

# 鳥型結核菌の適応の一特異型式について

国立療養所春霞園（院長 工藤 敏夫博士）

部 勇

（昭和 28 年 3 月 13 日受付）

（本論文の要旨は第 6 回日本結核病学会近畿地方学会において発表した。）

## 第 1 章 緒 言

鳥型結核菌浮游液を用いる実験において種々の適応型式のある事は、山村等<sup>1),5)</sup>によつて報告せられている。そのうち須田<sup>2)</sup>, Stanier<sup>3)</sup>等によつて発表せられた「逐次適応」の現象は鳥型菌（竹尾株）においても証明することができた<sup>1)</sup>。すなわち代謝上位の物質 A に適応させると、代謝下位の物質 B, C, D, …… に適応している、この方法を用いて代謝経路を追跡することができ、山村はこの方法により安息香酸がブレンツカテキンを経て分解せられることを明らかにしている。

この外、山村等は化学構造が類似するものの中に、抗原抗体反応における交叉又は類属反応に類似した「類属化学適応」と言う現象のあることを明らかにした<sup>1)</sup>。すなわち、A（例えば安息香酸）に適応した菌は、A と化学構造が相似の A'（例えばアミノ安息香酸）にも若干適応しており、未処理菌に比して A' を速かに代謝することができるが、A' 適応菌に比すると適応が完全でなく代謝速度が遅い。

而して上の二つは、いずれの基質（A, B, C, D, …… A'）も菌によつて代謝をうける場合である。しかるに私は、マンデル酸に接触せしめた菌がマンデル酸を全く代謝することができないにも拘らず、安息香酸とその代謝下位のブレンツカテキンに完全に適応していることを認め、特異な適応型式と思われるので報告する。

## 第 2 章 実験方法

### 第 1 節 結核菌浮游液の調製

鳥型結核菌（竹尾株）の 4% グリセリン・肉汁寒天培地に培養したものを、白金耳を用いて無菌的に採取し生理的食塩水に浮游せしめ、通常 5 回遠心沈澱、洗滌を繰り返して、最後にメノウの乳鉢で 20 分間充分に磨砕し、再び生理的食塩水に均等に浮游せしめたものを用いた。浮游液中の菌量は各実験毎に可及的同一とするようにし、1cc 中約 10mg の乾燥菌量を含むようにした。一般に酵素作用最大である培養第 4~6 日目の菌を使用した。

### 第 2 節 適応菌の調製

未処置の菌浮游液は一定の誘導期の後に安息香酸を酸化するが、これを「普通菌」と呼ぶこととし、一定時間

安息香酸と共存せしめた菌は誘導期を認めないで直ちに安息香酸を酸化することができ、これを「適応菌」と呼ぶこととする。さらに本論文においては、後者の如く菌と基質を一定時間共存せしめる処置を行つた菌を便宜上すべて「適応菌」と呼ぶこととする。従つてマンデル酸適応菌の場合の如くマンデル酸を代謝することができない場合でも、以下の如き一定の処置を行つた場合は「マンデル酸適応菌」と呼ぶこととする。

適応菌の調製は次の如く行う。すなわち鳥型結核菌の浮游液 10 部、燐酸緩衝液（N/10, PH 7.5）4 部、M/10 基質液 1 部を温度 37.5°C で激しく振盪せしめた後、遠心沈澱して菌を集め上清を捨て再び生理的食塩水に浮游せしめ、さらに数回遠心沈澱と洗滌を繰り返したる後、最後に生理的食塩水に浮游せしめたものを「適応菌」浮游液とする。

### 第 3 節 結核菌浮游液による基質の酸化の測定法

#### 第 1 項 ワールブルグ氏検圧法による測定法

菌浮游液を基質に作用せしめた時の酸素吸収量をワールブルグ氏検圧法により測定した。

すなわち容器主室に菌浮游液 1.0cc、燐酸緩衝液（PH 7.5, N/10）0.4cc を入れ、側室に基質液 0.1cc（通常、基質濃度 0.1cc 中 10 $\mu$ M とし、一定時間後主室と混和する）、中央小室に 20% 苛性加里液 0.2cc を入れ、容器中の液総量 2.4cc となるように残余は蒸留水を加えた。温度は凡て 37.5°C で容器内容は空気を以てみたした。

