

ジフテリア菌の生存機構について I

金沢大学医学部細菌学教室(主任 西田尚紀教授)

寺 本 友 一

(昭和38年1月22日受付)

固定培地上のジフテリア菌の生存について Gins¹⁾ は「多くの著者らはこの菌が7, 12, 13, 24カ月間、時として4カ年生存した」と記載している。総じて多くの教科書は、この菌が非孢子形成菌群の中では自然界で最も生存力の強い菌の一つと考える点で一致しているように見える。

一方形態学的には pleomorphic ではあるが、club-shape を形成する性質をもつことについては異論がない。著者の同僚の石田²⁾ は「固型培地上で古い培養のジフテリア菌が長く生存する際必ず見られる Gram 強陽性の「oval granule」(club-shape の尾部は Gram 陰性となる) がこの菌の生存にあずかる耐久形であろう」と推定した。

ジフテリア菌の顆粒構造については沢山の細胞化学的研究があり Mudd³⁾ の綜説に詳しく記載されている。大別して metaphosphate の polymer とする者、これと RNA の結合した volutin granule とするもの、DNA, RNA が結合して composite organelle を作るもの、Mitochondria とするもの、細胞の縮合体とするものなどがあげられる。

陳旧培地で club-shape の先端に残る「oval granule」がこれらに等しいものかどうかを吟味する前に、このものが果してこの Species の生存という重要な機能をになつた構造体であるかどうかを更に検討すべきであるし、且つたまたもしそうだとすればこの形を形成するための適合した環境の発見が先ずなされねばならぬと考えた。そこで著者は種々の異なつた club-shape 形成能力をもつた13株のジフテリア菌と、いくつかの環境を組合わせて、各菌株が各環境下で作る「oval granule」の菌と生存の関係を追求した。この「oval granule」を従来のジフテリア菌顆粒の概念と区別するため今後顆粒体と呼ぶこととする。

実験方法及び材料

使用菌株: ジフテリア菌13株(教室保存株2株, 伝

研株7株, 新分離株4株)の Löffler 培地継代のものを使用した。各実験により適宜選択して使用した。表 I にその菌型並びに由来を示した。伝研株は伝染病研

表 I 使用菌株とその菌型並びに由来

株 名	菌 型	由 来
RT - 2	Gravis 型	伝 研
金子 630	Mitis 型	〃
岩井 630	Gravis 型	〃
尾 崎	Intermedius 型	〃
松 原	Gravis 型	新分離
10 - 19	Gravis 型	伝 研
金 谷	Gravis 型	〃
Kg - 1	Gravis 型	教 室
RT - 17	Mitis 型	伝 研
北 1	Gravis 型	教 室
名 倉	Gravis 型	新分離
西 藤	Gravis 型	〃
上 田	Gravis 型	〃

究所佐藤和男博士より分与された菌株である。新分離株は生存実験開始1カ月前に著者が分離同定した菌株である。

培地: 0.3%炭末加 Pope 消化寒天培地 (Pope 氏消化液⁴⁾ に寒天を入れて固めたもの), Löffler 培地, Chocolate 寒天培地, C.C.Y. 培地⁵⁾, 血清寒天培地, 血液寒天培地, 血球寒天培地, 血液ブイオン培地を使用した。血球寒天培地は、血球を生理食塩水にて3回洗滌後、生理食塩水を加えて原血液量にもどしたものを10%の割に加えた。各培地に使用した血清は大多数は馬血清を使用した。Chocolate 寒天培地では寒天濃度を1%, 1.5%, 2%としたものを使用した。その他の培地寒天濃度は特に記載せぬ限り粉末寒天で2%である。

各培地は同一菌株を4乃至12個の容器に同一条件で植菌し、保存した。

A Study on the Mechanism of Survival of *C. diphtheriae*. Yuichi Teramoto, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, University of Kanazawa.

培地容器：30ml 入りの screw capped bottle (投薬瓶) の口を更にセロテープまたはビニールテープで封じ、培地の乾燥と雑菌の混入を防止した。

植菌並びに採菌：可及的培地全表面に平等に発育する如くに植菌し、採菌は培地中心部より行い、なるべく同一個所よりの採取をさけて取るようにつとめた。

菌の保存：植菌後 37°C, 36時間培養し、十分に培地全表面に発育したことを確認後それぞれの条件下に保存した。

顆粒体の定義：「Gram 強陽性の 少なくとも vegetative phase の細胞と同じ位に染まり）位相差顕微鏡にてまばゆいばかりの光輝性をもつ club-shape 或いは oval granule」を顆粒体とした。その大きさは Gram 染色所見では常に異染小体より大で、時として 3 倍前後に達するものもあつた。この顆粒体のどれかが生存に関係すると思われ、より正確な規定が必要であろうが、判定の正確を期すために判定の容易な「Gram 強陽性」を規準とした。より一層この形を明確たらしめるために石田ら²⁾が 8 カ月生存した Löffler 培地上の club-shape 並びに「oval granule」を再掲して第 I 図とした。

