

異常長大菌の生理学的研究

第 1 編

ペニシリン長大菌の酵素的性状及び細胞表面構造について

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上栄教授，指導：金政泰弘講師）

大 熊 晴 男

〔昭和 39 年 12 月 25 日受稿〕

緒 言

細菌が薬剤，放射線等各種の誘因によりその形態に変化を来す事実は古くから多くの研究者によつて報告されている。中でも腸内細菌のあるものは上記のような培養条件に於て，異常に長い紐状の形態をとることが知られている。この様な菌の長大化をひき起こす誘因として抗生物質¹⁾²⁾，紫外線³⁾，X線⁴⁾等がある。細菌は，それらの作用により分裂を抑制され，その結果菌体の長大化を招来するものと考えられる。この分裂阻害により長大化した菌の生理学的性状が正常に発育した菌のそれといかなる点に於て異つておるかを検討することは細菌の細胞分裂の機構を解明する端緒となるものと考えられる。この報告に於ては *Sal. typhi* H 901w を用いて酵素活性及び表面構造について検討を行なつた。

実験材料及び実験方法

培養基：市販の材料によるブイヨン，及び固形培地としては寒天を 3% の割合に加えたものを使用した。pH は 7.0~7.2 に調整した。

供試菌：当教室保存の *Sal. typhi* H 901w を使用した。

酸素消費量の測定：ワールブルグ検圧計を用い常法によつた⁵⁾。基質はいずれも市販品を用い必要に応じて pH を修正して使用した。

長大菌の調製：上記普通寒天培地に 37°C 18 時間前培養せる菌をペニシリン 1u/ml 含有普通寒天培地に塗布し，37°C に培養一定時間後にかき取つて使用した。X線による長大菌の調製は，同じく 18 時間前培養せるものを普通寒天培地に塗布し，X線 4000r 相当を照射した後に 37°C に培養した。

グルコースの定量：3,5-ジニトロ・サリチル酸による比色法によつた⁶⁾。

焦性ブドウ酸の定量：2,4-ジニトロ・フェニル・

ヒドラジンによる比色法によつた⁶⁾。

乳酸の定量：P-ヒドロキシ・ジフェニルによる比色法によつた⁶⁾。

免疫家兔血清：体重 2kg の家兔を用い，第 1 日加熱死菌を湿菌量 1mg，第 5 日同じく 5mg，第 8 日生菌 4mg，第 14 日同じく 10mg を家兔耳静脈に注入し，抗体価測定の上第 21 日に全採血を行ない，マーズニンを加えて使用した。

凝集反応，沈降反応及び吸収試験：細菌学実習提要⁷⁾の記載に従つた。

酸凝集反応：日立 pH メーターを用い，重フタル酸カリ-HCl，重フタル酸カリ-NaOH 系，Citrate-磷酸系及び酢酸ソーダ-HCl 系のそれぞれ pH 2.0~7.5 (M/20) の緩衝液階段を作り，緩衝液 1ml に濃厚菌液 2~3 滴を滴下し，室温に 24 時間放置した後凝集の有無を判定した。

酸可溶性抗原抽出法：トリ・クロル 醋酸 (TCA) を使用する Boivin の方法にならつた⁸⁾。普通寒天培地に 6 時間培養せる菌 (湿菌量約 5g) を，寒天を含まぬように洗い集め，0.85% 食塩水で 3 回洗滌し，エタノール：エーテル混液 (1:3 v/v) 50ml を加え振とうし，37°C 18 時間保存後，上清を捨て沈澱部を 25ml の蒸溜水に浮遊せしめ 5% TCA を等量加え，十分振とうし，4 時間氷室におき，その間時々振とうする。イソアミルアルコール 1 滴を加え消泡せしめ，10,000 r. p. m. 20 分遠沈，上清を透析し，アセトン 3 倍量を加え氷室に 3 日保存後遠沈，沈澱を乾燥保存する。(収量乾燥量 30mg)

