三方菌の赤痢分類学上の地位について

石 丸 隆 治

(国立予防衛生研究所第二細菌部; 部長 福見秀雄博士)

〔受付: 4月13日, 1951年〕

第1章 緒 言

1898年志賀¹⁾が赤痢病原菌として志賀赤痢菌を分離して以来, 諸学者により多数の新菌株が赤痢病原菌として分離された。わが国においても, この方面の多くの業績が発表されたが, 今日なお病原不明の赤痢ないし赤痢様疾患に出会うことがしばしばある。

さきに三方²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾は赤痢および赤痢様患者から新種赤痢菌様桿菌を分離, 詳細な細菌学的研究を発表した。その後竹下および奥田⁶⁾, 鈴木⁷⁾, 竹内⁸⁾, 田沢および清水⁹⁾¹⁰⁾も三方発見の赤痢菌様桿菌と同種の菌を分離し, 該菌の細菌学的性状を種々研究して来たが, 現在にいたるまで本菌のしめるべき分類学上の地位が確定せず, 昭和19年日本学術振興会発表の「赤痢菌の分類命名に関する提案¹¹⁾」においても, 本菌は赤痢菌分類表から除外されている。筆者は本菌第1群と既知赤痢菌との生物学的ならびに抗原的関係について, 種々研究を行つた結果, 本菌がアメリカの標準菌株のうち *Shigella alkalescens* type I と生物学的にも, 血清学的にも一致する結果を得たので報告する。

第2章 検査菌の由来

本実験に使用した菌株は, 日本学術振興会決定の標準赤痢菌株13株, A.J. Weil より送付をうけたアメリカの標準菌株26株, 昭和8年三方が赤痢および赤痢様患者から分離した赤痢菌様桿菌(以下三方菌と云う)の41菌株であり, これらの諸菌株はいずれも予防衛生研究所に保管中のものである。三方は三方菌属を3群に分類し, そのおのおのの代表菌株を河野株, 小原株および倉本株としたが, 予防衛生研究所に保管のものは河野および小原の2株であつて, 河野株はS型に保たれていたが, 小原株はR型に変異していたので, 実験は河野株についてのみ行つた。なお参考として北里研究所保管の河野株についても実験を行つたが, まつたく同一の結果を得た。

第3章 生物学的的一般性状

第1節 形 態

三方菌河野株および *Shigella alkalescens* type I はともにアニリン色素に濃染する, グラム陰性の短桿菌で,

芽胞および莢膜を形成することがない。

両菌とも普通寒天培地によく発育し, 37°C 24時間培養後大腸菌様大きさの集落を形成する。集落の色調は落下光線では灰白色であるが, 透過光線で観察すると少々青味をおびている。三方菌については免疫学的性状の項で後述するように, その集落に3種あり, S型, R型のほかに外観上S型に類似しているがS型より透明性の高い集落を認めた。ブイヨンに37°C 24時間培養すると平等に濁濁し, 生理食塩水菌浮遊液は平等な濁濁液を呈する。

第2節 生物学的性状

(1) 運動性: 従来, 三方菌属の中には運動性および鞭毛の存在が認められるものがあるとの報告⁷⁾¹²⁾があるが, 筆者の使用した河野株では運動性も鞭毛も認められなかつた。*Sh. alkalescens*においても運動性, 鞭毛ともに認め得なかつた。

運動性有無の決定には, 懸滴標本, 0.5% 寒天培地の外に, P.R. Edwards の提案した下記処方の培地をも使用し, 37°C および22°C の低温でも観察をこころみた。

Peptone	10g	Agar	4g
Meat extract	3g	Sodium chloride	5g
Gelatine	80g	Ag. dest.	1,000cc
(pH=7.2)			

(2) インドール反応: 亜鉛ペプトンを使用したペプトン水を検査用培地とした。Ehrlich-Bismarck および Kovac 試薬を用いて該反応を検査したところ, 培養24時間後においてすでに強陽性を呈した。

(3) ゲラチン液化能: ゲラチン培地に移植, 48時間37°C のもとに培養後10°C に冷却するに, 両菌ともにゲラチン液化能を認め得なかつた。

(4) 硫化水素発生試験: Kligler Iron Agar (Difco) に培養したが, 両菌とも硫化水素の発生は認められなかつた。

ISHIMARU, Takaji: On the Position of "Mikata Bacillus" in *Shigella* Classification.
National Institute of Health of Japan.

