

Klebsiella感染症の疫学的研究-1-KlebsiellaのO抗原群別について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8848

Klebsiella 感染症の疫学的研究

[I] Klebsiella の O 抗原群別について

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

金沢大学医学部附属病院検査部 (部長: 松原藤継教授)

藤 田 信 一

(昭和55年7月19日受付)

Klebsiella 感染症の疫学的研究は、これまで生物学的性状試験、薬剤感受性試験、フェージ型別、莢膜抗原による血清型別などにより行なわれてきた^{1)~6)}。このなかで、生物学的性状の違いから Klebsiella を 6~7 種類の菌種ないし生物型に分類する試みは主に呼吸器由来株について実施されているが、その大部分は Klebsiella aerogenes である⁷⁾。最近、Rennie ら⁸⁾は本菌のフェージ型別について検討し、臨床由来株のせいぜい 70% しか型別できなかつたことからフェージ型別のみで本菌の疫学を論じることは困難であろうと述べている。

Klebsiella の血清型別に関しては、本菌が莢膜を有する無鞭毛菌であることから、その血清型別は莢膜抗原 (K 抗原) と菌体抗原 (O 抗原) の 2 種類に限られる。とくに、K 抗原型別は現在、K 抗原が 81 種類に達していること⁹⁾や、型別方法もすでに確立していることから Klebsiella の疫学的研究に最も広く利用されている^{4)~6)}。しかし、一般に K 抗原の決定は容易でなく、現在でも特定の研究施設で行なわれているにすぎない⁹⁾¹⁰⁾。

一方、O 抗原については Kauffmann¹¹⁾ や Ørskov¹²⁾ の報告がみられるものの、その群別方法が明確に確立されたわけではない。そこで、今回は Klebsiella の O 抗原群別の可能性を検討したうえで、各種の臨床材料から分離された Klebsiella を対象に O 抗原群別を試みたのでその結果を報告する。さらに、O 抗原群別が Klebsiella 感染症の疫学的研究に有用であるか否かについて若干の検討を加えた。

材料および方法

I. 材料

対象とした Klebsiella は 1976 年 8 月より 1977 年 3 月までの間に当科に入院した患者の咽頭培養、便培養および血液培養から分離された 575 株と、当院検査部細菌検査室で分離された 203 株、さらに順天堂大学医学部臨床病理学教室から分与された 122 株である。なお、尿中分離株では 10^4 /ml 以上の菌数で分離され、咽頭粘液、喀痰、便、膿および浸出液では分離平板上で多数を占める菌株を対象とした。

II. 方法

1. Klebsiella の分離と同定

Klebsiella の分離にはドリガルスキー改良培地 (BTB 培地、栄研) を使用した。同定検査には Kligler 確認培地 (栄研)、サッカローゼ・マンニット培地 (栄研)、SIM 培地 (栄研)、VP 半流動培地 (栄研)、Simmons のクエン酸塩培地 (栄研) の各生物学的性状試験用培地を使用し、Decarboxylase Base Møller (Difco) を基礎培地としてリジンとオルニチンの脱炭酸試験を行なった。なお、同定は Cowan & Steel の成書¹³⁾を参考に属のレベルにとどめた。

2. 無莢膜変異株の分離

無莢膜変異株 (decapsulated strain, DC 株と略) の分離は Ørskov の方法¹²⁾で行なわれた。すなわち、DC 株を得ようとする親株 (parent strain, P 株と略) を heart infusion (HI) 寒天平板 (栄研) に孤立集落が得られるように塗抹し、37℃で 18 時間培養する。その

Epidemiological study on nosocomial Klebsiella infections. [I] Serological O-grouping of Klebsiella strains. Shinichi Fujita, Third Department of Internal Medicine, (Director: Prof. K. Hattori), Central Clinical Laboratory, (Director: Prof. F. Matsubara), School of Medicine, Kanazawa University.

後、集落の辺縁に扇状の切れ込みができるまで平板を室温に放置する。切れ込みが出現したらその部分を約菌し、BTB培地に塗抹する。これにより最初に分離したP株とそれにまざって小さいや透明な集落がみられる。今回は、このようにして得られた菌株にHissの莢膜染色を行なって莢膜の脱落を確認し、これをDC株として以下の実験に供した。

