

赤痢菌族の「ヒスタミン」産生能に関する実験的研究

第Ⅲ報 培養条件の研究

金沢医科大学小児科学教室(主任 泉仙助教授)

吉 田 清 三

(昭和46年10月1日受付)

本論文要旨は昭和24年5月第52回日本小児科学会総会及び同年10月十全医学会第3回集会上において発表した。猶本研究の費用の一部は昭和24年度文部省科学研究費によるものである。

私は第Ⅰ及びⅡ報において、赤痢菌の「ヒ」産生に及ぼす培養液中の成分の影響を「ヒ」産生原及び「ヒ」産生促進物質の二つに分けて報告した。然し乍ら斯る物質が存在するのみでは赤痢菌は「ヒ」を産生しない事は、阪大前田³⁷⁾の実験成績に徴しても明な所である。即ち「ヒ」産生には猶種々の条件を必要とするのであって、本報においてはその中培養条件の主要なものについて報告する。

実験方法

概ね第Ⅰ報所載に準じたが、猶一部において異なるはその都度記述する。

実験成績及び考按

1. 培養液の水素イオン濃度

周知の如く、細菌の発育代謝は培地のpHと重大な関係を有し、豊田⁸⁹⁾に拠れば赤痢菌の発育範囲は概ねpH 5~9、菌の発育に好適なpHは6.3~7.6~8.0であり、これら範囲以外では赤痢菌は発育増殖しないか、死滅するとしている。従って「ヒ」産生もまた培地のpHに左右されるものである事は容易に想像し得る所である。

今0.1%「ヒチ」0.2% 葡萄糖加肝浸出肝ブイオン培地の起始pHを8, 7.3, 6, 5とし、大野及び大原菌を39°C半嫌気培養して、その「ヒ」産生度を日を追って検索した。而して培養中のpHの修正に当っては、後述の理由により、起始pH 6以上のものは6前後に、pH 5のもののみ5に修正した。

その「ヒ」産生成績及びpHの変化は表1及び2の如くである。

即ち表1大野菌培養成績をみるに、先ず起始pHの影響の最も大きい培養2日目の成績では、起始pH 7.3の場合が最も「ヒ」産生量が多くて170mg/l、次いでpH 6の150mg/l、pH 5の90mg/l、pH 8の80mg/lの順となっている。即ち中性に近い弱酸性である事が「ヒ」産生に好適であるようである。而して2日間培養における菌の発育状況を寒天平板培養で検してみるに、起始pH 7.3及び8における場合が最もよく、起始pH 6ではやや劣り、pH 5が最も劣っている。従って菌の発育状況と「ヒ」産生度との関係を考察すれば、起始pH 7.3では菌の発育もよく「ヒ」産生も良好であるのは蓋し当然であるが、同じく菌の発育良好なpH 8の場合よりも、菌の発育がそれよりも不良ではあるが初期より酸性メヂウムにある起始pH 5の培地の「ヒ」量がややまさっている事は、単に菌の発育のみで「ヒ」産生が決定されるものでない事を物語るものと考えられる。

而して培養2日目における培地のpHは表1(b)に示す如く、起始pH 5の場合に4になっている以外は、pH 7.3が4.5、6が5.0、8が5.7となっており、各培地のpHの変化は略々「ヒ」産生量に比例して酸性となって居る。

次いで培養2日目に培養基番号(1)、(2)、(3)はpH 6に修正し、(4)は起始pHと同様に5に修正した結果、培養3日目成績ではpH 5修正以外は菌の発育良好なのに比し、pH 5では菌の発育悪く、従って「ヒ」産生好適性「メヂウム」にあるにも拘らず「ヒ」量は減少している。反之他の3者は夫々「ヒ」の増加を来し、表示の如き成績を得て居る。然し4日目にはこれらもpHは修正値より「アルカリ側に傾

Experimental Studies on the Histamine Producing Activity of Bac. Dysenteriae. [Ⅲ] Cultivating Conditions. **kiyozo Yoshida**, Department of Pediatrics, (Director: Prof. S. Izumi), Kanazawa Medical College.

