

二、三細菌の赤血球に及ぼす影響について

第 2 編

有及び無カタラーゼ血球に対する肺炎菌
及び連鎖球菌の溶血作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

松 本 万 輔

〔昭和32年3月27日受稿〕

目 次

緒 言

第 I 章 実験事項, 実験方法及び実験成績

第 1 節 固形培養

第 1 項 血液寒天培養.

第 2 項 1%葡萄糖加血液寒天培
養

緒 言

肺炎菌及び溶連菌等は血液寒天培地において、その集落の周囲に透明な溶血環をつくるが、更に一部のものに於ては菌集落のまわりに緑褐色環を形成するものがある。これをメトヘモグロビン (MetHb と略す) の生成によると考えたのは Schottmüller (1903) である。その後肺炎菌、溶連菌及び緑連菌等の溶血作用について多くの研究が行われ、又これら菌集落周囲の緑褐色環をめくり幾多の論争があるが、Oppenheim¹⁾、Clawson²⁾ は好条件下では溶連菌も肺炎菌も陽性であるといっている。肺炎菌、連鎖球菌は一般にカタラーゼを殆んど含まぬか或は極めて僅かである。これらの菌が新陳代謝の過程に於て H_2O_2 を蓄積することは McLeod³⁾ により初めて明らかにされ、更に藤田氏等⁴⁾ はこれに関し量的研究を行つている。上記の如くこれらの菌は溶血作用を有するが、更にこれらの生成する H_2O_2 により血液のヘモグロビン (Hb と略す) が酸化されて MetHb を形成し、所謂 α 型溶血

第 2 節 液体培養

第 1 項 血液液体培養

第 2 項 1%葡萄糖加血液液体培
養

第 II 章 総括及び考按

結 語

を起すと考えられている。然し従来のこれに関する研究は殆んどカタラーゼ (K と略す) を有する一般の血液を用いたものである。又培地における血液の種類と溶血環及び集落の大きさとの差を論じたものに松井氏⁵⁾ の報告があるが、アカタラーゼ血液 (A-K と略す) の事についてはふれていない。A-K 血液における溶血作用をのべているのは第 1 編記載の宮本氏であるが、主として肺炎菌 I 型と溶連菌についてである。そこで著者はアカタラーゼ血液と細菌の溶血作用及び MetHb 形成との関係を更に詳しく知るため次の実験を行つた。

第 I 章 実験事項, 実験方法及び
実験成績

第 1 節 固形培養

第 1 項 血液寒天培養

i) 実験方法

K 保有血として人、兎、モルモット、山羊の血液を用い、A-K 血液として家鴨又は鷺鳥の血液を使用した、これらの血液で 4% 血液

寒天培地を作り、pHは7.4としたが、pHの差による変化を見るため6.4及び8.4の実験も併せ行つた。供試菌は肺炎菌I、II、III型(P_I、P_{II}、P_{III}と略す)、溶血性連鎖球菌(Cook株)(Hと略す)、緑色連鎖球菌(Viと略す)とし、24時間孵卵器にて培養し、集落、溶血環の大きさ及びMetHb環の有無を検した。尚培養は好気性と嫌気性とにわけて観察した。

ii) 実験成績

a) 好気性培養(第1図)

