

結核菌によるビタミン B₂ の産生

国立療養所 刀根山病院 (院長 渡辺三郎博士)

山村 雄一・渡辺 震

(昭和 27 年 2 月 12 日受付)

(本論文の要旨は第 3 回日本結核病学会近畿地方会ならびにビタミン B 総合研究委員会において発表した)

結核菌の培養液が黄色を呈し、螢光を發し、その菌体や培養液中にビタミン B₂ (VB₂ と略記) の存在していることについてはすでに若干の報告がある。Rohner と Roulet¹⁾ は人型結核菌中には、1.25mg/菌体 100g(乾燥量)、牛型結核菌中には 1.64mg/菌体100g(乾燥量)の割合に VB₂ が存在することをみとめ、そのほか Bouissvain 等²⁾及び Street and Reeves³⁾ 等も同様に結核菌中に VB₂ がふくまれていることをみとめ Meyer and Rodbart 等も恥垢菌について VB₂ が産生せられることをみとめている。種瀬等⁴⁾は鳥型結核菌から二種の乳酸々化酵素の抽出に成功し、そのうちの一種は助酵素部分としてフラビン・アデニン・チマクレオチドをふくんでいることを報告し、また山村及び今津は⁵⁾鳥型結核菌から抽出した脂肪酸脱水素酵素を精製してその助酵素部分としてラクトフラビン磷酸がふくまれることを指摘した。このように結核菌においてはその酵素作用から考えても VB₂ が重要な役割を演じていることが想像せられる。

われわれは数年来結核菌の物質代謝について研究を行つており⁶⁾、その一部として結核菌による VB₂ の産生の問題を検討することとした。

実験方法

試料としては結核菌を適当な液体培地に培養した後、

第 1 表 各種抗酸性菌によるビタミン B₂ の最大産生量

抗 酸 性 菌	培養日数 (37°C)	ビタミン B ₂ 最大産生量	
		γ% (培地)	B ₂ mg(培地) /乾燥菌 100g
鳥 型 結 核 菌 (竹 尾)	10	220	13.0
牛 型 結 核 菌 (三 輪)	59	225	10.8
人 型 結 核 菌	青 山 B	32	150
	上 池	40	225
	高 垣	31	140
	H ₂	41	260
恥 垢 菌	14	240	13.8
チ モ テ 菌	27	240	6.9

註：Kirchner 氏基礎培地。(PH7.0)：無滅菌にて測定。培養温度 37°C：表面培養。

十分に菌が増殖するのを待つて、その菌体を濾別してえた濾液を用いた。この際培養液を加熱滅菌すると VB₂ の著しい破壊が行われるので、原則として滅菌を行わないでそのまま用いた。濾過によつて得られた菌体は十分に蒸溜水を用いて洗滌した後、90°C にて乾燥し、後秤量して乾燥菌量を求めた。

基礎培地としては Kirchner 氏無蛋白培地を用いた。(以下 K 培地と略記す) K 培地は Kirchner 氏培地より血清を除いたものであつて、次の組成から成つている。

グリセリン 40cc, グルタミン酸ソーダ 10g, クエン酸ソーダ 2.5g, KH₂PO₄ 4g, Na₂HPO₄ 3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.6g, を蒸溜水を用いて 1l とする。

VB₂ の定量はルミフラビン法 (藤田氏法)⁷⁾ に従つた。

実験成績

第 1 節 種々の抗酸性菌によるビタミン B₂ の産生

人型・牛型・鳥型結核菌及びその他の抗酸性菌は K 培地において、いずれの菌株を用いても VB₂ の産生量は 200~250γ% を示しており、乾燥菌量 100g あたりの培養液中の VB₂ 産生量は 10~15mg である。その成績は第 1 表に示す如くであつて、結核菌をふくめた抗酸性菌が、窒素源としてグルタミン酸ソーダを、炭素源としてグリセリンのみを用いて VB₂ を産生することは興味深い。以下の実験は比較的取扱いが容易

