

「 β -Phenylpropion 酸反応」に関する知見補遺

その1 谷・吉田培養基の改良法及び β -phenylpropion 酸 反応の意義について

金沢大学医学部微生物学教室(主任: 谷友次教授)

川崎 浩 西田 尚紀 河上 清
高野 宗一 村上 政夫 矢島 治
沢田 英夫 山岸 幸造

(昭和33年1月9日受付)

I. Eine Verbesserung des Tani-Yoshidaschen Differentialnährbodens und die Bedeutung der " β -phenylpropionsäure-Reaktion"

HIROSHI KAWASAKI, SHOKI NISHIDA, KIYOSHI KAWAKAMI,
SOICHI TAKANO, MASAO MURAKAMI, OSAMU YASHIMA,
HIDEO SAWADA und KOZO YAMAGISHI

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät, Kanazawa Universität
(Direktor : Prof. Dr. Tomoji Tani)

(本論文の要旨は第10回日本細菌学会北陸地方会にて発表した.)

REFERAT

Im Jahre 1952 veröffentlichten Tani und Yoshida einen Differentialnährboden für Darmbakterien, mit Anwendung der " β -phenylpropionsäure-Reaktion" (Japanese J. of Medical Science and Biology. 5 (6): 461-465, 1952). Dieser Nährboden stellt eine Modifikation des Kligler'schen Mediums dar. Wir haben Nachprüfungen über die Brauchbarkeit dieses Nährbodens angestellt.

Die Prüfungen wurden auf 324 Stämme von Shigella, 47 Stämme von Salmonella, 15 Stämme von Vibrio comma und 938 Stämme von anderen Arten der Darmbakterien, zusammen 1,320 Stämme angewandt. Auf dem Wege des Versuches stellten wir fest, dass der Zusatz einer geringen Menge von Cystein (0.03%) zu diesem Nährboden erfolgreich war, um die Poduktion des Schwefelwasserstoffes klar zu machen. Die Bakterien, bei denen die β -phenylpropionsäure-Reaktion sich positiv erwiesen, waren auf Shigella-gruppen beschränkt, und zwar, auf Shigella dysenteriae 2, Shigella flexneri 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 3c, 4a, 4b, 5, Variant X, Variant Y und Shigella sonnei. Dagegen fiel die Reaktion negativ aus, sowohl bei Shigella dysenteriae 1, Shigella flexneri 3a und 6, Shigella boydii, als auch bei anderen Darmbakterien. Daher war dieser Befund für die Diagnose der Shigella sehr nützlich.

前 が き

谷教授¹⁾は昭和18年頃より Shigella のある種がレンダー肉エキスの寒天を赤変することに注目し, 吉田²⁾の³⁾を指導してその本態につき研究した。これ

より以前百瀬⁴⁾が「ヒドロ桂皮酸又はその曹達塩類を加えた培養基は志賀菌以外の赤痢菌により赤褐色に着色される。」と述べていたが, 吉田⁴⁾はレンダー肉エ

キスの *Shigella* による赤変は丁度ヒドロ桂皮酸 (β -Phenylpropion 酸) (以下 β -Ph. P. 酸と略記す.) によることを確認し, この反応を最初の発見者の名をとつて百瀨反応と呼称した. 吉田⁹⁾は *Shigella* の内, 大野菌, 中村菌, 昭和菌, 駒込 B_{III} 菌, 川瀨菌の一部, 西貢菌の一部, 駒込 A 菌, 駒込 B_I 菌, 及び大原菌により色素の形成が観察され, 同様の色素は大腸菌の一部でも形成されると述べている. これとは無関係に伊国の D'Alessandro^{8) 9) 10) 11) 12) 13)} は β -Ph. P. 酸が *Shigella* 及び *Escherichia coli* 0-19 によつて赤変すると報告し, この反応を β -Ph. P. 酸反応と呼んで

いる. 更に Cefali¹⁴⁾ は *Shigella boydii* の Sero-type ca/792 により β -Ph. P. 酸反応が陽性であると述べている. この反応は欧州では専ら β -Ph. P. 酸反応の名で呼ばれているので著者等もこの名称を用いることにした.

吉田⁷⁾はこの反応を確認培養基に応用し, Kligler 培養基より発展せしめた培養基を考案し, この培養基を谷・吉田培養基と呼んでいる.

著者等はこの反応の再検討を行い, まず培養基の実用的な改良をめざし各種腸内菌の態度を検討し, 知見を得たのでここに報告する.

実験方法

谷・吉田培養基⁷⁾

基礎培養基として Peptone (照内) 20gr, NaCl 5gr, 寒天 20gr, 蒸溜水 1,000 ml を煮沸溶解し, pH 7.4~7.6 に修正する. この基礎培養基に Lactose 10gr, Glucose 1gr, FeSO₄ · 7 H₂O 0.2gr, Na₂SO₃ 0.4gr, Na₂S₂O₃ · 5H₂O 0.08gr, β -Ph. P. 酸 (10% Alkohol 溶液) 1.5ml, 0.2% B.T.B. 液 4ml を加え, 煮沸 1~2 分間にて薬品を完全に溶解し, 液量を補正し, pH を再修正し, 滅菌小試験管に 3.5~4.0ml ずつ分注する. 滅菌は 100° C 30分間 3 回の間歇滅菌を行い, 下部 $\frac{1}{2}$ を高層に上部 $\frac{1}{2}$ を斜面とする. 以上を 37° C 24時

間, 更に室温 (10~25° C) 24時間の無菌試験を行い使用した.

