



Title	結核菌の脂肪酸代謝に関する研究
Author(s)	佐藤, 孝治; SATO, Koji
Description	
Citation	結核の研究, 12, 66-80
Issue Date	1960-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26690
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_P66-80.pdf



結核菌の脂肪酸代謝に関する研究

佐藤 孝治

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(厚生省北海道医務出張所 所長 有末四郎博士)

(昭和 34 年 11 月 20 日受付)

Streptomycin が抗結核剤として登場する以前に、油脂または脂肪酸類による結核の治療が、かなりの希望をもつて試みられた事があり¹⁾、化学療法の進歩した今日でもなお、薬剤耐性菌出現の頻度が次第に増加しつつある現況から、脂肪酸の抗菌作用に再び注目せんとする学者^{2),3)}は無くなつていない。従つて、脂肪酸類の結核菌発育に及ぼす影響を調べた実験もこれ迄数多く行われてきたが、実験に使用した菌型、菌株、培養条件、殊に培地の適否、等についての吟味が十分でないため、各人の成績はかなりまちまちである⁴⁾⁻¹¹⁾。一方、脂肪酸の結核菌の酸素消費に及ぼす影響についての成績にも、かなりの変動が認められる¹²⁾⁻¹⁶⁾。この種の実験において特に留意しなければならない点は、同じ脂肪酸でもその濃度によつて、菌に対する態度を異にする事である。よつて著者は、結核菌に対する脂肪酸の作用をより系統的に整理すると共に、これ迄の報告にみられた成績不一致の原因を探究せんとして本実験を行つた。即ち炭素数 1 の蟻酸より炭素数 18 のステアリン酸に至る飽和脂肪酸、及び不飽和のオレイン酸について、広い範囲の濃度に亘つて結核菌の発育並びに酸素消費に及ぼす影響を調べ、更に、抗菌作用の比較的強いラウリン酸、オレイン酸に接触せしめた場合における結核菌の発育、物質代謝、脱水素酵素反応についても検索した。この研究によつて、色々な作用を現わす脂肪酸の至適濃度が明らかになると同時に、その他の濃度における脂肪酸の作用も総合的に観察せられたと考えるので、以下に得たる成績を報告したいと思う。

実験材料及び実験方法

1) 使用菌株及び培地 全実験を通じて鳥型菌竹尾株(当研究所保存のもの)を使用し、培地としては味の素変法 Sauton 培地(味の素 0.4%)を用いた。

2) 菌液調製法 上記培地に 37°C で 4 日間培養して得た菌膜を十分蒸留水で洗い培地成分をよく取り除いた後、型の如く水晶玉入りコルペンに移して振盪、磨砕し、

蒸留水を加えて所要濃度の菌浮游液とした。

3) 実験に使用せる脂肪酸 下記の如く炭素数 1 の蟻酸から炭素数 18 のステアリン酸までの直鎖飽和脂肪酸と、炭素数 3 の乳酸(オキシカルボン酸)及び炭素数 18 のオレイン酸(不飽和脂肪酸)を使用した。

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| (i) 蟻酸……………(C ₁) | (viii) ラウリン酸…(C ₁₂) |
| (ii) 醋酸……………(C ₂) | (ix) ミリスチン酸…(C ₁₄) |
| (iii) プロピオン酸(C ₃) | (x) パルミチン酸…(C ₁₆) |
| (iv) 酪酸……………(C ₄) | (xi) ステアリン酸…(C ₁₈) |
| (v) カプロン酸…(C ₆) | (xii) オレイン酸…(C ₁₈) |
| (vi) カプリル酸…(C ₈) | (xiii) 乳酸……………(C ₃) |
| (vii) カプリン酸…(C ₁₀) | (α-オキシプロピオン酸) |

なお各脂肪酸は NaOH によつて pH. 7.0 に修正した後用いた。

4) 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の発育に及ぼす影響の測定 Dubos et al^{6),7),17),18)}, Drea¹⁹⁾ らにより、結核菌に対する脂肪酸の発育阻止作用は血清アルブミン又は sphingomyelin 等によつて中和される事が報告されている。この実験において Sauton 味の素変法培地(以下 Sauton 培地)を扱んだのは、かかる血清の影響を除外するためである。これに 10⁻⁶M から 10⁻⁸M に至る種々なる濃度の上記脂肪酸を加え、何れも 100 ml のコルペンに 40 ml 宛、又は中試験管に 5 ml 宛分注した後菌液を接種した。即ち三角コルペンの培地(各濃度の脂肪酸ごとすべて 3 本宛用意)には 10 mg/ml (wet weight) の菌液を 0.1 ml 宛接種して 8 日後に発育菌の乾燥重量を測り、試験管の培地には Youmans⁹⁾, 新明²⁰⁾ らの small inoculum technique に従つて色々な量の菌を接種し、これより generation time を求めた。

5) 酸素消費量及び炭酸ガス排出量の測定 Warburg 検圧計によつて型の如く測定した。検圧計の各室に加えられた試料の量は次の如くである。(i) 主室。1 ml の菌液(濃度は per ml 20 mg のもの)と 0.2 ml (実験 7 の場合のみ 0.4 ml) の基質。これに 1/15M の Soerensen 磷酸緩衝液を加えて全量を 2 ml とする。(ii) 副室。酸

素消費量測定の場合には 0.3 ml の 10% NaOH 溶液、炭酸ガス排出量測定の場合には 0.2 ml の 3N, H₂SO₄ 溶液。

6) 菌のラウリン酸, オレイン酸接触時間と生存菌数の測定 Sauton 培地 4 日培養の菌を蒸留水で十分洗い, 37°C において 10⁻²M から 10⁻⁵M までの濃度のラウリン酸, または 10⁻³M から 10⁻⁵M までのオレイン酸, (共に NaOH で中和後, pH 7.0 の 1/30 M 磷酸緩衝液に溶かしたものに) に 3 分から 72 時間接触させ, 再び蒸留水で十分洗った後, 定量培養法により生存菌数を測定した。対照には pH 7.0 の 1/30 M 磷酸緩衝液に同じ時間浸した菌を用いた。

7) 脱水素酵素活性の測定 反応測定には Thunberg 管を用いた。その主室には 20mg/ml (wet weight) の菌液 0.5 ml と, 0.01 M のオレイン酸 0.2 ml, 或いはそれに加えてグルタミン酸, グリセリン, 乳酸, 焦性ブドウ酸 (以上は何れも NaOH で pH 7.0 とし, 濃度は 0.1 M), Sauton 培地及びこれに鳥型菌竹尾株を 2 日培養した培養濾液等をそれぞれ基質として 0.2 ml 宛入れ (1/15 M Soerensen 磷酸緩衝液をもつて全量を 1.8 ml とす), 副室には水素受容体として 0.2 ml の 1/500 M 2-6-dichlorophenol indophenol を入れた。測定は 37°C において行い, 色素液が完全に脱色する時間 (分) をもつて還元時間とした。

実験成績

実験 1. Sauton 培地中に含まれるグリセリン及び味の素の濃度と菌発育との関係について。

鳥型菌竹尾株に対する各種脂肪酸の発育阻止作用並びに促進作用を検索せんとするに先立ち, 先づ菌発育の有力な炭素源たるグリセリンの至適濃度を定め, 且グリセリンの種々なる濃度に対する味の素の態度, 殊にこれが炭素源として利用され得るか否か, を調べるために, 次の如き予備実験を行つた。即ち Sauton 培地中に含まれるグリセリン濃度を 5%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0% の 5 通りに変え, 同時に味の素の濃度も同じく 1%, 0.4%, 0.1%, 0.01%, 0% の 5 通りに変えて, 両者の色々な量的組合せのものに菌を培養し, その発育状況を観察した。結果は表 1 の如くである。なおクエン酸については Cutinelli¹⁴⁾, Edson & Hunter²¹⁾, 今井¹⁰⁾, 高橋²²⁾ とも報告している如く, 結核菌の発育を支持しないし, また呼吸も促進せしめない事が知られているので, この予備実験においては特に検査の対象としなかつた。菌の発育は, 乾燥重量及び generation time の両面から調べたが, 表 1 に見る如く, グリセリン及び味の素は共に濃度

表 1 Sauton 培地中のグリセリン, 味の素濃度と鳥型菌竹尾株の発育との関係

味の素		味の素				
		1%	0.4%	0.1%	0.01%	0%
Glycerol	菌重量	156	162	83	16	3
	G. T.	3.21	3.01	3.61	6.02	9.63
5%	菌重量	113	114	67	13	3
	G. T.	3.61	3.61	3.61	4.2	9.63
1%	菌重量	52	72	30	7	2
	G. T.	5.42	4.22	4.22	4.82	8.02
0.1%	菌重量	15	8	8	6	3
	G. T.	6.02	5.42	5.42	6.02	8.02
0.01%	菌重量	2	4	4	3	2
	G. T.	10 ⁻² mg	9.06	9.06	9.63	10 ⁻² mg

註 1) 10⁻²mg は 10⁻²mg 以上の菌を接種した培地にのみ肉眼的発育を認めたことを示す。

2) 菌重量の単位は mg., G. T. (generation time) の単位は時間。

が増すにつれて菌の発育を良くする。但し味の素については至適濃度が 0.4% にあり, これを 1% に増しても同等またはそれ以下の菌発育しかみられなかつた。殊にグリセリンが無い培地においては, 味の素の濃度を 1% にすると菌発育は 0.4% の場合より遙かに悪く, 味の素を全く加えなかつた場合と同程度の成績しかみられなかつた。

