

アミノ酸加培地に於ける普通大腸菌の 変異に関する研究

金沢大学医学部細菌学教室(主任 谷教授)

専攻生 窪田保

Tamotsu Kubota

(昭和27年11月20日受附)

第1章 緒言

種々なる無蛋白培養基が創製されて以来、細菌の発育と「アミノ酸との関係に就いては先人の¹⁾²⁾³⁾が数多く研究し來れる所なり。然るに、「アミノ酸によりて細菌が如何なる変異を惹起せらるるやに就いての研究は甚だ少し。1951年 Braun 及び Robert⁴⁾等は、鼠チフス菌感染海猿に「スレオン」を注射することにより該菌の毒力上昇を報告し併せて生物学的性状の変化をも報告せり。私は広く「アミノ酸による細菌

の変異を知らんと欲し、培地に各種「アミノ酸」を加え、これに細菌を累代培養して実験し聊か知見を得たり。依つてここに報告し大方の御批判を乞わんとす。(初め腸内細菌等19種類の細菌を用いたるも、無蛋白培地に継代培養可能なる菌は、普通大腸菌、パラチフスB菌、ゲルトネル菌、緑膿菌及び枯草菌にて、その中変異の現れたるものは普通大腸菌のみなり。従つてこの菌に就いて記載す)

第2章 実験方法

第1節 使用アミノ酸

使用せる「アミノ酸は次の10種類にして、「ミノファーゲン製薬のものなり。

- | | |
|--------------|--------------|
| 1) L-アスパラギン | 6) L-チステイン |
| 2) β-アラニン | 7) L-塩酸ヒスチジン |
| 3) L-塩酸アルギニン | 8) dl-メチオニン |
| 4) グリコール | 9) L-リジン |
| 5) タウリン | 10) L-ロイチン |

第2節 使用培地

基礎培地として次の合成培地⁵⁾を作り、これに各種アミノ酸を0.15%の割合に加えたものを使用培地と

し、対照としては「アミノ酸を加えざるものを使用せり。

基礎培地

Na ₂ HPO ₄	2.5g	KH ₂ PO ₄	0.35g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.5g	NH ₄ Cl	0.5g
FeSO ₄	0.001g	MgSO ₄	0.001g
葡萄糖	2.0g	蒸溜水	1000cc
pH7.2 100°C 15分3回 間歇滅菌			

第3節 培養方法

普通大腸菌を隔日に継代培養す。

第3章 実験成績

第1節 細菌の発育状態

L-チステイン加培地に於ては常に対照培地に於けるより発育は不良なり。その他の培地に於

ては対照と同様によく発育す。

第2節 集落の状態

L-塩酸アルギニン加培地 42代通過菌に於ては

大小2種の集落を生ず。小なる集落は対照菌と近似し、円形灰白色半透明、直径約0.5~1.0mmなり。大なる集落は灰白色不透明、辺縁は稍不規則、表面稍凸凹あり直径約1.5~2.0mmなり。この大集落を普通寒天培地及び2%可溶性澱粉加寒天培地に10代継代培養するも原型には復帰し難し。即ち相当に固定性あるものと思わる。

今これらの菌に就いてS~R型鑑別反応を行えば、第1表に示す如く、小集落は3反応共に陰性、大集落は陽性を示す。

第1表 l-塩酸アルギニン加培地42代通過菌のS~R型鑑別反応

反 応	集 落	
	小集落	大集落
Millon 反応	—	+
重金属イオン反応	—	±
Trypaflavin 反応	—	+

註：重金属としては10%硫酸銅及び5%硝酸銀溶液を使用す。(以下同様)

l-塩酸ヒスチジン及びl-リジン加培地42代通過菌に於てもl-塩酸アルギニン加培地に於けると同様の集落を生ず。

dl-メチオニン加培地42代通過菌は極めて微小なる集落を生じ、正円形半透明、直径は0.2~0.4mmなり。70代継代培養するも同様の集落を生ず。

タウリン加培地60代通過菌は大小2種の集落を生じ、小集落は対照と同様にして円形灰白色、大集落は灰白色不透明にして小集落の約3~4倍大、直径は3~4mmなり。この大集落を2~3日放置すれば、周辺に1個の球頭を作る

