

Title	腸内細菌科の鑑別をかねた新しい確認培地の研究
Sub Title	Studies on a new differential-confirmatory medium for the family enterobacteriaceae
Author	林, 江沢(Hayashi, Kotaku) 木村, 都(Kimura, Miyako) 丹後, 順子(Tango, Junko) 佐野川, 弘子(Sanogawa, Hiroko) 鈴木, 宣子(Suzuki, Nobuko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1964
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.8(1963)/9(1964) ,p.16- 25
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000008-0016

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

腸内細菌科の鑑別をかねた新しい確認培地の研究

林 江沢, 木村 都, 丹後 順子, 佐野川 弘子, 鈴木 宣子

Studies on a New Differential-confirmatory Medium
for the Family EnterobacteriaceaeKohtaku HAYASHI, Miyako KIMURA, Junko TANGO,
Hiroko SANOGAWA and Nobuko SUZUKI

I. 始めに

従来腸内細菌科の確認培地として汎用されているものに TSI 培地,¹⁾ Kligler²⁾ 培地等があり, これらの培地の培地上所見では大腸菌属, Shigella 属, Salmonella 属等の鑑別は可能であるが, Salmonella 属と Proteus 属, または Shigella 属と Morganella, Rettgerella, Providencia 諸属との鑑別は不可能なことが多い. しかし特に臨床検査等においては Proteus 属 Providencia 属等と Shigella 属, Salmonella 属等とを鑑別する必要が多く, 同一培地上で鑑別をかねた確認培地があれば極めて便利であろう. これまで用いられてきた腸内細菌の確認培地は 4 反応系がもつともすぐれており, Paradakis³⁾ (1960) は dulcitol-sucrose-salicin-iron-urea-agar の 5 反応系をもつ培地を報告したが, これは Salmonella の鑑別培地であつて, 腸内細菌全般についての確認培地ではない.

そこで Kligler 培地を基礎として PPA 反応をも同一培地上で反応させるかどうかを試みたところ所期の目的を達しうる知見を得たのでここに報告する.

II. PPA 反応の再検討

Henriksen and Closs⁴⁾ (1938) は Proteus が phenylalanine (以下 Phe. と略す) より phenyl pyruvic acid (以下 PPA と略す) を生成することを認め, さらに Stumpf and Green⁵⁾ (1944) はこれに関与する酸化的脱アミノ酵素について報告した. また Henriksen⁶⁾ (1950) は urease-test と比較して PPA 反応を用いて腸内細菌のうち Proteus 属を鑑別しうるすぐれた方法を示し, Clark and Shaw⁷⁾ (1954) も Proteus, Providence 群のみがこの酵素反応を示すことを報告した. さらに Singer and Volcani⁸⁾ (1955) がこれらの菌が数種のアミノ酸を対応する α -ケト酸にする反応に基づいて tryptophan を用いて Proteus, Providence 群を鑑別している. その後本反応は Stewart⁹⁾ (1959) により簡易化されたが, 従来使用されていた確認培地と同じく同一培地上でこの反応を検しうるという報告はない.

原法では PPA 反応には硫酸が必要であるとされていること, 鉄塩の溶液の強酸性, 酸化的脱アミノ反応の至適 pH がアルカリ側であることと, 培地上でこれら反応をおこさせるためには必然的に菌の増殖が要求されるなど矛盾した点が多く, 確認培地に加えるという試みはなされていない. これらの矛盾を解決するために まず PPA 反応の追試を行なつて本反応の必要にしてかつ最少の条件を検討した.

i) 硫酸の必要性

実験条件: 原法に従い, dl-Phe. 2 mg/ml を含む生理食塩液および Proteus vulgaris の 18 時間培養菌体の 1 mg/ml 生理食塩液浮遊液を調製し, それぞれ pH 7.4 に修正し, 1 ml づつを混合して 37°C 1 時間反応させる. この反応液 2 ml 対して, 10% 塩化第二鉄溶液 1 ~ 数滴を

加えた後 2 群にわけ、硫酸添加群と無添加群とする。

Table 1. Additive effect of sulfuric acid on PPA reaction

Species	Sulfuric acid	
	Added	Not added
Proteus mirabilis 88 ①	卅	卅
Proteus vulgaris OX-2	卅	卅
Proteus morgani S-58	卅	卅
Proteus rettgeri ES-84	卅	卅
Providencia 157 O-11	卅	卅

