HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	BCGのテトラゾリウム鹽還元作用に就いて：第1報 反應測定に關する基礎的實驗
Author(s)	有馬, 純; 山本, 健一; 高橋, 義夫; 柿本, 七郎
Citation	結核の研究, 2, 47-50
Issue Date	1955-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26559
Type	bulletin (article)
File Information	2_P47-50.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

BCG のテトラゾリウム鹽還元作用に就いて

第1報　反應測定に關する基礎的實驗

有馬　純　山本健一　高橋義夫
(豫　防　部)

柿本七郎
(化　學　部)

I 緒　　言

BCG の酵素に関しては，従来我が国に於て，主としてワクチンの力価検定の目的から，乳酸脱水素酵素[1)2)]，ウレアーゼ[3)4)]，カタラーゼ[4)~6)]等の研究がなされているが，之等の酵素と菌の増殖力との関係は，夫々の酵素によつて可成り異なる様である。即ち乳酸脱水素酵素の様に菌の増殖力に比較的密接な関係を示しながら消長するものもあり，又ウレアーゼの様に増殖力が失われても猶永く其の活性を保つものもある。しかも前者の様な酵素でも猶，菌の置かれる条件によつては必ずしも増殖力の忠実な指標とはなり得ないのである。

近年，Kuhn 及び Jerchel[7)] 以来，テトラゾリウム塩が各種生物組織及び細菌類の酵素作用の研究に広く応用されて来ているが，本物質は周知の様に還元されると赤色乃至紫紅色のフォルマザンを生ずるもので，従来還元反応の指示薬に用いられているメチレン青の如く酸化型が着色して居り，還元されると無色になる薬剤とは逆の態度を示すものである。又其の還元反応は被検材料によつては，嫌気的に或いは好気的に，又細胞化学的に或いは比色計の使用の下に測定され得るのである。而して此の酵素作用が発芽力の旺盛な植物種子の胚芽[8)~14)]に顕著に見られる事や，動物の悪性腫瘍組織[15)16)]に強く起る点，或いは又，最近 Mudd[17)18)] 等が，結核菌の菌体内顆粒がテトラゾリウム塩を選択的に還元すると報じている事などから，かかる酵素作用が動植物の組織或いは細菌細胞の生命に極めて密接な役割を演ずる事が推察される。此の意味から，結核菌に於ても，当該酵素作用と菌の生死との関係を調べる事は甚だ価値のある事と言えよう。然し，此の点に関する業績[19)20)]は未だ数が少なく，従つて又，十分詳細な結果は得られていない様に思われる。

我々の研究も亦，BCG のテトラゾリウム塩還元酵素作用と菌の増殖或いは生死の関係を追究するにあるが，その為には先ず本酵素反応の生起の状態を色々の条件の下で調べ，反応に最適の条件を見出す必要があるわけである。本報はそこに到達する迄の基礎実験の報告である。

II 実験條件及び方法

総ての実験を通じて用いた BCG 菌液は，ソートン培地培養より型の如く水晶球入コルベンによる振盪法で調製した休止菌液であるが，菌の培養日数及び菌液 1 ml あたりの含有菌量は実験の目的によつて変えたし，又用いた緩衝液及び基質の濃度と種類もさまざまである。然し大部分の実験には，10 日培養の菌膜から製した 40 mg per ml の菌液を用い，緩衝液としては 1/10 M 硼酸・硼砂緩衝液 (pH 9) を，基質としては 1/5 M 乳酸カリ溶液を用い，又テトラゾリウム塩としては 2，3，5-トリフェニール・テトラゾリウム・クロライド (T.T.C.) の 0.5% 溶液* を使用した。又反応はチューンベルグ管を用いて嫌気的条件下で検した。之は後から述べる様に，以上の実験条件が BCG のテトラゾリウム塩還元能の研究に最良である事を知つたからである。

