Yersinia enterocolitica の生物学的性状と 病原性に関する研究

I. *Y. enterocolitica* の培養温度による発育態度について

丸 山 務

東京都立衛生研究所 微生物部
東京都新宿区百人町3-24-1 〒160

〔受付：1月25日，1973年〕

Yersinia enterocolitica の各種温度域における発育態度を明らかにする目的で，振とう温度勾配培養装置を用いて，0～50℃の間の各種培養温度で本菌が示す発育態度を，同属の仮性結核菌，およびサルモネラ，赤痢菌，病原大腸菌などの腸内細菌のそれらと経時的に比較検討したところ，本菌の発育可能温度域は0℃から44℃の範囲で，至適発育温度は30℃前後であつた。また，最短世代時間の平均は43.5分であり，対照として用いた腸内細菌のそれらの約2倍であつた。

なお，本菌の発育態度は仮性結核菌のそれときわめて近似していたが，腸炎起病性のある腸内細菌のそれらとは明らかに異なり，その好冷性状と世代時間の長さは本菌の特性と考えられた。

Yersinia enterocolitica によるヒトの感染症は1964年 Carlson ら⁴⁾，Mollaret ら¹¹⁾により 確認報告されて以来，特にヨーロッパ諸国を中心として数多くの症例報告が積み重ねられてきた¹²⁾。わが国においても最近，Zen-Yoji & Maruyama²¹⁾により日本における最初の本菌による散発感染症例が報告され，そのなかで虫垂炎，回腸末端炎，さらに幼児の腸炎と深い関連のあることが指摘されている。また，本菌は，細菌性食中毒同様の発生様相を示す集団発生をおこすことも浅川ら³⁾，Zen-Yoji *et al.*²²⁾により明らかにされてきた。これらの報告が契機となつて，わが国でも本菌感染症は臨床，公衆衛生の両分野にわたつてここ一兩年，急速に関心を集めるようになっていく。

Y. enterocolitica という菌名は，以前 *Bacterium enterocoliticum*¹⁷⁾ あるいは *Pasteurella* “X”^{5,8)} などと仮称されていた *Pasteurella pseudotuberculosis* のなかの特殊性状を示す一群の菌に対して Frederiksen⁶⁾ によつて提唱されたものである。現在本菌は，genus *Pasteurella* から分かれた genus *Yersinia* のなかに *Y. pestis*，*Y. pseudotuberculosis* (仮性結核菌) とともに加えられ，さらにこの genus *Yersinia* は family *En-*

terobacteriaceae に編入されようとしている⁹⁾。

腸内細菌科にはいる *Y. enterocolitica* の病原菌としての役割は，当初虫垂炎との関連において強調されてきたが，その後結節性紅斑²⁰⁾，関節炎^{1,2)}などの一原因としても注目され，さらに Reiter 症候群との関連を示唆する報告¹⁹⁾もみられている。

しかし，本菌の研究の多くは症例報告の域にとどまり，細菌学的，病原学的基礎研究はきわめて少ない。現在こうした現況の中で，*Y. enterocolitica* 感染症をめぐる諸問題のうち速急に解明されなければならないのは本菌の発育態度と，実験的動物感染による感染病像の解析であろう。発育態度については，本菌が他の腸内細菌に比較してより低い培養温度と長い培養時間を必要とすることが経験的に知られており¹⁴⁾，また好冷性状のあることはすでに Mollaret¹¹⁾，Niléhn¹³⁾ により示唆されているところであるが，その発育様相については十分な認識が得られていない。経口感染する本菌では好冷性状と分裂時間を正確に知ることが感染予防の面でも重要な課題の一つである。

そこで，実験感染による病因学的研究は次報にゆずり，本報では *Y. enterocolitica* の各種培養温度での発

育態度について、同属の仮性結核菌、および病原腸内細菌であるサルモネラ、赤痢菌、病原大腸菌を対照として比較検討した成績について述べる。

材料と方法

供試菌株：*Y. enterocolitica* は Niléhn から分与を受けた M. Y. 0 株（ヒト由来，O 抗原型 3），M. Y. 79 株（ヒト由来，O 抗原型 9）および Becht 51 株（チンチラウサギ由来，O 抗原型 1）の 3 株である。対照として用いた菌種，菌株は Mollaret から分与を受けた仮性結核菌 *Y. PST 48-I* の 1 株と，当研究所で下痢患者便より分離された *Salmonella typhimurium* FE4767，*Shigella sonnei* yH 65 および *Escherichia coli* O119：K 69 Ec1335 の各 1 株である。

