



Title	腸炎ビブリオの溶血因子に関する研究 : 1. 乾燥菌体の溶血因子について
Author(s)	飯田, 優; IIDA, Atsushi; 田中, 豊 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(1), 91-99
Issue Date	1971-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24223
Type	departmental bulletin paper
File Information	22(1)_P91-99.pdf



腸炎ビブリオの溶血因子に関する研究

1. 乾燥菌体の溶血因子について

飯田 優・田中 豊・高木光造

Studies on the Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*

I. Hemolytic factor of dried cell materials

Atsushi IDA*, Yutaka TANAKA* and Mitsuzō TAKAGI*

Abstract

In this paper, the authors have determined the hemolytic activities of the preparations of washed cell, dried cell, water soluble fraction and water insoluble fraction, deriving from each of the three strains of *Vibrio parahaemolyticus* (serotype; O9:K23, O1:K32 and O5) by the method described in Fig. 1. Hemolytic materials were prepared by the method of Sakazaki¹⁾ and Sakazaki and Tamura²⁾ as described in Fig. 2, moreover, and estimated the hemolytic activity. Hemolytic activity was expressed in H.H.U.³⁾. A summary of the results is shown as follows.

1) The preparations of the dried cell and the water insoluble fraction had hemolytic activities of about 2.0 H.H.U. and 3.0~5.0 H.H.U. per one mg. of total nitrogen respectively, but in the preparations of the washed cell and the water soluble fraction, hemolytic activity was not found.

2) The existence of a thermostable hemolysin was estimated in the preparation of the water insoluble fraction derived from the strain O5, and when being heated at 100°C for 60 minutes, more than 1.9 H.H.U. per one mg. of total nitrogen of hemolytic activity remained.

3) A thermostable hemolysin by Sakazaki and Tamura was found to exist in all the strains, and to be derived from the preparations of the water insoluble fraction, but not from the water soluble one.

緒 言

腸炎ビブリオの患者由来株の多くは神奈川現象検査培地上で溶血性を示し、いわゆる神奈川現象陽性株として知られている^{4,5,6)}。藤野ら^{7,8,9)}は本菌の培養上清について神奈川現象と関連する溶血現象を種々検討して耐熱性溶血因子の存在を報告し、加藤ら¹⁰⁾、善養寺ら¹¹⁾も本菌溶血株の培養上清中にマウス致死毒性を有する耐熱性の溶血物質の存在を認め、また坂崎¹⁾、坂崎・田村²⁾は本菌の細胞中に耐熱性溶血物質が存在することを認めたが、その溶血性は生菌の示す神奈川現象性とは無関係であると述べている。以上のような溶血現象の機序を明らかにすることは本菌による食中毒病原因子の究

* 北海道大学水産学部食品化学第二講座

* Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Fisheries, Hokkaido University

明に関連して重要と考えられる。

著者らは今回腸炎ビブリオの神奈川現象陽性株3株について、各供試菌の低温乾燥菌体を水溶性画分と水不溶性画分に分離しそれぞれ溶血価を測定し、それらの比較を行なった。なお供試菌中1株の水不溶性画分について、坂崎・田村の溶血物質との関連性や溶血能の耐熱性なども検討したので、ここに得られた若干の知見を報告する。

実 験 方 法

供試菌株：供試菌株の O9 : K23 および K26 は北海道立衛生研究所，O1 : K32 は函館市立保健所，また O5 は本学部微生物学教室よりそれぞれ分与を受けたものである。下記の各検査および大量培養には各供試菌株をまず BTB ティポール寒天培地に画線培養し，培地上に発育した集落より S 型集落

