

野兎から分離した *Salmonella enteritidis* の

1 株について

長崎大学風土病研究所病理部 (主任 : 登倉登教授)

井 上 千 代 子
いの うえ ち よ こ

A Strain of *Salmonella enteritidis* Isolated from a Hare. Chiyoko Inoué. Pathological Department (Director : Prof. N. TOKURA), Research Institute of Endemics, Nagasaki University.

本編の概要については、1960年11月20日 (長崎)、日本細菌学会第13回九州支部総会に於いて口演発表した。

本県愛野村附近に野兎病が存在するらしいということを知ったので、本年1月中旬から3月初旬までの間、国見町と瑞穂村において猟銃で捕獲した野兎8羽について病原菌を検索し、現在迄野兎病菌 = *Pasturella tularensis* の検出に至っていないが、たまたま、*Salmonella enteritidis* の1例に遭遇した。*Salmonella* をウサギから検出したという報告は珍しくないが、*enteritidis* をウサギから検出したという報告は案外少ないので (後述)、分離菌の二三の性状を記して、追加報告する次第である。

実験方法並びに成績

1) 材料採取 : 南高来郡国見町において本年1月14日午後6時に猟銃によって獲捕し、同16日に処理した茶褐色の雌兎で、外見は胸部に銃弾を受けた外に異常なく、内臓は表面平滑で断面にも異常を認めず、肺臓に銃弾による凝血を認めたに過ぎないが、臓側腹膜表面に軽く結合して散在する長径6~7mmの楕円形の多数の水胞があり、その内容は約1mm直径の淡黄色の顆粒 (膿塊) 1個をつつむ漿液であった。

2) 菌検索 : 野兎の死体から、心臓、肺臓、肝臓、脾臓及び前述した水胞を無菌的に採取して、各々生理食塩水の乳剤として、各乳剤0.5ccをマウス2匹宛の腹腔内に注射して経過を観察した。水胞乳剤を接種したマウスは、運動不活潑となり、9日目に殆ど無力状態となったので、その心血0.5cc宛健康マウス2匹に接種すると同時に、大原 & 佐藤 (1955) の豚肝ヘモグロビン培地に37°Cに培養して翌日集落の発生を見

た。第2代目血液接種マウスは2匹共に7日目には殆ど虫の息の状態に衰弱し、その心血を普通寒天斜面に培養して同様の菌株を得たので、それを国見株として検査に供した。野兎の他の臓器の乳剤を注射したマウスは、何等の異常も呈せず、30日後心血を培養して生

表 1. 分離菌の生物学的性状

Gram	-	lactose	-
運動性	+	sucrose	-
硝酸塩還元	+	adonitol	-
Simmons 培地	+	inositol	-
KCN 試験	-	salicin	-
M - R反応	+	glucose	+
V - P反応	-	maltose	+
H ₂ S 産生	+	mannitol	+
indole 産生	-	dulcitol	+
gelatin 液化	-	sorbitol	+
urea 分解	-	arabinose	+
牛乳凝固	-	rhamnose	+
d-酒石酸分解	-	xylose	+
		trehalose	+

菌の発育を認めなかった。なお、他の野兎7匹についても同様の検索を行なったが、如何なる細菌も分離されなかった。

3) 分離菌の一般生物学的性状(表1) : 分離菌は, gram陰性, 芽胞及び莢膜を形成せず, 運動活潑な小桿菌であって, 普通寒天培地に完全円形, 灰色半透明, 湿潤円滑な集落を作って良好に発育し, 表1に示すような一般生物学的性状によって *Salmonella* 属であると推定され, 就中, 運動性(+), 硫化水素産生(+), 枸橼酸ソーダ利用(+), によって, *Shigella* 属とは区別された。

4) 分離菌の血清学的性状 : 北里研究所の *Salmonella* 因子血清によってD群と思われたので, 長崎大学細菌学教室保存の *Salmonella* 属D群の標準株と凝集素交叉吸収試験を行ない, それによる血清学的同定を試みた。

抗血清 : 初回免疫には各菌の 100°C/30分加熱死菌 0.5mg, 次回より37°C/20時間ブイオン培養液を 0.6%ホルマリン生理食塩水で2倍稀釈した菌液を3日間隔を以って漸次増量 (0.5~3.0ccm) しつつ家兎の耳静脈内に数回接種して, 適時心血を採取し, 非働性血清として試験に供した。