(1) 各菌集落の大きさはカタラーゼ保有血液培地(K培地と略す)においては著差を認めない。然し、カタラーゼ欠乏血液培地

(A-K培地と略す)では各集落の大きさは、K培地のものに比し、同程度乃至稍々大である。

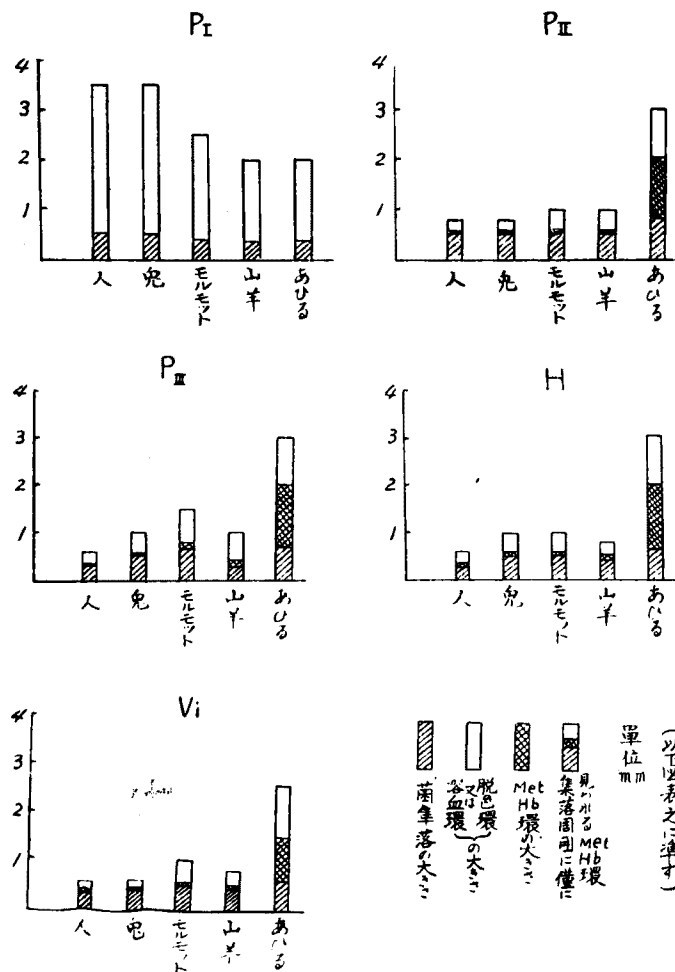
(2) P_IはK培地において、他の菌に比し遙かに大きい溶血環を示す。即ちP_Iでは2~3mmに達するが、他の菌は概ね1mm前後である。又各菌周辺の褐色環、所謂メトヘモグロビン環も僅かにみとめられる程度である。但しP_Iでは殆んどみとめられない。

(3) A-K培地では、一般に菌集落の周囲に褐色粒子を有する帯状環、所謂メトヘモグロビン環(MetHb環と略す)を形成し、更にその周囲に全く脱色され、透明で恰も局所が穿通された如く見える部分がある。これはK

培地の溶血環即ち血色素の色調が失われ一見透明のようであるが、尚僅かに黄色調をおびたものとは明らかに異なる。これを今後脱色環と名づける事とする。これはHbが更に分解されるためと推測される。この脱色環はP_Iを除き何れも、K培地の夫々の溶血環より遙かに大である。P_Iは唯脱色環のみであるが、他の諸菌では菌集落周囲に1~1.2mm内外の中を有する上記MetHb環を明らかにみとめる。これはK培地におけるより著しい。そしてこの脱色環及びMetHb環の大きさは、P_Iを除く各菌の間では著差は認められなかつた。

(4) 4%血液寒天培地を4%赤血球寒天培地にかえ、pH7.4における実験を行つたが、集落、溶血環、脱色環及びMetHb環の大きさ等において、両者の間

第1図 pH 7.4, 4%血液寒天培養(好気性)

