病原大腸菌に関する研究

1. *Escherichia coli* O 112 c の部分抗原を有する新病

原大腸菌の検出について

原 田 賢 治 清 水 喜 四 郎 松 山 達 夫
小 宮 山 茂 人

群馬県衛生研究所

三 橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

〔受付：9 月 29 日・1958 年〕

E. coli の血清学的分類は Kauffmann¹⁾ により O 1 から O 25 までの抗原診断表が報告されて以来急速なる発展をとげた。この血清学的分類法が基となつて多くの病原大腸菌が発見追加され、中でも O 26, O 55, O 111 及 O 86 の各型はその病原性が承認された²⁾。本邦においても坂崎³⁾ による O 136, 原田等⁴⁾ による *Salmonella poona* の O 抗原を有する *paracoli*, 福見等⁵⁾ による O 75 及中西等⁶⁾ による O 28, O 42 抗原と関係をもつ菌株等の報告がある。

著者等は1956年4月疫痢様疾患及急性腸炎の患者2名から夫々 *E. coli* O 112 抗原と関係を有する大腸菌を分離し、*E. coli* Gunma と仮称して研究を進めてきた処血清学的に新しい型であり、その病原性についても上述の疾患と考えられる結果を得たので報告する。

尚この研究の途上で山形等⁷⁾ は1956年7月盛岡市の某小学校における学童の集団下痢症の発生で、本症の原因菌と考えられる新病原大腸菌を分離し *E. coli* Iwate と仮称している。著者等は相次いで無関係に分離された *E. coli* Gunma と *E. coli* Iwate との性状についても併せて比較検討した。

材料及び方法

由来：食慾不振を前駆として発熱(39°C)及痙攣を伴つて発病した5歳の男児の粘液性の尿及軽度の下痢症状を有する39歳の婦人の尿から同一性状を有する菌株を夫々純培養状に分離した。前者よりの分離菌を No. 41 及び後者よりのそれを No. 42 と各々記号した。尚患者2名は母子の関係にあつた。

分離及同定：SS 及 Drigalski 培地に患者の尿を直接塗抹して培養し、発生した乳糖非分解の *Shigella* 様集落を Kligler 培地に移植して確認培養を行い、更に生化学的性状及血清学的性状について型の如く検討した。

使用菌株及抗血清：*E. coli* の O 抗原としては O 1 から O 136, K 抗原としては K 1 から K 74 及 H 抗原としては H 1 から H 40 までの夫々標準菌株を使用した。各診断用抗血清は Edwards 及 Ewing⁸⁾ の著書 “Identification of Enterobacteriaceae” に記載された方法に準拠して上述の各抗原を家兎に免疫して作られた。特に O 112 との関係については *Shigella dysenteriae* 2 1694 及 *E. coli* O 112 a, b: B 13: H 18 の2株を用い、抗血清はこれ等2株のホルマリン処理菌で家兎に免疫して得られたものを使用した。分離菌2株の抗 O 血清は 100°C で 2 1/2 時間加熱した死菌を、抗 K 血清はホルマリン処理菌を、及抗 H 血清はクレギー培地を 22°C で 8 代継代通過させたブイヨン培養ホルマリン処理菌で夫々家兎に免疫して得た。*E. coli* Iwate (Iwate と略) の抗 K O 血清はホルマリン処理菌と同様家兎に免疫して作製した。抗 *E. coli* O 112 c 血清は抗 *Shigella dysenteriae* 2 血清を

HARADA Kenji, SHIMIZU Kishiro, MATSUYAMA, Tatsuo, KOMIYAMA Shigeto & MITSUHASHI Susumu*: Study on the pathogenic *E. coli*. (I) The strain of new serotype containing the partial antigen of *E. coli* O 112. Gunma prefectural Institute of Health, Dep. of Microbiology, School of Medicine, Gunma University.* — Jap. J. of Bact., 14(3), 206-210, 1959.