O抗原 : 普通寒天37°C/20時間培養後 100°C°/1時間加熱した死菌を用いた。

H抗原 : 1%寒天培地に37°C/20時間培養の生菌を用いた。

吸収法 : 5倍稀釈抗血清に各吸収抗原をどろどろに加わえ, 37°C/2時間保った後氷室に置いて翌朝血清を遠心分離した。

凝集反応 : 37°Cに2時間保った後, 翌朝まで室温に放置し, 肉眼を以って凝集を認め得る血清の最終稀釈倍数をもって凝集価を表わした。

吸収試験成績(表2)(表3) : 国見株免疫血清は, 1 : 20480のH凝集価と1 : 5120のO凝集価を有し, *enteritidis*, *dublin*, *rostock*, *berta* 株に対しても略々同様の価を示したが, それを *enteritidis* のO抗原で吸収すると, 各株に対するO凝集価は消失した。そのH血清を *dublin* 株のH抗原で吸収したが, 吸収不充分のためか, なお *dublin* に対するH凝集素が残存したので, 更に *berta* 株のH抗原で吸収すると, *dublin*, *rostock*, *berta* に対するH抗体は完全に消失したのに, 国見株及び *enteritidis* に対するH抗体は1 : 1280倍まで残っており, *dublin*, *rostock*, *berta* 株に欠如するH抗原が分離株と *enteritidis* 株に存在することが知られ, それは抗原構造表から見てm因子に他ならないと考えられた。m因子を持つ菌型には *enteritidis* の他に *blegdam* (g, m, q) と *pensacola* (g, m, t) とがあるが, 最後に *enteritidis* 生菌によって吸収して国見株のH抗体も完全に消失し, また, *enteritidis* 免疫血清が国見株によって

O抗体, H抗体共に完全に吸収される結果を得たので(表3), 本菌は *Salmonella enteritidis* と同定された。

表 2. 抗国見株血清による吸収試験

抗血清	未吸収	吸 収			
		1 ent 死菌 1, 9, 12	2 dub 生菌 g, p	3 bert 生菌 f, g, t	4 ent 生菌 g, m
国見株	H 20480	10240	1280	1280	0
	O 5120	0			
<i>enteritidis</i> 1, 9, 12 : g, m	H 20480	5120	1280	1280	0
	O 5120	0			
<i>dublin</i> 1, 9, 12 : g, p	H 20480	10240	20	0	
	O 5120	0			
<i>rostock</i> 1, 9, 12 : g, p, u	H 20480	10240	20	0	
	O 5120	0			
<i>berta</i> 9, 12 : f, g, t	H 10240	10240	20	0	
	O 2560	0			

表 3. 抗 *enteritidis* 血清による吸収試験

抗血清	未吸収	吸 収	
		1 国見株死菌	2 国見株生菌
国見株	H 20480	10240	0
	O 2560	0	
<i>ent.</i>	H 20480	10240	0
	O 2560	0	

5) マウスに対する分離菌の毒力(表4) : 普通寒天37°C/20時間培養菌苔を以て生理食塩水1.0ccmに10⁻²mg乃至10⁻⁷mgの浮遊菌液を作り, その0.5ccm宛各群4匹, 6群のマウスの腹腔内に接種して, 2週間以内のマウスの斃死数からLD₅₀を測定し, 国

表4. 分離菌のマウスに対する毒力 (2週間観察の結果)

菌株	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	LD ₅₀
国見株	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○	10 ^{-5.5}
<i>ent.</i>	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○	○○○○	10 ^{-4.6}
<i>bert.</i>	●●●●	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	10 ^{-2.3}

見株 ($10^{-5.5}$) は *enteritidis* 標準株 ($10^{-4.5}$) より稍々強毒であるという成績が得られた。

6) 分離菌の家兎に対する毒性 (表5) : 国見株 0.5乃至2.0mgを静脈内及び腹腔内に接種した家兎は、全例4匹共に3日目乃至4日目に口及び鼻から出血して斃死し、その心血を直接に寒天斜面に培養して抗血清と凝集する生菌の発育を認めた。分離菌2.0乃至4.0mgを家兎の皮下の極く浅い部分に接種し、その後3, 5, 9, 14, 21日に心血を採取して、その1.0ccmを普通

表5. 分離菌の家兎に対する毒性

(1) 静脈内及び腹腔内接種

菌 株	菌 量	静 脈 内	腹 腔 内	血中菌
国見株	2.0mg	3日目斃死	4日目斃死	+
	0.5 "	"	"	+

(2) 皮 下 接 種

菌 株	家 兎	菌 量	発 硬	赤 結	潰 瘍 形 成	血中菌	凝集価
国見株	No. 5	2mg	+	+	-	-	10240
	No. 6	4	+	+	+	9	10240
	No. 11	3	+	+	-	-	10240
ent.	No. 10	3	+	+	+	9	20480
berta	No. 13	3	+	+	-	-	5120
	No. 14	3	+	+	-	-	10240

