馬流産菌々体成分に及ぼす 培地成分の影響に就て

佐 藤 壽 氷 室 功

東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)

[受付: 9月5日 1953年]

緒 論

菌体内有毒物質の研究に当り、従来集落型又は菌力等を標準として菌を選び、培養条件等に就ての考慮を拂つた記載は甚だ少い。先に当教室に於て菊池¹⁾は、チフス菌体から有毒物質を多く得る爲の培地として、カルノペプトン、或はポリペプトンにブドウ糖を添加せる肉汁培地を挙げている。栃木²⁾は赤痢菌に就て、ペプトンの硫酸水解物を窒素源として用いることに依り毒力の強いS型菌が得られると述べ、Walker³⁾及びFreeman⁴⁾等はチフス菌に於て普通寒天及び合成培地を用いて菌体成分を比較している。又 Rogosa⁵⁾は培地に Tween 80 を添加して乳酸菌のS型菌を保ち得るとなし、Crossely⁶⁾等はS型菌を得るには可溶性澱粉加培地が良いと報告している。一方 Hehre⁷⁾はブイヨンに蔗糖を加えて、Neisseria の1株を培養し、培養液及び菌体に著しく多糖体 (Amylopectin 様物質) が増加することを認めている。

一般に細菌は人工培地上でS型からR型へと変異することは古くから知られて居り、この様な発育相の変遷によつて、多糖体分割の全部又は一部が消失し、毒力が減弱し、抗原構造の変化を来すこと等が指摘され、且つ之等は培養基成分と密接な関係があるとされている (Davis and Dubos)⁸⁾ 而して特に毒性の変化に就ては、Boivin⁹⁾ 及び Ivanovics¹⁰⁾ はS型、R型菌の多糖体成分の毒素としての役割に関して研究し、黒屋等¹¹⁾¹²⁾¹³⁾は、チフス菌体の同様の成分の毒性作用に就て種々研究した。

従つて多糖体物質の多く含む菌を培養条件等を吟味することによつて求めることは、菌体内毒素の研究に當つての基礎的問題であるに拘らず、この方面の研究は甚だ少い様である。

余等は斯る目的を以て馬流産菌の1株を用い、(1) 僅かの菌体を用いて、蛋白分割 PF と多糖体分割 CF とを比較測定し、菌型と菌体成分との関係を明らかにし、

更に CF を多く含む菌集落を選択累代することに依つて 目的とする集落を得ようとする試みと、(2) 従来供試菌の培養時間として慢然と 24 時間又は 48 時間培養が選ばれていたが、この培養時間と PF, CF の量との関係、更に (3) 培養基成分の変化によつて影響されると考えられる PF, CF の量の問題及び (4) PF, CF 量を異にする菌の毒性等に関し検討を加え、些か所見を得たので茲に報告する。

実験方法並びに成績

使用菌株は家畜衛試東北支場より分譲を受けた馬流産菌遠隔菌株である。

PF 及び CF の比較測定方法

単一の集落を培養して得られた菌体 45.6 mg を 5 cc の水に均等に懸濁し、光電光度計に依つて其の混濁度を一定となし、この液を中性加熱 (100°C, 1 時間) して菌体成分を抽出し、其の 2 cc を pH 3.6~3.8 (三塩素醋酸) となし、この際生ずる混濁度を比濁して之を PF 値とした。次に遠心により蛋白を除き、其の上清 1 cc を用いて Carbazol 反応 (試料 1 cc に純濃硫酸 2 cc, 0.5 % Carbazol-alcohol 溶液 0.1 cc を加え沸騰浴中で 10 分加温、冷却後直ちに比色) による呈色の強さを比色測定し、之を CF 値とした。尚お以上の操作過程に於て、明瞭に等電点を示すものと、然らざるものとを区別し、比濁、比色の結果は吸光度 E を以て示した。

実験 I. 肉汁培地を使用せる場合

培養基は馬肉汁、極東ペプトン及び食塩より成る普通寒天培地を用い、培地作製条件を努めて一定にした。

SATO, Hisashi, and HIMURO, Isao: Studies on the effects of culture media for bacterial body substances of *S. abortus-equi*. Bacteriological Department, Medical Faculty, Tohoku University, Sendai. — Jap. J. of Bact., 8(8), 835-839 1953.

