



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	BCGのテトラゾリウム鹽還元作用に就いて：第2報 テトラゾリウム還元作用と菌増殖力との関係
Author(s)	有馬, 純; 山本, 健一; 高橋, 義夫
Description	
Citation	結核の研究, 2, 51-54
Issue Date	1955-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26560
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P51-54.pdf



BCG のテトラゾリウム鹽還元作用に就いて

第2報 テトラゾリウム還元作用と菌増殖力との関係

有馬 純 山本健一 高橋義夫
(豫 防 部)

前報に於て、我々は BCG の T.T.C. (2, 3, 5-トリフェニールテトラゾリウム, クロライド) 還元に関与する酵素の性状を調べ、その酵素作用の測定に最適と思われる条件について検討した。次で我々は、この実験成績に基づいて、種々なる実験条件の下で T.T.C. 還元作用と菌増殖力を測定し、両者の間に如何なる関係があるかを調べた。又之と同時に乳酸脱水素酵素とカタラーゼの酵素作用を測定し、菌増殖力に対する3つの酵素の態度を比較した。

I 実験方法

BCG の菌液の調製並びに T.T.C. 還元作用の測定は前回の実験同様にして行つた。

乳酸脱水素酵素の活性度は大林の方法¹⁾に従つて測定した。即ち反応測定にはチューンベルグ管を用い、その主室には 40 mg per ml の菌液 0.5 ml と M/7 磷酸緩衝液 (pH 6.9) 0.5 ml を入れ、副室には M/5 乳酸カリ溶液 0.5 ml と M/500 2,6-デクロールフェノール、インドフェノール溶液 0.5 ml を入れた。管内の空気を排除 (約 10 mm Hg) した後、37°C の恒温槽に入れ暫時加温後、両室の液を十分に混ぜ、その時を基点として試験液の色調が予め準備して置いた標準色素液の色調迄褪色するに要する時間を測り、それを還元時間とし、その逆数を 1000 倍して還元度とした。

標準色素液は次の様にして調製した。即ち 40 mg per ml の加熱死菌液 0.5 ml、上述の磷酸緩衝液 0.5 ml、蒸留水 0.8 ml 及び色素液 0.2 ml をチューンベルグ管と同じ直径をもつ試験管に入れた。

カタラーゼの活性度の測定は KMnO_4 による滴定法²⁾によつた。100 ml 入の三角コルベンに 5 mg per ml の BCG 菌液 4 ml と M/7 磷酸緩衝液 (pH 6.9) 1.0 ml を入れて混和し、之に N/50 H_2O_2 液 10 ml を加え、手早く混和後、直ちに 37°C の恒温槽に入れ、5 分後に 4 倍希釈硫酸水 0.5 ml を加えて酵素作用を止め、残余の H_2O_2 の量を N/50 KMnO_4 で滴定した。酵素の活性度は 37°C で 5 分間に分解される H_2O_2 の量を以て表わした。

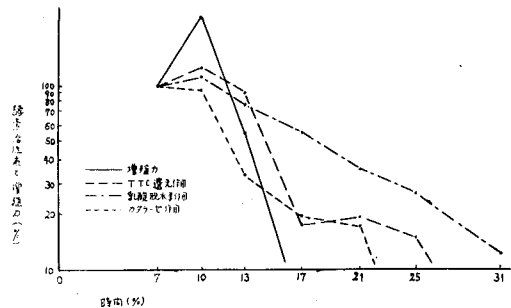
菌の増殖力は小川氏定量培養法によつて測定した。即ち夫々の実験に際して適宜に希釈した菌液を 0.1 ml 宛小川

培地に流し、培養 4 週後に生じた集落数を数え、各希釈菌液につき培地 5 本から得られた集落数の平均値を以て生菌単位とし、之から得られる菌液の生残率を以て増殖力を表わした。

II 実験成績

実験1 BCG の培養日数と酵素作用及び増殖力との関係

ソートン培地に BCG を培養し、培養日数 7 日より 31 日迄、3 日の間隔で菌液を作り、夫々のものについて酵素作用と増殖力を測定した。成績を第 1 図に示したが、培養経過を追つて増殖力と T.T.C. 還元作用は共に減弱するが、その度合は必ずしも同じではなかつた。即ち T.T.C. 還元作用の減弱の程度は増殖力のそれよりもやや弱い傾向が見られた。同様の事は乳酸脱水素酵素とカタラーゼにも当てはまるが、増殖力に比較的近い経過を示す酵素はカタラーゼであり、最も遠いのは乳酸脱水素酵素で、T.T.C. 還元酵素は両者の中間を示した。



