グラム陰性腸内細菌に及ぼす弗化曹達の影響

第3報 酸性弗化曹達の影響

富 田 幸 美

京都大学医学部小兒科教室 (主任 服部峻治郎教授)

〔受付: 9月25日1951年〕

弗化曹達は NaF で表わされる中性塩であるが我々の周囲には NaHF₂ なる化学式の酸性弗化曹達がより広くより多く存在しており市販の所謂弗化曹達は酸性弗化曹達である事が多い。従つて我々の生活には中性塩以上の密接な関係をもつものである。又其の化学式で明かな様に強烈な作用をもつ所の弗化水素分子 HF を含んでいるから細菌に対しても中性塩と異つた大きな影響を予想される。O-Hewelke¹⁾ も弗化曹達の知見という論文の冒頭に実験材料が中性塩であるか酸性塩であるかに就て十分注意すべしと述べている。

1. 実験材料

弗化物の化学に就て詳述した Ernst Scemidts²⁾, Oscar Kausch³⁾ によると 酸性弗化曹達は菱形の小結晶で 270 度の加熱によつて HF を脱出して中性塩 NaF になるもので水に対する溶解度低く大略 1% 程度で飽和する。実験に供したものは光山薬品工業株式会社のものを加熱溶解濾過冷却を繰返して精製したものであつて中性の蒸餾水を以て 0.5% 液を作るにその pH は 3.8 であつた。この 0.5% 液, 1.0% 液を原液として使用した。諸種の培地に之を混合すると pH は酸性に移行するけれども中和するとその特性を失う虞があるので pH 無修正の儘で使用し必要に應じて醋酸等で同程度に酸性とした培地を対照に置いて比較観察した。供試菌は第1報のものと全く同じものである。

2. 殺菌力試験

1) Reddish 法

実験 培地は肉エキス 0.5%, ペプトン 1.0%, 食塩 0.5% pH 7.0 のブイヨンとし菌株はチフス菌芳賀株, 赤痢志賀菌微研株, 大腸菌見崎株を用い 37 度 20 時間ブイヨン培養の 0.5 cc を可検液に加え 5 分, 10 分, 15 分に可検液の 1 白金耳をブイヨンに移植して菌の生死を検査した。

成績 酸性弗化曹達の飽和に近い 1% 液も 5~15 分では供試菌を殺滅せず, 従つて石炭酸系数は算出されない。

2) 便法

実験 薬剤の殺菌力検定法にある如き短時間には殺菌作用を見ぬので同じ要領で時間だけ延長して 24 時間, 48 時間とする。

成績 弗化曹達と異り 48 時間作用では 150 倍 (0.67%) 以上で大腸菌を 250 倍 (0.4%) ではチフス菌, 赤痢菌を殺滅する。大腸菌はチフス菌, 赤痢菌より抵抗が大である。

3. 発育抑制試験

1) 固形培地上の発育抑制

実験 使用菌株の普通寒天培地 37 度 20 時間培養を用い培地は pH 7.4 の普通寒天培地で之に種々の量に酸性弗化曹達を添加し其のため起る pH の変化は無修正のまま使用した。

成績 (1) 酸性弗化曹達に対し固形培地では大腸菌最も抵抗強く 0.06~0.07% で発育抑制を認め 0.08% 以上では集落の発生を見ない。(2) サルモネラ菌属は大腸菌よりも敏感で赤痢菌は更に弱く夫々 0.06%, 0.05% で発育抑制を認める。発育抑制を受け易い菌種の順序は弗化曹達の場合と一致する。(3) 酸性弗化曹達を添加せず醋酸で pH を 5.2, 4.6 とした寒天培地では菌の発育は良好である。此の点よりして前述の成績は pH によるものでなく弗化物の特殊作用によると考えられる。

2) 液体培地に於ける発育抑制

実験 pH 7.2 のペプトン水に種々の濃度に酸性弗化曹達を添加し pH 値の変動は無修正の儘とし之に供試菌の 37 度 20 時間ブイヨン培養の 0.1 cc を植付け 37 度 24 時間にして各培養液を滅菌食塩水で 200 万倍に希釈し其の 0.1 cc を 50 度の普通寒天培地に振盪培養して発生した集落数を計算して之を菌数と見做した。

TOMITA, Yukimi: The influence of fluornatrium upon gramnegative intestinal bacilli. Department of pediatrics, University of Kyoto. — Jap. J. of Bact., 7(4): 297—301, 1952.

