乳房炎より分離された *Staphylococcus aureus* の毒素産生性について

溝本朋子*¹・市川意子*²

Productions of the Bacterial Toxins from *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitis.

Tomoko MIZOMOTO*¹ and Motoko ICHIKAWA*²

*¹ Federation of Agricultural Mutual Aid Association in Chiba prefecture

*² and Tsuba medical junior college

Summary

Staphylococcus aureus, isolated from bovine mastitis in South Veterinary Clinical Center in Chiba between October 1990 and April 1993, were examined for their coagulase type (CT) and enterotoxin type (ET), and productivities of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). ET and TSST-1 were not significantly associated with degrees of clinical conditions of mastitis. Bacterial type in significant critical cases had 30.9% in CT-6, 47.8% in ET-C strain and 34.3% in TSST-1 against the whole isolated bacteria. One or few strains which had same types in CT, ET and/or TSST-1 were mainly detected in each farm.

Therefore, the present study indicated that ET and TSST-1 induced the inflammations and some bacterial or host factors might be also playing some important roles in determining of the clinical conditions of mastitis.

I. 緒 言

牛乳房炎で最も問題となる原因菌の1種である *Staphylococcus aureus* (以下 *S.aureus*) は、数種の酵素や毒素を産生する事が知られており、これらは菌体物質とともにその病原性に深く関与しているとされている²⁾。特にエンテロトキシンと毒素性ショック症候群毒素 (以下 TSST-1) は、乳房炎における炎症誘起に関与している事が指摘されている^{17,19,20)}。そこで今回、この2種の毒素とコアグラセタイプを調べる機会を得たので、臨床症状との関係および農家毎の毒素産生株分離状況を比較した。

II. 材料と方法

1. 調査期間は、1990年10月から1993年4月。
2. 供試材料は管内搾乳牛118戸のべ231頭より分離された *S.aureus* 265株で内訳は表1に示した。
3. 調査項目は、供試株のコアグラセタイプ、

表1 供試材料の内訳

乳房炎乳	甚急性	5
	急性	140
	慢性	15
	潜在性	79
	不明	7
バルク乳		19
計		265株

* 千葉県農業共済組合連合会, 南部家畜診療所
〒294 千葉県館山市安東86

エンテロトキシン, 毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1)について検査し, 臨床症状別にその成績を比較した。また, 調査期間中に *S.aureus* が5株以上検出された農家11戸について, 農家別に成績を比較した。コアグラセタイプはデンカ生研のブドウ球菌コアグラセ型別用免疫血清, エンテロトキシンと TSST-1は同じくデンカ生研の逆受け身ラテックス凝集反応による検出用キットを用いた。

III. 成績

1. 臨床症状別のコアグラセタイプ, エンテロトキシン, TSST-1産生性について

臨床症状別のコアグラセタイプについて表2に示した。全体では, I型からVII型まで全て検出され, そのうちVI型が265株中82株 (30.9%)と最も多く, 次にII, III, VII型が多かった。甚急性では, 例数が5例と少なかったがその中では, III型が3例で最も多かった。急性では, VI型が140株中44株 (31.4%)と最も多く, 次にII, III, VII型が多かった。慢性で

は, III型が15株中7株 (46.7%)と最も多く, 次にVI型が多かった。潜在性では, VI型が79株中23株 (29.1%)と最も多く, 次にII型とVII型が最も多かった。

2. 臨床症状別のエンテロトキシン産生性とその型別を表3に示した。全体では, エンテロトキシン産生株は265株中134株 (50.6%)で, そのうちC型が134株中64株 (47.8%)と最も多く, 次にB型が多かった。甚急性では, エンテロトキシン産生株は5株中2株 (40.0%)で, A型とC型だった。急性では, エンテロトキシン産生株は140株中76株 (54.3%)で, そのうちB型とC型がそれぞれ27株 (33.5%), 29株 (38.2%)と多かった。慢性では, エンテロトキシン産生株は15株中9株 (60.0%)で, そのうちC型が5株 (55.6%)で最も多かった。潜在性では, エンテロトキシン産生株は79株中37株 (46.8%)で, そのうちC型が20株 (54.1%)で最も多かった。エンテロトキシン産生性およびその型別と, 臨床症状

表2 全体および臨床症状別のコアグラセタイプ

	全体	甚急性	急性	慢性	潜在性
I	20 (7.5%)		17 (12.1%)	2 (13.3%)	1 (1.3%)
II	49 (18.5)	1 (20.0%)	23 (16.4)	1 (6.7)	17 (21.5)
III	46 (17.4)	3 (60.0)	22 (15.7)	7 (46.7)	9 (11.4)
IV	9 (3.4)		3 (2.1)		6 (7.6)
V	12 (4.5)		7 (5.0)		5 (6.3)
VI	82 (30.9)	1 (20.0)	44 (31.4)	4 (26.7)	23 (29.1)
VII	43 (16.2)		20 (14.3)	1 (6.7)	18 (22.8)
VIII	2 (0.8)		2 (1.4)		
I + VII	1 (0.4)		1 (0.7)		
II + III	1 (0.4)		1 (0.7)		
n	265	5	140	15	79