一般にグリセリン及び味の素は, 何れか一方が欠けても菌の発育を著しく低下せしめるが, グリセリンが欠如した場合味の素の如何なる濃度においても殆んど菌の発育をみない事は, 味の素がグリセリンに代つて炭素源となり得ない事を示しているものと考えられる。故に次に述べる実験 2 においては, グリセリン濃度を 1% とし主として脂肪酸による発育阻害作用を観察する事に努め (勿論発育促進作用ある時はこれも同時に観察し得る), 実験 3 においてはグリセリンを除外して色々な濃度の脂肪酸を加え, 主として脂肪酸が炭素源として利用されるや否やを観察するようにした。なお味の素の濃度は, この予備実験に基き, 以下すべての場合に 0.4% の濃度を使用した。

実験 2. 含グリセリン培地における発育菌重量並びに generation time に及ぼす各種脂肪酸の影響について。

各脂肪酸を種々なる濃度にして Sauton 培地に加え, 菌接種 7 日後に発育した菌膜の乾燥重量を測定した。結

果は図 1, 及び図 2 に示す如くである。即ち, 各脂肪酸の菌発育促進作用を, 至適濃度における菌重量の多いものから順に並べてみると, 酪酸 (190 mg), 乳酸 (171 mg), 蟻酸 (161 mg), 醋酸 (159 mg), カプリン酸 (152 mg), カブロン酸 (146 mg), プロピオン酸 (135 mg) の順序で, その他の脂肪酸は対照に比し僅か 10 mg 内外の菌重量増加を示したに過ぎなかつた。

次に菌の発育を阻止する濃度を図 1, 図 2 について比較してみると, 次の如き興味ある成績が観察される。

先づ乳酸は 0.5 M の高濃度ではじめて菌の発育抑制を示したが, なお且 98 mg の菌量を得ているに反し, 蟻酸 (C₁), 醋酸 (C₂), プロピオン酸 (C₃) 及び酪酸 (C₄) はこの濃度において完全に菌の発育を抑え, 更にカブロン酸 (C₆) は 10⁻¹ M, カプリル酸 (C₈) は 10⁻² M, カプリン酸 (C₁₀) は 5×10⁻³ M, ラウリン酸 (C₁₂) は 5×10⁻⁴ M においてそれぞれ完全に菌の発育を阻止している。

かくの如く, 炭素数 1 の蟻酸から炭素数 12 のラウリン酸に至るまでは, 炭素数に比例して菌に対する発育抑制作用は漸次強くなる。然し炭素数が更に多くなると, この作用は再び弱くなる。すなわちパルミチン酸 (C₁₆) は稍抑制作用が低下して 10⁻³ M の濃度で菌の発育を阻止し, ミリスチン酸 (C₁₄) 及びステアリン酸 (C₁₈) は同じ濃度において発育を抑制はするものの, 完全に阻止

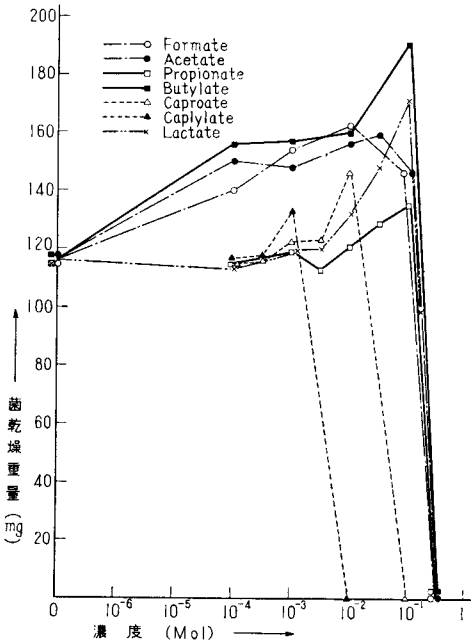


図 1 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の発育菌重量に及ぼす影響 (その 1) (含グリセリン培地, 7 日培養)

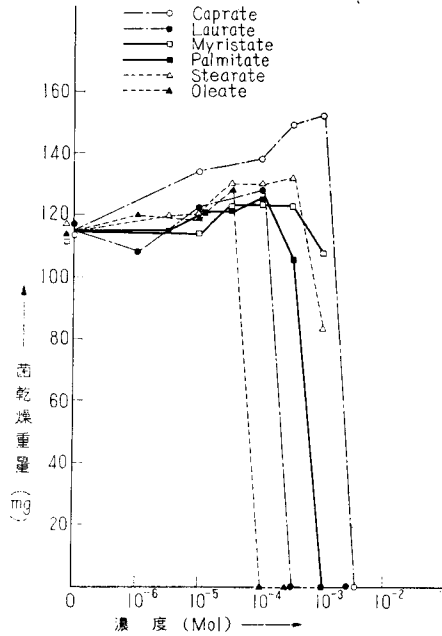


図 2 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の発育菌重量に及ぼす影響 (その 2) (含グリセリン培地, 7 日培養)

するまでには至っていない。但し同じ炭素数 18 でも不飽和のオレイン酸になると抑制作用は著しく強く, 被検脂肪酸中最もうすい 10⁻⁴ M の濃度で菌の発育を完全に

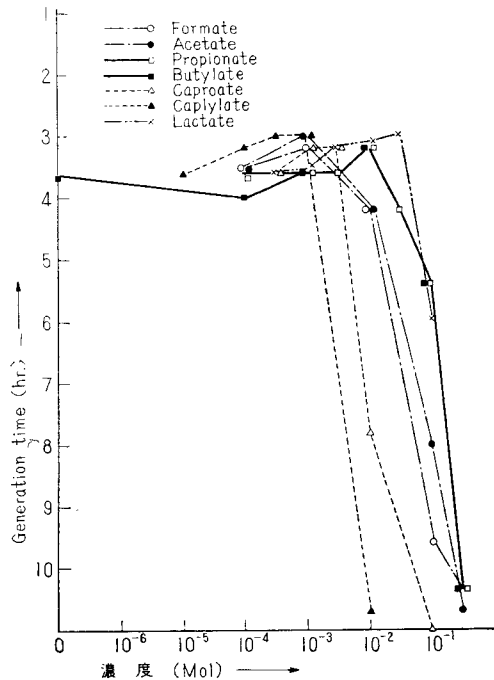


図 3 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の generation time に及ぼす影響 (その 1) (含グリセリン培地)

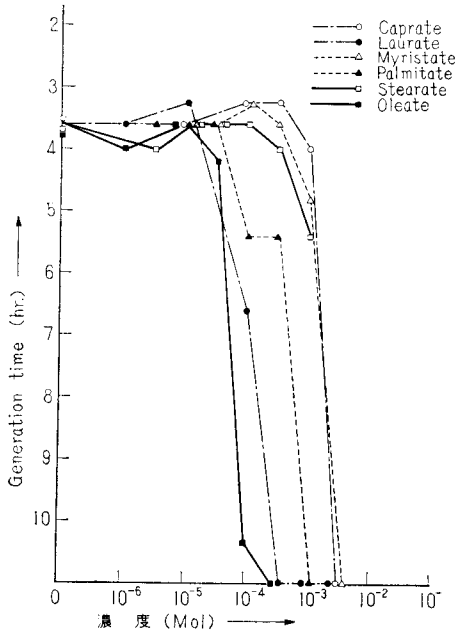


図4 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の generation time に及ぼす影響 (その2) (含グリセリン培地)

抑えた。

図3及び図4は各脂肪酸の菌発育に及ぼす影響を generation time によつて観察したものである。傾向としては乾燥重量測定による結果と同じであるが、対照の3.61時間に対して、各脂肪酸による generation time の短縮の差はさほど著明でなかつた。特に著明に generation time を短縮せしめたのはカプリル酸、醋酸、及び乳酸で、それぞれ $5 \times 10^{-4} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-1} M$ の濃度において3.01時間の世代時間を示した。この値は予備実験(表1)でみた最上の条件、即ち5%グリセリンと0.4%の味の素を用いた場合の値と同じである。ただここに奇異に思われた点は、各脂肪酸の結核菌発育に及ぼす影響が乾燥菌の重量からみても generation time からみてもよく平行するのは当然の事ながら、菌重量を最大ならしめる脂肪酸の至適濃度と generation time を最も短縮せしめる濃度とを比較してみると、後者の濃度が前者の1/2乃至1/10の濃度又はそれ以下となっている事である。但し、ミリスチン酸及びパルミチン酸のみは両方の濃度が同じであつた。

実験3. グリセリンを含まない培地における発育菌重量及び generation time に及ぼす各脂肪酸の影響について。

前実験と同じ事を、グリセリンの無い Sauton 培地について繰り返してみた。その結果は図5から図8までに

示す如くである。図5にみる如く、最も良好な菌発育が認められたのは乳酸を培地に加えた場合で、 $10^{-1} M$ の濃度において87mgの発育菌量が得られた。これはグリセリンを1%に加えた場合の116mgに比し稍劣るとは云え、この成績からみれば乳酸もまた良好な炭素源となり得るものと云わなければならない。次に良好な菌発育を促す脂肪酸としては、 $10^{-1} M$ の酪酸(68mg)、 $5 \times 10^{-2} M$ のプロピオン酸(49mg)が挙げられ、続いてカブロン酸、醋酸、蟻酸、カプリン酸の順に菌発育を促した。ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸は乾燥重量にして10mg以下の程度にしか菌を発育せしめなかつたが、これらを加えない対照と比較すれば幾分か発育の促進が認められるので、炭素数の多

