

溶連菌並びに肺炎双球菌の検出・分離用培地と しての核酸-ヒヨリン-加血液寒天について

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

石 川 正 幸

(昭和34年12月9日受付)

1937年岡本・車古によつて Choline による肺炎菌 (*Diplococcus pneumoniae*, *Pneumococcus lanceolatus*, *Streptococcus lanceolatus*) の長連鎖発育現象^{1,2)}が、次いで間もなく(1939年, 岡本)リボ核酸(RNA)による溶連菌(β *Streptococcus hemolyticus*)の Streptolysin S 増産現象³⁾が見出されたこと、

1) Choline-加血液寒天培地は肺炎菌の検出・分離の目的に、又

2) RNA-加血液寒天培地は溶連菌の検出・分離の目的に

夫々応用して利便であろうことが推想されるに至つた。

そして実際、Choline-加血液寒天の効用性は岡本・鈴木⁴⁾によつて行われた咽頭分泌物についての培養実験で証明され^{5,7,8)}、他方 RNA-加血液寒天の効用性は Grubb・Nyman⁹⁾によつて行われた咽頭分泌物についての培養試験で証明された。

私はこれらの研究に続行して、肺炎菌に対する Choline-加培地の特異的検出効果と溶連菌に対する RNA-加培地の特異的検出効果を同一培地、即ち RNA-Choline-加血液寒天で期待し得るならば、時間的にも経費的にも更に効率的であろうとなし、ここに本問題に対し考査の歩を進めた訳であつて、本論文はその成績を記載したものである。

因に、現在の分泌物、病巣などの生体試料についての溶連菌並びに肺炎菌の検出に用いられている普通血液寒天培地では、溶連菌はとも角、肺炎菌となると諸他の連鎖球菌類との識別・分離はさほど簡単容易ではなく、いきおい二次、三次と分離培養を重ね、その一つ一つについて性状を点検して行く必要があることは研究者^{9,10)}の均しく経験している所である。

I. 純粋培養菌をもつての基礎的考査

RNA-加血液寒天培養法は RNA の溶連菌に対する Streptolysin S 増産効果(核酸効果とも略記す)を利用したものであり、又 Choline-加血液寒天培養法は Choline の肺炎菌に対する長連鎖形成効果を利用したものであるが、これに関し岡本等が記載^{1,2,3,4,6,7,8)}している所を要約せば次の如くである：

a) RNA の溶連菌に対する Streptolysin S 増産効果は RNA-加血液寒天試験では集落周囲に出現する溶血環の異常な増大として顕現し、この場合 RNA の至適濃度は大体1%である(但し集落は個々散在した菌の集塊よりなり、連鎖形成が見られない点では肺炎菌におけると同様である)。

b) 肺炎菌の Choline-加血液寒天培養試験では集落の菌が特異な長連鎖発育型をとつていることが検証され、この場合 Choline の至適濃度は大体1%である(溶連菌では長連鎖形成が起らない)。

然らば同一培地に RNA と Choline の両者を含有せしめた場合、夫々の効果性に果して拮抗或いは協力現象が起らないであろうか。この問題に対して先ず基礎的方面からの知見を得べく、純粋培養の肺炎菌株並びに溶連菌株をもつて次のような順序で吟味考査を進めた。

即ち

A) RNA-加血液寒天並びに Choline-加血液寒天における実験

i) 溶連菌(S-株)についての単独培養試験

ii) 肺炎菌(I-型)についての単独培養試験

iii) 溶連菌と肺炎菌の混合培養試験

B) RNA-Choline-加血液寒天における実験

i) 溶連菌(S-株)と肺炎菌(I-型)の単独培養並

RNA-Choline-Blood agar as a Medium for the Detection and Isolation of *Streptococcus hemolyticus* and *Pneumococcus*. Masayuki Ishikawa, Department of Pharmacology (Director: Prof. H. Okamoto), School of Medicine, University of Kanazawa.

びに混合培養試験

- ii) 諸他の溶連菌株、及び I-、II-及び III-型肺炎菌株についての培養試験

実験方法

1) 培地の調製：

a) 酵母核酸原液：酵母核酸ソーダの10並びに20%水溶液(何れも必要に応じて Na_2CO_3 で中和)を調製し、これに蒸気釜で 100°C 、30' の処置を施したものを RNA-原液として用意す。

b) 塩化ヒヨリン原液：Choline Chloride の10並びに20%水溶液に対し同じく 100°C 、30' の処置を施したものを Choline-原液として用意す。

c) 基礎培地：型の如く普通ブイヨン ($\frac{1}{2}$ kg 牛肉, 5g NaCl, 10g Peptone に常水を加えて 1ℓ とし, Na_2CO_3 で pH=7.6 に調製) をもつて 2% 普通寒天培地 (pH=7.6) を調製用意す。

