

## ジフテリア菌の生存機構補遺

金沢大学医学部細菌学教室(主任: 西田尚紀教授)

寺 本 友 一

(昭和38年5月6日受付)

前報で<sup>1)</sup>著者はジフテリア菌の作る「oval granule」が細胞化学的には vegetative phase の細胞と著しく異なり、生存実験の上ではこの菌の生存にあずかる形であろうと述べ、且つ生化学的には metabolic dormancy をいとなむものと推定し細菌の spore 構造と似たものであることを暗示した。この「oval granule」の存続に関して前報で述べた時は培養直後から形成まで(すでに早期に完成するが)と更にその後1カ月目(培養直後より)までの詳しい過程についてふれなかつたので、本報ではこの点について述べたい。

## 実験材料及び方法

使用菌株: 前報<sup>1)</sup>に述べた13株の内 RT-2 株及び上田株を主として使用した。

顆粒体の定義: 前報に同じ。

顆粒体形成率: Gram 染色で、塗抹菌の個々のよく分離した部分を選んで、ocular counter の区画内の総菌数に対する club-shape 及び「oval granule」を数えた。総菌数は1回大体20視野1000個の菌を数え、3回の平均を出した。

固形培養基表面の pH の測定: 東洋濾紙 pH 試験紙(B.T.B, C.R, T.B)をこまかく切りこれを screw capped bottle に入れてぬれないようにして 115°C, 10分高圧滅菌した。これを菌が生えた培養基の表面(菌苔の上)に当てその色調により pH を測定した。滅菌試験紙は普通の試験紙と比べてその反応力において差のないことをあらかじめ確かめておいた。

培地: 前報に使用した培地を主として使用したが、中には後に詳述する特殊培地を使用した場合もあった。

## 実験成績

実験 I. 糖及び Fe イオンと顆粒体形成の関係

Löffler 培地に加えるブイオンに糖として1% Maltose, 1% Glucose, 0.5% Glucose を加え、また1%

Glucose を加えたものに FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液(血清を加えた最終濃度が 50 $\gamma$ /ml Fe<sup>++</sup> となるように FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を加えたもの)を加えたものを作り、計4種の培地を 37°C に保存して1カ月間、日を追って顆粒体の形成率を観察した。その結果は Maltose は Glucose より劣り、また Glucose では1%より0.5%方が形成やや良好であつた。Fe イオンはやや阻害的に働くように思われた。しかし以上4つの条件は顆粒体形成に著名な影響を与えないように思われた。

実験 II. 培地の pH の変動と顆粒体形成の関係

Löffler 培地と条件を同じくするため0.25%に Glucose を入れた Pope 消化寒天培地<sup>2)</sup>並びに chocolate 寒天培地を作り、Löffler 培地における顆粒体形成率と比較した。37°C に保存し1カ月間、日を追って菌の生えた培養基表面の pH を測定した。菌株は5株を使用した。

一般に初めの pH より Glucose の分解により一時的に pH が低下して、その後上昇するのが常であつた。

Pope 消化寒天培地(初めの pH 6.6)は pH の上昇が急速で、その1カ月間の変動範囲はほぼ pH 6.3~9.4 に及び、強アルカリ性となり全く顆粒体を形成しない。

Löffler 培地(初めの pH 6.8)は Pope 消化寒天培地より pH の上昇がゆるやかであり、その1カ月間の変動範囲は pH 6.5~7.8 に及び、やはりアルカリ性が強く、一度は糖分解のため pH は下降するが後早く pH が上昇した。その顆粒体形成時の pH は最低 6.7, 最高 7.5 であつた。

これに比し chocolate 寒天培地(初めの pH 6.6)は pH も安定し、その1カ月間の pH の変動範囲は pH 6.2~6.6 で、その顆粒体形成時の pH は最低 6.3, 最高 6.6 であつた。なお初めの pH 6.2 の chocolate 寒天培地を作製し同様の検査を行ったが顆粒体の形成は初めの pH 6.6 もと同様であつた。特に顆粒体

Addendum to the Thesis "Studies on the Mechanism of Survival of *C. Diphtheriae*" Yuichi Teramoto, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, University of Kanazawa.