き、「ヒ」量も減少し始めて居る。

以上の如く大野菌培養においては、培養基の起始 pH 7.3 乃至 6, 即ち中性乃至は中性に近い弱アルカリ」或は弱酸性である事が、「ヒ」産生培地として好適である。

大原菌培養の場合においても、表 2 に示す如く、大野菌の場合と同様の成績を得て居る。

文献に拠れば、Hanke & Koessler⁸⁾ 等は大腸菌族を以って「ヒチ」の分解を検せる際に、培養液が酸性の時に「ヒ」の形成されるのを認め、細菌が培養液の酸性になる事を防ぐ為、即ち中和の目的で「アミン」の形成をみるものであると称した。また Raske¹³⁾ は大腸菌の「アミン」産生は「メヂウム」が酸性の時のみおこるとした。更に Gale¹⁶⁾ は大腸菌の脱炭酸酵素の実験において、これが「メヂウム」の pH と深い関係を有し、「ヒチ」に対しては pH 4.0 の時においてその作用最も旺盛なりと報じている。これに反して Berthelot & Bertrand²⁾, Mellanby & Twort³⁾ 及び Jones⁶⁷⁾ 等は「アルカリ性メヂウム」でのみ「ヒ」を産生する細菌について記載している。また平井一門²¹⁾は大腸菌、腸球菌その他による「アミン」形成の実験において、概ね培地が酸性なる事を認めているが、細菌によっては「アミン」形成はみるにも拘らずその pH の変化をあまりみず、寧ろ中性に近い場合

があるのを認め、培養液の酸性転化と「アミン」産生とは常に必ずしも平行するものとは限らず、寧ろ両者は別個のものと云わざるべからずとしている。

赤痢菌においては、Eggerth¹⁵⁾ は「ヒ」産生好適 pH は 5.0~5.3 前後として居り、私の成績 5.0~5.5 前後で「ヒ量」最大である点とよく一致するものである。而してこれを Gale¹⁶⁾ の Decarboxylase の好適 pH 4.0 に比する時、やや趣を異にするが、細菌性酵素のみを以てする実験と、細菌の増殖する培養基内における「ヒ」産生実験とは、その間自ら差異あるものと思うべきであろう。従って培養基内の生菌による「ヒ」産生には、菌の繁殖が先ず必要であり、且つまた酸性メヂウム内にある事も必要であって、表 1 及び 2 の実験成績はこれを実証するものと考えてる。

更にこれに関連して培養基 pH の修正について考察を加えたい。培養基内に赤痢菌を培養しておけば速に培地が酸性となる事は、表 1 及び 表 2 (b) に示す如くであるが、これをその儘放置しておく時は、菌の死滅を来す事は当然である。従ってその培養液 pH を適当に修正して、菌の増殖を図り、且つ「ヒ」産生の増量を計らねばならない。斯る為には pH を幾何に修正すべからず自ら一問題をなす。

和田²⁶⁾によれば、pH 6.6 に修正すれば「ヒ」産生量は最大であり、次いで 6.2, 7.0, 5.8, 7.4 の順に劣

表 1 大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす培養液起始水素イオン」濃度の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

培養番号	培養基起始 pH	培養日数		
		2	3	4
(1)	8	80	100	70
(2)	7.3	170	250	100
(3)	6	150	200	100
(4)	5	90	70	50

(b) 同上培養液 pH の変化

培養番号	培養基起始 pH	培養日数		
		2	3	4
(1)	8	5.7→6.0	4.5→6.0	6.0
(2)	7.3	4.5→6.0	4.7→6.0	6.5
(3)	6	5.0→6.0	5.5→6.2	6.3
(4)	5	4.0→5.0	4.5→5.0	4.8

るとしており、これを要約すれば6前後の弱酸性が好適である。館³¹⁾もまた pH 6.5~6.8 前後に調節して大量の「ヒ」を得て居る。これに反して Eggerth¹⁵⁾は、前述の如く5.0~5.3に修正し、而も菌培養10時間後48時間迄は6~8時間毎に、以後は1日1乃至2回

の割に修正を行っている。

私は表1の実験に準じて、0.1%「ヒチ」0.2%葡萄糖加肝浸出間「ブイオン」(pH 7.3)に大野菌を培養し、培養2日目より pH を 7.3, 6, 5~5.2に修正して、その産生「ヒ」量の消長を検討した。その成績は

表2 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす培養液起始水素イオン濃度の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

培養番号 培養基	培養基 起始pH	培養日数		
		2	3	4
1	8	50	60	30
2	7.3	70	100	50
3	6	50	80	50
4	5	70	50	40

