肝臓ブイオン中に於ける破傷風菌芽胞の 発芽と死滅に関する研究

蜂 須 賀 養 悦

名古屋大学医学部細菌学教室 (主任 小笠原一夫教授)

[受付: 7 月 6 日, 1951 年]

破傷風菌芽胞(以下破芽胞と略す)を肝臓ブイオン中で培養する際、流動パラフィン(以下流パラと略す)を重層して、37°C で培養すれば速かに発芽増殖して、24 時間たてばブイオンは著明に濁濁して来る。しかるに同じメジウムに於て流パラを重層することなく 27°C で培養すると、24 時間にして投入した芽胞の大部分が死滅していることが分つた。

この現象については既に 2 回¹⁾²⁾にわたつて報告したが、こゝに以後の研究の結果を含めて検討を加えたい。

実験材料、条件及び方法

菌株——破傷風菌陸 3 号株。

芽胞液の調製——破傷風菌を Tarozzi の肝々ブイオンに、3, 4 日間 37°C で培養し、更に室温に 4, 5 日間放置して充分芽胞を形成せしめたものから芽胞液を作製した。芽胞液の作製については先報¹⁾²⁾に詳しくのべてあるので、その概略をのべると、上述の肝々ブイオンを無菌的に滅菌スピッツグラスに約 3 ml ばかりとり、これを 1000 r. p. m. で約 2 分ばかり遠心して大きい夾雑物をのぞき、この上清を更に別の滅菌スピッツグラスにとる。これを 3,000 r. p. m. にて 10 分間遠心して上清を捨て、更に生理的食塩水を加え一度遠心洗滌を行う。この沈澱物に肝臓ブイオン(其他、各種メジウム)を一定量加え、よく混合した後、70°C の重湯煎にて 30 分加熱して栄養型を殺し、芽胞のみとする。この芽胞液の含有芽胞数を調べるため直ちに芽胞計算の培養を行つた後、そのまゝ 37°C の孵卵器におさめ、検査すべき各培養時間毎にその 0.1 ml をとり出し、菌数計算を行つた。

芽胞及び菌数の計算——肉水(肉水: 馬肝浸出液 = 2:1)に対し、ペプトン 1%, 食塩 0.3%, 葡萄糖 0.2%, 寒天 1% の割合に溶解、pH を 7.4 に修正した培地を、内径凡そ 0.5 cm, 長さ凡そ 20 cm の試験管に約 15 cm ばかりの高さまで分注し、3 回、間歇滅菌したものが菌数及び芽胞数計算用の培養基である。

計算すべき材料の 0.1 ml を、細長のメスピペットで、あらかじめ溶解した後 50°C に保たれた上述の培養基に

混注し、速かに振盪一様に混合せしめた後、流水で冷却し、その後培養する。24 時間培養後培養基中に形成されたコロニー数を数え、菌数及び芽胞数を求めた。

肝臓ブイオン——牛肉を浸出して作製した肉水をもととしてブイオンをつくり、このブイオン中に馬肝臓を入れ(ブイオン 100 ml に対し馬肝臓 30 g の割合) 30 分間煮沸、濾過して、pH を 7.4 に修正、高压滅菌してつづつた。

好氣的及び嫌氣的條件——滅菌流パラを重層して培養したものを嫌氣的、重層しないので培養したものを好氣的とした。

実験

(1) 好氣的培養に於て破芽胞が自然消滅現象をおこし得るメジウムの種類について。

破芽胞を各種のメジウムに入れて、37°C で好氣的に培養した場合の芽胞の減少状態を調べた。メジウムの種類としては肝臓ブイオン、肉水ブイオン(牛肉を浸出してつづつた肉水を基本にしてペプトン及び食塩を型通り加えたもの)、肉エキスブイオン(肉エキスをもととして、之にペプトン、食塩を加えたもの)、生理的食塩水、陳旧培地(7, 8 日間、破傷風菌を培養した肝々ブイオンを、ザイツの濾過器で濾過したもの)である。

その成績は第 1 表に示す。それによれば、この現象はメジウムが肝臓ブイオンである場合は非常に著明であり、次で肉水ブイオンに著しく、肉エキスブイオンの場合にはごく僅かしか芽胞の減少状態は見られない。更に生理的食塩水、陳旧培地の場合には全然変化が見られない。

(2) 肝臓浸出液及びその透析液中に於ける破芽胞の消滅現象について。

HACHISUKA Yōetsu: Studies of germination and death of tetanal spores in liver broth medium. Department of Bacteriology, Nagoya University School of Medicine. (Chif: Proef. Kazuo Ogasawara) Jap. J. Bact., 7(1), 49-52, 1952.

