



Title	結核菌の生物学的研究, 特に毒力菌と弱毒菌の差異について : (第1報) Viability, 脱水素酵素, 呼吸等の時間的消長について
Author(s)	横井, 敏夫; YOKOI, Toshio
Description	
Citation	結核の研究, 5, 17-25
Issue Date	1956-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26603
Type	departmental bulletin paper
File Information	5_P17-25.pdf



結核菌の生物学的研究, 特に毒力菌と弱毒菌の差違について

(第1報) Viability, 脱水素酵素, 呼吸等の時間的消長について

横井敏夫

(北海道大学結核研究所細菌部 主任: 大原 達教授)

(昭和31年7月10日受付)

結核菌の毒力の概念について, Dubos¹⁾ は広い生物学的立場よりこれを菌の永続的, 内在的な性質とは考えず, host-parasite relationships によつて規定されるものとなし, 感染, および抵抗に関与する微生物, ならびに生体側の数多くの因子を考慮して解釈すべき事を説いている。Host の条件を出来得る限り一定にした上で, いろいろな種類の結核菌および非病原性抗酸性菌を動物に接種し, その体内における菌の増殖力を調べた研究はかなり多いが, そのうち略々一致した成績が得られているのは菌の毒力と増殖力の関係に就いてである。

即ち Dubos²⁾, Mackaness³⁾, 佐藤⁴⁾, 加藤⁵⁾, 勝山⁶⁾ 金井⁷⁾ その他多くの学者が観察している如く, 感受性動物体内で毒力結核菌は増殖傾向が極めて顕著であるが, 弱毒結核菌はこの傾向が遙かに弱く, 非病原性抗酸性菌に至つては生体内に侵入後速かに減少の一途を辿り, 増殖傾向は殆んど認められない。Rich⁸⁾ は結核菌の毒力を定義して「元来その菌型の菌に対して感受性のある動物の正常組織中で, その菌が生存し増殖し続けていく能力の程度」と述べているが, 上述諸家の実験成績は Rich の定義の妥当性を裏付けるものである。しかし結核菌の毒力を論ずるには, 宿主の生物学的性質と生理的条件を考慮するにも増して, 菌自体の本来持つている内在的な能力を追求しなければならぬのはいう迄もない。菌の増殖によつて生体に進行的な病変が惹起せられる事は, 少くもその大部分を結核菌自身の持つ未だ説明せられない未知の力によつて説明すべきものとする。しかしこの力は菌が生体内に侵入する事によつて突然獲得されたものとは到底考えられず, 菌が本来持つている個々の性質と考えるべきであろう。この意味から, この未知の力を *in vitro* の立場より解明しようとする一つの探究方法は結核菌における強毒株と弱毒株の生物学的な差違, ひいては毒力の本質を追求する上に決して無意義な事とは考えられない。

近年 Bloch⁹⁾ は, 結核菌の特性的な化学成分である wax 部分から石油エーテルによつて1つの化学物質を分離し, これを“Cord factor”と命名した。この物質はマウスを斃死せしめるが, いろいろな strain のマウスに対する Cord factor の毒性はこれを分離した original の菌自身の持つている毒性と正しく平行する。即ちこの物質は結核菌の Cord 形成と関係があると同時に, 謂わば結核菌毒素とも考えるべき物質である。然しこのものは強毒株のみから分離せられるものではなく, 毒性の弱い BCG 等からも分離され, 更にこれと類似の物質は, 牝牛の肺や非病原性抗酸性菌 Smegma にも存在する事を Bloch 自身報告している。

また, 最近 Spitznagel¹⁰⁾ は抽出方法を変えて結核菌から毒性物質を得たが, BCG より抽出したものと強毒菌より得たもの間には毒性において大差がなかつたという。同様の毒性物質として Choucroun¹¹⁾¹²⁾ の PMKo や Lederer の Wax C 等があり, これ等は化学的にそれぞれ近似しているものと考えられるが, 何れも強毒株のみから得られるものではない。斯く見ると結核菌の毒力を以上の如き毒性物質の存否によつて解明する事は出来ないように思われる。

著者は *in vitro* において結核菌の毒力を理解するには, 強毒菌, 弱毒菌, 鳥型菌, 非病原性抗酸性菌のいろいろの生物学的態度を比較研究して見ることにより, あるいは毒力菌の特殊な性状の一端を知り得るのではないかと考えた。特に著者は菌の Viability に関し, 弱毒株は生体内において増殖傾向が少いのと同様に, 試験管内においても強毒株に比し生命力の弱いものではなからうかと考え, 培養日数を追つて生菌数の消長を仔細に調べた結果, 大体においてこれを実証する事が出来た。これと共に, 併せて菌の呼吸, 脱水素酵素の消長をも観察したので, 茲に得たる成績を報告したいと思う。

実験方法

1) 菌株： 人型菌仲野株，青山 B 株（以上何れも強毒株），人型菌今村喜文字株（弱毒株。以下今村株と略記す）BCG，鳥型菌竹尾株，非病原性抗酸性菌 *M. Phlei* および *M. Smegmatis* の 7 株を使用。いずれも当研究所保存の菌株である。

2) 菌液調製法： ソートン味の素法培地（味の素 8 g 使用，500 cc 入ルーの培養瓶に 150 cc 分注，または 100 cc 入三角コルペンに 40 cc 分注）に発育した菌膜を充分洗い，培地成分を取除いた後型の如く水晶玉入コルペンによる振盪法で調製した resting cell を使用する。

3) 世代時間の測定法： Youmans¹³⁾ 新明等¹⁴⁾ の行つた方法による。即ち血清加 Kirchner 培地に 10^{-1} mg より 10^{-6} mg 迄段階的に稀釈した菌量を接種し，菌が増殖して肉眼的に初めて観察される日より世代時間を測定した。

4) pH の測定法： 菌培養濾液を滅菌したる後 SZK. 水素イオン比色計にて測定す。

5) 酸素消費量の測定： Warburg 旧法によつた。主室には 1 ml の菌液（菌の濃度は 40 mg/ml 時に 20 mg/ml）1 ml と 0.5 ml の 1/7 M 磷酸緩衝液（pH 6.9），副室には 0.5 ml の 10% KOH 側室には 0.5 ml の M/5 乳酸カリまたは同量の蒸留水を入れ，観察時間は 3 時間とした。

