

X線照射による異常長大菌の生理学的研究

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

西 井 怜

〔昭和40年4月23日受稿〕

目 次

I 緒 言	4) 長大菌の核酸量の推移
II 実験材料及び実験方法	5) X線照射菌の誘導酵素の活性
III 実験成績	6) X線長大菌の復活の検討
1) X線長大菌の酵素活性	IV 総括及び考按
2) 培地に対するX線照射効果の吟味	V 結 語
3) 長大菌の凝集性及び免疫学的性状	文 献

緒 言

放射線の生物作用に関しては、近年とみにその重要性が増して来た。単細胞生物特に細菌に対する放射線の影響も多方面からの研究がなされている。Pacinnoti の業績を始めとして、Wyckoff¹⁾²⁾, Luyet³⁾, Zirkle⁴⁾, Claus⁵⁾, 武田⁶⁾, 西脇⁷⁾, 金政⁸⁾ 等の報告がなされている。当教室金政のX線照射の細菌に対する効果の報告の内、照射後培養を行うと分裂抑制を受けて、*Sal. typhi* 等の杆菌は紐状の長大菌となる。その形成された長大菌を形態学的に追求した報告によると、細胞壁及び菌体は一見増大して行くが、分裂のための隔壁は形成されず、又内部構造を追求するための特殊染色法又は超薄切片法による核様物質の検討では、細胞質の延長にともなう増加していない成績が得られている。

以上の成績から、X線照射によつて得られた糸状長大菌(以下X線長大菌と称す)を生理学的に色々な観点から追求することは、菌の分裂機構の解明の端緒になるものと考えられるので以下の実験を行い、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 供試菌：教室保存の *Salmonella typhi* H 901 W株を常法の如く普通寒天平板培地に数代継代して純化したものを供試した。
2. 培地及び化学薬品：すべて市販品を使用し、培地は原料化学薬品から調製した。
3. X線発生装置及び照射法⁸⁾：東芝製 KXC 18

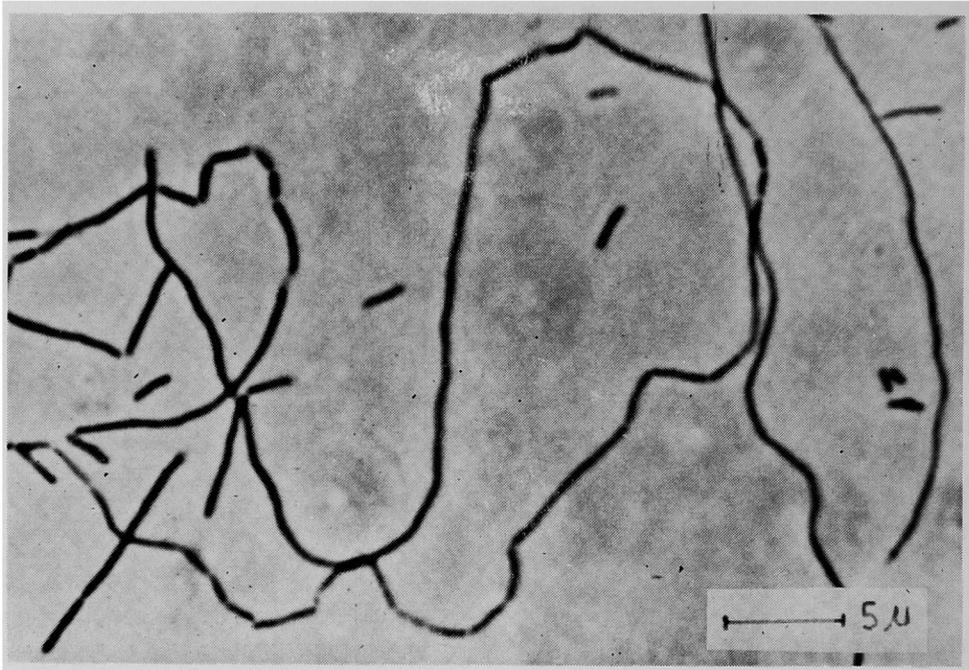
型深部治療用X線装置を使用し、200 KVP, 25 mA連続で Cu 0.5 mm + AL 0.5 mm の Filter を使用して 30 cm の距離から照射を行った。供試菌は普通寒天平板培地に極薄の菌苔として発育したものを、鉛板上にふせて置いて、上方より一定量照射(特殊な場合を除き 2000 r)を行った。後培養を行うには照射後直ちに 37°C の孵卵器内に入れ一定時間培養して長大菌を得た。

