Osaka University Knowledge Archive

Title	Streptococcus faecalisとStaphylococcus aureusとの異属間L型細胞の融合に関する研究　Ⅰ．ヒト口腔レンサ球菌，特にS. faecalisよりのL型菌の誘導　Ⅱ．S. faecalisおよびS. aureus由来の安定ならびに不安定L型菌の細胞融合
Author(s)	戸田，洋一郎
Citation	大阪大学，1986，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35519
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	戸田洋一郎
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 7461 号
学位授与の日付	昭和61年10月13日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	***Streptococcus faecalis*とStaphylococcus aureus*との異属間L型細胞の融合に関する研究** **Ⅰ. ヒトロ腔レンサ球菌，特に*S. faecalis*よりのL型菌の誘導** **Ⅱ. *S. faecalis*および*S. aureus*由来の安定ならびに不安定L型菌の細胞融合**
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 鈴木不二男　助教授 斎藤 喜八　助教授 雫石 聡 講師 高田春比古

論文内容の要旨

細菌細胞間での種を越えての細胞融合に関する研究は極めて少ない。*Staphylococcus aureus*と*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sanguis*と*Streptococcus faecalis*ならびに*Streptomyces*の異なる種間でのプロトプラストの融合，またL型菌を用いた*Escherichia coli*と*Pseudomonas aeruginosa*の異属間融合の研究があるのみである。この研究では，まず*Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *Streptococcus salivarius*ならびに*S. faecalis*の4種の口腔レンサ珠菌についてL型菌を誘導することを試み，ついで得られた*S. faecalis* L型菌と*S. aureus* L型菌，すなわち属を異にするグラム陽性菌間での細胞融合を行った。

Ⅰ. 口腔から分離した上記4種，25株の菌株をブレイン ハート インフュージョン（BHI）ブロスに1%あるいは3%食塩，1,000単位／mlのペニシリンG（PCG），1%寒天を加えて作った平板培地に接種し，37℃で4週間培養して，fried egg状の集落を形成するL型菌の誘導実験を行った。その結果，*S. faecals*では供試した27株（口腔以外より分離した株を含む）のすべてがL型集落を形成するが，他の菌種ではL型集落の出現は全く認められないことが示された。*S. faecalis*の代表株について，種々の培養環境がL型集落の出現率（PCG無添加対照での全集落数に対する割合）に及ぼす影響を調べた。NaCl濃度については3%，また3%NaClを添加した際にはpHが7.2のとき，最大のL型集落の出現率（4×10^{-5}）が見られた。誘導に用いた培地のBHIを普通ブロスあるいはトリプチケースソイブロス（TSB）にかえても出現率は影響されず，ウマ血清の添加は出現率を低下させた。またPCG濃度，

種々のアミノ酸の添加ならびに二価イオン（$MgCl_2$と$CaCl_2$）の添加も，調べた限りでは，無影響であった。

誘導一代目のL型集落を呈する菌は，NaCl無添加のＢＨＩブロス，および３％NaClおよび50単位／mlのＰＣＧ加ＢＨＩブロス中では増殖しなかったが，ＰＣＧ無添加の３％NaCl加ＢＨＩブロス中では，接種後２週間以内に，その大部分が珠菌型の集落を呈しつつ発育した。この不安定L型菌を，50代以上ＰＣＧ添加の３％NaCl加ＢＨＩ寒天培地に継代培養することにより，ＰＣＧ添加の有無にかかわらず，３％NaCl加ＢＨＩブロス中で増殖するが，NaCl無添加のＢＨＩ平板上では集落を形成せず，また細胞壁ペプチドグリカン特有な成分であるムラミン酸を含まない安定L型菌（Ｔ－２株）を分離した。

Ⅱ．上述した安定L型菌から分離したストレプトマイシン（ＳＭ）耐性亜株〔Ｔ－２（ＳＭ）〕，カナマイシン（ＫＭ）耐性亜株〔Ｔ－２（ＫＭ）〕ならびにエリスロマイシン（ＥＭ）耐性亜株〔Ｔ－２（ＥＭ）〕ならびにＴ－２株の親株（珠菌型）であるＴＨ－６株のＳＭ耐性亜株〔ＴＨ－６（ＳＭ）〕より誘導した不安定L型菌を融合実験に供した。異属間細胞融合の相手とした*S. aureus*の安定L型菌は，クロラムフェニコール（ＣＰ）耐性あるいはテトラサイクリン（ＴＣ）耐性プラスミドを持つ，それぞれＦＰ－Ｌ（pCp）あるいはＦＰ２－Ｌ（Em^rpTc）株，ならびに染色体性のＳＭ耐性のＥＭＴ（Sm^r）株およびＣＰ耐性ＥＭＴ（Cp^r）株である。

