黄色ぶどう球菌の合成培地について

大 川 豊 太 郎

東邦大学医学部微生物学教室 (主任 桑原章吾教授)

[受付: 5月21日・1959年]

1. ま え が き

先に Gladstone¹⁾は16種のアミノ酸を含む合成培地の成分アミノ酸のうちでアルギニン, グリシン, プロリン, フェニールアラニン, パリンの5種アミノ酸がぶどう球菌の α -リジンの産生に重要であると報告し, Surgalla²⁾は同じくアラニン, アルギニン, チスチン, グリシン, フェニールアラニン, プロリン, パリン, の7種アミノ酸を含む合成培地で32 MHD の α -リジンが産生されるがアラニン, プロリンを除いた5種アミノ酸培地では α -リジンの産生は更に低下すること, プロリンの代りにグルタミン酸を用いて32~64 MHD, 18種アミノ酸培地で32~64 MHD, 最高128 MHDであることを報告している。

いずれもリジン産生能は比較的弱く毒素産生用培地としては実用性に乏しい。

著者は15種のアミノ酸を窒素源とする合成培地について先に多田等³⁾が報告した無ビタミンカザミノアシッド培地でぶどう球菌の発育をよく支持した比較的高濃度の磷酸塩環境における黄色ぶどう球菌寺島株の発育と α -リジン産生をアミノ酸及びビタミン抜取試験を行うことによつて検討し必須アミノ酸及びビタミンの検索を行うと共に旺盛な増殖と α -ヘモリジン産生を支持する合成培地を調製することが出来たのでここに報告する。

2. 実験方法

1) 培地及び培養: 基準培地として L-アルギニン塩酸塩 0.1 g/dl, L-チスチン 0.005 g/dl, L-プロリン 0.05 g/dl, L-ヒスチジン塩酸塩 0.01 g/dl, グルタミン酸ソーダ 0.1 g/dl, L-トリプトファン 0.001 g/dl, L-アスパラギン 0.1 g/dl, L-チロシン 0.01 g/dl, DL-アラニン 0.01 g/dl, DL-パリン 0.01 g/dl, L-ロイシン 0.01 g/dl, DL-メチオニン 0.01 g/dl, DL-フェニールアラニン 0.01 g/dl, L-リジン塩酸塩 0.01 g/dl, の15種アミノ酸, ビタミンとしてパントテン酸 $\text{Ca}^{107}/\text{ml}$, ビタミン B_1 10^{-7}M , ニコチン

酸アミド 10^{-4}M , 磷酸緩衝液 (Soerensen, pH 7.6) $1/20 \text{ M}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1/1250 \text{ M}$ を含む培地を 110°C , 20 分間高圧滅菌したものを用いた。発育をみるためには小試験管に各々 3 ml 宛分注した培地に培養直前に滅菌ぶどう糖 (20 g/dl) を 0.2 g/dl に加え斜面寒天 20~24 時間培養の黄色ぶどう球菌 (寺島株) を生理食塩水にて 1 回洗滌し 0.7 mg 乾燥量/ml の懸濁液を作り培地の $1/100$ 容を接種して 37°C に静置培養した。同時に毒素産生用培地 (7 ml 宛分注) にはこのほか更に粉末寒天 (Difco Bacto-agar) を 0.2 g/dl に加えデシケーターに納め炭酸ガス (ドライアイスを用いた) を約 20% に入れて 37°C に静置培養した。