酸可溶性抗原の加水分解：抗原乾燥量 10mg に 2ml の N-H₂SO₄ を加え，水浴中で 100°C 6 時間加水分解した。

構成単糖のペーパー・クロマトグラフィーによる定性：東洋濾紙 No. 50 (40×40cm) を使用。Phenol-水 (4:1, v/v)，n-Butanol-醋酸-水 (9:1:7, v/v) 及び醋酸エチール-醋酸-水 (3:1:3 v/v)

を使用した⁹⁾。

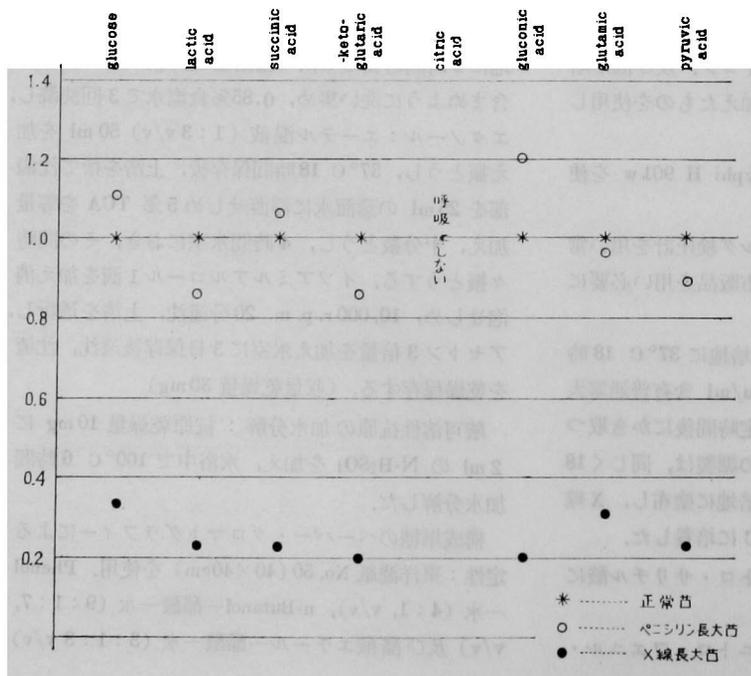
菌体グルコサミン定量：18時間培養せる菌を普通寒天及びペニシリン 1u/ml含有普通寒天培地に塗布し 37°C に培養，0，1.5，3.0，4.5，6.0時間毎に菌をかきとり 0.85%食塩水で 3回洗滌後，一方を溶封した肉厚ガラス管中に湿菌量 85mg/ml に懸濁した菌液 2ml を注入，更に 12N-塩酸 1ml を加えガラス管の他端をも溶封し，内容を十分混和した後 100°C 水浴中で 6時間分解した。後，封管を開き内容 1ml をとり 6N 苛性ソーダで中和後，水にて全量を 2ml とし試料とした。アセチル・アセトンを用いて発色せしめ 530m μ で吸光度を測定した¹⁰⁾。

実験成績

1. 各種基質についての酸素消費量の比較。

チフス菌をペニシリン 1u/ml含有固型培地上で 37°C，4時間培養せるもの，及び X線 4,000r 照射後，同様に培養せるもの及び対照として単に普通寒天培地上に 37°C，4時間培養せる菌について各種基質に対する酸素消費量をワールブルグ検圧計で測定した。基質はグルコース，乳酸，コハク酸， α -ケトグルタル酸，クエン酸，グルタミン酸を終濃度 0.05Mとなる様に加えた。酸素消費量の比較は対照

図1. 正常菌，ペニシリン長大菌及び X線長大菌の酸素消費量の相対的比率（正常菌の O₂ 消費を 1 とする比率で表わしてある）



菌（正常菌）のそれぞれの基質に対する酸素消費量を 1 とする比率で表した（図 1）。ペニシリン長大菌では各種の基質に対する酵素活性において正常菌との間に大差を見なかつたが，X線長大菌においては総ての基質に対する酸素消費量は著しく低下していることが認められた。

