

〔特別掲載〕

(東女医大誌 第30巻 第5号)
頁 919—927 昭和 35 年 5 月)大腸菌 O 111 でのウサギ小腸結紮法による
内毒素の作用の実験的観察

国立予防衛生研究所細菌部 (部長 福見秀雄)

村 田 行 夫
ムラ タ エキ オ

(受付 昭和 35 年 4 月 8 日)

緒 言

病原大腸菌のヒトに対する発病試験は Kirby ら¹⁾ Ferguson ら²⁾, Braun ら³⁾, June ら⁴⁾の多くの報告があり, わが国でも福見ら^{5) 6)}はその生菌および乾燥死菌を健康成人に与えて発症させることに成功している。また, 大腸菌性胃腸炎の発症要因について, 古屋ら^{7) 8)}は, 発症にはまず嚥下された大腸菌が, 小腸上部で増殖することが必要で, 発症の主役を演ずるのは菌体内毒素であらうと推論した。

一方 De ら⁹⁾は, コレラ菌の検出されないコレラ様疾患の原因菌として大腸菌を疑い, 結紮したウサギの小腸の一部に分離大腸菌の生菌培養を注入して, 24時間後に観察したところ注入部に肉眼的および組織学的変化を認め, この変化は大腸菌の病原性に関連するとのべている。その後同様な実験成績は De ら¹⁰⁾および Taylor ら¹¹⁾により既知の病原大腸菌 O 26, O 55, O 111 などについて得られており, とくに Taylor ら¹¹⁾は, 死菌接種ではすべて, 陰性に終つたことから, 小腸に対する起炎作用は生菌のみのもつ特性であると結論した。わたくしどもは病原大腸菌の起炎性の本態を追究するため, De ら⁹⁾の方法を用いて, 病原大腸菌 E. Coli O 111 および非病原大腸菌 O 19 につき, その生菌培養, 乾燥死菌および内毒素の起炎作用を検討するとともに, 乾燥死菌および内毒素のハムスター, マウスに対する致死量と毒性を比較検討し, 以下の知見を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

供試菌株は大腸菌 O 111 : B₄, Stoke W. (Dr. W.H. Ewing より送附された株), O 111 : B₄ KD (都立駒込病院より分与された株) および O 19 b : K : H7, F8188—41 (Dr. F. Kauffmann より送附された株) の 3 株で,

生菌としてはペプトン水 (pH 8.2) 37°C 24 時間培養 (菌数約 5×10^9) を, また死菌にはアセトンで殺菌, 乾燥した菌体を用い, 内毒素は Boivin 抗原として使用した。実験動物としてはつぎのものを用いた。

ウサギ: 体重約 1.5 kg の健康な市販雑系白色の雄,
ゴールデン・ハムスター: 体重約 85—90 g の雌および雄。

マウス: d d 系 (N I H) 20 g の雌および雄。

乾燥死菌および内毒素の作り方

乾燥死菌: 0.2% ぶどう糖加肉汁寒天 (pH 7.6) に 37°C 24 時間培養してえた湿菌量 100—150 g の菌を滅菌食塩水で 2 回遠心洗浄し, その一部を冷アセトンで処理したのち, 使用に際して, 56°C 30 分 2 回の間歇滅菌をおこなない, 生菌の残存しないことを確かめて実験に供した (乾燥死菌)。

内毒素: 上記乾燥死菌に用いた残りの菌体を 1 夜氷室 (3—5°C) においてから, 湿菌重量の 4 倍の冷却水 (1—2°C) に浮遊させ, 4°C で等量の 0.5 M 三塩化醋酸を加えて 3 時間攪拌抽出したものを, 15,000 rpm 20 分間遠心, その上清に少量のトルオールを加え, 牛腸膜を用いて流水で 24 時間透折後, Seitz E K で濾過した。この抽出液は硝酸銀溶液を加えてももはや沈澱を生じない。これに少量のトルオールを加えて 1 夜氷室に放置, ついで 38—40°C で減圧濃縮して 68% (W/W) にアルコールを加え, ふたたび 1 夜氷室においてから 1,500—3,000 rpm で遠心して沈澱をとり, これを内毒素 2 C B とした。その上清にはさらに 75% (W/W) にアルコールを加えて上記と同様の操作を反復し, ここで得た沈澱を内毒素 3 C B とした。各沈澱はアセトンで 3 回, エーテルで 2 回洗浄後, 五酸化リン上で減圧乾燥して各分画ごとの内毒素

Yukio MURATA (Department of Bacteriology, National Institute of Health, Tokyo): Studies on the mode of action of Boivin type antigen of *Escherichia coli* O111 by the ligated rabbit-gut method.