培養方法：供試菌株をつぎのごとく準備培養し，本実験培養に移した。*Y. enterocolitica* と仮性結核菌はハートインフュージョン (HI) 寒天 (Difco) の斜面に 25 C，48 時間培養したのち，白金線で微量菌をブレンハートインフュージョン (BHI) (Difco) に移植し，25 C，24 時間培養した。サルモネラ，赤痢菌，病原大腸菌は HI 寒天斜面に 37 C，18 時間培養したのち，同様に BHI に移植，37 C，12 時間培養した。各菌株の上記培養液は，それぞれあらかじめ BHI 13 ml を分注滅菌しておいた温度勾配培養装置用 L 型培養管（17.5 ϕ × 170 m/m）に最終菌量が 1.0×10^5 コ/ ml となるように接種した。

各種温度における発育態度については，振とう温度勾配培養装置（東洋科学産業製，TN-3 型）を使用し，振とう角度 30°，35 回/分の条件での振とう培養により検討した。

設定温度域は，0 C から 50 C までの 1.7 C 間隔 30 段階と，0 C から 15 C までの 1 C 間隔 16 段階との 2 種類である。各段階での温度誤差は最大で ± 0.5 C であった。

菌数測定：0 C から 50 C までの温度域の場合は，菌接種後 4，8，12 および 24 時間後の培養液を，0 C から 15 C までの温度域の場合は 6，12，24，48，72 および 96 時間後の培養液を，各勾配温度の培養管より 0.1 ml ずつ採取し，HI 寒天 (Difco) を用いて常法により混釈培養を行ない 30 C，48 時間後に菌数を算定した。

各温度での発育曲線および発育温度曲線図は得られた生菌数の常用対数をもつてあらわした。

世代時間の算出：上記の各種培養条件で得られた生菌数から Porter の記載¹⁶⁾にしたがって世代時間を算出した。

成 績

***Y. enterocolitica* の各種温度域での発育態度：**供試した *Y. enterocolitica* の 3 株のうち M. Y. 0 株と，対照として用いたサルモネラ，赤痢菌，病原大腸菌のうちサルモネラ FE 4767 株の 0 C，6 C，12 C における 96 時間目までの発育曲線を図 1 に，また両菌株の 20 C，35 C，45 C における 24 時間目までの発育曲線を図 2 に示した。

Fig. 1. Growth of *Y. enterocolitica* and *S. typhimurium* at various temperatures (1).
○—○, *Y. enterocolitica*
×·····×, *S. typhimurium*

Y. enterocolitica は 0 C で 24 時間目から菌数の増加が認められ，96 時間目に測定された菌数は 6.8×10^5 / ml であった。6 C では約 6 時間の誘導期を経過してから対数増殖期にはいり，この増殖期間は 96 時間目まで継続する。10 C から 40 C の間での発育は良好で，12 C，20 C，35 C における発育の停止期に達する所要時間はそれぞれ

Fig. 2. Growth of *Y. enterocolitica* and *S. typhimurium* at various temperatures (2).

○—○, *Y. enterocolitica*
 ×·····×, *S. typhimurium*

72, 24, 12時間であった。しかし45°Cでは培養時間の経過とともに菌数の減少がみられ、さらに50°Cでは4時間目ですでに生菌数はゼロであった。

供試した *Y. enterocolitica* の他の2株, M. Y. 79株および Becht 51株の各種培養温度における測定菌数から求められた発育曲線はともに M. Y. 0株とほぼ同じであった。

仮性結核菌 *Y. PST 48-I* 株は0°Cで明らかに増殖が認められ、96時間後の菌数は $5.5 \times 10^5/\text{ml}$ であり、また、各温度での発育態度は *Y. enterocolitica* とまったく同じ傾向を示した。

一方、サルモネラは6°C以下では96時間後の菌数に増減はみられないが、12°Cでは約12時間の誘導期を経過してから対数増殖期にはいり、96時間で停止期に到達する発育曲線が観察された。20°C以上の増殖はきわめて旺盛

