赤痢菌の栄養要求に関する研究

(I) 栄養要求性ことにニコチン酸要求性について

中山 英男^{*1)}・川口 信行・元木 義信

山口県衛生研究所 (所長：芳野俊五博士)

[受付：6月27日・1960年]

赤痢菌の栄養要求性についてはすでに Koser 等¹⁾, Kligler 等²⁾, Dorfman 等³⁾ の研究がある。彼らによれば *Sh. paradysenteriae* のある菌株に対してはニコチン酸が重要な発育因子となると云う。更に Weil 等⁴⁾ は *Sh. flexneri* に属するある菌株は NiA^{*2)} を必須発育因子とすることを追試確認したが NiA 以外に Pantothenic acid を要求する菌株もあると報告している。また Braun⁵⁾ によれば赤痢菌の栄養要求はチフス菌に似ており大部分の菌株は Tryptophan を要求するとした。

しかしこれらの報告はいずれも材料とした菌型に限られており且その菌株数も少いので Genus *Shigella* 全体についての知見は得られておらず、また栄養要求性と菌型との関係等については殆んど知られていない。

我々は菌型の明らかな赤痢標準菌25株および患者より分離固定した赤痢菌 131株、計 156 株の栄養要求性をしらべたところ、①ブドー糖、無機アンモン、無機塩類よりなる簡単な基礎培地によく発育し、特に発育因子の添加を要しない菌株、②NiA を要求するもの、③NiA とアミノ酸の同時添加を要求するもの、④ Purine, Pyrimidine 塩基を必要とするもの、⑤ 栄養要求性が複雑でその要求性を明らかにし得なかつたもの等、菌株により種々の様相を示した。これらの要求性の相違は同一菌型の間でも時として見られることはあつたが、原則として菌型と関係のある場合が多く興味ある知見を得た。この報告では被検赤痢菌の栄養要求性について述べ要求性と菌型との関係についても論述した。

尚本論文の要旨は第12回日本細菌学会中国四国支部総会の席上で公表した⁶⁾。

* 1) 山口県立女子短期大学・山口県立医科大学微生物学教室

* 2) NiA: Nicotinic acid

実験材料と方法

1) 使用菌株：国立予防衛生研究所より分与をうけ Cooked Meat Medium 中で保存した赤痢標準菌株25株を用いた。標準菌株の Strain No. および菌型は表1に示した。この他昨年山口県各地で分離され当研究所で固定した赤痢菌 131株を用いた。これらの菌株は分離後普通寒天高層に保存されたものである。分離菌の菌型と菌株数は表2に要約した。標準株、野生株共に実験に供するに当つては菌型を更試験してから用いた。

2) 接種用培地：普通寒天斜面 (Polypeptone, 1.0%; 肉エキス, 0.5%; 寒天, 2.0%; pH 7.2) に菌を移植 37°C 24時間培養したものより接種菌をつくつた。

3) 接種菌液：接種菌をかきとり滅菌蒸水で遠心洗滌後蒸水に再浮游、生菌が大略 10^8 /cc になる様に水で稀釈して本液 2 滴あてを試験用培地に接種した。

4) 試験用培地：試験用基礎培地は Davis・Mingioli の培地⁷⁾ を改変したものでその 2 倍濃度の組成は次の通りである。K₂HPO₄, 1.5%; KH₂PO₄, 1.5%; (NH₄)₂SO₄, 0.4%; Na₃-Citrate, 0.1%; MgSO₄・7H₂O, 0.02%; ブドー糖, 0.8%。培地調製にさいしては磷酸塩、ブドー糖、その他の塩類の 3 群にわけて蒸水にとかし 10 Lb, 10 分間高圧滅菌後冷却をまつて 3 者を無菌的に混合しその 2.5cc あてを試験管に分注した。更に添加物、滅菌水を加え最終 5.0cc として使用した。尚これら一連の操作は全部無菌的に行つた。

5) 添加物：

NAKAYAMA Hideo, KAWAGUCHI Nobuyuki and MOTOKI Yoshinobu: Nutritional Studies in Genus *Shigella*. I. Nutritional Requirements--Special Reference to Niacin Requirement--Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health, Yamaguchi, Japan.—Jap. J. of Bact., 16 (1), 26-31, 1961.