実験成績： Table 1 の如く反応液に硫酸を添加することは必須条件ではなく、非添加群は添加群に比べてやや呈色が弱い程度で、硫酸無添加でも十分反応しうる事が判明した。

ii) 鉄塩の溶解性

無機鉄塩の水溶液は強酸性を示し、pH 3.0 以上では水酸化第二鉄の沈殿を生じ、pH 4.0 では PPA と反応し得ない程度に鉄イオン濃度が低くなる。しかしクエン酸鉄アンモニウム水溶液は弱酸性 (pH 4.0~5.0) で pH 7.4 でも沈殿せず、水溶液そのものがやや着色しているが、PPA 反応を明らかに示しうる。

なお無機鉄塩でも 1% 寒天溶液に溶かせば、物理的粘性によつて鉄イオンが沈殿しにくくなるとの想定のもとに、実験したところ pH 7.2~7.4 においても PPA 反応陽性を示し、鉄塩を培地に添加しうる事が判明した。

III. PPA 反応の化学

i) PPA 生成の証明

細菌が Phe. に作用して PPA を生成することの証明として Singer and Volcani⁹⁾ (1955) は α -ケト酸の hydrazone 形成による方法を報告しているが、著者らは α -アセトアミノ桂皮酸の加水分解によつて合成された PPA と細菌が Phe. に作用して生成した物質が化学的に同一物質であるかどうかを検べて、PPA 生成を証明した。

実験方法： (a) α -アセトアミノ桂皮酸より PPA の合成。文献記載の合成法により PPA を得た。

(b) 菌培養液から PPA の抽出法¹⁰⁾

Proteus mirabilis 88 ① の普通寒天斜面 18 時間培養菌体を 3 mg/ml の割に、2.5% Phe. 生理食塩液に浮遊させ、pH 7.4 に修正し 37°C 1 時間振盪する。反応液を 2N-HCl で酸性 (pH

Table 2. Identification of the synthetic PPA and the substance extracted from the Pr. mirabilis-culture containing phenyl alanine

	Synthetic PPA	Extracted substance	Described in Literature
Coloration with Fe ³⁺	dark green	dark green	green
Crystal form	plate crystal	plate crystal	plate crystal
Melting point	150°C	152°C	150~154°C
Mix. melting point	150~154°C		

1 以下) とし, 水浴中にて 10 分間煮沸後, 遠心分離 (5000 r.p.m. 10 分) し, その上澄をエーテルで抽出した後, エーテルを蒸散, 析出する白色結晶を得た.

実験成績: Table 2 の如く合成した PPA および菌液より抽出された白色結晶について, 第二鉄イオンとの呈色反応, 結晶形, 融点測定, 混融試験を行ない, 同一物質であることを確認した.

ii) PPA 生成酵素の阻害

PPA 反応が酸化的脱アミノ酵素に基づくものとして, 酸化的脱アミノ酵素の阻害剤の一つ青酸カリで阻害されるかどうかを検べた. なお *Proteus* 属の菌は KCN 培地によく増殖することはすでに知られている.

実験方法: *Proteus mirabilis* の 18 時間培養菌体を 1 mg/ml の割に 0.2% Phe. 溶液 (pH 7.4) に浮遊させ, これに各種濃度の青酸カリ溶液 (pH 7.4) を加えて, PPA 反応を検べた. なお鉄塩溶液を加える直前に 1 白金耳を Kligler 培地に移植して菌の生存をも検べた.

実験成績: Table 3 に示すごとく, 青酸カリは 50 γ /ml 以上で PPA 反応を阻害している. これは KCN による菌の増殖阻止ではなく, KCN によつて酸化的脱アミノ酵素が阻害されたものである.

Table 3. Inhibitory-concentration of KCN on PPA-reaction

KCN γ /ml	200	150	100	50	40	30	20	control
PPA-test	--	-	-	±	+	+	卅	卅
Growth	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

IV. PPA 反応の諸条件

i) 鉄塩の種類と濃度

(a) PPA と各種鉄塩との反応

前述のごとく鉄塩を培地に加えることは判明したがさらに合成 PPA と最も強く反応しうる鉄塩の種類を検討した.