で、しかも培養日数が短時間で VB₂ の最大産生に達する鳥型結核菌 (竹尾株) を使用することとした。

第 2 節 培地 PH のビタミン B₂ 産生に及ぼす影響

K 培地の種々の PH のものを作製し、鳥型結核菌 (竹尾株) を培養し、日を逐つて第 4, 7, 10, 14 日目に培地中の VB₂ を定

第 2 表 培地 PH の VB₂ 産生に及ぼす影響

培養前	培 養 日 数 (日)							
	4		7		10		14	
PH	PH	B ₂ (%)	PH	B ₂ (%)	PH	B ₂ (%)	PH	B ₂ (%)
6.0	6.3	6.0	8.1	90.0	7.5	217.5	8.3	250.0
6.2	6.7	6.0	8.1	70.0	7.5	215.0	8.2	215.0
6.4	7.2	7.0	8.1	120.0	7.6	240.0	8.4	125.0
6.6	7.4	8.0	8.2	125.0	7.7	240.0	8.9	70.0
6.8	7.7	20.0	8.3	120.0	8.4	235.0	9.3	50.0
7.0	7.7	8.0	8.2	100.0	8.5	225.0	9.3	37.5
7.3	7.7	15.0	8.3	125.5	8.5	230.0	9.2	35.0
7.7	7.9	11.0	8.2	89.5	8.5	235.0	8.9	80.0

最大産生量を増加させる物質を添加するといずれの場合にも単位菌量に対する VB₂ の産生量も大となっている。ペプトンを N 源とすると、5g/dl の割に添加したとき VB₂ 産生量が最大であるが、基礎培地の VB₂ 量と大差がなく、このとき菌の増殖は基礎培地にして旺盛であるから単位菌量に対する VB₂ 産生量はかえつて減少して

量したところ第 2 表の成績を得た。すなわち培地の PH が酸性である程 VB₂ の産生が最大に達するのに日数を要しており、培地 PH がややアルカリ側であると VB₂ の産生は速かに最大に達するが、その後極めて速かに減少する。この際いずれの場合においても培養日数の経過とともに培地 PH はアルカリ側に傾くが、培地 VB₂ の急激な減少は PH の変化のみによつては説明できないのであつて VB₂ の酵素的分解が考えられる。

第 3 節 磷酸塩の影響

K 培地において緩衝液として添加する磷酸塩の濃度を N/2 より漸次低減して N/10 迄添加したところ、第 3 表に示す如く VB₂ の最大産生量は濃度が大となるとかえつて低下しているが緩衝能力は濃度が高いほど強い。

第 4 節 N 源のビタミン B₂ 産生に及ぼす影響

K 培地の N 源として使用しているグルタミン酸ソーダの代りに N 量において当量となる如く、種々のアミノ酸・酸性磷酸アンモニウムを N 源として添加して鳥型結核菌の培養を行った。その結果は第 4 表に示す如くで、アルギニン・アスパラギン・酸性磷酸アンモニウムを N 源とするときは、培地中の VB₂ 産生量はかなり増加し、グリシン、または尿素を N 源とするときは培地 VB₂ 量は増加するが最大産生量に達するのに日数を要する。以上の培地中の VB₂

第 3 表 磷酸塩の VB₂ 産生に及ぼす影響

磷酸緩衝液 (PH 6.4) 終末濃度	終末 PH	B ₂ 産 生 量	
		B ₂ (培地) %	B ₂ (培地) mg / 乾燥菌 100g
N/20	8.5	205	14.1
N/10	8.4	225	14.0
N/5	8.3	240	16.5
N/3	7.9	175	11.6
N/2	7.7	180	18.1

註：PH 6.4 の Kirchner 氏基礎培地の磷酸緩衝液の濃度を上表の如く種々のものを作製し、鳥型結核菌（竹尾株）の培養。37°C、表面培養。培養日数 14 日。

第 4 表 N 源のビタミン B₂ 産生に及ぼす影響

培 地 N 源	終末 PH	培 養 日 数	B ₂ 産 生 量 (最 大 量)	
			培 地 %	培地 B ₂ mg / 乾燥菌 100g
対照(グルタミン酸ソーダ 10g/l)	7.7	10	240	14.7
アスパラギン 7.9g/l	7.0	19	425	29.1
グリシン 4.5g/l	7.5	43	815	29.8
アルギニン 9.5g/l	5.3	17	1100	64.5
(NH ₄) H ₂ PO ₄ 6.8g/l	6.8	19	410	42.7
0.5g/dl	6.5	14	35	4.1
1g/dl	6.7	〃	85	5.6
ペプトン 2g/dl	8.1	〃	185	7.8
5g/dl	8.5	〃	275	9.6
10g/dl	7.3	〃	155	5.5
ペプトン 5g/dl 米糠エキス (2%)	8.5	14	205	7.3
尿 素 1.8g/dl	8.1	38	700	50.7
チラ尿素 2.3g/gl	殆ど菌の發育をみとめず			
炭酸グアニザン 7.0g/dl	發育をみとめず			

