

抗酸性菌の試験管内病原性試験に関する研究

第3報 Sauton 培地培養液の示す酸化還元電位と色素反応の関係

松 尾 仁

鳥取大学医学部細菌学教室 (主任 高木篤教授)

受付 昭和32年7月1日

緒 言

細菌の示す酸化還元電位 (ORP) は細菌菌株によつておのおの異なることについては幾多の業績がある。そのうちに、抗酸性菌の毒力に関する研究の1つとして酵素系、ないしはORPの面から毒力株と無毒株を区別しようとする試みがあり、メチレン青の還元力、還元時間の測定、ORPの測定等による結果が報告されている。

さきに Aksianzew¹⁾ は結核菌浮游液のORPの時間曲線を測定し、無毒株と有毒株の間には、無毒株の曲線下降が有毒株のそれよりも緩やかであることその他特に差は認められず、測定した電位は+380mVから+5mVの間にあつたと述べている。辻岡²⁾ は抗酸性菌の発育に伴う培地のORPを Sauton 培地につき目を追つて測定し、そのORP曲線に酸化傾向を示すものと還元傾向を示すものとが区別され、そのおのおのにカーブの急なものと緩かなものがあるが、要するに菌株の毒力とORPの間に多少関係あるものようであるが、それによつて抗酸性菌の完全な分類を行うことは不可能であると述べている。また内田³⁾ は人型菌、牛型菌、鳥型菌各1株ずつにつき、磷酸塩緩衝液中に菌を浮遊し、ORP曲線を作りその下降速度が人型菌、牛型菌、鳥型菌の順に速いが、単に下降速度が異なるのみで下降曲線から結核菌の分類はできないと述べている。

さて Wilson⁴⁾ は色素による抗酸性菌の試験管内病原性試験の1つとして Phenol indophenol 他3種の酸化還元色素によるいわゆる Wilson の反応を発表したが、この反応は抗酸性菌の酸化還元酵素系に由来するものとされており、事実 Wilson⁴⁾ は、抗酸性菌の示すORPが菌株によつて異なることを、無血清の Youman⁵⁾ による Proskauer & Beck⁶⁾ の変法培地に培養したさいの培養液のORPを測定することによつて明らかに抗酸性菌は人型および牛型菌の毒力株、減毒株、鳥型菌、非病原性抗酸性菌の4群に大別できるところのそれぞれ異なつたORP曲線を示し、ほぼ $-0.2V$ の E'_{10} をもつた酸化還元色素を緩衝液中にて抗酸性菌に接触せしめると、毒力株によつて脱色されず、無毒株によつて脱色されるであろうと予測して実験を行つた。かくてこれらの色素は大體毒力株によつては全く脱色されないか、わずかに

1, 2の色素が脱色されるに留るが、非病原性抗酸性菌および鳥型結核菌によつては脱色され、減毒株は脱色するものもしないものもあるという結果を得、抗酸性菌の *in vitro* の毒力試験として有意義であることを発表したのである。しかしてこの反応の追試が種々試みられ⁷⁾⁻⁸⁾ 大體において動物実験を除外しえないが、毒力判定のための有意な方法であると報告されている。著者も第1報⁹⁾、第2報¹⁰⁾において Dubos¹¹⁾、Desbordes¹²⁾ の反応と平行して Wilson の反応を行い、動物実験との関係を追求し、また実験条件によるこれらの反応の差等についての結果を報告した。一方松原¹³⁾⁻¹⁴⁾ は Wilson の反応と抗酸性菌の示すORPの関係を見るために固型培地発育の菌を血清を加えない Kirchner 液に浮遊させてORPを測定し、また血清を加えない Kirchner 培地に培養し、その培養液のORPを測定し、抗酸性菌のORPと Wilson の反応との間に関連性があり、また菌のカタラーゼ含有量、活性度と平行関係ありと報告している。

