

〔特別掲載〕

(東女医大誌第30巻第9号)
(頁1665—1674昭和35年9月)Salmonella pullorum の短時間振盪
培養に関する研究

主として Cytomorphosis について

千葉県血清研究所 (所長 越後貫 博)

成 田 亮 一
ナリ タ ヲウ イチ

(受付 昭和 35 年 7 月 7 日)

1. 緒 言

多くの細菌が好適培地で増殖する際に、その増殖過程に細菌細胞の変化、すなわち Cytomorphosis (細胞変態) があることを Henrici (1925)⁹⁾ が提唱し、その後 Dubos (1949)⁵⁾ らが支持している。しかしながらこの細胞変態は、菌種によっておおむね一定のように考えられてきたために、これに種々の相があることは殆んど検討されていないようである。従つてこれを知ることは、単に菌種の形態学的分類に重要であるのみならず、発育代謝の様相を知る指標としても意義があると思われるので、細菌の形態学的研究に比較的便利な振盪培養法を用い、*Sal. pullorum* の細胞変態について種々検討し、3の知見を得たので報告し、御批判を仰ぐ次第である。

2. 実験材料および実験方法

2の1 培養方法

使用菌株：*Salmonella pullorum* の Standard-type は 9—25 株を主とし、中村株を従とし、Variant-type としては L 6013 株を用いた。

振盪培養方法；気温 37°C で、円振式振盪培養機を用い、1分間 90 回転で培養を行なつた。

培地：培地はいずれも 500 ml の三角コルベンに 200 ml 入れ、15 ポンド 15 分滅菌した。使用培地の組成は次の通りである。

1) Difco Nutrient Broth 或は榮研の乾燥ブイヨン (肉エキス 5g, ペプトン 10g, 塩化ナトリウム 5g, 溜水 11) を溜水に溶解後 pH 7.2 に修正。

2) YCC ブイヨン：肉エキス 5g, ペプトン 20g, 食塩 2g, 磷酸水素 2 カリ 2g, 塩酸シスチン 0.2g, 亜

硫酸ソーダ 0.2g, ブドウ糖 2g, カゼイン水解液 50ml, 水 950 ml, pH 7.4。

3) 合成培地；食塩 2g, 第一磷酸カリ 2g, 第二磷酸ソーダ 2g, クエン酸アンモン 0.4g, ブドウ糖 2g, 塩酸シスチン 0.2g, ビタミンフリーカザミノアシド 0.2g, ニコチン酸 0.001g, 溜水 11, pH 7.4。

4) 培養濃液 (老發培地)；Difco 培地に菌液を培地量に対して 1% の割 (含有菌数 100 万/ml 前後) に接種し、ただちに振盪培養を行ない、所定の時間後に培養液を遠沈次いで Seitz 濾過器で濾過し、無菌としたもの。

2の2. 種培養。

斜面寒天から 2 白金耳撮取り、前記振盪用培地に接種し、37°C 18 時間静置培養したものを種菌とした。接種菌量は特に断わりのない場合は、上記の種菌を培地量 200 ml に対して 1% の割に接種した。

2の3. 菌数計算法。

振盪管から必要量を吸いとり、試験管に移し、ただちに氷のはいた硝子円筒に立て別室で直ちに菌数を計算した。計算法は、あらかじめ普通ブイヨン 4.5 ml を入れた試験管に、前記培養 0.5 ml を加えて 10 倍にし、以下 10 倍稀釈を行なつた。この 0.5 ml を 50°C に保つた普通寒天に移し、よく混和後、平板になし、37°C に 24 時間培養した。同じ平板を 3 枚作り、発育した集落数を平均した。

2の4. 菌の長さの測定法。

本菌培養の一滴をスライドガラス上に落して広げ、風乾後ライト液で染色した。時には 80% エタノールで固定し、ギムザ液で 30—40 分染色、水洗風乾後、アセト

Ryoichi NARITA: (Chiba Prefectural Serum Institute) Studies on very young bacterial cells of *Salmonella pullorum* grown in various media by shaking apparatus with special references to cytomorphosis.

ン、エタノール等量液で分別する。分別後直ちに水洗風乾する渡辺変法により染色された標本について、細胞膜がくびれていないことが確実に観察されたものを一個とみなし、その200個を有蓋法で測定して平均値を出し、菌測定のかたよりを避けるように努めた。

2の5. 電子顕微鏡写真について。

培養液を遠心して集菌し、蒸留水で3回洗浄し、最後の沈渣(菌)をコロジオン膜にのせ風乾後、オスミウム酸で固定することなく、日立HU9で電顕写真を撮影した。

3. 実験成績

3の1. Difco 培地とYCC培地の増殖菌数と細胞変態について。

Sal. pullorum の増殖能が高く、比較的一定な培地性状の条件がえられる Difco の乾燥ブイヨン培地と、一定の条件は得難いが、Difco 培地よりも増殖能がすぐれているYCC培地とをえらび、これを比較して、増殖曲線と細胞変態を求めた。

両培地とも60分頃から対数増殖期にはいり、Difco培地では5時間目頃から増殖が衰え、終末培養時間に2億前後の生菌数が、YCC培地では終末培養時間まで対数増殖を示し、終末菌数がおおむね20億であった。

細胞変態は、培養開始直後から菌の大きさが増しはじめ、両培地とも3時間目に菌の長さが最大で、その後時間と共に漸次大きさを減ずる傾向がみられた(図1, 2 附図1参照)。