註：PH 6.4 の Kirchner 基礎培地のグルタミン酸ソーダの代りに上表の如く種々の N 源を添加。培養温度 37°C。表面培養。鳥型結核菌（竹尾株）：

第 5 表 C 源の VB₂ 産生に及ぼす影響

添 加 C 源	添加量 g/L	終 末 PH	菌 乾 燥 量 (mg/50cc)	培 養 日 数	B ₂ 産 生 量	
					B ₂ (培地) γ%	B ₂ (培地) mg /乾燥菌100g
ブドウ糖	51.7	8.2	460	18	225	15.2
果 糖	46.9	8.4	437	18	85	6.2
焦性ブドウ酸	45.9	9.1	140	7	20	6.6
イノシット	56.3	8.3	340	18	145	12.8
酪 酸	34.4	} 殆んど菌の発育をみとめず				
酒 石 酸	58.7					
リンゴ酸	52.4					
乳 酸	70.1					
コハク酸	46.2					
アセトイン	48.0					

註: Kirehner 氏基礎培地 (PH6.4) よりグリセリンを除いた培地に、上表の如く種々のC源を添加して、鳥型結核菌(竹尾株)の培養。37°C, 表面培養。数値は B₂ の最大産生量を示す。培養液量 50cc。

すると菌の増殖も VB₂ も、ともに低下し、前者の方がより著明である。グリセリンの代りに酪酸・酒石酸・リンゴ酸・乳酸・コハク酸又はアセトインを添加しても殆んど菌の発育をみとめることができなかった。

次にK培地に少量添加してあるクエン酸を除いて、他のC源又は芳香族化合物をC量においてクエン酸と等量となる如く添加して鳥型菌の培養を行うと、第6表に示す成績を得た。すなわち果糖、

いる。米糠エキスを添加しても VB₂ 産生量は増加しない。この点はアセトン・ブタノール醗酵菌と異つている。⁸⁾

チオ尿素や炭酸グアニチンの添加によつては菌の発育を殆どみとめることができない。

第5節 C源のビタミン B₂ 産生に及ぼす影響

K培地の主要なC源として使用しているグリセリンの代りに、他の種々のC源となると考えられる物質を、グリセリンとほぼC量において等量となる如く添加して鳥型菌の増殖と VB₂ 産生に及ぼす影響をしらべると、第5表の如き成績を得た。すなわちブドウ糖を以て代用すると菌の増殖も VB₂ の産生もグリセリンのときと大差をみとめないが、果糖を使用すると菌の増殖度は変わらないが、VB₂ の産生は著しく低下する。焦性ブドウ酸又はイノシットを使用

第 6 表 C 源及び芳香族化合物の VB₂ 産生に及ぼす影響

添 加 C 源	添加量 g/L	終 末 PH	菌 乾 燥 量 (mg/50cc)	培 養 日 数	B ₂ 産 生 量	
					B ₂ (培地) γ%	B ₂ (培地) mg /乾燥菌100g
ブドウ糖	1.70	8.2	610	10	245	13.7
果 糖	1.50	8.3	560	10	135	8.2
イノシット	1.84	7.9	510	10	205	12.4
酪 酸	1.12	8.0	490	10	215	14.6
酒 石 酸	1.90	8.6	420	22	240	14.9
コハク酸	1.50	8.0	510	10	205	14.1
フマール酸	1.48	9.0	625	10	155	8.7
乳 酸	1.53	9.2	440	18	205	15.4
焦性ブドウ酸	1.50	8.4	510	18	205	13.7
アセトイン	0.25	8.0	506	14	150	10.4
	0.5	7.5	425	14	80	6.6
	1.0	7.7	227	9	50	7.9
パラアミノ安息香酸	1.0	7.3	360	17	85	7.3
	0.5	7.7	405	17	125	8.6
	0.1	6.4	330	17	50	4.8
P A S	5.0	6.8	385	17	255	20.3
	1.0	6.7	455	17	230	16.7
	0.5	6.6	375	17	165	14.5
	0.1	6.6	420	17	175	13.3
安息香酸	5.0	8.3	497	17	275	17.2
	1.0	8.0	522	17	240	13.8
	0.5	8.6	505	17	245	14.8
	0.1	8.5	430	17	240	17.0

