

2. 赤痢菌と共通抗原を有する野外分離の乳糖非分解性大腸菌に関する研究

第1報 その生物学的諸性質について

横 田 健 山 下 豊 子

法定伝染病の原因菌である赤痢菌 (*Shigella*) と、原則としては、非病原性の腸内常住細菌である大腸菌属 (*Escherichia*) とは、通念的に性質の離れた細菌のように考えられているが、実際の遺伝学的性質は極めて近縁関係にあり、実験的には試験管内において、接合と染色体組み換え (conjugation and chromosomal recombination) により両者の合いの子 (hybrid) をつくり得ることや、phage Plkcによる形質導入 (transduction) により、大腸菌のもつ乳糖分解性を一時的ではあるが、赤痢菌に賦与し得ること知られている。自然界において、このような遺伝現象がおこっているかどうかは明らかでないが、赤痢菌と共通抗原を有し、しかも乳糖非分解の大腸菌で、簡単な検査では赤痢菌と誤まり易い株が下痢患者あるいは健康者からしばしば分離されることは事実である。

著者らはこの点に注目し、これらの菌と、真の赤痢菌との鑑別方法の確立、その病原性の有無、およびこれらの菌の疫学的意義や、遺伝学的発生機序について検討する目的で、赤痢菌保菌者検索時に、これらの菌を意識的にさがし、相当数をあつめることができたので、今回はその赤痢菌との鑑別点、および病原性の有無について報告したい。

1. 実験材料および実験方法

下痢患者の検便または赤痢保菌者検索に際し、SS寒天平板またはMacConkey寒天平板上に発生した小さな乳糖非分解集落を型の如くTSI半斜面寒天およびSIM半流動寒天に接種し、37°Cで1夜培養后、赤痢菌に対する市販の抗血清をもちいて“ためし凝集反応”を行い、成績が陽性にでたものはすべて、リジン脱炭酸試験、クリステンゼン培地およびシモンズ、クエン酸培地上の発育試験、methyl red試験、Voges-Proskauer試験、各種糖

分解を行った。生物学的性状の総合判定により、真の赤痢菌を除外し、のこったものについてチトクローム・オキシダーゼ反応を試験管法で行って *Aeromonas* を区別し乳糖非分解で、しかも赤痢菌と共通抗原を有する大腸菌属を撰別した。

これらの大腸菌属の腸管内における病原性の有無は、中谷らによる培養細胞法で検討した。

すなわち被験大腸菌のブイヨン18時間培養菌をHanks液で2回洗浄したのち、同液中に $10^8/ml$ になるように浮遊し、その0.1mlをcover slipを入れたLeighton tube中で、2mlの10%仔牛血清加Hanks培地を用いて48時間培養したHeLa細胞に接種し、2時間毎にHanks液で細胞を洗いながら培養を続け、菌接種后9時間目にcover slipをとり出して、軽くHanks液中で洗い、メタノール固定の後、Giemsa染色して、検鏡により接種した菌のHeLa細胞内増殖の有無をしらべてその病原性を推定した。

2. 実験成績

第1表に1966年6月から1967年3月迄に野外から分離された乳糖非分解で、しかも赤痢菌との間に共通抗原を有する大腸菌の生物学的諸性状をあげた。すなわち *Sh. dysenteriae* と共通抗原を有するもの1株、*Sh. flexneri* と共通抗原を有するもの8株 (他 *Cloaca* 1株)、*Sh. boydii* と共通抗原を有するもの2株、*Sh. flexneri* の群抗原と *Sh. boydii* 2との双方に対する共通抗原を有するもの1株の計12株で、*Sh. sonnei* に対する共通抗原を有する乳糖非分解大腸菌属は今迄のところ1株も野外から検出することはできなかつたが、チトクローム、オキシダーゼ陽性菌で *Sh. sonnei* I 相またはII相菌との間に共通抗原を有するグラム陰性桿菌が2株分離された。この点については次報にその詳細を報告する予定である。

第1表 Biological characteristics of various strains of *E. coli* possessing common antigens with *Shigella*

Strain	T-1	T-2	T-4	T-5	T-8	T-11...17
Appearance Lac+clone	+	+	+	+	+	+
Common antigen (<i>Shigella</i>)	C2	C2 Bg3	A7	Bt1	C13	B-IIb

