

ガスクロマトグラフィーを用いた好気性菌代謝脂肪酸の経時的変動に関する研究：  
好気性菌同定法への新しい試み

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8887">http://hdl.handle.net/2297/8887</a>

# ガスクロマトグラフィーを用いた好気性菌代謝脂肪酸 の経時的変動に関する研究

—好気性菌同定法への新しい試み—

金沢大学大学院医学研究科小児科学講座 (主任：谷口昂教授)

鳴 大 二 郎

(昭和56年1月10日受付)

Key words GLC VFA NVFA Aerobes

ガスクロマトグラフィー (Gas-Liquid Chromatography : 以下 GLC と略す) は、技術的理論的に手法が簡単であること、試料量が少なくかつ極微量の物質の検出に適すること、短時間で分析が行えること、沸点の近い異性体の分離も極めて正確であり、しかもデータの再現性にも富むことなど多くの利点の故に、現在では工業化学・生化学・公害分析等の分野で広く活用されている。

医学の面においても近年、尿・血清あるいはその他の体液中に含まれる特定物質の定量や、アミノ酸分析、あるいは抗痙攣剤等薬物の血中濃度の測定にも応用されている。

細菌学・感染症の分野では、1970年 Mitruka ら<sup>1)</sup> が、マウスで実験的に起こした bacteremia についてその血清を直接 GLC 分析したパターンを比較分類することにより、bacteremia の有無や起炎菌を早期に捕え得る可能性を示し、感染症の迅速診断への一方法を開いた。

その後、例えば species の分類が従来の生化学的方法では困難であったり、煩雑であったりする *Pseudomonas* species の同定に用いられたり<sup>2)3)</sup>、また嫌気性菌の分類に重要とされる形態・芽胞・グラム染色性・鞭毛・終末代謝産物のうち、代謝産物としての揮発性脂肪酸 (Volatile Fatty Acids: 以下 VFA と略す) や難揮発性脂肪酸 (Non-Volatile Fatty Acids: 以下 NVFA と略す) の分析に GLC を用いて嫌気性菌同定

の一助とする試みが 1960 年代からなされ、近年ではほぼその方法が確立されて臨床材料にも応用されつつある<sup>4)5)</sup>。

しかし、各種細菌の *in vivo* あるいは *in vitro* での脂肪酸構成についての従来の研究は、ある一時点のみの GLC パターンを論じているものが多く、臨床検体を直接 GLC 分析したものと、検体から分離した菌を *in vitro* で培養したものの GLC 分析でそのパターンが大きく異なる<sup>6)</sup>のは、菌の増殖程度の違いが大きく関与している可能性が考えられる。従って、GLC を用いた脂肪酸分析を臨床材料に直接応用していくためには、その前段階として、各菌種の *in vitro* 培養中の菌代謝産物としての脂肪酸構成の変化を経時的に捉えておくことが必要である。

そこで著者は、臨床医が日常遭遇する機会の多い好気性菌 16 菌種について、各々 5 株を *in vitro* で培養し、菌液全体の脂肪酸構成を時間経過の中で GLC 分析したところ、結果として、各菌特有のほぼ安定した脂肪酸構成の経時的動態が得られ、また技術的にも VPI manual<sup>7)</sup> による抽出法を更に簡略化及び改善し得ることを確認し、かつ臨床材料への GLC 分析導入に関する若干の考察もなし得たので報告する。

## 材料および方法

### 1. 被検菌

実験には各菌種 5 株を用いることとし、以下に示す

Sequential Changes of Fatty Acid Profiles in Metabolites of Cultured Aerobes Assessed by Gas-Liquid Chromatography —A New Trial for Identification of Aerobes—  
Daijiro Shima, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

16 菌種 80 株について検索を行った。

1) *Staphylococcus aureus* (以下 *S. aureus* と略す) : 標準株 ATCC 25923 及び教室分離株 4 株

2) *Staphylococcus epidermidis* (以下 *S. epidermidis* と略す) : 標準株 ATCC 12228 及び教室分離株 4 株

3) *Streptococcus pyogenes* (以下 *S. pyogenes* と略す) : 標準株 ATCC 19615 及び教室分離株 4 株

4) *Streptococcus agalactiae* (以下 *S. agalactiae* と略す) : 教室分離株のみ 5 株

5) *Streptococcus pneumoniae* (以下 *S. pneumoniae* と略す) : 教室分離株のみ 5 株

6) *Escherichia coli* (以下 *E. coli* と略す), 標準株 ATCC 25922 及び教室分離株 4 株

7) *Salmonella typhimurium* (以下 *S. typhimurium* と略す) : 標準株 ATCC 14028 及び教室分離株 4 株

8) *Citrobacter freundii* (以下 *C. freundii* と略す) : 教室分離株のみ 5 株

9) *Klebsiella oxytoca* (以下 *K. oxytoca* と略す) : 教室分離株のみ 5 株

10) *Klebsiella pneumoniae* (以下 *K. pneumoniae* と略す) : 標準株 ATCC 13883 及び教室分離株 4 株

11) *Enterobacter cloacae* (以下 *E. cloacae* と略す) : 標準株 ATCC 23355 及び教室分離株 4 株

12) *Serratia marcescens* (以下 *S. marcescens* と略す) : 標準株 ATCC 8100 及び教室分離株 4 株

13) *Proteus vulgaris* (以下 *P. vulgaris* と略す) : 標準株 ATCC 13315 及び教室分離株 4 株

14) *Proteus mirabilis* (以下 *P. mirabilis* と略す) : 標準株 IFO 3849 及び教室分離株 4 株

15) *Pseudomonas aeruginosa* (以下 *P. aeruginosa* と略す) : 標準株 ATCC 27853 及び教室分離株 4 株

16) *Hemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae* と略す) : 教室分離株のみ 5 株

以上 16 菌種 80 株は全て、培養に先立ち、常法に従い再同定し、菌種を確認した。

## 2. 培養方法

### 1) 前培養

各菌とも、本培養に必要な菌数を確保するため、予め前培養を行った。*H. influenzae* には Brain Heart Infusion (BHI) (以下 BHI と略す) broth に綿羊脱

繊維を 5 ml 加えた Levinthal broth を、その他の菌には BHI broth を用い、各培地 5 ml に該当菌を 1 エーゼ分接種し、37 °C の恒温槽に 8 時間静置して前培養した。

### 2) 本培養

本培養には、約 100 ml の容量をもつ血液培養用 bottle を用いた。上記 bottle で、BHI broth 50 ml に Levinthal broth 5 ml を添加したもの、及び BHI broth 50 ml のみのものを予め滅菌準備した。1) で前培養した各菌液を生理食塩水にて希釈し、*H. influenzae* は前者、その他の菌は後者の bottle に、それぞれ生菌数が培地 1 ml 当たり数ヶとなる様に接種した。

菌を接種した culture bottle は全て、内外の通気性を保つため、シリコンゴム連続気泡スポンジプラグ (シンエツシリコセン® S-35) にて栓をし Gyrotory® Water Bath Shaker : Model G 76 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC.) を用いて、温度 37 °C、Speed 6 (約 100 回/分) にて振盪培養した。

### 3. 検体の採取

菌を接種した後は、培養開始前を 0 時間として、以後、10, 12, 14, 16, 18, 21, 24 時間の計 8 回にわたって、bottle より菌液の一部を採取し、4 ml を GLC 分析に供する為、即刻 -20 °C にて凍結保存して可及的速やかに分析を行うこととし、また少量は生菌数 (Colony Forming Units : 以下 CFU と略す) の測定に供した。

