



Title	黄色ブドウ球菌の自己融解のリポタイコ酸による調節とペニシリンによる殺菌 1. 自己融解の調節因子としてのリポタイコ酸の役割 2. ペニシリンによる溶菌のリポタイコ酸による阻止
Author(s)	嶋谷, 雅博
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32192
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

黄色ブドウ球菌の自己融解のリポタイコ酸
による調節とペニシリンによる殺菌

1. 自己融解の調節因子としてのリポタイ
コ酸の役割

嶋 谷 雅 博

(昭和54年1月 日受付)

緒 言

細菌細胞壁の骨格をなすペプチドグリカン
は、細菌細胞をとりかこみ、そのユニークな
化学組成ないし分子構造に基づく物理的な強剛
性や化学的安定性によって、それぞれの細菌
細胞に個有の形態を与え、また「脆弱な」細
胞質膜に包まれた細胞の内部構造を外部環境
から保護することなどをその主な機能として

いる。したがって、細菌細胞の生長、分裂および分離は、このペプチドグリカン層の適正にコントロールされた合成と分解を必要とし、このプロセス、特に分解に関与するペプチドグリカン加水分解酵素（以下慣用にしたがって autolysin, 自己融解酵素と呼ぶ）は、細菌細胞のさまざまな生理機能に重要なかわりを持っている。Autolysinのこのようなかわり合い、すなわち生理的役割の主なものの一つに、袋状¹⁾のヘテロポリマーであるペプチドグリカンを一時的に切断し、その部位への、新しく合成されたペプチドグリカンの構築単位の組み込みを可能とする作用がある²⁾。この他に autolysinの働きとして、形質転換に際してデオキシリボ核酸を受容する能力（competence）をコントロールする作用³⁾、*Streptococcus pneumoniae*⁴⁾や *Bacillus subtilis*⁵⁾で示されているように、細胞壁合成阻害剤が示す溶菌を伴う殺菌作用への関与などがあげられる。

さてこのように細菌細胞の生理に重要な役

割を果たす autolysin の作用は、当然のことながら十分にはコントロールされていなければならないが、最近ある種の bacillus や streptococci の autolysin の作用が、それぞれの菌体より抽出したりポタイコ酸 (lipoteichoic acid , 以下 LTA と略す) によって抑制されることが報告され⁶⁻⁸⁾、LTA の生理機能⁹⁻¹²⁾が注目されるようになった。ちなみに LTA は、比較的最近になって研究が開始されたこともあり、多くのグラム陽性菌の細胞質膜に起始することが知られているが、グラム陰性菌では、これまでのところ、一例の報告¹³⁾があるのみである。図 1 に、M. Duckworth ら¹⁴⁾によって提示された *Staphylococcus aureus* H 株の LTA の化学構造を示した。すなわちグリコリピドとポリグリセロリン酸とが結合した高分子物質であり、*S. aureus* の場合には、グリセロール残基の C-2 位の OH 基に D-アラニンが結合している。また LTA の細胞表層における存在様式については、Driel ら¹⁵⁾によると、グリコリピド部分が細

胞質膜の構成成分の一部となり、ポリグリセロリン酸部分は細胞壁の網状構造の中に入り組んで伸長し、一部は、菌体表面にまで露出しているという。

著者は、従来この方面での研究が少ない *S. aureus* を供試し、以上のように様々な面から興味ある研究課題であるこの菌の autolysin ならびに autolysin のモジューレーターと考えられる LTA について、種々の角度から検討を加えた。ちなみにこれらの研究のうち、ペニシリンによる溶菌に果たす autolysin と LTA の役割については、次の報告¹⁶⁾で論ずることとする。

材料ならびに方法

1. 使用菌株

S. aureus FDA 209P 株 (本学口腔細菌学教室保存株) を主として用いた。その他 autolysin の基質としては、*S. aureus* Copenhagen 株, *Micrococcus lysodeikticus*

NCTC 2665 株の凍結乾燥菌、ならびにそれぞれの菌体から得た純化細胞壁を供試した。

また autolysin の活性と形態との関係を調べるために、*S. aureus* Copenhagen 株のストレプトマイシン耐性株である SAK 101 株、およびこの菌株を *N*-メチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグマニジン処理して得られ、細胞分裂後の娘細胞の分離が阻害される結果、細胞がパケットを形成する変異株 (SAK 132 株)¹⁷⁾ を用いた。これら両菌株は、松橋通生博士 (東大、応用微生物研究所) より恵与された。

2. 菌体および培養上清の調製

FDA 209P 株を、トリプチナス・ソイ・ブローース (BBL, USA) 中で、37°C で振盪培養 (振幅 8 cm、往復振盪数 100 回/分) し、対数増殖後期に培養液を遠心 (5000 g、15 分) 集菌し、菌体と培養上清とに分離した。全菌体は、自己融解を調べる場合には精製水にしり、その他の場合には生理食塩水にしり、遠心洗浄した。

3. 菌体5りのLTAの抽出

遠心洗浄した上記湿菌体に、20倍容のクロロホルム・メタノール(2:1, v/v)混合液を加え、室温で8時間攪拌処理後、遠心($5000g$, 5分)して沈渣(脱脂菌体)を得た。上清(抽出リポド)は減圧濃縮後、構成脂肪酸の分析に供した。沈渣には出発材料湿重量の5倍容の精製水を加え、さらにこの菌液と等量の90%フェノール水を加えて、1時間、室温で攪拌処理した。この菌液を遠心($5000g$, 15分)して、水層を分け取り、残りの層(フェノール層と菌層)には分け取ったのと等量の精製水を加えて、1時間、室温で攪拌処理して再度LTAの抽出を行った。このようにして得たLTAを含む水層は、1/2量のクロロホルムを加えて振盪することにより、混在するフェノールを抽出して除き、この抽出操作を4~5回くり返した後、ロータリーエバポレーター(浴温 $30^{\circ}C \sim 40^{\circ}C$)を用いて約20倍濃縮した。濃縮物は、後述する5うに、セファロース6

Bカラムによるゲル濾過により分画した。

4. 標識した菌体内LTAの調製

FDA 209P株を2項で述べたような条件で培養する際に、培地200 mlに、 $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -グリセロール (ロット番号 908-22, NEN社, 英国; 8.75 mCi/mmol) の40 μl を増殖開始1時間後に添加して振盪培養し、対数増殖後期に集菌した。この菌体より、上記の方法でLTAを抽出した。

5. (菌体外) 遊離LTAの抽出法

トリブチケース・ソイ・ブロー (あるいはその透析外液) に FDA 209P 株を2項記載の条件で培養し、対数増殖後期の培養上清を精製水に対して透析し、その内液をロータリーエバポレーターで約1/5容に濃縮後、等量の90%フェノール水を加えて1時間、室温で攪拌した。水層を分離後、フェノール層に精製水を加えて再抽出した。分離した水層部分にクロホルム・メタノール (1:1, v/v) 混合液の等量を加えて8時間、室温でリポド画分を

抽出除去した後、セファロース6Bカラムにより分画した(後述)。

6. 菌体からのLTAの遊離量の測定

菌体から培地中へのLTAの遊離量を調べるために、対数増殖初期に10mlの培養液当り、前記 $[^{14}\text{C}]$ -グリセロールの20 μl を添加して培養し(培養1)、対数増殖後期に集菌、洗浄して得た、 $[^{14}\text{C}]$ -グリセロールで標識されたLTAをもつ菌体を、通常の培養液にOD₅₅₀(波長550nmにおける濁度, optical density)が0.25になるように接種した培養(培養2)。

培養1および2における増殖の各段階で、菌体および培養上清の両方から、既述した方法でLTAを抽出し、それぞれの放射能を液体シンチレーションスペクトロメータ(LSC 653型, Aloka)で測定した。

7. Autolysin の調製

対数増殖期の湿菌体を、10倍容の2% Triton X-100 (和光純薬、大阪)に懸濁し、氷水中で冷却しつつ、3.5時間攪拌後、10,000g,

10分間遠心して分離した上清を精製水に対して透析した。透析内液に、75%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて8時間塩析し、ついで10.000g, 20分間遠心して沈殿を集めた。この沈殿を0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解後、同緩衝液に対して透析したものを、菌体由来の autolysin 標品とした。一方、対数増殖期の培養上清を75%飽和の硫酸アンモニウムにより塩析し、以下菌体の場合と同様に透析したものを、培養上清由来の autolysin 標品とした。

8. 自己融解の測定

対数増殖期の洗浄菌体を精製水に浮遊(4倍希釈した液のOD₅₅₀が0.5になるように菌濃度を加減した)させたものの0.5mlに、0.12Mリン酸緩衝液の0.5mlと被験物質(LTAなど)とを加え、精製水を補って全体を2mlとした。この反応系を、試験管(10mmφ×120mm)に入れて、37°Cで反応させ、光電比色計(Shimadzu-Bausch & Lomb, 20型, 島津製作所,

京都) を用いて OD_{550} を経時的に測定し、自己融解の速度と程度を調べた。

9. LTA の菌体への結合

FDA 209P 株の対数増殖期の凍結乾燥菌体を、
0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、種々の濃度の [^{14}C] グリセロールで標識した LTA と反応させた。37°C で 10 分間反応後、反応液を遠心して得た全菌沈渣を 0.03 M リン酸緩衝液で十分洗浄し、未結合の遊離放射能を除いた。全菌体に結合している LTA 量を、その放射能を液体シンチレーションスペクトロメータを用いて測ることにより、測定した。

10. Autolysin 活性の測定

S. aureus FDA 209P 株、あるいは *M. lysodeikticus* NCTC 2665 株の加熱処理菌体および分離細胞壁標品を基質として用い、これに autolysin 標品を自己融解測定の場合と同じ条件 (8 項参照) で作用させ、 OD_{550} の減少を指標として、autolysin 活性を測定した。すなわち反応系は総量 2 ml とし、基質の終末濃度は、全菌体の場合では

0.25 mg/ml、細胞壁の場合では 1 mg/ml、autolysin 標品の蛋白量（終末濃度）は、培養上清由来の標品では 300 μ g/ml、菌体由来の標品では 50 μ g/ml とした。

11. Autolysin の細胞壁に対する作用点の解析

0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、終末濃度が 5 mg/ml の *M. lysodeikticus* 細胞壁に培養上清由来あるいは菌体由来の autolysin 標品（終末蛋白濃度をそれぞれ 600, 100 μ g/ml とした）を 37°C で反応させ、時間を追って反応液の 0.5 ml ずつをくみだした。これらの反応液は直ちに 100°C で 10 分間加熱して反応をとめた後、末端アミノ基および還元基量を測定した。

12. 化学分析法

還元末端アミノ糖の定性と定量：Tipper と

Strominger の記載¹⁸⁾を参考にして、autolysin によ

る細胞壁の溶解産物を水素化ホウ素ナトリウ

ム (NaBH_4) により、室温、暗所で 6 時間還

元後、この処理試料を、対照の未処理試料と

ともに、6 N HCl 中で 100°C、14 時間加水分

解し、これら兩者について、アミノ酸自動分析計 (KLA-3B型, 日立製作所, 東京) を用いてアミノ糖およびアミノ糖アルコールを同定、定量した。

タイコ酸の加水分解と薄層クロマトグラフィー (TLC) : LTA画分を 2N HCl 中で 100°C 、3 時間加水分解し、この分解物、ならびに標準としてグリセロール、 α -グリセロリン酸およびグルコース (おのおの $100\mu\text{g}$) を薄層プレート (10mm \times 10mm, HPTLC Fertigplatten, Kieselgel 60; E. Merck, Darmstadt, West Germany) にスポットし、 n -プロパノール-アンモニア-水 (6:3:1, v/v/v) を溶媒として上昇法で約 2 時間展開した。展開物の同定および定性のための発色は、Cifonelli と Smith の方法¹⁹⁾によった。

LTA 濃度の測定 : LTA のグリセロリン酸部分の平均鎖長を 28 として¹⁴⁾、測定したグリセロール量より換算して、試料中の LTA 濃度を算出した。

ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分

析：3項で述べたリピドおよびLTAを10% KOH-CH₃OH中で、100°C、1時間アルカリ加水分解し、遊離した脂肪酸をヘキサンにて抽出した。抽出した脂肪酸は、ベンゼン-メタノール-硫酸(10:20:1, v/v/v)を加えて60分間、還流加熱してメタノリシスを行ってメチルエステル化し、生成したメチルエステルを日立、063型ガスクロマトグラフ装置を用いて分析した。カラムには15% EGS on Chromosorb W, 80/100 mesh を充填したFIDステンレススチールカラム(2m×3mm)を用い、カラム温度は200°C、N₂をキャリアーガスとした。定量は内部標準法によりcis-バクセン酸メチルエステルを標準物質として実施した。

← 行間 ツメル →

その他、総リンおよび無機リンはLowryらの方法²⁰⁾により測定し、総リンから無機リンを減じた値を有機リン量とした。グリセロールはHanahanとOileyのパーアイオデート・クロマ

トロピック アシッド法²¹⁾、ヘキソースはアンスロン法 (Aschwell)²²⁾、蛋白質は Lowry らの方法²³⁾、遊離アミノ基は Ghysen らの方法²⁴⁾、還元基量は Park と Johnson の方法²⁵⁾ により定量した。

13. 走査型電子顕微鏡による観察法

供試料にグルタールアルデヒド (和光純薬、大阪) を終末濃度が 2.5% となるように加え、室温で 4 時間固定後、精製水で 3 回遠心洗浄した。型の如く、洗浄沈渣を 50% から 100% に至るエタノールで順次処理して脱水後、純エタノールに浮遊させた試料の一滴をガラス板 (5×5 mm) にのせ、ただちにデシケータ内で真空乾燥させた。