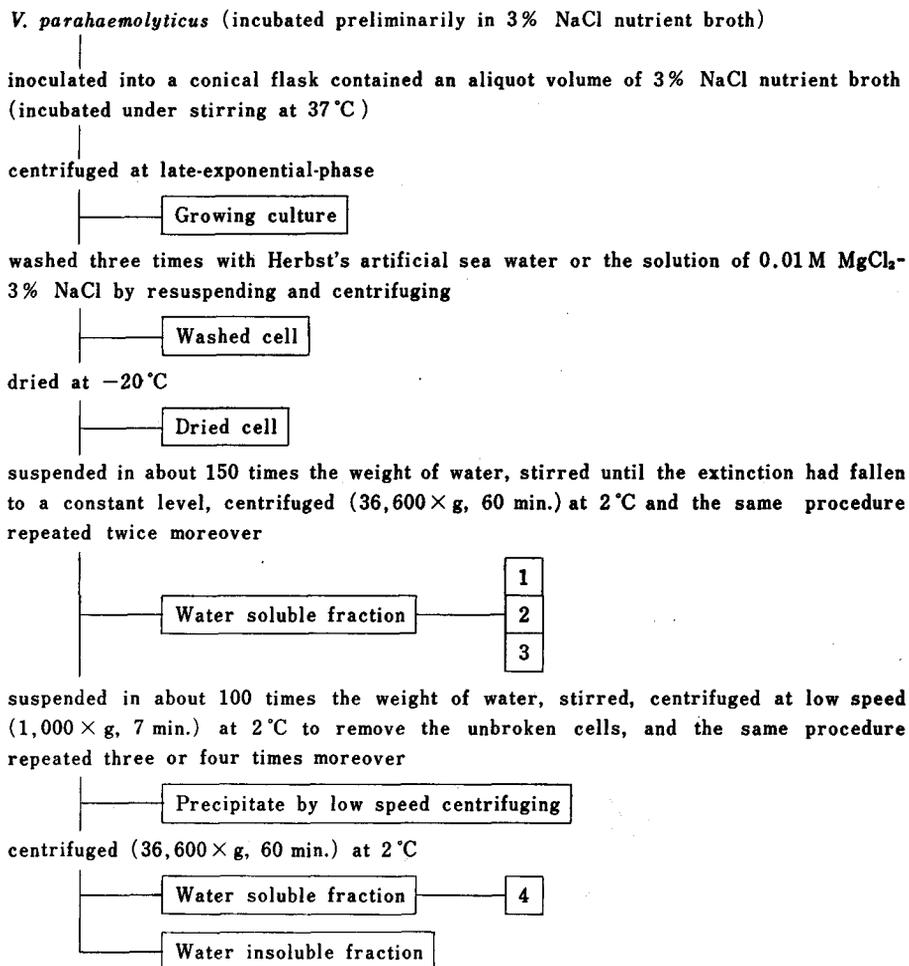


Fig. 1. Methods of the preparation of *V. parahaemolyticus* and the cellular fractions.

各1個を釣菌し, 3%食塩加ブイオンに接種, 37°Cで一夜培養した培養液をそれぞれ供試した。なお供試菌株のうち, K26はおもに溶血現象などの一部の実験にのみ供した。

形態学および生化学的性状検査: 各供試菌株について常法どおり^{14,15)} グラム染色性 (HUCKER変法), 運動性, 好塩性, 食塩耐性を観察し, ついでチトクロームオキシダーゼ試験, HUGH-LEIFSON試験によるブドウ糖の酸化と醗酵, インドールの産生, MR試験による酸の生成, 硝酸塩の還元, ゼラチン液化, VP反応, 硫化水素の産生, 炭水化物の分解性, d-酒石酸塩の利用, クエン酸塩の利用などの各性状を検査した。また神奈川現象 (溶血性) を観察するために神奈川現象検査培地 (日水, 我妻変法) を用い, これにヒトまたはウサギの原血濃度の血球浮遊液をそれぞれ5% (V/V) の割合に添加して調製した培地 (以下これを神奈川現象検査培地と記す) 面に前記各供試菌培養液の1白金耳量を滴下し, 我妻の方法⁹⁾ に準じて37°Cで20時間ないし, 2日間培養し, 発生した集落の周辺と下面の溶血環の出現の有無を観察した。

供試菌体: 菌体の培養法の概要は Fig. 1 に示すとおりである。あらかじめマグネチック・スターラーの攪拌子を入れた2l三角フラスコ中の3%食塩加ブイオン1.2lに, 前記培養液1mlをそれぞれ接種し, 37°Cでマグネチック・スターラーによる攪拌を続けて培養を行ない, 一定時間毎に培地の所定量を無菌的に採取して, 供試菌の増殖による培地の濁度を前報^{14,15)} と同様の方法で観察し, 対数期末期におけるそれぞれの培養液から3,300×g, 15分間の遠心分離により菌体を集め, 3回の洗浄によって培地成分を除去して得た洗浄菌体を供試菌体として使用した。なお菌体の洗浄液にはO9:K23とO1:K32はHERBSTの人工海水を, O5では0.01M塩化マグネシウム添加3%食塩溶液を使用した。これらの洗浄液の選択にあたっては各供試菌の菌体を3%食塩溶液, 0.01M塩化マグネシ

