

嫌気性菌の半流動寒天培地における発育形態 と菌体の物理的要素との関係について

東京女子医科大学微生物学教室

中 西 清 子 ・ 森 分 由 紀 子
ナカニシ キヨコ ・ モリワケ ユキコ

(受付 昭和48年12月19日)

Relationship between Colonial Appearance in Soft Agar Media and Physical Characteristics of Anaerobic Bacteria

Kiyoko NAKANISHI and Yukiko MORIWAKE

Department of Microbiology, Tokyo Women's Medical College

Previously we reported that medium components in soft agar media influenced on the growth and colonial appearance of several anaerobic bacterial strains. In this paper, using 43 strains belonging to 15 anaerobic bacterial species, types of colonial morphology were found to be generally stable within species. Among various physical characteristics of the bacteria examined, growth rate, anaerobicity and gas productivity were closely concerned to the specific colonial appearances.

I. 緒 言

半流動寒天培地中における嫌気性菌の単一集落の発育形態には、大別して compact (C), diffuse (D), feathery (F) および tailed (T) があり、集落叢には、幕状、雲状、綿状、サンゴ状がみられ、これらの発育形態と培地成分との関係については、さきに報告した¹⁾。一方、これらの特異形態は、培地成分の影響以外に、菌体自身のもつ種々の物理的および生物学的性状が組み合わされて形成されるのではないかと考え、次の実験を行なった。すなわち、嫌気性菌14種、41株を用いて発育形態が種特異性を示すや否やをあらためて検討するとともに、これらの菌株の物理的性状、すなわち、菌形、菌の大きさ、配列、血液平板上の集落の大きさ、増殖度、嫌気度、ガス産生能と発育形態との関連を研究した。

II. 実験方法

1. 使用菌株

嫌気性球菌として、*Peptococcus anaerobius* 6株、*Peptococcus variabilis* 6株、*Peptococcus variabilis* 近似菌4株、*Peptostreptococcus putridus* 4株、*Veillonella parvula* 2株、計5種22株。嫌気性杆菌として、*Corynebacterium anaerobius* 6株、*Corynebacterium granulosum* 4株、*Corynebacterium acnes* 2株、*Sphaerophorus funduliformis* 2株、*Sphaerophorus necrophorus* 1株、*Eubacterium lentum* 1株、*Eubacterium cadaveris* 1株、*Fusobacterium biacutum* 1株、*Bacteroides insolitus* 1株、計9種19株を用いた。

2. 使用培地および培養方法

使用培地はさきに発表した基本培地と同様のものを用い、培養方法もこれに準じた¹⁾。

III. 実験結果

1. 種特異性の検討

株数の多い菌種について、発育形態の種特異

性をみると、表1、表2のごとく、*Peptococcus anaerobius* 6株はすべて単一集落はD、集落叢はうすい幕状、*Peptococcus variabilis* 6株はすべて単一集落はD、集落叢はうすい幕状、*Peptococcus variabilis* 近似菌4株もすべて単一集落はD、集落叢はうすい幕状を示した。また *Peptostreptococcus putridus* は4株中、3株が単一集落はC、集落叢は黒色を帯びた雲状を示し、他の1株は単一集落はD、集落叢は黒色を帯びた雲状を示した。*Veillonella palvura* は2株とも単一集落はFを示したが、集落叢は1株がサンゴ状、他の1株が幕状を示した。一方、杆菌では、*Corynebacterium anaerobius* 6株、*Corynebacterium granulosum* 4株、*Corynebacterium acnes* 2株が、それぞれすべて単一集落はC、集落叢は菌塊のある綿状を示した。*Sphaerophorus funduliformis* 2株は単一集

落はT、集落叢はサンゴ状を示した。以上のごとく、同種間では単一集落、集落叢ともに同一形態を示すものがほとんどであった。また、単一集落がDのものは、集落叢がうす幕状を形成し、Cのものは、雲状および綿状、Fのものは、ほとんどサンゴ状を示した。

2. 菌形と発育形態

菌形と発育形態との関係を見ると、球菌、杆菌とも、それぞれ単一集落にD、C、F、Tがみられ、集落叢に綿状、雲状、幕状、サンゴ状がみられた。したがって発育形態は菌形には無関係であることがわかった。