Indole	+	+	+	+	-	-
MR	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-
Simmons citrate	-	-	-	-	-	-
Christensen citrate	+	+	-	+	+	-
Motility	+	+	+	+	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-
Lysin-decarboxylase	-	+	+	+	+	+
Nitrate-reduction	+	+	+	+	+	+
H ₂ S-production	-	-	-	-	-	-
sugar-fermentation	Geucose	⊕	⊕	+	⊕	⊕
	Lactose	-	-	-	-	-
	Mannitol	⊕	⊕	+	⊕	⊕
	Sucrose	⊕	-	-	-	-
	Dulcitol	-	-	-	-	-
	Maltose	⊕	⊕	+	⊕	⊕
	Arabinose	⊕	⊕	-	⊕	⊕
	Xylose	⊕	⊕	-	⊕	⊕
	Rhamnose	⊕	+	-	⊕	⊕
	Inoistol	⊕	-	+	-	-
	Fructose	⊕	⊕	-	+	⊕
	Sorbitol	⊕	⊕	-	-	-
	Starch	⊕	⊕	+	-	-
	Salicine	-	⊕	-	-	+
Trehalose	⊕	⊕	+	⊕	⊕	

赤痢菌，大腸菌の典型的な代表株と，上述の大腸菌属との生物学的性状を比較すると，第2表の如く，全株乳糖非分解性で，この点では赤痢菌と誤まる危険性があり，一方*Sh. dysenteriae* 7と共通抗原を有するT-4を除いて，これらの菌株はブドウ糖を分解してその量には多少はあるが，ガスを産生するものが多く，赤痢菌とこの点で区別できるものが多いが，その他の生物性状は運動性，クリステンゼン培地上の発育，リジン脱炭酸酵素の有無を含め，陰性の株も陽性の株もあり，これらの性状の1つを以て赤痢菌と区別することはできなかつた。

またその病原性の有無について検討すると，これらの乳

糖非分解性大腸菌はすべて健康者から分離されたものであり，疫学的にその病原性の存在は考え難いのみならずHeLa細胞内における増殖は調べた限り認められない点からも，これらの菌に赤痢菌の如き強い腸管内における病原性があるとは考えられない。

一方，対照として行つた患者分離の*Sh. flexneri* 3aのHcLaの細胞内における増殖は，前2者の場合接種された菌細胞がHeLaの細胞外に留まっているのに比較してこの場合は菌の明らかな細胞内への侵入増殖が認められている。

第2表 Comparison of biological characteristics between genera of *Shigella*,
Escherichia and *Aeromonas*, and isolated strains of Lac- *E. coli*
possessing common antigens with *Shigella*

Group or Genus		<i>Shigella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Aeromonas</i>	Isolated strains
IMViC	Inodofe	+ or -	+	+ or -	+ : 4/12
	Methyl red	+	+	-	+ : 12/12
	V-P	-	-	-	+ : 0/12
	Simmons citrate	-	-	-	+ : 0/12
Christensen citrate		-	+ or -	-	+ : 4/12
Motility		-	+ or -	+ or -	+ : 11/12*
Urease test		-	-	-	+ : 0/12
Nitrate reduction		+	+	+	+ : 12/12
Lysine decarboxylase		-	+ or -	+	+ : 11/12
H ₂ S production		-	-	+ or -	+ : 0/12
Sugar fermentation	Glucose	A	AG	AG	AG : 11/12
	Lactose	-	AG	- or A	AG : 0/12
	Mannitol	A or -	AG	AG	AG : 11/12
	Sucrose	-	AG or -	AG or -	AG : 1/12
	Dulcitol	- or A	AG or -	-	AG : 7/12
	Maltose	A or -	AG	AG	AG : 11/12
	Arabinose	A or -	AG	- or AG	AG : 11/12
	Xylose	- or A	AG	-	AG : 11/12
	Rhamnose	- or A	AG	-	AG : 3/12
	Inositol	-	-	A or -	A : 1/12
	Fructose	A or -	AG	AG	AG : 10/12
	Sorbitol	A or -	AG	A or -	AG : 9/12
	Starch	-	AG or -	AG	AG : 2/12
	Salicine	-	AG	A or AG (25 C)	AG : 1/12
Trehalose	-	AG	-	AG : 11/12	