(1) 集落型による PF 及び CF の相違：平板上に分離された菌集落から S 型, SR 型及び R 型とを区別し, 夫々 10 コを別々の寒天斜面に 37°C, 24 時間培養した菌体に就て PF, CF 値を測定したところ, S 型菌は R 型菌に比して一般に CF 多く, PF が少い。又等電点明瞭な集落は R 型, SR 型に多いことを知った。(第 1 図)。

第 1 図 集落型を異にする菌体の PF 及び CF

(2) 菌集落の選択：保存培地から平板上に集落を分離し, 其の中から S 型集落 50 コを拾い, 之等を別々の寒天斜面に 37°C, 24 時間培養した。この培養菌体に就て PF, CF 値を測定し, CF の多く, PF の少い菌を再び平板に移植し, 同様な操作を繰返すことに依つて 30 ~ 50 コの集落中から CF の多い集落を逐次選択し VIII 代に及んだ。第 2 図は之等の結果を I 代に就ては各集落の

第 2 図

試験管内及び動物通過菌集落の PF 及び CF (肉汁培地)

PF, CF 値を示し, I 代から VIII 代迄の PF, CF 値は夫々 30 ~ 50 コの集落の平均値を以て表したものである。本図に明らかな様に 1 代から逐次選択累代することにより, III, IV, V, VI 代迄は I, II 代に比して CF

も増加し, 等電点明瞭な集落も消失し, 集落は S 型性状を呈する様になつて来た。然るに VII 代以後に於ては逆に CF の減少と PF の増加が認められ, 等電点を明瞭に示す集落数も増加し, やゝ R 型を呈して来た。即ち本菌では肉汁培地で CF の多い集落を選択すると III, IV, V, VI 代に於て略々其の目的を達するけれども, 更に継代を続けるときは逆に CF の減少と PF の増加が見られる。

次に動物通過菌の菌体成分を知る爲に, 本菌 0.01mg にて死亡せるマウスの脾臓乳剤 0.5cc を次代のマウス腹腔内に注射し, 更に死亡せるマウスから逐次他のマウスに接種すること 20 代, 其の間マウス通過 7, 12, 15, 20 代とに於て平板上に生じた集落 30 ~ 50 コについて PF, CF 値を測定した。第 2 図は之等の結果を PF, CF の平均値を以て示したもので, 動物通過 7 代—I に於て既に等電点を明瞭に示す集落がなく, 此の中から CF の多いものを選んで寒天培地で植次いで見ると, 7 代—I に示す様に CF の増加が見られる。而して連続動物通過せる場合は 12 代位迄は PF, CF 共に多く, 定型的 S 型を呈しているが, 15 代以上の動物通過になると再び PF 特に CF の減少, 動搖を見, 集落型も R 型に傾き, 等電点を示す集落も出現して来る。即ち本菌では動物通過によつて 7—12 代位で一應目的を達成し得るが, 更に之を続けるときは再び PF, CF の減少を来す。

(3) 培養時間に依る PF 及び CF の変化：S 型集落 2 コを拾い, 12, 24 及び 48 時間培養し, 夫々の菌体に就て PF, CF 値を測定した。この結果培養初期の菌体は PF, CF 共に多く, 培養時間の経過と共に減少する。