判定法は白金線にて高層に穿刺を行い, ついで斜面に塗布し, 37° C 24時間培養後室温 (10~25° C) に 24時間放置し, その發育状態を観察した.

使用した菌株

実験に使用せる菌株は教室保存菌株, 新潟衛生研究所より分与を受けた菌株, 著者等が分離同定せる菌株で, *Shigella* 324 株, *Salmonella* 47 株, *V. comma* 15 株, その他の腸内菌 938 株, 合計 1320 株である.

その他の実験はその都度のべることとする.

実験成績及び考案

1) 基礎培養基の種類の影響

基礎培養基について吉田⁷⁾は肉汁を除いた 2% ペプトン加寒天をえらび出している. 著者等は上記の培養基のほか, レンダー肉エキス加普通栄養寒天, β -Ph. P. 酸加肉汁寒天, β -Ph. P. 酸加肉エキス普通栄養寒天, β -Ph. P. 酸加 1% ペプトン加寒天を基礎培養基とし, これに谷・吉田法の如く薬品を添加した. これに *Salmonella typhosa*, *S. Paratyphi*, *S. Schottmulleri*, *S. enteritidis*, *Shigella dysenteriae* 1, *Sh. dysenteriae* 2, *Sh. flexneri* 1b, *Sh. flexneri* 2a, *Sh. flexneri* 3b, *Sh. flexneri* 6, *Sh. boydii* 1, *Sh. sonnei*, *Proteus vulgaris* OX19, *P. vulgaris* OXK₁, *Escherichia coli* 0-55, *E. coli* 0-19, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Vibrio comma* (原型) の 20 株の菌を接種し, 37° C 24時間培養後, 室温 24時間放置し, その高層及び斜面の着色, 瓦斯の産生, 硫化水素の産生, 及

び發育度を検した. その成績は第 1 表に示す如くである. 即ち β -Ph. P. 酸反応が陽性の菌株においては, 斜面は紫紅色となる. β -Ph. P. 酸反応, 硫化水素の産生及び菌の發育等より, 谷・吉田法の如く 2% ペプトン寒天を基礎培養基として使用するのが最も良好なる如く思われる.

2) 国内産ペプトンの良否

最近国内産のペプトンの種類も多く, これらのペプトンは原材料を異にし, 又精製法も異にしている関係上, 含有するアミノ酸の構成及び量的関係は異なつてゐる. 著者等は在来照内ペプトンを使用していたが近年その入手が困難なるにより, これに代るべきペプトンをもとめるため, ペプトンの種類を変え, その着色, 硫化水素の産生, 及び菌の發育度を比較した. 使用したペプトンは極東, 臈研, 亜鈴, ポリ, 大島, 及び照内の各ペプトンである.

実験方法は前記同様に行いその成績は第 2 表に示

第1表 谷・吉田培養基の基礎培養基の種類の影響

基礎培養基種類 接種菌種	レンダー肉エキス普通栄養寒天			β-Ph. P. 酸 加肉汁寒天			β-Ph. P. 酸 加肉エキス栄養寒天			β-Ph. P. 酸 加1%ペプトン寒天			β-Ph. P. 酸 加2%ペプトン寒天		
	斜面/高層	硫化水素	発育	斜面/高層	硫化水素	発育	斜面/高層	硫化水素	発育	斜面/高層	硫化水素	発育	斜面/高層	硫化水素	発育
<i>Salmonella typhosa</i>	B/Y	-	++	B/Y	-	+++	B/Y	-	+++	B/Y	-	+	B/Y	-	+++
<i>S. paratyphi</i>	B/⊙	-	++	B/⊙	-	++	B/⊙	-	++	B/Y	-	+	B/⊙	-	++
<i>S. schottmuelleri</i>	B/⊙	+	+++	B/⊙	+	+++	B/⊙	+	+++	B/⊙	+	++	B/⊙	+	+++
<i>S. enteritidis</i>	B/⊙	+	++	B/⊙	+	+++	B/⊙	+	+++	B/⊙	+	++	B/⊙	+	+++
<i>Shidigella dysenteriae</i> 1	YG/Y	-	+	G/Y	-	++	G/Y	-	++	G/Y	-	+	B/Y	-	++
<i>Sh. dysenteriae</i> 2	G/Y	-	++	G/Y	-	+++	G/Y	-	++	G/Y	-	+	P/Y	-	++
<i>Sh. flexneri</i> 1b	P/Y	-	++	P/Y	-	+++	P/Y	-	+++	P/Y	-	++	P/Y	-	+++
<i>Sh. flexneri</i> 2a	B/Y	-	++	B/Y	-	++	B/Y	-	++	G/Y	-	+	BP/Y	-	++
<i>Sh. flexneri</i> 3b	B/Y	-	+	B/Y	-	++	B/Y	-	++	P/Y	-	+	P/Y	-	++
<i>Sh. flexneri</i> 6	B/⊙	-	++	B/⊙	-	++	B/⊙	-	++	B/⊙	-	+	B/⊙	-	++
<i>Sh. boydii</i> 1	B/Y	-	++	B/Y	-	++	B/Y	-	++	B/Y	-	+	B/Y	-	++
<i>Sh. sonnei</i>	B/Y	-	++	B/Y	-	+++	B/Y	-	++	P/Y	-	++	P/Y	-	+++
<i>Proteus vulgaris</i> OX19	G/⊙	±	++	B/⊙	+	+++	B/⊙	±	++	B/⊙	±	++	B/Y	±	++
<i>P. vulgrais</i> OXK ₁	G/⊙	±	++	B/⊙	±	+++	B/⊙	±	++	B/⊙	±	++	B/⊙	±	+++
<i>Escherichia coli</i> 0-55	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	++	Y/⊙	-	+++
<i>E. coli</i> 0-19	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	++	Y/⊙	-	+++
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++	Y/⊙	-	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B/G	-	+	G/G	-	+++	B/G	-	+++	B/G	-	+	B/G	-	++
<i>Vibrio comma</i> (原型)	B/Y	-	+	B/Y	-	++	B/Y	-	++	B/Y	-	++	B/Y	-	+++
<i>Alicaligenes faecalis</i>	B/G	-	++	B/G	-	+++	B/G	-	+++	B/G	-	++	B/G	-	++