d) 0.5%又は1%酵母核酸加血液寒天〔以下 RNA (0.5 or 1%)-加血液寒天とも略記〕：

普通寒天培地 (pH=7.6)	9分	の割合に混じたものの 25ml 宛を Petri-dish (直径 10cm) に注加固定せしめる。
10%又は20% RNA-原液	0.5分	
家兎脱線維血液	0.5分	

e) 0.5%又は1%ヒヨリン加血液寒天〔以下 Choline (0.5 or 1%)-加血液寒天とも略記〕：

普通寒天培地 (pH=7.6)	9分	の割合に混じたものを Petri-dish に注加固定せしめる。
10%又は20% Choline-原液	0.5分	
家兎脱線維血液	0.5分	

f) RNA (0.5 or 1%)-Choline (0.5 or 1%)-加血液寒天：

普通寒天培地 (pH=7.6)	9分	の割合に混じたものを Petri-dish に注加固定せしめる。
10%又は20% RNA-原液	0.5分	
10%又は20% Choline-原液	0.5分	

g) 対照血液寒天：上記 d, e 及び f の各培地における RNA-原液或いは Choline-原液の代りに滅菌生理的食塩水を加えたものを対照培地とす。

2) 培養試験：供試菌を普通ブイヨン (pH=7.6) に 37°C 下で24時間培養したものを、よく振つた後、滅菌食塩水で 1:50-100 に稀釈し、その1白金耳を試験培地に塗擦し、孵卵器 (37°C) に納める。

3) 成績の判定：かくて培養 24, 48, 72 及び 96 時間目と逐時的観察を行つた。即ち溶連菌にあつては集落の周囲に出現する溶血環の直径 (mm) を測定し、又肺炎菌はもとより溶連菌の場合でも、集落よりの塗抹染色 (メチレン青或いは石炭酸フクシン) 標本を作成して連鎖形成の有無如何を検した。

なお、塗抹標本の作成に当つてはオブジェクト硝子の上に食塩水 1 滴を落し、これに白金耳で菌集落から釣取したものを軽く接せしめながら広げるといつた具合にして可及的連鎖が切断されないようにと努めた。

而して以下実験成績の記載で

i) (一) とあるは溶連菌が、対照血液寒天培養におけると同様に、専ら個々散在しており稀に 4~6 個連結した鏡検所見を示したことを、

ii) 一は肺炎双球菌が、対照血液寒天培地におけると同様に、単なる双球菌として散在しておる (稀に高々10個程度の短連鎖が混在) という所見を示したことを、又

iii) 卅又は卅は肺炎双球菌が極めて顕著な長連鎖発育の所見を示したことを意味する。

実験成績

A) RNA-加血液寒天並びに Choline-加血液寒天における実験

i) 溶連菌 (S-株) についての単独培養試験

表 I は溶連菌 (S-株) を 0.5% RNA-並びに 1% RNA-加血液寒天, 0.5% Choline-並びに 1% Choline-加血液寒天と普通血液寒天 (対照) とに夫々塗擦培養した比較実験の成績である。即ちここに先ず

a) RNA-加培地たると Choline-加培地たるとを不問、菌集落の塗抹染色標本における鏡検所見は対照の血液寒天培地におけると全く同様で、個々の菌が単に散在しているというだけであること、

b) RNA-加培地での溶血環の大きさは、対照培地におけるそれに対比して異常に大であり、而も RNA 含量が 0.5% の場合よりも 1% の方が溶血環が大きく出現していること

の諸点に注目すべきであろう。而して今 1% RNA-加血液寒天培養と普通血液寒天培養 (対照) について、夫々の溶血環の大きさの時間的推移関係について述べれば、対照培地では溶血環の直径は24時間後には 2mm で、以後時間の経過と共に漸増しているとはいえ96時間後に漸く 5.5mm に達しているに過ぎない、これに対し 1% RNA-加培地では24時間後で既に 5.5mm の大きとなり、以後時間の経過と共に益々増大して96時間後には実に 15mm にも達しているといつた如くである。

ii) 肺炎菌 (I 型) についての単独培養試験

表 II は 0.5% RNA-並びに 1% RNA-加血液寒天, 0.5% Choline-並びに 1% Choline-加血液寒天と普通血液寒天 (対照) に対する肺炎菌の比較培養実験の成

績である。即ちここでは

a) RNA (0.5-1%) - 加培地では肺炎菌が、普通血液寒天培地におけると全く同様、双球菌が単に雑然散在するという発育型を示しているに対し、

b) Choline (0.5-1%) - 加培地では双球菌の長連鎖発育が起つており、而もその程度において Choline 含量が 0.5% の場合よりも 1% の方で明らかに顕著である