本論文の要旨は昭和 27 年 4 月 3 日第 53 回日本小兒科学会に於ける「弗素に関する医学的研究」と題する平田美穂教授の講演中に発表された。

第 1 表 酸性弗化曹達加寒天培地上の菌の發育狀況

NaFHF 濃 度			發 育 狀 況								對 照 發 育 狀 況			
			0.03%	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0	0	0	0
pH			6.8	6.4	6.0	5.6	5.4	5.2	5.0	4.6	7.4	5.2	4.6	4.2
菌 株														
大腸菌	井 上 株	C ₁	++	++	++	+	+	—	—	—	++	++	++	—
	見 崎 株	C ₂	++	++	++	+	+	—	—	—	++	++	++	—
	前 田 株	C ₆	++	++	++	+	+	—	—	—	++	++	++	—
	西 村 株	C ₁₂	++	++	++	+	+	—	—	—	++	++	++	—
サルモネラ屬	國 松 株	T ₁	++	++	++	+	—	—	—	—	++	++	+	—
	京 病 株	PA ₁	++	++	++	+	—	—	—	—	++	++	+	—
	カウフマン株	PB ₃	++	++	++	+	—	—	—	—	++	++	+	—
赤痢菌	花 房 株	SK ₁	++	++	+	+	—	—	—	—	++	++	+	—
	傳 研 株	N ₁	++	++	+	—	—	—	—	—	++	++	+	—
	桃 山 株	K ₁	++	++	+	—	—	—	—	—	++	++	+	—

++ 發育良好 + 發育不良 — 發育なし

第 2 表 ペプトン水中に於ける酸性弗化曹達の菌發育抑制力

試 験 管 番 號		I	II	III	IV	V	VI	VII	對 照
2 倍濃度ペプトン水		2.5cc	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
1 %酸性弗化曹達水		0.10cc	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0
生 理 的 食 鹽 水		2.40cc	2.35	2.30	2.25	2.20	2.15	2.10	2.50
NaFHF 濃 度		0.02%	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0
pH		6.4	6.2	6.0	5.8	5.2	5.0	4.8	7.2
井上株 C ₁	菌 數 { 第 1 回	無 數	無 數	無 數	848	7	55	5	無 數
	第 2 回	無 數	無 數	無 數	786	11	45	4	無 數
	發 育 抑 制	—	—	—	+	++	++	++	—
安原株 C ₃	菌 數	無 數	無 數	無 數	2,712	56	24	12	無 數
	發 育 抑 制	—	—	—	+	++	++	++	—

成績 (1) 大腸菌はペプトン水に於て酸性弗化曹達 0.05 % 附近から發育抑制作用が發現し 0.06 % 以上では著明である。(2) 固形培地の場合に比較して幾分小濃度で既に發育抑制作用を現わす事は弗化曹達の場合と同じ。(3) 酸性弗化曹達の發育抑制濃度は固形培地でも液体培地でも中性弗化曹達の約 10 分 1 のである。

4. 普通寒天培地上の菌に及ぼす影響

実験 pH 7.2 の普通寒天培地に種々の濃度に酸性弗化曹達を添加して之に供試菌の平板培養を行った。0.001~0.01 % 添加では培地の pH は依然中性附近にあるが 0.03 % で 6.8, 0.04~0.05 % で 6.4~6.0 更に 0.06~0.07 % では 5.6~5.4 となるが之は無修正で使用し

た。供試菌は大腸菌井上株, 前田株, バラ大腸菌西村株である。

成績 (1) 0.001, 0.005, 0.01 % 添加の場合は発生した菌集落の性状, 菌の形態, 染色等すべて無添加の対照と差異は認められず。Hesse 寒天を用いて運動に対する影響を検査したが之も差異はない。(2) 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 % 添加の場合は集落の性状には変化を認め得ないが菌は多少染色不同はあるが著しい変化はない。娘集落発生を促進する様な例を見ない。

5. 糖加培地に於ける作用

1) 固形培地

基礎培地は肉エキスをを用いた普通寒天培地で 1 % の割

に糖を加え又標示薬として培地 1 l に対して 0.2 % B. T. B. 液 40 cc を混和し之に酸性弗化曹達を添加した。平板培地層は 3.3~3.5 mm の厚さである。