この乾燥試料に、C-Au を約 100 Å の厚さに蒸着し、MINI-SEM 型 MSM-4S 電子顕微鏡 (明石製作所、東京) で、常法に従って観察した。

結果

1. LTAの精製と得られた標品の化学特性

図2(左)は、FDA 209P 株全菌体をフェノール抽出して得た粗LTA画分をセファロース6Bカラム (1.7 x 22 cm) にかけ、0.02M 酢酸アンモニウムにより溶出し (流速: 30 ml / 時間)、分取したフラクション (1.4 ml) についてグリセロール量を測定した結果を示す。2つのピーク ($k_d = 0.18$ と 0.72) 画分の分離が認められた。void volume 近くに溶出されるピークI (第16 - 23管) について、その加水分解物をTLCで展開し、Cifonelli と Smith の方法¹⁹⁾で検出される構成成分を調べたところ、グリセロール、グリセロリン酸とグルコースが検出された (図3)。一方、ピークI画分として得たLTAの化学組成を調べたところ、グリセロール、リン、脂肪酸およびヘキソースのモル比は、1.0 : 1.10 : 0.071 : 0.105 であり、Duckworth ら¹⁴⁾によって既に報告されている

S. aureus H の LTA の化学構造 (図 1 参照) から計算される値とよい一致を示した。なお、ピーク I 画分には、通常の方法で検出しうる量の蛋白質は全く含まれず、また核酸 (OD₂₆₀ を指標として) の混入も無視できる程度であった。ちなみに以下の記述で LTA とするのは、特にことわらないかぎり、このピーク I 画分として得た精製 LTA を指す。

次にこの LTA の脂肪酸組成を、全菌体よりクロホルム・メタノール (2:1, v/v) 混合液で抽出したリポドのそれと比較したところ、図 4 表 1 および表 1 に示すように、脂肪酸の組成およびその成分比において、これら両者の間に強い類似が認められることがわかった。すなわち、LTA の構成脂肪酸としては、分岐 C₁₅ が全脂肪酸の半分を占め、ついで分岐 C₁₇、直鎖 C₁₈ の脂肪酸が多いことがわかった。

2. 自己融解に及ぼす LTA の影響

(1). LTA による自己融解の阻害

図 5 (左) は、FDA 209P 株全菌の自己融解に及

ばすLTAの影響を示したのである。対数増殖期の洗浄菌体^{図5}を0.03Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に浮遊させると濁度の減少を伴う溶菌がみられるが、この系に、菌体から抽出したLTAを加えると、加えたLTA濃度に比例する濁度減少の抑制が認められ、20 nmol/mlで完全に溶菌は阻止された。またこの濃度のLTAは、溶菌過程のどの時点で自己融解系に添加した場合にも、直ちに溶菌を阻止した(図5(右))。しかし、0.1% Triton X-100の存在下では、LTAの上述の溶菌阻止作用は全くみられなかった(図5(左))。

(2). 阻害様式

LTAによる自己融解の阻止がどのような機序でおこるのかを探るために、まずLTAが反応液中に存在し続けることが必要かどうかを検討した。^{図6}

溶菌を完全に阻止する濃度のLTAと洗浄菌体とを、0.03Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中で反応(37°C, 10分間)させ、菌体を集めて同

上緩衝液で洗浄後、この洗浄菌体をLTAを含まない新しい緩衝液に浮遊させた。この浮遊液についても濁度の減少はみられず、自己融解はほぼ完全に阻止されたまでであった(図6)。

そこで、全菌(凍結乾燥菌)への $[^{14}\text{C}]$ -グリセロールで標識したLTAの結合を調べたところ、LTA濃度の増加とともにその結合量も増加し、LTA濃度 20 nmol/ml において結合量は飽和に達するの(図7)が認められた。ちなみにこの濃度は、全菌体の自己融解を阻止するのに必要なLTAの最低濃度とよく一致していた。

一方 Triton X-100 存在下では、LTAが菌体にはほとんど結合しなかった(図7)。この事実は、Triton 存在下ではLTAにより自己融解が阻止されなかった事実とよく一致する。

以上のことから、LTAによる自己融解の阻止は、LTAが菌体表層に結合することを前提とすることが推測される。そこで次に、

LTAの菌体における結合部位について検討を加えた。FDA 209P株全菌へのLTAの結合が飽和に達する 20 n mol/ml の $[^{14}\text{C}]$ -LTAを、表2に示すような種々の処理をほどこした全菌体に作用させ、それぞれに結合したLTA量を、未処理全菌に対するそれと比較した。全菌のLTA結合能は、トリプシン処理では変化せず、熱処理により半減した。この所見は、少くとも細胞表層に存在する蛋白質成分がLTAの結合に大きな役割を演じていることを推測させる。また Triton 処理全菌のLTA結合量は未処理全菌のそれとそれほど変わらなかった。この事実より、前述の Triton 存在下で、LTAがほとんど全菌体に結合せず、また全菌の自己融解がLTAによって全く阻害をうけないのは Triton によって細胞表層に存在するLTAの結合部位が遊離するためではないと推測される。

3. Autolysin の作用点 および LTA による抑制.

S. aureus FDA 209P 株の培養上清及び菌体由来の両酵素標品の autolysin 活性は、基質に全菌を用いた場合、*S. aureus* に対するよりも *M. lysodeikticus* に対して強い溶解活性を示した(図8)。細胞壁についても、*S. aureus* よりも *M. lysodeikticus* のものが 209P 株 autolysin に対して、高い感受性を示した。

図8

そこで以下の実験には、特に断わらない限り、より感受性の高い *M. lysodeikticus* の全菌ないしは細胞壁を基質として用いることとした。

(1). Autolysin の作用点

— 培養上清あるいは菌体由来の Autolysin 標品による *M. lysodeikticus* 細胞壁溶解産物の分析 —

培養上清由来の autolysin 標品を *M. lysodeikticus* 細胞壁に作用させた場合、図9(左)に示すように遊離アミノ基の増加を伴う濁度減少がみられた。一方、還元基量の増加は認められなかった。この結果から、この酵素標品にはペプ

チドグリカンを加水分解するエンドペプターゼあるいは、およびアミダーゼが含まれていると考えられる。すでに、*S. aureus*の培養上清に存在する autolysin としては、N-アセチルムラミル-L-アラニン アミダーゼが報告されているが、²⁶⁾細胞壁の溶解にアミダーゼとエンドペプターゼのいずれが主役を演じているかの決定は、遊離するアミノ基がペプチドグリカン由来のどのアミノ酸残基に属するものが、あるいはC-末端部が何に由来するかが明らかにされるのを待たねばならない。

一方、菌体由来の autolysin 標品を作用させた場合には、濁度の減少に伴い、遊離アミノ基及び還元基量の増加を認めた(図9(右))。このことは、用いた酵素標品に上記アミダーゼあるいはエンドペプターゼ以外に、グリカン部分を解体する酵素が含まれていることを示唆する。菌体由来の autolysin 標品を10時間作用させた後の細胞壁溶解産物について、 NaBH_4 により還元したものと未処理の対照について、

還元末端アミノ糖の分析結果を比較した。(表3)。グルコサミン残基の2が減少し、グルコサミンシトールの2が出現し、ムラミン酸の減少やムラミシトールの出現は認められないことがわかった。グルコサミンの還元による減少量と、それに対応するグルコサミンシトールの生成量の間に、多少の差異が認められる点にやや尚題が残るが、以上の分析結果は、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンとの間のグリコシド結合を切断するエンド-N-アセチルグルコサミダーゼが菌体内 autolysin 標品に存在することを示す。ちなみに供試細胞壁 1 mg 当たり 150 nmol (グルコサミンとして) の還元力の増加が認められた。この値は基質とした供試 *M. lysodeikticus* 細胞壁のグルコサミン残基の1モルに対するモル比として計算すると 0.28 となり、グリカン部分がオリゴサッカライドに切断されていることが示唆された。

(2) autolysin 活性に及ぼす LTA の影響

培養上清由来の autolysin 標品の活性は、

8 nmol/ml 濃度の LTA の添加によって完全に阻止された。全菌の自己融解に対する場合と同様、Triton X-100 存在下で LTA を添加した場合には、autolysin 活性は阻害されず、むしろ増強される傾向がみられた (図 10 (左))。

菌体由来の autolysin 標品の活性について、ほぼ同様な LTA による抑制と Triton X-100 存在下における増強が観察された (図 10 右)。ただし菌体由来の標品では、図には示されていないが、添加する LTA 濃度を 200 nmol/ml まで増しても、autolysin 活性を完全に阻止できなかった。その理由として、菌体より autolysin を抽出した時に用いた Triton X-100 がわずかながら酵素標品中に残存しているのではないかと？

あるいは菌体由来の autolysin 標品中には複数の酵素が存在し、その一部は LTA によって抑制を受けないためではないかと？ などが考えられるが、いずれの理由によるかは、現在のところ、明らかでない。

4. 菌体外 autolysin の生理的役割

図11は、細胞の分離が抑制を受け、パット
 トを形成する *S. aureus* の変異株 SAK 132 株¹⁷⁾
 の菌体及び培養上清より抽出した autolysin 標品
 の活性を、親株である SAK 101 株のそれと比
 較した結果を示す。菌体由来の autolysin 標品に
 は、親株と変異株との間にこれといった差が
 ないのに、培養上清由来の標品では、変異株
 のものが著しく低いことに気付く。この所見
 は、菌体外に遊離される autolysin が、細菌の分
 裂後の分離に重要な役割を演じていることを
 示唆するものと考えられる。

5. LTA の遊離

(1). 増殖における LTA の役割

この問題についての手掛りを得る目的で、
 菌体表層に存在する LTA が、増殖に伴って
 どのように挙動するかを調べた。すなわち
 FDA 209P 株を [¹⁴C]-グリセロール存在下で培養
 し、新しく合成された LTA が、増殖の過程
 でどのように菌体外に遊離されるかを調べた。

図表には示さないが、菌体外に遊離されるLTA量は、対数増殖期で17%、初期静止期では約30%に達することがわかった（それぞれ増殖時期における全LTA量を100%とした）。

一方、 $[^{14}\text{C}]$ -グリセロール存在下で培養しておいた菌体を、ラジオアイソトープのない新しい培地に移植し、標識されたLTAの菌体外への遊離を測定したところ（図12）、菌体外へ遊離される累積LTA量が、対数増殖期までに約30%、初期静止期までに70%近くに達することが示された。

図12

以上、菌体内に合成されたLTAは、増殖に伴って速かに代謝回転し、その大部分が菌体外に遊離されることを示す所見が得られた。

(2) 遊離LTAの分析と性状

FDA 209P 株の増殖中に菌体外へ遊離されたLTAの化学特性を、菌体内のそれと比べるために、遊離LTAを1項で示したのと同じ条件でセファローズ6Bカラムによって分画した。グリセロール量を指標にして溶出バ

ターンを図2(右)に示した。遊離LTA画分は単一のピークを与え、このピーク画分は菌体内LTA(図2(左))、すなわち2つのピーク画分のうちのピークII($k_d = 0.72$)とほぼ同じ位置に溶出された。

このピーク画分(第32~37管)のグリセロール、リン、脂肪酸およびヘキソースのモル比は、 $1.0 : 1.0 : 0.004 : 0.210$ であり、脂肪酸がほとんど存在していないことがわかった。またこの画分には、自己融解及びauto-lysin活性を阻害する活性が全く認められなかった。

ちなみに菌体由来の粗LTA画分から分離するピークII画分(第32-35管)は、菌体外に遊離したLTAと同様、auto-lysinを阻害する活性を欠くことが示された。さらに、著明な自己融解阻害活性をもつ菌体内LTAのピークI画分を 1.25 N KOH で15分間、室温で加水分解して脱アシル化すると、自己融解を阻害する作用が完全に失われることが示された。

以上の結果から、増殖中に菌体外へ遊離さ

れたLTAは、菌体内LTAの脱アシル化されたものであることが示唆された。

6. LTA添加による形態変化

増殖の速度と程度に検知しうる影響を及ぼさない濃度のLTA (40 n mol/ml) 存在下で、

S. aureus Copenhagen 株を培養し、対数増殖後期の細胞の形態を、光学顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡で観察した(図13)。個々の細胞は未添加のそれと比べて体積で約8倍大きくなり、分裂や分離が抑制をうけていることを示す像が観察された。この変化は、autolysin 活性の少くとも一部が、添加したLTAによって阻害をうけたためにおこったものと考えられる。

図13

考 察

1937年、Dubos²⁷⁾によって見い出された autolysin が、細菌細胞の生長、分裂に重要な役割を果たしているらしいことが、約30年の後に Mitchel ら²⁸⁾によって指摘された。以後、autolysin について活発な研究が展開され、autolysin が細菌の増殖をけじめとする生理に演じる役割や、²⁾またペニシリンのような細胞壁合成阻害剤の殺菌効果の発現とのかかわりあいについて^{4,5)}多くのデータが集積されつつある。

本質的にペプキドグリカン加水分解酵素である autolysin は、もしペプキドグリカンの合成と調和を保ちながら作動するのでなければ、致死的に作用しかねない。したがって autolysin の活性発現は十分適正にコントロールされていなければならない。この制御機構の解明は、様々な面から興味をひく研究課題である。

現在までに、数種の streptococci や bacillus において、autolysin 活性が LTA あるいはある種の

リピドによって抑制されることが報告され⁶⁻⁸⁾、
これらが、autolysinの作用を調節する可能性が
示唆されている。

さて一方LTAは、細菌細胞に於ける存在
様式から膜タイコ酸とも呼ばれ²⁹⁾、最初トリフ
ロロ酢酸で抽出された。しかしその後、この
方法で得られた標品では、LTAの生理機能
の発現に重要と考えられるリピドが脱離して
いることが示され³⁰⁾、現在では、抽出時に脱ア
シル化を受けないように配慮し、たとえば

