

# Rough 集落を呈する腸チフス菌についての知見補遺

## 第一編 その生理学的血清学的性状

昭和34年12月1日受付

信州大学医学部細菌学教室 (主任: 田崎忠勝教授)

愛知県衛生研究所 (指導: 増山忠俊所長)

松島立雄

### Studies on Rough Colonies of Typhoid Bacillus

#### Part I. On the Physiological and Serological Properties

Tatsuo Matsushima

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director: Prof. T. Tazaki)

The Institute of Hygiene, Aichi Prefecture

(Director: Dr. T. Masuyama)

#### 緒言

腸内細菌の解離変異については, Arkwright (1921) ①以来, Arkwright②, Burnet③, Dulaney④, Wilson⑤, White⑥⑦等の詳細な研究があり S→R 変異は菌体抗原の変異移行即ち O→φ で φ は R 主要抗原とされ, これについては, White⑦, 岡本⑧, 安東⑨の報告に詳しい。

Kauffmann⑩, Topley 等⑪はその成書において S→R 変異は質的な変化 variation と共に量的な移行があり多くの中間型の存在することを述べている。Hardley⑫はこれらは一定の順序で出現し, 細菌の生活環あるいは発育相に当るもので段階的に起り一般の変異とは区別すべきものであるとしている。Jordan⑬は又 S. paratyphi B の単個培養により S と R がある一定の率で出現することを実験報告している。これに対し, Deskowicz⑭は S. aertrycke の実験より S→R は環境に関係なく起り mutation であると論じ, Luria & Delbürck⑮は大腸菌のファージ耐性の実験から mutation & selection においてその変化を論じている。

S→R 中間型については, Wilson⑥の S. typhi murium についての報告, Burnet③の S. enteritidis における集落ならびに血清学的性状の詳細な報告があり, 岡本⑧もコレラ菌, ゲルトネル菌についての S→R 中間型の研究から S→R は種々の遅速はあるがこれらはしばしば段階的に起り必ずしも突発的に起るものではないと述べている。

私は, 腸チフス菌 S. typhi H901W のパイオン陳旧培養により得た rough 集落を呈する菌が, 胆汁加

パイオンの継代培養により smooth 集落に復帰することに気が付き, S. typhi H901W により Kauffmann 等⑩⑪の述べる S→R 中間型の菌についてその性状を追求したので報告する。

#### 実験材料

腸チフス菌株 S. typhi H901W, 同株の長期パイオン培養により得た rough 集落を呈する 6 株及び S. typhi R<sub>2</sub> rough の 8 株。

rough 集落菌 (以下 R 形菌と呼び R 型又は R と区別する) は, 当室保存の S. typhi H901W 株の S 型菌をマウスを 2 回通過して最初に S 型菌 (以下原 S と呼ぶ) を選出し, 後これを普通肉水パイオン約 30cc にて 37°C 孵卵器に長期培養, 1 日 1 回軽く振とうし, 3% 普通寒天にて 6~12 週間で肉眼的に種々 rough の度を示す集落を選出した。これらの集落について, およそ 6, 8, 12 週間培養の段階でなるべく rough の度の強い集落群からそれぞれ 2 個づつの集落を選び, 生理食塩水に浮游し, 3% 普通寒天に 5 継代しても肉眼上均一な集落を示し, その後マウスによる 2 回の動物通過によつても以前同様の均一な集落を示すことを確めた上, 培養令及び rough の程度に従つてそれぞれ R<sub>1-a</sub>, R<sub>1-b</sub>, R<sub>2-a</sub>, R<sub>2-b</sub>, R<sub>3-a</sub>, R<sub>3-b</sub> (数字は同培養令に鈎菌したことを示すと) ラベル供試菌株とした。

なお, 同時に S. typhi R<sub>2</sub> rough 株もマウスによる 2 回の動物通過後対照株として供試した。

#### 実験方法及び結果

##### 1. 各種寒天板上の集落性状

供試培地：1) 普通寒天培地—肉水, Difco ペプトン使用, 寒天濃度 1%, 2%, 3%, 5% のもの 4 種を作製。2) BTB 培地—寒天濃度 2%, 0.2% BTB 溶液使用。3) Mc Conkey 培地。4) SS 培地 (Difco)。以上 4 種の培地をシャーレに 20cc ずつ分注。

各株のブイヨン培養 37°C 18 時間を生理食塩水で 10<sup>-6</sup> に稀釈したもの 0.2cc をガラス棒にて塗布, 37°C 24 時間にて集落の発育, 形態を観察した。

結果：寒天平板上, 集落の肉眼的形容に smooth, rough を用い, 表の記載は慣例により, S, SR, RS, Rr 等を用いた。

各平板とも R 形菌は rough を呈し, 普通寒天ではその寒天濃度の高いもの程 rough が強く, 1% 寒天では集落がやゝ大で, smooth の傾向がみられるが,

集落の固さ顆粒性はどの培地とも同一株については変わらない。

分離用培地では, SS 培地上の集落は普通寒天における rough の度に応じて発育が弱く集落が小で, R<sub>3-a</sub>, R<sub>3-b</sub> では微細な集落を示す等各菌間の外見の差が大きく, R 形菌に対する抑制を示している。Mc Conkey 培地では 3% 普通寒天との差が少い。BTB 培地ではやゝ発育抑制がみられるが集落形態は 3% 普通寒天と比べ各菌株間の差が認められない。

