

# 手指付着 coagulase negative staphylococci の 菌種と宿主 ABO 式血液型の関係

美祢弘子\*<sup>1</sup> 小場美穂\*<sup>2</sup> 河原和枝\*<sup>1</sup>

## 要 約

ヒトの皮膚常在菌の一種である coagulase negative staphylococci (CNS) には *S.epidermidis* や *S.capitis* ほか16種が含まれている。宿主の ABO 式血液型と分離される CNS の菌種との関係を各血液型宿主より200個ずつの CNS を分離し、API-STAPH 法によりそれらの菌種を同定して比較した。

A 型宿主からは *Staphylococcus epidermidis* が118株 (59%), *S.capitis* が28株 (16%), その他 CNS が54株 (25%) 分離された。B 型宿主からは *S.epidermidis* が146株 (73%), *S.capitis* が8株 (4%), その他 CNS が46株 (23%) 分離された。AB 型宿主からは *S.epidermidis* が123株 (62%), *S.capitis* が17株 (9%), その他 CNS が57株 (29%) 分離された。すなわち、これら3種類の宿主からは *S.epidermidis* が50%以上の高率で分離され、*S.capitis* は16%以下の低率でしか分離されなかった。これに対し O 型宿主からは *S.epidermidis* が50株 (25%), *S.capitis* が49株 (25%) とほぼ同率分離され、その他の CNS は101株 (50%) 分離された。今回は *S.capitis* が *S.epidermidis* よりも高率に O 型宿主より分離される点に注目し、原因を解明するために三つの仮説を立てて各種の実験を行った。この結果、*S.capitis* は *S.epidermidis* に比較すると O 型的性状を示すニワトリ赤血球に結合しやすいことや、O 型特異糖である fucose を利用しやすいことなどが明らかとなった。これらの結果は *S.capitis* が *S.epidermidis* に比較すると O 型宿主に定着しやすいことを示唆すると考えられた。

## 緒 言

ヒトの皮膚には数多くの微生物が付着しているが常在菌の菌種はあまり多くない<sup>1,2)</sup>。代表的なものは好気性細菌である *Corynebacterium* sp.<sup>3)</sup> と *Micrococcus* sp.<sup>4)</sup>、偏性嫌気性細菌である *Propionibacterium acnes*、通性嫌気性細菌である coagulase negative staphylococci (CNS) および好気性の酵母類である *Pityrosporum* sp. の5種類の微生物である。ただし、CNS には *S. epidermidis* や *S. capitis* ほか16菌種が存在する<sup>5,6)</sup>。

皮膚常在菌の種類は宿主の身体部位、年齢および性別などの性状によって異なる<sup>7)</sup>とされているが、これを証明するきちんとしたデータは少ない<sup>7,8)</sup>。我々はヒトの皮膚常在菌の一種である CNS の protease 産生性や機器への接着性等の研究を行ってきた<sup>8-11)</sup>。今回、ABO 式血液型が異なる4種類のヒト宿主から CNS を分離して菌種同定を行ったところ、宿主の血液型が異なると異なる菌種が分離さ

れることが明らかとなった。すなわち A 型、B 型および AB 型宿主からは CNS の一種である *Staphylococcus epidermidis* が高率で分離されるが同じく CNS の一種である *S. capitis* は分離率が低かった。これに対して O 型宿主からの *S. epidermidis* の分離率は低く、*S. capitis* の分離率が比較的高かった。

ABO 式血液型は赤血球細胞の表層だけでなく、皮膚も含めた各種臓器の細胞表層においても示され、その化学的本体は特殊な糖鎖構造であることも明らかとなっている。また、ABO 式血液型はヒトなどの高等生物だけでなく細菌類においても見られることから宿主の血液型と定着する細菌の間に何らかの相関関係があるのではないかと考えられている。

今回 ABO 式血液型の異なる宿主から分離される CNS の種類が異なることが示されたので、この原因を究明するため次のような3種類の仮説を立てた。仮説1: *S. capitis* の細胞表層が O 型に類似しているため O 型宿主から排除されにくい。これに対し *S. epidermidis* の細胞表層は AB 型に類似し

\*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 \*2 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻  
(連絡先) 美祢弘子 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