#### 第 2 項 ベックマンのスペクトロフォトメーターによる測定法

ベックマンのスペクトロフォトメーター DU 型を用いて波長 220~300m $\mu$  の紫外部において透光率を測定して基質の吸収スペクトルの変化を観察した。試料は、反応液に硫酸を添加して反応を停止せしめ、遠心沈澱によつて上清をとり中和後、添加基質量が M/10,000 となる如く稀釈したのを用い、10mm の直径の容器中にて測定した。

## 第 3 章 実験成績

### 第 1 節 適応菌による安息香酸の酸化

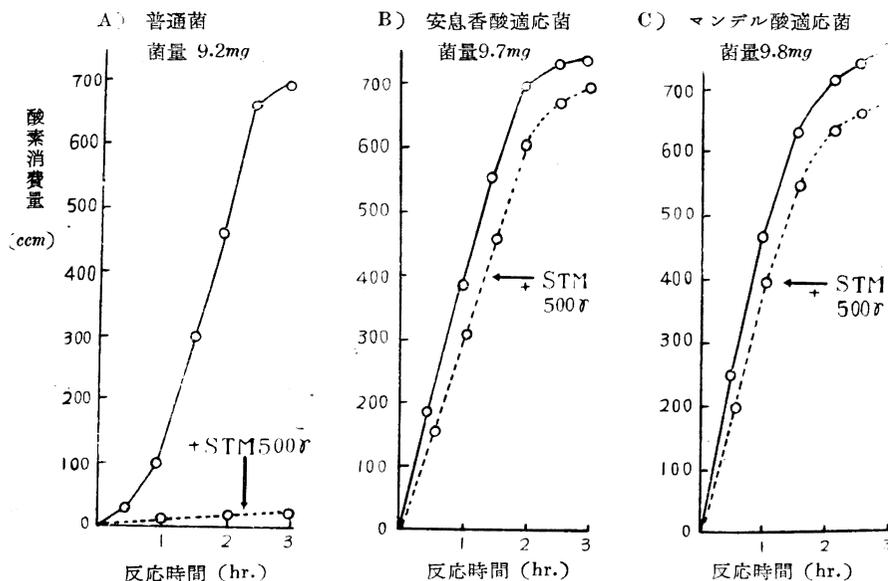
前述の如く調製した安息香酸適応菌・マンデル酸適応

### 第1図 安息香酸の酸化とストレプトマイシン (STM) の影響

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン寒天培養第3日目の菌浮游液

基質はいずれも安息香酸  $10\mu\text{M}$ 。菌量は菌浮游液 1.0cc 中の乾燥菌量 (mg)。測定温度  $37.5^\circ\text{C}$

測定は Warburg 検圧計を用いて酸素吸収の増加を測定し、対照の酸素消費量を差引いてある

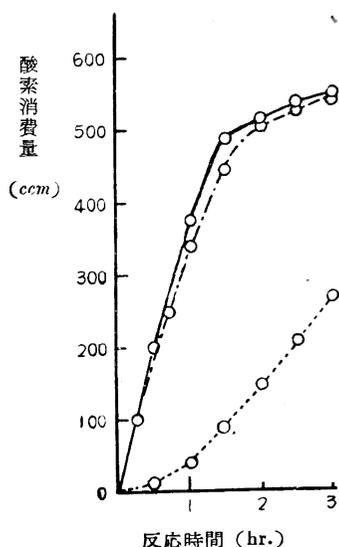


### 第2図 プレンツカテキンの酸化

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン寒天培養第3日目の菌浮游液。基質はいずれもプレントカテキン  $10\mu\text{M}$

○—○ 安息香酸適応菌 (菌量  $10.4\text{mg}/\text{cc}$ )  
 ○- - ○ マンデル酸適応菌 (菌量  $10.2\text{mg}/\text{cc}$ )  
 ○.....○ 普通菌 (菌量  $10.1\text{mg}/\text{cc}$ )

その他の実験法は第1図に同じ



菌・対照の普通菌を用い、基質を安息香酸ソーダーとしてワールブルグ氏検圧計により酸素吸収量を測定すると第1図及び第2図に示す通りである。すなわち普通菌は一定の誘導期(30分~60分)を以て安息香酸とプレントカテキンを酸化するが、マンデル酸適応菌は安息香酸適応菌と同様に全く誘導期を要しないで安息香酸を酸化することができ、又その代謝下位のプレントカテキンも同様に誘導期なしに酸化することができる(第2図)。

