

Sh. sonnei S 型, R 型 菌 の 酵 素 的 性 状

第 1 編

発 育 菌 に つ い て

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

浜 野 充 生

〔昭和 33 年 5 月 8 日受稿〕

目 次

I 緒 言	2 ニコチンアミド, VB ₆ の影響
II 実験材料及び実験方法	3 C 源の影響
III 実験成績	IV 総括及び考按
1 発育に及ぼすアミノ酸の影響	V 結 言

I 緒 言

腸内細菌の S 型, R 型変異に関しては最初 Arkwright^{1,2,3}) により研究されて以来, 多くの研究者によつて集落の形態, 菌体抗原, 毒性その他種々の生物学的性状について報告されている。⁴⁻¹²⁾

これらを総括するに S 型菌は, 毒性は R 型よりも大であり, 又ブイオン培地で混濁平等に発育し, 生理的食塩水で自然凝集を起さずミロン反応陰性であるのに対し, R 型菌は毒性なく, ブイオン培地に沈澱性に発育し, 生理的食塩水で自然凝集を起し, 又ミロン反応陽性である。即ち S 型菌は菌体表面が主として蛋白体よりなると云う劃然とした差異が見られる。

これらのことより S 型, R 型菌間には当然物質代謝に於ける差異が期待されるのであるが^{13,14,15)}, 細菌の S 型, R 型の代謝に於ける本質的な差異については未だ鮮明に至っていない。著者は Sh. sonnei 菌の酵素的性状を主として S 型, R 型菌の比較という観点より検討した。

細菌の S 型菌体を純粋に大量得る事は勿論困難であるが, 本実験に於ては, 出来るだけ完全な S 型集落より接種し培養した菌体を取り行つた。R 型菌は, 教室小林¹⁶⁾が継代培養を行つた純化 R 型を用いた。

本編に於ては Sh. sonnei 菌教室保存株の S 型, R 型の発育に関する実験成績を記して御批判を仰ぐこととする。

II 実験材料及び方法

供試菌: 岡等¹⁷⁾により分離後教室保存の Sh. sonnei 菌 (島山株) S 型及びこれより解離した R 型菌を用いた。尚, Sh. sonnei 菌は自然発生的に S-R 解離を起すので S 型菌は, 動物通過, 糖類添加培地継代により, 極力 R 型の出現を抑制し, 寒天平板上で S 型集落を示すものを選んで用い, R 型菌は小林¹⁶⁾が継代した安定した R 型を用いた。実験に際してはその都度, 生理的食塩水による自然凝集性, ミロン反応, 試凝集反応より, S 型, R 型であることを確認して用いた。

使用培地: 水野¹⁸⁾の培地を考慮しつゝ, 教室常用の下記基礎培地に市販のアミノ酸, 或いはペプトンを適当濃度溶解して, HCl, 又は NaOH により pH を修正して用いた。

基礎培地

第 1 磷酸カリ	0.35 g
硫酸第一鉄	0.001 g
第 2 磷酸ソーダ	2.5 g
硫酸マグウシウム	0.001 g
食 塩	3.0 g
水	1.0 l

接種菌量及び増殖度の観察: 普通寒天平板培地培養菌を集め, 生理的食塩水で洗い 10 cc の生理的食塩水に 2 mg/cc の菌浮游液としてこの 2 白金耳 (実験中同一のものを用いた) を 5 cc の培地に接種

5代継代した。発育度は5代目のものを肉眼的に24、48時間後に観察し、混濁により(+)、(-)を用いて示した。但し表は全て24時間の成績を示した。

III 実験成績

1. 発育に及ぼすアミノ酸の影響

発育に於けるN源としてアミノ酸要求を検討するため、実験方法の項に記した基礎培地に各種アミノ酸を組合せて、或いは単独で添加し、更に赤痢菌の多くが要求する発育素ニコチンアミド、及びC源としてグルコースを添加した培地について発育度を観

表1 発育に於けるアミノ酸の影響(1)

グルコース 0.2%
ニコチンアミド 10⁻⁶M

アミノ酸	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
トリプトファン グルタミン酸 アスパラギン酸 メチオニン システイン	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++
トリプトファン アスパラギン酸 グリニン ゼリ	+++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
トリプトファン システイン アラニン リ	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
アスパラギン酸 システイン グリニン フェニル アラニン	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

表2 発育に於けるアミノ酸の影響(2)

グルコース 0.2% ニコチンアミド 10⁻⁶M

アミノ酸組合せ	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
アラニン メチオニン	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
アスパラギン酸 メチオニン	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
グルタミン酸 メチオニン	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
トリプトファン グルタミン酸	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
トリプトファン アスパラギン酸	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
システイン グルタミン酸	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
システイン アスパラギン酸	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
チロシン グルタミン酸	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+
チロシン アスパラギン酸	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+

