

結核菌ノ等電點ニ就テ

有馬研究所(所長 有馬博士)

醫學士 岩 崎 基
楠 節 子

(本論文ノ一部ハ昭和 12 年 4 月第 15 回日本結核病學會總會ニテ發表セリ)

目 次

第一章 緒 論	1. 酸性等電點
第二章 實驗材料	2. 菌體成分トノ關係
第三章 余等ノ三槽式電氣泳動ニ就テ	3. 「アルカリ」性等電點
第四章 實驗方法	第六章 結 論
第五章 實驗結果	第七章 文 獻

緒 言

周知ノ如ク蛋白質ノ I. E. P. (Isoelectric point) 等電點、以下 I. E. P. トノミ記ス)トハ、ソノ解離分子ニ就テハ陰陽各「イオン」ガ最小且等量ニ存スル PH ニシテ、ソノ中性分子濃度ノ最大點ナリ。Michaelis ニ依レバ蛋白質「イオン」ガ陰陽何レノ極ニモ移動セザルカ、或ハ兩極ニ微等量ノ移動ヲ見ル時ノ H⁺「イオン」活動度ナリ。然ルニ原形質ハ蛋白質複合體ヲ主成分トスル兩性體故 I. E. P. ノ存在又當然ナリ。而シテ I. E. P. ニ於テハ蛋白質、原形質、或ハ細胞ハソノ物理的、化學的又ハ物理化學的諸性狀最小或ハ最大値ヲトルヲ以テ、細菌ニ於テモ亦ソノ生理上大イナル意義ヲ有スルナリ。各種病原菌ノ I. E. P. ニ關スル報告ハ多々アリ。今ソノ一端ヲ引例セバ、Michaelis (1911) ハ酸凝集反應ニヨリテ、「チフス」菌、「コレラ」菌、腦脊髓膜炎菌及ビ人型結核菌等ノ I. E. P. 夫々 4.15—4.45、3.0、4.1 及ビ 2.2 ナリトシ、E. W. & A. E. Stearin (1925) ハ沈澱反應ニ吸著試験ヲ並用シテ枯草菌、化膿性球菌、大腸菌、赤痢菌及ビ變形菌ノ値夫々 1.9、2.1、5.0、

3.5—4.0 及ビ 3.2 ヲ得。Northrop, De Krnif Falk, Winslow & Schaughnessy (1922—1925) ハ「チフス」族ノ各種細菌ヲ材料トシテ、電氣泳動及ビ凝集反應ニ依リ、廣汎ナル細菌生理學ノ研究ヲナシ、細菌ハ一般ニソノ I. E. P. PH 3 ヲ中心トスル酸性側ニアリトセリ。而シテ又氏等ハ細菌ニ於ケル「アルカリ」性等電點ノ存在ヲ認メ B. Cereus, 大腸菌ニ於テ 13.8—13.4、13.6—13.8 ナル數值ヲアゲタリ。本邦ニ於テハ從來ハ多クウィールスノ電氣泳動實驗行ハレタレド[例之中村(1930)]、山羽(1932) ハ白色葡萄球菌、脾脫疽菌、大腸菌ソノ他微生物ノ I. E. P. 酸性、「アルカリ」性等共ニ求メ 1.6、1.75、2.0 2.2—2.6 及ビ 10.0—11.5 ヲ發表セリ。以上ノ如ク結核菌ノ I. E. P. ニ就テハ Michaelis ノ報告ヲ除キ、之ニ關スル記載ニ接シ得ザルノ憾アリ。茲ニ於テ余等ハ毒性、染色性等ニ特異性狀ヲ有スル結核菌ガ I. E. P. ニ於テモ亦他種細菌トノ間ニ差異ヲミルヤ否ヤヲ再検討セントシテ本實驗ニ著手セリ。但、由來結核菌ノ平等安定ナル乳劑ヲ調製スル

超音波處置條件記録

室溫 23°C—25°C, 濕度 60—75%		
作用時間、結核菌 30 分、對照菌 15 分		
水晶發振子	厚サ	7 m.m.
	直徑	35 m.m.
周波數	始メ	410 kc/sec.
	終リ	„ kc/sec.
油ノ溫度	始メ	23°C
	終リ	23°C
油ノ厚サ		8cm.
噴油ノ高サ		ca 5cm.
直流電壓計		2200 V.
直流電流計		0.2 M.A.
熱電流計		270 M.A.