方法としては，先ずチューンベルグ管の主室に所定菌量を含有する菌液 1 ml と所定の緩衝液 0.5 ml を混入し，副室には 0.5% T.T.C. 溶液 1 ml と所定の基質 0.5 ml を混入した。管内の空気を約 10 mm Hg 迄排除した後，反応を 37°C の恒温槽で検した。即ち試験管を恒温槽に入れて暫時加温した後に，両室の液を混和し，作用時間 1 時間の後，混和試験液 1.5 ml を取出し，之にアセトン 4.5 ml を加え，暫時強く振盪して T.T.C. の還元によつて生じたフォルマザンをアセトンに移行させ，次いで 3000 p.r.m. 15 分間菌体を遠沈した後，其の上清をとり，エルマ式光電比色計を

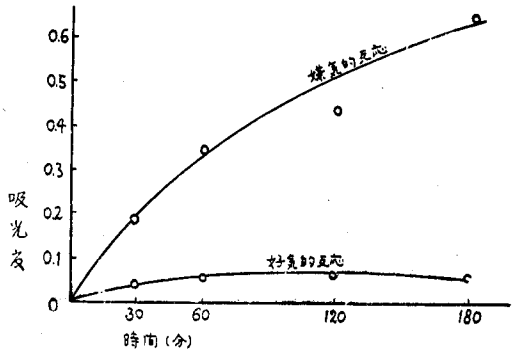
* 本實驗に於ては，T.T.C. の 0.5% 溶液を一貫して用いたが濃度につきその後再検討したところ，0.25% 附近では 0.5% の場合よりも幾分強く反應が起る事が判つた。併し何れにしても實驗成績の相對的關係に變りはないと思う。

用いてその吸光度を測定し，得られた値を以て酸素の活性度とした。此の際用いたフイルターは500 mμである。尙，各実験は少なくとも3回繰返した。

III 実験成績

實驗1　好氣的並びに嫌氣的條件に於ける還元反應

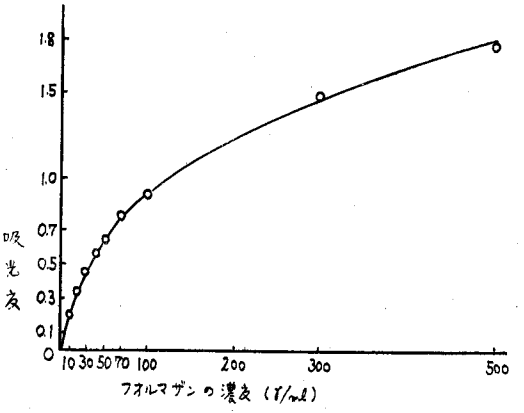
第1図に示す様に，反応は好気的条件に於ては極めて弱く，之に反して嫌気的条件に於ては著しく強く且つ速かに起つた。従つて以下の諸実験は総て嫌気的条件に於て行つた。



第1圖　好氣的・嫌氣的條件に於ける還元

實驗2　フオルマザンの量と吸光度との關係

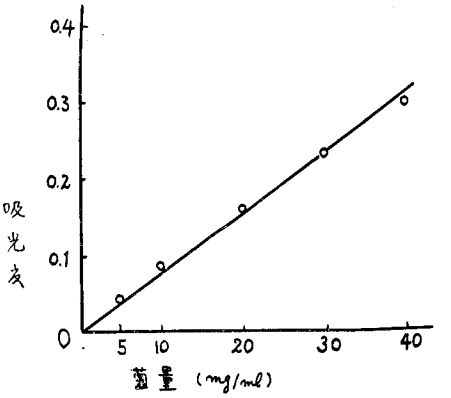
T.T.C. の還元物質たるフォルマザンの量と吸光度とは，前者の濃度が凡そ40γ per ml 迄は直線的関係を示した（第2図）。而して本実験の実験方法の範囲では，成績は概ね此の直線的関係の範囲内で得られるから，得られる吸光度はフオルマザンの量に比例し，従つて又 T.T.C. 還元の強さに比例すると言える。