(Boivin 抗原)とした。使用に際しての滅菌には、その溶液を Seitz EK で濾過した。

以上のようにして作った乾燥死菌および内毒素についてキールダール(マイクロ)法により測定した窒素量を mg % でしめすと、乾燥死菌では O111, 11.6%, O19, 10.9%。内毒素では O111-2 CB, 2.40%, O111-2 CB-2, 2.57%, O111-3 CB, 2.59%, O111-3 CB-2, 2.37%, 以上(平均 2.5%), O19-2 CB, 1.94% であった。また内毒素の抗原性は沈降反応(重層法, 寒天拡散沈降法)でたしかめた。使用血清は E. Coli O111: B₄, Stoke W の O B 血清および E. Coli O19: K, :H7, F8188-41 O 血清で、それらの O 凝集素価は O111 O B 血清が 1:10240, O19 O 血清が 1:5120 で、また O111 O B 血清の生菌に対する凝集素価は 1:1280 であった。これらの血清の 1:10 希釈を用い、重層法により 2 時間後測定した各内毒素の沈降素価はつぎのとおりであった。O111-2 CB=1:640,000, O111-3 CB=1:640,000, O19-2 CB=1:320,000。さらに寒天拡散沈降反応ではいずれも、その当該ウサギ免疫血清(原液)に対し抗原希釈 1:64,000 まで反応し、沈降線は 1 ないし 4 本であった。これらの成績は、いずれも調製した内毒素の O 抗原性が安定していることをしめしている。このようにして作った内毒素材料の 2 分面のうちで、収量の多かつた方の分面を、他の分面と同様な性状であることを確かめた後、動物接種に使用した、すなわち O111 では O111-3 CB を、O19 では O19-2 CB をそれぞれ用いた。なお各実験において用いた特殊な材料および方法については、それぞれの項においてのべる。

実験成績

1 ウサギ小腸結紮実験

ウサギ小腸結紮実験の方法はおおむね De ら⁹⁾の原法に準じた。すなわち、ウサギを実験前約 20 時間絶食させた後、腹部野術の剪毛をおこない稀ヨードチンキおよびアルコールで消毒、エーテルおよび 1% 塩酸プロカインで全身および局所麻酔をほどこして開腹した。小腸をとりだし回腸末端部より上行して約 30cm のところを 1 カ所、さらにこれより約 30cm 上方に 1 カ所の計 2 カ所に、血管を避けながら、腸間膜の小腸と接する部に穿孔して、長さ 5-6cm のウィンナソーセージ様に小腸を結紮し、これら 2 カ所の結紮部のいずれか一方に病原菌材料を、他方に非病原菌材料を 1ml ずつ接種した後、小腸を腹腔内におさめ腹壁を縫合した。施術所要時間は約 25 分で、手術中には腸管の乾燥を防止するため、滅菌食塩水を灌注した。接種後 24 時間を経過してから、耳静脈の空気栓塞によりウサギを致死させて開腹し、小腸結紮部および各臓器の肉眼的観察、ならびに結紮部の組織学的および細菌学的検査をおこなった。なお対照として、結紮部以外の無処置部分の組織学的および細菌学的

検査のほか、別に 6 頭のウサギを手術し、単に結紮のみ、あるいは結紮部にペプトン水 (pH 8.2, 8.4) または滅菌食塩水を注入して同様な観察をおこなった。

組織学的検査には、肉眼的観察のおわつた材料を直ちにホルマリン固定し、パラフィンで包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色した標本を用いた。

細菌学的検査では、結紮部および対照部の内容を EM B 培地、マツコンキー培地および普通寒天培地に直接塗抹するとともに、ブイオンを用いて増菌後分離培養した。

成績：以上の実験でえられたおもな所見はつぎのとおりである。

1) 生菌培養接種群 (供試菌 O111: B₄, K D. O19b, 接種菌数約 5×10^9)

ウサギ No. 1

肉眼的所見……O111: 腸管の膨脹ほとんどなく、毛細血管やや拡張、内容は少量で固く黒褐色を呈し、その周囲粘膜面に少量の血液様滲出液が貯溜。O19: 腸管の膨脹なし、毛細血管は無変化、少量の赤褐色泥状の内容あり、粘膜面は無変化。対照部: 普通の小腸の内容があり無変化。

組織学的所見……いずれの部分にも炎症性変化なし。

ウサギ No. 2

肉眼的所見……O111: 腸管のあきらかな膨脹、腸壁の菲薄感、毛細血管の軽度のびまん性充血、内容に出血性、水様性滲出物の充満、粘膜面無変化。O19: 腸管の膨脹、毛細血管のごく軽度の充血、内容はやや紅色をおびた粘液、粘膜面無変化。対照部: 変状なし。

組織学的所見……いずれの部分にも変化なし。

2) 乾燥死菌接種群 (供試菌 O111: B₄, Stoke W, O19b: K: :H7, F8188-41)

ウサギ No. 3 (50 mg 接種)

肉眼的所見……O111, O19 ともに腸間膜側漿膜面の化膿巣、壊死、両結紮部とも赤血性で腸管の極度の膨満、および充血。(腹水の貯溜が約 10 ml)。内容に出血性、水様性滲出物の充満 (O111 においてやや出血性がつよい) 粘膜面にはやや黄褐色の壊死が地図状に附着し、指でこすると容易にはがれてうすい透明な筋層のみとなる。対照部: 内容、粘膜面に変化なし。(図 1 参照)

