

アトピー性皮膚炎患者由来黄色ブドウ球菌の毒素産生性と生物学的性状

Production of Various Toxins and Some Biological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates in Atopic Dermatitis

砂川 紘之 池田 徹也 久保亜希子
武士 甲一 内野 栄治 都築 俊文
米川 雅一 長谷川 浩*

Hiroyuki Sunagawa, Tetsuya Ikeda, Akiko Kubo,
Kouichi Takeshi, Eiji Uchino, Toshifumi Tsuzuki,
Masaichi Yonekawa and Hiroshi Hasegawa

目 的

近年、アトピー性皮膚炎（以下、ADと略す。）の患者は増加傾向にあり、また小児期のみでなく大人になっても治癒しなかったり、大人になってから発症したりして多くの患者が長期間にわたって悩まされている。その治療には、ステロイドや漢方薬などの薬剤を用いる薬剤療法や、食餌の成分を制限したり有害物質の含まれる可能性の低い食品を選択するなどの食餌療法が行われている。しかし、それらの治療法はいずれも顕著な効果を示すものになり得ていないのが現状である。

一方、AD患者の患部には多数の黄色ブドウ球菌が存在し、患部の増悪因子として作用しているとされている。また、これらの黄色ブドウ球菌は、スーパー抗原として作用する各種の毒素を産生し、そのため患部の増悪が進行するとも報告されている¹⁾。

温泉入浴療法は有史以来わが国を含め多くの国々で皮膚疾患の治療に用いられており、AD治療にも効果を有することが報告されている²⁾。我々は、北海道内の温泉についてAD治療効果を調査しており、先の報告では豊富町の温泉水を用いた入浴療法がADの治療に有効であることを明らかにした³⁾。本年度の調査研究ではAD患者の温泉療法の有効性と黄色ブドウ球菌の関連性について調査しており、その成績については内野らが別報で報告する。この研究の一環として、本報告は札幌市内の1医院で治療を受けているAD患者について行った患部における黄色ブ

ドウ球菌の調査結果と、検出された黄色ブドウ球菌の毒素産生性あるいは薬剤感受性等の生物学的性状について述べる。

方 法

1. 材料

1998年12月から1999年1月にかけて、札幌市内のHクリニックにかかりつけの患者のうち64名について調査を行った。患者は39名が札幌市内で、その他札幌市周辺の江別、恵庭、千歳、小樽、岩見沢、そして帯広、芦別、蘭越からの患者が含まれる。各患者については問診票を作製し、年齢、AD発症年齢、AD罹患年数、症状の程度（目視診断により軽症、中等症、重症に判別）、症状のタイプ（目視診断により乾燥型、湿潤型、痒疹型等に判別）、使用薬剤の種類などを調べた。図1には調査対象AD患者の年齢、AD罹患年数、発症年齢を男女別にプロットし、各患者毎に線で結んで示した。

2. 培養

患者の患部と、対照部位として一般的に比較的病変の少ない右上腕外側上部の皮膚に卵黄加マンニット食塩スタンプ培地（Merck、表面積16cm²）を押しつけて、その部位に付着しているブドウ球菌を採取した。このスタンプ培地を37℃で48時間培養し、生育した黄色ブドウ球菌と推定される集落数を測定した。また、それぞれのスタンプ培地上の2個の集落よりブドウ球菌を採取し、純粋分離を行った後、ブドウ球菌同定用キット（アピスタフ、bioMérieux）を用いて菌種の同定を行い、黄色ブドウ球菌と同定された菌株のみを以後の試験に供した。

