大原一箕田菌の S 型及び R 型に関する研究

中 沢 仁

傳染病研究所第一研究部 (指導 細谷省吾教授)

日本赤十字社中央病院

〔受付: 8 月 23 日, 1951 年〕

1921年Arkwright³⁾のS型及びR型の発見は de Kruif¹⁾のD型及びG型と共に集落形成上の変異を主徴とする変異形式を確立したもので、その後このS-R型変異は種々の変異形式の中で最も普通に見られ、重要なものとされている。

S型よりR型への変異の促進については培地の成分に関してブイヨン中のペプトン或は肉汁の濃度の影響¹⁾⁵⁾⁴⁰⁾、培地のpHの影響¹⁵⁾³⁹⁾、などの報告がある。変異の抑制、すなわち型保存に関しても多くの努力がなされ、種々の培地が挙げられている⁴⁾¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾³⁸⁾⁴⁰⁾。

R型よりS型への復帰、すなわちS-R型変異の可逆性に関しては如何なる培養方法、或は動物通過による也不可能とするもの¹⁹⁾²⁹⁾³¹⁾、可能とするも集落形態上の復帰に止り生物学的、血清学的には不可能に終つたもの³²⁾³⁵⁾³⁷⁾、など帰するところがないようである。

私は大原箕田菌のS型及びR型の集落形成に及ぼす培地の寒天濃度の影響に関して興味ある新事実をえたのでここに報告する。

実 験

実験に用いた菌株は北里研究所平野憲正博士より御分與をうけた大原一箕田菌西川株で、S型は普通寒天培地よりその都度釣菌した純粹のS型集落菌で、R型は普通寒天培地に十数代つた完全なR型集落菌である。

〔1〕 S,R型の集落形態に及ぼす培地の寒天濃度の影響

普通ブイヨン、肉水、1%ペプトン水を基礎培地としてそれぞれに5, 3, 1.2%の割合に寒天を加えた平板培地にS,R型菌を37°C 1乃至3日間培養、さらに14日間室温においてその集落形態を観察した。

3%寒天培地ではS型菌は形態上S,R及びその混合型の集落が現れ、日がたつにつれてR型の集落が増加する。これに反しR型菌はR型の集落のみを生じた。

5%寒天培地ではS型菌は外見全く変異するようなR型集落のみに変形し、R型菌は外見R型集落のみを生じた。

1.2%寒天培地ではS型菌は外見S型集落のみを生じ、

R型菌は外見全く復帰するようなS型集落のみに変形した。

以上の成績はブイヨン、肉水、1%ペプトン水のいずれの寒天培地についても同様結果を生じ、又棒寒天、粉末寒天(武田化学)、精製寒天(250瓦の棒寒天を5lの水に加えて煮沸溶解し、バットに固め、水洗7日後40°C 10時間真空乾燥してえられたもの)を用いた培地についても同様結果を生じた。

便宜上S型菌の5%寒天培地でしめすR型集落をRs菌とし、1.2%寒天培地でしめすS型集落をSs菌とする。又R型菌の5%寒天培地でしめすR型集落をRr菌とし、1.2%寒天培地でしめすS型集落をSr菌とする。

〔2〕 Rs, Ss, Rr, Sr菌の生物学的性状

以上の観察によつて知りえたこれらの各集落菌の生物学的性状をしらべた。

(1) 集落性状 Rs,Rr菌の外観は全くR型集落を呈し、両者を区別し得ない。Ss, Sr菌は全くS型集落を呈し、両者を区別し得ない。これらの集落形態は14日間の長期観察によつても安定で、当該培地では累代培養するも変形を来さない。しかし3%寒天培地にうつせば容易に原型にかえる。

(2) 菌の形態

Rs,Ss菌は短桿菌で何等の特徴を見ないが、Rr,Sr菌では短桿菌で長糸状に連結菌塊を作る傾向がある。

(3) ブイヨン、或はペプトン水培養

Rs,Ss菌は平気濁濁を呈し、Rr,Sr菌では沈澱を生じ、上清は清澄となつた。

(4) 自然凝集

生理食塩水に浮游したRs,Ss菌は自然凝集陰性、Rr, Sr菌では自然凝集陽性であつた。

(5) 酸凝集

塩酸を滅菌蒸留水で2倍階段稀釈し、これに2 mg/dl

NAKASAWA, Jin: Study on the S and R-form of OHARA-MITA'S Bacillus (Sonne).
Institute for Infectious Diseases, Tokyo University.
Jap. J. Bact., 7(2): 115-119, 1952.

