コレラ菌主要性狀の相關性に関する靜態觀察

—— コレラ菌性狀の動態研究補遺¹⁾ I ——

山 口 伊 典

長崎大学風土病研究所病理部 (指導 青木義勇教授) 佐賀縣衛生研究所

〔受付: 9 月 6 日, 1951 年〕

コレラ菌は、病原細菌の中でも、その性狀が明らかにせられたものに属して居る。然し、これは他の細菌の場合と同じく、或る特定条件下のものに就いての其れであり、体内感染の時期から培地に馴致される迄を連續觀察し、その間の條件の影響を考察すると謂う、吾々の行っている方式によるものであるとは称し難い。

師青木教授は池田の十二指腸直接接種試験時²⁾のコレラ菌性狀の等閑視し得ない變動に留意し、これを高山の研究に誘導し、こゝに於て、高山はコレラ菌では、その毒力の低下に伴い、特定の性狀群が相關々係を保ちつゝ變動する、即ち形態学的な変化以外に、酸凝集性は強度を減じ、範圍を狭め、菌發育、溶血性、硫化水素產生、含水炭素分解能で示される該菌生活力は弱体化し、カタラーゼ作用も亦菌株によつて低下、抗原性も弱体化、インドール產生、コレラ赤反應は上記に反して昂進乃至陽性に轉化するといつて居る³⁾。

余は、高山の成果より派生した一連の問題に就いて青木教授の御指導により研究を行い、一連の所見を得たので以下報告する。

即ち、第一に高山が立証した相關々係は主として原型稻葉株で觀察されたもので、他の供用株異型小川株では移變の態度が必ずしも相關的でないものがあつた。これは、動物通過と云う動物の個性因子という外的條件が必ずしも一定でなかつたが爲とも考えられ、何れにせよ人工的環境、即ち試験管内培養等により、一定の外的條件下に實驗を行い、再吟味する必要を生じた。

同学福田⁴⁾は赤痢菌を發育忍容限界濃度にアルバジールを加えたペプトン水に、柴原⁵⁾はチフス菌その他を全血液培地等に経代培養する事によつて、毒力の試験管内増強を行つて或る程度成功し、又、桑波田、安村⁶⁾はサルモネラ簇細菌に就て上記福田の意想を適用して性狀の移變を論じ、該菌簇診斷時の注意を喚起して居る。故に、後藤⁷⁾の謂う如くコレラ菌でも動物通過によらずし

て、試験管内で毒力増強や性狀の移變が可能であるならば、高山の所産を増強過程から減弱過程までを、充分に吟味する事が出来るであろう。

更に、この實驗を広く、且つ系統的に行えば、從來試験管内毒力増強に用いられて来た各材料、即ち、血液、血清、サルファ剤、消毒薬剤、ペプトン等の菌に及ぼす影響を比較し得る訳であり、何れに最大増強効果を期待すべきかの点が明らかになると同時に、抗菌性物質作用の菌側の変化に或る程度の体系を立て得るのではないかと考える。

第1章 多數の菌株に就いての靜態觀察

余の研究の首題たる所謂動態觀察用の供用菌を選定するために、昭和21年の内地流行株165株を集め、諸性狀を檢查し、コレラ菌として疑わしいもの、集落が著しく變異したもの等を除き111株に就いて前述相關々係を示すとされる諸性狀を檢查した。この實驗は、各菌株が分離時に受けた外的影響が種々であると思われるので、殊更に性狀を一定せしめる等の操作は加えず、1回ペプトン水通過後分離し供用した。尚、この實驗は昭和22年末に行われた。

検査項目とその方法

1) カタラーゼ作用: 過酸化水素水0.5ccをN/250過マンガン酸加里1ccで完全脱色し得る如く準備し、18時間培養菌液(生理食塩水4ccに1mg菌量)を予め倍数稀釈し、その0.5cc宛を加え、37°C 2時間放置後、10% 硫酸水1滴滴下、2分後上記過マンガン酸加里液1cc投入、振盪し5分間放置、其後、別に0.01~0.0002%フクシン液の色列の色調と比色し、その反應成績を判

YAMAGUCHI, Isuke: Statical observation for correlation on chiefly properties of cholera vibrio. — Supplement to movemental studies on vitality of cholera vibrio, part I. — Jap. J. of Bact., 7 (3): 185-189, 1952.

