

口腔内病巣より分離したブドー球菌の性状について

第 1 編

溶 血 毒 産 生 に つ い て

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

岡山大学医学部歯科学教室（指導：現 渡辺義男教授
前 今川与曹教授）

安 井 立彌

〔昭和 32 年 9 月 10 日受稿〕

目 次

I. 緒 言	(2) 振盪時間との関係
II. 実験材料及び実験方法	(3) pH の影響
III. 実験成績	(4) C 及び N 源の影響
1. 発育菌の溶血毒産生	(5) 溶血毒産生に於ける促進及び阻害物質
(1) 教室保存株の動物通過	3. 溶血毒の加熱による不活化
(2) 各菌の血液加培地に於ける溶血能	IV. 総括及び考案
(3) ブイヨン培地発育の溶血毒産生	V. 結 言
2. 静止菌の溶血毒産生	
(1) 各菌の溶血毒産生	

I. 緒 言

頸口腔領域の感染性化膿性疾患の大部分は、歯性混合感染によるものである。従来頸口腔領域の化膿巣に於ける細菌としては、大体連鎖球菌、ブドー球菌、グラム陰性桿菌等が主なるものとされ、そのうち、ブドー球菌に於て最も多く発見されるものは *St. aureus*、次で *St. albus* で、その他まれには *St. citreus* も見出される。これら細菌の病巣内に於ける消長、或は病原性に関する研究業績は数多く発表されているが、そのうち特に本菌の病原性の一因として、溶血毒産生性が取りあげられており、これに関する報告は枚挙にいとまがない。然しこれらの研究の殆んど総ては細菌の発育途次に於て產生される溶血毒について行われたものであつて、未だ必ずしも溶血毒産生機序を完全に解明し尽したとはいひ難い。一方静止菌又はそれに近い状態のものに

於て短い時間のうちに起つて来る溶血毒産生現象に対し、種々条件の影響を検討することは、発育途次の場合に比し条件が単純である為に結果の分析が容易であり、溶血毒産生機序をうかがう一助となるものと考える。而るに頸口腔領域より分離したブドー球菌に就いて一般性状、殊に酵素化学的研究を詳明に行つた報告は殆んど見られない様である。

そこで私は口腔内に化膿性疾患を有する患者の病巣より種々の細菌を分離し、そのうち *St. aureus* 及び *St. albus* に属すると推定されるもの各 4 株づつを選び、対照として教室保存の標準株 1 株、同動物通過株の合計 12 株の細菌につき溶血毒産生能を比較し、かつこれに対する種々の条件の影響を検討した。次に 2、3 の酵素化学的性状を比較し、併せてこれと各菌の溶血性との間に何らかの関連が存在するか否かについても検討を加えた。

II 実験材料及び実験方法

供試細菌：口腔内病巣より分離した菌のうち、集落の形態及び色調、染色法、顕微鏡的所見、などから *St. aureus* 及び *albus* に属すると考えられる菌各 4 株、対照として教室保存標準株各 1 株、同動物通過株各 1 株、計 12 株を供試菌とした。

血液培地の調製：血液は兎血液を採血後脱
纖維して用い、ブイヨン又は普通寒天に適當
濃度になる様に加えた

溶血毒定量：兎の脱纖維した血液を遠沈して赤血球を集め M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) で 2 回洗滌したものを、同一組成の緩衝液に 100 倍稀釀になる様浮遊せしめたものを血球浮遊液とし、一方溶血毒試料溶液の 2 倍稀釀列を作り、その夫々 1 ml に血球液 0.5 ml を加え 1 時間 37°C に保ち後 1 時間氷室に放置してから溶血度を判定した。

生菌浮遊液の調製：培地より集菌後、M/50
磷酸緩衝液（0.85% NaCl 加、pH 7.2）によ
つて2回洗滌し再び同一組成の緩衝液に浮遊
せしめたものを生菌浮遊液とした。菌量決定
は光電比濁計により、あらかじめ作つて置い
た標準曲線と対比して決定した。

基質：何れも市販品を緩衝液に溶解し、必要により NaOH, HCl を以つて pH を修正して使用した。

阻害剤、抗生物質：何れも市販品を蒸溜水に溶解して使用した。

金属イオン： Fe^{++} は $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Mg^{++} は $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Mn^{++} は $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 Co^{++} は $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 Cu^{++} は $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 Zn^{++} は $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を夫々蒸溜水に溶解して使用した。