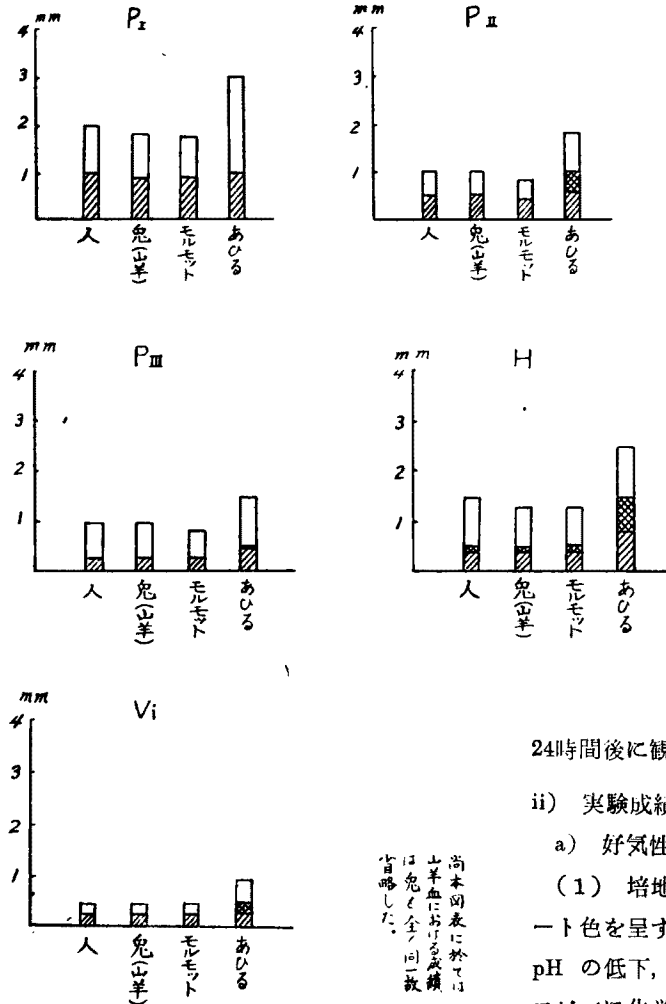


に有意の差をみとめなかつた。

(5) pH を 6.4 及び 8.4 に変更して実験を行つたが、結果は pH 7.4 の場合と大体同様である。ただ培地が酸性に傾くと、溶血環或いは脱色環が僅かに増大する傾向が見える。

b) 嫌気性培養 (第2図)

第2図 4%血液寒天培養 (嫌気性)



(1) 各菌集落は大部分 0.5 mm 前後で、好気性培養の場合と大差ないようである。但し P_I を除き一般には発育はやや悪いように見られる。

(2) K 培地においては、P_I の溶血環は最も大である。然し各菌の溶血環の大きさは好気性時に比し著差は認めない。ただ、H を

除き嫌気時においては、P_{II}, P_{III}, V_i において MetHb が殆んどみとめられない。

(3) A-K 培地においては、好気性の場合と同じように、K 培地での溶血部に相当する部は脱色環を呈し、P_I は最も著明である。P_{II}, H ではかなりの MetHb 環がみとめら

れるが V_i ではごく僅かである。然しこれら MetHb 環も、好気性時に比し明かに小さくなつている。

(4) 嫌気性培地では、好気性に比し一般に MetHb は生成され難いようであり、これは A-K 培地でも該当する。

(5) 血液培地を赤血球培地に変更し、又 pH を 6.4 及び 8.4 に変えても、結果に著差はみられなかつた。

第2項 1%葡萄糖加血液寒天培養

i) 実験方法：実験材料は前項に同じ。前記各種動物血液の 4% 血液寒天培地に 1% の割に葡萄糖を加えたものに、上記各供試菌を好氣的及び嫌氣的に培養して 24 時間後に観察した。なお pH は 7.4 である。

ii) 実験成績

a) 好気性培養 (第3図)

(1) 培地は赤色でなく、一般にチョコレート色を呈する。これは細菌の発育による pH の低下、その他種々の因子が血中へモグロビンに化学的变化を及ぼした結果ではないかと推測される。