顆粒体の存否と菌の生存の判定：主として Gram 染色で行い、同時にまた位相差顕微鏡でもこの存在を確認した。Gram 染色は Hucker 変法によつた。約 500~1000個の菌を数える視野（菌数は時としてこれより多いことはあつたが少ないことはなかつた）の 4~5 視野に 1 個の割で顆粒体が存在したとき陽性とした。1 白金耳充分の菌苔をとつて生存試験をするのが常であつたが、新鮮な菌ではこの 1 白金耳中に 10^6 以上の菌が含まれていると考えられるから、染色検査で $10^3 \sim 10^4$ に 1 個の割に顆粒体を見つけたとし、且つこれが生存するとすればなお判定用の小試斜面には 100 個以上の菌が生えることになる。著者が用いた小試斜面は 100 個の菌が生えると大多数は培養して小試斜面一杯に生えた。従つて $10^3 \sim 10^4$ に 1 個という鏡検下の単位は斜面培地上の発育によつて生存をきめようとする際には決して少なすぎる限界値ではない。

菌の生死の判定は前記各培地より毎月 1 白金耳取り、これを 0.3% に炭末を加えた Pope 消化寒天培地斜面（小試験管）または平板（シャーレ表面積の 6 分の 1 の面積）に塗末し、37°C, 72時間培養して集落の発生の有無を検した。集落が密接して一面に生えて来たもの並びに 72 時間後に大多数が接着しているものを + とし、個々の集落が分離して発育しているものを ±、少数のものを干、無いものを - として ± 以下を前述の理由により陰性とした。

写真 Asahiflex II 型カメラ並びに同写真装置（拡大倍率 1:1）並びに Nikon S 型カメラ並びに同写真装置（拡大倍率 1:2）を使用した。位相差装置は千代田光学製を使用した。

実験成績

実験 I Löffler 培地における保存温度の顆粒体の存続並びに菌生存期間に及ぼす影響

前に述べた投薬瓶の中に Löffler 培地を作つて使用したこれは斜面部が広く採菌に適し、且つ蒸発も防げの長期観察に耐えた。その大部は 16 カ月後もなお充分の凝固水を存し、且つ雑菌の混入は殆んど見られなかつた。

その結果は表 II に示した如く、25°C では最長 15 カ

表 II Löffler 培地における保存温度の顆粒体の存続並びに菌生存期間に及ぼす影響

菌株名	25°C		0~4°C	
	顆粒体	生存	顆粒体	生存
RT - 2	8*	8	0	5
金子 630	12	12	1	3
岩井 630	8	8	0	3
尾 崎	—	—	0	2
松 原	9	9	0	3
10 - 19	6	7	0	1
金 谷	13	13	1	2
Kg - 1	7	7	0	2
RT - 17	15	15	0	3
北 1	12	13	1	2
名 倉	12	12	1	3
西 藤	12	12	1	3
上 田	12	12	0	2
平 均	9.7	9.8	0.4	2.6

* 表中数字は顆粒体の存続並びに菌生存月数を示す。

月、平均 9.8 カ月生きると共に、顆粒体の存続は最長 15 カ月、平均 9.7 カ月存在し、生存との一致率は 99% の高率を示した。0~4°C では最長 5 カ月、平均 2.6 カ月であつた。この際顆粒体のないまま、いいかえれば普通の vegetative phase のまま保存されたことになるが、このときには桿状の細胞は Gram 強陽性に染まるが、用いた株の殆んど（1 株を除きすべて）は 3 カ月以内に死滅した。1 株は 5 カ月生存したがこれは vegetative phase のままでの保存の限界値であろう。

実験 II Chocolate 寒天培地における保存温度の顆

粒体の存続並びに菌生存期間に及ぼす影響
前実験に引き続き、ジフテリア菌の顆粒体形成能の良
い **Chocolate** 寒天培地で保存温度の影響を検討した。
菌株は6株を用いたが、得られた結果は表Ⅲに示した