組織学的所見……O111: 強度の粘膜の変性剝離および壊死、粘膜下組織から筋層および漿膜にまでいたる出血性および滲出性炎、著明な多形核白血球の浸潤。O19: O111 の場合とほとんど同様。漿膜面における化膿巣。対照部、病的変化なし。

ウサギ No. 4 (10 mg 接種)

肉眼的所見……O111: 軽度の腸管の膨脹および毛細血管の拡張、少量のやや固つた内容、粘膜面に変化なし。O19: 腸管は O111 の場合よりやや大きく膨脹、毛細血管

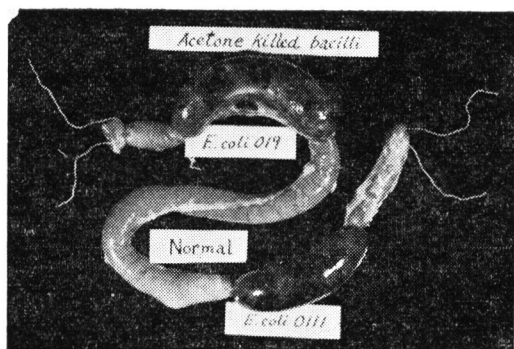


図1：O111, O19 ともに腸間膜側漿膜面の化膿巣, 壊死, 両結紮部とも赤血色で腸管の極度の膨脹, 充出血。内容に出血性, 水様性滲出物が充満, 粘膜面にはやや黄褐色の壊死か地図状に附着。(ウサギ No. 3 乾燥死菌 50 mg)

には変化なし, 少量の粘血性泥状の内容を含む, 粘膜面には変化なし。対照部変化なし。

組織学的所見……O111: 粘膜下組織に軽度の充出血および多形核白血球の浸潤。O19および対照部: 炎症性の変化なし。

ウサギ No. 5 (2 mg 接種)

肉眼的所見……O111, O19 接種のいずれも軽度の腸管の膨脹および毛細血管の拡張。内容は少量の粘血塊を含む泥状物。対照部: 緑黄色の水様性の内容があつたほか所見なし。

組織学的所見……O111: 炎症性の変化なし, O19: 粘膜下組織から筋層に軽度の多形核白血球の浸潤あり。対照部: 炎症性の変化なし。

ウサギ No. 6 (0.4 mg 接種)

肉眼的所見……O111: わずかな腸管の膨脹, 毛細血管の充血, 内容にはわずかに血液を混じた, 水様液少量。O19: 強度の腸管の膨脹および毛細血管の充血, 腸壁の菲薄化, 内容は少量のふん便様泥状物の混入した透明な水様液で充満。対照部: 変化なし。

組織学的所見……O111: 炎症性変化なし。O19: 粘膜上皮の剝離, 変性, 粘膜の充出血, 粘膜下組織における著明な多形核白血球の浸潤など強度の炎症像をしめした。対照部: 病的変化なし。

3) 内毒素接種群(供試菌O111—3CB, O19—2CB)

ウサギ No. 7 (5 mg 接種)

肉眼的所見……O111: 明らかな腸管の膨脹, 毛細血管の拡張と出血斑あり, 内容にはやや多量の出血性水様液, 粘膜面は菲薄, びらん性, 透明で指をあてると指紋がみえる。

O19: O111 の場合とほぼ同様な所見で, 内容はやや多量で水様性, 出血性なし。対照部: 腸の内容, 粘膜面

ともに正常。

組織学的所見……O111: 粘膜の剝離, 変性および充出血, 粘膜下組織から筋層にわたって充出血および多形核白血球の浸潤がある。O19: O111 の場合とほぼ同様な所見である。対照部: 病的変化なし。

ウサギ No. 8 (1 mg 接種)

肉眼的所見……O111: 腸管の極度の膨満, 毛細血管の拡張, 漿膜面は紅赤色で菲薄, 壊死がある。内容は少量の黄褐色の小塊およびわずかに血液を混じた卵白様液が多量。粘膜面はびらん性である。O19: 腸管の軽度の膨脹, 毛細血管の軽度の拡張, 腸の内容, 粘膜面に変化なし。対照部: 少量の粘液が腸の内容に混入し, 小粘血塊が2つみられた。(図2参照)

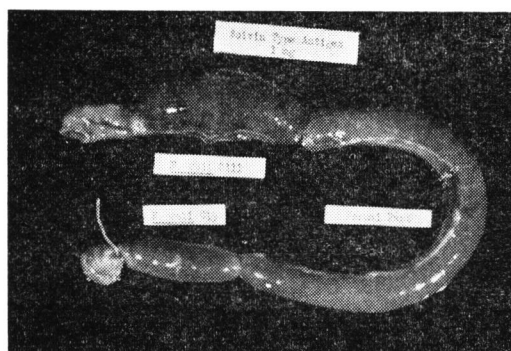


図2：O111: 腸管の極度の膨満, 毛細血管の拡張, 漿膜面は紅赤色で菲薄, 壊死がある。内容は少量の黄褐色小塊とわずかに血液を混じた卵白様液が充満, 粘膜面はびらん性。O19: 腸管の軽度の膨脹, 毛細血管の軽度の拡張, 腸の内容, 粘膜面に変化なし。(ウサギ No. 8 内毒素 1 mg)