Baddileyら³¹⁾のフェノール抽出法のように、
より緩和な条件で抽出が行われるようになった。

この研究では予備実験において、全菌体と
菌体より分離したエンベロープ画分の両者に
フェノール抽出法を適用し、得られたLTA
画分について、全菌の自己融解およびautolysin
標品の活性に及ぼす影響を比べたが、両者の
間にほとんど差は認められなかった。また
LTA調製過程で核酸分解酵素処理を施した
ものと同様に、いものとの間にも、上記活性

に著明な差は認められなかった(ちなみに、DNAおよびRNAはともに、5mg/ml硫酸の高濃度でも autolysinの活性に影響を与えなかった)。したがって著者がこの研究で用いた、全菌からLTAをフェノールで抽出する方法は、簡易で、かつ効率のよいLTAの抽出法と考えられる。

このようにして得たLTAが *S. aureus* 全菌の自己融解を阻害する機序について、次の事実が明らかにされた。すなわち阻害機序として、全菌にあらかじめLTAを作用させておくと、遠心洗浄により反応系よりLTAを除いても、自己融解は阻止されたままとどまる(図6)。またLTAは、菌体に飽和結合し、飽和点におけるLTA濃度は自己融解を完全に阻止する濃度と同じ次数であった。さらにLTAとの結合には、菌体表層に存在する蛋白質性の因子が関与することが示された(図2)。

Tomasz(1932) *Str. pneumoniae* では、LTA(この菌の自己融解酵素である N-アセチルムラミル

-L-アラニン アミダーゼ活性を阻害する) が細胞壁に結合することを証明できなかったと述べている。ちなみに、本稿で述べた研究では、autolysinの基質として *S. aureus* の代わりにより感受性が高い *M. lysodeikticus* の全菌を用いて、LTAによってautolysin活性が阻害されるのを認めたが、*M. lysodeikticus* 全菌に対するLTAの結合量は、*S. aureus* のそれと比べて少ないことが観察された。また、これとは別に、LTAと細胞壁との結合は、LTAがautolysinの作用を抑制するための必要条件であつても十分条件ではないことを示唆するデータを持っている(未発表)。このように一見矛盾したような所見が得られているが、これは作用因子であるautolysin、基質である細胞壁、およびコントロール因子であるLTAの三者が、絶えず、たがいに作用し合いながら働いているためであり、これらの相互作用をどのような観点でとらえ、観察しているかによつて、様々な結果が生じるものと考えられる。

自己融解の阻害にLTAのリピド部分が必要

要であることは、⁶⁻⁸⁾ *Str. faecalis* や *Lactobacillus acidophilus* においてすでに報告されている。著者は、*S. aureus* でも同じように、LTAが脱アシル化されると自己融解を抑制する作用が失われ、また Triton X-100 存在下ではLTAの阻害活性が発現しないことを、全菌及び酵素レベルで明示した。このことは autolysin 活性を阻害するためには、LTAはミセルを形成しなければならぬことを推測させる所見ではないかとも考えられる。また溶菌阻害活性を備えたLTAが脱アシル化によってその活性を失う事実は、細菌細胞の生理に大きな役割をもつ autolysin の作用の発現がLTAによりどのようにして調節されるかの機序を考える上で、大変意味がある。

数種のグラム陽性菌で、増殖中にLTAが菌体外へさかんに遊離されることが示されている³³⁻³⁵⁾。著者も、同様な現象を *S. aureus* において24とめた。また遊離LTAは脱アシル化されていることを確認した。この所見に基づいて、

S. aureus の増殖における LTA の役割を考察すると、菌体表層において LTA は本来 autolysin の作用発現の阻止に与っているが、増殖過程すなわち細菌の生長、分裂および分離に際して、自己融解の発動が要求されると、脱アシル化され、その結果 LTA により作用の発現が阻止されていた autolysin が活性化され、かつ脱アシル化された LTA は菌体外へ遊離されると、結論される。

なお、菌体外へ遊離された LTA は、*Str. faecium* では³⁴⁾ *S. aureus* と同様、脱アシル化されたもののみであるが、*Str. mutans*^{33, 34)} あるいは *Lactobacillus fermentium*³³⁾ では一部脱アシル化されていないものもあり、LTA の動態は菌種によってある程度異なるようである。

すでに、*S. aureus* の培養液には autolysin として N-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼが存在することが示されている。²⁶⁾ 著者の解析でも、培養上清由来の autolysin はアミダーゼないしはエンドペプターゼ作用を有

することが示された。一方、*S. aureus* の菌体内
 autolysin としては N-アセチルグルコサミニダー
ゼと N-アセチルムラミル-L-アラニン ア
 ミダーゼが存在することが報告されており、^{36,37)}
 著者の実験結果もこの報告を裏付けるもので
 あった。菌体由来の autolysin による細胞壁の溶
 解に伴う遊離アミノ基および還元末端アミノ
 糖を時間を追って測定した結果は、まず溶解
 に伴う遊離アミノ基の増加が認められ、次い
 で還元基量が増加することを示した(図9)。
 すなわちアミダーゼ作用がグルコサミニダー
 ゼ作用に先行すること、したがって後者は前
 者の作用をまって始動するのではないかと考
 えられる。

autolysin の生理的役割について、細胞の分離
 がわるく、パケットを形成する変異株 SAK
 132 株の培養上清には、その親株と異なり、
 autolysin 活性がほとんど存在せず、一方菌体には
 親株と同程度の autolysin 活性がみとめられた。
 この事実は、菌体外 autolysin は、細菌細胞の分

裂後の分離に重要な役割を演じていることを示唆する所見といえるかもしれない。また増殖に影響をおよぼさない程度のLTAを添加して親株を培養した場合に、個々の細胞が未添加に比べて4~8倍大きくなり、しかも細胞の分離が抑制をうけている像が観察された。この事実は、LTAが菌体外 autolysin はかりではなく、菌体内 autolysin の少くとも一部の作用を阻止することを想像させる。ちなみに *str. pneumoniae* では、LTA添加によって細胞が長い連鎖を作って発育することが報告されている³⁸⁾。

以上述べた事実は、全て、LTAの生理的役割の一つが autolysin 活性の調節であることを指し示しているといえる。

なお、LTAの溶菌阻止作用には、多少の例外を除いて、菌種特異性があるとされている。著者はさらに、同一菌種の作用点を異にする複数の autolysin に対して、当該菌種のLTAが異なる範囲に作用することを考えさせる所

見をもっている(未発表)。一つの細菌が、数種の autolysin をもち、それらが異なった機能をもち、異なった型式で調節されていることは十分考えられるところであろう。³⁹⁾

また本稿の序論で定義したような意味での LTA が検出されない *M. lysodeikticus* では、LTA と相同の機能を担う因子としてリポマンナン⁴⁰⁻⁴²⁾ が報告されている。LTA が検出されない細菌種、特にグラム陰性菌においては、autolysin の作用を調節する因子についての研究が遅れているが、この因子が何かを明らかにすることは、今後に残された重要な研究課題であろう。

また細胞壁合成阻害剤やバクテリオファージによる溶菌に、autolysin と LTA とが重要なかわりあいをもっていることが、これらの溶菌因子の作用を論ずる場合に、次第に、重要な問題になりつつある。この問題については次の報告¹⁶⁾でとり上げることにする。

総括

Staphylococcus aureus FDA 209P 株よりリポタイコ酸 (LTA) を分離、精製し、自己融解ないし autolysin との関係を調べ、次のようを得た。

1) LTA は、*S. aureus* 全菌の自己融解、および抽出した autolysin 標品の酵素活性を阻害した。この LTA は、脱アシル化された場合に自己融解および autolysin 抑制作用を失い、また Triton X-100 存在下では抑制作用を発現しなかった。このことから、LTA のリポド部分が autolysin 活性の阻害に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 菌体内の LTA は増殖に伴って、てさかんには菌体外へ遊離され、遊離された LTA は脱アシル化されていて、autolysin 活性を阻害する作用を示さないことがわかった。すなわち、菌体表層における LTA は、本来 autolysin の作用の発現を阻害しており、増殖(生長、分裂、分離)の必要な時期に、必要な部位で脱アシ

ル化されて菌体外へ遊離され、結果として、
autolysin が活性化されることが推測された。

3). LTA を添加して培養した場合、個々の
細胞が未添加 3.5 時間培養にくらべて大きく
なり、しかも細胞の分裂が抑制された像が観
察された。これは、細胞の増殖に必須の autolysin
活性の少くとも一部が、LTA によって阻害
されることを示す所見と考えられる。

以上のようにより、*S. aureus* においても細菌細胞
における LTA の主な生理的役割が、autolysin
の作用の調節であることが、議論の余地なく
解明された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の「指導、」
校舎を賜った口腔細菌学講座小谷尚三教授、
本講座主任作田正義教授、ならびに本研究を
行うにあたり機会を与えて下さった川勝
賢作大阪大学名誉教授に深謝いたします。

なおこの間、終始ひとかたならぬ「指導と
」助言をいただきました口腔細菌学講座杉中
秀寿講師に厚くお礼を申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、さまざま
な「援助をいただいた、口腔細菌学講座加
藤慶二郎助教授はじめ同教室ならびに口腔外
科学第二講座教室員諸氏に感謝いたします。

またLTAの分析にあたり、御援助をいた
だいた、大阪市立大学医学部細菌学講座矢野
郁也助教授に感謝いたします。

- 1) Weidel, W. and Pelzer, H. (1964): Bagshaped macromolecules - A new outlook of bacterial cell walls. Advan. Enzymol., (26), 193-228.
- 2) Shockman, G. D. (1965): Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts. IV. Unbalanced cell-wall synthesis: Autolysis and cell wall thickening. Bacteriol. Rev., (29), 345-358.
- 3) Tomasz, A., Zanati, E. and Ziegler, R. (1970): DNA uptake during genetic transformation and the growing zone of the cell envelope. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (68), 1848-
- 4) Tomasz, A. (1974): The role of autolysins in cell death. Ann. N. Y. Acad. Sci., (235), 439-448.
- 5) Rogers, H. J. and Forsberg, C. W. (1971): Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J. Bacteriol., (108), 1235-1243.
- 6) Cleveland, R. F., Holtje, J. -V., Wicken, A. J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. (1975): Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun., (67), 1128-1135.
- 7) Cleveland, R. F., Wicken, A. J., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. (1976): Inhibition of wall autolysis in Streptococcus faecalis by lipoteichoic acid and lipids. J. Bacteriol., (126), 192-197.
- 8) Cleveland, R. F., Daneo-Moore, L., Wicken, A. J. and Shockman, G. D. (1976): Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol., (127), 1582-1584

- 9) Knox, K. W. and Wicken, A. J. (1973): Immunological properties of teichoic acid. Bacteriol. Rev., (37), 215-257.
- 10) Wicken, A. J. and Knox, K. W. (1975): Lipoteichoic acids: New class of bacterial antigen. Science, (187), 1161-1167.
- 11) Lambert, P. A., Hancock, I. C. and Baddiley, J. (1977): Occurrence and function of membrane teichoic acid. Biochem. Biophys. Acta., (472), 1-12.
- 12) Naumova, I. B. (1978): The role of teichoic acids in the regulation of biochemical process in microorganisms. Biochemistry (USSR), (43), 195-207.
- 13) Sharpe, M. E., Brock, J. H. and Phillips, B. A. (1975): Glycerol teichoic acid as an antigenic determinant in a gram-negative bacterium Butyrivibrio fibrisolvens. J. Gen. Microbiol., (88), 355-368.
- 14) Duckworth, M., Archibald, A. R. and Baddiley, J. (1975): Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in Staphylococcus aureus H. Febs Lett., (53), 176-179.
- 15) Driel, D. V., Wicken, A. J., Dicken, M. R. and Knox, K. W. (1973): Cellular location of the lipoteichoic acid of Lactobacillus fermenti NCTC 6991 and Lactobacillus casei NCTC 6375. J. Ultrastruct. Res., (43), 483-497.
- 16) 嶋谷雅博 (1979): 黄色ブドウ球菌の自己融解のリボタイコ酸による調節とペニシリンによる殺菌. II. ペニシリンによる溶菌のリボタイコ酸による阻止, 阪大歯学誌, 24, 〇—〇 昭和54.

