

# 15 Dimethylsulfoxide 還元試験による腸内細菌の鑑別について

Diagnostic Use of Dimethylsulfoxide Reduction Test within Enterobacteriaceae

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)  
 技師 熊谷 満  
 技師 安藤 芳明  
 技師 唐島 隆  
 技師 飯田 広夫

## I 緒言

多くの細菌は Reductase 系の酵素をもっており、これを細菌の属、あるいは群の分類に応用しようとする研究もおこなわれてきた。例えば硝酸塩還元や Trimethylamine Oxide 還元による腸内細菌の分類等がそれである。

われわれは広く有機の Oxide の還元系を種々の細菌について追究し、簡単にこれを判別し得る方法を確立しようとして研究しているが、今回は Dimethylsulfoxide を基質とする Reductase について、種々の細菌、殊に腸内細菌について追究し、新知見を得たのでここに報告する。

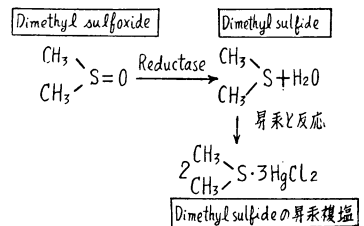
## II 実験材料及び方法

本実験に使用した Dimethylsulfoxide は当研究所において合成したものである。

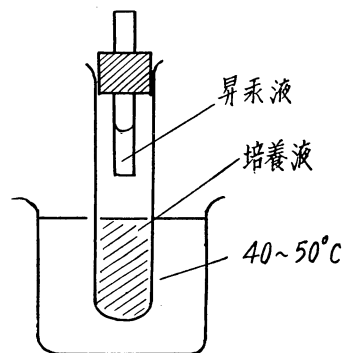
Dimethylsulfoxide の還元は第 1 図の如くおこなわれる。もともと Dimethylsulfoxide は不揮発性でしかも安定なものであるが、これが還元されてできる Dimethylsulfide は揮発性のものである。この Dimethylsulfide は昇汞と反応させると不溶性の白色沈澱、すなわち Dimethylsulfide の昇汞複塩ができる。

そこで、今回の Dimethylsulfoxide Reductase 系の追究は、Dimethylsulfoxide (以下 DMSO と略す) を含む培地に被検菌を培養し、培養液中に揮発性の Dimethylsulfide (以下 DMS と略す) が生じているかどうかを昇汞と反応させることにより定性的に証明する方法でおこなった。その装置は第 2 図の如くで、ゴム栓にガラス管を挿入し試験管内に入るガラス管部に昇汞の飽和溶液をつけて、これを培養液のはいつている試験管口に栓し 40~50°C の温浴槽中に試験管を浸す。もし DMS が生じておる場合にはガラス管の昇汞溶液附着部分に白色の沈澱物がで

第 1 図 Dimethyl sulfoxide の還元



第 2 図 検査装置



きるが、DMS が生じていなければガラス管には白い沈澱物の形成が見られない。前者を DMS-test 陽性とし、後者を陰性とした。

つぎに今回の試験に使用した DMSO を基質とする培地の組成は第 1 表の如くである。この培地に被検菌を培養して一定時間後に DMS 産生の有無を観察するのであるが、接種菌量及び培養の時間については更に種々検討しており、今回はすべて 37°C 20 時間培養後の培養液についておこなつた成績である。なお Reductase 系の酵素作用の強い菌では培養数時間で強く陽性反応を示すことをみとめた。

第 1 表 培 地 の 組 成

Dimethylsulfoxide	1.0gr	Glucose	2.5gr
Peptone	10.0gr	NaCl	1.0gr
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0gr	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0gr
Aqdis.	1,000.0ml	pH	7.2

### Ⅲ 実 験 成 績

色々な細菌が Reductase 系の酵素をもっていることは知られているが、DMSO-Reductase についての報告はない。われわれはまず一般の好気性菌の中から球菌、桿菌及び芽胞形成菌を選びこの酵素系の有無をしらべた。成績は第 2 表に示す如くで、*Staphylococcus aureus* 及び *Streptococcus faecalis* のような球菌と、*Bac. subtilis*, *Bac. megaterium* 及び *Bac. mesentericus* のような芽胞形成菌では DMS-test 陰性であつたが、*Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* 及び *Aerobacter aerogenes* 等の Gram 陰性桿菌及びこれに類似の菌株では DMS-test 陽性を示した。

第 2 表 好気性菌培養 (30°C 培養)

Species	Growth	Reaction	Species	Growth	Reaction
<i>B. subtilis</i>	+++	-	<i>Staph. aureus</i>	+++	-
<i>B. megaterium</i>	+	-	<i>Strept. faecalis</i>	+++	-
<i>B. mesentericus</i>	+	-	<i>Pseud. fluorescens</i>	++	+
<i>Serratia marcescens</i>	+++	+	<i>Aerobact. aerogenes</i>	+++	+

