ジフテリア毒素產生に関する研究

第1報 二三の物理的條件に就て

堀 和 弘 萱 沼 和 子

北里研究所 (部長 沼田岳二)

〔受付: 6月25日 1954年〕

緒 言

高単位毒素を產生するジフテリア菌は液体培養に際し培地液表面に菌膜を作り發育する事は周知の如くであり毒素產生に際して培養液表面積を広くする事が条件の一つとされこの目的の爲に從來種々の工夫がなされて來ている。Pope and Smith (1932), Tayler (1933) 菌が發育しその菌の代謝の結果として毒素が產生せられるのであるから菌の大量に増殖する様な環境を設置する事は大切な事であろう。我々は菌の發育は培地の物理的、化学的の諸條件の調整及び發育中の代謝諸産物間の一定の平衡とが、菌の發育並びに毒素の產生を繼續せしめる、即ち如何に最初の條件が好適でも菌が發育してその産出する代謝物質及び培地中の各養素の消費との間に發育に不都合な條件が形成せられれば其れ以後の菌の發育及び毒素產生は停止せられると考えられる。(培養液中に炭末を入れたセロファン膜を挿入して菌の發育を良好ならしめる如き実験も、他の物理的意味も考えられるかも知れないが培地の化学的平衡を害する様な物質を吸着して發育に良好なる條件を維持する一つの方法であるとも考えられるであろう。我々は斯かる考え方に依り培地の二、三の物理的條件を変化して研究を行つた。

実験方法

培地: 培地は主としてペプトン培地を使用した。ペプトンを10%溶液とし之に Mueller の方法 (Mueller 1939, 1941) に従つて KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 及び CaCl_2 を加え pH 7.6 に修正し 85°C 加温後濾過する。此の除鉄操作を繰返す事3回 (3回目は CaCl_2 のみを加う) 液中の鉄量はジフテリア菌毒素產生に至適なる量より少くなる。(FeSO₄ · 7H₂O に換算して 0.2 ~ 0.3 r/ml) 此の除鉄濾液にクロロホルムを加え貯蔵液とした。貯蔵ペプトン液に蒸溜水を加え5倍に稀釈し、之に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 及び CaCl_2 (Mueller の処方通り) を加え再び 85°C 加温濾過除鉄し之に

更に Mueller の II 液及び III 液を規定通り加え pH 8.0 に修正した。容器に所要量を分注後 100°C 30 分宛 3 日間或は 120°C 15~20 分間滅菌した。水飴は 50% (重量%) 溶液とし除鉄をする。(CaCl₂ を適量に入れる) 100°C 30 分 3 日間滅菌し培地に菌接種直前に加入した。

菌株 P.W. No.8 Toronto 株 (我々は Harvard 大学由来の株に依り Harvard 株と称す) 之の Loettler 継代せるもの 1 白金耳を液体培地 (無糖又は糖加ペプトン培地) に接種しその 36~48 時間培養せるもの 1 菌膜 1 白金耳を実験用培地液面に接種した。

培養温度及び時間 接種せる培地は 33°C~34°C に 7 日間静置培養した。

毒素価測定 7 日間培養せるものはそのジフテリア菌純培養なる事を確めた後濾紙にて菌体を取り去りその濾液に就いて flocculation Test に依り毒素価を測定した

終末 pH 測定 接種前の培地及び上記濾液に就き東洋濾紙社 pH 試験紙により pH を測定した。

実験結果

I. 培地 pH と水飴量との関係

培地の起始 pH 6.5, 7.0, 7.5 及び 8.0 の 4 群の培養液を作り 30 ml 宛電球型コルベン (第2図C型) に分注滅菌せるものに種々の量の 50% 水飴液を加入培養した。実験成績は Fig 1 に見られる通りであつて起始 pH 6.5 では水飴 1.0% (0.6 ml/30 ml 培地) が至適であり、pH 7.0 では水飴 1.2%, pH 7.5 では 1.5%, pH 8.0 では 1.8% が適量であつた。即ち毒素產生は起始 pH 6.5 では 4.5 Lf/ml, pH 7.0 では 60 Lf/ml, pH 7.5 では 75 Lf/ml, pH 8.0 では 90 Lf/ml が最良の条件であり以後の実験はすべて起始 pH 8.0 で培養した。此の水飴

HORI, Kazuhiro, KAYANUMA, Kazuko: Studies on the toxin production of *Corynebacterium diphtheriae* No. 1 Especially under some physical conditions. Kitazato Institute for Infectious Diseases. — Jap. J. of Bact., 10(1), 5—8, 1955.