(b) 同上培養液 pH の変化

培養番号 培養基	培養基 起始pH	培養日数		
		2	3	4
1	8	5.8→6.0	5.5→6.0	6.2
2	7.3	5.6→6.0	5.2→6.0	6.8
3	6	5.3→6.0	5.5→6.0	6.3
4	5	4.2→5.0	4.8→5.0	5.5

表3 大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす培養液水素イオン濃度正修の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

培養番号 培養基	pH 修正値	培養日数			
		2	3	4	5
(5)	7.3	170	200	200	170
(2)	6.0	170	250	100	100
(6)	5	170	200	150	90

(b) 同上培養液 pH の変化

培養番号 培養基	培養日数	培養日数				
		0	2	3	4	5
(5)	7.3	7.3	4.5~7.3	5.2→7.4	6.3→7.3	7.3
(2)	7.3	7.3	4.5→6.0	4.7→6.0	6.5→6.0	6.7
(6)	7.3	7.3	4.5→5.0	4.8→5.2	5.2→5.2	5.6

「ヒ」産生にはあまり酸素を必要としないようである。

しからば「ヒ」産生には全く酸素を必要としないかどうか、斯る点を究明すべく、次の第2実験を行った。

即ち表5に示す如く、大原菌を用いて、第4号は好気培養、第5号は半嫌気培養、第6号は大原菌接種後培養液表面に流動パラフィン」を重層して嫌気培養を、夫々39°Cで行い、第2日以後毎日「ヒ」産生量を検し、且つpHを5.5前後に修正した。

その成績は表5に示す如く、第1実験同様好気培養による「ヒ」産生量は甚だ少ないが、嫌気培養でもまた「ヒ」産生量は不良であり、封蠟による半嫌気培養の「ヒ」産生量が最大であった。而して寒天平板培養によって細菌の増殖の消長をみるに、好氣的と半嫌氣的では不良であった。これよりみれば細菌の発育上酸素を全然欠く訳にはいかぬが、「ヒ」産生の為には寧ろ欠乏状態である事が望ましい。

以上2実験より、赤痢菌の「ヒ」産生には、細菌の発育を許す限度において酸素欠乏である事が必要であり、従って半嫌気性培養法が最適であると考え。これに照応して甚だ興味深いのはHoltz u. Heise⁹⁴⁾等の実験である。即ち彼等は家兎、海狸等の肝臓或は腎臓を「ヒチ」に作用せしめる時「ヒ」が形成されるとし、その際「ヒ」形成は酸素欠乏状態においてのみ起り、窒素ガス」中の如き無酸素状態が最適であるとしている。また前節において述べた如く、産生「ヒ」

の減量が一部Histaminaseの作用によるものとすれば、Bestは該酵素作用において酸素の消費される事をみて居り、またHenry等は種々の事実から本酵素作用は酸化的「アミノ基脱作用ならずやとしている事等と併せ考えて、酸素の充分な好気培養よりも、酸素に乏しい半嫌気培養において産生「ヒ」の減少が少く、従って「ヒ」総量の大きさを来すものに非ずやとも推察するものである。然しこれが解明には猶今後の研究に待つべきであろう。

3. 培養温度

Gale¹⁰⁾は大腸菌の酵素による「アミノ酸のDecarboxierung」の実験において、その「メヂウム」の温度は30°Cを以て好適として居る。またEggerth¹⁵⁾は種々の細菌についての「ヒ」産生試験において、全試験菌株において37°C以上では「ヒ」産生が抑制され、また大部分の場合では26°C以下では不適当なりとし、赤痢菌株4株では31~26°Cが適当なりとして居る。

これを按ずるに、前者は単に細菌性酵素のみを問題として居り、従って細菌の発育をも考慮すべき私の実験の場合と趣を異にすべく、且つまた前後両者共好氣的培養による成績であって、私の半嫌氣的培養とは自ら事情が異なるものというべきであろう。今「ヒ」産生に及ぼす培養温度の影響を、培養方式と関連して些か検討を加えてみたい。

先ず肝ブイオン」寒天平板に前培養した大野菌を、

表5 好気、半嫌気、嫌氣的培養による大原菌の「ヒ」産生度の相違

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

培養番号	培養方式	培養日数		
		2	3	4
第4号	好 気 的	50	50	40
第5号	半 嫌 氣 的 (封蠟)	70	100	40
第6号	嫌氣的 (流動パラフィン) 重層	50	40	30