組織学的所見……O111: 強度の粘膜上皮の剝離, 変性および崩壊, 粘膜面に強度の充出血および滲出, 粘膜下組織から筋層にいたるまで著明な充出血および多形核白血球の浸潤がある。O19: 粘膜上皮の軽度の剝離, 変性, 粘膜下組織から筋層にかけて軽度の充血および多形核白血球の浸潤。対照部: 病的変化なし。(図4, 5, 6参照)

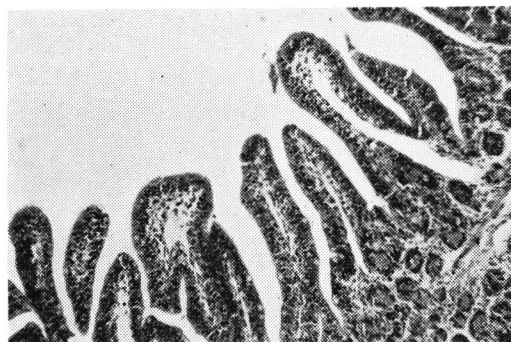


図3：O111: 炎症性の変化なし。H. E. 染色 50 × (ウサギ No. 10 内毒素 0.04 mg)

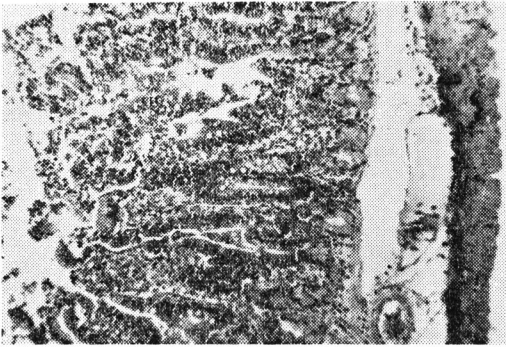


図4：O19：粘膜上皮の軽度の剝離，変性，粘膜下組織から筋層にかけて軽度の充血および多形核白血球の浸潤。H.E.染色50×（ウサギ No.8 内毒素 1.0 mg）

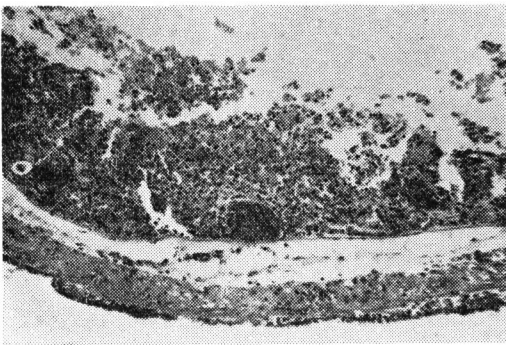


図5：および図6：O111 強度の粘膜上皮の剝離，変性および崩壊。粘膜面に強度の充出血および滲出，粘膜下組織から筋層にいたるまで著明な充出血および多形核白血球の浸潤。図6 では漿膜面の壊死がある。H.E.染色50×（ウサギ No. 8 内毒素 1.0 mg）

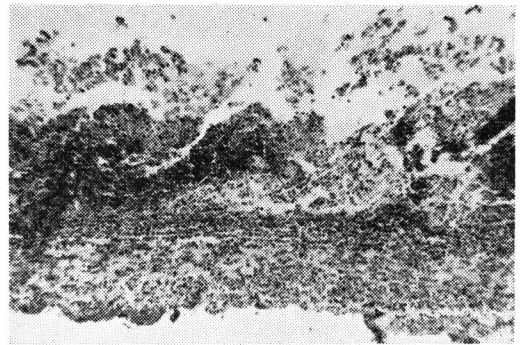
肉眼的所見……O111：腸管の軽度の膨脹，毛細血管変化なし，内容は少量の粘性泥状。O19：腸管の膨脹なし，内容は少量で黒褐色を呈し比較的固く，軽度の出血性。対照部：病的変化なし。

組織学的所見……O111，O19ともに炎症性変化なし。対照部：病的変化なし（図3参照）。

以上の肉眼的および組織学的所見を一括し，O111およびO19のウサギ小腸に対する毒性を比較すると表1のようになる。なお，この際における変状の程度はおおむねつぎのようにしてわけた。

肉眼的変化

++：結紮部腸管の高度に膨脹，表面は光沢ある赤血色または紅色を席び，漿膜面の壊死または化膿巣，腸管壁



ウサギ No.9 (0.2 mg 接種)

肉眼的所見……O111，O19ともに腸管の膨脹なし。その他病的所見なし。内容はO111，O19ともに少量で，暗赤色を呈し，比較的固く，軽度の出血性。対照部：病的変化なし。

組織学的所見……O111，O19ともに炎症性変化なし。

ウサギ No.10 (0.04 mg 接種)