という所見に注目すべきであろう。

iii) 溶連菌 (S-株) と肺炎菌 (I-型) の混合培養試験表Ⅲは 1% RNA-加血液寒天, 1% Choline-加血液寒天及び普通血液寒天の夫々に対し溶連菌と肺炎菌の混合培養を行つた成績である。即ちここに

a) 溶連菌の RNA-加血液寒天培養で起る集落周囲の溶血環増大現象は肺炎菌の共存でも全然影響されることがなく、又

b) 肺炎菌の Choline-加血液寒天培養で起る長連鎖発育現象は溶連菌が混在していても何ら影響されることがない

という所見は最も注目に値する所である。

B) RNA-Choline-加血液寒天における実験

実験 A では血液寒天に対し RNA 或いは Choline を夫々別個に含有せしめたものについて溶連菌並びに肺炎菌の移植培養が行われたのであるが、然らば血液寒天に対し RNA と Choline の両者を併有せしめたならばどうであろうか。この問題に対する考査成績は次の如くである。

i) 溶連菌と肺炎菌の単独培養並びに混合培養試験表 IVa は RNA (0.5%) - Choline (0.5%) - 加血液寒天における成績であり、又表 IVb は RNA (1%) - Choline (1%) - 加血液寒天における成績である。ここに先ず両表を相対比照合する時、夫々に共通する所見として、

a) 溶連菌の RNA-Choline-加培地における単独培養では、普通血液寒天培養に対比して、集落の周囲に大なる溶血環が出現している。

b) 肺炎菌の RNA-Choline-加培地における単独培養では、普通血液寒天培養における双球菌の単なる散在的発育とは異なり、長連鎖発育が起つていること、而も

c) 全く同様の効果は又、RNA-Choline-加培地に対し溶連菌と肺炎菌との混合培養を行つた場合でも得られている (Fig. 1a 及び b 参照)

ことが看取されるのであるが、このことは正に血液寒天に RNA と Choline が共存していても夫々は何ら拮抗或いは協力的に影響し合うことなく、依然として各その特異的生物学的効果性を顕示していることの証左である。

次に表 IVb では表 IVa に比して溶連菌集落における溶血環の増大度並びに肺炎菌の長連鎖形成度という点で勝つてることが着目されるのであるが、これは RNA-Choline-加血液寒天培地としては RNA 及び Choline の附加量が共に 1% であることの有利性を示しているものである。

因に、RNA (1%) - Choline (1%) - 加血液寒天培養の溶連菌並びに肺炎菌では、その形態においても亦メチレン青による被染色性という点でも、普通血液寒天培養のものに対比して、異変が認められなかつた。

ii) 諸他の溶連菌株、I-, II-及び III-型肺炎菌株についての培養試験

前記実験に鑑み、本実験では培地として RNA (1%) - Choline (1%) - 加血液寒天のみが使用された。

供試菌は次の如くである。

a) 溶連菌 18 株 : Nos. 15, 16, 17, 23*, 39, 46*, 51, 59, 61, 67, 149, 151, 152 及び 154 (以上は何れも昭和30年全国に流行した“子供の奇病”から分離**されたもの)、水島株、佐藤株及び藤川株 (以上3株は昭和30年著者によつて“子供の奇病”から分離されたもの)、並びに S-株 (教室保存株)。

b) 肺炎菌 3 株 : I-, II-及び III-型菌 (何れも教室保存株)。

表 V は各その成績を一括展示したものであるが、本表では溶連菌株にあつては例外なく RNA-Choline-加血液寒天上で集落周囲における溶血環の増大現象が出現しており、又肺炎菌にあつては I-, II-及び III-型の何れもが RNA-Choline-加血液寒天上で長連鎖発育を来たしていることが看取されよう。

即ち、以上の基礎的考査の結果として、ここに新たに

1) RNA-Choline-加血液寒天では、溶連菌に対する RNA の溶血毒増産効果と肺炎菌に対する Choline の長連鎖発育効果とは夫々全く無関係に発現し、その間に何らの拮抗或いは協力的現象も起らないこと、及び

