

ヒト正常腸内フローラよりの *Enterococcus faecalis* の 薬剤感受性と溶血性、プロテアーゼ活性の関係について

小林 實詔・宮崎 修一・西田 実・五島遊智子

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
森 節子・鈴木 美幸・高橋 かおる

バイオス臨床検査センター化学療法研究室

(昭和 62 年 1 月 14 日受付)

健康正常者の糞便中の *Enterococcus faecalis* は Cefotaxime, Gentamicin, Erythromycin および Minocycline に比較的感性的な菌株と高度耐性株が存在する。これらの各薬剤に耐性の菌株は、感性株に比較して全般に β -溶血型を示す菌株が多かった。また、これらの耐性株のうち、Cefotaxime および Erythromycin 耐性株では感性株に比較してプロテアーゼ活性が陽性の菌株がやや多かった。Gentamicin および Minocycline 耐性株と感性株にはこのような傾向はみられなかった。さらに、これらの 4 薬剤に耐性株では、感性株より β -溶血型およびプロテアーゼ活性が共に陽性を示す株が多かった。

前報で我々は *E. faecalis* を含む D 群連鎖球菌は、各菌種の分離頻度が臨床材料によって異なり、さらに病原性に関与すると考えられる溶血性およびプロテアーゼ活性の陽性率が菌株の由来および菌種によって異なることを報告した¹⁾。特に正常フローラを構成している糞便由来株では溶血性、プロテアーゼ活性が陽性を示す菌株の割合は他の臨床材料由来株と比べて低く、また特定の薬剤に対し高い感受性を示す傾向が認められた。

今回は糞便由来株を特定の薬剤に対する感受性から耐性株と感性株に分け、それらの溶血性およびプロテアーゼ活性との関連について検討した。

I. 実験材料および方法

1. 試験菌株

1986 年度に健康人正常糞便より分離され、当教室保存中の *E. faecalis* 79 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)
Cefotaxime (CTX, ヘキスト)
Gentamicin (GM, 塩野義製薬)
Erythromycin (EM, 塩野義製薬)
Minocycline (MINO, 日本レダリー)

3. 薬剤感受性測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法で測定した。すなわち、各菌株は Mueller Hinton broth

(Difco) にて 35°C で一夜培養し、各薬剤の希釈系列濃度をそれぞれ含む Mueller Hinton medium (Difco) に 10^6 CFU/ml の菌液を接種し、35°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

既報に従って測定を行なった。すなわち溶血性は 5% 馬脱纖維血液加寒天培地 (Blood Agar base No. 2: OXOID) に各菌株を割線接種し、35°C, 18 時間培養後に判定した。接種した周囲が透明なものを β -溶血型、深緑色を呈するものを α -溶血型、周囲が全く変化の認められないものを γ -溶血型とした。

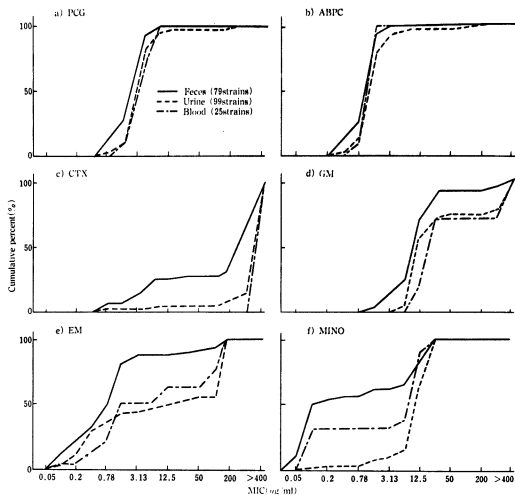
プロテアーゼ活性は 5% スキムミルク加 Nutrient agar (Difco) を用い、各菌株をそれぞれ線接種し、35°C, 48 時間から 2 週間培養し、透明帯や白濁帯を形成した場合を陽性とした。

II. 実験結果

1. 正常健康人糞便由来 *E. faecalis* の薬剤感受性

糞便由来 *E. faecalis* の 6 薬剤に対する感受性を、他の臨床材料由来株と比較した結果を Fig. 1 に示した。

PCG, ABPC 両薬剤においては他の臨床材料由来株と同様に MIC₅₀ が約 1.56 μ g/ml, MIC₉₀ が約 3.13 μ g/ml とほとんどの菌株が感性を示した。しかし CTX では血液、尿由来のほとんどの菌株の MIC が 400 μ g/ml 以上と高度耐性であったが、糞便由来株では約 30% に感性の菌株が認められた。アミノ配糖体系の GM では