3% 普通寒天平板は発育がよく, 形態上の差が R 形菌間で比較的明瞭であり, このため集落の形態観察は全実験を通じこれによった。原 S, R<sub>2</sub> rough の標準株は各培地間に発育, 集落形態とも大差は認められず菌株の安定であることを示している。

表 1. R 形菌の形態及び色素, 重金属イオンによる凝集等の諸性状

| 集 落 形 態              |    | ブイ<br>ヨ<br>ン<br>沈<br>澱<br>発<br>育 | 白<br>発<br>凝<br>集 | 熱<br>凝<br>集 | Milion<br>凝<br>集 | トリ<br>バ<br>フ<br>イ<br>ビ<br>ン | Mg<br>So <sub>4</sub> | Cu<br>So <sub>4</sub> | Hg<br>No <sub>3</sub> | Pb(CH<br>3O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> |
|----------------------|----|----------------------------------|------------------|-------------|------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| S                    | S  | -                                | -                | -           | -                | -                           | -                     | 320                   | 320                   | 160                                     |
| R <sub>1-a</sub>     | R  | +                                | +                | +           | +                | 40                          | 40                    | 640                   | 640                   | 160                                     |
| R <sub>1-b</sub>     | R  | +                                | +                | +           | +                | 20                          | 40                    | 640                   | 640                   | 160                                     |
| R <sub>2-a</sub>     | R  | +                                | +                | +           | +                | 20                          | 40                    | 1280                  | 640                   | 160                                     |
| R <sub>2-b</sub>     | Rr | +                                | +                | +           | +                | 20                          | 40                    | 1280                  | 640                   | 160                                     |
| R <sub>3-a</sub>     | Rr | +                                | +                | +           | +                | 40                          | 40                    | 1280                  | 1280                  | 320                                     |
| R <sub>3-b</sub>     | Rr | +                                | +                | +           | +                | 40                          | 80                    | 1280                  | 1280                  | 320                                     |
| R <sub>2</sub> rough | Rr | +                                | +                | +           | +                | 20                          | 40                    | 640                   | 640                   | 320                                     |

註：数字は各 10% 溶液による凝集値を示す。熱凝集は 100°C 30 分, 2 時間放置後判定。+…凝集沈澱の特に著しいもの。

表 2. 名 種 寒 天 平 板 上 の 発 育 状 況

|                      | 1% 寒天   | 2% 寒天   | 3% 寒天   | 5% 寒天   | SS 寒天   | BTB 寒天 | McConkey 培地 |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|-------------|
| S                    | ## S 大  | ## S 中  | ## S 中  | ## S 中  | ## S 中  | ## S 中 | ## S 中      |
| R <sub>1-a</sub>     | ## SR 大 | ## RS 中 | ## R 中  | ## R 中  | ## SR 小 | ## R 中 | ## R 中      |
| R <sub>1-b</sub>     | ## SR 大 | ## RS 中 | ## R 中  | ## R 中  | ## SR 小 | ## R 中 | ## R 中      |
| R <sub>2-a</sub>     | ## SR 大 | ## RS 中 | ## R 中  | ## Rr 中 | ## SR 小 | ## R 中 | ## R 中      |
| R <sub>2-b</sub>     | ## SR 大 | ## R 中  | ## Rr 中 | ## Rr 中 | ## SR 小 | ## R 中 | ## Rr 中     |
| R <sub>3-a</sub>     | ## SR 大 | ## R 中  | ## Rr 中 | ## Rr 中 | + RS 微細 | ## R 中 | ## Rr 中     |
| R <sub>3-b</sub>     | ## SR 大 | ## R 中  | ## Rr 中 | ## Rr 中 | + R 微細  | ## R 中 | ## Rr 小     |
| R <sub>2</sub> rough | ## R 大  | ## R 中  | ## Rr 中 | ## Rr 中 | + R 中   | ## R 中 | ## Rr 中     |

註：普通ブイヨン 24 時間培養中 10, 0.2cc 塗布による発育, 集落形態, 集落大き = 直径の 2mm を中とした, の順で記載。% は寒天に濃度を示す。

2. 働性モルモット血清に対する感性

表 3. 働性モルモット血清に対する感性試験 (ThjØtta Waaler 法による)

| 菌 株                 | 血清添加 | 対 照  |
|---------------------|------|------|
| S                   | 1    | } S  |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>1-a</sub>    | 1    | } R  |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>1-b</sub>    | 1    | } R  |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>1-a</sub>    | 1    | } R  |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>2-b</sub>    | 1    | } Rr |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>3-a</sub>    | 1    | } Rr |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>3-b</sub>    | 1    | } Rr |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |
| R <sub>2rough</sub> | 1    | } Rr |
|                     | 2    |      |
|                     | 3    |      |