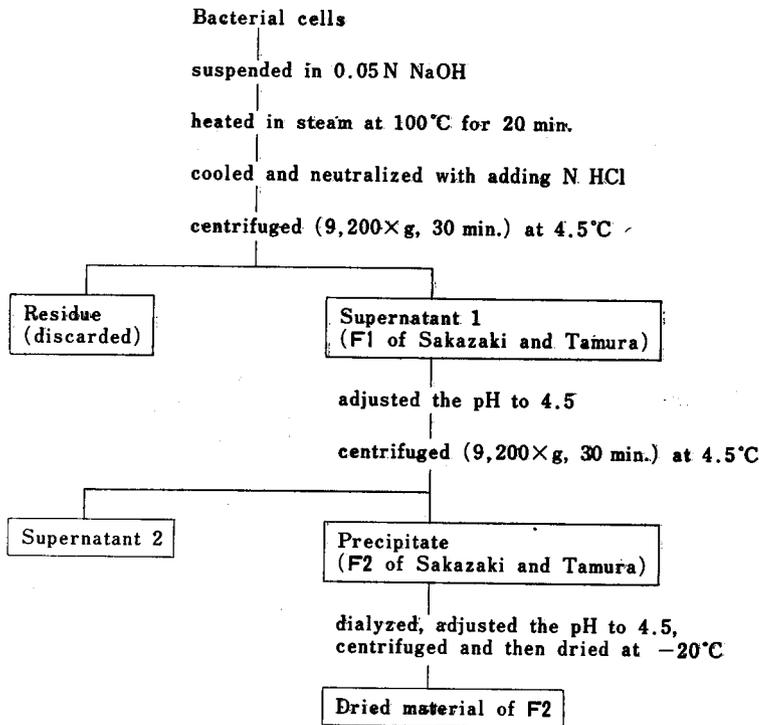


Fig. 2. Preparation of hemolytic material by the method of Sakazaki and Tamura.

ウム添加 3% 食塩溶液および HERBST の人工海水にそれぞれ懸濁し、一定時間攪拌して均質とし、それぞれの懸濁液について濁度、レフレル染色性、遠心上清の紫外外部吸収スペクトルなどを比較検討して、溶菌現象の起り難いものを洗浄液として用いた。また各供試菌株とも 10~14 回培養を行なって供試した。

乾燥菌体の調製: 前記の各供試菌体を硫酸デシケーターに移して吸引し減圧にしたのち、 -20°C に保たれたストッカーに 20 日ないし 40 日間納置し、この間適宜デシケーターを室温にとり出して硫酸の更新と吸引を反復して菌体の低温における乾燥を促進した。乾燥した菌体は粉碎したのち上記同様に低温減圧乾燥を行なって恒量化し、得られた乾燥物を乾燥菌体として供試した。

菌体の分画: 各画分の調製法は Fig. 1 に合わせて示したとおりである。まず前記の各乾燥菌体を約 150 倍重量の水に懸濁したのち、室温でマグネチック・スターラーによる攪拌を続けて菌体の浸透溶解を促進し、一定時間毎に液の少量をとり光電比色計（日立製 EPW-4 型）を用い、フィルター 66 で吸光値を測定しつつ吸光値が減少しないで一定になるまで攪拌を行なった。得られた懸濁液を $36,600 \times g$, 60 分間、 2°C で遠心分離し、沈澱について前記同様の浸透溶解と遠心分離をさらに 2 回反復し、得られた上清をそれぞれ水溶性画分 1, 2 および 3 とした。他方沈澱は室温で 100 倍程度の水に懸濁し、スターラーで攪拌して均質とし、 $1,000 \times g$, 7 分間、 2°C で低速遠心分離して上層部と下層部に分け、上層部についてさらに同様の遠心分離を 3~4 回繰り返したのち、下層部を集めてこれを低速遠心沈澱画分として供試した。また上層部は $36,600 \times g$, 60 分間、 2°C で遠心分離して沈澱を集め、得られた上清を水溶性画分 4 とし、また沈澱を水不溶性画分としてそれぞれ供試した。