(b) 同上培養液 pH の変化

培養番号	培日養数				
	0	1	2	3	4
第4号	7.3	5.5	5.4	5.8	6.5
第5号	7.3		5.6	5.2→5.6	6.0
第6号	7.3	5.1→5.5	5.4	5.5	5.7

0.1%「ヒチ」0.2%葡萄糖卵黄「アスパラギン」培地 (Egg-yolk-histidine-asparagin-glucose-medium) に次の如く培養して, その「ヒ」産生量を検した。

即ち第1実験 封蠟半嫌気培養

培養温度

A 39°C

B 29°C

第2実験 好気培養 (但し Eggerth 氏に倣い, 培養48時間迄は8時間毎に pH 5.3 に修正)

培養温度

A' 39°C

B' 29°C

その成績は表6に示す通りである。

即ち半嫌気培養を行った第1実験では, 29°Cの低温よりも39°Cの高温培養の方が「ヒ」産生速度も速く, 且つその量も多い。これに反して好気培養においては, 高温よりも低温の方が「ヒ」産生量が大きい。即ち酸素の少い時は高温がよく, 多い場合には寧ろ低温の方が「ヒ」産生には好都合である。

次に大原菌を用いて下記の如き実験を行った。

使用培養基

pH : 7.3

組成

卵黄浸出液 300cc

1-Histidin · HCl (武田) 0.3g
 Ha₂HPO₄ · 12H₂O 0.9g
 KCl 0.3g
 MgSO₄ 0.05g
 「アスパラギン」 1g
 「グルタミン酸ソーダ」(味の素) 0.12g
 「ニコチン酸」 10⁻⁴Mol
 「パラアミノ安息香酸」 10⁻⁴Mol
 葡萄糖 0.6g

培養方法

第3実験 流動パラフィン重層嫌気培養

培養温度

C 39°C

D 36°C

第4実験 封蠟半嫌気培養

培養温度

C' 39°C

D' 36°C

E' 30°C

第5実験 好気培養

培養温度

C'' 39°C

D'' 36°C

E'' 30°C

表6 大野菌の「ヒ」産生に及ぼす培養温度の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

実験区分	培養番号	培養時間		32時間	48時間	3日	4日
		培養温度	培養温度				
第1実験	半嫌気培養	A	39°C		130	200	150
		B	29°C		90	170	150
第2実験	好気培養	A'	39°C	30	50	30	
		B'	29°C	70	80	50	

(b) 同上培養液 pH の変化

培養番号	培養時間	0時間	8時間	16時間	24時間	32時間	40時間	48時間	3日	4日
		A	7.3							5.4
B	7.3							5.3	5.3	5.3
A'	7.3	5.4	4.5→5.3	5.3	5.3	5.2	5.1→5.3	5.2		
B'	7.3	5.5	4.7→5.3	5.1→5.3	5.0→5.3	5.3	5.5	5.3		

猶 pH 修正は 5.5 前後にした。

その成績は表 7 の如くである。

即ち 嫌気培養を行った 第 3 実験においては、39°C 及び 36°C 培養ではその「ヒ」産生量には殆ど差異がなく、強いていえば低温の方が僅に多かった。第 4 実験たる半嫌気培養では高温の方が低温よりも「ヒ」産生量が多く、且つその産生速度も速いようである。第 5 実験好気培養では 30°C 培養の「ヒ」産生量最も多く、それよりも高温の 36°C、39°C 培養ではこれに劣り、且つ両者間では差異が認められなかった。

以上第 1 より第 5 実験迄の成績よりすれば、私が行っている半嫌気培養では、低温よりも寧ろ高温の 37~39°C 培養の方が「ヒ」産生量が多い。これに反して好気培養では高温よりも低温、即ち 39°C よりも 34°C 前後が有利であって、従って本培養条件下では前記