100°C で1時間加熱した *E. coli* O 112 a, b で吸収したものを充てた。抗 K55A 血清は 100°C で1時間加熱した *E. coli* O 9:9 L: H12 でO抗体を吸収除去して用いた。分離菌の抗K血清 100°C で1時間加熱した *S. dysenteriae* 2 で吸収して、できるだけ純粋にしたものを使用した。抗 *E. coli* H 25 血清及分離菌の抗H血清は 100°C で2½時間加熱処理した血清当該菌でO及K抗体を吸収除去したものを用いた。

莢膜膨化反応並に溶血毒及壊死毒の証明法：坂崎及波岡⁹⁾の著書“腸内細菌検索法”に記載された方法に従った。

薬剤感受性試験法；試験にはクロラムフェニコール (CM), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), ネオコリマイシン (NC), 硫酸コリマイシン (SC), 及サルファインキサゾール (S) 等の結晶を使用し、又 CM, TC, SM, NC 及 SC は何れも力価のわかっているものを用いた。培地は次の処法のもので既往の実験成績では肉水寒天の成績と略々同様か、又は少しく感受性が高かったが常に一定の価が得られるので使用した：
: Na₂HPO₄ 12 H₂O (8.0 g), KH₂PO₄ (2.0 g), Na-citrate 11 H₂O (0.6 g), MgSO₄ 7 H₂O (0.1 g), (NH₄)₂SO₄ (1.0 g), Bact. casaminoacid technical (Difco) (2.0 g), Tryptophane (10 mg), Nicotinic acid (2mg), Vit. B₁ (10 mg), Glucose (2.0 g), Bact agar (15 g), Distilled water (1000cc), pH 7.2.

毒性試験：使用したマウスは ddF 系で体重 16—18 g のものを30匹選び、内15匹を5群に分つて、予め光電比色計で一定菌数を含むように調製しておいた各菌液を、夫

々 0.5cc宛マウス腹腔内に接種して14日間その生死について観察した。残りの15匹は未接種の対照とした。

実験成績

1. 生化学的性状：分離菌2株は *Enterobacteriaceae* の具備すべき性状を有する運動性の桿菌で、KCN試験及PPA反応は何れも陰性、ゼラチンを液化せず、硫化水素を産生せず、尿素を分解しなかつた。又インドール反応及MR試験は陽性であつたがV.P試験は陰性であつた。

Ammonium citrate 寒天には発育しないが、Ammonium glucose 寒天には良く発育する。グルコース及マンニトールを分解して酸とガスを産生する。マルトースラムノース、キシロース及アラビノースは1日で分解するがダルシトールは2—3日で分解した。ラクトース、アドニトール、イノシトール、ソルビトール、サリシンは両株共30日まったく分解しなかつた。シユウクロースはNo. 41 が8日で分解したのに対して、No. 42 は30日間まったく分解しなかつた。

分離菌2株及Iwateの溶血性を調べてみると、何れも馬血球を24時間以内で溶血するが綿羊、家兎及人の各血球は48時間以内では溶血しなかつた。又壊死毒は何れの菌株にも証明できなかつた。

2. 血清学的性状：まづGunma No. 41, No. 42 及Iwateの抗原的関係を調べてみた。上述の3菌株は抗No. 41, 抗No. 42 及抗Iwate KO血清に対して何れも血清当該菌の終末凝集価まで凝集し、交叉吸収試験の結果、血清当該菌に反応する抗体は総て吸収除去され、

表1 O抗原(標準血清の吸収試験)

抗血清	S. dysenteriae 2			E. coli O 112 a,b			O 112 c 因子	
	凝集価			凝集価			凝集価	
	未吸収	下記菌株で吸収後		未吸収	下記菌株で吸収後		未吸収	下記菌株で吸収後
原		Gunma 41, 42	O 112 a,b		Gunma 41, 42	O 112 a,c		Gunma 41, 42
EW-2	5,120	5,120	1,280	320	320	0	1,280	640
O 112 a,c	5,120	5,120	1,280	320	320	0	1,280	640
O 112 a,b	1,280	1,280	0	2,560	2,560	2,560	0	0
Gunma 41	80	0	80	0	0	0	80	0
Gunma 42	40	0	40	0	0	0	40	0
Iwate	40	0	40	0	0	0	40	0

