腸炎菌 R→S 変異と anthracidal factor 感受性 及びマウス毒力との関係について

高 橋 三 男

慶応義塾大学医学部細菌学教室

〔受付： 6 月 16 日・1959 年〕

実験チフス症の研究と関連し腸炎菌の virulence 解明への手がかりとして、われわれの教室においては Bloom¹⁻⁹⁾ の炭疽菌殺菌物質 (anthracidal factor, 以下 ACF と略す) をとりあげ、これに対する腸炎菌の in vitro における感受性と、マウスに対する毒力との関連性が検討されてきた。即ち樋口¹⁰⁾ は種々な毒力をもつ腸炎菌諸菌株について、大橋¹¹⁾ は一強毒腸炎菌の各種陳旧培養より得られた種々変異株について検討し、in vitro において ACF に感受性の菌株は弱毒であるが ACF 抵抗の菌株は強毒であり、腸炎菌の毒力は S 型、R 型などの性状に関係するよりも、むしろ ACF 感受性に強い関連を有することが示された。また、私も¹²⁾ 一強毒腸炎菌株ブイオン培養の極めて早期に既に ACF 感受性の菌が混在し、それらは S 型の性状を有するにも拘らず弱毒化していることを知った。一方、Crossley¹³⁾ らは Salmonella の R 型菌を可溶性澱粉加寒天培地に継代培養することにより、容易に S 型に復帰せしめ得ると報告している。そこで私は一 S 型強毒腸炎菌株に由来する弱毒 R 型菌について Crossley らの方法を追試、また S 型菌を得られたときにはその ACF 感受性とマウスに対する毒力を検討することを企図した。その結果 S 型菌は可溶性澱粉の有無に関係なく出現することを認め、また得られた S 型菌の毒力は、毒力不変のものと強毒化しているものがありその毒力は ACF 感受性と密接に関係するという結果を得たので報告する。

実験 1 R 型菌から S 型菌の出現状況

強毒腸炎菌 No. 11 株 (S 型, ACF 500γ/ml 以上に抵抗性) に由来する R 型菌として大橋¹¹⁾ が陳旧培養から採取した “72” 株と “120” 株、及び私がブイオン 5 日培養から採取した B10, B30, B93 の各株の計 5 株を用いた。これらの菌株由来及び主要性状は第 1 表に示したが, “72”, “120” 株は集落所見は完全な rough で

あり。ブイオン中では沈澱性の発育を示し, trypaflavine に対して凝集性¹⁴⁾, Millon 反応¹⁵⁾ 及び重金属反応¹⁶⁾ 陽性であり, White¹⁷⁾ によるアルコール処理菌液を用いて原株 No. 11 株免疫抗血清 (O 凝集素価 640×) に対する凝集反応を検すると 40× 血清稀釈においては凝集を示さない, 定型的と思われる R 型菌である。B10, B30, B93 の 3 株是集落所見は一見 smooth であるが, ブイオン中では沈澱性の発育を示し, trypaflavine に対し凝集性。Millon 反応及び重金属イオン反応陽性であり, アルコール処理菌液を用いて原株 No. 11 株免疫抗血清 (O 凝集素価 640×) に対し 40× 以上の凝集素価しか示さない菌株である。なおこれらの菌株について樋口¹⁰⁾ の方法に従い, いわゆる学研変法培地を用いて ACF に対する感受性を検した結果を第 1 表に示したがいずれも ACF に対して感受性であり大橋の実験では > 500γ/ml の抵抗性を示した “72” 株も 7.8γ/ml の感受性を示すように変っていた。またこれらはすべてマウスに対する毒力はいずれも弱毒と判定されたものである (第 4 表参照)

これらの R 型菌から S 型菌の出現を検するには, Crossley らは 2%, 可溶性澱粉加 veal-agar 斜面培地に継代培養しているが, 彼らの方法を少しくかえて次の如く行つた。即ち, 上記 R 型株の普通寒天斜面 37°C 1 日培養から, 2% 可溶性澱粉加肉水ブイオン (5 ml 宛中試験管分注) 3 本に移植, 37°C に培養, 24 乃至 48 時間毎に新たな 2%, 可溶性澱粉加肉水ブイオンに移植継代, その際同時に 1 白金耳を 2%, 可溶性澱粉加普通寒天平板培地

TAKAHASHI Mitsuo: Correlation between the virulence of Salmonella enteritidis organisms and their susceptibility to the anthracidal factor while they are undergoing rough to smooth variation., Department of Bacteriology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo.—Jap. J. of Bact., 30-34, 1959.

