或る細菌が尿中に繁殖してリグニンを赤くする現象に就て

(第7報) L. R. 菌の細菌學的特性

原 田 篤 也 (大阪大學産業科學研究所)

昭和 25 年 5 月 16 日 受理

On a New Bacterium in Urine which makes Lignin Red.

Part 7. The Bacteriological Characteristics of the L. R. Bacterium

By Tokuya HARADA (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.)

綜 論 先にこの現象に關與する細菌として土壤中に廣く存在する L. R. 菌を分離し、その一般的性質を明かにし、この菌が *Streptococceae* であることを述べた⁽¹⁾⁽²⁾。本報告では L. R. 菌が尿インデカン⁽³⁾を分解する特性の他に、更に極めてアルカリ性を好み、酸性では殆ど繁殖しない特殊な *Streptococcus* であることを明かにした。BERGEY も認むる如く *Streptococcus* を正確に分類する事は極めて困難である。SHERMAN⁽³⁾は *Streptococcus* 中 aerobic の菌を 4 groups に分け、pH 9.6 以上のアルカリ性で繁殖し、6.5% の食鹽に抵抗性を有する菌は entero group にいれてある。L. R. 菌はまさしくこの性質を備えている*。

然るに entero group 中の菌(4種類)は何れも加糖肉汁培養基の終末 pH が 4.0~4.5 を示し、中性に近い終末 pH をもつ L. R. 菌と明かな差がある。なお pyogenic group のもので *Streptococcus pyogenes* は終末 pH 4.8~6.0 を示し、又この 4 groups 以外の菌で appendix として記載されているものの中で *Streptococcus acidominimus* は終末 pH が 5.6~6.5 で中性に近い。併しこれ等の菌は何れも pH 9.6 で繁殖しないとされている。

Streptococcus の加糖肉汁培養基の終末 pH を重視した研究は AYERS⁽⁵⁾、JONES⁽⁶⁾、GIBSON⁽⁷⁾、兼卷氏⁽⁸⁾の他に多數見られる。併し終末 pH が中性に近く且つ pH 9.6 以上のアルカリ性で繁殖する L. R. 菌の如き *Streptococcus* は知られていない。兼卷氏は終末 pH 6.6~6.8 の菌株をあげているがアルカリ性側の繁殖限界を記載していない。

さて *Streptococcus* の終末 pH を問題とするならば、アルカリ性側の繁殖限界をも共に考慮すべきで、例えば酸性を好む乳酸菌とされている火落菌⁽⁹⁾では此の點が明確にされている(L. R. 菌がアルカリ性を好み、火落菌が酸性を好む乳酸菌であるという點でよい對照をなしている)。

そこで著者は關係菌株につきアルカリ性側の繁殖限界をしらべた。その結果 L. R. 菌は試験した entero group 中の菌にくらべて更にアルカリ性を好む *Streptococcus* であることが判明した。entero group 中の菌の存在する腸内には pH 10 以上で繁殖する菌は存在しないといわれているが⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ L. R. 菌は pH 10.15 以上でよく繁殖する。

尿醗酵に出現する菌として松野氏⁽¹²⁾は種々な菌を分離したが、その中 *Streptococcus* をも分離し、この菌は醗酵性糖よりみて *Streptococcus faecalis* であろうと述べている。又 A. BECK 及び J. BROWN⁽¹³⁾ 又山元氏⁽¹⁴⁾に依れば腸内の *Streptococcus* はすべて尿培地に繁殖するが、しからざる *Streptococcus* は全く繁殖しないか(A. BECK)、或は繁殖しない菌株が多いという(山元氏)。併し尿の醗酵中に腸内の *Streptococcus* は勿論出現し得るが、BECK の斷定とは異り、著者の實驗の如く L. R. 菌の如き腸内の *Streptococcus* 以外の菌も亦出現し得るのである。一方古くより *Streptococcus* の變異の研究があり、⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ esculin を分解し得ない菌がアルカリ性培地通過、尿培地通過に依り變異を起し、esculin 分解能を得る事が報ぜられている、腸内の *Streptococcus* はすべて esculin を分解する故、以上の例は *Streptococcus* 中の或る種の菌の腸内の *Streptoco-*

