

【特別掲載：昭和14年8月19日受付】

Proteus X<sub>19</sub> 菌 (OX<sub>19</sub> 菌, HX<sub>19</sub> 菌) Bakteriophage 検索

千葉醫科大學細菌學教室(主任 緒方教授)

北 島 岩 八

## 目 次

第1章 緒 論	第2節 Bakteriophage 検出手技
第2章 實 驗 材 料	第3節 Bakteriophage 證明法
第1節 供 試 菌 株	第1項 直 接 證 明 法
第2節 培 養 基	(A) フ イ ヨ ン 法
第1項 寒 天 培 養 基	(B) 寒 天 法
第2項 フ イ ヨ ン 培 養 基	第2項 増 殖 的 證 明 法
第3章 實 驗 方 法	第4章 實 驗 成 績
第1節 Bakteriophage 採 取 法 及 び 増 強 法	第5章 總 括 及 び 結 論 文 獻

## 第 1 章 緒 論

赤痢快復期患者の糞便濾液が、赤痢志賀菌を溶解せしむる特異なる現象を、1917年 d'Herelle が発見せし以來、各所に於て之が複試行はれたる結果、孰れも d'Herelle の所見を肯定し、此の現象を“d'Herelle 氏現象”又は“Bakteriophage 現象”と唱へ、頗る斯界の興味を惹起するに至れり。

而して本現象の特異なるは、溶菌現象の行はるゝ事、同時に溶菌性物質の増強すること及び上記の兩作用が、生活菌の存在に於てのみ起り、死菌に於ては、起らざる事にして、d'Herelle に依れば、本現象を起す物質は、超顯微鏡的生体なりと信じ之を“microbe filtrant bacteriophage”又は“Bacteriophagum intestinale”と命名せり。一般には Bakteriophage 又は簡単に Phage 或は Bacteriolysant と稱せらるゝものなり。而して該物質に關しては、夫れが細菌よりも熱及び化學的物質に對して、抵抗力強きを以て、細菌体内にプロフェルマンの形にて存在する酵素なりと主張する者(壁島)、又は細菌の遺傳的變化により溶菌性物質の産出に原因するものとし、“Viciation nutritive hereditaire”と唱へ、或は細菌自体より發生する濾過性小片(Bail)又は菌体蛋白片(Otto)と想像する者あり。斯くの如く、該物質に關し研究検討せられ、微生物説と矛盾する事實の発見により漸次酵素説に傾きつゝあるに反し、他方向微生物

説を主張する學者ありて、結局尙未知の問題に屬するものなり。本現象は其の他幾多の研究により、獨り赤痢菌のみならず、チフス菌、バラチフス菌、大腸菌、コレラ菌、葡萄狀球菌、其の他約 20 數種の菌株に於ても見られ、本現象は、細菌一般に通有する一つの基礎現象ならんと想像せらるゝに至れり。

然れども Proteus 菌の Bakteriophage に關する報告は極めて少なく、著者の寡聞、涉獵範圍内にては、次の 1, 2 の報告を見るに過ぎず、即ち Russ Münser u. Kindermann (1933) は、Proteus OX<sub>19</sub> 菌, HX<sub>19</sub> 菌に就て實驗し、Phage を證明し得たりと云ひ、田村 (昭和 10 年) も吉積法及びプロタミラーゼ法を應用し、Proteus 菌 (X<sub>19</sub> 菌, XK 菌, OX<sub>2</sub> 菌) 16 株の Phage 檢出證明に成功し、各菌相互間には、Phage の特異性を認めずと報告す。

著者も Proteus X<sub>19</sub> 菌の Phage を檢出し得ば、その O 型及び H 型の相互間に極めて興味ある關係の出現せんことに期待し、之が檢出實驗を行ひたれども、Proteus 菌の Phage 檢出證明は不能に終始せり。

茲に於て唯その實驗の大要を記載し、以て著者の場合の如く、Proteus 菌の Phage は、果して證明不可能なるや否や大方諸賢の示教を仰がんとす。

## 第 2 章 實 驗 材 料

### 第 1 節 供 試 菌 株

- (1) 分讓菌株の Proteus X<sub>19</sub> 菌株、
- |        |                 |          |
|--------|-----------------|----------|
| Nr. 1. | 北里研究所よりの分讓菌株    | O 型, H 型 |
| Nr. 2. | 傳染病研究所よりの分讓菌株   | O 型, H 型 |
| Nr. 3. | 警視廳細菌検査所よりの分讓菌株 | O 型, H 型 |
| Nr. 4. | 富山日赤病院よりの分讓菌株   | O 型, H 型 |
| Nr. 5. | 川村教授よりの分讓菌株     | O 型, H 型 |
- (2) Nr. 6. 當教室保存の Proteus X<sub>19</sub> 菌株 O 型, H 型
- (3) (イ) 下記の魚貝、動物の臓器其の他より分離せる Proteus 菌の内、Proteus HX<sub>19</sub> 菌株に一致するもの 6 株、即ち、鱈、平目、タカサゴ、蜆、蒲鉾、人糞より分離せるもの。
- (ロ) Proteus vulgaris に一致するもの 24 株。
- 海老、烏賊、キス、アラ、メゴチ、甘鯛、サシ、鯛、女鯛、蛤、豚肉、牛心、兎肉、鮪、ザマカニ、牛肉、豚舌、鮫鱈、牛舌、鯖、牛大動脈、犬糞、アサリ、鶏糞より分離せるもの。
- (4) 對照菌、當教室保存菌株の赤痢志賀菌、大腸菌、駒込 BIII 菌。
- 但し以上の供試菌は、著者本實驗前、菌株を決定する豫備實驗に於て、生物學的及び免疫學的に (1) の 5 株は Proteus X<sub>19</sub> 菌 (OX<sub>19</sub>, HX<sub>19</sub>) に一致し、(3) は當教室篠崎氏が魚貝、動物の臓器其の他より分離せるものゝ内、(イ) は Proteus HX<sub>19</sub> 菌株に一致するものにして、他は (ロ) Proteus vulgaris の性状を有する菌株なり。猶 (4) は Bakteriophage 檢出の對照菌として供試せり。