各菌株3個つつの集落を試験し、発育、集落形態を記した。###~+は平板上の発育度を示す。

ThjØtta & Waaler 法<sup>⑧</sup>を用いた。

各株の普通寒天播種より集落3個つつ任意に選び、新鮮モルモット働性血清にて検べた結果、原Sにおいても平均5%程度に感性を示している。R<sub>2-a</sub>、R<sub>2-b</sub>において rough の小集落が僅かに発育したほかは、R<sub>2 rough</sub>を含めてR形菌は血清含有培地に発育せず、敏感な感性を示している。抵抗を示す如くみられたR<sub>2-a</sub>、R<sub>2-b</sub>小集落は、この集落を平板上白金耳にてよく掻き混ぜ再度検べた結果発育を示さず感性であった。これは最初生理食塩水使用による沈澱のため血清との完全な接触が行われなかつたものと考えられる。

ThjØtta & Waaler によれば、Rの除去でなくR形菌を除去する方法であるとしている。原Sの中にも5%程度において対照との比較から感性を示すものがみられ、集落中のR形菌の混在が考えられるが、モルモット血清通過の集落と対照の集落とは形態、集落の均一性においても肉眼上差は全く認められなかつた。

R形菌は敏感な感性を示し、これを原法の5倍稀釈血清に代えて10倍稀釈の血清を用いてもなお全く発育を示さず、この方法によるR形菌間の感性の比較は不可能であつたが、R<sub>1-a</sub>以下のR形菌は感性において原Sと明に区別されることが認められ注目された。

3. 色素及び重金属イオンによる凝集反応

はじめに、自発凝集をしらべると、原Sを除く7株はすべて生理食塩水による浮游液 37°C 2時間後室温放置1昼夜により、或程度 rough の度に応じた沈澱を示し、0.4%、0.2%食塩水ではR<sub>a-a</sub>、R<sub>a-b</sub>を除いてかすかに沈澱がみられ、0.1%は0.2%と同程度の凝集沈澱を示した。又R形菌のR<sub>a rough</sub>はやゝ安定を示し0.2%では沈澱がみられなかつた。

この成績により、凝集反応は0.1~0.2%食塩水による浮游液により、菌量は硫酸バリウム標準液との比濁により0.2mg/ccを用いた。なお、R<sub>a-a</sub>、R<sub>a-b</sub>についてはこれよりやゝ濃厚なものを絹花にて濾過し沈澱の起らないことを確かめて同濃度に合せ供試した。

Millon 凝集：岡本<sup>⑩</sup>により Millon 試薬による凝集は重金属イオンによるものと同じカテゴリーに属するものとの考え方から、その沈澱凝集をしらべた。

上記方法により約4mg/ccの浮游液1.0ccに試薬3滴を加え、軽く火焰沸とう後静置判定。

原Sを除く全R形菌に沈澱凝集を認め、これによる各R形菌間の沈澱量の差はR<sub>2 rough</sub>も含めて特にみられなかつた。

トリパフラビン及び重金属イオンによる凝集：色素としてトリパフラビンを用い、重金属イオンにはMgSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、AgNO<sub>3</sub>、Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>を用い各10% (重量%)の蒸溜水溶液を原液とした。5倍から始める倍数稀釈液を作り、その0.5ccに菌浮游液0.5ccを加え、37°C 2時間後室温放置して判定した。

トリパフラビンに対しては、原Sではスライド凝集反応も試験管内凝集もみられずR形菌は各株とも40倍の凝集価を示した。この反応は10°C~4°C 2時間後1屋液多放置によつても前法との差は認めなかつた。

重金属イオン凝集では、Cu<sup>++</sup>、Ag<sup>+</sup>に最も凝集が強く、原Sでも320倍の凝集価を示し、Cu<sup>++</sup>では原SとR<sub>2-b</sub>程度までの凝集が同じく160倍を示した。Mg<sup>++</sup>を除き、Cu<sup>++</sup>、Ag<sup>+</sup>、Pb<sup>++</sup>では凝集が硬く顆粒状でO凝集に類似し、しかも凝集のend-pointが高い。

以上、要するに、トリパフラビン、Mgイオンを除いては凝集は原Sにもみられ、O凝集原のないR<sub>2 rough</sub>、及びR<sub>1-a</sub>~R<sub>3-b</sub>とも大差のない凝集が観察された。

Bernstein 等<sup>20)</sup>はスライド凝集反応で、トリパフラピンはサルモネラの鞭毛抗原の第2相を強く凝集するが第1相を凝集せず、又O抗原も凝集しないことを述べている。水沼<sup>21)</sup>はCuSO<sub>4</sub>に腸チフス菌のO抗原が高稀釈まで凝集すること報告している。この実験ではMillon 試薬、トリパフラピン及びMgSO<sub>4</sub>による凝集によつてSとR形菌の区別が可能であつた。

4. 血清学的性状

1) 凝集反応

実験方法：ウサギ免疫血清の作製。原S, R<sub>1-a</sub>, R<sub>2-a</sub>, R<sub>3-a</sub>, R<sub>2 rough</sub>の5株の生菌及び100°C 2時間加熱菌で免疫した。生菌は普通寒天37°C 20時間培養の生理食塩水浮游液 0.5mg/cc を用い、死菌免疫においては、R形菌は特にやゝ濃度の高いものを用い、採血予定前にO抗体価をしらべ、追加免疫し、抗体価がそれ以上昇らないことを確めた上採血した。

