

綜 説

最近の細菌毒素の進歩について

金沢大学医学部細菌学教室

教授 西 田 尚 紀

初期の細菌の Products の仕事の中では「毒素」はそれなりはかなり正確な意味——即ち高分子の毒性物質という——をもつておつたわけであるが、ここに Antigenicity という問題が入つて来て Exotoxin と Endotoxin との2つに分けられるに至つた。Exotoxin に属するものは Growth の途中盛んに菌体外に出るばかりでなく、菌体を収獲してみても、菌体の中に毒素を発見し難く常に培養液の中にあるのに対し、Endotoxin に属するものは主として Autolysis や或いは故意に菌体を壊すことによつて出るものである。しかしながら、排出のあり方によるこの分け方は頗る曖昧なものであるから、実際としては物そのものの属性——例えば Antigenicity の有無——を Criteria として Exotoxin と Endotoxin とを鑑別した方が良いということで、今日我々は次の如き Criteria を設け、Exotoxin と Endotoxin とを区別している。¹⁾ Exotoxin は

- (1) 熱、紫外線その他の化学薬品に弱い。
- (2) 蛋白(主として単純な蛋白で複合蛋白ではない)で Formalin によつて容易に Toxoid 化する性質がある。
- (3) 抗原性がなく毒素を中和する抗体をつくる。以上を化学的性質とすれば病的には
- (4) 特定の組織例えば心筋(ジフテリア毒素)、神経細胞(テタヌス、ボトリヌス)、副腎(ジフテリア毒素)を襲い、却つて毒素の同定に病理症状を見るのが常である。

Endotoxin はどうかといえば上述の反対と思えばよいが、少し註釈を必要とするものとしては²⁾の項では Endotoxin は沈降原などのよい抗原とはなり得ても常に毒性基をふさぐ抗体を発生し得ないこと、又⁴⁾の項では nonspecific Symptom 例えば熱とか血圧下降³⁾とか共通した現象を起してくることを附記しておきたい。

現在我々はかくの如く属性にむかつて Exo-或いは Endotoxin と呼ぶのであるから菌体の中から Exotoxin のカテゴリーに属するもの、菌体外の濾液の中から Endotoxin のカテゴリーに属するものを抽出したといつても異とすることではない。元来 Exotoxin は菌体の中に発見されないものとされていたのを最初に打破したのはかなり古く、1927年 Nelson がボトリヌス毒素を³⁾菌体から抽出しているのである。最近になつて Raynaud⁴⁾ 東山ら⁵⁾が別々に(東山の論文は残念ながら戦争のギャップで発表が遅らされたが)菌体より抽出し、志賀菌毒素に関しては林⁶⁾最近 Van Heyningen⁷⁾によつて極めて強力な Exotoxin が抽出されるに至つている。ジフテリアに関しては Gonzalez ら⁸⁾ 西田⁹⁾の報告はあるが菌体から充分に得たものといひ難い。

この綜説では Endotoxin にはふれないで Exotoxin についてなされた目立つた研究を紹介するのが私の意図である。1957~1959年ヨーロッパに滞在した私は直接これらの研究者に会いその実際にふれることが出来たので彼等の印象を頭にえがきつつ述べて見たい。

現在得られている最強の毒素は Lamanna¹⁰⁾¹¹⁾らのボトリヌス毒素の結晶である。その分子量は 900,000 であり、毒性は 2.8×10^{16} mld for mouse per mole に相当している。1 mole の中に含まれる分子数を 6.06×10^{23} とすれば 1 mld (最小致死量) for mice は 2×10^7 molecules となる。mouse の神経細胞を仮に 2.5×10^6 とすれば 1 個の神経細胞を 8 molecules の毒素がたおす計算になる。最高の毒力をもつ薬品であるアコニチンには weight for weight で 15,000 倍、1 molecule としての比較では 2×10^7 倍となる¹²⁾。

Table I に Bacterial Toxin の毒性の比較を示したが、いかに細菌毒素がつよいものであるかが判るかと思ふ。

Recent advances in bacterial toxins. Shōki Nishida, Department of bacteriology, School of Medicine, University of Kanazawa.

Table 1. Toxicity of various Toxins for mice

Toxin	MLD/mg or LD ₅₀	N%	Addendum
Typhus, Para-A· B·Toxins (13) (14)	10	2~3	
S. typhi toxin (15)	200	7.35	
Past. pestis toxin (16) (17)	86,000 (LD ₅₀)	13.4	fairly purified
Sh. shiga toxin (18)	40,000 (LD ₅₀)	15.6	fairly purified
H. pertussis toxin (19)	10,000 (LD ₅₀)	—	partially purified
Cl. Welchii toxin (20)	10,000 (LD ₅₀)	—	partially purified
Cl. tetani toxin (21)	10 × 10 ⁶	16.3	crystalized
Cl. botulinum toxin (22) (23)	31 × 10 ⁶	15.7	crystalized

しかしながら毒素産生力 (Toxigenicity) がつよいことは直ちに Virulence に関係があるとはいえない。それどころか現在抗毒素血清に使用されている特に toxigenic Strains のすべてが avirulent であるという奇妙な事実がある。例えばジフテリアにおける Tronto 株, Tetanus における Harvard 株, Welchii における SI07 或いは SR12 は皆そうである。

Van Heyningen が志賀赤痢菌から抽出した際に用いた菌は avirulent な R 型である。ボトリヌス菌は最高に toxigenic であり得ても、ボトリヌス菌自体は決して virulent ではあり得ない。人間がボトリヌス中毒を起すのは菌が食物の中でボトリヌス毒素を出すからであつて、菌は生体の中に全く侵入し得ない。このように菌の Toxigenicity は菌の Virulence を構成する色々な Factors のうちの独立した 1 つの Factor であることが判る。