表3 全体および臨床症状別のエンテロトキシン産生性と型別

	全体	甚急性	急性	慢性	潜在性
-	131 (49.4%)	3 (60.0%)	64 (45.7%)	6 (40.0%)	42 (53.2%)
+	134 (50.6)	2 (40.0)	76 (54.3)	9 (60.0)	37 (46.8)
TYPE					
A	18 (13.4%)	1 (50.0%)	11 (14.5%)	1 (11.1%)	4 (10.8%)
B	36 (26.9)		27 (35.5)	3 (33.3)	6 (16.2)
C	64 (47.8)	1 (50.0)	29 (38.2)	5 (55.6)	20 (54.1)
D	15 (11.2)		9 (11.8)		6 (16.2)
AB	1 (0.7)				1 (2.7)

表4 全体および臨床症状別の TSST-1産生性

	全体	甚急性	急性	慢性	潜在性
+	91 (34.3%)	0	41 (29.3%)	6 (40.0%)	31 (39.2%)
-	174 (65.7)	5	99 (70.7)	9 (60.0)	48 (60.8)

図1 農家別検出成績

農家	Co.	SEs	TSST-1	症 例	
1	VI	C	+	●●●●●	n= 5
2	I	B	-	●●●●□□	n= 6
3	VI	C	+	●●●●●	n= 5
4	VI	C	+	●●●●●	
	II	D	-	△△△	n= 7
5	I	B	-	●●●●●●●	
	I	B	+	●	n= 8
6	VI	C	+	●●●●●	
	V	-	-	●●	n= 6
7	III	A	-	●●●☆	
	VI	C	+	●●●	n= 7
8	VI	C	+	●●●△△	
	VI	-	-	●	
	VII	-	-	△	n= 7
9	II	-	-	●△△△△△	
	II	-	+	△△	
	VI	-	-	△	
	VI	C	+	△	n=10
10	II	D	-	●●●●●●●△△△	
	II	-	-	●	
	A	-	-	●	n=13
	V	-	-	●	
11	IV	-	-	△△△△△△	
	VII	-	-	●△△△☆☆	
	III	-	-	●●□△△	
	VI	-	-	●●●●□	
	VII	-	+	●△△	
	II	-	+	●	
	III	-	+	●	
	V	-	-	△	n=28

注 ●：急性，□：慢性，△：潜在性☆：不明

Co：コアグラーゼ

SEs：エンテロトキシン

には有意な関係はなかった。

3. 臨床症状別の TSST-1産生性について表4に示した。全体では、TSST-1産生株は265株中91株 (34.3%) だった。甚急性では、5例全て TSST-1陰性だった。急性では、TSST-1産生株は140株中41株 (29.3%)、慢性では、15株中6株 (40.0%) だった。潜在性では、79株中31株 (39.2%) だった。TSST-1陽性率と、臨床症状には有意な関係はなかった。

4. 農家別に検出成績を比較した結果を、図1に示した。症例の記号は、1つが1例を示す。

調査期間中に5例以上、*S.aureus* が分離された農家11戸についてその内訳を調べたところ、11戸のうち3戸 (No.1～3) はコアグラーゼ、エンテロトキ

シン産生性とそのタイプ、TSST-1産生性が同じ組み合わせを示した。また、その他の農家も No.11を除いて、得られた菌株のほとんどが1～2種類の組み合わせに局限していた。

IV. 考 察

S.aureus は、その病原性の発現に関与するとみられる数種の酵素や毒素を産生する事が知られている^{7,18)}。たとえば、ヘモリジン、ロイコシジンは赤血球、白血球を破壊し、ヒアルロニダーゼは結合織、プロテアーゼは蛋白をそれぞれ分解する。今回著者らは、管内の牛乳房炎から分離された *S.aureus* について、その菌株の分類に利用されるコアグラーゼと、最近スーパー抗原としての関与が問題となっているエンテロトキシン、TSST-1についてその産生性を調査した。

コアグラーゼは、血漿を凝固させ毛細血管の血流を止めたり、菌体周囲にフィブリンを沈着させ、食細胞から細菌自信が身を守る作用を持つ酵素の1種で、その抗原型によりI型からVIII型に分類される、株によっては同時に2～3種の抗原型を持つものもある。人の食中毒などで分離されるものとしては、II, III, VIおよびVII型がほとんどであり、MRSAはII型が多いとされている¹²⁾。今回の調査では、全体としてはI型からVIII型まで全て検出され、その中ではVI型が最も多く、これは Matsunaga ら¹⁰⁾および Takeshige ら¹⁵⁾の報告と一致するものだった。症状別にみると、急性ではVI型が最も多く検出されたが、慢性ではIII型が最も多く、急性とは異なる分布を示した。慢性でIII型が最も多かった理由については不明だが、慢性に移行しやすいタイプと思われるので、今後さらに例数を集めて検討する必要があるものと思われた。

