ビブリオ属の1菌株の自家融解現象に関する研究

第1報 自家融解に及ぼす諸因子の影響

浅 木 快 造

鳥取大学医学部細菌学教室 (主任 高木 篤教授)

[受付: 7月21日・1958年]

細菌が自家融解を起す現象は1904年 Rettger¹⁾ の報告以来よく知られている。その過程は細胞諸成分に作用する諸種の酵素過程を伴った化学反応と考えられるが、これに関する研究は極めて少い。自家融解の研究は古くからこれを容易に起す肺炎球菌でなされ、Avery & Cullen²⁾, Goebel & Avery³⁾, Dubos⁴⁾⁻⁶⁾, の比較的詳細な実験が報告されているが、最近では、芽胞を形成する桿菌についての自家融解の研究が多く発表された。Greenberg & Halvorson⁷⁾ は *B. terminalis* の発芽培養濾液の中に autolytic substance の生ずることを報告し、Strange & Dark⁸⁾ は *B. cereus* 芽胞細胞の自解濾液の中に Norris⁹⁾ は *B. cereus* の培養濾液に、Horikoshi & Iida¹⁰⁾ は *B. circulans* の培養濾液の中に細菌細胞を溶解する物質が生ずることを報告している。また、Nomura & Hosoda¹¹⁾⁻¹³⁾, は *B. subtilis* アミラーゼ産生株の溶解濾液の中に生ずる autolysin の性質並びに作用機構について報告した。その他、Stacey & Webb¹⁴⁾, Jones ら¹⁵⁾ は *Cl. welchii* と *Staph. citreus* の溶解液の中に Boroff¹⁶⁾ は *Cl. botulinum* の培養濾液の中に細菌細胞溶解物質が生じることを発表している。この様に自家融解に関する研究は主としてグラム陽性菌についておこなわれ、グラム陰性菌については川田の *Aerobacter cloacae*¹⁷⁾ 並びに緑膿菌¹⁸⁾ の自家融解についての報告がみられるだけで、グラム陽性菌にみられる様な系統的でかつ詳細な研究も他にはみあたらない。

そこで私はグラム陰性菌の中で最もアルカリに対して高い感受性が観察されたビブリオ属の1菌株が、また自家融解を非常に速に起すことをみたので、この菌を用いて自家融解に及ぼす物理的・化学的因子の影響を検討すると共に、電子顕微鏡を用いてその形態的变化を観察して、興味を得たので報告する。

実験方法

使用菌株は教室保存の水ビブリオの1菌株で、その生

物学的性状は *Vibrio sp.* に似ている点が多いが、ゲラチン培地上のコロニーは灰色を呈する。

この水ビブリオの1菌株(以後WV株と略)を普通寒天平板に37°C, 15時間培養し、通常蒸留水で1回遠沈洗滌の後、実験目的によつて夫々の媒液に再浮遊し、37°Cに静置した。一定時間の後の浮遊液における自家融解の進行状態は吸光率の減少をEPO-B光電比色計(日立製)(660m μ のフィルター使用)で読むことにより知った。

なお、予め菌液を段階稀釈し、その各々の吸光率を測定し、菌液濃度と吸光率の関係をもとめたグラフから濁度の減少率を算定し溶菌率とした。

電子顕微鏡像は菌液を遠沈し、洗滌することなく、ただちに1%オスミウム酸を加えて1時間固定した後、蒸留水で1回洗滌した。その菌液をコロジオン膜を張ったメッシュ上にとつて空気中で乾燥し、パラヂウムでshadowして撮影した。

実験結果

1. 10⁻²N苛性ソーダによる諸種細菌の溶菌について
表はWV株と教室保存の17株の諸種の菌を用いて10⁻²N苛性ソーダ含有0.425%食塩水浮遊液を作り、37°Cの恒温槽中に30分間において吸光率の変化を読み、溶菌率を求めた。この際、37°C静置前の各菌浮遊液の濃度は20%Tに一定した。一般にグラム陰性菌は陽性菌にくらべてアルカリに対する抵抗性が弱いが、最も抵抗の弱かつたのはWV株で90%以上の溶菌率を示した。菌種乃至菌株間にも著しい差が認められた。

2. トルオール及び紫外線照射によるWV株の自家融

ASAKI Kaizo: Studies on the autolytic phenomenon of a strain of water vibrio. I. The effect of various factors on the autolysis of the strain. Department of Bacteriology, School of Medicine, Tottori University.—Jap. J. of Bact., 141-146, 1960.

