Pseudomonas aeruginosa に関する研究

堀 川 高 大

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室

鈴 木 武

愛知学院大学歯学部微生物学教室

藤 田 浩

国立癌センター内科

山 田 潔

三重県立大学医学部微生物学教室

吉 川 秀 成

三重県衛生研究所

〔受付: 7 月 20 日, 1962 年〕

緒 言

最近化学療法剤や抗生物質の普及に伴い, これら薬剤に比較的抵抗力の強い *Pseudomonas* (Ps.) *aeruginosa* の分離頻度が増加している。過去において本菌は外科的創傷に混合感染し緑色の膿をだす程度の, 病原性の弱い雑菌に近い位置を与えられ, 教科書でも本菌の記載は少く各種性状においてもなおはなはだ未完成のものである。例えば本菌の生化学的性状をみても, 糖類分解, 硫化水素の発生, ゼラチンの分解, 抗塩性などについて, 各成書^{1) 2) 3) 4) 5)}により記載はまちまちであり, 全く逆のことを述べてあることがある。また本菌の免疫学的性状, 抗原構造, フェージなどについても現在迄の知見は非常に少いが最近本間氏ら¹⁰⁾により本菌の表面構造が詳細に論じられているのは注目に値する。

私どもは数年間にわたり, 臨床各科の材料から本菌の分離をこころみた所, 敗血症, 脳膜炎, 中耳炎, その他化膿性疾患のかかなりの重篤な病状の起炎菌として相等高率に本菌が分離されること, また梅雨期や盛夏に病棟の中で本菌の流行を思わせるような多数の患者の創傷感染をきたしたこともあり, 本菌の意義は化学療法以前の時代に比し, 重要視しなければならない。

本菌の同定には, 特有色素たる pyocyanin の産生をしらべることが重要であることは勿論であるが, 分離株の相当数は non-pyocyanin variants であり, その他生化学的, 血清学的性状においても不明の点も多く, 同定

困難の場合に遭遇する。

これらの観点から, 私共は過去数年間にわたり Ps. *aeruginosa* の分布, 生化学的性状, 分類, 特異多糖体の性質, 薬剤耐性の諸問題などについて調査し発表を行なってきたが, ここにその大要を述べる¹¹⁻¹³⁾。

第1部 患者および自然界における Ps. *aeruginosa* の分布

第1項 分離培地

本菌は普通寒天培地やブイヨンなどのすべての通常培地に反く発育し, また EMB, McConkey, SS らの腸内細菌選択培地や高張塩類培地その他 koser の合成培地などにも生える。

本菌は好気的条件下によく発育し, 液体培地では菌膜を作り, 固形培地では比較的大きな円滑灰色を帯びたコロニーを発生する。このコロニーの着色は日とともに濃くなる。また多くの色素産生株において菌苔表面がフェージブラックのごとき iridescent phenomenon¹⁴⁾を呈し金属光沢を帯びるようになる。私共の 47 株中約半数が iridescent strain であつた。また本菌特有の臭を呈する, 最も重大なる性質は培地色が pyocyanin や fluorescin のために緑色化することである。而し普通培地では肉眼で明かに呈色の認められるのは, かなり色素産生の強い株だけである。培地色の変化がみられない場合, クロロホルムを培地に入れ溶出を行うと pyocyanin の青色を発見できる場合がある。本色素は稀塩酸に移行し赤

色になる。クロロホルム抽出でも色素がみられない場合は、色素産生増加培地え菌を移してみる。pyocyanin の産生促進には、King の A 培地¹⁷⁾が最も優れており、普通培地で色素産生のみられない株の多数は本培地中で色素を産生し、斜面の下部が深青色に、上部の寒天層の薄い所は赤色の pyorubin が形成される。ある株は pyorubin のみ産生することがある。これでもなお色素産生が全く認められない株は一応 non pyocyanin (non pyorubin) 株と考えて良いと思う。私共の調査で¹⁾、血液や扁桃からの分離菌の大部分はこの non-pyocyanin variant であった。

次で fluorescin 産生促進培地である King の B 培地¹⁷⁾に菌を移す。本色素が産生されれば培地は黄緑蛍光性の着色を帯びてくる。pyocyanin を産生し、fluorescin をださない株の記載¹⁷⁾もあるが私共の経験では non-fluorescin variant は 1 株も存在しなかつた。また本色素は *Ps. aeruginosa* にのみ特有ではなく、*Pseudomonas* 属の他の species でも産生する。

以上の培養性状から、分離および確認培地として何を選ぶべきであるか。分離培地は普通固形培地の何れをも使用できるが、選択して分離するには、desoxychol 酸含有培地や簡単な citrate から成る半合成培地が良いと思われる。また抗生物質耐性菌を分離するには、penicillin や streptomycin を含有した培地が推賞できる。確認培地には King の A, B 培地¹⁷⁾ (B 培地は分離培地としても優れている) で色素産生を検し、同時にその他生化学的性状検査培地に接種して検査すべきである。

第 2 項：剔出扁桃およびアデノイドよりの *Ps. aeruginosa* の分離成績

私共は数年前、剔出扁桃やアデノイドの virus 保毒の有無をみるためにこれらの乳剤に penicillin と streptomycin を加え孵化鶏卵に接種してみた。この時、接種卵の多数が、細菌感染を起し、腐敗死亡した。これの原因を追求するために、penicillin 100 u/ml, streptomycin 100 γ/ml を含むブイオンに扁桃およびアデノイド乳剤を接種培養を行なつた。

その結果 23 個の扁桃から 12 株、9 個のアデノイドから 5 株の細菌を分離した。この内、扁桃からの 1 株を除いて、他の全部が *Pseudomonas* に属する菌であつた。この *Pseudomonas* の species の決定に当り私共は非常に困難を感じた。既報の概要を第 1 表に示すと、分離菌は通常培地で色素産生しない。また Bergey によれば、*Ps. aeruginosa* は Xylose, arabinose, glucose,