エンテロトキシンは人の食中毒の原因物質として問題になる毒素^{8),14)}だが、次に示す TSST-1とともに外来性スーパー抗原の1種とされている^{3,17,18,20)}。一般の抗原は、A細胞 (accessory cells, あるいは抗原提示細胞) に取り込まれ、プロセッシングを受けて断片化 (10～15個のアミノ酸からなるペプチド化)

された抗原フラグメントがMHC (major histocompatibility complex) のクラスII分子のポケット部に結合した形でA細胞表面に提示される。これを特定のT細胞クローンのTCR (T cell receptor) の α 鎖と β 鎖が共同して認識しT細胞が活性化され免疫反応が進んでゆく。しかし、スーパー抗原の場合、抗原(外毒素)がフラグメント化されずにA細胞上のMHCクラスII分子に直接結合する。さらに、これがT細胞上のTCRに認識され、T細胞が活性化される。この際TCRのV β 領域で抗原が認識されるのだが、クローンの枠を越えてV β を表現するT細胞の集団を一括して活性化する。したがって、MHCクラスII分子に結合した毒素が特定のV β を表現するほとんど全てのT細胞集団に認識され、T細胞の活性化が起こり、TNF- β 、IL-2、IFN- γ などのサイトカインの産生を引き起こす。すなわち、外来性のスーパー抗原は直接の組織傷害作用は持たないが、強烈なT細胞刺激により生体の防衛機構を過剰応答させ、生理的調節機能の破綻や組織の破壊をもたらす事が推察される。牛の乳房炎においてもこのスーパー抗原としてのエンテロトキシンとTSST-1が炎症誘起に関与している事が疑われている^{7),19),20)}。しかし、今回の調査ではエンテロトキシン陽性率は、症状別には有意な差は認められなかった。また、エンテロトキシンタイプについては全体および臨床症状別のいずれもC型が多く、特に慢性と潜在性の症例で50%以上を占めていた。C型が最も多いという報告は多いが^{9,10,15,16)}、安里はエンテロトキシン産生株の半数が、A型を産生していたと報告し¹⁾、富永らは100%の株がC型を産生していたとしている¹⁷⁾。今回C型が最も多かったが、その他のタイプもそれぞれ検出された事は、年代順に早くから搾乳牛が導入されていたという安房郡の地域性によるものではないかと考えられた。しかし、エンテロトキシンタイプと臨床症状との間には有意な関係は認められなかった。

次に毒素性ショック症候群毒素(TSST-1)は、人では手術や外傷時の感染で、この毒素により高熱や低血圧、発疹、多臓器傷害などのショック症状が引き起こされる事が知られており^{4,5)}、TSST-1陽性のものにMRSAが多いとされている。牛では、エンテロトキシンとともに乳房炎における炎症反応誘起に関わっている事が示唆されている^{17,19,20)}。しかし、今回の調査では臨床症状別にみて、有意な差は認められなかった。松永らは、エンテロトキシンC型と

TSST-1が甚急性乳房炎に関与すると報告している¹⁰⁾が、今回の調査ではエンテロトキシン陽性は5例中2例、TSST-1陽性は1例もなかった。症例1では発症の翌日死亡したが、TSST-1は陰性だった。甚急性乳房炎は例数を集める事が困難で、松永らの報告も4例と少ないため、エンテロトキシンとTSST-1の甚急性乳房炎との関わりを述べるためにはさらに継続した調査の必要があると思われた。

農家別の成績では、No.11を除いて検出された株のコアグラーゼタイプ、エンテロトキシン産生性とその型別、TSST-1産生性の組み合わせがほぼ1種類ないしは2種類である事がわかった。これは*S. aureus*の伝染力の強さを示しており、ほぼ1種類ないしは2種類の株から、*S. aureus*の汚染がその牛舎全体に広がった事を示すと思われた。Katoらは、同一分房から少なくとも8か月間エンテロトキシン産生性*S. aureus*が排菌され、その間に牛舎内の他の牛に汚染が広がった事を報告している⁸⁾。No.11の農家は1腹しぼりで牛の入れ替えの激しい牛舎で、1つの組み合わせパターンは、症状に関わらず同じ時期に集中してでていた。

