

Serratia marcescens の病原性に関する実験的研究

毒力の検討ならびに実験的肺炎の作製

松島敏春・田野吉彦・副島林造

川崎医科大学呼吸器内科

(昭和 52 年 9 月 29 日受付)

はじめに

非病原性ないしは弱毒性の菌と考えられていた *Serratia marcescens* の臨床材料からの分離頻度が近年増加して来ている^{1,2,3)}。しかし、*Serratia* が分離されても明らかな病原菌となっている場合は少なく、*Serratia* による感染症は、抵抗性減弱を来すような基礎疾患を有する患者で導尿や気管切開など何らかの医療処置をうけている場合に起り易い^{4,5)}。すなわち、*Serratia* 感染症は opportunistic infection の型をとり、かつ院内感染の型をとる^{6,7,8)}もので、その頻度は臨床的には決して多くはないようである。

従って、*Serratia* の臨床分離菌の病原性がどの程度のものであるか、また、いかなる場合に病原性を発揮し、感染症を来すものであるのか、という点は興味深いところである。それを知るため私共は一連の実験を行なった。すなわち、マウスの腹腔内、肺内攻撃による菌の毒力の検討、宿主マウスの条件をかえることによる肺炎の作製、などの実験を行ない、興味ある結果をえたので報告する。

材料ならびに方法

使用実験動物は、ICR 雌マウスで生後 4~8 週、体重 20~35 g (平均体重 26 g) であり、使用菌株は *Serratia marcescens* で患者尿、喀痰、膿からの分離株 (長崎大学医学部第 2 内科 原耕平教授、神戸大学医学部泌尿器科 三田俊彦博士、京都薬科大学 故中沢昭三教授から分与されたものである)。

実験動物腫瘍は EHRlich 腹水癌細胞を使用した。

実験方法

1. セラチア各株の毒力の検討

Serratia の各株を 37°C にて 24 時間培養。その 10 倍稀釈系列を作り、その 0.1 ml をマウスの腹腔内に注射、あるいは経鼻吸引をさせて、致死率にて毒力を検討した。

2. 宿主抵抗減弱マウスの作製

i) Polyvinylpyrrolidone (以下 PVP) による網内系の障害。PVP (和光純薬 K=90) の 3% 溶液を作製し、隔日に 9 回、2 ml ずつ腹腔内に注入した。

ii) Cyclophosphamide による障害

Endoxan 50 mg/kg/day を 2 週間に 10 回腹腔内へ注入した。

iii) Corticosteroid による障害

Rinderon を 5 mg/kg/day を 5 日間連日腹腔内に注入、または、Predonine 約 10 mg/kg/day になるような溶液を作り飲ませた。

iv) 担癌マウス

エールリッヒ腹水癌細胞を腹腔内へ移植した。

3. *Serratia* の経鼻吸引

マウスをエーテルにて浅く麻酔し、26 G_{1/2} ゲージの針から菌液 4 滴をマウスの鼻へおとし吸引させた。吸入量は約 0.02 ml、吸入菌数は約 10⁶ 個である。

4. 肺内残存菌数の測定

Serratia 吸引後、一定時間後にマウスを屠殺し、ヒビテン液に漬す。肺を無菌的に摘出し、乳鉢にてホモジナイズして、生食水にて稀釈し、HI 培地にて 37°C で培養、生菌数をコロニー数から計算した。菌数計算用に使用した菌株は色素産生性のものである。

結 果

1. 患者分離 *Serratia marcescens* 各株の毒力

患者分離株 8 株を 24 時間 37°C で培地培養すると菌は 10⁹ オーダーまで増殖する。その 10 倍稀釈系列を作り、その 0.1 ml ずつを各群 4 匹の ICR 雌マウスの腹腔内に注入し、マウスの死亡率をみたものが Fig. 1 である。10⁸ 個では全て死亡するが、10⁷ 個で死亡したものは 2 株にすぎず、10⁶ 個の腹腔内注入では致死効果はない。次に、神戸大学から分与を受けた 5 株を同様の方法にて各群 3 匹のマウスで致死率をみたものが Fig. 2 である。この中で S 7 株は毒力が強く、1.1 × 10⁶ 個の腹腔内攻撃で 100% の死亡をみた。すなわち、*Serratia* 各株間には 10²~10⁸ オーダーの毒力の差異があるが、総じて *Serratia* の毒力は弱いものと考えられた。

