

in vitro における大腸菌族の赤痢 B 群抗原獲得について

岡 山 県 衛 生 研 究 所

北 村 直 次
吉 岡 達 治

[昭和 29 年 1 月 24 日受稿]

ま え が き

赤痢流行地に於て赤痢免疫血清に凝集する大腸菌族の検出が行はれる事は Salmonella 発生地に於て同様の大腸菌が検出される事と共に既に報告されている。この事態は昭和 27 年岡山県が赤痢菌で汚染され未曾有の赤痢禍を招いた際各地で経験された。併し乍らこの機序について未だ深い研究はない様である。Shigella group と大腸菌 O 抗原との関係について Kauffmann, Wheeler, -Stuart, -Ewing, Feaguson, -Wheeler 等が報告していると聞かすが流行地で上記の様な現象の起る解明には役立たない。吾々はこの問題解決の一助とならばしないかと考え、試験管内に於て赤痢菌乃至その煮沸上清液を以て以下の如き実験を行

ひ若干の知見を得た。

実験方法及結果

1) 煮沸上清液感作に依る大腸菌の赤痢抗原獲得。

煮沸上清液は赤痢 Flexner I b, II b IVa 菌を生理食塩水中に 10mg/c.c. 浮遊せしめ 100°C 1 時間煮沸したものを遠心沈澱し上清を更に高速遠心沈澱し完全に透明となつたものを用ひた。本上清の滅菌せるものに Escherichia I, IV, V, を接種し 6 時間 37°C に保ち普通寒天に移し 18 時間培養した。之を繰返して次の結果となつた。尚 Escherichia は北里研究所より分与された Kauffmann 分類による菌である。10 代目に於ける結果は表 1 の如く EI, Sh-F-I b 及び EI, Sh-F-II b

表 1. 煮沸上清感作培養 10 代目の対赤痢血清凝集度
Sh-F-I b 煮沸上清液感作培養の対 Sh-F-I b 血清への凝集度

Esch	Sera	20×	40×	80×	160×	320×	640×	1280×	Sh-Flex血清	F-Type I -Factor
	E I	卅	卅	卅	卅	+	+	-		
E IV	+	+	+	±	-	-	-	±	-	
E V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

Sh-F-II b 煮沸上清液感作培養の対 Sh-F-II b 血清への凝集度

Esch	Sera	20×	40×	80×	160×	320×	640×	1280×	Sh-Flex血清	F-Type II -Factor
	E I	卅	卅	卅	+	+	+	±		
E IV	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
E V	卅	+	+	-	-	-	-	-	-	

Sh-F-IVa 煮沸上清液感作培養の対 Sh-F-IVa 血清への凝集度

Esch	Sera	20×	40×	80×	160×	320×	640×	1280×	Sh-Flex血清	F-Type IV -Factor
	E I	+	+	±	-	-	-	-		
E IV	卅	卅	卅	±	±	-	-	-	-	
E V	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	卅	±	

に於て著明に対赤痢血清凝集価が上昇した、
20代目に於ては表2の如く1600倍迄にな

り Sh-Flexner 混合血清に対しても完全に又
Factor Serum にも完全に凝集する様になつ

表2. 煮沸上清液感作培養20代目の対赤痢血清凝集度
Sh-F-I b 煮沸上清液感作培養の対 Sh-F-I b 血清への凝集度

Esch	Sera		100×	200×	400×	800×	1600×	3200×	Sh-Flexner	F-Type I	F. Group 4	F-Group 6
	E I	I	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	±	+
E IV	IV	卅	卅	±	-	-	-	±	-	-	-	
E V	V	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sh-F-II b 煮沸上清液感作培養の対 Sh-F-II b 血清への凝集度

Esch	Sera		100×	200×	400×	800×	1600×	3200×	Sh-Flexner	F-Type II	F-Group 789
	E I	I	卅	卅	卅	+	±	-	卅	+	+
E IV	IV	卅	+	-	-	-	-	+	-	-	
E V	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sh-F-IVa 煮沸上清液感作培養の対 Sh-Flex IVa 血清への凝集度