*長谷川クリニック

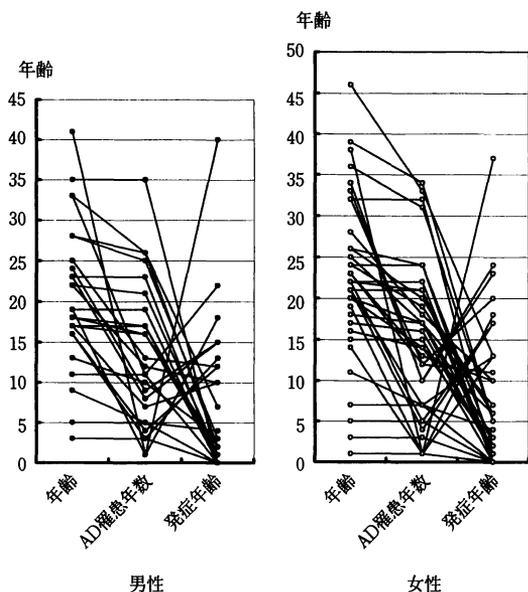


図1 AD患者の年齢、AD罹患年数、発症年齢の関係

3. PCR法

PCR法により enterotoxin 遺伝子 (Ent A ~ E)、exfoliative toxin 遺伝子 (ETA、ETB)、toxic shock syndrome toxin-1 (TSST) 遺伝子および methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 遺伝子の検出試験を行った。すなわち、被験菌を普通寒天平板に接種・培養後、菌体をかき取って滅菌水に浮遊させ100℃で10分間煮沸して鋳型DNA液とした。プライマーはJohnsonらの報告⁴⁾に従って作製し、常法⁵⁾に従って反応液を調製しPCR反応を行った。反応は熱変性(94℃、1分)、アニーリング(55℃、

1分)、伸長反応(72℃、1分)のサイクルを30回繰り返した。

4. enterotoxin 産生性

PCR法により enterotoxin 遺伝子の保有が認められたブドウ球菌については、enterotoxin 産生性を試験した。すなわち、被験菌をブレンハートインフュージョン培地(Difco)に接種、37℃で24時間振とう培養(120 rpm)した培養液の遠心(15,000 rpm、5分間)上清について、ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット(SET-RPLA「生研」、デンカ生研)を用いてラテックス凝集反応を行い毒素産生性を試験した。

5. コアグラージェ型

ブドウ球菌コアグラージェ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用い中和試験によりI~VIII型に分類した。

6. 薬剤感受性

細菌感受性試験剤(昭和ディスク)を用いて感受性試験を行い、試験剤に添付された判定表に従って感受性を判定した。試験に供した薬剤の製品名は、アンピシリン(ABPC)、メチシリン(DMPPC)、セフメタゾール(CMZ)、セファロリジン(CER)、エリスロマイシン(EM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、テトラサイクリン(TC)である。

結 果

1. AD症状と黄色ブドウ球菌検出数との関係

患者64名中53名の患部から、また対照部位では35名から黄色ブドウ球菌が検出された。患部のみから検出されたのは18名で、対照部位のみで検出された例は認められなかった。

患者の症状と患部および対照部位からの黄色ブドウ球菌

表1 AD患者の症状と皮膚からの黄色ブドウ球菌検出数および毒素遺伝子保有菌検出試料数の関係¹⁾

黄色ブドウ球菌数 ²⁾	病変部位の症状					対照部位の状態	
	軽症	軽・中等度	中等度	中・重症	重症	正常・ほぼ正常	軽~重症
∞ ³⁾	2(1)	0	15(3)	5(1)	4(2)	0	2
∞~1,000 ⁴⁾	3(1)	3(2)	2(1)	1(1)	2	0	4(1)
1,000~100	2(1)	2(1)	4(3)	0	0	0	9(1)
100~0	0	1	4(1)	1	2(1)	0	20(8)
0	4	1	6	0	0	8	21
合計試料数	11(3)	7(3)	31(8)	7(2)	8(3)	8	56(10)

1) 表中の数値は試料数を、()内の数値は毒素遺伝子保有黄色ブドウ球菌検出試料数を示す。

2) スタンプ培地1枚(16cm²)当たりの黄色ブドウ球菌数

3) ∞: 培地全面に黄色ブドウ球菌の集落が発育し、菌数測定不能のもの

4) ∞~1,000: 3)より菌数が少ないが計測不能のもの

検出数の関係を見ると、表1に見られるように、軽症患者でも多数の菌がスタンプ表面全面に発育し、菌数測定が不可能な状態（以下、無数と表現）の例、あるいは重症患者でも検出数が100以下の例が認められる。しかし、黄色ブドウ球菌が全く検出されない例は中等度より軽症の患者のみであり、中等度より重症の例ではその多くが無数あるいは無数に近い検出数であった。対照部位の病状は、正常からはほぼ正常あるいは病変があっても患部に比べて総じて軽度であり、正常あるいはほぼ正常の対照部位では黄色ブドウ球菌は全く検出されず、また後者の場合でも患部より検