2) アミノ酸抜取試験: 横山⁴⁾の方法に準じて1種宛アミノ酸を抜取つた培地の発育混濁度を相互に比較しつつ不必要なアミノ酸を順次抜取つていった。

3) ビタミン抜取試験: アノミ酸抜取試験に準じた。

4) 発育混濁度の測定法: 光電比濁計 (エルマ又は伊藤超短波製) を用い 470 μ で比濁度を測定し混濁度乾燥量標準グラフより乾燥量として菌量を計つた。

5) α -リジン測定法: 37°C 3~5 日間培養した培養液を濾紙 (東洋濾紙 No. 131) で濾過後濾液を遠心 (10,000 rpm, 15 分間) してえた上清を 1 列の試験管に生理食塩水で倍数に希釈した後新鮮な脱線維素家兎血球液を 3~4 回生理食塩水で洗滌して作つた 2% 血球浮遊液を培養濾液上清と等量 (0.5 ml) に加えよく混和し 37°C に保温し 60 分~120 分間観察して完全溶血を起した最大稀釈試験管における毒素液の稀釈倍数 (2^n) をもとめ, 2^{n+1} で濾液の 1 ml 当りの MHD 数を示した。即ち濾液原液 (1 管目) で完全溶血なら 2^1 , 8 管目 ($2^7=128$ 倍稀釈) なら血球液で更に 2 倍に稀釈されるから 2^8 が

OKAWA Toyotarō: Studies on the Composition of Synthetic Medium Suitable for Toxin Production of *Staphylococcus aureus* Department of Microbiology, School of Medicine, Tohō University. — Jap. J. of Bact., 14(12), 1016-1020, 1959.

1 ml 当りの MHD 数となる。

3. 実験成績

1) 塩類の発育に及ぼす影響

a. Mg 塩：基準培地のうち $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度は $1/2,500$, $1/1,250$, $1/500$ M が発育に適當であるが (図1) この際に 磷酸塩濃度との相互関係がみられ Mg 濃度が

図1 15 アミノ酸合成培地での磷酸塩-
 MgSO_4 の相互関係

(ぶどう糖 0.2 g/dl
ピタミン 添加
48 時間培養)

図2 15 アミノ酸合成培地での磷酸塩濃度の影響

(MgSO_4 M/1,250)
(ぶどう糖 0.2 g/dl)

少ないと磷酸塩濃度の多いところで発育が阻害される。

b. 磷酸塩：磷酸緩衝液 (Sørensen pH 7.6) の濃度は図1, 図2に示す様に MgSO_4 M/1,250~M/2,500, ぶどう糖 0.2 g/dl の存在において M/20 の濃度が最も安定した発育を示すことを知った。OM 及び $1/5$ M では強く阻止された。

2) ぶどう糖の影響：基準培地のうちぶどう糖の濃度は 1.0, 0.5, 2.0 g/dl で発育は最も良いが 1.0, 2.0 g/dl では磷酸緩衝液 M/20 でも pH が低下し毒素産生のためには不適當であつた。増殖には 0.5 g/dl, 毒素産生には 0.2 g/dl を用いた。

3) 寒天の影響：15 アミノ酸培地に 0.2, 0.1 g/dl に寒天を加えても寒天無添加の場合と比べて発育は殆ど変わらないが, 0.5 g/dl に加えると少しく阻害される。 α -リジン産生は無添加の場合でも MHD/ml 2^{8-9} であるが寒天を 0.2 g/dl に加えると 2^{10-11} であつた。7 アミノ酸培地 (アルギニン, チスチン, グリシン, プロリン, ヒスチジン, グルタミン酸, トリプトファン) でも無添加で 2^{7-8} , 0.2 g/dl 添加で 2^9 であつた。然し時として寒天を添加しても無添加の場合と同じく MHD/ml 2^9 で寒天の毒素産生促進効果の示されない場合もあつた。

4) CO_2 の影響： CO_2 はぶどう球菌毒素産生用に必要であることは古くから知られているが^{5), 6)}, 15 種アミノ酸合成培地でも CO_2 が必要であつた。 CO_2 はドライアイスを用いドライアイス 1 g が CO_2 約 580 ml として計算した。 CO_2 環境における発育は対照と殆ど大差がないが α -リジン産生は CO_2 を 20% に含む大気中が最もよく, 10, 30% が之に次ぎ 5% で更に低下し 0% で最も悪かつた。