## 第 2 節 培 養 基

## 第 1 項 寒 天 培 養 基

1) 1%, 1.5% 乃至 2% 普通寒天培養基  $P_H$  7.2 Eliava et Pozerski は寒天面乾燥せる時は, Bakteriophage の影響を受け難きを指摘し, 此の現象につき Doerr, Berger, Zdanski, 中村, 桑野及び鈴木是れに賛し, 寒天自身が Bakteriophage の作用並に増殖を阻止する作用あるを認め, 又 Bronfenbrenner, Helter は, 寒天の高濃度による阻止作用は, 培地が水を取るが爲めなりと述べたり。依って著者は寒天自身の Bakteriophage 阻止作用による反應障害を避けんが爲め, 上記の濃度の寒天培養基を Bakteriophage 検出證明用に供せり。

猶 Bakteriophage の能働性發揮並に増殖には, 一定の至適  $P_H$  あり。一般に適性 Medium に於て作用, 増殖共に最良にして, 大略  $P_H$  6.0-9.0 範囲にありと報ずるもの多し (Otto, Munter 及び岡部)。著者は先進諸賢の歌ゆる所に従ひ,  $P_H$  7.2 とし, 尙後出 Bouillon 培養基の  $P_H$  も亦 7.2 とせり。

2) 3% 寒天培養基  $P_H$  8.4-8.6 Proteus OX<sub>19</sub> 菌は弱適性寒天培地に移植する時は Schwärmen し容易に Hauch を形成し, H 型に移行し易きを以て, 供試 Proteus OX<sub>19</sub> 菌株は, 總て  $P_H$  8.4-8.6 の 3% 斜面寒天に培養し, 菌型變異を防ぐに努めたり。

## 第 2 項 Bouillon 培 養 基

1) 普通 Bouillon 培養基,  $P_H$  7.2 普通の處方及び製法によりて作製せるも, 特に Pepton は照内, Witte, 肉越幾斯は武田製, Liebig 並に生肉煎汁の各々を使用し調製せり。

但し菌培養, Bakteriophage 採取増強證明に使用す。

2) 臓器 Bouillon,  $P_H$  7.2 臓器壓搾液。腸管内容及び消化酵素劑は, 細菌との接觸により, 新に Bakteriophage を誘發する事を主張する Pico, Jötten, Borchardt, Thomas, 山口, 桑野, 長野, 吉積及び竹林等あり。故に著者も下記の臓器 Bouillon を作製し, Bakteriophage 検出増強法に使用せり。

(a) 無菌的に採取したる豚脾臓 3g を鉢を以て細切し, 上記の Bouillon 50 cc を加へ, 之を振盪, 室温に 1 時間放置し, 之に供試菌 1 Normalöse を移植し, 37°C-18 時間孵卵器内に納めて培養, 後述の實驗操作を施行す。但し  $P_H$  7.2 Phage 検出用とす。

(b) 豚脾臓 2g, 豚十二指腸管腔内容を含む粘膜 1g, 普通 Bouillon 50 cc

作製法は新鮮なる豚脾臓及び腸管粘膜の上記の如き量を普通 Bouillon に混じ, 能く振盪し, 室温に放置する事 2 時間, 之に供試菌 1 Öse を移植, 37°C 24 時間孵卵器に培養, 後述の検出操作を施行す。

但し  $P_H$  7.2 Phage 検出用とす。

(c) 豚十二指腸管腔内容を含む粘膜 3g, Bouillon 50 cc

(d) 豚脾臓 6g, 照内 Pepton 1g, 食塩 1g, 餉水 100 cc

(e) 豚脾臓 4g, 豚十二指腸管腔内容を含む粘膜 3g, Witte Pepton 及び食塩 各 1g, 餉水 100 cc

(f) 豚十二指腸管腔内容を含む粘膜 4g, Witte Pepton 及び食塩 各 1g, 餉水 100 cc

以上 c, d, e, f の臓器 Bouillon の調製法は, 之を小コルベン内に容れ, 55°C-30 分間重盪煎にて滅菌し  $P_H$  7.2 となし, 滅菌濾過紙を以て 2-3 回濾過し, 其の清澄濾過液を 9 cc 宛試験管に分注, 55°C 30 分間 2 日間, 間歇滅菌法を行ひその無菌試験を行ひたる後, Bakteriophage 検出乃至増強法に使用す。以上の 55°C-30 分 3 回間歇滅菌法を使用せるは, 豚脾臓及び十二指腸管腔内に存する Proteus 菌の Bakteriophage 誘發物質が, 若し温熱に對して極めて抵抗弱き時は, 普通 Bouillon 加熱滅菌法に依り, その作用減弱乃至消失するなきやを憂ひ, 特に低温滅菌により之を調製せり。主に Bakteriophage 検出増強法に