表Ⅲ **Chocolate** 寒天培地における保存温度の
顆粒体の存続並びに菌生続期間に及ぼす影響

菌株名	37°C		25°C		0~4°C	
	顆粒体	生存	顆粒体	生存	顆粒体	生存
RT - 2	7*	7	12	13	0	1
金子 630	11	11	12	12	0	1
10 - 19	8	8	14	14	0	2
Kg - 1	7	7	8	8	0	1
北 1	11	11	6	8	1	1
上 田	11	11	13	13	1	1
平均	9.2	9.2	10.8	11.3	0.3	1.2

* 表中数値は表Ⅱ参照。

如くである。

37°C では最長11カ月、平均9.2カ月生存し、25°C
では最長14カ月、平均11.3カ月、0~4°C では最長2
カ月、平均1.2カ月生存した。本実験で顆粒体の存続
は菌の生存月数と37°C では100%に25°C では96%
の一致率を示した。0~4°C では顆粒体は殆んどない
ままに1カ月生存したが殆んどものは2カ月目に切
れてしまった。これは本培地での vegetative cell の
ままで残り得る生存期間と考えられる。

実験Ⅲ 培地寒天濃度の顆粒体存続並びに菌生存期
間に及ぼす影響

本実験では1%、1.5%、2%に粉末寒天を加えた単
に寒天濃度のみ異なる **Chocolate** 寒天培地を使用
し、25°C に保存した。

5株のジフテリア菌を使用したか、その結果は表Ⅳ

表Ⅳ **Chocolate** 寒天培地寒天濃度の顆粒体
の存続並びに菌生存に及ぼす影響(25°C保存)

菌株名	1%寒天		1.5%寒天		2%寒天	
	顆粒体	生存	顆粒体	生存	顆粒体	生存
RT - 2	6*	6	7	7	12	13
尾 崎	5	6	8	8	12	13
10 - 19	8	8	8	8	14	14
北 1	7	7	7	7	7	8
上 田	7	8	11	11	13	13
平均	6.6	7.0	8.2	8.2	11.6	12.2

* 表中数値は表Ⅱ参照。

に示す如く、1%寒天のものは最長8カ月、平均7.0
カ月生存し、1.5%寒天のものは最長11カ月、平均8.2
カ月生存した。2%寒天では最長14カ月、平均12.2カ
月生存した。各条件下での顆粒体存続月数との一致率
は1%寒天では94%、1.5%寒天では100%、2%寒天
では95%の高い一致率を得た。

実験Ⅳ **Chocolate** 寒天培地と C.C.Y. 培地にお
ける顆粒体の存続と菌生存期間の関係

石田²⁾が先に顆粒体の形成が良好と報告している
C.C.Y. 培地³⁾(血液成分を含まない合成培地)がいか
なる生存を示すかを **Chocolate** 寒天培地と比較した。
その結果を表Ⅴに示した。

表Ⅴ **Chocolate** 寒天培地と C.C.Y. 培地にお
ける顆粒体存続と菌生存期間の関係(25°C)

菌株名	Chocolate 寒天培地		C.C.Y. 培地	
	顆粒体	生存	顆粒体	生存
RT - 2	13*	13	4	5
金子 630	12	12	9	9
尾 崎	13	13	8	8
10 - 19	13	13	9	9
Kg - 1	8	8	6	7
RT - 17	15	15	5	8
北 1	13	13	6	6
上 田	13	13	4	5
平均	12.5	12.5	6.4	7.1

* 表中数値は表Ⅱ参照。

合計8株を使用し、25°C に保存した。

Chocolate 寒天培地は前の諸実験と大体同じ結果を
示し、最長15カ月、平均12.5カ月生存した。一方C.C.
Y. 培地は最長9カ月、平均7.1カ月生存した。その際
の顆粒体存続月数との一致率は **Chocolate** 寒天培地
では100%、C.C.Y. 培地は90%であった。

実験Ⅴ 血液成分の顆粒体存続並びに菌生存期間に
及ぼす影響

以上の **Chocolate** 寒天培地での成績並びに血液成分
を含まない C.C.Y. 培地の成績から、また石田の報告
でも血液寒天培地が顆粒体の形成良好であり、また従
来でもこの顆粒体に似たものが血液寒天培地で作られ
ることが述べられている⁴⁾ので、血液寒天培地を検
討し、血液成分の内、血清と血球のいずれの分劃にそ
の成分があるかを検討した。

菌株は表Ⅵに示した如く8株を用い、保存温度はい
ずれも25°C である。

その結果は血清寒天培地では最長6カ月、平均4.5

表VI 寒天培地における血液成分の顆粒体存続並びに菌生存期間に及ぼす影響 (25°C 保存)