第1表 10^{-2} N 苛性ソーダによる諸種細菌の溶解

菌 株	溶 菌 率 %	
	30	分 間
Mycobacterium phlei	3.5	
Micrococcus lysodeikticus	12.0	
Staph. albus	10.0	
Streptococcus hemolyticus	12.5	
Dipl. pneumoniae	15.0	
N. gonorrhoeae	44.0	
B. subtilis	24.0	
Vibrio cholerae (Inaba)	37.5	
A. aeruginosa	25.0	
A. cloacae (C ₄)	38.0	
A. cloacae (Yoken)	62.0	
Sal. typhi (Okayama)	64.5	
E. coli B	69.0	
Ps. aeruginosa (Kyudai)	67.0	
Ps. aeruginosa B 15	70.0	
Ps. aeruginosa B 14	71.0	
W. V.	91.5	

解

最もアルカリに対する抵抗が弱いWV株を0.85%食塩含有磷酸塩緩衝液(pH=7.4)に浮遊させ、トルオール処理と紫外線照射処理をした後、自家融解の進行状態をしらべた。トルオール処理では菌液を試験管に5ml宛分注し、トルオールの0.2mlを加え、1時間後にトルオールを除去した。紫外線照射処理は19Wのマツダ殺菌灯で液層2mm、照射距離15cmで15分照射した。図1に示す様に紫外線照射直後から吸光率は急激な低下をみせ6時間で飽和し、その溶菌率は約82%で、24時間後も同じく82%であった。トルオール処理でも紫外線照射処理と殆ど同じ経過をたどつて、6時間後に約79%の溶菌率でほとんど飽和し、24時間後は81%となった。対照として浮遊液を37°Cで単に静置した場合は処理菌液より1時間程遅れて急に吸光率が低下し始め、溶菌率は6時間で約79%, 24時間後に約92%を示した。この点より本菌株は他の細菌に比し自家融解が速やかに行われる様である。

3. pH の影響

自家融解に及ぼすpHの影響をみるため、WV株をpH 5~8ではSørensen 緩衝液に、pH 8~9ではClark Lubs 緩衝液に浮遊した。その菌液を5ml宛試験管に分注し、トルオールを0.2ml加え(1時間後にトルオールを除去した)、37°Cで5時間静置し、吸光率を読み、溶

図1 トリオール及び紫外線照射処理によるWV株の自家融解曲線

図2 pH の影響

菌率を求めた。図2に示す様にpHが大きくなると共に溶菌率は上昇し、8を越えると下降を示した。即わち、自家融解の至適pHは7.0~8.0の間にある。

4. 加熱の影響

WV株を0.85%食塩含有磷酸塩緩衝液(pH=7.4)に浮遊し、その菌液を試験管に5ml宛分注し、50°C~100°Cの各温浴中で10分加熱した後、水冷し、0.2ml宛トルオールを加え、(1時間後トルオールを除去した)37°Cに静置し、5時間後と24時間後に吸光率の変化を読み、菌の溶菌率を比較した。図3に示す様に50°Cでは非加熱対照菌液に近い溶菌率を示すが、60°C10分加熱後は著しく阻害された。70°C以上では5時間後と比較して、24時間後の吸光率に変化がなく、温度の上昇と共に溶菌率も低い。これは70°C以上では自家融解が全く阻害されてい

図 3 加熱の影響

ることを示す。

5. 昇汞, ホルムアルデヒド, 石炭酸の影響

昇汞, ホルムアルデヒド, 石炭酸の所定の濃度を含んだ食塩磷酸塩緩衝液 (pH = 7.4) に WV 株を浮遊させ, トルオールを加えて 37°C, 6 時間後に溶菌率を算定した。図 4 に示す様に 10^{-3} Mol の昇汞で自家融解は強く阻害され, 10^{-1} Mol のホルムアルデヒド, 石炭酸でも相当強い阻害をきた。

図 4 ホルムアルデヒド石炭酸昇汞の自解に及ぼす影響

次にその菌液から各薬剤を遠心沈澱により除去し, 更に 2 回食塩含有磷酸緩衝液で洗滌後, 食塩含有磷酸塩緩

衝液に再浮遊し, 37°C の恒温槽中においた。図 5 に示す様に 24 時間後にその溶菌率を算定すると, 昇汞, ホルムアルデヒド, 石炭酸処理後, 各々の薬剤を除去すると各々 30% 前後の溶菌率を示し, かなり強く溶解の阻害が残る。

