

結核菌菌体成分特に蠟脂質の生成機序について

九州大学医学部第三内科教室(指導 沢田教授 貝田助教授)

佐 藤 壯 一

(昭和 26 年 6 月 15 日受付)

(本論文の要旨は第23, 第24回日本結核病学会総会に発表した)

1 緒 言

結核菌が種々なる化学薬品に極めて抵抗強き原因の一としてその有する蠟脂質が想像され、しかも菌体蠟脂質に抗酸性を与う本態の存することは既に「アンダーソン」その他の業績で明確にされた。しかし、蠟脂質がいかなる化学機序によつて生成されるかは未だ不明でない。従つて、結核菌の特質を形成するものとして蠟脂質の問題は重要であり、その本態の究明は結核の化学療法への示唆を与うるであろうと考えた。私は結核菌並びにその他の抗酸性菌二三につき菌の発育に伴う合成培地成分消費の定量測定により、菌体の新陳代謝の具体的事実を追求し、特に蠟脂質の生成機序に関する側面的実験を行った。

2 実験方法

実験に使用した菌株は人型 F 株・青山 B 株・B.C.G. 株・牛型三輪株・鳥型 A₆₂ 株・「チモテー」株、所謂「スメグマ」株の七株で、培地は Sauton 変法培地(味の素加)を用いた。培養の条件を総て一定するため培地の各成分は化学天秤で正確に秤量し、100cc 三角「コルペン」に 40cc 宛分注して法のごとく滅菌し培養に使用した。培養は渦巻白金耳で約 10mg に相当する各菌量を浮べ 10 日、30 日、50 日培養をしたものを滅菌して、溜水で 40cc とし濾過後さらに吸着をさせて Reichel 濾過管で除菌したものを定量の試料とした。対照は総て培地そのままについて定量測定し対照値とした。

3 実験成績

1) 増菌量及び PH の変化

菌は濾紙で濾別し十分に蒸留水で洗つた後 58°C の恒温器中で 3 日間濾紙上で乾燥して秤量した。PH は 28% 「アンモニア」水を培地 1L に 2.05cc 入れて PH 7.2 に修正した。菌体発育は鳥型及び非病原型に著しく培養 10 日で頂点に近く、人型及び牛型は 30 日以降より増菌し、特に牛型は発育の遅延なことを認めた。各株とも培養 50 日で 70%~90% の増菌量を示した。菌膜は牛型三輪を除く外は乾燥し、色調は「スメグマ」及び「チモテー」の帯朱褐色の外は帯黄色を示した。人型は菌膜に重厚味を帯び、牛型は比較的非薄で顆粒状を呈するものが多く、鳥型及び非病原型では軽い泡沫味を帯びた感があつた。菌膜の沈下は発育完了及び PH とは何等関係を認め得なかつ

た。PH の変化は概ね培養日数に比例して「アルカリ」性に傾く方向を示したが、B.C.G. では培養 50 日目に最初の PH に帰る現象を認めた。培地濾液の色調は人型、牛型では培養日数に比例して濃縮されたが、鳥型、非病原型では帯赤色を呈し特に「スメグマ」に著しかつた。

2) 粗製「ツベルクリン」蛋白の定量

蛋白沈澱剤として「トリクロル」醋酸を用い、試料 10cc に 50% 「トリクロル」醋酸を加えて遠心沈澱し定量した。粗製「ツ」蛋白量及び 50% 「トリクロル」醋酸による沈澱物は増菌に従い出現するが一般に遅れて現れ、人型、牛型、鳥型では培養 30 日以降に著しく非病原型は比較的早期に出現するのを認めた。

3) 「グリセリン」の定量

「グリセリン」の定量は Shukoff 及び Schestakoff の法により、試料 10cc を濃縮脱水後「アセトン」を溶媒として Soxlet 抽出器で約 5 時間抽出し、なお脱水して秤量した。培地 10cc 中の理論値は 747.6mg で対照値は 717.0mg であつた。「グリセリン」は菌体発育に伴い概ね比例して消費された。培養 50 日では人 F はその 71%、青山 B は 55%、B.C.G. は 40%、牛三輪は 27%、A₆₂ は 75%、非病原型は 75% 内外が消費された。すなわち人型、鳥型及び非病原型では高度に消費され、牛型では著しく消費の少ない特徴を表わした。