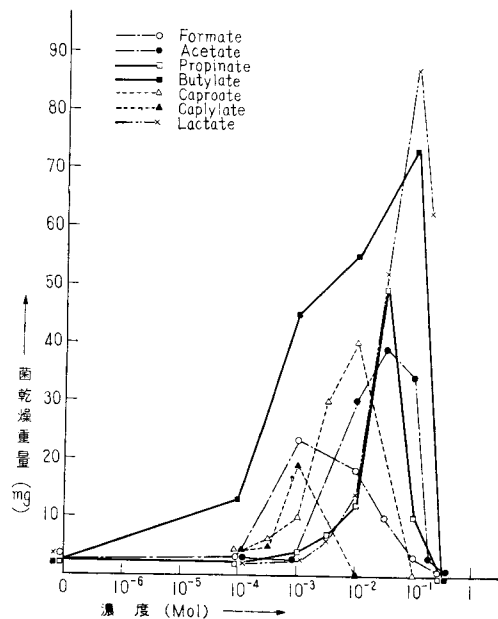


図5 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の発育菌重量に及ぼす影響 (その1) (無グリセリン培地, 7日培養)

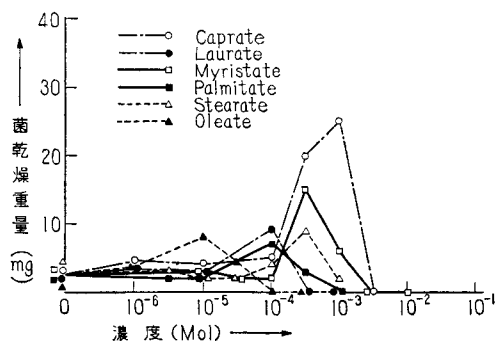


図6 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の発育菌重量に及ぼす影響 (その2) (無グリセリン培地, 7日培養)

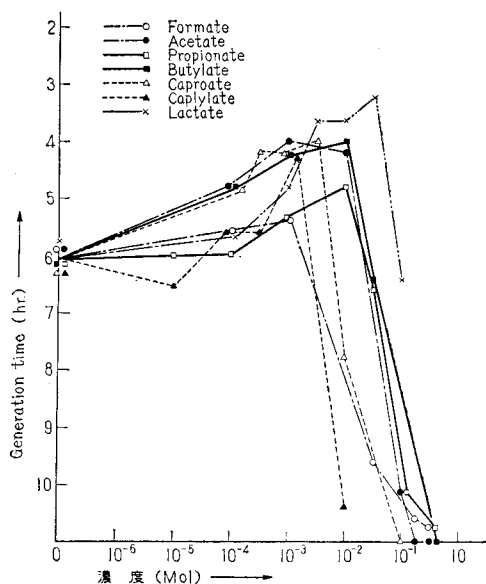


図7 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の generation time に及ぼす影響 (その1) (無グリセリン培地)

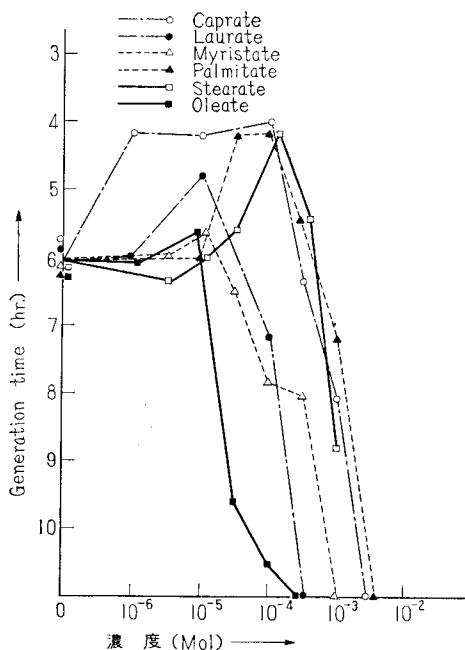


図8 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の generation time に及ぼす影響 (その2) (無グリセリン培地)

これらの脂肪酸も、低濃度においては多少炭素源として利用されるらしく思われる。

Generation time に対する影響は図7及び8に示した。即ち至適濃度において最も短い generation time を示したのは乳酸の3.2時間で、次に酪酸、カブロン酸、酪

酸、カプリン酸が至適濃度において4.01時間を示している。続いてカプリル酸、ミリスチン酸、ステアリン酸の4.22時間、プロピオン酸、ラウリン酸の4.82時間で、最も generation time の遅延しているのはパルミチン酸、オレイン酸の5.61時間であつたが、これとても対照培地の6.02時間に較べれば若干の短縮を認め得る。なお、菌の乾燥重量を最大ならしめる至適濃度と generation time を最も短縮せしめる至適濃度を較べてみると、この場合も前実験と同様に、2,3の例外を除き、後者の濃度は前者の1/2乃至1/10であつた。

実験4. 鳥型菌竹尾株の酸素消費に及ぼす各脂肪酸の影響について。

各脂肪酸の鳥型菌竹尾株の酸素消費、炭酸ガス排出に及ぼす影響を Warburg 検圧計によつて調べた。今、endogenous control における酸素消費量と脂肪酸添加時における酸素消費量との比をとつて成績を图示してみると、図9、図10の如くなる。

至適濃度においてこの比が最高であつたのは乳酸で、3.05の値を示し、続いてこの値の高いものから並べると、カプリル酸(2.09)、カプリン酸(1.90)、カブロン酸(1.75)、パルミチン酸(1.74)、酪酸(1.58)、オレイン酸(1.47)、酪酸(1.41)、ラウリン酸(1.39)、プロピ

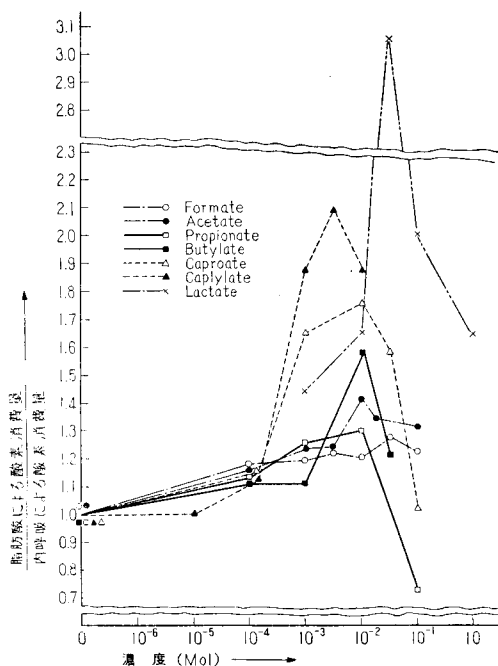


図9 各脂肪酸の鳥型菌竹尾株の酸素消費に及ぼす影響 (その1) (1.5時間の測定値、菌量20mg wet weight)

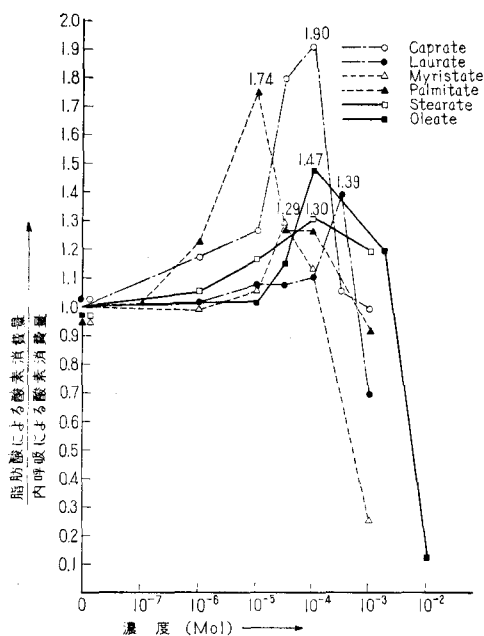


図 10 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の酸素消費に及ぼす影響 (その 2)
(1.5 時間の測定値菌量 20mg. wet weight)

オン酸 (1.30), ステアリン酸 (1.30), ミリスチン酸 (1.29) の順になる。最もこの値の少ないもの、すなわち酸素消費増加率の最も低かつた脂肪酸は蟻酸で、至適濃度において対照の 1.26 倍を示したに過ぎなかつた。

ここに記載した脂肪酸の順序と実験 2 及び 3 において観察した成績、即ち菌の発育に好影響を与える脂肪酸の順序とを比較してみると、両者の間には何ら特別な関係を見出し得ない。云い換えれば、脂肪酸が菌の発育に与える影響と菌の酸素消費に及ぼす影響との間には、全く平行関係が認められない。すなわち酸素消費を著しく増加せしめる脂肪酸が同時に菌の発育に対しても同様に好影響を与えるとは限らず、又両方の作用が大体同程度のものにおいても、酸素消費を増加せしめる濃度が必ずしも菌発育に対する peak と一致するとは限らなかつた。但し脂肪酸によってそれぞれの作用を現わす至適濃度が異なることを考慮に入れず、画一的な濃度について比較を行えば、上記と異なる結論が出てくることは云うまでもない。