III 實驗成績

1. 発育菌の溶血毒産生

(1) 教室保存株の動物通過

口腔内病巣よりの分離株について以下の実験を行うに当り、その対照として、*St. aureus* 及び *albus* の教室保存標準株を用いる事としたが、此等の菌は普通寒天培地に長期継代を重ねているため溶血毒産生能が低下していると考えられるので、溶血性増強の目的で動物通過を行つた。各教室保存株（「教」と略す）の普通寒天培養菌体を集菌し、湿菌量 15 mg/ml となる様に滅菌生理食塩水に浮遊せしめ、その 0.5 ml づつをマウス 3 匹の腹腔内に注射し、1～2 日で死亡したものの心血を血液加普通寒天に塗沫して培養し、発育せる集落のうち溶血能の比較的大なるものを更に普通寒天に継代、18 時間培養後集菌、次のマウスに注射する事をくり返した。毒性の増大するに従い注射菌量を減じ常に 1～2 日で死亡する様調節した。*aureus* では動物通過 10 代まで、*albus* では 20 代まで継続し、各代の菌の 2 % 血液加普通寒天培地（24 時間培養）に於ける溶血能を肉眼的に判定した結果は、第 1 表に示す如くであつた。同表に於て、溶血能卅で表わしたものは集落周辺に 7～8 mm の明瞭なる溶血環の認められるもの、土は僅かに見られるもの、他は夫々それらの中間のものを示した。同表に見られる如く、*aureus* では 5～6 代動物通過により著明なる溶血能の増強が認められたが、*albus* では極めて徐々に増大するのみで、20 代に至るも + を以て示す程度にすぎなかつた。*albus*、教室保存株はもともと溶血能（その他の病原性も）が弱いために、動物通過によつても、著しい変化を示さないものと考え 20 代まで動物通

第 1 表 動物通過による溶血性の増大

過を中止した。

(2) 各菌の血液加培地に於ける溶血能

口腔内病巣よりの分離株 St. aureus No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, albus No. 1, No. 2, No. 3, No. 4 及び aureus, albus の各教室保存株、同動物通過株（「教動」と略す）の夫々を血液加固体培地、液体培地に接種後24時間、48時間、72時間目に於ける溶血の程度を肉眼的に判定して第2表に示した。

第2表 血液加培地に於ける溶血

培地	血液加普通寒天			血液加ブイヨン		
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
St. aureus						
教	±	+	++	-	±	+
教動	++	++以上	++以上	++	++	++以上
No. 1	+	+	++	±	+	++
No. 2	++	++以上	++以上	++	++	++以上
No. 3	+	++	++	±	+	++
No. 4	++	++	++以上	±	++	++
albus						
教	-	-	±	-	-	-
教動	±	+	++	±	±	+
No. 1	-	±	+	-	-	±
No. 2	-	-	±	-	-	-
No. 3	±	+	++	±	+	++
No. 4	-	±	+	-	-	-

固体培地、2%兔加普通寒天平板培地での溶血能は、aureus では「教動」、No. 2, No. 4, No. 3, No. 1「教」の順、albus では aureus に比し一般に溶血能は小であり、No. 3「教動」、No. 4, No. 1, No. 2「教」の順であつた。液体培地、0.5%兔血加ブイヨン培地に於ける溶血度を比較したのであるが、液体培地に於いては培養中赤血球が試験管の底部に沈殿するため溶血毒との接触が不均一となり溶血能の判定に誤差が生じ易いが、各菌の溶血能の順位は大体固体培地に於けると大差なかつた。

(3) ブイヨン培地発育中の溶血毒產生

ブイヨン 30 cc を滅菌コルベンに取り、各菌を接種後 24.48 hr 目にその一部づゝを取り

遠沈上清中の溶血毒を定量した。即ち上清の2倍稀釈を作り、その各々 0.5 ml に兎赤血球浮游液 0.5 ml を加えて、30 分間、37°C に保ち溶血度を判定したところ第3表の示す通り各菌の溶血毒產生能は一般に血液加培地に於ける溶血能と平行関係にあつた。

第3表 ブイヨン培養菌の溶血毒產生

菌株	培養	稀釈倍数					
		1	2	4	8	16	32
教	24 hr	-	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
教動	24	+	±	-	-	-	-
	48	+	+	+	±	-	-
No. 1	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 2	24	+	±	-	-	-	-
	48	+	+	+	±	-	-
No. 3	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 4	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	+	±	-	-	-
aureus							
教	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
教動	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 1	24	-	-	-	-	-	-
	48	±	-	-	-	-	-
No. 2	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
No. 3	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 4	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
albus							
教	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
教動	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 1	24	-	-	-	-	-	-
	48	±	-	-	-	-	-
No. 2	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
No. 3	24	±	-	-	-	-	-
	48	+	±	-	-	-	-
No. 4	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-