菌浮游液の調製。生菌液については前述に従い、死菌については、加熱による沈澱が非常に強いために、White<sup>10)</sup>に従いアルコール処理菌を使用した。即ち、0.2%食塩水に濃厚な菌液を作り、3倍量の純エタノールを加え、37°C 3時間後氷室1昼夜放置、0.2%食塩水で洗滌、0.2mg/ccの浮游液として用いた。なお、少量の沈澱を示すものは脱脂綿にて軽く濾過し判定時特に対照に留意した。

表 4. 凝 集 反 応

| 血清        | S    | R <sub>1-a</sub> R <sub>2-a</sub> R <sub>3-a</sub> R <sub>2 rough</sub> |                 |      |     |     |   |
|-----------|------|---|-----------------|------|-----|-----|---|
|           |      | 生菌血清対生菌   | 煮沸菌血清対アルコール処理抗原 |      |     |     |   |
| 抗原        | S    | 5210  | 1280            | 1280 | 640 | 640 | - |
| R 1-a     | 2560 | 640   | 640             | 640  | 640 | 640 | - |
| R 1-b     | 2560 | 320   | 320             | 320  | 320 | 320 | - |
| R 2-a     | 2560 | 640   | 640             | 640  | 320 | -   | - |
| R 2-b     | 1280 | 320   | 160             | 160  | 160 | -   | - |
| R 3-a     | 2560 | 320   | 320             | 320  | 640 | -   | - |
| R 3-b     | 1280 | -   | -               | 20   | 40  | 20  | - |
| R 2 rough | 640  | -   | -               | -    | 20  | 320 | - |

数字は凝集価を示す。

実験成績：表の如く、原Sは生菌免疫で5120倍、加熱菌免疫で1280倍を得た。

O凝集において、原S血清に対するR形菌の凝集価は、原Sの1280倍に比べ、やゝ低下を示しR<sub>3-b</sub>を除いて640~320倍であつた。即ち、roughの強いR<sub>2-b</sub>, R<sub>3-a</sub>においてもなお320倍を保持し、R<sub>1-a</sub>, R<sub>2-a</sub>は原

Sより1管低い640倍、R<sub>1-b</sub>, R<sub>2-b</sub>, R<sub>3-a</sub>の3株はほぼ均一に320倍でそれ以下の凝集を示した菌株はみられなかつた。R<sub>3-b</sub>は原S, R<sub>1-a</sub>血清に対し全く凝集がみられずO抗原性を消失したR形菌と考えられる。

生菌免疫血清対生菌抗原においてはR形菌間に凝集価の差は殆ど認められない。

R<sub>1-a</sub>及びR<sub>2-a</sub>血清は原S血清の凝集反応と大差を示さないが、R<sub>2-a</sub>血清に対しR<sub>1-a</sub>が1管低い640倍、R<sub>3-b</sub>に対しても僅かに凝集がみられ、又両血清ともR<sub>2-b</sub>に160倍と低い凝集を示し注目される。

R<sub>3-a</sub>血清に対しては、R<sub>2-a</sub>が320倍まで凝集し前者血清に比べ低下を示し、R<sub>3-b</sub>及びR<sub>2 rough</sub>にも僅かな凝集が認められR型凝集の傾向を示しているものと考えられる。

R<sub>2 rough</sub>の加熱菌血清は、同菌に対し320倍と明にR型凝集を示しているが、R<sub>3-b</sub>を除く外のR形菌には全く凝集がみられない。

以上、煮沸菌血清対アルコール処理抗原の凝集反応において、原S血清に対するR形菌はR<sub>3-b</sub>にO抗原の消失と思われる1株を認めたほかは原Sと比べ1~2管低い640~320倍にあり、R形菌血清においては原S, R<sub>1-a</sub>に対する凝集価は原S血清にやゝ低く、低く特にroughの強いR<sub>2-a</sub>, R<sub>3-a</sub>血清によるR形菌の凝集は640~160倍と比較的の広い価を示し、しかも、R<sub>3-b</sub>, R<sub>2 rough</sub>に対してもR型凝集と思われる凝集が認められ、総じてO凝集よりみたS→R方向の一連の傾向がうかがわれる。R型凝集については沈澱反応等による詳細な検討を要するが、このR形菌ではR<sub>2 rough</sub>血清に対する明らかな凝集はみられなかつた。

2) 吸収試験

実験方法：菌体抗原の相互の関係を追求するため専ら煮沸菌血清と前法アルコール処理抗原を用いた。各血清の0.2%食塩水による5倍稀釈血清にアルコール処理の大量菌を混ぜ、37°C 2時間氷室1昼夜の上清を用い、同時にR形菌については対照として0.2%食塩水により塩類凝集による吸収でないことを確かめ試験を進めた。

結果：原S及びR<sub>1-a</sub>菌血清の同菌による吸収後血清は他の菌を凝集せず、たゞ僅かに原S及びR<sub>1-a</sub>で吸収したR<sub>2-a</sub>及びR<sub>3-b</sub>に同菌に対する凝集の痕跡が認められる。

R形菌のR<sub>2 rough</sub>による吸収では明かに未吸収の如き凝集価を示し、R<sub>2-a</sub>, R<sub>3-a</sub>等のroughの強い菌による吸収においてR型凝集による吸収が行われるためか、他菌との凝集価が僅かに減少している。