図 11, 12 は各脂肪酸による炭酸ガス排出量を酸素消費量で除した商、即ち RQ を求めてこれを図示したものである。而してこの RQ の消長を示す曲線が谷になっている所、即ち最も低い値を示す所の濃度が、前述の generation time を最も短縮せしめる濃度と極めてよく一致

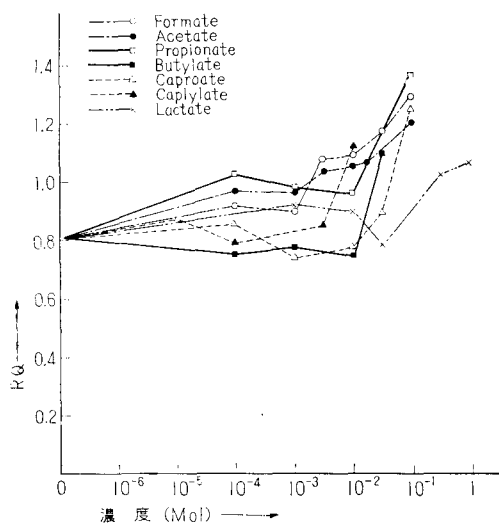


図 11 各種脂肪酸の鳥型菌竹尾株の RQ に及ぼす影響 (その 1)

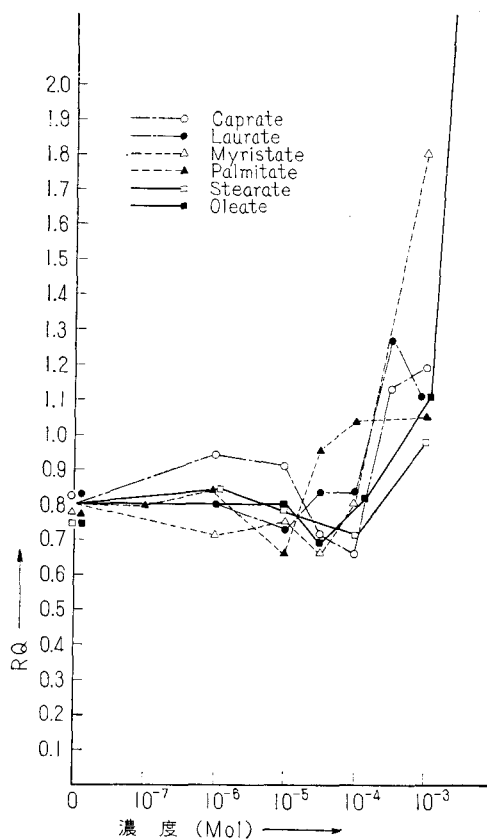


図 12 各脂肪酸の鳥型菌竹尾株 RQ に及ぼす影響 (その 2)

している事は興味深い。なお 1, 2 の例外もあるが低級脂肪酸による RQ は高級脂肪酸による RQ に比し、一般に高い値をとる傾向がみられた。

実験 5. ラウリン酸, オレイン酸との接触による菌の生存数と接触時間との関係について。

実験 2 及び 3 において, 被検脂肪酸中最も結核菌発育阻止作用の強いのはラウリン酸及び不飽和のオレイン酸である事を知った。よつて著者は鳥型菌竹尾株を種々なる濃度のラウリン酸及びオレイン酸 (10^{-2} M ~ 10^{-5} M) に色々な時間 (3 分, 10 分, 30 分, 1 時間, 4.5 時間, 24 時間, 72 時間) 接触せしめ, それぞれの場合における生存菌数を測定してみた。結果は表 2 に示す如くである。対照としては, 菌を pH 7.0 の 1/30 M 磷酸緩衝液に浸しこれを 37°C の孵卵機においたが, この場合の colony count による生存菌数は, 表に示す如く, 30 分後に 423, 4.5 時間後に 236, 24 時間後に 136, と漸次減少し, 72 時間後には急激に生菌数が低下して 2.3 の値を示した。これと略々同様な傾向を示したのは 10^{-2} M のラウリン酸に接触せしめた場合のみで, それ以外の濃度のラウリン酸及びオレイン酸に接触せしめた場合は, 予期に反し, 生菌数の減少が殆んど見られなかつたばかりか,

表 2 ラウリン酸, オレイン酸接触による生存菌数の時間的推移

脂肪酸	濃度 (M)	接 触 時 間						
		3 分	10 分	30 分	1 時間	4.5 時間	24 時間	72 時間
ラウリン酸	10^{-2}	426			362		129	2.6
	10^{-3}	442	451	412	405	381	213	196
	10^{-4}	418	418	436	410	423	512	383
	10^{-5}	379	432	411	409	412	388	391
オレイン酸	10^{-3}	412	430	419	422	408	196	93
	10^{-4}	443		462	452	375	363	236
	10^{-5}	436		414		418	388	391
対照 (磷酸緩衝液)				423		336	136	2.3

註 表中の数字は viable count によつて求めた生菌の colony 数を示す。

りか, ある場合にはかえつて生存菌数が増加する傾向さえ認められた。即ち 10^{-5} M のラウリン酸及び 10^{-5} M のオレイン酸によつては殆んど菌数の変化なく, 10^{-3} M のラウリン酸及び 10^{-3} M, 10^{-4} M のオレイン酸によつては 24 時間以後になつて幾分菌数の減少するのを見たが, 10^{-4} M のラウリン酸を作用せしめた場合には, 24

時間接触によつて寧ろ菌数の増加する傾向が認められた。この成績は (i) 菌がラウリン酸, オレイン酸に接触することによつて発育に対する刺激を受けたか, 或いは (ii) これらの酸が菌の代謝活動を抑え, resting cell の状態にして時間的な消耗を免かれしめたか, の何れかによるものと考えられる。何れにしても実験 2 において我々のみたラウリン酸, オレイン酸の発育阻止作用は, これら脂肪酸が殺菌的に働いたのではなくて, 静菌的に働いたのである事をこの実験は示しているものとする。**実験 6.** 種々なる濃度のオレイン酸による酸素消費の時間的消長, 並びに 10^{-3} M オレイン酸に 4.5 時間接触した菌のオレイン酸再接触による呼吸の変化について。

前実験から, 結核菌はオレイン酸との接触によつて viability にさほど影響を受けない事を知つたので, 次にかかる接触が菌の酸素消費能に如何なる影響を与えるかを調べてみた。然し前実験にみた如く, 菌液は 37°C に放置するのみで時間的にかなり viability に変化を来たすものであるから, 菌液調製直後のものと, これを 4.5 時間及び 24 時間放置したものに対して色々な濃度のオレイン酸を作用せしめ, これが酸素消費及び炭酸ガス排出に及ぼす影響を調べた。また, 予め 4.5 時間 10^{-3} M のオレイン酸に浸した菌について, 更に上と同じ濃度のオレイン酸が如何なる影響を与えるかをこれと平行して調べた。その結果表 3 の成績を得た。表中の数字はすべ

表 3 各種濃度オレイン酸による菌呼吸の時間的消長, 並びに 10^{-3} M. オレイン酸 4.5 時間接触菌の呼吸の変化について

A		濃 度 (M)			
接触時間	呼 吸	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
0 時間	O ₂ ($\mu\text{l.}$)	96.5	97.8	131.2	94.0
	RQ	0.81	0.82	0.83	1.06
4.5 時間	O ₂ ($\mu\text{l.}$)	62.0	68.2	58.1	50.9
	RQ	0.62	0.77	0.78	1.02
24 時間	O ₂ ($\mu\text{l.}$)	43.3	53.5	41.9	38.6
	RQ	0.55	0.67	0.51	0.32
B					
10^{-3} M オレイン酸 4.5 時間接触	O ₂ ($\mu\text{l.}$)	55.2	55.4	55.4	50.7
	RQ	0.77	0.82	0.88	1.11

註 測定値はすべて 90 分間測定して得たもの。菌量は 20 mg. (wet weight)。

て 90 分間の測定値である（既に掲げた図 10 の成績は Sauton 培地 7 日間培養菌について調べたもので、この実験とは目的を異にする）。

浮游液調製後 4.5 時間放置した菌は調製直後のものに比し viability においては余り差がなかつたが（表 2）、酸素消費能の面においてはある程度の低下が認められた。特にその低下は、オレイン酸を作用せしめないものと及びうすい濃度（ $10^{-5}M$ ）のものを作用せしめた場合に比し、高濃度（ $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ ）のオレイン酸を作用せしめた場合に著明であつた。24 時間放置菌はこの傾向が更に強いようである。なお、上記 $10^{-5}M$ のオレイン酸を作用せしめた場合の酸素消費量の低下と、これを作用せしめない対照との比較においては、前者の方が低下度は少なく、24 時間放置菌といえども減り方は他の濃度のものより遙かに少なかつた。RQ は菌液調製後放置時間が長くなるにつれて低下したが、この値が最も良く保持されていたのは、同じく $10^{-5}M$ のオレイン酸を作用せしめた場合であつた。また RQ はオレイン酸の濃度が高くなるにつれて低下するのを認めた。即ちオレイン酸の濃度が高くなると、酸素消費量の減少と共に、炭酸ガス排出量もまた減少するものと考えられる。一方、予

め $10^{-3}M$ のオレイン酸を作用せしめておいた菌は、その後更に色々な濃度のオレイン酸を加えても、酸素消費の上で濃度による影響は受けなかつた。但し酸素消費量の絶対値は、オレイン酸無処置菌に較べると可なり低いものであつた。