第1表 使用 R 型菌株の主要性状

菌株	採取条件	集落性状	トリニンパ凝集性	ミロン反応	重金属反応	A感受性 C受 F性	O*凝集素価
“72”	合成培地 62日	R	+	+	+	7.8γ	<40×
“120”	陳旧ブイヨン 17日	R	+	+	+	31.2γ	<40×
B10	ブイヨン 5日	S	+	+	+	31.2γ	40×
B30	“ 5日	S	+	+	+	16.6γ	<40×
B93	“ 5日	S	+	+	+	15.6γ	40×

* No. 11株免疫ウサギ抗血清 (0凝集価 640×) の各株
アルコール処理菌液を用いたときの凝集素価

に分離培養してS型菌の出現を追求した。S型菌の出現を検するにはこの分離された集落のうち肉眼的にsmoothな集落30×宛を at random に選び 500×trypaflavine に対するため凝集反応を行い、一又は土のものを一応S型菌として普通寒天斜面に保存次項以下の性状の検査に供した。Pampana¹⁴⁾の云う如く trypaflavine 非凝集性のものを以てS型菌と一応判定したことには問題があると思うが、この点に関しては次項以下の実験結果において誤りのないことが証明された。なお対照として可溶性澱粉を加えない肉水ブイヨンについても同様な方式を用いてS型菌の出現を検し Crossley の云う如く R→S の変異に可溶性澱粉の存在が影響を与えているか否かを検した。

結果は第2表に示すようにR型菌からのS型菌出現は

継代初期には少いが、継代6—7代目頃より多くなり、継代10—12代においては最も多くなっている。そしてブイヨンに可溶性澱粉添加の影響は殆んどみられなかつたといつてよい。またS型菌の出現にはR型菌株間における差がみられ合成培地陳旧培養に由来する“72”株は継代9代まではS型菌の出現が少く、またブイヨン陳旧培養に由来する“120”株は実験全期間を通じS型菌の出現がみられなかつた。これらに反し、ブイヨン5日培養に由来する集落性状の smooth な B10, B30, B93 の各株では前記2株に比し比較的早期継代からtrypaflavine 非凝集性のS型菌の出現がみられ、その割合も“72”株に比しやや多かつた。

実験2 得られたS型菌諸株の血清学的性状

実験1においてR型菌から得られた trypaflavine 非凝集性の一応S型菌として採取されたもののすべて計 166株について、原株 No. 11 株免疫ウサギ抗血清を用いて凝集反応を行つた。凝集反応用の菌液はすべて White¹⁷⁾に従いアルコール処理を行つたいわゆるO菌液を用い、判定は37℃ 2時間後一夜室温放置した後に肉眼でよんだ。なお対照として原株 No. 11 株の同様なアルコール処理O菌液を用いて凝集反応を行つた。

結果は第3表に示すように由来するR型菌株、或は継代数に関係なくすべて No. 11 株抗血清の 320×~640×稀釈まで凝集を示し、S型菌である原株 No. 11 株と同様なO抗原を有することが示された。なお同時に行つた No. 11 株アルコール処理菌液に対する凝集素価は 640×である。

この結果は実験1において trypaflavine 非凝集性集落

第2表 R 型菌 から S 型菌 の 出 現 状 況

R型菌菌株名	肉水ブイヨンに澱粉添加の有無	継 代 数					計
		2—4代	5代	6—7代	8—9代	10—12代*	
“72”	+	1/90	0/30	1/60	1/60	13/90	16/330
	—	0/90	0/30	1/60	2/60	5/90	8/330
B10	+	0/90	1/30	5/60	6/60	9/90	21/330
	—	0/90	3/30	5/60	8/60	10/90	26/330
B30	+	0/90	2/30	6/60	6/60	9/90	23/330
	—	9/90	3/30	6/60	6/60	10/90	34/330
B93	+	0/90	3/30	6/60	6/60	6/90	24/330
	—	0/90	0/30	4/60	4/60	6/90	14/330