註 B : 青, BG : 青緑, G : 緑, YG : 黄緑, P : 紫, BY : 青紫, Y : 黄, ⊙ : 黄, ガス産生

す。これを見るに亜鈴ペプトン及びポリペプトンは殆んど照内ペプトンに遜色なく、他の極東、臈研、大島の各ペプトンは稍々劣る如く思われる。特にポリペプトンにて作製せる培養基は非常に透明で後の判定に良好な結果が得られるので著者等はこれを受用した。しかし亜鈴ペプトンもいささかも劣るものではなく、本培養基作製には亜鈴ペプトン及びポリペプトンが好適である。

3) Cysteine 添加の影響

本培養基は *Salmonella* その他硫化水素産生能においても優れた性能が必要である。細菌の硫化水素の産生は主として Cysteine 及び Cystine 等硫黄を含有するアミノ酸であり、特に Cysteine の含有が硫化水素産生能を増すことは論を待たない。しかるに Cysteine

はアルカリ性で熱を加えるとたやすく分解されやすい。このことより Cysteine の含有の少ないペプトンを使用することにより硫化水素産生能が悪くなる。上記のことより Cysteine の添加は当然考えられるところである。著者等は Cysteine を 0%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05% になる如く添加した培養基を作製し、これに上記菌株を接種した。その成績は第3表に示す。その成績を見るに 0.04% 以上の添加では *S. paratyphi*, *Sh. flexneri* 等の一般に陰性とされている菌株においても陽性となり、又 0.01% 以下では *S. typhosa*, *P. vulgaris* OX19, *P. vulgaris* OXK₁, *Aerobacter aerogenes* 等の硫化水素産生弱陽性の菌株では陰性となる。以上の成績より 0.03% の添加量が最も良好な成績の如く思われる。

第2表 谷・吉田培養基の国産ペプトンの良否

ペプトン種類 接種菌種	極東		臓研		照内		亜鈴		ポリ		大島	
	斜面/高層	硫化水素	斜面/高層	硫化水素	斜面/高層	硫化水素	斜面/高層	硫化水素	斜面/高層	硫化水素	斜面/高層	硫化水素
:Salmonella typhosa	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++
S. paratyphi	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++
S. schottmuelleri	R/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##
S. enteritidis	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##	B/⊙	+##
Shigella dysenteriae 1	G/Y	-+	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++
Sh. dysenteriae 2	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++
Sh. flexneri 1b	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++
Sh. flexneri 2a	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++
Sh. flexneri 3b	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++
Sh. flexneri 6	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++	B/⊙	-++
Sh. boydii 1	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++
Sh. sonnei	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++	P/Y	-++
Proteus vulgaris OX19	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++
P. vulgaris OXK ₁	B/⊙	±++	B/Y	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++	B/⊙	±++
Escherichia coli 0-55	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++
E. coli 0-19	Y/⊙	-++	Br/Y	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++
Aerobacter aerogenes	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++	Y/⊙	-++
Pseudomonas aeruginosa	G/G	-++	G/G	-++	G/G	-++	G/G	-++	G/G	-++	G/G	-++
Vibrio comma (原型)	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++	B/Y	-++
Alcaligenes faecalis	B/G	-++	B/G	-++	B/G	-++	B/G	-++	B/G	-++	B/G	-++

註 B : 青, G : 緑, Br : 褐, P : 紫, Y : 黄, ⊙ : 黄, ガス産生

第3表 谷・吉田培養基の Cysteine 添加による硫化水素産生能

接種菌種	Cysteine 添加濃度						
	0	0.01%	0.02%	0.03%	0.04%	0.05%	
Salmonella typhosa	-	-	±	<u>+</u>	+	+	
S. paratyphi	-	-	-	-	±	+	
S. schottmuelleri	++	##	##	<u>##</u>	##	##	
S. enteritidis	+	+	++	<u>++</u>	##	##	
Shigella dysenteriae 1	-	-	-	-	-	-	
Sh. dysenteriae 2	-	-	-	-	-	-	
Sh. flexneri 1b	-	-	-	-	±	±	
Sh. flexneri 2a	-	-	-	-	-	-	
Sh. flexneri 3b	-	-	-	-	-	±	
Sh. flexneri 6	-	-	-	-	-	-	
Sh. boydii 1	-	-	-	-	-	-	
Sh. sonnei	-	-	-	-	-	-	
Proteus vulgaris OX19	±	±	±	<u>±</u>	+	++	