6) 脱水素酵素の活性度の測定法： 大林¹⁵⁾，有馬¹⁶⁾ の方法に従つて測定した。即ち反応測定には Thunberg 管を用い，その主室には 0.5 ml の菌液（20 mg/ml）と 0.5 ml の M/7 磷酸緩衝液（pH 6.9）とを入れ，乳酸添加の影響を見る場合には 0.5 ml の M/5 乳酸カリ溶液と同じく 0.5 ml の M/500 2.6 dichlorophenol-indophenol 溶液を，無基質時の酵素活性を調べる場合には乳酸カリ溶液の代わりに同量の蒸留水を，それぞれ副室に加えた。

管内の空気を排除（約 7 mm Hg）した後，37°C の恒温槽に入れ，暫時放置した後両室の液を十分に混ぜ合わせる。その時を基点として試験管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た。標準色素液は上記の色素液 0.2 ml に 0.5 ml の加熱死菌液（20 ml/mg），0.5 ml の磷酸緩衝液および 0.8 ml の蒸留水を加えて作つたものである。

7) Viability の測定： 小川氏定量培養法によつた。即ち各培養日数における各菌株の適宜に稀釈した菌液を 0.1 ml 宛小川培地に流し，4 週間培養後の発生集落数を以つてその菌の生菌単位とした（即ち「生菌単位」と「生菌数」とは同じ意味であるが，1 個の集落が必ずしも 1 個の結核菌から作られるという保証はないので「生菌数」という言

葉を避けた）。

実験成績

1) 使用菌株の世代時間： 菌株の最も良好なる状態の菌膜を使用して世代時間を測定した。その結果は第 1 表に示す如くである。

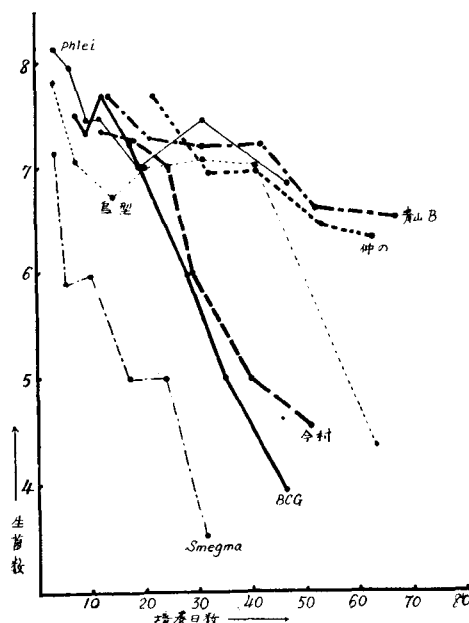
第 1 表 使用菌株の世代時間

菌株	仲野	青山 B	今村	BCG	鳥型	Phlei	Smegma
培 養 日 数	16 日	13 日	9 日	7 日	4 日	4 日	4 日
接 種 生 菌 単 位	7.7 (10^{-6})	22.3 (10^{-6})	5.7 (10^{-6})	53 (10^{-6})	36 (10^{-6})	59 (10^{-6})	29.3 (10^{-6})
世 代 時 間 (時間)	26.5	20.8	19.3	16.8	3.5	3.5	3.2

接種時における生菌単位を調べて見るに仲野株と今村株はその値がそれぞれ 7.7 および 5.7 (10^{-6} mg) で，他の菌株が 22.3 (10^{-6} mg) 乃至 59 (10^{-6} mg) であるのに較べるとかなり低いものであつたが，ソートン培地上の成長状態を比較して見ると，コルペンの全表面に菌膜が成長する期間の長短と，世代時間の長短とはよく一致していた。

第 1 表より各菌株間の世代時間を比較して見れば，鳥型菌竹尾株 *Phlei*，および *Smegma* の 3 株が他に比して

第 1 図 Viability の消長



著しく早く、3.2 時間から 3.5 時間の値を示し、青山 B 株、今村株、BCG の 3 株がおのおの 20.8, 19.3, 16.8 時間（鳥型、Phlei, Smegma の約 5.2 倍から 6.5 倍）と大体同程度の世代時間を以つてこれに次ぎ、仲野株は世代時間最も長く、その値は 26.5 時間（鳥型等の約 8 倍）であつた。

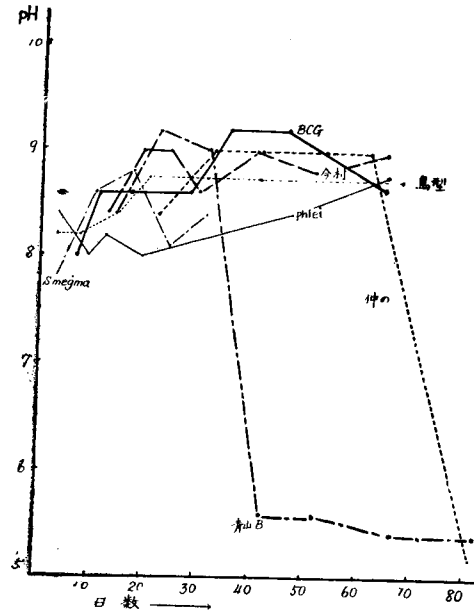
即ち少くとも初期の間は鳥型、Phlei, Smegma は他の菌に比し分裂能力が旺盛であり、仲野株は他の菌株に比較して分裂速度が最も遅い。

2) Viability の消長： 各菌株毎に培養日数を追つてその Viability を測定して見た。その成績は第 1 図に示す如く、各菌株とも培養日数と共に Viability は減弱するが、減弱の度合は決して同じでなく strain によつてそれぞれ異つてゐる。仲野、青山 B 株、および Phlei は相当長期迄 Viability が減弱せず、前二者の生菌単位は 82 日目において仲野株 $10.5(10^{-5})$, 84 日目において青山 B 株 $9.5(10^{-5} \text{ mg})$ であり、Phlei の生菌単位は 64 日目で $25(10^{-5} \text{ mg})$ であつた。これに反し BCG, 今村株等の弱毒菌は略々 30 日頃迄相当高い生菌単位を保つてゐるが、以後急激に減少の傾向をとり、50 日前後になると生菌単位がもとの $1/10^3$ 乃至 $1/10^4$ に落ちる。鳥型菌は前二者よりやや長く、40 乃至 50 日ころまでは相当高い生菌単位を示すが 69 日に到り急激に下つて $22.3(10^{-4} \text{ mg})$ の値を示した。