察した。各アミノ酸単独の場合には0.05%となるように二種以上のアミノ酸を加える場合には適当に減量することとした。

結果は表1~3に示す如くであり、実験を行つたアミノ酸の組合せに於てはS型、R型共に発育は良好で、何れも5代継代可能であつた。そこでアミノ酸単独の場合について見ると、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、グリニン、トリプトファン、ヒスチチン、フェニルアラニンでは発育可能であるが、メチオニン、リジン、ゼリン、チロシン、アルギニン、では不可能であつた。而してS型はR型より僅かながら発育は良好であつたが、一般に栄養要求に関しては有意の差はなかつた。

表3 発育に於けるアミノ酸の影響

グルコース 0.2%
ニコチンアミド 10⁻⁶M

アミノ酸	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
アスパラギン酸	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
グルタミン酸	++	++	+	+	+	++	++	+	+	+
アラニン	++	++	+	+	+	++	++	+	+	+
グリニン	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
トリプトファン	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
ヒスチチン	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
フェニルアラニン	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
メチオニン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リジン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ゼリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
チロシン	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アルギニン	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

2. ニコチンアミド, VB₆ の影響

発育に於けるニコチンアミド, VB₆ の影響を見るため, C源をグルコースとし, N源を前述の如きアミノ酸の組合せとした培地に, ニコチンアミド, VB₆ を各単独で, 及び両者を同時に, 或いは全く加えないで, 菌を接種し5代継代を行い, 5代目の発育度を(+), (-)を以て示すと表4, 表5の如くであつた。即ちニコチンアミドを加えない培地ではVB₆ の存在下でも, 各アミノ酸組成に於て両菌共発育は不能であり, 又ニコチンアミドを加えても発育不能の場合にはVB₆ を更に追加しても発育し得ない。然しニコチンアミド添加の下に発育可能の場合にVB₆ を更に追加することにより幾分発育が良好となる場合は見られた。

従つて発育に決定的影響を与えるものは, ニコチンアミドであることが認められるが, S型, R型間に有意の差異は見られなかつた。

3. C源の影響

発育に於ける培地C源の影響を見るため, N源として発育を最も支持するアスパラギン酸を加え(0.1%), 更にニコチンアミド(10⁻⁶M)を加えた培地にC源として, グルコース, グルコン酸, リボース, 悪性ブドウ酸, コハク酸を夫々0.2%となるよう添加した培地に於ける発育を観察した。

結果は第2表の如く, C源無添加では両菌共発育は不能であるが, グルコース, グルコン酸, 乳酸, 焦性ブドウ酸, 添加に於ては良好な発育を示し, 特にグルコースをC源とした場合に最も発育が大であつた。然しリボースをC源とした培地には, S型, R型共に5代継代は可能であつた。

以上の実験より一般にS型はR型より発育は良好である傾向が認められたが, この培養実験に用いた容器は試験管であり, 培養条件が幾分嫌氣的に傾いていると考えられるので比較のため大試験管に少量

表4 発育に於けるビタミン類の影響(1)

グルコース 0.2% ニコチンアミド 10⁻⁶M VB₆ 10⁻⁶M

アミノ酸	S				R			
	ニコチンアミド VB ₆	ニコチンアミド	VB ₆	(-)	ニコチンアミド VB ₆	ニコチンアミド	VB ₆	(-)
トリプトファン グルタミン酸 アスパラギン酸 システイン	卅	卅	-	-	卅	卅	-	-
トリプトファン グリシン アスパラギン酸 アゼ	卅	卅	-	-	卅	卅	-	-
トリプトファン システイン アラニン	卅	卅	-	-	卅	卅	-	-
システイン グリシン フェニールアラニン アスパラギン酸	卅	卅	-	-	卅	卅	-	-
トリプトファン グルタミン酸	卅	+	-	-	卅	+	-	-
トリプトファン アスパラギン酸	+	+	-	-	+	+	-	-
トリプトファン グリシン	+	+	-	-	+	+	-	-
トリプトファン フェニールアラニン	卅	+	-	-	卅	+	-	-
アスパラギン酸 チロシン	卅	+	-	-	卅	+	-	-

炭素源：乳酸

継代	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ビタミンなし	+	±	-	-	±	-	-	-	-	-
V. B ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V. B ₆ ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

炭素源：焦性ブドウ糖

継代	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ビタミンなし	+	±	-	-	±	-	-	-	-	-
V. B ₁	+	±	-	-	±	-	-	-	-	-
ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V. B ₆ ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