菌株名	血 清		血 液		血 球	
	顆粒体	生 存	顆粒体	生 存	顆粒体	生 存
RT - 2	4*	4	9	9	15	15
金子 630	4	6	4	9	13	13
松 原	1	4	4	9	15	16
10 - 19	4	4	14	16	19	19
Kg - 1	4	6	6	9	15	15
RT - 17	4	4	15	15	18	18
北 1	4	4	4	6	16	17
上 田	4	4	4	4	19	19
平 均	3.6	4.5	7.5	9.6	16.3	16.5

* 表中数値は表II参照。

カ月生存し、血液寒天培地では最長16カ月、平均9.6カ月生存し、血球寒天培地では最長19カ月、平均16.5カ月生存した。顆粒体存続月数との一致率は血清寒天培地が80%を示したが8株中5株が100%を示した。また血液寒天培地は78%を示し、血球寒天培地は98%の高率を示した。

実験VII 血液ブイオン培地における保存温度の顆粒体存続並びに菌生存期間に及ぼす影響

以上の実験はすべて固型培地上の菌について行つたが、液体培地である血液ブイオン培地でも第II図、第III図に見られる如き顆粒体の形成が見られた。

本実験は3株を使用し、37°Cと25°Cに保存した。その結果は表VIIに示した如く、37°Cでは最長4カ月、

表VII 血液ブイオン培地における保存温度の顆粒体の存続並びに菌生存期間に及ぼす影響

菌株名	37°C		25°C	
	顆粒体	生 存	顆粒体	生 存
RT - 2	2*	2	4	4
金子 630	2	2	8	9
10 - 19	4	4	12	13
平 均	2.7	2.7	8.0	8.7

* 表中数値は表II参照。

平均2.7カ月生存し、25°Cでは最長13カ月、平均8.7カ月生存した。顆粒体存続月数との一致率は37°Cが100%で、25°Cが91%を示し、固型培地と同じく高い一致率を示した。この際生存菌は常に沈下した血液凝塊中に存在し、上清部には全く存在せず、また顆粒体も同様に血液凝塊中にのみ陽性であつた。

考 察

ジフテリア菌の顆粒構造をめぐつて多くの論争があるが、殆んどの細胞学者はジフテリア菌が培養の時間と共に形を変えないことを前提としている。僅かにBringmann⁸⁾が培養の古い菌の顆粒構造が新生菌のそれと異なることを述べ、古いものでRNA-DNAの結合した composite organelle を想定しこれを Dauernde Form としているに過ぎない。この主張ははげしい反論にあつたが、反対者のいずれも培養の古い菌について実験を行つていない。著者の成績ではこの菌は形態学的には vegetative phase と明らかに異なる rest-form を作り、生物学的には代謝冬眠ともいふべき状態にあることを示し、細胞化学的には vegetative phase と異なる phase のあることを暗示した。

細菌にとって“代謝冬眠”の機構といえば直ちに胞子の形成が考えられるが、ジフテリア菌がこのような機構体をもつのではないかということは著者の成績から考えて、またこの菌の分類学的位置から考えて再検討されてよいように見える。即ち Corynebacterium は Mycobacterium に分類学的位置が近く、この Mycobacterium は Nocardia や Streptomyces と共に Actinomycetaceae を作つている。Nocardia や Streptomyces の胞子は細菌の胞子のように熱耐性はないがジフテリア菌の顆粒体はこれらのグループの胞子と共に研究される必要があるであろう。最近 Mycobacteria にも胞子があると Csillag⁹⁾ は述べているが形態学的証明のみで、更に生物学的、細胞化学的検討が望まれる。

一方生存の種々の条件の中、最も生存力の強い培地程(血液成分を含む培地)「oval granule」の形成がよいことが判つたが、これはいずれも vegetative cell の横径より“vulged”ではあるが0.9×1.2μ程度のやや小さな「oval granule」が多い所から、この程度に止まり得るものが細胞化学的検討をうけるべきであろうと考えられた。Chocolate 寒天培地は生存力においてやや血球寒天培地に劣つたが、恒常的により沢山の「oval granule」を作つたのでこの培地が Dauernde Form の検討に望ましいと思つた。

結 論

1) ジフテリア菌は Löffler 培地上で 0~4°C に保存すると平均2.6カ月生存するに過ぎないが、25°C に保存する場合平均9.8カ月生存し、長いものは15カ月生存した。

更に血球寒天培地上で 25°C に保存すると平均16.5

カ月生存し、最長19カ月生存した。

2) ジフテリア菌顆粒体はその形成能力の異なる種々の培地の上で且つまた形成能力の異なる菌株を用いての、いずれの場合でも顆粒体の形成期間はその生体月数と90~100% (血清, 血液寒天培地は約80%) の一致率を示した。