5. アミノ酸特にトリプトファン要求について

表 5. 吸収試験 (煮沸菌血清対アルコール処理抗原)

| 血清               | 抗原                   |   | 吸収  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                      |
|------------------|----------------------|---|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
|                  | S                    | R | S   | R <sub>1-a</sub> | R <sub>1-b</sub> | R <sub>2-a</sub> | R <sub>2-b</sub> | R <sub>3-a</sub> | R <sub>3-b</sub> | R <sub>2</sub> rough |
| S                | S                    |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>1-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>3-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2</sub> rough |   | 640 | 640              | 320              | 320              | 160              | 160              | —                | —                    |
| R <sub>1-a</sub> | S                    |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>1-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>3-a</sub>     |   | —   | —                | (5)              | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2</sub> rough |   | 640 | 640              | 160              | 320              | 80               | 160              | —                | —                    |
| R <sub>2-a</sub> | S                    |   | —   | —                | (5)              | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>1-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>3-a</sub>     |   | (5) | —                | —                | 5                | —                | —                | (5)              | —                    |
|                  | R <sub>2</sub> rough |   | 320 | 320              | 320              | 320              | 80               | 160              | 10               | —                    |
| R <sub>3-a</sub> | S                    |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | 5                | —                    |
|                  | R <sub>1-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | (5)              | 10               | 5                    |
|                  | R <sub>2-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>3-a</sub>     |   | —   | —                | —                | —                | —                | —                | —                | —                    |
|                  | R <sub>2</sub> rough |   | 320 | 320              | 160              | 160              | 40               | 320              | —                | —                    |

数字は吸収後の凝集価を示し、( )は5倍血清に弱陽性を示したもの。

実験方法: Saunder 培地, 即ち,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.4g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g,  $\text{NaCl}$  2.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g, アスパラギン 3.0g, チスチン 0.1g, ダルコース 2.0g, Aq. dest. 1,000.0cc. pH 7.2.

これを基礎培地として  $\beta$ -トリプトファン添加による発育度及びチスチン, アスパラギンとの関係を光電比濁計 (日立, 昭和25年製) により追求した。

菌株は8株中, 原 S, R<sub>1-a</sub>, R<sub>2-a</sub>, R<sub>2-b</sub>, R<sub>3-a</sub>, R<sub>2</sub> rough の6株を選び供試した。各菌株の37°C 20時間培養の寒天斜面1白金耳量を2.0cc 生理食塩水に浮游, 遠心沈澱し上清を捨て3回洗滌した後, 生理食塩水で元の量とした菌浮游液の1白金耳量を接種した。

なお, 透明にした寒天平板を用い混釈法による14時間及び24時間培養の生菌数をしらべた。記載は生理食塩水による10倍段階稀釈において10<sup>-7</sup>で行った。

結果: 原 S, R<sub>2</sub> rough とともにトリプトファンは必須でなく, アスパラギン, チスチン等の直鎖アミノ酸必須株に属し, アスパラギン, チスチンを除いたトリプトファン 1 $\gamma$ /cc 添加のみでは36時間培養にても原 S が僅かに発育するのみで他の菌は殆ど発育をみない。

アミノ酸中, チスチン 0.1g のみの培地では, 原 S, R<sub>1-a</sub> が僅かに発育し, アスパラギン 3.0g の単独では長い lag をおき36時間で原 S を最高に rough の弱い順からかなりの発育を示している。

チスチン, アスパラギン2種の添加は, その相乗作

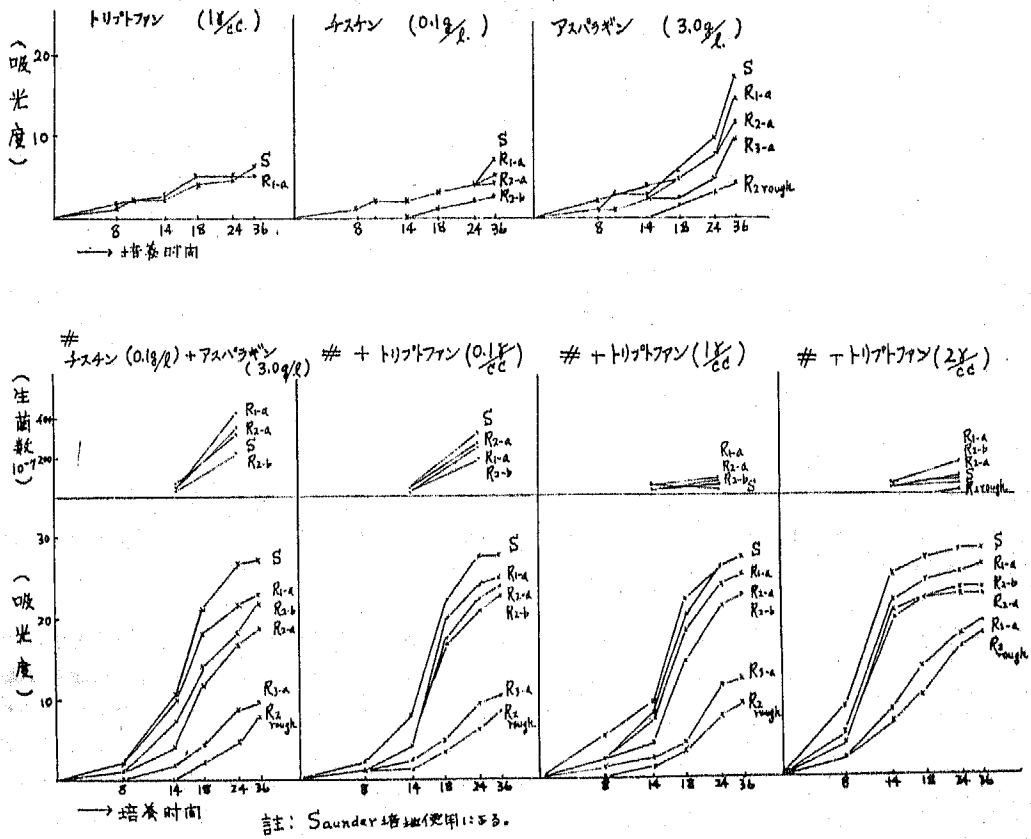
用により原 S, R<sub>1-a</sub>, R<sub>2-a</sub> と大差なく著明な発育を示すが, R<sub>3-a</sub>, R<sub>2</sub> rough ではなお発育が劣っている。これにトリプトファンを0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\gamma$ /cc の割合で添加した結果は, 0.1 $\gamma$  では変わらず, 1.0 $\gamma$  特に2.0 $\gamma$  では lag が短縮し指数発育が早期にみられ, 特に原 S が勝れ, R<sub>1-a</sub>, R<sub>2-a</sub>, R<sub>2-b</sub> 少し遅れて, R<sub>2</sub> rough, R<sub>3-a</sub> と rough の度とかなり一致するような段階の利用度を示している。