Fig. 1 Antibiotic susceptibilities of *E. faecalis* from different specimens in human

糞便由来株の MIC_{50} が約 6.25 $\mu\text{g/ml}$ に比べ血液、尿由来株で 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上となり、CTX の場合と同様に血液、尿由来株では耐性株の検出頻度が高かった。マクロライド系の EM においても、臨床材料由来株に比べて糞便由来株では多くの感性株が認められた。さらにテトラサイクリン系の MINO でも糞便由来株の MIC_{50} が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下に比べ臨床材料由来株では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上となり、この薬剤についても両群間に感受性分布の差異が認められた。

2. 糞便由来株の薬剤感受性と溶血性およびプロテアーゼ活性との関連

糞便由来 *E. faecalis* について、CTX 耐性株 ($\text{MIC} : \geq 200 \mu\text{g/ml}$) と感性株 ($\text{MIC} : \leq 25 \mu\text{g/ml}$) に分類し、それぞれの溶血性とプロテアーゼ活性を Table 1 に示した。

Table 1-a) の溶血性では耐性株の 19% が β -溶血型を示したが、感性株では β -溶血型を示すものはなかった。 α -溶血型を示す株は感性株で 35% と多く、耐性株では 2% のみであった。 γ -溶血型については、耐性株、感性株間にほとんど差が認められなかった。Table 1-b) のプロテアーゼ活性については、耐性株が 88% 陽性を示したが、感性株では 65% とやや低い結果となった。さらに、これらの菌株で、溶血性およびプロテアーゼ活性が共に陽性の菌株は耐性株で 12% 認められたが、感性株においては全く存在しなかった。反対に共に陰性の菌株は感性株で 35% と耐性株の 5% に比べ明らかに高率であった (Table 2)。

GM の MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性株、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下を感性株とした場合、Table 3-a) に示すように耐性株に β -溶血型を示す菌株が 25%、感性株では 9% と

CTX 同様耐性株の方が高率となった。また α -溶血型を示す菌株は耐性株 24 株中には全く認められず、感性株に 15% 認められた。すなわち β -溶血型とは全く逆の傾向となった。一方、プロテアーゼ活性との関連については、耐性株および感性株間で共に陽性率は 82~83% と差がみられなかった (Table 3-b)。

Table 1-a) Cefotaxime susceptibility and haemolytic activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Type of haemolysis		
	α	β	γ
Resistant (59)	2	19	69
Sensitive (20)	35	0	65

Resistant: MIC \geq 200 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 25 μ g/ml

(): Number of strains

Table 1-b) Cefotaxime susceptibility and protease activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Protease activities	
	Positive	Negative
Resistant (59)	88	12
Sensitive (20)	65	35

Resistant: MIC \geq 200 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 25 μ g/ml

(): Number of strains

Table 2 Haemolytic and protease activities of cefotaxime resistant and sensitive strains of *E. faecalis* (%)

Strains	Haemolytic and protease activities	
	Both positive	Both negative
Resistant (59)	12	5
Sensitive (20)	0	35

Resistant: MIC \geq 200 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 25 μ g/ml

(): Number of strains

溶血性、プロテアーゼ活性両性状と GM に対する薬剤感受性について Table 4 に示した。両性状共に陽性の菌株は耐性株で 12% と感性株よりやや多く認められた。両性状が共に陰性の菌株は耐性株に 4% と極めて低かったが感性株では 16% 検出された。

次に EM についての結果を示した (Table 5)。この薬剤についても β -溶血型を示す菌株の出現頻度は耐性株で 36% と高く、感性株には 13% となった。 α -溶血型を示す株では耐性株には全く認められなかったが感性株では 16% 認められた。

プロテアーゼ活性が陽性を示す菌株は耐性株で 91% と非常に高率で、陰性の株は 11 株中 1 株 (9%) のみであった。また感性株では陽性率が 79% と耐性株よりやや低く、一方、陰性の株は 21% とやや高い値を示した。