第2表 タウリン加培地60代通過菌のS~R型鑑別反応

反 応	集 落	
	小集落	大集落
Millon 反応	±	+
重金属イオン反応	—	+
Trypaflavin 反応	—	+

ものあり。この球頭を穿刺し斜面寒天に植え生

物理的性状を検するも特記すべき所見を得ず。

上記2集落に就きてS~R型鑑別反応を行えば第2表に示す如く、小集落はMillon反応弱陽性、他の2反応は陰性、大集落は共に陽性なり。

第3節 形態的観察

l-塩酸アルギニン加培地50代通過大集落菌は大小不揃いの桿菌伸張し糸状形をなすものあり、又2~3個或は数個連鎖をなすものあり。

l-塩酸ヒスチジン及びl-リジン加培地50代通過大集落菌は中央部稍膨化せる感を与え両端は鈍にして濃染性なり。

タウリン加培地60代通過大集落菌は染色性一般に不均等なり。

dl-メチオニン加培地通過菌は形態的には著変を認めず。

グラム染色に於ては、何れも変化を認めず。

第4節 糖類分解試験

糖類分解試験を行うに當りては、各菌を普通

第3表 タウリン加培地通過普通大腸菌の糖類分解試験

菌 名	普通大腸菌			変性集落小	変性集落大	変性集落小	変性集落大
	培 地		タウリン加培地				
	対 照	右各世代		20	45	70	70
Arabinose	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Xylose	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Rhamnose	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Glucose	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Saccharose	—	—	—	—	—	—	—
Maltose	⊕	⊕	—	—	—	—	—
Lactose	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Dulcitol	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Sorbit	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Mannit	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Inosit	—	—	—	—	—	—	—
Salicin	⊕	⊕	—	—	—	—	—

註：+=分解 —=非分解 ○=ガス形成
普寒10=タウリン加培地70代通過菌を普通寒天培地へ10代培養

寒天培地に 37°C 20時間培養せる菌を用い、糖加培地として、変法 Barsiekow 培地を用う。

(使用種類は12種(武田)観察期間は2週間とす)

タウリン加培地通過菌の糖類分解試験を行えば、第3表に示す如く、20代まで、対照菌と異なる所なし。45代以後に於ては Maltose 及び Salicin に対する分解能力を消失す。

次にL-ロイチン加培地通過菌の糖類分解試験を行えば、第4表に示す如し。20代に於ては未

第4表 L-ロイチン加培地通過普通大腸菌の糖類分解試験

菌名	普通大腸菌					
	培地	対照	L-ロイチン加培地			普寒
糖類	継代数	右各世代	20	45	70	10
Arabinose		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Xylose		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Rhamnose		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Glucose		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Saccharose		—	—	—	—	—
Maltose		⊕	⊕	—	—	—
Lactose		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Dulcitol		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Sorbit		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Mannit		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Inosit		—	—	—	—	—
Salicin		⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

註：⊕=分解 —=非分解 ○=ガス形成
普寒10=L-ロイチン加培地70代通過菌を通普寒天培地へ10代培養

だ対照菌と異なる所なし。然れども45代以後に於ては Maltose に対する分解能力を消失す。而して共に相当固定性あるものの如し。

その他の生物学的性状として、Imvic 系試験牛乳凝固、ゲラチン液化及び硫化水素発生試験を行いたるも原型菌と異りたる所見を認めず。

第6節 血清学的観察

変性集落菌が原型菌免疫血清に対し如何に凝集せられるかを知らんと欲し、70代通過菌に就いて凝集反応を行えば、第5表に示す如く、対照菌は1600倍まで凝集せられるに反し、アミノ酸加培地通過変性集落菌は何れも400倍以上に於ては凝集せられず。

