The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腸炎ビブリオのcell envelopeと塩濃度の低下による溶菌現象との関係
Author(s)	田村, 俊秀
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29705
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【21】

氏名・(本籍)	田村俊秀（たむらとしひで）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1640 号
学位授与の日付	昭和44年3月28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	**腸炎ビブリオの cell envelope と塩濃度の低下による溶菌現象との関係**
論文審査委員	(主査) 教授 藤野恒三郎 (副査) 教授 天野 恒久 教授 米田 正彦

論文内容の要旨

〔目　　的〕

1950年，藤野らによって発見され，その後食中毒性腸炎の重要な原因菌であることが明らかにされた *Vibrio parahaemolyticus* (VP) は，海水由来のグラム陰性桿菌で，淡水にさらすと著るしい濁度の低下（溶菌）を起すことを特徴としている。この研究は，病原細菌では例のないこの著るしい溶菌現象が VP の cell envelope (CE) のどのような特殊性によるのかを明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

Vibrio parahaemolyticus A55株（血清型 O：5，K：15，神奈川現象陽性）を 0.5M NaCl, 0.01M $MgCl_2$ 加燐酸緩衝液，pH 7 (PB) に浮遊させて保存したものを出発材料とした。

I）溶菌現象の観察：上述の保存菌液を種々の溶液で約20倍に稀釈し，溶菌の程度を OD_{550} の減少を指標として観察した。0.02M PB で稀釈した際，OD の最大減少は80～90%におよび，上清中に多量の UV 吸収物質が放出された。溶菌は 1）その速度も程度も殆んど温度に依存せず極めて速やかに進行した。2）アルカリ側で促進され，pH 5 以下で阻止された。3）Na^+ の 0.5M, Mg^{++}, Ca^{++}, Zn^{++} などのカチオンでは各々 0.01M, spermine の 0.01M により阻止された。以上の所見は他のグラム陰性海水細菌や中等度好塩菌についての報告と同様であった。しかし 4）高張 sucrose の影響については異なり，溶菌は 0.5M sucrose によって阻止されなかった。また 5）静止期の菌は対数期の菌に較べて溶菌しにくかった。

II）溶菌に伴う形態の変化：0.02M PB 中での溶菌の前後で，電子および光学顕微鏡による観察を行ない，1）溶菌後にも桿菌の輪廓を保持したまま染色性の低下したいわゆる rod ghost が，溶菌前の intact cell (IC) と同数認められた。2）rod ghost をトリプシン処理すると桿状形態は失われ

て球状になることが認められた。以上のことから，溶菌は中等度および高度好塩菌にみられるような菌体の破裂による細片化ではなく，カチオンが必要濃度以下になったことにより“変性”したCE を通じて細胞質が漏出することによると考えられる。

Ⅲ）分離した cell envelope について：0.5M NaCl, 0.01M $MgCl_2$ の存在下に低温で IC を Braun の装置で破壊し，分別遠沈して得た CE は，1）IC の場合と同様，必要濃度のカチオンが存在しない条件では，その重量の25%におよぶ CE 構成成分を溶出した。2）溶出物中には表層抗原であるOおよびK抗原の存在が，ゲル内沈降法により認められた。Diaminopimeric acid(DAP) も検出されたが，その量は CE に含まれる DAP の約5%にすぎなかった。すなわち lipopolysaccharide 層および peptidoglycan (PG) 層の溶出がみられたが，後者のそれは極めて部分的であった。

Ⅳ）PG 画分の分離：一般に好塩菌では PG 層が欠けるか，僅少であるとされている。しかし VP の IC もしくは CE を1%，SDS, 6M 尿素，pancreatin, pepsin 等で順次処理したところ，1）多少の細片化を示すが多くはなお菌体に近い大きさの極めて薄い膜様構造物が得られ，2）この画分（乾燥重量比で収量は IC の約0.14%）は，大腸菌など DAP 型の細胞壁の PG に類似する組成を示した。但しこれとは別に glucose と poly-β-hydroxybutyrate (PHBA) の存在が認められた。3）この画分は，細胞壁溶解酵素の lysozyme, L-3, L-11 によって溶解し，lysozyme 処理では還元基を，L-11 酵素では NH_2 末端 alanine を遊離し，その消化産物を sephadex G 50 でゲル沪過したところ glycan と peptide との分離がみられた。

Ⅴ）polyglucose と PHBA：1）L-11 酵素消化した PG 画分のゲル沪過に際して，glucose は完全に exclude されることから polymer を形成していると考えられた。α- および β-amylase 処理によって遊離する還元基は総還元基の約1%にすぎず，この際明確な低分子化はみられなかった。なお，ゲル沪過の成績からは，PG と glucose polymer が結合しているという証拠は得られなかった。2）IC を SDS-尿素処理した際，電顕所見で膜状の PG に付着してみられる電子密度の高い直径 200mμ 前後の顆粒は，熱クロロフォルムによって抽出され，エタノール/エーテル (3:1v/v) を加えて沈澱精製したものについて，ペーパークロマトグラフイー，元素分析，赤外吸収スペクトル等の成績から膜構造とは別個の poly-β-hydroxybutyrate と同定された。

〔考察と総括〕

1）カチオンを除いて溶菌した ***V. parahaemolyticus*** は，若干の cell envelope 成分を溶出しているが，細胞の自然の輪廓や cell envelope の桿状膜様構造は少くとも顕微鏡的に見て損われていない。しかし cell envelope が細胞質を内部に保持する為にはカチオンが必要であり，カチオンを除くと変性した cell envelope を通じて細胞質が漏出し，溶菌現象となって観察されるものと考える。この現象に浸透圧差による“burst”や，自己融解酵素は関与していないようである。

2）ある種の好塩菌では peptidoglycan 層の intactness の維持にはカチオンが必要とされているが，VP の peptidoglycan 層の構造維持には特にカチオンは関係しないようであり，大腸菌などの DAP 型の peptidoglycan と組成，含量および細胞壁溶解酵素に対する感受性などの点で本質的な差は認められない。3）一般に細菌の形態を決定するのは peptidoglycan 層とされているが，***V. parahaemolyticus*** の場合，cell envelope 構成成分中のトリプシン感受性物質と peptidoglycan の協

同により桿状形態が維持されるもののようである。4）peptidoglycan 層の分離の過程で poly-β-hydroxybutyrate および glucose polymer がこの菌に存在することが示された。いずれも genus Vibrio 中では本菌において始めて確認されたものである。前者は明らかに細胞質顆粒であるが，glucose polymer についてはその細胞における存在様式や，いわゆる bacterial glycogen との異同について今後の吟味を要する。

論文の審査結果の要旨

この研究において田村は，***Vibrio parahaemolyticus*** の cell envelope が，好塩菌としての特性と大腸菌などグラム陰性菌のそれに共通する性状とを合わせもっていることを明らかに，またビブリオ属ではいまだ報告されていない poly-β-hydroxybutyrate 顆粒と glucose polymer の存在を確認した。このような重要な知見を明らかにした本研究者は，医学博士の学位を受けるに充分な資格があるものと認める。