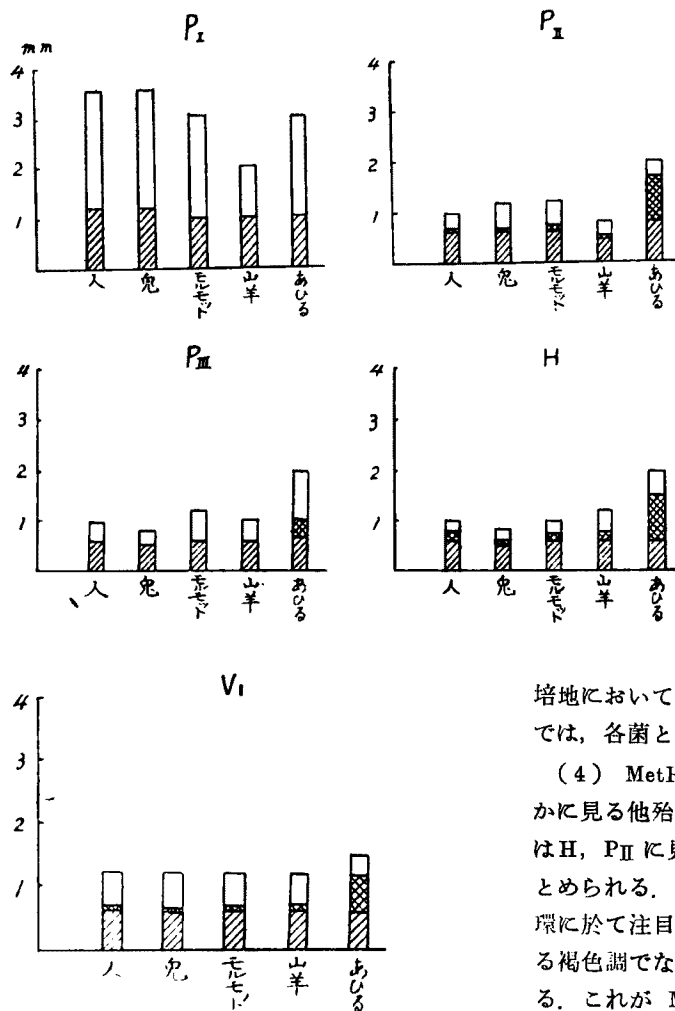
(2) 集落の発育は一般に良好で大きい。そして光沢ある灰黄色を呈する。

(3) 菌集落周囲の溶血環は淡灰黄色で透明で、血液培地との境界は明らかである。

(4) P_I は K 培地に於て最も大きい集落と溶血環を示す。他の菌は集落の大きさの割

尚本図表に於ては山羊血における成績は兎と全く同一故に省略した。

第3図 1%葡萄糖加血液寒天培養(好気性)



には溶血環は大きくない。

(5) A-K培地においては、各菌の溶血環は無色透明に近く、脱色環を呈する。この場合にもPIは最も著しい。

(6) A-K培地のH, PII, VI等の菌集落周囲には暗褐色帯を見る。そして更にその周囲に脱色環が存在する。この暗褐色帯は、血液寒天培地で見られたMetHb環に相当するものと考えられる。HとPIIで著明である。このMetHb環はK培地では各菌とも殆んど見られず、Hにおいてさえ極めて僅かである。この点普通血液寒天培地の場合と多少異なる。

(7) 以上の所見は、赤血球寒天培地に変えた場合も、又pHを6.4及び8.4に変更した場合にも著変をみとめなかつた。

b) 嫌気性培養(第4図)

(1) 培地は好気性の場合の如くチョコレート色調は甚だ少く、赤色をおびている。嫌気性培地ではO₂が殆んどないため葡萄糖血液培地における酸化或は還元作用が好気性時程起り難いため、両者間に培地の色調の差が見られるものと考えられる。