(1) 1%乳糖寒天培地

実験 1%乳糖寒天培地に種々の濃度に酸性弗化曹達を加え之に普通寒天培地 20 時間培養の供試菌を劃線培養し毎日之を観察した。観察時以外は孵卵器内に置く。

成績 (1) 酸性弗化曹達添加 0.001 % 以下では無添加のものと全く同所見である。(2) 0.005~0.02 % 添加では乳糖分解菌も分解を行なわず。粘液化して培地はアルカリ性に移行して粘液臭を発生し集落の発育甚だ良好となる。(3) 0.03~0.05 % では集落の発育は不良であるが糖分解の所見を呈して培地は酸性となり 72 時間前後から娘集落の発生を見る。酸臭はない。(4) 乳糖非分解菌であるパラ大腸菌西村株, 赤痢菌花房株等では糖分解はないから軽度発育抑制量である 0.03~0.05 % でも 0.005~0.02 % のものと等しく緑青色を呈しやがて粘液臭を発生するに至る。(5) 醋酸を用いて培地の pH を 6.4 としても 7.4 のものと同所見である。従つて前述の諸変化は pH によるものでなく酸性弗化曹達特有の作用と解せられる。(6) 酸性弗化曹達と第 1 報に述べた弗化曹達とは其の作用は質的差異は認められずして量的差異のみ存在する様である。

(2) 1%葡萄糖寒天培地

実験 前項と同様にして大腸菌見崎株, 安原株, 前田株及び赤痢中村菌傳研株に就て実験した。

成績 (1) 添加酸性弗化曹達量 0.001 % では影響を認めない。(2) 0.005~0.02 % 程度では糖分解は行われず培地はアルカリ性になり集落も緑色, 帯緑青色となり漸次粘液臭を発生する様になる。娘集落の発生はない。(3) 軽度発育抑制量たる 0.03~0.05 % では再び糖分解による培地の酸性化が見られ黄色乃至帯褐黄色の稍々発育不良の集落が生じ 72~96 時間で娘集落を生ずる。(4) 酸性弗化曹達加糖培地上の集落では弗化曹達の場合と全く

同様の菌の形体上, 被染色上の変化が見られる。特に母娘解離の際の菌の形体は甚だ特異であつて之は後報に詳述する。

2) 液体培地

実験 発育に障碍を与えず対照と略々同菌数になる範囲である所の 0.001~0.01 % に酸性弗化曹達を加えた 1 % 乳糖ブイオンによつて醗酵試験を行つた。醗酵管は 15 cc 内容のものをを用い供試菌のブイオン血温 20 時間培養 0.1 cc を植付量とした。各管内の培地は添加量の異なるに従つて起始 pH が一樣でないから醗酵後の pH や酸度の測定比較は省略して瓦斯発生量を讀んで糖分解の程度を窺つた。又発生瓦斯の量的変化以外に質的差異有無の大略を知るため苛性加里液を用いて発生瓦斯中の炭酸瓦斯と水素との比を求めた。

成績 (1) 乳糖ブイオンに加えた酸性弗化曹達濃度と糖分解による瓦斯產生量とは反比例する即ち糖分解は抑制される。(2) 発生する瓦斯は質的に変化はない様である少くとも炭酸瓦斯と水素との比は対照の 0.58 に対し 0.001 % のもので 0.62, 0.005 % のもので 0.62, 0.01 % のもので 0.59 であつて差異は認められない。

6. インドール產生に及ぼす影響

ペプトン水又はブイオンに糖を加えて細菌を培養するとインドール產生は甚しく阻害される。其の現象を糖分解による酸生成のためと理解する一派もある。之は第 2 報記載の実験で必しも當つてはいないことを証明した。然し乍ら酸がインドール產生に対して或る関係にあるものとすれば酸性弗化曹達は弗化曹達と異つた大きな影響を予想し得る。

実験 ブイオン血温 20 時間培養の供試菌を酸性弗化曹達加ブイオンに移植し 37 度 24 時間で之にエールリッヒ試薬を重疊して紫紅色輪の出現するか否かを観察した。菌は大腸菌井上株, 見崎株, 安原株を用いた。