出菌数が低い例が殆どであった。表1には毒素遺伝子保有菌が検出された患者数を括弧内の数値で示したが、これらの菌の検出と症状の軽重には関連性が認められなかった。

2. AD病型と黄色ブドウ球菌検出数との関係

患者の病型は表2に見られるように乾燥型が主体であった。患者の病型を皮膚からの黄色ブドウ球菌の検出数と比較すると、湿潤あるいは乾燥・湿潤型では黄色ブドウ球菌数が多い傾向が認められた（表2）。しかし、その違いも顕著なものではなく、またその他の病型では黄色ブドウ球菌の検出数との関連性は認められなかった。また、毒素産

表2 AD病型と皮膚からの黄色ブドウ球菌検出菌数および毒素遺伝子保有菌検出試料数の関係¹⁾

黄色ブドウ球菌数 ²⁾	病変部位						対照部位				
	乾燥型	乾燥・湿潤型	湿潤型	乾燥・痒疹型	痒疹型	湿疹・痒疹型	乾燥型	乾燥・湿潤型	湿潤型	乾燥・痒疹型	正常
∞ ³⁾	9(1)	13(5)	3(1)	0	1	0	2	0	0	0	0
∞~1,000 ⁴⁾	5(1)	3(3)	1	1(1)	1	1	3(1)	0	0	0	0
1,000~100	3(3)	1	0	4(2)	0	0	7(1)	1	1	1	0
100~0	3(1)	1	0	1(1)	2	1	20(8)	0	0	1	0
0	3	1	1	2	2	1	21	0	0	0	8
合計試料数	23(6)	19(8)	5(1)	8(4)	6	3	53(10)	1	1	1	8

- 1) 表中の数値は試料数を、() 内の数値は毒素遺伝子保有黄色ブドウ球菌検出試料数を示す。
- 2) スタンプ培地1枚 (16cm²) 当たりの黄色ブドウ球菌数
- 3) ∞: 培地全面に黄色ブドウ球菌の集落が発育し、菌数測定不能のもの
- 4) ∞~1,000: 3) より菌数が少ないが計測不能のもの

表3 分離菌株の毒素産生遺伝子保有、エンテロトキシン産生性およびコアグラゼ型別

コアグラゼ型別	菌株数	毒素遺伝子および MRSA 遺伝子保有菌株数									エンテロトキシン産生菌株数	
		Ent A	Ent B	Ent C	Ent D	Ent E	ETA	ETB	TSST	MRSA	Ent A	Ent B
I	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
III	16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0
IV	4	4 ¹⁾	0	0	0	0	2 ¹⁾	0	0	0	1	0
V	20	1 ²⁾	0	0	0	0	2	0	1 ²⁾	0	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
VII	60	8	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VIII	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
多型 ³⁾	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
UT ⁴⁾	56	2	8	0	0	0	1	0	0	0	2	0
合計	177	19	22	0	0	0	7	0	2	0	19	0

- 1) 2株は Ent A および ETA 両遺伝子保有株
- 2) 1株は Ent A および TSST 両遺伝子保有株
- 3) 2種類以上の血清と反応
- 4) 型別不能

表4 AD患者より分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性¹⁾

感受性 ²⁾	ABPC	DMPPC	CMZ	CER	EM	GM	KM	TC
+++	103	26	181	181	175	111	125	181
++	78	155	0	0	0	26	18	0
+	0	0	0	0	4	30	14	0
-	0	0	0	0	2	14	24	0

- 1) 表中の数値は菌株数を示す。ABPC：アンピシリンナトリウム、DMPPC：メチシリンナトリウム、CMZ：セフメタゾールナトリウム、CER：セファロリジン、EM：エリスロマイシン、GM：硫酸ゲンタマイシン、KM：硫酸カナマイシン、TC：塩酸テトラサイクリン
- 2) 感受性の判定は細菌感受性試験剤（昭和ディスク）に添付の感受性判定表に従った。

