ぶどう球菌のコアグララーゼ産生用半合成培地について

林 道 雄

東邦大学医学部微生物学教室 (主任：桑原教授)
(指導：多田助教授)

〔受付：6月8日，1960年〕

緒 言

病原ぶどう球菌は大部分がコアグララーゼを産生することが既に知られており、又 Bergy's Manual of Determinative Bacteriology (1957) の7版には *Staphylococcus aureus* はコアグララーゼを産生することが規定されている。

この様にコアグララーゼは病原ぶどう球菌の重要な特性であるが、そのコアグララーゼ産生の方法には従来獣肉成分¹⁻⁶⁾ 或はペプトン⁵⁾ を主窒素源としたものが多く用いられ、又カザミノアシッド^{2,3,6)} を用いた培地もあるがコアグララーゼの産生が高単位で且つ安定性のある実用培地はまだみられない。この高単位のコアグララーゼを大量にしかも再現性多く産生する培地の調製を目的として、無ビタミン性カザミノアシッドを窒素源とする半合成培地によるコアグララーゼ産生の条件を検討し^{2, 3} の新知見をえたのでここに報告する。

実験材料と実験方法

1. 基礎培地

無ビタミン性カザミノアシッド	1.0 g/dl
リン酸緩衝液* pH 6.6	1/10 M
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1/1,250 M
ビタミン：ニコチン酸アミド	10 ⁻⁵ M
サイアミン塩酸塩	10 ⁻⁷ M
パントテン酸 Ca	10 γ/ml

以上を蒸留水にとかして要すれば 10 g/dl HCl または 10 g/dl NaOH で pH 6.6 とし、三角コルベン 50 ml 容に 20~40 ml あて分注し 110°C 20 分間加熱滅菌する。

2. 培 養

斜面寒天に 20~24 時間培養した K-372 株 (群馬大学医学部微生物学教室今村博士より分与された株) を生理食塩水にかきとつて懸濁液を作り、比濁度〔エルマ光電

分光光度計 (4 型) を使用、470 mμ〕を測定して乾燥菌量 0.25 mg/ml 相当量に生理食塩水でうすめる。この菌液を培地に 1/100 容に接種して 37°C に保温し静置培養を行う。

3. コアグララーゼの測定

1~10 日間の培養液を 10,000 rpm 15 分間遠心して分離した上清を粗コアグララーゼ液として使用し、コアグララーゼ活性の測定法は今村ら⁵⁾ の方法に準じた。すなわちまずポリペプトン 2%，クエン酸ソーダ 1%，マーゾン 0.01% を含有する pH 6.6 の溶液でプラスマを 10 倍にうすめる。これに 2% ポリペプトン水 (pH 6.6) で適量にうすめたコアグララーゼ稀釈液を等量 (0.5 ml ずつ) に加え、37°C に保温して 60 分、120 分、16~18 時間目の 3 回に肉眼的に血漿凝固の有無を観察した。プラスマは人の O 型保存血液 (富士臓器株式会社血液銀行調製、血液はぶどう糖 1.33 g/dl, クエン酸ソーダ 1.32 g/dl, クエン酸 0.4 g/dl の混合した抗凝固液で 1.25 倍にうすめられている) のものを用いた。

実 験 成 績

1. 塩類の影響

1) リン酸塩

前述の基礎培地のうちリン酸緩衝液の濃度は MgSO₄ 1/1,250 M, pH 6.6, ぶどう糖無添加の場合に 1/5 M, 1/10 M, 1/20 M, 1/50 M, 1/100 M, 0 M のうち高濃度の 1/10 M, 1/5 M が発育もコアグララーゼ産生も良好であることを知った。これは α-リジン産生⁷⁾ の場合にリン酸塩が比較的高濃度 (1/10 M~1/20 M) で良好であることと相通ずる成績である。

2) Mg 塩

HAYASHI Mitio: Studies on the Semisynthetic Media Suitable for the Production of Staphylococcal Coagulase. Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University. — Jap. J. of Bact., 15 (12), 1250-1255, 1960.