2. 静止菌の溶血毒產生

以上發育時に於ける各菌の溶血毒產生につき 2, 3 の実験を行つたのであるが次に静止菌の 1~3 時間程度の短時間に於ける溶血毒產生に就て種々検討を加えた。

(1) 各菌の溶血毒產生能

各静止菌浮游液湿菌量 30 mg 2.0 cc にペ

ブトン水 0.25 cc を添加し、更に緩衝液を加えて全量 3.0 cc として 37°C 2 hr 振盪後、遠沈上清中の溶血毒を定量したところ、第4表に示す如く、*aureus* では溶血毒産生能は No. 2「教動」、No. 4、No. 3、No. 1「教」の順であり、*albus* では、「教」、No. 3、が比較的大であるのみで他は極めて微弱であつた。而して *albus* では「教動」は「教」よりむしろ溶血毒産生能は小であつた。

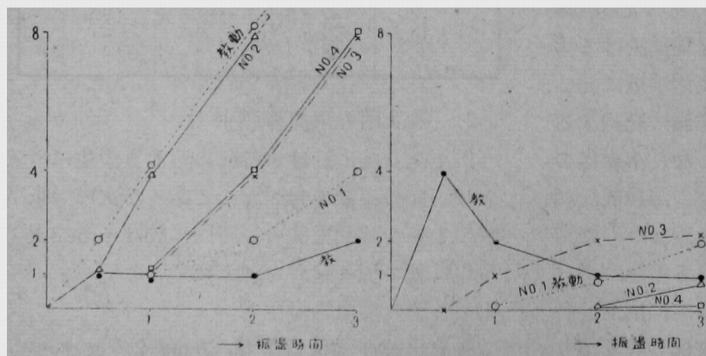
(2) 振盪時間との関係

第4表 静止菌の溶血毒産生

菌株		稀釀培養	1	2	4	8	16	32
<i>aureus</i>	教	±	-	-	-	-	-	-
	教動	+	+	+	±	-	-	-
	No. 1	+	±	-	-	-	-	-
	No. 2	+	+	+	±	-	-	-
	No. 3	+	+	±	-	-	-	-
	No. 4	+	+	±	-	-	-	-
<i>albus</i>	教	+	±	-	-	-	-	-
	教動	±	-	-	-	-	-	-
	No. 1	±	-	-	-	-	-	-
	No. 2	-	-	-	-	-	-	-
	No. 3	+	±	-	-	-	-	-
	No. 4	-	-	-	-	-	-	-

上の実験と同様各菌浮遊液にペプトンを加え、振盪時間を夫々 0.5, 1, 3 時間として上清中の溶血毒を定量した成績は第1図の通

第1図 溶血毒産生と振盪時間との関係



りであつた。

同表に於いては溶血毒量の表現は溶血度±に相当する稀釀倍数を以つてする事とした。同図に見られる如く *albus* 「教」株以外の各菌では、溶血毒産生量は振盪時間と共に大となるのに対し、*albus* 「教」株では振盪 30 分の上清が溶血毒量最大であり以後時間と共に低下するのが認められた。

以上の実験により静止菌溶血毒産生能の大なることを認められた *aureus* 「教動」、No. 2 *albus* No. 3 及び溶血毒産生に及ぼす振盪時間の影響が他菌と異なる *albus* 「教」の 4 株を選び以下の実験に供する事とした。

(3) pH の影響

溶血毒産生に於ける至適 pH を見るに既に Neisser, Wechsberg¹⁾ 等は「アルカリ性」なりと唱え、Bigger²⁾ は pH 7.2, 百瀬 pH 7.8, 玉置¹⁵⁾ pH 6.0, 吉岡³⁾ pH 70, 清水(19.20)⁴⁾ は pH 7.0~7.8 と至適 pH には夫々相異なる報告が有るので私も又溶血毒産生に就き比較研究を試みた。至適 pH を見るため、菌浮遊液にペプトンを添加し pH を 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 として 2 時間 (*albus* 「教」株のみは 30 分) 振盪後上清中の溶血毒を定量したところ、第 2 図に見られる如く各菌共 pH 7.0~7.5 附近に至適 pH の存在し、*albus* 「教」株では pH による影響は他菌に比し比較的少なかつた。