別に2, 3, 4, 5, 7時間目の夫々の発育菌の長さの数値をプロットしたところ、両培地とも菌の長さの分布はおおむね同様な傾向がみられ、3時間目に最長となり、Difco 培地では9 μ 、YCC培地では14 μ であった。次いで菌の大きさは減じ、培養時間の経過に伴いかなり均一な短い菌となる(図3参照)。

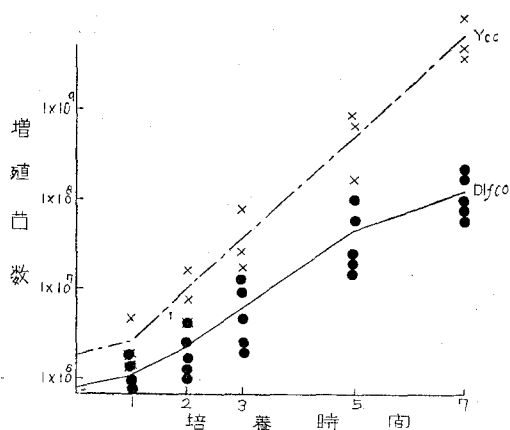


図1 Difco Broth と YCC Bouillon に於ける増殖菌数

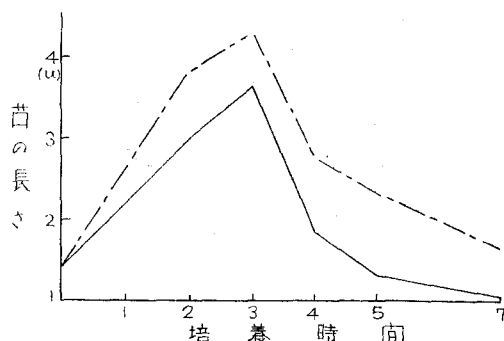


図2 同上培地の細胞変態

培地と菌の長さとの関係は、常に Difco 培地よりも YCC 培地に菌の長いものが多かった。

発育菌の連鎖の数は、細胞変態の最大な時期に最も多く、細胞変態の相におおむね一致している。すなわち対数増殖期に菌の長さの増大と、減少の細胞変態が認められることを知った。

3の2. 各種培地における増殖と細胞変態

この様に細胞変態が常に一定の傾向を示したが、組成の異なる培地ではどの様になるかを知るために、Difco, YCC, 榮研, 合成培地の4種の培地で実験を行なった。菌の増殖能はYCC, 榮研, Difco, 合成培地の順であったが、細胞変態はいずれの培地でも同一の傾向を示し、培養3時間目がピークで、その後急速に菌の長さを減じた。しかし各培養時間の細胞の長さの平均値は、増殖能のよい培地ほど大で、培地の増殖能と発育能とは互に平行関係を示した(図4, 5参照)。

3の3. YCCブイヨンの発育促進物質の検討。

発育能の最もすぐれたYCC培地について、その培地組成の elimination test を行ない、YCC培地の発育促進物質の検討を行なった。その方法は、YCC培地の組成を基そ培養液(食塩2g, 磷酸水素2カリ2g, 亜硫酸ソーダ0.2g, ブドウ糖2g), 肉エキス・ペpton, カゼイン水解液, 塩酸シスチンと種類に大別し、対照のYCC培地からこれらの培地成分を順次抜き取り、5種類の培養液を調製し増殖能および発育能を比較した。

その結果増殖能は、いずれの培養液も対照のYCC培地に及ばず、肉エキス・ペpton培養液がこれに次ぎ、カゼイン水解液単独培養液が最も劣っていた。これに反し発育能は、カゼイン水解液を含む培養液は、これを含まない培養液よりも高く、しかもカゼイン水解液のみの培養液が、これを含まない培養液よりも高かった。

細胞変態は、いずれの培地も最大時期が培養3時間目で、対照のYCC培地と全く一致した。従ってカゼイン水解液は、YCC培地の発育促進と関係があるが、変態とは無関係の様である(図6, 7参照)。