### 第2節 適応菌によるマンデル酸の酸化

第1節と同様に安息香酸適応菌・マンデル酸適応菌・普通菌を用いてマンデル酸を基質とした場合には酸素吸収の増加は全く認められない。すなわちマンデル酸は安息香酸適応菌・マンデル酸適応菌・普通菌のいずれによつても酸化を受けない。

### 第3節 適応菌による基質の酸化に及ぼすストレプトマイシンの影響

第1節の実験において、同時にストレプトマイシン(STM)を添加して基質の酸化に及ぼすSTMの影響を観察すると、第1図に示す如くSTM 500r添加により普通菌においては著しい阻害を受けるに拘らず、マンデル酸適応菌においては、いずれも著しい阻害を受けないことを認めた。すでに山村は普通菌による安息香酸の酸化はSTMによつて阻害せられるが、安息香酸適応菌による安息香酸の酸化はSTMによつて阻害をうけず、STMは菌が安息香酸に適応することを阻害すると述べている<sup>4)</sup>。上述の成績から、マンデル酸適応菌による安息香酸の酸化もSTMによつて全く阻害せられず、安息香酸適応菌と同様な態度を示すことを認めた。

### 第4節 適応菌の基質の酸化に及ぼす培地の影響

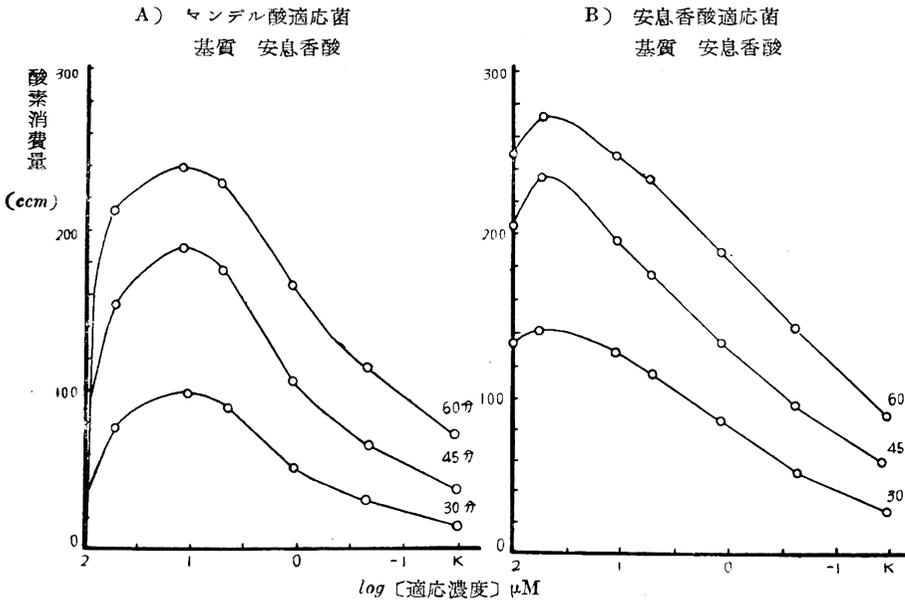
前節迄の実験成績が培地の変化により如何なる影響を

第3図 適応に用いる安息香酸とマンデル酸の量的関係

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン寒天培養第4日目  
 使用乾燥菌量は下表の如くである。数字の単位は mg/cc

適応濃度 $\mu\text{M}/1.5\text{cc}$	100	50	10	5	1	0.2	K	
$\log$ 〔適応濃度〕 $\mu\text{M}$	2	1.7	1.0	0.7	0	-0.7		
乾燥菌量	マンデル酸適応	11.1	10.5	9.8	10.2	10.8	11.0	10.0
	安息香酸適応	10.8	11.2	9.1	8.7	8.8	8.8	8.9

但し K は対照の普通菌



受けるかを検討する為に、グリセリン寒天、グリセリン・ブイオン、キルヒナー氏無蛋白培地より得たる菌につき同様の方法によりそれぞれ比較実験を行つたが第1図と同様な曲線を描き、これ等の培地の変化によつては差を認めない。