Virulence を構成する諸因子をここで一応説明し、Toxin の占める位置を明らかにしておきたい。Dubos²⁴⁾ は次の如く説明している。

1. Communicability (通過能力) 普通「伝達性」と訳されているがこのの方が判りよく、直訳でもあるのでこう訳しておく。

Virulence を發揮するためには、侵入すべき細菌は先ず生体表面の粘膜、時としては皮膚を通過しなければならない。Young²⁵⁾ Zelle²⁶⁾ らは B. anthracis (脾脱疽菌) の 4 種の変異性を用いて実験した時モルモットの皮下に注射すれば、いずれも等しい Virulence を持っているのに、呼吸器から吸引させると著しい差のあることを発見した。ツラレミヤでは皮膚でこの現象が見られる。皮下注射するといずれも等しい Virulence をここでも發揮するのに剃毛した皮膚の上にこの菌の Emulsion をなすりつけた時の発症能力は大変違ふ。

これはツラレミヤ菌が皮膚を通過しうる数少ない菌の 1 つではあるが、この能力はしばしば失われ勝ちだからである。しかしこれらの能力こそ家兎或いは人への virulent, avirulent の鍵となつているものである。

2. Invasiveness (侵襲性)

たとえ通過し得たとしても淋巴球、白血球、組織球、網状内被細胞或いは抗体の形成など、様々の生体の phagocytting Systems との戦いが起るであろう。この戦いは生体の防禦機構と細菌との界面で行われるわけであるが、ここで Gram positive の菌と negative の菌とでは大いに異ならざるを得ない。Gram negative の菌は所謂 O-抗原をその表面にもつているものが virulent なものである。O 抗原では主として Polysaccharide が 50~80% を占めている。Protein がなお 20% 前後を占めるのが常であるが蛋白が本質的に毒性にあずかるかどうかは疑わしい。寧ろ否定的である。しかしとにかく O-抗原は Lipo-polysaccharide-protein-complex として現在規定されている。このものは "hardly soluble" な形で菌体表面にあり我々はこれは S-抗原或いはピリジン、フェノール或いは醋酸などの所謂 drastic な操作を経て抽出する Boivin-抗原とも呼ぶものである。S 抗原の喪失は S→R 変異或は O→φ の変化として表示されるもので、そのまま avirulent Strain への変化である。

Gram positive の菌は総じて自己の菌体表面にこのような防禦抗原を持つていない。例外としては肺炎菌の夾膜 (polysaccharides), Streptococcus の M-protein, B. Anthracis (脾脱疽菌) の夾膜 (Glutamyl polypeptide) の如きものがあげられ、従つてこれらの菌の侵襲力は Gram negative の菌のそれらに劣らない。但しその他の Gram positive の菌は自己の Surface Layer に殆んど防禦抗原を持つていない。しかしながら恰も「攻むるは守る也」とでもあるかのように Gram positive の菌には生体組織と菌との界面で強く諸種の組織破壊に働く Enzymes が產生されるのは注目し得る。これらの酵素はいずれも發育に応じて外に排出されるものであり、菌体内には却つて求め難い。Welchii の出す Enzymes は別に述べるから今ここで Staphylococcus と Streptococcus について見ると、Staphylococcus では²⁷⁾

- 1) α-haemolysin
- 2) β-haemolysin
- 3) γ-haemolysin
- 4) staphylocoagulase
- 5) hyaluronidase
- 6) leucocidin
- 7) fibrinolysin
- 8) protease
- 9) lipase

Streptococcus では¹²⁾

1. streptolysin O
2. streptolysin S
3. fibrinolysin
4. desoxyribonuclease
5. hyaluronidase
6. proteinase

などの酵素群が産出される。

Coagulase, Hyaluronidase と *Staphylococcus* の Virulence と密接な関係にあることは確立された事実であるが、それはこれらの酵素が「攻める」ことによつて「守り」の O-抗原の役に代つていることを示すものに外ならない。

しかしながら私はここで、Gram positive でしかもこれらの O-抗原にもかかわるべき酵素群——単に Toxins といつていいすぎなら Aggressin の意味での Toxins といえる——をも出さない菌について考えたい。これらの菌は phagocytting Systems と殆んど抗争出来ず virulent であることが仲々にむつかしいであろうことが予想されるに違いない。誠に、テタヌスは組織の破壊による phagocytting Systems の破壊がなければ——ボトリヌスはそれがあつても駄目——到底 virulent 足り得ぬのである。そこに又ジフテリア感染症——Gram positive で且つこれらの Aggressin としての Enzymes を殆んど出すように見えぬジフテリア菌の Virulence——の問題が在在するのである。

ジフテリア症の成立について

ジフテリア菌が Gravis, Mitis, Intermedius 型に分けられ Gravis 型, Intermedius 型が重症に多く発見され、Mitis は軽症若しくは無症状のケースから発見されるケースの多いことを Anderson 等が報告して以来、この問題について沢山の論議がついやされている。この事実は大体英国の学者に承認されているが^{28) 29)} 米国では必ずしも認容されていないようである。しかし無症状のケースから発見されるジフテリア菌の殆んどが Mitis 株であることは事実である。又これらの Toxigenicity を検査しても総じて Gravis の毒素が Mitis の毒素よりも強いと多くの strains を用いて K. Zinnemann は述べている³⁰⁾。しかし先述の如く Toxigenicity は必ずしも Virulence と平行するものでなく Mitis 株の中にも Gravis より toxigenic のものはいくらかあることは英国の学者も認めている。

Zinnemann の Data からジフテリア感染症の菌側の与件としてはジフテリア毒素そのものも Virulence に関与していると考えるべきであるが、これのみでないことも明白である。

1. ジフテリア菌自体の中に感染によるその他の Factors 例えば *Staphylococcus* の Coagulase にお

ける如き Aggressin の如きもの或いは O-抗原の如き Phagocytosis に抗する Surface Antigens の存在の可能性

2. 或いは両者とも今に至るもさして明らかにされていない所から、テタヌスの如く他力本願例えば streptococcus 或いは staphylococcus 等の Focal mixed Infection に toxigenic なジフテリア菌が Virulence を発揮する可能性をもつという2つの問題が提起される。