第 1 表 剔出扁桃およびアデノイドよりの *Ps. aeruginosa* の分離率およびその生化学的性質

			色素産生能		糖 分 解 能									
	検査例数	分離株数	ビ オ チ ル ア ニ ン	フル オ レ ス チ ン	グル コ ー ゼ	ハ ス ガ ス	キ シ ト ー ゼ	ガラ クト ー ゼ	アラ ビ ノ ー ゼ	ラク ト ー ゼ	フル ク ト ー ゼ	マン ニ ツ ト	イ ノ シ ツ ト	グリ セ リン
扁桃	23	11	—	—	+	d	—	+	+	d	—	—	—	—
アデノイド	9	5	—	—	+	d	—	+	+	d	—	—	—	—

galactose らを分解しないことになっているが、分離菌は通常 Barsiekow 培地でこれより明かに酸を形成した。それで、*Ps. intybi* (Bergey's manual の第 7 版では記載がない) と似ているが矛盾も多いと言う結論をだし発表¹⁾したが、後刻、本論文生化学の部で述べるごとく、本菌は *Ps. aeruginosa* の non-pyocyanin variant であつて、糖分解性、血清学的性状等標準株と合致することが判明した。

以上の結果から *Ps. aeruginosa* が非常に高率に扁桃やアデノイドから検出され、また分離株は各種薬剤に高度の耐性を有することが判つた。臨床的にも本菌が他の菌属とともに、扁桃腺炎の慢性化や病巣感染にかなりの役割をしているのではないかと思われる。また non-pyocyanin 株のみが分離されたが、興味ある本現象の理由について現在のところ説明を為しえない。

第 3 項：各種臨床材料からの *Ps. aeruginosa* の分離時に non-pyocyanin 株の検出率について¹⁸⁾

三重県立大学附属病院中央検査室に呈出された検査材料より、SS 培地と血液寒天により本菌を分離、King 培地で色素産生をしらべた。その結果第 2 表に示すごとく、各種患者材料より計 50 株の *Ps. aeruginosa* を分離同定した。

色素産生試験で、全株 fluorescin を産生したが、pyocyanin は産生するものとししないものが有り、一定の分離材料からは常に非産生株がえられると言う非常に興味ある結果をえた。敗血症や扁桃腺炎からの分離株のすべてと、中耳炎からの分離株の多数が non-pyocyanin 株であつた。この理由を想像すると、血液寒天では本菌の色素産生が減弱することから、血色素がこの variant を

第2表 各種臨床材料より *Ps. aeruginosa* の分離特に non-pyocyanin 株の検出率

分離材料	臨床診断	<i>Ps. aeruginosa</i> の分離数	non-pyocyanin 株数
血液	敗血症	4	4
糞便	腸炎及健康者	7	0
膿汁	創傷感染	7	0
耳漏	中耳炎	12	10
扁桃腺炎及 アデノイド	扁桃腺炎及 肥大・アデ ノイド肥大	16	16
眼脂	結膜炎	2	0
脳脊髄液	脳膜炎	1	0
膿汁	肝膿瘍	1	0

生じる上に何らかの作用を有することが考えられる。また第2に, chloramphenicol が pyocyanin 産生を抑制すると言う私共の実験があるが, 患者が本剤の投与を受けている場合, 本 variant の出現の可能性があるとも思われる。また non-pyocyanin 株の同定は, 生化学的, 血清学的性質を充分注意しないと必ずしも容易には *Ps. aeruginosa* の決定はできない。

これら患者中, 2, 3 興味ある症例を附記すると腸チフスの永続保菌者で胆のう剔除後も, なお菌の排泄が止らなかった。ところが本患者が突然 *Ps. aeruginosa* の感染を受け, 純培養状態で本菌が便より分離されるようになって以来, *Salm. typhi* の排泄は完全に止つた。すなわち菌交代現象により carrier は伝染病棟から退院できた。

meningitis の患者は多分腰椎穿刺の時本菌が入つたと想像されたが重篤な化膿性脳膜炎の症像を呈し死亡した。逆性石鹼での手指の消毒は本菌にはあまり有効でないと思う。

敗血症患者4名の中, 1名は出産後の産褥であつた。38°~39°C の弛張性の発熱が, つづき各種抗生物質による治癒は殆んど無効で pyocyanin 非産生の R 型の菌が十数回も分離された。これら患者に polymyxin B の治療は当時入手困難のためできなかったが, 今後は是非試みるべきで薬剤であると思う。

次に中耳炎の場合には予想外に高く, 36 検体中 1/3 に *Ps. aeruginosa* が分離された。また混合感染が大部で特に *Staphylococcus* との2種感染が多かつた。その他, 本学検での最近の経験では健康人糞便から数%~十数%の carrier がみられた。また時々重症肺膿瘍の患者から本菌の混合感染が証明された。

第4項: 自然界からの *Ps. aeruginosa* の分離, 特に自然界由来株と人由来株との相について⁷⁾第3表。

第3表 *Ps. aeruginosa* 人由来株と自然界由来株との相違

	色素産生			菌体凝集反応による分類*						代表宿主株に対する培養液の溶菌性					
	検査例数	ピオン	フルオレスチン	I型	II型	III型	IV型	V型	VI型	その他	5株の溶菌	4株の溶菌	3株の溶菌	2株の溶菌	1株の溶菌
人	50	20	50	2	3	7	22	11	1	4	1	4	9	16	14
自然界	21	20	21	2	1	3	2	0	1	12	2	0	0	2	2