つた。

(5) Voges-Proskauer 反応: 両菌とも陰性。

(6) Methylred 反応: 両菌とも陽性。

(7) Trimethylamine oxide 還元試験: 両菌とも本試薬を Trimethylamine に還元した。(Wood Test 陽性)。

第3節 含水炭素分解能

含水炭素分解試験は亜鈴ペプトンを用い、1%ペプトン水に各種糖類を1.0%のわりに加え、指示薬として0.2% B.T.B溶液を1.2%のわりに加え、これをダーラムはつ酵母管を入れた小試験管に分注した培地を使用して行つた。

三方菌, *Sh. alkalescens* とともに Mannit, Glucose, Trehalose, Galactose, Xylose, Maltose および Arabinose をいずれも24時間以内に分解して酸を発生するがガスを発生しない。また Sorbit は両菌ともに48時間で分解, 酸を発生した。Dulcit については, 三方菌は24時間, *Sh. alkalescens* は72時間と所要時間に差異があつたが分解して酸を産生した。

Inuline については, *Sh. alkalescens* がこれを24時間で分解したが, 三方菌は1週間後においても分解しなかつた。

Lactose, Salicin, Dextrine, Inosit, Raffinose および Saccharose)に対する分解試験においては両菌株ともに, これらの糖類を分解せず培地の変化は認められなかつた。

第4節 発育素

赤痢菌属が発育素としてニコチン酸, あるいはそのアミドを必要とすることは, Koser, Dorfman & Saunders¹³⁾の研究以来よく知られている事実である。福見等¹⁴⁾は赤痢菌の各種について, その発育素としてのニコチン酸, あるいはそのアミドを検査し, 大野菌属, 二本菌属, 大原菌属は概してニコチン酸を発育素として必要とするが, 二本菌属のうち西貢菌株は発育素としてニコチン酸を必要としないと報告している。筆者は福見の実験方法にならい, 三方菌および *Sh. alkalescens* の発育素としてのニコチン酸およびそのアミドの役割について検討してみた。培地は福見の実験と同一の下記処方基礎培地を使用した。

基礎培地	Asparagin	0.05g
	Tryptophan	0.05g
	Cystin	0.02g
	K ₂ HPO ₄	0.1g
	MgSO ₃	0.01g

NaCl	0.05g
Glucose	0.1g
Aq. dest.	100cc (pH=7.2)

実験結果は両菌株ともまったく同一の結果であつた。すなわち両菌株とも上記基礎培地にニコチン酸あるいはニコチン酸アミドを加えなくとも十分に発育する。従つて, 三方菌および *Sh. alkalescens* はともに発育素としてニコチン酸あるいはそのアミドを必要としないことが分る。

第5節 小括ならびに考察

以上, 生物学的性状をまとめると第1表のごとなる。第1表から明らかなように, 三方菌河野株と *Sq. alkalescens* type I の両菌株は生物学的性状殆んど同一であつて, Inulin の分解性に於いては両者の間に差異が認められたが, 両菌株を生物学的性状の差異をもつて区別することは不可能である。

第1表 生物学的性状

	河野株 (生菌)	河野株 (変異株)	<i>Sh. alkalescens</i>
Mannit	+	+	+
Glucose	+	+	+
Dulcit	+	+	+
Sorbit	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Inulin	-7	-7	+
Lactose	-7	-7	-7
Salicin	-7	-7	-7
Dextrin	-7	-7	-7
Inosit	-7	-7	-7
Raffinose	-7	-7	-7
Saccharose	-7	-7	-7
Indol	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Wood Test	+	+	+
V.P. Test	-	-	-
M.R. Test	+	+	+
Nicotic Acid	不必要	不必要	不必要
Motility	-	-	-

[註] 右肩の数字は培養日数を示す

硫化水素発生試験は Kligler Iron Agar (Difco) を用いた筆者の成績では両菌株陰性であつたが, こゝで文献

による考察をこゝろみよう。

三方²⁾はペプトン水を使用して三方菌の硫化水素発生試験を行つたところ、成績区々にして大体 37°C 48時間培養の成績は陰性と報告している。これに反して、鈴木⁷⁾は 0.5% チスチン加フレンケル氏無蛋白培地を使用して 37°C 48時間培養で著明に硫化水素の発生を認めたと報告している。

Sh. alkalescens については、Friewer & Shaugenes¹⁶⁾および Galton & Hess¹⁵⁾が Kligler Iron Agar を用いて硫化水素の発生が認められる菌株のあることを報告している。

以上のように、三方菌, Sh. alkalescens とともに試験法, 菌株によつて異なるが、硫化水素の発生は不定と思われる。

第4章 免疫学的性状

第1節 凝集反應

三方は三方菌が、従来分離された赤痢菌と異なり凝集反應にさいし特異な現象を呈すること、すなわち、37°C 24時間培養の生菌は自己菌家兔免疫血清に対しても凝集反應を呈しないが、100°C 1時間加熱することにより凝集反應を呈することを報告した。