生遺伝子保有株は乾燥・湿潤型あるいは乾燥・痒疹型では約半数の患者から、乾燥型では約26%の患者から検出されたが、病型と毒素の種類および型との関連性は認められなかった。

3. 分離菌株のコアグララーゼ型別と毒素遺伝子の保有状況および毒素産生性

64名中53名の患者の患部および対照部位から分離された黄色ブドウ球菌177株について行ったコアグララーゼ型別、PCR法による enterotoxin 遺伝子 (Ent A ~ E)、exfoliative toxin 遺伝子 (ETA, ETB)、toxic shock syndrome toxin-1 遺伝子 (TSST) および meticillin resistant *Staphylococcus aureus* 遺伝子 (MRSA) の検出、enterotoxin A, B 産生試験の結果を表3に示す。コアグララーゼ型ではⅦ型が全菌株の約3分の1を占め、次いでⅤ型、Ⅲ型が多かった。Ent 遺伝子保有株は Ent A が19株、Ent B が22株であった。それらの株について毒素産生性を調べた結果、Ent A 株は全株が enterotoxin A を産生したが、Ent B 株は全株が enterotoxin A および B 非産生であった。その他、ETA および TSST 遺伝子保有株がそれぞれ7および2株検出された。Ent C、Ent D、Ent E、ETB、MRSA 遺伝子保有株は検出されなかった。

4. 分離菌株の薬剤感受性

分離株177株についてアンピシリン他8種類の抗生物質に対する感受性を調べた結果、表4に見られるように、カナマイシン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン耐性株がそれぞれ24株、14株、2株検出された。このうち5株はカナマイシン、ゲンタマイシンの2薬剤に耐性であったが、その他の株は単独耐性であった。アンピシリン、メチシリン、セファロリジン、セフメタゾール、テトラサイクリンに対する耐性菌はいずれも検出されなかった。

考 察

札幌市内のHクリニックに来院のAD患者64名について患部および対照部位から黄色ブドウ球菌の検出試験を行

い、黄色ブドウ球菌の検出頻度、検出数そして分離菌の毒素産生性と患者の年齢、AD罹患年数や病状、病型との関連性を検討した。

AD患者の皮膚患部では黄色ブドウ球菌が高率に検出されることについて数多くの報告がなされている¹⁾。今回の調査でも、患部では64名中53名、約83%から、また対照部位でも病変のある患者では56名中35名、約63%から黄色ブドウ球菌が検出された。しかし、病変のない正常あるいはほぼ正常な対照部位では黄色ブドウ球菌は検出されなかった。また、当研究所職員のうち皮膚病変のない健康な職員15名について行った調査では全例から黄色ブドウ球菌は検出されなかった。これらのことはAD疾患と黄色ブドウ球菌の存在は密接に関連していることを示しているが、黄色ブドウ球菌はAD患部で一次的に働くのではなく二次的な存在であるとの説もあり、AD患部での黄色ブドウ球菌の病原作用については議論のあるところである²⁾。AD患者でも疾患の状態で黄色ブドウ球菌の検出状況が異なるとされ、特に湿潤型の患者では黄色ブドウ球菌の検出率および検出数が高いことが報告されている^{6,7)}。安藤らは、湿潤部位では96.7%、苔癬化部位では96%、非病変部位では75.9%の検出率で、検出数もそれぞれ10cm²あたり平均で82、77.2、42.1個であったと報告している⁸⁾。また、秋山らは成人AD患者について湿疹⊕群の患者では季節に関係なく100%から検出されたが、湿疹⊖群では10~100%と、病型によりまた季節によって差異があり、7月から10月までより11月から1月の間の方が検出率が低くなると報告している⁹⁾。すなわちAD患者の病型あるいは試験を行った季節によって黄色ブドウ球菌の検出率に差のあることが報告されている。これに対し、今回我々の行った調査では、病型および症状の軽重によって黄色ブドウ球菌の検出率および検出数には若干の差異は認められたものの、特定の病型と黄色ブドウ球菌の検出を関係付けるような明確な差異は認められなかった。これは、今回の調査が12月から1月の間に行われたため乾燥型の病型が多く、また北海道