坂崎・田村の耐熱性溶血物質の分離: 坂崎¹⁾, 坂崎・田村²⁾ の耐熱性溶血物質の分離方法は Fig. 2 に示したとおりである。洗浄菌体または乾燥菌体を三角フラスコにとり適量の水に懸濁したのち、それと同容量の 0.1 N 苛性ソーダを加えて攪拌し、 100°C の蒸気中で 20 分間加熱した。加熱後速やかに水道水で冷却し、N 塩酸を加えて中和したのち、 $9,200 \times g$, 30 分間、 4.5°C で遠心分離して沈澱を捨て、坂崎・田村の F1 に相当する上清 1 を得た。ついでその一部をとり、攪拌しつつ 0.1 N 塩酸を加えて pH を 4.5 に調節すると沈澱が生成するので、上記同様の条件で 30 分間遠心分離して上清 2 と坂崎・田村の F2 に相当する沈澱を得た。さらにこの沈澱の一部を透析膜にとり、 0°C の氷室中で塩素イオンが検出されなくなるまで透析を行ない、再び pH を 4.5 に調節し、生成した沈澱を遠心分離し、硫酸デシケーター中に入れて -20°C で減圧乾燥して恒量化し、これを坂崎・田村の F2 の乾燥物として供試した。

血価の測定: 各試料をマグネシウム-食塩水¹⁶⁾ に溶解または懸濁させて適宜に段階希釈液を調製し、またヒト洗浄血球も試料の場合と同様のマグネシウム-食塩水に懸濁させて 2% 血球浮遊液とした。各試料の希釈液 4 ml と血球浮遊液 4 ml とを中型試験管にとり、 37°C に保持された恒温水槽に浸漬し、振盪しつつ反応液の温度が 37°C に達してから 30 分間納置したのち速やかに $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ に冷却し、約 $20,000 \times g$ で 20 分間遠心分離を行ない、各上清の $550 \text{ m}\mu$ における吸光値を測定して所定の方法で 50% 溶血単位⁹⁾ (以下これを H. H. U. と記す) あたりの希釈度を求め、各試料の最低希釈の全室素量より H. H. U. あたりの全室素量と全室素 1 mg あたりの H. H. U. を算出した。なお吸光値は日立製光電分光光度計 EPU-2A 型を用いて測定した。

全室素の測定: 各試料について全室素をケルダール法で測定した。

紫外外部吸収スペクトルの測定: 各供試菌の水溶性画分 1~4 について日立製光電分光光度計 EPU-2A 型を用いて $235\sim 300 \text{ m}\mu$ の吸光値を測定し、吸光値を供試乾燥菌体重量と抽出液量で補正して $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 曲線を求めた。

結果ならびに考察

供試菌の形態学および生化学的性状検査の結果は Table 1 に示したとおりで、供試菌 3 株の各性

Table 1. Morphological and biological characteristics of the strains tested.

Strains tested	09 : K23	01 : K32	05
Gram	-	-	-
Motility	+	+	+
Halophilic character 3%NaCl	+	+	+
Cytochrome oxidation	+	+	+
Hugh-Leifson medium			
Open	Acid	Acid	Acid
Close	Acid	Acid	Acid
Gas	-	-	-
Indole production	+	+	+
MR test			
at 22°C	+	+	+
at 37°C	-	+	+
KNO ₃ reduction	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-
Tartarate utilization	+	+	+
Citrate utilization	±~+	+	+
Tolerance for NaCl			
7%	+	+	+
10%	-	-	-
VP reaction	-	-	-
Cleavage of carbohydrate			
Sucrose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Kanagawa phenomenon			
Human blood agar*	+	+	+
Rabbit blood agar*	+	+	+

* Saline suspension of red blood cells was added to modified Wagatsuma agar up to a concentration of 5% (v/v).

状は完全に一致し、神奈川現象はヒト血球、ウサギ血球のいずれの場合も陽性であることが認められた。

また各供試菌の培養液の1白金耳量を、ウサギ洗浄血球を添加した神奈川現象検査培地に滴下して37°Cに35時間納置し、その結果をPlate Iに示した。これによると溶血環の状態は菌株間で多少の差はあったが、どの供試菌でも明瞭なβ型溶血が認められ、またPlate Iに合わせて示したK26は狭塩型の菌株であるが、同様に明瞭な溶血環が認められた。