さらに鈴木および安齋¹²⁾は本菌をブイオンに長時間培養する時3種の集落を生ずることを証明した。すなわち、S型とR型の外に、加熱することなく本菌家兔免疫血清と凝集反應を呈し、もとの非凝集性集落より外観上透明性の強い集落を生ずると報告している。

三方²⁾およびその後の研究者^{7,8)}は、この特性は三方菌に易熱性の凝集反應阻止物質が存在するためであつて、かかる物質は本菌特有なものであると考えた。また、その凝集反應から本菌が既知赤痢菌のいずれにも該当しない新菌種と考えた。

しかし、かかる性質を有する赤痢菌の存在については従来多くの学者¹⁶⁾が報告しており、三方菌に特有と考えられた易熱性凝集反應阻止物質は他の赤痢菌にみられるものと同様なものではなからうかと考えられるので、しからは三方菌と既知赤痢菌との免疫学的関係如何と考え次の実験を行つた。

第1項 凝集原

凝集原としては既述の菌株を使用したが、その製法は次の方法に従つた。

三方菌河野株を普通寒天培地に 37°C 20時間培養後、新鮮菌を滅菌生理食塩水に 1.0cc 中 1.0mg の割りに浮遊させ、これを二半し一つはそのまゝ河野株生菌液となし、他は水浴中で 100°C 1時間加熱、河野株加熱菌液と

した。

河野株をブイオンにうゑ 37°C に保ち毎日普通寒天平板培地に移植し、予備凝集試験で凝集する相変異を起した集落をひろい、この集落について上記生菌浮遊液と同様な方法で菌浮遊液を作製し河野株変異菌浮遊液とした。

他の赤痢菌については常法に従い、37°C 20時間培養菌で菌浮遊液を作製した。

第2項 免疫血清

免疫血清は家兔免疫血清を使用した。

免疫は各菌の 37°C 20時間培養の新鮮菌生理食塩水浮遊液を使用、常法に従つて家兔を免疫し、採血し、血清を分離した。

第3項 共通抗原

上記凝集原 および 免疫血清を用いて凝集反應を行つた。

第2表 凝集試験成績

	河野株 免疫血清	Sh.alkal. 免疫血清
Sh. dysenteriae I	400	400
Sh. dysenteriae II (Schmitz)	0	0
Sh. dysenteriae III (Q.771)	0	200
Sh. dysenteriae IV (Q.1167)	0	0
Sh. dysenteriae V (Q.1030)	0	0
Sh. dysenteriae VI (Q.464)	0	0
Sh. dysenteriae VII (Q.102)	0	200
Sh. flexneri I (V)	100	200
Sh. flexneri I (V,Z)	100	200
Sh. flexneri II (VV)	0	0
Sh. flexneri II (W,X)	50	400
X	800	800
Y	1600	200
Sh. flexneri III (Z)	0	0
Sh. flexneri IV (Boyd 103)	400	400
Sh. boydii I (Boyd 170)	400	400
Sh. boydii II (Boyd p 288)	50	50
Sh. boydii III (Boyd DI)	0	0
Sh. boydii IV (Boyd p 274)	200	400
Sh. boydii V (Boyd p 143)	0	0
Sh. boydii VI (Boyd D 19)	0	0
Sh. boydii VII (Etousae)	0	0
Sh. dispar II	0	0
Sh. alkalescens I	3200	1600
Sh. alkalescens II	0	0
Mikata (Kono) 加熱菌	3200	3290

数字は凝集價、0は50倍陰性を示す

凝集反應試験は常法に従つて、免疫血清を倍數稀釈し、これに凝集原を加え37°Cの孵卵器中に2時間靜置、しかる後これを室温に放置して24時間後、凝集鏡を用いて結果を判定した。その成績は第2表のごとくなる。

三方菌河野株および *S. alkaescens* type I の他種赤痢菌との間の共通抗原は両菌株とも殆んど一致している。すなわち、両菌株と共通抗原を有する赤痢菌は *Sh. dysenteriae* I, *Sh. flexneri* I (Flexner I および I,III), *Sh. flexneri* II (Flexner II,VII: WX), *Sh. flexneri* IV (Boyd 103), X, Z, *Sh. boydii* I (Boyd 170), および *Sh. boydii* IV (Flexner XIV: Boyd P. 274) である。