註: Kirehner 氏基礎培地よりクエン酸を除いた培地に、上表の如くC源又は芳香族化合物を添加。その他の実験条件は、第4表に同じ

第7表 重金属塩の V B₂ 産生に及ぼす影響

Fe 百分率	赤 血 塩		FeCl ₃		Fe ₂ (SO ₄) ₂	
	培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌量(g)	培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌量(g)	培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌量(g)
0.005	325	18.4	190	14.3	150	17.5
0.01	350	19.3	155	13.3	180	19.7
0.05	335	33.6	165	12.6	185	12.8
0.1	370	32.9	100	5.7	—	—
0.2	—	—	—	—	260	15.6
0.3	—	—	—	—	240	12.7

Cu 百分率	CuSO ₄ ·5H ₂ O		Ni 百分率	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		Zn 百分率	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	
	培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌100g		培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌100g		培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌100g
0.001	225	10.2	0.0001	215	16.9	0.0001	145	6.8
0.005	140	11.6	0.0005	210	14.4	0.0005	160	7.8
0.01	200	9.1	0.001	215	13.8	0.001	120	7.0
0.05	125	3.0	0.005	165	14.2	0.005	170	9.8

Co 百分率	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		Mn 百分率	MnCl ₂ ·4H ₂ O	
	培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌100g		培地 B ₂ γ%	培地 B ₂ (mg) /菌100g
0.00001	100	4.1	0.0005	235	15.4
0.00005	105	4.4	0.001	240	14.8
0.0001	110	4.8	0.01	200	13.7
0.0005	205	17.2			

註: Kirchner 氏基礎培地 (P H6.4) に上表の如く, 種々の濃度の重金属塩 (濃度は培地中における重金属の百分率にて示してある。) を添加
鳥型結核菌(竹尾株)の培養。
37°C, 表面培養。数値は培養日数 8~19 日における B₂

の最大産生量を示す

アセトイン, 又はパラアミノ安息香酸を添加した場合には菌の増殖度は不変であるが, V B₂ の産生量は低下し, フマル酸を添加したときも僅かに低下しているが, その他の化合物を添加しても対照と差をみとめなかつた。

第6節 金属塩のビタミン B₂ の産生に及ぼす影響

K培地に第7表に示す如く種々の鉄塩及びその他の重金属塩を添加して V B₂ 産生に及ぼす影響を検すると, 赤血塩は V B₂ 産生を若干促進しており, その他の Fe 塩, Zn, 及び Co の塩は V B₂ 産生を僅かに阻害するが, Cu, Ni, Mn 塩の添加にては殆んど無影響であつた。アセトン・ブタノール醗酵菌の如く鉄イオンによつて影響されないことは興味深い。

考 按

微生物のビタミン B₂ の産生能はその種類によつて著しく異つており, 顕著な産生を行うものから全く合成能を欠いているものまでである。例えば Lacto bacillus manni-topocus, Lacto bacillus lycopersici 等の乳酸菌は全く合成能を欠いており, 生長素として V B₂ を要求する。V B₂ を多少に拘わらず産生するとみとめられている細

菌はかなり多いが, 抗酸性菌の V B₂ 産生量は, V B₂ の工業的生産に使用せられる Clostridium acetobutylicum や Eromothecium Ashbyii について多量にのぼる。従つてこの V B₂ またはフラビン酵素系が抗酸性菌の物質代謝において重要な役割を演じていることが想像せられる。すでに述べた如く, 鳥型菌から抽出せられた乳酸々化酵素の一種や, 脂肪酸脱水素酵素の助酵素部分としてそれぞれフラビン・アデニン・チモクレオチッドやフラビン磷酸を有

することは, このビタミンが菌の呼吸系に重要であることを物語っている。V B₂ を多量に培地中に産生する Clostridium acetobutylicum と抗酸性菌による V B₂ 産生の状況はかなり異つている。山崎⁹⁾によると前者

の V B₂ 産生は鉄によつて著しい阻害をうけることが明らかにせられているが抗酸性菌においてはみとめられない。また前者は米糠エキス, ペプトンによつて V B₂ の産生が促進されるが⁸⁾ 抗酸性菌においては全く影響をうけない。両者の相似している点は, アルギニンやアスパラギンによつても V B₂ 産生が促進せられる点である。これらのアミノ酸は V B₂ のイソアロキサジン核合成に際して, 一種の基質として働くものと想像せられる。然し同様な考えのもとに使用したアセトインはかえつて V B₂ の産生を低下せしめている。