註：1. Gunma 及び Iwate の吸収及凝集用抗原は 120°C で2時間の加熱菌

2. EW-2=S. dysenteriae 2

3. O=1:20 陰性

表 2 O 抗原 (抗 Gunma O 血清の吸収試験)

抗 血 清	Gunma 41 O				Gunma 42 O			
	凝 集 価				凝 集 価			
	未吸収	下記菌株で吸収後			未吸収	下記菌株で吸収後		
原		O 112 a, c	O 112 a, b	Gunma 41		O 112 a, c	O 112 a, b	Gunma 42
EW-2	5,120	0	5,120	0	1,280	0	1,280	0
O 112 a, c	1,280	0	1,280	0	640	0	640	0
O 112 a, b	20	20	0	20	20	20	0	20
Gunma 41	5,120	1,280	5,120	0	2,560	640	2,560	0
Gunma 42	2,560	640	2,560	0	2,560	640	2,560	0
Iwate	2,560	640	2,560	0	2,560	640	2,560	0

3株は同一K O抗原であることがわかった。

次に Gunma の O 抗原を抗 O-1 から抗 O 136 までの E. coli 診断血清を用いて検討した処、O 112 a, c のみに関係が認められたので O 112 a, c と Gunma との抗原的関係について追求した。その結果 Gunma は O 112 a 抗原を有しないが、O 112 c の部分抗原を保有している事が明となった。

尚 Gunma 41, 42の両抗血清に対して E. coli O 112 a, b は 1:20 まで凝集するが、抗 E. coli O 112 a, b 血清に対しては Gunma, 及 Iwate がまったく凝集しないし、更に Gunma 41, 42の両抗血清を E. coli O 112 a, c で吸収しても O 112 a, b の凝集価に影響を与えない事から、O 112 a 抗原と関係のない事を確め得た (表 1 及表 2 参照)。

Gunma の K 抗原について E. coli 抗 K 血清 74 種を用いて検討した処 K55 A 抗原のみに関係があることがわかったので、K55 A と Gunma の K 抗原との抗原的関係を追求してみた。抗 K 55 A 血清に対して血清当該菌は 1:160 まで凝集したが、Gunma は 1:2560 まで更に高く凝集した。この抗血清を Gunma で吸収しても血清当該菌の凝集価に影響はなかったが、血清当該菌で吸収すると分離菌に反応している抗体は総て吸収除去された。又 Gunma の抗 K 血清には、血清当該菌は 1:1280 まで凝集し、E. coli O 9:55 A:—は 1:20 まで凝集した。更にこの抗血清を E. coli O 9:55 A:—で吸収してみると血清当該菌の凝集価は 1:320 まで下降し、K55 A の部分抗原を保有していることがわかった。次に Gunma K 抗原の理化学的な性状について調べてみた。即ち抗 O 112 c 血清に対する Gunma の凝集性は 100°C で 1 時間—2 1/2 時間の加熱処理では失われないが、120°C で

2 時間の加熱で易凝集性となった。Gunma の 0.5 % ホルマリン処理及 50% アルコール処理の両抗原は凝集能、吸収能及免疫能に変化なく、又 100°C で 2 1/2 時間の加熱処理抗原でも吸収能及免疫能に変化はなかったが、凝集能については分離菌の K 抗体を純粋にすることができなかったので調べ得られなかった。1 N 塩酸処理抗原は吸収能を有し、凝集能及免疫能は調べなかった。以上の結果から Gunma の K 抗原の性状は A 抗原のそれを有していることがわかった。莢膜膨化反応は、Gunma の抗 KO 血清又は抗 K55 A 血清の何れを用いた場合にも陰性の成績を示した。

