ジフテリア菌の増殖の特異性について

(2) 増殖期に於ける生菌数

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: 6月1日 1954年〕

私は前報²⁾でジフテリア菌の増殖曲線は実は変性菌(酵素活性を全く失い細胞質を流出させるに到る)の集積曲線に他ならぬと述べた。この際変性菌(増殖していないと推定した)の, 実際に増殖に関与している菌(Physiological youthの菌)に対する割合が圧倒的に多いと述べたが, 定量的に確定したわけではなかった。私は本報で増殖の各時期に於ける生菌数を測定することによって, 一層之を明かにする事が出来たので之について述べたい。

I

従来ジフテリア菌の生菌数を測定するという事は殆どこゝろみられなかつた。嘗て Eisler²³⁾がジフテリア菌膜は殆んど死菌であると述べたけれども, その数値又は測定法については何等の記載もしていない。それはこの菌が柵状配列を為し, 之が連鎖して疎水性な菌膜を形成して発育する為, 単個の菌に解離し難いために他ならない。私は尙も充分とは言いがたいが, 次の方法によつてこの困難に打ち勝つ事に努めた。

実験方法 培養法は総べて前報にしたがう。培養の各時期に菌の発育している 25 ml Pope 培地の入ったフラスコを孵卵器から取り出し, その菌を遠心し上清をあげ充分水を捨て切つた後, tween 80 約 0.05 ml~0.1 ml を管壁に附着せしめ, 試験管底で tween-80 を少量づゝ菌の中にすりこみ, 更に 3~5 分間菌液と tween をこねる様にする。然る後生理食塩水を少量づゝ全量 4 ml 加え, この 2 ml を取り 200 ml 容量のコルペンの中に入れ之に 18 ml の生理食塩水を加えて振盪機にかけ, 30 分の後光電値を求めて菌液の濃度を一定にした。之を原液とし 10^{-1} 飛びに或いは 10^2 飛びに 10^{10} まで希釈液をつくり各希釈液から 0.1 ml ビベットで菌液を吸いあげ 0.01 ml を酵母エキスを加血液寒天平板培地面に落しスパテル様なガラスの糞便棒でひろげた。各希釈段階毎に 3 枚の血液寒天平板培地が用いられその平均値をと

つた。(血液を用いた理由は単に発育を良くする為ばかりではなく, 発育した菌と赤色の環境のコントラストがある為, 菌計算上極めて有利であるからである。コントラストを良くする意味でフェノールレッドを用いても見たが, 血液寒天培地に比較して略々 20~30 % 生菌数が少なかつた)。

実験結果 第 1 表は 10^6 希釈と 10^8 希釈の成績を示したものである。但しこの実験に限り tween を使用しなかつた。(tween はこの実験の直後阪大小谷氏の奨めに従つて用いたもので敬意を表する次第である)。この成績から見るとジフテリア菌は如何に均等に見えても単個に解離しているという状態とは程遠いことが判る。次に培養日数と解離の難易について観察すると培養日数の新しいもの程解離が困難である事が判る。之は各時期の菌から均等な菌液を調製しようとする培養の若いもの程均等になし難いことから推測出来ることである。そこで先づこの均一性の相違が, 光電値によつて一定濃度の菌をつくる際にどの位の誤差を起すかについて以前になした実験を念の為附記した。

即ち各時期の菌液 (1 mgN/ml) 1 ml を取り之を 60°C 24 時間乾燥し測定した値は次の如くである。

24 時間培養	14 mg
48 "	13.5 mg
72 "	14.5 mg
96 "	16.0 mg
120 "	16.5 mg

時間の経過と共に一定濃度の液の重量が増加する様に見えるのは予想に反したものであるが, いづれにせよこ

NISHIDA Shoki: On the Growth curve of *C. diphtheriae*. (2) Viable count in growth phase. Bacteriological Laboratory, Faculty of Medicine, Kanazawa University. — Jap. J. of Bact., 9(11), 917-921, 1954.