では特に冬期間の湿度が本州に比べて低いため、湿潤型と診断された疾患においても本州での症例と比べて黄色ブドウ球菌の検出率および検出菌数が低くなるなどの差異があるのでないかと思われる。

AD患者の皮膚疾患では黄色ブドウ球菌がある種の増悪因子として働いていると考えられている。しかし、現在のところ黄色ブドウ球菌の産生する成分あるいは菌体成分のなかで何が増悪因子として作用しているかという点は明確にされていない。黄色ブドウ球菌が産生する enterotoxin や toxic shock syndrom toxin-1などは直接的な細胞障害性は示さないものの、スーパー抗原としての作用によってAD皮膚炎を増悪させている可能性が指摘されている⁹⁾。一方、AD患者から検出される黄色ブドウ球菌のすべてがこれらの毒素を産生するわけではないので、本菌のAD疾患に対する関与はアトピー素因などによる皮膚病変に対して二次的に働くものであるとも考えられている²⁾。末廣ら¹⁰⁾はAD治療でブドウ球菌対策を主とする治療を行い、ブドウ球菌が検出されない例ではADスコアが 1.1 ± 0.43 、毒素非産生菌のみの検出例で 1.7 ± 0.28 、毒素産生菌が検出された例で 2.9 ± 0.22 とAD疾患とブドウ球菌の検出が関連し、毒素産生菌の検出される例で症状が重いことを示した。また、彼らは治療によって毒素産生菌数が減少すると同時に患者のADスコアが下がったと報告している。その他の報告でも、いずれかの毒素を産生する黄色ブドウ球菌はAD患者の約半数から検出され、湿潤型では苔癬型あるいは非病変部位より検出率が高い⁶⁾、あるいはEnt B産生菌は湿潤部からの検出率が高い¹¹⁾など、毒素産生菌の検出と病型と関連性があるという報告がなされている反面、AD患者の約半数から何らかの毒素産生菌が検出されるが、これらは患部において定着しているだけで病原性を発揮しているとはいえないとする夏秋らの報告⁹⁾も見られる。今回の報告では、64名中21名、約30%からEnt A、Ent B、ETA、TSST毒素のいずれかを産生する黄色ブドウ球菌が検出された。しかし、これらの菌の検出とその患者の病型あるいは症状の軽重を比較するとこれらの間には何らの関連性も認められなかった。この成績を見る限りでは夏秋らが述べているように、黄色ブドウ球菌が病原性を発揮しているとはいえないと思われる。しかしながらStricklandら¹²⁾は最近、*in vivo*の実験を行い、黄色ブドウ球菌の産生する各種の毒素がAD患者の患部で実際にスーパー抗原として作用していると報告しており、AD疾患部位における黄色ブドウ球菌の作用についてはさらに詳細な検討を要する。

AD患者から検出された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性試験ではマクロライド系薬剤に対する耐性菌が若干数検出さ

れたが、皮膚疾患でしばしば検出されるメチシリン耐性菌は感受性およびPCR法の両試験で検出されなかった。これは秋山ら⁶⁾が述べているように、今回の試験対象者のAD治療に抗生剤が用いられていなかったためであると考えられる。

今回の調査でも明らかなように、AD症に対しては的確な治療法がないため、幼児期に発症した患者は成人になっても長期間にわたって悩まされている例が多く、社会生活にも支障を来している。種々の皮膚病に対しては有史以来温泉による入浴療法が行われており、ある種の温泉がAD症の治療に効果のあることが報告されてきた²⁾。我々は、先の調査で道内の豊富温泉水を用いた入浴療法がAD治療に効果を有することを報告した³⁾。久保田ら²⁾はAD症に対する草津温泉療法の効果を調べ、温泉療法の効果が患者皮膚の黄色ブドウ球菌数を減少させることによると報告している。現状ではAD皮膚疾患における黄色ブドウ球菌の作用は確定されていないが、薬剤などによって黄色ブドウ球菌数を減少させる治療方法がAD症を軽減させる効果を示し¹⁰⁾、また、黄色ブドウ球菌の産生する毒素群が*in vivo*でスーパー抗原として作用しているとの報告もあり¹²⁾、AD治療の一つとして患部より黄色ブドウ球菌を除去することは有効であると考えられる。抗生剤などの薬剤を用いることは耐性菌の出現・増加を招く恐れがあるなど根本的な治療になりがたい面がある。温泉療法では患部から黄色ブドウ球菌が洗い流され、また温泉水の殺菌効果によって患部が殺菌されれば治療効果の上昇が期待できる。我々は現在、道内各地の温泉水について黄色ブドウ球菌の殺菌作用について調査を行い、より効果の高い温泉療法の確立を目指している。