2) 溶連菌並びに肺炎菌に対する鑑識培養の目的には 1% RNA-1% Choline-加血液寒天 (pH=7.6) を

* は何れも A 群属であるという。

** Nos. 15-154 株が予防衛生研究所の好意によつて分譲されたものであることを記して感謝の意を表す。

使用の方が好適であろうことが確かめられた訳である。

II. RNA-Choline-加血液寒天に対する咽頭分泌物の培養実験

I項における溶連菌と肺炎菌の純粋培養菌株をもつての実験では、この両菌種をRNA-Choline-加血液寒天に混合培養すると、溶連菌はその集落周囲における異常に増大した溶血環の出現することで、又肺炎菌はその長連鎖発育型をとることから、夫々を劃然と識別し得ることが確かめられたのであるが、然らば溶連菌或いは肺炎菌以外に諸他の雑菌類が混在している場合は果してどうであろうか。

この間の消息を明らかにすべく、試料として咽頭分泌物を選ぶ^{12,13)}こととし、そのRNA-Choline-加血液寒天に対する培養実験を行った。

実験方法

1) 咽頭分泌物の採取並びに培養：

小児(扁桃腺炎2名、気管支炎1名、健常児2名)の咽頭粘膜を綿棒で擦過し、これを滅菌食塩水10ml中でよく振る。次いでその1白金耳をRNA(1%)-Choline(1%)-加血液寒天に塗擦した後、37°Cの孵卵器中に納める。

2) 分離試験：培養48時間後、集落発生の状況を観察し、専ら次のような方式で菌の分離培養を行った。

a) 巨大なβ-型溶血環を示す集落から釣取し、これをRNA-Choline-加血液寒天に転培し、

b) 溶血環を示さない表面平滑な集落については、先ずその一部から塗染染色標本を作成し鏡検で長連鎖を形成しているものを求め、該集落からRNA-Choline-加血液寒天への転培を行う。

c) なお、周囲が狭く緑色調を帯びた集落(即ち一見肺炎菌集落に類似しているもの)では、たとえ鏡検上連鎖形成を証し得なくとも、一応前記同様RNA-Choline-加培地への転培を行った。

3) 菌種の判定：かくて分離培養された菌については、グラム染色、胆汁酸による溶菌試験の外に、Choline効果並びにRNA効果試験による判定法をも応用した。

i) Choline効果試験法：

被検菌をCholine(1%)-加血液寒天(pH=7.6)及び普通血液寒天(pH=7.6)、並びにCholine(1%)-

加ブイオン(pH=7.6)及び普通ブイオン(pH=7.6)に夫々移植培養し、連鎖形成の有無如何によつて次の如く判定す。

a) Choline-加血液寒天並びにCholine-加ブイオンで乱麻状の長連鎖発育を示し、而も普通寒天並びに普通ブイオンで単なる個々散在の発育を示すものを肺炎菌とし、

b) RNA効果陽性で、Cholineが何ら連鎖形成的に影響しないものを溶連菌とし、又

c) Choline-加血液寒天では、普通血液寒天におけると同様、極めて短い連鎖或いは単なる個々散在の発育型を示すのみであるが、普通ブイオンでは短連鎖発育をなし、而もCholine-加ブイオンでは連鎖形成が相当著しく起つているものを緑色連鎖球菌に属せしめる。

因に、本法はCholine-加血液寒天における培養で長連鎖発育の成績を与えるのは肺炎菌*のみであり、溶連菌、非溶血性連鎖球菌、緑色連鎖球菌、葡萄球菌、大腸菌等ではかかる現象が起らない、しかしこのうち緑色連鎖球菌にあつては液体培地(即ち1%Choline-加ブイオン、pH=7.6)における試験で或る程度Cholineの連鎖形成に対する催進的影響が検証されるという知見^{1,6,7,8)}に基くものである。

ii) RNA効果試験法：被検菌を1%RNA-加血液寒天(pH=7.6)及び普通血液寒天(pH=7.6)に夫々移植して検した。本効果はβ-溶連菌に対してのみ陽性であつて、緑色連鎖球菌、非溶血性連鎖球菌、肺炎菌、葡萄球菌、大腸菌を初めとして諸他のグラム陰・陽性菌では陰性成績を与えることは岡本⁹⁾、Bernheimer¹⁰⁾等によつて已に実証されている所である。

実験成績

表VIは小児5名の咽頭分泌物についてのRNA-Choline-加血液寒天培養所見とこれから直接分離された菌についての考查成績を総括展示したものである。

即ち、先ず注目すべきは諸他の雑菌類の共存にも不拘、実験例I及びIVでは溶連菌が大なる溶血環を有する集落を目標として、又実験例II及びIVでは肺炎菌が長連鎖発育所見を目標として夫々純粋に分離された点であつて、これは少なくともRNA-Choline-加血液寒天には溶連菌並びに肺炎菌に対する特異的検出培地としての利用価値があることを如実に示しているものといえよう。

