ジフテリア菌の増殖の特異性について

III. 菌体内に於ける強力ジフテリア外毒素の証明

西 田 尚 紀

金沢大学医学部細菌学教室 (主任 谷教授)

〔受付: 6月18日 1954年〕

現在ではジフテリア毒素を除く他の殆んど毒素は夫々の菌体から抽出する事に成功している。之等の実験に共通する根本の原理は培養期間の若い菌を集めて之から抽出するという事である。即ち幼若菌は毒性を持つているが陳旧菌は殆んど体内に毒素を持つていない事が相ついで証明されて来た⁴⁾²⁹⁾。テタヌス毒素の様に比較的早期に培地に排出されるものでさえ実は菌の透明化(恐らくは細胞質の融解……之は実験的にも関一門³⁾によつて証明された)に伴い排出されるもので、之以前の菌を集めればこの菌は強力な毒素を体内に持っている事が証明された。然しながらジフテリア毒素の場合には見た所、上述の原理は全くあてはまらない。如何に早期に菌を集めても菌は毒素を持たず常に濾液の中にある事がその第一の理由であり、且つ發育曲線と毒素産生曲線が全く一致する事が第2の理由であつた。したがつて現在外毒素研究者は外毒素排泄の機作としては、ひとつは従来の外毒素の概念のまゝに Physiological youth に於けるメタボライト、他は菌体の崩潰による遊出物、という見解を持つている様に見える。かくして四囲の外毒素のこのような趨勢に抗してジフテリア毒素のみが前者に属するものとしては考えられているが、Pappenheimer 一門の研究⁹⁾³⁰⁾³¹⁾以来この考えは一層汎く世界に支持を受けている様である。Eisler³²⁾が尚お数10年の持説を曲げず、崩潰による毒素の排出を説いてはいるが、前述のこの毒素のふたつの特性との矛盾を説明すべき根拠を何等示すに到つていないから依然として注目を受けるに到つていない。

然しながら前報来私が述べて来たこの菌の増殖曲線の特異性を考える時、ジフテリア毒素のみを別けて考える理由が毫も無い事が明かとなつたであらう。即ちジフテリア菌の増殖曲線では実際に増殖に関与している菌は極めて少く、それは死菌の蓄積曲線(或いは増殖を停止した菌の集積と言つても良い場合もある)であるという事

と、然もこのような状態の菌が異常に早く変性を起すという事とのふたつの特異性のために、今までの静置培養を使う限り本当の意味での幼若菌を集める事が極めて困難であり、私の知る限りでは、この変化をうけない若いジフテリア菌を集めて実験した人は誰一人無いと言つて過言ではない。したがつて今真の幼若菌を集めてこの中に毒素があるか無いかを追求する事が目下の急務である。私は前報で振盪培養法で幼若菌を大量に得る事が実験的に可能である事を知つた。したがつて本報ではその条件を吟味して、以上の目的を追求した。

実験方法

振盪培養の条件は特に記載しない限り殆んど前報に等しい。各時期の菌の毒性は生理食塩水で1~2回水洗の後一定光電値をもつた菌浮游液をつくり之を更にマーズニン水(最終濃度0.01%)で稀釈した後37°C 孵卵器に1時間置き、一部を取り無菌試験に供された後(翌日の判定ではジフテリア菌のみならず他の一般空中菌も發育しない)その所定量をモルモットの腹腔或いは腹部皮下に注射した。始め皮下が用いられたが結締織なぞに包埋されて徐々に毒素が排出される恐れがあるため腹腔を使用した。

実験結果

I 菌体内に於けるジフテリア外毒素の証明

第1図(a)は振盪培養、(b)は静置培養の増殖曲線と毒素産生曲線であるが、両者の相違は前者に於いて菌の増殖速度が最大の時と毒素産生速度の最大の時期が、接近はしているが明かにふたつの山としてみとめる事が出

NISHIDA, Shoki: On the growth curve of *C. diphtheriae*. III. Demonstration of potent diphtheria toxin within the cell of *C. diphtheriae*. Bacteriological Laboratory, Faculty of Medicine, Kanazawa University, — Jap. J. of Bact., 9(12), 1045-1049, 1954.

