原 著

ヒト口腔および鼻腔より分離した黄色ブドウ球菌の性状

野 田 充 宏 山 村 正 次 高 瀬 市 将
浅 井 昭 士 郎 梅 本 利 彦 並 河 勇

朝日大学歯学部口腔細菌学教室（主任：並河 勇教授）

〔受付：平成5年12月24日〕

Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral and nasal cavities of healthy young adults

Mitsuhiro Noda, Masatsugu Yamamura,
Ichio Takase, Shojiro Asai,
Toshihiko Umemoto and Isamu Namikawa

Department of Oral Microbiology
(Chief : Prof. Isamu Namikawa)
School of Dentistry, Asahi University
1851 Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02, Japan
〔Accepted for publication : December 24, 1993〕

Key words : *Staphylococcus aureus*/MRSA/oral cavity/nasal cavity/biological characteristics

Abstract : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most important pathogens in nosocomial infection. It has recently been reported that the MRSA strains were sometimes detected in the oral cavities of individuals.

In this study the isolation of *S. aureus* from the oral and nasal cavities of 135 healthy students was designed and the subsequent examination of their biological characteristic was conducted. The incidence of *S. aureus* strains isolated from both cavities ranged from 3.7 to 6.7%. Remarkable differences in the biological characteristics between the two groups of the isolates from both cavities were not found. Every isolate from both cavities was sensitive to antibiotics including oxacillin, methicillin, tobramycin, ampicillin, gentamicin, cefazolin, chloramphenicol and vancomycin. No MRSA strains were detected from either cavity. In the isolates from the oral cavities, the predominant hemolysin type was mostly the $\alpha\gamma\delta$ type and covered 79%. Production of enterotoxins of the isolates ranged from 28.6 to 60%. Type B of staphylococcal enterotoxins and type VII of coagulase were predominant among them. The production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) was shown in the isolates at a rate of 30%. There were no differences in hydrophobicity between methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA.

These results suggest that the isolation of the MRSA from healthy students might be a rare occurrence, indicating that some isolated *S. aureus* in the oral and nasal cavities produces toxins as enterotoxins and TSST-1.

抄録: MRSA は院内感染の最も重要な微生物の1つである。また、最近、口腔からも MRSA の分離が報告されている。

そこで、歯学部学生 135 名の口腔および鼻腔から *S. aureus* を分離し、各種生物学的性状の検査を試みた。両部位からの *S. aureus* の分離率は、3.7~6.7%の範囲であった。両部位からの分離菌の生物学的性状に著しい差異はなかった。すべての分離菌は、オキサシリン、メチシリン、トブラマイシン、アンピシリン、ゲンタマイシン、セファゾリン、クロラムフェニコールおよびバンコマイシン等、いずれの薬剤にも感受性を示し、また、MRSA 株の検出は認められなかった。口腔からの分離 *S. aureus* では、溶血素の型は $\alpha\gamma\delta$ 型が主体で 79%を占めた。エンテロトキシン産生菌は、28.6~60%であり、型別は B 型が主体であった。

また、コアグラゼ型別は、VII 型が最も高率に検出された。TSST-1 産生菌は 30%であった。疎水性菌の比率は、MRSA と MSSA で差は認められなかった。

今回の検査では、MRSA が学生の両部位から全く分離されなかったことから、一般健康人では、MRSA の検出は極めてまれであることが示唆された。また、*S. aureus* の産生毒素の1つであるエンテロトキシン B および TSST-1 産生菌も、健康人の口腔からしばしば検出されることが示された。

緒 言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) はヒトの化膿性疾患の代表的な病原菌としてよく知られており、細菌性関節炎¹⁾、骨髄炎²⁾、急性心内膜炎³⁾などを起こすこともあり、従来より注目されてきた。一方、口腔領域では顎骨髄炎、膿瘍、耳下腺炎、歯肉炎、潰瘍性口内炎などの多くが *S. aureus* による感染と関係していることが報告されている⁴⁾。また、*S. aureus* は唾液、歯垢などの口腔常在菌叢の一員として、しばしば検出されるような極めてありふれた細菌でもある。口腔部位での *S. aureus* の主な定着場所は、舌部に多いと報告されている。加えて、星野らは歯垢では、その細菌叢に占める *S. aureus* の割合は 0.3%で極めて低率であると述べている⁵⁾。

しかし、*S. aureus* が薬剤耐性となった MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) は本邦では 1985 年以降、第 3 世代セフェム系抗生物質の大量使用に伴って、臨床、特に外科領域で爆発的に増加して免疫不全や術後の易感染患者の重篤な感染症として、現在社会問題となっている⁶⁾。また、最近、口腔領域にも MRSA 感染症が見いだされるようになった⁷⁾。MRSA は MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) と比べて、その病原性が特に強いということはないと考えられている。その最も大きな相違は MRSA が *mec A* 遺伝子を保持していることである。最近、本遺伝子は、*S. epidermidis* 等の他のブドウ球菌属にも検出されている。したがって今後、MRSA の *mec A* 遺伝子が MSSA や他のブドウ球菌属に移行する可能性すら論じられている⁸⁾。

従来から口腔分離の *S. aureus* の生物学的性状の詳しい研究報告は少ない。また、*S. aureus* の化膿性感染症等

において、本菌の多様な生物学的性状のどの因子が、本質的にこれらの病原性と関係しているのか、明確になっていない。このような理由で今後 MRSA については、十分な基礎的研究をすることが期待されている。