また、今回の成績から、同じ組み合わせパターンを持つ株でも急性、慢性、潜在性と様々な症状を示す事がわかった。さらに、No.1の農家の症例のうち潜在性の2例は、体細胞数も少なく、エンテロトキシン、TSST-1ともに陽性にも関わらず、生体には何の影響も及ぼしていないものと考えられた。

最近、遺伝子型の異なる*S. aureus*の株では、遺伝子型により、好中球の*S. aureus*に対する殺菌効果や、食作用が異なる事が報告されており、*S. aureus*の作り出す、まだ特定されていない毒素の存在が示唆されている¹³⁾。このことから、病態に強く影響するものがエンテロトキシンやTSST-1以外の未知の物質である可能性も否定できない。

宿主側の要因としては、亜鉛、銅、セレンなどの微量ミネラル^{11,18)}や、ビタミンA、 β -カロチン¹¹⁾などが宿主の免疫能に与える影響が注目されている。また、同一個体でも周産期に免疫能が低下する事も報告されている⁹⁾事から、あるいはこの様な物質の血中濃度の違いによる宿主の抵抗力の差や、個体の感染時期が病態を決定する事が考えられる。

スーパー抗原としてのエンテロトキシンやTSST-1を産生する*S. aureus*に感染しても、症状を示さない個体について、今後さらに様々な角度から調査する事が必要であり、抗病性に優れた個体を作

り出す事が可能となると考えられた。

要 約

管内の牛乳房炎より分離された *S.aureus* のコアグラセタイプ、エンテロトキシン、毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) の産生性について調べたところ、エンテロトキシンと TSST-1 については、臨床症状別では、その産生性に有意な差は認められなかった。臨床症状を示したものは全体で、コアグラセVI型が最も多く (30.9%)、エンテロトキシン産生株は50.6%でそのうちC型が最も多かった (47.8%)。次いで、TSST-1産生株は、全体の34.3%あった。農家別では、コアグラセタイプ、エンテロトキシンタイプおよび TSST-1産生性に関連して検出される菌は、農家毎に特定のタイプに片寄る傾向がみられた。以上の結果から、エンテロトキシンと TSST-1は乳房炎の炎症誘起の要因となっている可能性は示唆しました。さらに他の細菌側の因子、あるいは宿主の免疫能が病勢を大きく左右するものと思われた。

文 献

- 1) 安里章：家畜診療，351，39～43. (1992)。
- 2) 本田武司：病気と細菌毒素，47～55，99～104. 化学同人，京都 (1994)。
- 3) 藤川浩，高山博夫，内山竹彦ら：日本細菌学雑誌，43(1)，211. (1988)。
- 4) 五十嵐英夫：感染症学誌，58，44. (1984)。
- 5) 五十嵐英夫：日本細菌学雑誌，44(1)，88. (1989)。
- 6) 五十嵐英夫，藤川浩：感染症学誌，57，113. (1983)。
- 7) Jonsson, P. and Holmberg, O.: Staphylococci and Staphylococcal Infections, (Jeliaszewicz, J.ed.) 793～801, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1981)。
- 8) Kato, E. and Kume, T.: Jpn.J. Vet. Res. 28, 75～85. (1980)。
- 9) Kashiwazaki, Y., Maede, Y., Namioka, S.: Jpn. J. Vet.Sci. 47(2), 337～339. (1985)。
- 10) Matsunaga, T., Kawata, S., Kakiichi, N. et al.: J. Vet. Med. Sci. 55(2), 297～300. (1993)。
- 11) 永幡肇：家畜診療，359，41～50. (1993)。
- 12) 岡本了一，大久保豊司，井上松久：医薬ジャーナル，27(12)，25～29. (1991)。
- 13) Sordillo, L.M., Scott, N.L., Aerestrup, F.M.: 34th National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 148～149. (1995)。
- 14) 坂口玄二：ブドウ球菌，ブドウ球菌研究会編，147～153，医歯薬出版，東京 (1986)。
- 15) Takeshige, K., Watanabe, K., Igarashi, H., et al.: Jpn. J. Vet. Sci. 45(3), 355～362. (1983)。
- 16) 寺山武：細菌毒素研究 最近の歩み，別冊蛋白質核酸酵素，69～82，共立出版，東京 (1976)。
- 17) 富永潔，横溝祐一：平成6年度学会年次総会抄録集，106～107. (1994)。
- 18) Torre, P.M., Harmon, R.J., Sordillo, L.M., et al.: 34th National mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 150～151. (1995)。
- 19) 横溝祐一，稲毛幹雄，五十嵐英夫ら：日本細菌学雑誌，45(1)，267. (1990)。
- 20) Yokomizo, Y., Mori, Y., Shimoji, Y., et al.: J. Vet. Med. Sci. 57(2), 299～305. (1995)。
- 21) Zavizion, B., Bramley, A.J., Politis, I., et al.: J. Dairy Sci. 78, 277～284. (1995)。