試みに, グルコースを除いた3種アミノ酸添加培地では72時間培養によるも何らみるべき発育なく, グルコースがC原として不可欠であることを示した。

生菌数においては, 1.0 $\gamma$ ~2.0 $\gamma$  トリプトファン添加では発育濁度の大にもかわらず, 24時間培養の生菌数は14時間培間におけると殆ど変わらず, トリプトファンを欠くもの又は0.1 $\gamma$ /cc程度の添加と比べむしろ少くなっている。これは1.0 $\gamma$ ~2.0 $\gamma$ 程度の微量のトリプトファンにより急激に発育が賦活され, 栄養源の消耗, 代謝産物の蓄積が促進され, 発育最高濃度が早期に達せられるため, 生菌数の定常状態死菌の増加を来すためと考えられる。2.0 $\gamma$  トリプトファン添加において原 S よりも R 形菌の方が24時間培養の生菌数で多くなっている事実もこの考えを裏付けるものであろう。

R 又は R 形菌に対するこの種の報告は少い。rough の強い R<sub>3-a</sub>, 標準 R 株 R<sub>2</sub> rough では図の如く, トリプトファンを含まない又は0.1 $\gamma$ /cc程度の極めて微量

図 1. R形菌の氨基酸特にトリプトファン利用の状況



な培地では殆んどその発育がみられない。この事実は、これらの菌にとりトリプトファンは必要というよりもむしろ必須な氨基酸であると見なすことが出来る。

6. マウスに対する毒力

各菌のマウスに対する致死量が予備試験にて、R<sub>2</sub> roughを除いて、0.25mg~2.0mgにあることを知り、11g~14gの市販マウス各3匹、対照2匹に、3.0mg, 2.0mg, 1.0mg, 0.5mg, 0.25mgの段階の菌量を用い、24時間斜面寒天培養を秤量びんに測り、各菌が0.25ccになるように生理食塩水に浮游したものを腹腔内に接種、1週間観察した。斃死したマウスの心血からSS及びMcConkey培地により当該菌を確認した。

結果: R<sub>2</sub> roughを除いて供試菌株のMLDは0.25mg~2.0mgにあり、原Sは0.25mg~0.5mgにあつた。O凝集価とは必ずしも一致しないがR形菌のroughの程度は比較的その菌力に明瞭な段階を与えているように思われる。斃死マウスからの菌の寒天平板上

所見は各菌とも均一な集落を示し、肉眼的には通過前と変つていない。

O抗原のないR<sub>2</sub> rough株においてもMLD 2.0mg~3.0mgを示し、R<sub>1-a</sub>, R<sub>1-b</sub>と大差を示さず、このことは、他のR形菌との各種培地上の発育度の比較からしても、endotoxinによるtoxicityというよりも、菌の増殖による一次的敗血症による斃死も充分考えられ、菌体抗原量と共に菌の増殖力も考慮されてよいものと思う。

7. 生物学的諸性状

糖分解培地はBarsickow培地を用い、その他の試験はすべてKauffmannの成書<sup>10)</sup>によつた。

結果: R形菌において、ガラクトースを分解しないもの、グリセリン分解の遅速等がみられたほか、いづれも著明な差を認めず、同一菌株からの各菌はかなり安定した性状をもっているものと考えられる。ガラクトース非分解菌については、2週間後にこの培養を普通寒天に播種し、その集落数個を混合、10組に再び試験したが分解又は遅延分解を認めることは出来なかつ