O'Mera³¹⁾ 等が Gravis など virulent な株にジフテリア毒素に中和されない毒素があることを述べて注目されたが、多くの学者はこれに対して否定的である。Hewitt³²⁾ は virulent diphtheria を「より少量より感染し得る Strain」と規定し toxigenic か否かを問題とすべきでないと述べている。尤もな意見であるがこのこと自体は何も明らかにしていない。彼は同時に dermonecrotic Action の強いジフテリア菌はより virulent であると述べたのは、この dermonecrotic Toxin がジフテリア毒素とどのような関係にあるかを検討すれば一層興味ぶかいものとなつたに違いない。何故ならば、最近 Poulik^{33) 34)} が Starch Zone Electrophoresis でジフテリア毒素を分析し、毒素分割の中には lethal and necrotic Toxin (これは従来のジフテリア毒素) と共に strongly necrotic but not lethal Fraction を示しているからである。Orr-Ewing³⁵⁾ はジフテリア菌の Phagocytosis に対する抵抗力を検討し Gravis 株が Mitis より強いと述べたのも又注目すべきである。Pope^{36) 37)} によれば精製されたジフテリア毒素の中になお DNA-ase の存在することを、又最近 Niggemeyer³⁸⁾ が Gravis 株に本来のジフテリア毒素と異なる皮膚毒の存在を主張している。単に toxic Principle そのものをとりあげることに過去集中しすぎたけれども、ジフテリア菌の multiple Toxins の可能性と感染の問題を今一度考えて見るべきであると思う。

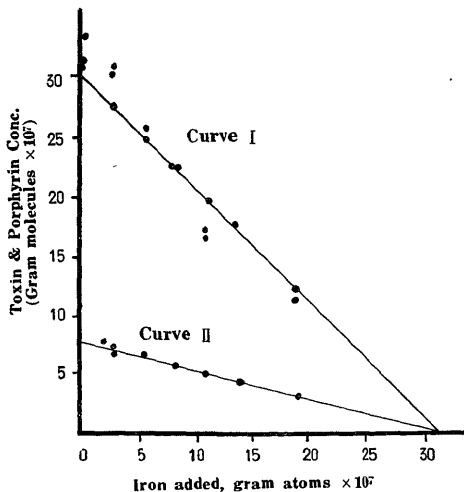
それでは今1つの問題として Streptococcus や他の菌と Focal mixed Infection が関係しているかは古来論議されつづけられている。最近の考えではこれに対して否定的であるが³⁹⁾、既に古く関屋⁴⁰⁾ は実験ジフテリアの成立のためには、極めて微量の Staphylo-toxin とジフテリア菌とを混ざることによつて容易になしとげ得ることを述べている。ジフテリア菌の Invasiveness の弱さから考えて、最近頃に明らかにされつつある Streptococcus の型との関連において更に検討すべき問題ではなからうか。実際ジフテリア症が冬に多いことなどを考えて客観的な条件がかなり関係するものと思われる。これらの検討がなされる前に

ヨーロッパからジフテリアは姿を消し、従つて彼等はこの問題にあまり興味を有していないように見える。

以上私はジフテリア毒素をジフテリア感染症との関係のうちに明らかにしようところみだが爾後 Toxin 自体の研究について述べて見たい。ジフテリアの毒素を見ることは生化学的にも、生物学的にも飛躍して発展する細菌毒素の縮図を見ることである。

ジフテリア毒素の研究の燎原に火をつけたのは1947年の Pappenheimer⁴¹⁾ の論文である。そもそもジフテリア毒素の形成に Fe⁺⁺ の存否が死活をもつ重要なことを発見したのは彼で、これより 11 年前⁴²⁾ の論文でこれを示している。ジフテリア毒素は、培地に加えられた Fe⁺⁺ が 1 γ /cc でその形成は完全に阻止される。Fe⁺⁺ が少なすぎる時は Growth が制約をうけて生えないので毒素は出来ない。しかし 0.2 γ /cc 以後は Growth はよくなつて行くが毒素は次第におさえられるカーブを示す。後、彼は毒素——排出されるポルフィリン量——Fe⁺⁺ の関係 (毒素が排出される時ポルフィリンが一括に出てくるのが既に判つていた) を更に定量的に追究し Fe⁺⁺ 4 分子を加えると培地の中には 4 分子の Porphyrin と 1 分子の毒素といった割合でポルフィリンと毒素が産生されなくなることを、且この 4 分子の Fe⁺⁺ は菌体の中から発見出来、これはチトクローム b のポルフィリン環の中に入つていたのであろうと推論した。第 1 図はこの関係を示したも

図 1



The relation between diphtheria toxin (II) and porphyrin (I) production and the iron content of the medium (Pappenheimer, 1947).

ので、Fe⁺⁺ : Porphyrin は 4 : 4 で増減し Toxin 対 Fe⁺⁺ は 1 : 4 であることが判る。当時恰も Horse Haemoglobin の構造が明らかとなり⁴³⁾ Fe⁺⁺ : Porphyrin : prosthetic group = 4 : 4 : 1 となることが判つた頃とて彼のこの説は忽ち working Hypothesis として全世界に拡まつたわけであつた。即ちこの説によれば「ジフテリア毒素は本来ジフテリア菌のチトクローム b の蛋白担体たるべきものであつたが Fe⁺⁺ 欠如下の条件でチトクローム b 合成不全が起き、同時に Fe⁺⁺ 欠如のためポルフィリンと毒素との結合点が切れ、ポルフィリンと毒素は培地の中に排出されるもの」とするのである。

彼はこの仮説を証明するためにジフテリア菌からチトクローム b を抽出し毒素と交叉免疫をやつて見たが⁴⁴⁾ 不成功であつた。その後更にジフテリア毒素を「かいこ」に注射し「かいこ」のチトクローム b の合成が阻害されることを報告している⁴⁵⁾。

最近 Clarke⁴⁶⁾ は Pappenheimer のこの説に対し大きな疑義のあることを示した。Fe⁺⁺ を加えて行くと共に培地ろ液の中の Porphyrin (Coproporphyrin III) と毒素が消えるけれども菌体に入つた Fe⁺⁺ の運命をしらべた結果、このうち Haemin 中に入つた Fe⁺⁺ は僅かに 9% にすぎないことを示した。又チトクローム b は疑いもなく鉄ポルフィリン酵素の主たるものに違いないが、この鉄ポルフィリン酵素の Fe⁺⁺ 自体が細菌全体の Fe⁺⁺ 量の 14% 位に過ぎぬものであることを明らかにし 4 : 4 : 1 の「魅力ある仮説」を鋭く攻撃している。