それをつぎに腸内細菌の各群についてこの定性試験をおこなつてみた。

まず *Salmonella* group の菌株については、第 3 表に示すように、当研究所保存の標準株のなかから各 O-group それぞれ 1~2 株を選び試験をおこなつてみたが、*S. paratyphi B* 8006 株のみ

第 3 表 *Salmonella* group

Test Strains	Reaction	Test Strains	Reaction
<i>S. paratyphi A</i> 1015	-	<i>S. newport</i>	-
<i>S. paratyphi B</i> 8006	+	<i>S. enteritidis</i>	-
<i>S. typhimurium</i> 1406	-	<i>S. newington C</i> <sub>2</sub>	-
<i>S. paratyphi C</i>	-	<i>S. typhi H</i> 901 W	-
<i>S. cholerae-suis</i> 1348	-	<i>S. typhi O</i> 901 W	-
<i>S. thompson</i> 8	-	<i>S. typhi</i> 分離株	-

が陽性を示し、その他の供試菌株はことごとく陰性であつた。なお最近の集団発生例及び散発例から分離された *S. typhi* についてもすべて陰性であつた。

つぎに *Shigella* group の菌株については、当研究所保存の各 Subgroup の標準株ならびに分離株、すなわち *Sh. dysent.* 1~7 の標準株 7 株と *Sh. dysent.* 1 の分離株 4 株、*Sh. flex.* の標準株 13 株と各 Subtype の分離株 40 株、*Sh. boyd.* の標準株 7 株、*Sh. sonn.* I 及び II 相の標準株と分離株 12 株について試験をおこない第 4 表のような成績を得た。すなわちどの Subgroup の標準株も DMSO を還元しなかつたし、それぞれの Subgroup に属する分離株についても、血清学的ならびに生物学的に *Shigella* group の性状をそなえている菌株では DMS-Test はすべて陰性であつた。これに反して血清学的に *Shigella* group の診断用血清に凝集する菌株——すなわち *Sh. dysent.* 1 及び 3 型の血清に凝集する菌株や、*Sh. flex.* の混合血清とのみ、あるいは群 4, 6, 7 のすべてに、また型 I, II, III のすべての血清に凝集する菌株で、しかも生物学的には *Shigella* と異なる性状をもっている菌株——すなわち *Shigella* と共通抗原を持つ *Escherichia coli* と考えられる菌株ではこの試験はすべて陽性であつた。

第 4 表 *Shigella* group

Strains	Number of Strains	Reaction	Strains	Number of Strains	Reaction
<i>Sh. dysent.</i> (標準株)	7	—	<i>Sh. boyd.</i> (標準株)	7	—
<i>Sh. dysent.</i> 1 (分離株)	4	—	<i>Sh. sonn.</i> (標準株)	2	—
<i>Sh. flex.</i> (標準株)	13	—	<i>Sh. sonn.</i> (分離株)	12	—
<i>Sh. flex.</i> (分離株)	40	—	Sh. と共通抗原を有する <i>E. coli</i> の分離株	20	+

ついで *Escherichia* group の菌株についてこの反応をおこなつてみた。使用菌株は、予研より分与された Standard Strain O-group 1~25, Test Strain の O-group の中から 30 株、病原性大腸菌の 3 株及びわれわれが分離した *Escherichia coli* O-55 の 3 株、その他非公認の病原性大腸菌 30 株及び糞便由来の 60 株で、生物学的に *E. coli* と決定した菌株である。その成績は第 5 表に示すように、供試菌株はすべて DMS-Test 陽性であり、その反応も非常に強かつた。

第 5 表 *Escherichia* group

Strains	No. of Strains	Reaction	Strains	No. of Strains	Reaction
Standard strains (O-1~O-25)	25	+	Isolated strains		
Test strains			Pathogenic <i>E. coli</i> (O-55)	3	+
Pathogenic <i>E. coli</i> (O-55, 26, 111)	3	+	Other pathogenic <i>E. coli</i>	30	+
Other test strains	30	+	Other faecal <i>E. coli</i>	60	+
			<i>E. freundii</i> (Bethesda)	20	+

なお集団検索によつて分離された *Esch. freundii* (Bethesda) の 20 株も非常に強い反応を示した。その他供試菌株数が少ないが、*Cloaca* 及び *Aerobacter aerogenes*, すなわち *Klebsiella* に属する菌株も陽性であつた。