* リン酸緩衝液：1 M KH₂PO₄ 1 容 + 1 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O 1.5 容の混合液を培地に 1/10 容に加える。

前述の基礎培地のうち MgSO_4 量を $1/250 \text{ M}$, $1/500 \text{ M}$, $1/1,250 \text{ M}$, $1/2,500 \text{ M}$, 0 M といろいろ変化させると最も低い 0 M 以外は菌の発育濁度曲線はいずれも概してゆるやかな傾斜で日時 (10日間観察) とともにほぼ同じ程度にまで上昇しコアグラールゼもほぼ同じ程度に産生されるが、時間的には $1/1,250 \text{ M}$, $1/250 \text{ M}$ の場合に最も早くコアグラールゼの産生をみた。

2. PH の影響

MgSO_4 量が $1/1,250 \text{ M}$, リン酸塩量が $1/10 \text{ M}$ の濃度でリン酸緩衝液の KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の混合の割合を

図 1. pH の影響 1 (ブドウ糖無添加)

かえて起始 PH 6.0, 6.6, 7.2 の 3 つの培地を作り, それぞれを比較すると, ブドウ糖を添加しない場合図 1. に示すように菌増殖はいずれの pH でも殆んど同じ程度にゆるやかな上昇線をえがくが, コアグラールゼは pH 6.6 培地の場合に最も高く (200×) かつ速かに (5日) 産生され, ついて pH 7.2, 6.0 の順に産生度が低下する。こ

れに反してぶどう糖を 0.5 g/dl の割合に添加したときは図 2 の如くいずれの培地でも増殖濁度は強くかつ 1 ~ 3 日で最高値に到達した後, やや下降して M 字型の濁度曲線を示すが, コアグラールゼは pH 7.2 及び 6.6 培地では 1 日目にすでに 20× まで陽性になつてもそれぞれ以上には上昇しなかつた。pH 6.0 培地では全く産生しなかつた。ぶどう糖添加の場合終末 pH は $4.4 \sim 4.8$ で無添加の場合の pH $5.8 \sim 7.2$ よりも低い。pH の低下はコアグラールゼの産生に不適當であると思われる。

3. ブドウ糖の影響

図 2. pH の影響 2 (ブドウ糖 0.5 g/dl 添加)

pH 6.6 に調製した前述の基礎培地にぶどう糖を添加しない場合には当初菌発育濁度は小さく, 10日間観察では漸次直線に近いゆるやかな傾斜で上昇し pH の低下は少なく ($5.8 \sim 6.0$ まで) とどまる。ぶどう糖を 0.2 , 0.5 , 1.0 g/dl に加えると菌発育は旺盛で M 字型に近い濁度曲線を示し pH は $4.6 \sim 4.4$ まで低下する。一方コ

図 3. トリプトファン、チスチンの影響

コアグラゼ産生を見るとぶどう糖添加の場合は無添加の場合 (200×) よりも著しく低く (2~20×) かつ時間的に早く活性が低下する。基礎培地にトリプトファン、チスチンをそれぞれ 0.005 g/dl に添加した時のぶどう糖の影響は前述と同じような結果となるが、ぶどう糖がなくても培養後半 (6~10日目) には既に活性度が低下しはじめるのが一般である。

4. トリプトファン、チスチンの影響

基礎培地 (pH 6.6, ぶどう糖なし) に L-トリプトファン、L-チスチンをそれぞれ 0.005 g/dl に加えると図 3 に示すように菌の増殖度はそれらを加えない時と殆んど変りがないが、コアグラゼ活性ははるかに高いことが判る。又この時に α-リジンの産生は非常に弱く、原液が家兎血球に対して僅かに不完全溶血を示すにすぎなかつ

た。トリプトファンとチスチンを同時に添加しないで単独に加えた時は、加えない対照 (20×) よりもはるかにコアグラゼ産生はよいが (2,000 ×), 同時に加えた時よりも産生時間がおくれる傾向が見られた。菌体の増殖濁濁度は単独の場合も同時に加えた場合も無添加の対照と殆んど変りがなかった。