* 分離株の多数は種々の程度の共通抗原を有し, 各型抗血清に凝集を示したが, 凝集価の最も高い型に入れて, 分類した。

Ps. aeruginosa は人体感染にて稀な菌種では無いと同時に, 自然界にもあまねく存在する。McLeod は病棟周囲のほこり, 毛布, 手指, 器具, 近辺の溝などでの本菌の分布を調べている。Rigen らは土, 下水, 天然水, 腐敗した果物, 糞便などにおける本菌の分布をしらべた結果, その natural habitant としては人間の便(11%)と下水(90%)が最も重要であると述べている。私共は自然界由来株を分離するために, 夏季(7, 8, 9月)津市内の各所の池, 溝, 水田, 川, 水溜などの検査を行なつた。

その結果ブイヨン増菌, desoxychol 酸培地分離法により, 検体60例中より, 27株の *Ps. aeruginosa* を分離同定した。検出率は池, 汚水, などは高く(50%以上), 水田, 河川は低かつた(20%以下)。

この分離菌の人由来株との相違を調査した結果, 第3表に示すごとく, 自然界由来株は殆んどが pyocyanin 産生株である。また免疫学的に人由来株は大部分6型に分類可能であつたが, 自然株は約半数が分類不可能であり, 更に広い他の抗原を有するものが多い。また phage-typing によつても人由来株と異つた態度を示すものが多い。而し他の生化学的性状では両者の差違は少なかつた。

第5項: 某整毛工場のモヘア原料の *Ps. aeruginosa* 汚染による着色およびその対策について

夏季高温多湿の地域において, fleece や mohair の細

第4表 各種消毒剤による *Ps. aeruginosa* および *Serratia marcescens* の発育阻止試験

菌 株 \ 薬 剤	Pentachlorophenol	Sunnit	Hyamine T Solution	Liquefied Carbolic Acid	Sodium Hypochloride Solution	Sunchlomin	Formalin
<i>Ps. aeruginosa</i> Chuō 1	0.250	> 2	0.0	0.24	2	1	0.062
<i>Ps. aeruginosa</i> Chuō 2	0.031	> 2	0.5	0.125	2	0.5	0.062
<i>Serratia marcescens</i> Chuō 3	0.125	> 2	0.5	0.25	1	1	0.062

* Pentachlorophenol: Mitsui kagaku Co. Ltd.
 Sunnit: Bis normal Tributyl Tin Oxide 10 % Solution, Nitto Kagaku Co. Ltd.
 Hyamine-T Solution: Benzosonium Chloride 10 W/V % Solution, Sankyo Pharmac Co.
 Liquefied Carbolic Acid: 90 % Solution, Yamazen Pharmac. Co.
 Sodium Hypochloride Solution: About 4 % Solution, Takeda Pharmac.
 Sunchlomin: 100 % Chloramin T, Sakae Kagaku Kogyo K.K.
 Formalin: 35 % Formaldehyde Solution, Maruishi Pharmac. Co.

菌汚染の結果、紡績工場で細菌色素による着色が惹起することがある。Fraser¹¹⁾らによれば、本着色は *Ps. aeruginosa* の pyocyanin 酸化および還元物質による着色であることを指摘している。

1958年夏、津市内某整毛工場で、夏季、倉庫内のモヘア原毛が汚染し緑色、褐色、赤色の着色を示し、その原因の追求と対策を依頼された。このため、着色モヘアを可及的無菌的に採取し、プイヨンに浸し増菌後、寒天平板に移植し分離した。その結果2群の材料から *Ps. aeruginosa* を1群から *Serratia marcescens* を純培養状に分離した。また逆に分離菌により無着色モヘアを着色せしめた。すなわち緑色は *Ps. aeruginosa*、褐色、赤色着色は *S. marcescens* でも *Ps. aeruginosa* でも起しうることが判った。(*S. marcescens* は特に King の A 培地で美麗赤色コロニーを作る) (第4表)

対策として、先ず14種の有機溶媒で脱色実験を行なったが、線維の変質や経済的理由により実施は不可能であった。故に細菌汚染を予防するために数種の工業的消毒剤によるこれら細菌の発育阻止力を検査した。その結果第4表に示すごとく、フォルマリン、pentachlorophenol や organo-tin compound が有効であり線維も損傷しないことが判明した。

この中フォルマリンが最有効であり、倉庫を密閉し、フォルマリンガス消毒を行うことを私共は推奨した。

第2部 *Ps. aeruginosa* の生化学的性状の諸問題

第1項: *Ps. aeruginosa* の糖類分解能について⁴⁾

Bergey's Manual¹¹⁾によれば“glucose, fructose, galactose, arabinose, maltose, lactose, sucrose, dextrin, inulin, glycerol, mannitol, dulcitol were not fermented”と述べている。而し多くの textbook¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ らでは glucose (dextrose) からのみ酸を産生することを述べている。Ringén²⁰⁾らは、固形培地では glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose から酸を産生すると報告している。また Liu²¹⁾によれば, glucose, fructose, mannitol, trehalose, glycerol を合成培地で唯一の炭素源として利用し, 酸を形成する。また arabinose, xylose, mannose, rhamnose らを唯一の炭素源としては利用できないが、これらから酸を産生すると発表している。

第1図 0.1%ペプトン、2%炭水化物含有培地において *P. aeruginosa* の形成する酸の定量

10 ml の培地中に菌と接種し、6日間培養後生じた酸を 0.1 N NaOH で測定した。

第5表 Pyocyanin, および Fluorescin 産生に及ぼす4抗生物質の影響について

菌株名	色素 産生能	感 性 菌		CM 耐性菌		SM 耐性菌		TM 耐性菌		AM耐性菌	
		py.	fl.	py.	fl.	py.	fl.	py.	fl.	py.	fl.
上 島		++	++	-or±	++	++	++	++	++	++	++
宇 野 4		++	++	-or±	++	++	++	++	++	++	++
大 谷		++	++	-or±	++	++	++	++	++	++	++
小 林		++	++	-or±	++	++	++	++	++	++	++