定記録した。

2) コレラ赤反應: pH 7.6 ペプトン水を用い、その1 ccに上記菌液1滴を滴加し、8及び36時間培養時に濃硫酸0.5 ccを投入振盪し、発色後、アミルアルコール0.5 ccを加え、再び振盪、移行した色調を同じく上記色列と比色し、成績記録した。

3) インドール反應: コレラ赤反應と手技とし、Ehrlich氏試薬を用いた。

4) 硫化水素產生: 1%寒天及び0.05%に塩酸チスチンを添加したそれを基質として、共に0.1%醋酸鉛を加えて高層とし、其に上記菌液を穿刺白金線にて可及的一定量用いる如く穿刺し、37°C 18, 48時間培養時の成績を判定し記録した。

5) 乳糖分解性: 0.5%乳糖加ペプトン水をpH 7.6としB.T.Bにて着色せしめ、上記菌液をその1 ccに滴下し、37°C 12, 24, 48, 72, 96, 120時間目の成績を観察した。

6) 酸凝集性: Michaelisの酒石酸、醋酸、苛性曹達緩衝液を用い、且つ高山の経験に従い、反應は弱いが移變の明瞭に現われる食塩水法に拠つた。試験域はpH 2.4~5.0で、上記菌液を用い、24時間時の成績によつて判定した。

7) 免疫凝集反應: 傳研製抗血清を用い、上記菌液滴下、24時間後の成績により判定した。

尚、前記各実験を共通し、ミクニペプトン、極東肉エキス、邦製純食塩其他培地等條件を統一し、変化のない様に留意した。

成績の記録

実験成績の記録は簡潔と比較の便のため、以下各表を通じ次の如く行つた。

1) カタラーゼ作用(略号C): 標準色列によつて各管の成績を一、+, ++, +++の如く判定し、其の総+数を合計し、その和が1以下を(-), 3迄(+), 5迄(++), 6以上(+++)と記した。

2) コレラ赤反應(略号R)及び3), インドール反應(略号I): 共にアミルアルコールに移行したインドール色調を前記の如く色列と比色し、50,000倍稀釈液色調以下(-), 20,000倍迄(+), 10,000倍迄(++), 以上(+++)とした。

4) 硫化水素產生(略号S): 48時間培養時の醋酸鉛黒變の程度で記し、疑陽性は陰性に入れた。

5) 乳糖分解性(略号L): 48時間目迄に分解したもの(++), 72時迄(++), 96時迄(+), 以降120時迄に分解或は非分解のものを(-)とした。

6) 酸凝集反應(略号AA): pH 3.6の試験管の成績で反應の強弱を代表させ、+, ++, +++等と記し、反應の範囲がpH 3.9に及ぶとき(+), pH 4.2迄凝集する時(++), 以上(+++)と併記した。即ち、pH 3.6が強度凝集を示し、pH 4.2迄凝集が見られる時は++(+++)と記し、更に簡約にする要のあるときは総ての+数を計し、4迄(-), 9迄(+), 15迄(++), 16以上(+++)とした。

7) 免疫凝集反應(略号IA): 上記に準じ800倍稀釈度の反應程度を強弱の指度とし、範囲の表現は1600倍陽性迄を(+), 3200倍迄(++), 以上(+++)とし、簡潔には総+数6迄(-), 15迄(+), 24迄(++), 以上(+++)とした。

成績の説明

以上の方法に拠り、相關性ありとせられる個々の主要性状、即ちカタラーゼ作用、コレラ赤反應、インドール反應、硫化水素形成、酸凝集性、免疫凝集性に就いての各菌株の成績を第1表に要約し、その反應程度別の分布を第1図に示した。

カタラーゼ作用は陰性と認められるもの12株、内1株は全く陰性、他は総て陽性域にある。この内強陽性株は33株で、各試験管共全部強陽性のもの10株を含んでいる。即ち、本作用はコレラ菌として先ず普通性を有するものと思われる。コレラ赤反應は陰性32株(内完全陰性5株)、他は総て陽性であるが、弱陽性と判定したものは、一般検査に於ては陰性で見做され得るものであるから、大体3分の1陰性で見られ、コレラ菌必備の性状とするのには如何と思われる。但し、之は培養8時間目の所見に基づくものであつて36時間目になると勿論陽性例が増えている。

インドール反應は陰性31株、其他は陽性で、陽性数がコレラ赤反應陽性数と偶然一致したが、必ずしも両者一致はしていない。但しコレラ赤反應陰性株にインドール陰性が比較的多い傾向は認められる。この両者間の關係については別に之を攻究した。

硫化水素形成能検査に普通培地を用いた場合は、殆ど大部分が非形成で、陽性のものも弱陽性程度に過ぎず、塩酸チスチン添加培地での成績を第1表に掲げた。本法に拠つても60株が陰性、他は弱陽性39株、中等度陽性11株、強陽性1株で、本性質はコレラ菌の通有的なものでない事を認めざるを得ない。

乳糖分解性は一般に弱く、非分解域のもの65株、内120時間迄、即ち観察中完全に非分解に終つたもの34株があつた。

酸凝集反應では、そのpHは全菌株共に凝集したが、一部の29株は更に明瞭に反應域が伸びてpH 3.6~3.9

Table 1. Results of Studies on So-called "Correlative Properties of Cholera Vibrio" on 111 Strains.