(2) 菌集落の発育は好気性時と大差がない。

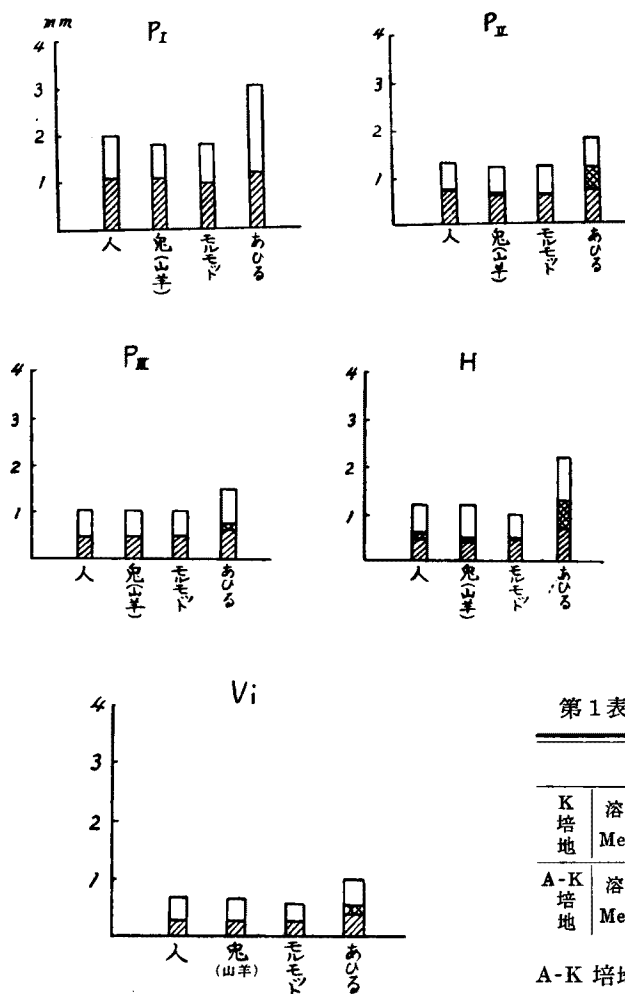
(3) 各菌の溶血環はK培地において、PIが最大である。A-K培地では、各菌とも集落周囲は脱色環を示す。

(4) MetHb環はK培地ではHにおいて僅かに見る他殆んどみとめない。A-K培地ではH, PIIに見るが、PIII, VIでも僅かにみとめられる。但しこの際H, PIIのMetHb環に於て注目されることは、その色調が単なる褐色調でなく、濃緑褐色を呈することである。これがMetHbなりや否やは俄かには断じ難い。この緑色をおびたものは或はVerdohbに類するものであろうか。このgreen hemolysisはかつてMetHbの生成に基づきかつH₂O₂の生成に関連すると考えられていたが、Anderson⁶⁾等は、この緑色物質は恐らく還元により生ずる血色素鉄含有誘導体であろうといっている。或はこれに類するものかも知れない。

(5) 上記A-K培地におけるMetHb環乃至緑褐色環の大きさは、一般に好気性時におけるより小である。

(6) 以上の所見は、赤血球培地、pH6.4及び8.4においても著差は認められなかつた。

第4図 1%葡萄糖加血液寒天培養(嫌気性)



物の種類による差は殆んど認めなかつた。溶血部を分光器で観察するに、P_I、P_{III}では550m μ 附近と580m μ 附近に吸収線を見る。之はHbO₂の吸収線である。然し、Hでは630m μ の部分に濃厚な吸収線あり、又540及び570m μ 附近にも濃い吸収線を見るが、これはMetHbの吸収線である。P_{II}、V_iでも僅にMetHbの吸収線を見る。P_I、P_{III}では殆んどみとめられなかつた。

(2) A-K培地では、P_Iは強い溶血を示すが、P_{II}、H、V_iに於ては、所謂溶血したと思われる部分は暗褐色調を呈し、分光器でもMetHbの吸収線を明瞭にみとめる。なおこの

第1表 4%血液ブイオン培養(好気性)

		P _I	P _{II}	P _{III}	H	V _i
K培地	溶血	+	+	+	+	+
	MetHb	-	±	-	+	±
A-K培地	溶血	+	±	±	+	±
	MetHb	-	+	±	+	+