実験方法: 合成 PPA 濃度 1 mg/ml より 0.03125 mg/ml の間の 6 段階の濃度につき, 各種鉄塩を 0.5% に加えて呈色状態を検べた.

実験成績: Table 4 のごとく合成 PPA には第二鉄イオンのみが反応しうる. なお第一鉄イオンは酸化されやすいために混在する第二鉄イオンにより PPA 反応陽性を示すこともある. こ

Table 4. Reaction of synthetic PPA with some iron salts

Synth. PPA mg/ml	Iron salts		Ferric salts		Ferrous salts		
	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	FeCl_3	$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$	Ferric ammonium citrate	FeSO_4	FeCl_2	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$
1	卅	卅	卅	卅	--	--	--
0.5	卅	卅	卅	卅	--	--	--
0.25	卅	卅	卅	卅	--	--	--
0.125	+	卅	+	±	--	--	--
0.0625	+	卅	±	--	--	--	--
0.03125	±	+	--	--	--	--	--

の場合はロダン反応，サリチル酸反応により第二鉄イオンの存在を確認した。

第二鉄塩中，塩化第二鉄がもつとも強い呈色反応を示すが，硫酸第二鉄の方が水溶液の着色が薄いので，培地に添加する場合は硫酸第二鉄を用いる方がよいと思われる。

(b) 鉄塩の濃度

合成 PPA および培養液中の PPA について，これと反応しうる鉄塩の最少量をしらべた。

実験方法：合成 PPA 1 mg/ml の 2 ml の群および Phe. 1 mg/ml 1 ml と *Proteus* あるいは *Providencia* の菌液 (1 mg/ml) を 1 ml ずつ混和し，37°C 1 時間培養した群を作り，硫酸第二鉄，クエン酸鉄アンモニウムを，それぞれ最終濃度が Table 5 に示す各濃度であるように添加する。さらにこの反応観察後塩酸を加えて呈色度が増すかどうかを検した。

実験成績：Table 5 のごとく，硫酸第二鉄は 0.5~0.25 mg/ml で必要かつ充分である。また塩酸添加によつて呈色度は増す傾向がある。

Table 5. Concentration of ferric salts on PPA-reaction

Ferric salts	Conditions mg/ml	Synthetic PPA 1mg/ml (pH 7.4)		Phenyl alanine 1 mg/ml + bacteria (pH 7.4)			
		HCl not added*1	HCl added*3	Proteus mirabilis 88 (1)		Providencia 157 1 mg/ml	
				*1	*2	*1	*2
Ferric sulfate (pH 1.0)	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	0.5	+	卅	卅	卅	卅	卅
	0.25	±	卅	卅	卅	卅	卅
	0.125	-	+	±	卅	+	+
	0.0625	-	±	-	±	-	±
Ferric ammo- nium citrate (pH 5.0)	1	+	卅	+	卅	+	卅
	0.5	-	卅	-	+	±	+
	0.25	-	卅	-	+	-	+
	0.125	-	+	-	+	-	+
	0.0625	-	±	-	±	-	±

Table 6. Relationship in PPA-reaction between bacterial amounts and the concentration of phenyl alanine

Species Bac. amounts mg/ml Phe. mg/ml	Proteus mirabilis 88 (1)						Providencia 157					
	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
	1	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅	卅	卅	卅
0.5	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅	卅	卅	卅	+
0.25	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅	卅	卅	卅	+
0.125	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅	卅	+	+	±
0.063	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅	+	+	+	±
0.031	+	+	±	±	±	±	卅	卅	+	+	±	±

ii) 菌量と Phenyl alanine 濃度の関係

実験方法： *Proteus mirabilis* と *Providencia* を用いて、それぞれの菌量 1 ml と Phe. の各濃度 1 ml をまぜて 1 時間振盪培養後に 10% FeCl_3 を 2 滴加えてその反応の程度を検べた。

実験成績： Table 6 のごとく Phe. の濃度は 0.5~1 mg/ml, 菌量 0.5~1 mg/ml を使用すれば、強く呈色するが、さらに低濃度でも反応性があることが判定した。

