
短報

**B群レンサ球菌の溶血素抽出
に関する基礎的検討**

岡崎則男、鈴木理恵子、山井志朗

**Studies on Hemolysin Extraction
from
Group B streptococci**Norio OKAZAKI, Rieko SUZUKI
and Shiro YAMAI**はじめに**

B群レンサ球菌 (group B streptococci、以下 GBS) は新生児細菌感染症の重要な原因菌で、肺炎、敗血症および髄膜炎などの重篤な疾患を引き起こす¹⁻³⁾。これらの感染症の発症機構は現在も明らかにされてはいないが、最近、GBS の溶血素が発症に関与することが示唆されている⁴⁻⁶⁾。この溶血素の活性は血液寒天培地上では比較的明瞭に観察されるものの、液体培地中に産生される溶血素は極めて不安定で、その活性を確認することは困難であった。このことが障害となり、A、C および G 群レンサ球菌の産生するストレプトリシン O やストレプトリシン S 等の溶血素と比べ研究が遅れていた。しかし、Marchlewicz and Duncan⁷⁾により、GBS 菌体から溶血素を抽出する方法が見い出されてから研究に進展が見られ、最近では、Nizet ら^{4,5)}が溶血素による肺細胞の破壊そして Ring ら⁶⁾は敗血症性ショックの誘発を報告し注目されている。

溶血素の発症への関与をより明確にするためには、その病原作用を追究することと同時に多数の GBS 分離株について溶血活性を調べることも重要と考えられる。一方で、溶血活性測定方法については確立されたものがなく、再現性のある測定を行うことは容易ではない現状にある。著者らは溶血活性を調べる際の GBS の培養方法を含めいくつかの条件を検討し、知見を得たので報告する。

材料と方法

健康妊婦より分離された No. 1 (I a 型) と No. 2 (III) の2株ならびに新生児患者から分離された No. 3 (III)、No. 4 (NT 6) および No. 5 (JM 9) の3株、計5株の GBS を供試した。これらの菌株を Todd-Hewitt broth (Difco) (以下 THB) 3 ml で37°C、18時間培養後、各培養液をリン酸緩衝食塩液、pH 7.2 (以下 PBS) にて1/100に希釈した。PBS 希釈液 0.1 ml を必要な本数の THB 10 ml および5%仔牛血清 (Gibco) 添加⁷⁾ THB 10 ml に接種し、37°Cで好気培養した。経時的 (6、9、12、15、18および24時間) に培養液を採取し、波長 540 m μ における増殖濁度を測定後、6,000 xg、10分間遠心して GBS 菌体を得た。尚、上記培養時間ごとに各菌株につき3本の THB 培養液を使用した。菌体を PBS で洗浄後、濁度を1.0に調整し、更に濃縮して以下の実験に使用した。

GBS 菌体からの溶血素抽出は次のような方法で行った。PBS にブドウ糖0.2%を加えて PBSG とし、これに可溶性デンプン (Difco) (以下デンプン) 1%および Tween 80 (Difco) 3%を加え、既報の抽出液⁷⁾を作成した。また、この抽出液組成中の Tween 80 を酵母エキス (Difco) 0.5%に換えた修正抽出液を併せて使用した。それぞれの抽出液に GBS 菌体を浮遊させ、37°C、15分間反応後、6,000 xg で10分間遠心し、得られた上清を溶血素試料とした。

溶血活性の測定は丸底マイクロプレート (96ウェル、住友ベークライト) を使用し以下のように行った。溶血素試料50 μ l を PBS で2倍階段希釈後、1%ヒツジ赤血球 PBS 浮遊液50 μ l を加え、更に PBS 100 μ l を加えて各ウェルの総量を200 μ l とした。マイクロプレートを振盪し、37°C、60分間の溶血反応を行った⁷⁾。その後、マイクロプレートを740 xg で5分間遠心し、上清100 μ l を別の平底マイクロプレート (96ウェル、住友ベークライト) に採取し、マイクロプレートリーダー (Model 400、BIO-RAD) にて波長420m μ における吸光度を測定した⁴⁾。溶血活性測定は2ウェル法で実施し、溶血力価は50%溶血を1溶血単位 (以下 HU) として算出した。

結果と考察

表1に溶血素抽出液組成と抽出された溶血素の活性を示した。この実験には、仔牛血清添加 THB で9時間あるいは18時間培養後、10倍に濃縮した GBS (No. 4) 菌体を使用した。18時間培養の GBS 菌体においては溶血活性は4 HU と極端に低かった。9時間培養菌体では、PBSG、デンプンおよび酵母エキスから成る修正抽出液を使用した時に356 HU の溶血活性を示し、最高値が得