5. ビタミン類の影響

基礎培地 (この場合トリプトファン、チスチンをそれぞれ 0.005 g/dl に加え、ぶどう糖なし) はニコチン酸アミド、サイアミン塩酸塩、パントテン酸 Ca の 3 ビタミンを含んでいるが、これに B₆ (1 γ/ml), 葉酸 (1 γ/ml), B₁₂ (0.1 γ/ml), ビオチン (0.0025 γ/ml), ビメリン酸 (1 γ/ml) の 5 ビタミンを追加すると増殖は殆んど変りがないが、コアグラゼ活性は 2,000× (18 時間値) で対照 (200×) よりも明らかに強かつた。

6. カザミノアシッドの濃度の影響

基礎培地に前項同様にトリプトファン、チスチンを加え、ぶどう糖を加えないでカザミノアシッドの濃度をかえて 2.0, 1.0, 0.5 g/dl の 3 種類の培地をつくり 3 者を比較すると、菌体の増殖は 2.0 g/dl が最もよく 1.0, 0.5 g/dl のものは殆んど同程度であるが、コアグラゼ産生は 2.0 (2,000×), 1.0 (500×), 0.5 g/dl (200×) の順に低下した。

7. 各種の糖の影響

基礎培地にトリプトファン、チスチンを加えたものにぶどう糖、レヴロース、ラクトース、サッカロース、ラムノース、キシロースの 6 種類の糖を別個に 1/100 M (ぶどう糖で約 0.18 g/dl) に加えた場合の各々を比較してみると、菌発育濁濁度は一般に M 字型の濁濁曲線を示し、ラクトース、サッカロース、ぶどう糖、キシロース、レヴロース、ラムノースの順位で発育度は低くなるが全般的には各糖共に大差を示さない。pH の低下はサッカロース添加の場合に最も甚しく pH 5.6~6.0 まで低下する。次にラクトース及びぶどう糖は Hp 5.8~6.2 まで低下するが、キシロース、ラムノースは起始 pH (6.6) より低下することとはなかつた。

コアグラゼ産生能に就ては全般に培養後 6~8 日目に最高値を示し、その活性度はラムノース (500×), キシロース (500×), レヴロース (200×), ラクトース (200×), ぶどう糖 (200×), サッカロース (100×) の順に低下し、ラムノース或はキシロース添加の場合には pH 値は低下することなくコアグラゼ産生能が良好であつた。この場合対照とした糖無添加培地とラムノース添加培地とを比較してみると、7 日目に無添加培地 200×, ラムノース添加培地 500× の成績を示した。

8. 嫌気的培養

基礎培地にトリプトファン、チスチンを加えぶどう糖無添加のものに流動パラフィンを重ねて嫌気的に培養した場合、菌の発育は好氣的培養よりもはるかに劣るが、コアグラゼ活性度は却って好氣的培養の場合 (K-372 株 20×, No. 104 株 100~200×) よりも良好で 7~9 日目に最高を示し、K-372 株で 200~500×, No. 104 株で 200~500×の値を示した。

チスチンとチオグリコール酸ソーダを別個に 0.005 g/dl, 0.01 g/dl, 0.02 g/dl, 0.05 g/dl の割合に添加するといずれの場合にも菌の発育は各々無添加の場合と殆んど同じ程度であるが、コアグラゼ産生能は添加によつていずれの場合にも却って低下する。

9. 攪拌培養法と静置培養法による大量培養

約 3 l 容のコルベンに 2 l の培地 (基礎培地にトリプトファン、チスチンを加え、ラムノース 0.08 g/dl の割合に添加してある) を入れ反転連続攪拌器を使用して培養すると、菌の発育は極めて旺盛で 5 時間目にすでに OD 470 mμ 0.65, 7 時間目に 1.3 となるが静置培養では 6 日目に OD 470 mμ 0.48 を示すに過ぎない。

しかしコアグラゼ産生能に就ては全く逆の関係を示して、静置培養の方は 3 日目 500×, 5 日目 1,000×, 6 日目 2,000×であるのに対して振盪培養 5 時間目が 10×位, 6 時間目 50×, 7 時間目 20×で極めて低かった。