3. 抗血清の作製

抗血清は以下に述べる方法で作製された。まず、DC株をHI寒天平板1枚に塗抹し、37℃で18時間培養する。次に、菌を生理食塩液に浮遊させ100℃で2時間半加熱後、生理食塩液で3回洗浄する。洗浄後遠心(3,000rpm, 30分間)して上清を捨て、沈渣に2%ホルマリン加生理食塩液4mlと同量の2%クロムミョウバン水を加える。これを時々振りながら37℃のふ卵器に3日間おいてから滅菌生理食塩液で3回洗浄する。再び遠心して沈渣を4mlの滅菌生理食塩液に浮遊させる。このようにして得られた抗原液を5~6日間隔で1mlずつ2回家兎の耳静脈に注射し、最終注射日より10日目に試験採血して凝集素価をWidal法¹⁴⁾に準じて測定する。凝集素価が1,600倍以上なら全採血し、血清を分離して-80℃に保存する。当教室保存株で家兎を免疫する場合には血清希釈200倍でいずれの抗血清とも凝集しない菌株を選んで行なった。これにより8種類の抗血清を得た。なお、K抗原の場合と違ってO抗原にはまだ公式の標準株があるわけではないが、Ørskovは現在までに報告されているKlebsiellaのO抗原群を検討しTable 1に示した7種類8菌株に整理している。今回はØrskovの好意により分与していただいた8菌株を抗原として上記と同様の方法で家兎に免疫して抗血清を作製した。抗血清を使用する時にはこれを56℃で30分間非動化した。

4. 交差吸収試験

上述の免疫株が同一のO抗原群に属するか否かを定めることは容易でないが、今回は交差凝集試験と交差吸収試験を参考にして行なった。すなわち、交差凝集が認められても、交差吸収前後の凝集素価にほとんど変化がない場合にはこれらの菌株は別々のO抗原群に属すると判断した。交差吸収試験は以下の方法で行なった。まず、吸収原となる菌をHI寒天平板3枚に塗抹し、37℃で18時間培養する。培養後菌をかき取って生理食塩液約10mlに浮遊させ、100℃で1時間加熱してから遠心(3,000rpm, 30分間)する。次に、滅菌生理食塩液で3回洗浄後、沈渣に10倍希釈血清を加えて十分に混合し、50℃の恒温槽に2時間、ついで冷蔵庫に一晩おいてから遠心する。上清を分離し、これを10倍希釈吸収血清とした。吸収後も血清希釈200倍で交差凝集が認められる場合には吸収操作を繰り返した。

5. O抗原群の決定

O抗原群の決定は試験管内凝集反応により凝集素価を測定して行なった。抗原液はHI寒天平板に37℃で18時間培養したDC株を生理食塩液に浮遊させ、100℃で1時間加熱して遠心し、沈渣を生理食塩液に約1mg/mlの濃度に浮遊させて使用した。抗血清の免疫株に対する凝集素価は3,200~12,800倍であったことから、最初に血清希釈200倍と2,000倍で凝集の有無を観察してO抗原群のscreeningを行なった。次に、被検菌株で抗血清の凝集素価を測定し、免疫株で同時に測定した凝集素価の50%以上の値を示す場合に免疫株と同じO抗原群に属すると判断した。なお、交差凝集が認められる場合には必要に応じて吸収血清を使用した。また、O2群については菌株7380と5053が同一のO抗原群に属することを確認してから2つの亜群に分類を試みた。

Table 1. Eight strains of klebsiella offered by Dr. Ørskov

Klebsiella strain	O antigen	K antigen
204	1	—
7380	2a	—
5053	2a, 2b	—
390	3	11 (test strain)
Michigan 61	4	15 (//)
4425-51	5	57 (//)
264 [1]	7	67 (//)
708	12	80 (//)

6. スライド凝集反応

免疫株 16 株と試験管内凝集反応にて O 抗原群が明らかになった 50 株, さらに O 抗原群不明の 10 株を対象にスライド凝集反応を行なった。まず, 本反応に使用する抗血清の希釈倍数と抗原濃度を検討した。抗血清は滅菌生理食塩液で倍倍希釈して使用した。菌液は HI 寒天平板 1 枚の菌を生理食塩液に浮遊させ 100 °C で 1 時間加熱後遠心し, 沈渣を 0.5 ml の生理食塩液に浮遊させ, これを生理食塩液で倍倍希釈した。このようにして得られた抗血清と菌液をそれぞれ 10 μ l ずつスライドグラス上で混和して凝集反応を観察した。なお, 交差凝集が認められる抗血清については交差吸収試験を行なってから希釈した。抗血清を保存する場合には抗血清に石炭酸を 0.25 %, ヒト血清アルブミンを 0.05 % に添加してから, これを小型の滴びんに入れ 4 °C で保存した。