各供試菌の菌体の分画方法はすでにFig. 1に示したとおりで、前記のごとく乾燥菌体の水懸濁液について浸透溶解による菌体細胞の破壊を3回反復し、その際に得られた水抽出液をそれぞれ水溶性画分1, 2および3とし、ついで沈澱について分画遠心操作を繰り返して低速遠心沈澱画分, 水溶性画分4および水不溶性画分の3つに分画した。これらの各画分について全窒素を測定し、その結果をTable 2に示したが、乾燥菌体の全窒素は約10~12%で、菌株によって多少の差がみられた。また各乾燥菌体の全窒素を100として、これに対する各画分中の全窒素の比を求めると、乾燥菌体中の水溶性全窒素は40~50で、1回目の浸透溶解によって得られた水溶性画分1は、その水溶性全窒素のそれぞれ90%以上を占め、画分2あるいは3においては若干残存したが、画分4においてはまったくこれを認めなかった。また水不溶性画分の全窒素は1.0~1.7%と菌株によって差があり、低速遠心沈澱画分には4.3~4.9%と乾燥菌体中の35~50%の全窒素が含まれていた。

水溶性画分1~4の235~300 mμにおけるE_{1cm}^{100ml}をFig. 3に示した。各測定液のpHは6.0~6.7の範囲にあり、いずれの菌株も水溶性画分1はそれぞれ255 mμ付近に顕著な極大吸収を示し

Table 2. Analysis of total nitrogen of the fractions.

Strains tested	09:K23		01:K32		05	
	TN*(%)	Ratio	TN*(%)	Ratio	TN*(%)	Ratio
Dried cell	9.7	100.0	11.2	100.0	11.9	100.0
Water soluble fraction-1	3.5	36.5	4.6	41.2	5.1	43.0
" fraction-2	0.3	3.0	0.6	5.5	0.5	4.5
" fraction-3	0.0	—	0.0	—	0.3	2.2
" fraction-4	0.0	—	0.0	—	0.0	—
Water insoluble fraction	1.0	10.3	1.3	11.3	1.7	14.5
Precipitate by low speed centrifuging	4.9	50.2	4.7	42.0	4.3	35.8

* Total nitrogen was abbreviated to TN.

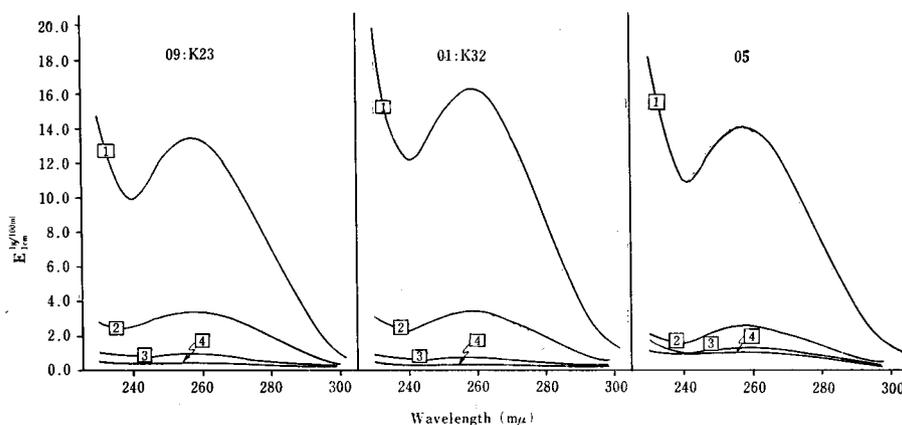


Fig. 3. E-value of water soluble fractions (100 ml) from dried cells (1 g).

て、核酸または核蛋白などの物質が多く溶出されたことを裏づけているが、水溶性画分2ではそれらの値はいちじるしく小さくなり、水溶性画分3および4では特異的な吸収帯がほとんど認められなかった。これらの結果から核酸または核蛋白などの物質も前記の全窒素量においてみられたと同様、浸透溶解1回目の各水溶性画分1に集中的に溶出されていることがわかった。