Smegma の増殖は被検菌中甚だ特異なもので Sauton 培地においては培養後 5 日位でほとんどの菌が液面下に沈んでしまい、そのあとの培地表面には極めて菲薄な菌膜が残される。而して沈下した菌の Viability は非常に低く、 10^{-8} mg でも小川培地上に認むべき Colony を作らない。これに反し表面の薄膜はかなりの Viability を有し、26 日目に生菌単位 $13(10^{-6} \text{ mg})$ を示した。第 1 図の curve は表面の薄膜と管底の沈下菌とを併せて測定したもので、かかる特異な発育状態から見れば他の strain と直接比較する訳には行かないかも知れない。しかし発育した菌全体について、一応他の strain と同様に測定した結果においては、第 1 図の如く被検菌株中最も Viability の低いものであつた。なおこのため、後述の酸素消費量、脱水素酵素の活性度の測定等にも決定的な意義はおけないものと考えられる。

3) pH の消長： 培養濾液の pH をそれぞれ培養日数を追つて測定した。その成績は第 2 図に示す如く、仲野および青山 B の強毒 2 株を除く他の strain は初めの pH 7.2 よりその値が上昇して終始アルカリ性を保つていたが、青山 B 株は 30 日から 40 日の間において、仲野株は 62 日から 82 日迄の間において何れも急激にこの値が下り PH 5.

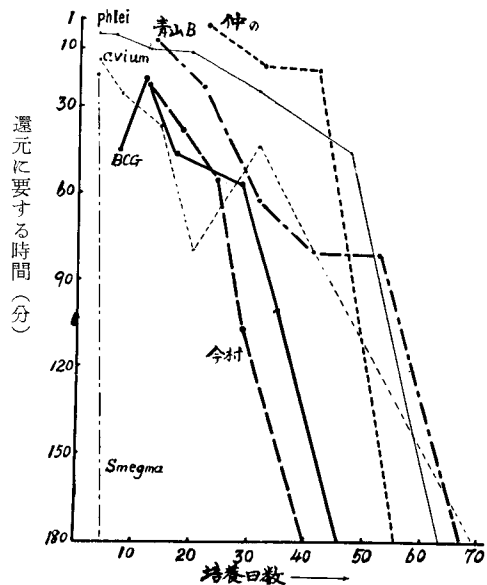
第 2 図 使用菌株の培地中における変化



4 から 5.2 程度の強い酸性側に転じた。

4) 脱水素酵素活性度の消長： 培養日数を追つて各菌株の乳酸添加時ならびに不添加時（無基質時）における脱水素酵素の活性度を測定した。

第 3 図 基質無添加時の脱水素酵素の消長

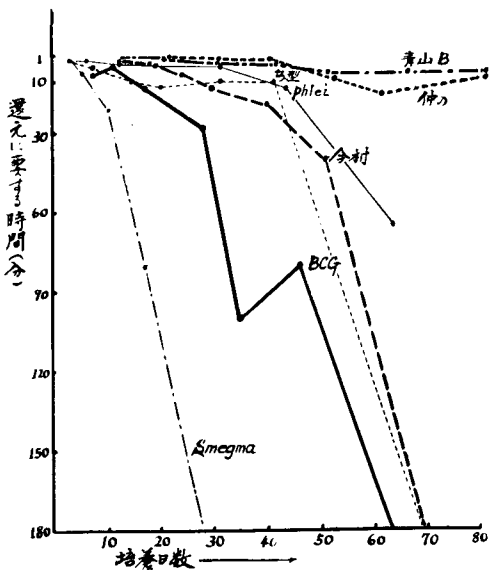


A) 無基質時： 第 3 図に示す如く age の若い菌については Phlei, 仲野株, 青山 B 株の酵素活性が強く、他の菌株は色素の褪色に 14 分から 20 分を要し上記三者に較べる

と活性度は著しく弱い。phlei を除き一般的傾向として培養日数と共に酵素活性度は何れも急激に低下し、各 strain の間に大差を認めない。これに反し Phlei は 50 日頃迄かなりの程度に酵素活性を保持しているが、この事は世代時間が 3.5 時間である事を考えると注目し得る事と思われる。

B) 乳酸添加時： 第 4 図に示す如く幼若なる菌は一般に酵素活性が強く、BCG を除き、その褪色時間は 1 分 30 秒より 2 分 30 秒位迄である。BCG のみはこれに 5 分という時間を要し、明らかに初期において既に酵素活性が弱いことを示している。この場合も一般に各菌株は培養日数

第 4 図 乳酸添加時脱酸素酵素の消長



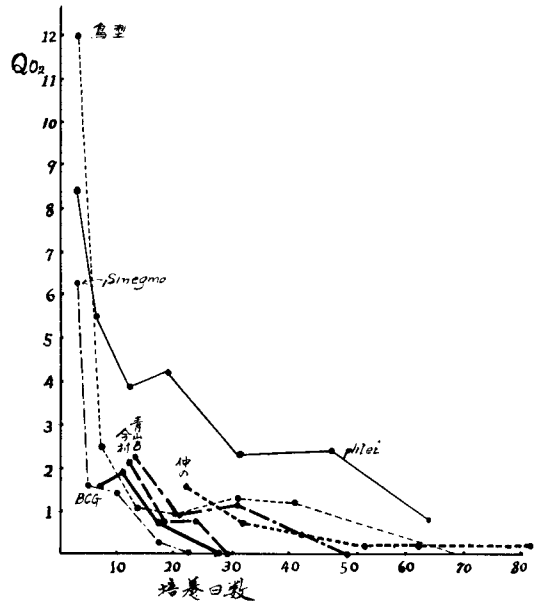
と共に酵素活性を減弱するが、その程度は菌株によつて一様でない。仲野および青山 B 株は他の菌株に比し減弱の度合が著明でなく、約 80 日に至るもその褪色時間はそれぞれ 10 分、7 分であつた。BCG、今村株は前二者に較べると、急激に減弱の傾向を示し、BCG は 30 日ころより、今村株は 40 日頃より特に減弱の傾向が強い。