7. 薬剤感受性試験と生物学的性状試験

P 株 50 株とその DC 株について薬剤感受性試験と糖分解試験を行なった。薬剤感受性は日本化学療法学会標準法¹⁰⁾による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定で行なった。使用薬剤は ampicillin (ABPC),

sulbenicillin (SBPC), cefazolin (CEZ), tetracycline (TC), chloramphenicol (CP), kanamycin (KM), gentamicin (GM), colistin (CL) の 8 剤である。糖分解試験は OF basal medium (BBL) に炭水化物を 1 % に添加して行なった。炭水化物は adonitol, L-arabinose, dulcitol, D-glucose, inositol, inulin, lactose, maltose, mannitol, rhamnose, salicin, D-sorbitol, L-sorbose, D-xylose, sucrose の 15 種類を使用した。さらに, 各種の O 抗原群菌株 178 株を対象に上記の試験に加えてマロン酸利用性試験 (マロン酸塩培地, 日水) と尿素分解試験 (Urea agar base, BBL) を成書¹⁹⁾に従って行なった。

成 績

1. DC 株の分離状況

集落の辺縁の切れ込みはすべての P 株に観察された。また, この現象は大部分の菌株において約 1 週間以内に認められた。しかし, この切れ込み部分を塗抹して得られた非ムコイド型菌株の 58 株 (8.8 %) は数日の間にもとのムコイド型にもどるきわめて不安定な

Table 2. Cross-titration of antisera prepared against O antigens of Klebsiella

Strains	Sera	F 2 0 1	F 4 02 a	F 477 0 3	F 5 0 4	F 6 0 5	F 8 012	F 80 013	F 567 014	204 0 1	7380 02 a	5053 02a, 2b	390 0 3	Michi- gan 61 04	4425 51 05	264(1) 0 7	708 012
F 2	01	12800	800	-	-	-	-	-	-	6400	800	200	-	-	-	-	-
F 4	02 a	100	12800	-	-	-	-	-	-	200	6400	1600	-	-	-	-	-
F 477	03	-	-	3200	-	-	-	-	-	-	-	-	12800	-	-	400	-
F 5	04	-	-	-	12800	-	-	-	-	-	-	-	-	6400	-	-	-
F 6	05	-	-	-	-	12800	-	-	-	-	-	-	-	-	12800	-	-
F 8	012	-	-	-	-	-	6400	-	200	-	-	-	-	-	-	-	6400
F 80	013	-	-	-	-	-	-	6400	-	-	-	-	-	-	-	200	-
F 567	014	-	-	-	-	-	100	-	6400	-	-	-	-	-	-	-	400
204	01	6400	400	-	-	-	-	-	-	6400	800	-	-	-	-	-	-
7380	02 a	200	12800	-	-	-	-	-	-	400	6400	800	-	-	-	-	-
5053	02a, 2b	-	400	-	-	-	-	-	-	-	400	6400	-	-	-	-	-
390	03	-	-	3200	-	200	-	-	-	-	-	-	12800	-	-	1600	-
Michigan 61 04		-	-	-	3200	-	-	-	-	-	-	-	-	6400	-	-	-
4425-51	05	-	-	-	-	12800	-	-	-	-	-	-	-	-	12800	-	-
264(1)	07	-	-	1600	-	-	-	1600	-	-	-	-	3200	-	-	6400	-
708	012	-	-	-	-	-	6400	-	200	-	-	-	-	-	-	-	6400

Initial dilution of antisera was 1:100, and negative tests at this dilution are indicated by a minus sign.

菌株であった。

2. 交差凝集試験と交差吸収試験

教室保存株 (F 番号で表示) および Ørskov 博士から分与された菌株とそれぞれの抗血清との交差凝集反応を Table 2 に示した。この表と交差吸収試験の結果から F2 と 204, F4 と 7380, F477 と 390, F5 と Michigan 61, F6 と 4425 - 51, F8 と 708 はそれぞれ同一の O 抗原群に属することが判明した。一方, 交差

凝集反応が認められた 204, 7380, 5053 の各抗血清の間で行なった吸収試験では, 血清 204 を 7380 や 5053 の菌株で吸収しても, 逆に 7380 や 5053 の血清を 204 の菌株で吸収しても吸収後の凝集素価に変化は全くみられなかった (Table 3)。しかし, 7380 の血清を 5053 の菌株で吸収すると凝集素価は 6,400 倍から 100 倍以下に低下し, 5053 の血清を 7380 の菌株で吸収すると 6,400 倍から 1,600 倍に低下した。この成績から 7380

Table 3. Results of cross-absorption in O group 1 and 2

Sera Strains	204 01			7380 02a			5053 02a·2b		
	Not absorbed	absorbed by		Not absorbed	absorbed by		Not absorbed	absorbed by	
		7380	5053		204	5053		204	7380
204 01	6400	6400	6400	400	—	400	200	—	100
7380 02a	200	—	—	6400	6400	—	1600	1600	—
5053 02a, 2b	—	—	—	800	800	—	6400	6400	1600

Initial dilution of antisera was 1:100, and negative tests at this dilution are indicated by a minus sign.