本報告において著者は第1報、第2報において実験に用いた教室保存の抗酸性菌について、これらの菌を Sauton 培地に菌膜発育せしめ、呈色反応、ことに Wilson の反応との関連性を調べる目的でその培養液のORPを測定した結果について述べる。というのは、著者の行つた Wilson の反応における結果では、Wilson の反応において非病原性抗酸性菌はやや不規則な成績が得られており、また Wilson⁴⁾ が抗酸性菌のORPを測定したのは無血清の Proskauer & Beck の Youman⁵⁾ による変法培地に培養したものであり、松原の実験でも固型培地の菌を緩衝液に浮遊せしめたもの、あるいは無血清の Kirchner 培地培養液についての測定であり、無血清の液体培地に抗酸性菌を培養した著者の経験では、非病原性抗酸性菌、鳥型結核菌はかなり発育を見るが、人型、牛型結核菌は同一培養日数では充分な発育を認められないので、これらを比較することはかなり無理があるものと思つた。そこで著者は、Sauton 培地に菌膜発育せしめ、その培養液の apparent ORPを測定し、Wilson の反応との関係、非病原性抗酸性菌が示した Wilson の反応における菌株による差の間にも関連性が認められはしないかという考えのもとに実験を行つた。

実験材料ならびに実験方法

1) 使用菌株: 人型結核菌4株, 牛型結核菌10株, BCG 1株, 鳥型結核菌10株, 非病原性抗酸性菌17株でいづれも教室保存株である。これらの菌株の Petraghani 培地 1 ヶ月培養の菌塊はほぼ5mgを, 直径2cm, 深さ18cmの太めの試験管に Sauton 培地を正確に 15cc ずつ分注しコルクの小片を浮かせたものの上に載せ, 37°Cの孵卵器中で正確に28日間培養した。菌膜発育した菌体の混入しないよう注意しつつ培地全体を均一になるように静かにピベットで混和し, その5cc ずつを径18mm, 深さ45mmのガラスカップにとり, ORPの測定に供した。

また対照としては, 培養に用いた Sauton 培地で菌を接種しないものを同様な方法で ORP を測定した。

2) ORP測定法

i) 電位差計: 島津K2型電位差計

ii) 検流計: 島津L型, 感度 1.4×10^{-8} A 77×10^{-6} V

iii) 電池構成: 飽和甘汞電極を基準として測定した。すなわち被検液(抗酸性菌 Sauton 培地培養液)に白金極を浸し, 飽和寒天橋をもつて対極飽和甘汞電極と液絡した。

しかして著者の実験は絶対的なORPを意味するのではなく, 各菌株によるORPの差を比較するのが目的であるため空気の遮断等取敢て行わず, 飽和甘汞電極に対する被検液の apparent のORPを測定したことになる。

読み取りは白金電極を被検液に浸した直後から10分おきに行い, 一応終末点は100分とした。これはORP曲線で特に急な傾斜を示す1, 2の例外を除き, 大部分の例が測定開始後50~60分位のところでほぼ安定し一定の値に近づき, あまり変動が認められなかつたためである。

実験成績

測定時間を横に, 電位を縦にとつて電位時間曲線を作つて見るならば, 図1~図5の如くなる。またORP測定開始直後および測定終末値を, Dubos, Desbordes, Wilson の各色反応その他と比較して見るならば, 表の如くである。人型菌, 牛型菌, 鳥型菌, 非病原性抗酸性菌とも, 各菌株によりかなりまちまちの曲線を描いているが, ほとんどの例が測定開始後最初は急な傾斜を示し, 時間が進むと共になだらかになり, 50~60分ごろから水平に近くなり, 90~100分値あたりではそれぞれほぼ個有の一定値に終るように思われる。

なお菌発育程度と, その培養液の示すORPとの関係を見ると, 発育程度良と判定したものと, それよりも発育の度合低く, やや良と判定したものとに, はつきりした差異がなく, 発育良好で陽電位をとるもの, 陰電位をとるもの両者があり, やや良としたものにも陽電位, 陰電位両方が見られるので発育程度が電位を決定している