Eggerth¹⁵⁾ の説も妥当なりと考うべきであろう。

然し乍ら斯る関係は如何にして生ずるものであるかについては、今日迄論及した者を見ず、従って遽に論断し得ぬ所であるが、今些かこれに関する私見を述べたい。

「アミノ酸から「アミン」が形成される機構に関しては、Aberhalden, Guggenheim 等の仮説⁴⁸⁾⁵⁴⁾があるが、今日未だ決定的なものはない。然し乍らその形成過程において酵素が関与する事は一般に認められて居る所であり、「ヒチ」より「ヒ」を形成する Histidin-decarboxylase については、Werle⁹⁵⁾⁹⁶⁾その他により報告されて居る。

従って細菌の「アミン」形成においても、先ず斯る酵素が適応的に産生されるものである事は想像し得る所であり、既に述べた如く Gale¹⁶⁾ は大腸菌の De-

表 7 大原菌の「ヒ」産生に及ぼす培養温度の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

実験区分	培養番号	培養日数		2	3	4
		培養番号	培養温度			
第 3 実験	嫌気培養	C	93°C	50	40	30
		D	36°C	60	50	40
第 4 実験	半嫌気培養	C'	39°C	70	100	40
		D'	36°C	40	80	70
		E'	30°C	30	50	50
第 5 実験	好気培養	C''	39°C	50	50	40
		D''	36°C	50	50	40
		E''	30°C	70	80	60

(b) 同上培養液 pH の変化

培養日数 培養番号	0	1	2	3	4
C	7.3	5.1→5.5	5.4	5.5	5.7
D	7.3	5.3→5.5	5.4	5.6	5.8
C'	7.3		5.6	5.2→5.6	6.0
D'	7.3		5.5	5.5	5.7
E'	7.3		5.7	5.5	5.7
C''	7.3	5.5	5.4	5.8	6.5
D''	7.3	5.4	5.7	6.0	6.5
E''	7.3	5.6	5.3	5.5	5.7

carboxylase について種々実験研究を行っている。斯く考察し来れば、赤痢菌の場合においても同様酵素作用によるとするも大過はないであろう。

一方「ヒ」破壊酵素 Histaminase も存在し、諸氏の報告⁹⁰⁾⁻⁹³⁾によれば、本酵素作用時酸素が消費され、至適 pH 7-8, 至適温度 37°C とされて居る。赤痢菌の「ヒ」産生経過中に本酵素が関与するや否やについては確言し得ぬが、第 1 及び 2 節に述べた如く、これを考えしむる事実が多い。即ち赤痢菌はその代謝機構の一環として、Decarboxylase 産生により「ヒ」を形成し、更に Histaminase 産生により「ヒ」を分解するものと考えられる。

而して酵素作用による反応の速度は一般に化学反応と同様に温度の上昇と共に増加し、至適温度以上では却って減少し、遂には酵素作用は止むに至る。

以上より考えれば、赤痢菌の「ヒ」産生量の大ききを期するには、先ず赤痢菌が発育し得、且つ Decarboxylase の作用し得る限り温度が高く、一方 Histaminase の作用を出来得る限り少くすべきである。従って第 2 節で述べた如く、「ヒ」分解の少いと考えられる半嫌気培養では低温よりも高温が有利であり、「ヒ」分解に好適なりと考えられる好気培養では寧ろ低温培養の方が「ヒ」の分解が少く、従って見掛上の「ヒ」産生量が多くなるものと考えられる。

4. ウエルシー氏菌との混合培養

ウエルシー氏菌³²⁾⁹⁷⁾⁹⁸⁾ (以下「ウ」氏菌と略記す) は 1891 及び 1892 年 Achalame 及び Welch 等によって記載されて以来、諸氏の報告相次いで発表され、就中その存在に関しては佐々木は人糞中に 100% に証明し、「ウ」氏菌は大腸菌と共に腸内常住菌ならんとしている。一方その病原学的意義についても報告多く、本菌の毒素として易熱、非透析性にして抗原性を有する真性毒と、耐熱、透析性で抗原性の無い急毒性の 2 種が挙げられている⁹⁹⁾。而してその急性毒は「ヒ」なる事が決定され¹⁸⁾、爾来「ウ」氏菌の「ヒ」産生に関する業績は尠くなく¹⁰⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾²³⁾²⁴⁾²⁶⁾、当教室松田³²⁾も本菌培養濾液中の海鼠腸管収縮物質の約半分は「ヒ」であると報告している。従って疫痢症状発現に当り、腸内常住菌たる「ウ」氏菌が関与するやもしれない事は想像し得る所であるが、吾教室高橋¹⁰¹⁾等は疫痢症状患児並びに対照小児糞便より「ウ」氏菌を分離し、各菌株につき細菌学的諸性状を検し、そのみを以てしては菌株と臨牀症状との間に特殊の関係を認めなかったと報告している。また松田によれば、疫痢症状患児糞便とその他疾患児及び健康小児糞便より分離した「ウ」氏菌の「ヒ」産生能に関しても、特殊差異を認めない。

