faecium* のみに限られた。この事実は両菌種がこれらの感染巣へより高い侵襲性をもち、病原因子を保有する可能性を示唆すると考えられる。一方、胆汁由来株では両菌種に加えて *E. avium* が高率に検出され、糞由来菌の分布と類似した検出傾向を示しているが腸管に存在する主要菌種の胆道系への侵襲を反映するものではないと思われる。

今回の実験成績によれば、傾向として血液、尿および胆汁より得られた臨床材料由来株では糞由来株よりも  $\beta$  溶血性を示す菌株が多くみられた。これに関しては *E. faecalis* には  $\beta$ -haemolysin を産生する菌株があり、この種の菌株は同時に bacteriocin を産生し両者は同じ遺伝子決定因子によって調節されていることが知られている。この種の菌株が一般にマウスに病原性をもつことが報告されている<sup>9)</sup>。G. M. DUNNY ら<sup>10)</sup> は、*E. faecalis* DS-5 株が 3 種の plasmid をもち、そのうち pAM $\gamma$ 1 は  $\beta$ -haemolysin と 2 種の bacteriocin 活性をコードすることを認めている。この plasmid は接合伝達により、他の菌株に移ることを明らかにしている。彼らは St. Joseph's Mercy 病院よりの臨床分離の 50 株のうち、25% は牛血液に対して溶血性を示すことを報告している。

我々の成績ではプロテアーゼ活性も血液、胆汁由来株では、ある程度陽性株が多いことを認めている。ただこのような各要因がそれぞれ単独で決定的な病原因子であると考えるよりも、Table 3 の成績から明らかとなり、溶血性、プロテアーゼ活性などその他未確認の複数因子が総合的に *E. faecalis* の病原性に関与する可能性が考えられ、今後その方向の検討の必要が考えられる。

一方、*E. faecium* では臨床材料由来株のうち菌株数の少ない血液、胆汁を除き尿由来株と糞由来株を比較すると、 $\alpha$ ,  $\beta$  両溶血性を示すものが臨床材料株では 18%、糞由来株では 10% と両者間である程度の相違を示している。またプロテアーゼ活性を加味して両活性が陽性のものは尿由来株で 16%、糞由来株で 6% となり、*E. faecium* の場合も複合的な要因が関与する可能性を示唆する成績を得た。

次に *E. faecalis* および *E. faecium* と一部の例外を除き、臨床材料由来株と糞由来株の間に  $\beta$ -ラクタム剤、アミノ配糖体系などに対する感受性に相違がみられることは興味のある問題である。この原因として病巣よりの菌株の採取に先行して、 $\beta$ -ラクタム剤などの抗菌剤

の投与が行なわれ、これらの薬剤に感受性菌が選択され、比較的耐性株が残存することも考えられる。また *E. faecalis* には R-plasmid 由来の耐性があり<sup>11,12)</sup>、臨床材料由来株にはこの種の耐性機構の関与も考える必要があろう。

#### 文 献

- 1) 熊本悦明：尿路感染症における複数菌感染。臨床と細菌 8：141～150, 1981
- 2) 蟹本雄右, 河田幸道：尿路感染症の治療。臨床と細菌 7：49～56, 1980
- 3) 金子裕憲, 北原 研, 富永登志, 岸 洋一, 新島端夫, 岸本幸子：*Streptococcus faecalis* の分離された尿路感染症の臨床的検討。Chemotherapy 32：685～691, 1984
- 4) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 佐々木宗男, 畠山 勤, 上条仁子, 稲松孝思, 浦山京子, 岡慎一：腸球菌敗血症に関する研究 第一報 血液培養から分離された腸球菌 49 株の Speciation と薬剤感受性。Chemotherapy 32：435～437, 1984
- 5) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 上条仁子, 佐々木宗男, 畠山 勤, 稲松孝思, 浦山京子, 岡慎一：Ampicillin 耐性腸球菌の分離状況と薬剤感受性。Chemotherapy 32：507～510, 1984
- 6) 紺野昌俊, 野々口律子, 後藤 朗, 生方公子, 川上小夜子：血液培養から検出される細菌の動向について。感染症学会雑誌 58：99～111, 1984
- 7) COUDON, P. E.; C. G. MAYHALL, R. R. FACKLAM, A. C. SPADORA, V. A. LAM, M. R. LYBRAND & H. P. DALTON：*Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. 20：1044～1048, 1984
- 8) FACKLAM, R. R.: Recongnition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. Appl. Microbiol. 23：1131～1139, 1972
- 9) 吉川昌之介編：細菌の病原性—その分子遺伝学。184～188 頁, 丸善, 1984
- 10) DUNNY, G. M. & D. B. CLEWELL：Transmissible toxin (hemolysin) plasmid in *Streptococcus faecalis* and its mobilization of noninfectious drug resistance plasmid. J. Bacteriol. 124：784～790, 1975
- 11) SCHABERG, D. R.; D. B. CLEWELL & L. GLATZER：Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents & Chemother. 22：204～207, 1982
- 12) CALDERWOOD, S. B.; C. WENNERSTEN & R. C. MOELLER, JR.: Resistance to antibiotic synergism in *Streptococcus faecalis*: further studies with amikacin and with a new amikacin derivative, 4'-deoxy, 6'-N-methylamkacin. Antimicrob. Agents. & Chemother. 19：569～555, 1981

HAEMOLYTIC AND PROTEASE ACTIVITIES AND DRUG  
SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*  
AND OTHER D GROUP STREPTOCOCCI FROM  
CLINICAL SPECIMENS AND NORMAL  
INTESTINAL FLORA

INTETSU KOBAYASHI, SHUICHI MIYAZAKI, MINORU NISHIDA  
and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine Toho University

KOICHI TEZUKA, AKEMI KUSANO, YUMIE SATO,  
MIYUKI SUZUKI and KAORU TAKAHASHI  
Bios Clinical Research Laboratories

The haemolytic and protease activities of *E. faecalis* and *E. faecium* in the blood, urine and bile of patients were compared with those of the same organisms in the feces of healthy volunteers. The drug susceptibility of the two groups of isolates were also compared.

Strains of *E. faecalis* and *E. faecium* were mainly present in clinical specimens of blood and urine and a wide range of species of D group *Streptococcus* were present in the feces. The frequency of the strains of *E. faecalis* with haemolytic activity was higher in the clinical specimens (blood, urine and bile) than in the fecal specimens. And this was also the case with protease activity. The frequency of strains with both activities was also higher in the clinical specimens than in the fecal specimens. This was also true of *E. faecium*.

The fecal isolates, regardless of haemolytic or protease activity, were significantly more susceptible to various antibiotics than were these isolates from the blood and urine.