炭素源：醋酸

継代	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ビタミンなし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V. B ₁	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
ニコチンアミド	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
V. B ₆ ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

炭素源：コハク酸

継代	S					R				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ビタミンなし	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
V. B ₁	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V. B ₆ ニコチンアミド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4. 好気性, 嫌気性培養に於ける発育曲線及び培地グルコースの分解

前述の如く液体培地に於ては静置培養をするとS型の方が, 又振盪培養するとR型の方が発育が良好である傾向が認められたので, C源をグルコースとし, ペプトンをN源とした液体培地に両菌を接種し, 静置培養, 及び振盪培養しながら2~4時間毎にそ

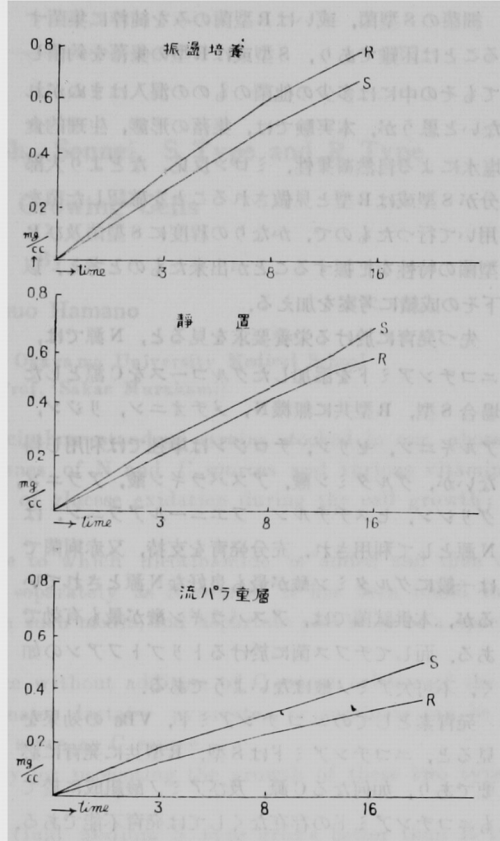


表 9

培養条件	pH		グルコース消費 μM/cc		焦性ブドウ酸蓄積		乳酸蓄積		醋酸蓄積	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
2% ブドウ糖 振盪培養	4.65	4.9	5.2	8.2	4.0	3.8	0.4	0.1	0.2	0.2
2% ブドウ糖 静置	4.65	4.8	4.2	3.6	2.6	1.7	1.9	0.8	0.7	0.3
2% ブドウ糖 流パラ重層	4.70	4.71	3.5	3.0	1.7	1.5	1.4	1.3	0.5	0.3

の一部をとり菌濁度を光電比濁計で測定して発育曲線を記録し、又静置培養では12時間、24時間に、振盪培養では4時間、8時間目に培養液の一部をとり出し、グルコース消費量、焦性ブドウ糖、乳酸、酢酸の蓄積量を定量した。結果は第1図及び表9の通りであつた。

IV 総括及び考按

細菌のS型菌、或いはR型菌のみを純粋に集菌することは困難であり、S型或はR型の集落を釣菌してもその中には多少の他菌のものの混入はまぬがれないと思うが、本実験では、集落の形態、生理的食塩水による自然凝集性、ミロン反応、などより大部分がS型或はR型と見做されることを確認した菌を用いて行つたもので、かなりの程度にS型菌及びR型菌の特性を把握することが出来たものと考え、以下その成績に考案を加える。

先づ発育に於ける栄養要求を見ると、N源では、ニコチンアミドを添加したグルコースをC源とした場合S型、R型共に無機N、メチオニン、リジン、アルギニン、セリン、チロシンは単独では利用し得ないが、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、グリシン、ヒスチチルン、フェニールアラニン、はN源として利用され、充分発育を支持、又赤痢菌では一般にグルタミン酸が最も良好なN源とされているが、本供試菌では、アスパラギン酸が最も有効である。而してチフス菌に於けるトリプトファン、の如く、不可欠アミノ酸はないようである。

発育素としてのニコチンアミド、VB₆の効果をみると、ニコチンアミドはS型、R型共に発育に必要であり、如何なるC源、及びアミノ酸組成に於てもニコチンアミドの存在なくしては発育不能である。赤痢菌ではニコチンアミドを必須発育素とするものが多いが、供試菌に於てもそうであつた。一方VB₆は一般に発育を促進はあるが、必須とは考えられない。次に発育に於けるC源の影響を見ると、N源をアスパラギン酸とし、ニコチンアミドを添加した培地ではC源の添加なしでは発育不能であるが、グルコース、グルコン酸、焦性ブドウ糖、乳酸、コハク酸をC源として添加すると発育可能となり、特にグルコースが効果的であるが、リボースでは発育しない。