(4) 種々なる成分を添加せる培地に於ける菌体 PF, CF：肉汁培地を対照とし, 之に種々なる物質を添加せる培地の菌体に就て PF, CF 量の変化を検した。この結果, ブドウ糖 (0.2%), 乳糖 (0.2%) 加培地の菌体は対照に比して PF 少く, CF が著明に多く, 可溶性澱粉 (2%), 活性炭末 (0.05 ~ 0.1%) 加培地及び無水炭酸 (ローソク法) 環境下の培養菌体は PF, CF 共に多い。ブドウ糖加培地では R 型を呈するが, 可溶性澱粉, 活性炭末及び乳糖加培地では著明な S 型を呈している。以上の結果に就ては再試する必要があると思う。

(5) PF, CF 量の異なる菌体の毒性：PF, CF 値を異にする菌体のアセトン乾燥死菌を用いて, 腹腔内注射によりマウスに対する毒性を検した。之等の結果では各菌体間に余り著明な差異を認めることは出来なかつたが, PF 少く, CF の多い菌体, PF, CF 共に多い菌体

は、それらの少い菌体に比較して若干毒性が強い様である。

実験 II. カゼイン培地を使用せる場合

以上余等は普通寒天培地に於て種々検討を加えて来たが、この様な培地に於ける継代では本菌は菌型のみならず、菌体成分に於ても変異を来しやすく不適当であるので、カゼイン水解産物による半合成培地 (Na_2HPO_4 1.4g KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, Nicotin 酸アミド 0.01 g, 1%カゼイン水解溶液 1.0l, 寒天 3%, pH 7.4) を用いて菌体成分を検討した。(尚おこの培地に Tryptophan 0.025 g/l 又は Indol 0.1g/l を加えても菌の発育は対照と同様であり、又後述の菌体成分に対しても影響はなかつた)。

(1) 菌集落の選択: 肉汁培地からカゼイン培地平板に集落を分離し、S型菌と思われる集落 30 コを拾い、肉汁培地の場合と同様にしてVIII代迄果代し、其の間 PF, CF 値を測定した。第3図に示す結果はI代に於ける 30 コの集落の PF, CF の関係を示したもので、かく各集

第3図

カゼイン培地を用いて菌集落の選択 (I-VIII 代)

落の集中した関係は、VIII代に到つても略々同様な関係を示したので、以後の各代は平均値を以てつ1の図にまとめて表した。この結果から明らかな様に、本培地に於ては果代により菌体成分の動揺も少く、集落型も一樣な大きさのS型を呈している。

(2) 培養時間による PF 及び CF の変化: カゼイン寒天平板の集落 10 コを釣菌し、其の1コ宛を3本の寒天斜面に培養し、12, 24, 48 の各時間培養して得られた各菌体の PF, CF 値を測定した。即ち培養時間による PF, CF の関係は肉汁培地の場合と略々同様な結果を示した (第4図)。

(3) 種々なる成分を添加せる培地の菌体 PF 及び CF: カゼイン培地を対照となし、之にブドウ糖 (0.2%), 乳糖 (0.2%), 活性炭末 (0.1%), 可溶性澱粉 (2.0%) 添

第4図

培養時間による PF, CF の変化 (カゼイン培地)

加及び無水炭酸環境培養菌体に就て、肉汁培地の場合と同様にして PF, CF 値を測定したが、この場合は対照との間に差異が著明でなかつた。

実験 III. 肉汁培地とカゼイン培地とに培養せる菌体の比較

以上肉汁及びカゼイン培地上の菌体成分に就て種々検討を加え、其の結果、後者は前者に比して形態上並びに菌体成分上優つて居る様に思われるが、更に之等の関係を確める爲に次の実験を行つた。