備考：血中菌+の下の数字は菌接種後の日数を示す

ブイオンに37°C/24時間培養後寒天斜面に移植して生菌の発育の有無を検査し、同時に採取血清の凝集価を測定した。この皮下接種家兎群では斃死例はなかったが、国見株及び *enteritidis* 菌注射局所に発赤、硬結、壊死が現われ、続いて直径約3×4cmの深い湿潤した潰瘍を形成し、食慾減退、運動緩慢を示した。berta菌による家兎の潰瘍は、大きさは殆ど前者と同様であったが、潰瘍面が浅く乾燥していて、全身状態も稍々軽症であった。国見株及び *enteritidis* の皮下接種の家兎4例の中、No. 6及びNo. 10において9日目の採血時に只1回だけ血中に菌が検出されたが、それは局所

の壊死組織の脱落直後の時期であった。血清凝集価は接種後2週間に最高1:10240を示した。

考 察 と 結 語

長崎市及びその附近の動物における *Salmonella* の分布に就いては、長崎大学細菌学教室の林・吉村・森川(1950)、中村(1953)、吉村(1955)等による調査報告があるが、それによると、家鼠591件より29株、家鶏236件より6株、家鴨230件より1株、野犬200件より4株が分離されている。その中、*enteritidis* は家鼠と野犬からの検出16株40%という最高を占め、*typhimurium* が家鼠、家鶏、家鴨より10株25%が分離されて第二位に立っている。坂崎等(1959)は、1949年より1957年の8年間にわたって、動物腸内細菌委員会で日本各地方における動物のサルモネラ分布調査をした成績を総括して報告しているが、それによっても、動物より分離された2314株の中、*enteritidis* は466例20.1%で、*gallinarum-pullorum* の528例22.3%に次いで第二位を占めている。しかし、*gallinarum-pullorum* の99.6%が鶏と卵から分離されたもので、他の動物から分離された例は非常に少ないのに反して、*enteritidis* は非常に広い範囲に分布している事が知られ、本菌が我国における人の *Salmonella* 症に重要な役を演じているのは当然であると考えられる。EDWARDS, BRUNER & MORAN (1948) は1934年から1947年の13年間に米国各地で蒐集された11961株の *Salmonella* の人及び動物に於ける分布の調査を総括したが、それによると、*typhimurium* が3187株で特に多く、*enteritidis* は187例で第18位を占めており、日本に於ける *Salmonella* 分布との地理的な差異が認められる。しかし、ウサギから *Salmonella* を検出した例の報告は非常に少なく、本邦においては、坂崎(1959)によると、*thompson* 1株、*aberdeen* 1株(上田1949)、*oranienburg* 1株(坂崎・山田1951)の3例の分離が記載されているだけである。外国においては、MORGAN (1905) がウサギの糞便から *paratyphoid A* 様の細菌を3株得ており、FERRY (1914) が *B. bronchisepticus* 感染ウサギの二次感染菌として“*paratyphoid B. enteritidis* group”の細菌を認め、KRUMWIEDE, VALENTINE & KOHN (1919) が *Aertrycke* type の1株を分離し、LITSCH & MEYER (1921) は4匹のウサギの死体から *paratyphoid B* を検出した事を報告している。JORDAN (1925) は“*hemorrhagic septicemia*”の1菌株を皮下接種した後死んだ家兎の胆嚢から *enteritidis*

の1株を検出し、MAC CONKEY (1906)が料理したウサギから、BATES がウサギの脾臓から、それぞれ Aertrycke type を検出した事を記している。なほ、比較的近年に至って、BRONSTEIN, SAPHRA & STRAUSS (1941), EDWARDS & BRUNER (1943), EDWARDS, BRUNER & MORAN (1948) 等によっても Aertrycke type がウサギから検出された例が報告されている。Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (1948/57)によれば、原著は不明であるが、*muenchen, morbificans, gallinarum - pullorum* がウサギから分離されている事が記されているだけである。このように *Salmonella* をウサギから検出したという報告は少ないわけではないが、*enteritidis* の分離は JORDAN (1925) の1例を見るだけであるし、文献を詳細に調査すれば