第1図 振盪培養並びに静置培養時の増殖曲線
毒素産生曲線の比較

(実線は増殖曲線, 点線は毒素曲線)

(a) 振盪培養, 振盪回轉数 140/分, 振幅 13 cm

(b) 静置培養

来るのに、後者では全く一致している事である。前者のふたつの速度を比較したのが第2図である。後者では2つの山が低くなり且つ重なる様になる。第2図で菌増殖の速度の落ちる時が前述の如く通常細菌と異り蛋白変性の第一段階とみなさるべきである事を考えると厳密な意味での Physiological youth の菌をあつめる為には増殖衰退期にうつる前の菌をあつめねばならない。然しながら毒素を得る為には菌量を出来るだけ多く得て然も培地の毒素との差が最も著しい時期を選ぶことが実験としては便利であるためこの方針にしたがつて菌をあつめた。第3図では14時間目の菌は培地中に既に15 Lf/mlの毒素を出している。この菌の浮游液を前述の如くにしてつくり 250 g のモルモットの腹部皮下に1/250 mgN 注射した。尙おコントロールとして30時間培養の菌(培地

第2図 培養の各時期に於ける $\frac{\Delta L_f}{\Delta t (1 \text{ 時間})}$ (点線),
 $\frac{\Delta C}{\Delta t (1 \text{ 時間})}$ (Cは菌発育量・実線)

第3図 振盪培養に於いて菌の収穫された時期
(↓印で示す)

Lf 43...この培地の最高 Lf) を 1/20 mgN 注射した。洗滌はこの菌の化学的不安定さを恐れて1回しか行つてい

ないので附着毒素を考えねばならぬが、附着毒素の点では後者が一層強いから之をコントロールとして差し引けば前者の毒性は総て菌体内にある外毒素によるものと見なして良いと考えた。モルモットは 1/250 mg N を注射したものは 48 時間以内に既に死亡したがコントロールは 7 日の観察後尚健全であつた。死亡したモルモットの剖検所見としては副腎の症状は定型的ジフテリア死を示す発赤、壊死を起している事を確認した。更にこの菌の 1/25 mgN とジフテリア血清 1 cc (350 AE) とを混和、30 分室温に放置後モルモットの腹腔に注射したものは 7 日を経るも何等の異常を呈せずジフテリア血清によつて中和される事を示した。

その後数回の実験の後得られた最高の値は 1,000 M.L.D./mgN であつた。前報にしたがつて 1 mgN=14 mg 菌量の計算で乾燥量 (グラム) に換算すると 1 g の乾燥量について 71,000 M.L.D. となる。之を今まで得られた最高の毒性菌の成績と比較すると

71000 M.L.D./g...西田 (1954)

75 M.L.D./g...Prigge (1932³³⁾)

1 M.L.D./g...Eisler (1926²⁹⁾)

となる。Prigge, Eisler の成績は現在用いられている P.W. No. 8 とは異なるが No. 8 Strain を用いた実験は 1942 年に Morton と Gonzalez³⁴⁾ によつて試みられ、彼等によれば菌体内には殆んど毒素が証明されず、したがつて毒素形成の場所は細胞内ではなく Active phase に於いて分泌されるものと結論されたのである。濾液の中の毒素に比べてあまりにも微少な菌体内毒素の故に稍々神秘的ながらいつもこの結論を下さざるを得ないのであるが菌体内崩壊説をなす Prigge, Eisler と言えどもこの点から考えれば単なる想像を出でないと言わねばならない。然しながら前報の実験による推定と、此処から出発した実験によつて始めて幼若菌の中に強力な毒素を証明し、陳旧菌の菌体には毒素がなく且つ濾液の中に移行している事を証明し得た。之は一般外毒素に共通する原理であつてジフテリア外毒素のみを別として考える事が誤りである事を示している。

II. 培養各時期の菌の毒性について。

第 1 図で見る様にジフテリア菌の静置培養では、同一の環境下では発育量に比例して毒性を出すのが常であるが、振盪培養では菌が良く生えているにも拘らず毒素がその割に産生されない時期がある。之は毒素がつくられないのではなく菌量に比例してつくられた毒素が、増殖カーブの可也の量に到るまで (図 1) 菌が log-curve をえがいて増殖する為、毒素を菌体中に保留しているもの