(4) C 源及び N 源の影響

次に溶血毒産生に及ぼす C 源及び N 源添加の影響を検討した。

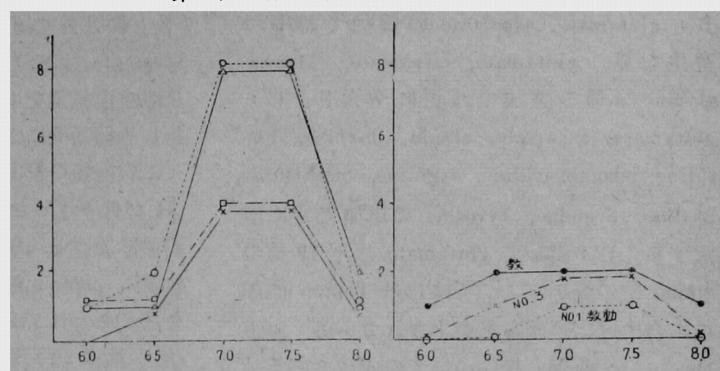
先ず amino 酸添加の影響を見たのであるが添加 amino 酸は難溶性の cysteine, tyosin, phenylalanine は夫々終濃度 M/500, 他は M/30 とし 2 種以上の amino 酸添加の場合は各 amino 酸濃度を低くして総 N 量が大体同一となる様にし、菌浮遊液 1.0 ml に amino

酸を加え全量を 3.0ml と
して 2 時間振盪し (albus
「教」株のみは 30 分間),
遠沈上清中の溶血毒を定
量した。

結果は第 5 表の如くで
あり、溶血毒素は +, ++,
+, ±, - の符号で表
わした。即ち遠沈上清を
2 倍稀釀して稀釀列を作
り夫々血球浮游液を加え

て溶血を見た場合の溶血度 ± に相当する稀釀
倍数が 8 倍のものを ++, 4 倍のものを +, 2

第 2 図 溶血毒產生に於ける至適 pH



倍のものを +, 1 倍のものを ± として表示す
る事とした。同表を要約すると A : 各 amino

第 5 表 添加 Amino 酸と溶血毒產生 (aureus 「教動」株)

A		B		C		D	
基 質	溶 血	基 質	溶 血	基 質	溶 血	基 質	溶 血
pepton	++	glutamate	±	glutamate		glutamate	
glutamate	-	aspartate	±	aspartate		aspartate	
aspartate	-	glutamate		alanine		alanine	
alanine	-	aspartate		glycine		glycine	
glycine	-	alanine		histidine		histidine	
histidine	-	glutamate		leucine		cysteine	
cysteine	-	aspartate		valine		leucine	
leucine	-	glycine		arginine		valine	
valine	-			methionine		threonine	
threonine	-			proline		lysine	
lysine	-			cysteine		arginine	
arginine	-			tyrosine		serine	
serine	-	histidine				thyrosine	
thyrosine	-	cysteine		glutamate		proline	
proline	-	leucine		aspartate		phenylalanine	
phenylalanine	-	valine		alanine		ornithine	
ornithine	-	threonine		glycine		iso-leucine	
iso-leucine	-	lysine		tryptophane		methionine	
methionine	-	arginine		phenylalanine		tryptophane	
tryptophane	-	serine		ornithine			
				iso-leucine			
				threonine			
				lysine			
				serine			

酸単独では殆んど溶血毒産生が認められず、
B : glutamate, aspartate の添加で若干の
産生を見、 glutamate, aspartate, alanine,
glycine 4種の添加では更に増大し、 C :
glutamate, aspartate, alanine, phycine, his-
tidine, leucine, valine, arginine, methionine,
praline, cysteine, tyrosine の添加で更に増
大する。D : 而して glutamate 以下 19 種の
amino 酸の添加によつてはほぼ pepton 添加
の場合に近い溶血毒が産生されている。以上
は aureus 「教動」株についての成績であるが
aureus No. 2, albus 「教」 No. 3 についても
同様の傾向が見られた。

次に glucose, mannose, galactose などの
6 炭糖, ribose, xylose, arabinose などの 5
炭糖及び Pyruvate, Succinate などの C 源添
加の影響を見ると、これらはいずれも単独で
添加した場合、並びに 2 種以上の C 源を同時
に添加した場合共に溶血毒産生を来さなかつ
た。而して albus 「教」株では此等 C 源は何
れもペプトン或はアミノ酸類等の N 源と同時