P. vulgaris OXK ₁	±	±	±	<u>+</u>	+	++
Escherichia coli 0-55	-	-	-	-	-	-
E. coli 0-19	-	-	-	-	-	-
Aerobacter aerogenes	-	-	-	-	±	+
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-
Vibrio comma (原型)	-	-	-	-	-	±
Alcaligenes faecalis	-	-	-	-	-	-

4) β-Ph. P. 酸の量的影響

β-Ph. P. 酸の添加量は吉田¹¹⁾及び D'Alessandro¹²⁾はペプトン寒天添加において M/1.000 即ち約 0.15% の終末濃度が好適であると述べている。著者等は谷・吉田培養基に対する最良の添加濃度を検討して見た。即ち β-Ph. P. 酸を 10% アルコール溶液とし、β-Ph. P. 酸の終末濃度が 0.005%, 0.01%, 0.015%, 0.02%, 0.03%, 0.05% なる如く添加した本培養基を作製し、これに前記同様の菌株を接種し、法の如く培

養しその着色及び発育を見た。その実験成績は第 4 表に示す如くである。これを見るに低濃度では発育良好なるも着色悪く、又高濃度では発育が稍々阻碍され、そのため着色も悪くなる如くである。以上の点より 0.02% の終末濃度が着色及び発育が最良の如く思われる。この吉田¹¹⁾、D'Alessandro¹²⁾等の成績より稍々高い値を示したのは B. T. B. 等他の色素の添加の影響であろう。

第 4 表 谷・吉田培養基の β-Ph. P. 酸の量的影響

β-Ph. P. 酸濃度	0.005%		0.01%		0.015%		0.02%		0.025%		0.03%		0.05%	
	培養性状		培養性状		培養性状		培養性状		培養性状		培養性状		培養性状	
	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育	斜面 / 高層	発育
接種菌種														
Salmonella typhosa	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	++	B/Y	++	B/Y	++
S. paratyphi	B/⊙	++	B/⊙	++	B/⊙	++	B/⊙	++	B/⊙	++	B/⊙	++	B/⊙	+
S. schottmuelleri	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	++
S. enteritidis	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	++
Shigella dysenteriae 1	B/Y	++	B/Y	++	B/Y	++	B/Y	++	B/Y	++	G/Y	++	G/Y	+
Sh. dysenteriae 2	B/Y	++	BP/Y	++	<u>P/Y</u>	++	<u>P/Y</u>	++	<u>P/Y</u>	++	BP/Y	++	BP/Y	+
Sh. flexneri 1b	B/Y	+++	BP/Y	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	BP/Y	++
Sh. flexneri 2a	B/Y	+++	B/Y	+++	<u>BP/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>BP/Y</u>	+++	<u>BP/Y</u>	+++	BP/Y	++
Sh. flexneri 3b	B/Y	+++	BP/Y	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	BP/Y	++
Sh. flexneri 6	B/⊙	+++	B/⊙	+++	<u>B/⊙</u>	+++	<u>B/⊙</u>	+++	<u>B/⊙</u>	+++	<u>B/⊙</u>	+++	B/⊙	++
Sh. boydii 1	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	++
Sh. sonnei	B/Y	+++	BP/Y	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	<u>P/Y</u>	+++	BP/Y	+++	BP/Y	++
Proteus vulgaris OX19	B/⊙	+++	B/⊙	+++	<u>B/⊙</u>	+++	<u>B/⊙</u>	+++	<u>B/⊙</u>	+++	B/⊙	++	B/⊙	++
P. vulgaris OXK ₁	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	+++	B/⊙	++	B/⊙	++
Eoherichia coli 0-55	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	++	YG/⊙	++
E. coli 0-19	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	++	YG/⊙	++
Aerobacter aerogenes	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	+++	Y/⊙	++
Pseudomonas aeruginosa	B/G	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	++	G/G	++
Vibrio comma (原型)	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	+++	B/Y	++	B/Y	++
Alcaligenes faecalis	B/BG	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	+++	B/G	++	B/G	++

註 B : 青, BG : 青緑, G : 緑, YG : 黄緑, P : 紫, BP : 青紫, Y : 黄, ⊙ : 黄, ガス産生

5) B.T.B. の添加量の影響

B.T.B. の添加量は β -Ph. P. 酸の着色と相乗して着色するので、その着色と B.T.B. の着色とは密接な関係があるから、その最適量を定める必要がある。0.2% 標準 B.T.B. 溶液を培地 100ml に対し、0.2 ml, 0.3ml, 0.4ml, 0.5ml, 1.0ml の割に添加した培養基を作製し、これに *S. typhosa*, *Sh. dysenteriae* 1, *Sh. flexneri* 1b, *Sh. sonnei*, *E. coli* を法の如く