鳥型及び Phlei も 40 日頃迄はその減弱の程度は少ないが、以後鳥型は急激に減弱し、Phlei はある程度の減弱を示す。Smegma は培養初期より急激に減弱する。

5) 酸素消費量： 各菌株を使用して乳酸添加時と同時に無基質時の酸素消費をワールブルグ極圧計により測定した。その結果は次の如くである。

A) 細胞内呼吸（無基質時）： 第 5 図に示す如く、age の若い菌では、鳥型、Smegma、Phlei が他の菌に比し呼吸量が著しく高く、それぞれ Q_{O_2} が 12、6.3、8.4 であるに反し、仲野、青山 B、今村、各株、および BCG

第 5 図 細胞内呼吸の消長



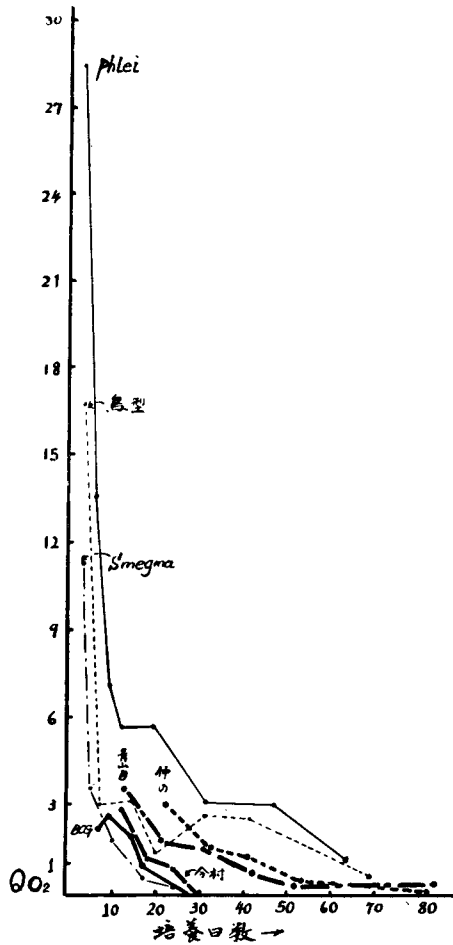
はこの値がそれぞれ 1.6、2.3、2.1、1.6 で上記 3 株に比して著しく低かつた。培養日数と共に各菌株ともその酸素消費量を減じて行く事はこれまでと同様であるが、Phlei は他の菌株に比して減弱の傾向が少く、64 日に至るも Q_{O_2} は 0.8 を示した。今村株、BCG が両株とも 30 日頃既に測定不能の微弱呼吸量となるに反し、青山 B 株は 50 日頃迄測定可能であり、仲野株は 80 日頃に至るも弱いながら未だ測定可能な呼吸量を示していた。

Smegma は短期間の培養で急激にその呼吸量を減じ、24 日頃には測定不能の微弱呼吸に落ちる。

B) 乳酸添加時呼吸： 第 6 図に示す如く、第 5 図の成績と類似している。また第 5 図と 6 図を比較して、一般に菌の呼吸は乳酸添加により増加する事が分る。幼若菌について見ると、Phlei、鳥型、Smegma は酸素消費量が他の菌に比し著しく多く、 Q_{O_2} はおのおの 28.5、16.8、11.3 であつたのに対し、仲野、青山 B、今村株、および BCG における値はそれぞれ 3.0、3.5、2.8、2.2 に過ぎなかつた。各菌株共通の傾向として、菌の酸素消費量は培養日数の経過と共に急激に減少するが、その減り方は菌株によつて一様でない。毒力の強い仲野、青山 B 両株の酸素消費量は、微弱ながらも 80 日目においてなお測定可能であるに反し、今村株、BCG は既に 30 日頃において測定不能の微弱呼吸に落ちてしまう。鳥型、Phlei ではその減弱程度は極めて著しいけれど、相当後期迄、他の菌より高い呼吸量を持つている。

以上乳酸添加時呼吸、細胞内呼吸を総合して見ると、age の若い菌では両者の場合とも、Phlei、Smegma、鳥型

第6図 乳酸添加時呼吸の消長



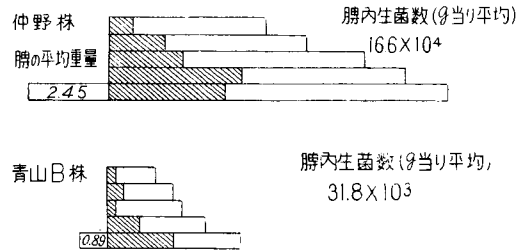
が高く、仲野、青山 B、今村の人型菌 3 株および BCG は何れも同程度に低い。しかし培養日数が経過するにつれて菌株間に差違が現われ、仲野、青山 B 両株が長期間、測定可能なる呼吸を継続しているのに反し、BCG、今村株は早期に測定不能程度の微弱呼吸に落ちる。Phlei は他の菌株に比して乳酸添加時、細胞内呼吸共に培養経過中最も高い呼吸量を持続する。鳥型は Phlei に較べると低いが他の菌株に比して高い呼吸量を相当後迄持続している。これに反し Smegma は極めて早期に測定不能の微弱呼吸量に落ちる。前述の如く一般に乳酸添加時呼吸は細胞内呼吸よりも高く、細胞内呼吸が測定不能程度の微弱呼吸に落ちた場合でも、乳酸を添加すると測定可能なる呼吸を営むことが知られた。

6) 使用菌株の毒力試験： この実験に使用した当研究所の保存菌株、仲野、青山 B、今村の各株、および BCG について海狸を使用して毒力試験を行った。接種菌量とし