3の4. カゼイン水解液の発育促進について。

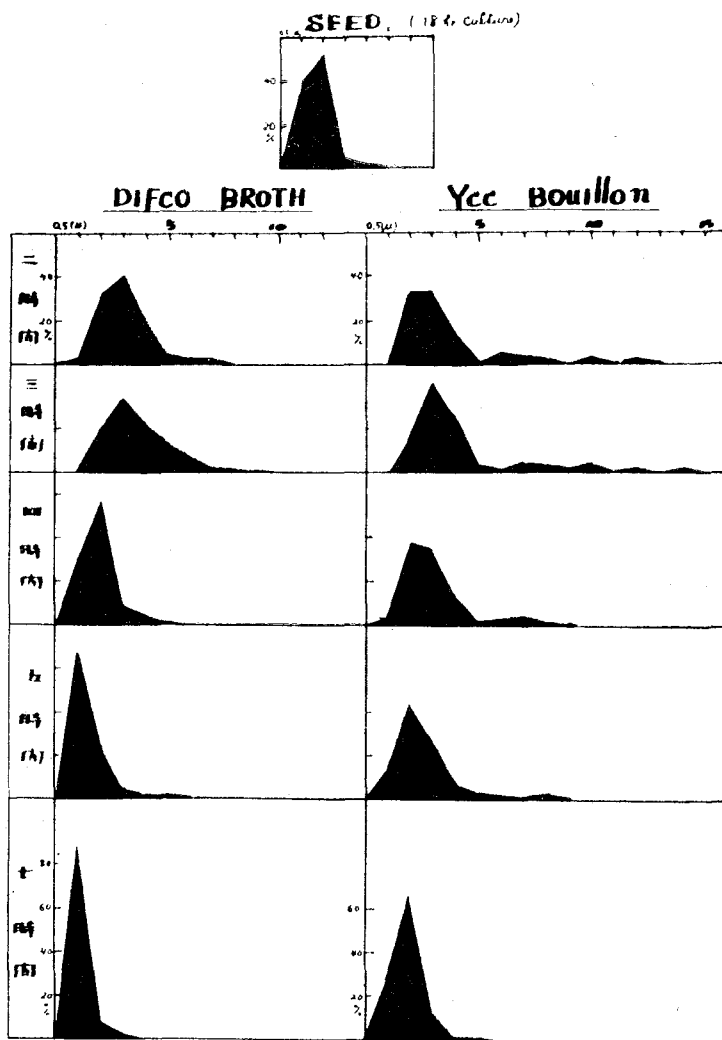


図3 培養時間に伴う菌の長さの分布

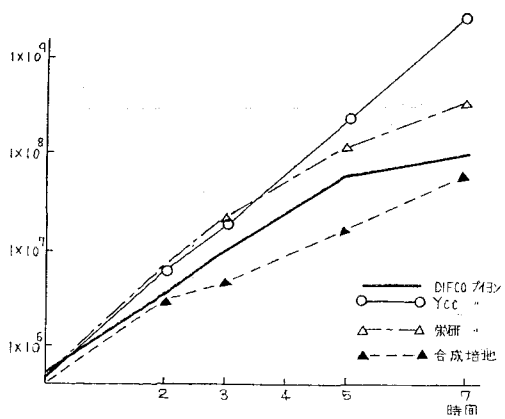


図4 各種培地の増殖能の比較

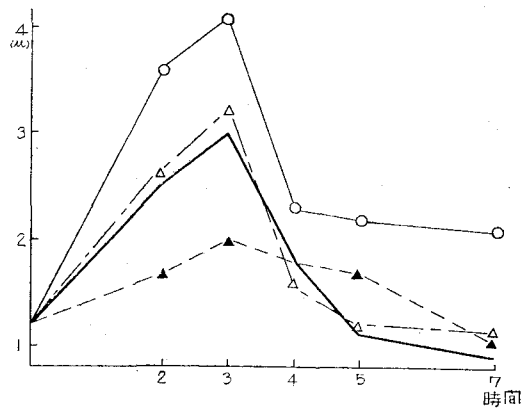


図5 同上培地の細胞変態の比較

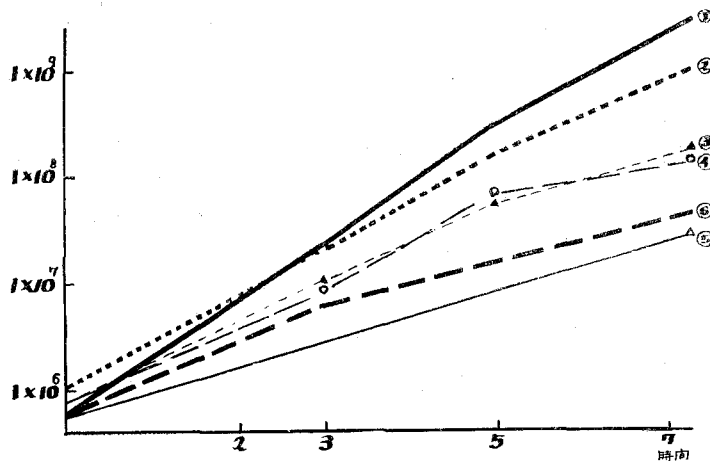


図6 YCC ファイオンの elimination test による増殖能の比較

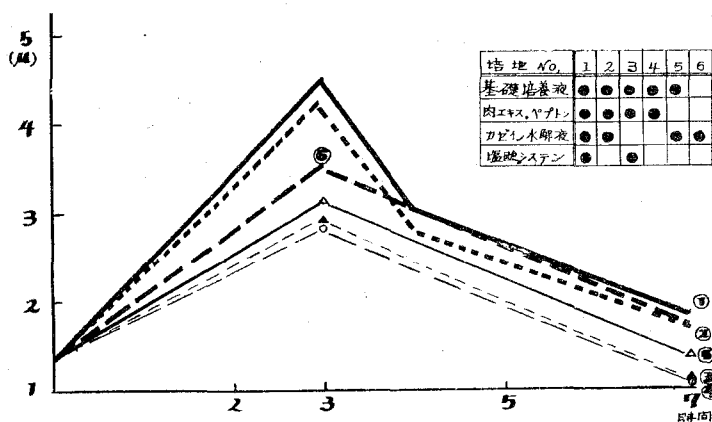


図7 同上 発育能の比較

YCC培地の発育促進物質を検討したところ、カゼイン水解液であることが考えられた。そこで合成培地にこれを5%の割合に添加したものと、これを加えない合成培地の発育能を比較した。