接種培養し、その着色を見た。その成績は第 5 表に示す。これを見るに低濃度においては黄色強く、かつ着色度の判定がしにくい。しかるに高濃度においては B.T.B. の着色に支配され、 β -Ph. P. 酸反応の着色が不明である。以上の点より 100ml の培養基に 0.4 ~ 0.5ml の B.T.B. 溶液を添加するのが最良の如くで谷・吉田培養基に一致した。

第 5 表 谷・吉田培養基の B. T. B. の添加量の影響

接種菌種	B. T. B. の量				
	0.2ml/100ml	0.3ml/100ml	0.4ml/100ml	0.5ml/100ml	1.0ml/100ml
<i>Salmonella typhosa</i>	B/Y 見にくい	B/Y	B/Y	B/Y	B/Y
<i>Shigella dysenteriae</i> 1	Y/Y 見にくい	G/Y	B/Y	B/Y	B/Y
<i>Shigella flexneri</i> 1b	Br/Y 見にくい	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>	B/Y
<i>Shigella sonnei</i>	Br/Y 見にくい	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>	B/Y
<i>Escherichia coli</i> O-55	Y/⊙ 見にくい	<u>Y/⊙</u>	<u>Y/⊙</u>	<u>Y/⊙</u>	Y/⊙

註 B : 青, G : 緑, P : 紫, Br : 褐, Y : 黄, ⊙ : 黄, ガス産生

6) 初発 pH の影響

pH 指示薬を使用する関係上培養基の初発 pH が大きく終末 pH の上に影響する。特に培養基の斜面部の pH を大きく左右する。この点より初発 pH の最適値を定めることも大切である。谷・吉田培養基の初発 pH が 7.0, 7.2, 7.4, 7.6 のものを作製し、前項の菌株を

法の如く接種培養しその着色を見た。その成績は第 6 表に示す如くである。これを見るに pH の酸性側はアルカリ性側に比し、斜面の着色度は黄色を帯び特に志賀菌において顕著である。以上の成績より、pH 7.6 のものが最適の如くである。

第 6 表 谷・吉田培養基の初発 pH の影響

接種菌種	初発 pH			
	7.0	7.2	7.4	7.6
<i>Salmonella typhosa</i>	G/Y	GB/Y	B/Y	B/Y
<i>Shigella dysenteriae</i> 1	Y/Y	YG/Y	BG/Y	B/Y
<i>Shigella flexneri</i> 1b	G/Y	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>
<i>Shigella sonnei</i>	G/Y	<u>G/Y</u>	<u>P/Y</u>	<u>P/Y</u>
<i>Escherichia coli</i> O-55	Y/⊙	Y/⊙	<u>Y/⊙</u>	<u>Y/⊙</u>

註 B : 青, GB : 青緑, G : 緑, P : 紫, YG : 黄緑, Y : 黄, ⊙ : 黄, ガス産生

7) 滅菌法の比較

谷・吉田培養基に限らず確認培養基が早期の使用を必要とすることが多い。この目的のためにも、100° C 30分, 3回, 3日間の間歇滅菌法は時間を要する点不満の点がある。それに変えて高圧滅菌法を如何にすればよいかを調べる必要がある。滅菌法は、1) 100° C 30分, 3回の間歇滅菌, 2) 110° C 15分間の高圧滅菌, 3) 100° C 10分間に引続き 110° C 15分間の高圧滅菌, 4) 115° C 15分間の高圧滅菌, 5) 120° C 15分間の高圧滅菌の 5 つとした。1 回に培養基を 500

本ずつ作製し、100本ずつを上記の異なる滅菌法を行い滅菌後 37° C 24時間、引続き室温 (10~20° C) 24時間の無菌試験を行い、その雑菌混入率を調べた。作製後の着色度及び志賀菌接種後の着色を検した。上記実験を異なる季節に 5 回くりかえした。その成績は第 7 表に示す。これを見るに、115° C 15分間及び 120° C 15分間の高圧滅菌は雑菌の混入率は低い培養基は初めより稍々黄変している。このような培養基は使用することは出来ない。110° C 15分間の高圧滅菌はその組成を破壊されずにあるが、雑菌の混入率が

平均52%もあり実用に供し得ない。その点100°C10分間引続き 110°C 15分間の高圧滅菌はその培養基組成を破壊せず雑菌の混入も少なく最も優秀である。

第7表 谷・吉田培養基の滅菌法の比較

滅菌法	100°C 30分間 3回間歇滅菌	110°C 15分間 高圧滅菌	100°C 10分間 引続き 110°C 15分間 高圧滅菌	115°C 15分間 高圧滅菌	120°C 15分間 高圧滅菌
初めの着色	淡青緑	淡青緑	淡青緑	淡 緑	淡黄緑
雑菌混入率 (平均値)	2~20% (8.2%)	0~80% (52.4%)	0~5% (2.4%)	0~5% (1.8%)	0% (%)
<i>Shigella dysenteriae</i> 1 接種結果	BG/Y	BG/Y	BG/Y	G/Y	Y/Y

