大野赤痢菌々体内毒素の研究 (第5報)

大野赤痢菌々体内毒素による大野菌バクテリ

オフィーの増殖阻害作用に就いて

花 新 發 実

東京大学傳染病研究所第3研究部 (部長 武田徳晴教授)

〔受付 10 月 22 日 1953 年〕

バクテリオファージは宿主菌に吸着し、菌体内に侵入して増殖し、溶菌によつて遊離されてファージ数は増加する。この過程の連続によつてファージの増殖は行われるのであるが、この増殖の一代の過程を Delbrück 3.4) 等は One-step 増殖実験として定量的に分析した。この One-step 増殖実験を用いてファージの増殖を促進又は阻止する物質に就いて増殖に及ぼす興味ある幾多の業績がみられる。

大野菌々体内毒素及びそのアルカリ分解産物たる多糖体分割が大野菌を固有宿主とするファージの溶菌作用を強く阻止する事は前報²⁾に於いて述べた。私はこの菌体内毒素及びその分解産物たる各分割に就いてそれ等が大野菌ファージの One-step 増殖に及ぼす作用に就いて実験を行い、その増殖阻止作用につき検討してみたので茲に報告したい。

実 験

用いた菌株：当研究室保存の大野赤痢菌府中株で本研究の大野菌々体内毒素の抽出に用いた菌株であり使用に際し S 型である事を確めた。

用いた大野菌ファージ：豚の糞便を材料とし前記の大野菌府中株を固有宿主菌として分離増殖せるものである。

(1) 大野菌ファージの One-step 増殖実験

初め Delbrück 等が行つた如く次で Adams⁵⁾の法に準じて大野菌ファージの One-step 増殖実験を行い、先ず 10 分間吸着により大野菌ファージの潜伏期は 50~55 分であり 90 分で上昇期を終り定常期になるのを認めた。

次で 5 分, 10 分, 15 分, 20 分, 30 分, 40 分と種なる吸着時間に於いて実験を行い、吸着時間が 20 分以上に於いて Step-size が略々一定値 70 を示す事を認めた (第1図)。

第1図

種々なる吸着時間に於ける大野菌ファージの増殖実験

よつて 25 分の吸着時間を用いて以後の実験を行う事とした (第2図)。

第2図 25分吸着に於ける大野菌ファージの増殖実験

KASHIBA, Minoru: Studies on the endotoxin of Ohno dysentery bacillus. (V). The inhibitory action of the endotoxin and its degradation products on the formation of a bacteriophage. The Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact. 9(2)91-94, 1954.

(2) One-step 増殖に於ける各分劃の作用に就いて
Adams の法に準じて行い菌との吸着時間は以後 25 分
に一定した。

1) 吸着時に各分劃を作用させて行いたる増殖

大野菌フェージとその宿主菌たる大野菌を吸着させる
際に同時に各分劃を作用させてフェージの吸着及びその
増殖に如何なる変化を来すかを見る為に次の如き One-
step 増殖実験を行つた。

各実験に於いて吸着用試験管内に各分劃の 500 r/cc を
含有する如く調製してフェージを菌に 37°C 25 分間吸
着せしめた。対照として同じ条件の下に分劃を含有しな
い吸着用試験管を作り 5 分後に吸着を開始して実験を行
つた。

実験に用いた分劃は原毒素 Fr. No. 23 及びその醋酸
分解産物たる蛋白分劃 Fr. No. 46, ビクリン酸分解産
物たる蛋白分劃 Fr. No. 50, 多糖体分劃 Fr. No. 52,
原毒素 Fr. No. 43 及びそのアルカリ分解産物たる多糖
体分劃 Fr. No. 53 の 6 分劃である。

第一増殖用試験管内に於いては吸着試験管から 10⁻⁵
に希釈されるので分劃の含有量は甚だ微量となる。第二
増殖用試験管は之を更に 1/100 に希釈したものである。

実験成績 (第 3 図)

第 3 図 吸着時に各分劃を作用させて行いたる増殖

各実験は別個に行つたのであるが対照はすべて殆んど
同様にあらわれているので同一図表に一括してあらわし
対照は 1 つの増殖曲線で示した。

図にある如くこの実験に於いては何れの方劃を作用さ
せた場合も One-step 増殖曲線がみられるが、原毒素た
る Fr. No. 23, Fr. No. 43 及びそのアルカリ分解産物
たる Fr. No. 53 の作用をうけたフェージの増殖は対照
の夫に比して 50~60 % に阻害されている。之に対し酸
分解産物たる Fr. No. 50, Fr. No. 52, Fr. No. 46 の
各分劃の作用をうけたフェージの吸着後の増殖には対照