* 以前は entero group を特に enterococcus と稱していた。enterococcus は腸内に普通に存在する球菌で熱に對する抵抗性が強く、低い溫度より高い溫度迄生育し、膽汁、食鹽等に對する抵抗性が強くアルカリ性にも耐え、又 esculin, salicin, mannit を醗酵する。これ等の點より明かに *Streptococcus* とは區別されていた。ところが SHERMAN はこれ等の各性質は特に enterococcus のみに夫々特有なものではないという理由よりして、これを entero group となし、*Streptococcus* の 4 groups 中の 1 group とした。BERGEY⁽⁴⁾は enterococcus group と記載している。

ccus への變異とみなされている。

L. R. 菌の特性である尿インデカン分解能がこのような變異によつて得られるかどうかは急には明かにし得ないが、たとえかかる變異が起るとしても、終末 pH 及びアルカリ性側の繁殖限界についての變異の可能性に關しては從來全く論じられていない。従つて菌の特性として終末 pH とアルカリ性側の繁殖限界を明かにすることは意義あることと信ずる。即ち L. R. 菌は尿インデカンを分解する特性の他に、終末 pH が 6.5 であり、アルカリ性側の生育限界が pH 10.15 以上であるという特性を有する。併し SHERMAN は多くの特性の中 entero group は pH 9.6 以上で繁殖するという點をあげているので、此の點からしては L. R. 菌はやはり entero group に

Streptococcus (aerobic, facultative anaerobic)

	Tolerate 6.5% NaCl	Final pH	Growth at pH 9.6	Growth at pH 10.15
<i>pyogenic</i> group	—	4.2~6.0	—	
<i>viridans</i> //	—	4.0~4.5	—	
<i>lactic</i> //	—	4.0~4.6	—	
<i>entero</i> //	+	4.0~4.5	+	(—)
<i>Streptococcus acidominimus</i>	—	5.6~6.5	—	
L. R. bact.	(+)	(6.5)	(+)	(+)

( ), data by the author's experiments

實 験

[I] L. R. 菌の發酵試験： 培養液…葡萄糖添加肉汁 100 cc (アンモニア水で pH 9.6 に調整) に炭酸石灰 2g 添加, 37°, 3 日間培養。

Total glucose (a)	Fermented glucose (b)	b/a	Involatile acid (lactic acid) (c)	c/b	Alcohol
3.55 g	0.62 g	16%	0.48 g	84%	0.002g

乳酸を亜鉛鹽として確認した。L. R. 菌は葡萄糖よりほぼ乳酸のみを生成する *Streptococcus* であるとみなされる。(なお蔗糖添加培養基を粘質化しないことを確めた)

[II] 類似細菌として腸内の *Streptococcus* の分離： 宮入氏⁽¹⁰⁾は腸内の *Streptococcus* の分離には pH 9.8~10.0 の肝片、肝臓ブイヨンを使用し長期培養 (10~20日) の後分離を行うのがよいとしている。DOWNIE 及び CRUICKSHANK⁽¹⁵⁾は 5 cc の肉汁に 1 N NaOH を 0.3 cc 加えた強アルカリ性 (pH 11.0) の培養基を用いる分離法をあげている。なお多くの分離法が知られているが、最近ナトリウムアチッドを使用する分離法が報告⁽¹⁶⁾されている。著者は此の菌種の好アルカリ性及び耐食鹽性を利用して、pH 9.6~9.8 の食鹽 6.5% 含有加アンモニア加糖肉汁 10 cc を培養基として、これに新鮮糞約 0.1 g を加え、37° に放置して、濁濁して來た時、同一新培養液に移植して淘汰を 2, 3 回繰返し、殆ど *Streptococcus* のみになった培養液について扁平培養を行い目的の菌を得た。かくして人糞より F.1, F.2, F.3, を得、又鶏糞より F.K を得た。