* Cholineによる肺炎菌の長連鎖発育に関してはRochford & Mandle¹⁴⁾による追証報告がある。

而して実験例 I, III, IV及びVでは緑色連鎖球菌属と判ぜられるものが分離されているのであるが、これらは何れも RNA-Choline-加血液寒天培地では肉眼的には肺炎菌に酷似した集落所見を呈しながら、連鎖発育を示していない点で肺炎菌と劃然区別し得られていることも亦本培地の実地応用上の面に鑑みて重視すべき所である。

結 論

本研究では溶連菌の検出・分離には1% RNA-加血液寒天 (pH=7.6) を、又肺炎菌の検出・分離には1% Choline-加血液寒天 (pH=7.6) をと、夫々別個の培養基を使用する代わりに、RNA (1%)-Choline (1%)-加血液寒天 (pH=7.6) をもつてする時は、同一培地上での溶連菌と肺炎菌とに対する検出・分離が可能であり、而もこの関係は緑色連鎖球菌を含む諸他の雑菌類が混在している場合でも不変であることが実証された。かくて RNA (1%)-Choline (1%)-加血液寒天には実地応用上の価値があると論結され得ることとなつたのであるが、今本培地培養における溶連菌、肺炎菌及び緑色連鎖球菌の特異所見を夫々要約せば次の如くである：

- 1) 溶連菌：集落の周囲に巨大な溶血環が出現している。但し菌は個々散在の発育型をとつている。
- 2) 肺炎菌：集落の周囲が狭く緑色調を帯びている。而して菌は長連鎖発育型をとつている。

3) 緑色連鎖球菌：集落の周囲が狭く緑色調を帯びている。しかし菌は個々散在の発育型をとつているのみである。

文 献

- 1) Okamoto, H. & Shako, T. : Japan. J. Med. Sci., IV, Pharmacol., 10, 129 (1937).
- 2) Okamoto, H. : ibid, 12, 143 (1940).
- 3) Okamoto, H. : ibid, 12, 167 (1940).
- 4) Okamoto, H. & Suzuki, M. : ibid, 11, 1 (1938).
- 5) Grubb, R. & Nyman, M. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., 36, 187 (1955); Grubb, R. : ibid, 36, 181 (1955).
- 6) 岡本：金沢医科大学結核研究所年報, I, 67 (1942).
- 7) 長谷川・細谷・安東・武田編：細菌学の新領域, 106頁1953.
- 8) 岡本：細胞化学シンポジウム, 3, 145 (1954).
- 9) Yamaguti, M. : Zbl. f. Bakter., I Orig., 90, 345 (1923).
- 10) Gundel, M. und Linden, H. : Zeitschr. f. Hyg., 112, 3 (1931).
- 11) Bernheimer, A. W. : Bact. Reviews, 12, 195 (1948).
- 12) Kolle und Waasermann : Handbuch d. pathog. Mikroorganismen, 4, 1, 355 (1929).
- 13) Schlirf, K. : Zbl. f. Bakter., I Orig., 99, 129 (1926).
- 14) Rochford, E. J. & Mandle, R. J. : J. Bact., 66, 554 (1953).

Abstract

Basing upon the results of present study it was concluded that RNA (1%)-Choline (1%)-Bloodagar, pH 7.6, may be useful in practice for the purpose of detection and isolation of *Streptococcus hemolyticus* and *pneumococcus* present in human samples.

The characteristics, which made it possible on the RNA-Choline-Bloodagar plate to differentiate colonies of hemolytic streptococci and of pneumococci from those of other bacteria, were as follows :

- 1) Colonies of *Str. hemolyticus* were surrounded by enormously large zone of β -hemolysis. Microscopically, the organisms were found as isolated cocci (and here and there in the form of lineal arrangement consisting of less than 4-6 cocci).
- 2) Colonies of pneumococci were surrounded by faintest zone of greenish tinge. Microscopically, the organisms were found as distinct long chains.
- 3) Viridans streptococci could be differentiated from hemolytic streptococci in not forming β -hemolysis, and from pneumococci in not giving long-chain growth.