* 継代12代目は実験開始より30日目に当る。

分数の分母は被検集落数、分子は trypaflavine 非凝集性集落 (S型菌) 数

“120”株は全実験経過を通じ trypaflavine 非凝集性集落の検出不能の為 表略

第3表 得られたS型菌諸株の血清学的
性状及び ACF 感受性

原 株 名	採取 時 継 代 数	検 査 株 数	O凝集価 *		ACF感受性 (γ/ml)		
			320×	640×	3.9 15.6	31.2 62.5	125 ≥500
“72”	2—4	1	0	1**	1	0	0
	5	0	—	—	—	—	—
	6—7	2	0	2	2	0	0
	8—9	3	2	1	2	1	0
	10—12	18	3	15	14	4	0
B10	2—4	0	—	—	—	—	—
	5	4	0	4	0	0	4
	6—7	10	6	4	0	0	10
	8—9	14	9	5	1	0	13
	10—12	19	14	5	0	0	19
B30	2—4	9	1	8	0	0	9
	5	5	3	2	0	0	5
	6—7	12	4	8	0	0	12
	8—9	12	9	3	1	0	11
	10—12	19	13	6	0	2	17
B93	2—4	0	—	—	—	—	—
	5	3	0	3	0	0	3
	6—7	10	4	6	0	0	10
	8—9	10	6	4	0	1	9
	10—12	15	13	2	1	0	14

* No. 11 株免疫ウサギ抗血清 (O凝集価640×) の各株アルコール処理菌液を用いたときの凝集価

**数字は菌株数を示す。

を以てS型菌と一応判定したことの間違いのなかったことを示すものであろう。

実験3, 得られたS型菌諸株のACF感受性

実験1においてR型菌から得られた trypaflavne 非凝集性のS型菌として採取されたものすべて計166株についてACFに対する感受性を測定した。ACFに対する感受性の測定は前報¹²⁾と同様樋口¹⁰⁾に従い赤痢学研変法培地を用いて500γ—3.9γ/mlの2倍稀釈系列を作りこれに被検菌株の普通寒天斜面37°C1日培養から作ったpH7.2 phosphate buffer 浮遊液の一定稀釈液1白金耳宛(生菌数100±内外)を移植し, 37°C24時間培養後に発育の有無によって判定した。

結果は第3表に示したように, 陳旧培養に由来するR型菌“72”株から得られたS型菌株ではすべてACFに感受性でありACF15.6γ/ml以下の感受性を示すもの

が大部分(19株)で, 多くの継代後に得られた5株が31.2—62.5γ/mlの感受性を示したのみであつた。これに反しブイヨン5日培養に由来するR型菌B10, B30, B93の3株から得られたS型菌は大部分(136株)がACFに抵抗性で125≥500γ/mlの感受性を示し, 継代後期に得られた3株が3.9—15.6γ/ml, 3株が31.2—61.5γ/mlの感受性を示したにすぎなかつた。

実験4, 得られたS型菌のマウスに対する毒力

実験1においてR型菌から得られた trypaflavine 非凝集性のS型菌として採取された菌株のうち, R型菌“72”, B10株に由来する3株宛, R型菌B30株に由来するもの2株の計8株と, 対照としてR型菌“72”, B10, B30の各株, 及び原株No. 11株の総計12株のマウスに対する毒力を検した。マウスは市販雑系マウスの体重15g前後のものを用い, 各菌株の37°C18時間普通寒天斜面培地培養から10⁻¹, 10⁻⁴, 10⁻⁷ mg/0.3mlの割にpH7.2のphosphate bufferに浮遊せしめた菌液の0.3mlずつを腹腔内接種した。感染後は3週間観察, この間に死亡したマウスは心血を培養, 感染死か否かを確かめた。3週間生残したマウスはエーテルにて屠殺, 心血は一白金耳, 肝, 脾, 腸間膜リンパ腺はコンラージ棒にて圧碎したものをそのまま遠藤平板に直接塗抹培養, またブイヨンに増菌培養して保菌の有無を検した。