Number of Strain	C	R	I	S	L	AA	IA	Number of Strain	C	R	I	S	L	AA	IA
50	++	-	-	-	-	+(+)	++(++)	72	++	++	++	-	-	++(++)	++(++)
54	++	-	-	+	-	++(++)	+(+)	78	++	++	++	+	-	++(++)	++(++)
59	++	-	-	+	-	++(++)	++(++)	118	++	++	++	+	-	++(++)	++(++)
62	++	-	-	++	-	++(++)	++(+)	120	+	++	+	+	-	++(++)	++(++)
66	++	-	-	++	++	++(++)	++(++)	151	+	++	+	+	-	++(++)	++(++)
67	++	-	-	-	-	++(++)	++(++)	182	+	++	-	+	-	++(++)	++(++)
196	++	-	-	++	-	++(++)	++(-)	8	++	++	++	++	-	++(++)	++(++)
1	-	-	++	+	-	++(++)	++(+)	159	++	++	+	-	-	++(++)	++(++)
97	++	-	-	-	-	++(++)	++(+)	173	+	++	-	-	-	++(++)	++(++)
121	++	-	-	-	-	++(+)	++(+)	17	++	++	++	++	-	++(++)	++(++)
162	++	-	++	-	++	++(+)	++(++)	40	-	++	+	-	-	++(++)	++(++)
65	++	-	-	+	-	-(-)	++(++)	51	+	++	++	+	-	++(++)	++(++)
132	++	-	++	-	-	++(++)	++(++)	77	++	-	++	-	-	++(++)	++(++)
21	++	-	+	++	-	++(++)	++(+)	94	++	++	++	-	-	++(++)	++(++)
56	++	-	+	+	+	++(++)	++(++)	98	++	++	-	-	-	++(++)	++(++)
15	++	-	++	++	-	++(++)	++(++)	100	++	++	-	-	-	++(++)	++(++)
101	++	-	++	+	-	++(++)	++(++)	161	++	++	++	-	-	++(+)	++(+)
82	++	-	++	-	-	++(++)	++(++)	178	+	++	-	-	-	++(+)	++(+)
84	++	-	-	+	-	++(+)	++(++)	46	+	++	+	+	+	++(++)	++(++)
85	++	-	++	+	-	++(++)	++(++)	79	++	++	+	+	+	++(++)	++(++)
103	+	-	++	+	-	++(++)	++(++)	181	+	++	+	+	+	++(++)	++(++)
140	+	+	-	-	-	++(+)	++(+)	10	++	++	++	+	++	++(++)	++(++)
86	++	-	+	-	-	++(++)	++(++)	11	+	++	++	++	++	++(++)	++(++)
88	+	-	+	-	-	++(+)	++(++)	32	++	++	-	-	-	++(++)	++(++)
4	++	-	-	+	-	-(-)	++(++)	47	++	++	+	+	++	++(++)	++(++)
55	++	-	-	-	-	++(++)	++(++)	70	+	++	+	+	++	++(++)	++(++)
87	+	-	++	-	-	++(++)	++(++)	75	+	++	+	-	++	++(++)	++(++)
152	+	-	++	-	-	++(++)	++(+)	114	++	++	+	-	++	++(++)	++(++)
160	+	-	++	-	-	++(++)	++(++)	147	+	++	+	-	++	++(++)	++(++)
16	++	-	+	++	++	++(++)	++(++)	148	++	++	+	-	++	++(++)	++(++)
126	++	-	+	+	++	++(++)	++(++)	156	++	++	++	+	++	++(++)	++(++)
19	++	+	+	++	-	++(++)	++(++)	175	++	+	-	-	++	++(++)	++(++)
92	++	+	+	-	-	++(++)	++(++)	2	+	++	++	+	+	++(++)	++(++)
129	++	+	+	-	-	++(++)	++(++)	7	+	++	++	+	++	++(++)	++(++)
136	++	+	+	+	++	-(-)	++(-)	28	-	++	++	-	++	++(++)	++(+)
168	++	+	+	-	-	++(++)	++(++)	111	+	++	+	+	++	++(++)	++(++)
80	++	+	++	-	-	++(++)	++(++)	116	+	++	++	-	++	++(++)	++(++)
125	+	+	-	+	-	++(++)	++(++)	117	++	++	++	-	++	++(++)	++(++)
128	++	+	++	-	-	++(++)	++(++)	153	-	++	++	+	++	++(++)	++(++)
206	-	+	+	-	-	++(++)	++(++)	179	++	++	+	-	++	++(++)	++(++)
74	++	+	+	-	-	++(++)	++(++)	44	+	++	+	+	++	++(++)	++(++)
13	++	+	++	++	++	++(++)	++(-)	31	++	++	-	-	-	++(++)	++(++)
54	+	+	++	+	++	++(++)	++(+)	41	-	++	-	+	-	++(++)	++(++)
69	+	+	++	+	++	++(++)	++(++)	42	++	++	+	-	-	++(++)	++(++)
127	++	+	+	-	++	++(+)	++(++)	154	-	++	++	+	-	++(++)	++(++)
146	++	+	++	-	++	++(++)	++(++)	155	++	++	++	+	-	++(++)	++(++)
150	-	+	++	-	++	++(++)	++(++)	171	++	++	+	-	-	++(++)	++(++)
130	+	+	+	+	++	++(++)	++(++)	26	++	++	++	-	-	++(++)	++(++)
165	+	+	++	-	+	++(++)	++(++)	61	++	++	++	+	++	++(++)	++(++)
38	++	+	+	+	++	++(++)	++(++)	33	++	++	++	-	++	++(++)	++(++)
133	+	+	+	-	++	++(++)	++(++)	9	+	++	++	-	++	++(++)	++(++)
145	+	+	++	-	++	++(++)	++(++)	197	++	++	++	++	++	++(++)	++(++)
3	++	++	++	-	-	++(+)	++(++)	35	+	++	-	-	-	++(++)	++(++)
36	++	++	-	+	-	++(++)	++(++)	24	-	+	+	-	-	++(++)	++(+)
48	-	++	++	+	-	-(-)	++(++)	157	+	++	++	+	++	++(++)	++(++)
71	+	++	+	+	-	++(++)	++(++)								