### 4. CFU の測定

培養菌液の一部をとり、生理食塩水にて 10 倍希釈系列をつくり、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  の希釈段階をそれぞれ 0.1 ml あて平板培地に播種し、37 °C で 18 時間培養後、flood plate 法にて CFU を算定した。CFU 測定用培地としては、*S. pyogenes*、*S. agalactiae*、及び *S. pneumoniae* にはハートインフュージョン寒天培地 (ニッサン) に綿羊脱繊維を 5 % 加えた血液寒天平板培地を、*H. influenzae* には BHI broth に細菌培地用寒天末 (和光純薬) 1.5 % 及び綿羊脱繊維 5 % を加えたチョコレート寒天平板培地を、*P. vulgaris* 及び *P. mirabilis* にはその遊走能を防ぐ目的で DHL 寒天 (ニッサン) 平板培地を、その他の菌には全て、BHI broth に細菌培地用寒天末 1.5 % を加えた BHI 寒天平板培地をそれぞれ用いた。

### 5. GLC 分析への検体の前処置 (図 1 参照)

#### 1) VFA 測定用検体の調製

菌液 2 ml に 50 % v/v の精密分析用硫酸 (和光純薬 : 以下硫酸とする) 0.5 ml を加えて pH 2.0 以下に調整

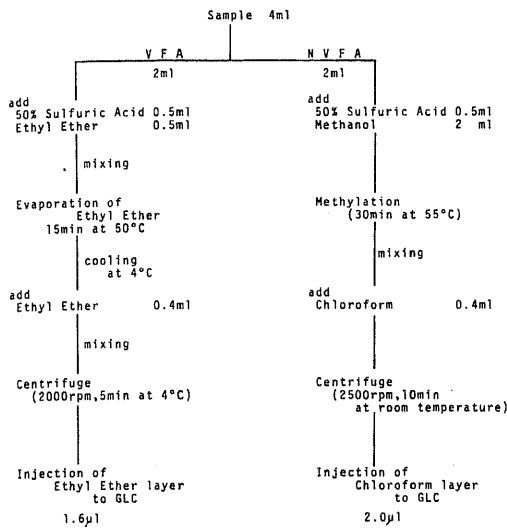


Fig. 1. Procedure for extraction of fatty acids.

Note: VFA means Volatile Fatty Acids.

NVFA means Non-Volatile Fatty Acids.

した後、特級エチルエーテル（和光純薬：以下エチルエーテルとする）0.5mlを加えて PARAFILM® (AMERICAN CAN COMPANY：以下パラフィルムとする)で密封し、強く振盪混和した。パラフィルムを開放して50℃のwater bath中に15分間静置して、一旦エチルエーテルを全部揮発させ、改めてパラフィルムで密封して、GLC分析を行うまで4℃にて保存した。VFAのGLC分析はこれより12時間以内に行った。GLC分析時、再びエチルエーテル0.4mlを加えて強く振盪混和し、エチルエーテルの揮発を最小に抑える為、パラフィルムで密封して、4℃、2000回/分で5分間、冷却遠心した。遠心後も氷水中に保存して、可及的速やかにエチルエーテル層の1.6µlを分析器に注入した。

## 2) NVFA 測定用検体の調製

菌液2mlに50% v/v 硫酸0.5mlを加えてpH 2.0以下に調整した後、クロマトグラフ用メタノール（和光純薬：以下メタノールとする）2mlを加えて混和後、55℃のwater bath中に30分間静置してNVFAをメチル化した。室温まで冷却後、クロマトグラフ用クロロホルム（和光純薬：以下クロロホルムとする）0.4mlを加え、パラフィルムで密封して強く振盪混和した後、室温、2500回/分で約10分間遠心して、クロロホルム層の2.0µlを分析器に注入した。

## 3) 標準脂肪酸の調製

VFAの標準脂肪酸液として、酢酸・プロピオン酸・

イソ酪酸・正酪酸・イソ吉草酸・正吉草酸・イソカブロン酸（以下全て和光純薬特級）及び正カブロン酸（和光純薬一級）の8種をそれぞれ0.2mg/ml H<sub>2</sub>O含む混合液を作り、その2mlについて、上記1)と同じ要領で抽出・GLC分析を行い、各脂肪酸同定のために保持時間(Retention time: 以下Rtと略す)のcontrolとした。

また、NVFAの標準脂肪酸液として、ピルビン酸・乳酸・オキサロ酢酸・シュウ酸・マロン酸・フマル酸・コハク酸（以上全て和光純薬特級）の7種をそれぞれ0.2mg/ml H<sub>2</sub>O含む混合液を作り、その2mlについて、上記2)と同じ要領で抽出・GLC分析を行い、各脂肪酸同定のためにRtのcontrolとした。

## 6. GLC 分析

GLC分析にはFlame Ionization Detector（以下FIDとする）を装備したGAS CHROMATOGRAPH GC-4CM PF (Shimadzu)を用い、またcolumnには、10% Reoplex 400 on 80~100 mesh Chromosorb W（和光純薬）を充填剤とする径2.6mm×長さ2000mmのpacked column (Shimadzu)を用いた。以上の操作条件は、Injection Temperature: 180℃, Column Temperature: 130℃, Carrier Gasは窒素（体積% 99.99%以上）: 60ml/min, FIDの条件は、水素（体積% 99.99%以上）: 0.6kg/cm<sup>2</sup>, Air: 1kg/cm<sup>2</sup>で、Sensitivity: 10<sup>2</sup> MΩ, Range: 8×10<sup>-2</sup>Vとした。

記録計は、HITACHI RECORDER QPD<sub>34</sub>を用いて、chart speedを10mm/minとし、記録紙は日立VD-10001-Aを使用した。

また、試料のchromatographへの注入には、テルモマイクロシリンジMS-10を用いた。

## 7. 分析結果の解析

### 1) 脂肪酸の同定

VFA, NVFAともに、予め標準脂肪酸によるクロマトグラムを作製しておき（図2）、試料のクロマトグラムでは、試料注入点より各peakの頂点までのRtの長さの比較により脂肪酸の同定を行った。標準脂肪酸とした15種以外のRtを持つpeakが出現した場合は、例えばVFAの場合にはV<sub>0.28</sub>, NVFAの場合にはN<sub>2.03</sub>などのように、VFAではイソ吉草酸の、NVFAではコハク酸のそれを1としたRtの比で表わすこととし、物質の化学的同定は行わなかった。

ただし、この分析法では、NVFAのピルビン酸とオキサロ酢酸がともに二つのpeakに分かれ、それぞれのpeakのRtが両酸で等しい為、乳酸の前に出るpeakをX、乳酸とシュウ酸との間に出るpeakをY

と名付けた。

## 2) 各脂肪酸の半定量

各脂肪酸とも、注入した脂肪酸量と peak の高さとは、記録紙の範囲内では正確に比例するので、各 peak の経時的な相対的量的変化を見るには、peak の高さの動きの観察のみで充分である。従って各 peak は、peak の頂点から base line に下ろした垂線の長さを計測して、mm の単位で表現した。また、peak が記録紙から振り切れた場合には、改めて適当な少量を注入したクロマトグラムを得て、他の既知の高さの peak との比、あるいは注入量の比よりその高さを求めた。