5) アミノ酸の抜取試験：基準培地中の 15 種アミノ酸より 1 つ宛のアミノ酸を抜取つて発育 (48 時間観察)

表1の1 合成培地におけるアミノ酸抜取の
発育と α -リジン産生に及ぼす影響 (1)

試料	抽出液	Arg.	Cys.	Gly.	Pro.	His.	Glut.	Tryp.	Asp.	Leu.	Ala.	Val.	Met.	Pha.	Lys.
14	a) 100% b) 10% c) 2%														
13	a) 0.07 b) 0.02 c) 2%														
2	a) 0.03 b) 1% c) 2%														
11	a) 0.4 b) 1% c) 2%														
10	a) 0.7 b) 1.0% c) 2%														
9	a) 0.42 b) 0.7% c) 2%														
8	a) 5.0 b) 1.5% c) 2%														

* a) 寒天無添加培地 b) 寒天添加培地
c) MHD 数/ml

表 1 の 2 合成培地におけるアミノ酸抜取の発育と α -リジン産生に及ぼす影響 (2)

アミノ酸	抜取	15 アミノ酸	Arg.	Cyst.	Gly.	Prol.	Hist.	Glut.	Tryp.	Asp.
7	a) 0.53 b) 1.6 c) 2.4									
6	a) 0.7 b) 1.6 c) 2.9									
5	a) 0.77 b) 2.8 c) 2.19									
4	a) 0.5 b) 0.22 c) 2.7									
3	a) 0.44 b) 0.08 c) 2.4									
2	a) 0.43 b) 0.92 c) 2.19									
1	a) 全上 b) 全上 c) 全上									
1	a) 全上 b) 全上 c) 全上									
0	a) 全上 b) 全上 c) 全上									

* 同前

と α -リジン産生 (3~5 日観察) を調べると表 1 の 1 及び表 1 の 2 に示す様にリジン、フェニールアラニン、メチオニン、ロイシン、バリン、アラニン、チロシン、アスパラギンの順に削除する事が可能でありこれ等の場合には発育、 α -ヘモリジン産生に悪影響を及ぼさないで 15 種アミノ酸培地における発育と α -リジン産生の 80% 以上の値を示した。発育と α -ヘモリジン産生の様子は大体平行関係にあることが分つた。最後にアルギニン、チス

図 3 15 アミノ酸培地での発育及び α -リジン産生の時間的経過

チン、グリシン、プロリンは全く不可欠であるがヒスチジン、グルタミン酸、トリプトファンは促進的に作用することが分つた。15 アミノ酸及び 7 アミノ酸培地における増殖と α -リジン産生の時間的経過は図 3 に示す様に発育は 15 アミノ酸培地では旺盛であり又時間的にも早い増殖曲線を示す。7 アミノ酸培地では増殖曲線の立上りが少しく傾斜し 15 アミノ酸培地よりは劣るが α -リジン産生は 15 アミノ酸培地と殆ど変りなく 3~4 日で最高値を示した後 M 型の産生曲線を示した。15 及び 7 アミノ酸培地共に 10 代以上継代することが可能である。

6) ポリビニールピロリドンの影響: 15 アミノ酸培地にポリビニール化合物 (和光純薬、プラスドン N.P.K 30, K 60, K 90) を寒天の代りに 0.2 g/dl に加えると発育は必ずしも増進するとはかぎらぬが寒天を 0.2 g/dl に添加した場合と殆んど同じ α -リジン産生効果をうることが出来た (MHD/ml 2^{10-11})。アミノ酸培地でも同様の効果がみられた。この 2 つの培地のいずれでもプラスドンの粘度が大きい方 (K 90) が効果が多かつた。プラスドンの濃度は 0.05~2.0 g/dl の間では発育及び α -リジン産生ともに殆んど大差がみられなかつた。

7) 核酸塩基の影響: 15 アミノ酸及びアミノ酸培地に核酸塩基 (アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、チトシン) を 0.005 g/dl に夫々 1 つ宛添加するとウラシルが発育促進的に作用し α -リジン産生も 1~2 管増強される場合が多い。