の夫に比して差異は認められない。

前 3 者の実験に於いて、潜伏期は対照の場合と同様に
50 分前後の経過の後上昇期に移るが上昇の曲線は対照に
比しやゝ緩慢な弧を画いて対照と同じく 90 分頃に定常
期に至るが定常期の遊離フェージの数は対照の夫に比し
及ばない。この事は吸着直後に測定した潜伏期の遊離の
フェージ即ち吸着されないフェージ数が対照の夫と殆ん
ど差のなかつた所より (共に毎回 20 % 前後を示す) み
て吸着用試験管にて作用させられたフェージは増殖を阻害
されたものと考えられる。

2) 吸着後に各分劃を作用させて行いたる増殖

大野菌フェージとその宿主菌たる大野菌を吸着させた
後各分劃を作用させてフェージの増殖が阻止されるか否
か又増殖したフェージに如何なる変化を来すかを見る為
に次の如き One-step 増殖実験を行つた。

大野菌フェージと大野菌を 37°C に於いて 25 分間吸
着させて行つた。実験に用いた第 1 及び第 2 増殖用試験
管には吸着用試験管よりの希釈液を加えた時に 1 cc 中
に 100 r の分劃が含有される様に予め調製したのを用
い、別に分劃を含まない対照としての第 1, 第 2 増殖用
試験管を置き同時に行つた。

実験に用いた分劃は前回と同じであるが、Fr. No. 46
に就いては物質少量の為今回は用いられなかつた。

先ず第 2 増殖用試験管のフェージ数が第 1 増殖用試験
管の夫の 1/100 として行つたのであるが、実験成績に於
いて述べる如く増殖曲線に変化のみられた Fr. No. 23,
Fr. No. 43, Fr. No. 53 は更に繰返し実験を行いこの時
は第 2 増殖用試験管のフェージ数が第 1 の夫の 1/10 とし
て希釈し、対照はすべて毎回 1/100 に一定した。

実験成績

各実験に於ける One step 増殖曲線をみるに変化のみ
られるものは原毒素 Fr. No. 23 (第 4 図), Fr. No. 43

第 4 図 吸着後に Fr. No. 23 を作用させて行いたる増殖, I. 第 1 回実験, II. 第 2 回実験

(第5図), 及びアルカリ分解産物たる多糖体分割 Fr. No. 53 (第6図) の作用をうけたファージの増殖曲線であり, ピクリン酸分解による蛋白分割 Fr. No. 50 及び多糖体分割 Fr. No. 52 には対照の夫と殆んど差を認めない。

第5図 吸着後に Fr. No. 43 を作用させて行いたる増殖 I. 第1回実験, II. 第2回実験

第6図 吸着後に Fr. No. 53 を作用させて行いたる増殖, I. 第1回実験, II. 第2回実験

Fr. No. 23, Fr. No. 43 及び Fr. No. 53 を含有する第1増殖用試験管よりの溶菌斑数即ち潜伏期のファージ数は対照の夫と比して80%前後となつている。この事は第1増殖用試験管にファージが加えられると直ちに20%前後が之等の分割によつて不活化せられたものである。潜伏期に於けるファージは後の定常期に於ける如く分割の作用をうけて次第に減少する事なく直線となつている。潜伏期の時間は対照と比べると5分位のずれがある例もあつたが各実験に於いては不同であり分割の作用をうけて潜伏期の延長又は短縮を来したとは思われない。

上昇期は Fr. No. 23, Fr. No. 43, Fr. No. 53 を作用させた各実験に於いて只1例のみ即ち第6図の Fr.

No. 53 を作用させた2回目実験を除き, 吸着後50~60分より始まり90分頃にて最高に達している事は対照と同様であるが, 然しこの上昇曲線は対照の夫に及ばない。かくして最高に達した曲線は対照に於いては遊離ファージが定常期に入り直線を示すのに之等の分割の作用をうけたファージは90分前後を極大として時間と共に不活化されて漸次曲線を画いて減少している。前記の第6図にあげた Fr. No. 53 を作用させた第2回目の実験に於いてはやゝ緩慢な曲線を画いて吸着後110分にして最高を示し漸次減少している。