Table 4. O-antigen distributions of Klebsiella isolates from clinical materials

Materials	O-antigens										Nnt decided		Total of strains
	01	02a	02a·2b	03	04	05	07	012	013	014	R form	Others	
Feces	49 (22.2)	29 (13.1)	2 (0.9)	45 (20.4)	17 (7.7)	33 (14.9)	0	10 (4.5)	2 (0.9)	4 (1.8)	7 (3.2)	23 (10.4)	221
Sputum and oropharyngeal swabs	89 (33.0)	48 (17.8)	2 (10.7)	45 (16.7)	14 (5.2)	20 (7.4)	0	8 (3.0)	2 (0.7)	10 (3.7)	3 (1.1)	29 (10.7)	270
Urine	17 (21.5)	11 (13.9)	0	22 (27.8)	5 (6.3)	11 (13.9)	0	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	4 (5.1)	6 (7.6)	79
Pus and exudate	13 (48.1)	5 (18.5)	0	2 (7.4)	2 (7.4)	3 (11.1)	0	0	2 (7.4)	0	0	0	27
Blood	8 (44.4)	2 (11.1)	0	4 (22.2)	1 (5.6)	2 (11.1)	0	0	0	0	0	1 (5.6)	18
Bile	7 (38.9)	3 (16.7)	0	3 (16.7)	1 (5.6)	0	0	0	0	1 (5.6)	0	3 (16.7)	18
Liquor	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0	1
Others	4 (19.0)	5 (23.8)	0	6 (28.6)	1 (4.8)	1 (4.8)	0	0	0	0	1 (4.8)	3 (14.3)	21
Total	187 (28.5)	103 (15.7)	4 (0.6)	127 (19.4)	42 (6.4)	70 (10.7)	0	19 (2.9)	7 (1.1)	16 (2.4)	15 (2.3)	65 (9.9)	655

* Number of strains. Parentheses indicate the percentage.

と 5053 は同一の O 抗原群に属していることが支持された。次に、390 と 264〔1〕の抗血清について行なった吸収試験により吸収後の凝集素価はいずれも 1/2 ~ 1/4 低下した。このことから 390 と 264〔1〕の O 抗原には共通部分が少なくないと推定された。この場合それぞれの O 抗原群は異なることも考えられるが、今回は Ørskov の見解に従ってこれらの O 抗原群を区別して記載した。同様に、F80 の抗血清と他の抗血清との間で行なった交差吸収試験では吸収後のいずれの抗血清にも凝集素価の低下は全くみられなかった。F567 の抗血清についても同様の結果であった。以上より、Ørskov 博士から分与された 8 菌株に対する抗血清と F80、F567 の計 10 種類の抗血清を用いてすでに述べた方法で O 抗原群別を行なった。

3. Klebsiella の O 抗原群

臨床材料から分離された Klebsiella 900 株のうち、重複菌株を除く 655 株の O 抗原群分布状況を Table 4 に示した。ただし、1 人の患者から異なる材料が提出された場合には材料別に 1 人として記載した。金沢大学で分離された Klebsiella の主な O 抗原群の分離頻度は 01 が 27.7%，03 が 19.2%，02 が 17.1%，05 が 12.1% であった。なお、02a・2b の 4 株のうち 2 株は Klebsiella ozanae と同定された。一方、順天堂大学で分離された Klebsiella の各 O 抗原群の分離頻度は金沢大学のそれと比べて 05 が 4.2% と低いものの ($\chi^2; p < 0.05$)、その他の O 抗原群の分離頻度に差はみられなかった。また、分離材料と O 抗原群との間

にも一定の傾向はみられなかった。

O 抗原群不明の菌株は 80 株 (12.2%) であり、このなかで上述の 10 種類の抗血清に血清希釈 100 倍で凝集しない菌株は 48 株であった。また、凝集がみられても免疫株に対する凝集素価よりも低く、4 倍以上の差がみられる菌株は 17 株で、このうち 11 株は 01, 02a, 03 のいずれかの抗血清に凝集した。さらに、凝集反応を実施する時に R 型菌であった菌株は 15 株 (2.3%) であった。