Table I Comparative Cultivation Experiment with *Streptococcus hemolyticus* (S-strain) on RNA-Bloodagar, Choline-Bloodagar and Bloodagar Plates

Time of incubation at 37°C (in hours)	Diameter, in mm, of hemolysis zone around colonies of <i>Streptococcus hemolyticus</i> (S-strain) grown on				
	0.5% RNA-Bloodagar	1% RNA-Bloodagar	0.5% Choline-Bloodagar	1% Choline-Bloodagar	Bloodagar (Control)
24	3.0mm (-)	5.5mm (-)	2.0mm (-)	2.0mm (-)	2.5mm (-)
48	6.5mm (-)	11.0mm (-)	4.0mm (-)	4.0mm (-)	4.0mm (-)
72	9.0mm (-)	13.0mm (-)	5.0mm (-)	5.0mm (-)	5.0mm (-)
96	10.5mm (-)	15.0mm (-)	5.5mm (-)	5.5mm (-)	5.5mm (-)

(-) = Microscopically, the organisms were found as isolated cocci (and here and there in the form of lineal arrangement consisting of less than 4~6 cocci)

Table II Comparative Cultivation Experiment with Pneumococcus (Type I) on RNA-Bloodagar, Choline-Bloodagar and Bloodagar Plates

Time of incubation at 37°C (in hours)	Microscopic findings of <i>pneumococci</i> grown on				
	0.5% RNA-Bloodagar	1% RNA-Bloodagar	0.5% Choline-Bloodagar	1% Choline-Bloodagar	Bloodagar (Control)
24	Isolated diplococci	Isolated diplococci	Long chains	Extremely long chains	Isolated diplococci
48	Isolated diplococci	Isolated diplococci	Long chains	Extremely long chains	Isolated diplococci
72	Isolated diplococci	Isolated diplococci	Long chains	Extremely long chains	Isolated diplococci
96	Isolated diplococci	Isolated diplococci	Long chains	Extremely long chains	Isolated diplococci

Table III Cultivation Experiments with a Mixture of Hemolytic Streptococci (S-strain) and Pneumococci (Type I)

Time of incubation at 37°C (in hours)	1% RNA-Bloodagar	1% Choline-Bloodagar	Bloodagar (Control)
24	5.5mm — (—)	2.5mm †† (—)	2.0mm — (—)
48	11.5mm — (—)	3.5mm †† (—)	3.5mm — (—)
72	13.0mm — (—)	4.5mm †† (—)	4.0mm — (—)
96	14.5mm — (—)	5.5mm †† (—)	4.5mm — (—)

Notes :

- a) The figures were millimeter measurements of diameter of the hemolysis zone around the colonies of hemolytic streptococci.
 (—)=The hemolytic streptococci were found as isolated cocci (and here and there in the form of lineal arrangement consisting of less than 4~6 cocci).
- b) The following signs were arbitrarily used to express the growth form of pneumococci :
 ††=Long chains
 —=No chaining (i.e., the organisms were found as isolated diplococci)

Table IVa Cultivation Experiments on RNA (0.5%)-Choline (0.5%)-Bloodagar

Bacteria	<i>Streptococcus hemolyticus</i> (S-strain)		<i>Pneumococcus</i> (Type I)		A mixture of <i>Streptococcus hemolyticus</i> (S-strain) and <i>Pneumococcus</i> (Type I)	
	RNA (0.5%) -Choline (0.5%) -Bloodagar	Bloodagar	RNA (0.5%) -Choline (0.5%) -Bloodagar	Bloodagar	RNA (0.5%) -Choline (0.5%) -Bloodagar	Bloodagar
24	3.5mm	2.0mm	††	—	3.0mm ††	2.0mm —
48	6.0mm	4.5mm	††	—	6.5mm ††	4.0mm —
72	8.5mm	5.0mm	††	—	9.0mm ††	5.5mm —
96	10.5mm	5.5mm	††	—	10.5mm ††	5.5mm —

For convenience, the abbreviated nomenclature, RNA (0.5%) -Choline (0.5%)-Bloodagar, is employed to denote "Blood (5%)-Agar, pH 7.6, containing 0.5% sodium yeast ribonucleate and 0.5% choline chloride.

††=Long-chain growth of pneumococci

—=Growth of pneumococci in the form of isolated diplococci

Table IVb Cultivation Experiments on RNA (1%)-Choline (1%)-Bloodagar

Bacteria	<i>Streptococcus hemolyticus</i> (S-strain)			<i>Pneumococcus</i> (Type I)			A mixture of <i>Streptococcus hemolyticus</i> (S-strain) and <i>Pneumococcus</i> (Type I)		
	RNA (1%) -Choline (1%) -Bloodagar	Bloodagar		RNA (1%) -Choline (1%) -Bloodagar	Bloodagar		RNA (1%) -Choline (1%) -Bloodagar	Bloodagar	
24	5.0mm	2.0mm		##	—		5.5mm	##	2.0mm —
48	11.5mm	4.0mm		##	—		10.5mm	##	3.5mm —
72	13.5mm	4.5mm		##	—		13.0mm	##	4.5mm —
96	15.0mm	5.5mm		##	—		14.5mm	##	5.5mm —

Table V Showing the Results of Cultivation Experiments with 18 Strains of Hemolytic Streptococci and 3 Types of Pneumococci