4. 酸素消費量の測定：Warburg 検圧計を用いて常法に従った。
5. 酸凝集反応：日立 pH メーターを用い Mc Ilvain による Citrate-phosphate 系の緩衝液段階を作り、それぞれの 1 ml に菌 10 mg/ml 液 3 滴を混和して、室温にて 30 分凝集の有無を観察した。
6. Widal 反応及びミロン反応は臨床細菌学提要の記載に従った⁹⁾。
7. 核酸定量法：抽出は Schneider 法¹⁰⁾ に従った。DNA は Indol 法¹¹⁾ により、RNA は Orcinol 法¹²⁾ により発色定量した。

実 験 成 績

1. X線長大菌の酵素活性
各種の基質に対するX線長大菌の酸素消費量を Warburg 検圧法により測定し、正常菌のそれと比較した。長大菌は 2000 r 照射後、0 時間(照射直後)、2 時間培養せるもの、4 時間培養せるもの(以下 2 時間長大菌、4 時間長大菌の如く略す)を用いた。長大化した菌の形態を示すために照射後 4 時間培養の菌の一部をスライドグラス上にとり、位

図 1 X線照射後培養の長大菌



註：2000r 照射後4時間培養せるものの位相差顕微鏡

相差顕微鏡で観察したのが図1である。殆んどの菌が紐状に長大化していることが観察出来る。

かく長大化した菌を集菌後生理的食塩水により3回洗滌し静止菌とした。基質にはブドウ糖、焦性ブドウ酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸及びグルタミン酸を用いた。

表1は何れの菌も湿菌量で5mgの菌体を1カップに入れて酸素消費量を測定したものである(正確を期するため、調製菌液の一部は乾燥後乾燥菌量を測つて菌量の誤差による補正を行った。) X線照射直後菌では正常菌に比べて酸素消費量はやや低下する程度で大差は認めない。しかし2時間長大菌、4時間長大菌では、すべての基質について著しい活性低下が認められた。

2. 培地に対するX線照射効果の吟味

X線はある種の化合物に対し変性作用を有する。特に培地にX線を照射する場合は、 H_2O_2 の如き細菌発育を阻害する物質を作るとの報告がある¹³⁾。X線照射後の長大菌形成に関し、X線による二次的物質の形成による間接効果の関与の有無を吟味する目的をもつて次の実験を行った。すなわち普通寒天平板培地に菌照射と同様の方法で、8000rのX線照射後、菌をその上に薄く塗布し、37°Cで培養した。そして一定時間後長大菌形成の有無をしらべたが、

表1 X線照射後培養の長大菌の酵素活性
(Warburg 検圧計による酸素消費量)

(単位 μ l)

菌	基 質					
	なし	ブドウ糖	焦性ブドウ酸	α -ケトグルタル酸	コハク酸	グルタミン酸
正 常 菌	10	201	258	120	127	94
照 射 直 後 菌	11	176	210	93	125	103
照 射 後 2 時 間 長 大 菌	11	98	103	51	48	48
照 射 後 4 時 間 長 大 菌	12	74	60	25	28	22

反応液：M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2 0.9%食塩加)

菌 量：5 mg/Cup

基 質：M/100 (終濃度)

実験条件：37°C 1hr

X線照射：2000r

全く認められなかつた。更にその生育した菌の酵素性状を検圧法によつて比較した。

照射培地に移植後7時間培養、20時間培養の菌について、又無処置培地上に同時間培養したものを対照として数種基質に対する酸素消費量を比較した。形態の変化のない事は勿論、酸素消費量の点においても全く差異は認められなかつた。即ち以下の実験においてX線の培地に対する間接効果は全く無視し

表 2 細菌発育培地へのX線照射の影響 特に照射培地発育菌の酵索性状 (単位 μ l)