の位の誤差を認めれば菌液の不均一性のため菌を多くと
るという事はない事が判つた。

第1表 ジフテリア菌の培養経過に伴う
一定濃度中の生菌数の変化

培養時間	稀釈倍数	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
24		1332	493
		1121	320
		951	299
48		445	92
		425	77
		—	67
72		225	35
		217	32
		—	—
97		28	3
		30	0
		22	0
146		10	0
		1	0
		1	0

第1図 ジフテリア菌増殖期中の生菌数
(第1表並びに本文参照)

註 発育菌量は 25 ml 培地に発育した菌の総量
(以下同じ)

表1の10⁶稀釈で示される各時期の生菌数を比較する
と次の如くなる。今仮に24時間目の10⁶稀釈液の菌

が100%生菌であると考えれば

24時間目	100%
48 "	22%
72 "	1.3%
96 "	0.7%

となる。実際には24時間目の菌は勿論100%生菌と
は考えられないがその相互の生菌数の比は変らない。次
に表1の解離度から見て日数の若い菌液は解離度が古い
ものに較べて、より悪い所から個々のコロニーは尚お数
個の生菌数から成ると考えられるから、生菌数の比は表
1より一層大きくなる。然しこの数値によつて生菌の%
を書いて見ると第1図の如くなる。(実際のカーブは一
層急降下する)即ちこの%の数値と発育量から生菌の総
量(各時期の発育量× $\frac{\text{上述の\%で示された数値}}{100}$)を書
いて見ると、第1図の点線の如くなる。(実際の生菌
数カーブは一層沈下する)即ち前報で別の面から述べら
れたが、こゝでも実際に増殖に関与する菌は極めて僅か
に過ぎない事が証明された。増殖カーブは実は死菌蓄積
カーブに他ならない。この増殖能力を失つた菌がジフテ
リア菌特有の早さで変性を起す所に前報の特異な酵素活
性様式があるわけであつて、元をたゞせばその特異な増
殖様式に原因すると言わなければならない。

第2表 ジフテリア菌の培養経過に伴う
一定濃度中の生菌数の変化

培養日数	稀釈倍数	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
24		無数	575	3
		"	476	3
		"	—	0
48		無数	18	0
		"	11	0
		"	50	0
72		無数	13	1
		"	11	0
		"	15	0

次に上述の実験と等しいがtweenを用い解離が充分
行われている成績を示す。こゝでは(第2表)残念な事
に24時間目と48時間目との中間がしらべられていない
が、前実験にしたがつて数値を出すと、こゝでも増殖の
頂点に達した時は殆ど死菌であつた。上記にしたがつて
計算すると

24時間目の菌	100%
48 "	3%
72 "	3%

となる。そこで増殖曲線とこの数値から生菌濃度を出す

第2図 ジフテリア菌増殖期中の生菌数
(第1表並びに本文参照)

と第2図の点線の如くなる。即ち第1図と第2図から毒素産生が平行するのは、増殖能力を失い酵素活性も全く失うに到る菌の量と比例するものであつて、Physiological youth の菌とは平行しない。即ちこゝで始めて、漠然と増殖期に一致して毒素が産生されると考えられて来たことが誤りである事が明かとなつた。同時に菌体の内に未だ嘗てジフテリア毒素を証明出来た人が居ないのは毒素を排出しない菌——従つて種々の細胞質を未だ流出していない菌——の%が、上述の根拠によつて判る様に、増殖につれてあまりにも少なすぎる様になるからに他ならないと推定されるに到つた。

次に実験の条件は殆んど等しいが鉄イオンを充分培地に加えて行つて見ると第3図で見る如く、殆んど等しい現象がこゝでも起ることが認められた。即ちこゝでは毒素の産生は全く無視されるから上述の特異な増殖様式は毒素産生とは直接的には関係はない。それは菌体内で産生された毒素が培地に排出される経緯を説明するに止ま