総括並考察

前報²⁾に於いて大野菌々体内毒素及びそのアルカリ分解産物たる多糖体分割は100 r/ccで大野菌ファージに作用する事により作用直後に於いて前者はその約30%, 後者はその約20%の不活化が見られる事, そして該毒素の酸分解産物たる蛋白分割及び無毒性多糖体分割にはこの作用の認められなかつた事を報告した。

之を One-step 増殖実験に就いて菌とファージの吸着時及び吸着後に作用させてファージの増殖曲線をみたのであるが, 原毒素 Fr. No. 23, Fr. No. 43 及び前述のアルカリ分解産物たる多糖体分割 Fr. No. 53 に於いて変化がみられ, 酸分解産物たる Fr. No. 50, Fr. No. 52 Fr. No. 46 には対照と同じ増殖曲線を画いた。

即ち原毒素及び多糖体分割 Fr. No. 53 は吸着時に之等の分割を500 r/ccに於いて作用させると認め得る程のファージの菌体への吸着阻止はなかつた。Levine & Frisch⁶⁾はファージの菌浸出液に対する affinity は弱く恐らく菌体に対するファージの affinity より弱いだろうと述べている。大野菌々体内毒素 Fr. No. 53 は100 r/ccでは著明にファージの活性を阻止するのであるが之等の分割の500 r/ccの存在にも拘らず尚ファージの菌への吸着が行われてファージの増殖がみられる事は Levine & Frisch の言う如くファージの菌体内毒素に対する affinity は生菌に対する夫より弱いものと考えられる。然し乍ら定常期の溶菌斑数即ち増殖したファージの数は対照の夫と比すれば著明に減少(50~60%)している結果から之等の分割の作用をうけてファージの増殖は著しく阻害されているのである。

又第1及び第2増殖用試験管内に之等の分割を100 r/ccの割に入れて吸着後のファージに作用させた所潜伏期のファージにも作用してその数は減少しているがこの場合その阻止された数は約20%であり, 又この際測定した菌に吸着されないファージ数も約20%である点からこれらの分割が遊離のファージにのみ作用するか又は

感染したファージにも作用するかに就いてこの実験の場合では明らかにすることはできない。次に溶菌により逐次放出された遊離のファージは 100 r/cc のこれらの分割の作用をうけてその増殖曲線は対照の潜伏期と同じ潜伏期の後上昇し始め対照の定常期の開始時を極大とする下向きの弧状曲線を描いた。

此等吸着時及び吸着後に作用させた増殖実験の結果よりみて遊離のファージは菌体内毒素及びアルカリ分解による多糖体分割によつて著しく不活化されるのであるがこれに比し一旦宿主菌に吸着したファージは之等の分割の作用によつてその吸着を全く阻止されないか又は阻止されたとしても僅かである事は推測される所である。

私の実験に於いて蛋白分割である Fr.No. 50, Fr.No. 46 は共にファージの増殖に作用を示さなかつたが、最近 Price⁷⁾ は葡萄状球菌ファージに就いてその増殖を促進するリボ核蛋白分割を菌体及びイーストから抽出している事は興味のある所である。

結 論

1. 大野赤痢菌々体内毒素及び酸及びアルカリ分解産物たる各分割を作用させて大野菌ファージの One-step 増殖実験を行った。

2. 大野菌々体内毒素及びそのアルカリ分解産物たる多糖体分割にファージの増殖阻害作用のあるのを認めた。

3. 菌体内毒素の酸分解産物たる蛋白分割及び多糖体分割には増殖阻害作用は認められない。

文 献

- 1) 花新発：日本細菌学雑誌，第 1 報及び第 2 報 8 (7), 727, 8(8), 807, 1953.
- 2) 花新発：日本細菌学雑誌，第 3 報及び第 4 報 8 (9), 905, 1953, 9(1), 13, 1954.
- 3) Ellis, E. L. & Delbrück, M.: J. Gen. Physiol., 22, 365, 1939.
- 4) Delbrück, M.: J. Gen. Physiol., 23, 631, 643, 1940.
- 5) Adams, M.H.: Methods in Medical Research, Vol. 2, edited by J. G.H. Combroe
- 6) Levine, P. & Frisch, A.W.: J. Exp. Med., 59, 213, 1934.
- 7) Paice, W.H.: Proc. Nat. Acad. Sci., 34, 317, 1948.
- 8) Anderson, T.F.: Research in Medical Science, edited by D.M. Green & W. E. Knox, 1950.
- 9) 新井：日本細菌学雑誌，5, 87, 昭 25