第1表 好氣的培養に於て破傷風菌芽胞が自然消滅現象をおこし得るメジウムの種類について

メジウムの種類	最初の芽胞数	培養後の菌数		
		72時間	48時間	72時間
肝臓ブイヨン	1.8×10^6	1.5×10^3		
	35×10^6	20×10^2	20	20
	9.6×10^6	4.8×10^2	110	20
	43×10^4	56×10	5	
肉水ブイヨン	6.3×10^5	5×10^3		
肉エキsbイヨン	33×10^6	28×10^6	7×10^5	2.9×10^5
	60×10^6	48×10^5	45×10^5	58×10^5
生理的食鹽水	1.6×10^6	1.7×10^6		1.1×10^6
	12.4×10^6	12.8×10^6	12.6×10^6	10.0×10^6
陳舊培地	7.2×10^7	7.6×10^7		1.1×10^7

実験(1)の結果よりすれば破芽胞が、破傷風菌の増殖に好適な環境にて培養されたときにのみ、芽胞は急激に死滅して行くのである。このことはあたかも好適な培地中に、破芽胞に対して害作用を及ぼすものが存在する様な結果を示す。この点を明にするため、肝浸出液をつくりこれにその作用があるかないかを確かめ、更にこの浸出液を透析して、有効成分の分析につとめた。

肝浸出液は水道水に馬肝臓を1:1の割合に加え、30分煮沸浸出してこれを濾紙にて濾過し、pHを7.4に修正、高圧滅菌して作製した。透析はセロファン囊を用いコルペン中で無菌的に行つた。即ち1lのD型コルペンに外液として蒸留水500mlを入れ、この中に予め用意したセロファン囊を入れて高圧滅菌しておく、滅菌後このセロファン囊中に60mlの肝浸出液を入れ、2日間室温で透析した。

内液190ml、外液340mlは各々重湯煎にて各20mlに濃縮された。之をそれぞれpH7.4に修正して、100°Cにて10分間滅菌した。

以上3種類のメジウム中に於ける破芽胞の好気培養に於ける消滅状態は第2表に示す。

この結果によれば全部に於てこの現象が見られる。特に透析外液にその作用が見られることは透析性の物質のみでこの作用を有していることを示す。流水にて完全に透析した場合、その内液にこの作用があるか否かは未だ実験していない。

(3) 破傷風菌芽胞が肝臓ブイヨン好気性培養に於て死滅現象をおこすまでの時間。

破傷風菌の発育に好適な培地のみならず、肝臓浸出液

第2表 肝臓浸出液及びその透析液中に於ける破傷風菌芽胞の消滅現象について

メジウムの種類	最初の芽胞数	培養後の菌数		
		24時間	48時間	96時間
肝浸出液	4.4×10^5	2.0×10^4	10^2	12
透析外液	4.2×10^5	4.0×10^5	2.0×10^3	20
透析内液	4.3×10^5	4.0×10^5	2.2×10^3	90

の透析液中にても好氣的培養を行えば破芽胞が死滅することが分つた。

そこで問題になるのは破芽胞が死滅する際発芽して死滅するのか、それともそのまま死滅するのであるかと云う点及び、実験(1)(2)に於ては破芽胞を孰れも24時間、好気性培養した後、死滅状態を調べているが、果して培養開始より何時間位経過して破芽胞は死滅しているのかと云う2つの点である。この2点を明にするために本実験を行つた。

実験方法は 84×10^4 箇の破芽胞を混入した3mlの肝臓ブイヨンをスピッツグラスに入れたまゝ、好氣的に37°Cで培養し、4時間毎に芽胞数の減少状態を見た。尚この時、菌数計算用培養管2本に培養を行い、その内1本は70°Cにて30分加熱して培養し、芽胞が既に発芽しているか否かを調べた。

結果は第3表及び第1図に示す通りである。この結果

第3表 破傷風菌芽胞が肝臓ブイヨン好気性培養に於て死滅現象をおこすまでの時間

培養時間	最初の芽胞数 84×10^4					
	4時間	8時間	12時間	16時間	20時間	24時間
菌の總數(栄養型及芽胞)	61×10^4	34×10^4	24×10^4	30×10^2	30	30
芽胞のみ	14×10^2	42	24	10	4	0

第1図

によれば、好氣的培養にもかゝらず培養開始より培養8時間迄の間に、芽胞の大部分は既に発芽し終つてゐることが分る。しかもこの間に於ては生菌数(芽胞+発芽した菌)は最初の芽胞数と大差がない。即ち発芽した菌として生存を保つてゐるのである。ところが培養12時間より20時間に及ぶと、急激に生菌数が減少している。その減少状態は、発芽直線とほぼ平行な直線をえがいて死滅している。

以上のことで明になつたことは、好氣性培養に於ても芽胞は肝臓ブイオン中で発芽する、一旦発芽しても、流バラが重層されていない場合には、発芽後凡そ12時間生存した後急激に死滅すると云うことである。