測定時間	基質	正常培地発育菌				照射培地発育菌			
		なし	ブドウ糖	焦ブドウ糖	性コハク照	なし	ブドウ糖	焦ブドウ糖	性コハク酸
培養7時間	30'	4.0	83.2	101.4	15.7	3.8	88.1	98.5	15.7
	60'	7.5	174.5	197.5	34.2	6.7	179.4	185.6	30.2
	90'	10.2	260.0	290.5	49.6	9.2	274.5	265.4	43.2
培養20時間	30'	2.7	62.5	79.9	10.9	0	61.6	74.6	14.0
	60'	5.4	130.6	145.3	24.6	5.6	135.6	150.4	27.8
	90'	8.1	202.9	161.0	41.0	11.2	210.9	173.8	50.2

反応液: M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2 0.9% 食塩加)

菌量: 5 mg/Cup

基質: M/100 (終濃度)

実験条件: 37°C

培地へのX線照射: 8000r

て本稿の結果を論じ得ることを明らかにした。

3. 長大菌の凝集性及び免疫学的性状

細菌の細胞表面は各種の物質の自由端が荷電しており、菌の等電点はそれらの総和として表われ、それぞれの菌の表面構造の特性を示している。そしてこの荷電は H^+ イオンや塩類の陽イオンで中和されて、平衡状態を失つて菌凝集が見られる。

本実験においては、X線長大菌の表面構造が正常菌のそれと如何なる差異を示すかを、食塩溶液凝集性、ミロン氏凝集反応及び酸凝集反応を行つて検討した。

表3に示す如く酸凝集性において、長大菌では凝集域がややアルカリ側に偏していることが示された。しかし食塩凝集性、ミロン氏反応においては正常菌との間に差異は認められなかつた。

更に正常チフス菌の抗血清を家兔を用いて作り、常法によるWidal反応を行つて、正常菌と長大菌との間における免疫血清に対する凝集性を検討した。その結果では、正常菌では3200倍まで凝集が認められたのに、X線長大菌では800倍まで凝集が認められたのみで、免疫反応上やや反応性の低下が認められた。

4. 長大菌の核酸量の推移

緒言にて述べた如く、細菌の核様体染色法をX線長大菌にほどこした場合、X線長大菌では菌体の伸長にも拘らず、伸長した細胞質中に核様体は1~2個存在するのみで、数が増加していない報告がある¹⁴⁾。ここで当然考えられる事はDNAの合成阻害である。この事については金政が、 P^{32} Tracer法によつてX線照射菌におけるDNA合成は強く阻害さ

表 3 正常菌及びX線照射長大菌の凝集性比較

	正 常 菌								X 線 照 射 菌								
	4	3	2	1	0.8	0.6	0.4		4	3	2	1	0.8	0.6	0.4		
食塩水による凝集性 (彩)	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		
酸凝集性 (pH)	2.3	2.7	2.9	3.1	3.2	3.4	3.6	3.8	2.3	2.7	2.9	3.1	3.2	3.4	3.6	3.8	
	4.0	4.3	4.6	5.3	5.5	6.3	7.0		4.0	4.3	4.6	5.3	5.5	6.3	7.0		
	±	-	-	-	-	-	-		+	±	±	-	-	-	-		
Millon 反応	-								-								
Widal 反応	血清希釈	25	50	100	200	400	800	1600	3200	25	50	100	200	400	800	1600	3200
	1 時間	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-
	24 時間	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-

注: pH 変換は Mc Ilvaine 緩衝液の10倍希釈使用 (pH メーターにて測定補正)