しかし，上述の結果からは一般的にペニシリン長大菌の酵素活性は X線長大菌の場合のように低下しておらぬことは認められるが，ある特定の基質に対して相対的に活性の低下している可能性は否定できない。そこで同様の方法により図 1 の実験とは別に 3 回実験を行なつた。そして各種の基質に対する正常菌及びペニシリン長大菌の呼吸量の比を，グルコースに対する長大菌及び正常菌のその比で除したものが図 2 である。

図に見られるように，ペニシリン長大菌においては，すべての基質に対する基質酸化能は正常菌と大差ないと考えられる。

2. 長大菌の呼吸商及び終末産物の比較。

ペニシリン長大菌及び X線長大菌の呼吸商及び終末産物を正常菌のそれと比較した。方法はワールブルグ検圧計を用い，グルコースを終濃度 0.1M に加え振とうし，呼吸商の測定を行ない，更に終了後直ちにフラスコ内容に 0.2M のトリクロル醋酸を加え

た後冷却し，5,000 r. p. m. 20 分遠沈後上清について化学的定量を行なつた。

その結果，ペニシリン長大菌，X線長大菌の何れに於ても呼吸商，終末産物生成に於て正常菌との間に差を認めなかつた。これを前述の実験 1 の結果と併せて考えるとペニシリン長大菌は基質酸化能は正常菌と殆ど変わりなく，X線長大菌では量的に全般的に活性が低下していることが知られた。

3. 長大菌の酸凝集性の比較

高橋¹⁾らによればペニシリンによる長大菌は細胞壁を有しているが細胞隔壁は長大菌中に形成されないといつている。又，Park を始めとする

図2. ペニシリン長大菌の各種基質に対する呼吸活性度の相対的比率

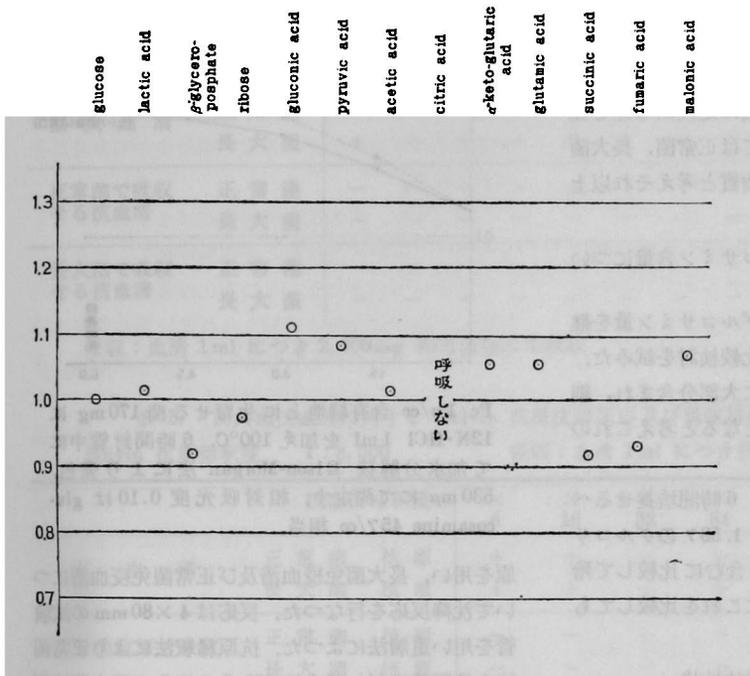


表1. 長大菌の呼吸商及び終末代謝産物の比較

	正常菌	Pc 長大菌	X線長大菌
酸素消費	11.9 μ M	13.4 μ M	4.6 μ M
C O ₂ 生成	11.7	13.6	4.5
呼吸商	0.98	1.02	0.98
Glucose 消費	7.4	7.2	2.8
Pyruvate 生成	0.5	0.3	0.2
Lactate 生成	0	0	0