そこで、著者らは今回、口腔から分離した *S. aureus* の各種生物学的性状を検索し、これらの因子の相互関係を調べる目的で、広範囲な性状検査を試みた。

材料および方法

1. 被検対象

朝日大学歯学部学生約 135 名 (男性 108 名、女性 27 名)、平均年齢 22.6 歳 (20~32 歳) を対象とした。なお、分離は 1992 年 11 月と約 1 カ月後の 12 月、合計 2 回にわたって分離した。

2. 菌の採取、分離および供試菌株

舌背部からは検査材料を滅菌綿棒で擦り採取した。唾液からは滅菌綿棒に唾液を浸し採取した。鼻腔前庭部からは滅菌生理食塩液に浸した綿棒を用いて採取した。歯垢は歯肉縁下から滅菌スクレーパーで採取した。次に、採取した検体をブドウ球菌選択培地である MS (mannitol salt) 平板培地に接種して、37°C 48 時間培養した。平板培地上に形成したコロニーから、*S. aureus* と思われる任意の黄色のコロニーを 1 つ採取し、Trypticase soy 寒天 (TSA) 平板培地で純培養して *S. aureus* 同定検査材料とした。同一個体からの分離株は 1 株とし、重複株は除外した。2 回とも分離できた株は 2 回目の分離株を、検査および統計処理対象としては削除した。また、名古屋大学医学部付属病院細菌検査室から分与された 7 株、H310, H103, S239, M145, S152, S465 および M118 と岐阜大学嫌気性菌研究施設から分与された 18 株、G6, G8,

G14, G17, G19, G67, G73, G74, G86, G89, G91, G111, G112, G113, G117, G118, G119 および G120 の MRSA 各菌株も供試し、比較した。

3. *S. aureus* の同定

1) グラム陽性球菌, 2)カタラーゼ産生, 18 時間培養したコロニーから被検菌を白金線で少量採り, 過酸化水素 (30%) を 1 滴のせたスライドグラスに移し, 混和後, 気泡を産生したものをカタラーゼ陽性とした。3) マンニット分解, 検査材料を MS 寒天培地に接種し, 培養後の寒天培地上で黄色コロニーを形成したものを陽性とした。4) DNase 産生, DNA 寒天培地 (日水製薬) で 37°C24 時間培養後, コロニー周囲の培地の色が赤色に変化したものを陽性とした。5) コアグラゼ産生, 通法に従ってウサギ乾燥プラズマ (栄研化学) を用いてコアグラゼ産生能を調べた。これらすべてについて, 陽性を示した菌株を *S. aureus* と判定した。さらに, 必要に応じて, スタフィオグラム (テルモ) も併用して同定した^{9,10)}。同定した分離菌株を各種生物学的性状の検査用被検菌とした。

4. 溶血素産生

各種溶血素の検出の基礎培地として TSA を使用し, いずれも pH 7.0 に調整した。

α 溶血素 ウサギ血液 (1%) 寒天培地に被検菌株を接種後 24 時間培養し, 溶血環形成の認められたものを α 溶血素陽性とした¹¹⁾。

β 溶血素 hot-cold 法, すなわち, ウマとヒツジの 2% 血液, それぞれと 37°C18 時間培養, 遠心後の菌の上清を 37°C1 時間反応後, さらに, 4°C1 時間反応させヒツジの血液のみを溶血させた被検菌液を β 溶血素陽性とした¹¹⁾。

γ 溶血素 ヒト血液 (1%) 寒天培地, ウサギ血液 (1%) 寒天培地, ウサギ血液 (1%) Trypticase soy アガロース (1%) 培地およびヒツジ血液 (1%) 寒天培地に菌を接種して 37°C24 時間培養後, すべての血液寒天培地上のコロニーの周囲が溶血したものを γ 溶血素陽性とした¹¹⁾。

δ 溶血素 ヒト血液 (1%) 寒天培地を溶血したものを δ 溶血素陽性とした¹²⁾。

5. 薬剤感受性試験

センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を使用して 1 濃度ディスク法で判定した¹³⁾。オキサシリン (MIPIC, 1 μ g), メチシリン (DMPPC, 5 μ g), トブラ

マイシン (TOB, 10 μ g), アンピシリン (ABPC, 10 μ g), ゲンタマイシン (GM, 10 μ g), セファゾリン (CEZ, 30 μ g), クロラムフェニコール (CP, 30 μ g) およびバンコマイシン (VCM, 30 μ g) の 8 剤のディスクを, Mueller Hinton (MH) 寒天培地に被検菌の接種後, 寒天表面上に置き 37°C24 時間培養した。その後, ディスクの周囲に発育阻止帯が形成された菌を感受性菌, 形成されない菌を薬剤耐性と判定した。また, 被検菌について MIPIC センシ・ディスクの 1 濃度法で発育阻止帯が形成されないものを MRSA, 形成された菌株を MSSA と判定した。分与された MRSA 株については, 液体微量希釈法で MRSA のメチシリンに対する最小阻止濃度 (MIC) を測定した¹⁴⁾。

6. β -ラクタマーゼ産生

β -ラクタマーゼ検出用ディスク (セフィナーゼ, BBL) を用いて, 通法に従い検査した¹⁵⁾。

蒸留水で湿らせたディスクに白金線で少量塗抹し, 1 時間後に赤色を呈した被検菌を陽性とした。また, 無変化は陰性とした。

7. リパーゼ産生

GAM ブイヨン (日水製薬) に卵黄 (4%) とスキムミルク (2.5%) および寒天を加えて, pH 7.0 に調整した平板寒天培地に 1 白金耳量の被検菌を接種し 37°C24 時間培養後, コロニーの周囲が光沢し, 虹色を呈した被検菌をリパーゼ産生菌とした^{16,17)}。