表 6. マウスに対する毒力試験

|         | 3.0mg | 2.0mg               | 1.0mg               | 0.5mg                             | 0.25mg              |
|---------|-------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|
| S       |       |                     | D D D               | D D <sub>24</sub> S               | D <sub>72</sub> S S |
| R 1 - a |       |                     | D D D               | D D D <sub>24</sub>               | S S S               |
| R 1 - b |       |                     | D D D               | D D <sub>24</sub> S               | S S S               |
| R 2 - a |       |                     | D D D               | D <sub>24</sub> S S               | S S S               |
| R 2 - b |       |                     | D D D               | D <sub>24</sub> D <sub>48</sub> S | S S S               |
| R 3 - a |       | D D D               | D D D <sub>24</sub> | D <sub>48</sub> S S               |                     |
| R 3 - b |       | D D D <sub>24</sub> | D <sub>48</sub> S S | S S S                             |                     |

註：11~14♂マウス使用，腹腔内接種，D=斃死，S=生存，5日間観察，数字は斃死までの時間を示す。

表 7. 生物学的諸性状

|        | S   | R <sub>1-a</sub> | R <sub>1-b</sub> | R <sub>2-a</sub> | R <sub>2-b</sub> | R <sub>3-a</sub> | R <sub>3-b</sub> | R <sub>3-rough</sub> |
|--------|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
| グルコース  | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| ラクトース  | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| サツカロース | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| マンニトール | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| ソルビトール | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| キシロース  | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| マルトース  | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| ラムノース  | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| アラビノース | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| グリセリン  | (+) | (+)              | (+)              | (+)              | +                | +                | (+)              | -                    |
| ガラクトース | +   | +                | +                | -                | -                | +                | (+)              | +                    |
| インドール  | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| M. R.  | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |
| V. P.  | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| 尿素     | -   | -                | -                | -                | -                | -                | -                | -                    |
| 硫化水素   | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | (+)                  |
| 運動性    | +   | +                | +                | +                | +                | +                | +                | +                    |

(+)=遅れて3~6日に分解(陽性)を示したもの。

た。秋葉<sup>22</sup>はキシロースにより，中村<sup>23</sup>はキシロース及びアラビノースの分解能より腸チフス菌を類別し，これらの性状はかなり安定で，分解能そのものは固定性であつて菌令により差が認められ，集落中の分解，非分解菌の混在性を述べている。ガラクトース分解能についてはなお詳細な検討を要するが，roughの比較的強い菌にその欠除が認められた。

硫化水素産生は各菌とも差がなく，運動性はR<sub>3-rough</sub>にやゝ劣りをみるほか各菌に保持され，これは生菌の凝集価とも一致している。

考按及び總括

Arkwright<sup>24</sup>は腸チフス菌のSがブイヨン長期培養により2~3ヶ月で大部分Rに移行することを述べているが，この実験における当室保存の腸チフス菌株 S. typhi H901W の長期ブイヨン培養では，3ヶ月の培養にても全集落の完全なSの消失はみられず，陳旧培養液の著しい減少のない限り，R又はR形菌への完全な移行は非常に困難なものであると思われ，これにより得た各培養令のR形菌として一括した rough を呈する各菌はかなり安定した性状をもっていることを知つた。即ち，血清学的には6週間の培養で得たR<sub>1-a</sub>程度では肉眼的に明に rough であるがO凝集価は原Sと殆ど変わらず，その他の菌の凝集価はO抗原の消失と考えられる1株を除きやゝ低下の傾向がみられたが原Sの血清1280倍に対しアルコール処理抗原との凝集においてなお640~320倍を示した。しかも，普通寒天等の比較的環境の変化少い培養条件では，血清学的にも又集落の性状から言つても安定を示していた。この見地から，この実験に供試した S. typhi H901W のS→R中間型の菌株としての性状追求は可能であつた。

集落性状が rough であるもの必ずしも完全なRでなく，又ブイヨン沈澱発育，Millon 試薬及び重金属イオンによる凝集等のいわゆるS-R鑑別法による性状の比較によつてもその鑑別は困難なものであることはKauffmann, Topleyの成書にも述べられている。

R形菌の集落性状は，これを観察する寒天濃度により差があり，1~5%寒天の範囲では濃度の高い程 rough の度が強く，中沢<sup>25</sup>も大原，箕田赤痢菌の研究からこの知見を報告している。この結果より普通寒天平板上の集落観察は比較的集落性状の差が明瞭な3%寒天含有の平板により行つた。これにより，R形菌はR<sub>1-a</sub>, R<sub>1-b</sub>の如く，表面が乾燥し中央部に金属様

光沢があり集落の円形形態の比較的保持されている“roughの弱い”グループと、R<sub>2-a</sub>, R<sub>2-b</sub>, R<sub>3-a</sub>, R<sub>3-b</sub>及び対照株のR<sub>2</sub> roughの如く、それに加えて辺縁が不規則で顆粒性の強い性状をもつ“roughの強い”菌に大別することが出来た。

SS培地(Difco)ではR形菌の集落が小さく発育も弱く、この発育の抑制はroughの強さと一致しておりR形菌間の比較的明瞭な発育態度の差違が観察され注目された。

モルモット働性血清に対するThjotta & Waaler法はR形菌除去の比較的有効な方法とされているが、既に原S集落の5%程度に感性を示すものがあり、肉眼上比較的軽度のR形菌においても血清添加培地には全く発育せず非常に敏感で、R形菌相互の差の比較は不可能であつた。しかし、この方法により、補体に対する抵抗力が菌のO凝集性と余り関係のないという事実と共に、集落の肉眼的区別で行つた原Sとこの一連のR形菌に一つの明瞭な客観的区別を与えることが出来た。