結果は第4表に示したように採取されたときの継代数の如何をとわず, マウスに対する毒力はACFに対する感受性に密接な関連を有していた。即ちACFに対し>500γ/ml抵抗性を示す“20”, “159”, “22”の3株は殆んど原株強毒腸炎No. 11株と同程度の毒力を示したのに反し, ACFに対し31.2γ/ml以下の感受性を示した諸株はその程度に差はあるが一般にマウスに対して弱毒であつた。ここにいう毒力の差は死亡マウス数によつても見られるが, 殊に死亡日数の差を見ると10⁻¹mg接接種群において一日目に死亡するマウスの多い菌株と三日以後に死亡するマウスの多い菌株との間で, 毒力の差が明瞭に現われている。もし中間の菌量を細かく検討したならば, さらに判然とした毒力の差が得られたであらうことは想像に難くない。

考 察

以上の結果のうちまずR→S変異について考察を加えてみよう。Crossley¹³⁾らは2%可溶性澱粉加veal agar斜面に継代培養することにより, SalmonellaのR型菌を容易にS型菌に変えうると報じている。これに反し今回の実験結果は一腸炎菌株に由来するR型菌からは, 可溶

総 括

1) 一強毒 S 型腸炎菌から得られた種々の R 型菌株からブイヨン継代培養中に S 型菌を得ることができるが、この S 型菌の出現に対し可溶性澱粉添加が有利に働くという Crossley らの報告は実験できなかった。

2) R 型菌株からの S 型菌出現を追求する際に、trypaflavin 非凝集性を指標として一応 S 型菌としたが、O 凝集反応の検査の結果は trypaflavine 非凝集性の菌株はすべて S 型菌と同様な O 抗原を有することが示された。

3) 得られた S 型菌株には anthracidal factor (A C F) に対し抵抗性のものと、感受性のものがあり、A C F 抵抗性の菌株はマウスに対する毒力が大であるが、A C F 感受性の菌株はマウスに対し弱毒であることが認められ既報の諸成績とともに、A C F に対する感受性とマウスに対する毒力との間に密接な関連が立証された。

稿を終るに当り牛場教授の御指導、御校閲並びに斎藤講師の御忠言、御助力に深く感謝する。

文 献

- 1) Cromartie, W. J., Bloom, W. L. and Watson, D. W., J. Infect. Dis., 80; 1-13, 1947.
- 2) Cromartie, W. J., Watson, D. W., Bloom, W. L., and Heckly, R. J., J. Infect. Dis., 80;

- 14-27, 1947.
- 3) Watson, D. W., Cromartie, W. J., Bloom, W. L., Kegles, G. and Heckly, R. J.: J. Infect. Dis., 80; 28-40, 1947.
- 4) Bloom, W. L., Watson, D. W., Cromartie, W. J. and Freed, M.: J. Infect. Dis., 80; 41-52, 1947.
- 5) Bloom, W. L. and Blake, F. G.: J. Infect. Dis. 83; 116-123, 1948.
- 6) Lewis, G. T., Bloom, W. L. and Smart, C. W.: Cancer Research, 9; 103-167, 1949.
- 7) Bloom, W. L., Winters, M. G. and Watson, D. W.: J. Bact., 62; 7-31, 1951.
- 8) Watson, D. W. and Bloom, W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 81; 29-33, 1952.
- 9) Bloom, W. L. and Prigmore, J. R.: J. Bact., 64; 852-858, 1952.
- 10) 樋口三郎: 日本細菌学雑誌, 8 (9), 917-921, 1953.
- 11) 大橋俊彦: 日本細菌学雑誌, 12 (11), 885-890, 1957.
- 12) 高橋三男: 大橋俊彦: 日本細菌学雑誌, 発表予定
- 13) Crossley, V. M., Ferguson and Brydson, L.: J. Bact. 52; 367-371, 1946.
- 14) Pampana, E. J.: J. Hyg., 33; 402-403, 1933.
- 15) White, P. B.: J. Path. Bact., 32; 85-94, 1929.
- 16) 岡本 啓: 日新医学, 32; 894, 昭18(1943).
- 17) White, P. B.: J. Path. Bact., 30; 113-132, 1927.