細菌の腹腔内攻撃の場合、ムチン添加によりその毒力が増加されることが知られている^{9,10)}。Fig. 3 は患者尿分離株で色素産生性 *Serratia* S 1006 株 (長崎大学から分与された) を用いたムチンの効果をみたものである。4% のムチンを加えることにより、ほぼ 10 倍の毒力の

Fig. 1 Death rate after intraperitoneal inoculation of eight strains of *Serratia marcescens* (○.....○ strain 1006)

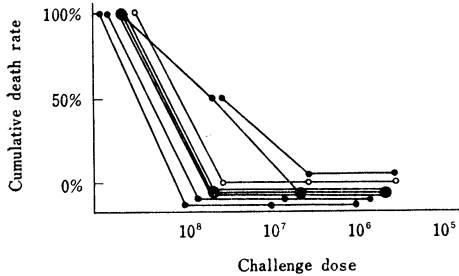


Fig. 2 Death rate after intraperitoneal inoculation of various strains of *Serratia marcescens*

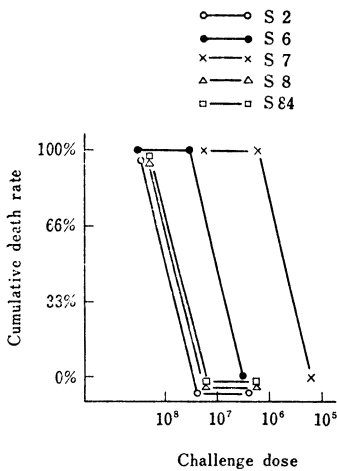
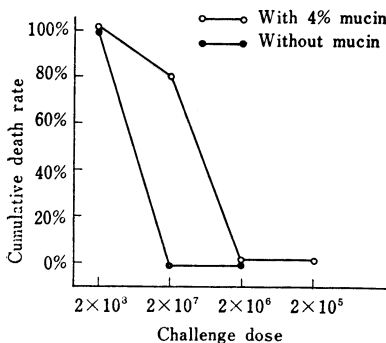


Fig. 3 Effect of gastric mucin added to bacillary suspension



増強が認められるにすぎなかった。

2. マウスのちがいによる *Serratia* の毒力の相違の検討

ICR 雌マウスの成熟度、体重により *Serratia* の毒力が変わるか否かを検討した。すなわち、ICR 生後 5 週、平

Fig. 4 Susceptibility for *Serratia marcescens* in two mouse groups with different body weight

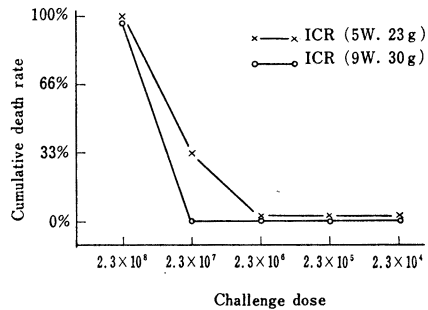
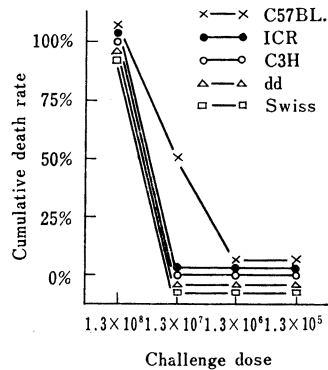


Fig. 5 Susceptibility for *Serratia marcescens* in five different strains of the mouse



均体重 23g と生後 9 週、平均体重 30g の各群 3 匹の腹腔内に、*Serratia* 1006 株、 2.3×10^8 個の 10 倍稀釈系列を 0.1ml 注入して死亡率をみたのが Fig. 4 である。生後 5 週をすぎると殆んど差はないようである。

次に、宿主マウスの系の違いにより、*Serratia* に対する感受性の違いがあるか否かをみたものが、Fig. 5 である。川崎医大で飼育されている近交系 C57B1, ICR, C3H, dd, Swiss の 5 系を対象に、*Serratia* 1006 株の腹腔内攻撃による致死率をみた。体の小さい C57B1 で僅かに致死率が高かったが、殆んど差をみとめなかった。