の菲薄化，毛細血管の拡張，多量（10—15 ml）の出血性，水様性または粘液の混入した内容物の充満，粘膜面はびらん状で，出血斑，出血点散発。

++：所見は前者同様であるが，その程度のやや軽度なもの。

+：結紮部腸管の軽度の膨脹，毛細血管の軽度の拡張，内容は粘性少量（2—4 ml）かまたは卵白様でや

表1 ウサギ小腸の病理学的変化

接種材料	接種量	ウサギ No.	E. coli O-111		E. coli O-19	
			肉眼的変化	組織学的変化	肉眼的変化	組織学的変化
生菌培養	1 ml	1	-	-	-	-
	1	2	++	-	++	-
乾燥死菌	50 mg	3	+++	+++	+++	+++
	10	4	+	+	±	-
	2	5	±	-	±	+
	0.4	6	+	-	+++	+++
内毒素	5.0 mg	7	++	++	++	++
	1.0	8	+++	+++	+	+
	0.2	9	-	-	-	-
	0.04	10	±	-	-	-

や多量 (5—7 ml) で粘膜面には著変はない。

±：前者とほぼ同様の所見であるが、その程度の軽いもの。

—：ごく軽度の毛細血管の拡張と内容に少量の滲出液がみられたほかには病的変化のなかったもの。

組織学的変化

卅：粘膜上皮の剝離，変性，壊死および崩壊。粘膜下組織から筋層，漿膜にまでおよぶ出血性滲出性炎，多形核白血球の浸潤。

卅：前者とほぼ同様の所見がみられるが、その程度はやや軽く，粘膜上皮の壊死はない。

十：粘膜上皮の剝離，変性，粘膜下組織および結締組織層における軽度の充出血と多形核白血球の浸潤。

—：炎症性的変化はほとんどない。一部の粘膜下織に浮腫がみられたが，これは単に結紮のみをおこなったものおよび食塩水注入例にもみられ，軽度の循環障害によるものと思われる。

以上の所見を総括すると，表1から明らかなように，肉眼的所見と組織学的所見とはかならずしも一致しないが，O111およびO19の乾燥死菌，内毒素は，程度の差こそあれ，ともにウサギ小腸に対してつよい毒性をもち，また生菌では組織学的変化には乏しいが，肉眼的には明らかな小腸炎をおこすことがみとめられた。しかし，O111およびO19相互間の毒性に，本質的な差があるような成績はえられなかった。

なお，腸管以外の臓器については，少数例に肝臓と脾臓の軽度の腫大と腸間膜リンパ節の腫脹がみられたほかには著変はなかった。また生菌接種例における細菌学的検査では，全例で接種菌は，接種部位からほとんど純培養のように検出されたが，対照部分からは分離されなかった。さらにまた，生菌接種部の内容を100 mlの滅菌食塩水に洗浄浮游させ，生菌数の計算をおこなったところ，腸管の膨脹したものと，しなかつたもの間に有意の差がみられなかっただけでなく，接種菌数と生菌数の間でも，いちじるしい差異をしめさなかった。

以上大腸菌O111およびO19の生菌，乾燥死菌および内毒素を，Deらの方法によつて，10頭のウサギの小腸に接種し，つぎの成績を得た。

1) 生菌接種群：2頭中1頭においてO111，O19ともに肉眼的に中等度の変化がみとめられたほか，すべて陰性であつた。

2) 乾燥死菌接種群：50 mg 接種例ではすべて肉眼的および組織学的に強度の変化がみられたが，10 mg 接種例ではその程度が弱く，とくにO19の例では組織学的に無変化で，2 mg 接種例では一般に変化の程度はさらに弱かつた，ところが0.4 mg 接種例ではO111による変化が軽度であつたのに対し，O19では強度の毒性をしめた。

3) 内毒素接種群：5 mg および1 mg 接種例ではO111，O19ともに肉眼的および組織学的に明らかに毒性をしめたのに対し，0.2 mg および0.04 mg 接種例ではほとんど変化はみとめられなかった。

2 ハムスター接種による乾燥死菌および内毒素の毒性の比較

既述のように調製した供試菌の乾燥死菌および内毒素を，ゴールドン・ハムスターに接種して，それらの毒性を比較した。接種材料は死菌では1 mlあたり2.0 mg，0.67 mg および0.22 mg，また内毒素では1 mlあたり0.20 mg，0.067 mg および0.022 mg を，それぞれ1万倍マーズン加生理食塩水に浮游または溶解させ，その1 ml づつを，5頭づつを1群とした計60頭のゴールドン・ハムスターに腹腔内接種した。また対照には別の5頭にマーズン加生理食塩水を同様に接種した。

供試したゴールドン・ハムスターは体重約80～90 gのもので，とくに雌雄をえらぶことはしなかつたが，群別にあつてはそれらが各群に平均して分配されるように注意した。

接種後，1日1回定時刻に体重の測定と臨床症状の観察をおこない。10日以内にへい死したものはもちろん，10日後まで生残したものは11日目にと殺して剖検した。

このように観察したO111およびO19のゴールドン・ハムスターに対する毒性を，それらの致死率，臨床症状および病理解剖学的変化の軽重ならびに体重の増減によつて比較するとつぎのごとくである。

1) 致死率：ハムスターの致死率は表2にしめすように，死菌ではO111が20.0%，O19が46.7%また内毒素ではO111が13.3%，O19が60%で，死菌および内毒素ともに，O111よりもO19の方が幾分つよい毒性をしめた。