(1) 動物通過菌に就ての PF, CF の比較: 先ず対照として動物通過直前に於ける両培地平板上集落の PF, CF 値を比較する爲に、肉汁保存培地から肉汁及びカゼイン培地平板に培養し、夫々15コ宛の集落に就て PF, CF 値を測定した。一方保存培地からの菌を連続マウスを通過し、1, 3, 5, 7, 9 代に於て対照と同様にして PF, CF 値を測定した。この結果、動物通過以前の両培地からの菌体 PF, CF 値は著明な差異があり、特にカゼイン培地からの菌体は遙かに CF が多く、集落も一樣なS型を呈しているが、動物通過の代数を余り重ねると前と同様に菌の変異を来すものと思われ、7代及び9代に及んでは両培地とも CF の減少を来し、R型性状を呈して来た。

(2) 毒性の比較: 肉汁培地とカゼイン培地とから得られた菌体のアセトン乾燥死菌を用いて毒性を比較した。この結果 PF, CF 共に多いカゼイン培地の菌体は M.I.D. 0.03mg を示し、0.06mg を示した肉汁培地のそれに比し明らかに毒性が強い (第1表)。

(3) 液体培養による菌集落型の変化: 普通ブイヨンの長時日培養によつてS型菌がR型菌へ変異することはよく知られているが、カゼイン培地に於ても同様な現象を

第1表 肉汁培地及び Casein 培地菌体の毒性

培 地	PF及びCF (E)	菌 量 mg	マウス生死
カゼイン培地	PF 0.25 CF 0.57	0.06	● ● ●
		0.03	● ● ●
		0.01	● ○ ○
肉 汁 培 地	PF 0.11 CP 0.36	0.12	● ● ●
		0.06	● ● ○
		0.03	● ○ ○

○ 生 ● 死

示すか否かを肉汁培地と比較検討した。

先ず肉汁寒天平板よりS型集落1コを拾い、之をブイヨン及びカゼイン液体培地5ccに接種し、37°C、24時間、更に8日後に夫々同培地及び異名培地の平板に接種し、各平板につき50~100コの集落を観察して、其の結果を各集落型の百分率を以て表した(第2表)。即ちカ

第2表 液体培養による菌集落の変異
24時間及び8日間培養の比較

培 地	菌 型	S %	SR %	R %
B→Bs		73 (0)	26 (30)	1 (70)
B→Cs		94 (55)	6 (45)	0 (0)
C→Bs		64 (38)	36 (61)	0 (1)
C→Cs		98 (69)	2 (31)	0 (0)

註 B ブイヨン培地 () は8日間培養所見

Bs 肉汁寒天培地

C. カゼイン液体培地

Cs. " 寒天培地

ゼイン液体培地から同寒天培地に移した場合に最もS型が多く、ブイヨン培養からカゼイン寒天培地及びカゼイン液体培地より肉汁寒天培地に移した場合之に次ぎ、肉汁培地間に於ては培養8日後には殆んど総べてがR型に変異している。

以上の結果はカゼイン培地に於て保たれたS型菌が肉汁培地に移すことによりR型菌となり、又反対にブイヨンよりカゼイン培地に移すことに依つて、恐らくSR型がS型へ復元する現象を示唆するものとも考えられる。

考 按

馬流産菌に限らず、一般に菌体内有毒物質の研究に当つては、毒性の強い毒素成分を多量に含む菌体を得ることが望ましい。余等は之等の手段として、マウスに対し

て毒力の強い馬流産菌を用い、集落の選択をなすことにより、又培養条件等を変えることにより得られた菌体の菌体成分の変化を種々検討した。

(1) S型菌は一般にR型菌に比してCFが多く、PFが少く、而もPFをCFから等電点により分離することが困難である。即ちS型菌体の抽出溶液に就き、種々水素イオン濃度を変えてもPFの沈降が認められない。この事は恐らくCFがPFの保護膠質的な作用をなす爲と考えられる。

