ジフテリア毒素產生に関する研究

第3報 鉄, 磷酸塩及び水飴相互の關係に就て*

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

我々は前諸報に於て鉄と水飴, 磷酸塩と水飴, 鉄と磷酸塩の各二者間の關係に就て検討して來た。培地中の鉄濃度を増量する時は水飴の濃度を増加する事に依つてその鉄の條件に於ける最高の毒素が産出せられる事, 即ち鉄量と水飴量とは相互に増量せらる可きものである事及び磷酸塩は毒素產生に第二義的意味を有し磷酸塩濃度は培地により又糖源により至適量を異にし, 糖の至適量には何等の変化も及ぼさない (Hori 1953)。即ち一見水飴と磷酸塩濃度間には直接的相互關係がない様に見える事。更に鉄量と磷酸塩量との間には何の關係も見出せなかつた事等を知つた。

しかし磷酸塩の増量が糖の至適量を変化させる様な実験事実がしばしば見られた。此の原因につき第一に考えられる事は磷酸添加と共に鉄が迷入したのでは無からうかと云う事である。従つて本実験に於てはこの点に細心の注意を払い上述の三組成即ち鉄, 磷酸塩, 及び糖の相互關係を詳細に知らんとした。

実験及び結果

実験方法: 実験に用いた培地, 菌株等々に就ては第一報に記載した通りである。

I. 再び鉄と水飴の關係に就て。

我々は前諸報に用いたと同様水飴の量を種々変化し乍ら, 添加する鉄量を変化させた。実験の結果は Fig. I に示す如くで鉄量が少くても多くても毒素產生の障害される事は同じである。此の事は特に水飴 1.5% 添加の曲線に明かに示されている。此の場合鉄の至適量は約 0.13 γ /ml 添加した場合である。しかし水飴 1.84% 添加の曲線では鉄の至適量は約 0.33 γ /ml 添加の場合であつた。斯くの如く水飴の濃度に依つて至適鉄量は異なる事は前報に報じたと全く同様である。鉄量 0.5 γ /ml (第一図中では 15 γ /30 ml) 添加の場合には水飴 1.5% では毒素は 40 Lf/ml 以上は期待出来ないのであるが, 水飴を 2.34

Fig. I.

%に加える事に依り 70 Lf/ml の毒素が産出せられている。此の事は前諸報にも論じた如く培地 pH に及ぼす物質間の平衡であると考ええる。即ち鉄は培地をアルカリ性にし水飴は培地を酸性にする。(渡辺1952) 従つて鉄の多い所では水飴も多くなければ培地に於ける菌の發育に良好な平衡が破れるのであろう。

II. 鉄, 磷酸塩及び水飴相互の關係

鉄量約 0.3 γ /ml 及び 0.57 γ /ml 加入の二条件で水飴と磷酸塩を変化させた。結果は Fig. II に見られる如く鉄濃度が異ると水飴の至適量の異なる事は Fig. I と同

* 本論文の要旨は昭和26年1月北里研究所研究会に於て発表した。

HORI, Kazuhiro & KAYANUMA, Kazuko: Studies on the toxin production of *Corynebacterium diphtheriae*. III Correlation between iron, phosphate and sugar. Kitasato Institute for Infectious Diseases, — *Jap. J. of Bact.* 10 (3), 201~204, 1955.

Fig. II. Fe, phosphate 及び水飴相互の関係

括弧内% = 磷酸塩

Fig. III. Fe, phosphate 及び水飴相互の関係

ml of Millet Jelly added to 30ml of media.

様であるが、同時に磷酸塩の至適量も 0.6% から 0.8~1.1% と増している。又鉄 0.3 r/ml 又は 0.5 r/ml 加入の各々一つの場合だけを考えるとその曲線は前報 Fig. III と全く同傾向である。即ち 0.3 r/ml 鉄の場合は磷酸塩濃度 0.6%, 水飴 0.7 ml/30ml の培地がこの場合の最適条件であり、鉄 0.57 r/ml では 磷酸塩濃度 0.8~1.1% 水飴 1.2 ml が最適の条件であり、各々の場合磷酸塩の量に関係なく水飴の量が一定である。然し鉄量に変化すると磷酸塩の濃度も水飴の量も変化している。即ち従来我々の行った実験は鉄が一定で水飴とか磷酸塩とかを変えた実験を行っていたわけである。此処で注目すべき事は鉄 0.3 r/ml 添加の場合 磷酸塩 0.14% で水飴 0.7 ml/30ml 以上、鉄 0.57 r/ml 添加の場合 磷酸塩濃度 0.14% で水飴は 0.9 ml 以上、磷酸塩濃度 0.36% で水飴 1.1 ml 以上、磷酸塩濃度 0.6% で水飴 1.2 ml 以上の場合には