ジフテリア毒素の性状を明らかにするためにはこの毒素の精製は欠くべからざることである。既に古く 1941 年 Pappenheimer らは毒素の精製をこころみ超遠心器による沈降試験⁴⁷⁾ で pH 5.6~pH 10.0 の範囲内で均一で S₂₀ = 4.6 × 10⁻¹³ cm/sec/dyne 得、その分子量を 72,000 と推定した。

この毒素はジフテリア抗毒素によつて、特異的に中和を受け完全に沈澱するが 1Lf (1unit の血清と沈澱する毒素) あたりの窒素は 0.00046mg であつた。このものは Tiselius の泳動装置では 4.9 × 10⁻⁵ cm²/sec/volt (イオン強度 0.1, pH 7.35) の易動度をもつ単一の成分であると示された。1947 年 Pillemer⁴⁷⁾ も彼の駆使する低温メタノール法をジフテリア毒素の精製にも利用し、やはり 1Lf あたり 0.00046mg N あたりの毒素を報告しているが、この時までには依然としてジフテリア毒素のみは結晶状にはとり出されていなかった。しかし如上の物理不学試験に基づいて彼等

はこれが純粋なものだと考えたいと述べている。しかるに Oudin に始まる寒天拡散法による免疫学的蛋白の分析はこれらの精密機械より更に超微量の分析を可能にしたのである。毒素の精製を同じく志したイギリスの Pope はこの寒天拡散法をいち早く応用して Pappenheimer の純品と称するものの中に抗元抗体反応ラインとして 14 本を検出したのである⁵⁰⁾。その後彼等はこの方法をより所とし純一のラインを旨として精製をこころみ遂に結晶化に成功した。しかし結晶化が必ずしも蛋白の純粋を証明⁵¹⁾するものでないことはよく知られていることであり⁴⁸⁾、1Lf あたり 0.00031mg N にまで純化し得て彼はなお微量の DNA-ase を含むのではないかと著者に語っていたのを記憶している。Pope はこの精製されたジフテリア毒素が単一のラインを示すことを、そそくさと引出しの中から 1 本の中試を出して示し、Pappenheimer の 14 本のラインとをくらべて示して見せた。

この Pope の研究とは別に我国の曾良⁴⁹⁾も 1957 年又ジフテリア毒素の精製をくわだて 0.0003 D~0.0031mg N per Lf の Pope らと殆んど等しい純度のものを得て結晶化している。これらの純粋化された毒素は更に将来のジフテリア毒素の化学の土台となることは論をまたない。

私は Pope, Pappenheimer らの斯界の碩学の業績についてこれまで語つたが以下はこれにも劣らぬ発見——但しそれはアメリカのミヤトルのワシントン大学の大学院学生によつてなされた——について語りたい。

即ち Freeman⁵⁰⁾⁵¹⁾の avirulent Strain から virulent Strain へのジフテリア Phage による Conversion の現象に外ならない。衆知の如くジフテリア菌は常人の鼻咽腔にかなりの%(現下の日本では 2~3%)に発見される。これらのジフテリア菌は大がいに⁵²⁾ avirulent Strain で nontoxigenic であるが、この avirulent Strain が何らかの機会に有毒化するのではないかということは何れも疫学的にかなりの問題とないて来た。英国政府のジフテリアの報告を見ると⁵³⁾、1941 年にはイングランドには 2641 名のジフテリアによる死亡者がいたが、1957 年には僅かに 6 名の死亡者があるに過ぎないと述べている。これは McLeod, Anderson 以来のジフテリア検索のセンターで今なお K. Zinnemann を擁するリーズの大学で私もつぶさに Routine を観察し、年間の膨大な Swabs の数から 2~3 名の保菌者を検索しうるに過ぎないことから想像のつくことで、殆んどイギリスにはジフテリア菌の Carrier がいなく

なつたのではないかを予想させる。(少なくとも (K. Zinnemann は以上の如く述べていた。) 我国におけるジフテリア症による死亡は大体年間 500~600 名を上下して下らない。これは Carrier の数が常人の 2~3% と関係があることが考えられる。Freeman の phage 実験による virulent 化は自然界における Etiology として重視されるのは当然である⁵⁴⁾。そして又一面 Pappenheimer 以来の毒素産生への Metabolism への新しい解明に希望を持たれたのであつた。次いで Hewitt も又 Freeman の分離した有毒化に働くジフテリアバクテリオファージを発見している。バクテリオファージがいかにして nontoxigenic Strain を toxigenic Strain に変えるかは Lyzogenization⁵⁵⁾ という近代生物学が発見した最も興味ある事態の説明を簡単にしておく必要がある。

細菌がファージによつて攻められた時、ファージの Potency が強い時ファージは Host を完全に溶解してしまうし、若し Potency が弱ければ追いかえされてしまうであろう。しかしここにこの中間の Potency をもつたファージ——我々は temperate Phage と呼ぶが——が存在する時 Phage は菌体の中に入つたまま残存する。そしてこの残り方こそが問題であつて菌体に侵入——といつてもファージヴィールス DNA の注入と呼んだ方がふさわしいが——したファージ DNA は細胞核に入つて細胞核 DNA と區別出来ぬ DNA となるらしく、爾後無限に増殖分裂をくりかえした後もどの細菌細胞の核もいわば Prophage の形で——それ自身の核 DNA がファージとなるという意味で——ファージを持っているということが発見された。そして丁度人体の抵抗が弱まつた時にウイルス病が発症(例えばヘルペス)するように色々な Inducer 例えば紫外線⁵⁶⁾ Nitrogen Mustard⁵⁷⁾ 付加などの物理的、化学的操作によつて核の菌体合成の organizing Centre は直ちにファージ合成の organizing Centre と化してしまうのである。このような Strain を我々は lyzogenic Strain と呼びならわしている。1951 年 Freeman は彼が分離したファージ B を他の avirulent 株にかけた時大部分の溶菌の中にファージ耐性のコロニーが現われるのを発見し、この菌をとつて毒性検索をして見て 100% 有毒化していることを発見した。これらの事実はその後 Frobisher⁵⁸⁾、Grohman⁵⁹⁾、Barksdale⁶⁰⁾ 波多野⁶¹⁾ らによつて確認された。Pappenheimer は Lyzogenization という metabolic Pattern が virulent 化を起すのではないかと予想しており⁶²⁾、パスツール研究所の Lwoff⁶³⁾ も亦研究所にくる菌のうちかなりの高い%のジフテリア菌が