て仲野株 (生菌単位 7.7×10^6 /mg) および青山 B 株 (生菌単位 22.3×10^6 /mg) は共に 1/100 mg, 今村株 (生菌単位 5.7×10^6 /mg), BCG (生菌単位 16.8×10^6 /mg) は共に 1 mg を用い、何れも右鼠蹠部皮下に接種し、8 週間後に剖検して脾を定量培養した。

第 7 図は仲野、青山 B 両株を感染せしめた場合の肉

第 7 図 仲野株、青山 B 株の肉眼的病変ヒストグラム



眼的ヒストグラムである。両株とも肉眼的に結核性の病変を作り、脾において相当数の生菌が認められている。(仲野株は生菌数 16.6×10^4 /mg, 青山 B 株は 31.8×10^3 /gm) これに反し今村株、BCG は軽度のリンパ腺腫脹を認めるに止まり、肉眼的には結核性病変を認め得ず、脾内にも生菌が検出せられなかつた。

総括ならびに考按

以上述べた実験成績から、使用菌株はすべて、培養日数と共に Viability, 呼吸量, 脱水素酵素活性を減ずるが、その減弱の様子は菌株により異つている事が明かになつた。細菌という生命現象を持つ生物を考える以上、Viability 乃至増殖という問題は非常に重要な位置をしめるものと考え、著者は本実験において in vitro における Viability の消長を日数を追つて調べ、いろいろな strain 間における相違を比較して見た。

著者の使用した菌株は、約 5 年間小川培地で継代培養された保存株であつて、一応毒力減弱の予想も考えられるので、本実験を始めるに先立ち、先づ毒力試験を行つて見た。その結果によれば、仲野、青山 B 両株とも海狸に進行性結核病変を起し、体内で菌増殖傾向が著しいことが証明された。衆知の如く BCG は Calmette et Guérin により、今村喜文字株は今村¹⁷⁾により共に Calmette 培地に継代培養した菌であり、今村株の毒力は BCG に似ていると報告されているが、著者の実験でもこの事は認められた。即ち動物実験において今村株はリンパ腺腫脹を見るのみで、肉眼的に進行性病変を作らなかつた。また Youmans 等¹⁸⁾は、5 年間にわたる実験の結果、H 37 Rv 株は純系マウスに接種した場合、常に一定した期間中にこれを弊

すことからその毒力の安定性を強調しているが、著者の用いた仲野、青山 B 両株もその安定性に関しては未だ明白でないにしても、程度こそ差あれ 5 年の継代培養にもかかわらずかなりの毒力を保持していることが確められた。緒言で述べた如く、諸家等の実験結果から見て、感受性動物体内でその菌の示す増殖力がその毒力を示す最も重要な因子である事は疑いない事実である。而して菌も生物である以上、絶えず外界より種々の物質をとり入れ、それを必要な有効なものに変えてこれを利用し、不要なもの、老廃物を排出する。即ち物質代謝を行っている。この物質代謝を特徴づけているものは、たしかに触媒としての蛋白質即ち酵素である。生菌には未知、既知の酵素系が複雑な形で存在し、この酵素系がさまざまな外界の変化によく適応しつつ一連の菌車の如き密接な関係を以つて円滑に動く時、はじめて正常なる菌の増殖能力が発揮せられることになるのではなからうか。即ち増殖力とは各種酵素系の機能が総合統一されることによつて示される 1 つの能力である。現在 *in vitro* において生菌であることを確かめる方法としては鋭敏な培養基を使用する *Viable count* の方法と、菌の有する酵素活性を測定する方法とが一般に用いられている。何れも一長一短があり、両者が相俟つて菌の発育、増殖状態は一層明かになるものと考えられる。故に著者はこの 2 つの方法により、菌の *Viability*、脱水素酵素活性および呼吸の消長を時間的に観察し、これが菌株間の毒力の相違を解明する何らかの手掛りになり得るか否かを追求して見た。ここに述べた成績は菌の毒力を解明する一端に過ぎず、これを以つて菌力の全貌を窺い得るものでない事はいふ迄もないが、とにかく、弱毒菌は単に生体内において増殖する傾向が少いのみならず、試験管内においてもまた生命力の弱いものである事が、この実験から明らかとなつた。この実験においては *in vitro* における菌の *Viability* を規定する内外の要因の中、菌の内呼吸および基質として乳酸を与えた場合の呼吸、脱水素酵素の活性、ならびに培地中の pH の変化を報告するに止め、その他の酵素作用の変化や産生された代謝産物の影響等は、今後の実験にまつことにしたいと思う。以下実験結果につき各項毎に先人の業績を眺めつつ若干の考察を加えて見よう。

1) *Viability* の消長： 四宮¹⁹⁾ は青山 B 株、H 37 Rv 株を無蛋白 PL 培地に深部培養し、培養日数を追つてその生菌単位を調べているが、それによれば 10 週間でも減少の傾向は無く、14 週に到つてはじめて減少するのが見られたという。一方 BCG については、Obayashi²⁰⁾ の実験によると、21 日間の観察において生菌単位が 103 (10^{-6} mg) から 2.9 (10^{-6} mg) 迄落ち、その減少は 14 日頃より特に著しく、信太²¹⁾、有馬²²⁾ の実験もまた BCG の生菌単位

が 10 ~ 15 日目頃より著明に減弱することを示している。著者の実験もこれ等と良く一致し人型強毒菌仲野、青山 B の両株は 80 日に至るもその生菌単位があまり減少しないのに反し、弱毒菌今村株および BCG は何れも極く早期に大部分の *Viability* を失う事が証明された。而して試験管内におけるかかる成績と、動物体内で見られるこれ等 4 株の増殖傾向とが良く一致していることは興味深い。