4. スライド凝集反応

種々の濃度の菌液と抗血清について行なったスライド凝集反応の結果を Table 5 に示した。凝集反応は 1 分以内に粗大な凝集塊を形成し、完全な凝集が認められる場合を ++, 凝集塊は小さいが明瞭な凝集が認められる場合を +, わずかに凝集が認められる場合を ±, 全く凝集が認められない場合を - と記載した。抗血清 204 以外の抗血清においても上記とほぼ同じ結果が得られた。以上の成績により、スライド凝集反応に使用する抗血清は凝集素価が約 100 倍になるように希釈し、菌液は HI 寒天平板 1 枚の菌を 4 ml の生理食塩液に浮遊させた状態が適当であることが明らかになった。以上の条件下でスライド凝集反応を行なった結果、O 抗原群が明らかな菌株はすべてそれぞれの O 抗原群に対する抗血清にのみ凝集し、O 抗原群不明の 10 株はいずれの抗血清にも凝集反応は認められなかった。

5. 薬剤感受性試験と生物学的性状試験

Table 6 に生物学的性状試験の結果を、Table 7 に薬

Table 5. Relationship between agglutinin titers and slide agglutination

Serum 204*1 diluted at	Cell suspensions*2 diluted at					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1:20	++*3	++	++	++	++	++
1:30	++	++	++	++	++	++
1:40	++	++	++	++	++	++
1:60	+	++	++	++	++	+
1:80	-	±	++	++	+	+
1:120	-	-	+	++	+	+
1:160	-	-	-	+	+	±
1:240	-	-	-	-	-	-

*1 Agglutinin titer against the homologous strain was 1:6400.

*2 Cell harvest from one plate was suspended in 0.5 ml of saline.

*3 Slide agglutination reactions are designated at very strong agglutination, ++; strong, +; weak, ±; no agglutination, -.

Table 6. Biochemical properties of 178 Klebsiella isolates

Biochemical tests	No. of positive strain (%)
Indole, SIM	35 (19.7)
Voges-Proskauer	178 (100)
Citrate, Simmons	178 (100)
Urease, Christensen	177 (99.4)
Lysine decarboxylase	178 (100)
Ornithine decarboxylase	0 (0)
Malonate	177 (99.4)
Acid from D-glucose	178 (100)
L-arabinose	178 (100)
Lactose	178 (100)
Maltose	178 (100)
Rhamnose	178 (100)
Sucrose	178 (100)
Xylose	178 (100)
Adonitol	160 (89.9)
Dulcitol	72 (40.4)
Mannitol	178 (100)
Sorbitol	178 (100)
Salicin	178 (100)
Inositol	176 (98.9)

剤感受性試験の結果を示した。なお、P株とそのDC株ではいずれの性状にも差は全くみられなかった。また、各O抗原群 (01;60株, 02a;50株, 03;60株, 04;40株, 05;40株, 012;10株, 014;10株)の間にも上述の性状に明瞭な差はみられなかった。

6. O抗原群別と生物学的性状試験および薬剤感受性試験の併用について

白血病の1症例から分離されたKlebsiella 27株の同一性を菌株により性状に差のみられた indole 反応, dulcitol の発酵, さらに CEZ, KM, TC に対する薬剤感受性から検討し, その結果を Table 8 に示した。なお, 薬剤感受性は同一薬剤に対する MIC 値に2段階以上の差がみられた場合に感受性が異なると判断した。これにより 27 菌株を O 抗原群から 5 種類に, 生物学的性状と薬剤感受性から 6 種類に, O 抗原群と生物学的性状さらに薬剤感受性から 9 種類に分けることができた。

考 察

Klebsiella の O 抗原に関しては 1949 年に Kauffmann¹¹⁾ が 3 種類の O 抗原群について報告し, その後は 1954 年の Ørskov の報告があるにすぎない。また, Klebsiella の O 抗原群が臨床細菌学の分野に応用されたという報告もない。このように現在まで本菌の O 抗原群別に関心がよせられなかった理由として, すでに K 抗原型別の方法が確立しており K 抗原の種類も 81 種類⁹⁾に達していること, Klebsiella の K 抗原は耐熱性であるために O 抗原群決定には無荚膜変異株を分離する必要があること, さらにこれまで O

Table 7. Antimicrobial susceptibility of 270 Klebsiella isolates

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
ABPC						2*(0.7)	9 (3.3)	30(11.3)	93(34.1)	68(25.3)	68(25.3)
SBPC							4 (1.3)	2 (0.7)	2 (0.7)	12 (4.7)	250(92.6)
CEZ			2 (0.7)	140(52.0)	47(17.3)	47(17.3)	14 (5.3)	9 (3.3)	4 (1.3)	5 (2.0)	2 (0.7)
KM		1 (0.4)	9 (3.3)	130(48.4)	78(28.9)	9 (3.5)	18 (6.7)	4 (1.4)	4 (1.4)	3 (1.1)	14 (5.2)
GM	5 (2.0)	177(65.3)	79(29.3)	7 (2.9)	2 (0.7)						
TC		3 (1.0)	25 (9.1)	93(34.5)	94(34.9)	14 (5.4)	4 (1.4)	4 (1.4)	4 (1.4)	6 (2.1)	23 (9.0)
CL		96(35.5)	138(51.1)	5 (1.7)	5 (1.7)	8 (3.1)	3 (1.0)	8 (2.9)	1 (0.4)	3 (1.3)	3 (1.3)