Esch	Sera		100×	200×	400×	800×	1600×	3200×	Sh-Flexner	F-Type IV	F-Group 4
	E I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E IV	IV	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	
E V	V	卅	卅	卅	-	-	-	卅	±	-	

た。併し2株を除いた他の株と上清液の組合せは Titer の上昇は認められなく以後40代目迄同様操作を繰返すも効がなかつた。E I-Sh-F I b が3200倍 E I-Sh-F II b が1600倍迄が最高であつた。この Test に用ひた赤痢免疫血清は F-I b が12,800倍。F-II b が12,800倍。F-IVa が6,400倍のものである。Sh-Flexner 混合は稀釈血清であり Type Factor Group Factor も稀釈血清であつて最小凝集能迄稀釈してある。斯くして凝集度の上昇した菌を各型赤痢血清で定量凝集すると非常に複雑な凝集形態で相対血清にのみ強く反応するのではない。勿論赤痢菌を抗原としてこの様な定量凝集を行う時も Factor でない血清であるからこの傾向は避けられないが程度は赤痢菌より甚だ複雑多岐で流行地で分離された赤痢血清凝集大腸菌が全くこの通りの様相を呈している事を考えると興味ある問題と思はれる。その結果は表3の如くである。

2) 赤痢血清への凝集能を得た大腸菌属の生物学的性状

光電比色計を用ひて菌の一定濃度の浮游液を作り同一量を同一量の培地に接種し標準株との間の生物学的性状を調べたのが表4である。48時間後の判定を以てして標準株との間に差は見られない。

3) 本獲得抗原は耐熱性か

当所に於て流行地より分離した多くの赤痢血清凝集 Escherichia は易熱性で100°C30分で消失するものが多かつた。之は Flagella にその性状が与えられた為ではないかと思ふが吾々の実験では表5の如く100°C 2時間30分煮沸するもその凝集性に大した変化を来さず、本菌を洗滌したのもも生菌と大差がない事はO抗原の意味を持つ様に赤痢菌の抗原性が与えられたのではないかと思はれる。

4) 其の他の血清学的試験

F I b, F II b血清をそれぞれ相対 F-I で吸収するとその血清は該菌に反応しなくなる。所がこの血清に対し Sh-F I b, Sh-F II b 菌は原未吸収血清と殆ど変りなく反応する。(表6) 所が相対赤痢菌を以て吸収した血清にこの

表3. 各型血清に対する定量凝集

E-I, F-Ib						E-I, F-IIb							
Sera	dil	100x	200x	400x	800x	1600x	Sera	dil	100x	200x	400x	800x	1600x
F I a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F I a	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F I b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F I b	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F II a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F II a	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F II b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F II b	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F III a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F III a	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F III b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F III b	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F IV a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F IV a	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F IV b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F IV b	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F IV c	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F IV c	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F V	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F V	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F VI	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F VI	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F X	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F X	卍	卍	卍	卍	卍	卍
F Y	卍	卍	卍	卍	卍	卍	F Y	卍	卍	卍	卍	卍	卍

表4. 標準株及び凝集能獲得株の生物学的性状

Strain.	Rham.	Mal.	Man.	Sac.	Dul.	Inoc.	Sorb.	Gluc.	Arab.	Lac.	Indol.	H ₂ S.	Amm.	Cit.	KNO ₃	V.P.	MR.	Sod.Cit
F I標準	⊕	⊕	⊕	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E I-I b	⊕	⊕	⊕	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E I-II b	⊕	⊕	⊕	-	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E IV標準	⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E IV-II b	⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E V標準	⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-
E V-IVa	⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	-	+	-	-

○は瓦斯発生を示す。

表5. 煮沸による影響

	E I-I b 対 I b 血清						E I-II b 対 II b 血清					
	100x	200x	400x	800x	1600x	B群	100x	200x	400x	800x	1600x	B群
生菌	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
100°C 3'	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
100°C 1h.	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
100°C 2.5h.	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
100°C 2.5h. 洗滌菌体	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