すなわちカゼイン水解液加合成培地の細胞変態も、最大時期が培養3時間目で、YCC培地や合成培地のそれと一致するが、各時間の菌の長さは、カゼイン加合成培

地ではYCC培地と近似で、合成培地でははるかに短少であった。このようにカゼイン水解液は本菌の発育を促進した(図8, 9参照)。

3の5. 培養濃液における細胞変態。

培地条件を変えた場合の細胞変態に及ぼす影響を知るために、振盪培養を行ない所定の時間の除菌した培養液に、再び種菌を接種した。

その成績は、いずれの培養濃液も対照と同様に対数増

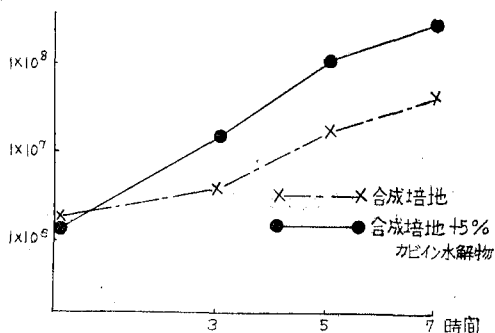


図8 カゼイン水解物と増殖

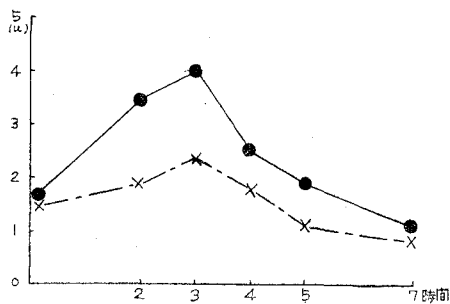


図9 カゼイン水解物と細胞変態

殖を示したが、前培養の長かつたもの程増殖能がやや劣っていた。

菌の長さは、最長となる時間が対照より早いものがあり、その長さは対照に及ばず、また前培養の長いもの程、各培養時間の菌は短少であつた。特に7時間培養の濾液では、菌が対数増殖を示すのに殆んど菌の長さを増すことなくかえつて短くなつた。このことから増殖能と発育能は異なるものであることを知つた(図10, 11参照)。

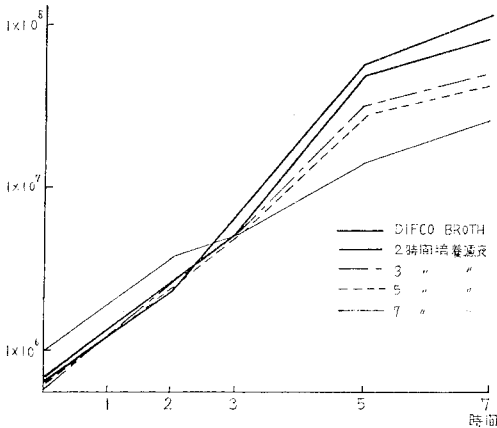


図10 振とう培養濾液の増殖

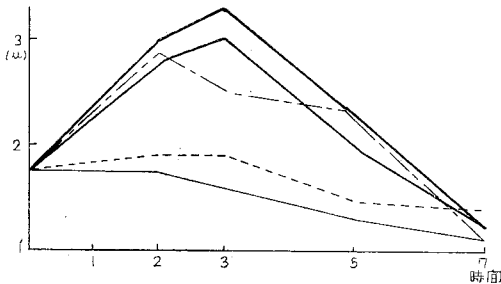


図11 同上濾液の細胞変態

3の6. 接種菌量の増殖および細胞変態におよぼす影響。

細胞変態の最大時期を任意の培養時間に求め得るかを
知る目的で、Difco 培地に種菌を培地量の5, 1, 0.2%
の割合に接種した。

増殖曲線はいずれも平行を示したが、接種菌量が多い
程増殖度が高く、菌の最長となる時間も早くみられた。
すなわち5%が2時間目、1%が3時間目、0.2%が5
時間目にそれぞれ細胞変態の最大時期があつた。

また長い菌は接種菌量が少ないもの程多く、0.2% 接
種例では 15~20 μ の長大な菌もみられた。このように
接種菌量が異なると細胞変態の相が著しく変動すること
が判つた(図12, 13 附図2参照)。

3の7. 接種菌量と接種菌の大きさが異なる場合の細胞
変態。

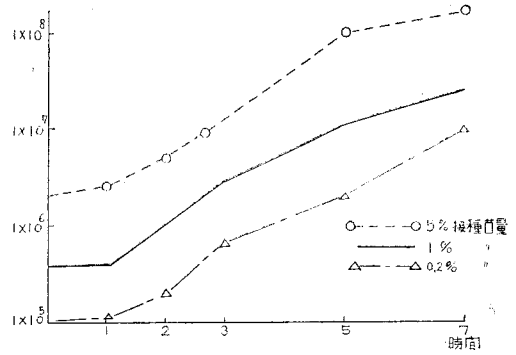


図12 接種菌量と増殖

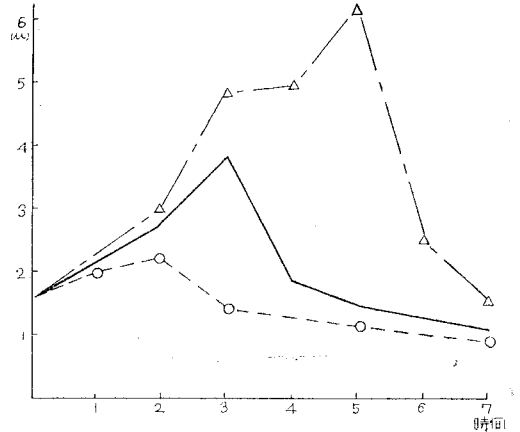


図13 接種菌量と細胞変態

上述の成績から菌数が $10^7/ml$ 前後になると、菌は短
小の時期となるので、接種菌量を調節し、出発菌数を
 $10^7/ml$ とした場合と、終末培養時間に $10^7/ml$ 以下に
なる様にした場合とで細胞変態を検討した。後者の場合
種菌は、振盪培養3時間目の長い菌と、18時間静置培養
の短い菌の2例について行なつた。