註 BG：青緑，G：緑，Y：黄

8) 谷・吉田培養基の改良法

以上の成績を総合して見ると次の如くなる。基礎培養基はペプトンとしてポリ又は亜鈴ペプトンを使用し、上記ペプトン 20g, NaCl 5gr, 寒天 20gr, 蒸溜水 1,000ml, 以上を煮沸溶解し、布にて濾過し、pHを7.6に修正する。以上を基礎培養基とする。上記基礎培養基に Lactose 10gr, Glucose 1gr, FeSO₄ · 7H₂O 0.2gr, Na₂SO₃ 0.4gr, Na₂S₂O₃ · 5H₂O 0.08gr, Cystein 0.3gr, 2% B.T.B. 液 4~5ml, 10% β-Ph. P. 酸アルコール溶液 2ml を加え、煮沸1~2分間にて完全に薬品を溶解させる。液量を補正し、pHを再修正し、滅菌小試験管に3.5~4.6ml 分注し滅菌する。滅菌法は100°C 10分間引続き 110°C 15分間の高圧滅菌法を行うか、又は100°C 30分間3回の間歇滅菌を行う。滅菌終了後下部1/3を高層とし、上部2/3を斜面とする。以上を無菌試験後使用する。本培養基の使用法は、高層部に白金線にて穿孔を行い、ついで斜面に塗布したものを37°C, 18~24時間培養後、室温にて6~24時間放置後判定する。

9) β-Ph. P. 酸反应用培養基

谷・吉田培養基は分離した菌の確認培養基として優秀な性能を有するが、腸内細菌の生物学的性状として単に本反応のみを見る培養基としては下記の組成の培養基が良い。

ペプトン (ポリ又は亜鈴) 20gr. NaCl 5gr 寒天 25gr, 蒸溜水 1,000ml, 10% β-Ph. P. 酸アルコール溶液 2ml, 以上を煮沸溶解して、布にて濾過し、pHを7.6に修正し、滅菌小試験管に約3ml ずつ分注する。滅菌は120°C 20分間高圧滅菌を行い、斜面として使用する。判定法は白金耳にて斜面に塗布後37°Cにて18~24時間培養、更に室温(10~20°C)にて6~

第8表 腸内細菌群の谷・吉田培養基所見及びβ-Ph. P. 酸反応

性 状	谷・吉田培養基所見		β-Ph. P. 酸反応
	高層/斜面	硫化水素	
<i>Salmonella</i> 一般	B/Ⓢ	+	-
<i>Salmonella typhosa</i>	B/Y	+, -	-
<i>Salmonella paratyphi</i>	B/Ⓢ	-	-
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	B/Ⓢ	+	-
Arizona I	B/Ⓢ	+	-
" II	B/Y	+	-
<i>Escherichia coli</i> (Alkaescens-Dispar) I	Y/Ⓢ	-	-
" II	B/Ⓢ	-	-
" III	B/Y	-	-
<i>Escherichia coli</i> O-19 I	<u>P/Ⓢ</u>	-	<u>+</u>
" II	<u>Y/Ⓢ</u>	-	<u>+</u>
<i>Escherichia freundii</i> (Bethesda-Ballerup) I	Y/Ⓢ	+	-
" II	B/Ⓢ	+	-
" III	B/Y	+	-
<i>Klebsiella</i>	Y/Ⓢ	-	-
Cloaca I	Y/Ⓢ	-	-
" II	B/Ⓢ	-	-
Hafnia	B/Y	±	-
<i>Shigella dysenteriae</i> I	B/Y	-	-
" II	<u>P/Y</u>	-	<u>+</u>
<i>Shigella flexneri</i> I	<u>P/Y</u>	-	<u>+</u>
" II	<u>B/Y</u>	-	<u>-</u>
" III	B/Ⓢ	-	-
<i>Shigella boydii</i>	B/Y	-	<u>-</u> , (+)
<i>Shigella sonnei</i>	P/Y	-	<u>+</u>

<i>Proteus vulgaris</i>	B/⓪	+	—
<i>Proteus mirabilis</i>	B/⓪	+	—
<i>Proteus morgani</i>	B/⓪	±	—
<i>Proteus rettgeri</i>	B/⓪	—	—
<i>Providencia</i> I	B/⓪	—	—
" II	B/Y	—	—
<i>Pseudomonas</i> I	B/Y	—	—
" II	B/G	—	—
<i>Vibrio comma</i>	B/Y	+, —	—
<i>Alcaligenes</i>	B/G	—	—

註 B: 青, G: 緑, P: 紫, Y: 黄,
⓪: 黄, ガス産生

24時間放置後紫赤色に着色するものを陽性とする。

10) 腸内細菌群の谷・吉田培養基所見及び β-Ph. P. 酸反応

腸内細菌群の谷・吉田培養基における所見及び β-Ph. P. 酸反応を標準菌株及び分離同定した菌株についてその態度を見ると第8表の如くなる。即ちE. coli

0-19及び *Shigella* 菌族においてのみ β-Ph. P. 酸反応が陽性である。このことは *Shigella* の分離確認に重要な意義を有する。

その他 *P. vulgaris* 及び *V. comma* の一部においてしばしば黄褐色の稍々きたない色素をつくる。又 *Pseudomonas* は淡紅色の色素か、茶褐色の色素を作る。しかしこれらの色素は本反応とは異なるものと考えられる。