細菌の接種部位により、致死率に差があるのは当然であり、中でも腹腔内攻撃において最も致命的であると考えられた。従って *Serratia* 1006 株を用いて ICR 雌マウス各群 3 匹に、腹腔内、静脈内、経鼻肺内接種を行なったところ (Fig. 6)、致死的效果は殆んど同様であった。

3. 各種条件下マウスにおける *Serratia* 肺炎作製の試み

以上の各実験により、*Serratia marcescens* の毒力は極めて弱いものであり、例えば、腹腔内攻撃の場合、多くの株では 10^8 個接種で致死性であるにすぎない。宿

Fig. 6 Change of death rate by three different inoculation routes

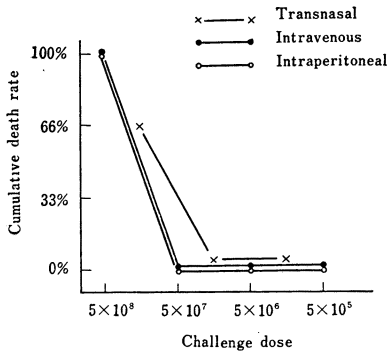
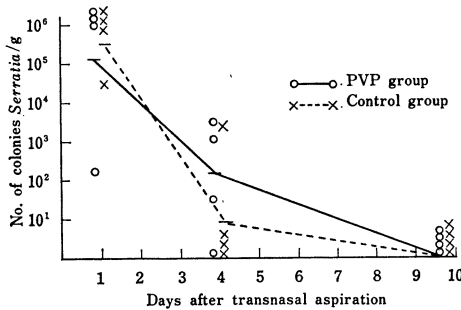


Fig. 7 Bacterial clearance in the lung of the mouse treated with polyvinylpyrrolidone (○····○) or with physiological saline (×····×)



主マウスが死亡するのは殆んど 12 時間以内であり、もし、菌量が致死量以下の場合には、マウスは漸次健常となる。経鼻肺感染の場合も同様で急性致死量以下の菌数の肺内接種では、*Serratia* の肺内残存菌数は漸次減少し、肺は清浄化されて来て、肺炎を起すことはない。

従って私共は *Serratia* 肺炎に対する適切な化学療法を検討する目的で、マウスで *Serratia marcescens* による肺炎の作製を試みた。

まず、網内系機能を障害するとされている PVP を使用してマウスの抵抗性を減弱させた後、セラチアを肺に吸入した。この PVP の注入により、マウスは皮下血腫を作ったり、死亡したりするものもあり、全体的に体重の減少があり、全身状態が障害された。また、白血球などの計算を試みたが、マウスであり、全身状態も悪く、採血が困難であったために、一定の結果をうる事が出来なかった。この PVP 前処置マウス群 15 匹と健常対照マウス群 15 匹に *Serratia* 1006 株 9×10^4 個の 10 倍稀釈液 4 滴をエーテル麻酔下で経鼻的に吸引させた。その後の肺内残存 *Serratia* 菌数をみたのが Fig. 7 で、1 日後には平均 $10^5 \sim 10^6$ 個の菌数を肺内に証明できるが、4 日後には PVP 群で平均 2×10^2 個、対照群で 10 個

Fig. 8 Bacterial clearance in the lung of the mouse treated with endoxan (○····○) or with physiological saline (×····×) days after transnasal aspiration

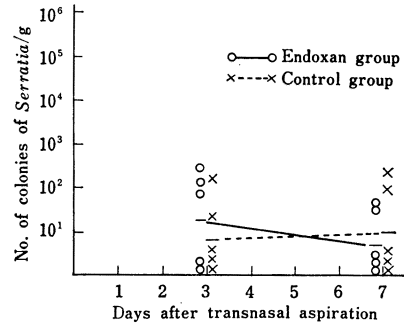
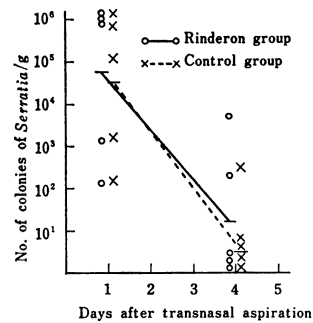