増殖は、前者においておおむね培養2時間目頃まで対
数増殖を示し、殆んど平行曲線であつた。細胞変態は、
前者では最大時期が培養、1時間目で、その後は短小時期
に移行し、一層短小となつた。後者では、長い菌を接種
した場合は最大時期がおおむね培養3時間目で、短い菌
のそれは培養4時間目にみられた。

培養過程に伴う菌の長さは、長い菌を接種したもの
が一層長大で、60 μ 前後の菌も認められた(図14, 附図
3)。

3の8. 細胞分裂の電子顕微鏡写真像

振盪菌の電顕像は、増殖過程を通じて Density の高
い菌体の周囲を Density の低い菌膜がとりまいてみられ
る。分裂に際しては、始め菌体および菌膜にくびれを生
じ、次いで菌体のくびれが両方に引張られた様に細長く
なり、さらにのびて糸の様になり、ついで切断される。

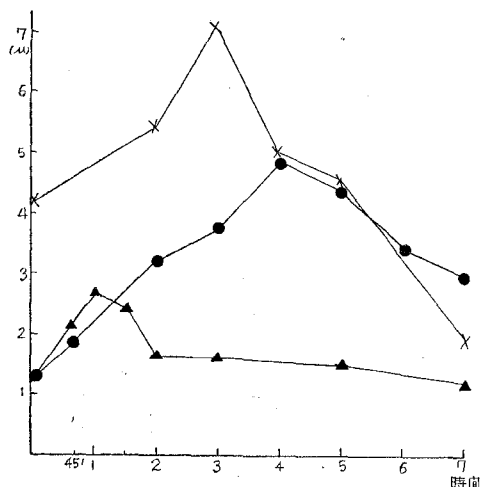
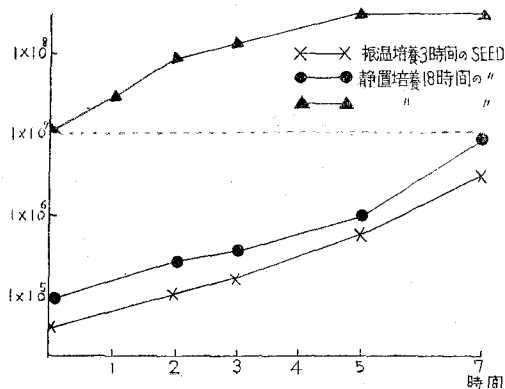


図 14 接種量及び接種菌の長さを異にする場合の細胞変態

この様な分裂様式は本菌の細胞変態の各時期にみられ、最大時期あるいはその前後では、長大な菌の一端に近い部分がくびれ始め、最初のくびれが切斷しない間に逐次くびれを生じ、これが連鎖としてみられる様相が認められた。

短小時期の培養時間を 15 分間隔で精細に観察してみると、短桿菌の中央部にくびれを生じ、それが引張られた様にのびて糸の様になり、菌体が 2 分するものが多いとみられる。

従つてこの時期では、長い菌が分裂して短い菌を形成したのでなく、短桿菌が短いままで 2 分することがわかる。また細胞変態の電顕像と光学像は、全く一致した(附図 4 参照)。

4. 考 察

細菌細胞の増殖過程において、その大きさが著しく変化するという報告はかなり古くから多くある。すなわち Clark & Ruehl (1919)⁴⁾ は *Corynebacteria* と鼻疽菌を除いた 37 種 (70 株) の菌のすべてが、培養初期に細胞の大きさが著しく増すことを示した。その後 Wilson

(1926)¹⁵⁾ も *Sal. aertrycke* に同様な所見を認め、さらに Jensen (1928)¹⁵⁾ も *E. coli* の個々の細胞を精細に観察し、Lag phase では分裂がないのに發育することを報告した。これらの知見は、Henrici (1921)⁷⁾, Adolph (1932)²⁾, Alper & Sterne (1933)³⁾, Hershey & Bronfenbrenner (1938)¹¹⁾ らに支持されている。

この様に初期の研究は、細胞の極大時期が發育環のどの時期に相当するかが重要であつた。この問題について Jensen は *E. coli* では個々の細胞が最大になつた後、対数増殖を示すとし、他方 Henrici (1924)⁸⁾ は *E. coli* が対数増殖の中間に最大になつたと報告し、Jensen の成績と異なつた所見を發表している。さらに Henrici (1928)¹⁰⁾ は *B. megatherium* では、誘導期に菌が大きくなり始め、対数増殖期の直後最大となり、ついで徐々に短くなつたとし、菌種によつても度があることを示している。

最近 Dubos (1949) は細胞の平均の大きさは、誘導期に増し始め、増殖率が最大になる以前に極大となり、対数増殖期に減少するとし、しかも若干の例外を除いたすべての細菌種が同様な傾向を示すと記載している。

著者の実験は振盪培養であるために、直ちに静置培養と種々な問題を比較討論することは危険であるが、振盪培養では集団の菌の平均の大きさの最大時期はおおむね対数増殖期の中間で、Henrici が *E. coli* で得た成績とかなり一致した。