Fig. I. Initial pH と毒素産生

1.5%の条件で起始 pH 6.5 で培養しても 全然毒素の産生は見られなかつたであろう。(培地 pH が菌の発育と共に酸性となり菌の発育は第3日以後停止する) 我々は此の場合起始 pH を変化させると同時に水飴の量も変化させたのである。斯くすると培地の起始 pH と至適糖量との間に直線関係が存在する事を知つた。即ち培地に加うべき糖量は其の培養条件(此の場合は培地の起始 pH)に依つて異ならなければならない事が知られる。

II. 液層及び表面積と水飴との関係

ジフテリア菌の発育に於て培養液の高さ即ち液層の厚さと単位表面積に発育する菌の代謝産物の濃度とは逆の関係にある。又一定条件の下で菌量は液の表面積に比例するものであろう。ジフテリア菌毒素の単位容積に於ける濃度は表面積の広い程、又液層の薄い程大である筈である。然し乍ら表面積が大であり又液層が薄ければ菌の発育に依り生ずる代謝産物及び各栄養素の消費による培地の物理的・化学的变化はそれだけ激しいわけである。そしてかかる変化は或は菌の発育、毒素産出に有害である

Fig. II. 種々の形状の培養コルベン

かも知れない。即ち表面積の大である事は無条件に毒素産生を大ならしめるものではないかも知れない。我々は斯かる意味で Fig. II に示す如き種々の形状の培養器を使用して種々の表面積の条件でジフテリア菌の毒素産出状況をしらべた。図中 A, B, C の形のコルベンはガラス蓋を附し滅菌し、D型のコルベンは綿栓をして滅菌後

第 I 表 各種液量に於ける毒素産生状況

培養した。之等各種のコルベンに種々量の培地を入れ又 media: 2% Pepton media, Total N abt. 2.0mg/ml, Fe als FeSO₄ · 7H₂O abt. 8g/20 ml, P als H₃PO₄ 0.7%

培養コ ルベン	液量 (v)	液層 (h)	表面積 (c)	v/c	c/h	Lf/ ml	Total Lf*	
A 型	50	0.9	50	1.0	55.5	60	3,000	
	100	1.5	80	1.35	51.5	70	7,000	
	200	2.6	98	2.04	36.6	55	11,000	
	300	3.4	118	2.54	34.4	50	15,000	
	400	4.3	129	3.10	30.0	35	14,000	
	500	5.2	131	3.85	25.0	30	15,000	
B 型	50	0.8	85	0.59	102.5	65	3,250	
	100	1.3	85	1.37	64.0	80	8,000	
	200	2.7	85	2.35	36.2	60	12,000	
	300	3.9	85	3.53	22.0	50	15,000	
D 型	縦	50	1.1	35.5	1.43	31.8	70	3,500
		100	2.1	35.5	2.75	16.6	55	5,500
		150	3.3	35.5	4.3	10.6	42	6,250
		200	4.4	35.5	5.73	8.0	35	7,000
		300	6.7	35.5	8.6	5.2	25	7,500
	横	50	0.9	55	0.91	61.0	70	3,500
		100	1.6	56	1.78	35.0	70	7,000
		150	2.3	57	2.64	24.8	60	9,000
		200	3.0	59	3.4	19.5	50	10,000
		250	3.5	61	4.1	17.5	42	10,500
	平	50	0.35	150	0.34	430	65	3,250
		100	0.7	152	0.66	217	70	7,000
		150	1.0	155	0.97	155	70	12,000

* Total Lf は分注時の液量に Lf value を掛けた値であつて滅菌時及び培養中の液量の損失は此の場合除外した。普通約 10% 見なければならない、又表面積の広い程液量の損失も大である。