成績 総ての菌株に於て酸性弗化曹達 0.001, 0.005, 0.01 % のいずれにも対照と同程度にインドールを產生

第 3 表 酸性弗化曹達加乳糖ブイオン醗酵成績表

菌株 NaHF 濃度	培養時間	瓦斯產生量 (cc)											
		井上株 C ₁				見崎株 C ₂				安原株 C ₃			
		6 時	12	18	24	6	12	18	24	6	12	18	24
對照 0		1.3	4.9	6.8	8.2	0.9	5.4	7.9	8.8	1.0	5.0	6.7	7.5
0.001%		0.8	3.8	5.2	6.2	0.6	4.3	6.5	7.4	0.7	3.5	5.0	5.8
0.005		0.8	3.4	4.9	5.6	0.6	4.1	6.0	7.1	0.7	3.4	4.7	5.6
0.01		0.8	3.2	4.3	5.0	0.6	3.5	5.1	6.0	0.7	3.1	4.1	4.9

第4表 瓦斯量比較グラフ

した。

7. 硫化水素発生に及ぼす影響

実験 肉エキスを pH 7.6 の寒天培地に 5% 醋酸鉛溶液 20 cc を加えて滅菌し試験管内に高層として使用した。培地のペプトンはチヌチンを含む武田のポリペプトンを使用した。之に 0.001, 0.005, 0.01, 0.02% に酸性弗化曹達を含まして之に試験管壁沿いに数カ所宛穿刺培養して時間を追つて培地黒変の状況を観察した。

成績 大腸菌の二株、パラ大腸菌一株、チフス菌、パラチフス B 菌各一株に就て実験した結果硫化水素発生に対して酸性弗化曹達の影響は見られない。0.02% の場合にパラ大腸菌、サルモネラ菌属では培養 24 時間で培地の黒変がやや弱いが菌の発育も悪い。48 時間にして菌が十分発育するとその差も認め難くなる醋酸鉛寒天培地によく発育する大腸菌では総て全く同一で何等差異はない。

8. 中性紅還元作用に及ぼす影響

実験 武田のポリペプトン及び肉エキスをを使用した寒天培地 1% に葡萄糖 5g 中性紅飽和水溶液 10 cc を加え、之の中に酸性弗化曹達の 0.001, 0.005, 0.01, 0.02% に含有するものを作り適量を試験管に分注高層として使用した。供試菌は大腸菌見崎株、安原株、パラ大腸菌三宅株、チフス菌國松株、パラチフス B 菌京病株、油谷

株であつた。

成績 酸性弗化曹達の影響は殆んどない。実験した程度の濃度では中性紅還元作用を僅かに促進する様であるが顯著でない。

9. カタラーゼ作用に及ぼす影響

1) カタラーゼ反應に及ぼす影響

実験及び成績 普通寒天培地 20 時間培養の菌集落を掻き取つて 5 cc, 1 mg の割に菌浮遊液を作りメヂウムを生理的食塩水とした場合と 0.03% 酸性弗化曹達水を用いた場合とを比較した。カタラーゼ測定法は過マンガン酸加里法を用う。

第二報記述の弗化曹達水の場合と同様に酸性弗化曹達水メヂウムは著明にカタラーゼ反應を抑制し例えば大腸菌前田株 C₆ に就て見るに生理的食塩水メヂウムでは菌浮遊液 32 倍迄カタラーゼ反應陽性なるに酸性弗化曹達水の場合は僅に 2 倍迄陽性であつた。

2) カタラーゼ産生に及ぼす影響

(1) 普通寒天培地に於けるカタラーゼ産生に及ぼす影響

実験 普通寒天培地に種々の量に酸性弗化曹達を加えて之に供試菌 37 度 24 時間培養し其の菌苔を掻きとり生理的食塩水 5 cc に 1 mg の割に浮遊液を作り之をカタラーゼ原液として過マンガン酸加里法で測定した。供試菌は大腸菌前田株、宮井株、美和株である。

成績 (1) 酸性弗化曹達はカタラーゼ産生に影響はない。(2) 培地の起始 pH 5.0 程度でカタラーゼ産生量少しく減少するとの報告もあるが酸性弗化曹達添加の爲培地 pH 5.4 迄変化したがカタラーゼ量は減少しない。

(2) 糖加寒天培地に於けるカタラーゼ産生に及ぼす影響

酸性弗化曹達は量的質的に細菌の糖分解に影響を及ぼす。

第5表 酸性弗化曹達添加糖培地上菌のカタラーゼ産生量

培地及 pH		稀釋倍數	カタラーゼ反應							
			2倍	4	8	16	32	64	128	256
宮井株	普通寒天培地	7.4	+	+	+	+	+	+	—	—
	0.03% NaFHF 添加普通寒天培地	6.8	+	+	+	+	+	—	—	—
	1%乳糖寒天培地	7.4	+	—	—	—	—	—	—	—
	0.03% NaFHF 添加1%乳糖寒天培地	6.8	+	+	+	—	—	—	—	—
	1%葡萄糖寒天培地	7.4	+	—	—	—	—	—	—	—
	0.03% NaFHF 添加1%葡萄糖寒天培地	6.8	+	+	+	—	—	—	—	—