A-K培地において特に注目すべきは、P_Iの溶血部もK培地におけるのとは異なり、赤色調は少くむしろ黄色に近く、分光器でもHbO₂の吸収線のみとめるが、525m μ 附近にも薄い吸収線を見る。恐らくHbが更に分解して、Pentdyopent反応を起して、むしろ一部脱色されているのではないかと想像される。P_I以外の菌の溶血部も、赤色調の淡い点より、A-K培地では一般に溶血部に於て、Pentdyopent反応による脱色化がおり、又P_{II}、HではMetHb形成もK培地よりも著明と推測される。

(3) 以上の所見は、pH 6.4、8.4においても著差はなかつた。

第2節 液体培養

第1項 血液液体培養

i) 実験方法：供試血液及び供試菌は前節固形培養の際と同様である。4%血液ブイオン培地を作り、pHを7.4とし、各菌を夫々1mg宛を培養して、24時間後観察した。なお培養は好気性及び嫌気性の状態で行い、溶血を起した試験管を軽く遠沈し、溶血部を分光器により観察した。

ii) 実験成績

a) 好気性培養(第1表)

(1) K血液液体培地では、溶血現象はP_I、Hが最も強い。各K保有血液においては、動

b) 嫌気性培養(第2表)

第2表 4%血液ブイオン培養(嫌気性)

		PI	P _{II}	P _{III}	H	Vi
K 培 地	溶 血	++	+	+	++	+
	Met Hb	-	-	-	±	±
A-K 培 地	溶 血	++	+	+	++	+
	Met Hb	-	±	-	±	±

(1) K培地では一般に各菌とも溶血は強いが, Met Hb の吸収線が僅かに認められるのはHにおいてのみで, 他の菌では殆んどこれをみない。

(2) A-K培地でも, P_{II}, H, ViにおいてMetHb形成は好気性時程著しくない。溶血作用は各菌ともかなり著明であるが, 溶血部は何れも脱色されている傾向が強い。この場合も, A-K培地ではK培地における如き単なる溶血でなく, Hb分解の更に進んだ段階にあるものと考えられる。嫌気性培地では一般にMetHb形成が少い。

第2項 1%葡萄糖加血液液体培養

i) 実験方法: 供試材料は前項と同様である。4%の血液ブイオン培地に1%の割に葡萄糖を加え, pHを7.4とし好気性及び嫌気性培養を行い24時間後観察した。

ii) 実験成績

a) 好気性培養(第3表)

第3表 1%葡萄糖加血液ブイオン培養(好気性)

		PI	P _{II}	P _{III}	H	Vi
K 培 地	溶 血	++	+	±	+	±
	MetHb	-	±	-	+	+
A-K 培 地	溶 血	++	±	++	+	+
	MetHb	-	+	±	+	+

(1) 溶血部は黄赤色, Met Hb形成を見る時は暗赤褐色調を呈する。

(2) K培地では, 溶血はPI最も強く, P_{II}, H之に次ぐ。MetHb形成は, H, Viに見られ, 又P_{II}では僅かに之を見る。PI, P_{III}では殆んどみとめぬ。

(3) A-K培地では, 各菌とも強い溶血を

呈するが, この場合も溶血部の脱色がみられる。特にPIで著明である。MetHb形成はPIを除く各菌に見られるが, H, P_{II}において著しい。

(4) 以上の所見は, 赤血球培地或はpH 6.4及び8.4の場合も著差を認めない。

b) 嫌気性培養(第4表)

第4表 1%葡萄糖加血液ブイオン培養(嫌気性)

		PI	P _{II}	P _{III}	H	Vi
K 培 地	溶 血	++	++	+	++	+
	Met Hb	-	-	-	±	±
A-K 培 地	溶 血	++	++	+	++	+
	Met Hb	-	±	-	+	±

(1) K培地では, 溶血は各菌とも好気性時に比し, 同程度或は稍々強くあらわれているが, MetHb形成は殆んどみとめられない。

(2) A-K培地では, 溶血乃至脱色現象は著しいが, P_{II}, HではMetHbの吸収線がみとめられる。

第II章 総括及び考按

有カタラーゼ血液(人, 兎, モルモット, 山羊)及び無カタラーゼ血液(家鴨, 鶯鳥)を夫々加えた培地に, 肺炎菌(P_I, P_{II}, P_{III}), 溶連菌(H), 緑連菌(Vi)を培養した際の溶血, 脱色の現象及びメトヘモグロビン(Met Hb)の生成を比較検討した上記実験成績を総括し, これに考按を加えた。