添加 50% Millet Jelly 0.9 ml/30 ml of media (1.5%) 各種の位置に静止培養した成績は表 I に示した如く、液量: 表面積が 1.0~1.5 であると毒素の産出が最高である。液量: 表面積は液層に大体似た値である事は表にも示されている。しかし v/c が即ち液層 (h) が 1 以下であると毒素濃度 (Lf/ml) が余り高くない。之は恐らく前述した如く菌の代謝産物により急激に培地の条件が変化する為と考える。(理論的に云えば或一定条件の下では毒素の産出量は其の表面積に発育した菌量に比例する筈であり理想としては表面積を液層で割つた c/h に或恒数 X を掛けた Lf = x · c/h がその Lf 値となるべきで

あるが實際は表面積が極端に広い場合又は狭い場合には産出 Lf 価は全然異つたものとなる) 之は恐らく表面積の広い場合には短時日で菌の発育が最大となり培地中の物理的・化学的条件が以後の菌の発育及び毒素の産出を障害する結果であり又表面積が狭くて液層の厚い場合には培地の条件がいつ迄も毒素産出に好条件を持続するので長く毒素産生が行われるのではなからうか、之は同一表面積でも液量の多い程 Total Lf が多くなる事でも示されると思う。即ち表面積の極端に広い場合には表面積に比し菌量が少なく、表面積の狭い場合には菌量が表面積に比し多いと云う事及び Lf/ml が菌量に比例するか否かが問題となるが我々の此実験では菌量を測定してないので何とも云う事が出来ない。同僚渡辺の行つた実験(渡辺 1952) では或る条件に於ける Lf 価の上昇は菌の発育と平行していた。

我々は表 I に示した如く D 型コルベンを平にして培養した場合即ち表面積を非常に大にした場合終末 pH がアルカリ性となり D 型コルベンを縦にし 300 ml も液を入れて培養すると終末 pH が酸性に傾く事を知つた。それで此の場合終末 pH が中性に近づく様に水飴の量を加減したら如何であろうか、実験の結果は表 II に示した如く表面積が大である程添加す可き水飴の量を増加しなければならない。又表面積が狭く液層の厚い程水飴は少量で済む然も斯くする事に依つて或る程度表面積 : 液層の条件を克服して相当量の毒素産生を得る事が出来た。即ち上に述べた如く菌の代謝により生ずる悪条件も或程度培地の組成の量的比を増減する事に依つて克服出来るものと考えてよいであろう。更に表面積の広い場合に菌の発育を持続させる為に N 量とか Fe 量とか水飴量等を増す事も考えられるわけである。此の事は同僚渡辺の実験即ち液層が高ければ鉄量が或範囲内では多くても毒素産生が充分行われると云う成績からも当然考えられると思う。

考 察

ジフテリア菌の毒素産生機序に関する我々の知識は今尙お推測の域を出ない (Pappenheimer 1947) (米田 1951) が毒素が菌の物質代謝の産物である事には異論がない様である。毒素産生の条件の一つとしては菌の発育条件を整える事にあるとも云えるであろう。しかし Pappenheimer (1947) は毒素は pH 6.5~7.5 の間で産出せられると云い、又ジフテリア菌毒素産出に鉄の過剰が有害なる事は周知の事である。(Pappenheimer et al 1936) (Mueller 1939, 1941) (渡辺 1952) しかし又鉄の存在は菌の発育に好結果をもたらす (渡辺 1952)。この様に

菌の毒素産生と菌の発育とは必ずしも一致しない。しかし毒素産生の条件を整えれば毒素の産出は菌の発育とよく並行する。(Pappenheimer 1947, 渡辺 1952), 即ち毒素産生は必ずしも菌の発育と関係がないが、菌の或条件での代謝の産物として出来るものであるからこの意味で菌の発育とは密接なる関聯があるわけである。我々の研究は如何にして此の条件を整えるかにあるわけで本研究では主として二、三の物理的条件を変化させた場合毒素産生は如何に変化するかとこの場合培地の一組成としての水飴(糖)は毒素産生上如何なる役目を持つてゐるかを檢した。