第 6 表 添加 C 源と溶血毒産生

菌 株	aureus		albus	
	教動	No. 2	教	No. 3
glucose	-	-	±	-
fructose	-	-	±	-
mannose	-	-	±	-
galactose	-	-	±	-
ribose	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-
xylose	-	-	-	-
pyruvate	-	-	-	-
succinate	-	-	-	-
pepton	#	#	+	+
〃 + glucose	#	+	#	±
〃 + fructose	#	#	#	±
〃 + mannose	#	#	#	±
〃 + galactose	#	#	#	±
〃 + ribose	#	#	#	+
〃 + arabinose	#	#	+	+
〃 + xylose	#	#	+	+
〃 + pyruvate	#	#	#	+
〃 + succinate	#	#	+	+

に添加した場合溶血毒産生を助長し、又 albus 「教」株以外の供試菌では Pyruvate, 或は Succinate は N 源と同時に添加することにより溶血毒産生を助長するのに対し、糖類ではむしろ抑制的に働くのが認められた。

この糖類の抑制作用はそれらの分解により pH が低下するためではないかと考え、糖類添加に於ける pH の移動を測定した。即ち、菌液に pepton のみ及び glucose と pepton を添加し pH 7.2 として 2 hr 振盪し (albus 「教」株は 30') 終 pH を測定したところ第 7 表の如く pepton のみの添加の場合は殆んど pH の移動はないが glucose, pepton 添加の際には albus 「教」株以外の菌では著明な pH 低下が見られた。

第 7 表 添加基質と pH の変化

添加基質	pepton		pepton + glucose	
	始pH	終pH	始pH	終pH
aureus	教動	7.2	7.4	7.2
	No. 2	7.2	7.5	7.2
albus	教	7.2	7.5	7.2
	No. 3	7.2	7.5	7.2

(5) 溶血毒産生に於ける促進及び阻害物質

溶血毒産生に対する Vitamine 類、金属イオン、抗生物質、阻害剤の影響を検討するため菌浮游液に 1.0 ml pepton を加え、更にこれら添加物質を加えて全量 3.0 ml として 2 時間 (albus 「教」株のみは 30 分間) 振盪し、遠沈上清中の溶血毒の定量を行つたところ以下の成績が得られた。

(a) Vitamine 類の影響

溶血毒産生に対する VB₁, VB₂, VB₆, VC, nicotinamide, panthathie acid, folic acid の影響を見ると第 8 表の如く albus 「教」株ではこれ等 Vitamine 類は全く影響を及ぼさず、他の菌、aureus、「教動」、No. 2, albus, No. 3 の各菌では VB₆ のみが溶血毒産生を促進することを認めた。

(b) 金属イオン

次に Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺, Cu⁺⁺,

第8表 溶血毒産生に対する Vitamine 類の影響

添加物質	菌 株		aureus	albus
	教動	No.	教	No.
	2	3		
pepton	#	#	+	+
" + VB ₁ (1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + viboflanine (1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + VB ₆ (1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + VC(1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + panthathieacid(1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + folic acid (1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+
" + nicotinamide (1γ/cc)	#	#	+	+
" + " (10γ/cc)	#	#	+	+

第9表 溶血毒産生に対する金属イオンの影響

添加物質	菌 株		aureus	albus
	教動	No.	教	No.
	2	3		
pepton	#	#	+	+
- + Fe ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	±	±	+	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	+	+	+	±
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	#	#	+	±
- + Mg ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	-	-	+	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	±	±	+	±
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	#	#	+	+
- + Mn ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	-	-	+	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	-	±	+	-
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	#	#	+	+
- + Ca ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	-	-	-	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	-	-	-	-
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	+	+	+	+
- + Cu ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	-	-	+	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	±	±	+	+
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	+	+	+	+
- + Zn ⁺⁺ (3×10 ⁻⁴ M)	+	+	+	-
- + " (10 ⁻⁴ M)	+	+	+	+
- + " (3×10 ⁻⁵ M)	#	#	+	+

Zn⁺⁺ の各イオン添加の影響は第9表の如く aureus の 2 株及び albus No. 3 に於ては、各

金属イオン共溶血毒産生抑制作用を示し、特に Co⁺⁺ が最も抑制作用が大であり、次いで Cu⁺⁺ であつた。

albus 「教株」ではこれ等金属イオンの影響は殆んど認められなかつた。

以上の実験では溶血毒産生に対する金属イオンの影響を見たのであるが、次に溶血毒の赤血球に及ぼす作用（溶血反応）に対する金属イオンの影響を見たところ第10表の如く、Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Zn⁺⁺ などの金属は溶血反応を促進し Mn⁺⁺ はやや阻害、Co, Cu は無影響である事が認められた。