* : The number of strains having motility includes those with very weak motility

既に述べた如く、赤痢菌と、乳糖非分解性大腸菌との鑑別は両者の生物性状の総合的な検討により行はれるべきものであるが、この他に両者を比較的確実に鑑別する方法として、分離当初における乳糖分解cloneの自然的解離があげられる。すなわち疑わしい菌の純培養をとりその単一コロニーをもう一度、BTB-乳糖寒天、またはMacConkey平板に面線接種して、38~40°Cの高温に培養すると、24~48時間後に大部分の株は乳糖分解集落を種々の割合に解離する。この方法は被験菌の単集落培養をあまり何回もくり返したり、また長期間の植継保存をくり返すと解離頻度が低下して乳糖分解 clone の検出が困難になる場合もあるので、なるべく分離当初に試みる方がよいように思はれる。なおこのようにして得られたLac⁺ cloneは第1表に示された親株の性状を保持し、その乳糖分解性を除き、抗原性にも、生物性状にも調べられた範囲内において全く変化なく、他の大腸菌株の分離当初における混入によるとの可能性は全く否定される。乳糖非分解性大腸菌からの乳糖分解 clone の解離は、増殖速度に影響を与えない範囲においては、培養温度が高い程、解離頻度も高かった。

3. 考 察

既に述べた如く、赤痢菌と大腸菌とは微生物遺伝学的手法により、その遺伝的性質の近似性が証明されるのみならず、生化学的に生物の遺伝的似性を大まかに示すといはれる核DNA中のguanine-cytosine含有量(G-C content)もともに50%で等しい値を示し、さらに林らによる生物学的諸性状の統計的比較値、すなわちsimilarity valueからも生物学的に極めて近似であることが示されている。

しかしながら現在の伝染病予防法のもとでは赤痢菌による腸管感染症を有する患者は法定伝染病患者として法の定めるところに従って措置され、病原大腸菌による下痢患者は、たとえそれが*E. coli* 0-124の如く、赤痢様臨床症状と伝染様式をもつものによる場合でも、その一部が食中毒として届出の義務を生ずるに過ぎない。したがって保健所、衛生研究所等公的な病原菌検査、研究機関においては、いかに赤痢菌と大腸菌とが生物学的に近似のものであろうとも、これを誤まることは、単に医学的のみならず、社会的にも大きな影響があり、決して許されるものではない。

著者らは1966年度の後半から赤痢菌と共通抗原を有ししかも乳糖非分解性の大腸菌の野外からの分離と試み、主として健康者から計12株を得た。これらのものはHeLa細胞中への侵入増殖という点からしらべた限り、赤痢菌の如き病原性はもっていないか、あるいはもっていても極めて弱いものと想像された。

現在、赤痢菌の同定は乳糖を分解せず、ブドウ糖を分解して酸のみ産生するグラム陽性の運動性のない桿菌でインドール産生は菌型によって異なり、硝酸塩還元能、メチールレッド反応陽性で、クエン酸利用、リジン脱炭酸試験、VP試験、などすべて陰性で、しかも赤痢菌抗血清により菌型が決定されるもの、として行はれるのが普通であるが、忙がしいということを経験的に変則的な簡便法をとる場合も見受けられ、極端な時は分離平板から集落をKliglerまたはTSI半斜面にとり、乳糖、ブドウ糖の分解能をしらべ、ついで抗血清による「ためし凝集反応」を行って赤痢菌と決定してしまうことすらあるといわれる。このような方法では赤痢様集団下痢の原因菌となる病原大腸菌0-124が*Sh. dysenteriae* 3と誤認されることはあまりに有名である。現在赤痢菌と共通抗原を有する大腸菌および*Aeromonas* は数多く知られて居り、現在共通抗原を有する大腸菌の存在が確認されていないのは*Sh. flexneri* 3cと、*Sh. sonnei*(*Aeromonas*には存在する)のわずか、2種類にすぎない。大腸菌の乳糖分解性はpoint mutationまたはdeletion mutationにより陰性に変化することはめずらしくないので、これらの赤痢菌と共通抗原を有する大腸菌のなかで乳糖非分解のものが生じて決して不思議ではない。第1表に示した如く今回著者らが分離した菌株には、その抗原性および乳糖非分解性のほかの性質も赤痢菌と大腸菌の中間の性質を示すものが少なからず見出された。また赤痢菌と共通抗原を有し、しかも病原性を有するかも知れないと考えられる大腸菌も、その病原性が明らかにされている0-124 0-112, 0-143, 0-144のほかにも報告されている。これらの菌の赤痢菌との鑑別は、結局生物性状をできるだけ多く行い、その結果を経験的に検討して行う以外に確実な方法はないという極めてありきたりの結論になるがその他に確認培地中の微量なガス産生を見逃がさない注意や、分離当初のLac subcloneの発生の有無、特定のインドール陰性の赤痢菌との間に共通抗原を有する大腸菌の場合は、インドール産生能の有無などが鑑別のための重要な手がかりとなる場合もある。