定量的詳細は Mie Medical J., Vol. 7, No. 1 参照の事。

py.: pyocyanin fl.: fluorescin CM: Chloramphenicol SM: streptomycin

TM: terramycin AM: aureomycin

私共の以前の経験でも、通常 Barsiekow 培地で Bergey でのごとき結果のこともあり。また Ringen のごとき結果をうることもあり、この問題を解明すべく実験を行なった。詳細は既に発表⁴⁾したが Barsiekow-培地の組成中、peptone 量を1%, 1.5%, 0.1%と漸減した培地を作り、酸産生状況を観察した。その結果、ヘプトン量の減少に平行して数種の糖から著明な酸産生の起ることをみた。第1図は、0.1%ペプトン、2%糖培地で形成される酸を定量するために0.1%N NaOHで滴定した結果である。これによれば、xylose, arabinose, galactose, mannose, glucose から比較的大量の酸を、fructose は中等量の酸を、mannitol, rhamnose, glycerol, maltose から少量の酸を産生することが判明した。一方では、各種製品からの peptone からのアルカリ形成が観察された。Barsiekow 培地では、この糖からの酸とペプトンからのアルカリが打ち消し合い、その量関係により、ある場合は陽性、ある場合は陰性結果を生じることが明かにした。一般的に、上記大量酸形成の5種の糖は、Barsiekow 培地で形成がしばしば陽性にできることを注意したい。(第1図)

Hugh & Leifson 培地で嫌気性に glucose の分解が起るや否やについて検した結果陰性であった。

また上記糖類から酸を形成してもガスは産生しない。

第2項: Pyocyanin, Fluorescin 産生に及ぼす抗生物質の影響⁵⁾(第5表)

最近臨床各科より *Ps. aeruginosa* の分離件数が増加している。そしてその分離株の多数が nonpyocyanin 株である。患者は多少とも抗生物質の投与を受けている場合が多く、この抗生物質が non-pyocyanin variant の発生に影響を有するのではないかと推察される。

それで私共は terramycin, aureomycin, streptomycin, chloramphenicol の4種抗生物質を選び pyocyanin と

fluorescin 産生に対する影響をみた。詳細は既に発表したが、*Ps. aeruginosa* 4株をそれぞれの抗生物質を少量から次第に大量に含ませた培地に数代継代し、4株ともそれぞれ抗生剤に1000 γ /ml 以上の耐性を有する株を in vitro で作った。そして King¹⁷⁾のA培地(pyocyanin 用)、B培地(fluorescin 用)に移植し、色素産生状況をみた。その結果第5表に示すごとく、fluorescin の産生は抗生物質に影響されなかったが、pyocyanin の産生は、chloramphenicol により著明に抑制ないし消失することが判明した。

pyocyanin の産生には、酸素、塩類、pH、温度、糖類、アミノ酸など多くの因子が関係するが、私どもの研究によりも chloramphenicol 色素産生に重要な影響を有すると思われた。なお私どもと同様の観察は大沢らも学会に報告している。

第3項: *Ps. aeruginosa* のその他生化学的性質の特徴
糖分解性や色素産生以外にも、数種の生化学的性状において、本菌特有の性質もあり、なお二三不明の点も存在する。(第6表)

第6表 *Ps. aeruginosa* の特徴的な生化学的性状
(使用菌株 54株)

H ₂ S 産生	18.7 %
硝酸塩還元	100.0 %
ゼラチン液化	95.0 %
5% NaCl 発育	100.0 %
インドール産生	0 %
運動性	100.0 %
チトラート陽性	100.0 %
チトクローム酸化酵素陽性	100.0 %

私共は54株の *Ps. aeruginosa* を用いて、第6表に示す検査を行なってみた。この内100%陽性を示したのは、高張食塩培地での発育、チトクローム、硝酸塩の還

元、通動性などであつた。

硝酸塩の還元は非常に速かであり、24時間以内に亜硝酸や NH_2OH を通り越して N_2 ガスになるのが大部分であつた。

citrate の分解は速かで5～6時間後に現われる。

また最近抗塩菌が食中毒の原因となり、本菌は *Pseudomonas* 属 (*Ps. aeruginosa* ではない) に入るといわれているが、この *Ps. aeruginosa* が高張食塩類含有培地でも、非食塩含有培地でもともに生育することは興味深い。

H_2S 産生は Dubos¹³⁾ や Topley¹⁴⁾ は(－)、Zinsser と Jordan-Burrows では(＋)と述べているが、私共の実験では夜くの株が(－)であるが、約18.7%は(＋)であり、SIM, Kligler 培地で、ともに証明しうることが判明した。

ゼラチンの液化は殆んどの株が陽性であり、少数(5%)のみ陰性で、後者は変異株と考えても良いと思う。

indol 反応は Ehrlich の法で偽陽性を示す場合があると記載¹³⁾¹⁴⁾があるが、私共の SIM 培地に培養し、蔭酸紙で検したり、またエーテル抽出後、Ehrlich-Böhme の第1液を添加する方法では全例陰性であつた。

また本菌は溶血性を有し、古来 pyocyanolysin の名称がある。Wilson²⁰⁾によるとこの hemolysin は specific antihemolysin を産生せしめるといつている。私共はモルモットおよび兎の血液寒天を作成し溶血能を検したが、菌株により溶血は全例に起るが強弱種々の程度があり、新鮮培養すなわち24時間後では不完全溶血の株も多い。またブイヨン培地遠沈上清に洗滌血球を入れても、溶血価は低く、不完全溶血か、せいぜい8～32倍稀釈迄しか溶血は起らなかつた。

血液寒天培地では色素産生が抑制されるといわれているが¹³⁾、私共も他の一般培地と血液寒天との色素産生の差をクロロホルム抽出液で検した。その結果血液寒天培地では pyocyanin は著明に減弱をきたしたが、数代継代しても完全な色素産生の消失はきたさなかつた。