第5節 チモテー菌における適応菌の基質の酸化

以上の実験が菌型の変化により如何なる成績を示すかを検討する為に、鳥型結核菌の代わりにチモテー菌を使用したが、両者の間に何等差を認めなかつた。

第6節 適応に用いる安息香酸及びマンデル酸の量的関係

以上の如く、マンデル酸適応菌は安息香酸適応菌と同様に、安息香酸及びその代謝下位にあるプレツカテキンに適応しているが、適応に用いるマンデル酸と安息香酸の量的関係がどのようであるかを検討する為に次の実験を行つた。すなわち菌浮遊液 1.0cc に対して、安息香酸及びマンデル酸 100, 50, 10, 5, 1, 0.2 $\mu\text{M}$  をそれぞれ 0.1cc の蒸溜水に溶解したものを添加し、磷酸緩衝液 0.4cc を加えて総量 1.5cc とし、型の如く適応せしめ、これ等の適応菌による安息香酸の酸化について比較観察

した。

第3図は各適応濃度の対数を横軸に、酸素吸収量を縦軸にとり、その適応濃度と反応初速度(反応開始後30分、45分、60分の酸素吸収増加量)との関係を示したものであるが、これによると、マンデル酸適応の場合は約 10 $\mu\text{M}$  に、安息香酸適応の場合は 50 $\mu\text{M}$  附近に適応の至適濃度があり、マンデル酸適応の方が安息香酸適応の場合よりも却つて稀薄の至適濃度を有している。しかし 100 $\mu\text{M}/1.5\text{cc}$  においては、マンデル酸適応菌では安息香酸適応菌に比して反応初速度は著

しく低下している。

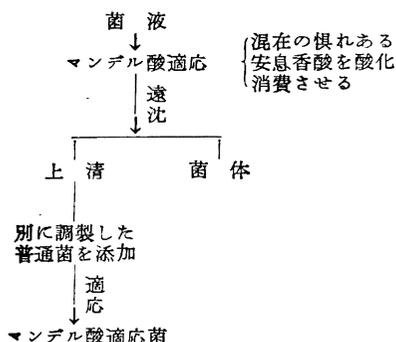
第7節 適応に用いるマンデル酸の検討

以上の実験においては再結晶して得たるマンデル酸を使用したのであるが、あるいはこのマンデル酸の中に僅かに安息香酸が混在して、その安息香酸に菌が処置の間に適応して、前述の如く安息香酸適応菌の場合と同様の成績を得たのではないかと言う惧れがあり、これを検討する為に次の実験を行つた。すなわち、第4図Aの如く、菌を適応せしむる場合と同様に型の如くマンデル酸と菌浮遊液とを3時間振盪して、その操作中に、僅かに混在の惧れのある安息香酸を酸化消費せしめ、かくして得たる菌浮遊液を遠心沈澱(10,000 r/m, 30分)して上清を得る。この上清をもはや安息香酸を含まぬマンデル酸液と見做して、これに別に新しく調製した菌液を適応せしめる。かくして得たる菌をマンデル酸適応菌とし、安息香酸を基質としてその酸素吸収量を測定したが、前述の成績と何等異なる点を認めず、かくして得たるマンデル酸適応菌は第4図Bの如く、安息香酸適応菌と同様に誘導期なしに直ちに安息香酸を酸化し、STMによつては著しい阻害を受けない。すなわち前節までの実験成績

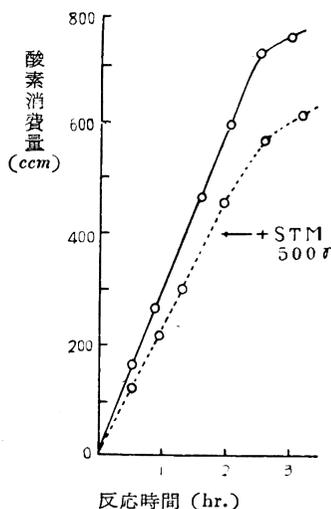
第4図 マンデル酸の検討

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン・フイヨン培養第4日目の菌浮游液  
 Bにおける乾燥菌量 9.2mg/cc  
 基質は安息香酸 10 $\mu$ M  
 その他の実験法は第1図に同じ