Fig. 9 Bacterial clearance in the lung of the mouse treated with rinderon (○····○) or physiological saline (×····×) inoculation route is transnasal



と肺内残存菌数は減少し、10 日後には両群とも 0 個となり、肺は清浄化された。

次に、抗癌剤、免疫抑制剤として知られる Cyclophosphamide (Endoxan) を用いて同様の実験を行なった。Endoxan で前処置したマウス群 20 匹と健常対照群 20 匹の ICR 雌マウスに、*Serratia* 1006 株 1.9×10^8 個の 10 倍稀釈液の 4 滴をエーテル麻酔下で経鼻的に肺に吸入させた。12 時間以内の死亡は Endoxan 投与群で 7 匹、対照群では 1 匹と大きい差が認められたが、肺内残存菌数 (Fig. 8) では 3 日目、7 日目ともに明らかな差を認めず、肺炎の作製も出来なかった。

免疫抑制剤として知られる副腎皮質ホルモン剤を用いて、宿主マウスの易感染性を計画した。まず、Rinderon 5 mg/kg/日 を 5 日間連日、腹腔内に注入した。その後、*Serratia* 1006 株 1×10^8 個の培養液を 10 倍稀釈し、その約 0.02 ml を経鼻的に吸引させた。その後の肺内残存菌数をみたのが Fig. 9 であり、Rinderon 前処置群でも 4 日後には菌数の減少、または消失を認めた。次に、Prednisolone ほぼ 10 mg/kg/日 を経口的に 4 週間摂取

Fig. 10 Bacterial clearance in the lung of mouse treated with predonisolone (○.....○) or physiological saline (×.....×) inoculation route is intravenous

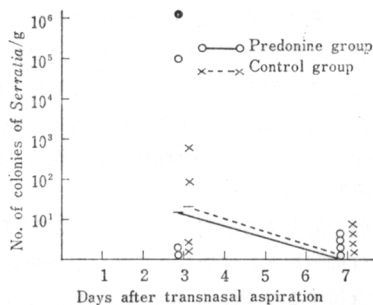


Fig. 11 Bacterial clearance in the mouse treated with predonisolone (○.....○) or with physiological saline (×.....×)

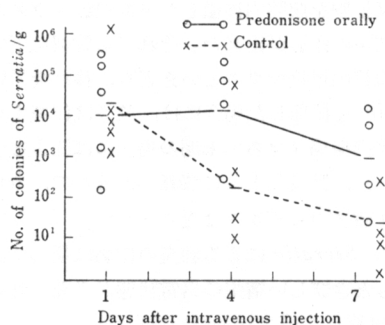
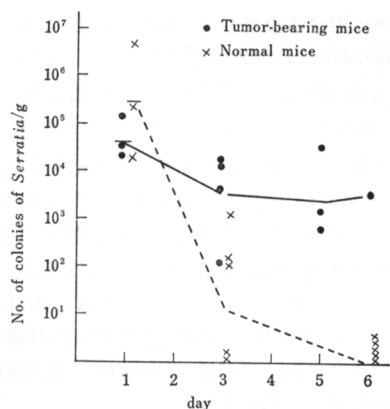


Fig. 12 Number of *Serratia* in the lung after transnasal aspiration

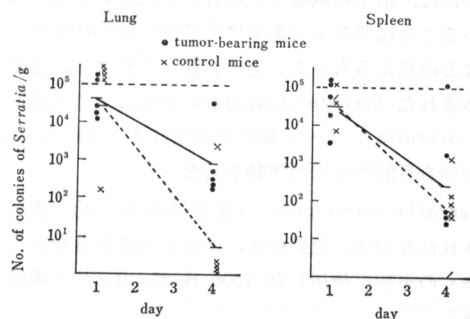


させて、マウスの易感染性を惹起させようとした。4週間後には対照健常マウスの体重が平均 31.5 g (27~34 g) となっているのに対し、Predonisolone 投与群では 22.5 g (19~25 g) と小さくなっていった。しかし、毛のツヤやマウスの活動性には変化がなかった。この両群に *Serratia*

Fig. 13 Photomicrograph from lung of tumor-bearing mouse 7 days after inoculation of *Serratia*, shows typical findings of pneumonia