基質：グルコース (0.1M)
 使用菌量：10mg (4.5時間培養)
 条件：ペニシリン, 1u/ml
 X線照射, 4000レントゲン
 pH 7.2, 37°C, 1時間振とう

表2. Penicillin, X線長大菌の酸凝集性の比較

緩衝液 (M/20) { 重フタル酸カリ-HCl-NaOH 系
 Citrate-Phosphate 系 (Mc-Ilvain)
 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 系 (Sørensen)

pH	2.2	2.5	2.7	3.0	3.2	3.5	3.7	4.0	4.2	4.5	4.7	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
正常菌	-	-	-	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
X線長大菌	-	-	±	-	±	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin 長大菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

上記緩衝液に濃厚菌液 2-3 滴を落とし室温にて 24hr 後に判定
 菌培養時間は何れも 4hr 培養せるものを使用。

一連の研究によりペニシリンはグラム陽性菌の細胞壁の合成を阻害するといわれている。したがってグラム陰性菌であるチフス菌においても長大菌形成を生ぜしめる諸種の要因は結果として菌の表面構造を変化させそれが分裂阻止即ち長大菌形成という現象を招来せしめるのではあるまいかと考えられる。以上の見地より既述の方法により長大菌の酸凝集性の比較を試みた。緩衝液としては実験方法の所で述べた3種の緩衝系について行なつたが、pHの重複した個所に於ても殆んど同様の実験結果を得た。

表2に示した如く、Sal. typhi H 901w のS型菌の4hr培養菌(正常菌)はpH 3.7を中心とし3.2~4.2にわたる狭い凝

集域を有しているに反し、長大菌ではいずれもその凝集域が酸性側に傾いており、特にペニシリン長大菌ではその凝集域も広く2.5~4.5の範囲にわたつて凝集が認められた。

4. ペニシリン長大菌の単糖構成

上記酸凝集実験の結果より、長大菌では正常菌に較べて細胞表面構造に変化を来していることが推定される。酸凝集実験に於て最も顕著な結果を示したペニシリン長大菌について、菌の表面構造に関係する成分、Boivin 劃分を抽出しその構成単糖の比較を行なつた。同定は試料と同時に既知の対照糖を展開し、aniline hydrogen phtharate 溶液により発色せしめた。同定は既知の対照糖を同時に展開し、三種溶媒での斑点の相互の位置関係、発色色調及び

Rf 値を参考して同定した。

同定の結果、正常菌、長大菌いずれの試料中にもラムノース、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノース、グルコサミン及びその他1種の未同定の糖の7種を検出し両者の間に定性的な差を見なかつた。尙未同定の糖については正常菌、長大菌両者の分割中に見出され同一の物質と考えそれ以上の追求は行なわなかつた。

5. ペニシリン長大菌のグルコサミン含量について

ペニシリン長大菌の含有するグルコサミン量を継続的に追求し、正常菌のそれと比較検討を試みた。グルコサミンは細菌の細胞壁中に大部分含まれ、細胞壁成分の量的関係を表す指標となると考えこの定量を行なつた。

既述の方法による実験の結果、6時間培養せるペニシリン長大菌は湿菌1mg 当り 1.53γ のグルコサミンを有し、正常菌が 1.58γ を含むに比較して殆ど差を認めなかつた。又経時的にこれを比較しても両者の間に大差を認めなかつた。

6. ペニシリン長大菌の血清学的性状

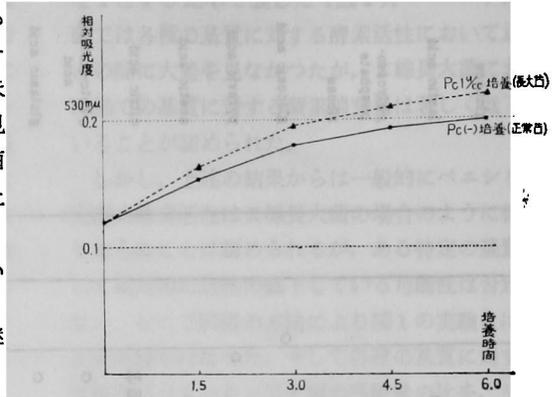
既述の方法により6時間培養せる正常菌及びペニシリン長大菌を抗原として得た2種の家兔免疫血清について抗原抗体反応を行ない、その異同を検討した。