毒素產生が行われていない事である。此の様な場合は培地の終末 pH が極度に酸性 (5.4 以下) となり、第三日目以後は菌の發育が全く見られぬ為であり、此の原因としては鉄の増量の為に水飴の至適濃度が増加しなければならないに拘わらず磷酸塩濃度が水飴濃度に対する必要量より (前報の如く緩衝液としての必要量) 少い為に酸の濃度が高くなり培地の pH が酸性となる事を阻止し得ない為と解する。斯くの如く解釈すれば鉄量の増加に従つて磷酸塩濃度の増量している事も理解されると思う。更に Fig. II に示されたと同様の実験を鉄量を変化させた三つの場合に就て水飴と磷酸塩との相互関係を試験した結果は Fig. III である。その結果は Fig. II と全く同様である。磷酸塩濃度 0.4% の条件では鉄 40 r% 水飴 0.9 ml が至適の条件であり、磷酸塩濃度 0.8% では鉄 65 r% 水飴 1.2 ml が至適であつた。併し此の図からも磷酸塩濃度は鉄量に依つて変化している様に見られるが鉄量と直接関係のない事は前報 Fig. V 及び Fig. IV に明かであろう。Fig. IV に於て実線で示された 3 本の曲線は水飴 1.5% の時の鉄と磷酸塩との関係を示し之は前報 Fig. V の結果と全く同様であり鉄量に依つて磷酸塩の至適濃度に変化のない事を示している。又図に点線で示された如く水飴濃度が変化した場合に磷酸塩の適量が変わるのである。

Fig. IV. Fe, phosphate 及び水飴の相互の関係

考 察

以上で我々のジフテリア毒素產生培地の条件に関する研究は一応終つた。ジフテリア菌に依る毒素產生に鉄の過量の有害なる事は Pappenheimer の報告以後多くの研究者に依つて認められた処であり我々の研究に於ても鉄 150 r% ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ として) 水飴 2.34% の条件では 30~40 Lf/ml 前後の毒素しか得られなかつた。然し此の鉄の条件では水飴 1.5% で僅に 10~20 Lf/ml の毒素が産出せられたに過ぎない。然しながら我々がジフテリ

ア Toxoid 製造に当り 大量にして 且つ高価な 毒素を作らねばならないが其の際あらゆる器具、器材からの鉄の迷入を無くする事は云い得べくして実現至難な事である。そこで多少の鉄の迷入があつても毒素を産出し得る様な培地条件を工夫する事が早道であり之は沼田及び橋本に依つて一応完成せられ既に発表せられた処である(沼田)。

我々はその毒素産出の条件に就て種々検討した結果が今回の成績であつて我々の初期の実験及び製造に於ては Fig. II, III, IV 等に於ける鉄 60 r%以上の条件で毒素産生を行つたわけであり当時は大体 40~50 Lf/ml の毒素の製造を行う事が出来たのであるが現在は鉄 40 r%附近の条件で毒素製造を行い Lf 価も 50~60/ml となつてゐる。斯くすれば多少の鉄量の過量の条件に於ても大した障害を受けないのである。之は実に水飴及び磷酸塩の大量を使用した結果に外ならないと考える。我々は鉄、N源、及び NaCl 濃度の増加更に表面積を広くする事等が培地の pH をアルカリ性に傾け又逆に水飴濃度の増加及び表面積を狭くする事が培地 pH を酸性に傾ける事を知つた(渡辺 1952, 堀 1953)。そして培養中の培地の pH が中性より何れに傾いても毒素収量が減少し特に糖原が少くても多くても pH は甚しく変動しアルカリ性又は酸性となり菌の発育には致命的である事を経験した。即ち之ら諸物質の間にある平衡が保たれ培地の pH が中性に維持せられる時其の条件に於ける最良の毒素収量が得られ鉄の多少の過量すらも或程度は克服される。之等の事実は菌体合成時の菌の代謝の特性を暗示するものである。ジフテリア菌は鉄の過量に於てはむしろ菌体合成が盛んに行われる。併し毒素は産出せられないが(渡辺 1952)、鉄量の少量の条件下に於て毒素は産出せられる。併し此の二つの条件に於て合成せられた菌量には大差がない(渡辺 1952)。此の事は此の二つの条件に於て鉄の有る場合と無い場合では菌体代謝の方式が或程度別の経路を経て行われるものと考えなければならない様である。米田及び西田氏等も之に別の仮説を提起している(Yoneda 1951, Nishida 1952)。我々も鉄の多い Lf 価の低い Toxin は赤褐色を呈し Lf 価の高い毒素がフラビン様の螢光を発するのを経験している。Pappenheimer は培地中の鉄 4 原子の増加に対し 4 分子の Porphyrin と 1 分子の毒素が培地中より減少することより、毒素はチトクロム b の蛋白部分であり毒素と結合してチトクロム b となるべき Porphyrin が培地中の鉄量の少い場合、菌体内に合成せられた Porphyrin が鉄-Porphyrin となり、得づして培地中に排泄せられるであろうと云う仮