使用す。

(g), (d) の臓器 Bouillon に賦活劑として、塩化カルシウムの微量 (塩化カルシウム添加量は Bouillon 20 cc に對し 0.02 mg) を添加したるものを作製す。Phage 検出用とす。

### 第 3 章 實 驗 方 法

#### 第 1 節 Bacteriophage 採取法及び増強法 (以下 Bacteriophage を B. P. と略稱す)

一般に慣用せらるゝ B. P. 採取法及び検出増強法は、38°C-18 時間寒天培養菌の 1 Normalplatinöse を滅菌生理的食塩水 1 cc に浮遊せしめ、其の 1 滴を Bouillon 9 cc に混入し、之に酵素製劑例へば 5% Protamylase の Chamberland 濾過液 1 cc 或は 0.1% の割に Protamylase 粉末を添加、之を 37°C 18 時間或は 24 時間孵卵器内に培養し、然る後 58°C-30 分間重盪煎にて加温滅菌するか、又は Chamberland L<sub>3</sub> にて濾過す。是れ B. P. の原液とも云ふべきものなり。

而して B. P. 増強法は、此の濾液 (又は加熱滅菌液) 1 cc を更に新に調製せる 37°C-18 時間培養菌液 1 滴と共に、Bouillon 9 cc に容れ、37°C-18 時間乃至 24 時間孵卵器に培養、次に之を上記滅菌法により B. P. 培養 Bouillon 内の生菌及び B. P. 抵抗菌を殺菌す、斯くの如き操作を返復、累代接種増強を計るを常とす。

著者も亦之に基き、B. P. 採取検出法を施行せるも、特に B. P. 生成に重要關係を有すると思惟する下記諸要約に注意し、其の採取に努めたり。

1) 即ち、上述の如く、各種の寒天又は Bouillon 培養基を採擇し其の B. P. の至適 pH を吟味すると共に、

2) B. P. の産生増強は生菌珠に幼若菌の混在を必要條件となすを以て、B. P. 増強、検出時に添加すべき生菌は 9 時間、或は 18 時間培養の滅菌食塩水又は Bouillon 浮游液 (1 cc に付き 1 Normalplatinöse) を以てし、

3) 是等 B. P. 菌液増強保温時間も亦其の B. P. の性状より考察し、12 時間、18 時間、24 時間の場合に於て施行し、

4) 此の際の B. P. 菌液の滅菌法は、加熱法、Chamberland L<sub>3</sub> 濾過法及び次に述ぶるクロロフォルム又は石炭酸滅菌法を併用せり。是れ即ち B. P. の耐熱に對する抵抗力に關しては、從來報告せられたるもの枚擧に違あらず。其の概ね一致せる見解は、B. P. の耐熱性は、一般に無芽胞菌に比し大にして、通常 65°C 1 時間以上の加熱により、初めて其の作用を失ふとなすにあり。此の間稀に 60°C-30 分間の加熱により既に B. P. 作用を失ふを認めたる Miessner, Necker, 吉川及び永井等の報告あり。一方 Seiffert は 65°C の加熱により非働性となれる B. P. を、濾過により再び能働性となし得るを報じ、又加熱 60°C を B. P. の産生に好適刺戟となす Otto, Munter, Gildemeister 及び Herzberg あり。以上の如く、B. P. 検出操作時の加熱滅菌法或は濾過法の適否に就ては、諸家の意見甲論乙駁一致せざるを見るも、若し Grigorieff 及び Wollmann の説の如く B. P. の耐熱抵抗性には、個性の差ありて、著者が検出せんとする Proteus X<sub>19</sub> 菌 B. P. にして、若し耐熱に對し特に抵抗力弱きか、又は其の生成極めて僅少なる場合は、普通の加熱滅菌操作乃至濾過法により、或は作用破碎或は吸着消失し、B. P. 存在するも之を逸し、陰性に終る事あらんを憂ひ、B. P. 液滅菌法には、著者大いに考慮し、各検出手技に於て、以上の 3 法を併用せり。而して著者の供菌 Proteus X<sub>19</sub> 菌株及び Proteus vulgaris 菌株の耐熱に對する抵抗力は、検索の結果、50°C-10 分にて已に死滅する菌株あるも、多くは 55°C-10 分乃至 20 分にて完全に死滅するを以て、Proteus 菌株 B. P. 液加熱滅菌は、總て 55°C-30 分を選定し、對照菌株、赤痢菌、大腸菌及び駒込 B III 菌の加熱は、58°C-30 分とせり。

加熱法の他、石炭酸及びクロロフォルム滅菌法に就ては、永井の報告に依れば、0.5%、或は 1% 石炭酸を使用する事により、一定時間内に於て B. P. を障害する事なく、當該菌及び B. P. 抵抗菌を殺菌する事を得と。依って著者は之を 1% の割合に B. P. 液に添加、1 時間後、B. P. の證明を施行せり。然れども石炭酸を使用したの B. P. 液滅菌法は、該液より石炭酸のみを容易に除去する事能はざるを以て、B. P. 増強法には使用せざりき。