- 17) Koyama, T., Yamada, M. and Matsuhashi, M. (1977): Formation of regular packets of Staphylococcus aureus cells. J. Bacteriol., 129, 1518-1528.
- 18) Tipper, D. J. and Strominger, J. L. (1966): Isolation of 4-O- β -N-acetylglucosamine and 4-O- β -N, 6-O-diacetylmuramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of Staphylococcus aureus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 48-56.
- 19) Cifonelli, J. A. and Smith, F. (1954): Detection of glycosides and other carbohydrate compounds on paper chromatograms. Anal. Chem., 26, 1132-1134.
- 20) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. -L. and Farr, A. L. (1954): The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods., J. Biol. Chem., 207, 1-16.
- 21) Hanahan, D. J. and Olley, J. N. (1958): Chemical nature of monophosphoinositides. J. Biol. Chem., 231, 813-828.
- 22) Aschwell, G. (1957): Colorimetric analysis of sugars (Colowick, S. D. and Kaplan, N. O., editor) Methods in Enzymol. III. Academic Press, New York., 73-105.
- 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 24) Ghuyssen, J. -M., Tipper, D. J. and Strominger, J. L. (1966): Enzymes that degrade bacterial cell walls. (Colowick, S. D. and Kaplan, N. O., editor) Methods in Enzymol. Vol. VIII, Complex

- carbohydrates, Academic Press, New York, 685-699.
- 25) Park, J.T., and Johnson, M.J. (1949): A submicrodetermination of glucose. J. Biol. Chem., (181), 149-151.
- 26) Huff, E., Silverman, C.S., Adams, N.J. and Awkard, W. (1970): Extracellular wall-lytic enzyme from Staphylococcus aureus: Purification and partial characterization. J. Bacteriol., (103), 761-769.
- 27) Dubos, R.J. (1937): The autolytic system of pneumococci, J. Exp. Med., (65), 873-883.
- 28) Mitchell, P. and Moyle, J. (1957): Autolytic release and osmotic properties of 'Protoplasts' from Staphylococcus aureus. J. Gen. Microbiol., (10), 184-194.
- 29) Baddiley, H. (1972): Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. Essays Biochem., (8), 35-77.
- 30) Wicken, A.J. and Knox, K.W. (1970): Studies on group F antigen of lactobacilli: Isolation of a teichoic acid-lipid complex from Lactobacillus fermenti NCTC6991. J. Gen. Microbiol., (60), 293-301.
- 31) Coley, J., Duckworth, M. and Baddiley, J. (1975): Extraction and purification of lipoteichoic acids from gram-positive bacteria. Carbohyd. Res., (40), 41-52.
- 32) Holtje, J. -V. and Tomasz, A. (1975): Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (72), 1690-1694.

- 33) Markham, J.L., Knox, K.W., Wicken, A.J. and Hewett, M.J. (1975): Formation of extracellular lipoteichoic acid by oral streptococci and lactobacilli, Infect. Immun., (12), 378-386.
- 34) Joseph, R. and Shockman, G.D. (1975): Synthesis and excretion of glycerol teichoic acid during growth of two streptococcal species. Infect. Immun., (12), 333-338.
- 35) Alkan, M. L., and Beachey, E.H. (1978): Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci. J. Clin. Invest., (61), 671-677.
- 36) Tipper, D.J. (1969): Mechanism of autolysis of isolated cell walls of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., (97), 837-847.
- 37) Takebe, I., Singer, H.J., Wise, E.M.Jr. and Park, J.T. (1970): Staphylococcus aureus H autolytic activity: General properties. J. Bacteriol., (102), 14-19.
- 38) Holtje, J.V. and Tomasz, A. (1975): Biological effects of lipoteichoic acids, J. Bacteriol., (124), 1023-1027.
- 39) Monodane, T., Matsushima, Y. and Kotani, S. (1978): Demonstration of the physiological role of autolysis by a comparative study with a wild-type and its non-autolytic mutant of Micrococcus lysodeikticus (luteus) cultivated with externally added proteolytic enzymes. Microbiol. Immunol., (22), 67-80.
- 40) Owen, P. and Salton, M.R.J. (1975): A succinylated mannan in the membrane system of Micrococcus lysodeikticus. Biochem. Biophys. Res. Commun., (63), 875-880.

- 41) Powell, D.A., Duckworth, M. and Baddiley, J. (1975): A membrane-associated lipomannan in micrococci, Biochem. J., (151), 387-397.
- 42) Pless, D.D., Schmit, A.S., Lennarz, W.J. (1975): The characterization of mannan of Micrococcus lysodeikticus as an acidic lipopolysaccharide. J. Biol. Chem., 250, 1319-1327.

LIPOTEICHOIC ACID FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS: REGULATION OF
AUTOLYSIS AND KILLING OF PENICILLIN

I. ROLE OF LIPOTEICHOIC ACID AS A REGULATOR OF AUTOLYSIS

Masahiro SHIMATANI

*The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka University Dental School, 3-48, Nakanoshima 4-chome, Kitaku,
Osaka, Japan*

The correlation between lipoteichoic acid (LTA) and cell lysis was examined with Staphylococcus aureus FDA-209P.; 1) The LTA inhibited both autolysis of intact cells and autolysin activity. The chemically deacylated LTA failed to inhibit significantly in the same concentration range. 2) The LTA was released into the growth medium and the released LTA, which was deacylated, had no autolysin inhibitory activity. 3) Addition of the LTA to the medium of growing S. aureus culture caused some morphological changes.

These results suggest that one of the major physiological functions of LTA may be the control of bacterial autolysins.

図 1

S. aureus H のリボタイロ酸の化学構造

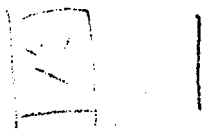
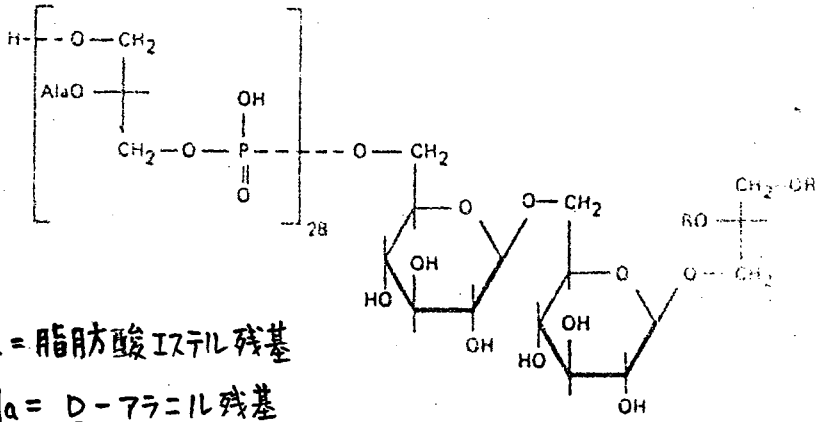
[Duckworth, M., Archibald, A.R. and Baddiley, J. (1975)

Febs Lett., (53), 176-179.]

コ



Handwritten text at the top right of the page, possibly a name or date.



※ 2.

S. aureus より抽出した菌体内および遊離リ
ポタイン酸のセファロース6Bによるゲル滲
透のパターン

↓ : void volume

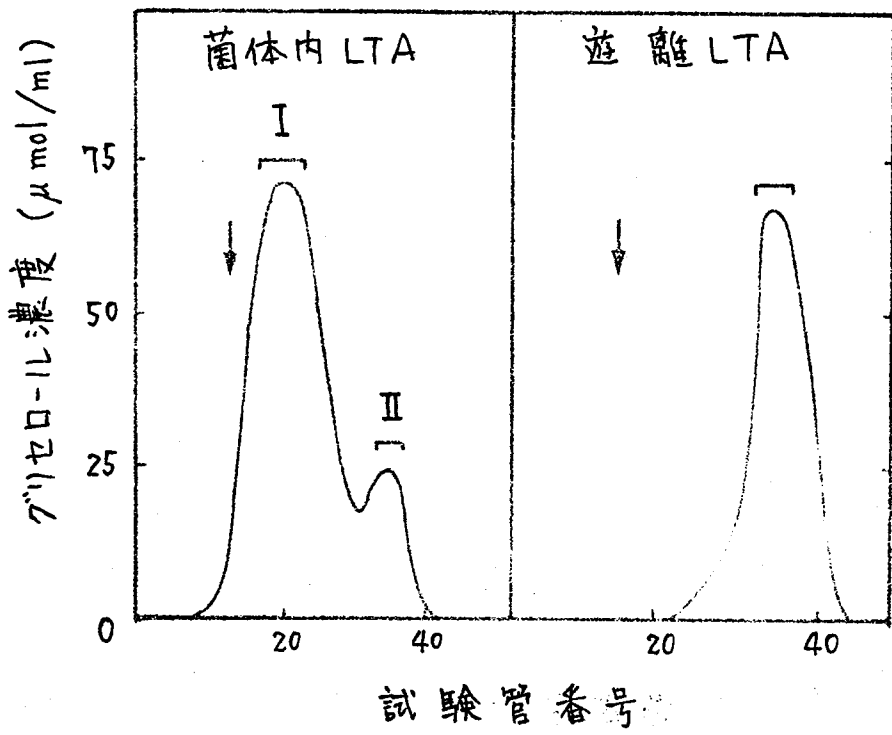
図3.

リポタイコ酸加水分解物の薄層クロマトグラフィー — 構成成分の分析 —

1. α -グリセロリン酸
2. グリセロール
3. グルコース
4. リポタイコ酸 (セ-7I)

図3は最終ページ

幅 6.5 cm l: 縮少



☒ 2

☒ 2

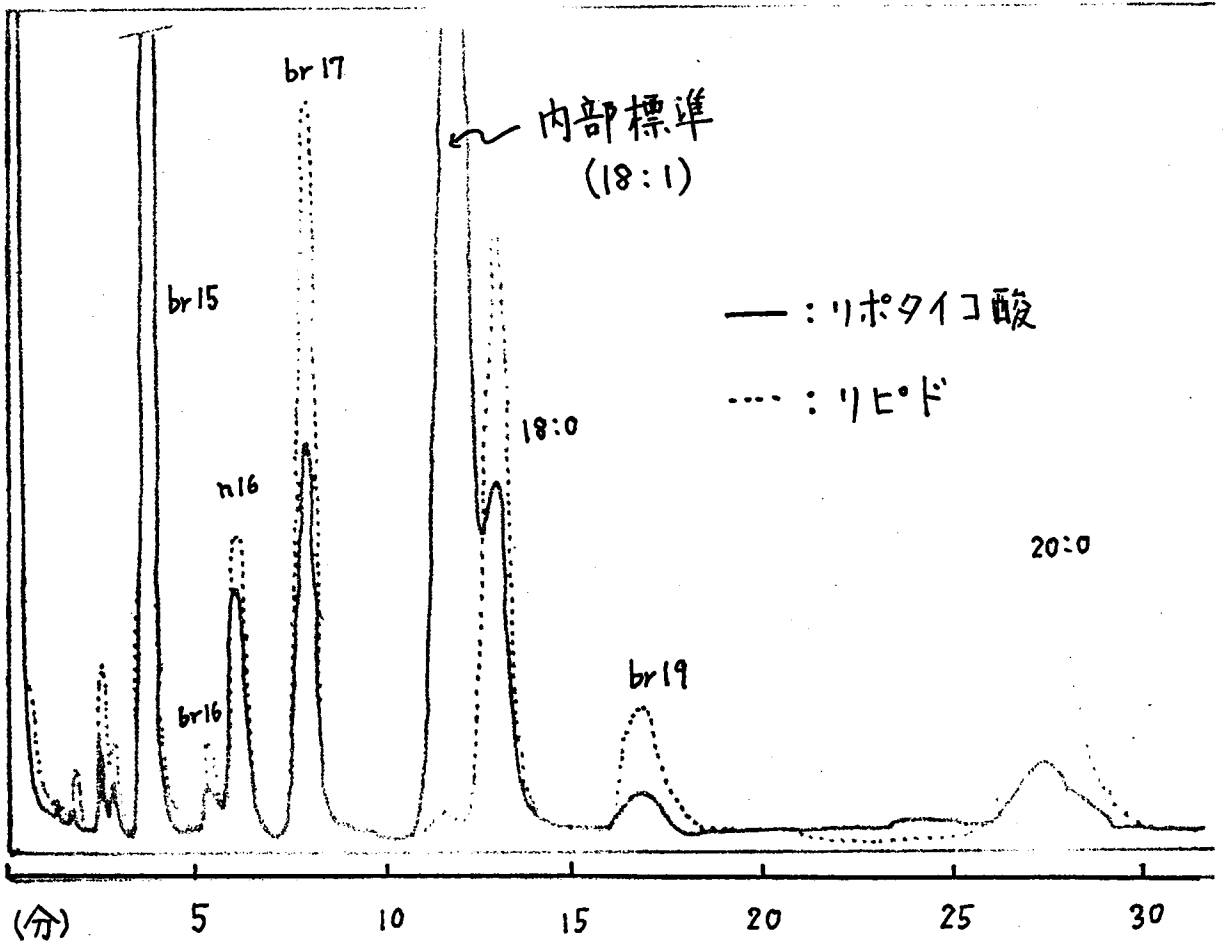
山崎

図4

S. aureus のリポドおよびリポタイコ酸
構成脂肪酸のガスクロマトグラフィー

図中の数字は脂肪酸の炭素数。
br は分岐脂肪酸、n は直鎖脂肪酸を示す。

幅 6.5



4

表1

S. aureus 全菌体より抽出したリポド及びリポタイコ酸の主な構成脂肪酸

脂肪酸**	リポド(%)*	リポタイコ酸(%)*
C15 br	48.9	50.0
C16 br	1.0	1.4
C16 <u>n</u>	3.3	7.0
C17 br	12.4	14.3
C18 <u>n</u>	13.9	16.2
C19 br	4.4	1.1
C20 <u>n</u>	12.1	3.1

* 総脂肪酸に対する百分率

** この表には試料中の含量が1%以上の主な脂肪酸のみを掲げた。脂肪酸は炭素数により示した。br: 分岐脂肪酸 n: 直鎖脂肪酸

図 5

S. aureus 全菌の自己融解に及ぼすリポタイ
コ酸の影響

左図、(●): LTA 添加(↓)、および(○): 未添加。
(▲): Triton X-100 存在下、LTA 添加(↓)、および
(△): 未添加.; 右図、(●): LTA (20 nmol/ml) 添加(↓)、
および(○): 未添加