10. 菌株による影響

これまでに述べた実験は主に K-372 株を使用した成績であるが、この株のほかに当教室で化膿性疾患々々から分離した 4 株と No. 104 株 (アメリカ Emory 大学 M. Tager 氏より都立衛研善養寺博士に分与されたもの) の合計 6 株のコアグラゼ産生性を、前項同様トリプトファン、チスチンを加えた基礎培地で比較してみると図 4 に示す如く 6 株とも増殖は殆んど変わらないが、コアグラゼ産生性はそれぞれ異なり No. 104 株が最高値を示し、次いで K-372 株が良好な値を示したが他の 4 株は 8~10 日目にようやく 500×を示すに過ぎなかった。この場合家兎血球に対する溶血性は No. 104 株が全然なく K-372 株は痕跡程度であつた。

11. プラスマ平板培地におけるコアグラゼ産生株の選択性

基礎培地に粉末寒天を 2 g/dl に加えてとかし、温時手早く 3,000 rpm 5 分間遠心して得た透明な上清を 50℃ に保つておいて 1/1 容の人血漿 (保存血遠心上清) を加え、ペトリシャーレに約 6 ml を分注して透明なプラスマ平板培地を作った。これに化膿性疾患患者から分離した黄

図 4. 菌株による影響

色ぶどう球菌或は K-372 株の 20 時間斜面寒天培養菌の微量を接種すると、コアグラゼ産生株は 16~48 時間後に集落の周辺に白濁輪を生ずる。この白濁輪には菌株によつて明瞭な白線をえがくものとびまん性の暈輪を生ずるものの 2 種がある。両者の特徴の著明なものを選んで 10 数代プラスマ平板培地に継代する一方、この様な特徴ある集落をえらんで肉汁ペプトン培地 (牛肉汁×3 稀釈液, ポリペプトン 1 g/dl, NaCl 0.5 g/dl, pH 6.6) に接種し 1~9 日間コアグラゼを定量的に測定して産生能の高い菌株を選択しようとした。10 代目に原株の 10 倍 (2,000) の産生能のある選択株を得たが、これを更に 14, 18 代と継代すると次第に産生能が低下していった。すなわちコアグラゼ産生の高い株をプラスマ平板培地でスクリーニングすることは必ずしも適当ではないことを知った。

12. 合成培地におけるコアグラゼ産生

大川⁹⁾の報告したぶどう球菌 α-リジン産生用の 7 種アミノ酸 [L-アルギニン塩酸塩 0.1 g/dl, L-チスチン 0.005 g/dl, グリシン 0.05 dl/g, L-プロリン 0.05 dl/g, L-ヒス

チジン塩酸塩 0.01 dl/g, グルタミン酸ソーダ 0.1 dl/g, L-トリプトファン 0.001 dl/g, パントテン酸 Ca 10 γ /ml, サイアミン塩酸塩 10^{-7} M, ニコチン酸アミド 10^{-5} M, リン酸緩衝液 (pH 7.6) $1/20$ M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $1/1,250$ M, ぶどう糖 0.2 g/dl, 寒天 0.2 g/dl (pH 7.6) のほか, 13 および 15 種のアミノ酸を主窒素源とするいずれの合成培地においても, K-872 株或は寺島株のコアグララーゼ産生性は非常に低く $20 \times$ プラズマはフィブリンの顆粒を形成する程度で凝固することはなかつた。

考 察

以上の実験成績が示す如く, カザミノアシッドを窒素源とする半合成培地におけるコアグララーゼ産生には, 先に多田等⁷⁾ の報告したぶどう球菌の旺盛な発育を支持する比較的高濃度のリン酸塩環境が α -リジン産生の場合と同様に好ましいが, 培養後半にはコアグララーゼ産生度は低下を来するのが一般であつた。

コアグララーゼが比較的耐酸性であることが報告されているが, 培地の pH の低下はコアグララーゼ産生には不適当でぶどう糖その他の糖の添加が pH の低下を伴いコアグララーゼ産生は低下する。しかしラムノース或はキシロースを添加すると酸形成およびガス産生もなく, つまりこの 2 つの糖は分解しないため pH の低下がなくコアグララーゼ産生には良好な結果が得られた。