Fig. 14 Number of *Serratia* in the lung and spleen after intravenous injection



1006 株 8×10^8 個の 10 倍稀釈液 4 滴経鼻的に吸引させた。肺内残存菌数を 3 日後、7 日後にみたが、対照群との間に差を見出すことが出来なかった (Fig. 10)。なお、図中の黒印で示した 1 匹は *E. coli* による肺の膿瘍であった。同様に Predonisolone 4 週間投与されたマウスと健常対照マウスに *Serratia* 1006 株 2.7×10^9 個の 10 倍稀釈液 0.1 ml を経静脈的に接種し、その後の肺内の残存菌数をみた (Fig. 11)。円印 Predonisolone 前処置群のほうで、×印対照群よりも、4 日目、7 日目ともに肺内残存菌数が多かった。

次に、エールリッヒ担癌マウスで *Serratia* 肺炎の作製を試みた。まず、腹腔内に EHRlich 癌細胞 9×10^5 個を接種し、7 日後で毛のツヤがなくなり、活動の鈍くなったマウス 15 匹と、健常対照マウス 15 匹に、*Serratia* 1006 株約 8×10^6 個を経鼻的に肺に吸引させた。担癌動物では肺炎死あるいは癌死により途中にて死亡したものもあったが、その肺内菌数は担癌マウス群で明らかに多く、*Serratia* が肺内で浄化され消失していく傾向もなかった (Fig. 12)。また、肉眼的にも組織学的にも明らかな肺炎の病像を呈していた (Fig. 13)。

同様に、 5×10^6 個の EHRlich 癌細胞を腹腔内に移植し、5日後に *Serratia* 1006 株 2×10^7 個を尾静脈から注入、その後の肺、脾の残存菌数をみたのが Fig. 14 である。担癌マウス群で *Serratia* の肺内残存が遷延していることがうかがえる。

考 察

老令者の増加、抗細菌性抗生物質の広汎な使用、副腎皮質ホルモン剤や抗癌剤など免疫抑制剤の使用、癌末期患者の増加などにより、グラム陰性桿菌による肺炎が増加して来ており、肺炎の変貌^{9,10}が注目されている。

グラム陰性桿菌の中で最近注目されているものとして *Serratia* 属がある。*Serratia* は多剤薬剤耐性を示すことが多く^{11,12,13,14}、抗生物質の使用でも生存し、ことに清水ら¹⁵は、Cephalosporin 系抗生物質の広汎な使用と比例して、その分離頻度が増加して来たとしている。細菌の毒力の弱いグラム陰性桿菌による感染症が成立するためには、宿主の基礎疾患の存在が大きい役割をはたしていることは明らかであり^{16,17,18,19}、*Serratia* 感染症などはその最たるものといえる。従って私共は、患者から分離された *Serratia* の毒力がいかなるものであり、また、*Serratia* により実験的肺炎を作ることが可能か否かを知る目的で今回の実験を行なった。

Serratia marcescens は患者の喀痰、尿、膿から分離されたもので、色素産生、非産生両者を含む。その後の多くの実験に使用した 1006 株は尿由来で色素産生性である。

菌の毒力はマウス腹腔内攻撃でみたが、*Serratia marcescens* の多くの株では、致死に要する菌量は約 10^8 個であった。最も毒力の強い S7 株の致死量は約 10^8 個であり、多くの *Serratia* の約 100 倍の毒力であった。しかしながら、総じて *Serratia marcescens* の毒力は極めて多いものであると思われる²⁰。また、腹腔内攻撃の場合、死亡するマウスは 6~12 時間内であり、*Serratia* 注入時の一過性の菌血症または毒力によると思われ、その後に菌が増殖して死亡に至るものはない。HAGIHARA ら⁹は Mucin 添加により毒力が約 10 倍増強することを報告しており、私共の成績もほぼ同様であった。しかし中沢らは、Mucin 無添加の場合 LD_{50} は 2.13×10^7 cells/mouse、Mucin 添加の場合 1.99×10^6 cells/mouse でマウスに対する病原性は予想以上に強く、大腸菌や緑膿菌に匹敵すると報告している。*Serratia* を肺に吸引させた場合も同様であり、致死量接種では 12 時間以内に死亡するが、それ以下の量の場合には、肺内生菌数は日時と共に減少し、ついには肺は清浄化される。このことを臨床的に考えると、健康人の場合では、日常の *Serratia* の侵入菌数では体内の防禦機構により