2) 臨床症状：おもな症状は眼脂と尿失で，それらは60例中55例(91.7%)において，接種材料の種類および量に関係なくみとめられ，接種後24時間目から通常4日—7日間，4例では10日間継続した。また，これら症状を呈したのものの中にはさらに鼻血，吐血または血便のみられたものがあり(O111死菌8頭，O19死菌2頭。O111内毒素3頭，O19内毒素4頭)とくにへい死例では死菌，内毒素のいずれの接種をとわずそれらの症状がつよかつた。なお，O19死菌接種(0.22 mg)の1頭およびO111内毒素接種(0.022 mg)の3頭にはみとむべき症状がなかつたが，前者が5日目にへい死したのに対し，後者では全頭が生残した。このように，臨床所見からみてもO111とO19との間の毒性の差は明らかでなかつたが，一般的にみてO111の接種よりもO19のそれの方がややつよい症状をしめし，その継続日数も長い傾向があつた。

表2 ゴールデンハムスターによる毒性試験
乾燥死菌および内毒素によるハムスターの致死率

接種材料	接種料	ハムスター	
		致死率	計
O-111 死菌	2.0 mg	2/5 (40.0)	3/15 (20.0)
	0.67	1/5 (20.0)	
	0.22	0/5 (0)	
O-19 死菌	2.00	3/5 (60.0)	7/15 (46.7)
	0.67	2/5 (40.0)	
	0.22	2/5 (40.0)	
O-111 内毒素	0.20	2/5 (40.0)	2/15 (13.3)
	0.067	0/5 (0)	
	0.022	0/5 (0)	
O-19 内毒素	0.20	5/5 (100)	9/15 (60.0)
	0.067	1/5 (20.0)	
	0.022	3/5 (60.0)	

備考：分母は供試したハムスターの頭数，分子はへい死頭数を示す。() 内は%を示す。

表3 ゴールデン・ハムスターによる毒性試験
体重の変動(増減率)

接種材料の種類	接種材料	接種量	生残(計算)匹数	接種前平均体重(g)	接種10日後の平均体重(g)	体重の平均増減(g)	平均増減率(%)
乾燥死菌	O-111	2mg	3	80.3	71.8	- 8.5	- 3.5
	O-19	2	2	87.5	64.5	-11.5	- 6.5
	O-111	0.67	4	86.9	84.8	- 2.1	- 0.6
	O-19	0.67	3	89.2	60.2	-29.0	-10.9
	O-111	0.22	5	75.4	76.1	+ 0.7	+ 0.2
	O-19	0.22	3	92.0	81.0	-11.0	- 4.0
内毒素	O-111	0.2	3	86.5	79.5	- 7.0	- 2.7
	O-19	0.2	0				
	O-111	0.067	5	90.8	83.1	- 7.7	- 1.7
	O-19	0.067	4	82.3	70.8	-11.5	- 3.5
	O-111	0.022	5	84.7	81.5	- 3.2	- 0.8
	O-19	0.022	2	99.5	86.8	-12.7	- 6.4
対照群	食塩水	1.0ml	5	91.3	105.9	+14.6	+ 3.2

備考：- は減少，+ は増加を示す

3) 体重：へい死例をのぞき，10日間生残した39頭における体重の変動は表3に示すように死菌，内毒素いずれの場合でも，O19接種群の方がO111のそれよりも体重の減少率がやや高かった。

4) 剖検所見：接種後10日間生残した39頭を11日目に剖検したところ，19例に肝包膜肥厚15例に肝臓の濁腫(15例に腫大，12例に濁濁)20例に肝葉の癒着，

4例に脾腫，2例に脾臓の胃および腸漿膜との癒着，3例に腎臓の濁腫。11例に腸管の癒着がみとめられた。

死菌と内毒素との間の毒性の差を，各臓器にあらわれた病変所見で比較すると，内毒素の方がややつよい病変像を呈したが，病変例数では有意の差はみられなかった。またO111とO19との間の毒性の差について，死菌接種群および内毒素接種群を比較したが両者の間には有

意の差はなかつた。なお、対照群の5頭には、何らみとむべき臨床症状、剖検所見はなく、観察期間中における体重の増加も順調であつたことはもちろんである。

3 マウス接種による乾燥死菌および内毒素の毒性の比較

O111およびO19の死菌ならびに内毒素を用い、死菌では1mlあたり1.0mg, 2.0mg, 4.0mg, 8.0mg, 16.0mg, また内毒素では0.1mg, 0.2mg, 0.4mg, 0.8mg, 1.6mgを1万倍マーズン加生理食塩水に浮遊または溶解させ、その0.5mlづつを7頭を1群とした計140頭のマウスに腹腔内接種した。供試したマウスは体重約20gのdd系で、とくに雌雄をえらぶことをしなかつた。その群別の要領はハムスターの場合に準じ、対照には5頭にマーズン加食塩水を上記同様に注射した。

