肺炎菌ノ研究

第5編 酸又ハあるかりテ抽出シ得タ 物質ノ物理化學的性狀

京城帝國大學醫學部微生物學教室 (主任 細川教授)

金光 大鳳

Taihō Kanemitsu

(昭和18年3月12日受付)

目 次

第1章 緒 論	第4章 抽出物ノ物理化學的性狀
第2章 豫備實驗	第1項 抽出物ノ沈澱反應
第1項 豫備實驗(A)	第2項 抽出物ノ呈色反應
第2項 豫備實驗(B)	第5章 銀たんのぞるニ對スル保護作用ノ檢 査
第3項 豫備實驗(C)	第1項 菌抽出液ノ作り方
第3章 實驗材料並ビニ抽出方法	第2項 實驗材料
第1項 菌 株	第3項 實驗方法
第2項 抽出ニ使用スル液	(A)
第3項 菌 培 養	(B)
第4項 菌培養時間	第6章 結 論
第5項 菌體洗滌	文 献
第6項 菌體乾燥	
第7項 抽出方法	

第1章 緒 論

余ハ曩ニ肺炎菌ノ銀たんのぞるニ對スル被染色性ニ就イテ、本染色ヲ施スニ當ツテ、陳舊菌株、標準菌株、新菌株、分離直後ノ菌株何レニ於イテモ、菌體ガ褐色ニ染色セラレルモノアリ、或ハ無色透明ニ染色セラレナイモノモアツタ。

然ルニ陳舊菌株ヨリ新菌株ニ、新菌株ヨリ分離直後ノ菌株ニ陰性菌ガ多イノヲ知ツタ。ソシテ陰性菌ニ毒力強キモノ多キコトヲ認メタ。

依ツテ陽性菌ニ對シ毒力ヲ増強シツツ染色ヲ施シタガ本染色ハ漸次陰性ニ轉化シタノデアリ、カヤウナコトハ細菌菌體成分ト被染色性トノ間ニ何等カノ交渉ヲ有スルモノデハナイカト思ハレル。

ソレデ培養肺炎菌=種々ナル操作ヲ加ヘ塗抹標本=前處置ヲ施シ、菌體染色ヘノ影響ヲ檢討シタガ、日高氏が指摘シタヤウ=菌ヲ酸又ハあるカリデ前處置スルトキ被染色性=著變ヲ來シタノデアル。

依ツテ菌體ヲ酸又ハあるカリデ抽出シ得タ物質ノ物理化學的性狀ヲ調べタガ陰性菌、陽性菌何レニ於イテモ大差ナキ結果=到達シタノデアル。

第 2 章 豫 備 實 驗

余ハ培養菌ヲ酸又ハあるカリデ處理シテ本染色ヲ試ミタナラバ如何ニ變化スルカヲ檢シタイモノデアル。依ツテ次ノ豫備實驗ヲ行ツタ。

第 1 項 豫 備 實 驗 (A)

余ハ肺炎菌ノ銀たんのぞる染色ニ於ケル陰性菌ト陽性菌各10株ヲ選ビ本實驗ニ供シタ。
 $n/10 \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液 3ccニ上記ノ17時間培養菌1白金耳量ヲ入レ 37°C 2時間加温後之カラ塗抹標本ヲ作り、乾燥ヲ待ツテ火焰固定ヲナシ、1晝夜流水中ニ於イテ水洗シ銀たんのぞる染色ヲ施シタ。

即チ陰性肺炎菌ハ陰性カラ陽性ニ變リ陽性肺炎菌ハ其儘陽性ヲ保ツタノデアル。

第 1 表

染色所見 陰性菌	17 時 間 培 養 直 後 被 染 色 性	n/10 (H ₃ CO ₂ H) 作 用 後 被 染 色 性	染色所見 陽性菌	17 時 間 培 養 直 後 被 染 色 性	n/10 H ₃ CO ₂ H 作 用 後 被 染 色 性
孫 俊	[-]	+	藤 岡	+	+
大 山	[-]	+	李 鳳	+	+
具 旺	[-]	+	佳 峯	+	+
金 寶	[-]	+	金 年	+	+
崔 正	[-]	+	李 鎬	+	+
三 中	[-]	+	鄭 鳳	+	+
鄭 玉	[-]	+	李 康	+	+
金 鐘	[-]	+	李 慶	+	+
金 夫	[-]	+	丁	+	+
海 平	[-]	+	中 村	+	+