実験 7. 菌の各種物質代謝に及ぼすオレイン酸の影響について。

$10^{-3}M$ のオレイン酸溶液に $37^{\circ}C$ において 4.5 時間接触せしめた菌と、対照として同じ時間 $1/30M$ の磷酸緩衝液に接触せしめた菌について $10^{-2}M$ のグルタミン酸、グリセリン、乳酸、焦性ブドウ酸、10 倍希釈の鳥型菌 2 日培養 Sauton 濾液、及び Sauton 培地をそれぞれ基質として加えた場合の酸素消費量を測り、この値と、これら基質に更に $10^{-4}M$ のオレイン酸を加えた場合の同様な測定値とを比較してみた。成績は表 4 の如くである。測定時間は 90 分間とし、前半の 45 分と後半の 45 分との間に著しい差があるかどうかをみるため、2 回に分けて測定値を記録したが、両者間に認むべき差はなかつた。表 5 は脱水素酵素反応について同様な測定を行った成績である。

対照たる磷酸緩衝液接触菌は、グルタミン酸以下の基

表 4 各種基質添加時の菌の酸素消費量に及ぼすオレイン酸の影響

磷酸緩衝液 4.5 時間接触菌													
時間	基質 無基質	グルタミン酸		グリセリン		乳 酸		焦性ブドウ酸		2 日培養 ソートン濾液		ソートン培地	
		オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	
45 分	31.5	40.9	41.0	66.2	48.5	36.8	56.0	47.3	46.6	66.6	44.1	79.1	59.8
45 分	28.6	34.1	32.6	62.0	57.8	32.2	53.0	34.0	50.5	61.9	34.5	62.2	73.3
10 ⁻³ M. オレイン酸 4.5 時間接触菌													
45 分	28.9	53.8	71.4	110.2	120.5	57.6	70.6	53.8	68.2	136.8	142.4	128.8	118.1
45 分	29.3	53.0	61.0	115.5	126.3	46.1	56.5	43.0	54.6	109.4	113.9	103.0	94.5

注 測定は 45 分毎に分けて 2 回行う。

表 5 各種物質による菌の脱水素酵素反応に及ぼすオレイン酸の影響

磷酸緩衝液 4.5 時間接触菌														
脱色時間(分)	対照(無基質)	グルタミン酸		グリセリン		乳 酸		焦性ブドウ酸		2 日培養 ソートン培地		ソートン培地		
		オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸	オレイン酸			
	22	15	19	17	20	16	5	4	20	17	18	16	15	
10 ⁻³ M. オレイン酸 4.5 時間接触菌														
	38	42	25	35	35	47	5	7	34	32	25	35	15	27

質により何れも酸素消費量を増したが、これらに同時に $10^{-4}M$ のオレイン酸を加えた時にもなお且酸素消費の増量を示した基質は乳酸と焦性ブドウ酸のみで、他は何れもオレイン酸添加により酸素消費量が減少した。この減少は、2日培養 Sauton 濾液を基質とした場合に特に著明であつた。

一方、 $10^{-3}M$ のオレイン酸に浸した菌も、グルタミン酸以下の基質によつて同様に酸素消費の増加を来たしたが、その増加率は対照菌（磷酸緩衝液接触菌）に比してより大きく、且また、対照菌とは逆に、 $10^{-4}M$ のオレイン酸添加によつて更に一層これが増大したのは興味深く思われる。

脱水素酵素反応についてみれば、オレイン酸無処置菌の無基質時における脱色時間は22分で、 $10^{-4}M$ にオレイン酸を加えるとこれが短縮して15分となるが、グルタミン酸以下の基質を加えた時も同様に、乳酸添加時の5分を頂点としてすべての場合に短縮が認められた。また、これら基質と同時にオレイン酸を添加すると、脱色時間は更に一層短縮するのを見た。

これに反して、予め $10^{-3}M$ のオレイン酸を接触せしめた菌は、グルタミン酸等の基質添加によつて脱色時間の短縮を来たすことは同様であるが、これにオレイン酸を同時添加することにより、すべて脱色時間が延長した。

なお、オレイン酸接触菌にオレイン酸のみを基質として与えた時（42分）も、これを与えなかつた時（38分）に較べ脱色時間は延長する。

総括並びに考察

従来行われた多くの培養実験において、脂肪酸は結核菌の發育を抑制するものと報告され、従つて炭素源としては不適当であると考えられて来た。例えば Iijima⁹⁾ は結核菌及びその他の抗酸性菌について培養実験を行い、蟻酸からステアリン酸に至るすべての脂肪酸は、菌發育に対し抑制的に働くとして報告しており、一般に炭素数の増加に比例して發育阻止力は増大するが、最も阻止力が強いのはカプリン酸(C_{10})であると述べている。Dubos⁶⁾⁻⁸⁾ も同様に高級脂肪酸及び乳酸が菌の發育を抑制するのを観察しており、半合成培地中のカプリン酸は $10^{-4}M$ の濃度で人型菌の發育を阻害し、 $2 \times 10^{-4}M$ の濃度で牛型菌の發育を抑制すると述べ、かかる脂肪酸の發育阻止作用を失わせる為に培地に血清アルブミンを加える事を提唱した。又 Chang²³⁾、Schöble²⁴⁾ らも結核菌に対する脂肪酸の作用を検索し、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸等は結核菌の發育に対して常に阻止的に働き、

決して促進的に働くことは無いと報告している。

一方、Youmans⁹⁾ は modified Proskauer and Beck 合成培地からグリセリンを除き、色々な脂肪酸の広い濃度範囲について、これらを炭素源として培養実験を行つたが、醋酸からリノレン酸に至るほとんど総ての脂肪酸がかなり低濃度のある狭い範囲（例えばカプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸は 0.00025% から 0.000015% までの濃度）において人型菌 H_37Rv 株の發育を支持する事を認めた。彼によれば、それまで脂肪酸が結核菌の増殖を妨げると思われて来たのは、かかる至適濃度を用いず、専ら高濃度のものについてのみ研究されて来た為と説明され、教室の今井¹⁰⁾もまた蟻酸を除く脂肪酸が炭素源として利用されることを認めている。

他方多くの脂肪酸が結核菌の酸素吸収を刺戟することも観察されているが、この場合も諸家の成績はかなり区々である。例えば、Hoshino¹³⁾、Cutinelli¹⁴⁾、Bernheim¹⁵⁾、Loebel¹²⁾ らは、人型菌 H_37 株の酸素吸収に対して蟻酸(C_1)は殆んど影響を与えぬと云い、Franke¹⁶⁾ は $M. rub.$ を用いた実験において、蟻酸からカプリル酸(C_8)までの脂肪酸と、パルミチン酸(C_{16})、ステアリン酸(C_{18})は菌の酸素消費を促進せしめるが、カプリン酸(C_{10})はかえつてこれを阻害し、ラウリン酸(C_{12})、ミリスチン酸(C_{14})は殆んど影響を与えぬと報告している。

以上に述べた例の如く、得られた成績が必ずしも一致していない原因の一端としては、実験者によつて用いられた菌型、菌株、培養方法乃至培養条件などが相違していることを挙げ得るであろう。殊に使用培地の撰択はこの種の実験において慎重を要する問題であり、橋本¹¹⁾も指摘している如く、培地中に、血清、寒天、その他の脂肪酸に対する拮抗物質が含まれている場合には、正確なる成績は期待し得られない。この意味で液体合地培地以外のものは不適当と云うべきであろう。

然しこれよりも更に大きな原因として、被検脂肪酸の濃度乃至濃度範囲が、実験者ごとに喰い違つていた事を挙げなければならぬと思う。Youmans⁹⁾、今井¹⁰⁾らの結果からも明らかな如く、多くの脂肪酸は結核菌の發育に対して抑制的に働くと同時に促進的にも働く。かかる事実は特に脂肪酸のみに限られた現象ではないが、1つの物質の生物学的、薬理学的作用を検索する上に、濃度の問題は常に留意しなければならない事柄である。よつて著者はこの点を十分考慮に入れ、菌の發育及び酸素消費に及ぼす脂肪酸の影響を広い範囲の濃度に亘つて検索した。以下得たる成績を纏めつつ若干の考察を加えてみたいと思う。

各脂肪酸はすべて多かれ少なかれ結核菌の発育を促進する。この作用が最も顕著に認められたのは酪酸及び乳酸で、これのみで十分炭素源たり得ることを示し、プロピオン酸、カブロン酸、酪酸、カプリン酸がこれに続く成績を示した。高級脂肪酸、即ちミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸及び不飽和のオレイン酸においても僅かではあるが鳥型菌竹尾株の増殖を認める事が出来た。この成績は Youmans⁹⁾ らの成績と大体において一致するものであり、Dubos⁸⁾ の成績とは相反するものである。一般に低級脂肪酸は高級脂肪酸よりも結核菌に対する発育促進作用が強く、その至適濃度は比較的高い濃度にあるのを認めた。従来抗結核作用のみ強調されていた高級脂肪酸に、弱いながらも発育促進作用を認めたのは、本実験が広い範囲の濃度について検索された為である。宮川¹²⁾は、耐性を得て一般抗結核剤の効果が認められなくなつた重症結核患者に対し、ラウリン酸、カプリン酸等の如き高級脂肪酸の使用を奨めているが、使用濃度によつてはかえつて菌の発育を助長する事も考えられるので、使用方法については十分注意しなければならないと考える。