表 1. 被検赤痢標準菌株とその栄養要求性

Strain	菌 型	栄養要求性
1197	<i>Sh. dysenteriae</i> 1	カゼイン水解物
1684	2	発育せず
177249	3	発育せず
75	4	NiA+アミノ酸混液
77	6	発育せず
78	7	NiA+アミノ酸混液
17017	<i>Sh. flexneri</i> 1a	NiA (S)
1674	1b	NiA (S)
1675	2a	NiA (S)
1676	2b	NiA (S): Cystine は発育促進
6980	2b	NiA+Cystine
102349	3a	要求性なし
95649	4a	NiA+Cystine
94949	4b	NiA (S): Cystine は発育促進
1583	4c	要求性なし
63	5	NiA+カゼイン水解物
7	6	NiA+Methionine
66	<i>Sh. boydii</i> 2	NiA+アミノ酸混液
67	3	NiA (S)
148	4	NiA+アミノ酸混液 +Purine, Pyrimidine 混液
375	5	NiA (S)
70	6	NiA+アミノ酸混液
1130	7	NiA+A ₁ アミノ酸 +Purine, Pyrimidine 混液
1196	<i>Sh. sonnei</i> I	NiA (R)
37148	II	NiA (R)

(R)=Rapid Growth (S)=Slow Growth

i) カゼイン水解物: ニッサン水産製の“カザミノ酸”を 5.0%に蒸水に溶解し10Lb, 10分間高圧滅菌後最終 0.5%となる様に添加使用した。

ii) アミノ酸混合液: 22のアミノ酸を各々最終濃度が 40γ/cc となる様に混合, 添加して用いた。ただし Valine, Homocysteine, Cysteine, Norleucine のみは 5 γ/cc となる様に添加した。使用アミノ酸は表 3 に示した。また同表に示した様に本混液で発育した場合には関係深いアミノ酸同志を集めて 4 組をつくり A₁~A₄として, どの組のアミノ酸で生育するかを検した。また単独アミノ酸使

表 2. 分離赤痢菌株とその栄養要求性

菌 名	菌 株 数	栄 養 要 求 性	要 菌 性 株 別 数
<i>Sh. flexneri</i>	1b 4	NiA (S)	2
		NiA+Cystine	2
	2a 19	NiA (S)	15
		NiA (R)	1
		NiA+Glutamic acid 又は Aspartic acid	2
		NiA+カゼイン水解物	1
<i>Sh. sonnei</i>	2b 1	NiA (S)	1
	3a 46	要求性なし	46
	6 1	NiA +Casein hydrolysate	1
	I 4	NiA (R)	4
	II 56	NiA (R)	53
		NiA (S)	3

計……………131

表 3. アミノ酸混液の組成およびその組分け

組	ア ミ ノ 酸
A ₁	DL-Homocysteine
	DL-Methionine
	L-Cysteine
	L-Cystine
	L-Lysine, Arginine. HCl
	L-Proline
A ₂	DL-Leucine
	DL-Isoleucine
	DL-Valine
A ₃	DL-Tryptophan
	DL-Phenylalanine
	DL-alpha-Alanine, Tyrosine, Glycine
A ₄	DL-Glutamic acid
	DL-Serine, Creatine
	DL-Threonine, Histidine. HCl, Aspartic acid

用の場合も最終濃度は同様である。

iii) ビタミン混液: 11 種の B-ビタミンを用い混合液としては 11 種全部の混合液および種々の組合せのもの 3 種 (V₁~V₃) を用いた。各ビタミンの最終添加濃度および組合せの種類等は表 4 に示した。また単独で用い

た場合も特に記載しない限り最終濃度は同一である。

表 4. ビタミン混液の組成およびその組分け

組	ビ	タ	ミ	ン	濃	度
V ₃	V ₁	Thiamine	1.0	γ/cc		
		Riboflavin	0.2	γ/cc		
		Pyridoxine	1.0	γ/cc		
		B ₁₂	0.01	γ/cc		
		Folic acid	0.1	γ/cc		
	V ₂	PABA	0.5	γ/cc		
		Choline. HCl	1.0	γ/cc		
		NiA+NAA	1.0	γ/cc		
		Ca-pantothenate	1.0	γ/cc		
		Biotin	0.1	γ/cc		
		i-Inositol	1.0	γ/cc		

iv) Purine, Pyrimidine 塩基: Yeast Ribonucleic acid を N/NaOH で加水分解したものを 20γ/cc になる様に用い Adenine, Guanine, Xanthine, 等の Purine 塩基: Cytosine, Thymine, Uracil 等の Pyrimidine 塩基: Cytidine, Thymidine 等の Pyrimidine riboside を混合して用いた。いずれも最終濃度は各 2 γ/cc となる様に添加した。