而してC源の効果に於てS型、R型間には有意の差は見られなかつたが、こゝで興味あることは、C源の如何に拘らず一般にS型の方がR型よりも発育

が良好であるという点である。

これはこの培養実験に用いた容器は小試験管であるので幾分嫌氣的条件に傾いていることが原因するのではないかと考えられるので、中試験管を用い振盪しながら、即ち充分好氣的条件として行つた所、今度はS型よりもR型の方が発育が良好であるという成績であり、S型はR型に比し幾分嫌氣性に傾いているのではないかと想像される。

このことはペプトンをN源とし、グルコースをC源とした液体培地にS型、R型菌を接種し、静置培養及び振盪培養して、発育曲線を記録し、又培地グルコースの消失量、焦性ブドウ糖、乳酸、酢酸の生成量を測定した実験より裏付けされた。即ち好氣的と考えられる振盪培養ではR型はS型より発育が良好であり、幾分嫌氣的に傾いていると考えられる静置培養ではS型はR型よりも発育は良好であり、且つ両培養法に於けるグルコース消失量に対する焦性ブドウ糖、乳酸、酢酸の蓄積量の割合はS型の方が大であり、S型はR型に比しグルコース酸化に於ける焦性ブドウ糖以下の完全酸化が不円滑であり、焦性ブドウ糖、乳酸、酢酸などの蓄積を見、換言すれば、幾分嫌氣性に傾いているものと推定される。

これについては更に次編に於て、静止菌体を用いて追求する。

V 結 言

Sh. sonnei S型、R型の教室保有株を供試菌とし、発育に於けるN源、発育素、C源の要求、並びにC源グルコースの酸化をS型菌、R型菌を比較しながら検討し次の結果を得た。

1. C源をグルコースとした場合ニコチンアミドを添加すれば、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、などを各単独でN源としてS型、R型ともよく発育し、特にアスパラギン酸は最良のN源となりうる。

2. アスパラギン酸をN源とした場合、C源の添加なしでは発育し得ず、グルコース、グルコン酸、乳酸、焦性ブドウ糖、コハク酸はC源となり得るがリボースはC源となり得ない。

3. ニコチンアミドは両菌の発育に必須であるがVB₆は発育を促進するが必須ではない。

4. 以上の如く発育に於ける栄養要求に於てはS型、R型に本質的な相異は見られないが、中試験管を用いた静置培養に於てはS型菌はR型菌より発育は良好であり、振盪培養するとR型菌はS型菌より

発育良好となる傾向が認められる。

いるものと推定される。

5. ペプトンをN源とし、グルコースとC源とした液体培地で静置培養してグルコース消費量に対する焦性ブドウ酸、乳酸、酢酸、蓄積量の割合を両型菌について比較すると、一般にS型のこれらの蓄積はR型より大であり、S型はR型に比し焦性ブドウ酸以下の完全酸化が不円滑であつて嫌氣的に傾いて

(参考文献は第2編の末尾に掲載)

Enzymatic Properties of Sh. Sonnei, S Type and R Type

Part 1. Growing Cells

By

Mitsuo Hamano

Department of Microbiology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae Murakami)

Using S type and R type of Sh. sonnei, those standard strains stocked in our laboratory as test bacteria, the author studied influences of N and C sources and various vitamins on cell growth and made a comparative study of glucose oxidation during the cell growth; and obtained the following results.

1. When glucose is used as C source to which nicotinamide is added and then using aspartate, glutamate, alanine, or glycine separately as N source, it has been found that S type and R type of Sh. sonnei grow well in such media, and aspartate proves to be a specially good N source.

2. When aspartate is used as N source without addition of C source, neither of the two types can grow. However, glucose, gluconate, lactate, pyruvate, or succinate can be used as a suitable C source, but ribose does not serve as C source.

3. Nicotinamide proves to be necessary for promoting the growth of these two types of bacteria, but vitamin B₆ is not necessary.

4. In the still standing culture with fluid medium S type grows better than R type, whereas in the roller tube culture R type grows better than S type.

5. When the accumulated amount of pyruvate, lactate or acetate is compared with the amount of glucose consumed in the still standing culture with fluid medium using pepton as the N source and glucose as the C source, it has been found that the accumulation of these substances in the case of S type is greater than in the case of R type, indicating that the complete oxidation of pyruvate is not carried out smoothly.