私は疫痢症状発現に対する「ウ」氏菌の「ヒ」産生

表 8 大原、大野菌の「ヒ」産生に及ぼすウエルシー氏菌の影響

実験区分		「ヒ」産生量 (mg/ℓ)			
		培養日数 接種菌	2	3	4
半嫌気培養	第 1 実験	大原菌	60	80	50
		「ウ」氏菌 (勝井株)	150	190	170
		「ウ」氏菌 + 大原菌	300	400	350
	第 2 実験	大野菌	120	230	150
		「ウ」氏菌 (勝井株)	150	190	170
		「ウ」氏菌 + 大野菌	450	350	300
好気培養	第 3 実験	大原菌	5	50	30
		「ウ」氏菌 (勝井株)	50	100	70
		「ウ」氏菌 + 大原菌	100	200	150
	第 4 実験	大野菌	30	70	30
		「ウ」氏菌 (勝井株)	50	100	70
		「ウ」氏菌 + 大野菌	250	250	200

能の意義について些か究明すべく、次の実験を行った。

培養基は 0.1%「ヒチ」0.2% 葡萄糖加牛肝浸出肝ブイオン」(pH 7.3) 20c.c. を用い、「ウ」氏菌は松田氏が健康小児より分離した勝井株をツアイスラー氏培養基に 37°C 24時間嫌気培養して用いた。

第1実験は

- a) 大原菌 1白金耳
- b) 「ウ」氏菌 1白金耳
- c) 大原菌 「ウ」氏菌各1白金耳宛

を各培養基に接種し、37°C 半嫌気培養して、日を迫ってその「ヒ」産生量を検した。

その成績は表8に示す如くで、各単独培養に比し、混合培養の方が「ヒ」産生量大であり、しかも各単独培養時の「ヒ」産生量の和を遙に凌駕するものである。

第2実験は赤痢菌として大野菌を用いたのであるが第1実験同様混合培養の方が遙に成績がよく、2日培養で 450 mg/l にも達している。

更に培養基を封蝋せざる好気培養法によって上記実験を行ってみた。即ち第3、第4実験であるが、第8表に示す如く、大原、大野菌共「ウ」氏菌との混合培

養の方が「ヒ」産生量大である。然し乍ら半嫌気培養と好気培養との「ヒ」産生量を夫々比較するに、一様に半嫌気培養の「ヒ」量が多い事は第2節の成績を裏書きするものである。

前述の如く「ウ」氏菌の示す腸管収縮値の 50% が「ヒ」であるに過ぎず、且つ混合培養時赤痢菌と「ウ」氏菌の内いずれの「ヒ」産生能が増大するものであるかは決定し得ぬ所であるが、以上の実験成績より両者の混合培養はその「ヒ」産生量を著しく増大するものであると考えるべきであろう。而して斯る事実を惹起する所以は、主として赤痢菌及び「ウ」氏菌の発育時における酸素需要の関係が、その共生に好適なる為によるものと考えられる。

5. 接種菌量と産生「ヒ」量の時間的消長との関係
先に第II報「ヒ」産生促進物質の研究において、「アミノ酸その他の赤痢菌発育促進物質」の存在が「ヒ」産生を促進する事を述べ、本菌の「ヒ」産生には先ず菌の充分なる発育が必要である事を報告した。

本節においては、斯る事実を別の方面から実証すべく、基本培養基に接種する菌量を種々の量に変えて、その「ヒ」産生の消長を検討した。即ち基本培養基として 0.1%「ヒチ」0.2% 葡萄糖加肝浸出肝ブイヨ

表9 接種菌量と「ヒ」産量との関係

(a) 「ヒ」産生量 (mg/ℓ)

培養基号	菌量 (per 20cc)	培養時間						
		24時間	30時間	48時間	3日	4日	7日	14日
(a)	0.005mg			20	40	50	150	50
(b)	0.2 mg			50	100	100	200	100
(c)	2 mg			180	250	100		
(d)	10 mg	100	120	250	150	100		
(e)	20 mg	200	250	130	100			