猶クロロフォルムに就ては、永井は 0.5% 乃至 2% にても 48 時間にも B. P. を破壊せず、5% に於ては、48 時間にて幾分障碍を及ぼすと報ず。依って著者は可檢 B. P. 液に其の 1% 乃至 2% の割にクロロフォルムを添加、良く振盪し 5 乃至 6 時間室温に靜置する時は、液の上部清澄となり、殺菌せる菌は沈降するを以て、其の上清液につき實驗を施行せり。

5) 又 B. P. の產生微量なる時は、之を増強操作を行へり。即ち、細菌の種類により B. P. は 2-3 回の細菌通過増強法によりて容易に證明し得れども、菌株により十數回の累代移植増強法によつて、辛うじて之を證明する事あるが故に、著者は後出各種増強手技に於て常に 8 回以上 20 回の反復増強操作を實施せり。

6) 是等 B. P. 檢出證明に際しては、檢出増強に使用せし菌を、その檢出菌とせしのみならず、之に使用せざる各供試菌株を使用し、その何れの菌株にか作用する B. P. なきやを檢索せり。

## 第 2 節 B. P. 檢出手技

B. P. 檢出増強乃至證明法の適否は、その實驗成績に重大なる素因となるものにして、B. P. 產生菌株も、其の手技の如何により檢出不能の結果を來す事あるは周知の事象なり。著者は既述の如き多數の供試菌株を蒐集使用し、種々の培養基を以て B. P. の檢索を行ひ、加之 B. P. 產生に極めて重大なる關係を有する諸要約に考慮を拂ひ、以下記載の方法により B. P. 檢出に努めたり。

### 第 1 法 鶏糞よりの B. P. 檢出法

實驗方法：鶏糞 2g と Protamylase 2g を普通 Bouillon 200 cc に容れ、2-3 日間 37°C の孵卵器内に放置し、始め濾過紙を以て、次に Chamberland L<sub>3</sub> にて濾過し、其の濾液につき供試菌及び對照菌に對する B. P. の有無を檢せり。

尙該濾液 1 cc を各種の可檢菌 (Proteus X<sub>19</sub> 菌, Proteus vulgaris 及び對照菌株) の新鮮培養生菌液 1 滴と共に普通 Bouillon 9 cc に混入し、37°C-18 時間孵卵器内に培養、後 Proteus 菌株の B. P. 液は上記の如く 55°C-30 分間加熱、對照菌株は 58°C-30 分間加熱滅菌、又は Chamberland L<sub>3</sub> 濾過、斯くの如き操作反復累代増強法 8 回乃至 15 回實施し B. P. 檢出を行へり。

### 第 2 法 下水(汚水)よりの B. P. 檢出法

Gildemeister 及び渡邊の法に依り、數ヶ所の下水を採取混合、その 50 cc を滅菌コルベンに採り、之に同量の Bouillon を添加し、37°C-24 時間孵卵器に納めたる後、Chamberland L<sub>3</sub> にて濾過し、其の濾液につき供試菌に對する B. P. の檢索を行ふと共に、該濾液 1 cc を Bouillon 9 cc に加へ供試菌を以て 15 回累代接種増強法を施行せり。

### 第 3 法 Protamylase 添加法

1) 著者は供試菌純培養より B. P. を檢出せんとし、Protamylase 粉末 0.1 gr 或は 5% Protamylase の Chamberland L<sub>3</sub> 濾過液 1 cc と、培養時間の異なる可檢菌の生菌液 1 滴とを、普通 Bouillon 9 cc に容れ 37°C 24 時間孵卵器に納め、之を各種滅菌法により B. P. 液の生菌及び抵抗菌を殺菌し、該液及び濾液の 10 回乃至 18 回累代増強法を施せる B. P. 液につき檢出證明を行へり。

2) Protamylase 添加 B. P. 検出操作には Protamylase を始めに 1 回使用するを慣例とし, Pico, Jötten, Borchardt, 桑野等は Protamylase が B. P. を誘發せしむべき物質を含有し, 殊に桑野は B. P. 生成量は培養液内に加へられたる Protamylase の多寡に平行すと云ふ。依って著者は B. P. 増強法操作毎回 Protamylase の粉末又は Chamberland L<sub>3</sub> 濾液の所定量を混入し, B. P. の産生を促せり。

本法増強回数 10 回以上 15 回施行せり。

#### 第 4 法 陳舊培養よりの B. P. 検出法

細菌の純培養中に B. P. の發生ある事は, Bail が始めて之を觀, 緒方, Weinberg, Gildemeister, Otto 及び Jötten も同様の事實を報告す。一般に細菌のみの Bouillon 培養に於て, 特に處置を加へざる場合, B. P. の自發發生には, 長期間の培養を必要とするものと如く概念せらる。即ち培養基の陳舊となり, 養素を消耗し, 菌の新陳代謝産物蓄積して, 菌の生存に不適當となり, 又菌が自家融解に陥るを以て, B. P. の自發發生に必要な條件と考ふ。Otto, Munter は 3 週間の培養濾液より 15 代通過の後 B. P. を得たりと報告す。