3. 菌の大きさおよび配列と発育形態

菌の大きさおよび配列とは無関係に、単一集落、集落叢ともに種々の発育形態がみられた。

4. 血液平板上の集落の大きさと発育形態

表1 嫌気性球菌の半流動寒天培地中の発育形態と菌の物理的性状

菌種	菌株	発育形態		菌			血液平板上の集落の大きさ	ブイヨン中の増殖度	嫌気度	ガス産生
		単一集落	集落叢	形	大きさ	配列				
P. anaerobius	32 T A 2 b	D	うす幕状	球	大	双球菌	0.8mm	1 × 10 ⁶	22.0mm	—
	46 CTBa	D	うす幕状	球	不同	双球菌	0.8	1 × 10 ⁶	22.0	—
	11 C T B	D	うす幕状	球	大	双球菌	0.5	1 × 10 ⁶	16.0	—
	142 C Z A	D	うす幕状	球	大	双球菌	0.5~1.0	1 × 10 ⁷	19.0	—
	B—40	D	うす幕状	球	中	双球菌	0.8	1 × 10 ⁶	10.0	—
	P L—12	D	うす幕状	球	大	双球菌	0.8	1 × 10 ⁶	22.0	—
P. variabilis	20 TAa 3	D	うす幕状	球	不同	双球菌	1.0	1 × 10 ⁵	12.0	—
	20 TBa	D	うす幕状	球	不同	双球菌	1.0	1 × 10 ⁶	5.0	—
	25 TAb	D	うす幕状	球	中	双球菌	0.8~1.0	1 × 10 ⁶	13.0	—
	11 C T A	D	うす幕状	球	大	双球菌	0.8~1.0	1 × 10 ⁵	20.0	—
	B—41	D	うす幕状	球	大	双球菌	1.5	1 × 10 ⁶	12.0	—
P-varia	D	うす幕状	球	小	双球菌	0.8	1 × 10 ⁶	9.8	—	
P. variabilis 近似菌	25 C Z E	D	うす幕状	球	不同	双球菌	0.8~1.0	1 × 10 ⁴	8.0	—
	116 C Z A	D	うす幕状	球	不同	双球菌	0.3	1 × 10 ⁵	8.0	—
	133 S Z C	D	うす幕状	球	不同	双球菌	0.2~1.2	1 × 10 ⁶	6.6	—
	23 S T C	D	うす幕状	球	不同	双球菌	0.2~1.2	1 × 10 ⁵	18.0	—
P.S. putridus	16 S Z A	C	黒色雲状	球	中	短連鎖	0.5~1.0	1 × 10 ⁷	18.9	+
	16 C T A	D	黒色雲状	ダ円形	中	短連鎖	1.2	1 × 10 ⁷	4.8	+
	38 C T A	C	黒色雲状	球	中	短連鎖	0.5	1 × 10 ⁷	15.0	+
	B—30	C	黒色雲状	ダ円形	中	短連鎖	1.1	1 × 10 ⁷	24.5	+
V. palvula	17 TAa	F	雲状	球	小	双球菌	0.5~1.0	1 × 10 ⁸	1.2	+
	25 a	F	サンゴ状	球	小	双球菌	0.2~1.0	1 × 10 ⁸	1.0	+

P.: *Peptococcus* P.s.: *Peptostreptococcus* V.: *Veillonella*
 C: compact colony D: diffuse colony F: feathery colony

表2 嫌気性桿菌の半流動寒天培地中の発育形態と菌の物理的性状

菌種	菌株	発育形態		菌			血液平板上の集落の大きさ (mm)	ブイヨン中の増殖度	嫌気度 (mm)	ガス産生
		単一集落	集落叢	形	大きさ	配列				
C. anaerobius	25 TBb	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.3~1.0	1×10 ⁹	3.5	—
	39 Sb	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁹	11.0	—
	41 a	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁸	6.1	—
	28CZA	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁹	15.0	—
	112CZC	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	極小	1×10 ⁹	4.0	—
	121CTA	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	極小	1×10 ⁸	1.0	—
C. granulorum	138CZC	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁹	7.0	—
	40CZC	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁷	10.0	—
	130STB	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.2~1.0	1×10 ⁷	11.0	—
	133STC	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	極小	1×10 ⁷	10.6	—
C. acnes	P-11	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.1~0.8	1×10 ⁷	4.0	—
	P-20	C	綿状(菌塊+)	多形・短杆	中	散在性・塊	0.8~1.0	1×10 ⁸	6.0	—
S. fundriformis	2377—I	T	サンゴ状	杆	中	散在性	1.2~2.0	1×10 ⁹	1.5	+
	2377—II	T	サンゴ状	杆	中	散在性	1.2~2.0	1×10 ⁹	1.0	+
S. necrophorus	Sn- 233	F	サンゴ状	杆, 両端とがり	中	散在性	1.2	1×10 ⁸	2.0	+
E. lentum	E-lent	F'	幕状(サンゴ類似)	短杆	やや小	散在性	1.0	1×10 ⁵	22.5	—
E. cadaveris	P-41	C	綿状	多形・短杆	中	散在性・塊	極小	1×10 ⁹	6.0	—
F. biacutum	F-bia	F	サンゴ状	多形・フィラメント	大	柵状	1.0~2.0	1×10 ⁷	6.8	+
B. insolitus	Ri	D, C	雲状	フィラメント, 紡錘状	大	散在性・塊	1.2~2.0	1×10 ⁷	7.0	—