ハ、甚ダ困難ナリトセラレ居リ、且不安定ナル乳劑ヲ以テスル I. E. P. ノ測定ノ確實性無キハ言ヲ俟タズ。斯ル故ニ本研究ニ於テハ、菌浮游液ハ常ニ超音波處置ヲ以テコノ難ヲ避ケタリ。以下コ、ニ得タル菌液ヲ以テ、電氣泳動並ビニ凝集反應ノ兩法ニ依リ、酸、アルカリ兩等電點ヲ求メタル結果ヲ報告シ、更ニ結核菌自身ノ I. E. P. トソノ成分ノ I. E. P. 關係ニ就キテ述ベントス。

實驗材料

A (1) 人型結核菌(死菌) 奥田株、「グリセリン」寒天 2 ヶ月培養 100°C 1 時間死滅セシメタルヲ微湯ニテ數回遠心洗滌シ、37°C 恒溫室、次イデ「エキシカトール」中一オキテ乾燥恒量ニ達セシム。得タル死菌 200 mg ヲ 20.0cc. ノ再蒸餾水一テ〔(2) 以下モ同量比〕先ヅ瑪瑙乳鉢ヲ用ヒテ十分磨碎シ更ニ表記條件ノ許ニ、超音波處置ヲ爲シ、念ノ爲メ 24 時間靜置、ソノ上清ノ平等ニシテ安定ナル懸垂液ヲ使用ス。

(2) 結核菌(生菌) 寒天培地ヨリ得タル菌苔ヲ洗滌乾燥磨碎後超音波ヲ作用セシムルニ際シ冷却裝置ヲ用ヒテ、ソノ熱作用ヲ除外ス。

(3) 大腸菌及ビ枯草菌 對照用。普通寒天 2 ヶ夜培養ヲトリ加熱死滅セシメテ洗滌乾燥乳劑化スルコト(1)ノ如シ。

(4) 脫脂結核菌體及ビ菌體脂質 「ソクスレット」裝置ヲ用ヒ酒精、「エーテル」ニテ抽出ス。即チ同筒濾紙 No. 84 ヲ用ヒ其底部ニ脫脂綿ヲ充填シ中央凹所ニ結核死菌ヲ入レ先ヅ無水酒精

一テ抽出 1 週間ニ及ビタル後「エーテル」一テ更ニ同時日間處置セルモノヲバ脫脂菌體トシ、兩液ニヨル抽出液ハ菌體ノ混入ヲ避ケテ「シランペラン」ヲ通ジ溶劑ヲ蒸發シ去ル。脫脂菌體ノ乳劑化ハ(1)(2)(3)ニ同ジケレド、抽出脂質ハソノ「エーテル」ニヨルモノ單獨ニテハ水ト親和セザルヲ以テ酒精ニヨルモノト收量比ニ混ジ、加熱溶解セルヲ超音波ニカク。

B 使用緩衝液 蛋白質或ハ原形質ハ、緩衝液中ニテハ酸或ハ鹽基トシテ完全ニ解離シ且ソノ價 1 價ト見做シ得ルモノ故(之即チ理想兩性體ノ法則ナリ) I. E. P. ノ測定ハ緩衝液中ニ於テナスヲ適當トス。余等ハ便宜上 Michaelis 氏乳酸鹽「ブッハー」液 PH 2.3—5.0、Sørensen 氏「グリココール」鹽酸「ブッハー」液及ビ「グリココール」苛性曹達「ブッハー」液ヲ主トシ、他ニ Wapole 氏醋酸鹽、Sørensen 氏磷酸鹽緩衝液ヲ利用セリ。且ソノ PH 値檢定ニハ板野氏 Quinhydrone 電極或ハ指示藥法ヲ以テセリ。

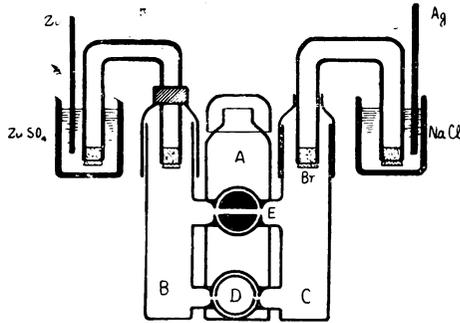
余等ノ三槽式電氣泳動ニ就テ

實驗方法ヲ述ブルニ先立ち、余等ノ考案使用セル電氣泳動器ニ就テ簡略ニ紹介セントス。

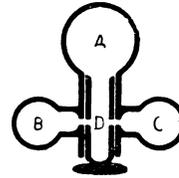
第 1 圖ニ於テ(a)ハソノ縱斷面ヲ(b)ハ横斷面ヲ示シ、Aハ可檢液ヲ入ル、主管ニシテ、B、Cハ同 PH 溶液ヲ容ル、側管ナリ。AトB、Cト