EM に対する感受性と溶血性およびプロテアーゼ活性の関係については Table 6 のとおり、溶血性およびプロテアーゼ活性が共に陽性の菌株は耐性株に 27% と感性株の 5% と比較して高い結果が得られた。それに対して

Table 3-a) Gentamicin susceptibility and haemolytic activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Type of haemolysis		
	α	β	γ
Resistant (24)	0	25	75
Sensitive (55)	15	9	76

Resistant: MIC \geq 25 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 12.5 μ g/ml

(): Number of strains

Table 3-b) Gentamicin susceptibility and protease activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Protease activities	
	Positive	Negative
Resistant (24)	83	17
Sensitive (55)	82	18

Resistant: MIC \geq 25 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 12.5 μ g/ml

(): Number of strains

両活性が共に陰性の菌株は、感性株に 13% 認められたが耐性株では全く検出されなかった。

MINO についても同様な検討を行なった。Table 7-a) の溶血性について耐性株 (MIC: $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$) の 28 株中 β -溶血型を示す菌株は 32% となり、 α -溶血型の菌株は全く認められなかった。しかし感性株 (MIC: ≤ 0.78

$\mu\text{g/ml}$) については 43 株中 β -溶血型は極めて低く (2%), α -溶血型は耐性株の 0% に比べ 14% と明らかな差異があった。

しかし Table 7-b) に示したプロテアーゼ活性については、CTX および EM の場合とは逆に感性株の 88% に比べ耐性株では 75% と低い値を示した。溶血性およ

Table 4 Haemolytic and protease activities of gentamicin resistant and sensitive strains of *E. faecalis* (%)

Strains	Haemolytic and protease activities	
	Both positive	Both negative
Resistant (24)	12	4
Sensitive (55)	7	16

Resistant: MIC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 6 Haemolytic and protease activities of erythromycin resistant and sensitive strains of *E. faecalis* (%)

Strains	Haemolytic and protease activities	
	Both positive	Both negative
Resistant (11)	27	0
Sensitive (38)	5	13

Resistant: MIC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 5-a) Erythromycin susceptibility and haemolytic activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Type of haemolysis		
	α	β	γ
Resistant (11)	0	36	64
Sensitive (38)	16	13	71

Resistant: MIC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 7-a) Minocycline susceptibility and haemolytic activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Type of haemolysis		
	α	β	γ
Resistant (28)	0	32	68
Sensitive (43)	14	2	84

Resistant: MIC $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 5-b) Erythromycin susceptibility and protease activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Protease activities	
	Positive	Negative
Resistant (11)	91	9
Sensitive (38)	79	21

Resistant: MIC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 7-b) Minocycline susceptibility and protease activities of *E. faecalis* from human feces (%)

Strains	Protease activities	
	Positive	Negative
Resistant (28)	75	25
Sensitive (43)	88	12

Resistant: MIC $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$

Sensitive: MIC $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$

(): Number of strains

Table 8 Haemolytic and protease activities of minocycline resistant and sensitive strains of *E. faecalis* (%)

Strains	Haemolytic and protease activities	
	Both positive	Both negative
Resistant (28)	18	11
Sensitive (43)	2	12

Resistant: MIC \geq 12.5 μ g/ml

Sensitive: MIC \leq 0.78 μ g/ml

(): Number of strains

びプロテアーゼ活性が共に陽性の菌株は耐性株に18%存在したが、感性株では2%にすぎなかった。共に陰性の性状を示す菌株は耐性株、感性株間で差は認められなかった (Table 8)。

III. 考 察

E. faecalis は他の *Enterococcus* 属の細菌と共に、ヒトの正常腸内フローラを構成する主要な好気性グラム陽性球菌としてよく知られている^{1,2)}。

先に我々は *E. faecalis* を含む *Enterococcus* 属の病原性について検討し、血液、尿および胆汁などの患者由来の臨床材料より分離された *E. faecalis* は、健康人の糞便より分離されたものよりも β -溶血型またはプロテアーゼ活性陽性の菌株が多いことを報告した³⁾。また同様な傾向は *E. faecium* についても観察された⁴⁾。