The abbreviations C, R, I, S, L, AA and IA indicate respectively Catalase activity, Cholera red reaction, Indol reaction, H₂S production, Lactose fermentation, Acid agglutination and Immune agglutination.

Fig. Frequency Distribution of Reactions.

Figures indicate percentage.

附近に亦強く凝集する点を有した。即ち、最大点を2つ持つている。前者を第1点、後者を第2点と呼ぶと、第1点だけのもの65株、第2点を有すると判断されるもの47株であった。

免疫凝集反応は原、中間、異型の血清を用いたが、第1表には異型血清に対する成績のみを掲げた。供試菌株は殆ど異型血清に特異的に凝集した。たゞ69号株が原型+ (H), 中間型+ (H), 異型+ (H)であり、134, 82, 150, 142号株も同様異型たるを疑わしむる結果を示した。反応程度に就いては、比較的難凝集性を示すもの、即ち800倍稀釈迄のもの4株があるが、全般には高稀釈迄凝集したものが多い。

以上は、蒐集菌株が分離後受けた外的影響の多様であつた事を推測せしめるが、全般的傾向としては、カタラーゼ作用普遍的、コレラ赤反応は比較的弱く、インドール反応亦同様、硫化水素産生及乳糖非分解性は陰性、酸凝集反応は第1点だけ、免疫凝集性は高稀釈度迄陽性が普遍的性質であつた。

此等性状間の相関、及び高山の実験の如何なる時期のそれに、この平均の傾向が合致するかを以下考察してみたい。

主要性状の相関に就いての考察

前掲の第1表に就いて個々の菌株の各主要性状間の相関を概観すると、カタラーゼ作用とコレラ赤反応の間に逆相関々係があるかに窺われ、これは又、インドール反応とも或る程度みられる。然し硫化水素産生能、乳糖分解性、酸凝集性、免疫凝集性等は、先ず無関係の様である。然し第1図の如く、供試菌株全部の平均性状としてみると、カタラーゼ作用とコレラ赤反応間の逆相関は、硫化水素、乳糖分解性等の反応分布が示す関係より不明瞭で、上記個々の菌株について検討した場合と異なる結果

を示し、何れにせよ詳細な分析方法で吟味する要が認められる。

そこで高山の実験上最も移変性の明瞭なコレラ赤反応を基準として、これと他との関係を相関表の形に描いてみた(第2図)。

Fig. 2. Correlation Figure of Cholera Red Reaction to Catalase Activity and to Indol Reaction.