[III] 土壤中の好アルカリ性細菌の分離 L. R. 菌は殆どすべての畑土壤中に存在しているが、かかる土壤中に L. R. 菌以上にアルカリ性を好む菌が存在するか否かを知る目的で次の分離法を行つた。

分離法… 殺菌後の pH が 10.5 前後の加アンモニア加糖肉汁を調整し、その培養液 10 cc に畑土 0.1 g を加え 37° に放置する。後述の無菌の對照試験で明かな如く、放置することのみに依つて培養液の pH が下り、菌の繁殖し得る pH の限界に至り、菌が繁殖する。僅に濁濁して來た時に (1日では證明のまゝである) 同一の新培養液に移植して淘汰 2~3 回の後扁平培養を行う。この方法に依つて分離した菌を S.A. とする。胞子を生じ、アルカリ性に粘質物をつくり、中性では褐色の色素を生産する。

[IV] L. R. 菌、腸内の *Streptococcus*、好アルカリ性有胞子細菌のアルカリ性側の繁殖限界： 強度のアルカリ性培養基では嚴密なアルカリ性側の繁殖限界を定めることは困難である。即ち強アルカリ性の培養基は蒸氣殺菌するに従い、水素イオン濃度が中性に傾き、殺菌後でも常溫放置により次第に中性に傾く。従つて宮入氏⁽¹⁰⁾はかかる缺點を少くする爲に殺菌後無菌的に修正するのがよいという。片桐、北原兩氏⁽¹⁷⁾は緩衝液で調整し

朝井氏⁽¹⁸⁾は緩衝液をあらかじめ殺菌し、これを移植の際に殺菌基本培養液に加える方法をとっている。

著者は次の如く行つた。

培養基、水道水に武田製ペプトン、武田製肉エキス、葡萄糖各 1% を加え、これを苛性曹達で中性に調整し、しかる後濃アンモニア水を 100 cc の培養液に對し 1~5 cc を夫々加え、3 日間間斷殺菌を行う。

測定 迅速水素イオン計（島津製、アンチモン電極）を用いて、移植時の pH を測定すると共に無菌の對照培養液を用意し、移植培養液と共に恒温器に保持し、24 時間、48 時間後の無菌培養液の pH を測定した。一旦菌の繁殖したものは生産される有機酸によつて pH は急に降下するから、この培養液の pH を測つてもその繁殖限界の pH はわからない。

この方法で眞の繁殖限界 pH を決める事は困難であるが、限界 pH は濁濁して來た移植培養液と同一の條件におかれた無菌の同一培養液の pH より多少アルカリ性である事は確かである。數回の實驗を平均して表にすると次の如くである。

最初の欄の 5, 4, 3, 2, 1, は培養液 100 cc に對し加えた濃アンモニア水の cc 數である。± は僅に濁濁、+ は明かに濁濁、++ は旺盛に濁濁した事を示す。なお alkalinity（アルカリ度）は無菌培養液 10 cc を中和するに要する N/10 HCl の cc 數である（中和指示薬メチルヴィオレット）。菌株の符號は前述の II 及び III 項を参照。St. F. は坂口研究室が米國より譲りうけた *Streptococcus faecalis* であり、更に著者が分譲をうけたもので深く感謝する。

以上の如く L. R. 菌は pH 10.15 で明に繁殖するのに對し、腸内の *Streptococcus* はあるものは明かに pH 9.9 で繁殖するが確實なものは、9.75 或はそれ以下である（St. F. は pH 9.75 でも繁殖しない様である）。なお pH 10.15 に調整した培養液には 3 日後で腸内の *Streptococcus* は繁殖しない。S. A. 菌は L. R. 菌とはほぼ同程度のアルカリ性を好む。従つて L. R. 菌は pH 10.15（アルカリ度 13.5）で繁殖するが（先に pH 11 で繁殖すると報告⁽²⁾したが訂正する）、*entero-group* の菌はかかる pH で繁殖できない。