第3部 *Ps. aeruginosa* の分類

第1項：*Ps. aeruginosa* の O, H 凝集反応による血清学的分類⁹⁾ (第7表)

本菌は色素産生や生化学的性質の変異が多い、この、variant を血清学的に簡易かつ確実に同定できないものかどうかを検査するため、私共が分離した49株のOおよびHの抗原性状をしらべた。

本菌の血清学的性質について、Munozら²¹⁾は血清学

第7表 H 凝集反応による緑膿菌の分類

菌	抗血清	I'	II'	III'	IV'	V'	VI'	Ps. fluo.'
<i>Ps. aeruginosa</i>	I	640	—*	—	—	—	—	—
	II	—	1280	—	—	—	—	—
	III	—	—	1280	—	—	80	—
	IV	—	—	—	1280	—	160	—
	V	—	—	—	—	1280	160	—
	VI	—	—	160	320	1280	1280	—
<i>Ps. fluorescens</i>		—	—	—	—	—	—	640

*—は<20 陰性

O 凝集反応による緑膿菌の分類

菌	抗血清	I'	II'	III'	IV'	V'	VI'	Ps. fluo.'
<i>Ps. aeruginosa</i>	I	320	—	—	—	—	—	—
	II	—	640	—	—	—	—	—
	III	—	—	320	—	—	—	—
	IV	—	—	—	320	—	—	—
	V	—	—	—	—	640	—	—
	VI	—	—	—	—	—	640	—
<i>Ps. fluorescens</i>		—	—	—	—	—	—	160

*—は<20 陰性

的に homo と hetero の2群に分けている。細谷および本間は凝集反応で型を沈降反応で3型を分離している。Vender²⁵⁾らによればO抗原10型を、また最近 McLeod²⁶⁾の詳細な研究でも10型を分つている。

私共は既報⁹⁾の方法により、本菌のHおよびO抗原を検し、第7表に示すごとく6型に分類した。そして各型の代表株として、比較的共通抗原の少いI～VI株を選定した。

この代表株により免疫血清を作成し、人由来株および自然界由来株を血清学的に分類すると第3表のごとく、人由来株の大部分はこの範中に入つたが、自然界株の約半数は6種血清に凝集を示さなかつた。すなわち、*Ps. aeruginosa* は6型以上の抗原の存在から予想され、国際的な代表株の統一が望まれている。

Ps. aeruginosa は *Ps. fluorescens* その他 *Pseudomonas* 属の他の菌種との共通抗原は少く²²⁾、私共の経験でも、上記6種多価血清により患者よりの分離株の同定に充分利用しえた。

また私共の6代表株と、伝研株²⁴⁾ Ginger²⁷⁾らの本菌抗原物質 PC-9 との抗原の比較検討を行い已に報告している。

第 8 表 *Ps. aeruginosa* phage typing による分類

	広範囲		中 間 型						狭 範 囲										0		
溶菌の株数	5		4	3				2					1					0			
溶菌の型式	typical	non-typical	typical	non-typical	typical	non-typical	non-typical	typical	non-typical	typical	non-typical	non-typical	typical	non-typical	typical A	typical B	typical C	typical D	typical E	typical F	negative
T 小 林 分 木 P ₄ 中 尾 崎	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	±	±	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	+	-

* typical 代表菌株を溶菌する順位により typical と仮称し、順位の乱れているものを non-typical とした。

第 9 表 *Ps. aeruginosa* の phage typing による分類と血清学的分類との相関関係

I	phage typing による	小林, 12, 17, 18, 21, P ₄ , 27
	血清学的による	小林, 12, 17, 18, 21, P ₄ , 16
II	phage typing による	大谷, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, W
	血清学的による	大谷, 5, 6, 7, 11, 20, 25, 26
III	phage typing による	分木, 2, 3, 22, 23, 中, 4, 5, 16
	血清学的による	分木, 2, 3, 22, 23, 9, 10, 19
IV	phage typing による	渡辺, T
	血清学的による	渡辺, T
V	phage typing による	宇野, 11, 19, 25
	血清学的による	宇野
VI	phage typing による	尾崎, 20
	血清学的による	尾崎, W, 中, 4, 24

第 2 項: *Ps. aeruginosa* の phage typing による分類⁷⁾

本菌 phage について、数人の報告があるが、Warner¹⁰⁾は、phage により本菌の同定可能と述べている。

私共は phage typing により分類を試みた。すなわち既報⁷⁾のごとく、教室保存株 34 株を lysogenic strain と仮定し、この遠沈上清と上記 34 株の仮定宿主菌とを互に縦横にかけ合せ、溶菌の有無を plaque の形成あるいは滴下簡便法により検査し、代表宿主菌の決定と phage の溶菌性状を検した。その結果は第 8 表に示すごとく、6 代表宿主菌に対し、高範囲に溶菌を起す phage から、中間型、狭範囲溶菌 phage のごとく緑膿菌 phage

を数種に分類することができた。(第 8 表)

かくして、特定株の 6 代表宿主に対する分離菌培養上清 (phage) の溶菌性をしらべることにより、第 9 表のごとく、分離株をその自己産生フェージにより、6 種に分類することができた。この結果で、非常に興味あることは、この phage-typing による分類と前項の菌体凝集反応による分類とが、かなり良く一致することである。(第 9 表)

以上の観察から、血清学的分類と同様に、bacterio phage を利用した分類も、本菌の同定あるいは抗原分析などに有用な手段となると考えられる。

第4部 Ps. aeruginosa 多糖体の免疫血清学的性質

第1項: Ps. aeruginosa 特異多糖体の抽出⁸⁾

細菌の菌体抗原物質は多糖体、蛋白質、脂質の複合物からできている。この中多糖体は主に細菌の血清学的特異性を決定している。各種細菌の多糖体の抽出法や抗原性状に関し、数多くの仕事がある^{29)~32)}。Ps. aeruginosa の多糖体に関しては、Gaines³³⁾らや Warren³⁴⁾らの文献がある。