このようにして接種材料のLD₅₀をプロビット分折法¹²⁾で求めると、表4のごとく、O111死菌…3.1mg±0.6mg, O19死菌…1.2mg±0.2mg, O111内毒素…0.55mg±0.1mg, O19内毒素…0.17mg±0.03mgで、死菌、内毒素ともに毒性をしめしたが、O19の方がややつよい傾向があつた。なお、接種10日後の生残マウスからえた血清では、各接種菌に対して凝集素価の上昇していることが確認された。

考 察

すでに Ferguson^ら²⁾は大腸菌O111の生菌10⁹個以上を成人に投与して確実に発症させえたことを報告し、また福見^ら^{5) 6)}はO111およびO19による人体実験で、O111は生菌および乾燥死菌ともに腸炎をおこさせるのに対し、O19投与例では1例をのぞいて無症状であつたと記載している。しかし、福見らとおなじ菌株を供試した著者のウサギ小腸への接種実験では、O111の起炎性とO19のそれとの間には、生菌、死菌および内毒素のいずれをとわずみるべき差異がなかつた。このようにO111とO19とがウサギの小腸に対してほとんど同程度の起炎性をもつことは、福見らの人体投与実験の成績に一見むじゆんしているように見える。しかし一方、さきに坂崎¹³⁾はウサギの小腸に対する起炎性を指標として大腸菌を毒性および無毒性の2種に大別し、しかもその指標による毒性大腸菌はいわゆる病原大腸菌も含んでいるが、一般に正常尿便中にひろく発見される大腸菌の中にもこの種の大腸菌はみられ、又そのような大腸菌はこの指標では毒性大腸菌であるが病原大腸菌にみるような一次的な起病性および定着性をもたないことを明らかにしている。この点から考察すれば、福見らおよび著者が供

表4 マウス(dd)による毒性試験

接種材料	接種量	マウス			
		致死率	計	LD ₅₀ (mg)	標準誤差 (mg)
O-111死菌	8.0mg	7/7 (100)	13/35 (37.1)	3.1	±0.6
	4.0	4/7 (57.1)			
	2.0	1/7 (14.3)			
	1.0	1/7 (14.3)			
	0.5	0/7 (0)			
O-19死菌	8.0	7/7 (100)	21/35 (90.0)	1.2	±0.2
	4.0	7/7 (100)			
	2.0	6/7 (85.7)			
	1.0	1/7 (14.3)			
	0.5	0/7 (0)			
O-111内毒素	0.80	6/7 (85.7)	7/35 (20.0)	0.55	±0.10
	0.40	1/7 (14.3)			
	0.20	0/7 (0)			
	0.10	0/7 (0)			
	0.05	0/7 (0)			
O-19内毒素	0.80	6/6 (100)*	18/34 (51.4)	0.17	±0.03
	0.40	6/7 (85.7)			
	0.20	5/7 (71.4)			
	0.10	0/7 (0)			
	0.05	1/7 (14.3)			

備考：分母は供試したハムスター頭数、分子はへい死頭数を示す。

() 内は%を示す。* 印は6頭で実験した。

試したO 19は坂崎のいう 毒性大腸菌にはいるべきもので、人体投与実験の成績とウサギの小腸に対する起炎性との間に差異があつても当然のことと思われる。福見らおよび著者の成績から、大腸菌の腸に対する起炎性はその菌体抗原、すなわち内毒素によつていであらうことが推察されるが、大腸菌間の毒性の差は、おそらく、菌型によつてのみ異なるばかりでなく、菌体1個あたりの内毒素含有量によつても影響をうけ菌集団としてみた場合に、それが毒性および無毒性、あるいは病原性および非病原性の差となつて表現されることも考えられる。すなわち、大腸菌の毒性または起炎性の差は菌型による差異のみでなく含有内毒素の量的な差によつても影響されているということである。しかし、菌のR型菌解離率、内毒素の純粋度などによつて以上の実験成績が左右されることは充分考慮されねばならず、これらの点について著者らの供試材料は粗毒素であるので、この考え方の適否はなお将来の研究にまたねばならないだろう。本研究においては病原大腸菌O111の内毒素が非病原性大腸菌たるO19のそれよりも、その毒性が弱いような傾向があつたが、毒性の強さが必ずしも腸炎の発症力の強さをあらわすものでないことは、福見らおよび古屋⁷⁾ 8)らの研究から明らかであつて、菌の腸管定着性がその起病性に密接に関連しているのみならず、腸炎の発症には嚥下された菌が小腸内で増殖することが第一要件であるという。動物実験でO111の内毒素がO19のそれよりも弱い毒性をしめすにもかかわらず、人体投与実験ではO111に強い起病性がみられる理由については、もちろん推論の域を脱しないが、ヒトの腸管に炎症をおこさせるには、多量の菌の増殖とそれによる内毒素の集積とが必要で、ヒトの腸管ではウサギの腸管よりもO111の増殖の場として適しており、その増殖率はO19のそれよりもはるかに高いために、その結果として腸炎を発症させるに十分な内毒素量に達することが考えられる。

さきに Taylor ら¹¹⁾は菌体抽出物質を用いておこなつたDeの試験の成績から、病原大腸菌のウサギ小腸に対する起炎性は、生菌だけの持つ特性であると結論したが、彼女らの考え方は、著者らの成績から明らかに否定でき、おそらく彼女らの供試した抽出物質中には内毒素が含まれていなかったか、またはそれが量的に不足していたものと思われる。