A)



B) Aのマンデル酸適応菌による安息香酸の酸化

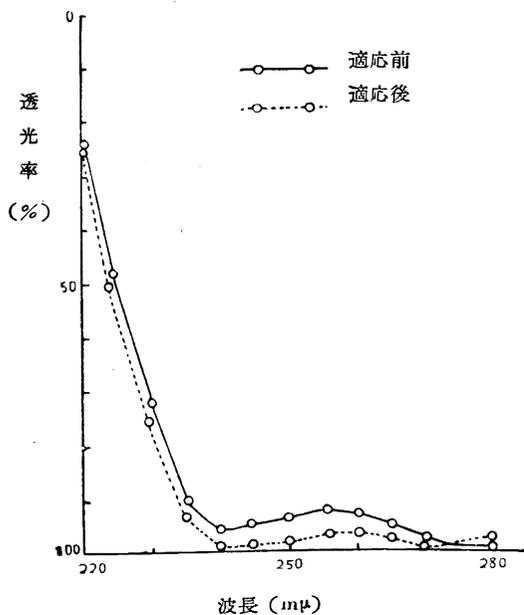


は、マンデル酸中に安息香酸が混在した為によるものではないと言うことを確かめることができた。

第8節 吸収スペクトルによる基質の変化の観察

以上は適応菌による酸素の消費量を観察したのであるが、次にベックマンのスペクトロフォトメーターDU型を用い、紫外部の吸収スペクトルを測定して基質の変化を追跡した。

第5図 マンデル酸の吸収スペクトル



第1項 マンデル酸の吸収スペクトル

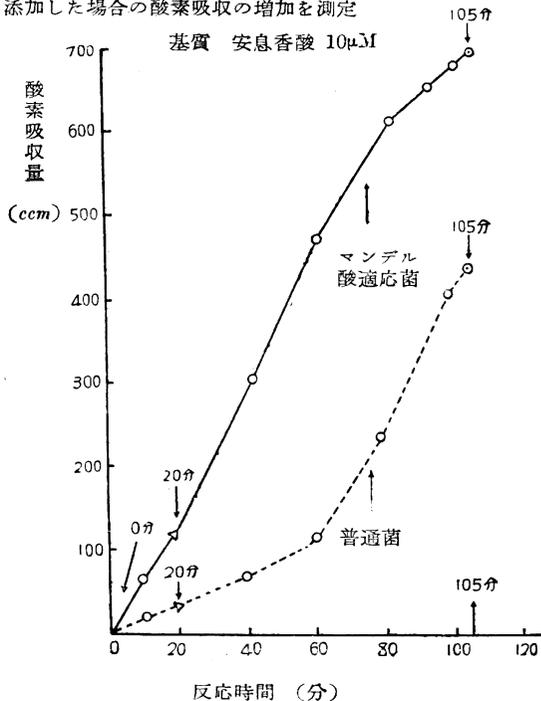
安息香酸適応菌・マンデル酸適応菌及び普通菌を用いて、マンデル酸を基質とした場合のマンデル酸の吸収スペクトルを時間的に追跡すると第5図に示す如く何等の変化を認めず、マンデル酸自身はこれらの菌液のいずれによつても代謝を受けないことを認めた。

第2項 安息香酸の吸収スペクトル

安息香酸適応菌・マンデル酸適応菌及び普通菌による安息香酸の酸化において第6図の如くまず酸素吸収を測定して、反応開始後0分、20分、105分で適応菌と普通菌との間に著しい差のあることを確かめた後、硫酸を添加して反