私共は第10表に示す方法により、トリプシン消化、三塩化醋酸処理、有機溶媒による fractionation を行なつ

第10表 緑膿菌多糖体の抽出法

て、型特異多糖体を抽出した。本抗原は既報のごとく、蛋白反応は陰性であるが、Molish 反応、orcinol 反応、diphenylamin 反応、ninhydrin 反応が陽性で、hexosamin を 33.5%、hexuronic acid を 3.9%、その他脂質を含有する lipo-polysaccharide であった。

本抽出抗原は中性では 120°C 30 分の加熱に耐えたが、pH 4.2~120°C、pH 9.9~120°C 各 30 分で抗原性状は不活化された。またペプシン、トリプシン、ジアスターゼなどの作用や、M/10 の H₂O₂、HCHO、HCOOH C₆H₅NH₂ の作用により抗原性に變化をきたさない。KMnO₄ や KIO₄(HIO₄) には特殊の作用を受け、本抗原の血球感作能の消失、抗体中和能の減弱、沈降能の軽

度の減弱をきたした。

第2項: 抽出多糖体の血清学的性状^{8) 9)}

私共の抽出 lipo-polysaccharide は O-抗原特異性を有し、抗血清との間に沈降反応を呈する。第11表に示すごとく、本抗原は人、モルモット、羊、鶏、犬、兎、マウス、藁、一部の牛等の洗滌血球に附着し、この抗原処理血球(感作血球)は菌体免疫血清により凝集される、(indirect bacterial hemagglutination)、またこの反応系に補体を入れると溶血反応を呈する。また本抗原は感作血球凝集性抗体や沈降抗体を中和、吸収する能力がある。

第11表 各種動物赤血球に対する Proteus および Pseudomonas 多糖体の感作能の比較

多糖体の感作に 用いた赤血球	Proteus OX ₁₉ 感 作血球凝集反応 の価*	Ps. aeruginosa 感作血球凝集反 応の価*
人間 O 型血球	1280×	1280×
モルモット //	640×	1280×
鶏 //	640×	1280×
羊 //	640×	1280×
犬 //	640×	1280×
家 兎 //	160×	320×
マウス //	160×	320×
藁 //	640×	1280×
イモリ //	陰 性	n. d.
山 羊 //	陰 性	陰 性
A 群の牛 //	陰 性	陰 性
B 群の牛 //	80×	80×

* 抗血清は Proteus 及び Pseudomonas の菌体で免疫した家兎血清を用いた。勿論対照として多糖体処理をしていない各種血球が家兎血清で凝集されない事を確かめている。

私共はこの感作血球凝集反応および溶血反応について、Pseudomonas の多糖体と Proteus の OX₁₉ および OXK の多糖体の山羊血球に対する作用を詳細に比較検討し興味ある現象を発表した⁸⁾。すなわち第12表に示す実験において、これらの感作血球に対してトリプシン処理による作用や、Coombs 血清の作用が、異つた態度を示すことから、各種細菌の多糖体を附着せしめる、血球表面の receptor はそれぞれ異つた 特定の位置にあることを推論した(第12表)。

前記のように Ps. aeruginosa は血清学的に 6 種に分類したが、この 6 種代表株から抽出した多糖体(I-p, II-p, ...VI-p)は、完全な O-特異性を有し、それぞれの免疫血清との間に homo の場合にのみ感作血球凝集反応や

第12表 山羊赤血球に対する *Proteus* および *Pseudomonas* 多糖体の特殊的作用**

	感作血球* 凝集価	感作血球* 溶血価
<i>Proteus</i> OX ₁ , 多糖体感作血球	陰 性	2560×
<i>Proteus</i> OX ₁ , 多糖体感作血球をトリプシンで処理	80×	2560×
<i>Proteus</i> OX ₁ , 多糖体感作血球に抗菌血清を作用後 Coombs 血清を添加	320×	2560×
<i>Proteus</i> OXK 多糖体感作血球	1280×	1280×
<i>Pseudomonas</i> 多糖体感作血球	陰 性	2560×
<i>Pseudomonas</i> 多糖体感作血球をトリプシンで処理	陰 性	2560×

* 抗血清は菌体免疫家兎血清を用いた溶血反応は、一定単位のもルモット新鮮血清を補体として添加した。

** 本実験の解釈の詳細は Mie Medical J, 9, 305, 1959 に発表している。

沈降反応を呈し、これらの方法によっても血清学的分類が可能であった。

第3項：多糖体感作血球凝集反応による血清中の *Ps. aeruginosa* に対する自然抗体の年齢別分布について¹⁾

Ps. aeruginosa の日常の洗礼により、人体に不顕性あるいは顕性感染を生じ、この結果として、本菌に対する血中抗体が証明されるや否やにつき、各種年齢層の正常人血清を採取し調査した。抗体値の測定は菌体凝集反応では titer が低く陽性例が殆んどでないために、より鋭敏な検査法である感作血凝集反応により測定した。

菌体多糖体は、異った菌種や、同菌種でもO抗原の差のある菌株などは同一血球に対し、何種でも、同時にあるいは逐次的に吸着せしめうる。この性質を利用し、6代表株から抽出した6種多糖体を二つに分け3種同時に同一血球に吸着せしめ、実験を行なった(第2図)。

その結果は第2図に示すごとく、血球凝集価の平均値は幼児、少年、成人へと年齢の高くなるにつれ上昇していることが判明した。

Gaines³³⁾ らも先に同様実験を行い注意しているごとく、われわれは本菌に対する日常の暴露の結果種々の程度の感染が起っているものと考えられる。

第13表 *Ps. aeruginosa* の比較的重篤な感染症であった敗血症、胆ノウ炎の患者の血清と本菌の混合感染の証明された中耳炎の患者血清について同様検査を行なつ