(b) 同上培養液 pH の変化

培養基号	培養時間	pH の変化							
		0	24時間	30時間	48時間	3日	4日	7日	14日
(a)	7.3				5.2→6.0	5.0	5.3	5.8	6.5
(b)	7.3				5.0→6.0	5.3	5.3	6.0	7.0
(c)	7.3				4.8→6.0	5.3	5.5		
(d)	7.3	4.5	4.7		4.8→6.0	5.2	5.6		
(e)	7.3	4.3	4.5		4.8→6.0	5.5	5.8		

ン) 20c.c. (pH 7.3) に, 表9の如く大腸菌を, (a) 0.005mg, (b) 0.2mg, (c) 2mg, (d) 10mg, (e) 20mg 接種して観察した。

その成績は表9に示す如くであるが, 一般に接種菌量を多くした方が「ヒ」産生が速い, 即ち (e) 20mg 接種では培養24時間目に既に 200 mg/l, 30時間目に 250 mg/l に達し, 以後は急激に減少している。これに反し (b) 0.2mg 接種では漸く7日目に 200 mg/l に, (a) 0.005 mg 接種では7日目に 150 mg/l にしか達せず, 以後減少している。

これより考えれば, 大野菌の「ヒ」産生は菌量と密接な関係を有するものであって, 接種菌量を多くし, 且つ培養条件を考慮した場合には, 培養短時間にして大量の「ヒ」を得る事が出来る。従って本成績は, 第II報所説の赤痢菌の「ヒ」産生には先ず菌の発育が必要である事と表裏一体をなすものである。

総 括

生体腸管内における, 赤痢菌の「ヒ」産生機転を考えるに, 決して単一なる条件の下で行われるものではなく, 多岐多様な事は推察に難くない。従って試験管内実験にあっても, これが考慮を要する事は蓋し当然であって, 斯る考慮を払わない時は, 「ヒ」の産生をみないか或は甚だ少量を得るのみである。今生体腸管内の状態を考慮しつつ, 「ヒ」産生好適培養条件について検討した成績を総括すれば次の如くである。

先ず培養液の起始 pH について検討すべく, pH 8, 7.3, 6 及び5として, 大野, 大原両菌を培養するに, 両菌共 pH7.3 の場合が「ヒ」産生量も多く, 次いで 6, 8, 5 の順に劣った。即ち起始 pH は中性或は中性に近い弱アルカリ」及び弱酸性が好適である。これを菌の発育状況と併せ考える時, 菌の発育の良好な培地が「ヒ」産生良好で, 従来より「ヒ」産生に好適とされる酸性培地では菌の発育が悪く, 従って「ヒ」の産生も少かった。

猶培養中の pH 修正値は 7.3, 6, 5 として検討を加えたが, 6 の場合が最も優れて居た。

細菌の培養法として, 好気, 半嫌気及び嫌気培養の三つが考えられるが, 斯る培養法の相違によって細菌代謝産物に相違が生ずる事は想像に難くない所であって, 赤痢菌の「ヒ」産生実験においても当然考慮するべき点である。従来諸報告では, 殆ど好気培養を以って試験を行って居るが, 独り吾教室では半嫌気培養によって居る。これ偏に, 生体腸管内の状態を考える時, 好気といわんより寧ろ半嫌気の状態である為で, 従って疫癘発生病理明上半嫌気培養を可とした訳で

ある。

今この3培養法による「ヒ」産生量を大原, 大野菌について検討してみると, 半嫌気培養が最も優れ, 酸素の流通の多い好気培養及び細菌の発育の不良の嫌気培養はこれに劣った。斯る相違の生じた所以は, 細菌の発育の不良の場合「ヒ」産生量の少いのは第II報実験成績に徴して自ら明であり, また好気では酸素流入により産生「ヒ」が破壊し易い為と考えられる。

更に進んで, 「ヒ」産生に好適な培養温度について検討したが, 培養方式と不可分の関係にある事を知った。即ち大野, 大原両菌を好気, 半嫌氣的に, 39°C, 36°C, 30 或は 29°C に培養して「ヒ」量を測定した所, 好気培養では高温よりも低温の30°C前後が「ヒ」量大となり, Eggerth の説に一致した。これに反して半嫌気培養では, 高温の39°Cの方が有利であった。嫌気培養では「ヒ」量は少く, 両者の優劣はなかった。