(2) S型集落で而もCFを多く含む菌集落の選択は、肉汁培地に於ても或る程度迄其の目的を達するけれども、本菌株はこの培地では菌体成分及び集落性状の変異が著しく、青野等¹⁴⁾の報告したチフス菌(58株)のそれらとは著しく趣きを異にしている。之に反してカゼイン培地では常に一樣なS型集落が得られ、菌体成分の変動も少い。カゼイン培地は一定組成の培地として調製されるに反し、肉汁培地は、肉汁そのものが一定条件のものを得難く、又ペプトン中にもFoster等¹⁵⁾及び黒屋等¹⁶⁾が認めている様に發育抑制物質があり、この種の物質がS型菌の發育に不適当な条件を與えている可能性も考えられるが、活性炭炭、可溶性澱粉等は恐らく培地中のこれら發育抑制物質或は變異促進物質等を物理的に不活化する作用を有するものと考えられる。

(3) 動物通過を連続繰返すことに依り得られた菌集落は、常に菌体成分が良好に保たれるだろうと考えられたが、本菌株に於ては、或る程度以上に動物通過を重ねるときは、菌体成分が次第にR型の性格を示して来る。このことは動物通過に当り(i)其の動物が菌に対して適当なものであるか否か、(ii)接種する菌量、(iii)動物が死亡してから菌を分離する迄の時間、(iv)分離する場合に用いる培養基等の諸因子が參與して菌体成分に影響を與えるものと思われる。

結 論

(1) S型菌は一般にCFが多く、PFが少い。又菌体抽出液に於けるPFの等電点は、CFの少い菌体に於て明瞭に認められる。

(2) 本菌株は肉汁培地に於て継代選択することにより、或る程度迄、S型にしてCF多く、PF少き菌を選択することが出来るが、之等の性状は何れも変異し易く、本培地上に於て余り累代することは出来ない。

(3) 肉汁培地でPF、CF共に多い菌体を得るには、短時間培養、可溶性澱粉、活性炭炭加培地及び無水炭酸環境培養等が適當である。

(4) カゼイン培地では肉汁培地に比し, 菌はS型を保ち, PF, CF 特に CF が多く, 累代することによつても之等の変動は起り難いが, 菌体収量は少い。

(5) CF の多いアセトン乾燥死菌は, CF の少いそれよりも毒性強力である。

(6) マウス通過によつて菌体の毒性物質は多くなるが, 連続通過に依つては 必ずしもこの状態が保たれず, 寧ろR型菌に変異することもある。

文 献

- 1) 菊池恭太郎: 東北医誌, 31, 553, 昭17 (1942)
- 2) 朽木武営: 実験医誌, 26, 443, 昭17 (1942)
- 3) Walker, J., Biochem. J., 34, 325, 1940
- 4) Freeman, G. G., Chaulinor, S. W. and Wilson, J., Biochem. J., 34, 307, 1940
- 5) Rogosa, M. and Mitchell, J. A., J. Bact., 59, 303, 1950
- 6) Crossley, V. M., Ferguson, M. and Brydson, J. J. Bact., 52, 367, 1946
- 7) Hehre, E. J. and Hamilton, D. M.: J. Bact., 55, 197, 1948
- 8) Davis, B. D. and Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 86, 215, 1947
- 9) Boivin, A. and Mesrobian, Z.: Rev. d. Immunol., 1, 553, 1935
- 10) Ivanovics, G.: Z. Immunit, Forsch., 87, 310 1936
- 11) 黒屋政彦, 押尾乾夫, 胡秉圭: 上海科研報, 9, 1' 1939
- 12) 黒屋政彦, 小泉和: 東北医誌, 26, 1, 昭15 (1940)
- 13) 黒屋政彦, 小泉和: 東北医誌, 29, 231 昭16 (1941)
- 14) 青野義一, 中目幡雄: 日本細菌学会第6回東北支部会, 昭27 (1952) 山形
- 15) Hardwick, W. A., Guirard, B. and Foster, J. W.: J. Bact. 61(2) 145, 1951
- 16) 黒屋雅, 清野嘉久彌: 第24回日本細菌学会総会, 昭26 (1951) 東京