なお脂肪酸の結核菌に対する発育促進作用を報告した論文のうちでも、その作用の強弱に関する順序は報告者ごとにかなり区々である。これらは実験条件の相違に帰せらるべきであると同時に、濃度の相違もまた原因の大半をなしている事は疑いない。而して本論文に掲げた脂肪酸の順序は、前述の如く、すべてそれぞれの作用を発揮する至適濃度において比較したものであるから、この基準を変えれば結果としての順序も当然変つてくるとは云う迄もない。

飽和直鎖脂肪酸の系列中で、結核菌に対し最も阻害作用の強い脂肪酸としては、これ迄カプリン酸^{6)~8)}、ラウリン酸¹¹⁾が挙げられているが、今回の実験においてもこれら2つを頂点として、蟻酸からラウリン酸まで炭素数の増加に比例して菌発育阻害作用が強くなるのを見た。なお被検脂肪酸中最も抗菌力の強いのは不飽和のオレイン酸、最も弱いのは乳酸であつた。

脂肪酸は至適濃度において多かれ少なかれ結核菌の酸素消費を増加せしめる。この作用と菌発育促進作用との間に如何なる関係があるかは興味ある問題なので、各脂肪酸ごとに、発育菌の乾燥重量、generation time、酸素消費量、炭酸ガス排出量及びRQ等に及ぼす各酸の作用を纏め、これを比較してみた。図13以下図25までは、蟻酸からオレイン酸に至る個々の脂肪酸について、これらの測定値を1つの図にplotしたものである。

図13~図25を通覧してみると、多少の例外はある

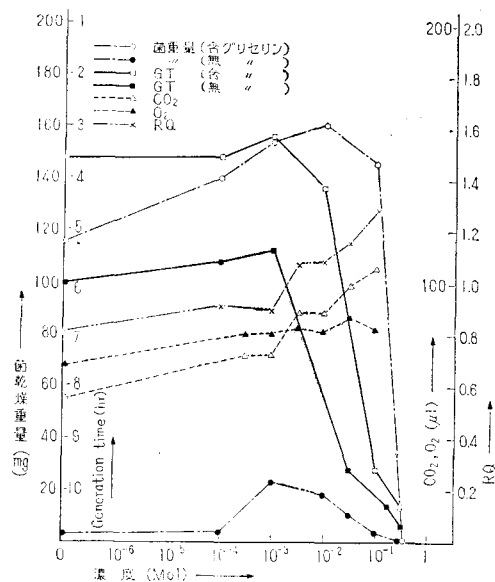


図13 鳥型菌竹尾株の Formate 代謝

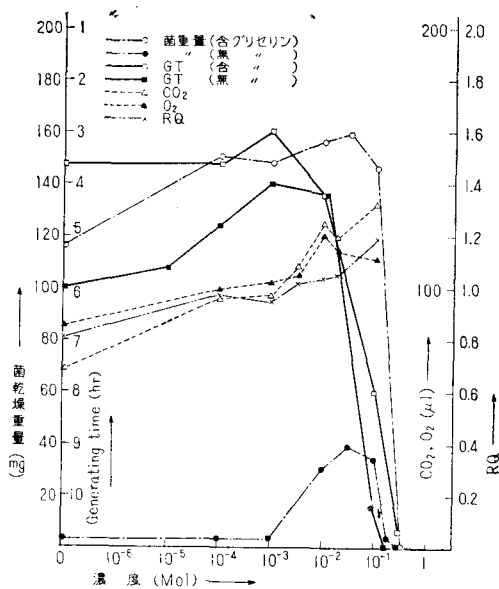


図14 鳥型菌竹尾株の Acetate 代謝

が、大体において次の事実を観察し得る。即ち酸素消費量を最も増大せしめる脂肪酸の至適濃度と、菌発育を最大ならしめる濃度とは必ずしも一致しないし、又先に述べた如く、菌の酸素消費をよく増大せしめる脂肪酸が必ずしも発育に対し同様に良好な影響を与えるとも限らない。要するに脂肪酸の菌発育に及ぼす影響と酸素消費に及ぼす影響との間には直接的な平行関係を認め得ない。又菌の generation time を最も短縮せしめる脂肪酸の

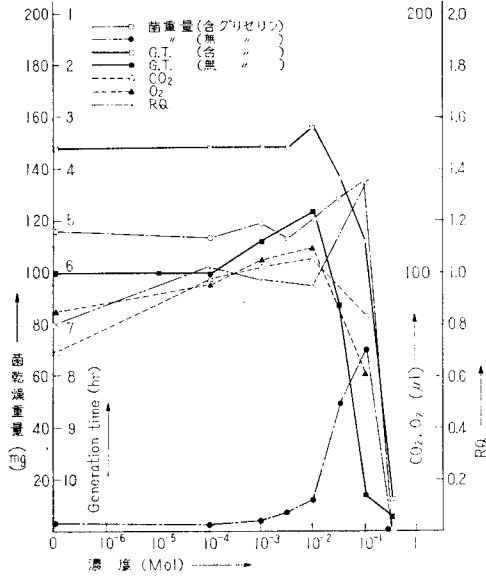


図 15 鳥型菌竹尾株の Propionate 代謝

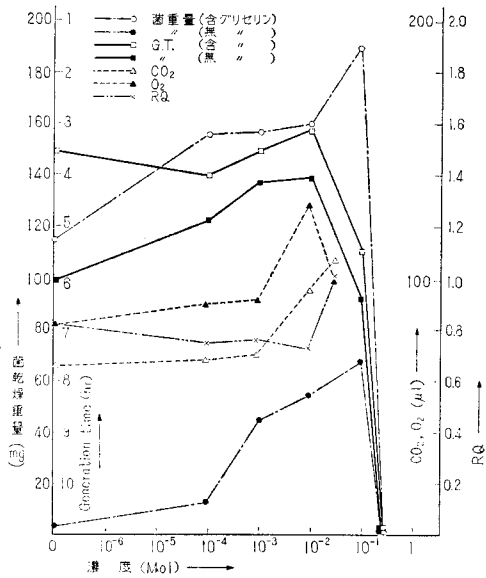


図 16 鳥型菌竹尾株の Butylate 代謝

濃度は、発育菌の乾燥重量を最大ならしめる濃度の 1/2 から 1/10 或いはそれ以下の所に認められた。

酸素消費を刺戟する脂肪酸の至適濃度と菌発育に対する至適濃が一致しなかつたことについては、後者の場合菌の発育する培地には、脂肪酸以外にも発育に影響を与える物質（例えばアミノ酸）が含まれていたことを考えれば別に不思議はないし、又酸素消費量の増大についても Dubos⁸⁾ の暗示している如く、菌の代謝系の騒擾によ

る場合があることを考慮に入れなければならない。この事は、菌の発育出来ない濃度において酸素消費量の増大しているオレイン酸、ラウリン酸等の例をみれば、特に考慮の必要があると思われる。

又 generation time に対する至適濃度と菌乾燥重量に対するそれとが一致しない事については次のように考えられる。即ち菌の generation time を最短ならしめるような濃度の脂肪酸を作用せしめた場合、確かに菌の

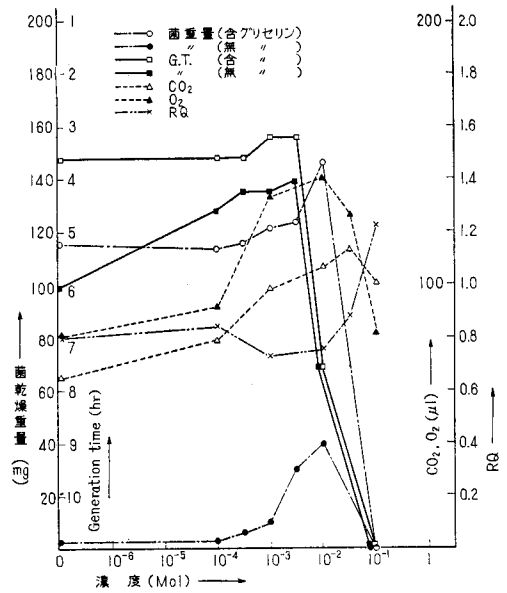


図 17 鳥型菌竹尾株の Caproate 代謝

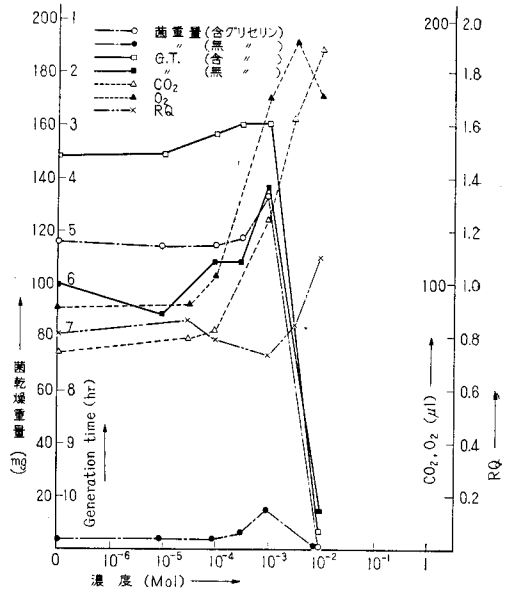


図 18 鳥型菌竹尾株の Capylate 代謝

分裂速度は最も早い、増殖が旺盛であるだけに菌の脂肪酸利用によって培地中の脂肪酸は急激に減少し、その為発育菌重量はその後余り増えないことが想像される。これに反し、菌の乾燥重量を最大ならしめた濃度においては、菌の増殖速度がそれ程早くなく、従つて **generation time** は比較的長い、徐々であるとは云え長い間継続的に菌の増量を続けて行くために、菌量が最大に達するのではなからうか？