第2図 正常人血清中の緑膿菌抗体の分布(幾何平均値)

第13表 緑膿菌感染患者血清の細菌凝集反応と感作血球凝集反応の比較

患者	山○美○子	本○由○子	水○○男
診断	胆嚢炎	敗血症	中耳炎
分離菌との細菌凝集反応	20×	20×	—
感作血球凝集反応			
I-p	<40	<40	<40
II-p	<40	<40	<40
III-p	<40	1280	<40
IV-p	<40	<40	<40
V-p	640	160	<40
VI-p	<40	<40	<40

た成績である。前者の血清において、菌体凝集反応に比して、血球凝集反応が、はるかに鋭敏であり、しかも本法により感染菌の型をも血清学的に判定することができた。

第5部 *Ps. aeruginosa* の薬剤耐性および耐性の移行について

第1項：*Ps. aeruginosa* の各種抗生物質に対する耐性試験³⁵⁾ (第14表)

本菌は各種抗生物質に対し耐性が大きくそれ故に、体の重要組織や器官に本菌の感染が一旦起ればその治療は非常に困難と努力を要する。しかも最近では本菌の感染は増加の傾向にあり、真菌症や病院ブドウ球菌などとともに、伝染病的に極めて注目を要するものである。

Ps. aeruginosa に対し penicillin や sulfa 剤は殆んど

第 14 表 Ps. aeruginosa 53 株の各種抗生剤の最小発育阻止濃度

PB		Cl		Cp		TM		KM		SM	
>10 μ	52.8%	>100 μ	33.8%	>50 γ	26.3%	>50 γ	52.8%	>100 γ	92.5%	>100 γ	32.1%
10 μ	18.8%	100 μ	26.3%	50 γ	15.0%	50 γ	41.3%	100 γ	7.5%	100 γ	51.1%
5 μ	7.5%	50 μ	35.8%	25 γ	52.8%	25 γ	3.7%	50 γ	0	50 γ	16.8%
2.5 μ	17.5%	25 μ	3.7%	10 γ	17.0%	10 γ	1.7%	25 γ	0	25 γ	0
1 μ	3.7%	10 μ	0	5 γ	0	5 γ	0	10 γ	0	10 γ	0

PB: polymyxin B TM: terramycin Cl: colistin KM: kanamycin
Cp: chloramphenicol SM: Streptomycin

効果が無い、私共は各種抗生物質の中から抗菌スペクトルにより比較的有効と考えられた 6 種の薬剤を選び、Ps. aeruginosa に対する最小発育阻止濃度を測定した。

その結果、第 14 表に示す通り、polymyxin B, colistin, chloramphenicol は比較的有効であり、菌株によっては治療剤として使用可能と思われる。kanamycin や streptomycin らは治療剤としては殆んど無効と思われた。

第 2 項: Ps. aeruginosa の薬剤耐性の移行について⁹⁾

前述のごとく、本菌は高度耐性株が多く、また in vitro でも in vivo でも耐性の獲得が速である。

例えばある薬剤に対し 10 γ /ml 程度の感性菌がある。この菌株を 20 γ , 50 γ , 100 γ , 1000 γ と同一薬剤を含む培地に逐次接種して行くと、速かに 1000 γ /ml 以上の耐性株に変化せしめうる。このような耐性獲得は勿論抗生物質の種類により程度の差が有り、例えば streptomycin らは最も速かであると思われた(第 3 図)。

落合や秋葉の赤痢菌の混合培養による感性菌から耐性菌への耐性の移行現象が、Ps. aeruginosa でも行われるや否やにつき実験を行なった。

細目は已に発表⁹⁾ したが、第 3 図に示す混合培養法により実験を行なった。

その結果、耐性緑膿菌から感性赤痢菌および感染ブドウ球菌へ、耐性移行することが認められた。また逆に耐性赤痢菌、耐性ブドウ球菌、耐性緑膿菌から感性緑膿菌へも耐性が移行することが判明した。(本実験で対象として、単独培養で同じ装置を行い、他の因子による耐性度の変化のないことを確かめている)。

この耐性の移行は死菌凍結融解液、透析膜による隔離培養では起らないことが判明した。また感性菌の耐性獲得により、血清学的性状などに変化が起らなかった。

かくのごとく family を異にする菌の間でも容易に、また速かに耐性の移行することが判明し、Ps. aeruginosa の耐性獲得の一因として、このような Recombi-

第 3 図 抗生物質耐性菌と感性菌との混合培養法

但し { 赤痢菌の場合はソルビット加ドリグルスキー培地
ブドウ球菌の場合は普通寒天培地
緑膿菌の場合はブドウ糖加ドリグルスキー培地

nation も考慮しなければならない。

総 括

私共は Ps. aeruginosa に関して、昭和 28 年以来現在に至る迄、種々の実験や調査を行なってきた。そして本論文においてその大要を述べた。

1) 患者および自然界における本菌の分布状態を調査し、検出率、色素産生変異株の発生、人由来株と自然界由来株の差違、紡毛の本菌汚染に対する対策などを検討した。

2) 本菌の生化学的性状の特徴につき述べた。特に本菌による糖分解を定量的に検査し、数種の糖から酸を形成するが、Barsiekow 培地で同時にペプトンより生ずるアルカリのために打ち消されることを明かにした。また本菌の抗塩性、チトクローム、H₂S、インドール、ゲ

ラチン, 溶血能につき記載した。また本菌の pyocyanin 産生は chloramphenicol により減弱ないし消失をきたすことが判明した。

3) 本菌を血清学的にHおよびO凝集反応により, 6種に分類した。また本菌の産生する phage により代表宿主株の溶菌性を検査した結果, やはり6種に分類された。更に血清学的分類と保有 phage による分類が少数の例外はあるが極めて良く一致した。また以上6型の範中に分類しえない *Ps. aeruginosa* も多くあり, 本菌はこの6型以上の抗原を有することが推察された。