8. エラスターゼ産生

Janda ら¹⁸⁾の方法を用いて行った。Brain heart infusion (BHI) 寒天 (pH 7.0) を基礎培地に, エラスチン (ナカライテスク) を 0.3% 濃度含むように添加して, 平板培地を作製した。本培地に 1 白金耳量の被検菌を接種し 37°C48 時間培養し, さらに, 室温で 8 日間放置後, 増殖したコロニー周囲のエラスチン粒子の溶解したものをエラスターゼ産生陽性と判定した。

9. 色素産生

トリプチケイス酵母抽出液 (TYB) を用いて色素産生を調べた¹⁹⁾。トリプチケイスペプトン (BBL, 1.7%) 酵母エキス (Difco, 1%), 塩化ナトリウム (0.5%), リン酸第二カリウム (0.25%), モノアセチン (0.4%) および寒天の成分からなる培地 (pH 7.0) を用いて 1 白金耳量の被検菌を接種, 37°C48 時間培養後, さらに, 室温で 2 日間放置した。その後, 黄色 (Y), レモン色 (L),

Table 1 Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral and nasal cavities of healthy students

Characteristic	Nasal (%)	Cavity ^a		
		Oral (%)		
		Plaque	Tongue	Saliva
Number of isolates ^b	10	10	18	15
Incidence of isolation	3.7	3.7	6.7	5.6
Pigment (color) production				
Yellow	80	80	50	46.7
Lemon	20	10	16.7	20
White	0	0	33.3	33.3
β -Lactamase production	80	70	66.6	53.3
Hemolysin production				
α	100	100	83.5	86.7
β	0	0	5.6	13.3
γ	100	100	88.9	86.7
δ	100	100	88.9	80.0
Lipase production	100	100	100	93.3
Elastase production	0	0	0	5.6
Enterotoxin production	50	60	44.4	28.6
TSST-1 production	0	30	33.3	33.3
Hydrophobicity	68.7	84.1	83.7	69.3
High	30	40	55.6	33.3
Middle	60	50	44	66
Low	10	10	0	0
Extracellular protein A production	30	20	33.3	60

^a Total numbers of students, 270 (isolation by twice). ^b Real number.

白色 (W) でコロニーの色を判別した。

10. コアグララーゼ型

ブドウ球菌コアグララーゼ型別免疫血清 (デンカ生研) を用いて, 通法に従い I から VIII 型までの型別を検査した²⁰⁾。

11. エンテロトキシン産生

エンテロトキシン A~D を逆受身ラテックス凝集反応 (SET-RPLA, デンカ生研) で通法に従い検査した²¹⁾。

12. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 産生

TSST-1 を逆受身ラテックス凝集反応 (TST-R PLA, デンカ生研) で通法に従い検査した²²⁾。

13. 疎水性

Rosenberg ら^{23,24)}の方法に準じて行った。被検菌を

TSA 寒天培地 (pH 7.0) で 37°C18 時間培養した。その培養菌を 3.5 ml の PBS 緩衝液 (pH 7.2) に加え, マックファーランド 1 の濃度の懸濁液を作製した。この菌液にキシレン 1 ml を加え, 1 分間試験管ミキサーで混和し, 20 分後, OD_{500nm} で吸光度を測定した。混和前 (A) および混和後 (B) の吸光度から, 疎水性指標 (hydrophobicity index, HI) を測定した。HI = A - B / A × 100 (%), HI 値が, 90~100% を高度疎水性, 90~20% を中等度疎水性, 20% 以下を低度疎水性 (親水性) と判定した。

14. 遊離 protein A 産生

Masuda ら²⁵⁾の方法に従い, イヌの新鮮血清 1% を含有した Heart Infusion (HI) 寒天培地に被検菌を接種し, 37°C48 時間培養後, コロニー周囲に沈降輪 (ハロー) を形成した菌株を遊離 protein A 産生陽性菌とした。

Table 2 Production of β -lactamase and β -hemolysin, antibiotic susceptibility and hydrophobicity of MRSA strains

Strain	β -Lactamase	β -Hemolysin	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Hydrophobicity (%)
			DMPPC ^a	MPIPC ^b	GM ^c	
MRSA						
H310	+	—	>100	>100	50	80.6
H103	+	—	>100	>100	>100	89.1
S239	—	—	>100	>100	>100	73.1
M145	+	+	50	50	100	85.3
S152	+	—	12.5	25	25	43.2
S465	+	—	100	50	N.T. ^d	100
M118	+	—	50	50	100	52.6
G6	+	—	>100	>100	>100	88.0
G8	+	—	>100	>100	0.4	89.3
G14	+	—	N.T.	>100	50	85.2
G17	+	—	>100	>100	100	80.0
G19	+	—	N.T.	>100	N.T.	52.3
G67	+	—	>100	>100	>100	100
G73	N.T.	—	>100	>100	0.4	78.3
G74	+	—	>100	>100	>100	38.1
G86	+	—	100	>100	0.4	98.2
G89	+	—	100	>100	0.4	63.6
G91	—	—	>100	>100	0.4	81.4
G111	+	—	>100	>100	1.6	85.0
G112	+	—	>100	>100	>100	85.7
G113	+	—	>100	>100	>100	77.0
G117	+	—	>100	>100	0.8	69.2
G118	+	—	>100	>100	>100	80.0
G119	+	—	>100	>100	>100	80.9
G120	+	—	>100	>100	50	91.4
92% ^e			4 % ^f			77.9 $\pm$ 16.6 (Mean $\pm$ SD) ^g

^a DMPPC, methicillin ; ^b MPIPC, oxacillin ; ^c GM, gentamicin ; ^d N.T., Not tested.^e %, positive ; ^f %, positive ; ^g SD, standard deviation.