## 成 績

各菌種 5 株の各採取時における全 peak の平均値 ( $\bar{x}$ ) 及び標準偏差 ( $\sigma_{n-1}$ ) を求め、平均値の対数値が、24 時間 8 回の計測内において、途中での新しい出現あるいは消滅も含め、2 倍以上の動きを示した場合のみ、その酸は有意の動きを示したと見做した。各菌における有意の動きを示す脂肪酸の経時的変動及び生菌数 (CFU) の動きを表 2～17 に示した。また代表例として、*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *H. influenzae* の対数値で表わした脂肪酸及び CFU の経時的動態を示すグラフと 16 時間及び 24 時間におけるガスクロマトグラムを示した (図 3～6)。なお *H. influenzae* とその他の菌では、本培養に用いた培地の内容が若干異なったが、0 時間におけるその脂肪酸構成に全く差は無かった。(図及び表における脂肪酸名の表示は、表 1、及び方法の節の 7 の 1) で述べた略号による。)

1) *S. aureus* は約 16 時間で growth curve が Logarithmic phase から Stationary phase へと移行した (以下この時点を一 L-S 点と略す)。緩徐に増加を続けた酢酸は、L-S 点を少し越えると急激に減少した。また有意の動きを示す他の酸として、VFA でプロピオン酸・イソ酪酸・イソ吉草酸、NVFA でマロン酸・コハク酸及び  $N_{2.03}$  が大幅に増加し続けたほか、新しく出現した  $N_{0.76}$  も同様の動きを示した (表 2・図 3)。

2) *S. epidermidis* は菌の発育が遅く、24 時間であらうやく Logarithmic phase の終わりに達した。この段階までで動きを見せたのは、イソ酪酸・イソ吉草酸・コハク酸・ $N_{2.03}$  の 4 者であった (表 3)。

3) *S. pyogenes* も菌の発育は遅く、24 時間でも L-S 点に達しなかった。VFA に有意の動きを示すものではなく、NVFA で約 12 時間より、X と本菌特有の  $N_{0.66}$  が新しく出現して著増を示すのが特徴であった。

その他 Y 及びマロン酸の著増をみた (表 4・図 4)。

4) *S. agalactiae* は 16～18 時間に L-S 点があり、*S. pyogenes* よりも growth curve に沿って長期にわたり観察し得たにも拘わらず、*S. pyogenes* の特徴であった X や  $N_{0.66}$  の出現・増加を見ず、わずかマロン酸が有意の動きを示したに過ぎなかった (表 5)。

5) *S. pneumoniae* は 21～24 時間で L-S 点に達したが、特に有意の動きを示した脂肪酸は無かった (表 6)。

6) *E. coli* は以下のグラム陰性桿菌一般と同様に発育が早く、12～14 時間で L-S 点に達した。L-S 点を数時間越えると、それまで増加していた酢酸が急激に減少した (以後この酢酸特有の動きを“A 動態”と称する)。*S. pyogenes* と同様、NVFA に X が出現するが、L-S 点を越えると急激に消失し、しかも最高値でも *S. pyogenes* のその約 1/6 量に過ぎなかった。乳酸も L-S 点を越えると酢酸よりやや早く消失した。その他、シュウ酸は漸増するが、コハク酸は 12 時間付近で最高値に達するまで急増した後、L-S 点付近から急激に減少していくパターンを示した (以後このコハク酸特有の動きを“S 動態”と称する) (表 7・図 5)。

7) *S. typhimurium* は 16 時間前後で L-S 点に達した。酢酸は A 動態を示し、プロピオン酸も一度増加して 24 時間で突然消失した。乳酸は、*E. coli* の場合と同様に L-S 点を越えると急激に消失した。マロン酸及び 18 時間より新しく出現した  $N_{1.64}$  は漸増したが、コハク酸は特有の S 動態を示した (表 8)。

8) *C. freundii* は 18～21 時間で、L-S 点に達した。酢酸は A 動態を示した。プロピオン酸もほぼ同じ動きを示した。乳酸はこれにやや先立って突然消失した。しかし、L-S 点を越えると、新たに  $V_{4.31}$ ,  $N_{1.64}$ ,  $N_{4.24}$  の 3 種の脂肪酸が出現してそれぞれ増加した。このうち、 $V_{4.31}$ ,  $N_{4.24}$  の 2 者は、被検菌の中で本菌のみに見られたものである。シュウ酸・マロン酸は漸増したが、コハク酸は特有の S 動態を示した (表 9)。

9) *K. oxytoca* は 14～16 時間で L-S 点に達した。酢酸は典型的な動態を示した。乳酸はやはり酢酸に先立って消失した。シュウ酸は漸増し、コハク酸は典型的な S 動態を示した (表 10)。

10) *K. pneumoniae* は 16 時間前後で L-S 点に達した。酢酸は A 動態を示した。イソ吉草酸は漸増したが、コハク酸は典型的な S 動態を示した。また  $N_{2.03}$  もコハク酸にやや遅れて似た動きを示した。Logarithmic phase 早期より  $N_{0.76}$  が出現して漸増した (表 11)。

11) *E. cloacae* は16~18時間でL-S点に達した。酢酸はA動態を示し、イソ吉草酸は漸増した。コハク酸は典型的なS動態を示したが、 $N_{2.03}$ もやや遅れて似た動きを示した。その他、Logarithmic phase前半より $V_{0.28}$ ,  $N_{0.76}$ ,  $N_{1.64}$ の新しいpeakが出現して漸増した(表12)。

12) *S. marcescens* は16時間前後でL-S点に達した。約12時間より $V_{0.28}$ を出したのは*E. cloacae*と本菌のみであったが、本菌では前者のその約2倍量にも達した。またL-S点付近より $N_{1.64}$ も出現・増加した。その他、イソ酪酸とイソ吉草酸が増加を示し、コハク酸は典型的なS動態を示した(表13)。

13) *P. vulgaris* は発育が速く、14時間でL-S点に達した。酢酸は典型的なA動態を示し、乳酸はそれにやや先立って消失した。イソ酪酸・イソ吉草酸・ $N_{2.03}$ の他、途中から出現した $V_{3.44}$ ・ $N_{0.76}$ ・ $N_{3.40}$ は漸増した。コハク酸は典型的なS動態を示した。シュウ酸は12時間で1000mmを越える大きなpeakに達したが、以後激減し、このパターンは*P. mirabilis*と共通であってこの2者以外の菌では見られない特徴であった。その他、Yが14時間にpeakをもつ増減を示した(表14)。

14) *P. mirabilis* もやはり14~16時間でL-S点に達した。*P. vulgaris*と同様、動きを示す脂肪酸の数が多かった。Yに有意の動きの見られないこと以外は*P. vulgaris*と大差がなかった(表15)。

15) *P. aeruginosa* は16時間前後でL-S点に達した。酢酸はA動態を示さず、最初から減少するのみで、被検菌中本菌の特徴であった。乳酸はL-S点付近から急激に減少して消失した。コハク酸は10時間

で一旦減少して、しかる後漸増しており、これも他の被検菌には見られない特徴であった(表16)。

16) *H. influenzae* は16~18時間でL-S点に達し、この時点で乳酸は消失した。シュウ酸は漸増し、コハク酸は典型的なS動態を示した(表17・図6)。

## 考 察

### 1. 実験成績に関する考察

細菌が嫌氣的発酵を行う場合、脱水素作用により基質から得られた水素が有機化合物に渡され、乳酸・プロピオン酸・酪酸等の低級脂肪酸やアルコールなどの中間産物を形成したところで反応が終わる。しかし菌が好氣的な条件で発育する場合、つまり狭義の意味での呼吸を行う場合には、基質からの水素が最終的に酸素に渡される為、もとの基質は完全に $CO_2$ と $H_2O$ になる<sup>40)</sup>。従ってこの研究の方法による培養を行うと、それが充分な好氣的条件を提供している為、脂肪酸が経過的には増加しても、最終的には $CO_2$ 及び $H_2O$ となる為、大部分の脂肪酸が減少又は消滅することが予想できる。また実際に本法を用いて2~3の菌を36~48時間培養してGLC分析を行うと、脂肪酸がほとんど消失している事実を予備実験で確認した。そこで今回は、*H. influenzae*の培地のみ構成成分が若干異なるものの、その他の培養開始時条件を一定に設置し、培養

Table 1. List of abbreviated words

VFA	NVFA
A: Acetic Acid	L: Lactic Acid
P: Propionic Acid	O: Oxalic Acid
iB: iso-Butyric Acid	M: Malonic Acid
B: n-Butyric Acid	F: Fumaric Acid
iV: iso-Valeric Acid	S: Succinic Acid
V: n-Valeric Acid	
iC: iso-Caproic Acid	
C: n-Caproic Acid	

Note: VFA means Volatile Fatty Acids.  
NVFA means Non-Volatile Fatty Acids.

