ジフテリア菌の増殖の特異性について

(1) 生化学的活性と形態との関係

西 田 尚 紀

金沢大学医学部細菌学教室 (主任 谷友次教授)

〔受付: 5月25日 1954年〕

「それが外毒素である」と定義されるには大別して二つの要約があるが、その第1は產生される条件であり、第2は產生されたものの生物学的或いは化学的屬性が外毒素の規定に合致しなければならないという事である¹⁾²⁾。第2の属性は外毒素を規定する上に可成り明確な条件であるけれども、第1の条件、詳しく言えば(I)菌の増殖期に毒素が產生される。(II)毒素は菌体中には無く培養濾液のなかにある、という規定とは必ずしも合致するもので無い事が最近の測定法の精密化と共に明かになった。かくてテタヌス菌毒素³⁾⁴⁾、ボトリヌス菌毒素⁵⁾、志賀菌毒素⁶⁾⁷⁾⁸⁾がすべて菌体から抽出されるか、又は菌体の崩潰によつて排出されるものである事が確定されるに至つた。

併しこの様な傾向にも拘らず、ジフテリア毒素だけは菌体の内には無く濾液の中に在り且又產生の時期も増殖の時期と全く一致する所から増殖時のメタボライトと考えざるを得ない様に見え加えて1947年 Pappenheimer 一門⁹⁾の鉄イオンを中心とした毒素とメタボリズムとの関係に対する推論が一層之を基礎づける様に見え、毒素研究者の間には Working Hypothesis として汎く受け入れられている現状である。

然しながら私は数年来第1の条件を吟味する事によつて古来のこの考えが疑はしい事については2, 3の意見を發表して来たが¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、本報では更に之を追究することによつて一層この見解が正しい事を証明した。

私は前報でジフテリア菌の3, 4の重要な酵素系の活性が意外に早く落下する事に就いて報告した。その際特別にこの菌の増殖曲線を測定しなかつたけれども、一定菌量の酵素活性の急激な落下は、特にその増殖期に著名である様に見えた。この事は之等の酵素がこの菌の構成酵素のうちでも最も主たる一群であるだけにこの増殖曲線が単なる Log Curve でない事を暗示する様に見えたしたがって代謝途次に生起すると考えられる物質を汎く

求め之を基質として酵素活性を驗した。

I

実験方法は Pope 培地に 35°C に培養したジフテリア菌 P.W. No. 8 トロント株を 24 時間, 48 時間, 72 時間 96 時間, 120 時間, 144 時間, 168 時間 の各時間目毎に培地¹⁰⁾の 2 本宛を取り出し、その發育量, pH, Lf を驗した後直ちに乳酸, グルタミン酸, アスパラギン酸, アラニン, 焦性葡萄糖, 琥珀酸, マリツク酸, フマル酸等を基質として酸素呼吸活性を檢查した。(酸はすべて中和して用いた) ワールブルグ檢圧計によつて酸素呼吸を観察したがその用量は前報にしたがつた。脱水素酵素反応はチュンベルグ管により乳酸ソーダ, 琥珀酸ソーダを基質とした。その用量はメチレン青, M/5000 0.3 ccm, 基質 M/50 1.0 ccm, 菌液 2.5 mg N/ccm 0.2 ccm, 磷酸緩衝液 M/5 (pH 7.0) 0.5 ccm 更に水を補足して全量を 2.5 ccm とした。この時の水銀柱圧は 10 mm であつた。菌の發育量は光電値から求められた。(培地 2 個に生えた菌総量の平均値) その結果第 1 図の如き結果を得た。

焦性葡萄糖, アスパラギン, フマル酸を基質とした時もこの傾向は同一であつた。かくて前報での構成酵素の落下は更に広範囲な活性の落下現象を伴っている事、然も之が増殖期に於いて著しいという事実を確認する事が出来た。次にこの様な酸化系とか醗酵系酵素と言う様な複雑なシステムに比べて単純で比較的安定と言われている乳酸脱水素酵素, 琥珀酸脱水素酵素に就いてその活性をしらべた。その結果は第 I 表の如くである。

NISHIDA Shoki: Studies on the growth curve of *C. diphtheriae*. Part I. On the relation between the morphology and the enzymic activities. The Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University. — Jap. J. of Bact., 9(10), 843-848, 1954.