ハ下部活栓Dヲ通ジテノミ相通ジ、上部活栓EハB、Cヲ連絡スルモノ。Dハ空管ニシテ液注入時閉塞シ試驗時開スルモ、Eハ實質ニシテ液注入時ノミ開キテ側管容量差異アルモDニ及ボス壓ノ相違ナカラシム。即チ Electrophoresis

第 1 圖
(a)



(b)



ハ D ノ兩孔 (Electrosmosis ヲ防グ爲メ孔ノ直徑ハ 2.0 mm 以上ナルヲ要ス) ヲ經テ行ハル。Br ハ本裝置ト電極間ノ橋ニシテ 1% KCl, 2% 寒天ヲ滿シ、ソノ兩端ヲ「コルク」栓ヲナセルモノ。ソノ他生菌ヲ以テ實驗スル時ハ A, B, C

ニ被蓋ヲナシ側管ト被蓋トハ「ゴム」管ニテ繼ギ雜菌ノ混入ヲ避ク。カ、ル三槽式電氣泳動器ハ從來行ハル、U 字型ノモノニ比シ、液注入、洗滌ノ便ハ言フマデモナク細菌殊ニ生菌研究用トシテ混亂、危險ヲ除キ得ルノ特長ヲ有スルナリ。

實驗方法

(1) 電氣泳動 上記ノ電氣泳動器ヲ用ヒ、ソノ主管ニハ菌乳劑ヲ緩衝液ニテ 20 倍ニ稀釋混和セルモノ 18cc ヲ入レ兩側管ニハ同一 PH 値ノ緩衝液(蒸餾水ヲ乳劑ト等量ニ加ヘタルモノ)ヲ 8.5cc 宛入レ、50—100V, 2—3 mA ノ條件ニテ 30 分後ノ結果ヲ判讀セリ。

管ニ 2.0cc 宛トリ之ヲ蒸餾水ニテ 4 倍ニウスメテ (1) ト同一濃度トナシタル乳劑 0.5cc ヲ加ヘ振盪混和シタルヲ、37°C 恒溫室內ニ 20 時間靜置シテソノ凝集度ヲ求ム。但結核菌體脂質ノ場合ノミハ沈澱度ニ代フルニソノ Flocculation ノ度合ヲ以テス。

(2) 凝集反應 緩衝液ヲ口径 1.1 cm ノ小試驗

實驗結果

第 1 表

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PH	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
結核菌 (死菌)										
CH	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Aggl	++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
結核菌 (生菌)										
CH	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Aggl	++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

枯草菌										
CH	+	+	+	0	-	-	-	-	-	-
Aggl	++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
大腸菌										
CH	+	+	+	+	0	-	-	-	-	-
Aggl	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-
CH: Charge. Aggl: Agglutination										

第 2 表

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
脱 脂 菌 體										
PH	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
CH	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-
Aggl	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
菌 體 脂 質										
PH	1.0	1.2	1.4	1.6	1.9	2.3	2.6	2.9	3.3	3.7
CH	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Fl	+	++	++	++	++	+	-	-	-	-
Fl: Flocculation.										

1. 第 1 表ノ如ク電氣泳動試験ニヨル I. E. P. ハ、何レノ細菌ニ於テモ略々酸凝集反應ノ最高圈ノ中心ニ位スルコトヲ知ル。而シテ結核菌ハ生、死菌共ニ I. E. P. PH 2.9—3.2 ニシテ、對照タル枯草菌ハ凝集圈ハ結核菌ヨリ大ナレド電氣泳動ニテハ殆ド變ラズソノ値 PH 3.2 ナリ。大腸菌ハ酸ニヨル凝集能力ナシトスル成書モアレド、微弱ナガラ凝集沈澱スルヲ認メ I. E. P. PH 3.5 ナリ。

2. 脱脂菌體ノ I. E. P. ハ PH 4.7 ニシテ蛋白質ノ PH 4—5 ナル値ニ移動セルハ當然ナリ。又抽出脂質ハ 1.9—2.3 ニシテ「レチチン」ノ I.