かくてアンモニアの多量に存在する腐敗尿に L. R. 菌が好んで繁殖する理由が明かとなり、又同菌が *Streptococcus* 中でも特にアルカリ性を好む菌であり、更に土壤中の菌としても最もアルカリ性を好む菌の 1 つであることがわかつた。

[V] 終末 pH : 通常酸酵液の pH を測定するのに pH 試験紙（Toyo pH Test Paper）を用いるが、著者は確實を

The Alkaline Limiting pH which permits the Growth of Bacteria.

cc of ammoniac solution		5	4	3	2	1
Initial pH		10.50	10.45	10.35	10.10	9.80
Initial alkalinity		21.6	20.7	16.6	13.1	9.4
after 24 hr. -cultivation	L. R.	—	±	+	++	++
	St. F.	—	—	—	—	—
	F. 1.	—	—	—	±	++
	F. 2.	—	—	—	±	++
	F. 3.	—	—	—	+	++
	F. K.	—	—	—	+	++
	S. A.	—	±	+	++	++
	pH	10.40	10.25	10.15	9.90	9.75
	alkalinity	19.8	15.6	13.5	11.2	7.2
after 48 hr. -cultivation	L. R.	+	++	++	++	++
	St. F.	—	—	—	—	+
	F. 1.	—	—	—	+	++
	F. 2.	—	—	—	+	++
	F. 3.	—	—	—	++	++
	F. K.	—	—	—	+	++
	S. A.	±	++	++	++	++
	pH	10.20	9.95	9.90	9.60	9.50
	alkalinity	16.7	13.0	11.7	10.8	6.8

期す爲に MC ILVAINE の種々な pH の緩衝液を對照におぎ迅速水素イオン計で測定した。對照の乳酸菌として F. 1.（腸内の *Streptococcus*）、D.（坂口研究室より譲りうけた *Lactobacillus delbrückii*）J. II.（有孢子乳酸菌）⁽¹⁹⁾ A 菌（*pediococcus*）⁽¹⁹⁾を用いた。

(A) は加アンモニアアルカリ性加糖肉汁（pH 9.6） (B) は中性加糖肉汁（pH 7.4）

何れも葡萄糖を 3% 加えた。菌移植後 37°, 5 日間培養のものについて pH を測定した。

Final pH of Culture Media fermented by the L.R. Bacterium and Other Lactic Acid Bacteria.

(A)	L.R. 6.6	F.I. 5.0	D. no growth	J.II. no growth	A. no growth
(B)	6.5	4.4	4.0	5.0	4.3

先に L.R. 菌の終末 pH を 5.6~6.2 と報告したが訂正する。

[VI] 酸に対する抵抗性： L.R. 菌の終末 pH は腸内の *Streptococcus* よりはるかに中性に近い。従つて L.R. 菌は酸に対する抵抗性が後者より弱いであろう。かかる考えの下に抵抗性をみた。實驗菌株は(V)と同じ。

實驗方法… 菌は何れも 24 時間培養の固體培養菌を用い、白金耳ではぼ一定量の菌體 (約 1~2 mg) をとり、N/100 鹽酸溶液 2 cc に加え、よく振盪し 1 定時間、20° に放置後、2 白金耳とり約 2 cc の培養液に移植する。3 日後に培養液の明に濁濁しているものを + とする。數回の平均値を示す。

Tolerance of the L.R. Bact. and Other Lactic Acid Bacteria to N/100 HCl (pH 2.0).