A. 凝集反応：長大菌抗血清及び正常菌抗血清と6時間培養のペニシリン長大菌及び正常菌の生菌、エタノール処理死菌、100°C 2時間加熱死菌との間に凝集反応を行なつた。表3はその一部でペニシリン長大菌抗血清に対する凝集試験である。

表の如く凝集価に於て長大菌、正常菌の間に全く差異を認めない。これは又正常菌抗血清を用いた場合も同様であつた。

B. 沈降反応：既述の方法で調製した Boivin 抗

図3. 菌体 Glucosamine 含量の推移



Pc 1u/cc 含有培地上に生育せる菌 170mg に 12N-HCl 1ml を加え 100°C. 6時間封管中にて加水分解後 Elson-Morgan 法により発色、530mμ にて測定す。相対吸光度 0.10 は glucosamine 45γ/cc 相当。

原を用い、長大菌免疫血清及び正常菌免疫血清について沈降反応を行なつた。反応は 4×80mm の試験管を用い重層法によつた。抗原稀釈法により正常菌抗血清原液に対し反応後 120 分の読みで長大菌抗原、正常菌抗原両者共に 64000 倍稀釈まで沈降反応陽性であつた。この場合の抗原稀釈度は乾燥抗原 1mg を 1ml に溶解したものを抗原 1000 倍稀釈液とした。又長大菌抗血清に対しては長大菌抗原で 64000 倍、正常菌抗原で 32000 倍まで反応陽性であつた。

C. 吸収試験：長大菌及び正常菌抗血清を全菌体又は酸溶性抗原を用いて吸収した吸収血清について凝集反応及び沈降反応を行なつた。

i) 吸収凝集試験：吸収血清の調製は次の如くである。即ち、抗血清 1ml に洗滌菌 500mg を 1ml に懸濁した菌液 4ml を加え 37°C で 2時間反応させた後氷室に一夜おき、後遠心し上清を用いた。吸収菌には長大菌、正常菌の生菌を用いた。

表3. 長大菌抗血清に対する凝集反応

	抗原	血清稀釈										対照
		200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	61200		
生菌	Pc 長大菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	正常菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
95% エタノール 10分処理	Pc 長大菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	正常菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
100°C 30分加熱処理	Pc 長大菌	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
	正常菌	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	

表 4. 長大菌抗血清に対する吸収試験
無処理菌(生菌)

		×	×	×	×	×	×	×	×	対照			
		50	200	800	3,200	12,800	51,200						
原 抗 血 清	正 常 菌	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	長 大 菌	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
正常菌で吸収 せる抗血清	正 常 菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	長 大 菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
長大菌で吸収 せる抗血清	正 常 菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	長 大 菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

吸収：血清 1ml につき 2,000mg 相当湿菌にて吸収

表 5. 長大菌抗血清に対する Boivin 抗原沈降反応及び吸収試験(重層法による)
Boivin 抗原稀釈度 1:8,000 吸収：血清 1ml につき抗原 8~4mg

			抗血清稀釈度	×	×	×	×	×	×	×	×	Control
				8	16	32	64	128	256	512		
原 血 清	正 常 菌	抗 原		+	+	+	+	+	-	-	-	-
	長 大 菌	抗 原		+	+	+	+	-	-	-	-	-
正常菌抗原で吸収	正 常 菌	抗 原		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	長 大 菌	抗 原		-	-	-	-	-	-	-	-	-
長大菌抗原で吸収	正 常 菌	抗 原		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	長 大 菌	抗 原		-	-	-	-	-	-	-	-	-