先ず血液加普通寒天培養における結果を要約すると第5表に示す如くである。

第5表

		PI	P _{II}	P _{III}	H	Vi
K 血	溶血環	++	+	+	+	±
	脱色環	-	±	-	±	-
	MetHb環	-	+	±	+	+
A-K 血	溶血環	±	±	±	±	±
	脱色環	++	++	+	++	+
	MetHb環	-	++	+	++	+

K培地ではPIが溶血環の生成が最も大であり、MetHb環の生成は逆に最も少く、P_{II}、H、Viの各菌では溶血環はPIより少く、MetHb環の生成はPIより僅かながら大である。これに対しA-K血培地では一般に各菌とも溶血環の生成はK血培地におけるよりも少く、脱色環、MetHb環はK血培地よりも顕著に認められる。ただPIはMetHb環をA-K血培地においても殆んど生成しない。かくの如くA-K血培地において脱色環、MetHb環の生成が著明であることは注目すべきことであると考えられるが、今細菌の赤血球に対する作用を考察するに、次の各場合があると思われる。即ち、(1)菌の産生する溶血素により赤血球が破壊されて、血色素その他が游出する場合(これをここでは溶血と称することとする)。(2)游出した血色素(Hb)、又は赤血球内の血色素が菌の産生するH₂O₂により酸化されてMetHbとなり、更に酸化が進むとSingerの述べる如く、ポルフィリン環の開裂が起り無色のPropent-dyopentその他のものに至ると考えられ、MetHbの段階で止まるとMetHb環の生成を見、更に酸化が進んだ場合には菌集落の周辺に無色の環がみとめられると推定される(これを脱色環とよぶこととする)。これらのことよりH₂O₂処理に関与するカタラーゼ(K)を欠く培地においては、K保有培地に比べてMetHb環、脱色環の生成が一般に大なることは納得のいくことである。

以上の固形培地で認められた溶血、脱色、MetHb生成の各現象は血液加液体培地においても同様の傾向がみられる。且つ液体培地においては菌培養後これを遠沈し菌体、血球その他を除去した上清につき分光光度計により分光的に検討して溶血、MetHb生成などの現象を更に確認するに便である。かくの如き液体培地による実験を併せ行つた結果、A-K血培地においては各菌とも一般に溶血現象は少いかに見受けられるが、実はこれは溶血後血色素が酸化をうけてMetHbとなり更に無色のものになつたためと想像しうるこ

とを知つた。

次に葡萄糖加血液培地について見るに、固形培地ではA-K培地、K血培地ともに一般に菌発育は葡萄糖無添加の場合に比し良好であり、脱色環の生成もまた一般に大である。これは発育が旺盛なためH₂O₂の生成が著しいことに起因すると考えられる。MetHb環生成は葡萄糖加培地では逆に一般に少く、これもH₂O₂生成の盛んなことに起因し、MetHbは一旦生成されても更に酸化されるのではないかと推定される。K血培地、A-K血培地を比較すると、葡萄糖無添加培地におけると同様、後者の方が脱色環が著明に大であり、その他の傾向もまた同様である。

次に好気性及び嫌気性培養につき比較するに、嫌気性では好気性に比し、K培地では勿論、A-K培地においてもMetHb生成、脱色現象共に極めて少く、菌によるH₂O₂の生成は主として酸素呼吸によると考えられるから、嫌気性発育に於てはH₂O₂の生成も少く、従つて血色素の酸化も起らないのは当然といえる。ただ本実験においてはP_{II}、Hなどが嫌気性培養でもMetHbを僅かながら生成する成績が得られたが、これは培地中に僅かに残存する酸素による呼吸の結果生成されるH₂O₂によるものと推測される。