Gunma の H 抗原を E. coli 抗 H 血清 40 種を用いて調べてみると H25 のみに関係がある事がわかったので、その関係について追求した。その結果は表 3 に示す如くで Gunma の H 抗原は H 25 と決定したが相互に僅かな相異が認められ完全には一致しなかった。又 Gunma と Iwate の両 H 抗原はまったく同一である事が明となった。

3. マウスに対する毒性試験: Gunma の 5×10^8 の菌数でマウスは総て死んだが 5×10^7 及 5×10^8 の菌数では 3 匹中 1 匹生存した。更に 5×10^6 以下の菌数ではマウスは総て生存した。この結果から Gunma の LD₅₀ を求めてみると 10^7 であった。尚死んだマウスは接種後 2 日以上生存したものはなかった。

4. Widal 反応: Gunma 2 株の由来した 2 名の患者血清について調べてみると、Gunma のホルマリン処理抗原では何れの血清も 1:20 まで凝集したが、120°C で 2 時間の加熱処理抗原では 1:320 又は 1:640 で比較的高かった。尚対照に用いた健康人血清 20 例の価は 1:10—1:80 の間に分布した。

薬剤感受性: Gunma 2 株及 Iwate は SM に対して

表 3 H 抗 原

抗 血 清	Gunma 42 H				E. coli H 25			
抗 原	凝 集 価				凝 集 価			
	未吸収	下記菌株で吸収後			未吸収	下記菌株で吸収後		
		Gunma 41	Iwate	N 234		Gunma 41	Gunma 42	Iwate
Gunma 41 H	10,240	0	0	320	10,240	0	0	0
Gunma 42 H	10,240	0	0	320	10,240	0	0	0
Iwate H	5,120	0	0	160	2,560	0	0	0
N 234 H	10,240	0	0	0	10,240	80	80	80

註: 1) N 234=E. coli O 15:K?: H 25

2) 0=1:40 陰性

12.5 mcg/ml-25 mcg/ml で, CM には 1.56 mcg/ml-3.13 mcg/ml, TC には 0.78 mcg/ml, NC には 100 u/ml, NS には 50 u/ml 及 S には 6.25 mcg/ml に夫々感受性であった。

考 察

Ewing 等¹⁰⁾は E. coli O 112 a,c と Shigella dysenteriae 2 が同一 O 抗原である事及 E. coli O 112 a, b と Shigella sero-type 703 が同一 O 抗原である事が報告され,更に E. coli 6182-50 (O 113)は O 112 b 抗原を介して O 群 112 と関係をもつ事が明かにされた。著者等は この研究で Gunma と Iwate とが同一の sero-type であつて,是等の菌株は E. coli O 112 c の部分抗原を保有していることを明かにした。著者等は Gunma の分類について次のような見解をもっている。前述した如く Ewing によつて調査された 4 菌株中 E. coli 6182-50 が O 112 b の部分抗原を保有していながら O 群 113 に分類されている事実から考えて, Gunma を O 群 112 に編入するよりは新しい O 群にその位置を定める事が妥当と思われる。

Seeliger¹¹⁾は Shigella dysenteriae 2 と E. coli O 112 a, c とは O 抗原が少しく異つていと報告しているが, Ewing 及 Tanner¹²⁾は更に研究を進めて, Seeliger の云う O 抗原の差異は, O 抗原ではなく K 抗原によるものであると述べている。Gunma の K 抗原は A 抗原の性状を示し血清学的には K 55 A の部分抗原を保有していた。然しながら莢膜膨化反応は陰性で又完全な K minus form も得られなかつたので今後更に検討してみたいと考えている。

次に Gunma の生化学的性状については,本菌が Lactose 非分解で且 S S 培地に發育する特性を有しているこ

とであり,今後の菌検索に良き目標となるであろう。Kauffmann¹³⁾は彼の著書に Ewartsen 及 Sjöstedt の業績を紹介して, E. coli の溶血性と壊疽性との深い関係について記載している。広木¹⁴⁾も又実験の結果同様の結果を得たと述べている。Gunma 及 Iwate は溶血性であるが壊疽性を欠いていた。