C.: Corynebacterium S.: Sphaeropholus E.: Eubacterium F.: Fusobacterium
 B.: Bacteroides C: compact colony T: tailed colony F: feathery colony
 F': feathery like colony D: diffuse colony

集落の大小にかかわらず、単一集落、集落叢ともに種々の形態がみられた。

5. ブイヨン中の増殖度と発育形態

比較的増殖度の低い菌では、単一集落はほとんどがDを示し、集落叢はうす幕状を示した。中等度の増殖度をもつ菌では、単一集落、集落叢ともに、種々の形態がみられ、増殖度の高い菌では、単一集落にDが全くみられず、したがって集落叢のうす幕状もみられなかつた。

6. 嫌気度と発育形態

単一集落のD、Cおよび集落叢の幕状、雲状は、嫌気度に無関係に全体にみられたが、単一集落F、Tおよび集落叢のサンゴ状は、比較的微弱な嫌気度の菌に認められた。

7. ガス産生能と発育形態

ガス産生菌には、集落叢の幕状、綿状がみられ

ず、一方、ガス非産生菌には、単一集落がFで、集落叢がサンゴ状を示すものはみられなかつた。

8. 各単一集落に含まれる菌数と発育形態およびシスチンとの関係

さきに報告したように¹⁾、基本培地においてCである菌が、シスチン無添加培地でDに変化する現象がみられた。そこで各形態を呈する株を用い、シスチンの影響を検討すると同時に、各々の形態と菌数との関係をしらべた結果、表3のごとく、DおよびFの株は、シスチン無添加培地では、基本培地に比べて、形態がやや拡散性であるが、本来の形態とほとんど変わらず、また個々の形態に含まれる菌数もほぼ同数であつた。CおよびTの株は3株ともシスチン無添加培地において、形態変化を起し、D形態を示した。しかもCの株はDに変化した場合、菌数が基本培地にお

表3 嫌気性菌の単一集落に含まれる菌数とシスチンとの関係

シスチン+ (基本培地)						シスチン-				
菌株	集落形態	回数	1培養液中の総菌数	1培養液中の総集落数	集落1コ当りの菌数	集落形態	回数	1培養液中の総菌数	1培養液中の総集落数	集落1コ当りの菌数
142CZA	D	1	5.7×10^6	25	2.3×10^5	D	1	3.3×10^8	80	4.1×10^6
		2	1.1×10^8	30	3.7×10^6		2	1.1×10^8	60	1.8×10^6
		3	8.6×10^6	3	2.9×10^6		3	3.2×10^6	2	1.6×10^6
		平均			2.3×10^6		平均			2.5×10^6
16CTA	C	1	1.9×10^9	50	3.8×10^7	D	1	7.0×10^6	20	3.5×10^5
		2	3.4×10^8	2	1.7×10^6		2	1.4×10^8	3	4.7×10^7
		平均			1.0×10^8		平均			2.4×10^7
38CTA	C	1	2.3×10^9	40	5.8×10^7	D	1	9.0×10^7	16	5.6×10^6
		2	9.2×10^7	23	4.0×10^6		2	2.2×10^7	20	1.1×10^6
		3	1.6×10^8	12	1.3×10^7		3	9.4×10^7	74	1.3×10^6
		4	1.7×10^8	5	3.4×10^7		4	8.0×10^6	2	4.0×10^6
		平均			2.7×10^7		平均			3.0×10^6
2377-I	T	1	1.3×10^{10}	50	2.6×10^8	D	1	5.5×10^8	26	2.1×10^7
		2	9.5×10^8	3	3.2×10^8		2	1.3×10^9	4	3.3×10^8
		3	7.4×10^7	22	3.4×10^8		3	1.3×10^9	14	9.2×10^7
		平均			1.9×10^8		平均			1.5×10^8
Sn-233	F	1	3.9×10^9	14	2.8×10^8	F	1	3.8×10^9	14	2.7×10^8
		2	9.7×10^8	2	4.9×10^8		2	2.3×10^9	26	8.8×10^7
		3	2.1×10^9	2	1.1×10^9		3	5.5×10^8	7	7.9×10^7
		平均			6.3×10^8		平均			1.5×10^8

ける単一集落中の菌数の約 $1/10$ であつた。表1, 表2のごとく, 一般にDは増殖度の低い株にみられる傾向があるが, 同じ型の形態でも, 株によつて含まれる菌数は必ずしも一定していなかつた。