形成良好な Chocolate 寒天培地はむしろ酸性であつたから、顆粒体の形成は特に酸性において弱いということはない。chocolate 寒天培地が1ヶ月間安定した pH を示したことはその強い生存力と関係があるかも知れない。

実験Ⅲ. C.C.Y. 培地<sup>4)</sup>と Glycerol 並びに Casamino acid と顆粒体形成の関係

Glycerol がジフテリア菌顆粒の形成を促進するという報告<sup>5)</sup>がある。著者は前報に使用した C.C.Y. 培地を基とし、グリセロリン酸ソーダの代りに Glycerol を使用、また Casein A<sup>4)</sup> (Casein の hydrolysate) の代りに市販の Casamino acid (Difco 社製) で代用して見た。Casein の hydrolysate を使つた C.C.Y. 原法培地は顆粒体の形成において Löffler 培地より良好だが、chocolate 寒天培地よりはるかに劣つた。しかし Casein A を Casamino acid で代用して見ると、発育は極めて良好となつたが顆粒体の形成は原法よりはるかに悪かつた。次にグリセロリン酸ソーダを Glycerol と Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> で代用して見たが顆粒体の形成は原法培地より悪かつた。

実験Ⅳ. 培地保存温度と顆粒体形成率の関係

前報の実験の結果保存温度が顆粒体形成に関係があると考えられたので Löffler 培地、血清寒天並びに chocolate 寒天培地を使用し、0~4°C, 25°C, 37°C の3温度に保存して顆粒体形成率を検討した。用いた菌株は RT-2 株及び上田株である。その結果を表 I に示した。表中記号は2株の平均値によつた。即ち一は形成なきもの、±は0.1~2.4%, +は2.5~4.9%, ++

表 I 培地保存温度と顆粒体形成率の関係

培地	培養日数		保存温度					
	5	10	15	20	25	30		
Löffler 培地	0~4°C	±*	±	—	—	—	—	
	25°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
	37°C	冊	冊	+	+	+	+	
血清寒天培地	0~4°C	+	±	—	—	—	—	
	25°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
	37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
Chocolate 寒天培地	0~4°C	++	+	+	±	—	—	
	25°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	
	37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	

\* 表中 一, 顆粒体形成せず。  
 ± 0.1~2.4%の形成率  
 + 2.5~4.9%の形成率  
 ++ 5.0~9.9%の形成率  
 冊 10.0~19.9%の形成率  
 冊 20.0~39.9%の形成率  
 冊 40.0%の形成率以上

は5.0~9.9%, 冊は10.0~19.9%, 冊は20.0~39.9%, 冊は40.0%以上の形成率を表わしている。

0~4°C ではすべての培地で vegetative phase のままの形で、殆んど顆粒体の形成はなかつた。37°C では相当顆粒体が形成されたが、保持がやや悪く、25°C が最も形成率がよくまた保持される率も高かつた。この現象は各培地を通じて共通であつた。顆粒体形成の時期としては 25°C では5~10日で最高に達したが、37°C では5日目までにはすべて最高に達していた。

またこの3種の培地の中では常に chocolate 寒天培地が形成良好であつた。Löffler 培地では顆粒体がよく形成されたが、その保持が悪かつた。なお 120°C, 20分加熱滅菌した chocolate 寒天培地を作製し、その顆粒体形成の様相を検討したが、普通の chocolate 寒天培地と殆んど変らなかつた。以上の成績は chocolate 寒天培地が最も長く生存する前報<sup>1)</sup>の結果と一致した。Löffler 培地が 37°C で長く生存しないのは顆粒体の保持が悪いためと判つた。

実験Ⅴ. 各種培地上の顆粒体形成

以上の実験で培地により顆粒体形成が異り、chocolate 寒天培地が最も顆粒体形成がよく、また 25°C が保存の最適温度と判明したので、次の諸種培地を用いて 25°C に保存し、その顆粒体の形成率及びその保持される率を検討した。即ち chocolate 寒天培地における寒天濃度を 1%, 1.5%, 2% のものを作つた。また血液成分を血球と血清に分けこれを普通寒天培地に 10% に加えた血球寒天培地、血清寒天培地を作り、またこの中間として血液寒天培地をも作つた。その他に Pope 消化寒天培地も使用した。菌株は RT-2 株、上田株を使用した。