(4) 発芽したての菌は死滅し易い。

実験(3)に於て本現象がおこる際破芽胞は一旦発芽して、しかる後死滅することが分つたのであるが、しからば肝臓ブイオン及び肝臓浸出液の透析液中の有効成分は、要するに発芽に有効な物質であるのみで致死的な作用を有するものでないのか、それとも一旦発芽した菌に致死的に作用するものであるかの疑問が生じて来る。この点を明にするためには嫌氣的に培養して発芽したばかりの菌が、肝臓ブイオン其他肝臓成分を含有していないメジウムに移された場合、死滅するか否かを調べればよい。本実験はその点を明にするため行われた。

その方法は次の通りである。破芽胞を含有した肝臓ブイオンに滅菌流バラを重層して37°Cにて6時間培養する。(前報りに於て明な如く4乃至8時間の嫌氣培養に於て破芽胞は全部発芽する)培養するとそのまゝ3,000 r. p. m. にて10分間遠心して上清を捨てる。沈渣に肉エキスブイオン(其他、滅菌蒸溜水等)を一定量加えてよく混合する。直ちにその中の菌数を数えておく。それが終るとこれを37°Cに24時間及び48時間放置して菌数の減少状態を調べた。

結果は第4表に示してある。之によれば一旦発芽した

第4表 発芽したての菌は死滅し易い

発芽したての若い菌の菌数	メジウムの種類	培養の菌数	
		24時間	48時間
20×10 ²	蒸溜水	10	7
22×10 ³	肉エキスブイオン	8	7
17×10 ⁴	肉エキスブイオン	180	

破傷風菌は周囲の環境が肉エキスブイオン及び蒸溜水におきかえられると、ともに菌数は著明に減少することが分つた。

考 按

破芽胞の相当数を肝臓ブイオンの如き破傷風菌の分裂増殖に好適な環境に入れ、37°Cにて好氣的に培養すると24時間にして破芽胞の数はその大部分が死滅する現象について、実験の結果を綜合して検討を加えたい。

この現象のおこる培地は孰れも破傷風菌の分裂増殖に適した培地である。このことはこの現象をおこしうる物質がこれらの培地中に存在するのではないかとの疑問をいだかしめる。それを確かめるための手掛をうる目的で、先ず肝臓浸出液にその作用があるかないかを調べた。確かに作用があるので、更にそれを透析して有効成分が透析性の物質か否かを調べた。その結果は実験(2)で明な如く透析液中に於てもこの現象が見られた。

しからば肝臓浸出液中の透析性の物質が直接破芽胞に致死的な作用を及ぼすのであろうか? この点を明にするため実験(3)及び(4)が行われた。

実験(3)によれば破芽胞は例え好氣的な培養にし、肝臓ブイオン中で発芽しうる。発芽した菌は約12時間生存を保つた後死滅して行くことが明になつた。従つてもし有効成分が致死的に作用するとすれば発芽した菌に対して作用するとしか考えられない。ところが実験(4)によつて明な如く、一旦発芽したものを死滅せしめ得るのは必ずしもメジウムが肝臓ブイオンである必要はなく、肉エキスブイオン或は蒸溜水中でも可能なのである。即ち有効成分がごくわずかか或は全然含まれていない環境に於てすら死滅は起りうるわけであるから、有効成分は致死的な作用を有するものではないと思われる。

しからば有効成分はいかなる作用を有するものなのであろうか? それは結論的に言つて破芽胞を発芽せしめる作用をもつてゐるものだと思われる。肉エキスブイオン或は生理的食塩水等がメジウムであつた場合、この現象が弱かつたり或は全然見られなかつたのは発芽に有効な因子が少いか或はなかつたために、かゝるメジウムで破芽胞が発芽することが出来ず、そのためについでおこるところの死滅と云う現象が見られなかつたのである。

しからば発芽したものが死滅するのはいかなる理由によるのであろうか? 肝臓ブイオンに於て発芽したものが死滅するのは流バラを重層されていない場合である。もし流バラが重層されておれば発芽した菌は更に分裂、増殖をいとなみ得るのである。従つて死滅の原因となるものは、流バラを重層することゝ重層しないことゝによつて生ずるところの酸化還元電位の差異をあげなくてはならないと思う。このことは実験(4)に照しても明らかである。唯單 酸化還元電位がちがうのみで死滅と云う現

象が発生して来る本態については不明である。

結 論

破芽胞は肝臓ブイヨン中では流パラを重層されなくても、重層された場合と同様に発芽しうる、発芽後は、流パラの重層されていないものは12時間位の間隔をおいて急激に死滅して行くが、流パラの重層されたものは分裂増殖をいとなみうる。

以上のことより、著者は破芽胞が発芽して、しかも死滅するところの酸化還元電位の域が存在するのではない

かと想像している。

この点に関しては電位差計を用いて正確な電位を測定した上更に発表したい。

搁筆するに臨み、御指導御校閲を賜った小笠原教授に感謝致します。

文 献

- 1) 蜂須賀: J. Antibiotics III 12, (1950).
- 2) 蜂須賀: 医学と生物学, Vol. 18, No. 3, (1951).