

## 黄色ブドウ球菌における食塩耐性の機構について

—— 医学研究実習における知見 ——

新潟大学医学部4年（指導：細菌学講座 光山正雄教授）

吉田 聡・丸山 亮

On the Salt Resistance of *Staphylococcus aureus*

—— A Finding in the Study during Basic Research Training ——

Satoshi YOSHIDA and Ryo MARUYAMA

*Niigata University School of Medicine*

(Supervisor: Prof. Masao MITSUYAMA, Department of Bacteriology)

*Staphylococcus aureus* is known to show a high level of salt resistance and this property has been ascribed to its ability to incorporate several osmolytes including glycine betaine. We have investigated the morphological change and the growth rate of this bacterium in a high salt environment. When *S. aureus* was grown in a high salt medium, colonies exhibited a diminished size, however, the size of each bacterial cell observed under microscopy was increased. The generation time of bacteria was increased from 28 min at regular NaCl concentration to 140 min in 7.5 % NaCl, indicating the limitation of metabolic activity under a high salt environment.

Key words: *Staphylococcus aureus*, salt resistance, osmolyte

黄色ブドウ球菌, 食塩耐性, オスマライト

### 緒 言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、各種化膿性感染症、毒素性食中毒や近年問題となった MRSA 院内感染原因菌として重要な病原細菌である。本菌種の示す細菌学的特徴のひとつに高度食塩耐性 (salt resistance) があり、この性質を利用してマンニット食塩培地などを

用いた選択分離が可能である一方、塩蔵など高い浸透圧による古来の食品保存法は本菌には効果が低いと考えられ、食品衛生学的に問題となる。

食塩耐性のメカニズムについては、高浸透圧環境下でどのように細菌菌体内部の浸透圧を上昇させるかという観点からの研究が多くなされており<sup>1)</sup>、アミノ酸性のオスマライト (osmolyte) を取り込むということが知ら

Reprint requests to: Satoshi YOSHIDA or  
Ryo MARUYAMA,

c/o Department of Bacteriology,  
Niigata University School of Medicine,  
1-757 Asahimachi-dori, Niigata City,  
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1-757  
新潟大学医学部細菌学講座 気付

吉田 聡・丸山 亮

れている<sup>2)</sup>。我々は、平成8年度医学研究実習(基礎配属)で細菌学教室において黄色ブドウ球菌の食塩耐性に関する実験を行い、菌の増殖に及ぼす各濃度の食塩の影響を調べた。

## 材料と方法

使用菌株：新潟大学医学部細菌学教室保存の *Staphylococcus aureus* No. 56 を用いた。

培養方法等：基本的には brain heart infusion (BHI) agar (0.5% NaCl 含有, 栄研化学, 東京) を用い、特級 NaCl (和光, 大阪) を添加して 2.5% までで最大 15.0% までの NaCl 最終濃度となる培地を作成した。また液体培養に際しては NaCl 濃度 0.5% と 7.5% の 2 種類の BHI broth を用意し、L 字管で 37°C 振盪培養して適当な時間後の生菌数を定量培養法にて求めた。さらに各平板培地上のコロニーを塗抹、グラム染色し、油浸対物レンズで観察される像をポラロイドカメラで撮影し、写真上の球菌の直径をビデオマイクロメータ (Olympus VM-31) を用いて測定し、平均値を算出した。

## 結 果

### 各種 NaCl 濃度平板培地における菌の増殖

NaCl 終濃度をそれぞれ 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0% とした平板培地に *S. aureus* を塗抹接種し、37°C 一夜培養後観察したところ、7.5% NaCl 培地までは colony 形成が見られたが、10% 以上の濃度の NaCl を含有する培地では colony 形成は見られなかった。なお、二日間培養したところ、10% NaCl 培地にも微少の colony 形成が見られた。以上のことから、*S. aureus* は成書に記載されているように高い食塩耐性を示すことが確認された。ところが、colony のサイズが NaCl 濃度に応じて小さくなる傾向が観察されたため、高 NaCl 濃度では個々の菌体のサイズ(径)が小さくなる可能性を考え、次の実験を行った。

### 各種濃度 NaCl 平板培地における菌体の径の変化

NaCl 終濃度 0.5, 2.5, 5.0, 7.5% の寒天平板培地において増殖したコロニーの菌体径を、それぞれランダムに 30 ずつ測定した。表 1 に示すように、NaCl 濃度が上昇するに従って菌体の径は大きくなる傾向がうかがわれた。

### NaCl 濃度に応じた増殖速度(世代時間)の変化

先の実験において、予想に反し菌体サイズは NaCl 濃度に応じて大きくなるのが判明した。しかし同一培養

時間では、NaCl 濃度が上昇するに従って明らかに colony のサイズが小さくなるという変化が肉眼的に確認されたため、増殖の速度に違いがある可能性を考えて、NaCl 濃度を変えた液体培地における増殖能を比較した。

NaCl 濃度 0.5% と 7.5% で比較したところ、図 1 に示すように、0.5% NaCl の培地における増殖の方が 7.5% NaCl 培地における増殖より速かった。計算される世代時間についても、表 2 に示したとおり、0.5% NaCl 培地での増殖に比べ 7.5% NaCl 培地では著明に延長していた。また、0.5% NaCl 培地における世代時間