: Millon 反応は 2 倍液使用常法による

れることを報告している¹⁵⁾。

著者は正常菌とX線照射後長大菌との核酸量の差異を発色定量法によつて比較検討した。

図2 X線照射後 incubate 時の菌量及び核酸量の推移

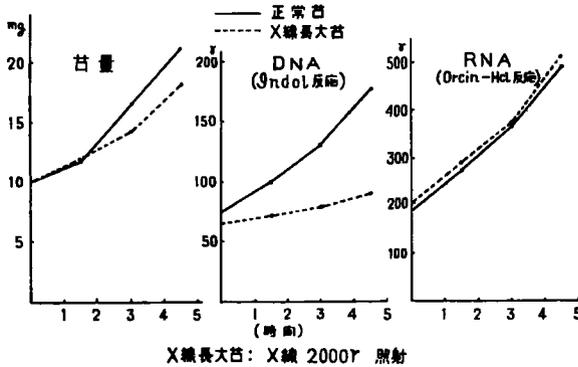


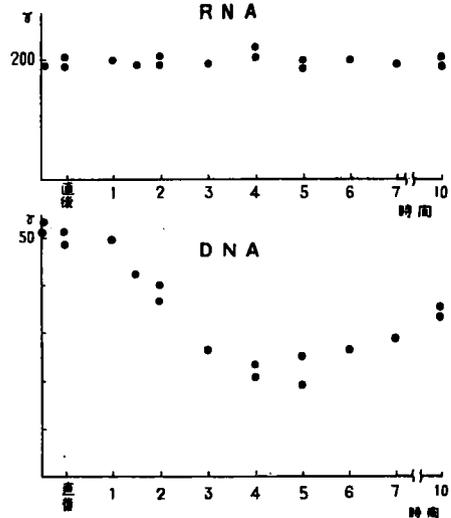
図2は常法によつて 2000r の X線照射を行つた菌体 10mg を普通 Bouillon に Inoculate して後培養 (緩速振盪) して、菌量及び RNA, DNA を経時的に定量した。RNA 量は Orcin-HCl 反応, DNA は Indol 反応によつて比色定量し、無照射正常菌の同様の操作を施した場合と比較した。正常菌では培養時間の延長と共に菌量を増し, RNA, DNA も共に平行して増加している。しかし X線照射菌では菌量及び RNA はほぼ同様に増加しているが, DNA はほとんど増加しない。照射菌を後培養したものを染色及び異相差顕微鏡で観察すると図1で示したように大部分の菌に長大菌形成を認める事が出来た。

更に常法により X線照射した菌をそのまま孵卵器におさめ 37°C で後培養して長大化せしめつつ、経時的に菌の一定量を掻きとつて RNA 及び DNA を定量し、その時の 10mg 菌当りの RNA, DNA 量を図示した。RNA は後培養によつても有意の変動は認められなかつたが、DNA は時間を経るに従つて減少し、5—6時間後に最低となる。この傾向は菌の長大化の計測を行つた報告と平行するものであることが分つた。

5. X線照射菌の誘導酵素の活性

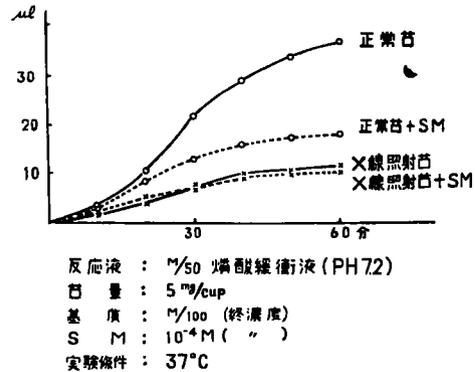
微生物を培養する時に、特定の物質即ち Inducer を添加すると、菌はその物質に適応して代謝する事が出来るようになる、即ち誘導酵素が産生もしくは活性化されてくるのである¹⁶⁾。この酵素産生は培地の中のみならず、増殖をとまなわない条件でも認め

図3 X線照射後培養の長大菌の核酸変化



られる。普通の培地に発育した *Sal. typhi* はグルコン酸を与えても初期は酸素消費は見られず、一定の Lag phase をおいて適応的に活性が高まつてくる。この現象が X線長大菌にも認められるかどうかというのがこの実験の目的である。グルコン酸を含まない普通寒天培地に培養した菌に 2000r の X線照射を行い、この照射菌と正常菌とについてワールブルグ検圧法により、グルコン酸酸化能の誘導活性について比較した。

図4 正常菌及び X線照射長大菌のグルコン酸に対する適応



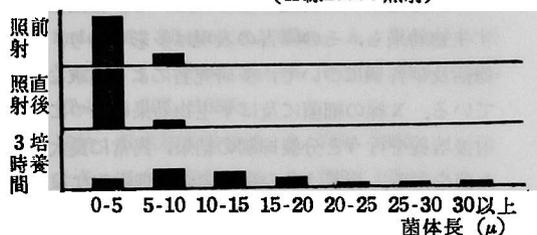
正常菌では15分位から誘導による活性化が認められ、誘導の阻害剤として知られるストレプトマイシン (SM) を反応系に加えると、誘導が抑制される。X線照射菌においては誘導現象が全く認められず、SM 添加の場合も全く同じ状態を示す。つまり X線