第10表 溶血反応に於ける金属イオンの作用

添加イオン	菌 株		aureus	albus
	教動	No.	教	No.
	2	3		
金属イオン無添加	#	#	+	+
Fe (3×10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
Mg (3×10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
Mn (3×10 ⁻⁴ M)	±	±	+	±
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
Co (3×10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
Cu (3×10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
Zn (3×10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+
" (10 ⁻⁴ M)	#	#	+	+

(c) 抗生物質、阻害剤の影響

次に溶血毒産生に及ぼす sulfathiazol, penicilline, streptomycine 等の抗生物質、並びに NaN₃, NaF, monoiodoacetate, 24-dinitrophenol (D. N. P) 等の阻害剤の影響を見ると、抗生物質では第11表に見られる如く albus 「教」株はオーレオマイシン 0.5 γ/cc により溶血毒産生が抑制されるのみで他の抗生物質によつては影響を受けず、他の菌では一様に sulfathiazol によつて促進され、penicilline では阻害されにくく 1000 γ/cc の濃度に於ても阻害が認められるにすぎない。次いでストレプトマイシン、クロロマイセチンで

第11表 溶血毒産生に対する抗生素質の影響

添加物質	菌株	aureus	albus	
		教動 No. 2	No. 3	教 No. 3
pepton		#	#	+
- + sulfathiazol	500 γ /cc	#	#	#
- + "	5000 γ /cc	#	#	+
- + penicilline	100 γ /cc	#	#	+
- + "	1000 γ /cc	#	#	+
- + streptomycine	10 γ /cc	#	#	+
- + "	100 γ /cc	+	+	-
- + chloromycetin	10 γ /cc	#	#	+
- + "	100 γ /cc	+	+	-
- + aureomycine	0.005 γ /cc	#	#	+
- + "	0.05 γ /cc	+	±	-
- + "	0.5 γ /cc	-	-	-

と共に 10 r/cc 附近の濃度より阻害が現われる。

オーレオマイシンは最も阻害が顕著であり、

0.05 τ/cc 程度の濃度で阻害が明らかに認められた。

阻害剤の影響は第 12 表に示す如く、NaF,

第12表 溶血毒産生に対する阻害剤の影響

添加物質	菌 株	aureus		albus	
		教動	No. 2	教	No. 3
pepton		#	#	+	+
- + NaF	10-2M	#	#	+	+
- + NaN ₃	10-2M	#	#	+	+
- + D. N. P	10-4M	##	##	+	+
- + //	10-3M	#	#	+	+
- + iodoacet	10-5M	#	#	+	+
- + //	10-4M	#	#	+	#
- + //	10-3M	#	-	#	-

NaN_3 では全く影響されず、D.N.P ではむしろ促進される。これに対して沃度醋酸は抑制的に働き 10^{-4}M 以上の濃度で溶血毒産生を阻害することを認めた。

3. 滲血毒の加熱による不活性化

各供試菌の静止菌及び発育菌の產生する溶血毒の加熱による失活について検討した

ブイヨン培地に24時間培養後、遠沈した上

第 13 表 溶血毒の加熱による失活静止菌の產生する溶血毒

第 14 表 溶血毒の加熱による失活発育菌の產生する溶血毒

清及び普通寒天培養菌の静止菌体浮遊液にペプトンを加えて2時間(albus「教」株のみは30')振盪後遠沈した上清の夫々を、50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°Cに30分間加熱した後、溶血度を測定した結果、第13表に示す如く、各菌共発育中產生される溶血毒は60°C 30'の加熱により著明に、70°C 30'の加熱により完全に不活化し静止菌の產生する溶血毒もalbus「教」株以外では同様に熱に対し不安定であるが、albus「教」株では90°C 30'加熱によつても溶血作用を殆んど失わなかつた。

IV. 総括及び考案

口腔病巣よりブドー球菌に属するものを分離し、aureus 及び albus と見做されるもの各4株ずつ、並びに対照として教室保存標準株を供試菌として溶血毒についての検討を上述の如く加えた。