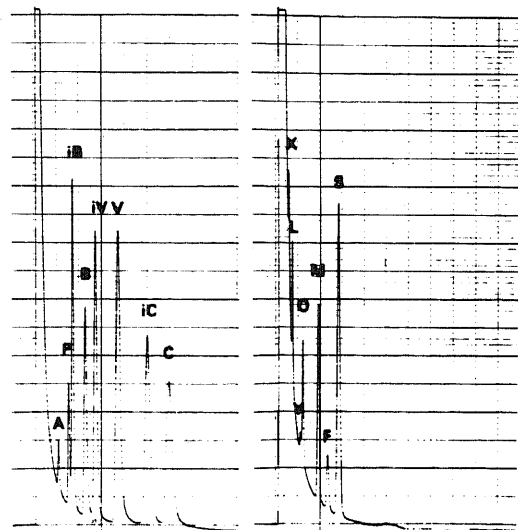


Fig. 2. GLC patterns of control fatty acids.

Sensitivity:  $10^2 M\Omega$

Range:  $8 \times 10^{-2} V$

Table 2. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. aureus*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	162±15	175±11	275±28	332±12	282±32	185±33	9.6±5.1
P	1.7±0.3	1.6±0.2	1.6±0.2	3.0±0.6	5.0±0.6	8.7±1.7	17.1±0.9	25.1±1.9
iB	2.2±0.3	2.4±0.9	2.1±0.4	2.0±0.6	10.5±3.9	46.2±20.7	167±76	234±52
iV	8.8±1.3	10.1±2.3	8.9±2.1	22.8±11.4	185±60	500±112	810±110	946±81
M	1.4±0.3	1.4±0.2	1.4±0.2	4.5±1.6	6.4±3.2	7.9±3.8	14.2±7.6	12.4±4.5
S	9.1±1.4	8.9±1.0	10.6±2.0	38.5±22.5	40.0±14.5	63.0±35.1	79.2±32.7	74.9±26.5
N <sub>0.76</sub>	—	1.3±0.3	1.4±0.2	2.0±0.4	4.3±1.2	9.0±2.2	18.6±3.2	32.5±7.1
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	2.5±0.5	2.7±0.6	3.8±1.4	18.7±10.4	80.4±37.2	147±47	198±50
Log of CFU		6.06±0.37	7.43±0.39	8.27±0.34	9.30±0.51	9.42±0.68	9.61±0.53	9.50±0.38

Table 3. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. epidermidis*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
iB	2.2±0.3	2.0±0	2.1±0.5	2.0±0.4	1.9±0.5	1.9±0.3	4.6±3.0	15.9±3.5
iV	8.8±1.3	7.6±0.5	8.4±1.8	9.0±0.7	9.1±2.4	20.0±10.4	106±49	198±52
S	9.1±1.4	7.0±0.7	7.4±1.6	8.4±0.3	9.1±1.4	19.6±11.3	57.1±22.6	97.6±22.9
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	2.3±0.3	2.5±0	2.6±0.3	2.4±0.6	3.3±0.7	7.9±3.5	31.3±4.6
Log of CFU		4.00	5.61±0.52	6.57±0.46	7.56±0.46	8.52±0.37	8.98±0.66	9.34±0.69

Table 4. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. pyogenes*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
X	—	—	16.0±0	10.4±3.1	44.6±25.7	134±55	210±60	264±64
Y	11.2±2.8	8.8±0.8	9.9±1.7	10.2±3.2	25.8±14.2	79.8±36.3	128±65	159±80
M	1.4±0.3	1.3±0.3	2.5±1.1	3.5±1.4	7.8±2.4	19.6±5.3	32.9±3.4	39.3±4.4
N <sub>0.60</sub>	1.4±0.2	1.0±0	1.3±0.4	1.1±0.3	3.2±1.5	10.8±3.7	22.0±4.9	27.1±5.7
Log of CFU		5.07±0.91	5.59±0.76	6.09±0.83	6.57±0.69	7.02±0.64	7.57±0.54	7.89±0.27

Table 5. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. agalactiae*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	18 hr	21 hr	21 hr	24 hr
M	1.4±0.3	2.5±1.7	2.6±0.7	8.4±5.2	15.4±6.7	18.5±7.4	15.1±5.7	16.0±6.0
Log of CFU		6.19±0.37	7.16±0.45	8.17±0.51	8.32±0.43	8.47±0.40	8.31±0.44	8.58±0.38

Table 6. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. pneumoniae*

0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
No significant changes of fatty acids							
Log of CFU	5.17±0.54	5.84±0.74	6.63±0.57	7.18±0.81	7.76±0.50	8.13±0.41	8.35±0.41

Table 7. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *E. coli*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	169±5	277±41	322±17	269±29	149±27	6.1±2.3	3.3±1.5
X	—	27.1±13.8	46.1±19.6	—	—	—	—	—
L	72.0±9.1	81.1±7.1	251±95	112±46	—	—	—	—
O	6.8±1.7	5.9±1.6	13.2±3.0	12.4±3.0	16.0±3.3	14.0±3.5	22.9±3.5	37.7±13.4
S	9.1±1.4	21.8±4.2	252±98	169±52	32.5±8.7	27.0±8.6	19.3±8.7	4.6±0.7
Log of CFU	7.46±0.59	8.93±0.57	8.94±0.39	9.31±0.34	9.24±0.17	9.33±0.23	9.29±0.16	

Table 8. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. typhimurium*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	146±7	168±9	259±27	340±11	292±48	233±39	136±18	4.6±2.3
P	1.7±0.3	1.7±0.5	1.9±0.4	4.4±1.7	9.4±3.7	14.8±3.9	14.8±6.3	—
L	72.0±9.1	78.2±8.3	209±79	191±45	98.6±33.9	60.3±23.0	—	—
M	1.4±0.3	1.0±0	1.6±0.8	4.1±2.1	5.8±2.7	7.9±3.6	10.3±5.3	14.9±7.0
S	9.1±1.4	19.8±13.5	262±49	274±98	38.3±22.5	9.4±8.1	5.0±2.6	4.0±2.5
N <sub>1.64</sub>	—	—	—	—	—	1.0±0	3.9±2.4	10.8±1.9
Log of CFU	7.06±0.41	8.41±0.43	8.80±0.24	9.39±0.34	9.51±0.20	9.60±0.24	9.63±0.09	