7) 栄養要求性の決定法: 被検菌株は, ①基礎培地のみ, ②基礎培地+カゼイン水解物, ③基礎培地+ビタミン混液, ④基礎培地+カゼイン水解物+ビタミン混液, ⑤基礎培地+カゼイン水解物+ビタミン混液+核酸水解物の 5 種の培地に培養し, 24, 48, 72 時間後にそれぞれの成績を判定した。カゼイン水解物が有効とみられる場合にはアミノ酸混液の効果をしらべ, もしこれも有効ならば A₁~A₄ の 4 組のアミノ酸の栄養活性を検した。このうち例えば A₂ の組が有効な時には A₂ を構成する各単独アミノ酸を添加しどのアミノ酸が栄養活性をもつかを検した。ビタミン混液が菌の発育を支持する場合には V₁~V₃ の 3 組のビタミンの活性をしらべた。この場合例えば V₂, V₃ が共に活性をもっている場合 V₂, V₃ に共通したビタミンとしては Choline, NiA, NAA^{*3)} の 3 種であるからそれら各単独の作用を検した。核酸水解物に発育支持作用のある場合は Purine, Pyrimidine 混液の活性をしらべ, それが有効な場合には更に単独の Purine, Pyrimidine についてその活性をしらべた。

* 3) NAA: Nicotinamide

表 5. *Sh. boydii* の栄養要求性

培地の種類	Strain	148		1130	
	培養時間	24	48	24	48
基礎培地+……………					
カゼイン水解物+ビタミン混液 +Purine, Pyrimidine 混液					
		29	28	40	42
カゼイン水解物+Purine, Pyrimidine 混液					
		100	93	100	100
NiA+Purine, Pyrimidine 混液					
		100	100	100	100
カゼイン水解物+NiA+Purine, Pyrimidine 混液					
		39	35	38	36
Purine, Pyrimidine 混液					
		100	100	100	100
NiA+Purine, Pyrimidine 混液+……					
	A ₁	100	100	33	33
	A ₂	100	100	100	100
	A ₃	100	100	100	100
	A ₄	100	100	100	100
NiA+カゼイン水解物					
		100	100	96	95

数字は透光率を示す

実験成績

1) 標準菌株の栄養要求性: 標準赤痢菌 25 株の栄養要求性は表 1 に示した。即ち *Sh. dysenteriae* に属する菌株の要求性は一般に複雑であつた。Strain 1197 はカゼイン水解物で中等度の発育を示すがこれにビタミン混液, 核酸水解物を添加するも発育は促進されず, カゼイン水解物をアミノ酸混液で置きかえると発育は低下した。アミノ酸混液を 4 組にわけるとどの組でも全く発育しない。したがつて本 Strain は多くのアミノ酸の同時添加を要するだけでなくアミノ酸, ビタミン, 核酸誘導体以外の発育因子を要すると考えられる。Strain 1684, 177249, 77 の 3 株は試験した範囲では如何なる培地にも全然発育し得なかつた。

Strain 75, 78 の株はカゼイン水解物と NiA または NAA の同時添加で良好な発育を示し, カゼイン水解物をアミノ酸混液で代用し得たが, アミノ酸混液中の有効単独アミノ酸については決定し得なかつた。これらの Strain も NiA と同時に 2 種以上のアミノ酸の同時添加を要すると推定される。

Sh. flexneri に属する菌株のうち Strain 102349 (3a), Strain 1583 (4c) の2株のみは発育因子を要求せず、基礎培地のみで最高発育を示したが他の Strain は全部 NiA 要求性を示した。NiA または NAA 単独添加で良好な発育を示したものととしては 1a, 1b, 2a, 2b, 4b に属する各 Strain である。これらは最高発育には3日間の培養を要するため、24時間ですでに最高の発育を示す菌株たとえば *Sh. sonnei* と区別するため前者を NiA (S)*4), 後者を NiA (R)*5) とした。Strain 6980 (2b), 95649 (4a) は NiA または NAA 単独では発育しないがこれに Cystine を同時添加すれば良好な発育を示す。Strain 6980 の NiA または NAA + Cystine による発育の詳細は図1 a, b に示した。即ち本株は L-Cystine 40γ/cc の存在下において NiA または NAA に

図1, a *Sh. flexneri* 6980 (2b) の栄養要求性

図1, b

$10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ M/l}$ の間で respond する。NiA と NAA の発育効果は各等モルで殆んど一致する。また NiA 10^{-5} M/l 添加培地に Cystine の種々の濃度を添加した場合は同図 b の様に Cystine 2 γ/cc 以上で発育をはじめ