これらの乳糖非分解性大腸菌で、しかも赤痢菌と共通抗原を有する大腸菌がどの程度野外に分布しているかという疫学的な考察や、その微生物遺伝学的な発生機序、さらには古くから知られている、赤痢患者から分離される大腸菌のparaagglutinationとの関係など目下追及中なのでその結果は次報にゆずりたい。

4. 結 論

健康者の糞便から、乳糖非分解で赤痢菌と共通抗原を有し、しかもその他の生物性状も赤痢菌と大腸菌の中間的な性質を示し、簡単な検査では赤痢菌と誤る可能性も

ある。大腸菌が12株分離された。赤痢菌との鑑別点その病原性の有無等に検討を加えた。

5. 文 献

- 1) Luria, S. E. & Currou, J. W. : J. Bacteriol. 74 : 461~476, 1957.
- 2) Luria, S.E., Adams, J.N. & Ting, R. C. : Virology, 12 : 348~390, 1960.
- 3) 中谷林太郎：腸炎（善養寺浩，齊藤誠編）納谷書店 1966, P.43~74.
- 4) Sukeoka, N. : The Bacteria Vol. V, Academic Press, 1964, P419~443.

5) 林江沢：共立薬科大学研究年報1963~4 : 8~15, 1964.

6) Edwards, P.R. and Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae : 腸内細菌同定法（中谷，坂崎，共訳）一成堂，1964, P29~67.

7) Matsumoto, H. : Japan, J. Microbiol., 8 : 143~148, 1964.

本研究は昭和42年6月2日および3日に東京でおこなわれた第20回日本細菌学会関東支部例会において報告した。

3. 温度感受性耐性因子（R因子）に関する研究

第1報 温度感受性 R (K M) 因子と非温度感受性 R 因子とが同一宿主菌細胞中に共存する場合の態度について

横田 健 有泉 昇 金丸 佳郎

1959年，秋葉ら⁽¹⁾，および落合ら⁽²⁾によって腸内細菌の伝達性薬剤耐性を支配する細胞質性の遺伝因子，すなわち耐性因子（R factor）が発見されて以来，この方面の研究は秋葉一門⁽³⁾，三橋ら⁽⁴⁾，中谷ら⁽⁵⁾，渡辺ら⁽⁶⁾および広田ら⁽⁷⁾によって詳細に研究され，この分野の研究は主としてわが国において完成されつつある。さらに今日ではR因子の関与する薬剤耐性は発見当初のchloramphenicol(CM) tetracycline(TC)，streptomycin(SM) およびsulfonamide(SA)のほかにkanamycin(KM)や合成penicillin⁽⁸⁾に対する抵抗性まで含まれることが明らかにされ，また臨床的にはR因子による薬剤耐性腸内細菌は消化器系伝染病のみならず，抗化学療法尿路感染症⁽¹⁰⁾においても重要な役割りを果たしていることが知られるに至った。

東京大学医学部寺脇は1963年⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾ 術后尿路感染症の1入院患者から分離した*Proteus vulgaris*と*Cloaca*がCM, TC, SM, SA およびKMに高い耐性を示すのみならず，*P. vulgaris*においてはKM耐性のみが，また*Cloaca*においてはKM, CM, SM およびSA耐性が，薬剤感受性*E. coli*または*Salmonella typhimurium*と混合培養することにより接合（conjugation）によって伝達することを見出し，さらにいづれの株においても35°C以上の混合培養

温度においてはKM耐性の伝達が強く抑制される事実を発見した。

種々の遺伝因子のなかには40°C前後の高温においてその複製化（replication）が強く阻害される，いわゆる温度感受性変異（temperature sensitive or thermosensitive mutant）の生ずることはすでに知られており，温度感受性PhageT-4がEdgarら⁽¹⁴⁾により，温度感受性F'-因子がJacob⁽¹⁵⁾により，それぞれ1963年に報告されている。R因子は細菌における染色体外遺伝因子として重要なものの1つであるが，今迄のところ温度感受性R因子の報告はこの寺脇らによるもの以外には，その存在を暗示するものすら見当たらない。

著者は寺脇からこの温度感受性R(KM)⁺因子の分与をうけ，このR(KM)⁺因子のreplicationが高温時においてどのように影響をうけるかしらべるとともに，同一宿主菌細胞中に他の非温度感受性R因子と共存した場合お互いにそれぞれのR因子のreplicationの温度に対する態度に変化が起こるかどうかが検討した。さらにこのR(KM)⁺因子の遺伝学的解析を試み，若干の知見が得られたので，1963年に提唱された遺伝因子複製化に対するJacob and Brenner⁽¹⁵⁾の“replcon., 説を考慮して検討を加えたい。