照射菌又はその後培養における長大菌では誘導酵素の生成もしくは活性化は認められない事が示された。

6. X線長大菌の復活の検討

普通寒天培地上に極薄に発育した菌苔にX線を2000r照射して、後培養3時間を行つて長大菌を得る。この長大菌の長さによる分布は図5に示す如くである。殆んど菌は正常大(0-5 μ)以上の長さに伸長し、長いものは30 μ にも及ぶものを生ずる。

図5 X線照射後の細菌の体長変化
(X線2000V照射)



これを標準白金耳で掻きとり、高度希釈混合培養法によつて生菌数算定を行つた。これと正常菌のそれとを比較したものが表4である。数回の実験の平均値をもつて成績を示した。X線長大菌では一定量を希釈して混合培養しても、可視集落を作る菌、即ち

表4 X線照射後3時間培養菌の生存率測定
(集落形成能を基準とす)

	生菌数/2 mg	期待される概算菌数
正常菌	940×10^5	(940×10^5)
X線長大菌	10×10^5	(180×10^5)

生存菌は僅少であることが分る。掻きとつた菌は鏡検によると殆んどが長大化した菌であり、もしそれらが分裂繁殖し得るものなら更に多数の集落が得られる筈である。図5の分布状態から概算して、長大菌がすべて集落をつくるとすれば少なくとも 180×10^5 個は形成されてよい筈であるが、それよりもはるかに少ない集落が得られたに過ぎない。つまり長大菌は早かれおそかれ死滅に向つている菌ということが出来る。

考 察

単細胞にX線照射を行つた場合、細胞の分裂が抑制されて、その結果細胞が異常形態をとることは種々の細胞について認められている。細菌特に杆菌で

は、このX線の分裂抑制の結果で異常に長い紐状の長大菌となる⁶⁾。しかしこの長大菌のカテゴリーに入るものとしては、色々の原因が存在し、或る種の薬剤、即ちペニシリン¹⁶⁾、アイロタイシン¹⁷⁾、テトラサイクリン¹⁸⁾、マイトマイシン¹⁹⁾等の抗生物質、フェニールエチルアルコールの作用²⁰⁾、又チミン欠乏培地におかれたチミン要求性大腸菌の場合²¹⁾、又高度の高水圧状態で菌が培養された場合²²⁾等が論じられている。又同じ放射線でも紫外線²³⁾、ガンマ線²⁴⁾の作用によつて生ずることが知られている。この内ペニシリンによる長大菌形成は細胞壁合成阻害として広く認められ、この長大菌は他のものと全く趣きを異にしており、DNAにおける変化は認められず、ペニシリナーゼによる復活が見られる。しかしそれ以外の長大菌誘起物質もしくは要因の多くは、DNAに変化を与えるものとして知られている事である。即ちマイトマイシン¹⁹⁾、フェニールエチルアルコール²⁰⁾、チミン欠乏状態²²⁾、X線の場合⁸⁾²⁶⁾について、化学的定量等の実験がなされて明らかにされている。DNAの機能については、DNA自身が自己複製を行う遺伝的単位であると同時に、一細胞一代について見れば、その細胞が生物として高次の機能を営むための統合的中枢の機能をもつとされている。したがつてDNAの破壊もしくは合成阻害があれば、その結果として色々の変調を来すことは当然考えられる。

この報告において核酸代謝の面は比色定量法によつて追求を行つた。金政の報告⁸⁾でX線照射菌は、RNA合成は全く阻害されないがDNA合成が阻害される事を認めている。著者の長大菌の分析結果においても、又時間的に長大化する菌の核酸分析においても、DNAは全く合成されない。そしてKane-masa¹⁴⁾の報告による菌体中のクロマチン様体の複製の抑制の所見とよく一致する。ペニシリンにより作られる長大菌においては、RNAは勿論DNAも正常に合成されるため、形態学的観察でもクロマチン様体は長大菌の内部に規則正しく一定間隔をもつて存在する²⁷⁾。そしてこの長大菌にペニシリナーゼを作用せしめると、ペニシリンによる分裂抑制が取り除かれて、速かに正常菌大に分裂してばらばらになる。しかしX線長大菌では、内部構造的にも全く異なるもので、しかも復活は全く不可能で長大菌は早晩死滅して行く事が、著者の行つた生菌数測定でも明らかな事である。結局X線照射によりDNAは直接のDamageを受け、又派生的にDNAの複製