Shigella の各型の谷・吉田培養基所見及び β-Ph. P. 酸反応は第9表に示す如くである。これを見るに、*Sh. dysenteriae* 中陽性を示すのは、*Sh. dys.* 2のみであり、*Sh. flexneri* では *Sh. flex.* 3. 及び4の一部、及び *Sh. flex.* 6の全部において陰性が見られ、他は陽性を示した。*Sh. boydii* は著者の行った範囲内には陽性を示したものはないが、Cefalu¹⁴⁾ は Serotyp ca/792 において陽性を認めている。*Sh. sonnei* については1相、2相共に陽性である。流行の際通常吾々が遭遇する赤痢菌株^{15) 16) 17)}の大部分は β-Ph. P. 酸反応が陽性であり、わずかに *Sh. flex.* 3a 及び6のみが陰性である。

第9表 *Shigella* の谷・吉田培養基及び β-Ph. P. 酸反応

菌 種 類	菌 株	谷・吉田培養基		β-Ph. P. 酸 反 応
		斜面/高層	硫化水素	
<i>Shigella dysenteriae</i>	1. EW " 1"	B/Y	—	—
	2. EW " 2"	<u>P/Y</u>	—	<u>++</u>
	3. EW " 3"	<u>B/Y</u>	—	—
	4. EW " 4"	B/Y	—	—
	5. EW " 5"	B/Y	—	—
	6. EW " 6"	B/Y	—	—
	7. EW " 7"	B/Y	—	—
<i>Shigella flexneri</i>	1a EW " 8"	<u>P/Y</u>	—	<u>+++</u>
	1b EW " 9"	<u>P/Y</u>	—	<u>+++</u>
	2a EW "10"	<u>P/Y</u>	—	<u>+</u>
	2b EW "40"	<u>P/Y</u>	—	<u>+</u>
	3a EW "14"	<u>B/Y</u>	—	—
	3b 金沢"150"	<u>P/Y</u>	—	<u>+++</u>
	3c 金沢"152"	<u>P/Y</u>	—	<u>+++</u>
	3 EW "15"	<u>P/Y</u>	—	<u>++</u>
	4a EW "17"	<u>P/Y</u>	—	<u>+</u>
	4b EW "18"	<u>P/Y</u>	—	<u>++</u>
	4 EW "20"	<u>P/Y</u>	—	<u>+</u>
	5 EW "21"	<u>BP/Y</u>	—	<u>±</u>
6 EW "22"	<u>B/Y</u>	—	—	

	6	EW "24"	B/Y	—	—
	var. X	EW "12"	<u>P/Y</u>	—	<u>卅</u>
	var. Y	EW "13"	<u>P/Y</u>	—	<u>卅</u>
Shigella boydii	1.	EW "26"	B/Y	—	—
	2.	EW "27"	B/Y	—	—
	3.	EW "28"	B/Y	—	—
	4.	EW "29"	B/Y	—	—
	5.	EW "30"	B/Y	—	—
	6.	EW "31"	B/Y	—	—
	7.	EW "32"	B/Y	—	—
Shigella sonnei	I相	“渡”	<u>P/Y</u>	—	<u>卅</u>
	II相	EW "34"	<u>P/Y</u>	—	<u>卅</u>

註 B : 青, P : 紫, BP : 青紫, Y : 黄

ついでこれを流行時に分類した菌株について β-Ph. P. 酸反応を検査して見ると第10表の如くである。これを見ると100%陽性のもものは Sh. dys. 2, Sh. flex. 1a, 1b, 2a, 2b, 3b, 4a, 5, Var. X, Var. Y, Sh. sonnei

1相, 2相であり, Sh. flex. 3c, 4b においては陰性株と陽性株とが存在しており, 100%陰性のもものは Sh. dys. 1, Sh. flex. 3a, 4, 6, 及び S. typhosa, S. paratyphi, S. schottmuelleri, V. comma 及びその他の腸

第10表 分離菌株の β-Ph. P. 酸反応

菌 種 類	菌 株 数	陽性株数	陰性株数	陽 性 率	
Shigella dysenteriae	1	3	0	3	0%
	2	4	4	0	100%
Shigella flexneri	1a	6	6	0	100%
	1b	16	16	0	100%
	2a	139	139	0	100%
	2b	4	4	0	100%
	3a	32	0	32	0%
	3b	27	27	0	100%
	3c	9	8	1	89%
	4a	2	2	0	100%
	4b	32	25	7	78%
	4 (群抗原不定)	13	0	13	0%
	5	2	2	0	100%
	6	3	0	3	0%
Var. X	1	1	0	100%	
Var. Y	4	4	0	100%	
Shigella sonnei	I相	16	16	0	100%
	II相	11	11	0	100%
Salmonella typhosa	32	0	32	0%	
Salmonella paratyphi	8	0	8	0%	
Salmonella schottmuelleri	7	0	7	0%	
Vibrio comma	15	0	15	0%	
その他の腸内細菌群	938	0	938	0%	

内菌群であつた。吉田氏のいう如き本反応陽性の *E. coli*⁵⁾ は著者等の株で 1 株も見られなかつたが、*E. coli* 0-19 は既に陽性であることは一般に認められている¹²⁾ から、*Escherichia* にも少数の陽性株^{5) 12)} の存在することは間違いない。