これを要するに、著者らの実験では大腸菌性急性胃腸炎において、菌のO抗原が疾病の成因にどのような意義をもつかという従来の課題の一端を実証しえたといえよう。本実験に供試した菌株は1株(O111: B₄, KD)をのぞいては陳旧保存株で、このような株では毒性が減少するのが通例であり、本実験の成績をもつて新鮮分離株の毒性を論ずることはやや早計のきらいもあるが、供試菌中ただ1株の新鮮分離株O111: B₄, KDによる

成績の範囲では、それと長期間継代株との間には何ら毒性の差はみられなかつた。なお、Taylor ら¹¹⁾はDeの試験に使用するウサギの系統によつて成績に差のあることをみとめているが、この点については今後検討の要があると思われる。

McNaught ら¹⁴⁾および須知¹⁵⁾は新鮮分離株を用いてDeらの実験を追試し、肉眼的よりもむしろ組織学的所見に判定の主体をおけば、Deらの試験は病原大腸菌の識別に有用な方法であるとのべている。たしかに、人体実験以外に大腸菌の病原性を証明する確実な手段がない現在、Deらの試験は病原大腸菌の研究に有効な一検査法である。しかし、ヒトとウサギの腸管が菌の起炎性に対して同じ反応をしめすかどうかはなお不明であるのみならず、本研究におけるO19の場合のように、非病原大腸菌のあるもの、すなわち坂崎らのいう一般の毒性大腸菌でもまたウサギの腸に対して強い起炎性をもつから、Deの試験の成績をもつてただちに菌の病原性を判定することは、いましめねばならないだろう。

結 論

病原大腸菌の腸炎発症因子を追究するため、病原性大腸菌 *E. coli* O111 および非病原性大腸菌 *E. coli* O19の生菌、乾燥死菌および内毒素を用いて動物実験をおこない、つぎの成績をえた。

1) Deらの方法によるウサギの結紮小腸への接種試験ではO111, O19ともに著明な急性小腸炎をおこさせた。両菌の起炎性にはあまり明瞭な差はなかつたが、O111内毒素接種例において炎症の程度がやや強い傾向があつた。

2) 乾燥死菌およびそれから抽出した内毒素がウサギの結紮小腸に対して生菌と同様の起炎作用をもつことが証明された。この事実からウサギの結紮小腸に対する大腸菌の起炎作用の本態は内毒素にあると思われる。

3) 乾燥死菌および内毒素の毒性をハムスターおよびマウスで比較したところ、O111よりもO19の方がやや毒性が強かつた。

4) ヒトに対する大腸菌の病原性および非病原性の差を、動物実験でもとめることはできなかつたが、大腸菌の腸に対する起炎作用の本態は内毒素にあることが立証できたように思われる。

5) ヒトに対しては非病原性のO19が、動物実験ではO111と同様な毒性をしめす理由について考察した。稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた福見秀雄細菌部長、東京女子医大細菌学教室平野憲正教授、並に御指導、御助言を賜つた予研細菌部第一室長中谷林太郎博士、坂崎利一博士に対し深く感謝致します。

本論文の要旨は昭和32年6月、第10回日本細菌学会関東支部例会において発表した。

文 献

- 1) Kirby, A.C., Hall, E.G. and Coacley, W. :
Lancet., 2 201 (1950)
- 2) Ferguson, W.W. and June, R.C. : Am. J.
Hyg., 55 155 (1952)
- 3) Braun, O. H. and Resemann, G. : Klin.
Wochr., 30 853 (1952)
- 4) June, R.C., Ferguson, W.W. and Worfel,
M.T. : Am. J. Hyg., 57 222 (1953)
- 5) 福見秀雄・中谷林太郎・小酒井 望・小張一峯
香川修事・鮎子田繁雄・他 : 日本医事新報
1506 14 (1953)
- 6) 福見秀雄・中谷林太郎・黒坂栄三・小酒井 望
深沢義明 : 日伝会誌 29 453 (昭 30)
- 7) 古屋曉一・小酒井 望・他 : 日伝会誌 27 1
(昭 28)
- 8) 古屋曉一・小酒井 望・深沢義明・広明竹雄 :
日伝会誌 28 461 (昭 29)
- 9) De, S. N. and Chatterje, D. N. : J. Path.
Bact., 66 559 (1953)
- 10) De, S.N., Bhattacharya, K. and Sarkar,
J.K. : J. Path. Bact., 71 201 (1956)
- 11) Taylor, J., Maltby, M. P. and Payne,
J.M. : J.Path. Bact., 76 491 (1958)
- 12) Finney, D. J. : Probit Analysis, Cambridge
University Press, Second edition, Cambridge,
(1952) P. 318
- 13) 坂崎利一 : 日本獣医師会雑誌 10 499 (昭 32)
- 14) McNaught, W. and Roberts, G. B. S. ; J.
Path. Bact., 76 155 (1958)
- 15) 須知 仁 : 日伝会誌 33 661 (昭 34)