られた。一方で、PBSG、デンプンおよび Tween 80 を

表1 GBS(No. 4)菌体からの溶血素抽出における抽出液組成の影響。

抽出液組成	溶血活性(HU)	
	GBSの培養時間	
	9h	18h
PBSG	<2	<2
+ 3% Tween 80+1% デンプン	164	4
+ 0.5% 酵母エキス+1% デンプン	356	4

表2 溶血素抽出における GBS(No. 4)菌体濃度の影響。

菌体濃度	溶血活性 (HU)
対照 ¹⁾	<10
x2 ²⁾	11
x4	205
x8	374
x16	358
x32	307
x64	234

¹⁾540m μ における濁度を1.0に調整。

²⁾対照に対する濃縮倍率。

組み合わせた従来の抽出液においては164 HU で、溶血活性は1/2以下であった。また、抽出液に浮遊させる GBS 菌体の濃度を検討すると、表2のように、4倍濃縮菌体から急激に溶血活性が上昇し、8倍濃縮で374 HU と最高値となった。16倍濃縮菌体でも高い活性が維持されたが、32倍以上では漸次低下する傾向が見られた。以上の結果から、GBS 溶血素の抽出には酵母エキスを添加した修正抽出液と8~16倍濃縮菌体を使用するのが適切と判断された。

GBS の溶血素は菌体表面に存在し、菌体から遊離すると極めて不安定であるが、周囲にデンプン、アルブミンおよび Tween (40または80) 等の高分子物質 (carrier) が存在すると、それらと結合し安定化するとされる^{4,7)}。また、赤血球のような標的細胞が近接していると菌体から遊離してそれに直接作用すると推定されている⁸⁾。上記 carrier 高分子物質の内、GBS 菌体からの溶血素抽出には Tween とデンプンの組み合わせが汎用されるが、界面活性剤である Tween はそれ自体が溶血作用を持っていることから、溶血活性を観察する際に使用することは好ましくないと考えられた。今回はその Tween に換

えて、細菌の溶血素産生用培地にしばしば添加される酵母エキス^{9,10)}の使用を試みた。その結果、上述のように酵母エキスは GBS の溶血素抽出に使用可能であり、その上に Tween よりも有用であることが判明した。

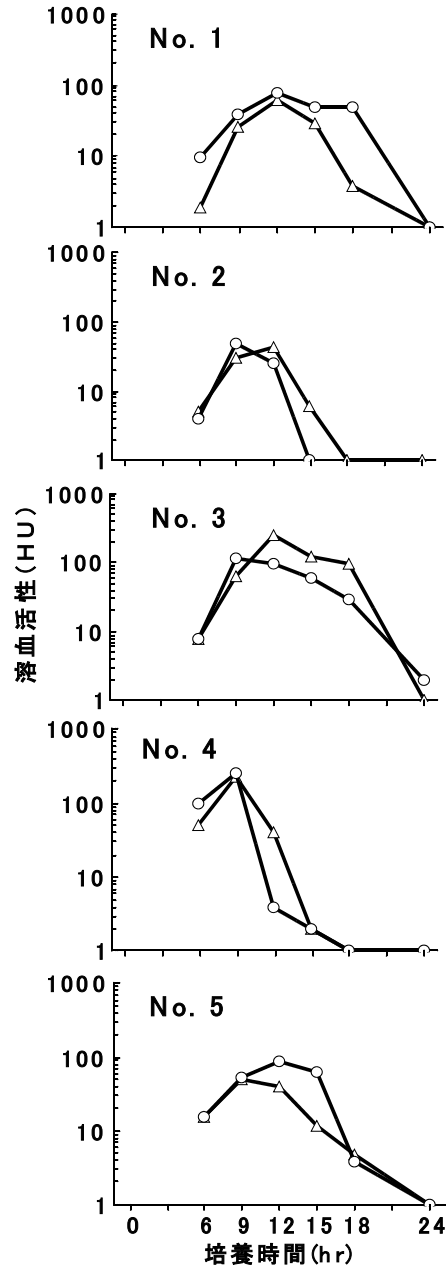


図1 GBS 分離株5株(No. 1~5)からの溶血素抽出における培養時間と培地への仔牛血清添加の影響。○は仔牛血清添加、△は同無添加。

溶血活性に及ぼす GBS の培養条件を検討した成績を図1に示した。溶血素の抽出には上記の修正抽出液と10倍濃縮菌体を用いた。まず、培地への仔牛血清添加の影響を観察すると、全体的に血清の存在が GBS の溶血活性を向上させる傾向は見られなかった。各菌株共に血清添加と無添加培地間における増殖の差異はなかった。培