又トリプトファン, チスチンを添加すると菌の増殖には殆んど影響がみられないが, コアグララーゼ産生度ははるかに増強される。同様なことはビタミン類 (ビタミン B₆, 葉酸, B₂, ビオチン, ピメリン酸等) の添加, カザミノアシッドの濃度の増加によつてもみられる。

コアグララーゼが酸化に対して不安定であり, コアグララーゼ粗液を大気中に放置することによりその活性は漸次低下するが, コアグララーゼ産生の際も好氣的培養法より嫌氣的培養法の方が良好な結果が得られた。しかしチステイン, チオグリコール酸塩を添加すると却つて産生の阻害がみられた。又酸化の激しい攪拌培養法では極めて活性が低かつた。これらはいずれも酸化がコアグララーゼ産生に不適当なことを示すものと考えられる。

ジフテリア毒素産生にも毒素産生に適した菌株が知られているが, コアグララーゼ産生にも菌株によつてその産生度は非常に異り菌株の選定が特に必要であることが判つた。菌株のコアグララーゼ産生性を増強するためのスクリーニングは, プラズマ平板培地上における選択法では必ずしも適当でないことが判つた。アミノ酸を主窒素源とする合成培地でのコアグララーゼ産生性は Lominski

等⁹⁾ の報告と同様に極めて低く実用に至らないことを知つた。

結 論

1) 大量の且つ高単位のコアグララーゼの産生を目的としたカザミノアシッドを主窒素源とする半合成培地を調製することが出来た。

2) この半合成培地でのコアグララーゼ産生には旺盛な菌の増殖を支持するリン酸塩と Mg 塩の濃度であれば充分であるが, 増殖とコアグララーゼ産生は必ずしも平行せず一般に培養後半 (6~10 日) には産生度は低下する。

3) ぶどう糖の添加は pH の低下を伴いコアグララーゼ産生には不適当で, 添加しない方が産生度および活性維持の点ですぐれている。但しラムノース或はキシロースの添加 ($1/100$ M) はコアグララーゼ産生には良好で pH の低下は認められず起始 pH を維持する。

4) 培地の起始 pH は 6.6 が最もよく 7.2, 6.0 の順にコアグララーゼ産生度が低下した。

5) トリプトファン, チスチンの添加および B₆, 葉酸, ビオチン, ピメリン酸の添加, カザミノアシッドの濃度の増加はいずれも菌の増殖性には殆んど影響を示さないがコアグララーゼ産生度を高めた。

6) 培地に流動パラフィンを重ねて培養すると, 菌の発育は抑制されるがコアグララーゼ産生能は上昇する。チステイン, チオグリコール酸塩を添加した場合は却つてコアグララーゼ産生能は阻止される。

7) 培地を連続攪拌培養すると菌の発育は飛躍的であるが, コアグララーゼ産生は極めて悪い。

8) コアグララーゼ産生には菌株の選択が不可欠である。

稿を終るに臨み御校閲を賜りました桑原教授に感謝の意を捧げ御指導と御援助下さいました多田助教授に謝意を表します。

本論文の要は第 5 回細菌毒素シンポジウム (飯坂・昭和 33 年 7 月) において報告した。

文 献

- 1) Rammelkamp, C. H. Jr., Badger, G. F., Dingle, J. H., Feller, A. E. and Hodges, R. G.: J. Inf. Dis. 86, 159-163, 1950.
- 2) Duthie, E. S. and Lorenz, L. L.: J. Gen. Microb. 6, 95-107, 1952.
- 3) Rogers, H. J.: J. Gen. Microb. 10, 209-220, 1954.
- 4) Smith, D. D. and Johnstone, J. M.: Brit. J. Exp.

Path. 39, 165-170, 1958.

- 5) 今村 晋, 亀田三男, 森田茂男 : 日本細菌学雑誌, 13, 1017-1022, 1958.
- 6) Duthie, E. S. and Haughton, G. : Biochem. J. 70, 125-132, 1958.
- 7) 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).
- 8) 大川豊太郎 : 日本細菌学雑誌, 14, 1016-1020, 1959.
- 9) Lominski, I., O'Hea, A. J., Goudie, J. G. and Porter, I. A. : Nature 166 (4216), 309-310, 1950.