第2圖　フオルマザンの量と吸光度との關係

實驗3　菌量と吸光度との關係

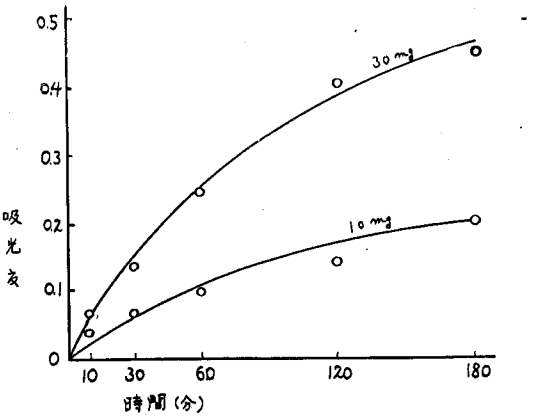
第3図に実験成績を示したが，菌量が5mg乃至40mg per ml の範囲にある場合，吸光度と菌量との間に直線的関係が認められた。従つて此の範囲では菌量と酵素作用は平行関係にあると言える。



第3圖　菌量と吸光度との關係

實驗4　菌量と反應速度との關係

第4図に明らかな様に，10 mg の菌液では，反応は3時間迄直線的に進行し，30 mg の場合には，1時間後に次第に緩い曲線を示した。従つて比較的短時間で反応を正確に検する為には，菌量を30 mg 乃至40 mg 附近にとどめ，反応時間を1時間以内にする事が適当と思われる。尙，使用に供する菌が培養初期で増殖力の旺盛な場合には，菌量が5 mg 附近でも反応を十分明らかに検し得るが，之に反して培養の古いものから作つた菌液の様に，菌の条件の不良な場合とか，又は凍結乾燥とか 37°C 保存の様な色々の外的条件が菌に加えられる場合等には，反応が著しく弱くなるので，比較的大量の菌量を用いなければ反応は起り難い。此の為，上記の様に条件を決める事が適当と考えられる。



第4圖　菌量と反應速度との關係

實驗5　至適 pH と至適溫度

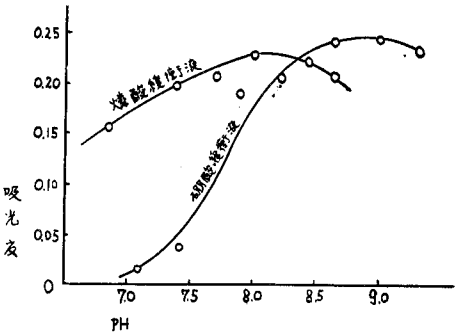
反応の至適 pH を検する為に，1/10 M の硼酸・硼砂緩衝液と燐酸緩衝液について夫々調べた。第5図に実験成績

を示した様に，前者ではpH 9.0附近，後者では8.0附近が至適であり，又前者に於ては後者に於けるよりも還元が強く現われた。尚，Kuhn等によれば，溶液のpHが9.0以上になると，その中に含まれる種々の還元性物質（例えばヴィタミンC，チスティン，グルタチオン等）が或程度迄テトラゾリウム塩を還元すると言うが，我々が此の点を確めるべく行つた実験では，BCG菌液40 mgの代りに1 mgのヴィタミンC又はチスティンを用いた場合，pH 9.0で微弱な還元が認められたが，100 γの場合には全く還元は起らなかつた。而して実際に実験に供する菌液の中に，かかる還元性物質が1 mgは勿論，100 γの様な量でも，含有される事は到底考えられない。従つてKuhn等の言う様に，pHを9.0にする事によるT.T.C.の還元は一応除外しても差支えないと思われる。