の割合に浮遊させた菌液(蒸留水)の等量を加え、37°C 2時間、更に室温に一夜放置後、凝集を観察したところ普通寒天培地のS型菌は陰性、R型菌では陽性であつて、塩酸濃度1%において最も著明であつた。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌に対しては1%塩酸を用いて同様凝集反応をしらべたところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

(6) 塩凝集

(i) 食塩反応

食塩を用いて酸凝集反応と同様実験したところ、もとのS型菌は陰性、R型菌では食塩濃度0.75%まで凝集陽性であつて、食塩濃度15%において最も著明に反応した。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌に対しては15%食塩水を用いて同様反応をしらべたところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

(i) 硫酸マグネシウム反応

硫酸マグネシウムを用いて酸凝集と同様実験したところ、S型菌は陰性、R型菌では硫酸マグネシウム濃度0.5%まで凝集陽性、硫酸マグネシウム20%において最も著明に凝集した。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌に対しては20%硫酸マグネシウムを用いて同様反応をしらべたところ、Rs, Ss菌は陰性、Ss, Rr菌では陽性であつた。

(i.i) 硫酸アンモニウム反応

硫酸アンモニウムを用いて酸凝集と同様実験したところ、S型菌は陰性、R型菌では硫酸アンモニウム濃度12.5%まで凝集陽性、硫酸アンモニウム25%において最も著明に凝集した。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌に対しては25%硫酸アンモニウムを用いて同様反応をしらべたところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

(7) ミロン反応

S, R型菌の5 mg/dl菌浮游液(蒸留水) 1 mlにミロン試薬を滴下(蒸留水約30滴が1 mlに相当するメスピペットを用いた)、かるく火焰上で沸騰後静置して判定した。試薬2滴の場合明瞭にS, R型菌を区別し得た。R型菌は沈澱量比較的少く、沈澱の色は濃いピンク色を示し、これを陽性とし、S型菌では沈澱量多く、沈澱の色は淡紅色を示し、これを陰性と判定した。試薬量を増すに従い沈澱の量と色はS, R両型菌ともに同様陽性を呈し両型の区別が困難となる。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌の5 mg/dl菌浮游液1 mlに2滴の試薬を加え、同様実験したところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr,

Sr菌では陽性であつた。

(8) 硫酸銅反応

S, R型菌の2 mg/dl菌浮游液1 mlに20%硫酸銅を滴下、火焰上で沸騰後静置して青色沈澱の有無を検した。試薬10滴の場合R型菌は青色沈澱陽性、S型菌では淡青色平素濁濁を呈し沈澱陰性であつた。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌の2 mg/dl菌浮游液に20%硫酸銅10滴を加え、同様実験を行つたところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

(9) イスラビン反応

イスラビンを滅菌蒸留水で2倍階段稀釈し、これに等量の2 mg/dl菌浮游液を加え、37°C 2時間、更に室温に一夜放置後、凝集の有無をしらべたところ、S型菌は陰性、R型菌ではイスラビン1000倍稀釈まで凝集陽性、500倍で最も強い反応を示した。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌について500倍イスラビン水溶液を用いて同様実験したところ、Rs, Ss菌は陰性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

800倍イスラビン水溶液を用いて血清学的試験凝集反応の如く載物ガラス上で凝集反応をしらべたところ、S型菌は陰性、R型菌では凝集陽性であつて、S, R型菌の鑑別に血清学的試験凝集反応に代用しうることが分つた。この方法は即座に、しかも各菌集落についてしらべうことも出来る。この反応を行うに当つて偽凝集反応を防ぐため、菌と試薬との混合を徐々に行う必要がある。

Rs, Ss, Rr, Sr菌に対して血清学的凝集反応と平行して毎日集落30箇宛14日間しらべたところ、Rs, Ss菌はすべての集落が陰性であり、Rr, Sr菌ではすべての集落が陽性であつた。