著者は, 供試菌の内, 培養後 5 ヶ月乃至 10 ヶ月を経過し, 培養の Bouillon の液量約 2-3g に枯涸せるもの又は寒天培養基の乾燥して原形を止めず, 萎縮せるものを選び, 之に普通 Bouillon 又は臍器 Bouillon 9 cc を加へ, 或は別に以上の Bouillon と共に當該菌を移植し, 之等を 37°C 24 時間或は 48 時間孵卵器に入れたるものにつき, その B. P. の有無を検索せり。

#### 第 5 法 混合培養による B. P. 検出法

B. P. の轉培養 (Umzüchtung) に就ては d'Herelle, Otto, Winkler 及び Seiffert 等の記載によれば, 或る一つの菌株に屬する B. P. を他の菌種又は菌株を以て世代通過を行ふ時は, 之に使用せる菌種又は菌株に對して, 溶解能力が高まり, 今迄作用せざりし菌に對しても作用を發揮するに至ると謂ふ。

(其の 1) 溶解能力の強度なる B. P. 液を添加しての B. P. 検出法: 以上各種の検出實驗に於て得たる對照菌, 赤痢菌, 大腸菌の Virulenz 高き B. P. 液 Appelmans-Werthemann 氏法にて eL=9-10) 1 cc を各種の Bouillon に容れ, 之に可檢菌を移植 37°C-24 時間培養したる後, 該液或はその 12 回乃至 20 回増強法を行ひたるものにつき検索せり。

(其の 2) B. P. 産生容易なる赤痢菌との混合培養による B. P. 検出法: B. P. を容易に産生する對照菌 (赤痢菌或は大腸菌) と可檢 Proteus 菌との各 1 Öse を Bouillon 培養基に混合培養し, Protamylase 法により B. P. 検出増強を企て, 其の検索に努む。但し通過培養回数は 15 回施行せり。

(其の 3) B. P. 増強操作毎回, 赤痢菌又はその力價高き B. P. 液を添加しての B. P. 検出法: 即ち増強毎回 B. P. Bouillon 液に赤痢菌又は其の B. P. 液を添加して B. P. の検出法を施行せり。

#### 第 6 法 アルカリ劑添加に依る B. P. 検出法

細菌の増殖に悪影響を及ぼす物質又は條件の存在が, B. P. 産生を却って促進せしむる事あり。例へば, 抗菌性血清, 菌の自家融解物質, 種々の化學的物質等にして, Pico は滅菌食塩水に其の作用ありと報じ, Bachmann は, 或る種の蛇毒に之を認め, Jötten は寒天培養菌苔を以て, 濃厚なる Bouillon 浮游液を作るに, B. P. の産生あるを見, 緒方及び永井は, 培養液に直流, 交流の電流を通ずる事によりて B. P. 産生あるを報す。著者は供試菌 Bouillon 培養に塩化カルシウム又はアンチフォルミンの微量を添加し, 之を 3 日間 37°C の孵卵器内に納め, 然る後 Protamylase 法を用ひて B. P. 検索を行へり。

### 第 7 法 Proteus 菌培養に死菌添加に依る B. P. 検出法

Russ-Münser u. V. Kindermann は Proteus 菌株の Phage 研究中彼等の供試菌 HX<sub>19</sub> 菌株? の一つの Pr. 1 菌に興味ある性質あるを認め、極めて検出困難なる Proteus OX<sub>19</sub> 菌, Proteus HX<sub>19</sub> 菌及び Pr. 1 菌の Phage を検出證明せりと報告す。

著者之を追試すべく, Proteus X<sub>19</sub> 菌株又は Proteus vulgaris 菌の 37°C-24 時間 Bouillon 培養に, 他の Proteus X<sub>19</sub> 菌の O 型寒天培養菌浮游液を 70°C-1 時間半滅菌したるもの 1 滴を加へ, 再び 37°C の孵卵器内に培養し, 次いで之を濾過し, B. P. を檢索せり。

### 第 8 法 動物体を藉りての B. P. 検出法

Borchardt は海狸に經口的に赤痢菌生菌を飲下せしめたるに, 其の後の腸管排泄物に B. P. の出現するを實驗し, Bordet 及び Ciuca は海狸の腹腔内に大腸菌の純培養生菌を注射し, B. P. を證明せりと報告す。

著者も供試菌培養生菌液 (寒天斜面培養 1 Normalöse を滅菌生理的食塩水 10 cc に浮游せしめたるもの 0.5 cc) を海狸の腹腔内に 4 回注射し, 最後の注射より 3 日を経て, Bouillon 10 cc を腹腔内に注入して, 腹腔液を採取し, 2-3 倍の Bouillon を加へ, 37°C-24 時間培養後 B. P. の検査を行へり。

又海狸の腹腔内に於て, B. P. の増強を計る爲め, 上述諸實驗にて得たる B. P. 液の 1 cc と, 供試菌培養菌液 1 滴との混合液を海狸の腹腔内に注入し, 18 時間を経て, Bouillon 約 10 cc を注射し, 腹腔液を採取し, その凝固を防ぐため, 枸橼酸曹達を加へ, 之を 37°C 3 時間放置し, 濾過法によりて之を無菌となし, B. P. の検出操作を施行せり。

## 第 3 節 B. P. 證 明 法

前節實驗に於て調製せる B. P. 液の B. P. 證明は, 下記の如き直接證明法及び増殖的證明法を併用し, 其の檢出菌は, B. P. 増強に使用したる菌は勿論他の可檢菌を以てせり。