一方、*Enterococcus* 属による感染は基礎疾患をもった症例、乳児や老人、その他の compromised host に多く⁵⁻¹⁰⁾、それらの起原菌の由来として、腸内フローラを構成している *E. faecalis* の細菌学的性状を検討する必要性を認めた。本報において、ヒトの正常腸内フローラより分離された *E. faecalis* は、第3世代セフェム剤の代表として CTX、および GM などの薬剤、さらに EM および MINO などにそれぞれ感性株と高度耐性株が存在することを認めた。すなわち、腸内の正常フローラより分離された *E. faecalis* は薬剤感受性において多様性を示すことが確認された。さらに各薬剤に耐性の株は感性株と比較して、病原性に関連すると推定される性状； β -溶血型およびプロテアーゼ活性陽性を示すことが認められた。また、このような傾向は腸内フローラより分離された *E. faecium* についても同様に確認されている (小林、他；未発表)。G. M. DUNN¹¹⁾ は、*E. faecalis* DS-5 株が3種の plasmid をもち、そのうち pAM₁ は β -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。 β -haemolysin 産生がこのように plasmid 由来のものであるにしても、我々の確認した CTX, GM, EM, MINO 耐性の遺伝子がこの種の plasmid に由来するという証明は全くない。*E. faecalis* および *E. faecium* におけるこれらの薬剤耐性と β -溶血型およびプロテアーゼ活性の関連を現在のところ説明する根拠をもたないが、今後、検討を加えてみたいと考えている。すなわち、腸内の正常フローラより分離された *E. faecalis* は、上述の通り患者由来の臨床分離株より β -溶血型およびプロテアーゼ活性陽性率が低いものの正常フローラには一部の薬剤耐性株が存在し、それらの菌株では病原性に関与する β -溶血型およびプロテアーゼ活性陽性率が高いことが知られた。また、これらの菌株は、host の感染抵抗性の低下に対応して起原菌として作用し得る可能性を示唆している。正常フローラを構成する常在菌が病原菌となる compromised host の感染は代表的な日和見感染の様式と考えられる。このような場合、感染防御能の低下に伴って病原性のより強い、また抗生剤に耐性の細菌による侵襲が感染の成立に関与するとと思われる。本報では、このような細菌学的側面として *E. faecalis* の性状の一部に検討を加えたもので、引き続き他の性状についても検討を加えて行く予定である。

文 献

- 1) 光岡知足：腸内菌の世界（嫌気性菌の分離と同定）。養文社、東京、1980
- 2) 山口恵三、菅原和行：腸球菌。化学療法領域 1: 570-575, 1985
- 3) 小林寅吉、宮崎修一、西田 実、五島瑛智子、他：Enterococcus faecalis、その他の D 群連鎖球菌の分離材料による溶血性、プロテアーゼ活性および各種抗菌剤に対する感受性の比較。Chemotherapy 34: 1238-1245, 1986
- 4) 小林寅吉、宮崎修一、西田 実、五島瑛智子、他：第33回日本化学療法学会東日本支部総会発表 (秋田市)、1986
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 島田 馨、安達桂子、田中喜久子、佐々木宗男、島山 勲、上条仁子、稲松孝思、浦山京子、岡 眞一：腸球菌敗血症に関する研究 第1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

- 9) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 佐々木宗男, 轟山 勲, 上条仁子, 棚松孝思, 清山京子, 岡 慎一: Ampicillin 耐性属球菌の分離状況と薬剤感受性。Chemotherapy 32: 507~510, 1984
- 10) 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
- 11) 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

HAEMOLYTIC AND PROTEASE ACTIVITIES AND DRUG SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* FROM NORMAL INTESTINAL FLORA IN VOLUNTEERS

INTETSU KOBAYASHI, SHUICHI MIYAZAKI, MINORU NISHIDA
and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine Toho University

KOICHI TEZUKA, AKEMI KUSANO, SETSUKO MORI, YUMIE SATO,
MIYUKI SUZUKI and KAORU TAKAHASHI

Chemotherapy Division, Bios Clinical Research Laboratories

E. faecalis isolated from the feces of healthy volunteers were either sensitive to or highly resistant to cefotaxime, gentamicin, erythromycin and minocycline.

There were more strains with β -haemolytic activity in the resistant group than in the sensitive group, and more strains with protease activity in the cefotaxime- and erythromycin-resistant group than in the cefotaxime- and erythromycin-sensitive group. Such tendency, however, was not seen in the gentamicin- or minocycline-resistant group. Overall, the number of the strain with β -haemolytic and protease activities was greater among the faecalis resistant to all four antibiotics than among those sensitive to all four antibiotics.