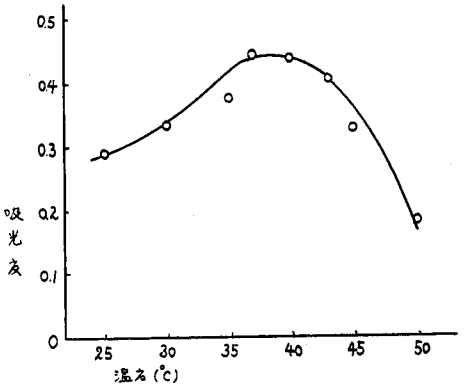
次に反応の至適温度は37°C乃至40°Cにある事が認められた（第6図）。

實驗6　基質の検討

種々の糖質，脂肪酸（総てカリ塩として使用），アミノ酸及びアミンについて基質としての効果の有無を調べた。供試薬剤は，アラビノーズ，ブドー糖，蔗糖，乳糖，デキストリン，乳酸，酒石酸，コハク酸，クエン酸，蟻酸，酪酸，林檎酸，焦性ブドー酸，味の素，アスパラギン，グリシン，グリセリン，ペプトーンである。糖質及びペプトーンは1%溶液とし，他は1/5 M溶液として用いた。



第5圖　至適pH



第6圖　至適温度

実験の結果，此の反応は，少なくとも現在の実験条件の下では，特に基質を加えても影響を受けない事，但し乳酸カリは反応を幾らか促進させる事が認められた。尚，ここに附記したい事は，基質として蒸溜水又は糖質を用いる時に，フォルマザンのアセトン抽出液がやや螢光を帯びて混濁し，この為に抽出液の吸光度を正確に測定し難くなる事である。それで本実験では，より強く又より明確に反応を起させる為に，基質として乳酸カリを用いたのである。

IV　総括並びに考察

以上我々はBCGの休止菌液についてT.T.C.還元酵素の性状を調べ，反応の測定法につき種々の検討を試みた。

此の酵素作用について明らかにされた第1の点は，BCGの場合，反応の起り方は好気的条件下では極めて微弱に過ぎないが，嫌気的条件下では極めて強い事であり，且つ又かかる無酸素状態では可成りの微量の菌でも，短時間で明瞭な反応を認め得る事である。注目すべき第2の点は，此の反応が特に基質を用いなくても著明に起り得る事である。

先ず第1の点に就いて考察して見よう。既にKun[21]及びBrodie及びGots[22]によつて報告されている様に，テトラゾリウム塩還元に関与する酵素系はヂフォスフオピリヂン・ヌクレオチドを助酵素とする脱水素酵素とフラボプロテインからなり，而してテトラゾリウムに対して直接の水素供与体となるものはフラボプロテインであろうと考えられている。ところで此の酵素系は，メチレン青を最終の水素受容体とする脱水素酵素の系列と同一であつて，水素の伝達は総て無酸素状態でのみ鋭敏に行われるのである。但し水素受容体としてメチレン青を用いる場合には，反応は全く嫌気的状態でしか起らないが，テトラゾリウムを用いる場合には，嫌気的に反応が強く起る事は勿論であるが，酸素の存在下に於ても微弱ながら反応が起るのである。之は，メチレン青に較べて，テトラゾリウムの水素に対する結合力が極めて大きく，このため酸素の存在下に於ても或程度の反応が起るためと考えられる。従来，多くの研究者達が動植物の組織片，ホモジエネート或いは細菌浮游液について，好気的条件下で反応を検しているのは，この様なテトラゾリウムの性質を利用したのであろう。何れにせよ，テトラゾリウム塩還元反応を，より鋭敏に測定する為には嫌気的条件の下で測定を行う事が必要であろう。

