



Title	ジフテリヤ菌における発育と毒素産生との関連性, 並びにその解析にもとづく新しい毒素産生系の開発について
Author(s)	平井, 俊博
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29147">https://hdl.handle.net/11094/29147</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	平 井 俊 博
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 958 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 4 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系
	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ジフテリヤ菌における発育と毒素産生との関連性, 並びに その解析にもとづく新しい毒素産生系の開発について
論文審査委員	(主査) 教授 米田 正彦 (副査) 教授 堀 三津夫 教授 天野 恒久

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔 目 的 〕

ジフテリヤ(以下「ジ」と略す)菌は, 至適条件下でその培養液中に多量の毒素蛋白質を産生する。最近米田, Pappenheimer らは, この形成が *de novo* に行なわれることを立証し, 菌体外蛋白質であるジ毒素生合成の機構研究を進めるうえに有力な足場を与えた。しかし, その反面, 毒素の菌体外遊出の生理は, 膜透過性につながる重要な問題として注目されているにもかかわらず, 未だ殆んど未解明の段階にあるといつても過言ではない。本研究の目的は, 新しい培養法を考案するとともに, 充分にコントロールされた培養条件下で, 毒素の菌体外蓄積について詳細な速度論的研究を行ない培養発育との定量的な比較解析をすることによって, ジ菌発育と毒素産生との関係を明確にし, ジ毒素産生機構を解明するうえのはっきりとした手がかりりを得ることにある。

## 〔 方 法 〕

- 1) 使用菌: *Corynebacterium diphtheriae* P.W. No 8, Biken 株を使用した。
- 2) 培養法: Ca-gel 法により除鉄した Pope 培地及びカザミノ酸培地を使用し, 34°C にて, 振盪培養した。なお, 発育抑制培養では, コハク酸を 0.3% に含むカザミノ酸培地又は 20 種アミノ酸混合培地を使用し, 上記と同様な方法で培養した。
- 3) 菌量: O.D. 590 m $\mu$ , 乾量の測定によった。なお, それらの蛋白量, DNA, RNA 含量はそれぞれ Lowry, Burton, Dische らの方法により測定した。
- 4) 菌数測定: 全菌数は, Petroff-Hauser の細菌計算板を使用し, 位相差顕微鏡下で算定した。生菌数測定には, チヨコレート寒天培地を使用した。
- 5) ジ毒素の定量及び検定: Lf 及び毒性試験は, それぞれ Ramon の flocculation 法, 家兎皮内反応により, 又 Ouchterlony の寒天ゲル内沈降法により, 産生毒素の免疫化学的性状を結晶ジ毒素と

比較検討した。

6)  $^{14}\text{C}$  ロイシンの蛋白への取り込み：毒素蛋白への取り込みは、結晶毒素から作られたトキソイドに対する家兎抗血清による特異反応沈降物について、一方菌体蛋白への取り込みは、Siekevitz の方法によって処理された菌体について、それぞれガスフローカウンター (Chicago) により測定した。

#### 〔結果〕

1) ジ毒素産生と、ジ菌の発育並びに Viability との関係を明らかにするために、培養法を考按して、declining 及び exponential growth rate の発育相にある培養それぞれについて、その O.D. 590, 菌体乾量、蛋白及び核酸量、全菌数及び生菌数を経時的に追跡した。その結果、O.D. 590 に対するその他の測定値の ratio は、それぞれ培養期間中ほぼ一定の値を示し、また生菌数と全菌数は殆んど一致することが明らかとなった。

2) 以上から明らかなごとく、ジ毒素産生が、いわゆる lethal production でないとすれば、ジ毒素産生と菌発育との速度論的関係について、少なくとも次のような二つの可能性が考えられる。