第 1 表 培地 1 L 中の理論的重量

グリセリン	60cc	CH ₂ OH	
		∴ CH ₂ OH	74.76gr
		CH ₂ OH	
クエン酸	2.0gr	CH ₂ COOH	
		∴ C(OH)COOH, H ₂ O	2.0gr
		CH ₂ , COOH	
味の素	8.0gr	CH ₂ , COOH	
		∴ CH ₂	6.9gr
		CH(NH ₂)COOH	
		Na	1.089gr
第二磷酸カリ	0.5gr	∴ K	0.2gr
		PO ₄	0.2965g
硫酸 マグネシウム	0.5gr	∴ Mg	0.101gr
		SO ₄	0.399gr

クエン酸鉄アンモン 0.05gr 不明
 28%アンモニア水 2.05cc : NH₃ 0.54gr

4) 味の素の定量

「グルタミン」酸の塩酸塩として定量した。試料10ccを除蛋白後濃縮し濃硫酸で処理して「グルタミン」酸の塩酸塩を結晶させ、硝子濾過器上で集め秤量測定した。培地10cc中の理論値は塩酸塩として75.7mgで対照値は71.0mgであつた。味の素の消費は概ね増菌量に比例し、菌体は発育に先立って、大量を消費する傾向があつた。人型及び牛型では50~75%を、鳥型及び非病原型では80%を消費した。

5) 鉄の定量

鉄を第二鉄「イオン」にまで酸化し之に「ロダンアンモン」を加え、「ロダン」鉄の赤色を比色定量した。対照値は0.115±0.017mgで理論値は不明なり。培地中の「クエン」酸鉄「アンモン」の鉄は所謂「スメグマ」を除く外は消費されなかつた。

(附) 培地1L中の成分の理論的重量は第1表のごとし。

6) 抗煮沸性試験

各菌株の「グリセリン」消費と抗煮沸性試験との関係と比較するため占部氏に準じて行つた。50日培養したものを試料とし、法に従い菌液作製後均等に載物硝子に塗つて、「チール」液で染色後沸騰水中に浸漬し鏡検した。各菌株の抗煮沸性試験値は「グリセリン」消費と何等関係を見出し得なかつた。

7) 酸可溶性無機磷の定量

培地中の第二磷酸「カリ」の磷の定量はYoungburg-Youngburgの法によつた。試料10ccに硫酸加Molybden酸塩溶液を添加して、磷—Mo—酸塩を化生させさらに

SnCl₂液を添加して、還元させるとMoO₂の還元物に基因する膠質性の青色が発現する。これを基準磷酸塩溶液と比色して測定した。一般に増菌に比例して消費されるが、牛型に著しく消費の少ないことが確認された。定量成績は第2表のごとし。

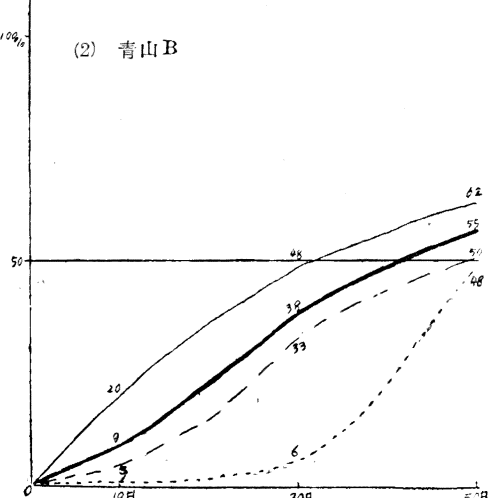
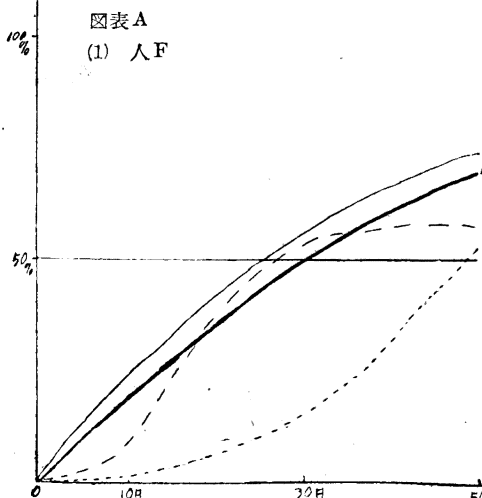
第2表 無機磷の定量