Table 9. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *C. freundii*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	184±11	265±36	362±61	357±25	282±33	89.0±26.0	4.4±2.7
P	1.7±0.3	3.3±2.1	4.4±2.5	6.6±4.0	8.7±3.7	20.6±10.0	31.0±15.0	1.6±1.3
V <sub>4.31</sub>	—	—	—	—	—	23.4±11.5	35.4±7.8	40.1±4.6
L	72.0±9.1	68.3±13.1	207±49	164±50	—	—	—	—
O	6.8±1.7	5.6±0.7	12.6±2.5	6.9±1.5	12.7±1.4	18.7±5.2	26.7±4.3	45.9±11.4
M	1.4±0.3	1.4±0.4	2.7±1.6	6.1±2.2	6.9±2.5	5.9±3.0	8.9±2.3	11.1±1.9
S	9.1±1.4	57.3±33.2	204±68	231±30	14.1±7.8	19.2±11.9	19.5±8.9	10.5±2.8
N <sub>1.64</sub>	—	—	—	—	—	2.0±0.4	6.7±3.9	13.7±8.5
N <sub>4.24</sub>	—	—	—	—	—	7.6±3.6	11.3±1.1	11.7±1.5
Log of CFU	6.98±0.43	8.03±0.54	8.70±0.46	9.22±0.45	9.49±0.33	9.69±0.14	9.40±0.32	



Table 10. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *K. oxytoca*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	144±6	188±12	309±25	323±19	278±23	105±51	3.8±1.8
L	72.0±9.1	72.0±4.1	105±17	176±37	102±35	20.5±15.4	8.8±1.1	—
O	6.8±1.7	5.2±0.6	7.6±1.5	7.4±1.6	9.4±2.7	10.2±2.1	12.1±4.2	39.4±17.5
S	9.1±1.4	8.8±0.5	29.8±6.7	90.2±12.3	22.1±10.8	20.5±9.9	31.1±11.2	13.8±8.9
Log of CFU		6.64±0.10	8.18±0.29	8.77±0.56	8.96±0.74	9.39±0.11	9.52±0.11	9.58±0.07

Table 11. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *K. pneumoniae*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	147±10	206±27	306±30	294±32	231±25	70.4±32.1	7.2±5.0
iV	8.8±1.3	11.3±19.9	11.0±1.2	12.9±2.1	14.3±2.2	23.5±7.7	51.2±16.4	96.4±35.5
S	9.1±1.4	12.2±4.6	40.0±20.1	108±31	45.0±20.6	26.5±12.8	26.8±13.3	27.4±18.6
N <sub>0.76</sub>	—	1.3±0.5	1.9±0.6	5.1±2.1	6.8±4.1	10.6±5.9	21.2±12.9	35.0±14.9
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	5.1±2.6	6.9±2.2	19.2±15.6	51.7±33.0	92.5±63.5	5.0±2.6	2.0±0.5
Log of CFU		6.96±0.27	8.11±0.32	8.61±0.29	9.23±0.25	9.38±0.18	9.57±0.15	9.50±0.18

Table 12. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *E. cloacae*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	172±9	250±48	285±17	257±34	191±44	139±43	9.9±7.0
iV	8.8±1.3	8.5±1.1	9.9±1.3	9.8±0.9	14.3±2.2	17.6±5.8	42.8±27.6	90.0±24.2
V <sub>0.28</sub>	—	—	9.3±0.9	9.9±3.0	8.5±2.7	8.0±1.0	11.6±3.7	18.0±9.3
S	9.1±1.4	19.0±5.2	66.9±32.3	106±21	47.3±34.3	38.9±9.8	38.0±11.8	30.4±9.9
N <sub>0.76</sub>	—	2.5±1.4	3.8±2.5	6.9±1.4	7.3±1.3	12.1±3.2	17.0±5.3	36.6±6.5
N <sub>1.64</sub>	—	—	—	2.4±1.1	7.8±3.3	17.1±4.2	27.6±3.3	37.8±3.7
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	2.9±0.6	2.1±0.5	8.6±8.0	28.0±13.9	77.3±16.2	67.0±3.7	3.0±0.6
Log of CFU		7.33±0.32	8.37±0.23	8.83±0.23	9.11±0.28	9.47±0.26	9.76±0.10	9.67±0.13

Table 13. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *S. marcescens*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
iB	2.2±0.3	2.2±0.5	2.3±0.6	4.0±1.3	9.3±2.6	12.8±2.3	20.4±3.1	27.6±6.5
iV	8.8±1.3	8.5±2.2	9.4±2.5	14.5±5.7	30.1±11.8	43.7±13.5	58.8±19.6	75.6±16.9
V <sub>0.28</sub>	—	—	21.8±12.3	20.0±9.2	27.0±5.1	28.8±6.5	29.8±8.4	34.2±2.7
S	9.1±1.4	42.1±17.4	216±75	175±25	21.5±6.7	28.1±6.9	43.3±11.6	46.1±17.7
N <sub>1.64</sub>	—	—	—	—	2.2±1.1	10.2±4.5	23.0±8.8	41.4±5.7
Log of CFU		7.42±0.51	8.65±0.64	9.08±0.54	9.44±0.27	9.76±0.21	9.76±0.44	9.79±0.34

Table 14. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *P. vulgaris*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	146±13	161±29	243±70	324±28	334±22	207±56	4.7±1.2
iB	2.2±0.3	1.5±0	1.8±0.3	3.3±0.8	25.2±2.8	33.0±4.4	54.7±16.5	67.2±19.7
iV	8.8±1.3	8.3±0.6	11.2±1.0	19.5±2.5	76.2±13.6	102±2.8	157±27	220±5.9
V <sub>3.44</sub>	—	—	—	3.2±0.6	56.8±6.5	61.3±14.2	57.7±16.8	53.5±12.3
L	72.0±9.1	65.8±5.0	71.0±10.6	117±26	27.2±7.3	9.5±3.1	—	—
Y	11.2±2.8	13.3±3.1	59.2±12.4	159±33	71.8±8.9	39.3±8.4	13.3±1.8	10.7±5.8
O	6.8±1.7	130±19	1470±92	1088±35	54.5±11.8	43.8±6.1	38.5±3.0	25.7±5.5
S	9.1±1.4	8.3±0.8	126±11	40.5±8.7	14.0±1.3	20.3±6.8	22.0±2.2	26.3±4.3
N <sub>0.76</sub>	—	1.8±0.3	12.7±1.5	9.5±2.3	8.8±3.1	27.2±5.2	54.7±9.0	71.5±9.3
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	3.2±0.8	8.8±4.1	12.2±2.0	132±13	160±21	178±29	191±29
N <sub>3.40</sub>	—	—	—	2.2±0.8	40.8±10.1	43.3±8.1	47.2±11.3	48.7±15.1
Log of CFU		5.39±0.95	7.94±0.44	8.76±0.75	9.17±0.16	9.21±0.08	9.31±0.06	9.64±0.18

Table 15. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *P. miradilis*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	171±24	291±44	333±18	301±64	207±57	5.8±2.9	1.8±0.9
iB	2.2±0.3	1.8±0.3	5.3±2.5	14.5±8.2	26.9±12.0	42.3±15.2	66.6±18.7	81.6±23.6
iV	8.8±1.3	9.9±2.2	22.3±12.3	46.6±23.2	95.3±32.0	194±40	304±49	417±128
V <sub>3.44</sub>	—	—	13.0±5.8	33.9±13.1	33.9±10.0	46.6±9.2	44.5±11.1	39.6±7.2
L	72.0±9.1	77.4±6.2	140±43	69.3±46.5	23.3±20.2	13.8±5.3	—	—
O	6.8±1.7	1071±33	209±117	34.3±6.0	9.5±2.3	8.0±1.6	14.6±12.0	28.6±28.9
S	9.1±1.4	45.9±4.2	102±26	112±63	17.1±7.4	19.1±7.4	21.1±5.0	19.9±4.0
N <sub>0.76</sub>	—	19.5±6.5	6.0±2.6	5.6±3.0	19.4±4.9	32.6±5.5	48.3±12.7	63.6±16.3
N <sub>2.03</sub>	2.7±0.8	5.4±1.1	13.6±12.3	67.5±35.7	104±53	131±58	175±56	220±30
N <sub>3.40</sub>	—	—	13.6±6.0	29.3±13.6	31.5±17.0	38.3±9.5	39.9±9.5	38.4±7.7
Log of CFU		7.41±0.56	8.49±0.35	9.35±0.21	9.53±0.06	9.77±0.09	9.56±0.25	9.82±0.16