であり、特に35°Cから45°Cの温度域では対数増殖期の期間が著しく短かく、8時間で休止期に達する発育曲線であった。50°Cにおける菌数の増加はみられなかった。

赤痢菌および病原大腸菌の発育態度は、いずれも *Y. enterocolitica* および仮性結核菌とは明らかに異なり、6°C以下の発育がみられないことをはじめとして、高温部における旺盛な増殖などサルモネラにきわめて近似した成績であった。

***Y. enterocolitica* の発育温度域および発育至適温度:**
Y. enterocolitica M. Y. 0株とサルモネラ FE 4767株の各種培養温度で測定した菌数から得られた発育温度曲線図のうち菌接種後4, 12および24時間後における両菌株のそれらを図3に示した。

また低温部における両菌株の発育曲線に著しい差を認めたので、0°Cから15°Cまでの温度域における96時間までの発育温度曲線図を拡大して図4に示した。

Y. enterocolitica の発育温度域は培養時間によつて異なるが、発育上限温度については図3から明らかなように44°Cであった。下限温度については4時間目では10°C, 12時間目では5°Cと漸次低温に移行し、24時間目では0°Cであった。

また本菌の発育可能温度域の内得られた最高菌数は培養時間によつて異なるが、図3から明かなように発育至適温度は30°C前後であった。

これに対し、サルモネラでは発育下限温度は96時間培養でも6°C以下の発育はみられず、一方、発育上限温度については48°Cでは徐々に菌数の減少がみられた成績から、サルモネラの発育可能温度域は7°Cから47°Cの間であった。

***Y. enterocolitica* の最短世代時間:** 供試した *Y. enterocolitica* 3株および仮性結核菌1株の最も増殖の著しかった温度域は、いずれも25~30°Cであり、最短世代時間はこの温度域の対数増殖期にある培養8時間目に得られた。対照の腸内細菌3株ではサルモネラの発育温度曲線にみられたように36~42°Cにおける培養初期にきわめて著しい菌数の増加がみられ、それぞれの最短世代時間がこの条件下で記録された。

供試した全7株の最短世代時間と、その得られた培養条件を表1に示した。すなわち、*Y. enterocolitica* の最短世代時間の平均は43.5分であり、対照腸内細菌の約2倍であった。

なお、37°C, 4時間目における *Y. enterocolitica* 3株の平均世代時間は56.7分であり、仮性結核菌では65分、腸内細菌3株はすべて28分台であった。

Fig. 3. Effect of incubation temperature on the growth of *Y. enterocolitica* and *S. typhimurium* (1).

○—○, *Y. enterocolitica*, ×·····×, *S. typhimurium*

Fig. 4. Effect of incubation temperature on the growth of *Y. enterocolitica* and *S. typhimurium* (2).

○—○, *Y. enterocolitica*
×·····×, *S. typhimurium*

考 察

Y. enterocolitica の発育態度で既知腸管系病原菌と比較してきわだつた特徴の一つは、本菌が腸内細菌の発育下限温度である6~7°C以下の4°Cで示す良好な発育であろう^{11,13)}。腸内細菌のうちでも好冷性を示すものがあり、最低発育温度が大腸菌で4~6°C¹⁰⁾、さらに *Aerobacter cloacae* で0°Cで生育する株が存在するとの記録もある⁷⁾。しかし、今回著者が *Y. enterocolitica* で明らかにしたように0°Cで生育する腸炎起病性のある低温細菌の存在は知られていない。

本菌の発育下限温度は0°Cにおける発育態度から、振とう培養ではおそらく-1°Cから-2°Cの間であろう。この低温における発育態度は由来およびO抗原型の異なる3株、および仮性結核菌も同様であり、さらに同属の *Y. pestis* の発育態度もこれにきわめて近似していることが知られている¹⁸⁾。したがって、genus *Yersinia* が腸内細菌科に編入されるとするならば、3種の *Yersinia* は発育態度からみた場合、腸内細菌科の中でも特異な存在であり、4°C以下で良好な発育を示す好冷性を本genusの特徴性状の一つとしてあげることができよう。

また、*Y. enterocolitica* の仮性結核菌との低温における発育態度の類似性は、仮性結核菌の増菌用に1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.6) の4°C、長期保存が有効であるとした Paterson & Cook の方法¹⁵⁾を本菌にも応用