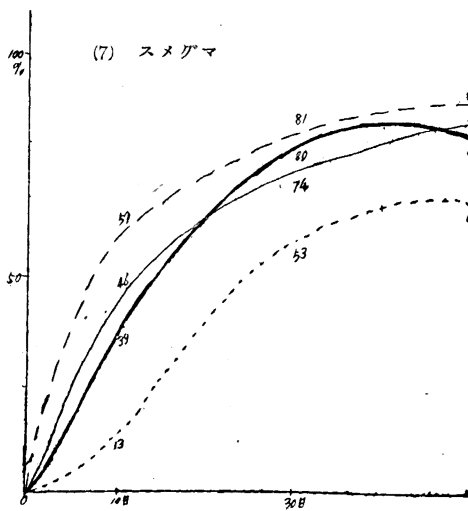
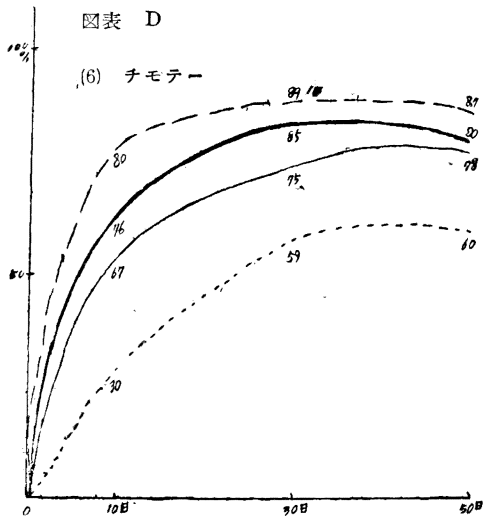
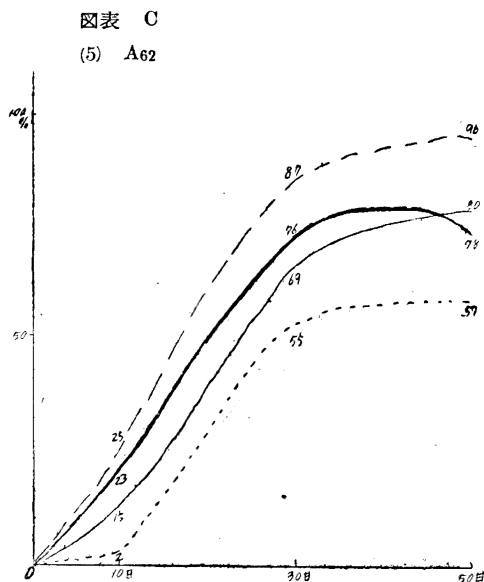
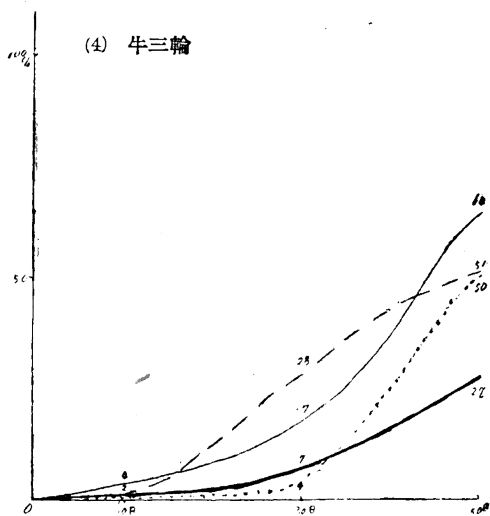
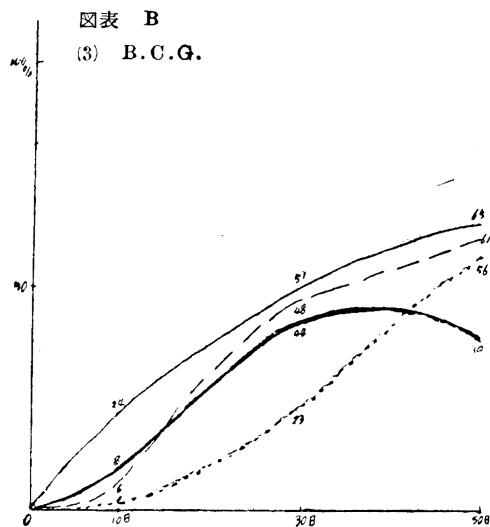
		10日	20日	30日
人	菌量	12mg	286mg	321mg
	磷	8.57mg/dl	3.29mg/dl	2.4mg/de
青山B	菌量	22mg	194mg	283mg
	磷	6.1mg/dl	3.24mg/dl	2.43mg/dl
B・C・G	菌量	14mg	237mg	365mg
	磷	8.02mg/dl	3.84mg/dl	2.97mg/dl
牛三輪	菌量	13mg	98mg	240mg
	磷	8.78mg/dl	6.57mg/dl	6.34mg/dl
チモテ1	菌量	164mg	286mg	385mg
	磷	4.73mg/dl	3.51mg/dl	3.36mg/dl