ているため O 型宿主からは排除されやすい。仮説 2: *S. capitis* の細胞表層には O 型細胞に対するレセプターが存在するが *S. epidermidis* にはこのレセプターが存在しない。その結果 *S. capitis* は O 型宿主に定着しやすくなる。仮説 3: *S. capitis* は O 型の特異糖である fucose を栄養源として利用しやすく, *S. epidermidis* はこれを利用しにくい。このため *S. capitis* は O 型宿主において増殖しやすく定着量も増える。これらの 3 種類の仮説をもとに実験を行ない考察した。

## 実験方法

### 1. CNS の分離同定方法

A 型, B 型, AB 型および O 型の 4 種類の ABO 式血液型宿主各 10 名の右手人差し指を Brain Heart Infusion 平板培地 (BHIA) になすりつけて 35°C で 2 日間培養した。まず肉眼判定で *Staphylococcus* 属と思われる白色小型の colony を選択し, 定法によりグラム染色と形態観察を行い, グラム陽性のブドウ球菌であることを確認後 coagulase テストをほどこし, 陰性の CNS を得た。CNS は一人あたり 20 個, 計 800 個を収集した。次にこれらの CNS を API-STAPH 同定キット (Biomerieu 社) を用いて菌種同定を行った (同定確率 80% を採用した)<sup>12)</sup>。これらの菌株を用いて生物学的および生化学的性状検査をする場合には新鮮な BHIA 培養菌を蒸留水に洗浄浮遊させ, マイクロプレートリーダーにより 415nm の吸光度 ( $A_{415}$ ) が 0.4 となるように蒸留水に再浮遊して濃度調整したものを種菌液として用いた<sup>11)</sup>。

### 2. 培養方法

培地としては日笠らの開発した完全合成培地を使用した<sup>11)</sup>。培地は基本的な塩類およびビタミン類と C 源として glucose, N 源として 14~16 種類の amino acid を含み, pH は 7.0 に調整してある。含有する amino acid の種類によって①~⑧の 8 種

類の培地ができる (表 1)。これらの培地は 14 種類の amino acid (arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophan, tyrosine, および valine) を共通に含み, alanine, serine, および lysine の 3 種類の amino acid を組み合わせで添加されている。常在菌は宿主細胞の化学的な表層構造や分泌物など様々な環境要因の影響を受けると考えられるので今回は amino acid 組成の異なる 8 種類の培地を使用して培養性状の比較をおこなった。直径 90mm のシャーレにこれら 8 種類の培地 20ml と種菌液 100 $\mu$ l を入れ, 35°C で 2 日間培養した。培養液を遠心洗浄後, 菌を PBS に再浮遊させ, 1 と同様な方法で  $A_{415} = 0.4$  となるように濃度調整して実験菌液とした。分離菌株の中から *S. epidermidis* KOB-11 株と *S. capitis* MAS-4 株を選び, それぞれの菌種の代表として実験に使用した。

### 3. 抗 A, 抗 B 抗体と菌の凝集反応実施方法

血球凝集板に抗 A ヒトモノクローナル抗体 (国際試薬株式会社: 日本) または抗 B ヒトモノクローナル抗体原液 200 $\mu$ l と 8 種類の培地で培養した *S. epidermidis* または *S. capitis* の実験菌液 200 $\mu$ l の計 400 $\mu$ l を分注し, よく混合した後室温で一晩静置した。ホール全体に菌が広がって沈殿しているものを凝集+, ホール中央に菌が集結しているものを凝集-, 菌がホールの半分程度に広がり少量の菌が中央に集結しているものを凝集土と肉眼で判定した。

### 4. ニワトリ赤血球と菌の凝集反応実施方法

O 型細胞としてはヒト O 型赤血球が適しているが, 実験に使用しにくいいため, まず O 型を示す動物血球を予備実験で選んだ。市販の動物血球 8 種 (ニワトリ, ウマ, ガチョウ, ウシ, モルモット, ブタ, メンヨウ, ウサギ) を用いて 3 に述べた方法で凝集反応を行い, 抗 A および抗 B の両抗体原液と凝集しなかったものを O 型血球とした。ニワトリ, ウマおよびガチョウの 3 種が O 型を示したが非凝集像が最も

表 1 実験に使用した培地の amino acid 組成  
14 種の amino acid 名は本文参照。

培地	N 源	amino acids
①		14種 amino acids
②		14種 amino acids + alanine
③		14種 amino acids + serine
④		14種 amino acids + lysine
⑤		14種 amino acids + alanine + serine
⑥		14種 amino acids + alanine + lysine
⑦		14種 amino acids + serine + lysine
⑧		14種 amino acids + alanine + serine + lysine