* Number of strains. Parentheses indicate the percentage

Table 8. Characters of Klebsiella isolates from clinical materials in a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis. (1976. 8—1977. 12)

Characters	Materials		Feces								throat swabs			blood
			0-1		0-2	0-3		0-5		0-12		0-1	0-3	0-12
Indole	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Acid from Dulcitol	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
MICs* for KM	25	3.13	25	3.13	6.25	3.13	1.56	3.13	3.13	25	3.13	3.13	3.13	
CEZ	6.25	50	>100	1.56	1.56	1.56	>100	1.56	1.56	6.25	1.56	1.56	1.56	
TC	6.25	>100	>100	6.25	12.5	6.25	>100	6.25	12.5	3.13	6.25	6.25	6.25	

*Minimum inhibitory concentrations

抗原群の種類がわずかに5種類¹²⁾と少なかったためと思われる。

K抗原型別は従来より莢膜膨化試験により行なわれてきた。しかし、莢膜膨化試験を行なうにはある程度の熟練を要することや、市販の抗血清には弱いながらも一部に交差凝集反応がみられる⁹⁾ことなどから本菌のK抗原型別は一部の研究機関で行なわれているにすぎない¹⁰⁾。著者も市販の72種類の抗K血清を用いて免疫株13株について莢膜膨化試験を試みたが、K抗原を決定することはできなかった。さらに、これまでDifcoから市販されていたK抗原型別用抗血清が製造中止になったことを考慮すると、本菌のK抗原型別を実際に行なうことは容易でないと考えられる。

KlebsiellaのDC株は炭水化物を含まない培地に培養を繰り返したり、50%胆汁ブイオンに数回継代培養することにより得られるが、いずれの方法も常にDC株が分離されるわけではない^{11,17)}。今回の検討でもO抗原群不明株のなかにDC株でない菌株が含まれている可能性も考えられる。しかし、大部分のKlebsiellaにおいて比較的短期間に群別可能なDC株が分離されたこと、さらにO抗原群別にスライド凝集反応の有用性が示唆されたことは今後本菌のO抗原群別が容易に実施できることを示すものとして注目される。

KlebsiellaのO抗原はSalmonellaと異なりEscherichia coliやvibrio parahaemolyticusにみられるように主要O抗原1種類をもって1つのO抗原群として表示する傾向にある。この場合、抗血清の吸収試験にて凝集素価がより強く残ったものを主要O抗原としている¹⁵⁾。これまで、KlebsiellaのO抗原群は11種類¹⁷⁾が報告されたが、Ørskov博士によると(私信)011は04と同一のものであり、06は01.08と

09は02とみなされ、010はKlebsiella以外の菌で記載されたためにO抗原群から除外されているとのことであった。これによりKlebsiellaのO抗原群は現在7種類に整理され、02はさらに02a, 02a・2bの2亜群に分類されている。すでに述べたごとく、今回は上述の8種類と新しいO抗原群に属する013, 014の計10種類の抗血清を使って群別を試みた。その結果、01が28.5%と最も多く、次いで03, 02の順に分離された。各O抗原群の分離頻度に関する報告はないが、K抗原15から62までの51株について検討したØrskovの報告¹²⁾でも01, 03, 02の順に多く分離され著者の成績とほぼ一致していた。なお、07に属する菌株が全く分離されなかったことや、02a・2bの4株のうち2株がK. ozanaeであったことからKlebsiellaの疫学的研究にこれらの抗血清の使用はそれほど有用と思われなかった。

O抗原群別がKlebsiellaの疫学的研究に有用であるか否かに関しては、臨床分離株をK抗原型別から検討した坂崎らの成績⁹⁾に比べて、わずか3種類のO抗原群がKlebsiella全体の約60%を占めていたことからO抗原群別のみで本菌の疫学を詳細に論じることができない。しかし、大部分の菌株で1週間以内にDC株が分離され、スライド凝集反応により簡便かつ迅速にO抗原群を決定することができたことから、血清型別では最初にO抗原群によりKlebsiellaを分類することが本菌感染症の疫学を論じる場合に実用的と思われる。しかも、K抗原型別単独よりもK抗原型別と生物学的性状試験の併用がKlebsiellaの分類に有用であったというRennieら⁹⁾の報告から、O抗原群別にその他の性状試験を併せて実施することにより本菌をさらに細かく区別できることが期待される。今回の検討