表6. 凝集能獲得菌で吸収した赤痢血清の赤痢菌への態度

	100x	200x	400x	800x	1600x	3200x	6400x
I b 原血清	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
I b 吸収血清	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
II b 原血清	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
II b 吸収血清	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

E-I を作用させても 20 倍前後反応するに止まる。獲得抗原が F-I b F-II b 各血清過剰の状態処理された時これを抜去し得るや否やについて見るにこれは不可能であつた。各血清に 5mg/ml Suspension を作り 2 時間 37°C に入れ後室温一夜放置の菌を 15% 食塩水及蒸溜水で洗滌したものをテストしたが凝集価に大差がなかつた。

5) 凝集能獲得菌の能力消失

この菌をペプトン分解半合成培地に 30 代培養を継続したが Titer 下降は認めず高層寒天に 1 ヶ月毎植継いだものは半年で半減した価を示した。煮沸 E-I 菌上清と肉汁ブイヨン同量混合培地中での 30 代培養で 400× 程度に下降した。

6) その他の試み

Flexner 菌煮沸上清液に 1% の割合に Glucose を加えた培地にて感作を続けた時は 30 代目に於て最高 200 倍迄上昇したに止つた。Glucose に保護作用が有るのではないかと思はれる。赤痢菌培養濾液による試み、菌凍結融解上清液による試み、又赤痢菌と Escherichia の混合培養によるものごとく失敗に帰した結果が出た。

7) Normal な兎血清の本菌への反応

Normal な兎の血清に偶然この様な結果の招来する事もあるのではないかと考え 42 頭の兎血清を使用して凝集能獲得菌及標準菌を定量凝集したが 160 倍を限度として反応せず

EI-I b EI-II b が標準 E I より凝集価が高いと云う様な現象も見られなかつた。

結 び

1) 赤痢流行地に於て赤痢免疫血清に凝集する大腸菌が屢々検出されるが之が In Vitro で起り得るや否や実験した。

2) 赤痢 Flexner I b, II b, IVa 煮沸上清液を以て Escherichia I, IV, V, を感作培養を試み EI I b EI-II b の組合せのみが 20 代目に於て 1600 倍迄凝集する様になつた。併し 20 代目以降殆ど上昇しなかつた。

3) この E-I は赤痢各型血清で定量凝集すると複雑な凝集形態を取り、原株と比し生物学的性状に何ら変化なく、分離の類似菌が易熱性であるのに比し耐熱性であつた。又本菌は Sh-F-I b, II b, などの血清を吸収し本菌えの凝集性を失うにも拘らず吸収血清は対赤痢菌への凝集能に殆ど変化がない。

4) 本菌の凝集能の消失は著明でないが漸次下降又標準株煮沸上清液を添加培養すると速かに下降した。

5) Normal な兎血清 42 を用ひて該菌を定量凝集したが 160 倍を限度とし反応しない。

6) 1% Glucose 加による感作では凝集能力を獲得出来ず、又赤痢培養濾液その他を用ひての実験で Titer の上昇したものはなかつた。

(本論文の要旨は昭和 28 年 11 月第 6 回日本細菌学会中国四国支部総会において発表した)

参 考 文 献

- 1) 伊達和男, 安齊 博 日本細菌学会第 21 回総会記録 No. 19.
- 2) 岡田正次郎, 芦田博文. 日本細菌学会第 27 回総会抄録 No. 241.
- 3) 大林静男 聯合微生物学会第 16 回総会記録 No. 69.
- 4) 渡辺周一, 沢井俊明 : 岐阜県衛生研究所業報

第 5 号.

- 5) 秋葉朝一郎・医学のあゆみ 13~5.

- 6) 矢追秀武, 江島新平・実験医学雑誌 11 卷, Page 501.

- 7) 動物腸内細菌委員会 Kauffmann の腸内細菌 P139~ P209~ P273~