V. 培地成分の PPA 反応に対する影響

i) 添加物質の影響

Kligler 培地の組成物質を参考にして、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乳糖、ブドウ糖、チオ硫酸ナトリウムなどの PPA 反応におよぼす影響について検討を行なった。

実験方法および条件： 普通寒天斜面 18 時間培養菌体を 1 mg/ml 生理食塩液、(以下いずれも最終濃度を示す) Rhe. 1 mg/ml 生理食塩液および各種濃度の添加物質溶液を作成しいずれも pH 7.4 とする。以上の菌液、Phe. 溶液、各種添加物質溶液をそれぞれ等量混和し、37°C 1 時間反応後、鉄塩として硫酸第二鉄を 0.5 mg/ml となるように加え、呈色反応を判定する。

実験成績： ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.25%, 酵母エキス 0.125% 以上では PPA 反応の阻害がみられる。しかしブドウ糖、チオ硫酸ナトリウムはほとんど阻害せず、乳糖は全く影響ない。

Table 7. Influence of added substances on PPA-reaction

Add substance	Species	<i>Proteus mirabilis</i> 88 (1)	<i>Proteus mirabilis</i> 325	<i>Proteus vulgaris</i> 87 (1)	<i>Proeust morgani</i> S-58	<i>Proteus rettgeri</i> NB-5	<i>Providencia</i> 157
	(%)						
Peptone	1	—	—	—	—	—	—
	0.5	—	—	—	—	—	—
	0.25	±	±	±	±	±	—
	0.125	+	+	+	+	±	—
	0.06	++	++	+	+	+	±
	0.03	++	++	++	++	+	+
Meat extract	1	—	—	—	—	—	—
	0.5	—	—	—	—	—	—
	0.25	—	—	—	—	—	—
	0.125	±	±	±	±	±	±
	0.06	+	+	+	+	+	+
	0.03	+	++	++	+	+	+
Yeast extract	1	—	—	—	—	—	—
	0.5	—	—	—	—	—	—
	0.25	—	—	—	—	—	—
	0.125	—	—	—	—	—	—
	0.06	+	+	+	±	+	+
	0.03	++	++	++	+	+	+
Lactose	1	++	++	++	++	++	++
	0.5	++	++	++	++	++	++
	0.25	++	++	++	++	++	++
	0.125	++	++	++	++	++	++

Glucose	1	+	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+	+
	0.25	+	+	+	+	+	+
	0.125	+	+	+	+	+	+
Na ₂ S ₂ O ₃	0.1	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+
	0.025	+	+	+	+	+	+
	0.013	+	+	+	+	+	+
Control		+	+	+	+	+	+

ii) 添加物質の影響する作用点

通常培地に添加された物質のうち数種が PPA 反応阻害を示すので、その作用点について考察した。すなわち PPA 反応においては次の2点が考えられる。

- ① Phe. より PPA が生成される過程すなわち細菌の酸化脱アミノ酵素の作用に対する阻害
- ② 生成した PPA と第二鉄イオンとの呈色過程に対する阻害

そこで前項添加物質による影響と同じ実験条件で作用点を検討した。

Table 8. Comparison between the inhibitory-effect of some substance on the process of oxidative deamination and coloration

Add substance		Process (%)					
		1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
Peptone	*(1)	-	-	±	+	+	+
	*(2)	-	-	-	+	+	+
Meat extract	(1)	-	-	-	±	+	+
	(2)	-	-	+	+	+	+
Yeast extract	(1)	-	-	-	-	+	+
	(2)	-	-	-	+	+	+

Note : *(1) Phe. + bacteria + FeCl₃ (Oxidative deamination and coloration process)

*(2) PPA + FeCl₃ (Coloration process)

実験成績： Table 8 のごとくペプトン、肉エキス、酵母エキスとも 0.5% 以上では両過程ともに阻害されている。しかしペプトンは 0.25% では鉄との呈色反応過程が阻害されていると思われ、また肉エキス、酵母エキスでは酵素反応の過程が阻害されているように思われる。