Cystine 量に応じた規則正しい発育曲線を示す。この場合 Cystine を DL-Methionine, DL-Homocysteine 等におきかえると菌の発育はみられなかった。尚成績は省略したが Cystine の代りに Cysteine を与えると菌の増殖がみとめられる。同じく 2b に属する Strain 1676, および 4b に属する Strain 94949 は NiA 単独でも発育はするが同時に Cystine を加えると明らかに発育は促進された。(成績省略) Strain 7 (6) では NiA + Methionine が有効で各単独では発育し得なかった。

Sh. boydii は菌型により簡単な要求性を示すものから複雑な要求性を示すものまで種々の菌株がみとめられる。即ち Strain 67 (3), 375 (5) 等は NiA のみで良好な発育を示したが、他の菌株は同表に示した様に NiA と同時に他の発育因子を添加する必要がある。148 (4) および 1130 (7) は共にアミノ酸、核酸構成分子および NiA を同時に添加するとはじめて発育がみられる。これらの成績の詳細は表 5 に示した。即ち両菌株共にカゼイン水解物、核酸混液、ビタミン混液の同時添加で最高発育を示しビタミン混液の活性は NiA 単独で代用される。尚カゼイン水解物中の有効アミノ酸は Strain 1130 では A₁ 組にあることが明らかであるが、Strain 148 の場合には既知アミノ酸のどの組も活性を示さない。*Sh. sonnei* に属する2株は共に NiA, NAA の添加で24時間培養ですでに最高の発育を示した。

2) 分離赤痢菌株の栄養要求性: 結果は表 2 に示した。即ち分離株中には *Sh. dysenteriae*, *Sh. boydii* に属する菌はなかったが *Sh. flexneri* では 3a に属する46株全部が要求性をもたないのに反し他の菌型に属する菌株は全部 NiA を単独または他の発育因子と共に要求する成績を得た。2a に属する菌株19株のうち16株は NiA 単独で発育し得るが2株のみは NiA と Glutamic acid または NiA と Aspartic acid の同時添加を要した。*Sh. sonnei* に属する60株は皆 NiA または NAA 単独で発育し得るがそのうち57株は NiA 添加により24時間ですでに最高の発育を示した。

考 察

Davis-Mingioli の大腸菌の合成培地を改変したものを基礎培地として Genus *Shigella* の栄養要求性について検討した。発育因子としては種々の物質を添加試験したが、①アミノ酸関係としてはカゼイン水解物、22種の既知アミノ酸混液、単独アミノ酸の順に活性をしらべた。アミノ酸混液の区分としては Lederberg⁹⁾ の法に準じて調製した。②ビタミンとしては12種の B-ビタミンの混

* 4) NiA (S): NiA (Slow Grower)

* 5) NiA (R): NiA (Rapid Grower)

混合液の栄養活性をしらべ有効な場合にはこれを3組の混合群 V₁~V₃にわけてその活性を検し、更にそのどれかが有効な場合にはそれを構成する単独ビタミンの活性を検討した。この様な方法をとることにより2種以上のビタミンが同一菌株に別々に活性をもつ場合これらを共に明らかに出来るし更に2種以上のビタミンが同時に必要な場合にも正しい判定を下すことが可能となる。しかし実験した範囲内では V₁ 混液 (Thiamine, Riboflavin, Pyridoxine, B₁₂, Folic acid, PABA) が有効な菌株には相遇しなかった。③核酸およびその誘導体としては酵母リボ核酸のアルカリ水解物を用い有効な場合には順次, Purine, Pyrimidine 混液, 単独塩基またはその Riboside の活性を検した。以上の3要素は使用に際しては種々の組合せを作り有効な場合は組合せそのものを簡単に行くとともに1つの要素の構成成分も簡単にしておく方法をとった。