図 5 昇汞ホルムアルデヒド石炭酸処理後の溶菌阻害

6. 電子顕微鏡による自家融解の観察

トルオール処理, 紫外線照射処理による自家融解の進行状態を電顕像で観察し, 吸光率より算定した溶菌率と形態的变化との関係を調べた。写真 1 は WV 株を 37°C で 15 時間培養した電顕像で, 細胞はコマ状で 1 端 1 本の鞭毛を有し, 1 様に電子密度は高く, 内部構造は観察出来ない。写真 2 はトルオール処理菌で 24 時間後に 81% の溶菌率を示したものであるが, ghost cell の状態となり, 膨化し, かつ扁平化し, 電子密度は著しく減少しているが cell wall の内部には円形顆粒状の電子密度の高い部分が散在している。写真 3 は紫外線照射処理菌で 24 時間後に 82% の溶菌率を示したものである。菌体の電子密度は均等に相当減じている。写真 4 は対照の為の浮遊菌液を 37°C にて 2 週間置いたもので 90% 以上の溶菌率を示したが, 写真 2, 3 よりも更に自家融解が進んでいる。細胞は全く扁平化し, 最も著しく電子密度が減少している。又, cell wall の内側には尚一枚の膜の存在が考えられ, この内側の膜は cytoplasmic membrane と推察される。尚, 紫外線照射処理後 37°C, 2 週間おいた菌の電顕像は 24 時間後のものと類似の像が観察され, もはや自家融解は余り進まない様に考えられた。

考 察

自家融解は Dubos¹⁹⁾ によると細胞の蛋白質, 脂質, 核酸, 多糖質等に作用する種々様々の酵素過程を伴つ

た。細胞の崩壊をまきこんでいる複雑な現象で、その研究は前述の様にグラム陽性菌に関しては比較的多いがグラム陰性菌では極めて少く、グラム陽性菌の研究にみられる様な系統的で、かつ詳細な報告はみられない。

自家融解の至適 pH はこの現象にあずかる諸酵素の活性至適 pH の平均した値を示すものと考えられるが、グラム陽性菌の自家融解の至適 pH については野村等¹²⁾は *B. subtilis* の autolysin の至適 pH は 6~8, Greenberg 等⁷⁾ は *B. terminalis* の autolytic substance の至適 pH は 5.0~5.5, Strange 等⁸⁾ は *B. cereus* の至適 pH は 4.5~8.0, Norris⁹⁾ は *B. cereus* の至適 pH は 8.0~8.2, Dubos⁴⁾ は *Pneumococcus* の至適 pH は 6.5~8.0, Avery 等²⁾ は *Pneumococcus* の至適 pH は 6~8, Jones 等¹⁵⁾ は *Staph. citreus* 至適 pH は 7.0~8.0にあると報告している。グラム陰性菌については川田が *Aerobacter cloacae* の C₄ 株¹⁷⁾ の至適 pH は 6.6~7.7, 緑膿菌¹⁸⁾ の至適 pH は 7~8であると述べ、Jones 等¹⁵⁾ は *Staph. citreus* B9 株の自解濾液のこの菌のグラム陰性 cytoskeletons に対する至適 pH が 8.0~8.5であると報告している。WV 株の自家融解の至適は 7.0~8.0であった。至適 pH は菌種、菌株間で差がみられるが、細胞の化学組成の相違から現われた酵素系の差によるものと考えられる。

川田は *Aerobacter cloacae* の C₄ 株²⁰⁾ を 60°C 10分加熱した後も自家融解が全く阻害されないと述べ、Dubos⁴⁾ は肺炎球菌の自解濾液から抽出した自解酵素は 60°C, 10分の加熱で完全に不活性化されると報告し、川田は緑膿菌¹⁸⁾ では 60°C, 10分の加熱で自家融解は著しく阻害されると述べている。WV 株では 70°C~100°C, 10分の加熱で全く不活性化されるが、60°C では時間の経過と共に僅かの吸光率が減少したことから、著しく阻害はされたがある程度自解酵素が作用していることを示唆している。以上述べた様に、自解酵素系の加熱に対する抵抗性はグラム陽性、陰性に関係なく、菌種、菌株により、かなりの差異がみられる。

Smolelis 等²¹⁾ は *Micrococcus lysodeikticus* に紫外線を照射して殺菌すると自解酵素がかなり不活性化され、lysozyme で溶菌させる場合、自解酵素の影響が最小にとどめられると考えた。又、川田は緑膿菌¹⁸⁾ で自家融解は紫外線照射殺菌すると速かに進行し、照射の影響を殆ど受けないと述べている。WV 株でも自家融解は紫外線照射殺菌直後から速やかに進み、吸光率の上からは阻害が認められない。そしてその電顕像については 37°C, 24時間においたものと 2週間おいたものとの間に変化が少く

無処理の菌浮遊液の 2週間後の電顕像(写真 4)まで自家融解が進んだ像が観察されないことから、これは紫外線照射処理で自解酵素系に極く僅かではあるが阻害があると考えられる。