しかし一方非病原性抗酸性菌である *M. Phlei* や鳥型菌竹尾株が相当後期迄高い生菌単位を保持していることを考えるならば、上述の *Viability* によつて一義的にこの問題を解釈し得るものとは思われぬ。加えて *Phlei* および鳥型菌が、世代時間の短い上に、生菌単位を後期迄持続しているという事実は、これ等 strain の増殖力が非常に強烈であることを意味するものである。毒力に関する Rich の定義に従えば、鳥類に対し強い毒力を有する鳥型菌が、*in vitro* においてかかる *vitality* を示しても驚くには当らぬかも知れぬ。しかしながら *M. Phlei* がかかる旺盛な増殖力を持つているという事実は、毒力と関係づけて考える時如何に説明すべきであらうか？ これは将来に残された問題である。なおまたこれら 2 株の幼若菌が、人型菌各株に数倍する呼吸量および酵素活性を示した事も注目ししよう。

2) 無基質時、および乳酸添加時の脱水素酵素活性について： 培養状態の細菌の脱水素酵素活性を調べる場合は、外界の基質を利用する能力と、細胞内の基質を利用する能力との両面より総合的に理解するのが妥当であると考えられる。Roulet²³⁾、大林¹⁵⁾ の示している如く、乳酸は結核菌によく利用される基質であるが、菌体内には乳酸以外のものを基質として利用する脱水素酵素も当然存在する。従つて乳酸を添加した場合の酵素活性については (i) これが乳酸のみを利用する脱水素酵素と菌体内に存在するその他の基質に働く脱水素酵素の作用を相加したものであるか否か、(ii) 乳酸添加により細胞内脱水素酵素作用が抑制あるいは促進される等の影響を受けないかどうか、等、いろいろの事を考えなければならない。従つて乳酸添加時における脱水素酵素活性をもつて直ちに乳酸のみに働く脱水素酵素の活性と考える事は早計であらう。

次に培養日数と共に細胞膜の透過性が如何に変化するかが問題となる。即ち古い菌においては細胞膜の透過性が変化して乳酸が細胞内に入り難くなるために利用度が落ちるのか、あるいは酵素自体の活性が落ちるのか、等についても考える必要がある。しかし、これについてもはつきりした研究はなく、以上述べた諸点に関しては、各自粗雑な方法で内部の働きを想像しているのに過ぎない状態である。

一般に細胞内脱水素酵素活性は初期の中に減弱する。この事も上と同様に初期に基質が消費され尽すためであるか、または酵素自身の活性が早期に落ちるためであるかは未だ不明である。しかし乳酸を添加した場合の活性度は、相当に強力で、細胞内脱水素酵素活性が落ちてしまった後にもなお活性が存続する。

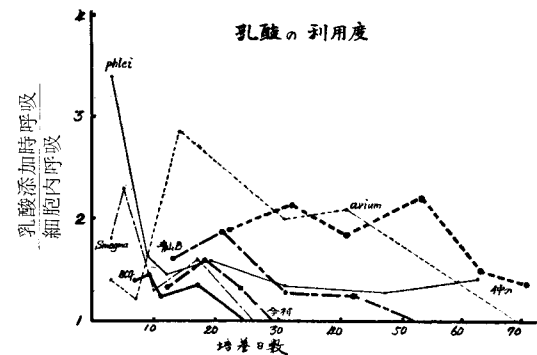
脱水素酵素活性の菌型による相違については、先人の報告が区々で、Aksianzew²⁴⁾によれば人型毒力結核菌はBCGより速にメチレン青を還元するといひ、Bloch²⁵⁾によれば、非病原性抗酸性菌の還元期間は1～3分以内、結核菌の無毒株は2分～15分以内、若い毒力菌では60分でも還元が起らないという。著者の実験においては、仲野株、青山B株の如き毒力菌の脱水素酵素活性が後期迄非常に強いのに反し、今村株、BCG等の弱毒菌は脱水素酵素活性が弱く、初期の中に減弱してしまう事が観察された。特にBCGは若い菌においても、他の菌株に比して著しく弱い事が知られた。

3) 呼吸の消長について：培養日数を追つて、呼吸量の消長を調べた実験から2, 3の成績を挙げて見るに、Loebel²⁶⁾はH37Rv (Long 培地)の呼吸が8日目より15日目頃迄高く(Q_{O2} 2.7)その後は急激に減少するのを観察し、瀬川²⁷⁾は人型Frankfurt株(ソートン培地)についてこれが第2週から第3週にかけて最高値に達し、以後次第に減少するのをみている。またEbina²⁸⁾等はいろいろな菌株について調べ、大体呼吸量は培養日数と共に減少すると述べている。著者の実験においても、菌型、菌株により呼吸量減弱の度合は異なっていたが、培養日数と共に減少する事は諸家の成績と全く同じである。各菌株のQ_{O2}値について調べた成績を見るに、Ebina²⁸⁾によれば発育旺盛なる時期において、鳥型非病原性抗酸性菌は-30以上、人型結核菌10株のQ_{O2}は-12.4から-5.9までの値を取り、緒方²⁹⁾によれば3.8(青山B株)、瀬川²⁷⁾によれば1.0～1.8とまちまちであるが、何れも鳥型、非病原性抗酸性菌のQ_{O2}は著しく高い事を示している。著者の実験においては人型菌1.6～2.26, BCG 1.59, 鳥型およびPhlei, Smegmaは6.3～12.0の値を示し、大体の傾向はEbina²⁸⁾等と類似している。

次に乳酸を基質として与えた場合の呼吸について考えて見よう。この場合も乳酸脱水素酵素の問題と同様に、乳酸添加時の呼吸と細胞内呼吸との関係については種々の問題がある。例えばWiame³⁰⁾が、基質を加えた場合に菌の内呼吸は抑制されると報告しているのに対しCochrane³¹⁾ Santer³²⁾, Moses³³⁾等はradioactiveのC₁₄を使用してこれに検討を加え、細胞内呼吸は基質添加によつて抑えられる事はないと報告している如く、一定した成績が得られ