Gunma の病原性については,患者の尿より純培養状に検出された事及当該患者 2 名の血中抗体価が高く証明された事等からみて虞らくこの疾患の原因菌であろうと考えられる。福見及中谷¹⁵⁾は Iwate による人体復原実験に成功したと述べており,著者等の考証を裏づける結果を得た。

Ewing¹⁶⁾は Shigella と E. coli の耐熱性抗原の関係を広範にわたり調査し,これを明かにした。Gunma が Shigella dysenteriae 2 (E. coli O 112 a,c) の部分的 O 抗原を保有していて,更に K 抗原が A 抗原の性状を有する菌株であつた事は新しい知見と考えられる。又本菌は先ず群馬県で発生した散発例から分離され,ついで 3 カ月後には岩手県において多数の学童に集団下痢症を惹起し,原因菌として分離された事は興味深く思われる。

結 言

新病原大腸菌を母子の患者から検出し E. coli Gunma と仮称した。Gunma の抗原構造は (O 112 c), S: (55 A), S: 25……(S は Gunma の特異抗原を示す)と決定した。然しながら O 112 c 及 K 55 A の各抗原とは部分的の関係であり,又 H 25 抗原も標準菌のそれと僅かに異つた。更に Gunma と Iwate とが同一 sero-type である事を同定し,この菌株の病原性及薬剤感受性について調査し,本菌分離の意義について考察した。

文 献

- 1) Kauffmann, F.: The serology of the coli group. *J. Immun.*, 57, 71, 1947.
- 2) VI Congresso internazionale di microbiologia, Roma, 1953.
- 3) 坂崎利一: 腸内細菌学の今日の諸問題. 日本公衆衛生学雑誌, 3(9), 407, 昭31.
- 4) Harada, K., Goto, R., and Yamamoto A.: On the discovery and Study of pathogenic paracoli, perfectly containing the omatic antigen of *Salmonella poona*. *Gunma J. Med. Sci.*, 2, 265, 1953.
- 5) 浜島腸炎 (第1報): 昭和28年, 昭和29年度, 三重県志摩郡浜島町に発生した流行性腸炎—所謂“浜島腸炎”の記録. 三重県, 昭30.
- 6) 中西良, 須知仁, 田尻稲穂, 山里将剛: 疫痢症状を呈した患者より分離した一大腸菌について, 日伝会誌, 31, 169, 1957.
- 7) 山形操六, 谷藤勝雄, 伊田勝, 福見秀雄, 中谷林太郎: 盛岡市某小学校における病原大腸菌が原因と思われる集団下痢症について, (その2) 病原. 第11回公衆衛生学会要旨, 1956, 於名古屋大学.
- 8) Edwards, P. R., and Ewing W. H.: Identification of Enterobacteriaceae. Printed U. S. A., pp. 137-160, 1956.
- 9) 坂崎利一, 波岡茂郎: 腸内細菌検索法, 細谷書店, 東京, pp. 112-113, 127, 1957.
- 10) Ewing, W. H., Hucks, M. C. and Taylor M. W.: Interrelationship of certain *Shigella* and *Escherichia* cultures, *J. Bact.*, 63, 319, 1952.
- 11) Seeliger, H.: Typenspezifische seren von *Shigella dysenteriae* 2 (Type Schmits). *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, 139, 182, 1954.
- 12) Ewing, W. H. and Tanner K. E.: The B antigens of *Shigella dysenteriae* 2 and *Escherichia coli* O group 112 a, 112 c. *J. Bact.*, 69, 89, 1955.
- 13) Kauffmann, F.: Enterobacteriaceae. *Ejnor munksgaard, copenhagen*, 2nd Ed., pp. 184-192, 1954.
- 14) 広木彦吉: 最近における腸菌属研究進歩の概況. 日本細菌学雑誌, 6, 337, 1951.
- 15) 福見秀雄, 中谷林太郎: 私信.
- 16) Ewing, W. H.: Serological relationships between *Shigella* and coliform cultures, *J. Bact.*, 66, 333, 1953.