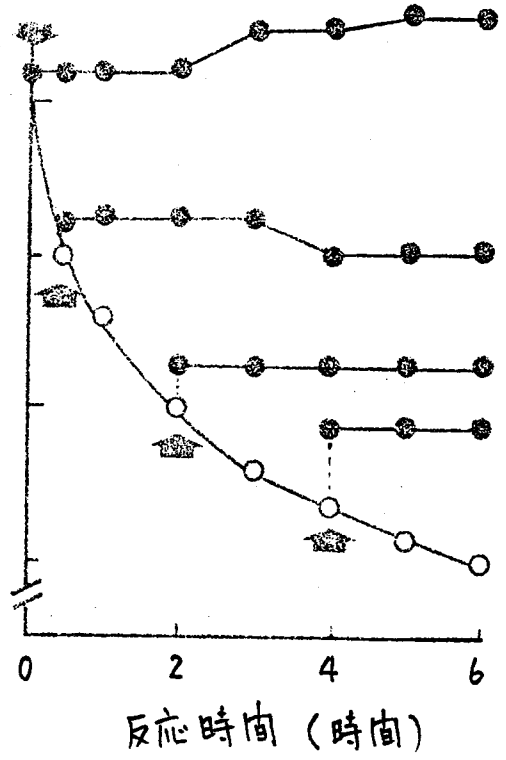
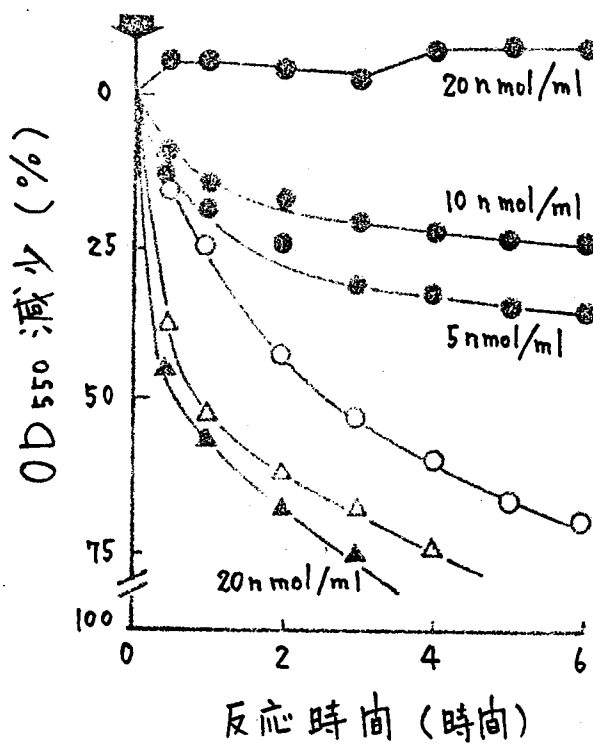


図 5

図6.

S. aureus 全菌の自己融解のリボタイコ酸処理による影響

(○) : 未処理, (●) : LTA (20 nmol/ml) 添加、

(⊖) : LTA 処理 (菌体を LTA (20 nmol/ml) と 10 分間反応させたのち、LTA を含まない緩衝液に浮遊させた。

20 nmol/ml

幅 5.0mm

図 6

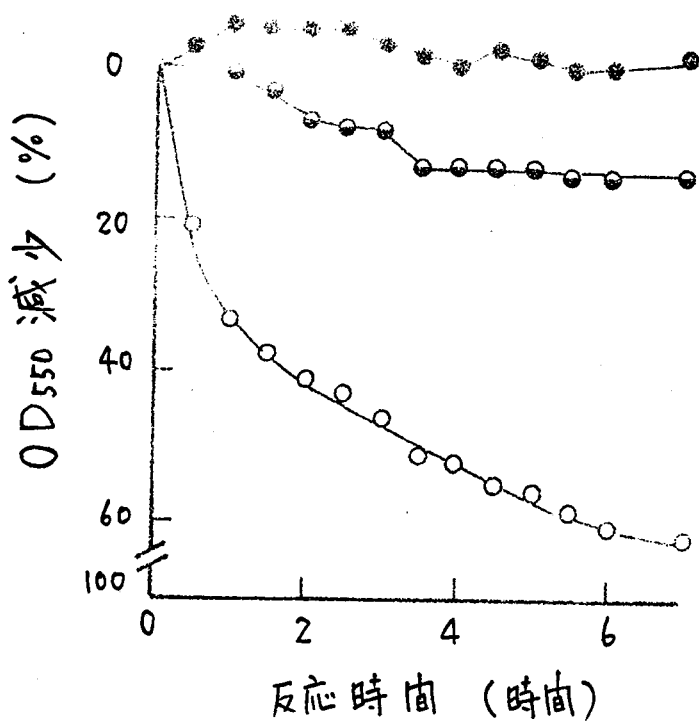


図 6

図 6

図7

S. aureus 全菌への $[^{14}\text{C}]$ -リボタイコ酸の
結合

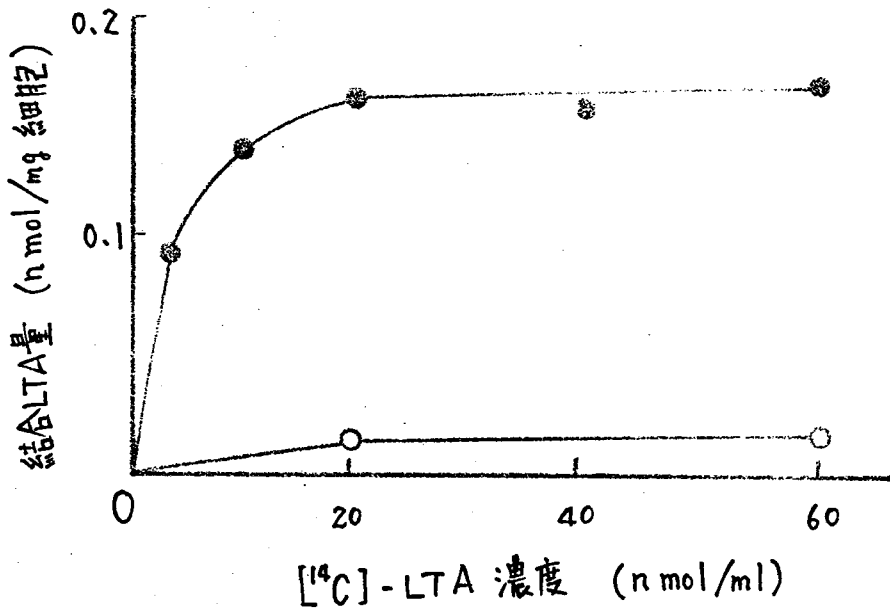
(●): 0.03M リン酸緩衝液中での結合

(○): Triton X-100 存在下での結合



7

Figure 1



7

表2

S. aureus 全菌への $[^{14}\text{C}]$ -リポタイン酸の結合量

全菌の処理条件	結合 $[^{14}\text{C}]$ -LTA量	
	n mol / mg細胞	(%)
未処理	0.170	100
トリプシン処理 (1mg/ml, 30分間)	0.175	103
加熱 (100°C, 10分間)	0.088	52
Triton X-100 添加 (1%, 60分間)	0.141	83
1% Triton X-100 存在下 での結合	0.017	10

1% Triton X-100

嶋谷雅博

図 8

S. aureus 培養上清および菌体由来の autolysin
標品の S. aureus と M. lysodeikticus 全菌に対する
溶菌活性の比較

左図は培養上清、右図は菌体由来の autolysin
標品。 S. aureus 全菌を基質とした場合、autolysin
標品を(△):添加、(▲):未添加。 M. lysodeikticus 全菌
を基質とした場合 autolysin 標品を、(○):添加、
(●):未添加。

图 8

幅 6.5 cm 縮少

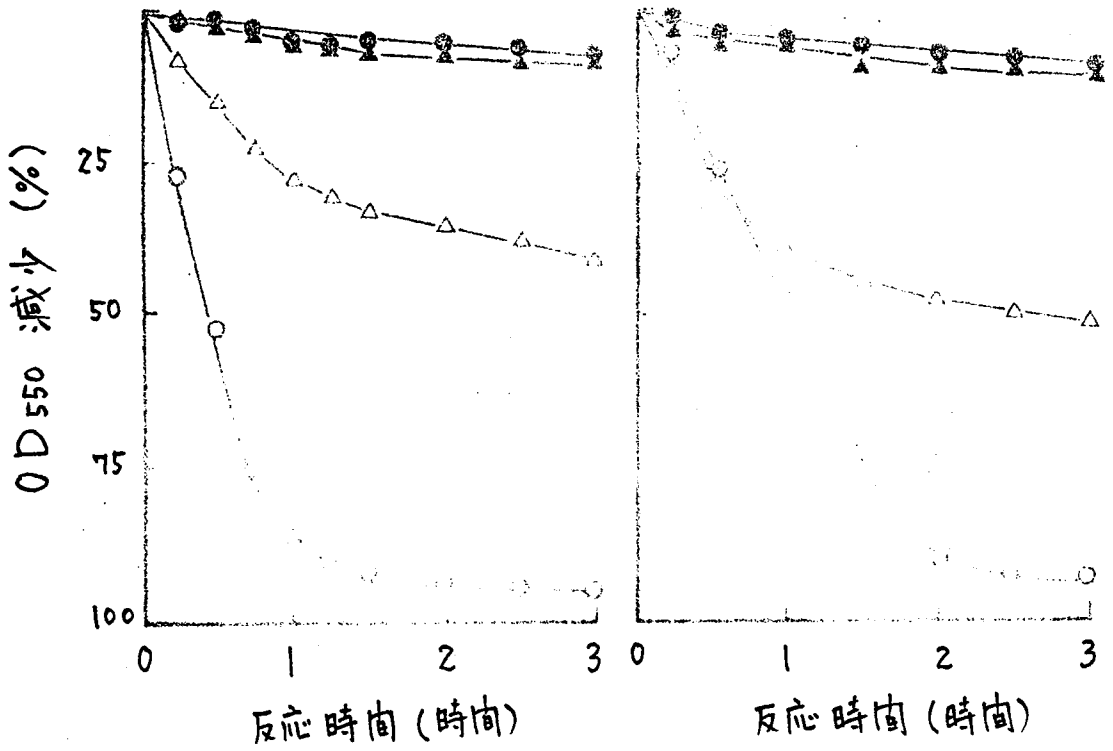


图 8

图 8

図9

S. aureus 培養上清および菌体由来の autolysin
標品による M. lysodeikticus 細胞壁の溶解、ならび
に遊離アミノ基および還元基量の増加

左図は培養上清、右図は菌体由来の autolysin
標品。(○): OD₅₅₀ 減少、(●): 遊離アミノ基量、
(▲): 還元基量。

図 9

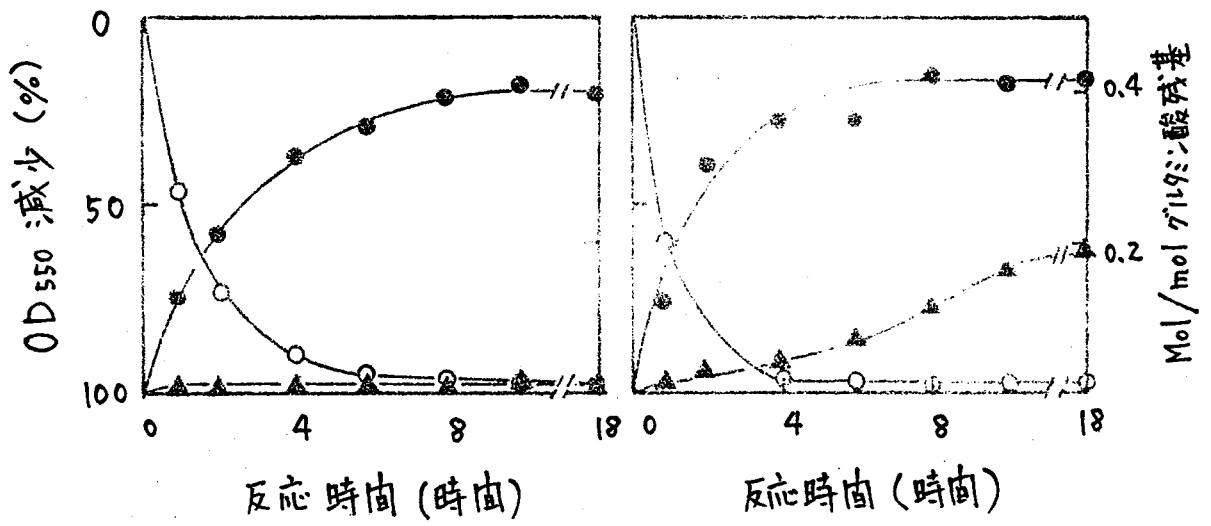


図 9

図 9

表 3

S. aureus の菌体由来の autolysin 標品による *M. lysodeikticus* 細胞壁の溶解に伴って還元基が遊離するアミノ糖残基の同定と定量

OD ₅₅₀ 減少 (%)	遊離した還元基 nmol/mg 細胞壁	ムラミン酸 ^{a)}	グルコサミン ^{b)}	ムラミットール ^{a)}	グルコサミットール ^{b)}
98	150	111	85	0	38