第1図 BCG の培養日数と酵素作用及び増殖力との関係

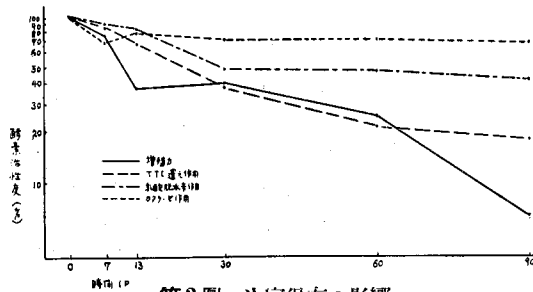
実験2 菌液保存の影響

i) 氷室保存の場合: 40 mg per ml の菌液を 4°C の氷庫に入れ、時間的に酵素作用と増殖力の関係を追究した。成績を第 2 図に示した。此の実験では、T.T.C. 還元作用の減弱と増殖力のそれとは凡そ一致し、カタラーゼ作用の減弱は最も緩慢であつた。乳酸脱水素酵素は他の 2 酵素の中間の態度を示した。

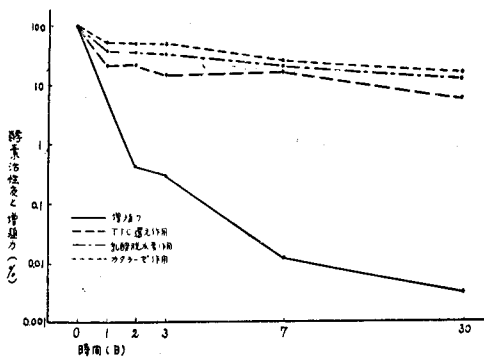
ii) 37°C 保存の場合：第3図に成績を示した様に、氷室保存の場合に比して酵素の不活性化は速やかに起るが増殖力の減弱は之より遙かに著明で、両者のカーブは早期に解離した。尙、この実験では各酵素間には著差は認められなかつた。

実験3 加熱の影響

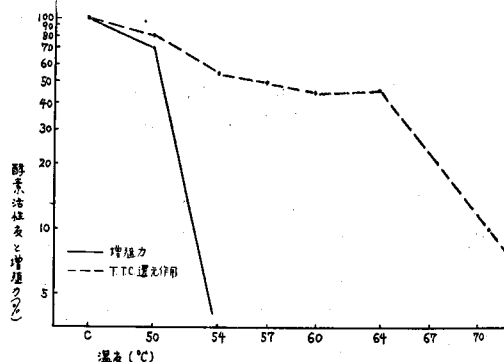
40 mg per ml の菌液を恒温槽中で絶えず振盪しながら 50 乃至 70°C で 10 分間加熱し、その後の酵素作用と増殖力を測定した。第4図に示す成績から明らかなように、T.T.C. 還元能は 65°C 迄は徐々に失なわれ、65°C から上の温度で急速に不活性化するが、之に反して増殖力は極めて速やかに減弱する傾向を示した。即ち 50°C で 70%、54°C で 0% の増殖力を示した。



第2圖 氷室保存の影響



第3圖 37°C 保存の影響



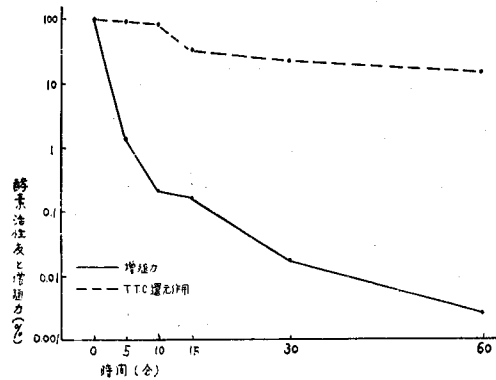
第4圖 加熱の影響

実験4 紫外線照射の影響

上記の実験と同濃度の菌液 3.0 ml を直径 4.0 cm のペトリ皿に入れて薄い液層となし、之に、光源 (マツダ殺菌燈, 20 W) との距離 30 cm で直接紫外線 (2535 Å) を照射した。第5図に成績を示したが、T.T.C. 還元酵素は照射時間 60 分で猶 20 乃至 30% の活性度を維持したが、増殖力は極めて急激に減弱した。