(2時間後判定)

表 4 はペニシリン長大菌抗血清を、正常菌で吸収を行なった抗血清及び長大菌で吸収を行なった抗血清について凝集反応を行なったものである。いずれの吸収血清についても、長大菌又は正常菌に個有の特異的な抗体の残存は全く認められなかつた。又、正常菌抗血清について同様の吸収試験を行なった結果、正常菌抗血清も全く同様の結果を示した。

ii) 吸収沈降反応：長大菌及び正常菌抗血清を長大菌又は正常菌の酸溶性抗原で吸収し、それぞれについて沈降反応を行なった、吸収は最適比でもつて行なった。最適比は Pc 長大菌抗血清：Pc 長大菌抗原=4000：1, Pc 長大菌抗血清：正常菌抗原=8000：1, 正常菌抗血清：Pc 長大菌抗原=8000：1, 正常菌抗血清：正常菌抗原=8000：1 であつた。

表 5 は長大菌抗血清に対する沈降反応(血清稀釈法)及びその吸収沈降反応である。その結果は吸収凝集試験の場合に得られた結果と同様である。

以上、実験 A) 及び B) について得られた結果を総合すれば、ペニシリン長大菌の血清学的性質は少くとも既述の実験方法による限りでは正常菌のそれ

と全く同一であるといえる。

考 察

細菌が薬剤等の作用により分裂を阻止せられ長大菌を形成する現象については古くから知られているが、近年に至り、この長大化した菌の生理面に新たに検討が加えられている。即ち、上条¹⁾ はペニシリンによる長大菌について、細胞化学的方法により、長大菌中の核様体は多核であり、細胞壁は認めるが細胞隔壁を認めず、ペニシリンによる長大菌は細胞質の連絡した紐状の一個の細胞であり、ペニシリンを除くことにより容易にその一部は原型に復すると述べている。ペニシリンが細菌の分裂機構のいかなる点に作用して分裂障害をひき起すかについては興味ある所であり、逆にその機序を知ることにより、複雑かつ総合的に作動しているであろう所の細胞分裂機構の一部を解明することができると思われる。

まず、このペニシリン長大菌の呼吸様式の変化についての結果を検討してみれば、金政⁴⁾ によると X 線により形成された長大菌では菌の呼吸は著明に低

下していることが示されており、又マイトマイシン長大菌については TCA サイクルの一部の基質に対する酸化能の低下が認められている¹²⁾。この点について、ペニシリン長大菌に於てもこれらの現象が認められるか否かについて検討したが、ペニシリン長大菌では基質酸化能の質的及び量的な変化は見出されなかつた。即ち、ペニシリンの作用下にあつても菌の呼吸酵素系の合成は正常菌と全く変わらず滞りなく進行していることが示された。このことは X線又はマイトマイシンによる長大菌に於て見られる特定乃至全般的な基質酸化能の低下は細胞の X線照射もしくはマイトマイシン処理による副次的な作用であり、特定の呼吸酵素系の活性低下が直接に菌の分裂障碍に結びつくものではないと考えられる。

又、Park, Strominger 等の研究により解明された様に、ペニシリンはグラム陽性菌の細胞壁に作用し、細胞壁の構成成分である アミノ酸-UDP-N-アセチル・グルコサミン複合体 (所謂 Park のヌクレオタイドの細胞壁基本構造への結合を阻げるとされている¹³⁾。このペニシリンの作用により所謂 Proto-plast が形成される¹⁴⁾といわれているが、著者の実験に用いたチフス菌に対してはその発育阻止濃度附近では Proto-plast 形成は全く見られず、ただ長大菌形成のみを起し、この長大菌について細胞壁染色を行なつた結果でも上条がのべている如く、細胞隔壁こそみられないが、細胞壁は正常菌の場合のように明らかに認められた。又菌体グルコサミン含量に於ても正常菌に比して減少していないことは、グルコサミンが大部分細胞壁に存在することからみて長大菌の細胞壁中のグルコサミン成分の減少のないこと、即ち Park の nucleotide の菌細胞壁への結合は阻げられてないことを示している。したがつて長大菌形成は高濃度のペニシリンを菌に作用させた時に