結 果

1. 分離 *S. aureus* の同定

黄色コロニー形成, グラム陽性球菌, コアグラールゼ陽性, カタラーゼ陽性, マンニット分解陽性および DNAase 産生陽性を示した被検菌を *S. aureus* と判定した²⁶⁾。さらに, *S. aureus* と判定した 53 株中 19 株についてスタフィオグラム簡易同定キットでも検査した結果, すべて *S. aureus* と同定できた。ヒトから分離される *Staphylococcus* 属で, coagulase 陽性を示す菌は, ほとんど *S. aureus* に限られると考えられているので, 生物

学的性状が上記検査項目に陽性を示した被検菌を *S. aureus* と判定した。

2. 各採取部位からの *S. aureus* の分離率

S. aureus 分離率は鼻腔で 3.7%, 歯垢で 3.7%, 舌背部で 6.7% および唾液で 5.6% の分離率であった (Table 1)。

3. 溶血素産生

α , γ および δ 溶血素とも鼻腔, 歯垢から分離した *S. aureus* はすべて陽性であった。 β 溶血素は鼻腔, 歯垢からの *S. aureus* はすべて陰性であった。舌背部および唾

Table 3 The relationship between coagulase and enterotoxin type of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavities of healthy students

Coagulase type	Enterotoxin type							Total
	A	B	C	D	A, B	C, D	non-production	
I								
II	1 ^a	1				<u>1</u> ^b	3	5 (11.6%) ^c
III		3					2	<u>1</u> (10%)
IV		1					1	5 (11.6%)
V							2	<u>2</u> (20%)
VI							1	2 (4.7%)
VII		10	1				5	7
VIII		<u>2</u>					2	<u>2</u> (40%)
non-typable					1		4	4 (9.3%)
	<u>1</u>						3	4 (9.3%)
							<u>2</u>	<u>3</u> (30%)
Total	1 (2.3%)	15 (34.9%)	1 (2.3%)		1 (2.3%)		25 (58.1%)	43
	<u>1</u> (10%)	<u>2</u> (20%)				<u>1</u> (10%)	<u>6</u> (60%)	<u>10</u>

^a Numbers of strains.^b Data of strains isolated from the nasal cavities of healthy students are underlined.^c Numbers within parentheses indicate percent of strains.

液からはそれぞれ、5.6%、13.3%の菌株が β 溶血素陽性を示した (Table 1)。一方、対照として供試した MRSA 株では、4%が β 溶血素陽性であった (Table 2)。

4. 薬剤感受性試験

供試したすべての抗生物質に対して、口腔および鼻腔より分離した *S. aureus* はいずれも感受性を示した。対照とした供試 MRSA 25 株の MIC は、DMPPC が未検査の 2 株を除いてすべて 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上、MIPIC では、すべての菌株とも 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した (Table 2)。

5. β -ラクタマーゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* の β -ラクタマーゼ産生率は 53.3~80%の範囲であった (Table 1)。また、供試した MRSA 株では 92%が陽性菌であった (Table 2)。

6. リパーゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* は、1 株を除いてすべて産生株であった (Table 1)。

7. エラスターゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* では、1 株を除いてすべて非産生株であった (Table 1)。

8. 色素産生

口腔から分離した *S. aureus* のうち、黄色を呈したコロニーは、いずれの部位でも 46.7~80%範囲にあった。レモン色を呈したコロニーは、10~20%の分離株にみられた。また、白色を呈したコロニーは、歯垢からの分離株では 0%であったが、舌背部および唾液からの分離株では 33.3%検出された (Table 1)。一方、鼻腔からとる分離した *S. aureus* は、歯垢からの分離株と同様で、黄色コロニーが 80%を占め、白色コロニーは認められなかった。

9. コアグララーゼ型別判定

口腔から分離した *S. aureus* のコアグララーゼ型の分布は、VII型が一番多く、41.9%、III型、IIおよびVで 11.6%、VIII型で 9.8%、I、IV、VI型は 5%以下であった。その他不定は 9.3%であった (Table 3 および 4)。鼻腔から分離した *S. aureus* のコアグララーゼ型の分布は、VII型で 40%、III型で 20%、II型で 10%および不定型が 30%で

Table 4 The relationship between TSST-1 production and coagulase type of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavities of healthy students

	Coagulase type									Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	non- typable	
TSST-1	+	2 ^a	3		2		5	2	0	14 (32.6%) ^c
	—	<u>3</u> <u>1^b</u>	<u>2</u> <u>2</u>	2	3		<u>13</u> <u>4</u>	2	<u>4</u> <u>3</u>	29 (67.4%) 10 (100%)
Total		5 (11.6%)	5 (11.6%)	2 (4.7%)	5 (11.6%)		18 (41.9%)	4 (9.3%)	4 (9.3%)	43
		<u>1</u> (10%)	<u>2</u> (20%)				<u>4</u> (40%)		<u>3</u> (30%)	<u>10</u>

^a Numbers of strains.^b Data of strains isolated from the nasal cavities of healthy students are underlined.^c Numbers within parentheses indicate percent of strains.