と推定され、この推定にしたがつて強力な毒素を証明し得たのであつた。然しながら菌の量に応じて毒素がつくられるものとして計算すると (もとより培地に排泄された毒素を差し引く) 数回の実験の結果一定の菌量から予想された値の M.L.D. を得る時と予想より遙かに低い時とがあつて必ずしもその計算に合わない事を知つた。そこで培養各時期の菌をとつて毒性をしらべた。その結果第 4 図、第 1 表に見る如き成績を示した。即ちこの成績

第 4 図 振盪培養時の菌の収穫された時期

(↑印で示す) 点線は培地中の毒素を示す

第 1 表 振盪培養の各時期に於ける発育量と単位菌量に含まれる毒素の量

	培養時間	菌発育量 mgN/Pope 20 ml	M.L.D/ mgN	M.L.D/g* (乾燥量)
No. 1	10.00	2.06	—	
No. 2	12.00	7.7	25 以下 (註1)	1775 以下
No. 3	13.30	10.0	200 以下 (註2)	
No. 4	15.00	11.8	300 以上	21300 以上
No. 5	35.00	13.9	20 以下	1440 以下

註 1, 註 2 共にそれ以下の量でこゝろみられなかつた

* 1 mgN を取り 60°C 24 時間乾燥しその重さが 14 mg に相当する事から計算された値である。

によれば菌が 8 mg N (全発育量の 3/5) に到達しても尚お菌体の内には毒素は無い。この時の培地の Lf は 0 であるからこの菌はこの時期に到るまで毒素を作つていな

い事が判つた。それから1時間30分の後にはこの培地の Lf は5 となるから菌体の中では毒素が作られ始めているものと思われる。この時期に 1/200 mgN をモルモットに試みたが全く症状を呈しなかつた。この時期は菌が対数増殖期を終えて増殖衰退期に入る時である。更に1時間半の後には 1/300 mgN でモルモット (250g) を 72 時間で斃すだけの毒素を体内に蓄積して来ている。この時期は体内に毒素が形成され最高に到達する時期である培地の Lf は 13 であつた。培養 35 時間目の菌は之に対して 1/20 mgN 注射で 7 日目にモルモットの斃死させた。(附着毒素が幾分毒性に関与している事は前述の如く 1 回の水洗しか行っていないので充分考えられる事である。今後細胞の化学的安定性と水洗との関係を一層明かにして完全な方法をつくりたいと考えている)

かくて菌量対毒素の関係は必ずしも比例するものではなく (同一培地で第 1 図では静置培養で 2 mg の所から毒素を培地につくつているのに対し振盪培養では 8 mg に到るまで培地に毒素をつくらず、以上の成績によればこの時期の菌体の中にも毒素が無いと考えられるからこの際菌はこの量に到達するまで毒素をつくらないと言つてよい。したがつて毒素の出来る出来ないは培地中の鉄イオンとは関係しない、発育の仕方如何によつて毒素を形成しないで発育する事が判つた。

考 按

鉄イオンが無くて普通ならば毒素をつくらねばならない環境に於いて、発育の仕方如何によつて毒素を排泄しないばかりでは無く菌体内にも作らないという事はこの実験をする前には全く予想しなかつた事である。したがつてその本態については何も判っていない。通常の菌体外毒素排泄菌の概念で考えれば若い菌程毒性をもつと考えるのが自然の様に見える。この矛盾がどの様に解決されるかは今後に残された問題である。然しながら更にひとつ検討すべき重要な問題がある。それは私は毒素が Log-curve の終り頃に培地中に排泄されると述べたけれども、こゝから始まる増殖衰退期カーブは、実は細菌の増殖カーブではなくて分裂しないまゝに菌形が大きくなる見かけの増殖にすぎない可能性が大である。と言うのは培養 12 時間目に取つた 対数増殖期の菌が 前報で述べた如く短小で細胞質のよく染まる菌であるのに 35 時間目の菌は異染小体を 2 乃至 3 個持つた可也に長い菌に変化しており、之が光電値によつて曲線が書かれているからに他ならない。之はこの時期に於ける酵素非活性化並びに色々の物質の排泄を考えて毒素の形成される条件に対して可也に重要な意義をもつて来るものと信ずる。