(10) リマオン反応

リマオンを用いてイスラビン反応と同様の凝集反応を行つたところ、S型菌は陰性、R型菌ではリマオン20000倍稀釈まで凝集陽性であつた。

そこでRs, Ss, Rr, Sr菌に対しては2000倍リマオン水溶液を用いて同様実験したところ、Rs, Ss菌は陽性、Rr, Sr菌では陽性であつた。

2000倍リマオン水溶液による載物ガラス上の試験凝集反応によつても、その凝集の有無によりS, R型菌が判別出来ることを知つた。

Rs, Ss, Rr, Sr菌に対してイスラビン試験凝集反応の如く、毎日集落30箇宛14日間しらべたところ、Rs, Ss菌はすべての集落が陰性、Rr, Sr菌ではすべての集落が陽性であつた。

(11) 熱凝集

生理食塩水 10ml に S, R 型菌を 2, 4, 10mg 宛浮遊させ, その各々を 10, 30, 60 分煮沸し, 室温に一夜放置後凝集の有無をしらべたところ, S 型菌はすべて陰性, R 型菌では 10mg 菌浮遊液を 30 乃至 60 分間煮沸したものが最も明瞭に凝集陽性であつた。

そこで Rs, Ss, Rr, Sr 菌を 10mg 生理食塩水に 10mg 宛浮遊させ, 30 分煮沸後一夜室温放置, 翌朝凝集の有無をしらべたところ, Rs, Ss 菌は陰性, Rr, Sr 菌では陽性であつた。

(12) 糖類分解, 牛乳凝固, インドール産生, ガス産生

S, R 型菌及び Rs, Ss, Rr, Sr 菌のこれらの反応はすべて同じ成績を示し, グルコース, マンニット, アラビノーゼ, マルトーゼ, ラムノーゼはいずれも 1 日で分解され, ラクトーゼは 4 乃至 8 日, サッカローゼは 13 乃至 19 日で分解される。ソルビット, キシローゼは分解されない。牛乳は 13 乃至 15 日で凝固し, インドール陰性, ガス産生陰性であつた。

〔3〕血清学的性状

S 型菌は S 型菌ウサギ免疫血清に対して粗大雲絮状に 1600 倍まで凝集し, R 型菌ウサギ免疫血清に対しては全く凝集せず。しかるに R 型菌は R 型菌ウサギ免疫血清に対して微細顆粒状に 6400 倍まで凝集し, S 型菌ウサギ免疫血清に対しても微細顆粒状に 600 倍まで凝集した。

そこで Rs, Ss, Rr, Sr 菌に対しては S 型菌ウサギ免疫血清及び R 型菌ウサギ免疫血清をそれぞれ R 及び S 型菌で凝集素吸収処置をなした型特異の S 型免疫血清及び R 型免疫血清を用いて凝集反応を行つた。Rs, Ss 菌は S 型免疫血清に 1600 倍まで粗大凝集し, R 型免疫血清には 50 倍で陰性であつた。Rr, Sr 菌では R 型免疫血清に 6400 倍まで微細凝集し, S 型免疫血清には 50 倍で陰性であつた。

尙お Rs, Ss, Rr, Sr 菌に対して血清学的凝集反応を毎日集落 30 箇宛 14 日間に亘つて行つたところ, Rs, Ss 菌はすべての集落において型免疫血清に凝集し, Rr, Sr 菌ではすべての集落において R 型免疫血清に凝集した。

〔4〕菌力試験

マウスの腹腔内注射によつて最小致死量を測定すると, S 型菌は 0.05mg, R 型菌は 0.5mg であつた。Rs, Ss 菌は S 型菌と同一で, Rr, Sr 菌では R 型菌と同じ最小致死量をしめした。

菌型	S	R	Rs	Ss	Rr	Sr
鑑別法						
集落形態	S	R	R	S	R	S
菌形態		長絲狀連結			長絲狀連結	長絲狀連結
ブイヨン培養	均濁	沈澱	均濁	均濁	沈澱	沈澱
自然凝集	—	+	—	—	+	+
熱凝集	—	+	—	—	+	+
酸凝集	—	+	—	—	+	+
鹽食鹽反應	—	+	—	—	+	+
凝硫麻反應	—	+	—	—	+	+
集硫安反應	—	+	—	—	+	+
ミロン反應	—	+	—	—	+	+
イスラビ反應	—	+	—	—	+	+
リマオン反應	—	+	—	—	+	+
血清學的性状	S	R	S	S	R	R
菌力(マウス致死量)	0.05mg	0.5mg	0.05mg	0.05mg	0.5mg	0.5mg