### 第 1 項 直 接 證 明 法

(A) Bouillon 法: B. P. 存在する時は細菌は, 其の作用により, 溶解乃至發育阻止せられ, Bouillon は當該 Bouillon 培養對照に比し, 透明化するを以て, 叙上の B. P. 檢出増強時に, 已に B. P. の産生有無を判定するを得るも, 之を精査せん爲め次の實驗を行へり。

即ち (1) Bouillon 9 cc に, B. P. 液 1 cc と同時に當該菌又は他の菌 (増強に使用せざる菌株) の 9, 18 或は 24 時間寒天培養 1 Öse を加へたるもの, 並に (2) 之と別試験管の Bouillon 9 cc に前同様の可檢菌 1 Öse のみを加へて 37°C の孵卵器内に於て豫め 6, 12, 或は 18 時間培養せる後, B. P. 液 1 cc 添加せるもの, 是等の Bouillon を孵卵器内に納め, 6, 12, 18 或は 24 時間毎に其の Bouillon の濁濁程度を觀察せり。即ち, 菌と B. P. 液同時培養による Bouillon の透明保持乃至濁濁の減弱, 或は細菌の發育により一旦生じたる Bouillon の濁濁の B. P. 液注加に依る再透明化, 濁濁減少程度を對照 Bouillon 培養と比較し其の成績を判定せり。

(B) Agar 法: 平板寒天面上に於て, B. P. の作用により生ぜる菌苔又は Kolonie の變化を觀察し, 其の成績を判定せり。

其の變化は, 完全溶菌現象, 菌苔中の孤立溶菌斑 (taches vierges), Kolonie の蠶蝕形 (Flutterform) 又は Kolonie の多形性 (Poikilomorphie) の發現なり。

而して檢出菌の濃度は 9 時間又は 18 時間寒天斜面培養菌 1 Normalöse を, 滅菌生理的食塩水 2 cc に浮游せしめたるものを使用し, 又 B. P. の溶菌現象觀察時間は, 操作後 6, 9, 12, 24 或は 48 時間に於て行へり。

著者の實施せる證明法次の如し。

(1) 寒天上面菌液塗布後 B. P. 滴下法 (Auftropfverfahren): 冬季は 1%–1.5%, 夏季は 2% の寒天を使用し, 其の平板上に検出菌液 1 滴 (菌液濃度は既述せり) を滴下し, 之を Conradi 棒を以て平等に塗布し, 孵卵器内又は乾燥器にて, 塗布面を乾燥せしめ, 毛細管ピペットを以て, B. P. 液 1 滴を滴下し, 37°C の孵卵器内に納め, 時間的 (9, 12, 24 或は 48 時間) に觀察せり。

但し著者の可檢 B. P. 液及び可檢菌株は, 饒多なるが故に, 1 枚の平板を以て, 多數の B. P. 検出證明を同時に行ふべく, 該菌塗布シャーレの裏面を豫め 7–8 箇所を區劃を施し, 各箇所異なる B. P. 液を使用せり。而して此の際の B. P. 液滴下は, 各滴合流する事あるにより, B. P. 液は白金耳を以て, 菌の塗布寒天面を擦過損傷せしめざる様注意して劃線し, 其の目的を達せり。

(2) 寒天平板上菌液 B. P. 液混合塗布法 (Aussat von Filtratbacteriengemischen): 上記の生菌液及び B. P. 液各 1 cc を試験管に採り, 其の 1 滴を寒天平板面上に塗布し, 之を孵卵器内に培養し, 前掲の如く時間的に觀察せり。

(3) 寒天平板上 B. P. 液塗布後菌液塗布法 (Aussat von Bakterien auf Agar nach dem Bestreichen mit Filtrat): 前掲 (1) の反對操作を行ふ。

(4) B. P. 液寒天混融後菌液塗布法 (Mischungsverfahren): 50°C に溶解せる約 10 cc のシャーレの寒天に, B. P. 液約 1 cc を加入良く混合し, 之を靜置凝固せしめ, 寒天凝固後可檢菌液 1 滴滴下, 平等に塗布, 孵卵器に容れて後之を觀察せり。

(5) 寒天 B. P. 液, 菌液混融法 (Mischungsverfahren): 50°C に溶解せる約 8 cc のシャーレの寒天に菌液及び可檢 B. P. 液各 0.5 乃至 1 cc 宛を容れ, 良く混和し靜置, 寒天凝固後其の上に寒天約 5 cc 弱を注ぎ上述の如く培養して觀察せり。

## 第 2 項 増 殖 的 證 明 法

B. P. は, それに相當する感受性菌との共存により, 増殖するを以て, B. P. 液と供試菌とを Bouillon に投じ, 之を 37°C の孵卵器内に納め, 而して 3 時間, 6 時間, 9 時間保温培養して, その増殖を計りたる後, 第 1 項の寒天法又は下記の方法にて検査せり。