要 約

札幌市内のHクリニックにおいて、アトピー性皮膚炎に罹患している患者64名の病変皮膚部分と対照として病変の少ない右上腕外側皮膚部分よりスタンプ法によって黄色ブドウ球菌を採取し、検出率、検出数そして分離菌株の生物学的性状を調べた。また、患者の病状等について問診および視診を行った。AD患部では、64名中53名から黄色ブドウ球菌が検出された。その菌数はスタンプ表面(16cm²)当たり16~測定不能の多数まで差異が認められたが、その数値と患者の症状および病型の間には明らかな相関性は認められなかった。また、PCR法による毒素産生遺伝子保有調査で、患部あるいは対照部位のいずれかから陽性菌が分離されたのは64名中21名であった。分離菌株177株中、Ent A遺伝子保有株が19株、Ent Bが22株、ETAが7株、TSSTが2株であり、19株がEnt A毒素

産生性であった。これらの毒素産生遺伝子保有菌の検出と患者の症状あるいは病型との間には明らかな相関性は認められなかった。また薬剤感受性はEM、GM、KM耐性菌がそれぞれ2株、14株、24株であった。

文 献

- 1) Lacour, M. & Corad, H. : *Clinic. Rev. in Allergy*, **11**, 491 (1993)
- 2) 久保田一雄他：リハビリテーション医学, **34**, 40 (1997)
- 3) 内野栄治他：道衛研所報, **48**, 1 (1998)
- 4) Johnson, W. M. *et al.* : *J. Clinic. Microbiol.*, **29**, 426 (1991)
- 5) 村松正實：ラボマニュアル遺伝子工学, 丸善, 東京 (1990) p.189
- 6) 秋山尚範他：日皮会誌, **103**, 1315 (1993)
- 7) 平田雅子他：日皮会誌, **104**, 1353 (1994)
- 8) 安藤仁志他：日本小児アレルギー学会誌, **12**, 307 (1998)
- 9) 夏秋 優：化学療法の領域, **11**, 45 (1995)
- 10) 末廣 豊：アレルギーの臨床, **16**, 428 (1996)
- 11) 中島敦子他：日細誌, **54**, 233 (1999)
- 12) Strickland, I. *et al.* : *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 249 (1999)

英 文 要 約

Sixty four atopic dermatitis patients (AD) who came to one medical doctor's office in Sapporo, were examined to determine the incidence of *Staphylococcus aureus* in the skin lesions of atopic dermatitis, and the biological properties of the *S. aureus* strains isolated from these patients were investigated. *S. aureus* were isolated from the inflammatory skin lesion of 53 of the 64 patients, and the number of *S. aureus* isolated ranged from 16 to an uncountable number per 16 cm² agar plate of an egg yolk mannitol salt agar (Merck). The number of *S. aureus* isolated from inflammatory skin had almost no demonstrable relationship with the type or degree of the disease. *S. aureus* strains with toxigenic genes were isolated from 21 of the 64 patients, but the type and degree of the disease were thought to have no relation with the isolation of the toxigenic-gene-positive *S. aureus*. Toxigenic-gene-positive *S. aureus* with *ent A*, *ent B*, *eta* and *tst* genes in 19, 22, 7 and 2 strains, respectively, were isolated from 177 tested strains. Strains resistant to erythromycin, gentamicin and kanamycin numbered 2, 14 and 24, respectively, among those isolated from the AD patients.

Key words : atopic dermatitis ; *Staphylococcus aureus* ; PCR ; toxigenic gene ; enterotoxin production