第 3 表

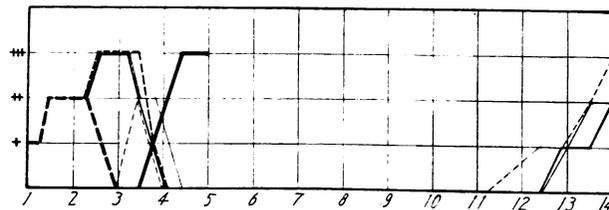
No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PH	8.5	9.3	9.7	10.1	11.3	12.4	12.9	13.5	14.0
結 核 菌									
CH	-	-	-	-	-	-	0	+	+
Aggl	-	-	-	-	-	-	+	+	++
枯 草 菌									
CH	-	-	-	-	-	0	+	+	+
Aggl	-	-	-	-	-	-	+	++	++
大 腸 菌									
CH	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Aggl	-	-	-	-	-	+	+	++	+++

E. P. PH 2.7 ヲ遙カニ越ユ。(第 2 表参照)

3. 第 3 表ハ同一材料ヲ以テセル「アルカリ」性等電點ノ測定結果ナリ。電氣泳動ニテハ結核菌ハ 13.0 ニシテ、枯草菌、大腸菌ハ夫々 12.4、11.3—12.4 ニシテ、凝集反應モ略々之ニ近キ成績ヲ示セド酸ニヨル場合ノ如クハ一致セズ。且 PH 12 以上ノ如キ強「アルカリ」性溶液中ニテハ、大腸菌菌體ハ甚シキ溶解ヲ爲シ、枯草菌、結核菌モ亦完全ナル桿狀ヲナサズ顆粒ノ竝列ヲ見ル如シ。

4. 以上ヲ總括シテ第 2 圖トシテ掲グ。

第 2 圖



縦軸: (1)—(5)凝集度 (6)飄出度

横軸: PH

- 1. 結核菌(死) —————
- 2. 結核菌(生) (dotted)
- 3. 枯 草 菌 - - - - - (dashed)
- 4. 大 腸 菌 - · - · - · (dash-dot)
- 5. 結核脱脂體 ———— (long-dashed)
- 6. 結核菌脂質 - - - - - (short-dashed)

結 論

a 人型結核菌ハ中性溶液中ニテハ陰性ニ帯電シ、ソノ I. E. P. ハ PH 3 ニシテ、ソノ位置他種細菌トノ間ニ大差ヲ見出ス能ハズ。

b 結核菌自體ノ I. E. P. ハ脱脂菌體及ビ抽出脂質ノ I. E. P. ノ殆ド中間ニ位スルヲ以テ、ソノ成分ノ形成セル複合兩性體ノ I. E. P. ニ適當スルモノト考フルヲ得ベシ。

c 結核菌ノ「アルカリ」性等電點ハ PH 13 ニシテ之亦他菌ノ値ニ遠カラズ。

要之、結核菌ノ特性ハ帯電状態ヲ以テハ説明スルコトヲ得ズ。

終リニ所長有馬博士竝ニ青山博士ノ校閲、教導ヲ深謝シ、所員安岡氏ノ助力ヲ多トス。

文 獻

- 1) Michaelis, L., (1911) *Deutsch. Med. Woche-*
nshr. (37). 969, 2) Stearin, E. W. & A. E.,
(1925) *J. Bact.* (10). 13. 3) Stearin, E. W. &
A. E., (1931) *Protoplasma*, (12). 435, 4) No-
rthrop, J. H. & De Kruif, P. H., (1922) *J. gen.*
Physiol. (4), 435, 5) Falk, I. S. & Caulfield,
(1923) *J. gen. Physiol.* (6). 177, 6) Winslow
C. E. A. & Shaughnessy, (1924) *J. gen. Physiol.*
(6), 697, 7) 中村豊, (昭和五年). 東京醫事新

- 誌, Nr. 2668. 1, 8) 山羽儀兵, (昭和八年). 一
般細胞學, 9) 箕作新六, (昭和四年). 膠質化學,
10) Alexander, (1928) *Colloid chemistry* Vol.
2, 11) Buchauan, R. E. & Fulmer, E., (1928),
Physiology & Biochemistry. of Bacteria. 12)
Abderhalden, *Biol. arb. Meth. abt 3. Physik-chem.*
Teil. B. 13) Freundlich, *Kapillarchemie.* 14)
Prausnitz, *Elektrophorese-osmose u. dialyse.*
15) Michaelis, *Die Wasserstoffionenkonzentration.*