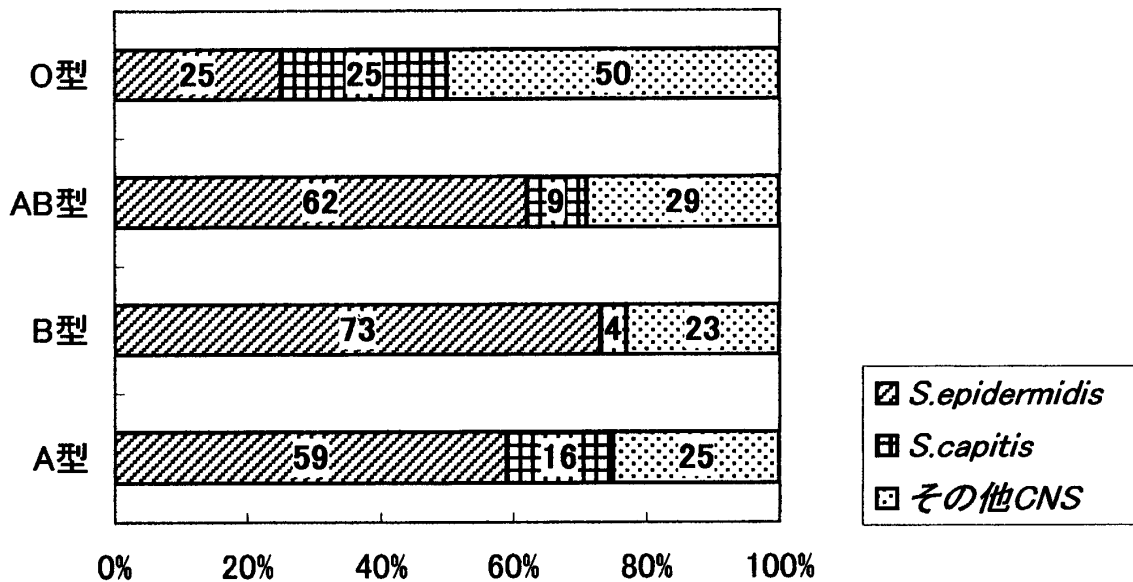


図1 宿主 ABO 式血液型と分離 CNS 菌種の関係

図中各コラム中の数字はそれぞれの宿主から分離される頻度 (%) を示している。O 型宿主からの *S. capitis* およびその他 CNS の分離頻度は A, B, および AB 型宿主からの分離頻度と比較して統計学的に有意に高かった ( $p < 0.05$ )。しかし、*S. epidermidis* の分離頻度の宿主血液型による統計学的な差異は認められなかった。

明瞭であったニワトリの赤血球を O 型細胞として以後の実験に使用した。また、未処理のニワトリ赤血球が菌と凝集反応を示さなかったため、定法に従い凝集反応を促進する目的でニワトリ赤血球を papain (和光社：日本) で処理した。処理条件は予備実験を行って決定した。ニワトリ無菌保存血 (日生研：日本) を遠心洗浄後、PBS に 10% となるように再浮遊した。10% ニワトリ赤血球液 50ml に 0.02% papain 液 (PBS に溶解) 50ml を混合後 37℃ で 1 時間処理した。処理後、ニワトリ赤血球を PBS で 3 回遠心洗浄し、最終的に 2% となるように PBS に浮遊させ papain 処理ニワトリ赤血球液 (以後処理赤血球液) とした。実験菌液 200 $\mu$ l と処理赤血球液 200 $\mu$ l を凝集板に入れて室温で 3 時間反応させた。菌と赤血球の結合物がホール全体に広がって沈殿したものを凝集+, 菌と赤血球がホール中央に集結して沈殿したものを凝集-, 菌と赤血球の結合物がホールの半分程度に広がり、菌と赤血球の一部がホール中央に集結して沈殿したものを凝集±と肉眼で判定した。

#### 5. 血液型特異糖の CNS の増殖に及ぼす影響の測定法

先に述べた 8 種類の培地中の C 源の glucose に代えて A 型特異糖である N-acethylgalactosamine (GalNac), B 型特異糖である galactose (Gal), および O 型特異糖である fucose (Fuc) を加えて増殖量を比較した。これらの糖はすべて NACALAI 社製 (日本) のものを用い、培地中の終濃度は 0.2% とした。培養後菌液をコンラージ棒を用いて均一にして A<sub>415</sub> 値を求め、あらかじめ作成しておいた 1 ml あたりの colony forming unit (CFU) 数と A<sub>415</sub> 値の