実験5 凍結融解の影響

先に我々は、BCG の増殖力が菌液の凍らせ方によつて影響を受ける事につき報じた。即ち之によつて、凍結速度が大なる程、又菌液の最低到達温度が低い程、菌の増殖力の受ける障碍の大きい事が明らかにされた。そこで、この傾向が、BCG の増殖力に於ける場合と同様に、酵素作用に於ても見られるかどうかを明らかにする目的で、菌液を急速に -180°C 迄冷却する場合と徐々に -30°C 迄冷却する場合について実験を試みた。



第5圖 紫外線照射の影響

第1表 凍結融解の影響

	凍結様式	増殖力		T.T.C.	乳酸脱氢素		カタラーゼ		
		V.U.	S.R.	O.D. %	R.T. (分)	%	H ₂ O ₂ (ml)	%	
実験 I	對照	71	100	0.38	100	7	100	4.0	100
	緩慢凍結	67	94	0.34	87	7	100	3.9	97
	急速凍結	24	34	0.31	80	7	100	3.9	97
実験 II	對照	100	100	0.19	100	13	100	7.5	100
	緩慢凍結	115	115	0.17	89	21	61	7.4	99
	急速凍結	66	66	0.14	73	17	77	7.8	103
実験 III	對照	154	100	0.21	100	22	100	5.2	100
	緩慢凍結	96	72	0.21	100	19	116	5.15	98
	急速凍結	76	49	0.17	81	19	116	5.10	98

註 V.U.: 生菌單位 S.R.: 生残率
O.D.: 吸光度 R.T.: 還元時間

先ず急速凍結の場合には、液体空気に直接に菌液の入った試験管を漬けて、急速に菌液を -180°C 迄冷却した。緩慢凍結の場合には、菌液を入れた試験管を之よりも直径の大きい容器に入れ、この容器を -30°C の飽和塩化カルシウム液に入れた。この為、試験管中の菌液は試験管と容器との間の空気の層を通して徐々に -30°C 迄冷却された。融解は総て 30°C の温水で行った。

第1表に実験成績を示した。即ち凍らせ方によつて現われる差異は、増殖力にも、又T.T.C.還元作用にも認められた。但し、酵素作用に見られる差違は増殖力に於ける差違程著明ではなかつた。尚、乳酸脱水素酵素とカタラーゼには全くこの様な差違は見られなかつた。

実験6 凍結乾燥の影響

メジウム1mlにつき夫々12mgと40mgを含む菌液を0.5ml宛アンプルに分注し、 -35°C の低温室に置いて徐々に凍らせた後、多岐管式真空乾燥器を使用し、室温で4時間乾燥し、凍結乾燥操作前後の菌液について増殖力とT.T.C.還元作用を調べた。尚、メジウムとして1%蔗糖溶液と蒸溜水とを比較した。第2表はその実験成績である。菌量が12mgの場合、メジウムが蒸溜水であると1%蔗糖溶液であるとに拘わらず、増殖力とT.T.C.還元能は共に減弱した。唯、メジウムが蔗糖溶液の時には、蒸溜水の時に較べて、両者の減弱の度合が少なかつた。之と同様な傾向は、菌量が40mgの場合にも認められたが、凍結乾燥の影響は菌量12mgの場合に比して少なかつた。

第2表 凍結乾燥の影響

アンプル中の菌量	メジウム	増殖力				T.T.C.還元			
		凍結乾燥前		凍結乾燥後		凍結乾燥前		凍結乾燥後	
		V.U.	S.R.	V.U.	S.R.	O.D.	%	O.D.	%
12mg	蒸溜水	47.6	100	18.6	39	0.09	100	0.04	44
	1%蔗糖			36.6	77			0.05	56
40mg	蒸溜水	47.6	100	29.6	62	0.30	100	0.25	83
	1%蔗糖			21.6	45			0.30	100