翻って生体腸管内の温度を考えてみるに, 37°C 以上であり, 炎症時には更に高く 40°C 前後あるものと思われ, 而も前述の如く半嫌気状態であるから, まことに「ヒ」産生に好適の状態にあり, 容易に大量の「ヒ」を産生するものと考えられる。

生体腸管内には多種多様の細菌が存在する事は周知の事実であるが, 就中殆ど常住菌とみなされて居る「ウ」氏菌が「ヒ」を産生する事は, 疾に認められている。疫癘症状発生機転上, 斯る「ヒ」産生嫌気性菌が如何なる役割をなすかは, 甚だ興味ある所である。今基本培地に大原, 大野両菌を夫々「ウ」氏菌と等量に混合培養して, 各単独菌培養の「ヒ」産生量と比較するに, 半嫌気培養及び好気培養共, 前者の「ヒ」量が多く, 且つ単独培養の「ヒ」量の和よりも大であった。赤痢菌及び「ウ」氏菌のいずれの「ヒ」産生が主として助長されたものかは明になし得ぬが, 両者の共生は「ヒ」産生に好適であり, 助長される。これは主として両菌種の酸素需要関係が, 共生に好都合の為によるものと思われる。猶半嫌気培養と好気培養と比較するに, 単独及び混合共, 前者の「ヒ」量が大きい。従って半嫌気状態にある小腸管内において, 赤痢菌が「ヒ」産生をなすとき, 「ウ」氏菌が存在すれば, 産生「ヒ」量は一層大となり, 容易に疫癘症状を起し得る事となるであろう。

従来赤痢菌の「ヒ」産生試験では, Eggerth¹⁵⁾の実験以外は「ヒ」産生迄に概ね7~14日を要し, 時には1カ月の長きを要して居る。従って斯る試験成績を以ってしては, 潜伏期間24~48時間, 時には数時間にして重篤な疫癘症状を惹起する機構をよく説明する事

が出来ず、疫痢「ヒ」中毒説の一弱点とされて居た。然し乍ら接種菌量を大量にして、その他の条件を考慮すれば、短時間にして大量の「ヒ」を得る事を知った。即ち大野菌を、0.1%「ヒチ」0.2%葡萄糖加肝浸出肝ブイオン」20 c.c. に 0.005mg, 0.2mg, 2mg, 10mg, 20mg と夫々接種して、39°C 半嫌気培養を行い「ヒ」産生量の消長を検討するに、0.005 mg 接種では48時間に漸く 20 mg/1, 7日にして始めて 150 mg/1 に達するに反し、20 mg 接種では24時間で既に 200mg/1, 30時間培養では 250 mg/1 に達し、以後漸次減量して居る。その中間の菌量接種群においても、同様の傾向が認められる。斯る事實は、第II報において述べた所の赤痢菌の増殖が「ヒ」産生量増大の一要約である事実と相俟って、泉教授の学説を裏書きするものである。即ち、若し小腸内へ一時に大量の赤痢菌が侵入するか、或は急激に増殖し得る様な状態では、短時間にして大量の「ヒ」が産生され、吸収されて疫痢症状を起し得るのである。

結 論

大原、大野菌を使用し、赤痢菌の「ヒ」産生に好適な培養条件を検討し、次の如き成績を得た。

1) 培養液の起始 pH は、中性乃至は中性に近い弱「アルカリ」或いは弱酸性が好適である。また培養中 pH の修正値が6の場合、「ヒ」量は最大となり、次いで 7.3, 5 の順に劣る。

2) 培養方式としては、半嫌気培養が最も優れ、好気及び嫌気培養の場合の「ヒ」産生量はこれに劣る。

3) 「ヒ」産生好適温度は培養方式と関係が深く、半嫌気培養では 87~39°C の高温がよく、好気培養では 30°C 前後の低温が好適である。

4) 「ウ」氏菌と混合培養する時は、各菌単独培養時よりも、「ヒ」産生量増大する。

5) 「ヒ」産生の速度は接種菌量に比例する。

拙筆するに当たり、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を辱うし、御校間の労を賜つた恩師泉教授に万腔の謝意を表します。

文献 第IV報にのせる。