1) 永井氏法: 永井の法に倣ひ, 著者は B. P. 液 5 cc に検出可檢菌液約 5 滴を加へ, 37°C–6 時間孵卵器内に容れ, 之を培養し, B. P. 液の滅菌法は, 既述の如く Proteus 菌株の B. P. 液は 55°C–30 分 (赤痢菌等の B. P. 液加熱滅菌は 58°C 30 分) 又は Chamberland L<sub>3</sub> 濾過法, 石炭酸クロロフォルム滅菌法にて處置し, 上記の寒天法を用ひて検査せり。但し Chamberland 使用の場合は B. P. 液 5 cc, 菌液 5, 6 滴を Bouillon 20 cc に加入す。

2) Pfreimbter, Sell u. Pistorius 法: 本法は可檢 B. P. 液 1 cc に供試菌液 1 cc を加へ, 37°C 孵卵器内に容れ, 6 時間後, 滅菌する事なく, 其の 1 滴を寒天平板上に塗布 37°C 24 時間培養後検索す。

3) Gohs 法: 1.5% の斜面寒天培養基面に白金耳を以て, 試菌の浮游液を塗布し, B. P. 液 0.5 cc を斜面に觸れざる如くにして試験管凝水中に注ぎ, 之を 37°C 24 時間孵卵器内に直立せしめて培養, 然る後検索す。

4) 内藤氏法: 本法は 2% の斜面寒天培養基の管底に斜面を汚染せしめざる様注意して, B. P. 液及び生菌液各々約 0.5 cc 宛注ぎ, 37°C 9 時間孵卵器内に直立せしめ, 然る後, 試験管を倒し管底の B. P. 液及び菌液混合液を以て全斜面を沾濕す。再び 37°C の孵卵器に保温し, 12–24 時間後斜面の變化を觀察す。

#### 第 4 章 實 験 成 績

以上の實驗に於て、對照菌株志賀赤痢菌、大腸菌及び駒込 BIII 菌は、B. P. 檢出手技により檢出難易ありしも、當該 B. P. を檢出證明し得たれども、著者の探求する *Proteus X<sub>19</sub>* 菌及び *Proteus vulgaris* 各菌株の B. P. の檢出は終始不能に終れり。

#### 第 5 章 總 括 及 び 結 論

B. P. 發見以來、各種細菌の B. P. 檢索せられ、其の研究知見發表種を接し、業績實に汗牛充棟も、ならざるに至れり。然れども *Proteus* 菌 Phage に關する業績發表は、極めて寥々たる感ありて、*Proteus* 菌を B. P. 檢出證明せらるゝ菌株の列に配する學者あるも、著者寡聞にして、唯田村及び Russ Münser, Kindermann の該菌 B. P. 檢出報告あるの他之を識らず。

著者は *Proteus X<sub>19</sub>* 菌株 (OX<sub>19</sub> 菌, HX<sub>19</sub> 菌) の B. P. 檢出は、他の細菌と同様、容易に可能なるを想定し、實驗當初に於ては、數株の *Proteus X<sub>19</sub>* 菌株を供試菌とし、檢索を試みたるに豫想に反し、其の結果は對照菌たる志賀赤痢菌、大腸菌の如く容易に其の B. P. を得られざりき。之れ供試菌株の不感受性なるが爲か、將又檢出菌の少なきに依り、B. P. 存在するも之を逸するに非らずやを思考し、*Proteus X<sub>19</sub>* 菌の蒐集に努め、又 *Proteus X<sub>19</sub>* 菌のみならず、*Proteus vulgaris* 總數 42 菌株を使用して、B. P. 檢出を実施せり。

而して、B. P. の一般生物學的及び物理學的性状より B. P. の能働性發揮に重要なる關係を有する諸要件、例へば生菌との共存、Medium の種類、その P<sub>H</sub> 關係、B. P. 菌液保温增強時間、B. P. 誘發物質 (例へば Protamylase) の添加培養及び檢出增強時の B. P. 菌液滅菌法等に考慮を拂ひ、次の檢出證明法を施行せり。

即ち著者は、(1) 鶏糞或は下水より *Proteus* 菌に作用する B. P. の採取を試み、(2) 供試菌純培養或は Otto, Munter, 緒方及び山口等の報ずる如く、その陳舊培養よりの證明を企て、(3) 又 B. P. 產生容易なる赤痢菌或は其の力價の高き B. P. 液との混合轉培養 (Umzüchtung) に依り、之を探求し、(4) 緒方, Bachmann の報告に倣ひ、細菌の發育に障害を及ぼすアルカリ劑を添加して、其の發生を促し、(5) 又動物体を藉り、檢出或は增強を試み、然かも增強回數は、總ての檢出手技に於て、8 回以上 20 回累代移植增強法を施行せり。

猶 B. P. 證明に際しては各手技毎に直接或は増殖的證明法各種を併用せり。

而して實驗の成績は、對照菌株赤痢菌、大腸菌及び駒込 BIII 菌の B. P. 檢出は、以上の各實驗手技に於て、其の結果に多少優劣ありしも、孰れも殆ど檢出證明せられたるに拘らず、著者の求むる *Proteus X<sub>19</sub>* 菌及び *Proteus vulgaris* の B. P. 檢出は、終始不可能に終れり。