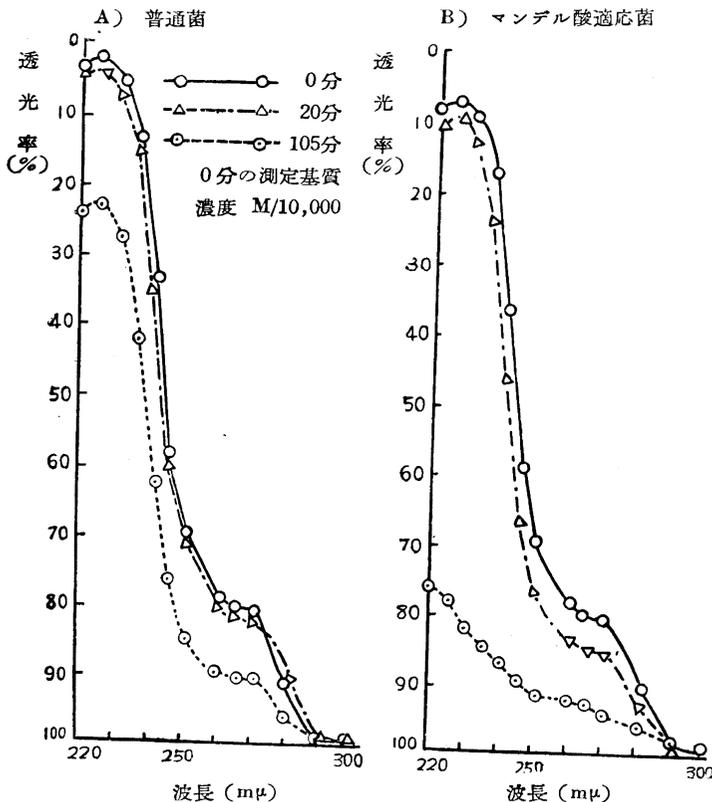
第6図 安息香酸の酸化

鳥型結核菌(竹尾株)のグリセリン寒天培養第4日目乾燥菌量 普通菌 29.3mg/cc マンデル酸適応菌 31.4mg/cc  
 酸素吸収は Warburg 検圧計によつて、安息香酸 10 $\mu$ M を添加した場合の酸素吸収の増加を測定



第7図 安息香酸の吸収スペクトル

安息香酸の吸収スペクトルは Beckmans' Spectrophotometer DU型を用いて、波長 220~300m $\mu$ の紫外部において透光率を測定した。一定時間後に硫酸を用いて反応を停止せしめ、遠沈によつて上清をとり中和後、添加安息香酸量が M/10,000 となる如く稀釈して、10mmの直径の容器中にて吸収スペクトルを測定した。



応を停止せしめ、上清について安息香酸の吸収スペクトルを追跡すると第7図に示す如く適応菌と普通菌の場合における吸収スペクトルの変化は著しい差異を示し、普通菌の場合に比し適応菌の場合は速かに安息香酸の特異的吸収スペクトルが消失する。すなわち 20 分では普通菌では殆んど変化なく、適応菌では若干分解せられ、105 分では著しい透光率の差を示し、適応菌の場合は普通菌よりも安息香酸の分解の度が大なることを認める。しかしてその分解速度はマンデル酸適応菌の場合と安息香酸適応菌の場合と殆んど差を認めない<sup>5)</sup>。

#### 考 按

最近 Stanier はマンデル酸添加培地に培養した *Pseudomonas fluorescens* の一菌株からの抽出液が D-又は L-マンデル酸を酸化して安息香酸とすることを報告している<sup>6)</sup>。私の使用した鳥型菌(竹尾株)は上述の如くマンデル酸を酸化することができず、又ベックマンのスペクトロフォトメーターによる吸収帯の変化から考えてもマンデル酸は代謝をうけるとは思われぬ。

従つて Stanier の使用した菌とは性状を異にしていると考えられる。

最近 Monod 等は大腸菌の一菌株が、代謝されない melibiose と接触せしめられることによつて  $\beta$ -galactosidase を産生してくることを報告しており、私の観察した現象と相似している。

上述の如く、代謝を受けない物質 X と共存させることによつて、或代謝物質 A に適応して来るということは、「逐次適応」によつて代謝経路を追跡するとき、その成績を誤らせる惧れがあるから注意を要する。

#### 総括及び結論

1) マンデル酸自身は、普通菌・適応菌のいずれによつても酸化せられないが、マンデル酸適応菌は安息香酸及びブレンツカテキンに適応しており、全く誘導期を要しないで、これらの基質を酸化することができる。