8) その他のアミノ酸の影響: 窒素源として前述の 7 種アミノ酸に更に DL-タウリン、DL-チトルリン、DL-オルニチン、DL-セリン、DL-イソロイシン、DL-スレオニン、L-ハイドロキシプロリン、L-チステインの 8 アミノ酸を添加しても又この 8 つのアミノ酸の抜取試験を行つても増殖及び α -リジン産生を特に促進するアミノ酸を見出すことが出来なかつた。

9) ビタミンの抜取試験: 7 種アミノ酸基準培地の 3 ビタミン即ちニコチン酸アミド、ビタミン B₁、パントテン酸 Ca の他に更にビタミン B₂、葉酸、ピメリン酸、ビタミン B₆、ピオチンを添加した 7 アミノ酸-8 ビタミン培地から各ビタミン 1 種宛を抜取ると B₂、葉酸、ピメリン酸、B₆、ピオチンはいずれも不必要であるがニコチン酸アミド、ビタミン B₁ の 2 つが必須でありパントテン酸 Ca が促進的に作用することを知つた。

10) その他の黄色ぶどう球菌々株についての実験: 寺島株以外に化膿性疾患々より分離した黄色ぶどう球菌 14 株中 13 株がアミノ酸培地で表 2 に示す様にかなり発育を示しそのうち 6 株が 8~64 MHD/ml の α -リジン

表 2 化膿性疾患由来のぶどう球菌 14 株の
7, 6, 5 アミノ酸培地での発育と
 α -リジン産生性

培地	発育*	α -リジン*	寺島株
7	11 1 0 1 1	0 0 3 3 0	2 ⁹
6	8 2 0 1 3	0 1 1 3 0	2 ⁸
5	1 1 8 1 3	0 0 0 1 0	2 ⁸
	0 0 0 4 10	0 0 0 0 0	2 ¹

* 15 アミノ酸培地 (寺島株) との比較

□ 100%以上, ▨ 80~100%未満,
▩ 50~80%未満, ▤ 20~50%未満,
■ 0~20%未満

を産生するが 6 アミノ酸培地 (7 アミノ酸培地よりトリプトファンを削除) で 11 株が発育, 5 株が α -リジンを産生をするが更にグルタミン酸を削除した 5 アミノ酸培地では 11 株が発育はするが発育度は低く α -リジン産生株はわずかに 1 株にすぎなかつた。寺島株をふくめていづれの菌株もこの合成培地ではコアグラエゼの産生能は非常に低く培養濾液原液でわずかにクエン酸加血漿のフィブリン析出を見るにすぎなかつた。ヒアルロニダーゼは産生されなかつた。 α -リジンは mld マウス (4 週 dd) i.p. で 0.02 ml, i.v. でも 0.02 ml で家兔皮内に 0.005 ml の注射で著明な発赤, 壊死を惹起した。この毒性は α -抗毒素で特異的に中和された。

4. 考 察

黄色ぶどう球菌寺島株がアミノ酸を窒素源とした合成培地で $MgSO_4$ との共存で比較的高濃度の磷酸塩環境で安定で旺盛な発育を示すことが分つたがこれは pH の安定をとまうので毒素産生用培地として好都合であることが分つた。この合成培地ではアミノ酸由来の培地と違って寒天を添加せずともかなりの α -リジンが産生されるが寒天を添加したり又ポリビニールピロリドンを添加して粘度を増加すると α -リジン産生を少しく高めた。アミノ酸を抜取つて 7 種アミノ酸では 15 種アミノ酸培地よりも発育は少しくおとるが α -リジン産生度は殆んど変りがないことが分つた。この 7 種アミノ酸のうちヒスチジン, グルタミン酸, トリプトファンの 3 アミノ酸は増殖, α -リジン産生に対して促進的に作用するもので 3 者がなくてもかなりの発育と α -リジン産生がみられる。然しアルギニン, チスチン, グリシン, プロリンの