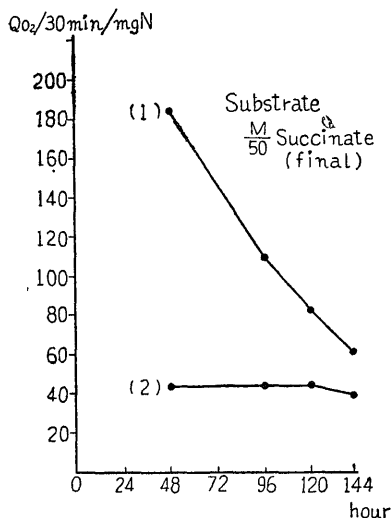
lysogenic であることを述べている。しかしその後現在までの間では当初の予想とは違つて Phage B 以外このような決定的に変化を行うフェージは仲々に発見され難いように見え、波多野もこのことを指摘している。且つ又他のフェージで Lyzogenization をしてもなお avirulent である場合があることが見出され Lyzogenization を行う phage 自体——例えば phage B の個性——が関係あるものであることが判つた。現状では Toxin の Gene の Locus に極めて近く phage B が存在するためフェージが菌体へ毒素 Gene を一緒にとりこんだ為 Conversion が行われると解すべきであろう。

私は今一つ我国の学者によつてなされた特徴のある仕事を紹介したい。Pappenheimer がその「Fe⁺ と Toxin」に関する輝かしい業績を残し得たのは、彼が従来用いて来た Martin 培地の如き（豚胃の自己消化液）複雑な構成を持つた培地から離れて合成培地から出発したことに原因する。この意味において我国の米田がなした僅か2種の Amino 酸と発育物質からなる米田培地⁶⁴⁾における高単位ジフテリア毒素の生産は将来への土台をなすものとして内外に注目をうけている。米田は培地の組成を蛋白としては Methionine と Leucin に固定して、むしろ菌の Mutant を探しこの Mutant を用いて従来のどの Medium にも劣らぬ毒素をつくりうるに至つている。更にこのような組成の簡単な Medium にあり勝ちな蛋白表面変性の問題を shaking Culture⁶⁵⁾でとりあげ、これを克服して shaking Culture ともして将来の研究にそなえた。

著者は毒素の研究というよりむしろ毒素を産生する基盤としてのジフテリア菌の Metabolism の検討に過去終始した。総括していえることはこの菌が液体培地では異常に生化学的に不活化をうけるということであつた^{66) 67)}。

このことは Pappenheimer の幻想的でさえあるチトクローム説に魅せられてジフテリア菌の生化学をこころざした私にとつてはつまづきの第一歩であつた。しかしながらこれを見のがして、若しジフテリアの菌の生化学的研究をしようというのであれば、例えば、Pappenheimer がなしている次のような誤りを易々として起すことは想像に難くない。彼はジフテリア菌に「チトクローム b 呼吸」という怪しい呼吸経路を発明している。その根拠とする所は、1) この菌がチトクローム b しかもたぬこと 2) KCN で呼吸のおさえられぬことの2点である。これがジフテリア菌の異常な生化学活性の喪失を無視するために起ることであることは第2図を見れば明白である。第2図でこの菌の呼

図 2



The effect of incubation at 37°C upon the activity of succino-oxydase of *C. diphtheriae*
 (1) oxidation of succinate.
 (2) oxidation of succinate in presence of 2.5×10^{-3} M KCN (final).

吸の値の活性を KCN の存在下と存在しない普通の状態で Succinoxydase System の活性を日を追つてしらべたものである。この菌が Growth の Maximum に達する頃この菌の活性は殆んど失われている。これは Succinate の外殆んどの基質 or Fermentation Enzymes, Dehydrase enzymes についてもいえる。このことは増殖の Maximum に達する5日~7日の菌が既に生化学的検索の対象とはなり得ないものであることを示している。

しかしながら 1958 年の Clarke⁴⁶⁾でさえ10日培養の菌を用いている。Pappenheimer とくらべて異常に少ない Haemin Fe の%が殆ど不活化した——殊に静置膜面培養の際は——菌を用いての分析だけに信用しがたいように見える。実際、24~48時間培養の新鮮な菌のチトクロームは10日培養のそれにくらべて著しく濃く且つシャープなスペクトルを示す。そればかりではなく新鮮な菌にはチトクローム b よりは弱いチトクローム a 並びに c のスペクトルを認めうるが7~10日の菌にはシャープさを欠き且きうすれたチトクローム b のスペクトルを見るに過ぎないのである。ジフテリア菌はチトクローム a, b, c を完備せることは藤田らが既に証明し広く認められていることである⁶⁸⁾ことを銘記すべきである。私のこれまでの過程は将来の実験にそなえて取り扱いのいかに困難なこと——不安定のために——について検討するにとど