VI. 確認培地としての培地組成の検討

腸内細菌科の検索において PPA 反応、ブドウ糖または、乳糖分解による酸およびガス発生または硫化水素産生能を同一培地にて検出する確認培地の作成を試みた。Phe., 第二鉄イオン、肉エキス、ペプトン、チオ硫酸ナトリウム、ブドウ糖、乳糖の中から Kligler 培地組成と前記実験値を考慮して実際の培地における成分と量的関係を調べた。Table 9 に示すような培地を調製し、PPA 反応陽性菌として *Proteus mirabilis* 88 ①, *Providencia* 157, 陰性菌として *Sal. typhosa* S-59 を接種し、37°C 20 時間培養後、PPA 反応その他の生化学反応を判定した。

なお PPA 反応の判定は Kligler 培地における斜面桃赤色に PPA 反応陽性の緑色加わり

紫赤色を呈するものと推定される。この点 PPA 反応陰性であるが青緑色の色素を出す *Pseudomonas aeruginosa* を用いて間違いないことが判明したので紫赤色～黒紫赤色を呈したものを PPA 反応陽性、Kligler 培地の斜面と同様の桃赤色を PPA 反応陰性とした。

Table 9. Composition of trial media

Media No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	cont. (Kligler)
Peptone	0.3	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5
Meat extract	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4
Yeast extract	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	0.1	—
NaCl	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5
Lactose	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Glucose	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Phenyl alanine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
Na ₂ SO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04
Na ₂ S ₂ O ₃	0.04	0.04	0.04	0.04	—	—	—	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.008
FeSO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.02	—	—	—	—	0.02
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.05	0.05	0.05	0.05	—	—	—	—	—	—	0.05	0.05	0.04	0.04	—
FeCl ₃	0.08	0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂	0.08	0.08	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ferric ammonium citrate	0.02	0.02	—	—	0.05	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.06	0.03	—
Agar	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.5
Phenol red	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6 ±0.2
Colour of medium	red														
Ppt of iron	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

実験成績：(a) ペプトンは先に行なつた添加物質の影響の実験では、0.25% 以上で PPA 反応阻害した。しかし培地に加えた実験では 0.5% 以下の添加ではペプトンの分解により生ずるアルカリが少量のために鉄塩の呈色反応はあつても培地は赤色調とはならず、0.8% 以上になつて判定しうる色調を生ずる。従つてペプトン 0.8~1.0% を用いても菌の増殖に従い消費されるために PPA 反応阻害濃度以下に下ること、またペプトン中の他のアミノ酸例えば histidine, leucine などの α -ケト酸反応も加わつて PPA 反応に支障はない。

(b) 肉エキスは 0.3%, 0.5% について行なつたが明確な差はなく、障碍はあまりなかつた。

(c) 鉄塩は PPA 反応および硫化水素の確認の両反応に必要なが、PPA 反応の条件によつて第二鉄塩のみの培地も用いた。なお pH 7.4 では鉄塩は 0.01% で沈殿を生ずるが、培地調製の際、他の成分を溶解させた後、少量の水に溶かした鉄塩を加えると 0.05% でも肉眼的な沈殿は生じない。

鉄塩の種類による差異については硫酸第二鉄のみでは *Sal. typhosa*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* の 3 菌種間の PPA 反応は小差であるが、クエン酸鉄アンモニウムを用いた No. 5~8 の斜面部は *Sal. typhosa* が Kligler 培地と同じ桃赤色であるのに対し、*Proteus*, *Pro-*

videncia は黒赤紫色～深紫赤色で著明な差を示した。しかしクエン酸鉄アンモニウムのみの培地では硫化水素の反応が弱いので硫酸第一鉄又は第二鉄を加えていろいろ検討した。

(d) 亜硫酸ナトリウムは添加、無添加いずれでも変化なく、以後無添加とした。チオ硫酸ナトリウムは硫化水素産生に必要である。

以上の実験成績より No. 12 および No. 14 がもつとも良い成績を得た。

VII. 試作培地上の腸内細菌の所見

試作培地 No. 12, 14 について腸内細菌の 18 菌種 45 菌株と *Pseudomonas* 1 菌株の反応を調べ、かつ Kligler 培地上の反応と比較した。