⑧ 毒素産生速度は、菌発育速度に比例する。 $\left( \frac{dT(t)}{dt} = Ka \frac{dB(t)}{dt} \right)$

⑨ 毒素産生速度は、菌発育速度に直接関係なく、菌量にのみ比例する。 $\left( \frac{dT(t)}{dt} = Kb, B(t) \right)$

(但し  $t$ : 時間,  $T(t)$ : 毒素蓄積曲線,  $B(t)$ : 菌発育曲線,  $Ka, Kb$ : 常数)。

そこでこの可能性の何れが正しいかを実証するため、declining growth rate の発育相にある菌について、その発育と産生毒素量とを定量的に比較解析した。この発育相では、 $B(t)$  は  $t$  に関する一次式で表わされる。従って、(a) 及び (b) の可能性からする毒素蓄積の理論曲線は、それぞれ一次式及び二次式として成立する。一方実測された毒素蓄積曲線は、二次式に極めてよく適合することが証明された。このことは、毒素が発育とは直接関係なく、菌量当たり一定の速度で産生されることを示唆している。

3) 上記の予測は、発育が極度に抑制された培養による毒素産生に成功することにより直接実証された。この培養系では、O.D. 590, 菌乾量、核酸量、全菌数及び生菌数により実測された菌量は、培養期間中殆んど変化せず、又  $^{14}\text{C}$  ロイシンの取り込みから算定すると、菌体蛋白合成は、発育系のそれに対し僅か 15% 以下に抑制されていることが明らかとなった。これに対し毒素は、可能性 (b) から推論されるごとく、直線的に増加し、その産生速度は、菌量に全く比例し、しかも発育系と同様の速度で *de novo* に形成されることが示された。

#### 〔総括〕

詳細な速度論的比較解析を行なうことにより、ジフテリヤ毒素産生が、菌発育とは関係なく行なわれうることを示す二三の知見を得た。また以上の知見に基づき実験を試みた結果、発育を伴わない培養での毒素産生系の開発に成功した。今後この方法はジ毒素蛋白合成、及びその菌体外遊出機構の研究を進める上に、有力な方法になるものと思われる。

## 論文の審査結果の要旨

ジフテリヤ（「以下「ジ」と略す）菌が至適条件下でその発育途上、毒素蛋白質を *de novo* に形成し、培養液中にそれを産生することはよく知られた事実である。しかし現在、その生理の全貌はおろか、ジ菌発育と毒素産生との関係といった最も基本的な問題すらなお殆んど未解明の段階にある。云うまでもなく、このような菌発育との関連性についてはっきりとした理解像をもつことは、ジ毒素産生の生理機構を明らかにするうえに、またひいてはその本質的な生理的意義を把握するためにまず必要なことなのである。

著者は、このような現状に鑑み、また上述の観点から、この問題をとりあげその解明を試みている。本研究で著者は、まずジ菌培養法について考案を重ね、コントロールされた発育条件下で、毒素の菌体外蓄積（狭義の毒素産生）について詳細な速度論的解析を行ない、ジ菌発育と毒素産生との量的関係を仮設にもとづく推計学的処理法によって比較解析した結果、ジ毒素産生が菌発育の有無にかかわらず起りうると云う全く新しい考え方を提出した。さらに著者はその推論にもとづき研究を重ねた結果、発育が極度に抑制されたジ菌培養による毒素産生系の開発に成功し、著者の推論の正しさを立証するとともに、この新しい系を用いて以下の諸事実を明らかにしている。

1. ジ毒素産生は、菌の死を伴わず、生菌によって行なわれ、かつ菌発育並びに分裂の有無にかかわらず起る。

2. 培養液中における毒素の増加速度は、その瞬間の全菌量にのみ規制される。

3. 至適条件下では単位乾菌量によって単位時間に産生される毒素量 ( $Kb: Lf/mg\ d.w.\cdot hour$ ) は菌濃度、培地組成、菌発育の有無のいかんを問わず一定である。

4. この発育抑制系においても、毒素はアミノ酸から *de novo* に合成される。

以上の著者の成果は、従来不明であったジ菌における発育と毒素産生との関係を初めて明確にしたのみならず、発育が極度に抑制されたジ菌による新しい毒素産生系を開発したことによって、ジ毒素産生機構の解明に有力な足場を与えるものであり、この分野の研究に寄与する所大なるものと考える。