Table 1. Minimum generation times manifested by *Y. enterocolitica* in comparison with those of *Y. pseudotuberculosis* and three other enteropathogenic bacteria at their optimal temperature and age

Strain	Conditions obtained minimum generation time		Minimum generation time (min)
	Incubation temperature (C)	Incubation age (hr)	
<i>Y. enterocolitica</i> M. Y. 0	30	8	47.5
<i>Y. enterocolitica</i> M. Y. 79	25	8	41.3
<i>Y. enterocolitica</i> Becht 51	25	8	41.8
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Y. PST 48-I	28	8	48.7
<i>S. typhimurium</i> FE 4767	42	4	24.7
<i>S. sonnei</i> yH 65	36	4	28.7
<i>E. coli</i> O119 : K69 Ec 1335	42	4	27.4

し得る可能性を示唆している。

Y. enterocolitica がヒトの腸炎起因菌として最近まであまり注目されずに経過してきた理由の一つとして考えられることは、本菌の培養性状が、他の既知腸内細菌の培養概念と著しく異なっていることに起因していることを否定できない。つまり、本菌の発育至適温度が30°C前後であつたこと、また、最短世代時間が40分台であつたことは腸内細菌に比較してより低い温度と、より長い培養条件を要求しているといえよう。実際に、現在本菌の培養には22~25°C, 48時間培養が行なわれているが、この経験的に得た分離、増菌効果の知見は、今回著者が明らかにした本菌の特徴ある発育態度によつて理論づけられる。

しかし、本菌の生育温度の特性がヒトへの感染、腸炎起病性、あるいは疫学的にどのような関連があるのかはまだ明らかにされておらず今後検討されなければならない問題である。

ただ、*Y. enterocolitica* の生態学については現在まだ十分明らかにされていないが、最近善養寺らの行なつた動物保菌の調査からは、ブタが汚染源の一つとして重要な役割を演じているものと推察され²³⁾、一方、Zen-Yoji et al.²²⁾ の報告した本菌による集団発生が典型的な感染型食中毒であつた事実を考えあわせれば、感染経路の中で本菌の好冷性を十分考慮する必要があるであろう。従来から病原菌の増殖防止には冷蔵による安全性が強調されているが、好冷性状を持つ本菌の存在は食品衛生の立場からも新たな問題を提起しているといえよう。

終りにこの研究に終始御懇篤な御指導をいただいた当

研究所微生物部長善養寺 浩博士、および研究にあたり有益なるご助言を賜り、さらに本稿を御校閲くださった東邦大学桑原章吾教授に深甚の謝意を表します。また、菌株を分与下さつた Sweden Lund 大学 Niléhn 博士、ならびにパスツール研究所 Mollaret 博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Ahvonen, P., Sievers, K. and Aho, K. (1969): Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica*. Acta Rheum. Scand., 15, 232-253.
- 2) Arvastson, B., Damgaard, K. and Winblad, S. (1971): Clinical symptoms of infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis., 3, 37-40.
- 3) 浅川 豊, 赤羽荘資, 野口政輝, 坂崎利一, 田村和満 (1972): *Yersinia enterocolitica* による集団発生について, 第27回日本細菌学会関東支部総会(静岡)。
- 4) Carlsson, M., Ryd, H. and Sternby, N. H. (1964): A case of human infection with *Pasteurella pseudotuberculosis* X. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 62, 128-132.
- 5) Daniels, J. J. and Goudzward, C. (1963): Enkele stammen van een op *Pasteurella pseudotuberculosis* gelijkend niet geïdentificeerd species, geïsoleerd bij knaagdieren. Tijdschr. Diergeneesk., 88, 96-102.
- 6) Frederiksen, W. C. (1964): A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X"). Proc. XIVth Scand. Congr. Pathol. Microbiol., Oslo. 103-104.