相関曲線を利用して増殖量を CFU 数として表した。

#### 結果と考察

今回の実験の結果、分離された CNS は 10 種類におよんだ。*S. epidermidis* と *S. capitis* 以外の菌種は分離頻度が低かったためその他 CNS としてまとめた。図 1 に示すように、A 型宿主からは CNS 200 株中 *S. epidermidis* が 118 株 (59%), *S. capitis* が 28 株 (16%) その他 CNS が 54 株 (25%) 分離された。B 型宿主からは 200 株中 *S. epidermidis* が 146 株 (73%), *S. capitis* が 8 株 (4%), その他 CNS が 46 株 (23%) 分離された。AB 型宿主からは 200 株中 *S. epidermidis* が 123 株 (62%), *S. capitis* が 17 株 (9%), その他 CNS が 57 株 (29%) 分離された。このように、これら 3 種類の血液型宿主からは *S. epidermidis* が 50% 以上 (59~73%) の高率で分離され、*S. capitis* の分離率は低かった (4~16%)。これに対して、O 型宿主からは 200 株中 *S. epidermidis* が 50 株 (25%), *S. capitis* が 49 株 (25%), その他 CNS が 101 株 (50%) 分離された。そこで O 型宿主と他の 3 種類の血液型宿主における *S. capitis*, その他 CNS, および *S. epidermidis* の分離頻度の違いを統計学的に検討した。その結果 O 型宿主からの *S. capitis* とその他 CNS の分離頻度は A, B, および AB 型宿主からの分離頻度より有意に ( $p < 0.05$ ) 高かった。一方 O 型宿主からの *S. epidermidis* の分離頻度は平均的には A, B, および AB 型宿主からより分離頻度が低かったものの個人差が大きく統計的な有意差は示されなかった。

また、*S. epidermidis* 分離菌株 437 株の中から

表2 実験に使用した培地の amino acid 組成  
14種の amino acid 名は本文参照.

抗原	抗体	培地							
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
<i>S.epidermidis</i>	抗A血清	-	-	-	-	-	-	-	-
	抗B血清	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.capitis</i>	抗A血清	+	-	+	+	-	-	±	-
	抗B血清	+	-	+	+	-	-	±	-

KOB-11株を, *S.capitis* 102株の中から MAS-4株を予備実験の結果それぞれの菌種の代表株として選び, 両者のどのような性状が宿主に対する定着性状の差をもたらすかを緒言に述べた3種類の仮説を立てて実証する実験に用いた.

1. 宿主 ABO 式血液型と分離 CNS 菌種の関係
2. *S.epidermidis* と *S.capitis* の細胞表層の血液型性状

8種の培地で培養した *S.epidermidis* と *S.capitis* の抗Aヒト抗体と抗Bヒト抗体との凝集反応の結果を表2に示した. *S.epidermidis* は8種類の培地由来のものすべてが抗Aおよび抗B両抗体とも全く凝集反応を示さなかった. この結果は *S.epidermidis* の細胞表層がO型的であることを示している. これに対して *S.capitis* における凝集性状は由来した培地の種類によって異なっていた. すなわち, 抗Aおよび抗Bの両抗体とも①, ③, ④, ⑦の alanine を含まない4種類の培地由来の *S.capitis* と凝集を示し, alanine を含む②, ⑤, ⑥, ⑧の4種類の培地由来の *S.capitis* は両抗体とは凝集を示さなかった. このように *S.capitis* は培地中に alanine が存在するとO型的になるが, 培地に alanine が存在しない場合にはAB型的となることが示された. これらの結果は *S.capitis* が *S.epidermidis* に比較するとO型

的性状が強く, O型宿主の産生する抗体(抗Aおよび抗B抗体)による排除から免れやすいという仮説1に反するものであった.