11) 谷・吉田培養基の長所及び欠点

第10表の成績からも腸内細菌群中本反応陽性は殆んど *Shigella* に属する菌株で、近年本邦に流行する *Shigella*^{15) 16) 17)} の菌株で *Sh. flex.* 3a を除きすべて陽性である。以上の事実より本反応は *Shigella* の確認診断に重要な意義を有するものと考えらる。

本反応を応用した谷・吉田培養基は確認培養基とし

て *Glucose* 及び *Lactose* の酸形成及びガス産生能、硫化水素の産生能、及び β -Ph. P. 酸反応の確認がたやすく行われ、流行 *Shigella* の確認に優秀な培養基であると信ずるものである。しかしながら一方培養確認には最低24~48時間を要し、菌の分離確認に時間を要する点、他の確認培養基と同様製作が稍々複雑であり、基礎培養基も他の確認培養基と異なり特殊な基礎培養基を必要とする点等が欠点である。その他一般確認培養基と同様、製作後長期の保存は不可で、その確認に正確を期する場合には製作後2週間以内に使用の方が良好の如く思われる。

結 論

1) 谷・吉田培養基の改良法として基礎培養基のペプトンの種類、*Cysteine* 添加量、 β -Ph. P. 酸添加量、B.T.B. の量、初発 pH、滅菌法等を検討し、次の改良法を考案した。

基礎培養基

Peptone (ポリ又は亜鉛)	20gr
NaCl	5gr
Agar	20gr
蒸留水	1,000gr

以上を煮沸溶解し布にて濾過し、pH を 7.6 に修正する。

上記基礎培養基に次の薬品を加える。

<i>Glucose</i>	1gr
<i>Lactose</i>	10gr
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2gr
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08gr
Na_2SO_3	0.4gr
<i>Cysteine</i>	0.3gr
0.2% B.T.B. 液	4~5ml
β -Ph. P. 酸 (10% <i>Alkohol</i> 溶液)	2ml

以上を基礎培養基に加え、1~2分間煮沸し、液量

(稿を終るにのぞみ種々御指導御助言を受けた恩師谷教授に感謝致します。又菌株の御分与を受けた新潟衛生研究所篠川博士に

を修正し、pH を再修正し、小試験管に 3.5~4.0ml ずつ分注する。

滅菌は 100°C 10分間、引続き 110°C 15分間の高圧滅菌を行うか、又は 100°C 30分間3回の間歇滅菌を行う。滅菌後下部 $\frac{1}{3}$ を高層、上部 $\frac{2}{3}$ を斜面とし、無菌試験後使用に供する。

2) β -Ph. P. 酸反应用培養基として、ペプトン (ポリ又は亜鉛) 20gr, NaCl 5gr, 寒天 25gr, 蒸留水 1,000ml, 10% β -Ph. P. 酸アルコール溶液 2ml, 以上を煮沸溶解して、布にて濾過し、pH を 7.6 に修正し、滅菌小試験管に約 3ml ずつ分注する。滅菌は 120°C 20分間高圧滅菌を行い、斜面として使用する。

3) 上記谷・吉田改良培養基及び β -Ph. P. 酸反応試験培養基を使用し、各種腸内細菌の発育性状を検し次の結論を得た。近年本邦に流行する *Shigella* の内 *Sh. flexneri* 3a と 6 を除き他の *Shigella* はすべて陽性菌株である。又他の腸内細菌では著者等は陽性菌株を確認出来なかつた。以上の事より、上記2種の培養基は *Shigella* の確認診断に大なる意義を有するものと考えらる。

感謝致します。)

文 献

1) T. Tani & T. Yoshida: *Japan. J. of Med. Science & Biol.*, 5, 461, (1952) 2) 百瀬: *衛生学伝染病学雑誌*, 26, 609, (1930). 3)

吉田耕: 十全医学会雑誌, 53, 755, (1952). 4) 吉田耕: 十全医学会雑誌, 53, 770, (1952). 5) 吉田耕: 十全医学会雑誌, 54, 132, (1952).

- 6) 吉田耕 : 十全医学会雑誌, 54, 309, (1952).
7) 吉田耕 : 十全医学会雑誌, 54, 325, (1952).
8) G. D'Alessandro, R. Comes : Boll. Soc. It. Biol. Sper., 25, 1309, (1949). 9) G. D'Alessandro, R. Comes : Boll. Soc. It. Biol. Sper., 27, 1748, (1951). 10) G. D'Alessandro, R. Comes : Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 31, 1, (1952). 11) G. D'Alessandro, R. Comes : Atti VI Congr. Internaz. di Microbiologia, Roma, 6-12 settembre, (1953). 12) G. D'Alessandro, R. Comes : Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 34, 468, (1955). 13) G. D'Alessandro, R. Comes : Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 35, 202, (1956). 14) M. Cafalù : Z. Hyg. u. Inf. 141, 421, (1955). 15) 中村正夫・田代実 : 十全医学会雑誌, 54, 511, (1953). 16) 厚生省 : 公衆衛生, 16, (No. 1), 6, (1954). 17) 川崎浩等 : 十全医学会雑誌, 57, 1835, (1955).