a) 還元前のムラミン酸残基に対する%で表わした。

b) 還元前のグルコサミン残基に対する%で表わした。

nmol/mg

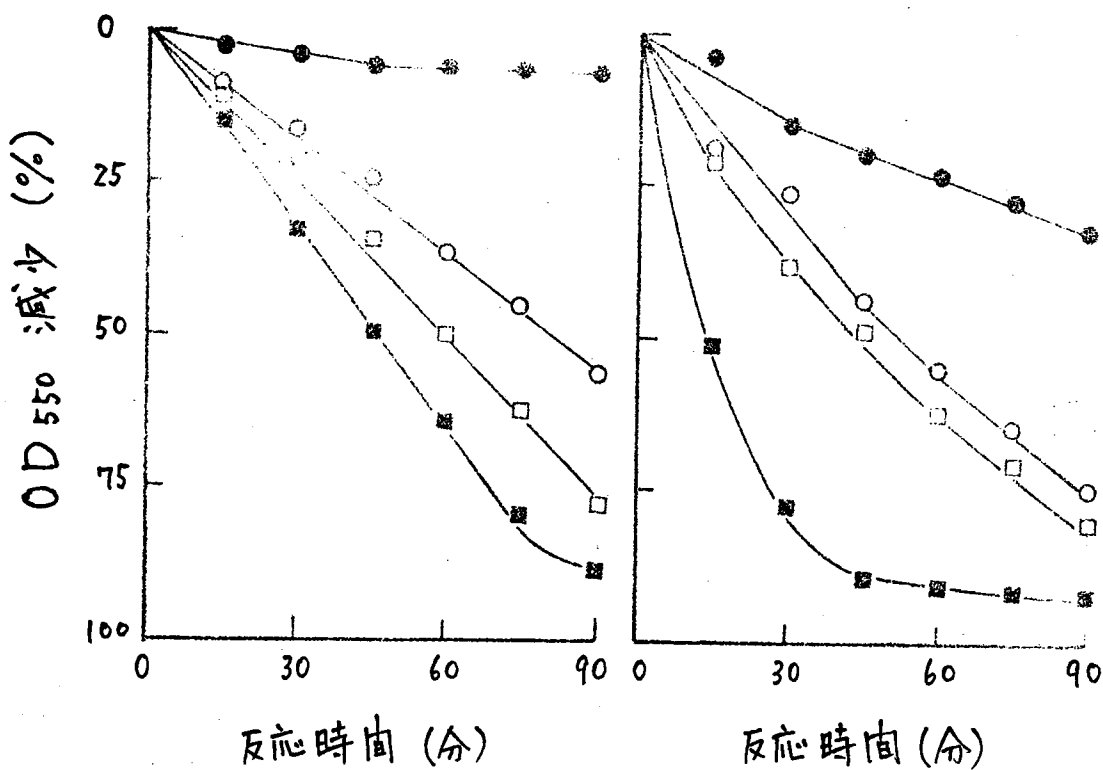
図10

S. aureus 培養上清 および 菌体由来の autolysin 標品による M. lysodeikticus の溶菌に及ぼす リポタイン酸の影響

左図は培養上清、右図は菌体由来の autolysin 標品。
(●): LTA (8 nmol/ml) 添加、および
(○): 未添加。(■): Triton X-100 存在下、LTA (8 nmol/ml) 添加、および (□): 未添加。

幅 6.5 cm 15 210

☒ 10



☒ 10

☒ 10

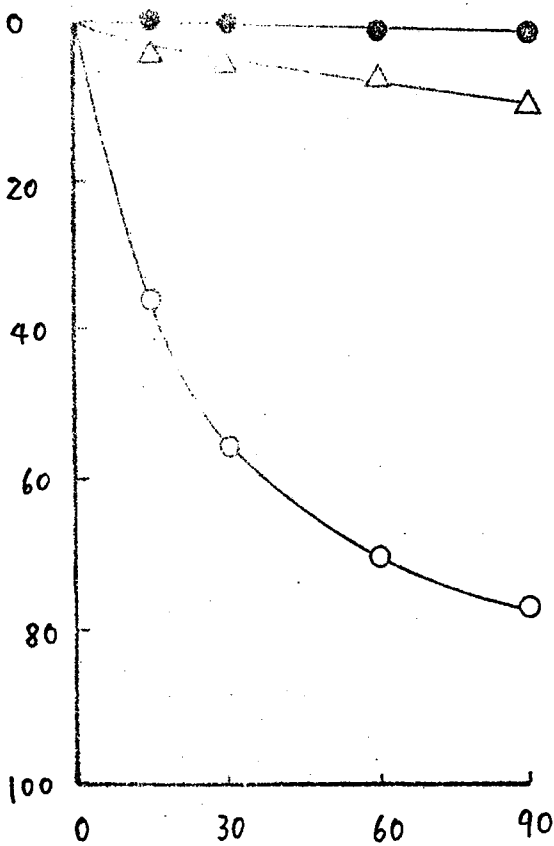
図 11.

S. aureus SAK 101 株および SAK 132 株の培養上清および菌体由来の autolysin 標品による *M. lysodeikticus* の溶菌活性

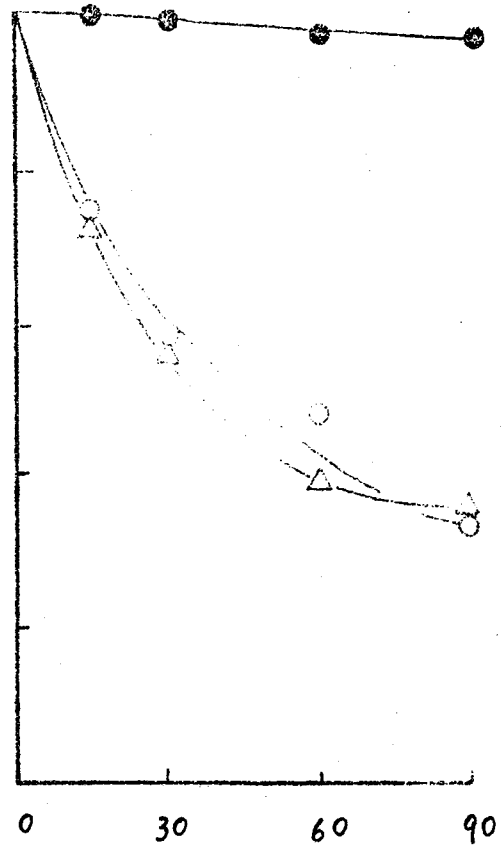
左図は培養上清、右図は菌体由来の autolysin 標品。
(○) : SAK 101 株の autolysin 標品。
(△) : SAK 132 株の autolysin 標品、(●) : 酵素未添加



幅 6.5 cm



反応時間 (分)






反応時間 (分)



図12

[^{14}C]-グリセロールで標識された *S. aureus* 菌体より、増殖に伴って菌体外に遊離されるリボタイコ酸量

( と  の合計): それぞれの培養時間までに培養液中に遊離したLTA量、(): 相続く測定時間の間に新しく遊離したLTA量。

* 菌体内LTAと菌体外遊離LTA量をあわせたものを100%とした。

Figure 12

Figure 12

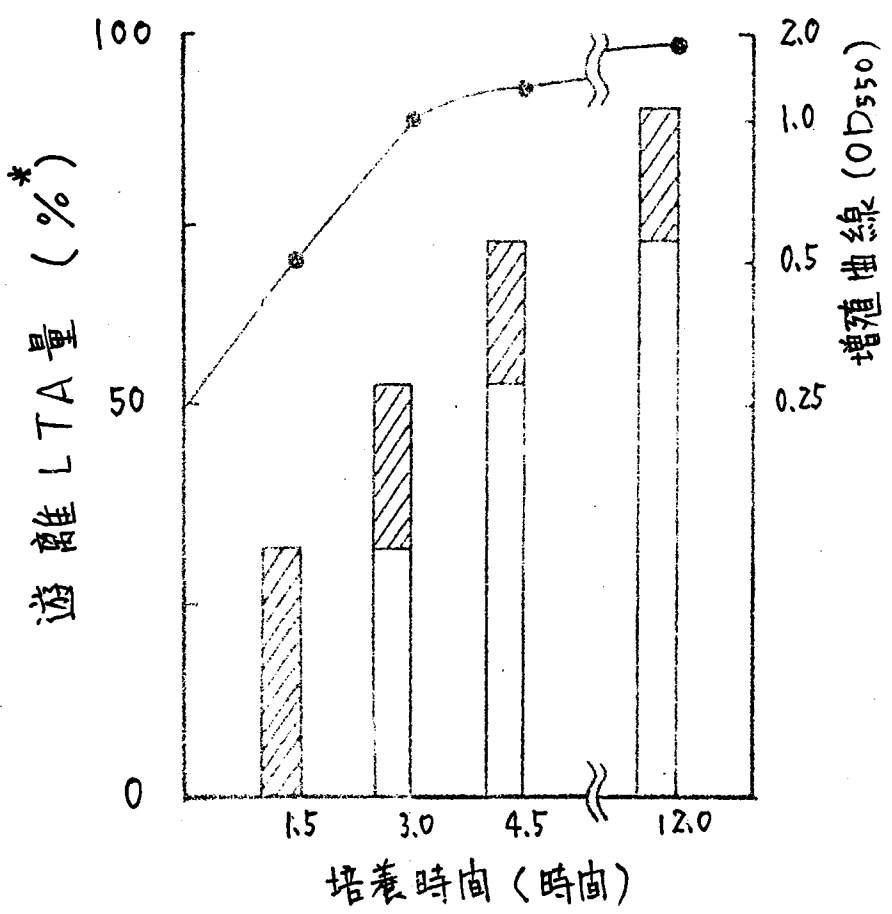


Figure 12

* 12

図13

リポタイコ酸を添加して培養した S. aureus
細胞の形態変化。

(左): LTA 未添加、(右): 添加 (40 ng/ml)。

(上): 光学顕鏡写真 (直接倍率、 $\times 1,000$)

(下): 走査型電子顕鏡写真 (直接倍率、 $\times 10,000$)

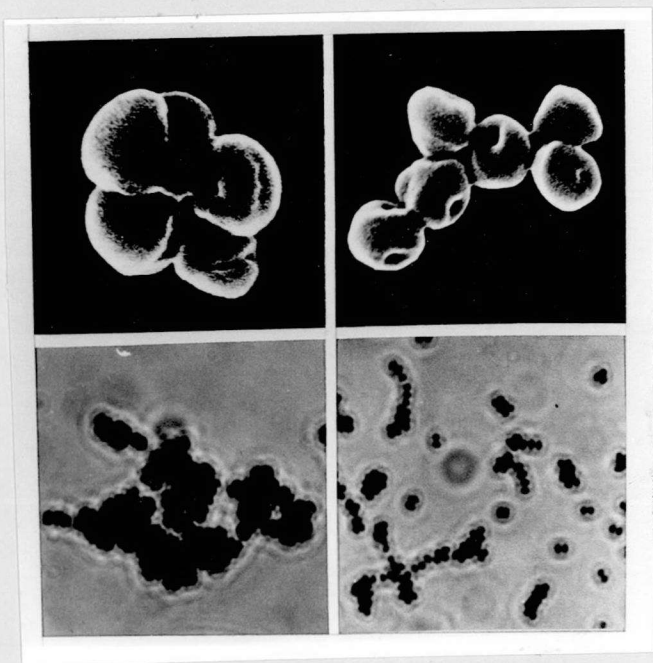


图 13

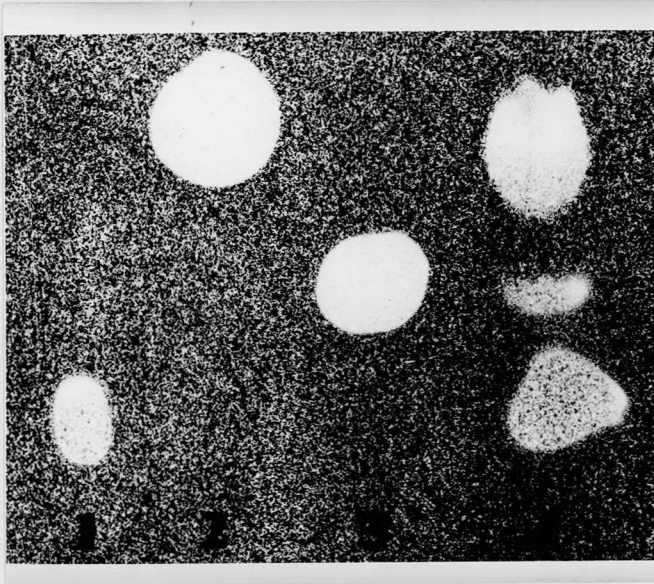


图 3

黄色ブドウ球菌の自己融解のリポタイコ酸
による調節とペニシリンによる殺菌

2. ペニシリンによる溶菌のリポタイコ酸
による阻止

嶋谷雅博

(昭和54年1月 日受付)

緒言

ペニシリン系(β-ラクタム系)薬剤は、
増殖中の細菌に作用して殺菌的に働き、溶菌
をもたらすことが知られているが、抗菌機序
については従来細胞の構造保持に必要な細胞
壁ペプチドグリカン合成、なかでも最終段階
である軸ペプチド間の架橋形成にあずかる反
応を阻害することが、重視されてきた^{1,2)}しか

しながらこのような作用のみでは、ペニシリン系薬剤の殺菌ないし溶菌機序は、必ずしも十分に説明できない。

一方細菌細胞の生長、分裂および分離に重要な役割を演じている autolysin (自己融解酵素)^{3,4)} が、ペニシリンによる溶菌に関係している可能性については、このことを指摘するいくつかの報告があり⁵⁻⁹⁾ 蛋白合成を阻害した場合や、⁵⁻⁷⁾ 自己融解能欠損変異株^{8,9)} ではペニシリンによる増殖阻止に続く溶菌がみられないことが示された。さらに最近では、Tomasz らによつて¹⁰⁾ *Streptococcus pneumoniae* にペニシリンを作用させると、autolysin の阻害因子であるリポタイコ酸 (lipoteichoic acid, LTA) が培地中へ著るしく遊離することが明らかにされた。

著者は以下に述べる研究において、*Str. pneumoniae* について示された、上述のペニシリン、autolysin および LTA 三者の相互作用が、ペニシリン系薬剤の耐性が臨床上しばしば問題にされる *Staphylococcus aureus* にも妥当するかどうか