福地株、美和株も全く同成績であつた。

す事は既に証明した。之を以て見ると当然糖のカタラーゼ產生抑制作用に或る変化を與える事を予想出来る。

実験 カタラーゼ原液の作り方, カタラーゼ測定法は前項と全く同一にした。

成績 (1) 乳糖或は葡萄糖寒天培地上の菌のカタラーゼ量は無糖寒天培地上のものに比して著減することは先人の業績の通りである。(2) 糖と同時に0.03%酸性弗化曹達を加えた培地ではカタラーゼ量の減少度は軽くなつて糖加寒天培地と無糖寒天培地の中間となる。

10. 凝集反應に及ぼす影響

実験 普通寒天培地に種々の量に酸性弗化曹達を添加して之に供試菌を培養し之で菌浮遊液を作り原株菌血清との凝集反應を行う。供試菌はチフス菌國松株, A型パラチフス菌カウフマン株, B型パラチフス菌油谷株, 中村菌微研株, 川瀬菌桃山株である。

成績 酸性弗化曹達添加培地に發育したチフス菌, パラチフス菌では輕微ながら被凝集の高まる傾向が見られ又血清稀釈倍数小なる範囲内では凝集絮狀物が頗る粗大である。然し赤痢菌ではその変化の程度が輕い。

総括

酸性弗化曹達はグラム陰性腸内細菌に対して。(1) 0.4~1.0%溶液48時間作用で殺滅する。(2) ペプトン水では0.05%, 普通寒天培地では0.05~0.07%以上の添加で發育抑制作用を表わす。赤痢菌が最も敏感である。(3) 普通寒天培地に0.001~0.07%添加しても發育する集落, 菌に著明な変化は見られない。(4) 乳糖寒天培地に添加すると乳糖分解菌も0.005~0.02%では糖分解を抑圧され培地はアルカリ性に移行し集落は粘液臭を發するに至る。0.03%以上に及ぶと再び糖分解の所見を表わして培地は酸性になる然し無添加の場合の様な酸臭はなく娘集落の發生を見る。乳糖非分解菌では0.03

%以上でも0.005~0.02%の場合と同所見である。之等の性質は遺傳的とはならない。(5) 葡萄糖寒天培地の場合も同じ関係である。(6) 乳糖ブイヨンに0.001~0.01%添加すると醗酵現象は抑圧されて瓦斯發生量が減少する。生ずる瓦斯の炭酸瓦斯と水素瓦斯の比は対照と差はない。(7) インドール產生に影響はない。(8) 硫化水素發生に影響はない。(9) 中性紅還元作用は0.001~0.01%添加で僅かに促進する観があるが顯著ではない。(10) カタラーゼ反應を阻害するがカタラーゼ產生には直接影響はない然し糖のカタラーゼ產生阻止作用を減弱せしめる。(11) 凝集反應には大なる影響はない。

要するに一定濃度で發育抑制的であり更に殺菌的にも働く。細菌の蛋白系代謝には大なる影響は無いが含水炭素系の代謝には特異且著明な変化を與える。

中性弗化曹達 NaF と酸性弗化曹達 NaFHF の比較 (1) 両者の作用に質的差異は認められない。然し量的には大差があつて後者は前者の約10分1の量で同じ力を發揮する。(2) 酸性弗化曹達の特異作用を發現するのはNaF部であつてHF部は寧ろ其の作用を増強している様である。(3) 自然界で諸生物に影響を與える点では其の分布の広いこと及び低濃度で作用を發揮する所の酸性弗化曹達がはるかに大である。

擱筆するに當り恩師服部教授の御指導御校閲を深謝し常に直接指導に當られた平田教授に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) O-Hewelke: d. Med. W. I. 477, 1890.
- 2) Ernst, Schmidts: Lehrb. d. Pharmaz. Chemie. 1933.
- 3) Oscar, Kausch: Flusssäure, Kieselflusssäure u. deren Metallsalze, Eigenschaften, Herstellung u. Verwendung. 1936.