Table 16. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *P. aeruginosa*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
A	149±7	114±4	99.0±10.9	60.8±20.1	34.9±7.9	23.9±9.3	3.3±1.4	2.4±0.4
L	72.0±9.1	67.1±4.1	56.1±8.5	37.8±12.3	4.0±1.7	—	—	—
S	9.1±1.4	1.9±0.2	3.6±1.1	5.6±0.6	10.1±1.6	13.1±3.9	15.5±2.9	14.9±2.7
Log of CFU		6.24±0.60	7.30±0.53	8.25±0.40	9.24±0.51	9.38±0.18	9.53±0.31	9.73±0.22

Table 17. Sequential changes of fatty acid profiles in cultured *H. influenzae*

	0 hr	10 hr	12 hr	14 hr	16 hr	18 hr	21 hr	24 hr
L	72.0±9.1	65.8±12.7	63.8±7.9	30.7±16.9	6.3±3.2	—	—	—
O	6.8±1.7	5.5±0.5	5.4±0.8	6.2±0.8	8.3±0.8	19.0±8.9	32.6±10.3	34.3±10.1
S	9.1±1.4	7.9±0.2	8.1±0.9	12.9±4.1	80.1±77.8	80.0±60.1	22.9±13.5	6.5±4.4
Log of CFU		5.47±0.44	6.85±0.56	7.92±0.53	8.82±0.49	9.09±0.24	8.82±0.23	8.71±0.37

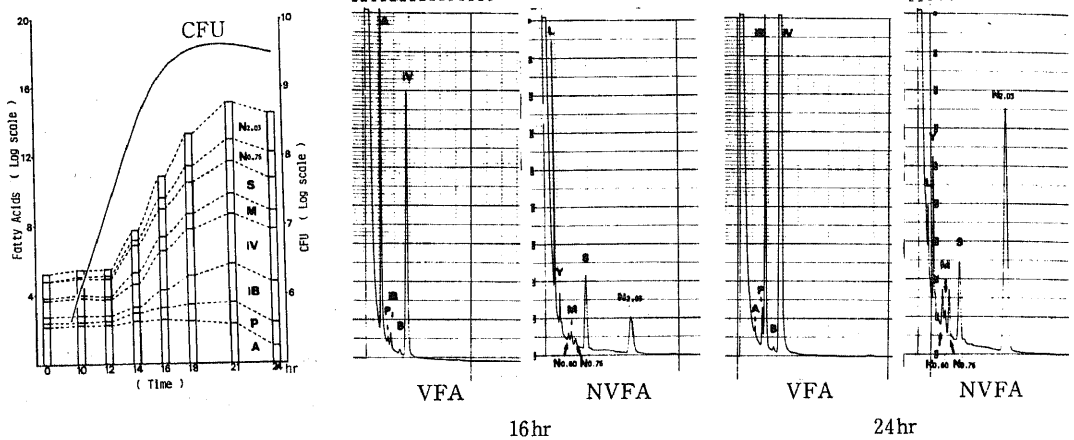


Fig. 3. Changes of CFU and fatty acids which showed significant alterations during 24 hr culture (left), and GLC patterns at 16 hr and 24 hr (right) in *S. aureus*.

Sensitivity:  $10^2 M\Omega$   
 Range :  $8 \times 10^{-2} V$

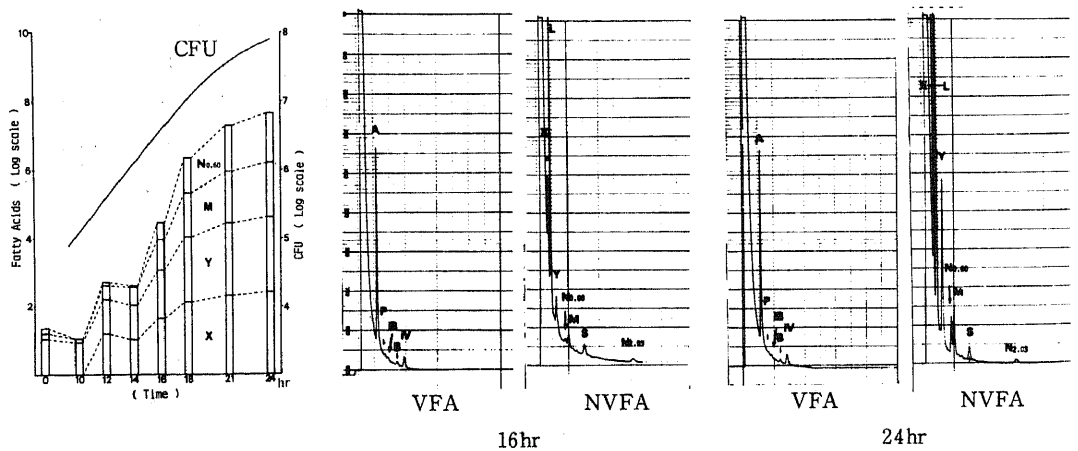


Fig. 4. Changes of CFU and fatty acids which showed significant alterations during 24 hr culture (left), and GLC patterns at 16 hr and 24 hr (right) in *S. pyogenes*.

Sensitivity:  $10^2 M\Omega$   
 Range :  $8 \times 10^{-2} V$

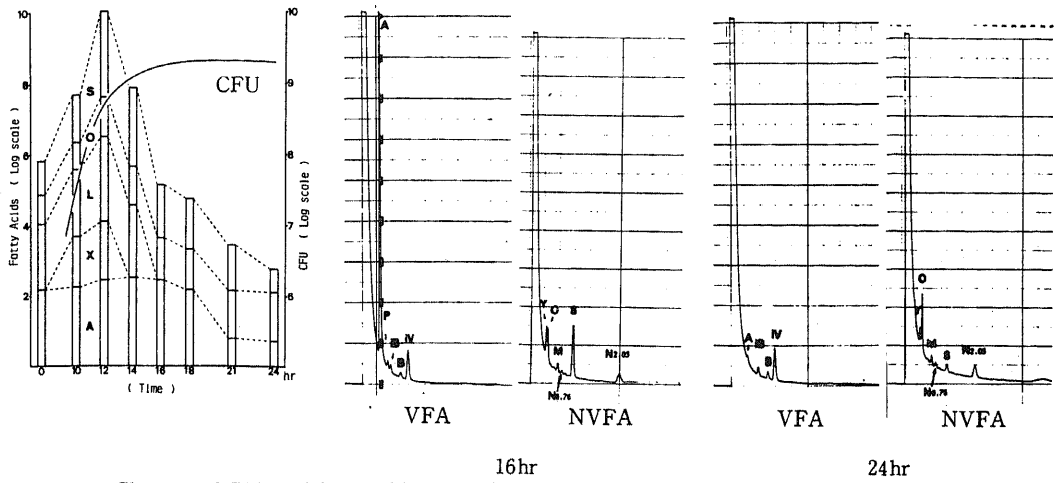


Fig. 5. Changes of CFU and fatty acids which showed significant alterations during 24 hr culture (left), and GLC patterns at 16 hr and 24 hr (right) in *E. coli*.