Serratia は排除され、発症するには至らないものと考えられる。

次に、化学療法の立場から *Serratia marcescens* 肺炎の場合、いかなる抗生物質が最適であるかを知ることは重要である。そのためには *Serratia* 肺炎のモデルを作ることはぜひ必要である。しかし、健常マウスではすでに述べたように治療の対照となるような肺炎の作製は困難であった。従って、宿主マウスの抵抗力減弱を来すような条件を作り、その後 *Serratia* を接種し、肺炎を作ろうと試みた。

網内系機能を障害する薬剤として知られる PVP や²¹、抗癌剤、免疫抑制剤として知られるエンドキサンや²²、易感染性を惹起するので最も有名な副腎皮質ステロイド²³を用いて宿主の抵抗力減弱をはかり、*Serratia* を経鼻的吸引で肺へ接種した。しかし結果は予想どおりにはいかず、肺炎を作ること出来なかった。僅かに、エールリッヒ癌細胞を腹腔内移植した末期担癌マウスの場合にだけ、肺炎の作製が出来た。それでも背部皮下担癌マウスや、腹腔内担癌マウスといえども、移植後早い時期に *Serratia* を接種した場合には、肺炎は作製出来なかった。腹腔内担癌マウスで末期の場合には肺炎を作製出来たとはいえ、肺炎死と共に癌死があるので、*Serratia* 肺炎の化学療法のモデルとはなりえない。

すなわち、*Serratia* による肺炎の作製は極めて困難であり、もっときびしい宿主の異常状態が必要と考えられる。

ま と め

Serratia marcescens の成熟雌マウスに対する毒力を検討し、また、同菌による肺炎の作製を試みた。

成熟マウスに対する致死量は、腹腔内攻撃で見ると *Serratia marcescens* 患者分離株の多くで、約 10^8 個であり、最も毒力の強い S7 株で約 10^8 個であった。*Serratia* の毒力は総じて弱いものと考えられた。

健常マウス肺へ *Serratia* を経鼻的に接種すると、致死量以下の場合には、肺内残存菌数は日時とともに減少し、7日後には肺は殆んど清浄化された。PVP、Cyclophosphamide、Corticosteroid でマウスを前処置しても、*Serratia* の肺内接種により、肺炎を作ること出来なかった。僅かに、EHRlich 癌細胞を腹腔内へ移植された担癌末期マウスにおいてだけ、*Serratia* の肺内接種により、肺炎を作ることが出来た。