次に、現在我が国で使用されているBCG乾燥ワクテンについて、T.T.C.酵素作用と増殖力の関係を調べてみた。即ちロット番号の異なる3種の製品の半数について実験を行い、他の半数は 37°C に1箇月放置した後に同様の実験を行った。第3表はその実験成績である。

之に明らかな様に、 37°C 1箇月保存によつて増殖力もT.T.C.還元酵素作用も共に減弱した。但し酵素の不活性化の度合は増殖力のそれよりも弱かつた。

実験7 抗結核剤の影響

この実験では、ストレプトマイシン(SM)、パラアミノ

サリチル酸(PAS)及び、イソニコチン酸ヒドラジド(INAH)の3種の抗結核剤が、休止並びに発育の状態にあるBCGのT.T.C.還元酵素作用と増殖力に如何なる効果を示すかを調べた。

i) 休止菌に薬剤を作用させた場合

SM, PAS及びINAHを、反応測定時の試験液に於ける濃度が1mg per mlとなる様に、菌液に加え、その直後或いは氷室24時間保存後のT.T.C.還元作用を検した。実験成績を第4表に示した。薬剤の作用直後に於いては、酵素作用に対するSMとPASの効果は全く見られず、独りINAHのみが酵素作用を約20~40%減弱させた。

尚、 4°C の氷室にて24時間作用させた場合にもこの傾向が認められた。

ii) 増殖中の菌に薬剤を作用させた場合

ソートン培地に菌が旺盛に増殖している時期に、上記の薬剤を、培地中の濃度が1mg per mlとなる様に無菌的に培地に加え、再び孵卵器に取め、24時間後に取り出して菌膜を集め、蒸溜水で十分に洗つて薬剤を落してから、夫々の菌膜より可及的同一条件で菌浮遊液を調製した。即ちこの場合には、培地の表面で増殖並びに成長しつつある菌に対する薬剤の影響を調べたのである。第5表に示した成績から明らかな様に、SM作用の場合には、T.T.C.還元能の減弱も明らかに認められたが、それよりも遙かに強く増殖力の減弱が見られた。之に反して、PAS作用の場合には、酵素作用も増殖力も共に寧ろ多少の増強する傾向が認められた。INAH作用の場合には、酵素作用は減弱し、増殖力は多少増強する結果が得られた。

第3表 乾燥ワクテンのT.T.C.還元作用と増殖力との関係

乾燥ワクテンロット番号	増殖力				T.T.C.還元			
	37°C保存前		保存後		37°C保存前		保存後	
	V.U.	S.R.	V.U.	S.R.	O.D.	%	O.D.	%
No. 1	58	100	11.7	20	0.095	100	0.045	47
No. 2	87.7	100	39.3	45	0.080	100	0.040	50
No. 3	113	100	22.7	20	0.120	100	0.080	67

第4表 抗結核剤の影響(休止菌に作用させた場合)

	実験I		実験II			
	薬剤作用直後		作用直後		$^{\circ}\text{C}$ 24h保存後	
	O.D.	%	O.D.	%	O.D.	%
対照	0.470	100	0.470	100	0.345	73
SM	0.460	98	0.490	104	0.370	79
PAS	0.450	96	0.480	102	0.365	78
INAH	0.370	79	0.280	60	0.200	43

實驗 8 酵素阻害剤の影響

種々の酵素阻害剤を、その最終濃度が 1/300 Mol となる様に菌液に加え、その直後の T.T.C. 還元作用を測定した。第 6 表はその実験成績である。硝酸銀、硫酸銅及びモノ沃度醋酸に可成り強い阻害作用が認められたが、シアン、マロン酸、アジド及び沸化ソーダには全く阻害作用は見られなかつた。フェニールヒドラジンは約 30% の阻害を示した。

第 5 表 抗結核剤の影響
(増殖中の菌に作用させた場合)

	實驗 I				實驗 II			
	増殖力		T.T.C.還元		増殖力		T.T.C.還元	
	V.U.	S.R.	O.D.	%	V.U.	S.R.	O.D.	%
對照	24	100	0.500	100	102.8	100	0.465	100
SM	4.7	19.5	0.350	70	0	0	0.400	89
PAS	32	133	0.600	120	179.5	114	0.530	117
INAH	28	116.6	0.390	78	166.0	161	0.246	55