Species Time	L.R.	F.I.	D.	J.II.	A.
5 m.	+	+	+	+	+
20 m.	+	+	+	-	+
40 m.	-	+	+	-	+
1 h.	-	+	+	-	+
5 h.	-	+	+	-	+

L.R. 菌は明かに他の乳酸菌に比して酸に対する抵抗性が弱い。ただ有孢子乳酸菌は L.R. 菌以上に抵抗性が弱い。有孢子乳酸菌は種々な性質が通常の乳酸菌と異り、かかる抵抗性に於ても異つているものと考える。腸内の *Streptococcus* の酸に対する抵抗性の強い事は SCHEER⁽²⁰⁾により指摘せられ、pH 1 で 3 時間、pH 2.0 で 12 時間、pH 2.36 で 24 時間生存し、これに反して大腸菌は pH 3.7 で 3 時間、pH

4.7 で 24 時間生存すると報告されている。又鐵本氏⁽²¹⁾は 4 種の菌を用い種々な酸に対する抵抗性をみて、N/100 HCl に對しては何れも 1 分~45 分以内で死滅すると記している。従つて F.I., D., A. 等一般に乳酸菌は何れも酸に対する抵抗性の強い菌であり、乳酸菌の中でも L.R. 菌の如き終末 pH の中性に近い菌は酸に対する抵抗性は弱いものと解せられる。

又アルカリ性に対する抵抗性をみる爲に炭酸ソーダ、苛性曹達の各濃度の溶液を用いて同様な試験をしたが、菌株の間の抵抗性の明かな差が見られなかつた。

終に臨み御指導をいただいている二國二郎教授並びに御助言をいただいている坂口謹一郎教授に深謝する。

- (1) 原田：農化，22，95 (1948)
- (2) 原田：産研報告，6，79 (1948)
- (3) HÜCKER, SHERMAN: *Bact. Reviews*, 1, 3 (1937)
- (4) BERGEY: *BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology* (1948)
- (5) AYERS: *J. Bact.*, 1, 84 (1916)
- (6) JONES: *J. Ex. Me.*, 32, 273 (1920)
- (7) GIBSON, MUIR: *J. Hyg.*, 35, 238 (1935)
- (8) 兼卷：千葉醫學會誌 17, 1151 (1939)
- (9) 山崎：農化，8, 991 (1932)
- (10) 宮入：千葉醫學會誌，13, 1102 (1935)
- (11) MARION L. ORCUTT: *J. Bact.*, 11, 129 (1926)
- (12) 松野：千葉醫學會誌，15, 844 (1937)
- (13) A. BECK, J. BROWN: *Zbl. f. Bakt.*, I. Orig., 127, 132 (1932)
- (14) 山元：細菌學雜誌，455~466 (1934)
- (15) A. W. DOWNIE, J. CRUICKSHANK: *Brit. J. of Exper. Pathol.*, 9, 171 (1928)
- (16) M. OSTROLENK, N. KRAMER, R. C. CLEVERDON: *J. Bact.*, 53, (1948)
- (17) 片桐，北原：農化，10, 952 (1934)
- (18) 朝井：農化，10, 1127 (1934)
- (19) 花岡，原田：23, 517 (1950) 有孢子乳酸菌の分離
- (20) SCHEER: *Z. f. Im-forsch.*, 33, 36 (1921)
- (21) 鐵本：農化，9, 67 (1933)

Summary

The alkaline limiting pH of growth and the final pH of culture media of the L.R. bacterium were examined as compared with those of the enterococcus group and the other lactic acid bacteria.

The limiting pH and the final pH of the L. R. bacterium were 10.15 and 6.5, respectively. They lied on extremely alkaline side as compared with these of the other lactic acid bacteria. So these data may be used as the characteristics in classification of the L.R. bacterium.

豆科植物根瘤の特殊ヘミン蛋白(根瘤ヘモプロテイン)に関する研究

(第 2 報) 根瘤呼吸の一酸化炭素による阻害実験

辻 村 克 良 (東京大学農学部農藝化学科)

昭和 25 年 5 月 10 日 受理

Studies on the Hemoprotein of the Root-Nodules of Leguminous Plants.