以上の実験の概要を比較表示すれば次の如くである。

考 按

大原一箕田菌西川株の S, R 型菌について培地の寒天濃度の集落形態に及ぼす影響, 更にそれに伴える生物学的, 血清学的性状, 或は病原性的変化などをしらべた。

S 型菌を 5% 寒天培地に培養すると集落形態は変異を

思わせる R 型集落に変形し, これを Rs 菌と称し, R 型菌を 1.2% 寒天培地に培養すると集落形態は復歸を思わせる S 型集落に変形し, これを Sr 菌と称した。この現象が基礎培地の種類, 又は寒天の種類によつても同一に現れることも確められた。すなわち S, R 型菌は基礎培地, 寒天の種類を問わず, 培地の寒天濃度の差によつてのみ集

落形態をS型或はR型に自由に変形しうることがわかった。すなわち培地の寒天濃度が集落形成上重要な役割をすることがわかった。

次に培地の寒天濃度の差によつて生ずるこれらの集落形態の変化が本来のS型或はR型菌の生物学的、血清学的性状、又は病原性の変化を伴っているかどうかを検討された。

従来の研究によれば大原—箕田菌のS,R型菌は菌の形態⁵⁾²²⁾²³⁾, プイヨン或はペプトン水培養^{8)11)16 17)24)25)}, 自然凝集⁸⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾, 酸凝集¹³⁾⁴¹⁾, 熱凝集¹⁰⁾¹⁷⁾²⁴⁾²⁵⁾, 免疫血清による凝集反應³⁾¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁵⁾²⁶⁾, 病原性¹¹⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁰⁾などによつて差異を認められているが、私の場合も同様の成績がえられた。この他一般にS,R型菌の鑑別に應用しうるとされている食塩反應¹⁾⁴⁴⁾, ミロン反應²⁾²¹⁾²⁸⁾⁴¹⁾, 硫酸銅反應²⁷⁾, などを試み、更に各種細菌の鑑別に試みられている硫酸マグネシウム反應¹²⁾²⁰⁾, 硫酸アンモニウム反應⁷⁾¹⁴⁾³⁴⁾, などが大原—箕田菌のS,R型菌の鑑別に應用しうることを明かにした。またイスラビン反應³³⁾と同様にリマオン反應が大原—箕田菌のS,R型菌の鑑別に應用しうることを確めた。

これらの反應によつてもRs菌はS型菌の性状を示し、Sr菌ではR型菌の性状を示した。

すなわちRs菌はR型集落を呈せるS型菌であつて未だ文献に見られないことである。Sr菌はS型集落を呈せるR型菌であつて White⁴²⁾の Smooth variant に相当するものと考えられる。

S,R型変異に於ける糖類分解については従来の成績に多少の異論があり、両型間に差異がないとするもの¹⁵⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁹⁾, 差異がありとするもの⁹⁾¹⁶⁾²⁶⁾がある。牛乳凝固、インドール反應に於ては両型間に差異がないとされている^{15)24 25)29)}。私の成績は糖類分解、牛乳凝固、インドール產生いずれに於ても両型間に差異が認められなかつたのみならず、Rr,Sr菌に於ても差異が認められなかつた。これを要するに大原—箕田菌のS,R型菌の培地の寒天濃度の差によつて生ずる集落形態の変化は、形態上のみで、その生物学的、血清学的性状には変化が認められなかつた。

結 論

大原—箕田菌は培地の寒天濃度によつて集落形態はS或はR型に自由に変形しうが、その生物学的、血清学的性状はいずれも元の性状を保つて変異をおこすことはない。

したがつて集落の外見のみによつてS,R型菌を判定することは出来ない。その判定は生物学的、血清学的性状

によらねばならない。

大原—箕田菌のS型保存培地には1.2%寒天培地がよい。

大原—箕田のS,R型菌の簡便な鑑別法としては1%塩酸による酸凝集反應, 15%食塩, 20%硫酸マグネシウム, 25%硫酸アンモニウム水溶液による塩凝集反應, 2000倍リマオン, 500倍イスラビン水溶液による凝集反應, 或はその試験凝集反應などがすゝめられる。