### 3. Papain 処理ニワトリ赤血球との凝集反応

8種の培地で培養した *S.epidermidis* および *S.capitis* の実験菌液と papain 処理したニワトリ赤血球(O型性状を示す)との凝集反応を行った結果, 図2に示すように *S.epidermidis* は①, ②, ③, ④, ⑤, ⑧の6種の培地由来のもので凝集反応を示さず, ⑥及び⑦培地由来のものでは弱い凝集を示した. これに対し, *S.capitis* では③, ④, ⑤, ⑦, ⑧の5種の培地由来の菌が強い凝集を示し, ①および⑥の2種の培地由来の菌が弱い凝集を示した. まったく凝集しなかったのは②の培地由来の菌のみであった. ニワトリ赤血球との結合力に関しては培地中の特定の amino acid の含有の有無との関連は示されなかった. これらの結果は, *S.capitis* の細胞表層にはO型細胞に結合するためのレセプターが多く存在するが, *S.epidermidis* の細胞表層にはこのようなレセプターが少ないことを示しており, 仮説2は肯定された. しかし培地によってレセプターの量が増えるなど, まだ解決しなければならぬ問題点も多く, 今後は CNS の結合実験に適した各種血液型細胞あるいは組織を検討すること等により, レ

菌種	培地	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
		<i>S.epidermidis</i>							
	判定	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S.capitis</i>									
	判定	+	-	++	++	++	+	++	++

図2 *S.epidermidis* および *S.capitis* の血液型性状  
表中の+, ±, および-は菌抗原と抗体(抗Aまたは抗B血清)の凝集結果を示している.

表3 血液型関連糖の増殖に及ぼす影響  
 表中の数字は 1 ml あたりの CFU 数×10<sup>-9</sup> 値を示している。

菌種	培地	糖		
		Fuc (O型)	Gal (B型)	GalNac (A型)
<i>S.epidermidis</i>	①	1.0	1.2	1.0
	②	2.2	6.2	0.2
	③	3.0	6.4	2.6
	④	1.0	1.6	1.0
	⑤	6.0	8.2	5.2
	⑥	2.4	4.6	2.2
	⑦	1.0	4.0	1.0
	⑧	4.4	7.6	4.6
<i>S.capitis</i>	①	4.4	4.6	4.0
	②	5.4	5.6	4.6
	③	5.8	5.8	5.6
	④	4.8	5.0	4.6
	⑤	6.4	6.8	6.4
	⑥	5.8	5.8	5.6
	⑦	5.6	5.4	5.2
	⑧	7.4	7.6	7.4

セプターのさらなる解析が必要であると思われる。

4. 培地中の糖の増殖に及ぼす影響

表3に培地中の糖を glucose に代えて3種の血液型特異糖を添加した場合の増殖量を示す。このように、*S.capitis* は8種の培地すべてにおいて3種類の血液型特異糖のどれを加えてもほぼ同様の強い増殖を示した。一方、*S.epidermidis* ではB型に特異的なGalを添加した場合には②, ③, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧の6種の培地において強い増殖を示し、①と④の2種の培地において非常に弱い増殖しか示さなかった。これに対して、A型に特異的なGalNacおよびO型に特異的なFucを添加すると、強い増殖のみられたのは⑤と⑧の2種類の培地のみであり、①, ②, ③, ④, ⑥, ⑦, の6種類の培地では増殖が非常に弱かった。培地中の amino acid の違いによりなぜこのような増殖量の差が生じるのかは現在解析中である。いずれにしても *S.capitis* はA型, B型, O型のいずれの特異糖をもエネルギー源として利用可能であるが *S.epidermidis* はB型特異糖であるGalは利用しやすいがA型特異糖であるGalNacやO型特異糖であるFucを利用しにくく、これらの結果が *S.capitis* がO型宿主に常在しやすい原因の一つとなっているとえられ、仮説3が部分的ではあるが肯定された。

おわりに

今回の実験で、O型宿主のみから *S.capitis* が *S.epidermidis* と同程度の高頻度で分離されることが明らかとなった。これまでの宿主の血液型に関係のないCNSの分離報告では、*S.epidermidis* の分離頻度が最も高く約50%<sup>13)</sup>とされている。

この数値は今回我々が得たデータを血液型に関係なく平均した値(55%)とほぼ一致している。今回、*S.capitis* がO型宿主から比較的に高頻度で分離された原因として、この菌の細胞表層に存在するレセプターやO型特異糖である fucose の利用能の高さなどが示唆された。多分この他の要因も含めて様々なものが組み合わせられて宿主に対する定着菌種が決定されると考えられる。一方CNSの性状も固定したものではなく、環境要因により変化することも示唆された。今後は宿主の状態の再現やこれらの菌の定着実験に適した細胞あるいは組織の開発を行っていきたい。