Sal. pullorum の形態変化について Wilson (1937)¹⁵⁾ の静置培養による各種培地による報告があるが、細胞変態については系統的ではない。著者は振盪培養方法で短時間に菌の發育過程を知り、且増殖と分裂とを容易に比較できた。すなわち、一般に組成の異なる培地間では、増殖能のすぐれた培地程、菌の發育もまさり両者の間に平行関係がみられた。しかし YCC 培地の elimination test による發育能の比較実験において、カゼイン水解物単独培養液は、肉エキス・ペプトン培養液に比べて増殖能が劣るのに、發育能が高いことが異例であつた。このことはカゼイン水解液が YCC 培地の發育促進物質であることを暗示している。

また同一培地に異なる菌量を接種した場合は、増殖曲線が平行関係にあるのに、接種菌量の少ない程長い菌が多くみられた。さらに老廃培地では増菌はするが、殆んど菌が大きさを増すことなく菌の發育を認めなかつた。これらのことから培地の増殖能と發育能とは異なるように考えられる。また老廃培地では、菌が長くならないのに菌の分裂がみられることは、菌が最大に發育した直後に分裂するという通説の例外であると考えられる。

發育中の細菌の大きさは、遺伝的特質、および環境因子の影響を受けるといはれているが Probisher (1926)⁶⁾, Henrici (1921) らは、それぞれ液内表面張力を変えた場

合に、細菌の大きさが変ることを提唱している。著者はこの細胞変態を規制する条件を検討したところ、特に接種菌量を変えた場合と、培養後除菌した培地に培養した場合に発育最大時期が変動し、菌の大きさも変化した。このことから接種菌量および培地の発育素の不足が細胞変態に影響を与えるものと考えられる。

Lamanna (1953)¹⁴⁾ は " 分裂は発育に左右されるのに、その分裂は発育とは無関係に変わりうる " ことを強調し、細菌の発育代謝機構の複雑さを暗示している。著者も分裂、増殖、発育の相関を振盪培養法で、この方面から観察した。

5. 結 論

1) 振盪培養によれば、短時間に発育と増殖との関係が容易に観察され、*Sal. pullorum* の増殖過程特に対数増殖期に細胞変態がみられる。

2) 同種培地および組成の異なる各種培地に、一定な菌量を接種すれば、細胞変態の発育最大時期が一致し、接種菌量を変えた場合と老廃培地に培養した場合にこれが規則的な変動を示した。

3) 菌の大きさは、接種菌量の少ない程大で、長い菌を接種すれば、一層長連鎖状を呈するものがみられる。

4) 発育能のすぐれた Y C C 培地の組成のうちで、最も菌の発育を促進した物質は、カゼイン水溶液であった。

5) 短小時期に入つた菌は、短いままで 2 分し、長い菌が分裂して短小となるものではなく、電顕像においてもこのことが認められる。

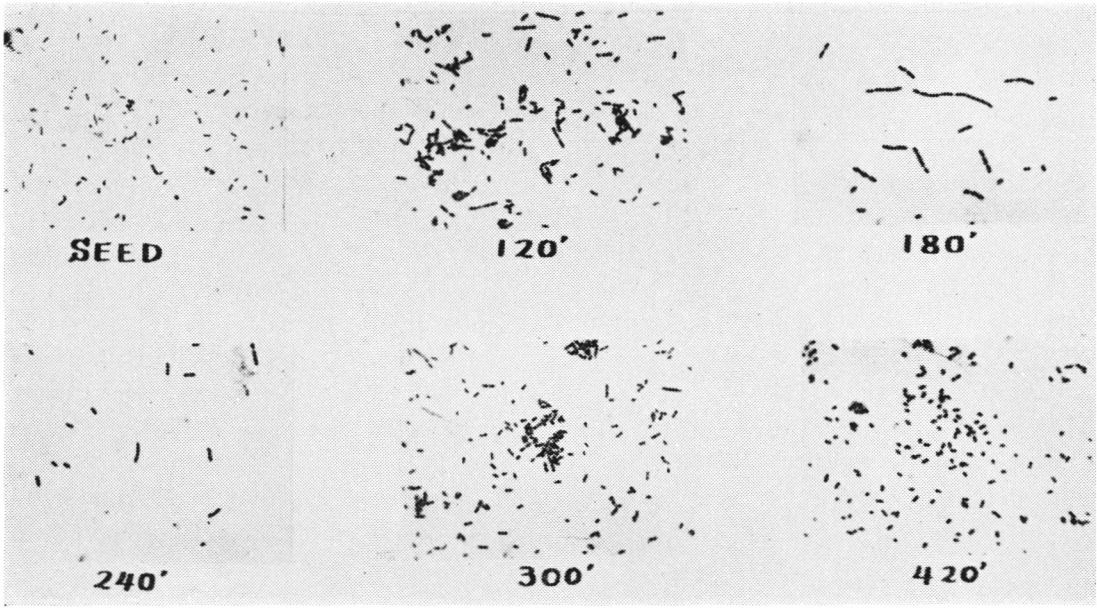
6) 培地内における菌の増殖と発育とは、その代謝が異なるものの様に考えられ、特にこのことが老廃培地において所見された。

稿を終るに当たり、御指導及び御校閲を賜つた農林省家畜衛生試験場渡辺守松部長、御協力と御教示を賜つた青木真治博士に厚く感謝の意を表します。尙論文は第 12 回日本細菌学会関東支部会で口演した。