Serratia の毒力は弱いものであり、同菌による肺炎の成立のためには、宿主の極めて強い異常状態が必要であろうと考えられる。

文 献

- 1) REIMANN, H. M.: The pneumonia. Adam Hilger, London, p. 55, 1971
- 2) JOHANSON, W. G. ; A. K. PIRECE & J. P. SANFORD : Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. New Engl. J. Med. 281 : 1137, 1969
- 3) 那須 勝, 猿渡勝彦, 餅田親子, 伊折文秋, 林愛 : 臨床材料からの *Serratia* 属の分離。臨床病理 25 : 325, 1977
- 4) WEBB, S. F. & A. VALL-SPINOSA : Outbreak of *Serratia marcescens* associated with the flexible fiberbronchoscopy. Chest 68 : 703, 1975
- 5) 本田靖明 : 留置カテーテルに伴うセラチア感染症とその対策。第 22 回日本化学療法学会西日本支部総会演題集, p. 41, 1974
- 6) BODEY, G. P. ; V. RODRIGUEZ & J. P. SMITH : *Serratia* species infections in cancer patients. Cancer 25 : 199, 1970
- 7) 清水喜八郎, 奥住捷子, 人見照子, 長野百合子, 千葉房子, 千葉純江, 大塚正和, 坂上ノリ子 : セラチア感染症。総合臨床 23 : 1694, 1974
- 8) 那須 勝, 斉藤 厚, 堤 恒雄, 岩永正明, 広田正毅 : *Serratia* 感染症に関する臨床的研究。最新医学 31 : 1370, 1976
- 9) HAGIHARA, Y. & M. SASAKI : Factors affecting pathogenicity of *Serratia marcescens* for mice. Kurume Med. J. 19 : 33, 1972
- 10) 中沢昭三, 黒田浩之, 中野一行, 佐藤清, 河野啓三 : *Serratia marcescens* に関する実験的薬学療法。第 2 報, 抗菌剤の *in vivo* 効果。Chemotherapy 25 : 364, 1977
- 11) WIEFERT, J. N. ; F. F. BARRETT, W. H. EWING, M. FINLAND & K. H. KASS : *Serratia marcescens* : Biochemical, serological and susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital. Appl. Microbiol. 19 : 345, 1970
- 12) 小栗豊子, 村瀬光春, 小酒井 望 : 臨床材料からの *Enterobacter-Serratia* 群の多剤耐性。Jap. J. Antibiotics 28 : 137, 1975
- 13) 那須 勝, 猿渡勝彦, 中富昌夫, 森 信興, 斉藤勝厚, 原 耕平 : 最近の臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の化学療法剤感受性。Chemotherapy 25 : 397, 1977
- 14) 中沢昭三, 大槻雅子, 平井芳美, 尾花芳樹, 久保田満寿江, 杉原芳樹, 戸田正人, 山田作夫 : *Serratia marcescens* に関する実験的薬学療法。第 1 報, 抗菌剤の *in vitro* 感受性。Chemotherapy 25 : 357, 1977
- 15) 清水喜八郎, 奥住捷子, 人見照子 : *Serratia* に関する検討 (第 4 報)。第 23 回日本化学療法学会総会抄録集 p. 73, 1975
- 16) FREID, M. A. & K. L. VOSTI. : The importance of underlying disease in patients with gram-negative bacteremia. Arch. Intern. Med. 121 : 418, 1968
- 17) 舟田 久, 服部絢一 : 終末感染。臨床と研究 51 : 3075, 1974
- 18) TILLOTSON, J. R. & A. M. LERNER : Pneumonia caused by gram-negative bacilli. Medicine 45 : 65, 1966
- 19) UNGER, J. D. ; H. D. RASE & G. F. UNGER : Gram-negative pneumonia. Radiology 107 : 283, 1973
- 20) HAGIHARA, Y. & M. SASAKI : Pathogenicity of *Serratia marcescens* for mice. Kurume Med. J. 17 : 13, 1970
- 21) OHBUCHI, S. : Suppression of antibody formation by the reticuloendothelial-blockade. 1. Effects of the RES-blockade with macromolecular polyvinyl pyrrolidone. Acta Med. Okayama 22 : 37, 1968
- 22) GERSHWIN, M. E. ; E. J. GOETZL & A. D. STEINBERG : Cyclophosphamide : Use in practice. Ann. Intern. Med. 80 : 531, 1974
- 23) HOEPLICH, P. D. : Infectious diseases. Harper & Row, Hagerstown, p. 219, 1972

STUDY ON PATHOGENICITY OF *SERRATIA MARCESCENS*:
ITS VIRULENCE AND EXPERIMENTAL PNEUMONIA
IN THE MOUSE

TOSHIHARU MATSUSHIMA, YOSHIHIKO TANO and RINZO SOEJIMA

Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine,
Kawasaki Medical School, Okayama

Virulence of *Serratia marcescens* in mature female mouse, and infection of *Serratia* to the mouse lung, were studied. *Serratia* isolated from urine and sputum of patients, showed low virulence for the mouse when injected intraperitoneally. Lethal dose for mature female mouse were about 10^8 bacilli in most strains of *Serratia marcescens*, and about 10^6 bacilli in S7 strain with strongest virulence.

As a large dose of *Serratia* 1006 strain inoculated transnasally to the lung of the mouse, numbers of bacilli in intact lung were decreased day by day, and no bacilli were recovered in the lung 7 days after inoculation. Pneumonia were not established by transnasal aspiration of *Serratia* even in pretreated mouse with polyvinylpyrrolidone, cyclophosphamide, or corticosteroids. Only terminal infection to tumor-bearing mouse with intraperitoneal transplantation of EHRlich ascites tumor cells, typical pneumonia was established by transnasal aspiration of *Serratia* 1006 strain.