るものである。

第3図 Fe 50 r/ml Pope 培地の条件下の
ジフテリア菌増殖期中の生菌数

菌体の内に毒素が形成され之が変性と共に排出される事実を証明する為には前報並びに本報で述べた様に是非とも Physiological youth の菌を必要とする。静置培養では条件にかなつた菌を多量に得ることは極めて困難であろうと前報で述べたが、之を解決するために私は振盪培養法に着目した。ジフテリア菌の振盪培養に関しては Lingood & Fenton²⁵⁾(1947), Woodward, Tallman & Perrotta²⁵⁾(1948), 三橋, 村上, 小島²⁶⁾(1949), 等の研究がありその特色としては (1)増殖が早いという事, (2)たえず同一相の菌が並んで増殖するという事, があげられる。(2)の条件は理論的推理を容易にする点で大いに有利である。(1)の理由としては(イ)分裂に要する時間が短縮される。(ロ)増殖が対数増殖に近づく即ち Generation index が2に近づくの2つの要因が考えられる。(イ)は判らないとしても対数増殖カーブに近づくだけに(ロ)の Generation index = 2 の可能性があることを示し若しそうなら前報来の Physiological youth

のみの菌を多量に得るといふ私の必要性はみだされるわけである。したがって振盪培養法に於ける生菌数、酵素活性を増殖曲線と比較しつゝ測定した。振盪培養法に於ける条件は次の如くである。

実験方法 1分間140回振盪、振幅13cm、培養温度35°C、Pope培地20mlを容量200mlコルベンに入れ菌移植前に50%水飴0.8mlを加える。この培養法にしたがつて16時間前培養せられた菌を0.5ml上記の培地に加えた。各時間毎にコルベンを孵卵器よりとり出し、発育量を光電値によって測定した後培養液をそのまま一定濃度に希釈しブイヨンで 10^3 飛びに 10^{10} まで希釈した。振盪培養の際はtweenを用いながつた。

実験結果 菌の解離は100倍希釈に際し、実際は40~60倍に希釈されることを示し振盪培地でも尙お充分とは言えないがこの菌の凝集性を考えて止むを得ないものと考えた。この際注目すべきことは希釈に際して使用した原液の濃度が第3図の際の2.00mgN/mlに較べて遙かに薄い0.438mgN/mlであつたにも拘らず、 10^3 希釈の所で計算された生菌数値は約5倍位多い事である。之は静置培養では若い時期の菌と雖も尙お相当に死菌を含むか、或いは均一にせられた後も尙お凝集性を保つか或いは又両者の理由が重なる為かによるものだろう。今 10^3 希釈の所を取つて生菌濃度を書けば第4図の如くで

第4図 振盪培養時に於けるジフテリア菌増殖曲線と生菌数曲線並びに毒素産生曲線

ある。即ち第4図ではその増殖曲線は殆んどLog-curveに近づき、このカーブの過程の菌は殆んど生菌である事を示している。この過程に於ける毒素の産生は菌の死滅が始まる前に既に完了している。即ち死滅が毒素を遊出させる原因で無い事を示している。

次に酵素活性を増殖曲線並びに毒素産生と対比させて見た。振盪培養の酵素活性に関しては既に三橋、八木、村上²⁷⁾等が述べており異常に早く落下する事が種々の基質について証明されては居るが増殖曲線と組みあわせて検討しては居ない。そこでそれらの内の琥珀酸を代表させて増殖カーブと併記したのが第5図である。即ちこゝ

第5図 ジフテリア菌増殖曲線、毒素産生曲線と酵素活性曲線

でも増殖の頂点に達する頃殆んど活性は消失しているが、この際に於ける活性の落下の最も著名なのはLog-curveが終りかけた直後からで爾後急転直下して下る。三橋の成績並びに前報来の私達の成績から考えて、この変化を他の一般基質に適用して考えても間違いないだろう。ここで既に変性の第一段階が始まるものと考えられる。毒素が排出されるのもこの曲り角の所で最も著名である。この酵素活性の落ち切る時期はそれに引きつづいて一齊に起る死滅化との間に僅かながら間隔があり死滅の前段階と考えて良いだろう。したがって前の実験の静置培養