を調べるとともに、ペニシリンによる autolysin の活性化の機序を検討したので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

1. 使用菌株

Staphylococcus aureus FDA 209P 株 (本学口腔細菌学教室保存株) を用いた。

2. 使用薬剤

ペニシリン G カリウム (明治製菓 K.K., 東京) および クロラムフェニコール (三共 K.K., 東京) を用いた。これら薬剤の *S. aureus* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) はそれぞれ $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

3. リポタイコ酸 (LTA)

S. aureus FDA 209P 株全菌体より、前報に記載した方法¹¹⁾で抽出したものを用了。

4. 増殖条件

L字型試験管（内径 10 mm, 垂直部 55 mm, 水平部 120 mm; あるいはそれぞれ 16 mm, 100 mm, および 120 mm のもの）に入れたトリプ・4 ケース・ソイ・ブロー（BBL, USA）中で振盪培養（振幅 5.5 cm, 往復振盪数 80 回/分）を行った。増殖の速度ないし程度をよかる指標として、培養の OD₅₅₀（波長 550 nm における濁度, optical density）を、光電比色計（Shimazu-Bausch & Lomb 20 型, 島津製作所, 京都）を用いて測定した。

5. 生菌単位数の測定

培養の各過程で培養液をくみだし、トリプ・4 ケース・ソイ・ブローに寒天末（和光純薬, 大阪）を 1% の割合に加えたものを培地とする平板培養法¹²⁾により、集落形成単位を測定し、それぞれの生菌単位数とした。

6. LTA の遊離

[¹⁴C(U)]-グリセロール（ロット番号 908-22, NEN 社, 英国; 8.75 mCi / m mol）の 20 μl を、増殖初期（OD₅₅₀ = 0.20）の培養液 10 ml に

添加し、 37°C で振盪培養し、 OD_{550} が1.0となつた時(対数増殖後期に当たる)に培養液を遠心集菌した。集めた菌体を遠心洗浄後、 ^{14}C -グリセロールを含まない新しい培地に OD_{550} が約0.25になるように接種し、ついで種々の濃度の抗生物質を添加して培養した。以後経時的に菌の増殖(OD_{550})と菌体外に遊離したLTA量(培養上清より抽出したLTA画分の放射能)を測定した。なお、培養上清のLTAは、前報に記載したように45%フェノール水で抽出し¹⁾、放射能は液体シンチレーションスペクトロメーター(LSC 653型、Aloka)で測定した。

結 果

1. ペニシリンGおよびクロラムフェニコールによる増殖阻止と溶菌

対数増殖期の *S. aureus* FDA 209P 株の培養に種々

の濃度のペニシリンGを添加すると、約2時間のlagの後に、加えた薬剤濃度に応じた強さの溶菌が誘発され、40 ng/ml で溶菌は最大となった。しかし400 ng/ml では増殖は阻止されるが、濁度の減少は全く認められなかった(図1)。

図1

一方、クロラムフェニコールを添加した場合には、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に増殖の阻止が認められたが、0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲内で溶菌は全く認められなかった。

2. ペニシリンによる誘発される溶菌に及ぼすLTAの影響(図2)

培養初期に強い溶菌を誘起する濃度(40 ng/ml)のペニシリンGを加え、ついで溶菌がはじまる時点に20 nmol/mlのLTAを添加し、溶菌に対する影響を調べた。LTA未添加の場合には著明な溶菌がおこる(C)のに対して、LTA添加では溶菌が全く阻止された(D)。また溶菌がすでにおこっている時点でLTAを添加すると、直ちに溶菌が完全に停止するの

が観察された(E)。

図2

またペニシリンGとLTAを添加する順序を逆にして、上記濃度のLTA添加1時間後、ペニシリンGを加えたところ、この場合にもLTA未添加(H)にくらべて溶菌が阻止される傾向が認められた(I)。

ちなみにLTAは、以上の実験に用いた濃度では、この菌の増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった(B、G)。

3. ペニシリンGの殺菌作用に対するLTAの影響

表1

上記のようにLTA添加によってペニシリンによる溶菌が阻止された菌の生死を調べた。すなわち図2に示す実験の(A)~(H)の各試験管から、LTA添加時(増殖開始2あるいは5時間後)および7時間後に培養液をくみだし、生菌単位数を比較した(表1)。

その結果、LTA未添加(C)では生菌単位数の著明な減少、すなわちペニシリンによる殺菌作用がみとめられるのに、LTA添加に

よって溶菌が阻止された場合(D)、LTA添加後は生菌単位数の有意の減少は認められず、ペニシリンの作用は静菌作用にとどまることがわかった。なお、溶菌中にLTAを添加した場合(E)には、(D)と(C)との中間の生菌単位数の減少を示した。おそらくはこの場合にも、LTA添加後直ちに殺菌作用は停止するものと考えられる。

LTAのみ添加した培養(G)は、未添加のもの(B)と有意の生菌単位数の差を示さなかった。

一方、LTA添加1時間後ペニシリンGを添加した場合(I)には、(H)とくらべて生菌単位数の減少が抑制される傾向がみられた。

4. ペニシリン添加によるLTAの菌体よりの遊離

対数増殖期の、菌体LTAを $[^{14}C]$ グリセロールで標識したFDA 209P株の培養に、種々の濃度のペニシリンGを加え、1時間後に細胞外へ遊離されるLTA量を、培養の遠心上清よりに

抽出したLTA画分の放射能を測定して調べた。 4×10^2 ng/mlまでの濃度では、1時間の培養のうちに、添加したペニシリンG濃度に応じて増加するLTAの菌体外への遊離が認められた(図3(左下))。ちなみにこの1時間の培養の間には、いずれの濃度のペニシリンGを添加した場合にも、溶菌は全くみられなかった(図3(左上))

図3

また、ペニシリンGの添加により菌体外に遊離するLTA量を、添加後の時間を追いかつクロラムフェニコールを添加したものを対照として調べた。 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のクロラムフェニコール添加ではLTAの遊離が未添加のものと同くらべて抑制されるのに対し、ペニシリンGを、溶菌が最も強くみられる $40 \text{ ng}/\text{ml}$ の濃度、あるいはその10倍量添加すると、短時間のうちに著明なLTAの遊離が認められた(図3(右下))。ちなみに2時間の培養期間内では、溶菌はいずれの場合にも全くみられず、むしろ濁度の増加が認められた(図3(右上))。

考察

ペニシリンは細菌細胞壁ペプチドグリカンの軸ペプチド間の架橋形成にあずかるトランスペプチダーゼおよびD-アラニンカルボキシペプチダーゼに結合し、これらの酵素活性を抑制し、トランスペプチドーションを阻害することが示されている。²⁾

一般にペニシリンの作用は、スルファミン剤等とは異なり、殺菌的であることが知られている。しかし、*S. aureus* その他数種のグラム陽性球菌におけるペニシリンの殺菌作用は、ある濃度以上ではむしろ減弱する傾向があることが報告されており^{13, 6)}、著者の研究でも同様な現象が認められた(図1)。この現象を形態的に検討した研究では¹⁴⁾、最小発育阻止濃度(MIC)近くでは、多くのスフェロプラストと溶菌像がみられるのに対し、さらに高濃度ではほとんどの細胞は細胞壁を保持しており、溶菌はほとんどみられないことが明らかにさ

れた。このような反転現象 (Eagle effect) の機序は明らかではないが、

高濃度のペニシリンはなんらかの機序で autolysin の活性を阻害すると考えられる。また、増殖中に添加した LTA がペニシリンによって誘発される溶菌を阻止するのが観察されたが (図 2)、これは前報¹⁾で述べた、LTA の自己融解阻止と同じ機序によるものと考えられる。さらに溶菌を阻止された菌は集落形成能を保持していることから、ペニシリンの *S. aureus* に対する直接作用は静菌的であり、殺菌ないし溶菌は autolysin の関与する二次的な反応の結果であると考えられる。

それでは、ペニシリンによる autolysin の活性化はどのような機序でおこるのであろうか？

1972年、Hartmann らは¹⁵⁾ *Escherichia coli* についての実験ではあるが、ペニシリンは、それまで主張されていたように、ペプキドグリカン合成過程における架橋形成にあずかるトランスペ

プクダーゼに對してばかりではなく、autolysin
にも作用することを示した。さらに、最近で
は、ペニシリンがグラム陰性桿菌より抽出し
た autolysin の活性を高めることが Fantana ら¹⁶⁾に
より報告されている。もっとも *S. aureus* では、
無細胞系でペニシリンが直接 autolysin を活性化
する事実は認められなかった(未発表)。

増殖時にペニシリンを添加すると直ちに、
しかも大量に、autolysin の阻害因子である LTA
が菌体外、培地中に遊離されるのを認めた
(図3)。この現象は、ある種の streptococci につ
いて Tomasz¹⁰⁾ や Alkan ら¹⁷⁾によっても報告され
ているが、この菌体外への LTA の遊離は、
ペニシリンによる autolysin の活性化の機序の一
端を説明するものと思える。すなわち、細胞
表層で LTA によってその活性を阻害されて
いた autolysin が、ペニシリン添加によつて LTA
が遊離される結果、活性化される。指摘を
要するのは、菌体外へ遊離した LTA は脱ア
シル化され、autolysin を抑制する作用を失つて

いて¹⁾もはや autolysin 活性を阻害しえないことである。

ペニシリン添加により LTA の遊離が時をうつさず起こるのに対し、溶菌が少しくおくれでおこるのは、トランスペプチダーゼの阻害により²⁾、未架橋のペプチドグリカンが形成されること、それ自体は直接殺菌につながらないとしても、autolysin の活性発現に必要なことによるのかもしれない。

なお、ペニシリン系薬剤とクロラムフェニコールを併用すると、溶菌が阻止されること⁵⁻⁷⁾は以前から知られており、この現象の説明として、単に蛋白合成阻害により autolysin の生成が低下するためとされていた。しかしクロラムフェニコールが LTA の遊離を抑制することが示されたので (図3(右下))、このような機作を介しての autolysin の活性化の抑制も、上述の現象に参与しうると考えられる。

以上を要約して、ペニシリンの作用機序を図4に図解した。ペニシリンは、一方で細胞

壁合成の最終段階である架橋形成(トランス
ペプチドーション)を阻害するので、部分的
に未架橋のペプチドグリカンが形成される。
しかし、この作用のみでは殺菌効果は結果し
ない。ところが他方において、ペニシリンの
作用、すなわち恐らくは未架橋ペプチドグリ
カンの生成とも関連して、autolysinの阻害因子
であるLTAが遊離し、LTAが脱離した細
胞表層部位におけるautolysinが活性化され、そ
の結果溶菌がおこる。このようなプロセスが
ペニシリンの殺菌作用をもたらすと考えられ
る。

図4

総括

Staphylococcus aureus FDA 209P株のペニシリンによる
殺菌作用の機序の究明を試み、次のような結
果を得た。

1) ペニシリンGによって誘発される *S. aureus*

の溶菌は、autolysin の阻害因子であるリポタイ
コ酸 (LTA) を添加することによって阻止
された。また、このように LTA によって溶
菌が阻止された菌は、増殖できないが集落形
成能を維持し、すなわち静菌状態にあること
が明らかにされた。

2). ペニシリンの作用を受けた FDA 209P 株は、
直ちに、しかも大量の LTA を菌体外に遊離
した。一方クロラムフェニコールは、菌体外
への LTA の遊離を抑制するのが観察された。
なお、菌体外に遊離した LTA は脱アシル化
されており、autolysin 活性を阻害しなかった。

以上のことから、ペニシリンの直接的な作
用は静菌作用であり、殺菌作用は autolysin の関
与する二次的な溶菌の結果であることが結論
された。また、この溶菌は、ペニシリンが菌
体表層に存在する、autolysin の阻害因子である
LTA を遊離させる結果、autolysin が活性化さ
れておこる現象であることが明らかにされた。

稿を終えるにあたり、本研究の指導、校閲を賜、た口腔細菌学講座小谷尚三教授、本講座主任作田正義教授、ならびに本研究を行うにあたり機会を与えて下さいました川勝賢作大阪大学名誉教授に深謝いたします。

なおその間、終始ひとかたなりぬ指導と助言をいただきました口腔細菌学講座物中秀寿講師に厚くお礼を申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、さまざまなご援助をいただいた、口腔細菌学教室諸兄ならびに口腔外科学第二講座教室員各位に感謝いたします。

- 1) Izaki, K., Matsuhashi, M. and Strominger, J. L. (1966): Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: Penicillin sensitive enzymatic reaction. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (55), 656-663.
- 2) Strominger, J. L., Blumberg, P. M., Suginaka, H., Umbreit, J. and Wickus, G. G. (1971): How penicillin kills bacteria: progress and problems. Proc. R. Soc. Lond. B., (179), 369-383.
- 3) Rogers, H. J. (1970): Bacterial growth and the cell envelope. Bacteriol Rev., (34), 194-214.
- 4) Shockman, G. D., Daneo-Moore, L. and Higgins, M. L. (1974): Problems of cell wall and membrane growth, enlargement and division. Ann. N. Y. Acad. Sci., (235), 161-197.
- 5) Prestidge, L. and Pardee, A. (1957): Induction of bacterial lysis by penicillin. J. Bacteriol., (74), 48-59.
- 6) Rogers, H. J. (1967): Killing of staphylococci by penicillin. Nature (London), (213), 31-33.
- 7) Rogers, H. J. and Forsberg, C. W. (1971): Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J. Bacteriol., (108), 1235-1243.
- 8) Tomasz, A., Albins, A. and Zanoti, E. (1970): Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature (London), (227), 138-140.
- 9) Tomasz, A. (1974): The role of autolysins in cell death. Ann. N. Y. Acad. Sci., (235), 439-448.