次に第2の点，本反応が特に其の基質を加える事なしに強く起り，加えられた基質によつて影響を受けない点につき考察を加えて見よう。この説明としては2つの考え方

が可能と思われる。其の1つは，BCG の T.T.C. 還元酵素が他の細菌（例えば E. Coli[23]）に較べてその活性度が弱いか，或いは酵素の量が少なく，其の結果反応は，少なくともその初期に於ては，菌液中に既存の未知の物質を基質として十分強く起り，この為単なる T.T.C. の固有還元のみが先行し，加えられた物質が反応に関与し得ないのであろうとする考え方である。其の2つは，加えられた物質がたとえ或程度基質として反応に利用されたとしても，其の効果が，前述の菌液自体に於ける T.T.C. の固有還元の為に掩われて現われて来ないのであろうとする考え方である。次に乳酸塩による反応促進の理由であるが，之は大林等[1]の実験成績から或程度迄説明される様に思われる。即ち彼等により，BCG に於ける乳酸脱水素酵素作用が他の脱水素酵素，例えばコハク酸，林檎酸脱水素酸素の作用よりも著しく強い事が明らかにされているが，T.T.C. を最終の水素受容体として用いる場合にも，加えられた乳酸塩を基質として脱水素反応が強く起り，この為に起る T.T.C. の還元が，菌液中の非特異的物質による還元に相加され，その結果全体として反応が促進されて現われて来るものと解される。

V 結　　論

BCG によるテトラゾリウムの還元は，嫌気的条件下で，基質として乳酸塩を，緩衝液として硼酸・硼砂液（pH 9.0）を用い，温度 37°C に於て，極めて速かに且つ強く起る。この為，可成り微量の菌量でも反応を光電比色計を用いて正確に測定する事が出来る。

（稿を終るに臨み，御懇切なる御教示を賜つた本学理学部植物学教室宇佐美教授に厚く御礼を申し上げる）。

参考文献

1) 大林・續木・古屋：醫學と生物學. 10, 311, 昭 22.
2) Kitamura, M.: Sci. Rep. Res. Lnst. Tohoku Univ. C. 5 (2) 143, 1953.
3) 河西・石川（正）：抗研誌. 4 (2), 76, 昭 24.
4) 有馬：結核. 25 (3), 105, 1950.
5) 加藤：抗研誌. 3 (1), 15, 昭 23.
6) Ito, K.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. C, 5 (1), 1, 1953.
7) Kuhn, R. & Jerchel, D.: Ber. Deut. Chem. Ges. 74, 949, 1941.
8) Waugh, T. D.: Science, 107, 275, 1948.
9) Jensen, C. O., Sachs, W. and Baldauski, F. A.: Ibid. 113, 65, 1951.
10) Bernett, N. & Loomis, W. E.: Plant Physiol. 24, 162, 1949.
11) Brewer, H. E.: Science, 110, 451, 1949.
12) Lambou, M. G.: Ibid. 117, 690, 1953.
13) Roistacher, C. N. et al.: Ibid. 118, 14, 1953.
14) Parker, J.: Ibid. 118, 17, 1953.
15) Straus. F. H., Cheronis, N. D. and Straus, E.: Ibid. 108, 113, 1948.
16) Black, M. M. & Kleiner, I. S.: Ibid. 110, 660, 1949.
17) Mudd, S., Winterscheid, L. C., De Lamater and Henderson, H. J.: J.Bact. 68, 459, 1954.
18) Wintersheid, L. C. & Mudd, S.: Am. Rev. Tuberc. 67, 59, 1953.
19) Mac. Vandiviere, H., Gentry, W. H. and Willis, H. S.: Am. Rev. Tuberc. 66, 95, 1952.
20) 金井：日本細菌學雜誌. 9 (1), 27, 1954; Ibid. 9 (2), 95, 1954.
21) Kun, E.: Proc. Soc. Exper. Biolog. & Med. 78, 195, 1951.
22) Brodie, A. F. & Gots, J. S.: Science, 116, 588, 1952.
23) Nordmann, J., Jude, A., Nordmann, R., Servant, P. et Gauchery, O.: Rev. Imm. 16, 157, 1952.