8) 培地組成の変化による菌体発育の観察

菌体はSauton変法培地に発育した約10mgをそれぞれの培地に移植した。第一群は対照としてSauton変法培地を、第二群は「グリセリン」量を0.5%とし、第三群は「グリセリン」を20%、第四群は第二磷酸「カリ」欠、第五群は「クエン酸鉄アンモン」欠の培地を作製した。培養は40日で第二代の培養に移し、その40日目の状態を比較した。まず第二群は人Fの外は対照に比して少量ながら菌の発育を認め、菌膜は菲薄で時に小片に分散する傾向を見た。第三群は人型牛型ともに発育せず、鳥型に少

培地組成の変化状態 { ———— 増菌量 ———— 味の素消費量
 ツベルクリン蛋白質 ———— グリセリン消費量





量、非病原型では相当量の増殖を認めた。第四群は人型、牛型及び鳥型ともに発育像なく、非病原型に極少量の増菌を認めた。第五群は対照に比し稍々増殖は少ないが總ての菌株に中等度の増菌を認めた。

4 総括並びに考按

以上の実験結果から各種結核菌の発育に伴う主なる培地成分の消費の定量的比較が、培地組成相互の関連性と菌体各個の新陳代謝の状態を若干明らかにし得たと思ふ。

1 各菌株毎の増菌量、「グリセリン」消費量、味の素消費量、粗製「ツベルクリン」量を%で函数曲線で表し比較すると図表 A.B.C.D. のごとくなつた。すなわち一般に各成分の増菌量に比例して消費される。この事實は鉄及び無機磷の定量においても同様のことがいえた。

- a) 人型では味の素及び「グリセリン」消費曲線は増菌曲線を上まわり比較的菌発育早期より多量を消費することを示した。味の素と「グリセリン」消費は増菌量に比例し、粗製「ツ」蛋白量は晩期に出現して比例しない。
- b) 牛型は味の素及び「グリセリン」の消費は概ね菌の

て一方触媒的作用を営みつゝ、他方自らも消費されて生体を構成してゆくことは注目すべき性質であるが、牛型菌において「グリセリン」消費が少ないと共に磷酸の消費も少ないという事実は、結核菌の代謝機構においても同様のことがいわれるということを示唆し興味深い。

第 3 表

(イ) グリセリン消費量
菌 量

	10日	30日	50日
人 F	2.52	1.09	1.75
青山 B	1.65	1.34	1.34
B.C.G.	1.11	1.05	0.77
牛三輪	2.9	0.41	0.59
A62	0.90	1.01	0.95
チモテー	1.07	1.04	0.95
スメグマ	0.79	1.22	0.97