2) マンデル酸適応菌による安息香酸及びブレンツカテキンの酸化は  $\beta$  T M によつて著明な阻害を受けない。

3) マンデル酸適応の方が、安息香酸適応の場合よりも稀薄の至適濃度を有する。

4) ベックマンのスペクトロフォトメーターにより紫外部において基質の変化を追求すると、マンデル酸は適応前も適応後も分解を認めず、適応菌に

おいては安息香酸の速かな分解が見られ、且つマンデル酸適応菌と安息香酸適応菌との間に基質分解速度の差を認めない。

5) 以上の現象は、グリセリン寒天、グリセリン・P イオン、キルヒナー氏無蛋白培地等の異なる培地に培養して得たる鳥型菌において同様に観察することができ、又チモテー菌においても同様の成績を得た。

終りにのぞみ、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた渡辺三郎教授並びに山村雄一助教授に深甚の謝意を捧げる。また常に種々の御指導と御鞭撻を賜つた恩師春霞園院長工藤敏夫博士に衷心より感謝する。

#### 文 献

- 1) 山村：第2回酵素化学シンポジウム，昭 24，酵素化学シンポジウム，第5輯，60頁。
- 2) 須田：第1回酵素化学シンポジウム，昭 23。
- 3) Stanier：J. Bact. 55, 477, 1948.
- 4) 山村・笹川・安立：医療，第3巻，第8号，17。

昭 24.

Congrès International de Biochimie, Paris

5) 山村：第 27 回日本結核病学会総会特別講演。

1952.

結核 27：450, 昭 27.

7) Monod &amp; Cohn: Ado. Enzymology 13, 67,

6) Stanier: Symp. Métabolisme Microbien, II e

1952.

東京通信 佐々貫之 東大教授 詫摩武人 東京警察 塩沢総一  
 病院 院長 坂本秀夫 東大教授 美甘義夫 病院 院長 福田保 共  
 東大助教授 順天堂 佐藤要 東京都 長岐佐武郎 東大助教授 江藤秀夫 著  
 医大教授 立東 宮本忍 東京第一 小山善之 東大講師 村上元孝  
 養所外科 院内科 院内科 院内科

## 近刊 新 しい 治療 第3集 A5判約500頁 印刷中

新しい治療第2集刊行後約半歳，その間各方面から続刊のおすめを享けて，ここに第3集の上梓も目睫に逼つたのは洵に光榮とするところである。

本書は前2集と同じく，刻々に，激しく進歩する治療界において，しかも今まで実施してきた治療法の中には根本的に改革せねばならぬもの多々あるに鑑み，従来の治療法中の真に優れたものを考慮しつつ，新たに開拓された今日の治療法，特に臨床医家に重要なものを可及的速かに紹介することを編集目的にしたものである。各人はこれを自家薬籠中に収めることにより，治療成果を躍躍的に向上することができると思ふ。

### 本 書 内 容

- |                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| 第1章 (佐々) アイロタインシンの臨床的応用      | 第11章 (坂本) 脳下垂体埋没療法について |
| 第2章 (美甘) 血漿療法                | 第12章 (長岐) 細菌性赤痢の最新治療   |
| 第3章 (美甘) ビタミン                | 第13章 (長岐) アメーバ赤痢の化学療法  |
| 第4章 (美甘) ストレプトキナーゼ，<br>ドルナーゼ | 第14章 (宮本) 肺切除術         |
| 第5章 (福田) 輸血                  | 第15章 (塩沢) ネフローゼの治療     |
| 第6章 (佐藤) ルチン療法               | 第16章 (塩沢) 狭心症の新治療      |
| 第7章 (村上) 強心剤と利尿剤             | 第17章 (村上) 心筋梗塞の治療      |
| 第8章 (坂本) 頭痛の新しい知識と治療法        | 第18章 (小山) 悪性腫脹の化学的療法   |
| 第9章 (詫摩) ACTH と Cortisone 療法 | 第19章 (坂本) カリウム欠乏症とその治療 |
| 第10章 (坂本) 細菌性発熱物質と臨床的応用      | 第20章 (江藤) 電子顕微鏡        |

佐々貫之 詫摩武人 塩沢総一 坂本秀夫 共著

改訂第3版 新 しい 治療 第1集 A5判350頁  
定価 450円 送料実費

佐々貫之 詫摩武人 塩沢総一 坂本秀夫 美甘義夫 共著  
 長岐佐武郎 島本多喜雄 中島喜久 佐々学

増補第2版 新 しい 治療 第2集 A5判450頁  
定価 550円 送料実費

発行所 株式会社 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