また水不溶性画分は前記のごとく浸透溶解によって破壊された細胞を含むものであるが、このことを観察するため各画分の菌体細胞についてレフレル染色を行ない、鏡検によって比較検討した。その一例としてO5の各画分の500倍レフレル染色像をPlate IIに示した。Plate IIのFig. 1は培養菌を0.01 M 塩化マグネシウム添加3%食塩溶液で3回洗浄を繰り返した正常な細胞像、Fig. 2は洗浄菌体の破壊を促進するために水による浸透溶解を3回行った細胞像である。Fig. 2は一般に菌体細胞が膨潤し、染色性の低下、染色性の不平等などがみられる。Fig. 3は水不溶性画分の細胞像で、乾燥菌体を前記同様の浸透溶解によって処理したのち、分画遠心を行なって得られた破壊された細胞であり、染色性はいちじるしく低下して正常な細胞はほとんど残っていないことがわかる。またこの水不溶性画分について3%食塩加ブイオン、4%食塩加ペプトン水、BTBティポール寒天平板培地およびWA寒天平板培地などに接種培養し、生死検定を行なった結果、各供試菌とも生存は認めら

Table 3. Assay of hemolytic activity of the fractions.

Strains tested	09: K23			01: K32			05		
	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***
	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.
Washed cell	—****		3.19	—****		3.04	—****		4.37
Dried cell	2.28	0.04	1.97	2.17	0.46	2.28	1.92	0.52	2.42
Water soluble fraction-1	—****		1.04	—****		1.48	—****		1.92
" fraction-2	—****		0.08	—****		0.20	—****		0.16
" fraction-3	—****		0.00	—****		0.00	—****		0.08
" fraction-4	—****		0.00	—****		0.00	—****		0.00
Water insoluble fraction	3.77	0.27	1.08	5.05	0.20	1.52	2.87	0.35	2.08
" heated, 65°C, 15min.							2.29	0.44	2.08
" 80 30							>1.89	<0.53	2.08
" 80 60							>1.89	<0.53	2.08
" 100 30							>1.89	<0.53	2.08
" 100 60							>1.89	<0.53	2.08

* Hemolytic activity was expressed in H.H.U.*)

** Total nitrogen was abbreviated to TN.

*** Showing the amount of total nitrogen per four ml of the minimum dilution one in a series of the analyzing test-tubes.

**** Showing that hemolytic activity was not found in this experiment.

Table 4. Assay of hemolytic activity of the fractions prepared by the method of Sakazaki and Tamura.

Strains tested	09: K23			01: K32			05		
	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***	H.H. U.*	TN** (mg)	TN (mg)***
	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.	per mg	per H.H.U.	in min. U. diln.
Washed cell	—****		3.19	—****		3.04	—****		4.37
Dried cell	2.28	0.44	1.97	2.17	0.46	2.28	1.92	0.52	2.42
Supernatant 2	—****		0.08	—****		0.19	—****		0.11
F2 of Sakazaki and Tamura	2.56	0.39	2.16	2.39	0.42	2.56	2.63	0.38	1.95
Dried material of F2	2.15	0.47	2.45	1.18		2.66	—****		2.57
F2 of Sakazaki and Tamura from water soluble fraction					0.85		—****		0.14
F2 of Sakazaki and Tamura from water insoluble fraction							12.29	0.08	1.44

*, **, ***, **** Showing the same properties as described in Table 3.

れず、また神奈川県検査培地にもまったく発育せず溶血現象は認められなかった。

各画分について溶血価を測定し、全窒素 1 mg あたりの H.H.U. (H.H.U./mg TN) で表わして、その結果を Table 3 に示した。なお表中の横線は、前記の実験条件下では 50% 溶血が認められなかったことを示すものである。また H.H.U. あたりの全窒素量 (TNmg/H.H.U.)、溶血価測定にあたって調製した段階希釈液の最低希釈の全窒素量も合わせて Table 3 に示した。すなわち洗浄菌体は