で両者が一時に起るために、どちらが原因であり結果であるかが判らなかつたのに対しこの成績は酵素非活性化が先行する事を明示した。加えて毒素がその変性の初歩段階に排出されるものである事が明かになったわけである。

III

次にこの酵素活性落下の時期にどのようなものが遊出して来るかが問題となるであろう。既にフラビンについては三橋、八木等¹⁵⁾によつて追求せられてはいるが上述の特異な様式を考慮に入れていない為に爾後更に検討を加える必要がある様に見える。之は次報で述べたい。ここでは私はこの時期における蛋白の遊出についてしらべた。

実験方法 各時期の培養濾液 2 ml を取り之に硫酸飽和溶液を加え 4% 飽和とし、起る沈澱をその濁濁度によつて光電管を用いて測定した。E (吸光係数) は 0.4 から 0.7 まで Lambert-Beer の法則に一致する事を確めた。沈澱の実数値は判らぬが相互の比は次の如くにして求めた。即ち被験時の E を Ex でコントロール培地の E を Em で現し、各時期の値を $(Ex - Em) \times 100$ で現した。

実験結果 第 6 図から菌体蛋白質が大量に放出され

第 6 図 ジフテリア菌増殖曲線、毒素產生曲線と培地に排出される蛋白

る前段階で既に毒素の排出が完了しているのを知る事が出来る。この一齊に蛋白質が排出されて来るのは第 4 図と照し合せて菌の死滅と相前後している事が判る。

かくして毒素が菌体内で、どのような意味をもつかは判らないとしても、それは変性の極めて早期に既に菌体蛋白から容易に遊離して出て来る蛋白であるという事だけはこの実験から言い得よう。

考 案

一般的に言つて菌が崩潰して行く径路として私は次の様な順序を推定した。

(1) 全面的な酵素系の活性喪失。(系という事に重点がある)。特に構成酵素系活性の喪失。系をなす酵素群としてはチトクローム系が最も不安定である。

(2) 脱水素酵素活性の喪失

(3) 菌の死滅

(4) 菌形態の崩潰

以上 4 段階を考えた。毒素は私達の現在の成績から少くとも第 3 の段階以前である事が判つた。したがつて菌の死滅と毒素との関係に執着しすぎる事は却つて誤りを犯す元となると言わなければならない。最近山中等²⁰⁾は私の研究を追試し静置培養でも菌が殆んど生菌であると述べたのはこの見地に立つて解釈すべき問題であろう。培地如何によつては増殖をストップしてから死滅するまでの時間がより長い場合(菌にとつて条件の良い培地であろうと想像される)もあり得るわけであつて、その環境では増殖しないまゝに生命を保っている時期が予想される。幸いに私の用いた培地条件では、その変性は直ちに死滅に移行するために増殖様式の特異性を明かにする上に好都合であつたと言わなければならない。

ジフテリア菌と同様な生物学的性状をもつ結核菌での研究で我々の同僚の 1 人河上²⁰⁾が先づ鳥型結核菌を用い、その増殖期では、生菌数が増殖カーブに一致し且つ脱水素酵素活性も落下していないのに殆どすべての構成酵素活性が落ちている事を確めたのはこの 4 段階の立場から考えて興味深く、目下実験を継続中である。

結 論

1. ジフテリア菌は Pope 培地の静置培養下ではその増殖曲線は実は死菌の著積曲線に他ならない。

2. Pope 培地の振盪培養下では増殖曲線は極期静止期に到達するまでは生菌曲線と一致する。然しながら酵素活性はこの時期には既に落ち切つている。毒素の排出はこの酵素活性の落ちる時期と一致する。

3. 振盪培養では毒素蛋白の排出される時期と菌体蛋白の排出される時期とは明確に区別し得る。前者は酵素活性の落ちる時期に後者は菌の死滅する時期と一致する終りに臨み御指導御校閲を賜つた谷先生に深謝します

文献 第 3 報に一括して記載する。