より、O 抗原群別に併用する性状試験として生物学的性状では indole 反応と dulcitol の分解が、薬剤感受性では CEZ, KM, TC に対する感受性試験が実用的と思われた。とくに、indole 陽性率はこれまで 1~6%¹⁷⁾¹⁸⁾とされていたが、著者の成績では約 20%であり、諸家の報告¹⁷⁾¹⁸⁾でも 15~17%である。このような indole 陽性株増加の原因は明らかでないが、indole 産生の違いにより耐性型や R 因子型が異なる²⁰⁾とされており、indole 陽性株の今後の動向が注目される。

R 型菌を除く O 抗原群不明株は 65 株 (9.9%) であって、O 抗原群の決定はすでに述べたごとく、被検菌株に対する抗血清の凝集素価が免疫株で測定した凝集素価の 50%以上を示す場合に免疫株と同じ O 抗原群に属すると判断した。しかし、細菌の O 抗原は通常いくつかの部分抗原からなっており²¹⁾、すでに Klebsiella の 01, 02 の O 抗原群は複合抗原であることが明らかにされている。しかも、このような菌株では主要 O 抗原の量的な違いにより凝集反応に強弱の差が生じることが予測される。従って、今回の不明株のなかにすでに述べた 9 種類の O 抗原群に特異な O 抗原を有する菌株が含まれていることも考えられる。

R 型菌の分離頻度に関して、Kauffmann¹¹⁾は約 42.2%であったと報告しているが著者の成績ではわずかに 2.3%であった。Ørskov¹²⁾も R 型菌を含む O 抗原群不明株は 15.6%であったと報告している。このような R 型菌の出現頻度の差は Kauffmann が 50%胆汁ブイオンを使って DC 株を分離していることから、分離方法の違いによるものと思われる。なお、R 型菌は尿から高率に分離されている¹¹⁾が今回の成績ではそのような傾向はみられなかった。

結 論

各種の臨床材料から分離された Klebsiella 900 株を対象に O 抗原群別を試みた。同一症例からの重複菌株を除く 655 株の O 抗原群別の成績はおよそ次のように要約された。

1. 対象とした 655 株のうちの 575 株 (87.8%) に O 抗原群が決定された。各 O 抗原群の分離頻度は 01 が 28.5%、02a が 15.7%、02a・2b が 0.7%、03 が 19.4%、04 が 6.4%、05 が 10.7%、012 が 2.9% であった。また、新しい O 抗原群と思われる F80 (013)、F567 (014) の各抗血清にそれぞれ 7 株 (1.1%)、16 株 (2.4%) の凝集がみられた。
2. O 抗原群不明株は 80 株 (12.2%) で、そのうちの 15 株が R 型菌であった。
3. ある特定の O 抗原群に属する菌株が特定の臨

床材料から多く分離されることはなかった。

4. 至適条件下でのスライド凝集試験が O 抗原群の決定に有用と思われた。O 抗原群別は K 抗原型別に比べて使用する抗血清が少ないことから容易に実施できると思われる。

5. 生物学的性状では indole 反応と dulcitol の分解が Klebsiella の分類に実用的と思われた。また、本菌をさらに細かく分類するには KM, CEZ, TC の感受性試験が便利と思われた。

6. 慢性骨髄性白血病の急性転化例から分離された 27 菌株は O 抗原群から 5 種類に、生物学的性状試験と薬剤感受性試験をこれに加えることにより 9 種類に分類された。