IV. 考 察

半流動寒天培地中における嫌気性菌の発育形態の種特異性について検討した結果, 同種間では, ほぼ同様な形態を示す事が知られたが, 嫌気性球菌に関しては *Peptococcus* に属する3種の菌が, また嫌気性杆菌においては *Corynebacterium* に属する3種の菌が, それぞれすべて同様の発育形態を示し, 著明な特異性を示した。他の種については, 単一集落, 集落叢のどちらか一方においてのみ, 特異な形態がみられた。また, 菌形, 菌の大きさ, 配列, 血液平板上の集落の大きさ, ブイヨン中の増殖度, 嫌気度, ガス産生能との関係をみた結果, 各菌の示す特異形態は, 菌形, 菌の大きさ, 配列, 平板上の集落の大きさには, ほとんど関係なく, 増殖度, 嫌気度, ガス産生能に影

響されているように思われる。すなわち, ブイヨン中の増殖度については, 低い増殖度の株には, C, Tおよび雲状, 綿状のごとく厚みのある発育形態はみられず, 高い増殖度をもつ菌では, D形態, うす幕状を示す菌がみられず, したがつて増殖度がかかなり形態に影響しているように思われる。嫌気度についてはD, Cおよび幕状, 雲状は嫌気度に無関係に多数の菌株間にみられたが, 単一集落がF, 集落叢がサンゴ状を示す株のすべてが, 弱い嫌気度のもので, かつガス産生株であつた。すなわちガス貯留の結果, 比較的上部まで菌がもち上げられ, またFおよびサンゴ状の様なやや周囲に拡散して増殖する形態を形成する要因になつているように思われる。形態と菌数との関係については, 単一集落を対象に検討した結果, D, C, T, F形態ともほぼ $10^6 \sim 10^8$ 個の菌数から成つており, 形態による差は認められなかつた。ただし, 基本培地においてC形態を示す菌が, シスチン無添加培地において, D形態に変化

した際、D形態に含まれる菌数が約 $1/10$ に減少していた。このことは、シスチン無添加培地内でCタイプの菌の増殖度が微弱となり、compact状をとらず、diffuse状となるためであろうと考えられるが、この点については、さらに検討するつもりである。Atami, S.Y. ら²⁾の報告をはじめ、Finkelstein ら³⁾⁴⁾および吉田ら^{5)~8)}の研究によると、Staphylococcus aureusおよび、Staphylococcus epidermidisも、半流動寒天培地において、CあるいはDの発育形態を示し、そのうちC形態を示す要因は、clamping factor によるという。またこれらのブドウ球菌も培地成分の異なつたものに移植することにより、C-D変異が起こるといふ。これらの論文に用いられている培地には、シスチンが含まれておらず、これらの現象は、主として血清の有無によるらしい。一方、Ward ら⁹⁾は、彼らの用いた Streptococcus がF形態を示した理由について、次のように述べている。すなわち Streptococcus の幼若な細胞は、強い負荷電を帯びており、そのため個々の細胞が互いに反発し合つて外へ広がる傾向をとるため、F形態のような発育形態になるという。われわれは荷電については検討してないが、われわれの用いた嫌気性の Streptococcus は、CもしくはD形態を示し、一方、F形態を示した株のほとんどは、ガス産生菌であつた。以上のごとく、菌の発育形態形成の要因は様々であり、いずれの菌にも共通する一定の

要素というものは認められない。

終りにこの研究に御指導と御校閲をいただいた当微生物学教室吉岡守正教授に深甚の謝意を表し、菌株を分与された岐阜大学微生物学教室鈴木祥一郎教授、上野一恵助教授に深謝し、なお菌株分離に御協力いただいた吉原次枝博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 中西清子・森分由紀子：日本細菌学会雑誌（現在投稿中）
- 2) Atami, S.Y. and F.C. Kelly: J Bact 78 539~544 (1959)
- 3) Finkelstein, R.A. and S.E. Sulkin: Bact Proc 97~98 (1957)
- 4) Finkelstein, R.A. and S.E. Sulkin: J Bact 75 339~343 (1958)
- 5) Yoshida, K., M. Takahashi and Y. Takeuchi: J Bact 100 (1) 162~166 (1969)
- 6) Yoshida, K. and Y. Takeuchi: Infection and Immunity 2 (5) 523~527 (1970)
- 7) Yoshida, K.: Infection and Immunity 3 (4) 535~539 (1971)
- 8) Yoshida, K., R. Smith Nelvin and Y. Naito: Infection and Immunity 5 (2) 8~11 (1972)
- 9) Ward, H.K. and G.V. Rudd: Austral J Exptl Biol Med Sci 16 181~192 (1938)
- 10) Shimizu, T., T. Takigawa and S. Shibata: National Inst Anim Health Quart 5 (1) 20~26 (1964)
- 11) Shimizu, T. and L. Greenberg: Canad J Microbiol 9 613~617 (1963)