Sh. alkaescens は *Sh. dysenteriae* III (Q. 771) および *Sh. dysenteriae* VII (Q. 102) との間に共通抗原をみとめたが、三方菌では証明されなかつた。

三方菌河野株と *Sh. alkaescens* type I の間における交叉凝集反應では夫々他の免疫血清に対しても終末價まで凝集反應を呈し、*Sh. alkaescens* type I は自己菌免疫血清に対するよりも河野株免疫血清に対する凝集價が高かつた。

第2節 凝集素吸収試験

以上の実験から河野株と *Sh. alkaescens* type I の間に密接な抗原的關係が推察されたので、この共通抗原が凝集素吸収試験でどの程度に吸収されるか Castellani の方法に従つて実験をすゝめた。

免疫血清は凝集反應に使用のものと同じのもので、加熱菌で免疫したものを使用した。

吸収菌としては河野株 37°C 20時間培養の新鮮菌、同菌を100°C 1時間加熱した加熱菌、上述の方法で得た河野株の相変異株を 37°C 20時間培養した新鮮菌、および *Sh. alkaescens* type I の 37°C 20時間培養の新鮮菌を使用した。

凝集素吸収は夫々の免疫血清を10倍に稀釈したものに、上記菌を血清2.0ccに対して約100mgのわりに浮遊させ、37°Cの孵卵器内に2時間靜置した後、毎分3000迴轉30分間遠心沈澱し、その上清に再び大量の菌を浮遊させて37°Cに2時間靜置、更に一夜氷室に保存した後、毎分3000回1時間遠心沈澱して透明な上清を得た。

この上清について、既述の凝集原を用いて定量凝集反應を行つた。その成績は第3表に示す。

第3表から分るように、河野株生菌は夫々の血清から河野株および *Sh. alkaescens* に対する凝集素を殆んど吸収しない。河野株加熱菌、河野株変異菌または *Sh. alkaescens* をもつてすれば、抗三方菌家兎免疫血清から

吸収に用いた菌株に対する凝集素のみならず、他の菌株に対する凝集素も完全に吸収する。またこれらの菌は抗 *Sh. alkaescens* 家兎免疫血清からも、同様に凝集素を完全に吸収する。

第3表 凝集素吸収試験

血 清	吸収菌	凝 集 原	吸収後 凝集價
河野株(加熱菌) 免疫血清	河野株 (生菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	1600
		河野株(変異菌)	1600
		<i>Sh. alkaesc.</i>	800
	河野株 (加熱菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	0
		河野株(変異菌)	0
		<i>Sh. alkaesc.</i>	0
	河野株 (変異菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	0
		河野株(変異菌)	0
		<i>Sh. alkaesc.</i>	0
<i>Sh. alkaesc.</i> 免疫血清	河野株 (生菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	200
		河野株(変異菌)	400
		<i>Sh. alkaesc.</i>	200
	河野株 (加熱菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	0
		河野株(変異菌)	25
		<i>Sh. alkaesc.</i>	0
	河野株 (変異菌)	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	0
		河野株(変異菌)	0
		<i>Sh. alkaesc.</i>	0
	<i>Sh. alkaesc.</i>	河野株(生 菌)	0
		河野株(加熱菌)	0
		河野株(変異菌)	0
		<i>Sh. alkaesc.</i>	0

0は25倍陰性を示す

第3節 小括ならびに考察

河野株および *Sh. alkaescens* type I は共通抗原を有し、交叉凝集反應で相互にその免疫血清に対して終末價まで凝集反應を呈する。

他の赤痢菌との間の共通抗原は Large-Sacks group の Q. 771 および Q. 102 に対し *Sh. alkaescens* のがみ共通抗原を有する以外、両者の間に差異が認められない。

凝集素吸収試験では、相互にその免疫血清から自己菌のみならず、相手菌に対する凝集素も完全に吸収する。

三方²⁾およびその後の研究者^{7,8,9,10)}は三方菌と志賀菌との共通抗原の存在を否定している。また Neter^{17,18)}は

Sh. alkalescens (Andrews) と志賀菌との共通抗原がないと主張している。

これに反し, Nabarro et al¹⁸⁾, および Wheeler et al²⁰⁾²¹⁾は Sh. alkalescens (Andrews) と志賀菌が抗原を共有していると報告している。