- 7) 駒形和男, 小川博望 (1966): 冷凍食品の微生物に関する研究, 第2報 市販冷凍食品より分離した細菌の性状, 食衛誌, 7, 234-238.
- 8) Knapp, W. and Thal, E. (1963): Untersuchungen über die kulturellbiochemischen, serologischen tierexperimentellen und immunologischen Eigenschaften einer vorläufig "Pasteurella X" benannten Bakterienart. Zbl. Bakt., 190, 472-484.
- 9) Knapp, W. and Mollaret, H. H. (1971): Report (1966-1970) of the Subcommittee on *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella* to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 21, 157.
- 10) Michener, H. D. and Elliott, R. P. (1964): Minimum growth temperature for food poisoning, fecal indicator, and psychrophilic microorganisms. Advances Food Res., 13, 349-396.
- 11) Mollaret, H. H., Chevalier, A. and Deplanche, M. C. (1964): Contribution à l'étude d'un nouveau groupe de germes proches du bacille de Malassez et Vignal. Ann. Inst. Pasteur, 107, 121-127.
- 12) Mollaret, H. H. (1971): L'infection humaine à *Yersinia enterocolitica* en 1970, à la lumière de 642 cas récents. Aspects cliniques et perspectives épidémiologiques. Pathol. et Biol., 19, 189-205.
- 13) Niléhn, B. (1969): Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl., 206.
- 14) Niléhn, B. (1969): Studies on *Yersinia enterocolitica*. Growth on various solid media at 37 C and 25 C. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 77, 685-697.
- 15) Paterson, J. S. and Cook, R. (1963): A method for the recovery of *Pasteurella pseudotuberculosis* from feces. J. Bacteriol., 85, 241-242.
- 16) Porter, J. R. (1946): Bacterial chemistry and physiology. 1073 pp. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 17) Schleifstein, J. and Coleman, M. (1943): *Bacterium enterocoliticum*. Annual Report of the Division of Laboratories and Research. New York State Department of Health, 56.
- 18) Sokhey, S. S. and Habbu, M. K. (1943): Optimum and limiting temperatures for the growth of the plague bacillus in broth. J. Bacteriol., 46, 25-32.
- 19) Solem, J. H. and Lassen, J. (1971): Reiter's disease following *Yersinia enterocolitica* infection. Scand. J. Infect. Dis., 3, 83-85.
- 20) Winblad, S. (1969): Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis., 1, 11-16.
- 21) Zen-Yoji, H. and Maruyama, T. (1972): The first successful isolations and identification of *Yersinia enterocolitica* from human cases in Japan. Japan. J. Microbiol., 16, 493-500.
- 22) Zen-Yoji, H., Maruyama, T., Sakai, S., Kimura, S., Mizuno, T. and Momose, T. (in press): An outbreak of enteritis due to *Yersinia enterocolitica* at a junior high school. Japan. J. Microbiol., 17, No. 3.
- 23) 善養寺 浩, 坂井千三, 丸山 務, 柳川義勢, 岡沢久美子 (1973): *Yersinia* の生態に関する研究 (1)と畜からの分離成績と分離菌の性状について, 第46回日本細菌学会総会 (東京).

**Studies on Biological Characteristics and Pathogenicity of
*Yersinia enterocolitica***

**I. Comparison of Growth Temperature Range between *Y. enterocolitica*
and Other Enteropathogenic Bacteria**

Tsutomu MARUYAMA

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan
Research Laboratory of Public Health, Tokyo

In order to ascertain the temperature range of growth of *Yersinia enterocolitica*, together with *Yersinia pseudotuberculosis*, the patterns of viable cell counts at various incubation periods were compared between these species and the known three groups of enteropathogens, Salmonella, Shigella, and enteropathogenic *Escherichia coli*, by using a temperature-gradient incubator.

The growth temperature of *Y. enterocolitica* ranged from 0 to 44 C. It was quite similar to that of *Y. pseudotuberculosis*. The optimal growth temperature of *Y. enterocolitica* was assumed to be around 30 C. In contrast to this, the growth temperature range of the other three groups of enteropathogens ranged from 7 to 47 C. The optimal growth temperature of these organisms ranged from 36 to 43 C. The minimum generation time of *Y. enterocolitica* was calculated to be 41.3-47.5 minutes at the age of 4-8 hours of incubation at 25-30 C, while that of the other organisms was 24.7-28.7 minutes at the age of less than 4 hours of incubation at 36-42 C.

Therefore, it was concluded that *Y. enterocolitica* was unique among enteropathogenic bacteria, since it was characterized by its psychophilic property and fairly long generation time.