まつたのは残念であつた。しかしながらこの *metabolic Instability* が或いはジフテリアの生物学的本質にもとづくものでないかは私の現在の最大の関心事である。生化学的に同じく甚だ不安定な態度を示すものは孢子形成菌である。田上⁶⁹⁾はこれがいち早く *Enzyme Systems* が水浮遊液の中で(従つて当然エネルギー源を欠く環境下で *disorganize* されることによるものと主張している。孢子形成菌の *Metabolism* については近時大いに進歩をとげ、この菌群が菌体 (*vegetative form*) を *disorganize* する *Systems* とこれを再び孢子体制に *resynthesize* する即ち極めてダイナミックな蛋白の変動力を持つた菌であることが明らかにされた。孢子形成菌^{70) 71)}のみがもつその *metabolic Instability* はその生物学的特異性によるものと田上は考えた。しかしながらジフテリア菌の *metabolic Instability* も孢子菌群のそれらに劣らぬものである。ジフテリア菌の示すその激しい解体力は 37°C の水溶浮遊では 3 時間乃至 6 時間でその活力を全く失うに至る程である⁷²⁾。このようなものはコレラ菌、孢子形成菌群を除いてはなかつた。しかし孢子形成菌の *disorganizing Systems* は適当な環境下では孢子形成の *polymerizing Systems* に——それは孢子形成即ちこの菌群の *Survival Form* への *physiological Process* である——と直結し菌の生存と関係するが、ジフテリア菌ではどうであろうか。エネルギーを欠く環境下で解体のかくもはげしいジフテリア菌が自然界において孢子形成菌と共に最も長く生存しうる菌であることは、ジフテリア菌の解体の *Systems* が孢子形成群と似た生物学的特性にもとづくのではないかを想起させる。石田⁷³⁾らは自然界においていかなる形がジフテリアの生存する *Form* であるかを検討したのは衆知の如く、ジフテリア菌は通常の菌と異なる *Neisser* の異染小体を示し、更に進んで容易に *Club-Shape* ——それは或る種の *Spore* 形成菌の *Forestage* にあまりにも似たものであるが——を形成するからに外ならない。石田らの成績は *Club-Shape* をつくる場合にのみ生存しうるであろうことを予報してこの方向にいろいろ希望をもたせている。西田⁷⁴⁾は更に *cytochemical* にこの陳旧菌の生存形成能を追究した。更にこの方向への努力は現在数人の同僚によつて検討されつつある。

テタヌス毒素

ヨーロッパの各国の優れた研究者に会えたことは誠に楽しい思い出であるが、この中でも *Van Heyningen* に *Oxford* で会い彼のこの度の優れた研究^{75) 76) 77)}を

直接聞くことを得たのは望外の喜びであつた。この研究はテタヌスのみでなく爾後のジフテリア毒素を含む多くの毒素の今後の方向に影響をあたえてゆくであろうことが予想されるので少しふれて見たいと思う。ジフテリア毒素やヴェルシー毒素の基質はひろく体中に分布しているが、テタヌス毒素の基質は専ら *nervous System* にあることはつとに予想された所であつた。このことに最初に着目したのは当時 *Wasserman* の下にあつた我が高木博士であつた⁷⁸⁾。即ち高木はテタヌスの毒素を脳のエマルジョンとまぜると、毒素が脳組織に吸着されてしまうと述べたのである。60年の後 1959 年の *Van Heyningen* の論文はこの吸着物質の解明をこころみたものである。彼は *gray Matter* のアルコールエキストラクト (*Hot 85% (v/v) ethanol in water*) から出てくる *Protagon* ($C_{108} H_{330} N_5 PO_{35}$) がその物質であることを証明した。(彼によればテタヌスの培養濾液の複雑な構成物質の中から、*Protagon* はテタヌスのみを吸着して他のいかなる *N-Substance* をも吸着しないという。且つ又 *Protagon* はテタヌス毒素のみをも吸着し他のいかなる毒素をも吸着しないと述べている)。この一種の *Phospholipid* である *Protagon* を彼は *Gregry & Craig* (1948) らの *Solvent*⁷⁹⁾ を用いて 2 層に分け、下層にあるものが *Phrenosine* で代置出来、上層が *gray Matter* 特有の成分である *Gangliosides* ——*Strandin* と呼ばれている——によつて代置出来ることをを見出した。面白いことに両者は 2 つに分けられると効果を失うのに分けられた後でも再び両者を合すれば元の効果が再現されると述べ、この結合にカルシウムイオンの必要性を見出した。

細菌毒素の基質、その作用機転に関しては次に述べる *Welchii* 菌の α -*Toxin Lecithinase* が唯一のものであることを考えると彼のこの研究のもつ意義は大であると考えられる。

Pasteur 研究所の *Raynaud*⁴⁾ が 1949 年テタヌス毒素を菌体内より抽出しうることを述べて以来のことと考えられる。

テタヌス毒素の精製に関してはジフテリア程の問題もなく早く *Pillemer*⁸⁰⁾ らによつて結晶化されている。彼がその他の種々の毒素の精製の上に果たした役割は大きい。いずれもコーンの *ionic Strength* を種々考慮しての低温アルコール沈澱法によつたものである。*Sedimentation Constant 4.5s* であつてジフテリア毒素の 72,000 と略々同じものと思われる。只テタヌスの毒素は不安定で刻々と毒力を失つて自然に *Toxoid* 化する傾向があるが、*Toxoid* の *Sedimentation Constant* が 7s であるのは *Toxoid* が毒素の *Dimer* で

あるという予想と一致するものとして興味深い。

ヴェルシー毒素

Welchii Toxins 嫌気性菌毒素の研究では英国が一頭地を抜いているように見える。私はその Anaerobe 陣の Boss たる Prof. Oakley に師事して1年半学んだことは細菌の毒素が単一の毒素からなるのではなく multiple Antigens から構成されるものであるということであつた。例えば Welchii の toxins としては α -toxin (lecithinase, lethal, necrotic & haemolytic toxin)

β -toxin (lethal & necrotic toxin)

ϵ -toxin (lethal & necrotic toxin, trypsin によつて活性化される)

ι -toxin (上に同じ、但し免疫学的に異なる)

κ -toxin (collagenase)

λ -toxin (proteinase)

θ -toxin (oxygen labile haemolysin)

δ -toxin (oxygen stable haemolysin)

μ -toxin (hyaluronidase)

ν -toxin (DNA-ase)

と、これ位のものから構成されることが英国の学者達によつて明らかにされた。すべての Welchii がこれらのすべての Toxins を出すわけではなく Oakley らはこの Toxins の種類によつて Welchii の型分類を行つている^{82) 83)}。毒素によつて型分類を行うことは不便のようであるが、Welchii に限らず Clostridium 一般を通じて凝集反応は信用されないものとされている。