Sensitivity:  $10^2 M\Omega$   
Range :  $8 \times 10^{-2} V$

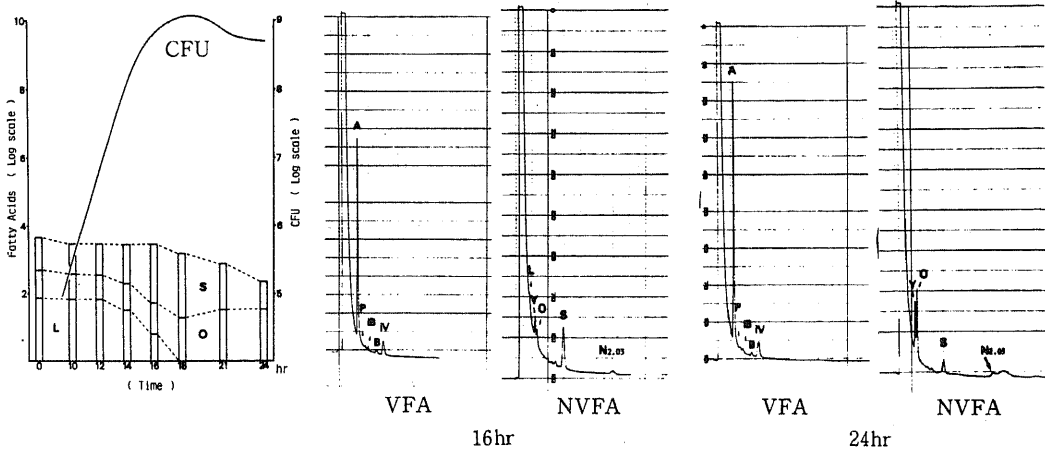


Fig. 6. Changes of CFU and fatty acids which showed significant alterations during 24 hr culture (left), and GLC patterns at 16 hr and 24 hr (right) in *H. influenzae*.

Sensitivity:  $10^2 M\Omega$   
Range :  $8 \times 10^{-2} V$

0時間～24時間の範囲のみでその菌液の脂肪酸構成をGLC分析し、各菌に特異的な動態が得られるかどうかを検討した。

被検菌16菌種を24時間にわたり本法で培養中、その菌液のGLC分析で有意の動きを見せたのは、VFA7種、NVFA12種、計19種の脂肪酸であった。各菌種とも5株について実験し、5株間での各peak値の標準偏差( $\sigma_{n-1}$ )は充分に小さいので、各脂肪酸の動きに関する値には充分な信頼性があり、かつ、菌未接種のまま同方法を行ったnegative cultureの実験では、24

時間を経てもGLCパターンに全く変化が見られないことより、各脂肪酸の動きは全て細菌の増殖及び代謝に関連して起こったものと考えられる。

有意の動きを示した脂肪酸の中には、*C. freundii*の場合の $V_{4.31}$ や $N_{4.24}$ 、あるいは*S. pyogenes*の場合には $N_{0.88}$ の様に、ある特定菌種のmarkerとなり得るものもあるが、多くの酸は複数の菌において複数個が動きを見せている為、その全容は複雑である。そこで、各菌種と有意の動きを示す脂肪酸との組み合わせをまとめると表18のようになる。しかしそれでも脂肪酸

の動きの組み合わせから菌の同定に至るには若干の煩雑さを伴う。この為、最近繁用されるようになった簡易同定法の手法にならって前述した(表18)の脂肪酸を左から順に3個1組の6 groupに分ける。ただしここで、V<sub>4.31</sub>及びN<sub>4.24</sub>は共に*C. freundii*のみに見られるので、1個としてNVFAの最後に置いた。各groupは左から順に4.2.1, 4.2.1, ...と配点して、有意の動きを示した酸にはその点数を与え、各group毎に点数を合計して6つの数を並べ、できあがった6桁の数をその菌のコード番号とする。このようにしておけば、動きを見せた脂肪酸の組み合わせからコード番号を介して菌の同定を容易に行うことができる(表19)。

1970年前後より、嫌気性菌の同定にGLCが導入され始めて以来、その代謝産物のGLCパターンを利用しての*in vitro*培養での嫌気性菌の同定<sup>41)</sup>や、臨床材料を直接分析して嫌気性菌感染症の迅速診断に至る方法<sup>9)</sup>など、GLCは主として嫌気性菌の分野で活用されてきた。前にも触れた如く、嫌気性菌の終末代謝産物の多くは低級脂肪酸の類であり、その検出にGLCが優

れた力を発揮する点を考えると、この事実は極く当然のことと言えよう。

しかし、好気性菌にGLCが応用される機会は少ない様で、わずかに*Pseudomonas*属のspeciesの同定に用いる試みを報告した文献<sup>21,23)</sup>が散見される程度である。その理由の1つは、ほとんどの好気性菌は、従来からの方法による同定が必ずしも困難ではないことにあるが、もう1つ、前述の如くその終末代謝産物が主にCO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>Oになる為に、一定以上の長時間にわたって培養を行うと、却って脂肪酸が少なくなってしまう、GLCの威力を発揮する場が全く無くなるということも大きな理由である。渡辺ら<sup>6)</sup>は、*Streptococcus* speciesが単独分離された膿汁を直接GLC分析したパターンと、菌を分離して48時間培地中で増菌したものとのGLCパターンが異なることを指摘している。これは菌の発育環境や、一緒に分析にかかる膿中物質の違いを反映している事も一因であるが、著者の実験から明らかな様に、増菌培養した時間の長さによってGLCパターンが大きく変化することが最大の原因と考えられる。殊に4日間の長時間にわたり増菌培養すれば、

Table 18. Specified fatty acids in metabolites of cultured aerobes  
(○ indicates fatty acids which showed significant alterations during 24 hr culture.)

	A	P	iB	IV	V <sub>0.28</sub>	V <sub>3.44</sub>	V <sub>4.31</sub>	X	L	Y	O	M	S	N <sub>0.60</sub>	N <sub>0.76</sub>	N <sub>1.64</sub>	N <sub>2.03</sub>	N <sub>3.40</sub>	N <sub>4.24</sub>	
<i>S. aureus</i>	○	○	○	○								○	○	○		○				
<i>S. epidermidis</i>			○	○									○					○		
<i>S. pyogenes</i>								○		○			○							
<i>S. agalactiae</i>												○								
<i>S. pneumoniae</i>																				
<i>E. coli</i>	○							○	○		○		○							
<i>S. typhimurium</i>	○	○								○		○	○						○	
<i>C. freundii</i>	○	○					○		○		○	○	○						○	○
<i>K. oxytoca</i>	○									○		○								
<i>K. pneumoniae</i>	○			○									○		○		○			
<i>E. cloacae</i>	○			○	○								○		○	○	○			
<i>S. marcescens</i>			○	○	○								○			○				
<i>P. vulgaris</i>	○		○	○		○			○	○	○		○		○			○	○	
<i>P. mirabilis</i>	○		○	○		○			○		○		○		○			○	○	
<i>P. aeruginosa</i>	○								○				○							
<i>H. influenzae</i>									○		○		○							



見られる為、数時間内での迅速同定は困難である。これは将来、検出器として FID よりも感度の高い Electron Capture Detector (ECD) などの導入によって更に細かい代謝産物の観察を行うことで解決に導かれる可能性がある。