3) 生存力の強い **Chocolate** 寒天培地, 血球寒天培地上の「**oval granule**」こそが生存耐久形として細胞化学的検討をうけるべきであると推定した。

稿を終るにあたり、絶えず御熱心に御指導と御鞭撻下さいました西田尚紀教授に心から御礼申し上げます。また絶えず御鞭撻下さいました谷友次名譽教授に深く感謝の意を表します。並びに本実験に際し、貴重な菌株を分与下さいました伝染病研究所佐藤和男博士に深く感謝致します。

文 献

1) **Gins, H. A.** : *Handbuch der pathogenen*

Mikroorganismen, 3. Auflage., Bd. V, -1, 451, Berlin und Wien, Gustav Fisher und Urban & Schwarzenberg (1928).

2) 石田宗治・寺本友一・西田尚紀 : *医学と生物学*, 63, 146 (1962).

3) **Mudd, S.** : *Ann. Rev. Microbiol.*, 8, 1 (1954).

4) **Pope, C. G. & Smith, M. L.** : *J. Path. Bact.*, 35, 573 (1932).

5) **Gladstone, G. P. & Fildes, P.** : *Brit. J. Exper. Pathol.*, 21, 161 (1940).

6) **Davis, J. C. & Mudd, S.** : *J. Bact.*, 69, 372 (1955).

7) **Parish, H. J.** : *Brit. J. Exper. Pathol.*, 8, 162 (1927).

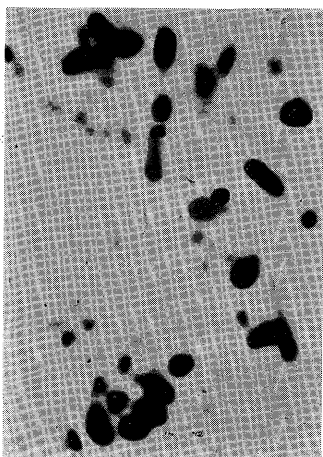
8) **Brinngmann, G.** : *Zbl. Bakt., Abt. 1. Orig.* 156, 493 (1951).

9) **Csillag, A.** : *J. gen. Microbiol.*, 26, 97 (1961).

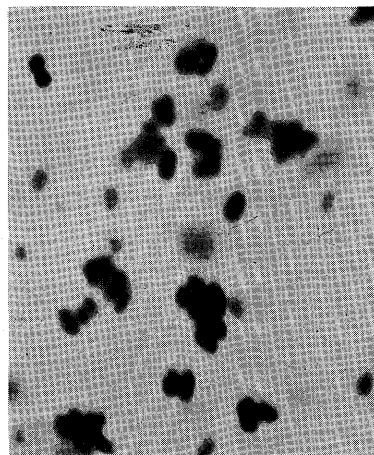
Abstract

The club-shape of *C. diphtheriae* is usually observable in old cultures, though this organism is markedly pleomorphic. The author suggests in this paper that the club-shaped cells as well as the oval granules which develop from the club-shaped cells are the ones in the rest-phase of this organism; The rest-phase formation of 13 strains of *C. diphtheriae*, has been investigated under a variety of environmental conditions, and it is proved that the length of survival of this organism is exactly coincident with that of the rest-form.

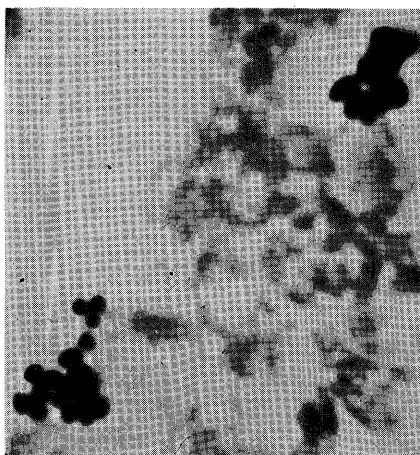
It is, furthermore, demonstrated that the organism survives much longer in the temperatures of 25°C and 37°C where the rest-phase is more easily produced than in the temperatures of 0°C and 4°C where only the vegetative phase of this organism can be observed. This finding suggests to the author that the rest-phase is of "metabolic dormancy."



第I図 *C. diphtheriae*, Kg-1株, $\times 4000$, Löffler
培地, 25°C 8カ月培養, Gram 染色.



第II図 *C. diphtheriae*, 金子630株, $\times 4000$, 血液
ブイヨン培地, 25°C 2カ月培養, Gram 染色.



第III図 *C. diphtheriae*, 金子630株, $\times 4000$, 血液
ブイヨン培地, 25°C 2カ月培養, Gram 染色.