結 論

肺炎菌I、II、III型、溶連菌(Cook株)及び緑連菌を、カタラーゼを有する血液及びカタラーゼを有しない血液を含む培地に培養し、菌の発育、溶血環、脱色環及びメトヘモグロビン環形成等につき観察して次の結果を得た。

(1) 各菌の発育は培地中の血液のカタラーゼの有無とは殆んど無関係で、両者に於てはほぼ同様の発育を示す。

(2) カタラーゼ保有血液培地ではPIの溶血環が最大で、MetHb環は殆んど認めない。P_{II}、溶連菌、緑連菌では僅かにMetHb環を見る。

(3) カタラーゼ非保有血液培地では、各菌集落周囲に溶血環よりも脱色環が甚だ著明で、

カタラーゼ血培地の溶血環より大である。これは Pentdyopent 反応によるものと推測される。

(4) カタラーゼ非保有血液培地では P_Iを除き MetHb 環の形成が著明で、特に P_{II}、溶連菌において著るしい。

(5) 1%加葡萄糖血液培地では、菌の発育甚だ良好で、溶血環或いは脱色環がやや大

となる。但しこの培地では MetHb 環の形成が少い。

(6) 嫌気性培養では一般に溶血環或いは脱色環は好気性培養におけるより稍々小さい傾向にあるが、著るしい差異はみとめなかつた。然し、前者においては、カタラーゼ及びアカタラーゼ血液培地ともに、MetHb形成は後者の場合に比し極めて僅かである。

文 献

- | | |
|---|--|
| 1) Oppenheim: J. Inf. Dis. 26 (1920) | (1930) |
| 2) Clawson, B. J.: J. Inf. Dis., 26 (1920) | 5) 松井清治: 細菌学雑, 4, 105 (1949) |
| 3) McLeod & Gordon: J. Path. and Bact. 25, 139 (1922) | 6) Anderson & Hart: J. Path. and Bact. 25, 139 (1922) Bioch. J. 18, 937 (1924) |
| 4) 藤田秋治, 児玉威: 東京医事新誌, 2699, 2549 | |

Studies on the Action of Some Bacteria on Erythrocytes.

Part 2: The Hemolytic Actions of Pneumococci and Streptococci on the Catalasemic and the Acatalasemic Blood.

By

Mansuke Matsumoto

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Murakami)

Many studies on the hemolytic actions of Pneumococci and streptococci have been carried out up to date, but they are all on the catalasemic blood while those on the acatalasemic blood are scarce. And ever since the discovery of acatalasemic patients in the department of oto-rhino-laryngology of our school, various clinical studies have been conducted. Prompted by the urgency of studying the latter, the author have conducted the experiments to clarify the hemolytic action of each bacterium mentioned above on the acatalasemic blood.

As for the bacteria of the present experiment, Pneumococci type I, II and III, *St. hemolyticus* (Cook's strain), and *St. viridans* have been selected. As for the catalase carrier, the blood of man, domestic rabbit, goat and guinea pig have been employed, and for the acatalase carrier, the blood of domestic duck or that of goose. Thereupon the following results have been obtained:

1. In the case of the 4% blood agar medium, the presence or the absence of catalase in the culture medium makes almost no difference in the growth of each bacterium.
2. P_{II}, P_{III}, *St. hemolyticus* and *St. viridans* form the larger hemolytic and the MetHb rings in the acatalasemic medium than in the catalase medium. As for P_I, it scarcely forms any hemolytic ring in either medium, but its MetHb ring is the largest of all.
3. In the acatalase carrier medium, the large discolored rings are formed, and this can be construed to be due to a pentdyopent reaction.

4. In the 1% glucose medium, the growth of bacteria is better and the hemolytic and the discolored rings are far larger. It seems that the formation of MetHb is somewhat inhibited in this medium.

5. In the anaerobic medium, the formation of MetHb is far less than that in the aerobic medium.