(ロ) 味の素消費量
菌 量 ×100

	10日	30日	50日
人 F	39	11	12
青山 B	40	14	13
B.C.G.	52	12	12
牛三輪	24	9	11
A62	9	9	10
チモテー	9	12	9
スメグマ	9	12	11

(ハ) 味の素消費量
「ツ」蛋白量

	30日	50日
人 F	19.4	5.6
青山 B	22.8	5.1
B.C.G.	12.7	5.8
牛三輪	20.8	5.7
A62	4.5	5.6
チモテー	7.0	7.0
スメグマ	5.3	5.9

4 菌体の「グリセリン」消費量と抗煮沸性試験の結果は関連性を見出し得なかつた。

5 菌体の鉄の消費量測定と鉄欠の培地における発育観察の結果から、鉄は Long u, Sailer が既に述べているごとく発育促進物質であるが、全然消費しない事実から一種の触媒

発育に比例するが、共に「グリセリン」の消費少なく特に牛三輪に著しく B.C.G. は人型との中間型をとつた。粗製「ツ」蛋白は殆んど人型と類似している。

- c) 鳥型は非病原型と殆んど同様の態度をとり「グリセリン」及び味の素の消費は人型より少なく、粗製「ツ」蛋白様物質の出現は比較的早期に現われた。
- 2 単位菌体の「グリセリン」及び味の素消費と粗製「ツ」蛋白量の味の素消費量の比を見ると第3表のごとくなつた。すなわち表中(イ)のごとく「グリセリン」に関しては、人型は培養50日で約 1.5、牛型は 0.6、鳥型及び非病原型は 0.9~1.0 の数値をだした。この事実は Anderson の菌体分析による蠟脂質量と一致しないが人型が他型より大量の蠟脂質を有するであろうことは一致している。つぎに(ロ)の結果のごとく味の素では、発育初期は人型牛型が多量を消費し、中期以後は一致した消費数値をだしている。粗製「ツ」蛋白量と味の素消費量の比は培養50日においては殆んど一致した値をだした。
- 3 各菌体の「グリセリン」消費量と無機磷の消費量を比較すると、牛型が「グリセリン」消費の著しく少ないことと無機磷も同様に消費の少ない事実を発見する。これは従来未だ指摘されなかつたところである。現在使用される「グリセリン」加合成培地においては、結核菌は主として多価「アルコール」である「グリセリン」から高級「アルコール」である蠟脂質を生成するものと考えられる。また磷酸が種々の生物化学的生体内反応におい

的役割をなすものであることを確め得た。

5 結 論

- 1 合成培地の主なる成分は菌体発育に伴い概ね平行して消費された。特に B.C.G. 株が人型と牛型の中間型を示した。
- 2 「グリセリン」及び無機磷の定量より牛型が特に消費少ない事実から、菌体蠟脂質の生成が「グリセリン」及び磷酸と密接な関係の存在することを認めた。
- 3 味の素の消費は菌体発育晩期においては粗製「ツ」蛋白量の出現と比例した。
- 4 抗煮沸性試験の成績は各菌体の「グリセリン」消費量と関係を認め得なかつた。
- 5 培地中の鉄は発育促進物質である外に触媒の役割をなす物質であることを認めた。

文 献

- 1) 貝原・杉山：福岡医学雑誌36巻，昭18。
- 2) Esmond R. Long and Lucy L. Finner: The Ame. Rev. Vol. 16. 1927.
- 3) Sauton: Comp. R Acad. Sci, 155. 1912.
- 4) 戸田：結核菌と B.C.G.
- 5) Long: The chemistry of Tuberculosis, 1923.
- 6) Guilford B. Reed and Christine E. Rice: Journ. of Bact. Vol 16. 1928.
- 7) Pregel: 4 Aufl. 1935.
- 8) 高木・山田：日本医学，第3378号，昭19
- 9) Abderhalden: Hb. Biol. Arb. 1. Chem. Teil 4.s. 137.