中村³⁰⁾、清水^(19, 20)はブドー球菌は累代培養により溶血毒產生能力著しく減退すると云い、又吉岡³¹⁾は同菌を動物通過により溶血作用を増強せしめたと報告している。原田¹⁴⁾は死亡したるマウスを解剖した所血液、内臓の一部にも溶血現象が証明された。私も又教室株はいづれも長期間人工培地に継代しているため、溶血毒產生が低下しておるものと考え、これを高めるために動物通過したものも併せ使用したのであるが、aureus 教室株はマウスを通過すること5代ですでにかなりの溶血性の上昇を認めたのに対し、albus は20代の継代によつてもわずかの上昇を認めるにすぎない。これは恐らく albus 教室株が溶血毒產生機構をもともと殆んど欠いているためと考えられる。私も死亡せるマウスを解剖した所、体腔に蓄積している血液及び心臓を穿刺して得られた血液には高度に溶血現象が見られた。

米沢⁸⁾等の実験によれば、歯槽膿漏症患者より分離した St. aureus, albus 共全て溶血能を有すると報告しているが、私はこれら各供試菌の血液加培地発育中の溶血能を見るに、兎血加普通寒天平板、兎血加ブイヨン両培地

共に一般に aureus に属する菌は、albus よりも溶血能が著しく大であり、菌別に見ると aureus では「教動」No. 2, No. 3, No. 4, No. 1「教」の順であり、albus では No. 3、「教動」若干 No. 1 がわづかに溶血能を有することを認めるが他の菌 No. 2, No. 4「教」は殆んど溶血性を示さない。而して静止菌の溶血毒產生能も大むね同じ順序であるが、ただ albus「教」株は菌浮遊液に pepton を加えて短時間振盪することによりかなりの程度に溶血性物質を產生するのが認められる。

上述の如く、ブドー球菌では溶血性を有する菌は静止菌の浮遊液に pepton を加え1~3時間振盪するのみで溶血毒を產生する。而してこの静止菌の溶血毒產生に対する種々条件の影響を検討することは、発育中の菌についてよりも要素が複雑でないので便利である。なお静止菌にペプトンその他を加えると発育しうる状態であり、厳密な意味での静止菌とは言い難いが、ここでは静止菌と称することとして以下その溶血毒產生について検討する。

先ず溶血毒產生に対するN源、C源の影響を見ると、amino 酸類(第5表)は各単独で添加しても殆んど溶血毒の產生は認められないが、glutamate, aspartate 両者の添加でわづかながら產生が見られ、更に alanine, glycine を順次追加すると漸次溶血毒產生が上昇する傾向があるが、特に発育に必要な amino 酸即ち histidine, valine, arginine, cysteine, methionine, proline, leucine, tyrosine などは有効と考えられる。然し glutamate, aspartate, alanine, glycine のみでかなりの產生を認めることからして必ずしも発育とは関係はない様である。

糖類その他のC源は、それらのみの添加によつては溶血毒產生は認められないが、pyruvate, succinate はN源と共に添加すると產生を増大せしめる傾向が認められ、これらは amino 酸代謝を促進することにより、その產生を助長するものと考えられる。ただ糖類はむしろ溶血毒產生を減少せしめる傾向があ

るが、これは糖類の分解により生成される酸のため pH の低下を来し、溶血毒産生の至適 pH 7.0~7.5 (第 2 図) をはずれるためと考えられる。

溶血毒産生に対しては Vitamine 類では VB₆のみが促進作用をもち、又金属イオンでは Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺ は全て 10⁻⁴M 前後に於て阻害的に働き、このうち特に Co⁺⁺, Cu⁺⁺ は阻害作用が大であり、阻害剤では NaN₃, NaF, D. N. P は全て無影響であるか、又はむしろ促進的に働くのに対し moniodo acetate は 10⁻⁴M 以上の濃度で抑制作用をもつ。抗生素質について見ると、スルファミン剤は無効であるかむしろ促進的に働き、penicilline は高濃度で僅かに阻害作用をもち、次いで streptomycine, chloromycetin の順に阻害作用が大となり、aureomycin は極めて微量で抑制作用を示す。これらのことより amino 酸代謝乃至は pypeptide, 蛋白合成に対して阻害的に働く物質が溶血毒産生を阻害する傾向が見受けられ、溶血毒産生機構に amino 酸代謝が関与することが更に確認される。

ブドー球菌の溶血素の熱抵抗性に就いて従来 Neisser u. Wchsberg¹⁾, 清水¹⁹⁾, 篠波⁵⁾, 米沢⁸⁾, 市之川¹⁸⁾等は 56°C ~ 60°C の間に於て大体不活化するといい、山本, 吉岡³⁾は一般に 65°C 30' の加熱により不活化し更に之を 100°C 3 分間にも破壊せざる一部ありと述べている。