結 論

振盪培養によつて真の意味のジフテリア幼若菌を大量に得る事が出来たがこの菌は体内に強力な毒性をもっている。最高 7100 M.L.D./g に達した。然しながら極めて初期の幼若菌は毒素を体内で作らない事も併せ証明した。その理由としては鉄イオンの存在によるものでなく菌の増殖の仕方如何にかゝわる様に見えた。

稿を終るにのぞみ御指導御鞭撻をたまわつた谷教授に感謝します。

文 献

- 1) Zinsser, H.: Zinsser's Textbook of Bacteriology (Revised by Smith, D. T., Martin, D. S. and Etc.) (9th Ed.) 166. Appleton-Century Crofts Inc., New York. (1948).
- 2) 細谷省吾: 医学の進歩, 第 1 集, 89. 共立出版社 東京 (1942).
- 3) Raynaud, M.: Compt. Rend. Acad. Sci., 125 543 (1943).
- 4) 東山晃: 大阪医学会雑誌, 9, 307 (1950).
- 5) Nelson, C.: J. Infect. Dis., 41, 9 (1927).
- 6) Dubos, R. J. & Geiger, J. M.: J. Exper. Med., 84, 143 (1946).
- 7) Okell, E. C. & Blake, A. V.: J. Path. & Bact., 33, 57 (1930).
- 8) Weil, A. J.: J. Immunol., 55, 363 (1947).
- 9) Pappenheimer, A. M.: J. Biol. Chem., 167 251 (1947).
- 10) 西田尙紀: 日新医学, 39, 552 (1952).
- 11) 西田尙紀: 日新医学, 40, 277 (1953).
- 12) 西田尙紀: 酵素化学シンポジウム, 第 8 集, 72, (1953).
- 13) Gale, E.: Bact. Rev., 7, 139 (1943).
- 14) Coulter, C. & Stone, F.: J. Gen. Physiol., 14, 583 (1931).
- 15) Mitsuhashi, S. & Yagi, K.: Jap. J. Exper. Med., 22, 1 (1952).
- 16) 細谷省吾: 細菌学の新領域 (伝染病研究所編輯) 医学書院, 東京.
- 17) Brandwijk, A. C., Tasman, A. & Ramshorst, J. D.: J. Infect. Dis., 87, 99 (1951).
- 18) Pope, C. G.: Brit. J. Exper. Path., 32, 246 (1951).
- 19) 植田三郎: 結核菌の研究, 南江堂, 東京 (1951)
- 20) Hauduroy, P.: 結核菌の特異な染色性とその本質 (植田三郎訳) 医学書院, 東京 (1953).
- 21) Bassermann, F. J.: Problem der Morphologie, Cytochemie und Wachstumsform des Tuberkulose Erregers, George Thieme Verlag, Stuttgart. (1953)
- 22) 西田尙紀: 日本細菌学雑誌 9(10), 843-848, 1954.
- 23) Eisler, M.: Z. Immunitt. Forschg. 56, 209 (1928).

- 24) Linggood, F. V. & Fenton, E. L.: Brit. J. Exper. Path., 28, 354. (1947).
- 25) Woodward, C. R., Tallman, A. W. & Perrota, J.: Can. J. Pub. Health, 42, 62 (1951).
- 26) Mitsuhashi, S. Murakami, M. and Kojima, Y.: Jap. J. Exper. Med., 22, 151 (1952).
- 27) 八木国夫, 三橋進, 小島保彦: 医学と生物学, 26 203 (1953).
- 28) 山中太木: 第27回日本細菌学会総会記録 (1954)
- 29) 林喬義: 昭和医学会雑誌, 10, 207 (1950).
- 30) Pappenheimer, A. M. & Hendee, E. D.: J. Biol. Chem., 171, 701 (1947).
- 31) Pappenheimer, A. M. & Hendee, E. D.: J. Biol. Chem., 180, 597 (1947).
- 32) Eisler, M.: Schweitz. Z. All. Path., Bakt., 13, 708 (1950).
- 33) Prigge, R.: Z. Immunit. Forsch., 77, 421 (1932).
- 34) Morton, H. E. & Gonzalez, L. M.: J. Immunol., 45, 63 (1942).