第1図 ジフテリア菌の諸種基質に対する
酸化酵素活性と培養日数

基質説明

- (1) 乳酸ソーダ (2) グルコース
(3) グルタミン酸ソーダ (4) 醋酸ソーダ
(5) 琥珀酸ソーダ (6) マリック酸ソーダ
(7) アラニン酸

第1表 ジフテリア菌の脱水素酵素活性と培養日数

基質	培養期間	24時間	48時間	72時間	120時間
乳酸ソーダ		22	235	350	570
琥珀酸ソーダ		85	245	—	435

(基質なしのコントロール値は引いてない)

こゝでも相当な活性の喪失が起つている事を示している。之等の前報来の構成酵素の様な落下を考えると構成酵素に関する限り代償的酵素形成は無いものと考えられる。培地には之等の基質が充分に与えられているから之等の基質に対する活性を喪失させて特殊な適応酵素の形成にそのエネルギー源を頼るとは考えられない。したがって前報来のデータを元としてこゝに全面的な機能の退行的変性が起きていると考えて間違いは無いであらう。然もこの退行的変性の起る場所は各々の酵素に共通する可成に根本的な所で起きていると想像される。その第1の段階としては助酵素類の遊出が考えられる¹³⁾。毒素に比例してポルフィリン¹⁴⁾、フラビン¹⁵⁾の遊出が証明され認められている事であるからこの第1の段階が存在する事は当然予想される所である。私の培地でもこの事実は追試確認する事が出来た。然しながら菌体中の之等の物質の運命に就いてはどの研究者も注意をはらっていない。それは之等の物質がその増殖期に一致して濾液中に排出されるために、積極的に合成分泌されるのであつて菌体

を犠牲にして遊出するので無いと漠然と考えられているに過ぎない。しかしながら遊出の可能性は上述の見地から充分ありうる事が予想される。菌体内の運命については次報で述べよう。

然しながら第2の段階としては単なる助酵素の遊出に止まらず之等の助酵素の結合すべきアポ酵素蛋白自体の変性遊出によるものとも考えられる。増殖期に於ける毒素蛋白、モロニー毒素蛋白¹⁶⁾、細胞質蛋白¹⁷⁾、その他種々の蛋白体¹⁸⁾の著しい排出から考えて、寧ろ之に伴つて補酵素属の遊出が起ると考えた方が良い様に思われる。したがって前報来の不活性化の現象の示す意味は、之等の蛋白体がこの時期に積極的に合成分泌されるのではなく細胞質を犠牲にして排出される事ではないかと私は考える。この事は菌体内と菌体外に於ける之等の物質の運命を追求する事によつて始めて明確にされるわけであるが、恐らくは個々の生物学的特異性を持つ蛋白を菌体内で追求する事は補酵素、ビタミンを追求するより一層困難な為解決は容易ではない。然しながら之等の個々の蛋白体を追求するに先だち、私は之等の蛋白を主とした細胞質の流出があるならば、そこに電子透過性の増大を電子顕微鏡写真によつて追求し得るかも知れないと考えた。したがって毒素産生の過程をマークして増殖の各時期の菌を電子顕微鏡によつて追求した。之と平行して光学顕微鏡所見にも留意した。

II

光学顕微鏡所見について先ず述べれば著しい生化学的变化が開始される24時間目から48時間目にかけて形態上の激変を見る事が出来る。即ち24時間目までは細胞質いつぱいに染まる菌(ナイセル染色)であるのに、それ以後は次第に異染小体をもつ菌(以後異染小体菌と仮称する)が殖え48時間目では菌体は稍々長く、且異染小体菌が殆ど全部という状態になる。(毒素は24時間目を起点として産生され出す)72、96時間目ではこの傾向は更に著しいが、96時間目以後では染色性自体がうすれる傾向を示し164時間目では異常小体は見えない。グラム染色性(陽性)は終始変らなかつた。

電子顕微鏡では光学顕微鏡で見る異染小体菌への変化は透光度の著しく増大した菌として把握する事が出来る。以下電子顕微鏡写真について述べて行くことにする。菌の収穫された時期、その折の毒素、発育量については第5図に示した。

第2図は培養初期(24時間目)の菌で電子透過性の悪い且境界鮮明な菌の集団である。細胞質が充実している像であり光学顕微鏡では細胞質いつぱいに染まる時期に

相当する。こゝでは培地の L_f は 0 である。之から 4 時間を経た菌では第 2 図に比べて既に境界がぼけて見え且電子透過性も増して見える。 L_f は漸く現われ始め 2 となる。之が 48 時間目 (第 3 図) に致ると俄然激変し境界は不鮮明になると共に著しい電子透過性の増大を来し且細胞質は不均一となる。両極に透過性の悪い部分が出るのは、この時期に光学顕微鏡で見るナイセル異染小体即ち核物質の集合体だろうと考えられる。細胞質の著しい遊出が想像される図である。この時期に L_f は急騰して 35 となる。酵素活性は著しい下降を示し出す。爾後 72 時間、96 時間、120 時間の各時間目毎にとられた写真は 24 時間から 48 時間目にかけての変化程に著しくはないが徐々に変化して行く。 L_f は菌の増殖曲線と共に更に上昇し極期静止期に達する頃 55 となる。この増殖の過程で酵素活性は益々下り極期静止期に到達して直ぐ集められた菌でさえ実は酵素活性が下り切った菌の集団に他ならない。第 4 図はこの時期 (96 時間目) に収穫された菌であつて電子透過性を増すと共に菌体が縮小して見える。然し実際には小さくなるのではなくて菲薄化された細胞膜が元通り残っているのが Shadowing によつて判る。