被検菌株としては実験成績の項で述べた様に標準菌株25株, 分離株131株であるが分離株は *Sh. flexneri* 1b, 2a, 2b, 3a, 6; *Sh. sonnei* I, II 等をふくみこれらについては分離株と標準株の要求性を比較出来たが, *Sh. flexneri* の1a, 3a, 4a, 4b, 4c, 5等および *Sh. dysenteriae* の各菌, *Sh. boydii* の各菌型等については標準株の知見だけで, その成績を分離株のそれと比較することは出来なかった。*Sh. flexneri* に属する菌株のうち3aは被検全菌株ともに基礎培地のみでよく発育し特に発育因子の添加を必要としなかった。同様な知見は4cに属する1株でも得られた。また *Sh. dysenteriae* に属する標準菌株は栄養要求が一般に複雑で2, 3, 6に属する株はカゼイン水解物, ビタミン混液, 核酸混液を同時添加するも尚発育せずそれらの菌株の要求性, 培養の物理化学的条件等については将来の問題としたい。*Sh. boydii* 各菌型, 3a, 4c 以外の *Sh. flexneri* の各菌型に属する株及び *Sh. sonnei* に属する菌株等では標準菌株または分離菌株の如何をとわず全株共に NiA 要求性が証明された。このうち NiA 単独添加で24時間培養ですでに最高発育を示したものは *Sh. sonnei* に属する大部分の菌株で残り一部の菌株も72時間培養すると NiA 単独でやはり最高発育をみる様になる。また *Sh. flexneri* も NiA 単独で発育する菌株が多いが分離株中1bに属する2株が NiA と Cystine, 2aに属する2株が NiA と Glutamic acid 又は Aspartic acid の各同時添加を要したのは興味深い。標準株2b, 4a もやはり NiA+Cystine, 6が NiA+Methionine を要求し NiA または アミノ酸単独では発育し得

なかった。また NiA+Cystine を要求する標準株2bに対する NiA の活性は同モルの NAA の活性に略一致した。この場合 Cystine は Cysteine では勿論代用されたが, それより代謝上位の化合物と考えられる Homocysteine, Methionine 等では少しも代用されなかった。このことは本菌が Cystine または Cysteine の微生物学的定量に利用され得る可能性を示すと共に *Shigella* の含硫アミノ酸代謝についても興味ある示唆をあたえる。*Sh. boydii* に属する標準菌株6株のうち NiA 単独で生育したのは3, 5に属する2株のみで他の株は NiA と同時にカゼイン水解物, 核酸混液等を要し, やや複雑な要求性を示した。なかでも興味の深いのは Strain 148, 1130の2株と共に NiA, アミノ酸の同時添加では発育しないがこれに核酸成分を加えると明らかに発育をはじめ。アミノ酸の有効成分は未だ明らかにし得なかったが核酸成分のうち有効なのは両菌株共に Adenine, Guanine, Xanthine 等の Purine 塩基で Pyrimidine には活性がない様である。しかしこれは尚追求中で定量的に明らかにし得た段階ではない。

結 論

1) 赤痢標準菌株25株, 分離菌株131株計156株の栄養要求性について検討した。この結果菌型と要求性との間にはかなりの一致がみられた。

2) *Sh. flexneri* 3a, 4c は基礎培地のみでよく発育したがこれ以外の *Sh. flexneri* に属する菌株, *Sh. dysenteriae*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei* 等に属する菌株はすべて基礎培地のみでは発育し得なかった。

3) これら基礎培地に発育し得ぬ菌株は *Sh. dysenteriae* に属する菌株をのぞいてはすべてニコチン酸もしくはニコチン酸アミド単独あるいはニコチン酸とアミノ酸; ニコチン酸, 核酸成分およびアミノ酸等の同時添加によつて発育し得る。ニコチン酸と同時添加により菌の発育を支持するアミノ酸としては菌株により一定しないが Cystine, Methionine, Glutamic acid, Aspartic acid 等であつた。

4) *Sh. dysenteriae* に属する菌株の栄養要求性は一般に複雑で試験した範囲の培地に全く発育しない菌株もあった。

終りにのぞみ本研究の機会を与えられ且御校閲をたまわつた当研究所長, 芳野俊五博士に厚くお礼申し上げます。また有益な御助言をいただいた山口県立医科大学微生物学教室林良二教授に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Koser, S. A., Dorfman, A., Saunders, F. :
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 38 : 311, 1938.
- 2) Kligler, I. J., Groschwitz, N. : J. Bact., 38 : 309,
1939.
- 3) Dorfman, A., Koser, S. A., Reames, H. R.,
Swingle, K. F., Saunders, F. : J. Inf. Dis.,
65 : 163, 1939.
- 4) Weil, J. et al., : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.,
55 : 24, 1944.
- 5) Bruan, H. : Zbl. Bakt., 155 : 118, 1950.
- 6) 中山・川口・元木 : 日本細菌学雑誌, 印刷中,
1960.
- 7) Davis, B. D., Mingioli, E. S. : J. Bact., 60 :
17, 1950.
- 8) Lederberg, J. : Meth. in Med. Res. 3 : 5,
1950.