このように志賀菌に対する類属凝集反応がまちまちである理由は, 安齋²²⁾がその綜説の中で説明しているところであり, 不定であるのは当然起り得ることであろう。

三方菌が特有の易熱性凝集反応阻止物質を有するとの報告があるのは既述の通りであるが, 37°C 24 時間培養の生菌では自己菌家免疫血清に対して非凝集ないし難凝集性であるが, 加熱により凝集性をおびる赤痢菌の存在については, 志賀菌について Seligmann¹⁶⁾, Bauch および Schutze¹⁶⁾, Sh. ambigua について Ornstein¹⁶⁾, Sh. alkalescens について Archer¹⁶⁾, Large-Sacks group について Weil, Binder & Slaufkousky¹⁶⁾, Sh. parady senteriae VI, IX ないし XIV について Weil, Black & Farresta¹⁶⁾, Sh. tiété について Weil & Slaufkousky²³⁾, および Sh. etousae について Weil¹⁶⁾が報告している。

Sh. alkalescens につき Archer¹⁶⁾が, Sh. tiété につき Weil & Slaufkousky²³⁾が, 非凝集性の集落と易凝集性の集落と 2 種の集落を有し両者は外観上区別可能で, 後者は前者より透明であると, 安齋¹²⁾の三方菌におけると同様の報告をしている。

これらの報告から, 従来三方菌に特有と考えられた易熱性凝集反応阻止物質は他の赤痢菌にみられるものと同様なものと考えられ, この特性のみをもつて三方菌を他の赤痢菌と区別することは妥当でない。

第5章 総 括

筆者は三方菌の赤痢菌分類上の位置を決定せんとして以上の実験を行つた。とくに本菌と Sh. alkalescens との種々の性状を比較した。

生物学的性状においては, 培養所見, 顕微鏡所見, 糖類分解能その他の性状が両者まづたく同じであつた。

免疫学的試験では, 交叉凝集反応, 他赤痢菌との共通抗原および凝集素吸収試験の結果が両菌が抗原的に殆んど同一であつた。

第6章 結 論

以上生物学的性状および免疫学的性状から昭和8年分

離以来, その分類学上の位置が確定していなかつた三方菌第1群は Sh. alkalescens type I に一致する。

稿を終るに臨み, 予防衛生研究所小林所長, 厚生省三木公衆衛生局長に敬意を表し, 終始御指導賜わつた予防衛生研究所小島副所長, 福見第二細菌部長に深甚の謝意を表する。併せて菌株の分與を受けた北里研究所安齋博士に感謝する。

文 献

- 1) Shiga, K.: Zbl. Bakt. 1. Orig., 24, 317, 870, 13, 1898.
- 2) 三方悦藏: 細菌学雑誌, 404号, 156-220, 昭8.
- 3) 三方悦藏: 細菌学雑誌, 445号, 300-309, 昭8.
- 4) 三方悦藏: 細菌学雑誌, 445号, 324-337, 昭8.
- 5) 三方悦藏: 日本医事新報, No. 1264, p. 6. No. 1265, p. 4, 昭23.
- 6) 竹下成一, 奥田正暉: 兒科雑誌, 406号, 305-315, 昭9.
- 7) 鈴木重一: 細菌学雑誌, 501号, 744-758, 昭12.
- 8) 竹内春彦: 細菌学雑誌, 508号, 437-452, 昭13.
- 9) 田沢芳三郎, 清水万之助: 東京医事新誌, 2849号, 2230-2234, 昭8.
- 10) 田沢芳三郎, 清水万之助: 東北医学雑誌, 17, 1-9, 昭9.
- 11) 日本学術振興会第53小委員会: 赤痢菌の分類に関する提案, 昭19.
- 12) 鈴木武夫, 安齋博: 北里実験医学, 第22巻, 47-54, 1949.
- 13) Koser, S.A., Dorfman, A., and Saunders, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 311, 1938.
- 14) 福見秀雄, 大村桂子, 砂川澄子: 医学と生物学, 第12巻, 第6号, 412-414, 昭23.
- 15) Galton, M.M., and Hess, M.E.: J. Bact., 52, 143, 1946.
- 16) Weil, A. J.: J. Immun., 55, 363-405, 1946.
- 17) Neter, E.: J. Bact., 35, 1938.
- 18) Neter, E.: J. Bact., 58, 681, 1939.
- 19) Nabarro, D., and Edwards, D.G.F.: J. Path. Bact., 49, 515-528, 1939.
- 20) Wheeler, K.M., Stuart, C. A., and Ewig, W. H.: J. Bact., 51(2), 169-176, 1946.
- 21) Wheeler, K.M., and Stuart, C.A.: J. Bact., 51(3), 317-355, 1946.
- 22) 安齋博: 赤痢50年(13), 医学通信, 第5年, 198号, 昭25.
- 23) Weil, A.J. and Slaufkousky, H., J. Bact., 55, 759-762, 1948.