又各毒素に対する抗毒素がその菌の感染から防禦しうるのであつて実際的にも有意義であるのですべての菌の型は毒素によつて分けられているが、我国ではこの multiple Toxins の多角的検討は行われていないのは残念である。Anaerobes の研究の発展史は戦争と不可分であるが戦敗国であるドイツ、日本が英、仏、米に一歩おくられているのは止むを得ないことであるかも知れない。

α -toxin である Lecithinase は、その毒作用がこの酵素作用にあることが判つている点、即ち作用機転の判つている点において唯一の細菌毒素である。それは Macfarlane^{84) 85)} らによつて Lecithinase C (第3図) であることが判明している。しかしながら Miles⁸⁶⁾ らは他の Anaerobes の Lecithinase を検討し、Lecithinase 作用を同一とする時 Table 2 の如く毒力が相違することを述べてこの考えに疑義をなげている。このように見れば、毒素の毒作用機構を示すその本態は何一つ

図 3

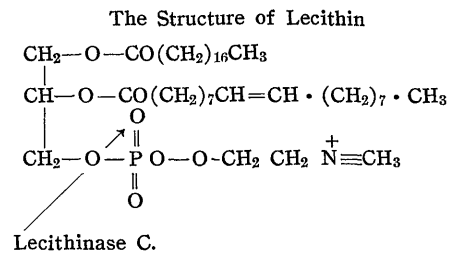


Table 2. Comparison of 5 preparations of Lecithinase from Clostridia

	lecithinase activity in Vitro	Haemolytic Dosis	LD ₅₀ for mice
Cl. bifermentans No. 17	100	173	4300
Cl. bifermentans No. 18	100	120	5400
Cl. bifermentans No. 20	100	28	670
Cl. Welchii No. 290	100	315	59
Cl. Welchii POO	100	218	85

(Miles & Miles, 1950)

解決されていないように見える。このような時に先述の Van Heyningen の毒素の作用基質の確定はこの方面への一条の光ともなるべき要素をもつているといわねばならない。

ヴェルシー毒素の精製分離は他の毒素の如く進歩していないのはテタヌス、ホドリヌスを除く他の嫌気性菌毒素と同様である。

結語にかえて

以上私は最近の毒素界の現況を幸運にもヨーロッパの斯界をになう人々と接するを得た印象下に記したものである。

英国のジフテリア研究はアカデミカルな Pope らの仕事を除けば甚だ地味なものに見えたが、しかし我々が忘れてはならないのは先述の如く英国のジフテリア患者が撲滅されたことである。我国の死亡者がここ数年来400~600名で患者が万を下らず全く減少を見せないのは何故かとよく聞かれた。尤も何故イギリスでも仲々に決しがたい所で Van Heyningen は第5回の英国細菌学会シンポジウムで「トキシイドが疑いもなく減少させたことは間違いないが、丁度同じ頃トキシイドを未だうつていないスエーデンがやはり激減しているのは不可解である」と述べている。

以上述べたその極めて鋭敏な生物学的活性の蛋白質分子の作用機構こそは生化学、病理学を通じて最も興味

深い分野の一つであることは疑いのない所であるが、私は現実の細菌学は実際の伝染病の減少させる努力とむすびついて始めて進歩したものといえるということを感じさせられたことを一言附記したい。

この講演の機会をあたえられた大谷学部長始め全学の諸兄に衷心よりの謝意を表すものであります。

文 献

- 1) Zinsser's : Bacteriology, p. 183, 11st Ed., Appleton-Century-Crofts. Inc., New York, 1957.
- 2) 武田徳晴 : 日本細菌学雑誌, 8, 441, 1953.
- 3) Nelson, C. I. : J. infect. Dis., 41, 9, 1927.
- 4) Raynaud, M. & Second, L. : Ann. Inst. Pasteur, 77, 316, 1949.
- 5) 東山昇 : 大阪大学医学部雑誌, 2, 307, 1957.
- 6) 林喬 : 昭和医学会雑誌, 10, 57, 1950.
- 7) Van Heyningen, W. E. & Gladstone, G. P. : Brit. J. Exp. Path., 34, 202, 1953.
- 8) Morton, H. E. & Gonzalez, L. H. : J. Immunol., 45, 63, 1942.
- 9) Nishida, S. : Nature, 174, 970, 1954.
- 10) Lamanna, G., Eklund, H. E. & McElroy, O. E. : J. Bact., 52, 1, 1946.
- 11) Lamanna, C., McElroy, O. E. & Eklund, H. W. : Science; 103, 613, 1946.
- 12) Van Heyningen : Bacterial Toxins, p. 15, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1950.
- 13) Boivin, A., Mersrobeanu, L. & Mersrobeanu, I. : Compt. rend. Soc. biol., 114, 307, 1933.
- 14) Boivin, A. & Mersrobeanu, L. : Rev. immunol., 4, 197, 1938.
- 15) 黒屋正彦・小泉 : 東北医学, 29, 231, 1941.
- 16) Burrell, J. I., Robins, K. C. & Pillemer, L. : Science, 108, 311, 1948.
- 17) Meyer, E., Meyer, K. F. & Pillemer, L. : Annual Rev. Microbiol. III, p. 281, 1959.
- 18) Refer to 7).
- 19) Robbins, K. C. & Pillemer, L. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47, 61, (1950).
- 20) Van Heyningen, W. E. : Referto 12) p. 36.
- 21) Pillemer, L., Wittler, R. G., Burrell, J. I. & Grossberg, D. B. : J. Exp. Med., 88, 205, 1948.
- 22) Abrams, A., Kegels, G. & Hottle, G. A. : J. Biol. Chem. 164, 63, 1946.
- 23) Burrell, H. J., Schantz, F. J. & Lamana, C. : J. Biol. Chem., 169, 295, 1947.
- 24) デュボス : 細菌細胞, (川喜田訳, 岩波 1952).
- 25) Young, G. A., Zelle, M. R. & Lincoln, R. E. : J. Infect. Dis., 79, 233, 1946.
- 26) Zelle, M. R., Lincoln, R. E. & Young, G. A. : J. Infect. Dis., 79, 247, 1949.
- 27) Elek, S. O. : Staphylococcus Pyogenes and its relation to Disease E. & S. Livingstone LTD., Edinburgh & London 1959.
- 28) McLeod, J. W. : Bact. Rev., 7, 1, 1943.
- 29) 漆原困天 : 北里実験医学, 23, 61, 1950.
- 30) Zinneman, K. : J. Path. Bact., 55, 275, 1943.
- 31) O'Meara, R. A. Q. : J. Path. Bact., 51, 317, 1940.
- 32) Hewitt, L. F. : Brit. J. Exp. Path., 29, 181, 1948.
- 33) Poulik, M. D. : Nature, 177, 982, 1956.
- 34) Poulik, M. D. & Poulik, E. : Nature, 181, 1958.
- 35) Orr-Ewing, J. : J. Path. Bact., 58, 167, 1946.
- 36) Pope, C. G., Caspary, S. M. F. & Fenton, E. L. : Brit. Exp. Path., 32, 246, 1951.
- 37) Pope, C. G. & Stevens, M. F. : Lancet, ii 1190, 1953.
- 38) Niggemeyer, H. : Ann. Pediatrics, 185, 1, 1955.
- 39) Updike, E. L. & Frobisher, M. : J. Bact., 54, 619, 1947.
- 40) 関屋重徳 : 実験医学雑誌, 22, 359, 1938.
- 41) Pappenheimer, A. M. Jr. : J. Biol. Chem., 167, 251, 1947.
- 42) Pappenheimer, A. M. & Jhonson, S. J. : Brit. J. Exp. Path., 17, 335, 1936.
- 43) Granick, S. & Gilder, H. : Advance in Enzymology, 7, 305, (1947).
- 44) Pappenheimer, A. M. Jr. & Hendee, E. D. : J. Biol. Chem., 180, 597, 1949.
- 45) Pappenheimer, A. M. Jr. & Williams, A. M. : J. Gen. Physiology, 35, 727, 1952.
- 46) Clarke, G. D. : J. Gen. Microbiol., 18, 698, 1958.
- 47) Lepow, I. H. & Pillemer, L. : J. Immunol., 69, 1, 1952.
- 48) Pope, C. G. & Stevens, M. F. : Brit. J. Exp. Path., 39, 143, 1958.
- 49) Katsura, T., Kato, I., Nakamura, H. & Koyama J. : Jap. J. Microbiol., 1, 213, 1957.
- 50) Freeman, V. J. : J. Bact., 61, 675, 1955.
- 51) Freeman, V. J. & Marse, I. U. : J. Bact., 63, 407, 1952.
- 52) Iida, H., Kumagai, M., Kasashimada, T. & Nakagawa, T. : Jap. J. Microbiol., 2, 403, 1958.