段階希釈液の最低希釈の全窒素量を 3.0~4.4 mg 程度として測定した場合、いずれの菌株にも 50% 溶血がみられなかったが、一方乾燥菌体は全窒素量 0.4~0.5 mg 相当の希釈で 50% 溶血を認め、洗浄菌体と異なりいちじるしい溶血能を示した。乾燥菌体の溶血価は菌株間で大差がなく、いずれも 2.0H. H. U./mg TN 前後の値であった。このように洗浄菌体では 50% 溶血が認められないが乾燥菌体では溶血能が認められることは低温乾燥操作によって菌体細胞が何らかの物理化学的变化を被った結果と推察されるが、その機序は目下不明であり、今後継続して検討を加えたいと考えている。また乾燥菌体から調製された水溶性画分 1~4 にはいずれも溶血能が認められなかったが、乾燥菌体から同様に調製された水不溶性画分は、その各最低希釈の全窒素量を各水溶性画分 1 の場合とそれぞれほとんど同じ程度になるように調製し、1~2 mg として測定した結果、それぞれ O9 : K23 は約 3.8 H. H. U./mg TN, O1 : K32 は約 5.1H. H. U./mg TN, O5 は約 2.9H. H. U./mg TN という値が得られ、各菌株とも乾燥菌体に比較してそれぞれ溶血活性の高いことが知られた。なお、この溶血因子の熱抵抗性を O5 の水不溶性画分について検討した結果は同じく Table 3 にみられるごとく、65°C, 15 分間の加熱によって溶血価は約 2.9H. H. U./mg TN から約 2.3H. H. U./mg TN へ若干下がるが活性は喪失することなく、さらに 100°C, 60 分の加熱によっても活性は失われず、溶血価は約 1.9 H. H. U./mg TN 以上の値を示した。

これらの結果から供試菌 3 株の乾燥菌体における溶血因子は、菌体細胞の水溶性画分ではなく水不溶性画分にあるものと推定され、耐熱性試験の結果によって溶血因子には易熱性のもののほかに耐熱性のものがかかり含まれていると考えられるので、ついでこの溶血因子と坂崎¹⁾、坂崎・田村²⁾の耐熱性溶血物質との関連性を検討した。坂崎らは腸炎ピブリオの菌体を 0.05N 苛性ソーダ加食塩溶液に浮遊させ、100°C の蒸気中で 20 分間加熱、N 塩酸で pH7.0 として遠心した上清はヒト血球に対して著明な溶血作用を示し、この物質は pH4.5 で沈澱し、中性で水に溶ける性状を持つと述べこの可溶物を F2 と呼んでいる。著者らは供試菌 3 株の乾燥菌体より、坂崎らの方法を追試して F2 を調製して溶血価を測定し、その結果を Table 4 に示した。坂崎らの F2 はいずれの菌株についても溶血能をもって 2.5 H. H. U./mg TN 程度の活性を示し、また F2 を沈澱させた上清にはまったく溶血能が認められなかった。さらに坂崎らの F2 を透析し、-20°C で低温乾燥した乾燥物はそれぞれ O9 : K 23 は約 2.2H. H. U./mg TN, O1 : K 32 は約 1.2 H. H. U./mg TN と F2 に比べて活性が低下し、O5 では溶血能は認められなかった。これらのことから坂崎らの F2 は透析と低温乾燥に対して幾分不安定なものではないかと推察される。さらに O5 について水溶性画分から坂崎らの F2 を分離してその溶血価の比較を行なった結果、水溶性画分由来の F2 には溶血能がみられず、一方水不溶性画分由来の F2 は 12.3H. H. U./mg TN という高い溶血活性を示した。これらの結果から、坂崎らの耐熱性溶血物質は本実験の水不溶性画分に由来するものと推察され、また水不溶性画分は坂崎らのアルカリ処理によって活性を増すものと考えられる。

以上の実験結果から、供試菌 3 株の乾燥菌体、水不溶性画分中の耐熱性溶血因子は、坂崎らの耐熱性溶血物質と関係あると思われるが、藤野ら^{7,8,9)}、加藤ら¹⁰⁾ および善養寺ら¹¹⁾ が指摘している本菌溶血株培養上清中の各耐熱性溶血因子と同じものか否かについては現在何もわかっていないので、さらに水不溶性画分について溶血因子の分画精製を行ない、これら不明の点を明らかにしたい考えである。

要 約

腸炎ピブリオについて神奈川現象など溶血現象の機序を明らかにすることは、本菌による食中毒病原因子の究明に関連して重要と考えられるが、著者らは本菌の神奈川現象陽性株 3 株の乾燥菌体を水溶性および水不溶性画分に分画して、それぞれの溶血能を検討し、次の結果を得た。

1. 洗浄菌体、乾燥菌体、水溶性画分および水不溶性画分の溶血価を測定した結果、いずれの供試

菌株も洗浄菌体には溶血能が認められなかったが、乾燥菌体は 2.0H. H. U./mg TN 前後の溶血価を示した。これは低温乾燥操作によって菌体細胞が何らかの物理化学的变化を受けた結果と考えられるがその機序は不明である。また水不溶性画分は 3.0~5.0H. H. U./mg TN を示したが、水溶性画分には溶血能が認められなかった。