Species	<i>Streptococcus hemolyticus</i>																			
	Strain or Type		S		15		16		17		23		39		46		51		59	
Time of incubation at 37°C (in hours)	Culture medium		R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C
	24	mm	mm	5.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	2.5	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	5.0	2.0	4.0
48			9.0	3.5	10.0	2.5	8.0	2.5	8.0	2.5	7.0	2.5	8.0	3.0	8.0	2.5	10.0	2.0	8.0	2.0
72			11.0	3.5	11.0	2.5	11.0	2.5	10.5	2.5	9.5	2.5	10.5	3.0	12.0	2.5	11.0	2.5	11.0	2.5
96			12.5	4.0	12.5	3.0	12.0	3.0	11.5	3.0	10.0	3.0	11.5	3.5	13.0	3.0	12.5	3.0	12.0	3.0

<i>Streptococcus hemolyticus</i>																		<i>Pneumococcus</i>					
61		67		149		151		152		154		Mizu-shima		Satō		Huzi-kawa		I	II	III			
R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C	R-C-B	C		
5.0	2.0	3.0	2.0	5.0	2.0	6.0	2.5	5.5	2.0	5.5	2.0	4.0	2.5	4.5	2.0	3.0	2.0	##	—	##	—	##	—
8.0	3.0	6.5	2.5	8.0	3.0	8.5	3.0	8.0	3.0	9.0	3.0	10.0	2.5	10.0	2.5	8.0	2.0	##	—	##	—	##	—
10.0	3.0	8.0	2.5	9.5	3.5	10.0	3.0	9.5	3.0	11.0	3.5	13.0	3.0	12.0	2.5	9.5	2.0	##	—	##	—	##	—
11.0	3.5	9.0	3.0	11.0	3.5	11.5	3.5	11.0	3.0	12.5	4.0	14.0	3.5	13.0	3.0	11.0	2.5	##	—	##	—	##	—

R-C-B=RNA (1%)-Choline (1%)-Bloodagar C=Bloodagar (Control)

##=Long-chain growth of pneumococci

—=Growth of pneumococci in the form of isolated diplococci

Table VI 小児咽頭分泌物の RNA-Choline 加血波寒天培養成績

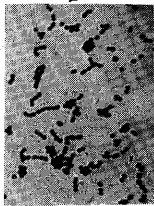
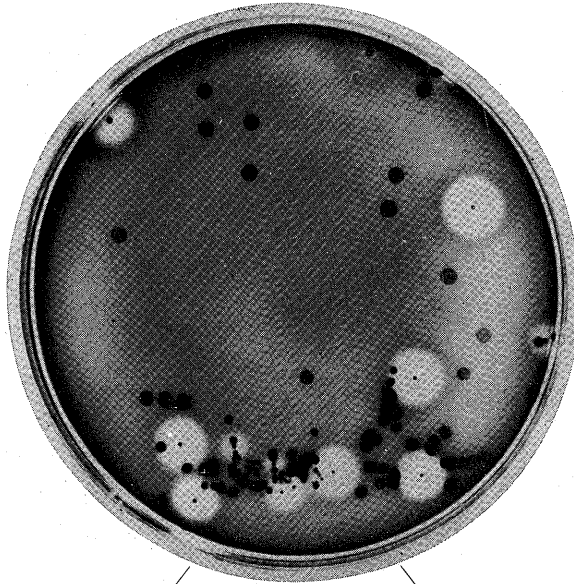
実験例番号	小児氏名(年齢)	臨床診断	咽頭分泌物の RNA (1%)—Choline (1%) 加血波寒天48時間培養所見 〔菌分離を行った集落の記号〕	分離菌に対する考査					
				菌分離の集落	鑑別成績			菌種判定	
					グラム染色	胆汁酸溶菌試験	ヒヨリン効果		核酸効果
I	桃○俊○(四歳)	扁桃腺炎	直径 8mm 前後の溶血環を有する集落〔A〕多数, 狭い緑色環を示す集落(但し連鎖を形成していない)〔B〕; やや白色味ある集落(但し連鎖を形成していない)〔C〕を認む. その他は雑菌*であり, 染色標本で連鎖形成の集落は見当らず.	〔A〕	+	-	-	+	溶連菌
				〔B〕	+	-	** (+) -	-	緑鎖球菌
				〔C〕	+	-	-	-	葡萄球菌
II	堀○雄○(五歳)	気管枝炎	雑菌類による多数の集落の外に, 所々に長連鎖形成を示した集落〔D〕を認む. 溶血環を有する集落なし.	〔D〕	+	+	+	-	肺炎菌
III	谷○ミヨ○(八歳)	扁桃腺炎	狭い緑色環を有する集落(但し連鎖を形成していない)〔E〕が相当多数. やや白色調の集落(但し連鎖を形成していない)〔F〕の外に雑菌類の集落を当相多数に認む. 長連鎖形成並びに溶血環形成の集落を認めず.	〔E〕	+	-	(+) -	-	緑鎖球菌
				〔F〕	+	-	-	-	葡萄球菌
IV	村○悦○(八歳)	健常	直径 7mm 程度の溶血環を有する集落〔G〕, 及び狭い緑色環を有する集落(但し連鎖を形成していない)〔H〕と長連鎖形成を示した集落〔I〕の少数と, 雑菌類の集落の多数を認む.	〔G〕	+	-	-	+	溶連菌
				〔H〕	+	-	(+) -	-	緑鎖球菌
				〔I〕	+	+	+	-	肺炎菌
V	明○則○(七歳)	健常	雑菌類の集落多数, 外に狭い緑色環を有する集落(但し連鎖を形成していない)〔J〕の少数を認む.	〔J〕	+	-	(+) -	-	緑鎖球菌