Table 10. Reaction on the trial medium of the family Enterobacteriaceae

Species	No. of strains	Coloration on slant	PPA reaction	H ₂ S production	Coloration in butt
<i>E. coli</i>	4	yellow	—	—	yellow
<i>Shigella</i>	6	cherry red	—	—	yellow
<i>Salmonella</i>	11	cherry red	—	+	yellow black
Arizona	1	cherry red	—	+	yellow black
<i>Citrobacter</i>	2	yellow	—	+	yellow black
<i>Aerobacter</i>	4	yellow	—	—	yellow
<i>Klebsiella</i>	1	yellow	—	—	yellow
Cloaca	2	yellow	—	—	yellow
<i>Proteus mirabilis</i>	4	deep purple red	+	+	yellow black
<i>Prot. vulgaris</i>	4	deep purple red	+	+	yellow black
<i>Prot. morgani</i>	3	deep purple red	+	+ —	yellow
<i>Prot. rettgeri</i>	2	deep purple red	+	—	yellow
<i>Providencia</i>	7	deep purple red	+	—	yellow
<i>Pseudomonas</i>	1	deep purple red	—	—	pink red

実験成績：Table 10 のごとく PPA 反応陽性の *Proteus*, *Morganella*, *Rettgerella* および *Providencia* の諸属の菌は斜面は赤紫色ないし黒赤紫色を呈し、ブドウ糖、乳糖の分解性、ガス産生および硫化水素産生性などは Kligler 培地と全く同じで、5 反応系を同一培地上で判定できて満足すべき結果を得た。

VIII. 考 察

1) *Proteus* 属はその酸化的脱アミノ酵素により phenyl alanine より phenyl pyruvic acid を形成する。Singer らは hydrazone 形成によりこれを証明したが、著者らは合成した PPA と、菌が phenyl alanine に作用して生成した白色結晶を混融試験その他により同一物質であることを証明した。また phenyl alanine より PPA 生成する酵素は酸化的脱アミノ酵素であるといわれ、この酵素は青酸カリにより阻害された。

2) PPA 反応にあづかる鉄塩は第二鉄イオンであり、第一鉄イオンは反応しない。しかし、*Proteus* 属などにより SIM 培地¹³⁾ は褐色を呈したり、また Kligler 培地においても時に斜面部が赤紫色を呈することがあり、これは第一鉄が酸化されやすく培地作製後に一部第二鉄塩に変化しているためであろう。この場合サリチル酸反応、ロダン反応などで第二鉄イオンを確認した。

3) ペプトン、肉エキスは単独の PPA 反応に加えた場合、0.25% 前後で反応を阻害している。しかし培地に添加した場合はさらに高い濃度でも障害があまりあらわれないのは菌の増殖とともに消費されるためと、菌の生存により持続的に PPA が産生されるためと考えられる。

4) 試作培地において PPA 反応、ブドウ糖、乳糖の分解による酸およびガス産生性、硫化水素産生性を矛盾することなく反応させることができた。この培地で腸内細菌科の各菌種を検査した結果先人が発表した PPA test と全く一致した成績を得た。

5) 本実験にもとづいて著者¹⁴⁾ が特許出願 (1961) 後に Biol. Abst. (1962) に Edwards et. al.¹⁵⁾ が phenyl alanine を培地に加えた報文として、

“Phenyl alanine-iron agar in the detection of *Proteus* and *Providencia* cultures”
の標題をみた。

原著を入手できなかつたため詳細は不明であるが、集落の鑑別に phenyl alanine と鉄塩を利用したものと思われる。

IX. 結 論

1) *Proteus*, *Morganella*, *Rettgerella* および *Providencia* の諸属菌種は, dl-phenyl alanine に作用して phenyl pyruvic acid を生成する。著者らは合成した phenyl pyruvic acid と、菌が phenyl alanine に作用して生成した物質を結晶状に培養液から抽出し、同一物質であることを確認した。

2) *Proteus* 属の酸化的脱アミノ酵素は KCN により阻害される。

3) PPA 反応にあづかる鉄塩は第二鉄塩であり、第一鉄塩では反応しない。

4) PPA 反応、ブドウ糖、乳糖の分解、およびガス産生性、および硫化水素産生性の 5 反応系を同一培地上にて反応させる鑑別をかねた確認培地を完成した。

5) 本試作培地にて *Proteus*, *Morganella*, *Rettgerella* および *Providencia* 諸属のみが特異的に斜面部で黒赤紫色を呈し、Kligler 培地では鑑別不能の *Salmonella* 属と *Prateus* 属さらに *Shigella* 属と *Morganella*, *Rettgerella*, *Providencia* 属との鑑別も可能となつた。