今回の成績から O 抗原群別と生物学的性状試験ならびに薬剤感受性試験の併用が Klebsiella 感染症の疫学的研究に利用できることが示唆された。

文 献

- 1) Fallon, R. J. : The relationship between the biotype of Klebsiella species and their pathogenicity. J. Clin. Path., 26, 523 - 528 (1973)
- 2) Forbes, I., Gray, A., Hurse, A. & Ravillard, R. : The emergence of Gentamicin-resistant klebsiella in a large general hospital. Med. J. Aust., 1, 14 - 16 (1977).
- 3) Rennie, R. P., Nord, C. E., Sjoberg, L. & Duncan, I. B. R. : Comparison of bacteriophage typing, serotyping, and biotyping as aids in epidemiological surveillance of klebsiella infections. J. Clin. Microbiol., 8, 638 - 642 (1978).
- 4) Sakazaki, R. & Namioka, S. : Serological typing of the klebsiella group. Japan. J. Exp. Med., 28, 85 - 93 (1958).
- 5) Selden, R., Lee, S., Wang, W. L. L., Bennett, J. V & Eickhoff, T. C. : Nosocomial Klebsiella infections : Intestinal colonization as a reservoir. Ann. Int. Med., 74, 657 - 664 (1971).
- 6) Rennie, R. P. & Duncan, I. B. R. : Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of klebsiella. Appl. Microbiol., 28, 534 - 539 (1974).
- 7) 西川徹 : 主として呼吸器疾患材料より分離された Klebsiella の分類に関する研究。長崎医誌. 48, 143 - 156 (1970).

- 8) **Nimmich, W. & Munter, W.** : Ein neuer klebsiella K 81. Zschr. Allg. Microbiol., **15**, 127 - 129 (1975).
- 9) **Duncan, I. B. R. & Rennie, R. P.** : Klebsiella in hospital-acquired infections. Lancet. **20**, 157 (1974).
- 10) **Riser, E., Noone, P. & Poulton, T. A.** : A new serotyping for klebsiella species : development of the technique. J. Clin. Path., **29**, 296 - 304 (1976).
- 11) **Kauffmann, F.** : On the serology of the klebsiella group. Acta. Path. Microbiol. Scand., **26**, 381 - 406 (1949).
- 12) **Ørskov, I.** : O antigens in the klebsiella group. Acta Path. Microbiol. Scand., **34**, 145 - 156 (1954).
- 13) **Cowan, S. T. & Steel, K. J.** : Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, 1973.
- 14) 医科学研究所学会 : 細菌学実習提要, 第5版, 227 - 244 頁, 東京, 丸善, 1977.
- 15) 三輪谷俊夫 : 腸炎ビブリオの血清学的型別とくに試験管内凝集反応による O 抗原型別法について, 感染症学雑誌. **46**, 83 - 89 (1972).
- 16) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会 : 最小発育阻止濃度測定法改訂について, Chemotherapy. **22**, 1126 - 1128 (1974).
- 17) 坂崎利一 : 腸内細菌 (IV) 各論 3. 1 - 28 頁, 東京, 近代出版, 1979.
- 18) **Edwards, P. R. & Ewing, W. H.** : Identification of Enterobacteriaceae, 3rd. ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1972.
- 19) **Metz, H. & Preac-Mursic, V.** : Zur biochemischen Differentialdiagnostik der klebsiella-Gruppe. Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A. **226**, 63 - 69 (1974).
- 20) 橋本一 : 薬剤耐性菌の疫学と遺伝, Chemotherapy. **27**, 413 - 414 (1979).
- 21) 坂崎利一 : 腸内細菌 (I) 概論, 28 - 30 頁, 東京, 近代出版, 1975.

Epidemiological Study on Nosocomial Klebsiella Infections (I) Serological O-grouping of Klebsiella Strains Shinichi Fujita, Department of Internal Medicine (III), Central Clinical Laboratory, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 508—517 (1980).

Abstract In an attempt to elucidate the usefulness of O-serogrouping of Klebsiella for the epidemiological study of infections due to this organism, O-group antigens of Klebsiella isolates from various clinical materials together with the reference strains offered by Dr. I. Ørskov were examined. O-serogrouping in combination with the biochemical and susceptibility tests seemed to be a potential tool for the epidemiological study of Klebsiella infections. The results obtained were as follows;

1. Of a total of 655 Klebsiella strains, 575 (87.8 %) were sorted into 8 O-serogroups at the following frequencies (%): 01, 28.5; 02, 16.3; 03, 19.4; 04, 6.4; 05, 10.7; 012, 2.9; 013, 1.1; 014, 2.4. Fifteen of the 80 remaining strains were spontaneously agglutinated in physiological saline, exhibiting R-form colonies.
2. No one particular O-group was associated with a specific clinical material.
3. The slide agglutination test was useful for O-serogrouping of Klebsiella, when performed under optimum conditions. O-serogrouping seemed to be more convenient than K-serotyping because of the fewer kinds of O-antisera.
4. Of the 20 biochemical characteristics examined, the indole production and fermentation of dulcitol varied from strain to strain. Antimicrobial susceptibility of 270 Klebsiella isolates showed that antibiotics such as kanamycin, cefazolin and tetracycline were useful for further subdivision of these organisms.
5. Among 27 Klebsiella isolates from a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis, only 5 O-serogroups were detected using 10 O-antisera. The addition of biochemical and susceptibility tests to this O-serogrouping made it possible to further subdivision into 9 biological groups of Klebsiella.