註 [-] 菌體ハ染ラナイガ菌體周圍ガ無色透明ナルモノ

第 2 項 豫 備 實 驗 (B)

10/nNaOHヲ用ヒ豫備實驗(A)ト同様ナ操作後染色ヲ施シタガ第2表ノヤウナ所見ヲ得タ。

第 2 表

染色所見 陰性菌	17 養被	時 直染	間 後色	培 ノ性	n/10NaOH 作 用被 後 染 ノ性
孫 俊			(-)		-
大 山			(-)		-
具 旺			(-)		-
金 寶			(-)		-
崔 正			(-)		-
三 中			(-)		-
鄭 玉			(-)		-
金 鐘			(-)		-
金 夫			(-)		-
海 平			(-)		-

染色所見 陽性菌	17 養被	時 直染	間 後色	培 ノ性	n/10NaOH 作 用被 後 染 ノ性
藤 岡			+		-
李 鳳			+		-
佳 峯			+		-
金 年			+		-
李 鎬			+		-
鄭 鳳			+		-
李 康			+		-
李 慶			+		-
丁			+		-
中 村			+		-

即チ豫備實驗(B)ニ於ケル所見ハ豫備實驗(A)ト異リ陰性肺炎菌ハ依然トシテ陰性ヲ保ツ
モ菌體周圍ノ白色輪狀帶ヲ缺キ、陽性肺炎菌ハ陽性ヨリ陰性ニ變ツタノデアル。

第 3 項 豫 備 實 驗 (C)

肺炎菌ノ陰性菌ト陽性菌トノ各10株ツツノ斜面寒天培養ヨリ 夫々集落ヲ搔キ集メ10/nCH₃
CO₂Hデ40°C1時間處理シテ遠心沈澱ヲ行ヒ沈澱菌ヲこるべんニ移シ之ニ常水ト細末硝子片
トヲ加ヘ1時間振盪シ更ニ遠心沈澱洗滌ヲ繰返スコト8回之レカラ塗抹標本ヲ作り火焰固定後
鹽類ノ脫除ノ目的ニ1晝夜水洗銀たんのぞる染色ヲ施シ得タ所見ハ第1表ト變ル所ガナカツ
タノデアル尙ホ10/nNaOHヲ用ヒテ同様ノ操作ヲ行ツタガ第2表ト同様ノ所見ヲ得タノデア
ル。

第 3 章 實驗材料並ビニ抽出方法

第 1 項 菌 株

上記ノ豫備實驗ニ使用シタ肺炎菌ニシテ而モ本染色上陰性菌ト陽性菌各10株デアル。

第 2 項 抽出ニ使用スル液

本實驗ニハn/10CH₃CO₂H, n/10NaOHヲ用ヒタ。

第 3 項 菌 培 養

記ノ組成ヲ有スル血液寒天培養ヲ使用シタ。

寒 天 80.0g

肉えきす 10.0g

べふとん 10.0g

水 1000.0g

之ニ牛血液ヲ10%ノ割合ニ加フ、但シ牛血液ハ58°C30分間滅菌シタ非働性ノモノデアル。

第4項 培養時間

24時間培養ノモノヲ用ヒタ。

第5項 菌體洗滌

斜面血液寒天培養ノ菌苔ヲ搔キ集メテ無菌常水中ニ投ジ振盪後ガーゼデ濾シ之ヲ遠心沈澱シ沈澱ニ水道水ト硝子片トヲ加ヘ振盪シタ斯ヤウニ遠心沈澱洗滌ヲ2回繰返シ可及的ニ有機物等夾雜物ノ除去ニ努メタノデアル。