ていない。従つて乳酸添加により増加した呼吸量は、乳酸添加時呼吸より細胞内呼吸を減じたものであると簡単に考えて良いか否かは疑問である。この意味から、乳酸添加による呼吸を論ずるには、細胞内呼吸との添加時呼吸との両面より考察して行かねばならぬと考える。一般に細胞内呼吸および乳酸添加時呼吸は、両者共培養日数の経過に伴い減弱するが、(i) 乳酸添加時呼吸量は細胞内呼吸量より多く、また後者が測定不能になつた場合にも、前者は未だ測定可能である事、(ii) 呼吸測定中の3時間内において培養後期の菌では細胞内呼吸が一定値を保たず、時間と共に漸次減少するが、この時期においても乳酸添加時呼吸は一定値を保っている事、(iii) 更に後期に到り、はじめて乳酸添加時の呼吸が減少して来る事、等を総合して考えれば、菌の呼吸においては、呼吸に与る菌体内の基質が早期に消費され尽すか、あるいは乳酸以外の物質を基質とする呼吸酵素の活性が先ず低下し、しかる後に乳酸を基質とする呼吸酵素の活性が低下するのではないかと想像される。

第8図 各菌株における乳酸添加時呼吸と細胞内呼吸の比



そこでGeronimus³⁴⁾に倣ひ乳酸添加時呼吸と、細胞内呼吸の比をとつて見た。これを菌株別に図示して見ると第8図の如くなる。一般的傾向として最高値を表す時期はいずれも培養経過の途中に現われ、後期にはまた減少の傾向が見られる。この最高値の現われ方も菌型、菌株により異なる。われわれの場合仲野株および鳥型菌竹尾株が比較的長期間最高値を保ち、前者においては概ね30日頃から53日頃迄、後者においては14日頃から40日頃迄高い値を示している。この値が高いのは、乳酸添加時呼吸の減弱程度が一定の期間中内呼吸の減弱程度より僅小であるためである。この値が1に近づく場合は、細胞内呼吸と乳酸添加時呼吸が類似の値であること、即ち乳酸添加によつて酸素消費量はほとんど影響をうけないことを示すものである。要するに乳酸添加時呼吸の減弱と細胞内呼吸の減弱とは時期的に一致しない。一般に細胞内呼吸の減弱は培養日数の早い時期より起るが、乳酸添加時呼吸の減弱はこれよ

り遅れ、培養が古くなつてから急速に減弱するようである。

4) pH の変化について：以上の呼吸量および脱水素酵素活性の測定にあつて最も問題となるのは溶液の pH である。結核菌を植えた培地の pH は第 2 図に見る如く日数の経過と共に変化して行くが、これは菌の代謝の結果によるものである。即ち主に炭素源から産生される CO_2 その他の有機酸量ならびに窒素源より発生される NH_3 その他のアルカリ量と培地成分の持つ緩衝能とにより、その時の pH は規定される。同時にまたこの pH の変化に伴つて菌体内酵素系の変化する事も考えられ、この変化が更にまた菌の代謝能力に影響をおよぼすという所謂因果循環的な関係により培地の pH は変化して行くものと想像される。例えば呼吸、脱水素酵素活性度の測定は、いずれも pH 6.9 の大体至適 pH と思われる所で行つたのであるが、これによる測定値は必ずしも培養基中での酵素活性度を忠実に表わしているとは限らない。第 2 図に示す如く、多くの菌は pH 9.0 附近の強いアルカリ性に留つており、この時の菌の activity はこの pH により規定される。呼吸測定時の至適 pH について瀬川²⁷⁾は、pH 6.4 から 8.3 迄の間ではほとんど影響がないと述べ、佐々木³⁰⁾も大体瀬川と同様な成績であるが、これに加えて pH が 8.0 から 9.0 程度になると呼吸は急激に減少する事を示している。また Roulé²³⁾によれば人型菌は pH 7 乃至 8、Smegma は 6 乃至 7 が optimal であり、何れにしても pH 9.0 附近は呼吸測定に関して至適 pH でないことが分る。また脱水素酵素測定に関する至適 pH は Bloch²⁵⁾によると 6.8 から 8.0、有馬等¹⁶⁾によれば硼酸、硼砂緩衝液で 9.0 附近、磷酸緩衝液では 8.0 附近の値をとり、その至適範囲は比較的広いようである。培養日数を追つて各菌型特有の pH の変動を知ろうと試みた研究は多い。Szüle³⁶⁾はソートン培地 4 週間培養の人型菌 7 株、牛型菌 2 株、および BCG の pH を調べて何れもアルカリ性側にあるのを観察し、Goyal³⁷⁾は牛型菌 5 株、人型菌 1 株 (M6)、鳥型菌 6 株 (いずれも Souton 培地) を使用し、次の結果を得た。即ち牛型菌 5 株は、4 週後の pH を見るといずれも 7.3 から 7.8 の間にあり、10 週後には 3 株が 5.3 から 6.0 の酸性に傾いたが、他の 2 株は 7.8、7.6 のアルカリ性に留まり、人型菌はアルカリ性を経て 10 週目に酸性となつた。鳥型菌 6 株についてはその成績が一定せず、この事から菌型によつて一定した pH の経過を取るものではないと述べている。Henley³⁸⁾は Glycerol と種々なる窒素源の量とをいろいろに変えた培地中に人型菌 Pn 株を培養し、培養における Glycoerol / nitrogen の比と pH の関係を調べているが、それによれば、この比の高い培地においては最終 pH が酸

性に移行し、低いものではアルカリ性に移行するという。また Goyal³⁹⁾は人型菌 2 株を使用し、Souton 培地の glycerin と Asparagin の量を変えることにより pH が変わることを報告している。その他の諸家の成績を総合して見るに、人型菌以外の菌においては成績が不定であるが、人型菌については、かなり長期間培養した場合、最終 pH が酸性側に傾くことは略々一致した成績のように思われる。著者の使用した培地は Souton 培地 (グルタミン酸ノーダ 8 g) であるが、Glycerol / nitrogen ratio の値は非常に高い。而して Henley その他の主張する如く人型毒力菌、仲野、青山 B 両株の pH は時間的な差はあれ何れも酸性に変じた。他の菌株は皆アルカリ性に留まつていたが、培養当初に較べると総て多かれ少なかれ pH は変化しており、一定の pH を保つているものはない。この事から見れば、果して菌体内で前述のような酵素活性度が保たれているか否かは甚だ疑問であり、仲野、青山 B 両株ともかなりの生菌単位を後期迄保つている事実など考える時に乳酸以外の物質を基質とする酵素で Viability ともつと密接な関係をもつものの存在も考えられない事はない。何れにせよ酵素系の問題は未だ不明の点が多く、菌体内における酵素活性と菌の生命現象についても研究すべき問題は多々残されている。われわれはこれ等を追求する事により、生物学的な立場から結核菌の示す毒力の本態を、その一端なりとも解明して行きたいと考えるものである。