*S. faecalis*と*S. aureus*のL型菌のそれぞれを，ＴＳＢに３％NaClと0.5％イースト抽出物を加えた基礎培地に一夜培養し，これら両L型菌（ともに10^9集落形成単位，ＣＦＵ）を同一遠心管に容れて遠心後，50％（Ｗ／Ｖ）のポリエチレングリコール6,000（ＰＥＧ）を加えて室温で１分間撹拌処理した。基礎培地で遠心洗滌してＰＥＧを除いた後，50単位／mlのＰＣＧを加えた基礎培地中で37℃18時間増菌培養を行った。この培養物を，パートナーとしたL型菌のマーカーとした両薬剤を加えたＴＳＢ寒天培地に混釈培養し，生じた二重耐性集落数の薬剤無添加の対照培地に生じる全集落数に対する割合を求めた。

1. ＳＭ耐性*S. faecalis* L型菌Ｔ－２（ＳＭ）株とＣＰ耐性プラスミドを持つ*S. aureus* L型菌ＦＰ－Ｌ（pCp）を混合してＰＥＧ処理し，ついで増菌培養することにより，ＳＭとＣＰに二重耐性を示す集落が10^{-5}～10^{-7}の割合で出現し，この出現率は，ＰＥＧ非処理の場合のそれの20ないし1,750倍の高率であった。増菌培養をしなかった場合，ならびにそれぞれの菌株を単独でＰＥＧ処理した場合などの対照実験では二重耐性菌は生じなかった。
2. 前項に述べた融合実験において，融合処理操作の全過程にDNase－Ｉを添加した場合，二重耐性集落の出現率は有意に影響を受けず，また融合に供するL型菌の一方を溶菌液とした場合には，逆に出現率が極端に低下した。またＰＥＧ処理を０℃とした場合にも，二重耐性集落の出現率は37℃での処理の場合と変わらなかった。これら１と２の結果は，二重耐性菌の出現に，形質転換，形質導入，接合の関与が除外ができることを強く示唆している。
3. *S. faecalis* L型菌，Ｔ－２（ＥＭ），Ｔ－２（ＫＭ）株あるいはＴ－２（ＳＭ）と，*S. aureus* L型菌，ＦＰ－Ｌ（pCp）あるいはＴＣ耐性プラスミドをもつＦＰ２－Ｌ（Em^rpTc）とを組み合せてＰＥＧ処理した場合にも，ＰＥＧ非処理対照のそれに比べ，250ないし640倍の高率で二重耐性集落

の出現が認められた。

4. しかし，*S. faecalis* T－2（SM），T－2（KM）あるいはT－2（EM）を染色体性の薬剤耐性を示す，*S. aureus* EMT（Sm^r）あるいはEMT（Cp^r）とを組み合せてPEG処理した場合には，二重耐性の集落はほとんど出現しなかった。

5. *S. faecalis* TH－6（SM）およびCP耐性プラスミドをもつ*S. aureus* MS353（pCp）の珠菌型のそれぞれから，不安定L型菌を誘導し，これらを一緒にPEG処理することによって二重耐性の融合体を珠菌型として分離することを試みたが，不成功に終った。

以上要約すると，*S. faecalis* L型菌と*S. aureus* L型菌との混合物をPEG処理により，属を異にするグラム陽性菌の間で細胞融合体を誘導し得ることを初めて明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本論文は口腔常在細菌を含む，グラム陽性細菌から安定L型菌を誘導し，薬剤耐性をマーカならびに細菌細胞融合体の選択に利用することにより，グラム陽性細菌の異属間細菌の細胞融合に初めて成功したものである。

第一報においてヒト口腔レンサ球菌のL型菌の誘導条件を詳細に明らかにし，第二報においてL型菌によるグラム陽性細菌の異属間細菌細胞の細胞融合体が誘導されることを証明した。

この業績は細菌遺伝学の今後の進展に新しい局面を開く可能性を秘めるものであり，歯学博士の学位請求に十分値するものと判定した。