終りに御指導御校閲を賜つた恩師細谷教授に深甚なる感謝の意を表す。

(本稿の要旨は昭和21年3月28日傳染病研究所集談会において発表した)。

文 献

- 1) Arkwright: J. Path. & Bact. 24, 36, 1921.
- 2) Aschehov etc.: Ind. J. of Med. Res. 20, 1101, 1933.
- 3) Braun u. Weit: Zbl. Bakt. 109, 16, 1928.
- 4) Braun u. Baake: Zbl. Bakt. 116, 462, 1930.
- 5) de Krnif: J. exp. Med. 33, 773, 1921.
- 6) Dienst: J. Bact. 26, 489, 1933.
- 7) Eisler u. Silberstein: Ztschr. Hyg. 93, 267, 1921.
- 8) Elkeles u. Schneider: Zbl. Bakt. 103, 48, 1927.
- 9) Fyfe: J. Hyg. 26, 271, 1927.
- 10) 福見, 佐藤及び白石: 実験医学雑誌. 23, 1717, 昭 14, (1940).
- 11) Hilgers: Zbl. Bakt. 114, 320, 1929.
- 12) 原田: 儿科雑誌. 380, 1, 381, 67, 昭 7. (1932).
- 13) " : 熊本医学会雑誌. 9, 743, 昭 8. (1933).
- 14) 石山: 福岡医科大学雑誌. 22, 68, 昭4. (1929).
- 15) Koser & Styron: J. inf. Dis. 47, 443 453, 1930.
- 16) 笠井: 日本微生物学会雑誌. 18, 695, 大 13, (1923).
- 17) 小林教授及び其の門下: 細菌学雑誌. 419, 1, 昭 6. (1931).
- 18) 日下: 大阪医事新誌. 7, 622, 昭 11, (1936).
- 19) Leüchs u. Plochmann: Zbt. Bakt. 104, 349, 1927. Ebenda 109, 398, 1928.
- 20) Liefman: Mün. m. W. S. 1417, 1913.
- 21) 前田: 実験医学雑誌. 21, 1729, 昭 12, (1937).
- 22) 養茂: 実験医学雑誌. 25, 731, 昭 16, (1941).
- 23) 箕田: 細菌学雑誌. 258, 173, 大 6, (1917).
- 24) 永野: 儿科雑誌. 397, 1064, 昭 7, (1932).
- 25) 長野: 儿科雑誌. 406, 11, 昭 9, (1934).
- 26) Prs'kov & Larsen: J. Bakt. 10, 473, 1925.
- 27) 岡本: 日新医学. 32, 894, 昭 18, (1943).
- 28) 岡本: 実験医学雑誌. 28, 83, 昭 19, (1944).
- 29) 大久保: 細菌学雑誌. 406, 916, 昭 4, (1929).
- 30) 大久保及び大野: 細菌学雑誌. 402, 603, 昭 4, (1929).
- 31) 奥山: 日本傳染病学会雑誌. 6, 668, 昭 7, (1932).
- 32) 太田及び福田: 長崎医学会雑誌. 19, 585, 昭 16,

- (1941).
- 33) Pampana: J. Hyg. 33, 402, 1933.
- 34) Porges: Zbl. Bakt. 40, 133, 1906.
- 35) Rcelcke u. Bartrain: Ztschr. Hyg. 122, 295, 1940.
- 36) 坂本: 兒科雜誌. 340, 1499, 昭 3, (1928).
- 37) 佐々木及び永野: 兒科雜誌. 353, 1775, 昭 4, (1931).
- 38) 進藤: 第10回聯合微生物学会記録. 昭11, (1936).
- 39) 染谷: 衛生學傳染病学会雜誌. 27, 423, 昭 6, (1931).
- 40) 栃木: 實驗醫學雜誌. 27, 54, 昭 18, (1943).
- 41) 都富: 長崎医学会雜誌, 16, 1804, 昭13, (1938).
- 42) White: Med. Res. Coun. Rep. 103, 1926.
- 43) White: J. Path. & Bact. 30, 113, 1927
- 44) 渡辺: 衛生學傳染病学会雜誌. 20, 155, 213, (1924).