結 論

強毒人型結核菌仲野、青山 B 両株、弱毒人型結核菌今村喜文字株、BCG 予研株、鳥型菌竹尾株、非病原性抗酸性菌 Phlei、および Smegma の 7 株を使用し、培養日数を追つて菌の viability、呼吸量、脱水素酵素活性等を研究し、次の結論を得た。

- 1) 世代時間：Phlei, Smegma, 鳥型は約 3.2 時間～3.5 時間、BCG、今村株、青山 B 株、仲野株はおのおの 16.8、19.3、20.8、26.5 時間であつた。
- 2) 菌の Viability：弱毒結核菌今村株および BCG は動物体内において増殖傾向が少いばかりでなく、in vitro においてもその Viability は弱い。即ち仲野、青山 B 両強毒株の生菌単位が長期間に亘るも減少しないのに反し、今村株および BCG の両者は培養早期においてこれが急激に減少する。Phlei、鳥型も青山 B、仲野株と同様に Viability は強かつた。
- 3) 脱水素酵素の活性度：培養経過中、無基質時には酵素活性最強の Phlei を除き、他の菌株間に差が認められなかつた。乳酸添加時には仲野、青山 B 両株と今村、BCG 両株間には明らかな差があり、前二者の酵素活性が長期間

に亘つて持続されるに反し、後二者のそれは極く早期に減弱する。

幼若菌について見ると、無基質時には、仲野株、青山 B 株および Phlei は他の菌に比し酵素活性が強く、乳酸添加時には最も活性の弱い BCG を除き、他の菌株間に差が認められなかつた。

4) 内呼吸および乳酸添加時呼吸：幼若菌では Phlei, Smegma, 鳥型が他の菌に比し著しく高く、仲野、青山 B, 今村の人型菌 3 株および BCG は大体同程度に低い呼吸量であつた。

その後の経過を見ると BCG, 今村両株は、内呼吸、乳酸添加時呼吸共に、仲野、青山 B 両株に比し遙かに早く測定不能の呼吸量に落ちる。鳥型菌および Phlei は相当後期迄高い呼吸量を持続した。

稿を終るに臨み、御指導ならびに御校閲を賜つた恩師大原教授に深謝する。また御助言を賜つた予防部、有馬助教授、山本講師、山下理学士に深謝する。

引用文献

- 1) Dubos, R. J. : 細菌細胞 (川喜田愛郎訳) 178~182, 1952.
- 2) Pierce, C.H. et al : J. Exp. Med. 97, 189~205, 1953.
- 3) Mackaness, G.B. et al : Am. Rev. Tuberc. 69(4) 479~494, 1954.
- 4) 佐藤直行 : 医学と生物学 34(2) 90~94, 昭 30.
- 5) 加藤允彦 他 : 結核 30(11) 638~642, 昭 30.
- 6) 勝山 茂 他 : 医学と生物学 34(4) 161~165, 昭 30.
- 7) 金井興美 : 日本細菌学雑誌 10(4) 321~327, 昭 30.
- 8) Rich, A.R. : 結核の病理発生論 (上) (隈部英雄訳) 77~80, 1953.
- 9) Bloch, H : J. Exp. Med. 91, 197~217, 1950.
- 10) Spitznagel J. K et al : J. Exp. Med. 101, 291~311 1955.
- 11) Choucroun : C. r. Acad. Sci, 224, 104 1946.
- 12) Choucroun : Science. 105, 46, 1947.
- 13) Youmans G. P et al : J. Bact 58, 247~255, 1949.
- 14) 新明美仁 他 : 結核の研究 第 3 集, 50~56, 1955.
- 15) 大林容二 他 : 医学と生物学 10(6) 311~313, 昭 22.
- 16) 有馬 純 他 : 結核の研究 第 2 集, 47~50 1954.
- 17) 今村荒男 : 奈良医学雑誌 1(2) 1~3, 1950.
- 18) Youmans, G. P. et al : Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90(1) 238~244, 1955.
- 19) 四宮 衛 : 医学研究 25(6), 142~146, 昭 30.
- 20) Obayasashi. Y : Dried BCG Vaccine 48~53.
- 21) 信太隆夫 他 : 結核の研究 第 2 集, 102, 1954.
- 22) 有馬 純 他 : " " 51~54, 1954.
- 23) Roulet F. et al : Helv. chim. Acta. 29, 1973 1946.
- 24) Aksianzew, M. I : Z. f. Tuberk. 68, 249~253, 1933.
- 25) Bloch, H : Am. Rev. Tuberc. 61, 270~271, 1950.
- 26) Loebel, R. C et al : J. Bact. 26, 139~166, 1933.
- 27) 瀬川二郎 : 臨床と研究 26(1), 39~43, 昭 24.
- 28) Ebina, T et al : Tohoku. J. Exper. Med. 31, 60~71, 1937.
- 29) 緒方正忠 : 医学研究 25(8) 83~99, 昭 30.
- 30) Wiame M. et al : J. Bact 62, 187~193, 1951.
- 31) Cochrane, V.W. et al : J. Bact. 61, 305~307, 1951.
- 32) Santer, M. et al : J. Bact, 67, 379~386, 1954.
- 33) Mosses. V. et al : J. Bact 70, 201~204, 1955.
- 34) Geronimus L. H. et al : Am. Rev. Tuberc. 64, 520~533, 1951.
- 35) 佐々木二郎 : 臨床と研究 26(1) 39~43, 昭 24.
- 36) Sziile. D. et al : Z. f. Bakt. 124, 413~416, 1936.
- 37) Goyal, R.K : C. R. Soc. Biol. 121, 1165~1167, 1936.
- 38) Henley, R.R. et al : Am. Rev. Tuberc. 40, 313~335, 1939.
- 39) Goyal, R.K : C.R. Soc. Biol, 122, 298~300, 1936.