あった (Table 4)。

10. エンテロトキシン産生

口腔から分離した *S. aureus* のエンテロトキシン産生率は 41.9% を占めた。非産生株は 58.1% で、B 型の割合が最も高く 34.9% で、以下 A 型、C 型、AB 型は 2.3% の割合を占めた。鼻腔からの分離菌も同様な割合であった (Table 3)。

11. TSST-1 産生

口腔から分離した *S. aureus* の TSST-1 産生率は、32.6% を占めた。一方、鼻腔から分離した *S. aureus* の TSST-1 産生菌は認められなかった (Table 4)。

12. 疎水性

口腔から分離した *S. aureus* の場合、高度疎水性菌の HI は、40~55.6% の範囲、中等度疎水性菌の HI は 44~66% の範囲を占めた。低度疎水性 (親水性) 菌の HI は歯垢では 10% を占めた。その他の部位では 0% であった。また、鼻腔からの分離菌の場合も同様であった (Table 1)。口腔および鼻腔の各部位から分離したすべての *S. aureus* は、MSSA であったので、分離 MSSA 株群として合計 53 株の HI を算定すると $78.0 \pm 17.4\%$ を示した。一方、対照としての MRSA 群 25 株の HI は、 $77.9 \pm 16.6\%$ であり有意の差はなかった (Table 2)。

13. 遊離 protein A 産生

口腔のうち、歯垢および舌背部よりの分離 *S. aureus* は 20~33.3%、また、鼻腔よりの分離 *S. aureus* は 20%

の遊離 protein A 産生率であった。一方、唾液からの *S. aureus* の産生率は 60% であった (Table 1)。

考 察

口腔に常在する *S. aureus* は口腔領域の化膿性感染症の起因菌となる。したがって、*S. aureus* の口腔内での出現頻度を調べることは、MRSA 感染症や口腔疾患の予防対策として極めて重要なことである。健康成人よりの *S. aureus* の分離頻度について、川島²⁷⁾は鼻腔から 28.3%、熊田⁴⁾は舌部から 23%、唾液から高橋²⁸⁾は 60%、野口²⁹⁾は 52% であると報告している。

しかし、同様に健康人から *S. aureus* の分離率を調べた著者らの結果は、口腔および鼻腔から 3.7~6.7% の範囲であり、従来の報告より低かった。このことは、*S. aureus* の分離率に関しては同じ健康成人からの採取でも、対象者の相違、採取方法および分離方法の相違で大きく異なることが考えられる。

口腔からの *S. aureus* の各分離株の産生する溶血素に関する報告は極めて少ない。 α 溶血素はほとんどのヒトの分離菌から産生され则认为られているが、今回の採取対象部位からの *S. aureus* 分離菌株でも同様の傾向を示した。しかし、舌背部、唾液からの分離菌の約 15% に α 溶血素非産生菌も認められた。 β 溶血素はウシから分離した *S. aureus* に多く、ヒトからの分離菌には少ないといわれている²⁶⁾が舌背部および唾液から β 溶血素産生菌が検出された。しかしこれらの由来について、現在不明である。 γ および δ 溶血素も、ヒトから分離した *S. aureus* ではほとんど産生がみられるといわれている

が、本研究では舌背部および唾液からは80~88.9%、他の部位は100%陽性であった。口腔よりの各分離菌の溶血素パターンは、今回の定性的検出方法で、 α 、 β 、 γ および δ の4つの溶血素を産生するものおよび産生しないものの組合せで分類すると6つのグループに分けられた。そのうち最も優勢な型は $\alpha\gamma\delta$ 型で、79%を占めた。その他、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 、 $\alpha\delta$ 、 α 、 δ および非産生の5つの型があり、それぞれ、4.7、2.3、2.3、2.3%および7%であった。このように、従来からヒトから分離した *S. aureus* は、ほとんど α 、 γ および δ 溶血素を産生するといわれているが、舌背部や唾液から分離した *S. aureus* にもこれらの溶血素非産生菌が認められた。

薬剤感受性試験結果では、被検菌のすべてが感受性の *S. aureus* であり、MRSA と判定される菌株は認められなかった。現在、多くの外科および内科系大病院で検出される *S. aureus* のうち、MRSA が50%以上検出される場所については多数報告されている。また、口腔領域でもMRSAの検出が報告されている⁷⁾。今回、歯学部学生からの *S. aureus* の各分離菌株では、供試した感受性ディスクに対してすべて感受性を示した。一方、供試した薬剤に耐性を示す *S. aureus* は全く検出されなかった。これらの事実から、通常の生活をしている健康な青年期の個体の口腔領域へのMRSA感染・定着は極めて稀なことと推定された。

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* の β -ラクタマーゼ産生菌率は53.3~80%を示した。横田³⁰⁾は、臨床分離(1986~1990年)の *S. aureus* 各菌株のうち69.4%が、 β -ラクタマーゼ産生菌と報告しており、ほぼ同一結果であった。一方、供試したMRSAでは、そのうち92%が β -ラクタマーゼ産生菌であった。庄司³¹⁾らは、MRSAがMSSAよりも β -ラクタマーゼ産生株が低いと述べているが、本実験結果は分離 *S. aureus* のそれぞれがすべてMSSA株であることを考慮すると、比較のために供試したMRSAの方が分離MSSA株よりも高い β -ラクタマーゼ産生率を示し、庄司らの報告と逆の傾向であった。この理由は明瞭ではないが、分離の時期および場所等の相違が関係しているかも知れない。