第6項 菌體乾燥

上記ノ洗滌シタ菌塊ヨリ水分除去ノタメ37°Cノ乾燥器ニ入レテ乾カンテ秤量ノ正確ニ便ナラシメタ。

第7項 菌抽出方法

陽性並ビニ陰性ノ乾燥菌ヲ各5.0g宛秤ツテ夫々化學的清淨ナ器ニ入レ之ニ $n/10\text{CH}_3\text{COH}_2$ 或ハ $n/10\text{NaOH}$ ヲ100cc宛入レ40°C1時間攪拌シツツ加温シ之ヲ硝子細末片ト共ニ振盪、1時間ノ後直チニ遠心沈澱ヲ行ツテ上清ヲ2分シタ。

(A) 其ノ半分ハ鹽類並ビニ酸ノ除去ノタメセロふあん紙デ2晝夜間透析ヲ待ツテ化學的清淨ノ蒸發皿ヲ用ヒ重湯煎上デ蒸發乾燥ヲ行フテ之ニ再蒸餾水ヲ添加シテ實驗ニ供シタノデアル。

(B) 他ノ半分ハ直ク實驗ニ使用シタ。

第4章 抽出物ノ物理化學的性狀

上記ノ乾燥菌ニ $n/10\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ヲ40°C1時間作用シ遠心沈澱シタ上清ハ陰陽性菌何レニ於イテモ淡黃色清澄デアツタ。

セロふあん紙デ2晝夜透析シタ色調ハ淡黃色清澄デアツタ。

重湯煎上デ蒸發乾燥シタモノハ何レモ淡黃色無晶形體デアツタ。

第 1 項 抽出物ノ沈澱反應

上記ノ乾燥シタ抽出物(A)ニ再蒸餾水20ccヲ添加シ次ノ沈澱反應ヲ試ミタノデアル。

1. 抽出物水溶液3ccニ鹽酸ヲ加ヘテ強酸性トナシ新鮮ナタンニん酸溶液(40%)ヲ滴下シタガ帶褐色ノ沈澱ヲ見ナカツタ。
2. 抽出物水溶液3ccニ少量ノ醋酸ヲ加ヘ酸性トシタモノニビクリン酸溶液ヲ滴下シタガ黃色ノ沈澱ヲ見ナカツタ。
3. 抽出物水溶液3ccニ1—2滴ノするふおさるちーる酸(10—20%ノ水溶液)ヲ加フルトキハ白色沈澱ヲ發生シナカツタ。

4. 煮沸試驗

- (1) 抽出物水溶液1cc+水1cc
- (2) 抽出物水溶液1cc+0.2%食鹽1cc
- (3) 抽出物水溶液1cc+0.02%醋酸1cc
- (4) 抽出物水溶液1cc+0.4%食鹽水0.5cc+0.04%醋酸0.5cc

以上悉ク陰性ニ終ツタ。

5. 抽出物水溶液ニ硫酸銅、昇汞、鉛糖ヲ加ヘタガ沈澱ヲ認メナカツタ。

以上ノ沈澱反應ハ何レモ陰性ノ結果ヲ見タノデアル。

第 2 項 抽出物ノ呈色反應

余ハ更ニ酸($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$)ヲ菌ニ作用シタ上清(B)ニ就イテ次ノ方法ニ依ツテ檢索シタ。

1. 濾紙デ抽出物ヲ濾過シ濾液ヲ貯ヘ置イテ紙上ノ殘渣ヲ濾紙ト共ニ4分シテ次ノ反應ヲ陰陽性菌ノ兩者ニ就イテ夫々行フタ。

- (1) Millon 反應 上記ノ1分ヲ試験管ニ投ジ之ニ0.5ccノ蒸餾水ヲ入レ振盪シテ Millon ノ試藥ヲ1—2滴ヲ加ヘタガ沈澱ヲ生ジナイ、久シク放置シテ煮沸シタガ赤染シナイ即チ陰陽性菌兩者トモニ陰性ノ結果トナツタ。

- (2) くさんとぶろていん反應 上記ノ1分ヲ試験管ニ投ジ之ニ0.5ccノ蒸餾水ヲ入レ振盪後1ccノ濃硝酸ヲ加ヘテ煮沸シタガ黃染シナイ即チくさんとぶろていん反應陰性デアツタ。