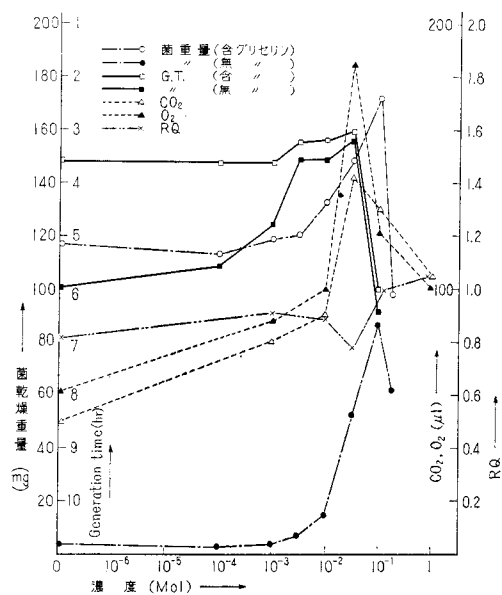


図 19 鳥型菌竹尾株の Lactate 代謝

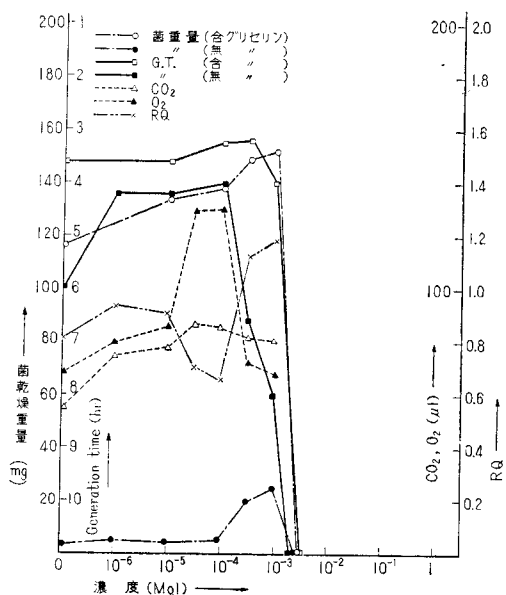


図 20 鳥型菌竹尾株の Caprate 代謝

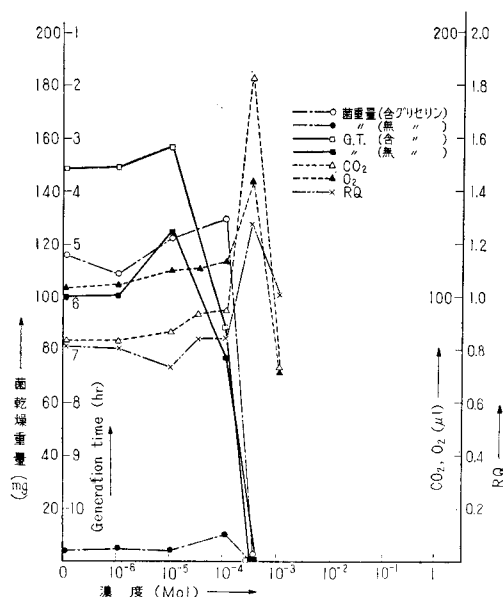


図 21 鳥型菌竹尾株の Laurate 代謝

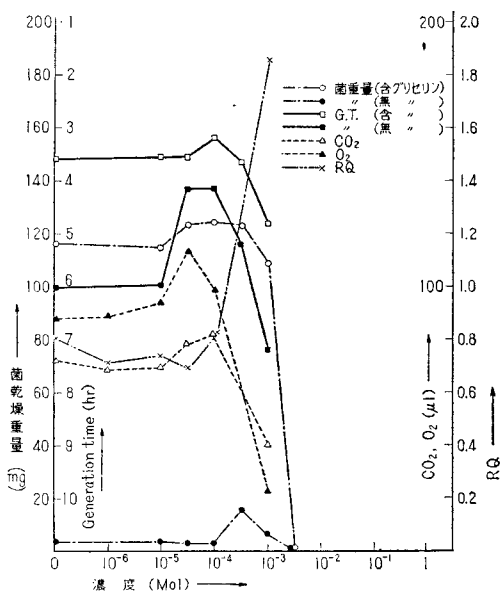


図 22 鳥型菌竹尾株の Myristate 代謝

また図において、**generation time** を最短ならしめる濃度は、**RQ** が最低になる濃度と丁度一致しているように見受けられるが、その意義付けに関しては未だ断定的な事を云う段階ではない。何となれば、この場合の **RQ** が何らかの意味をもつた真の最小値であるのか、或いは見掛け上の最小値で（次の脂肪酸濃度において **RQ** が上昇しているのは、この濃度では酸素消費が急速に減少するにも拘らず炭酸ガス排出の低下がこれに伴わない為な

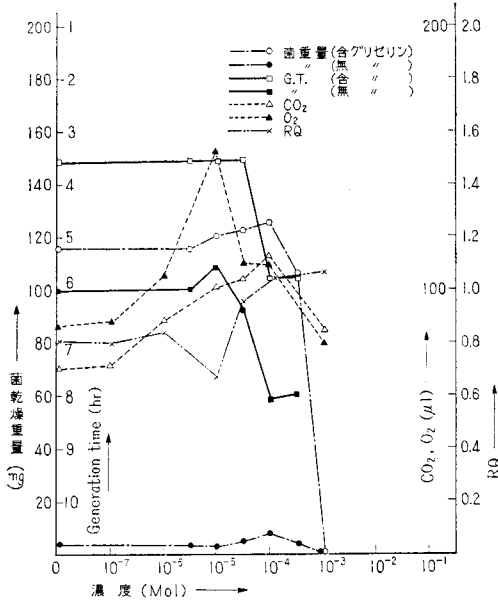


図 23 鳥型菌竹尾株の Palmitate 代謝

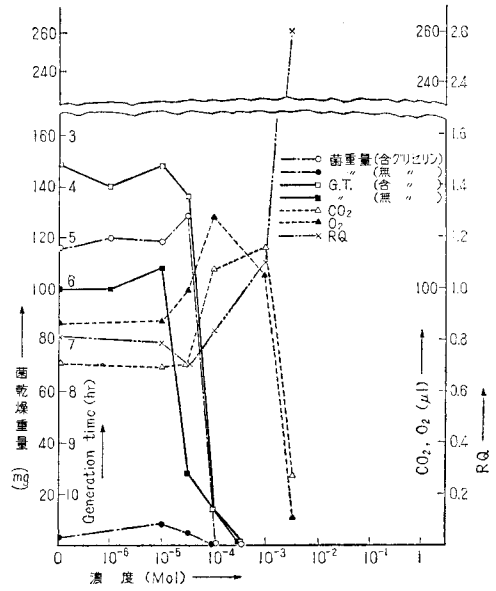


図 25 鳥型菌竹尾株の Oleate 代謝

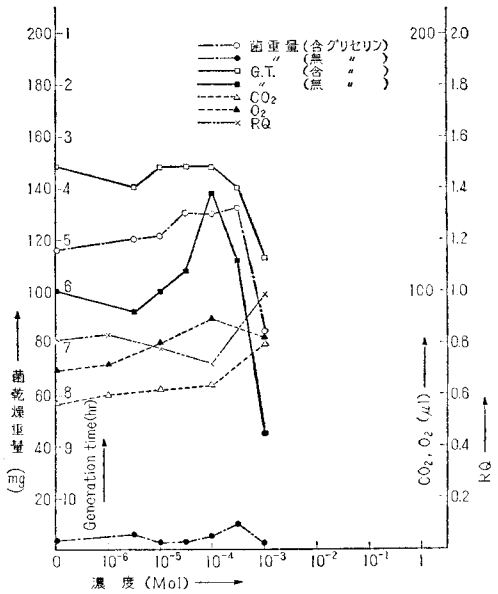


図 24 鳥型菌竹尾株の Stearate 代謝

のかも知れない), 相対的な意味のものに過ぎないのかは更に検討を要するからである。

実験 2, 3 において, 高濃度の脂肪酸, 殊にラウリン酸, オレイン酸等は, たとえ菌の酸素消費は促進せしめても, 菌の増殖に対しては阻止的な態度を示すことを知った。よつて 著者は, 実験以下において特にラウリン酸, オレイン酸を取り上げ, より詳細にその作用を検索した。

表 2 において見た如く, $10^{-3} M$ から $10^{-5} M$ までのオレイン酸又はラウリン酸に菌を接触させた場合, colony count による生菌数は対照より多く, 特に $10^{-4} M$ のラウリン酸によつては, 接触経過中に若干菌数が増加したような成績さえ示されている。Minami²⁵⁾ は同様な colony count による実験から, オレイン酸は鳥型菌竹尾株に対し殺菌的に働くと報告しているが, 上述した著者の成績から見れば, オレイン酸, ラウリン酸の結核菌に対する作用は殺菌的でなくて明らかに静菌的であり, 場合によつては菌発育に対し刺激的な態度を示すこともあるのではないかと考えられる。