リパーゼは被検菌のうち、1株を除きすべてが産生した。これは定性試験法による成績であったが、従来の報告と一致した。エラスターゼは被検菌のうち、1株を除きすべてが産生しなかった。Murphy (1974) ら³²⁾が、口腔から分離した *S. aureus* はほぼ40%エラスターゼを産生すると報告しているが、同様な検出方法で行った Janda ら¹⁸⁾ (1986) は、口腔から分離した *S. aureus* ではほとんど本酵素の産生がみられなかったと報告してい

る。著者らの実験成績でもほとんどの分離株が非産生であった。しかし、エラスターゼ産生菌はその酵素の組織破壊性のため、口腔組織に破壊的に働くと考えられるので、今後、歯周疾患患者から分離される *S. aureus* が本酵素を産生するかどうかを調べることは、*S. aureus* の歯周疾患を含め、口腔領域での感染病巣における *S. aureus* の病原的役割を知る上で重要なことと思われる。

舌背部および唾液から分離した *S. aureus* の33.3%に白色のコロニーが検出されたが、供試MRSA株には白色コロニーは認められなかった。46.7%以上の菌株はいずれも黄色であった。

以前、コロニーの色による分類も検討されたが変異しやすいことから、これらの色素産生性は現在考慮されなくなっている。しかし、このように肉眼的に、明瞭に容易に識別できることから今後、簡便な方法として有効に活用できうるかもしれない。

コアグララーゼ型の分布は、口腔から分離した *S. aureus* の場合、VII型が41.9%で最も高率に検出されたが、これは、向野³³⁾らの喀痰や口腔以外の他の部位での膿から分離された *S. aureus* の型の分布と同様であった。一方、最もよくエンテロトキシンを産生するコアグララーゼ型はVIIで、VII型と判定できた被検菌は43株中、エンテロトキシンBおよびC型を含む合計11株であり、25.6%の割合を占めた。このことは、VII型が食中毒を起こす *S. aureus* の血清型では最も多いとされ³⁴⁾、また、VII型以外には、II、III、IV型が食中毒を起こし、それ以外の型による食中毒はまれと考えられている³⁵⁾ことと一致していた。

ブドウ球菌食中毒に関連しているエンテロトキシン型として、A型が多いと報告されているが³⁴⁾、口腔から分離した被検菌では、A型は2.3%で少なく、B型が34.9%で最も多かった。著者らの結果は、B型毒素産生菌については三宅³⁶⁾の小児の口腔よりの産生率の報告と同様であったが、A型毒素産生菌については彼らの結果より著しく少なかった。このことは、成人と小児から分離したエンテロトキシン産生 *S. aureus* では、毒素型の種類に差があることを示していると思われる。

コアグララーゼ型とエンテロトキシン産生性との関連性では、岩井²⁶⁾はII、VII型に高率にエンテロトキシン産生性を認めたと報告しているが、著者らの得られた結果でもコアグララーゼVII型の分離菌に、エンテロトキシン産生菌が多く検出できた。

TSST-1産生性では五十嵐³⁷⁾および川上³⁸⁾が臨床分離 *S. aureus* のTSST-1産生率を、それぞれ12.6%、30.8%と報告している。著者らの結果では口腔から分離した菌株はTSST-1産生菌が32.6%を占めたが、鼻腔

Table 5 The relationship between TSST-1 production and enterotoxin type of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavities of healthy students

Enterotoxin	TSST-1		Total
	+	-	
A		1 ^a <u>1</u>	1 (2.3%) ^b <u>1</u> (10%)
B	7	8 <u>2</u> ^c	15 (34.9%) <u>2</u> (20%)
C	1		1 (2.3%)
D			
A, B		1	1 (2.3%)
C, D		<u>1</u>	<u>1</u> (10%)
non-productiton	6	19 <u>6</u>	25 (58.1%) <u>6</u> (60%)
Total	14 (32.6%)	29 (67.4%) <u>10</u> (100%)	43 <u>10</u>

^a Numbers of strains.^b Numbers within parentheses indicate percent of strains.^c Data of strains isolated from the nasal cavities of healthy students are underlined.

から分離した菌株は TSST-1 産生菌が認められなかった (Table 5)。このことは口腔から分離した菌株では、川上らの報告とほぼ一致している。しかし、著者らの分離菌株数が少ないためとも考えられ、鼻腔から分離した菌株では検出されなかったことが、必ずしも口腔と鼻腔の分離部位の相違と決められない。

松下³⁹⁾は、本邦の病院の婦人科外来患者の腔分泌物から *S. aureus* を分離した結果、836 名中 99 名 (11.8%) に *S. aureus* を検出し、そのうち、2 株 (2%) に TSST-1 産生菌が認められたと報告している。TSST-1 産生 *S. aureus* は婦人科領域で注目されたものではあるが、口腔から分離した *S. aureus* の TSST-1 産生菌の割合は、以前の報告と同様に、腔からの分離菌より高いことが示された。このことは、口腔から分離される TSST-1 産生 *S. aureus* の病原的役割をさらに検討する必要があることを示唆している。

従来、口腔から分離した *S. aureus* の疎水性を調べた報告はほとんどみられないが、検査結果では、低度疎水性 (親水性) を示す被検菌は 10% 以下で、40% は高度疎水性あるいは中度疎水性の菌株であった。量的には少ないが、親水性の *S. aureus* 株が口腔より分離されている