- 10) Tomasz, A. and Waks, S. (1975): Mechanism of action of penicillin: Triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (72), 4162-4166.
- 11) 嶋谷雅博(1979): 黄色ブドウ球菌の自己融解のリポ^ユタイコ酸による調節とペニシリンによる殺菌 I. 自己融解の調節因子としてのリポ^ユタイコ酸の役割
阪大薬学誌, 24, 〇-〇, 昭和54
- 12) 医学研究所学友会編(1973): 細菌学実習提要, 丸善, 東京, 164-165, 昭和48.
- 13) Eagle, H. and Musselman, A. D. (1948): The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. J. Ext. Med., (86), 99-131.
- 14) Nishino, T. and Nakazawa, S. (1976): Bacteriological study on effects of beta-lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob. Agents Chemother., (9), 1033-1042.
- 15) Hartmann, R., Holtje, J. V. and Schwarz, U. (1972): Targets of penicillin action in Escherichia coli. Nature (London), (235), 426-429.
- 16) Fantana, R., Satta, G. and Romanzi, C. A. (1977): Penicillin activate autolysins extracted from both species Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae envelopes. Antimicrob. Agents Chemother. (12), 745-747

17) Alkan, M. L. and Beachey, E. H. (1978): Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci. J. Clin. Invest., ⑥1, 671-677.

LIPOTEICHOIC ACID FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS: REGULATION OF
AUTOLYSIS AND KILLING OF PENICILLIN

II. PREVENTION OF PENICILLIN-INDUCED LYSIS BY CELLULAR LIPOTEICHOIC
ACID

Masahiro SHIMATANI

*The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka University Dental School, 3-48, Nakanoshima 4-chome, Kitaku,
Osaka, Japan*

The lysis of Staphylococcus aureus FDA 209P induced by benzylpenicillin was completely inhibited by cellular lipoteichoic acid isolated from an homologous organism. The cells prevented from penicillin-induced lysis were in static state and did not lose viability. This shows that autolysin plays an essential role in the killing of the organism by penicillin. Treatment of S. aureus with penicillin caused the release into the medium of deacylated lipoteichoic acid, which has no more autolysin inhibitory activity.

Based on these results, the mechanism of bactericidal action of penicillin was discussed.

図1.

ペニシリンG添加による *S. aureus* の増殖阻止
と溶菌

最終濃度 0, 10, 40 および 400 ng/ml のペ
ニシリンGを添加(↑)

図 1

幅 5.0 cm 以上 縮小

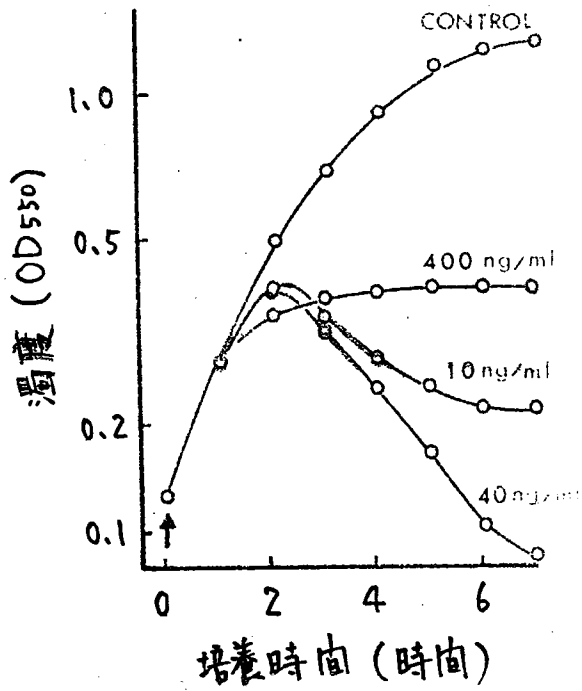


図 1

図 1

縮小 5.0 cm 以上

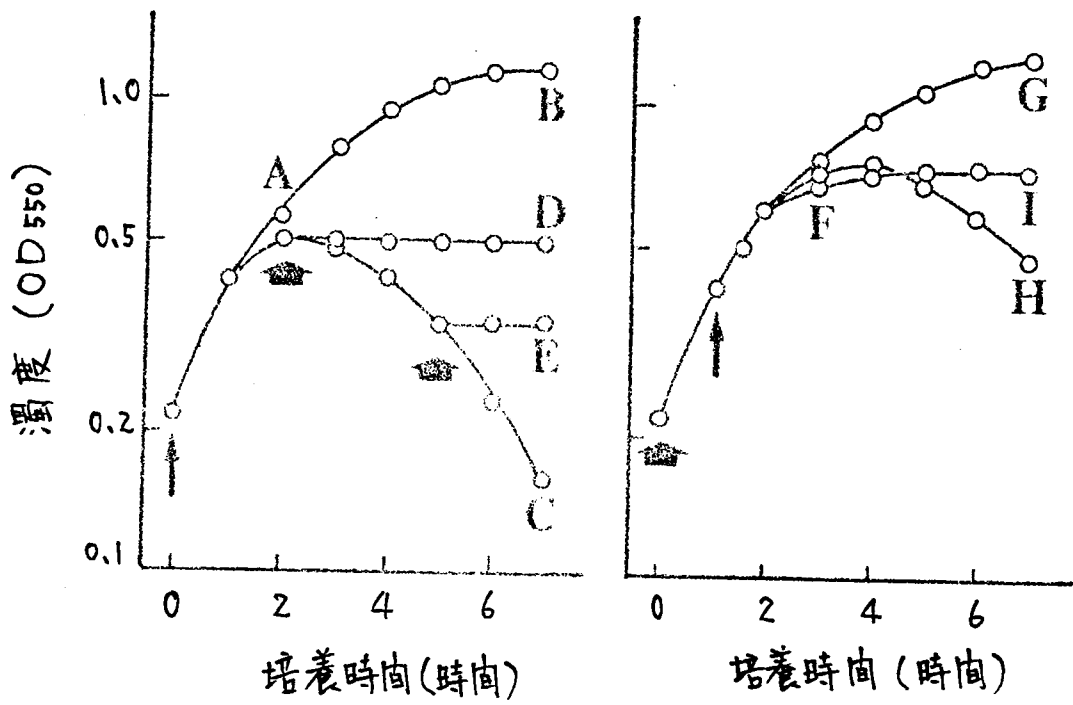
図 2

ペニシリン G に よる *S. aureus* の溶菌の リポ
タイコ酸による抑制

↑ ペニシリン G (40 ng/ml) 添加

↑ リポタイコ酸 (20 nmol/ml) 添加

A~H は 実験条件 (本文参照) および 生菌単
位数を測定した時点を示す。(表1参照)



2 图

図3

ペニシリンGあるいはクロラムフェニコール添加が *s. aureus* 菌体よりのリポタイコ酸の遊離に及ぼす影響

左図は、種々の濃度のPCG添加により1時間内に菌体より遊離されたLTA量を示す。

右図は、PCG (1) 40 および (2) 400 ng/ml) あるいはCP (10 μg/ml) を添加後経時的に調べた遊離LTA量を示す。

PCG: ペニシリンG CP: クロラムフェニコール

図 3

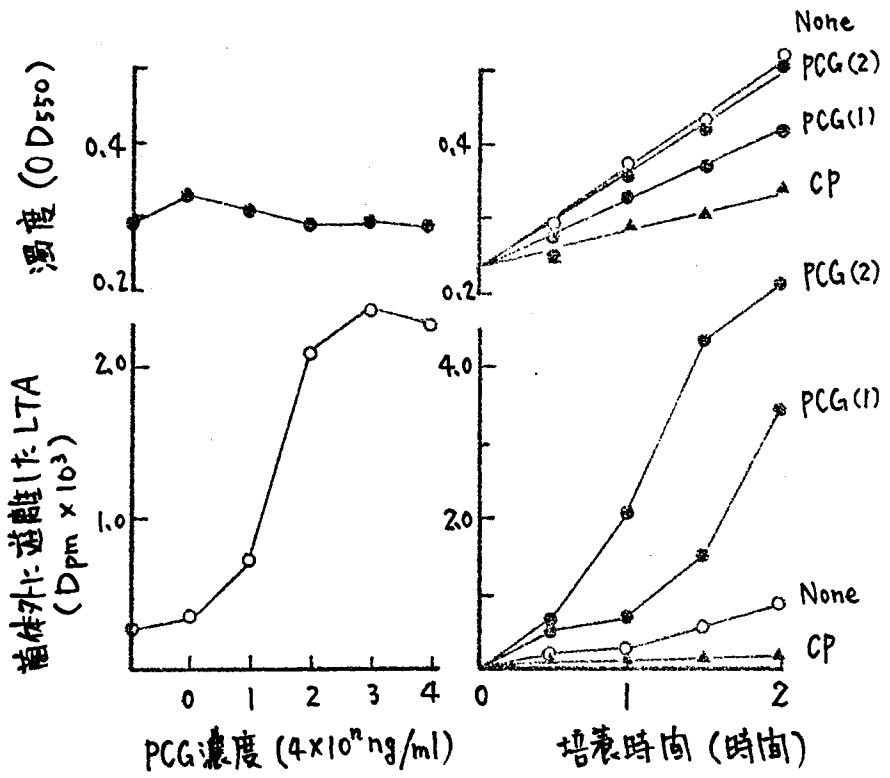


図 3

* 3

図4.

ペニシリンの殺菌作用機序の図解

J: LTA

∞ : グリカン鎖

⌋ : 脱アシル化されたLTA

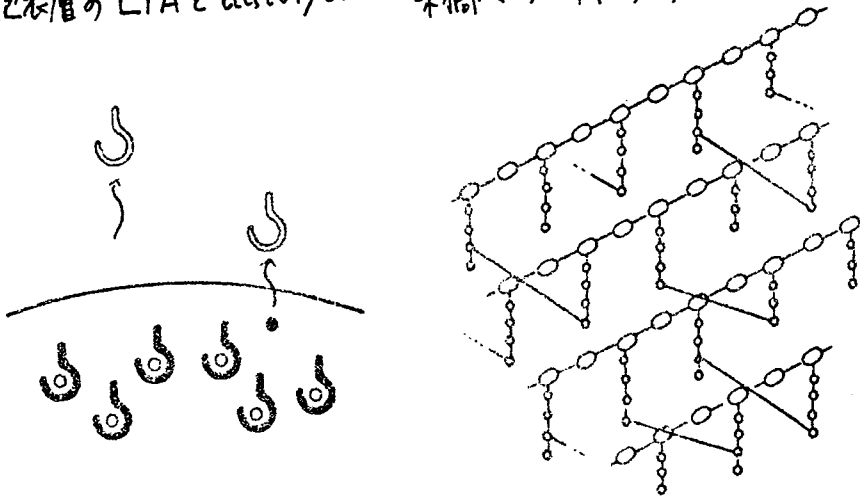
⊙ : 軸ペプチド

○ : 不活性化されている autolysin

— : 架橋ペプチド

● : 活性化された autolysin

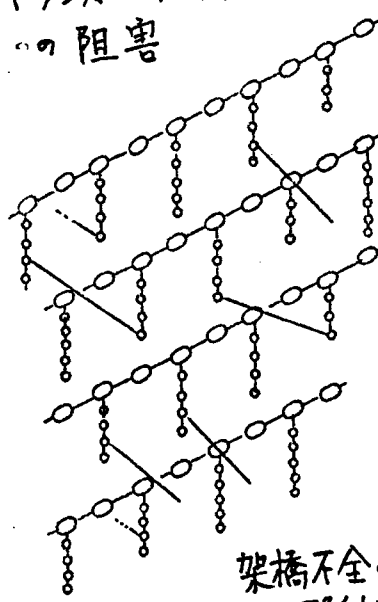
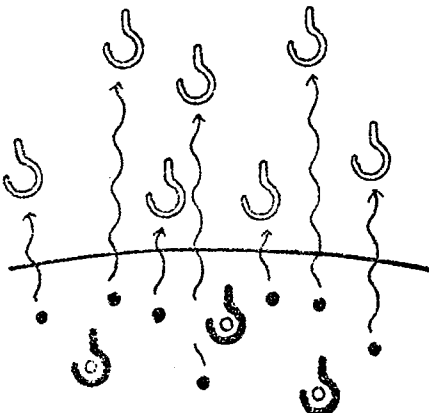
細胞表層の LTA と autolysin 架橋ペプチドグリカン



ペニシリン

リポタイコ酸
の遊離

トランスペプチダーゼ
の阻害



Autolysinの
活性化

架橋不全の
ペプチドグリカン

溶菌

図4

表 I.

ペニシリン G の殺菌作用に対するリボタイロ酸の影響

実験条件	生菌単位数** (CFU/ml)	
	2時間後	7時間後
未添加 (対照)		B* 4.0×10^9
PCGのみ添加	A* 2.2×10^8	C* 2.0×10^6
PCG 添加、 2時間後に LTA 添加		D* 1.2×10^8
5時間後に LTA 添加		E* 2.0×10^7

実験条件	生菌単位数** (CFU/ml)	
	3時間後	7時間後
未添加 (対照)	F* 3.6×10^8	B* 4.9×10^9
LTAのみ添加		G* 2.5×10^9
PCGのみ添加		H* 8.1×10^7
LTA 添加、 1時間後に PCG 添加		I* 4.4×10^8

* 図 2 の A ~ H を示す ** 菌が完全にばらばらになっていたため生菌数は生菌単位数とした。

PCG: ペニシリン G (40 ng/ml) LTA: リボタイロ酸 (20 ng/ml)