茲に於て、著者は遂に Proteus 菌株の B.P. を検出する事能はず、陰性の結果を見たるも、抑々其の原因奈邊に存するや、著者淺學菲才にして之を解明し能はず、著者の供試菌株は總て不感受性菌なるが爲か、檢出手技の拙劣なるが爲か益々不可解とする所なり。又密かに想ふ。各種の B.P. 檢出せられ、之に關する新知見陸續として發表せられ、枚舉に遑あらざるに反し、著者寡聞なりとは雖も、Proteus 菌 B.P. の檢討業績の極めて少なきは又如何なる理由に據る乎。著者は本實驗に 1 年有半の歳月を費し、徒勞一笑に値するを自覺するも、敢て實驗の實相を報告し、Proteus 菌 B.P. は果して檢出不能のものなるや、大方諸賢の御批判と御示教を仰いでやまざるものなり。

終稿するに當り、本實驗に於て著者が優秀なりと認めたる B.P. 檢出證明法は、檢出法に於ては Protamylase 粉末加入法、證明法に於ては永井法、内藤法にして、孰れも操作簡易且つ鋭敏なる方法と思惟し、之を推獎するものなり。

撰筆するに臨み、御懇篤なる御指導を賜はりし恩師緒方教授並に供試菌株を分譲せられたる諸賢の御好意に對し、満腔の感謝の意を表す。

## 文 献

- Appelmans:** C. r. Soc. Biol. 1921. **Balf:** Z. Immunit. forsch. 39, 1923. 1. Ref. Zbl. Bakter. usw. 78. **Borchardt:** Z. Immunit. forsch. Teil. 1. Orig. 37, 1. 1923. **Bordet et Cinea:** C. r. Soc. Biol. 86, 87, 1922. **Bronfenrenner:** Zbl. Bakter. usw. Ref. 91, 141, 1928. **Bachmann:** C. r. Soc. Biol. 86, 1108, 1923. **Combesco:** Zbl. ges. Hyg. 2, 547, 1923. **Doerr:** Z. Hyg. 97, 209, 1923. **Doerr u. Zdanski:** Z. Hyg. 100, 79, 1923. **Eliava et Pozerski:** C. r. Soc. Biol. 84, 708, 1921. **江:** 細菌學雜誌, 339號. 南滿醫學雜誌, 12卷, 5號 (大正13). **Gildemeister u. Watanabe:** Zbl. Bakter. usw. 122, 556, 1931. **Gildemeister u. Herzberg:** Zbl. Bakter. usw. Orig. 91, 12, 1924. **Grigorjeff et Wollmann:** C. r. Soc. Biol. 96, 1141, 1927. **Gohs:** Z. Immunit. forsch. 45, 1925. **岩瀨:** 臺灣醫學會雜誌, 265號 (昭和2). **Jötten:** Zbl. Bakter. usw. Orig. 89, 202, 1923. **吉川:** 日微生物學雜誌, 27卷 (昭和8). **Kleinberger:** Zbl. Bakter. usw. 1. Orig. 118, 411, 1930. **Keller:** Z. Hyg. 103, 177, 1924. **河北:** 衛生學傳染病學雜誌, 30卷, 9, 10號 (昭和9). **桑野:** 衛生學傳染病學雜誌, 20卷, 6號 (大正14). 日新醫學, 第15年, 第11號 (大正15). 東京醫學會雜誌, 第40卷, 第6號, 7號 (大正15). **Miessner:** Zbl. Bakter. usw. Abt. 1. Orig. 91, 149, 1924. **永井:** 千葉醫學會雜誌, 5卷, 5號 (昭和2). 6卷, 11號 (昭和3). 7卷, 5號 (昭和4). **長沼:** 實驗醫學雜誌, 9卷, 7號, 8號 (大正14). **中村:** 細菌學血清學檢查法 (增訂2版). **中野:** 日微生物學雜誌, 30卷, 10號 (昭和11). **藤:** 日微生物學雜誌, 30卷, 7號, 12號, 14號, 15號, 16號, 17號 (昭和11). **緒方:** Zbl. Bakter. usw. 1. Orig. 93, 329, 1924. **緒方, 永井:** 衛生學傳染病學雜誌, 22卷, 5號 (昭和2). **岡村:** 日微生物學雜誌, 3卷, 6號 (昭和4). **Otto Munter u. Winkler:** Z. Hyg. 96, 1922. **Otto**

- Munter: Dsch. med. Wschr. Nr. 52, 1921. Pico: Zbl. ges. Hyg. 2, 462, 1923. Preimbert, Seif u. Pistorius: Münch. Med. Wschr. 1922. Nr. 14, 495. Russ-Münser u. Kindermann: Zbl. Bakter. usw. 129, 1933. Reichert: Zbl. Bakter. usw. Abt. 1. Orig. 91, 235, 4, 1924. Seiffert: Z. Hyg. 98, 4829, 1922. 鈴木: 大阪醫事新誌 3卷, 6號 (昭和7). 治療及び處方; 108號 (昭和4). Tomas: Z. Immunit.forsch. 63, 521, 1929. 田村: 臺灣醫學會雜誌, 34卷, 5號, 6號 (昭和10.) 田中: 京都府立醫科大學雜誌, 101號, 102號. 竹林: 日微生物學, 19卷. Werthemann: Arch. Hyg. 91, 255, 1922. 渡邊: 實驗醫報, 132 (大正14). 日本傳染病學會雜誌, 1卷, 2號 (大正15). 吉積: 東京駒込病院第18回報告 (大正15). 實驗醫學雜誌, 15卷, 4號, 5號 (昭和6.) 山口: 日微生物學雜誌, 18卷, 6號 (大正13.)