本研究は川崎医療福祉大学平成10年度プロジェクト研究の補助を受けた。また、本研究を実施するにあたり協力をいただいた臨床栄養学専攻、修士課程4期生尾池麗さん、日笠友美さん、臨床栄養学科7期生久保美春さん、長町聡子さん、増田千鶴さんに深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Marples MJ (1969) The normal flora of the human skin. *British Journal of Dermatology*, **81**, 2-13.
- 2) 朝田康夫 (1978) 皮膚常在菌叢. 小沢 敦, 波岡茂夫, 坂崎利一, 松本文夫, 玉熊正悦 編, 臨床細菌学, 初版, 講談社サイエンティフィック, 東京, pp71-83.
- 3) Marples RR (1969) Diphtheroids of normal human skin. *British Journal of Dermatology*, **81**, 47-54.
- 4) Noble WC (1969) Distribution of the micrococaceae. *British Journal of Dermatology*, **81**, 27-32.
- 5) Gemmell CG (1986) Coagulase-negative staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*, **22**, 285-295.
- 6) Kloos WE and Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**(1), 117-140.
- 7) Somerville DA (1969) The effect of age on the normal bacterial flora of the skin. *British Journal of Dermatology*, **81**, 14-22.
- 8) 美禰弘子, 二宮健司 (1997) 加齢による手指付着 coagulase negative staphylococci の性状変化. 川崎医療福祉学会誌, **7**(2), 359-363.
- 9) 二宮健司, 美禰弘子 (1999) *Staphylococcus epidermidis* の産生する protease の性状について. 川崎医療福祉学会誌, **9**(1), 103-111.
- 10) 尾池 麗, 日笠友美, 美禰弘子 (2000) コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の Slime 産生量に及ぼす茶類の影響. 川崎医療福祉学会誌, **10**(1), 155-162.
- 11) 日笠友美, 尾池 麗, 美禰弘子 (2000) コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の既知組成培地に関する研究. 川崎医療学会誌, **10**(1), 163-169.
- 12) Gemmell CG and Dawson ED (1982) Identification of coagulase-negative staphylococci with the API Staph system. *Journal of Clinical Microbiology*, **16**(5), 874-877.
- 13) 小林寛伊 (1988) コアグララーゼ陰性ブドウ球菌感染症の現状. 化学療法の領域, **4**(12), 33-39.

(平成13年4月28日受理)

## Relationship between the Species of Isolated Coagulase Negative Staphylococci and The ABO-Blood Type of The Host

Hiroko MINE, Miho KOBAYASHI and Kazue KAWAHARA

(Accepted Apr. 28, 2001)

Key words : COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI, STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS, STAPHYLOCOCCUS CAPITIS, ABO-BLOOD TYPE, RESIDENT MICROBE OF SKIN

### Abstract

Coagulase negative staphylococci (CNS) are a kind of bacteria normally found on human skin (resident bacteria) and include *Staphylococcus epidermidis*, *S. capitis* and 16 other species. In this study, the relationship between isolated species of CNS and the ABO blood type of the host on which they were found was investigated. For this purpose, 200 CNS colonies were isolated from hosts of each blood type and identified by the method of API-STAPH system.

One hundred and eighteen strains (59%) of *Staphylococcus epidermidis*, 28 strains (16%) of *S. capitis* and 54 strains (25%) of other CNS species were isolated from hosts with blood type A. One hundred and fortysix strains (73%) of *S. epidermidis*, 8 strains (4%) of *S. capitis* and 46 strains (23%) of other CNS species were isolated from hosts with blood type B. One hundred and twentythree strains (62%) of *S. epidermidis*, 17 strains (9%) of *S. capitis* and 57 strains (29%) of other CNS species were isolated from hosts with blood type AB. Thus, *S. epidermidis* was isolated at high frequency (over 50 %) and *S. capitis* was isolated at low frequency (under 16%) in hosts with those three blood types.

On the other hand, 50 strains (25%) of *S. epidermidis*, 49 strains (25%) of *S. capitis* and 101 strains (50%) of other CNS species were isolated from hosts with blood type O.

Three hypotheses were proposed and experiments were carried out to explain the data showing a lower isolation rate of *S. epidermidis* and a higher rate of *S. capitis* in hosts with blood type O.

It was found that *S. capitis* combined more easily with O type chicken red blood cells and also easily utilizes the O type specific sugar, fucose, better than *S. epidermidis*. These data indicate that *S. capitis* has greater tendency to reside on hosts with O type blood.

Correspondence to : Hiroko MINE

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions  
Kawasaki University of Medical Welfare  
Kurashiki, 701-0193, Japan  
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.11, No.1, 2001 141-147)