みられる Proto-plast 形成とは異なるものである。そして又 Boivin 分割中の多糖類に関しても R型菌に見られるような構成単糖の欠落¹⁵⁾も認められず、又血清学的にも何等の抗原の欠落或は新生も認められず、かかる化学的・免疫学的性質において長大菌の壁構造は正常菌のそれとよく似かよつておることが示された。

しかし乍ら、長大菌の表面構造は正常菌のそれと全く同一でないことは菌の凝集域が著しく変化していることから示される。この変化は著者の用いた化学的・免疫学的方法では捕えられない微妙な変化ではあるが、それが多分裂抑制即ち長大菌形成と密接な関係を有しているものであろう。そしてペニシリンそのものが細胞壁に直接作用してかかる壁構造に変化を与えるのか、或は分裂に必要な他の系に作用して結果として壁構造変化を来さしめるのか、或はその両方の場合であるか今後とも検討の余地があると思われるが、いずれにしてもこの長大菌形成はペニシリンにより、最終的に細胞壁成分に変化を来し、細胞隔壁形成障碍による結果として表われる現象と考えられる。

小 括

1. *Sal. typhi* H 901 w はペニシリン 1 u/cc の存在で長大菌を形成する。その長大菌の各種基質に対する酸化能を正常菌のそれと比較した結果両者の間に質的及び量的に差を認めなかつた。
2. ペニシリン長大菌は酸凝集性が正常菌と異つている。
3. ペニシリン長大菌の菌体グルコサミン含量は正常菌に比して減少しておらず、ペーパークロマトグラフにより両者とも同じ 7種の単糖成分を有する。
4. 両者の間に血清学的に差は認められない。

参 考 文 献

- 1) 嘉納正武, 日本細菌学雑誌, 8: 769, 1953.
- 2) 秋葉朝一郎, 上条清明, 科学, 23: 459, 1953.
- 3) R. D. Deering, J. Bact., 76: 123, 1958.
- 4) 金政ほか, 日本細菌学雑誌: 16: 686, 1961.
- 5) W. W. Umbreit et al. Manometric Techniques.
- 6) 江上不二夫ほか, 標準生化学実験, 18, 35及び 36, 文光堂, 1953.
- 7) 伝染病研究所編, 細菌学実習提要, 233, 丸善, 1954.
- 8) 同上, 319.
- 9) 佐々木禎一, 日本細菌学雑誌, 11, 11, 1956.
- 10) S. P. Colowick & N. O. Kaplan, Methods in Enzymology vol. III. 95, Academic press inc., 1957.
- 11) 上条清明, 日本細菌学雑誌, 9: 129, 1954.
- 12) 大熊晴男, 岡山医学会雑誌, 印刷中.
- 13) I. C. Gansalus et al. The Bacteria vol. III, 411, Academic press, 1962.
- 14) 同上 vol. I, 297. 1962.
- 15) J. Beckmann et al. Nature, 201, 1301, 1964.

Physiological Approach to Filament Cells.

**I. Studies On the Enzymic Aspects and Surface Structure of
Filament Cells Induced by Penicillin.**

By

Haruo Ohkuma

Department of Microbiology, Okayama University of Medical School, Okayama, Japan.
(Director: Prof. S. Murakami)

The abnormal filament formation of *Sal. typhi* was observed on penicillin containing nutrient agar in 1u/ml.

Characters of the filament cells were compared with normally harvested cells in the view points of oxidative activities to some substrates, acid agglutinating property, glucosamine content and serological properties.

No difference was observed about the oxidative activities, the glucosamine content and the serological properties. With respect to the acid agglutinating property, as compared with the normal cells, the filament cells exhibited a property to agglutinate in broader PH range.