つぎに *Proteus group* の菌株については、1956年のカニによる食中毒に際してカニ及び患者糞便より分離した菌株及び日常の検査に際して分離された菌株で、一般的な生物学的性状の検査と尿素（液体尿素培地を使用）の分解性及び PPA (Phenylpyruvic acid) 反応（北研変法）の両反応から *Proteus group* と考えられる 76 菌株についてこの DMS-Test をおこなつた。その成績は第 6 表の如くで、陽性菌株と陰性菌株とに分れることを知り得た。そこでこれが Species による差異か否かを知るため Mannitol, Maltose 及び Xylose の分解能を調べて見ると、表のように *Morganella* に属する菌株がすべて陰性で、その他の Species に属する菌株は陽性を示すという興味ある成績が得られた。

第 6 表 *Proteus group*

	No. of Strains	尿 素	PPA	マニット	マルス	キローシ	DMS Reductase
Prot. vulg.	10	+	+	-	+	+	+
Prot. mirab	14	+	+	-	-	+	+
Morganella	27	+	+	-	-	-	-
Rettgerella	16	+	+	+	-	-	+
不 明	9	+	+	+	+	+	+

#### IV 考 按

腸内細菌の各 group について DMS-反応を試みた結果から、上述の通り陽性を示すものと陰性を示すものとの両者のあることが知られた。すなわち *Salmonella group* では *S. paratyphi B* 8006 株を除くすべての供試株が陰性を示し、*Shigella group* ではすべての供試株が陰性であつた。これに反して *Escherichia group* の全供試株は強い陽性を示し、*Cloaca* 及び *Klebsiella* に属する菌株も例数は少いがすべて陽性を示した。*Proteus group* では Species によつて差が見られ、*Morganella* に属する菌株のみが陰性、他はすべて陽性であつた。

以上の結果から考えると、腸内細菌の中でも病原性の強い *Salmonella* 及び *Shigella group* の菌株が DMSO-Reductase をもっていないのに対して、病原性の弱い *Escherichia group* の諸菌は本酵素をもっており、また *Proteus group* の中でも病原性についてしばしば問題となる *Morganella* に属する菌株のみがこの酵素をもっていないということは、細菌の代謝と病原性という立場から見て極めて興味ある問題と思われる。

つぎに腸内細菌は種属を同じくする一つの集団からなり、生物学的にも血清学的にも非常に類縁関係が多いが、なかでも *Shigella* と *Escherichia* のうち group の間の抗原関係は、全く同一のものから近似しているものまで様々である<sup>1)</sup>。このことがわれわれの日常の検査においてしばしばその判定を誤らしめる原因となる。すなわち確認培養の性状が *Shigella* に近似せる *Escherichia* で、しかも *Shigella* の診断用血清にある程度の凝集を示すという場合がしばしばある。例えば *Sh. dysent. type 1* 或は 3 の血清に凝集する *E. coli* O-1 とか O-124 の場合等がこれである。このような場合 Mannitol の分解性等を詳細に検討することにより一応の鑑別はできるし、また *Sh. flex.* の抗血清に *E. coli* O-13 とか O-19 等が凝集してくることがあるが、これらもすべて精密な検査により鑑別はできるのであるが、第一線で検査をおこなう場合には種々の制約からここまで検査を実施し得な

いことの方がむしろ多いと考えられる。現在 *Shigella* と *Escherichia* の鑑別のためには Christensen のクエン酸ソーダ培地が用いられているが<sup>2)</sup>、われわれのこの DMS-test によつても両者の鑑別が可能であり、実際にわれわれは *Shigella* の診断用血清に凝集する *E. coli* についてこの定性試験をおこない、これまでのところではすべて陽性であることを確認している。

以上現在までに得た成績を報告したが、さらに本反応の条件、その他について詳細に検討中である。

## V 結 論

- 1) 細菌の Reductase, 特に DMSO を基質とする Reductase の存在を証明する簡易な一方法を考案し、この方法を用いて一般の細菌, 特に腸内細菌の DMSO-Reductase 分布を追究した。
- 2) 好気性菌の中では, 球菌及び芽胞形成菌は DMSO-Reductase をもっていない。
- 3) 腸内細菌の中では, *Salmonella* 及び *Shigella* group の病原性腸内細菌はこの Reductase をもっていないが, *Escherichia*, *Cloaca* 及び *Klebsiella* group の菌株はこの Reductase をもっている。
- 4) *Proteus* group の中では, *Morganella* に属する菌株のみがこの Reductase をもっていないが, その他の Species に属する菌株はこの Reductase をもっている。
- 5) *Shigella* group とこれに抗原的な関連性を有する *Escherichia coli* との鑑別にこの反応が役立つことを指摘した。

擧筆するに当り, 御校閲をいただいた中村所長に深く謝意を表する。

## 文 献

- 1) F. Kauffmann, "Enterobacteriaceae", 2. Edition (Ejaer Munksgaard Publisher, Copenhagen) (1954)
- 2) 坂崎利一, 波岡茂郎共著, "腸内細菌検索法" (納谷書店) (1956)