さて, ラウリン酸, オレイン酸が酸素消費を促進せしめるにも拘らず, 菌の増殖を許さないのは如何なる機序によるものであろうか。

この点を考察するに先立つて, 脂肪酸の代謝経路に関する 2, 3 の文献を拾つてみたいと思う。笹川²⁶⁾は, 鳥型菌竹尾株より羧酸脱水素酵素を抽出してその性質を調べ, Ochoa et al²⁷⁾ 及び Goldman²⁸⁾ は H₃₇Ra 株について, 醋酸は先づ Coenzyme A と結合し, これとオキサロ醋酸が condensing enzyme によつて嫌氣的にクエン酸を生成するのを見ている。また楠瀬²⁹⁾は鳥型菌竹尾株を用いた実験によつて, 醋酸と結合した Coenzyme A は, 好氣的な条件下ではオキサロ醋酸の代りにリンゴ酸またはフマル酸と結合してクエン酸を生成すると述べている。炭素数の多い脂肪酸については, まだこのような結核菌による代謝経路の研究がなされていないが, 動物組織について見られている β -酸化や, Coenzyme A が

この場合にも関与^{30), 31)}していることは当然想像される。何れにしても脂肪酸代謝の第一段階は大体脱水素作用であるらしく、酸素消費量の変化となつて現われる過程は、それに続く一連の酵素作用の total によるものであろう。而してこの実験においては、これら脱水素作用も酸素消費も共に阻害されないような脂肪酸濃度で菌の発育が抑えられたのであるから、その阻害はもつと別な個所で起つているものと考えるのが妥当と思われる。

実験7において著者は、結核菌の物質代謝に及ぼすオレイン酸の影響を調べた。即ちグルタミン酸、グリセリン、乳酸、焦性ブドウ酸、結核菌2日培養ソートン濾液及びソートン培地等を基質として加えた場合の菌の酸素消費量及び脱水素酵素反応を、オレイン酸接触菌と非接触菌について比較してみた。その結果は前述の如く甚だ複雑であつて、グルタミン酸以下の物質代謝に当り、オレイン酸接触菌は、基質にオレイン酸を添加した場合酸素消費量を一層増すが、メチレン青の脱色時間はかえつて遅延し、一方オレイン酸非接触菌は、同じ条件下で酸素消費を増量する場合と減量する場合があり、脱色時間は前者と逆にすべて短縮するのみをみた。鳥型菌竹尾株には勿論種々なる呼吸酵素及び種々なる代謝系が存在しているから、恐らく高濃度のオレイン酸はこれら呼吸酵素、代謝系に対し、ある部分には刺激的に、ある部分には抑制的に働き、エネルギー利用代謝系を攪乱しているのであろう。然しその詳細についてはなお幾多の実験が必要であり、今後の研究によつて足らざる点を補つて行きたいと考えている。

結 論

炭素数1の蟻酸より炭素数18のステアリン酸に至る飽和直鎖脂肪酸並びに乳酸、オレイン酸の広い範囲の濃度について、鳥型菌竹尾株の発育、酸素消費量及び炭酸ガス排出量に及ぼす影響を調べ、更に菌発育阻止作用の比較的強いラウリン酸及びオレイン酸に接触せしめた場合における菌の viability, 物質代謝、脱水素酵素反応等についても検索した。得たる成績は次の如くである。

1) 実験に用いた脂肪酸は、比較的うすい濃度において多かれ少なかれ結核菌の発育を促進せしめる。菌の発育に対し最も良好な炭素源となつたものは乳酸及び酪酸で、プロピオン酸、カプロン酸、酪酸がこれに続き、最も菌発育を支持する作用が弱かつたのはラウリン酸及びオレイン酸である。

2) 被検脂肪酸はすべて、比較的高い濃度において結核菌の発育を阻止する。阻止作用が最も強いのはラウリン酸及び不飽和のオレイン酸で、乳酸はこの作用が最も

弱かつた。飽和直鎖脂肪酸においては、炭素数1の蟻酸から炭素数12のラウリン酸に至るまで、炭素数が多くなるのと比例して菌発育阻止作用は強くなるが、炭素数が14以上になるとこの作用は再び弱くなる。

3) 実験に用いた脂肪酸は何れも結核菌の酸素消費を増加せしめる。その作用が最も著明に認められたのは乳酸で、次いでカプリル酸、カプリン酸及びカプロン酸等が比較的強く酸素消費を増加せしめた。菌発育に対する脂肪酸の至適濃度と酸素消費を最大ならしめる至適濃度とは必ずしも一致せず、又各脂肪酸の示す発育促進作用と酸素消費促進作用との間には平行関係を認め得なかつた。即ち酸素消費を良く促進せしめる脂肪酸が必ずしも菌の発育に対し同程度の好影響を与えるとは限らず、またこの逆も真であつた。

4) 脂肪酸の菌発育に及ぼす影響を調べる場合、発育菌量を判定基準とした実験と generation time を基準とした実験とでは得たる至適濃度の値を異にする。即ち結核菌の generation time を最短ならしめる脂肪酸の至適濃度は発育菌乾燥重量を最大ならしめる濃度の1/2乃至1/10であつた。

5) この実験において、菌のRQが最も低い値をとつた場合の脂肪酸の濃度は菌の generation time を最も短くする脂肪酸の濃度と良く一致していた。また一般に低級脂肪酸を作用せしめた場合のRQは、高級脂肪酸を作用せしめた場合のそれよりも高い値を示した。

6) 結核菌の増殖を阻止するような濃度のラウリン酸又はオレイン酸に菌を長時間浸した後、菌液中の生菌数を colony count により調べてみると、燐酸緩衝液中に保つた対照に比し、菌数は全く減少していない。従つてラウリン酸、オレイン酸の発育阻止作用は、菌に対し殺菌的に働くのではなくて静菌的に働くものと考えられる。なお結核菌の増殖を許さない濃度($10^{-3}M \sim 10^{-5}M$)のこれら2つの酸も、菌の酸素消費に対しては促進的に働く。

7) 比較的高濃度のオレイン酸は、菌の物質代謝、脱水素酵素反応等に対して複雑な影響を与え、菌の持つている色々な呼吸酵素、代謝系のあるものには刺激的に、あるものには抑制的に働いて、エネルギー利用代謝系を攪乱するものと考えられる。

引 用 文 献

- 1) 広田慶一・堀三津夫：肺結核の化学療法，共立出版，東京，203，1942.
- 2) 宮川米次：日本臨牀結核，14，863，1955.
- 3) 渡辺 照：薬学雑誌，76，843，1956.
- 4) 若林 宏：実験医学雑誌，17，753，1933.

- 5) Iijima, S.: *Tohoku J. Exp. Med.*, 25, 424, 1935.
- 6) Dubos, R.J.: *J. Exp. Med.*, 85,9, 1947.
- 7) Dubos, R. J. & Middlebrook, G.: *Am. Rev. Tuberc.*, 56, 334, 1947.
- 8) Dubos, R.J.: *J. Exp. Med.*, 92, 319, 1950.
- 9) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: *J. Bact.*, 67, 731, 1954.
- 10) 今井 忠: 結核の研究, 5, 26, 1956.
- 11) 橋本達一郎他: 医学と生物学, 44, 91, 1957.
- 12) Loebel, R. O. & Shorr, E.: *J. Bact.*, 26, 139, 1933.
- 13) Hoshino, M.: *J. Biochem.*, 46, 825, 1934.
- 14) Cutinelli, C.: *Boll. ist. sieroterap. milan.*, 19, 88, 141, 146, 1940.
- 15) Bernheim, F.: *J. Bact.*, 41, 387, 1941.
- 16) Franke, W. & Schillinger, A.: *Biochem. Z.*, 316, 313, 1944.
- 17) Dubos, R. J. & Davis, B. D.: *J. Exp. Med.*, 83, 409, 1946.
- 18) Dubos, R.J.: *J. Exp. Med.*, 88, 73, 1948.
- 19) Drea, W.F.: *J. Bact.*, 44, 149, 1942.
- 20) 新明美仁他: 結核の研究, 3, 50, 1955.
- 21) Edson, N.L. & Hunter, G. J. E.: *Biochem. J.*, 37, 563, 1943.
- 22) 高橋和男: 結核の研究, 8, 44, 1957.
- 23) Chang, P. Y.: *China Med. Journ.*, 36, 311, 1922.
- 24) Schöble, O.: *Philippine Journ. Sc.*, 25, 123, 1924.
- 25) Minami, K. et al: *J. Bact.*, 73, 3, 1957.
- 26) 笹川泰治: 第26回日本生化学会総会発表, 1954.
- 27) Ochoa, S., Stern, J.R. & Schneider, M.C.: *J. Biochemistry*. 193, 691, 1951.
- 28) Goldman, D.S.: *J. Bact.*, 73, 602, 1957.
- 29) 楠瀬正道: 結核, 29, 19, 1953.
- 30) Mac Kay, E.M.: *J. Clin. Endocrinol.*, 3, 101, 1943.
- 31) Green, D. E.: *J. Biochemistry*, 206, 1, 1954.
- 32) 山村雄一: 結核菌の生化学, 共立出版, 1955.