* 鏡検で桿状, 大球菌状, 糸状等の形態を示したものを雑菌類に属せしめた.

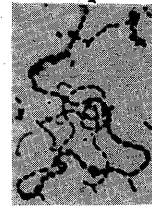
** (+)=1% Choline-bouillon 培養で軽度ではあるが連鎖形成の催進が検応されたことを意味す.

Fig. I a
48-hour culture of a mixture of *Streptococcus hemolyticus*
and Type I *Pneumococcus*

RNA (1%)-Choline (1%)-Bloodagar



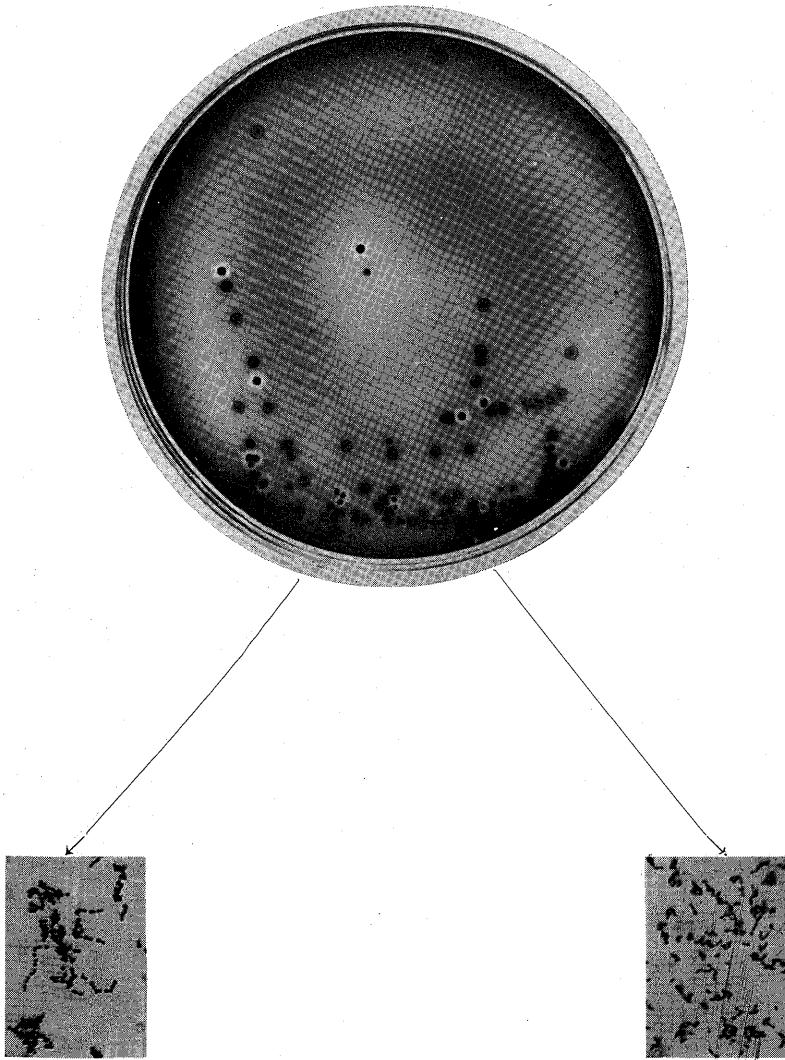
Streptococcus hemolyticus



Pneumococcus

Fig. I b
48-hour culture of a mixture of *Streptococcus hemolyticus*
and Type I *Pneumococcus*

Ordinary Bloodagar



Streptococcus hemolyticus

Pneumococcus