川田は *Aerobacter cloacae* の C₄ 株¹⁷⁾ では 0.2Mol ホルムアルデヒドで処理後薬剤を除去すると、溶菌は阻害を受けないで行われ、10⁻³Mol 昇汞, 0.2Mol 石炭酸処理後では薬剤を除去しても溶菌阻害は除かれなかつたと述べ、緑膿菌¹⁸⁾ では昇汞, ホルムアルデヒド処理後、薬剤を除去しても尚かなり強く溶菌は阻害されたと報告している。又、Dubos⁹⁾ は肺炎球菌を 0.5%ホルムアルデヒドで処理し、薬剤を除去すると 24時間以内にグラム陰性化し、部分的溶菌が起ると述べている。WV 株では 10⁻³Mol 昇汞, 0.1Mol ホルムアルデヒド, 0.1Mol 石炭酸で処理後、薬剤を除去した後も相当溶菌は阻害された。

又、川田¹⁷⁾ は自家融解した *Aerobacter cloacae* の C₄ 株の電顕像で cell wall と鞭毛が残存することを観察したが、WV 株でも cell wall と鞭毛は残り、電子密度の減少は細胞内容の融出に伴ったと考えられるが、少くとも細胞の形態は保たれた。

結 論

ビブリオ属の一菌株(WV 株)の自家融解に及ぼす若干の物理的・化学的因子の影響を検討し、又その形態学的変化を電子顕微鏡で観察して次の様な結果を得た。

1) WV 株にトルオール処理をすると 37°C, 6 時間後に 79%の溶菌率を示した。この菌の自家融解至適 pH は 7.0~8.0の間にある。

2) WV 株の自家融解は紫外線照射殺菌をすると速やかに進行し、6 時間後に 82%の溶菌率を示すがそれ以上進まず、殺菌による自解酵素の極く僅かな阻害を電顕像によつて観察した。

3) 60°C, 10分の加熱で自家融解は著しく阻害され、70°C~100°Cでは全く阻害された。

4) 10⁻³Mol 昇汞, 10⁻¹Mol ホルムアルデヒド及び石炭酸で自家融解は阻害される。昇汞, ホルムアルデヒド, 石炭酸処理の後、薬剤を除去しても尚溶菌阻害はかなり強く残る。

5) 自家融解した菌は ghost cell の状態になり、鞭毛が cell wall を貫いて出ている。

終りに臨み高木教授、川田助教授の御指導、御校閲を感謝致します。尙電顕撮影に御協力下さった勝木哲夫氏

に謝意を表します。

(本論文の要旨は 1958 年日本細菌学会中国四国地方支部第11回総会に発表した。)

文 献

- 1) Rettger, L. F. : J. Med. Res., 13, 79-92, 1904
- 2) Avery, O. T. & Cullen, G. E. : J. Exp. Med., 38, 199-206, 1923.
- 3) Goebel, W. F. & Avery, O. T. : J. Exp. Med., 49, 267-286, 1929.
- 4) Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 65, 873-883, 1937.
- 5) Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 66, 101-112, 1937.
- 6) Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 67, 389-398, 1938.
- 7) Greenberg, R. A. & Halvorson, H. O. : J. Bact., 69, 45-50, 1955.
- 8) Strange, R. E. & Dark, F. A. : J. gen. Microbiol., 17, 525-537, 1957.
- 9) Norris, J. R. : J. gen. Microbiol., 16, 1-8, 1957.
- 10) Horikoshi, K. & Iida, S. : Nature, 181, 917-918, 1958.
- 11) 野村真康 : 日本農芸化学雑誌, 29, 678-682, 昭 30 (1955).
- 12) 野村真康, 細田淳子 : 日本農芸化学雑誌, 30, 233-237, 昭31 (1956).
- 13) Nomura, M. & Hosoda, J. : J. Bact., 72 573-581, 1956.
- 14) Stacey, M. & Webb, M. : Nature, 162, 11-13, 1948.
- 15) Jones, A. S., Stacey, M. & Webb, M. : Biochim. Biophys. Acta, 3, 382-399, 1949.
- 16) Boroff, D. A. : J. Bact., 70, 363-367, 1955.
- 17) 川田十三夫 : 日本細菌学雑誌, 12, 831-333, 昭32 (1957).
- 18) 川田十三夫 : 日本細菌学雑誌, 14, 5C-53, 昭 34 (1959).
- 19) Dubos, R. J. : The Bacterial cell, Harvard University Press, 92-99, 1949.
- 20) 川田十三夫 : 日本細菌学雑誌, 7, 529-533, 昭 27 (1952).
- 21) Smolelis, A. N. & Hartsell, S. E. : J. Bact., 63, 665-674, 1952.

写 真 説 明

写真 1 : 対照菌

写真 2 : トルオール処理菌, 37°C, 24時間自家融解
(トルオール 1 時間後除去)

写真 3 : 紫外線 15 分間照射処理菌, 距離 15cm, 液
層 2 mm, 37°C, 24時間自家融解

写真 4 : 無処理菌, 2 週間 37°C 自家融解