養時間に注目すると、9～12時間の培養、即ち対数増殖期終期ないしは終止期初期で溶血活性は最高となった。一方、5株中3株 (No. 2、4および5) が18時間培養後には活性を失うか著しく低下した。

溶血活性を調べる際の GBS の培養には、仔牛血清が必須とする報告⁷⁾と必要としない報告⁴⁾がある。著者らの調べた限りでは、血清添加の溶血活性に及ぼす影響は観察されなかったことから、仔牛血清の添加は不可欠ではないように思われる。GBS の溶血活性にはむしろ GBS の培養時間の影響が大きく、今実験においては、溶血活性が最高となったのは培養9ないしは12時間後で、18時間後には著しく低下する菌株があった。この培養時間についても対数増殖期の後期^{4, 11)}あるいは18時間培養後⁷⁾との報告があり、定まった見解が示されていないが、過剰な培養は避けるべきで、対数増殖期後期ないしは終止期初期の菌体を使用するのが適切と考えられる。

GBS は新生児感染症の起因菌ではあるが、健康妊婦の膣にも20%程度に常在しているとされる^{2, 12)}。また、起因菌の血清型は特定のものに集中する傾向が見られ、我が国ではⅢ型菌が圧倒的に多い^{13, 14)}。従って、溶血素と発症との関わりを追究するためには由来あるいは血清型を考慮した多数の GBS 分離菌株につき溶血活性を調べる必要があると考えられる。このような観点から、本報において GBS の溶血活性測定に関わる条件がある程度把握できたことは有意義と思われる。

文献

- 1) Ablow, R. C., Driscoll, S. G., Effmann, E. L., Gross, I., Jolles, C. J., Uauy, R. and Warshaw, J. B. : A comparison of early-onset group B streptococcal neonatal infection and the respiratory distress syndrome of the newborn, *N. Engl. J. Med.*, **294**, 65-70(1976)
- 2) Baker, C. J. and Edwards, M. S. : Group B streptococcal infections. *In* Remington, J. and Klein, J. O., ed. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 980-1054(1995)
- 3) Weisman, C. L. E., Stoll, B. J., Cruess, D. F., Hall, R. T., Merenstein, G. B., Hemming, V. G. and Fischer, C. G. W. : Early-onset group B streptococci sepsis: A current assessment, *J. Pediatr.*, **121**: 428-433(1992)
- 4) Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M. and Rubens, C. E. : Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells, *Infect. Immun.*, **64**: 3818-3826 (1996)
- 5) Nizet, V., Gibson, R. L. and Rubens, C. E. : The role of group B streptococci β -hemolysin expression in newborn lung injury, *Adv. Exp. Med.*, **418**: 627-630(1997)
- 6) Ring, A., Braun, J. S., Nizet, V., Stremmel, W. and Shenep, J. L. : Group B streptococcal β -hemolysin induced nitric oxide production in murine macrophages, *J. Infect. Dis.*, **182**: 150-157(2000)
- 7) Marchlewicz, B. A. and Duncan, J. L. : Properties of a hemolysin produced by group B streptococci, *Infect. Immun.*, **30**: 805-813(1980)
- 8) Platt, M. W. : In vitro hemolytic activity of group B streptococcus is dependent on erythrocyte-bacteria contact and independent of a carrier molecules, *Curr. Microbiol.*, **31**: 5-9(1995)
- 9) Duncan, J. L. : Streptococcal growth and toxin production in vivo, *Infect. Immun.*, **40**: 501-505 (1983)
- 10) Gerlach, D., Kohler, W., Gunther, E., and Mann, K. : Purification and characterization of streptolysin O secreted by *Streptococcus equisimilis* (group C), *Infect. Immun.*, **61**: 2727-2731(1993)
- 11) Dal, M.-C. and Monteil, H. : Hemolysin produced by group B *streptococcus agalactiae*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**: 89-94(1983)
- 12) 後藤節子、杉山正子 : B群溶連菌(GBS)感染症の垂直感染とその予防、産婦人科治療、57: 681-686(1988)
- 13) 門井伸暁、仁志田博司 : B群レンサ球菌感染症、小児内科、17: 1523-1527(1985)
- 14) 保科 清、鈴木葉子、小野川尊、天野祐次 : 新生児B群溶連菌感染症の発症予防のためのスクリーニング、感染症誌、61: 561-569(1987)