第5表 アミノ酸加培地70代通過変性集落菌の凝集反応

アミノ酸加培地通過菌		稀 積				
		100	200	400	800	1600
L-塩酸アルギニン	大集落菌	++	+	—	—	—
	小集落菌	++	+	+	—	—
タウリン	大集落菌	++	+	±	—	—
	小集落菌	++	+	+	—	—
L-塩酸ヒスチジン	大集落菌	+	±	—	—	—
	小集落菌	+	+	+	—	—
L-リジン	大集落菌	++	+	±	—	—
	小集落菌	++	++	+	—	—
dl-メチオニン		++	++	+	—	—
対照菌		++	++	+	+	±

第4章 総括並びに考按

無蛋白培地に種々なる「アミノ酸を加えて、これに普通大腸菌を継代培養して前述の如き実験成績を得たり。これを次の如く総括し考按す。

1) 菌発育状態

アミノ酸加培地に於ける細菌の発育状態に関しては、富永¹⁾、桑原²⁾等の精細なる研究ありて、多くの「アミノ酸はその適当量の存在に於

ては細菌の発育を良好ならしむと。私は培地に0.15%の割合に「アミノ酸を加えて菌発育状態を観察するに、L-チステイン加培地に於ては発育不良なるも他に於ては何れも良好なる結果を得たり。

2) 集落の変化

アミノ酸加培地に普通大腸菌を継代培養すると変性集落を生ずるものあり。即ち10種類の

「アミノ酸を用い、L-塩酸アルギニン、L-塩酸ヒスチジン、L-リジン、dl-メチオン及び「タウリン」の5種加培地に夫々変性集落を生ず。而して変性集落の発現に、早きは、L-塩酸アルギニン加培地に於ける42代、遅きは「タウリン加培地に於ける60代なり。

変性集落2種の中一つはS型、他はS~R型なるもの多し。

アミノ酸の化学的組成とは特別の関係を認め難し。

3) 形態の変化

変性を生ぜる菌の形態は大小不揃いのもの多く、染色性も不均等となり連鎖をなすものあり、グラム染色性は不変なり。

集落の変化との関係を見るに、集落の変化と共に形態的变化を来すもの多し。ただdl-メチオン加培地通過菌は集落の変化を来すも形態

的には変化を来さず。

4) 糖類分解作用の変化

タウリン加培地通過菌は、45代以後に於ては Maltose 及び Salicin に対する分解能力を消失し、L-ロイチン加培地通過菌は、45代以後に於て Maltose に対する分解能力を消失す。

集落の変性と糖類分解作用の変化との関係を見るに、「タウリン加培地通過菌は集落の変化と共に糖分解作用にも変化を来す。然れ共L-ロイチン加培地通過菌に於ては、かくの如き現象を認めず。蓋し集落の変化と糖分解作用の変化とは必ずしも平行するものに非ず。

5) 血清学的変化

変性集落菌と原型菌免疫血清との間に凝集反応を行えば、何れも対照菌より相当に被凝集性が低下す。即ち対照菌が1600倍まで凝集せらるるに反し、被検菌は200~400倍の凝集なり。

第5章 結

論

1) 「L-チステイン」により普通大腸菌は発育を抑制さる。

2) 集落変化と菌の形態変化とは略々平行するもの如し。

3) タウリン加培地通過菌は Maltose 及び Salicin に対する分解能力を失い、L-ロイチン加培

地通過菌は Maltose に対する分解能力を失う。

4) 変性集落菌は原型菌免疫血清に対して被凝集性が低下す。

擧筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲とを賜りたる恩師谷教授に深謝す。

主要文献

- 1) 富永：衛生学伝染病学雑誌，23，4：543，1927.
- 2) 牧野：成医会雑誌，59，647：251，1940.
- 3) 桑原：最新医学，3，7：45，1948.

- 4) Robert and Braun：J. Bact.，62，5：639，1951.