結 論

われわれは結核菌及びその他の抗酸性菌によつて培地中に産生せられる V B₂ 量を測定し, Kirchner 無蛋白培地においては約 200~250% の割に産生せられることをみとめた。さらに鳥型結核菌を用いて V B₂ 産生に及ぼす諸条件を吟味し, アルギニン・尿素・アスパラギン等を添加するとその産生量が増加するが, 培地中の炭素源を変化せしめたり, 種々の金属塩を添加しても著しい影響をうけないことを明らかにした。

終りに終始御指導と御鞭撻を賜つた院長 渡辺三郎教

授ならびに大阪大学理学部 赤堀四郎教授に深謝する。

本研究は文部省科学研究費によつた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Rohner & Roulet: Biochem. Z. 300, 148, 1949.
- 2) Bounissevian, Drea & Schultz; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39, 481, 1938.
- 3) Street & Reeves; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44, 641, 1940.
- 4) 楠瀬・楠瀬・山村: 第4回酵素化学シンポジウム, 於東京, 1951, 「結核」掲載予定
- 5) 山村・今津: 医療, 3(9), 15, 1949.
- 6) 山村: 酵素化学の進歩, 第2輯, 269, 1950.
- 7) 藤田: ビタミン, 2, 254, 1950.
- 8) 片桐: 酵素化学シンポジウム, 第6集, 3, 1951.
- 9) Yamasaki & Yositone, Biochem. Z., 297, 398, 1938; 300, 160, 1939; 307, 431, 1941; 山崎, 農化, 16, 1130, 1940.

新 刊

東京慈恵会医科大学教授
医学博士 片山 良亮著

結核の化学療法

—殊に骨関節結核について—

A 5判 370 頁
上製函入
定価 480 円
〒 実 費

化学療法の発達は種々な疾病の治療に大きな変革を齎したが骨関節結核もまたその例にもれない。最近の治療は化学療法の利用下に結核病巣の治療と共に関節機能の保全にも努力せられる傾向にあつて、これは従来の治療法に対する敷衍であると共に治療上の大変革であると言ひ得る。

本書は骨関節結核の化学療法を述べると共に従来の治療法にも簡単に触れて記述し、また化学療法の施行時或いは実験をするに必要な検査法についてはその総てを網羅している。殊に戦後アメリカ医学の導入による新しい検査法或いは実験法の吸収に大きな努力が払われた。更に記載にあつては本書を見れば実験を実施し得るように懇切を極めていると共に実施中の体験と鮮明な多数の図版とを以て万全を期している。また各事項については夫々文献名を記載して研究の便を図っている。

ここに本社は医学者並びに臨床医家諸氏に貴重な参考資料として本書をお奨めする。

内容目次: 第1章 化学療法剤の発達史とその性状 第1節 Pc の発見 第2節 SM の発見とその性状 第3節 同 PAS 第4節 同 Tb₁ 第5節 虹波 第2章 骨関節結核の病変像と化学療法による影響に関する文献 第1節 血液所見 第2節 寒性膿の所見 第3節 ツ反心 第4節 自律神経機能 第5節 骨関節における結核菌と化学療法 第6節 化学療法による病理組織学的変化 第7節 抗結核剤の投与量と抵抗性 第8節 化学療法剤の運用法 第9節 化学療法剤の副作用 第10節 化学療法剤投与時の血液・膿及び組織内の濃度 第11節 化学療法剤による結核菌の形態的变化 第12節 Pc の投与法 第13節 化学療法剤による骨関節結核治療の総説殊に SM について 第3章 化学療法に必要な臨床的並びに実験検査法の実際 第1節 血液の臨床的検査法 第2節 膿汁の臨床的検査法 第3節 結核菌の証明法 第4章 動物実験による化学療法の検討 第1節 我々の実験法による海狸の人工膝関節結核の所見 第2節 同上人工的混合感染の所見 第3節 同上人工化膿性関節炎 第4節 同上人工膝関節結核に化学療法を施した際の成績 第5章 骨関節結核に対する化学療法の臨床応用 第1節 化学療法の臨床所見 第2節 骨関節結核に対する化学療法の実際

発行所 株式 東西医学社

東京都中央区(京橋局区内)銀座西7の1
電話銀座(57)2126~2129番 振替口座東京2818番