- (3) びうれつと反應 上記ノ1分ヲ試験管ニ投ジ0.5cc蒸餾水ヲ入レ振盪後之ニ $\frac{1}{10}$ 容積ノ10%苛性曹達ヲ加ヘ1%硫酸銅ヲ滴下シテ振ツタガ紫青色ヲ呈シナイ。即チびうれつと反應陰性ニ終ツタ。

- (4) 濾液1ヲ水溶上ニ蒸發シテ20ccトナシ之ニ20gヲ硫酸あんもんト3—4滴ノ稀硫酸ヲ混和シタガ白色絮狀ノ物質ヲ折出シタ之あるぶも—ゼデハナイカト思ヒあるぶも—ゼノ反應ヲ試ミタガびうれつと、みろん、くさんとぶろていんノ反應何レモ陰性ニ終ツタ。
- (5) (4)ノ濾液ニ就イデペふとん反應即チびうれつと反應ヲ試シタガ陰性ニ終ツタ。又一方せろふあん紙デ透析シ蒸發シタモノニ就イデびうれつと、みろん、くさんとぶろていん反應ヲ試シタガ何レモ陰性ニ終ツタ。次ニn/10NaOHデ抽出シタモノヲせろふあん紙デ透析シ前同様ニ蛋白反應ヲ試シタガ何レモ陰性ノ結果トナツタ。

以上ノヤウニ余ノ實驗成績ハ酸又ハあるカリデ抽出シタ物ハ悉ク蛋白反應ナク常ニ終ツタ。

- (6) (4)ノ濾液3ccニ1滴ノ5%a—なふと—あるこほ—る溶液ヲ加ヘ之ニ1—2ccノ硝酸、亞硝酸ヲ含マナイ濃硫酸ヲ靜ニ注加シテ下層シタガ兩液ノ接觸面ニ紫紅色ヲ呈シタ。之ノ反應ハ蛋白ノ礎石ナルぐるこざみんニ基因スルモノデアル該ぐるこざみんハ含水炭素ナルコトカラ余ハ葡萄糖ノ銀試驗ヲ試シタノデアル。
- (7) 銀試驗 セろふあん紙デ透析シタモノヲ試験管ニ5ccヲ入レ之ニ $\frac{1}{2}$ 容積ノ苛性ソーダ $\frac{1}{2}$ 容積ノあんもニヤ水及ビ硝酸銀液ヲ混和シ試験管ヲ平等ニ強ク熱シタガ黑色ノ沈澱ヲ生ジ管底ニ美麗ナ黑色ノ銀鏡ヲ見タ。

第 5 章 銀たんぞるニ對スル保護作用ノ檢索

第 1 項 菌抽出液ノ作リ方

余ハ陰性菌陽性菌各2.0g宛ヲ秤量シn/10CH₃CO₂Hデ抽出液ヲ作り、8晝夜透析ノ後蒸發血デ乾燥シタモノハ兩者共ニ0.65gニシテ之ニ10ccノ再蒸餾水ヲ注入混和シテ比較實驗シタノデアル。

第 2 項 實驗材料

Ag Sol ノ原液ハ濃厚ニ過ギルカラ稀釋液ヲ用ヒタ。

1. Ag Sol 0.3cc
再蒸餾水 99.7cc
2. 單寧酸溶液
40%水溶液
3. 麩鹽水

反應ヲ促進スル目的=0.1%ノ食鹽水ヲ用ヒタ。

4. 試 驗 管

化學的清淨ナ Widal 氏試験管

第 3 項 實 驗 方 法

A (1) 菌 Extrakt	1.0cc
0.1%食鹽水	1.0cc
40%單寧酸液	0.5cc
(2) 稀 Ag Sol	1.0cc
B (1) 水 道 水	1.0cc
0.1%食鹽水	1.0cc
40%單寧酸溶液	0.5cc
(2) 稀 Ag Sol	1.0cc