従来の、主に嫌気性菌に関しての GLC を用いた研究では、蓄積して検出される脂肪酸としては、VFA が主体であり、NVFA では乳酸・コハク酸の 2 種がわずかに注目されている程度である<sup>5,6,10,11</sup>。しかし、今回の著者の成績では、有意の酸としては、VFA よりもむしろ NVFA が有用であり、しかも乳酸・コハク酸は多数の菌に共通である為、実際に菌鑑別に役立つのはむしろ上記 2 者以外の NVFA である。これは、1 時点における酸の絶対量ではなく、時間経過の中で大きな動きを示す酸を中心に見たことが原因の 1 つと考えられる。

## 2. 実験方法について

VPI manual による抽出<sup>7)</sup>をして今回と同様に GLC 分析を行うと、NVFA のうちピルビン酸とオキサロ酢酸とがそれぞれ 2 つの peak に分かれ、両者ともに 2 つの酸において Rt が同じであるため区別が出来ない。今回の実験では、多くの検体を扱うことを前提として、少しでも手技を簡略化する目的で、VPI manual の抽出法を一部改変したが、上記 2 者以外の酸では各酸 1 peak をなし、結果も原法に劣る点はなかった。しかし、上記 2 者がそれぞれ 2 峰化することに変わりではなく、原因を求めたが得られなかった。従って、2 つの peak, X 及び Y は、ピルビン酸とオキサロ酢酸の濃度分布が複雑に絡み合ったものと考えて良い。今後この点の解決が必要である。

更に、VPI manual に従ってエチルエーテルで VFA を抽出する場合、例えば E. coli 等で菌数が非常に多くなった時には、エチルエーテル層がゼリー状となり、マイクロシリンジでの吸引が不能となる。このエチルエーテル層でゼリー状をなす物質は不明だが、方法の項でも示した通り、一度エチルエーテル層を揮発させる操作により、分析に影響を与える程度の VFA 損失もなく GLC 分析を行えることが判明した。

また、今回標準脂肪酸として用いた 15 種以外の peak については、菌種同定には大きな支障をきたさない為、特に化学的同定を行っていないが、今後これらを同定していくことが、細菌代謝の解明上にも必要であろう。

最後に、今回の成績の実用化への布石として、sampling 回数の問題点がある。今回は 24 時間に 8 回の sampling を行ったが、これを更に細かく検討したものを通して、check point とする時間を決め、

sampling 回数を減らす方向に持って行けば、sampling → 抽出 → GLC 分析の自動化と結びつけて、好気性菌同定の省力化が期待できる。

## 結 論

好気性菌の終末代謝産物は主として CO<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O になるので、好気性菌の一時点のみでの代謝産物で菌を同定することは困難である。そこで本実験では、好気性菌 16 菌種を 24 時間培養して、その代謝産物としての脂肪酸の経時的変動を観察した。

### その結果

1) *S. pneumoniae* を除く全ての菌において、それぞれいくつかの脂肪酸が有意の経時的変動を示した。これら脂肪酸のパターンの変化が好気性菌同定上重要である。*S. pneumoniae* では、24 時間の培養中に有意の動きを示す脂肪酸がみられなかった。

2) *S. pyogenes* では N<sub>0.50</sub>, *C. freundii* では V<sub>4.31</sub> 及び N<sub>4.24</sub>, また *P. vulgaris* あるいは *P. mirabilis* では V<sub>3.44</sub> 及び N<sub>3.40</sub> なる脂肪酸が marker となり得る。

3) 上記 2) 以外の好気性菌では marker となる脂肪酸は見られなかった。しかし、脂肪酸構成の変化をスコア化することにより、各好気性菌の同定が比較的容易となる。

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜った谷口昂教授、研究技術面で絶大な御指導を賜った西田尚紀教授に深く感謝の意を表します。また GLC の理論、手技の面で懇切なる御助言をいただいた佐藤保助教授に深く感謝致します。更に、本研究に際して多大な御指導と御協力をいただいた小児科西田直巳助手に深謝致しますとともに、細菌培養において長時間の労力を厭わず御協力いただいた小児科細菌研究グループの諸先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Mitruka, B. M., Jonas, A. M. & Alexander, M. : Rapid Detection of Bacteremia in Mice by Gas Chromatography. *Infect. Immun.* 2 : 474 - 478 (1970).
- 2) Wade, T. J. & Mandle, R. J. : New Gas Chromatographic Characterization Procedure : Preliminary Studies on Some *Pseudomonas* Species. *Appl. Microbiol.*, 27, 303 - 311 (1974).
- 3) Moss, C. W. & Samuels, S. B. : Short-Chain Acids of *Pseudomonas* Species Encountered in Clinical Specimens. *Appl. Microbiol.* 27 : 570 - 575 (1974).

- 4) Brooks, J. B., Moss, C. W. & Dowell, V. R. : Differentiation Between *Clostridium sordellii* and *Clostridium bifermentans* by Gas Chromatography. J. Bacteriol. 100 : 528 - 531 (1969).
- 5) Gorbach, S. L., Mayhew, J. W., Bartlett, J. G., Thadepalli, H. & Onderdonk, A. B. : Rapid Diagnosis of Anaerobic Infections by Direct Gas-Liquid Chromatography of Clinical Specimens. J. Clin. Invest. 57 : 485 - 495 (1976).
- 6) 渡辺邦友・上野一恵・沢村治樹・沢赫代・川出真坂・甲畑俊郎・江崎孝行・二宮敬宇・鈴木祥一郎 : 感染症診断へのガスクロマトグラフィーの応用 1) 臨床材料中に微量存在する細菌由来の低級脂肪酸の分析. 第9回嫌気性菌感染症研究会講演記録, 28 - 32 頁, エーザイ株式会社
- 7) Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C. : Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., 1 - 152, Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061, 1977.
- 8) 林江澤・上條清明・榊原榮一 : 入門微生物学, 上巻, 47 - 76 頁, 東京, 南江堂 1976.
- 9) Jetetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A. : Review of Medical Microbiology, 13th ed. Lange Medical Publications, California, 1976.
- 10) 牛嶋彊・谷悦子・上野一恵・鈴木祥一郎 : 嫌気性菌の分類同定のための揮発性脂肪酸(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)のガスクロマトグラフィーによる分析法, 医学と生物学, 86, 161-166, 1973.
- 11) 中山一誠・秋枝洋三・田島華陽・川口広・坂尾啓子・西本章子・石山俊次 : Gas Chromatography と Chromato-Pack 併用による嫌気性菌脂肪酸の半定量化. 第10回嫌気性菌感染症研究会講演記録, 14 - 17 頁, エーザイ株式会社



**Sequential Changes of Fatty Acid Profiles in Metabolites of Cultured Aerobes Assessed by Gas-Liquid Chromatography. — A New Trial for Identification of Aerobes —** Daijiro Shima, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — J. Jusen Med. Soc., **90**, 101–116 (1981).

**Key words:** GLC VFA NVFA Aerobes.

#### Abstract

Since the main end products of aerobes are CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O, it is difficult to identify aerobes with their metabolites at one selected time. In the present study, the sequential changes of fatty acid profiles in metabolites of cultured 16 aerobes were successively determined by gas-liquid chromatography from 0 to 24 hrs. after the inoculation.

The following results were obtained;

1. In all aerobes examined, except for *S. pneumoniae*, some fatty acids significantly changed with the passage of time and the changing patterns of these fatty acids were important for identification of aerobes. *S. pneumoniae* showed no significant change in fatty acid profiles during the culture
2. Some aerobes had several marker fatty acids; for example, No.60 (designated in the text) for *S. pyogenes*, V4.31 & N4.24 for *C. freundii*, and V3.44 & N3.40 for *P. vulgaris* or *P. mirabilis*.
3. The other aerobes had no characteristic marker of fatty acids. But, introduction of scoring system for evaluating changing patterns of fatty acid concentrations permitted a relatively simple identification for each species of aerobes.