Part 2. Inhibition of Respiration of Nodules by CO.

By Katura TUZIMURA (Dept. Agricultural Chemistry, Fac. of Agr., Univ., of Tokyo)

概要及び考察

さきに筆者等⁽¹⁾は根瘤ヘモプロテイン (KEILIN 及び WANG⁽²⁾は Nodule hemoglobin と呼んでいる) が生体外に於て O_2 及 CO と結合することを明かにし、生体内に於て O_2 の運搬或は貯蔵に役立つのであろうという久保⁽³⁾の考え方を支持したのであるが、直接生体に就て確めることが残されていた。そこで根から振取った根瘤の呼吸を測定し、その CO による阻害実験を試みた。

根瘤ヘモプロテインの酸素と一酸化炭素に対する結合の平衡恒数 $K = \frac{[HbCO][PO_2]}{[HbO_2][PCO]}$ は KEILIN 及び WANG⁽²⁾によれば約 37 であるから、哺乳動物のヘモグロビンの 120~550 に比べれば小さいが、ミオグロビンの 28~51 に等しく、 O_2 よりも CO に遙に強い親和力を有する。故に CO 95%, O_2 5% の混合氣體中では $[HbCO]/[HbO_2] = 703$ となり、大部分の根瘤ヘモプロテインが CO と結合することになるから、その O_2 傳達作用は殆ど全く妨げられる筈である。実験の結果は 95% CO, 5% O_2 混合氣體の呼吸阻害は大豆根瘤では 25%, ザートウィッケン根瘤では 23% の程度であつた。併しこの濃度では根瘤から取出された根瘤菌の呼吸は全然阻害されなかつたから (人工培養の根瘤菌はひどく阻害された) CO の阻害作用は直接菌體の呼吸を阻害するのではなく、宿主細胞の機能を阻害することは明かであつて、根瘤ヘモプロテインの作用を害するに由ると考えてよからう。

次にヘモプロテインの作用に對して二つの解釋が考えられる。

1) 根瘤ヘモプロテインは宿主細胞の呼吸にだけ關與し、菌體の呼吸に關與しない。従つて阻害された部分は菌體の呼吸を除いた宿主細胞の呼吸である。

2) 菌體の呼吸は根瘤ヘモプロテインを通して行われるが、それが CO と結合して酸素傳達の機能を失つたので正常な呼吸と異なる他の徑路をへて呼吸が行われた。

以下の諸事實では結論を下すには不十分で、この二つの考の何れが正しいかを立證することはできなかつた。

根を磨碎して組織を破壊すると、その呼吸は急速に衰へ 30 分後には極めて弱くなつた。根瘤の宿主の組織も同様だとすれば、根瘤を乳鉢で磨碎したものの呼吸は殆ど菌體だけの呼吸と考えられるが、その大さは根瘤呼吸の 75% とは全く異なるものであつた。それはつぶさない根瘤に比べて、大豆では増加した。ザートウィッケンの実験例がないが、ヘヤリーヴェッチでは減少した。このようなことは ALLISON 等⁽⁴⁾の報告にも明かである。これは菌體が外氣にふれて酸素の供給が潤澤になる十の影響と、根瘤内の何等かの機構が破壊される一的作用とが相反するために、場合によつていろいろの結果になつたのであろう。

人工培養根瘤菌に對する根瘤ヘモプロテイン試料の呼吸促進作用は疑問であつた⁽¹⁾。しかし空氣中だけの實驗では不十分で、5% 程度の酸素濃度で根瘤菌 (人工培養のもの、根瘤から分離したもの) の呼吸には充分で空氣中と變らないか、或は反つて呼吸が大であること⁽⁵⁾から考えて、ヘモプロテインの作用はもつと O_2 の稀薄