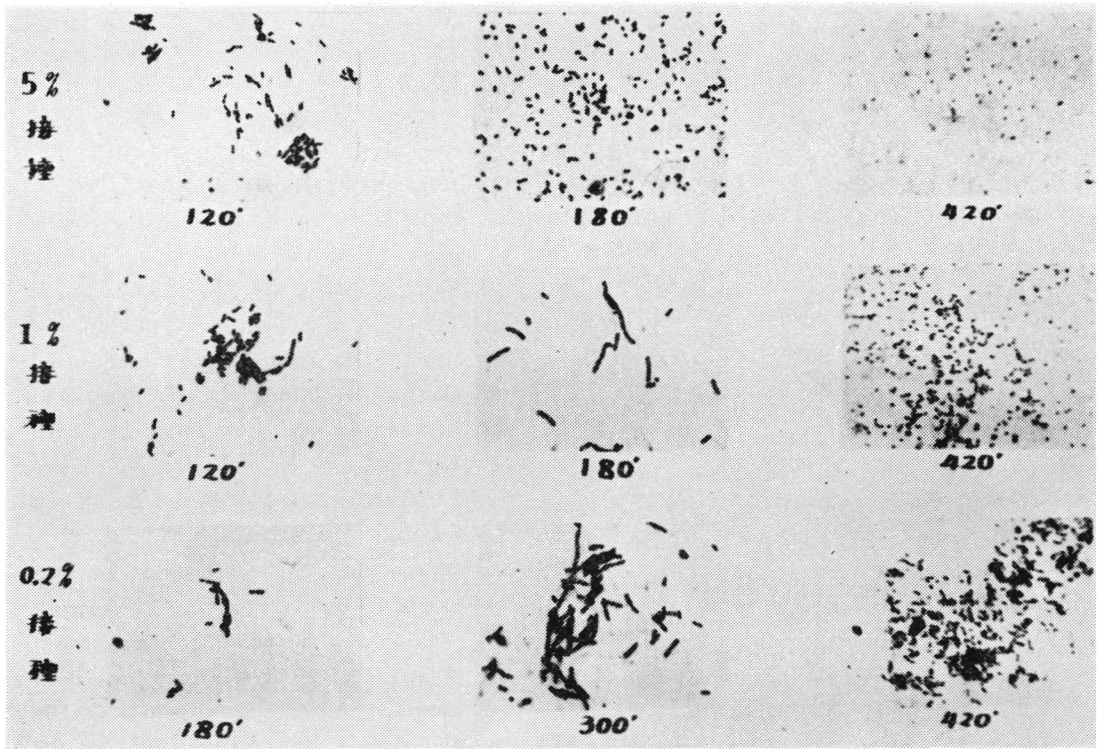
文 献

- 1) 青木真治・成田亮一・渡辺守松：炭そ菌の短時間接盪培養に関する研究 家畜衛生試験場研究報告 34 11 (1958)
- 2) Adolph, E.F. & Bayne-Jones, S. : Growth in size of microorganisms measured from motion picture. II *Bacillus megatherium*. J. Cell. comp. physiol., 1 409 (1932)
- 3) Alper, T. & Sterne, M. : The measurement of the opacity of bacterial culture with a

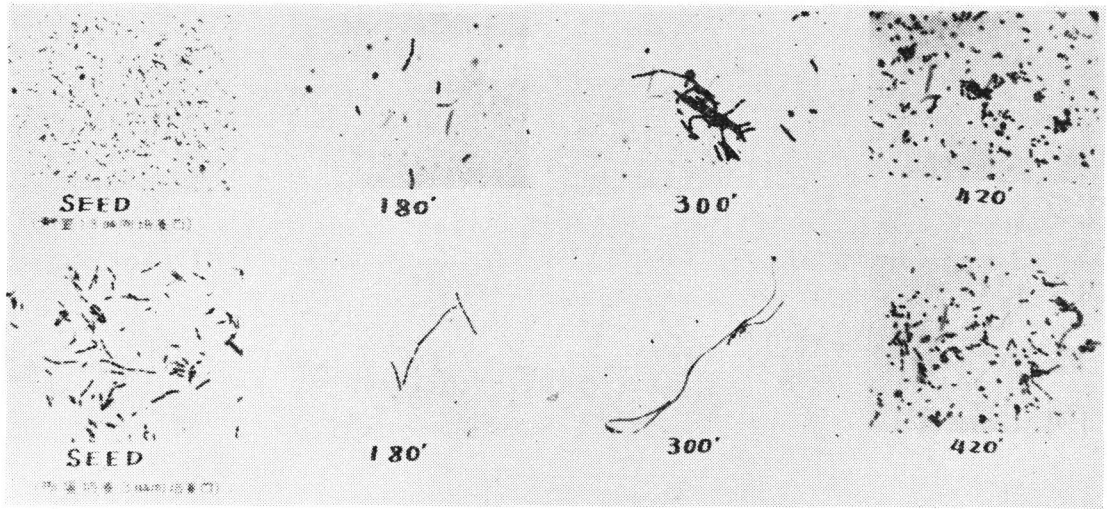
- photo-electric cell. J. Hyg., 33 497 (1933)
- 4) Clark, P.F. & Ruehl, W.H. : Morphological changes during the growth of bacteria. J. Bact., 4 615 (1919)
- 5) Dubos, R.J. : The bacterial cell. V. Variability of the bacteria. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1949
- 6) Frobisher, M. : Relations of surface tension to bacterial phenomena, J. Infect. Dis., 38 66 (1926)
- 7) Heurici, A.T. : A statistical study of the form and growth of a spore-bearing bacillus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 19 132 (1921)
- 8) Heurici, A.T. : A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 21 215 (1924)
- 9) Heurici, A.T. : On cytomorphosis in bacteria. Science., 61 644 (1925)
- 10) Heurici, A.T. : Morphologic variation and the rate of growth of bacteria, C.C. Thomas, Springfield, 11 1928
- 11) Hershey, A.D. & Bronfenbrenner, J. : Factors limiting bacterial growth. III Cell size and "physiologic youth" in *bacterium coli* culture. J. Gen. Physiol., 21 721 (1938)
- 12) Huntington, E., & Winslow, C.-E.A. : Cell size and metabolic activity at various phases of the bacterial culture cycle. J. Bact., 33 123 (1937)
- 13) Jensen, K.A. : Durch direkte mikroskopische Beobachtung ausgeführte Untersuchungen über das Wachstum des *Kolibazillus*. Zentr. Bakt. Parasitenk., 1 Orig., 107 1 (1928)
- 14) Lamanna, C. & Mallette, M.F. : Basic Bacteriology., The Williams & Wilkins Company. (1953)
- 15) Wilson, G.S. : The proportion of viable bacilli in agar culture of *B. aertrycke* (mutton), with special reference to the change in size of the organisms during growth, and in the opacity to which they give rise., J. Hyg., 25 150 (1926)