すなわち本培地一つで腸内細菌科の確認と各属の鑑別がほぼ可能となり、日常の臨床検査においても極めて有用であると考えられる。

文 献

- 1) Krumwiede and Kohn: J. Med. Research, **37**, 225 (1917)
- 2) Sulkin and Willett: J. Lab. Clin. Med, **25**, 649 (1940)
- 3) Papadakis, J. A.: J. Hyg. Camb, **58**, 331~336 (1960)
- 4) Henriksen, S. D. and Closs, K.: Acta. Path. Microbiol. Scand, **15**, 101~113 (1938)
- 5) Stumpf, P. K. and Green, E. D.: J. Biol. Chem, **153**, 387 (1944)
- 6) Henriksen, S. D.: J. Bacteriology, **60**, 225~231 (1950)
- 7) Clarke, P. H. and Shaw, C.: J. gen. Microbiol, **10**, 1 (1954)
- 8) Singer, J. and Volcani, B. E.: J. Bacteriology, **69**, 303~306 (1955)
- 9) Stewart, D. J.: Nature, **183**, No. 4674, 1537~1538 (1959)
- 10) 桜井, 小林, 木村共訳: “Organic synthesis” 合冊第 2 下巻, p. 691, 丸善出版 (1951)
- 11) 赤堀四郎著: 酵素研究法 II 巻, 467, 朝倉書店 (1957)
- 12) 波岡, 坂崎: 日本細菌学誌 **14**, (11) 952~956 (1959)

- 13) 林：腸内細菌確認ならびに鑑別用培地，特願 昭 36-33679 公告決定 昭 38 年
 14) Edwards, P. R. et al. : Publ. Health. Lab, 19, (5) 85~87 (1961); In : Biol. Abstract, 38, 1783 (1963)

Summary

Proteus, Morganella, Rettgerella and Providencia act on dl-phenyl alanine and produce phenyl pyruvic acid. (PPA). From the culture filtrate of above microorganisms, crystalline phenyl pyruvic acid was detected.

The authors intended to utilize this PPA production of the microorganisms above described for the differentiation of the family Enterobacteriaceae and investigated into the composition of a new medium.

The iron which participates in PPA-reaction is a ferric salt. A ferrous salt has no effect on it.

From results obtained, a new confirmatory medium which can also serve as differential medium was devised. By the use of this medium it is possible to observe PPA-reaction, acid and gas production by fermentation of glucose or lactose and hydrogen sulphide production simultaneously.

Proteus, Morganella, Rettgerella and Providencia produce a dark red-purple color on the slant surface of this medium. Hence, the differentiation of Salmonella and Shigella from Proteus, Morganella, Rettgerella or Providencia which was impossible on Kligler's medium became possible.

Use of this new medium alone, therefore, will enable confirmation and differentiation of the family Enterobacteriaceae and it is considered useful as a routine clinical test.

ペントースの比色定量 (第 3 報)* ピロガロール試薬による定量法

友田正司

Colorimetric Determination of Pentoses. III.

Determination with Pyrogallol Reagent.

Masashi TOMODA

塩酸・酢酸混液を溶媒とする多価フェノール試薬によるペントースの比色定量を検討した結果、ピロガロール試薬は呈色度が大きで定量に用いる可能性があることを前報¹⁾で報告した。しかしながらこの試薬を用いて同時操作による呈色の吸光度を比較すると、キシロース 20 µg/ml の 5 検液による場合、標準偏差 $\sigma=0.0216$, 吸光度の平均値 0.383, 変異係数 5.7% であり、正確度が低いことが判つた。著者はこの場合に試薬に微量の鉄塩を加えると測定値のばらつきはほとんどなく、ペントース定量試薬として用いることを知つた。

* Chem. Pharm. Bull. 11, 806 (1963) に発表

1) 第 2 報：薬誌 82, 1447 (1962).