Figures indicate frequency and percentage.

先ずコレラ赤反応とカタラーゼ作用間にはカタラーゼ陰性株の分布状態を除き、稍々負の相関傾向があるかに認められるが、数学的に計出すれば明らかに『相関なし』となる。

次にインドール反応との関係を検するに、之は相関を確証出来得ない。然し正の相関の傾向はある。他の性状との相関は全く認められない(図表略)。

次にカタラーゼ作用を基準にしてコレラ赤反応を除く5性状との関係を調べると、インドール反応の強陽性域を除いて概ね負の相関性を示すが、他性状とは関連しない(図表略)。

インドール反応を基準にし、硫化水素産生能、乳糖非分解性、酸凝集性、免疫凝集性との相関表、更に残りの各交叉相関表を作製したが、之等には全く傾向すら認められなかつた(図表略)。

以上より、コレラ赤反応或はインドール反応とカタラーゼ作用間の相関は、吾々の謂う静態観察に於ても或る程度まで負の関係が存在する事が知られる。コレラ赤反応とインドール反応との関係は、余の研究⁹⁾によつて本質として同一機序に基くものである。即ち、コレラ赤反応成立の一つの因子たる亜硝酸化は菌株の特性に関係なく、他の一つのインドール形成のみが菌株の性質に支配される。然らば、何が故に両者の完全な一致が示されないか。この点の説明の不可能な事が残念であるが、著者がコレラ赤反応をニトロゾインドールの証明で行い、インドール反応を Ehrlich 氏試薬を使用して行つたと言う

反應上の差異ではなくて、菌の發育に伴う複雑な代謝現象に基くものであらうと想像する。

要するに、所謂業室菌の平均性狀は大体に於て高山の實驗の保存菌に似ているが、氏の謂う性狀相関は嚴密な意味では認められない。各地より送られた個々の菌株は夫々異つた條件下に継代されたものであるから、これは寧ろ当然とすべきであらう。

余は本實驗の結果、種々な性狀の組合せを有する適当な菌株を選出し得る。これ等を組合せ、一定條件下に置き、継代し、その世代を追う所謂動態觀察を次の段階に於て行い度い。

要 約

(1) 昭和 21 年九州各地で分離された異型菌と推定される 111 株のコレラ菌を用い、之の諸性狀の相関を検した。

(2) 各反應の発現頻度は次の通りである。カタラーゼ作用 89%, コレラ赤反應 71%, インドール反應 72%, 硫化水素產生 46%, 乳糖分解性 40%。

(3) コレラ赤反應とインドール反應の発現は大体一致し、更に両者とカタラーゼ作用とは逆相関の発現傾向を示すが、例外がある。

(4) 免疫凝集反應と酸凝集反應も逆相関的であるかに

みられるが、これも亦例外が多い。

(5) 總体的に今回の蒐集菌株は高山の保存菌の性狀態度に近い。

(6) 靜態觀察によると高山の謂う相関性狀は嚴密には認められない。

文献及び註

- 1) 本研究は、昭和 21 年より昭和 22 年に到る間に於て、行われたものであり、長崎医学会第 149, 第 154 回例会 (昭 22) 及び第 20 回日本細菌学会 (昭 22) に於て公表せられ、長崎大学風土病研究所業報第 69 号 (昭 22. 8 月) としてプリント印刷し要旨を發表した。
- 2) 池田明: 長崎医大. 風土病研究所業報. 第 57, 58, 59 号, 昭 22 (1957).
- 3) 高山吉晴: 長崎医大, 風土病研究所業報. 第 60, 61, 62, 63 号. 昭 22 (1957).
- 4) 福田正雄: 長崎医会誌. 第 20 卷. 2019 頁. 昭 17 (1953).
- 5) 柴原義夫: 長崎医会誌. 第 20 卷. 1662 頁. 昭 17 (1953).
- 6) 桑波田節, 安村外茂鉄: 長崎医会誌. 第 21 卷. 522 頁. 昭 18 (1954).
- 7) 後藤次郎: 長崎医会誌. 第 20 卷. 臨時第 2 号. 2573 頁. 昭 18 (1954).
- 8) 山口伊典: 長崎医大. 風土病研究所業報. 第 70 号. 昭 22 (1957).