Millon試薬、色素及び重金属イオンによる凝集の結果は、Millon試薬、トリパフラビン、Mgイオンは原Sを凝集せずR形菌を凝集し、Cu, Ag, Pbの各イオンは原S, R形菌とも凝集し、この凝集価は各菌間にある程度の差を示したが、Mgイオンを除いて、実際にはこれらのイオンについてのSとR形菌の凝集価の相違は余りないものと考えてよいと思う。岡本<sup>⑧⑨</sup>はゲルトネル菌、赤痢菌の実験より、Mg, Mn以外のすべての金属イオンはR形菌を著明に凝集することを述べ、一般に色素もMillon試薬による凝集も金属イオンによる凝集と同一のカテゴリーに入れることが出来ることを強調している。Bernstein等<sup>⑩</sup>はトリパフラビンによる凝集はサルモネラの鞭毛抗原に関係がありO抗原は凝集しないことを述べている。この実験によれば、トリパフラビン、Millon試薬、Mgイオンを別として他の重金属イオンは明らかにO抗原を有するS, R形菌とも凝集を示し、水沼<sup>⑪</sup>のCuSO<sub>4</sub>が、腸チフス菌のO抗原を高濃度まで凝集するという主張と一致し、CuSO<sub>4</sub>のみならず、Pb, Agイオンもその凝集がO抗原にも関係あるものと考えられる。

O抗原の保持量は凝集反応において、血清の倍数階段稀釈により、原S血清に対しroughの比較的弱い方のR<sub>1-a</sub>及びR<sub>2-a</sub>に原Sより1管低い640倍を示したほかは、1株に凝集のみられないものがあり、他の3株はほぼ均一に360倍を示した。

安東<sup>⑫</sup>は濃厚煮沸抗原を用いて行つた沈降反応において、腸チフス菌のO抗原量はこれを有する菌間では

大きな動揺はないが、320~40倍の陽性を示すと述べている。これと比較して、アルコール処理抗原による本実験の凝集反応もその凝集価の中においてほぼ一致している成績と思われる。Burnet<sup>⑬</sup>もS. enteritidisの種々のR形菌が凝集反応により640~160倍にあつたことを実験報告している。この実験における菌株は標準菌株のため、抗原、集落とも安定しておりRへの移行は非常に除々にあつて変化の段階を示す類形的な培養相の把握は困難であつたが、各R形菌の煮沸菌血清に対するR形菌間相互の凝集反応が示す640~160倍の比較的中の広いO凝集価も考え併せると、S→R解離変異の抗原消失の進行過程も凝集反応により或程度知ることが出来るものと思う。

R型(φ)凝集は吸収試験によつても余り明瞭ではないが、roughの強い2株において僅かにその傾向がみられた。岡本<sup>⑭</sup>も腸チフス菌のR煮沸抗原は特異的なφ抗原をもっているが、W型腸チフス菌体及び免疫血清はφ又はφ抗体をもたないか又は微量であることを報告している。

アミノ酸特にトリプトファン要求について、秋葉<sup>⑮</sup>はアスパラギン、チスチンをN源として発育可能な腸チフス菌はこれらの直鎖アミノ酸よりトリプトファン合成が可能であることを報告している。この実験におけるH901W株もアスパラギン、チスチンを必要とし、トリプトファンを必須としないことが分り、これを親株とするR形菌においてもこれらアミノ酸のみにより発育可能であることを知つたが、roughの度に応じてトリプトファンの“必須性”は嵩まり例えば、roughの強くO凝集価の低いR<sub>3-a</sub>, O抗原を欠R<sub>4</sub> rough等の菌についてはそれ自体トリプトファン必須株とみることが出来る。

マウスに対する毒力については、その低下が必ずしもO凝集価とは一致していないが、roughの強い菌程毒力が低下し、S→Rにおける毒力の段階的低下の傾向がうかがわれた。

## 結 論

S. typhi H901Wのブイオン培養によつて得たrough集落を呈する菌の生理学的血清学的性状について、原S形菌及びS. typhi R<sub>2</sub> roughを対照として、その変化を観察した。

1. SよりR形菌への集落の変化にともない、モルモット働性血清による発育抑制、ブイオン沈澱発育、トリパフラビン、Millon試薬及びMgSO<sub>4</sub>による凝集が、早期の比較的明確な性状の変化として観察された。



2. R形菌のS→R過程における段階的变化と考えられる性状の変化は、SS 寒天培養の発育低下、トリプトファン要求度の増加及びブイヨン沈澱発育により、又或程度マウスに対する毒力低下によつても観察され、特にSS 寒天培養の発育低下及びトリプトファン要求増加は普通寒天培養の rough の程度と一致している。

3. R形菌のO凝集価は rough の度と必ずしも一致しないが、O抗原をもつ菌では、原Sの1280倍に対し640~320倍にあつた。

これらの生理学的血清学的性状は *S. typhi* H901W のS→R中間型菌としてかなり安定を示している。

(参考文献は第二編に一括掲載する)