4 アミノ酸はすべて必須でこのうち 1 つが欠けても発育も α -リジン産生もみられない。寺島株以外の化膿性疾患々々から分離した菌株ではグルタミン酸は増殖に比較して α -リジン産生を促進する様に思われた。

以上の様なアミノ酸抜取試験を行うと Gladstone¹⁾ や Surgalla²⁾ の報告した合成培地とかなり違つたアミノ酸組成となり発育度は比較することが出来ないが α -リジン産生ははるかに著者の培地の方が高いことが分る。使用した菌株ではビタミンの抜取試験によつてニコチン酸アミド, ビタミン B_1 が必須であることは先人の報告^{3,4)} と同様である他パントテン酸 Ca は促進的に作用することが分つた。この場合発育と α -リジンの産生度は大体比例の関係にある。7 アミノ酸及び 6 アミノ酸培地では寺島株以外の菌株もかなり良好な発育と α -リジン産生を示すことが分つた。即ち 13~11 株が寺島株の場合の 20~100%以上の発育度を示し, α -リジンは 7 種アミノ酸培地で 6 株が 20~60%, 6 種アミノ酸培地で 5 株が 35~75%の MHD/ml を示した。又 1 株を除いた 12 株はビタミン B_1 なくして発育は顕著ならず α -リジンの産生は全くみられなかつた。

5. 結 論

著者は以上の実験により次の主な知見を知ることが出来た。

1) 比較的高濃度磷酸塩環境においてアミノ酸抜取試験により 7 種アミノ酸 (アルギニン, チスチン, グリシン, プロリン, ヒスチジン, グルタミン酸, トリプトファン) を窒素源とする合成培地が黄色ぶどう球菌寺島株の α -リジン産生に好適であることを知つた。

2) α -リジン産生は増殖と大体比例関係にあるが寒天添加の代りにポリビニールピロリドンでもよく, CO_2 は 20%濃度で α -リジン産生を促進する。

3) 7 アミノ酸のうちアルギニン, チスチン, グリシン, プロリンの 4 アミノ酸が増殖及び α -リジン産生に必須でヒスチジン, グルタミン酸, トリプトファンがこれを促進する。ビタミンのうちニコチン酸アミド, ビタミン B_1 が必須でパントテン酸 Ca は促進的に作用する。

4) 寺島株以外の菌株においてもこの 7 アミノ酸培地が発育及び α -リジン産生をかなり支持する。

稿を終るに臨み御懇篤な御便達と御校閲を賜つた桑原章吾教授に感謝の意を捧げ多田助教授の御指導を感謝します。

(この研究の一部は昭和32年4月7日第30回日本細菌学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Gladstone, G. P.: Brit. J. Exp. Path. 19, 208~226, 1938.
- 2) Surgalla, M. J.: J. Inf. Dis. 81, 97~111, 1947.
- 3) 多田庄三, 大川豊太郎, 桑原章吾: 日本細菌学雑誌, 12, 580, 1957(学会).

- 4) 横山桂寿: 日本細菌学雑誌, 11, 535, 1956.
- 5) Parker, J. T., Hopkins, J. G. and Gunther, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 344, 1926.
- 6) Burnet, F. M.: J. Path. Bact. 33, 1, 1930.
- 7) Knight, B. C. J. G.: Biochem. J. 31, 731, 1937.
- 8) Gladstone, G. P.: Brit. J. Exp. Path. 18, 322, 1937.

正 誤 表

第14巻 第10号 p. 829~833

頁	誤	正
829 標題	結核動物の脱感染に……	結核動物の脱感 _作 に……
〃 右上3行	TC 法によつて	TCA 法によつて
〃 〃 5行	一層を	一部を
〃 〃 9行	含むも,	含む為,
831 右上4行	PP _{II} に	PF _{II} に
〃 〃 9行	図 IIa, IIIb	図 IIb, IIIa,
832 右下13行	特に CF	特に PF _I