説を提出しているが、我々は其の様な過程で毒素が出来るのではなく、もつと別の酵素系による菌代謝の産物として毒素が出来るのではないかと考える。何となれば既に述べた如く鉄の増量に依る毒素の減少は Pappenheimer の云う如く鉄 4 原子に対し 1 分子の毒素の事もあるし又 3 原子に対し 1 分子或は 2 原子に対し 1 分子の場合もあり得るのであつて(Watanabe) 此の現象は培地条件に依り区々である。又鉄の多い条件に於ても菌発育の Log. Phase の初期に於ては毒素の産出が認められるが以後全然毒素量が増加しない。然し菌量は毒素産出以後増加する(Watanabe 1952) 此の事実は代謝交代が行われているのか、即ち適応酵素が発達するのか、或は最初チトクロム系代謝を行う菌と他の代謝を行う菌とが共存して之がその培地条件により他に打ち勝つて増殖するものであるのかは不明である。

鉄量の過量が毒素産出上有害なる事は之を否定しないが他の条件と独立して鉄の固定濃度(Pappenheimer によれば鉄イオンとして 0.14 r/ml) が毒素産生上絶対最適濃度であるとは認め難い。むしろ毒素の産出を左右するものは鉄だけではなく鉄の他に培地組成の組合せがあらう。之が菌の代謝に関係するアミノ N や糖其の他、培地の物理的、化学的要因はすべて大なり、小なり毒素産生即ち菌の代謝に関係がある。之らの物理的、化学的要因の間にある平衡が(之は培地 pH が一つの指示となるであろうが) 保持せられて初めて菌の毒素産生を行う様な代謝が進行せられるのであらう。この平衡が破れ培地条件が悪化すれば毒素産生に適した代謝が阻害され、又それが極端な場合には菌の発育も又障害せられる。そして毒素を産生する様な代謝を促進するものは鉄の欠乏である。我々は此の平衡を維持する因子として培地中の鉄、アミノ N、NaCl 及び糖、磷酸塩が相關々係に在る事を知つた。従つて鉄にせよ糖にせよこれ以上は絶対に有害である云う様な特殊な狭い限界があるのでなく之らの物が一つだけ特に多かつたり少かつたりする事が培地の平衡を破る為有害であるわけで、一つの物が多ければ之に拮抗する物質を多くしてその平衡を維持すれば良いわけである。此の事を我々の実験が証明した。例えば鉄が多く培地がアルカリ性になる様な条件では糖を多くすればよく、糖が少なければ必然的に鉄も多くはいらない。表面積も広すぎると毒素産生は障害される。磷酸塩は特に糖量の増加に対して意義がある事は前述した如くである。更に鉄が増加すれば糖を多くせねばならない。糖を増加すればその酸性物質に対する緩衝剤として磷酸塩を必然的に増量しなければならない。此の事は特

に糖源として水飴を使用する場合には必要であり、麦芽糖は培地を酸性にする力が水飴に比し遙に弱いので、この物の増量に対しては水飴程磷酸塩を必要としないが原則的には同一である。

結 論

1. ペプトン培地でも鉄の増加に対しては水飴を増量する事で毒素産生の減少を相当防止し得た。

2. 鉄、磷酸塩、水飴の三者を変化せしめて行つた実験の結果、鉄の増加に対しては水飴を増量しなければならないが此の場合培地に充分の磷酸塩がないと培地 pH は酸性となり毒素産生は見られない。磷酸塩濃度を増せば pH が中性近くに維持せられ充分に毒素産生が行われる。此の場合一見鉄の増加は磷酸塩の至適量を変化させる様に見えるが鉄と磷酸塩とは直接に何の関係もない事が示された。

稿を終るに当り終始御指導を賜つた沼田部長及び種々御忠言された宗部長、渡辺、大西、橋本君及び名大米田

氏及び金沢大西田氏に深謝する。又技術的援助をお願いした国兼、喜多川、五十嵐、小林、諸氏に深謝する。

文 献

- 1) Hori, K.: 10(1), 5, 1955.
- 2) Watanabe, Y.: Kitasato Arch. of Exp. Med., 25, 283 (1952).
- 3) 沼田岳二, 橋本喬外: In press.
- 4) Hori, K.: 10(2), 109, 1955.
- 5) Nishida, N. and M. Nakamura: Jap. J. Bact. 7, 401 (1952).
- 6) Watanabe, Y.: Unpublished.
- 7) Pappenheimer, A.M.: J. Biol. Chem. 167, 251 (1947).
- 8) Pappenheimer, A. M. and E. D. Hendee: J. Biol. Chem., 197, 701 (1947).
- 9) Yoneda, M.: Nature.
- 10) Watanabe, Y.: In press.