次に之等の写真と共に Shadowing をほどこした写真についても観察したがその像から (第 6 図、第 7 図) 先の Shadowing をほどこさない透過像で境界が不鮮明になるのは細胞境界が融解消失するのでなくて細胞壁が菲薄化するためである事が判定された。

かくて光学顕微鏡で見る異染小体菌への変化は電子顕微鏡では著しく透過性の増大する変化であり生化学的には酵素非活性化への変化であり、毒素の側から見れば急激に濾液の中に毒素が排出される変化である事が明かになった。毒素の産生が前記の様な種々なビタミン或いは蛋白体と平行して産生されるだけにこの時期に於ける細胞透過性の増大は全面的な構成酵素活性の落下を併せ考えて細胞質の遊出が起つているものと判定した。然しながら電子顕微鏡で見る視野は限られた極小部に過ぎぬから染色標本を約 20 枚位作成し光学顕微鏡によつて異染小体菌をマークして変性の度合を求めると 48 時間以後は殆んどこの変性菌の集団に外ならない。この異染小体菌はその不活性化の傾向から増殖に関与していると考え難いが、この事を逆に言えば増殖に関与している菌は極めて小部分に過ぎない事になる。この事は生死菌数を測定する事によつて可成に明確とする事が出来たが詳細は次報にゆづりたい。この様に著しい変性不活性の菌を集積しつつ一部の菌のみが増殖能力を持つという事は普

通の細菌では考えられない事であるがジフテリア菌では以下述べる 2 つの意味において充分根拠を行つている。即ち第 1 には同じく分岐菌である結核菌で一部の菌のみが増殖に関与するという事は既に確認されている事実^{19) 20) 21)}であるから分岐菌としてその生物学的特異性の上から増殖様式の特異性が考えられるという事、第 2 には菌膜を形成して増殖する際、菌膜の部分によつて栄養が補給されるのに可成の差があるのではないかという事である。

かくてジフテリア菌は変性菌を異常につくりつゝ増殖し然も之等の変性菌が可成に早く細胞質を流出させこの時に毒素をも共に出しているとするれば時間の経過と共に Physiological youth の菌のパーセントは一層小となり菌体から毒素を抽出する事は不可能となるであろう。菌体の内に毒素を証明する事は誰一人として成功していないが、この生物学的特異性が無視される限りそれは常に不可能と言わなければならない。然しながら変性せぬ前の菌は、私の実験では 20 時間目位の菌が之に適當するが、この時期の発育菌量では培地に混在する微量の鉄イオンによつて菌体内の毒素産生が制約される事を考慮に入れねばならないから、静置培養に関する限り菌体から毒素をうる事は仲々に困難であろうと思われる。然しながら上述の所見に基づいて Physiological youth の菌を大量に集めてこの菌を一齊に異染小体菌へと変化せしめる事が出来ればその可能性はあるだろうと考え、実験を進めた結果、強力なジフテリア毒素が菌体の中に含まれたままの菌を得る事に成功した。この詳細については次報に報告する。

結 論

光学顕微鏡、電子顕微鏡の所見、並びに酵素活性の諸点を併せ考える時、異染小体を持つ菌への変化は酵素非活性化菌への変化である。この変化は蛋白変性にまで及ぶものと推論された。この見地から見ると、この菌の増殖曲線は実は変性菌の集積曲線に外ならない。之が増殖期に於ける菌の構成酵素の全面的非活性化の理由である。又一方毒素が増殖期に積極的に合成分泌されるメタボライトと考える事が誤である事を併せ説明した。そしてこの様な推論を根拠として菌体から毒素抽出を可能とすべき基礎条件を述べた。

稿を終るにのぞみ谷教授の御指導御校閲を深謝すると共に電子顕微鏡写真の作成をお願いした助手林保氏 (旧姓土井) の芳に感謝します。

文献 次報に記載の予定

第2図 24時間培養 $L_f = 0$
倍率 $\times 14,000$ 加速電圧 50 KV
(以下条件は同じ)

第4図 96時間培養 $L_f = 55$
(maximum)

第3図 48時間培養 $L_f = 35$
異染小体と思はれるものが見える。

第5図 第2, 第3, 第4図の菌が収穫された時期, 矢印で示す。その際の毒素, 菌発育量。

第6図 24時間培養 Lf=5 培地 pH 7.5

第7図 168間時培養 Lf=70 培地 pH 6.5