4) 本菌の型特異多糖類の抽出を行い, その物理, 化学, 血清学的性状を検査した。

本抗原が KIO₄ の特殊の作用を受けることやまた各種血球に対する感作能につき *Potus* 多糖体と比較実験を行い興味ある所見をえた。また各種年齢層の人血清を採取し, *Ps. aeruginosa* に対する抗体の分布状態をこの感作血球凝集反応により検査し, 年齢の高くなるにつれて, 自然抗体の平均値も高くなることが判明した。

5) 本菌の各種抗生物質に対する耐性試験を行い, polymyxin B, colistin, chloramphenicol が比較的有効である結果をえた。

また本菌の薬剤耐性の移行につき検し, 混合培養によって, 耐性菌から感性菌へ, 容易に耐性の移行する現象が観察できた。

稿を終るに際し, 終始実験に協力し, 多数の分離株を供与された, 三重県立大学附属病院中央検査室, 宇野逸郎, 渡辺一郎両氏に謝意を表する。

文 献

- Horikawa, T., Suzuki, T., Fujita, H. and Kitajiri, K.: *Mie Medical J.*, 5:1, 1955.
- Fujita, H., Yoshikawa, H., Nomura, N. and Yamada, Y.: *Mie Medical J.*, 8:323, 1958.
- Fujita, H.: *Mie Medical J.*, 7:169, 1957.
- Fujita, H.: *Mie Medical J.*, 7:163, 1957.
- Fujita, H., Fujita, Y. and Kuwabara, Y.: *Mie Medical J.*, 9:305, 1959.
- Fujita, H., Fujita, Y. and Kuwabara, Y.: *Mie Medical J.*, 9:315, 1959.
- Yamada, K.: *Mie Medical J.*, 10:359, 1960.
- 藤田浩: 三重医学, 2:121; 2:127, 1958.
- 吉川秀成: 三重衛研所報, 1960.
- 本間遜: 科学, 31:518, 1961.
- Bergey: *Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., p. 99, 1957.
- Jordan-Burrows: *Textbook of Bacteriology*, W. B. Saunders Co., p. 529, 1950.
- Zinsser: *Bacteriology*, Appleton-Century-Crofts Inc., p. 425, 1957.
- Topley and Wilsons: *Principles of Bacteriology and Immunity*, E. Arnold, p. 507, 1947.
- Dubos: *Bacterial and Mycotic Infections of Man*, J. B. Lippincott Co., p. 417, 1958.
- Warner, P. T. J. C. P.: *Brit. J. Exper. Path.*, 31:242, 1950.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E.: *J. Lab. & Clinical Med.*, 44:301, 1954.
- 山田 潔: 三重医学, 掲載予定.
- McLeod, J. W.: *Lancet*, 7017:394, 1958.
- Ringen, L. M. and Drake, C. H.: *J. Bact.*, 64:841, 1952.
- Fraser, I. E. B. and Mulcock, A. P.: *Nature*, 177, 628, 1956.
- Liu, P.: *J. Bact.*, 64:773, 1952.
- Munoz, J. Scherago, M. and Weaver, R. H.: *J. Bact.*, 57:269, 1948.
- Vender, E. and Watt, J.: *Bact. Proc.*, 1953:58, 1953.
- Gould, J. C. and McLeod, J. W.: *J. Path. Bact.*, 79:295, 1960.
- Homma, Y., Sugeshashi and Hosoya, S.: *Japan. J. Exper. Med.*, 21:375, 1951.
- Neset, J., McLallen, J., Anthony, P. Z. and Ginger, L. G.: *J. Amer. Pharmacol. Assoc. Scien. Edition*, 39:456, 1950.
- Warner, P. T. J. C. P.: *Brit. J. Exper. Path.*, 31:112, 1950.
- Keogh, E. V., North, E. A. and Warburton, M. F.: *Nature*, 160:63, 1947.
- Middlebrook, G. and Dubos, R. J.: *J. Exper. Med.*, 88:521, 1958.
- Neter, E., Westphal, O., Lüderitz, O., Gorzynski, E. A. and Eichenberger, E.: *J. Immunol.*, 76:377, 1956.
- Boyden, S. V. and Sorkin, E.: *J. Immunol.*, 75:15, 1955.
- Gaines, S. and Landy, M.: *J. Bact.*, 69:628, 1955.
- Warren, G. H. and Gray, J.: *J. Bact.*, 70:152, 1965.
- 山田 潔: 三重医学, 掲載予定.
- 落合国太郎: 日本医事新報, 1861:34, 1959.
- 秋葉朝一郎, 木村貞夫: 日本医事新報, 1866:46, 1960.
- Wilson, W. J.: *Lancet*, 1:222, 1922.

Studies on *Pseudomonas aeruginosa*

Takahiro HORIKAWA

Department of Oral-microbiology, School of Dentistry, Tokyo Medical
and Dental University, Tokyo

Takeshi SUZUKI

Department of microbiology School of Dentistry, Aichi-Gakuin
University, Nagoya

Hiroshi FUJITA

National Cancer Center, Tokyo

Kiyoshi YAMADA

Department of Microbiology, School of Medicine, Mie
Prefectural University, Tsu

Hiddenari YOSHIKAWA

Mie Prefectural Research Institute of Health, Tsu

Recent trend of popular application of antibiotics has resulted suppression of incidence of pathogenic organisms in many cases which were often replaced by *Ps. aeruginosa* because of its difference from these antibiotics. Authors report the results of investigations carried on biochemical and serological characteristics on this species and additionally the transfer of resistance against several antibiotics from a resistant strain to a sensitive one.