表 II 各種培地における顆粒体形成率 (25°C 保存)

培地	培養日数					
	5	10	15	20	25	30
1%寒天 Chocolate 培地	冊*	冊	冊	冊	冊	冊
1.5%寒天 Chocolate 培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊
2%寒天 Chocolate 培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊
血清寒天培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊
血液寒天培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊
血球寒天培地	冊	冊	冊	冊	冊	冊
Pope 消化寒天培地	+	—	+	±	—	—

\* 表中記号は表 I 参照。

その結果は表Ⅱに示した如く、chocolate 寒天培地がすぐれ、中でも寒天濃度の高いもの程よいことが判つた。血液成分中血球寒天培地が最も形成良好で、次いで血液寒天培地、血清寒天培地の順であつた。Pope 消化寒天培地は殆んど顆粒体は形成されなかつた。これらの事實は、そのまま菌の生存力の強さと関係することは前報でのデータと比較すれば明らかである。

### 考 察

以上の成績を第1報と比べると、顆粒体形成の観察成績は以後長期間にわたつて菌を生存させる培地の能力とよく一致している。換言すれば生存するかしないかは、25°C では5日目ですでに明白のように見える。37°C では Löffler 培地の如く、5、10、15日と顆粒体の減少するものは長く生存せず、chocolate 寒天培地の如く顆粒体をよく保持するものは長期に生存することが判明した。したがつて 37°C では 5、10、15日と検討すれば生存するかしないかが判る。

25°C という保存温度はジフテリア菌のエネルギーの消耗が緩徐であるため顆粒体が長く保持されると思われる。しかし 37°C で顆粒体が保持されにくいのはエネルギーの消耗が早いだけでなく「oval granule」が膨隆し、破裂する傾向が強いことが主因と考えられる。もしこれが保持されれば 37°C でも生存は長い。

Löffler 培地でも固いものが granular となるという報告<sup>6)</sup>があるが、確かに培地の固さも関係するかも知れない。血球が液体成分である血清よりよいことも固い故とも考えられ、また chocolate 寒天培地もその固

さがその長所の原因であるかも知れない。

### 結 論

ジフテリア菌を種々の条件下で保存し、1カ月間の間、顆粒体の形成を観察した。その結果は、

1) 顆粒体は培養基表面(菌苔の上)の pH が 6.2 ~ 7.5 の間で形成され、培地の pH がこの範囲内で安定している培地が最も顆粒体形成良好であつた。

2) 0~4°C, 25°C, 37°C に保存した場合、いずれの培地でも 25°C が最も顆粒体形成良好で、次いで 37°C であつたが、0~4°C では殆んどその形成を見なかつた。

25°C では 5~10日でその数が最も多く、以後減少したが、最も安定して保持された。

37°C では 5日目ですでに最高に達していたが、培地によっては著しく不安定であつた。

稿を終るに臨み、御指導並びに御校閲下さいました西田尚紀教並授びに御指導御鞭撻下さいました谷友次名誉教授に深く感謝致します。

### 文 献

- 1) 寺本友一：十全医会誌，印刷中。
- 2) 寺本友一：十全医会誌，印刷中。
- 3) Pope, C. G. & Smith, M. L. : J. Path. Bact., 35, 573 (1932).
- 4) Gladstone, G. P. & Fildes, P. : Brit. J. Exper. Pathol., 21, 161 (1940).
- 5) Goldworthy, N. E. & Wilson, H., : J. Path. Bact., 54, 183 (1942.)

### Abstract

The process of forming "oval granules" in *C. diphtheriae* had been observed in detail for a month immediately after its inoculation on a variety of media under different conditions. The results obtained were as follows;

1. Better results for forming the granules were obtained in media where proper pH had been kept.

2. Of the temperatures tested, 25°C was the most effective for their formation. It occurred both at 25°C and 37°C, but 25°C was definitely better for letting the granules persist in media than the latter temperature.

3. The abilities of media to let the organism survive could be anticipated when the transitional formation of the granules was observed on 5th, 10th and 15th days instantly after the inoculation on the media tested.