も不可能になつたと考えられる。細菌の分裂は形態学的に三段階を経過することが、Knaysi²⁸⁾²⁷⁾により明らかにされている。まず細胞質の分裂、ついで隔壁形成、最後に2個の娘細胞に分離するものである。しかし Kanemasa の報告によると、X線長大菌では細胞質の分裂は明らかに認められているが核様物質の分裂が行われていないという。核様物質の分裂が先行することが、細胞質の分離に必須ではないという事を頷推出来る。又著者の得た成績から、DNA が一定程度に増加(恐らく2倍量)しない限り、核様体の分裂は起らないものと考えられる。以上の事から核様体もしくはDNAが正規に存在しないならば隔壁形成の命令が出されないか、又DNAへの障害が隔壁形成に必要な物質の合成に影響するのかも知れないと考える。

著者の報告中、長大菌の生理面の追求を行つた成績に考察を加えれば、まずX線の菌酵素系に及ぼす影響については、菌量当りの酵素活性の低下として現われている。しかし酵素活性の低下はX線照射直後の菌では殆んど認められず、この事と考え合わせて、X線は酵素に直接打撃を与えて不活化するよりも、酵素産生系のどこかに障害を与えると考えられる。これは正常な *Sal. typhi* がグルコン酸酸化に適應する現象を持つにかかわらず、X線照射菌では、グルコン酸による誘導が全く認められず、ストレプトマイシンによる誘導阻止の場合と同態度を示している。酵素生成に核酸が必要な事は自明の事実であるが、Pardee³⁰⁾はRNAの存在もしくは合成があるのみで充分であると述べ、逆にGaleはDNAの存在が必要であると述べている³¹⁾³²⁾。著者の実験では酵素系の合成が認められなかつたが、これは総合的なRNAは正常でも、内容的に異つているか、又DNAの産生阻害か変性が影響を及ぼしているかは論ずる事は出来ない。

菌体表面構造を、酸凝集、食塩凝集、ミロン氏反応、免疫血清凝集反応を行つて検討した結果では、等電点がややアルカリ側に偏している事、及び免疫血清凝集価がやや低下している結果を得た。前述の酵素蛋白の合成が攪乱されている事と考え合わせて、

構成蛋白の合成も攪乱されており、その結果として表面構造にも変化が起つているものであり、又正常抗原物質の合成も低下しているものと考えられる。又形態学的に隔壁合成が認められないのも同様の原因結果ではないかという可能性も生じて来る。

結局X線照射は菌に対しては即死的ではなく、DNAへの直接的、間接的障害がおきてその結果が色々の生物学的効果として表現されるものであろう。

結 語

放射線の生物効果に関しては、その重要性にかんがみ多方面からの研究がなされている。細菌に及ぼす生物効果も、その障害の表現は多彩であり、その総括及び各個について、多研究者により追求なされている。X線の細菌に及ぼす生物効果の一つに、照射後培養を行うと分裂抑制の結果、異常に長大化した菌を得る。著者はこの長大菌の生理学的な追求を行つた。

1. 普通寒天培地上に薄く増殖した *Sal. typhi*H 901W 菌苔に 2000r の X線照射を行つて、その後培養を続けると糸状長大菌になる。4—5時間の後培養で長いものは 30 μ 以上にも達する。生菌数測定の結果からすれば、長大菌は早晚死の転機を取る。
2. X線照射菌は後培養で長大化するが、酵素系の合成は阻害されている。特に誘導酵素の生成は認められなかつた。
3. 長大化にともなつて、菌体構成蛋白及び RNA は正常菌と略変らない状態で増加するが、DNA は増加しない成績を得た。これは形態的に観察される小致核を有する長大菌の像とよく一致する成績である。
4. 長大菌の凝集性を、正常菌のそれと比較した。Widal 反応による凝集性から、凝集価がやや低下している成績を得た。又酸凝集反応より、等電点がややアルカリ側に偏している結果を得た。

稿を終るに際し御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師村上教授並びに金政博士に深甚なる謝意を表します。

文

- 1) Wyckoff, R. W. G.: J. Exp. Med., 52, 769, 1930.
- 2) Wyckoff, R. W. G.: J. Gen. Physiol., 15, 351, 1932.