表 1 食塩濃度と菌体径の関係

	NaCl 濃度 (%)			
	0.5	2.5	5.0	7.5
菌体径 (相対値)	100.0 ±9.7	124.4 ±17.6	135.0 ±16.8	129.3 ±16.5

表 2 高食塩濃度における世代時間の延長

NaCl 濃度 (%)	計算された世代時間 (分)	
	培養 0~60分	培養 60~110分
0.5	28.7	28.2
7.5	140.0	38.3

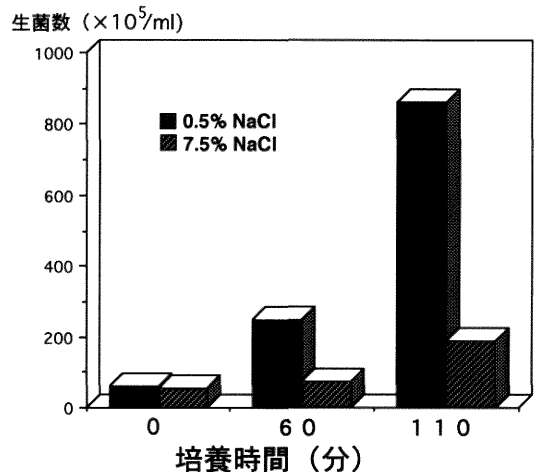


図 1 NaCl 濃度の違いによる *Staphylococcus aureus* 増殖の変化

*S. aureus* No. 56 株を brain heart infusion broth に懸濁し、培地中の NaCl 濃度が 0.5% と 7.5% の場合での増殖の違いをコロニーカウント法にて比較した。

は一定であったのに対し、7.5% NaCl 培地における世代時間は培養当初は長く、その後短くなる傾向が見られた。

## 考 察

*Staphylococcus aureus* の食塩耐性のメカニズムについては以下のように考えられている。菌体外の osmolarity が高い環境におかれた菌は、一般には菌体内外の osmolarity 差により原形質分離してしまう。ところが食塩耐性の高い菌では glycine betaine を choline 等と入れ替えることによって菌体内に貯蔵したり、proline や taurine などの osmolytes を取り込むことによって細胞内の osmolarity を上昇させ、菌体内外の浸透圧を平衡に保つと考えられている<sup>2)</sup>。また proline の取り込みには、affinity の異なる2つのシステムがあり何れも Na<sup>+</sup> 濃度に依存的であることも報告されている<sup>3)</sup>。このように、細菌の浸透圧調節機構は主にアミノ酸との関連<sup>4)</sup>で研究が進められてきている。

しかしながら文献をしらべた限り、高い NaCl 濃度環境における形態変化や増殖能の変化についてはほとんど報告が見られなかった。今回の我々の実験では、食塩濃度の上昇に伴って菌体のサイズは不変またはやや大型化した。高い食塩濃度では osmolyte を取り込むので菌体サイズが大きくなるとも考えられる。また、食塩濃度が高いと世代時間 (generation time, GT) が延長したが、表 2 に示したように最初の60分の GT: 140 min に対して次の60分では GT: 38.3 min と適応している様子が見られた。そのメカニズムは不明であるが次のような可能性が考えられよう。ひとつは、浸透圧調節を行う過程がエネルギー依存的であり、菌にとって原形質分離を回避するための osmolyte 取り込みが最優先となるために、エネルギー依存的な増殖に関連した細胞壁や蛋白合成を抑制するという考えである。proline の取り込みが proton-motive force に依存し ATP を要求しない可能性は示唆されているが<sup>3)</sup>、他の osmolyte については不明であり、この説を否定することはできない。もうひとつの可能性は、やはり osmolyte 取り込みを

優先させ、膜での transport system を働かせる必要上、膜の大きな変化をきたす分裂増殖を抑制するという考えである。これらの何れであるのか、または他のメカニズムが作用するかは今回のわずかな実験で明らかにすることはできないが、食塩耐性に伴う増殖抑制の報告はみられないので、我々が見出した現象は重要であろうと思われる。

古くから食品の塩蔵は人々の経験的な知恵であったが、10% NaCl でも増殖する *S. aureus* については全く無意味と思われてきた。しかし今回の実験で得られた、死滅はしないが世代時間が延長するという現象からは、やはり一定の抑制効果はあるということができ、食品の塩蔵は黄色ブドウ球菌など耐塩菌についてもそれなりの意味はあると思われた。

## 謝 辞

基礎配属に際して、直接実験の指導を頂き、結果をまとめて本誌に投稿する道を開いて下さった新潟大学医学部細菌学講座の光山正雄教授に感謝します。

## 参 考 文 献

- 1) Csonka, L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev., **53**: 121~147, 1989.
- 2) Graham, J.E. and Wilkinson, B.J.: *Staphylococcus aureus* osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. J. Bacteriol., **174**: 2711~2716, 1992.
- 3) Townsend, D.E. and Wilkinson, B.J.: Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. J. Bacteriol., **174**: 2702~2710, 1992.
- 4) Measures, J.C.: Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature, **257**: 398~400, 1975.

(平成8年12月12日受付)