水飴の過量は終末 pH を酸性にする、逆に水飴が少ないと終末 pH はアルカリ性となる。此の場合水飴を少くして培地の起始 pH を酸性にして置く事は当然考えて良い事であろう。何故ならば起始 pH も他の N 源や鉄、水飴等の培地組成と同様菌の代謝に関係する重要な因子である。pH が酸性又はアルカリ性に变化する事はジフテリア菌代謝に何等かの变化をもたらさなければならない。又ジフテリア菌の発育を檢した諸家 (Tasman et al 1936) 及び我々の経験では最初の Lag. Phase に於て培地は急激に酸性となり次で Log. Phase に移行すると再び培地はアルカリ性に転じ以後 pH 中性の近くをたどる。即ち菌発育の初期 36 時間位の内に酸性からアルカリ性への転換が起る。そしてこの転換後中性附近をたどる間に毒素の産生が見られる。我々の知り得た処ではこの Lag. Phase の時糖の消費が著明であり、Amino-N の消費は Log. Phase の菌の発育と並行している (渡辺 1952)。即ち Lag. Phase に於ける糖消費の結果培地は急激に酸性となり、Log. Phase に於ける Amino-N 消費による菌体合成の代謝の結果として培地はアルカリ性となり、N 代謝と糖代謝が適当に行われる場合は中性と云う形で表われるのであらうと考えられる。我々の今回の成績に見られる如く培地が酸性ならば C 源としての水飴が少量ですむが培地がアルカリ性ならば水飴も増量しなければならない、此の事は起始 pH の変化に依つて C 源代謝が質的には同じかも知れないが量的には变化したものが行われると考えてもよいであろう。しかしどの程度に糖としての水飴が消費されるかは之を檢してないので不明である。

次に菌発育場としての液量と表面積に就いてであるが液量 : 表面積は極く特殊なコルベンに於ける培養でない限り之は大体液層を以て表わす事が出来る。この液面にジフテリア菌が発育するのであるから液層の薄い程即ち表面積の広い程菌量は多くなるわけであるがしかし前に

も述べた如く極めて表面積の広い事は菌が急激に増量し
為に培地はアルカリ性となり以後の菌発育及び毒素産出
に有害であると思われる。又表面積が狭く液層の厚い事
は菌の発育が少く培地の変化も少く若し菌が培地の変化
即ち物質の欠乏又は pH の変化等に依つて次の発育代謝
の刺激を受けるものであるとするならば培地の変化の少
くない事も菌の発育及び毒素産生に好影響をもたらすと
は云われない。この事は培地が酸性になり菌量に比し糖
の過量なる事を示している。そこで斯かる一方的代謝を
行う事を防ぐ意味で糖量を増減する事は pH を調整し
菌代謝の平衡を維持する上に必要なのであらうと考
える。液層が厚いと Fe が多くても充分毒素産生が行われ
ると云う成績も Fe が多いと培地はアルカリ性になる。
処が液層が厚い事は培地を酸性にする。そこで此の条件
が相殺されて菌の発育、毒素産生に好適な pH の条件
が具わるからであらうと推察するものである。

結 論

1. 起始 pH と水飭量との間には pH 6.5~8.5 迄の
間では一定の直線関係が成立する。即ち起始 pH がアル
カリ性ならば水飭量を多く必要とし反対に酸性ならば水
飭量も少ない方がよい。そして本実験に使用された培地
に於ては 起始 pH 8.0 の場合最高の毒素が産出せられた。

2) 液量：表面積は大体液層の厚さで表わす事が出来
る。毒素産生は液層 1.0~2.0 cm の間で最も良く行わ
れた。

3) 培地組成が一定の場合液層が薄い場合では培地の
終末 pH はアルカリ側になり又液層の厚い場合は pH は
酸性に傾く傾向が見られこの傾向の極端な場合は毒素産
生に良くない。之を調整する為添加水飭の量を増減して
終末 pH を中性附近に来たらしめるならば或程度の v/c
の条件を克服して毒素産生を行わしめる事が出来た。

文 献

- 1) E. M. Taylor: Ann. J'Inst. Pasteur 55, 474 (1933).
- 2) C. G. Pope and Smith M. S.: J. path. bact. 35, 573 (1932).
- 3) Mueller J. H.: J. Immunol. 37, 103 (1939)
- 4) Mueller J. H. and P. A. Miller: J. Immunol. 40, 21 (1941).
- 5) 沼田 佑二外: (I. press),
- 6) Y. Watanabe: Kitasato Arch. of Exp. Med. 25, 283 (1952).
- 7) Y. Watanabe: un Published.
- 8) Pappenheimer, A. M. J. Biol. Chem. 167, 251 (1947).
- 9) Yoneda, M.: Nature. (1951).
- 10) Tasman, A. and A. C. Brandwijle: Biochem. J. 30, 1756 (1936).