献

- 3) Wyckoff, R. W. G. & Luyet, B. J.: Radiology, 17, 1171, 1931.
- 4) Zirkle, R. E.: Amer. J. Cancer, 23, 558, 1935.

- 5) Claus, W. D.: J. Exp. Med., 57, 335, 1933. 38, 1962.
- 6) 武田: 日本レントゲン学会雑誌, 8, 355, 1930. 20) Berrah, G. & Konetzka, W. A.: J. Bact., 83, 738, 1962.
- 7) 西脇: 日本細菌学雑誌, 8, 941, 1953. 21) Gallant, J. & Suskind, S. R.: J. Bact., 82, 187, 1961.
- 8) 金政: 岡山医学会雑誌, 71, 6723, 1959. 22) Zobell, C. E. & Cobet, A. B.: J. Bact., 84, 1228, 1962.
- 9) 臨床細菌学提要: 伝染病研究所学友会編, 昭和34年. 23) Payne, J. I. et al: J. Bact., 72, 461, 1956.
- 10) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 161, 293, 1945. 24) Lea, D. E. et al: J. Hyg., 41, 1, 1941.
- 11) Ceriotti, G.: J. Biol. Chem., 198, 297, 1952. 25) Shiba, S. et al: Nature, 183, 1056, 1959.
- 12) 江上: 標準生化学実験, P. 144, 1953文光堂. 26) Dondney, C. O.: J. Bact., 72, 488, 1956.
- 13) Lea, D. E.: 放射線生物物理学, P. 36, 1957. 岩波書店. 27) 大熊: 岡山医学会雑誌, 印刷中.
- 14) Kanemasa: Jap. J. Microbiol, in press. 28) Knaysi, G.: J. Bact., 41, 141, 1941.
- 15) Suda, M., Naono, S., Kato, A., Inoue, S. & Yugari, Y.: Proc. Intern. Symp. Enz. Chem (Tokyo) 307, 1957. 29) Knaysi, G.: Bot. Rev., 15, 106, 1949.
- 16) 嘉納: 日本細菌学雑誌, 8, 769, 1953. 30) Pardee, A. B., Proc. Natl. Acad. Sci., 40, 263, 1954.
- 17) 上条: 日本細菌学雑誌, 9, 253, 1954. 31) Gale, E. F. & Fokes, J. P.: Bioch. J., 59, 661, 1955.
- 18) 林: 岡山医学会雑誌, 70, 4511, 1958. 32) Gale, E. F. & Fokes, J. P.: Bioch. J., 59, 675, 1955.
- 19) Curry, J. & Greenberg, J.: J. Bact., 83,

Physiological Aspects of Filamentous Elongated Bacteria Induced by X-ray Irradiation

by

Satoru Nishii

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae Murakami)

Sequences of cytological changes occurring in some bacteria following irradiation of X-ray have been described by many workers. It is known that, unless bacteria receive a considerable amount of irradiation, they continue to grow and become elongated, only their cell division being inhibited.

In the present study, the author gave physiological aspects on the filamentous *Salmonella typhi* H901W elongated by culture following after X-ray irradiation (2000 r).

1. It was observed by Warburg's manometric technique that most of enzyme activities in the elongated cells were reduced. Especially, the induction of a adaptive enzyme for glucuronic acid could not be observed in the elongated cells.

2. In the post culture following after X-ray irradiation, protein and RNA increased as long as cell body elongates but DNA didn't increase. This result coincides with the finding that irradiated *Salmonella typhi* elongated without the increasing of number of nuclear apparatus.

3. In the studies on the agglutination reaction of the elongated cells, the author found that the agglutinability with antibody were reduced and moreover the isoelectric point moved slightly against to neutral pH.