ことが明瞭となった。

遊離 protein A は被検菌の 20% 以上が産生した。遊離 protein A は細胞結合性 protein A を有する *S. aureus* が自己融解する際に、過剰の protein A が放出されたものと考えられている⁴⁰⁾ので、遊離 protein A が検出される *S. aureus* は細胞結合性 protein A を有すると思われる。しかし、Jonsson ら⁴¹⁾の提唱している疎水性の高い菌は、結合性 protein A 産生菌が多いという従来の報告との関連性を調べるには、今後、さらに分離株について結合性 protein A の定量を検索する必要がある。

S. aureus による化膿性疾患に、本菌の持つどの因子が関与しているかを詳しく調べることは、重要な課題である。今回、著者らは健康人の口腔よりいくつかの各種生物学性状を有する菌株が分離できたので、今後、*in vitro* および *in vivo* で分離菌を供試し生体に対する影響を知ることができると思われる。

結 論

1992 年 11 月と 12 月の 2 回にわたり、朝日大学歯学部学生 135 名から、*S. aureus* を分離し、その各種生物学性状について、検索し、以下のような結果を得た。

1. *S. aureus* の分離率

口腔の唾液、舌、歯垢および鼻腔より *S. aureus* を分離した。検出率はそれぞれ、5.6, 6.7, 3.7 および 3.7% であった。

2. 溶血素の型

口腔から分離した *S. aureus* の溶血素は、 $\alpha\gamma\delta$ 型が 79% を占めた。その他、 $\alpha\beta\gamma\delta$, $\alpha\beta$, α , δ および非産生の 5 つの型があったが、いずれも 7% 以下であった。鼻腔から分離した *S. aureus* はすべて $\alpha\gamma\delta$ 型であった。

3. 薬剤感受性

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* の MIPIC, DMPPC, TOB, ABPC, GM, CEZ, CP および VCM のセンチ・ディスク 8 種類の薬剤に対する感受性は、すべての菌株に認められた。また、MRSA は検出されなかった。

4. β -ラクタマーゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* の β -ラクタマーゼ産生率は 53.3~80% の範囲であった。

5. リパーゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* は、1 株を除いてすべてリパーゼを産生した。

6. エラスターゼ産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* は 1 株を除い

てすべて非産生菌であった。

7. コアグラゼ型の分布

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* はVII型が約40%を占め、その他のII, III, IV, VおよびVIII型は20%以下であった。

8. エンテロトキシン産生

口腔および鼻腔から分離した *S. aureus* は、その約40%がエンテロトキシン産生株で、毒素型はB型が20～34.9%を占めた。

9. TSST-1 産生

口腔から分離した *S. aureus* の TSST-1 産生率は32.6%であった。一方、鼻腔からの分離菌では、本毒素産生菌は認められなかった。

10. 疎水性指標 (HI)

口腔および鼻腔からの分離被検菌の MSSA 株は $78.0 \pm 17.4\%$ 、供試 MRSA 株で $77.9 \pm 16.6\%$ の HI を示し、有意の差はなかった。

11. 遊離 protein A 産生

鼻腔、歯垢および舌背部から分離した *S. aureus* では20～33.3%の産生率であった。一方、唾液からの分離菌では60%の産生率であった。

以上の結果から、健康な歯学部学生の口腔および鼻腔部位からは、今回の結果では、MRSA は検出されないことが判明した。しかし、ヒトの口腔および鼻腔からは病原性と考えられる各種因子の産生も認められたので、今後、この方面の研究も必要である。

MRSA の菌株を分与して頂きました岐阜大学上野一恵名誉教授、名古屋大学医学部の太田美智男教授および名古屋大学医学部付属病院検査部の一山 智先生に本稿をかりて謝意を表します。

また、本研究の一部は、宮田奨励研究A(1988)および東海乳酸菌研究会(ヤクルト, 1993)の研究助成金によって行われた。

文 献

- 1) Goldenberg, D. L. and Reed, J. I. : Bacterial arthritis, N. Engl. J. Med. **312** : 764～771, 1985.
- 2) Sheagren, J. N. : *Staphylococcus* the persistent pathogen (First of two parts), N. Engl. J. Med. **310** : 1368～1373, 1984.
- 3) Pelletier, L. and Petersdorf, R. G. : Infectious endocarditis : a review of 125 cases from the University Washington Hospitals, 1963～1972. Medicine **56** : 287～313, 1977.
- 4) 熊田秀文, 金子伸雄, 菅沼宏行, 鹿谷 実, 弓削朝子 : 口腔より分離したブドウ球菌の性状と分類に関する研究, 神奈川歯学 **15** : 623～635, 1981.
- 5) Hoshino, E., Sato, M., Sasano, T. and Kota, K. : Characterization of bacterial deposits formed *in vivo* on hydrogen-ion-sensitive field-effect transistor electrodes and enamel surfaces. Jpn. J. Oral Biol. **31** : 102～106, 1989.
- 6) Muder, R. R., Brennen, C. M., Wagener, M., Vickers, R. M., Rihs, J. D., Hancock, G. A., Yee, Y. C., Miller, J. M. and Yu, V. L. : Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a longterm facility, Ann. Intern. Med. **114** : 107～111, 1991.
- 7) 下里常弘, 野村雅久 : 口腔領域の感染症, 広大歯誌 **24** : 152～153, 1992.
- 8) 平松啓一 : MRSA の分子遺伝学, 日本臨床 **50** : 938～944, 1992.
- 9) Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. : Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species, J. Clin. Microbiol. **1** : 82～88, 1975.
- 10) 河村好章, 江崎孝行 : *Staphylococcus* 属菌種同定キット「スタフィオグラム」, 臨床と微生物 **19** : 325～332, 1992.
- 11) Clyne, M., Azavedo, J., Carlson, E. and Arbuthnott, J. : Production of gamma-hemolysin and lack of production of alpha-hemolysin by *Staphylococcus aureus* strains associated with toxic shock syndrome J. Clin. Microbiol. **26** : 535～539, 1988.
- 12) Wiseman, G. M. : The hemolysin of *Staphylococcus aureus*, Bacteriol. Rev. **39** : 317～344, 1975.
- 13) Skulnick, M., Simor, A. E., Gregson, D., Patel, M., Small, G. W., Kreiswirth, B., Hathoway, D. and Low, D. E. : Evaluation of commercial and methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Clin. Microbiol. **30** : 1985～1988, 1992.
- 14) 日本化学療法学会 抗菌薬感受性測定検討委員会 : 微量液体希釈による MIC 測定 (微量液体希釈法), Chemotherapy **38** : 102～105, 1990.
- 15) O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M. and Shingler, A. H. : Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate, Antimicrob. Agents Chemother. **1** : 283～288, 1972.
- 16) Shah, D. B. and Wilson, J. B. : Egg yolk factor of

- Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol. 85 : 516~521, 1963.
- 17) Lee, C. Y. and Iandolo, J. J. : Mechanism of bacteriophage conversion of lipase activity in *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol. 164 : 288~293, 1985.
- 18) Janda, J. M. : Elastolytic activity among *staphylococci*, J. Clin. Microbiol. 24 : 945~946, 1986.
- 19) Xiong, Z. and Kapral, F. A. : Carotenoid pigment levels in *Staphylococcus aureus*, and sensitivity to oleic acid, J. Med. Microbiol. 37 : 192~194, 1992.
- 20) 寺山 武 : 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別, 臨床と微生物 15 : 10~15, 1988.
- 21) Igarashi, H., Fujikawa, H., Usami, H., Kawabata, S., Morita, T. : Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* FRI 1169 and 587 toxic shock syndrome toxins, Infect. Immun. 44 : 175~181, 1984.
- 22) 五十嵐英夫 : 細菌毒素の検出法 3 ブドウ球菌の毒素とくにブドウ球菌エンテロトキシンおよび toxic shock syndrome toxin-1 の検出法一, Medical Technology 18 : 771~776, 1990.
- 23) Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. : Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett. 9 : 29~33, 1980.
- 24) Rosenberg, M. : Bacterial adherence to hydrocarbons : a useful technique for studying cell surface hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett. 22 : 289~295, 1984.
- 25) Masuda, S. and Kondo, I. : Mechanism of the spur formation observed between two forms of extracellular staphylococcal protein A produced by mutants against normal dog serum, Microbiol. Immunol. 25 : 407~410, 1981.
- 26) 岩井康介 : 小児口腔よりの黄色ブドウ球菌の分離と性状, 広大歯誌 22 : 86~100, 1990.
- 27) 川島 崇 : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の鼻腔内保菌者の検討, 感染症学雑誌 66 : 686~695, 1992.
- 28) 高橋政文 : ヒト, 実験動物および野生げっ歯類の口腔ブドウ球菌の分布, 愛院大歯誌 20 : 268~286, 1982.
- 29) 野口 守 : 根端病巣の細菌学的研究, 九州歯会誌 14 : 114~168, 1960.
- 30) 横田 健 : 臨床分離菌の β -lactamase 産生率と各種薬剤に対する感受性の検討, Chemotherapy 39 : 941~952, 1991.
- 31) 庄司 聡, 菊地宏明, 渡辺 影, 本宮雅吉 : MRSA の β -lactamase 産生能—MRSA と MSSA の比較—, 日本臨床 50 : 131~135, 1992.
- 32) Murphy, R. A. : Elastase production by oral *staphylococci*, J. Dent. Res. 53 : 832~834, 1974.
- 33) 向野賢治, 芝 香子, 小貫圭介, 戸原震一, 武田誠司, 荒川規矩男, 中島八郎, 奥野隆子 : 福岡市圏の病院・診療所より分離された MRSA 株の検討, 日本臨床 50 : 970~974, 1992.
- 34) 潮田 弘 : コアグラゼ型別について, 臨床と微生物 18 : 119~120, 1991.
- 35) 寺山 武 : ブドウ球菌食中毒におけるエンテロトキシン検査および原因菌の型別成績, 食品衛生研究 31 : 192~203, 1981.
- 36) Miyake Y., Iwai, T., Sugai, M., Miura, K., Sugina-ka, H. and Nagasaka, N. : Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children, J. Dent. Res. 70 : 1045~1047, 1991.
- 37) 五十嵐英夫, 新垣正夫, 藤川 浩, 潮田 弘, 寺山武, 赤嶺郁子, 河合菜穂, 善養寺浩 : 各種臨床検査材料由来ブドウ球菌の Toxin Shock 毒素およびエンテロトキシンの産生とコアグラゼ型, 感染症学雑誌 58 : 256, 1984.
- 38) 川上 浩, 山田義則 : 臨床材料由来黄色ブドウ球菌の Toxin shock syndrome toxin の産生性について, 感染症学雑誌 60 : 133~140, 1986.
- 39) 松下真理 : 腔分泌物検査材料からの Toxic shock syndrome toxin-1 産生黄色ブドウ球菌の分離状況とその生物学的性状, 感染症学雑誌 60 : 195~203, 1986.
- 40) Movitz, J. : Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*, Eur. J. Biochem. 68 : 291~299, 1976.
- 41) Jonsson, P. and Wadstrom, T. : High surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography, Curr. Microbiol. 8 : 347~353, 1983.