他にもあるかも知れないが、それにしても極めて稀であろうと思われる。

著者は、野兎病菌検索中、野兎1頭の臓側腹膜に散在していた水胞を乳剤として腹腔内に接種したマウスの心血から *Salmonella enteritidis* の1株を分離した。野兎から直接に培養したのではないが、実験前後に飼育マウスが病死した例はなく、それが偶然に接種実験に供したマウスに潜在していたとは考えられないので、本株は野兎に寄生して存在していたと断定した。文献上、*Salmonella enteritidis* がウサギから分離されたという報告は稀有に属すると思われるので、検査の不備を顧みず、貴重な1例として報告した。

御懇篤な御指導並びに御校閲を賜わった登介教授並びに御援助を頂いた林講師に対して深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Bornstein, S., Saphra, I. & Strauss, L. : Frequency of Occurrence of *Salmonella* Species. J. Inf. Dis., 69 : 59-64, 1941.
- 2) Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Hitchens, A. P. : Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed., Baltimore, 1948, and 7th ed., Baltimore, 1957.
- 3) Edwards, P. R. & Bruner, D. W. : The Occurrence and Distribution of *Salmonella* Type in the United States. J. Inf. Dis., 72 : 58-67, 1943.
- 4) Edwards, P. R., Bruner, D. W. & Moran, A. B. : Further Studies on the Occurrence and Distribution of *Salmonella* Type in the United States. J. Inf. Dis., 83 : 220-231, 1948.
- 5) 林薫, 吉村重澄 & 森川利美 : 長崎市内に於ける家鼠のサルモネラ保有状況。長崎医学会雑誌, 25 (5.6) 234-240, 1950.
- 6) Jordan, E. O. : The Differentiation of the Paratyphoid Enteritidis Group. J. Inf. Dis., 36 : 309-329, 1925.
- 7) 小島三郎 & 滝田順吾 : 腸内細菌。初版, 医学書院, 東京・大阪, 1956.
- 8) Litch, V. M. & Meyer, K. F. : A Spontaneous Epidemic among Laboratory Rabbits caused a Paratyphoid B. Bacillus related to the Rodent Group. J. Inf. Dis., 28 : 27-42, 1921.
- 9) 中村俊之 : 長崎市及びその附近に於ける *Salmonella* の生態。長崎医学会雑誌, 28 (1) : 32-52, 1953.
- 10) 大原省一郎 & 佐藤信 : 豚肝ヘモグロビン培地による野兎病菌培養。福島医学会誌, 5 : 533-535, 1955.
- 11) 坂崎利一 & 波岡茂郎 : 腸内細菌検索法。初版, 納谷書店, 東京, 1956.
- 12) Sakazaki, R., Namioka, S. & Watanabe, S. : The Occurrence and Distribution of *Salmonella* and *Arizona* in Japan. J. Exp. Med., 29 (1) 15-35, 1959.
- 13) 吉村重澄 : 昭和27年度長崎市内で得た人, 犬, 鼠系 *Salmonella* 菌型。長崎医学会雑誌, 30 (8) : 1039-1043, 1955.

Summary

A strain of *Salmonella enteritidis* was isolated from a female hare gotten by a hunting gun in the mountainous area near to Kunimi village, Nagasaki Prefecture, in mid-January of

this year. As far as in a macroscopical observation, there was no pathological change in the internal organs, exclusive of gunshot wounds in the lungs. However, it was a peculiar finding that there were a good many vesicles, ellipsoidal 6 to 7 mm in length, containing each one pustulous coagulum all over the visceral peritoneum. The strain was obtained from these vesicles. Morphological, biological and serological properties of this strain were typical for *Salmonella enteritidis*. All O and H agglutinins in the antiserum from rabbits immunized with a standard strain of *Salmonella enteritidis* were absorbed by this strain, and vice versa. The LD 50 for mice of the strain was $10^{-5.5}$ in fatality inside of two weeks after an intraperitoneal inoculation therewith, and the organisms were every time recultivated from the blood of these dead animals. The virulence for rabbits of the strain intravenously or intraperitoneally inoculated in doses of 0.5 to 2.0 mg was fatal; all animals fell dead with nasal and buccal hemorrhage after 3 to 4 days. On the other hand, in case of an intracutaneous inoculation, there was no fatality of the animals, but formation of a marked ulcerative lesion, 3 x 4 cm in extent, was observed in that locality.

Since the report on isolating *Salmonella enteritidis* from rabbits is very rare, though it concerning other types belonging to the same genus is not uncommon, the authoress only wished to contribute one of rare cases to the *Salmonella* survey in animals.

TOKURA, N.

Received for publication November 14, 1960