私の場合発育菌、静止菌の産生する溶血毒に対する加熱の影響を見ると、albus「教」株の静止菌の産生するものを除いて、いづれも 60°C 30' 以上の加熱で不活化し、大体類似の性質を持つていると見てよい様である。而して albus「教」株静止菌では pepton その他を加えて 0.5~1 時間程度の短時間振盪することにより加熱に対して安定な溶血性物質を生成し、更に長時間 (2~3 時間) 振盪すると溶血性物質は漸次消失する(第 1 図)。又この溶血性物質の生成は阻害剤その他添加物質の影響或は pH の影響を受け難く、他の菌のも

のとは異なることは勿論であり、恐らくは菌体成分の一部が溶出するのではないかと想像されるが確認には至らなかつた。

V. 結 言

口腔内病巣より種々の細菌を分離し、そのうち St. aurers 及び albus に属すると推定されるもの各 4 株、並びに对照として教室保存標準株各 1 株を供試菌としてその発育菌、及び静止菌の溶血毒産生能を比較し、且つそれに対する種々条件の影響を検討して次の結果を得た。

(1) 教室株の動物通過により aureus は溶血性が著しく増大するが、albus は僅かである。

(2) aureus は一般に albus より溶血性大であり特に「教動」No. 2 が溶血性が最大であり以下 No. 3, No. 4, No. 1 の順である。albus では No. 3 教動が若干溶血性を有し、No. 1 は僅かであり、No. 2, No. 4 は殆んど溶血性がない。

(3) 静止菌の溶血毒産生には N 源の添加を必要とし、最も効果的なものは pepton であり、amino 酸では glutamate, aspartate, alanine, glycine が有効であるが、不可欠の amino 酸は存在しない。又 C 源のみを添加しても溶血毒は産生されないが N 源と共に添加すると産生を増大する傾向がある。但し糖類はその分解により pH が低下する結果、産生を抑制する傾向がある。

(4) 溶血毒産生は、Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺Cu⁺⁺ などの金属イオンにより抑制され、又 moniodoacetate, aureomycin, chloromycetin, streptomycine によつても抑制される。

(5) albus「教」株の静止菌の産生する溶血毒以外はすべて加熱に対し不安定である。

終りに臨み、御指導と御校閲を賜つた微生物学教室、村上栄教授及び歯科学教室、現渡辺義男教授、前今川与曹教授及御助力をいただいた松浦博士に深甚なる謝意を表します。

The Characteristics of Staphylococci Isolated from Lesions in Human Mouth

Part 1.

Production of Hemolysins

By

Ritsuya Yasui

Department of Microbiology Okayama University Medical School
(Director: Prof. Sakae Murakami)

Department of Dental Surgery (Director: Prof. Y. Watanabe)
(Prof. Y. Imagawa)

Using 4 strains considered to belong to *Staphylococcus aureus* and *albus*, selected from various bacteria isolated from the human mouth as test bacteria and one strain each of the standard-strain bacteria kept in our laboratory as the control, the author made comparative studies of the productivity of hemolysins of both growing bacteria and resting cells as well as investigated effects of various conditions on the production of hemolysins. The results are presented in the following.

1. By passage through the animal the productivity of hemolysin increases markedly in the case of standard strain of *aureus* while with *albus* the increase is only slight.

2. On the whole the productivity of hemolysin of the bacteria belonging to *aureus* strain is greater than those belonging to the *albus*, and No. 2 and standard strain of *aureus* presents the hemolyzat the highest degree.

3. Nitrogen source is required in the production of hemolysins by resting cells, and the most effective one is pepton; while among amino acids, glutamate, aspartate, alanine and glycine are effective, but there is no amino acid known to be indispensable to the hemolysin production.

Though hemolysin production does not occur when carbon source alone is added, when C-source is added in combination with N-source, the hemolysin production is enhanced. However, in the case of sugars, pH is lowered during the oxidation so there is a tendency to inhibit the hemolysin production.

4. Hemolysin production is inhibited by such metal ions as Fe^{++} , Mg^{++} , Co^{++} and Cu^{++} , and it is likewise inhibited by monooiodoacetate, aureomycine, and chloromycetine.

5. Hemolysin produced by the resting cells are all unstable against heat with exception of standar strain of *albus*.