- 53) Britain, an Official Handbook, 1959 Ed., Central Office of Information, London. 54) Hewitt, L. F. : J. Gen. Microbiol., 7, 362, 1952. 55) Lwoff, A. : Bacteriological Rev., 17, 269, 1953. 56) Lwoff, A., Siminovitch, L. & Kjeldgaard, N. : Ann. Inst. Pasteur, 79, 815, 1950. 57) Williams, Smith, H. : J. Gen. Microbiol., 8, 116, 1953. 58) Parsons, E. I. & Frobisher, M. Jr. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 78, 746, 1951. 59) Grohman, N. B. & Lockart R. Z. : J. Bact., 66, 184, (1953). 60) Barksdale, W. L. & Pappenheimer, A. M. Jr. : J. Bact., 67, 220, 1954. 61) 波多野基一 : 日本細菌学雑誌, 10, 475, 1955. 62) Pappenheimer, A. M., 5th Symposium of the Soc. Gen. Microbiol., 1955. Cambridge Univ. Press. 63) Lwoff, A. : 2nd Symposium of the Soc. Gen. Microbiol., 1952. Cambridge Univ. Press. 64) 米田正彦 : 日本細菌学雑誌, 5, 401, 1950. 65) Yoneda, Y. : Brit. J. Exp. Path., 38, 190, 1957. 66) Nishida, S. : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 7, 453, 1954. 67) Nishida, S., Ishida, M. & Tagami, M. : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 10, 221, 1957. 68) Fujita, A. & Kodama, T. : Biochem. Z., 273, 186, 1934. 69) 田上三雄 : 十全医学会雑誌, 58, 326, 332, 337, 1956. 70) Hardwick, W. A. & Foster, J. W. : J. Gen. Physiol., 35, 907, 1952. 71) Foster, J. W. & Perry, J. J. : J. Bact., 67, 295, 1954. 72) 石田宗治 : 学位論文 No. 1528, (金沢大), 蒸溜水中における酵素活性の定定性, 1959. 73) 石田宗治 : 学位論文 No. 1528, (金沢大), ジフテリアの研究, I, 1959. 74) 石田宗治 : 学位論文 No. 1528, (金沢大), ジフテリアの研究, II, 1959. 75) Van Heyningen : J. Gen. Microbiol., 20, 291, 1959. 76) Van Heyningen : J. Gen. Microbiol., 20, 301, 1959. 77) Van Heyningen : J. Gen. Microbiol., 20, 310, 1959. 78) Takagi, T. : Beitr. Chem. Physiol. Path., 11, 288, 1908. 79) Gregory, J. D. & Craig, L. C. : J. Biol. Chem., 172, 839, 1948. 80) Pillemer, L., Wittler, R. G., Burrell, J. I., Grossberg, D. B. : J. Exp. Med., 88, 205, 1948. 81) Smith, L. Ds. : Introduction to the Pathogenic Anaerobes, Univ. Chicago Press. (1955). 82) Oakley, C. L. : Bull. Hyg., 18, 781, 1943. 83) Brook, M. E., Sterne, M. & Warrack, G. H. : J. Path. & Bact., 74, 135, 1957. 84) MacFarlane, M. G. & Knight, B. C. : Biochem. J. 35, 884, 1941. 85) MacFarlane, M. G. : Biochem. J. 42, 587, 1948. 86) Miles, E. M. & Miles A. A. : J. Gen. Microbiol., 4, 22, 1950.