(1)ノ混和シタモノ=(2)ヲ注加シタガ所見第3表ト同シ。

第 3 表

	稀釋 Ag Sol 混 和直前ノ色調	混和後30—60 秒ノ所見	室 溫 放 置 5 分ノ後
陰性菌(10株共=)	淡 黃 色	淡 黃 色	淡 黃 色
陽性菌(10株共=)	淡 黃 色	淡 黃 色	淡 黃 色
水 道 水	淡 黃 色	血 赤 色	暗 赤 色

第3表=見ルヤウ=陰性菌ノ Extrakt =陽性菌ノ Extrakt =對照=用ヒタ水道水 = 比ベ
レベ銀たんのぞる = 對シ保護作用ヲ有シタノデアル。

即チ對照試験トシテノ水道水ハ稀 Ag Sol 混和=依ツテ淡黃色ノ液ガ30—60秒ノ後漸次血
赤色=變ジ5分後ハ暗赤色=變ジタノデアル、然ル=菌ノ抽出液ヲ使用シタモノハ陰性菌モ
陽性菌モ兩者トモ=室溫=於イテ變化シナイ、他ノ殘餘ノ陰性菌及ビ陽性菌各9株モ以上ノ
所見ト同様デアツタ。

B (A)=於イテハ混和後室溫=於イテ反應ヲ檢シタガ反應ヲ促進サス目的デ混和液ヲ60℃
=2—5分間加溫シタガ第4表ノ所見ヲ得タ。

即チ加溫スル時ハ菌ノ抽出液ヲ混シタモノハ淡黃色カラ帶赤びーる色=變ツタガ沈澱ヲ見
ナカツタ之ヲ5時間室溫=放置シタガ帶赤びーる色ヲ保持シ陰性菌陽性菌各株共何レ=於イ
テモ差異ヲ認メナカツタ。

對照ノ水道水ヲ混シタモノハ加熱=ヨリ帶紫灰色ヲ呈シ濁濁ヲ見。5時間室溫=放置スル

第 4 表

	加 熱 前	加 熱 5 分 間	加 熱 シ タ モ ノ 5 時 間 室 温 放 置
陰性菌(10株共=)	炎 黄 色	帶赤ビール色	帶色ビール色
陽性菌(10株共=)	淡 黄 色	帶赤ビール色	帶色ビール色
水 道 水	淡 黄 色	帶紫灰色濁濁	帶紫灰色 粗大沈澱

トキハ帶紫灰色粗大沈澱ヲ見タ。

之ヨリ見ルトキハ菌體カラノ抽出液ハ陽性菌陰性菌ノ間ニ差異ヲ認メナカツタガ對照ノ水道水ニ比ベレバ遙ニ大ナル保護作用ヲ有スルコトヲ得タ。

第 6 章 結 論

1. 菌塗抹標本ニ酸ヲ作用サセルトキハ陰性菌ハ陽性菌ニ變リ、陽性菌ハ其儘陽性ヲ保ツタノデアルガあるカリヲ作用サセルトキハ陰性菌ニ依然トシテ陰性ヲ保ツモ菌體周圍ノ無色輪狀帶ガナクナリ陽性菌ハ陰性ニ變ツタノデアル。

2. 酸或ハあるカリデ抽出シ得タ物質ニ就イテ蛋白反應ヲ試シタガ常ニ陰性ニ終ツタガモ一リシ反應並ニ銀鏡試驗陽性ニ現ハルコトヲ知り得タ。

3. 本銀たんのぞる被染色性陽性ノモノト陰性ノモノカラノ抽出液ニ就イテ銀ころいどニ對スル保護作用ヲ比較シタガ兩者間ニ差異ヲ認メナカツタ。對照ノ水道水ニ比ベテ遙ニ大ナル保護作用ヲ有スルコトヲ知り得タ。

稿ヲ終ルニ臨ミ御篇愛ナル御指導並ビニ本文ノ御校閲ヲ賜ウタ恩師細川教授ニ深甚ノ謝意ヲ捧ゲ又常ニ韓講師日高博士ニ御援助ヲ仰ギ眞ニ感謝スル次第デアル。

文 獻

- 1) 日高謙三；朝鮮化學會會報，第10卷，第16號，昭和14年，10號。