第 6 表 酵素阻害剤の影響

酵素阻害剤	T.T.C.還元度 (%)	酵素阻害剤	T.T.C.還元度 (%)
對照	100	アジド	106
フェニールヒドラジン	67	弗化ソーダ	96
硝酸銀	18	モノ沃度醋酸	32
マロン酸	105	硫酸銅	30
青酸加里	111		

III 総括並びに考察

以上の実験成績を概括すると、BCG に於けるテトラゾリウム塩還元作用は、ある限界内に於ては、菌の増殖力に伴つて消長する、併し菌が或る実験条件、例えば加熱とか、紫外線照射或いは凍結融解とかの障害を受ける場合には、此の酵素作用の減弱の度合は増殖力の夫よりも一般に弱い。換言すれば、細胞がその増殖力を失なつても猶、酵素の活性度が或る程度保たれているのである。併し、酵素作用と増殖力との斯様な関係も、現在、菌増殖力測定に用いられている培養方法が小川培地使用と云う条件の限られたものであり、此の方法では集落の現われて来ない菌にも、猶増殖力が保持されているものがあつて、より好適な環境に置かれるとそれが増殖して来る可能性のある事を考えるならば、必ずしも正しいとは考えられない。即ち BCG 菌液中の生菌数を培養方法によつて算定し、之を以て最も信

頼し得る菌の増殖力と見做す点に問題があるので、或いは寧ろ T.T.C. 還元酵素作用の方がより適切な菌増殖力の指標であるかも知れない。此の点に関しては今後より詳細な検討が加えられなければならないと思う。

次に吾々は、T.T.C. 還元作用以外に乳酸脱水素酵素とカタラーゼの酵素活性度を測り、3 者を比較したが、之等の酵素が与えられた実験条件に対し夫々異なる態度を示す事を知つた。例えば、氷室に菌液を保存した場合、T.T.C. 還元酵素は増殖力に最も密接な関係を示し、他の酵素に比して速やかに弱るが、カタラーゼは殆んど活性度を失なわず、乳酸脱水素酵素は両者の中間の態度を示した。又菌液の凍結によつて起る障害は T.T.C. 還元酵素にのみ著明に現われ、他の酵素には全く認められなかつた。しかも、急速凍結が緩慢凍結よりも菌に強い障害を与える傾向が、菌増殖力と T.T.C. 還元酵素の両者にのみ一致して見られる事は甚だ興味深く思われる。尙、凍結乾燥操作による影響も T.T.C. 還元能と増殖力が大体一致している点と、比較的菌量の少ない乾燥ワクチンについても、可成り明確に当該酵素反応を測定し得る点から、或いはこの方法が乾燥ワクチンの力価の迅速測定に応用され得るのではないかと考えられる。

最後に、抗結核剤 (SM, PAS, INAH) の当該酵素に対する作用について述べると、BCG の休止菌に作用させる場合、之等の薬剤は、其の作用時間の如何に拘わらず、殆んど T.T.C. 還元作用を阻害しない。併し同じ薬剤を、増殖中の菌に作用させると、休止菌の場合とは全く違つた結果が得られる。即ち SM を加えると、T.T.C. 還元作用は強く減弱するが、生菌数の減少は之よりも更に著しい。即ち金井が既に報じた如く、SM は増殖最中の結核菌に対しては明らかに殺菌的効果を示すのである。INAH を用いる場合には、酵素作用の減弱は或る程度認められるが増殖力の低下は見られず却つてやや増強する。PAS の場合には、増殖力も T.T.C. 還元作用も却つて明らかに強まる。この様に 3 種の薬剤が増殖、發育中の菌に対して夫々異なつた態度を示す事は、菌に対する薬剤の作用機転の独立性を示すものと興味深く考えられる。

参考文献

- 1) 大林容二・續木正夫・古屋さとよ：醫學と生物學. 10, 311, 昭 22.
- 2) 有馬純：結核. 25, 105, 1950.
- 3) Arima, J., Takahashi, Y., Nei, T. and Sato, T.: Jap. J. of Tuberc., 1, 26, 1953.
- 4) 金井興美：日本細菌學雜誌. 9(3), 181, 1954.