附図1 Difco Brothにおける細胞変態の光学像

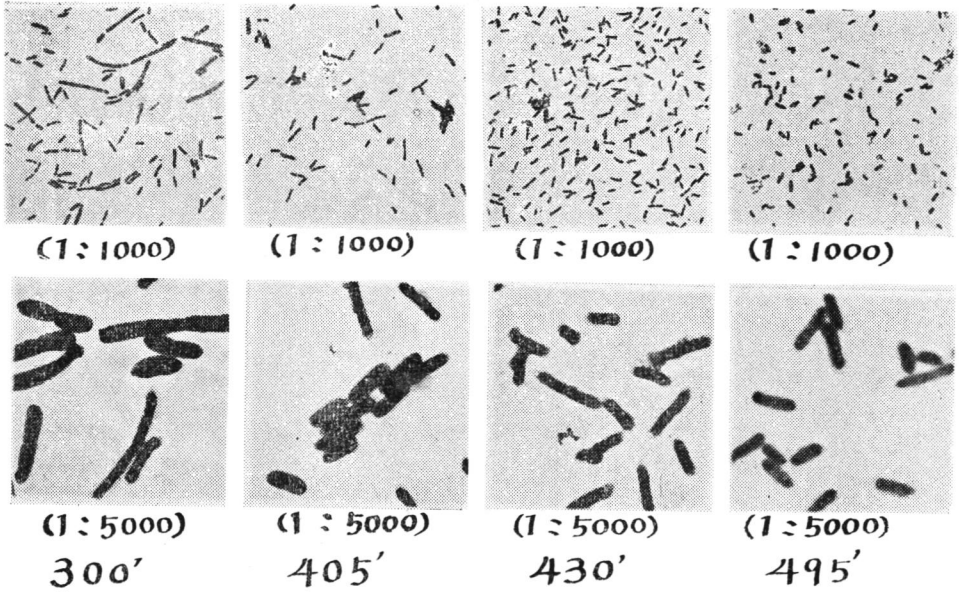


附図2 接種菌量と細胞変態の光学像

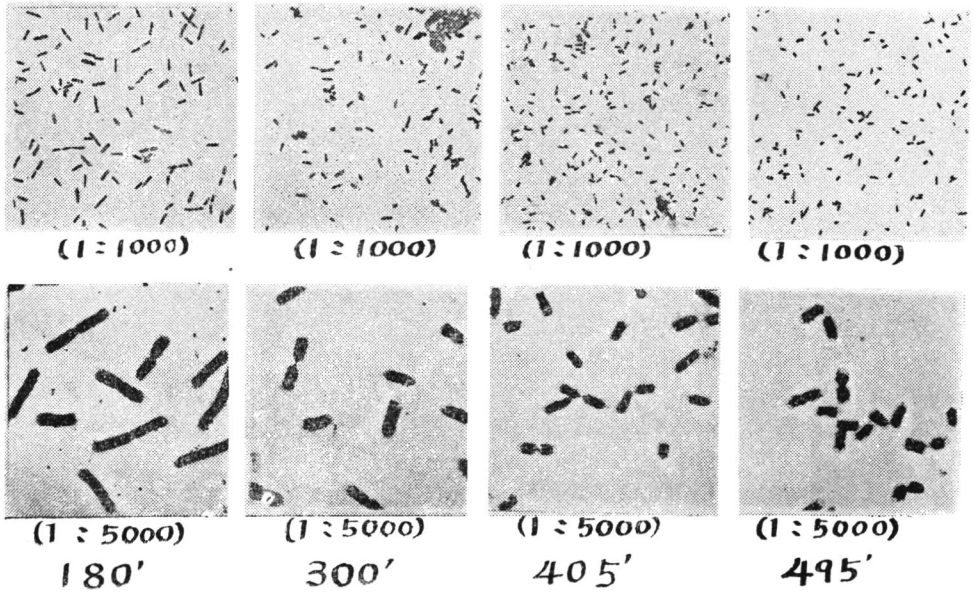


附図3 接種菌の長さを異にする場合の細胞変態の光学像

0.2%
接種例



5.0%
接種例



附図4 *Sal. pullorum* の分裂状況の電顕像