2. 供試菌のうち O5 の水不溶性画分について耐熱性を検討したところ、100°C、60 分間の加熱によっても活性は失われず、なお 1.9 H. H. U./mg TN 以上の値を示し、これらの結果から水不溶性画分に耐熱性溶血因子の存在することが認められた。

3. 坂崎らのアルカリ処理による耐熱性溶血物質はいずれの供試菌においても存在が確認された。またその溶血物質は本実験の水不溶性画分に由来し、水不溶性画分は坂崎らのアルカリ処理によって溶血活性を増すことが認められた。

終りに本研究の遂行にあたっていろいろ御助言を賜わり、また本稿を御校閲下された本学部微生物学講座坂井 稔教授に心から謝意を表す。

文 献

- 1) 坂崎利一 (1969). 食品衛生研究 19(8), 23.
- 2) ———・田村和満 (1969). モダンメディア 15, 220.
- 3) 江上不二夫 (1953). 標準生化学実験法 625p. 東京; 文光堂.
- 4) 加藤貞治・小原 寧・山井志朗・保母京子 (1968). メディア・サークル 13, 155.
- 5) 我妻正三郎 (1968). 同誌 13, 159.
- 6) Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Akizawa, K., & Yamai, S. (1969). J. Bacteriol. 100, 1147.
- 7) 藤野恒三郎・三輪谷俊夫・竹田美文・都丸明子 (1969). 食品衛生研究 19(8), 20.
- 8) ———・———・——— (1969). モダンメディア 15, 221.
- 9) ———・———・———・篠田純男・都丸明子・吉原明子 (1969). 日細誌 24, 517.
- 10) 加藤貞治・小原 寧・一戸治江・山井志郎・長島喜美子・坂崎利一 (1966). 同誌 21, 442.
- 11) 善養寺浩・一言 広・太田建爾・諸角 聖 (1970). 同誌 25, 439.
- 12) 厚生省食品衛生課 (1963). 食品衛生研究 13(9), 1.
- 13) 藤野恒三郎・福見秀雄 (1967). 腸炎ビブリオ 806p. 東京; 納谷書店.
- 14) 高木光造・飯田 優 (1967). 北大水産彙報 18, 271.
- 15) ———・——— (1969). 同誌 19, 288.
- 16) 伝染病研究所学友会 (1966). 細菌学実習提要 478p. 東京; 丸善.

Explanation of Plates

PLATE I

Kanagawa phenomenon by the strains of *V. parahaemolyticus* on the surface of modified Wagatsuma agar added with rabbit red blood cells.

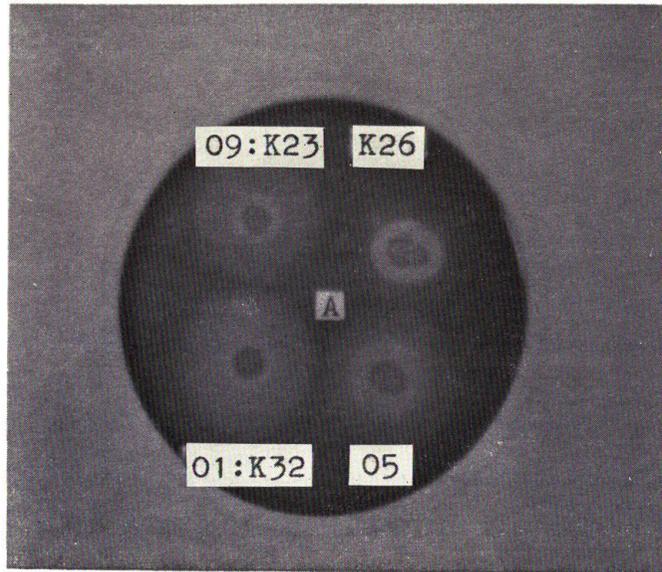


PLATE II

Photomicrographs of the cells of *V. parahaemolyticus* (serotype; O5) stained with Loeffler's alkaline methylene blue s.s.

- Fig. 1. Showing cells washed three times with the solution of 0.01M $MgCl_2$ -3% NaCl.
× 500
- Fig. 2. Showing cells washed as described in Fig. 1 and then treated by the method of osmotic lysis. × 500
- Fig. 3. Showing cells dried at $-20^{\circ}C$ and then treated by the method of osmotic lysis.
× 500