表1 ORPと色素反応の関係

対照	菌株	発育程度	集落型	Dubosの反応	Desbordesの反応	Wilsonの反応			ORP(V)	
						A	B	C	開始時値	最終値
人型菌	ソートン1	/	/	/	/	/	/	/	+0.074	+0.071
	ソートン2	/	/	/	/	/	/	/	+0.065	+0.065
	人 F	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.021	+0.110
	松本	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.177	+0.130
	青山B	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.069	+0.078
	H37Rv	良	R	+	+	+	+	+	+0.086	+0.071
牛型菌	BCG	稍良	R	+	+	+	+	+	-0.080	-0.122
	牛 1	良	R	+	+	+	+	+	+0.026	-0.037
	牛 2	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.073	+0.032
	牛 3	稍良	R	-	-	+	+	+	+0.051	+0.076
	牛 10	良	R	+	+	+	+	+	+0.068	+0.069
	牛 261	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.054	+0.084
	R-14	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.025	+0.021
	RM	稍良	R	+	+	+	+	+	-0.031	+0.042
	MD	良	R	-	-	+	+	+	-0.181	-0.247
	三輪	良	R	+	+	+	+	+	-0.118	-0.070
	仙台	稍良	R	+	+	+	+	+	-0.019	+0.070
鳥型菌	獣鳥	良	S	+	+	+	+	+	-0.025	-0.018
	A62	良	S	+	+	+	+	+	-0.104	-0.185
	A71	良	S	-	-	-	-	-	-0.085	-0.080
	A3171	良	S	-	-	-	-	-	-0.283	-0.139
	A4121	良	S	-	-	+	-	-	-0.016	-0.071
	TB13	良	R	-	-	-	-	-	-0.131	-0.256
	竹尾	良	R	-	-	-	-	-	-0.113	-0.202
	鳥京	良	R	-	-	+	-	+	-0.192	-0.264
	獣疫	良	S	-	-	-	-	+	-0.076	-0.162
	獣調	良	R	-	-	+	-	+	-0.194	-0.219
非病原性抗酸性菌	木戸黄	稍良	R	-	-	+	+	+	-0.028	-0.015
	木村II	良	R	-	-	+	+	+	-0.571	-0.562
	920(1)	良	S	+	+	-	-	-	-0.068	-0.085
	920(2)	稍良	R	+	+	+	+	+	+0.010	+0.107
	B102A	稍良	S	-	-	-	-	-	-0.062	-0.059
	S 50B	良	S	-	-	-	-	-	-0.122	-0.127
	Duval	稍良	R	-	-	-	+	+	+0.174	+0.120
	長崎ケド ロフスキー 549	良	R	-	-	+	+	+	-0.013	-0.010
	助滲黄	良	S	-	-	-	-	-	-0.240	-0.314
	助滲赤	良	S	-	-	+	-	-	+0.009	-0.034
	H 麦	良	S	-	-	-	-	+	-0.057	-0.321
	チモテー	良	S	-	-	+	+	-	-0.117	-0.120
	学非	良	S	-	-	-	-	-	-0.182	-0.255
	B101A	良	S	-	-	+	+	+	-0.131	-0.008
	人非35	良	S	-	-	+	-	-	+0.040	+0.068
	石川	良	S	-	-	+	+	+	-0.008	-0.054

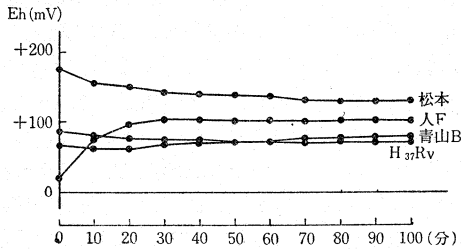
* A: Sodium benzenoneindophenol
B: Sodium enzenoneindo-3-chlorophenol
C: Sodium 2,6-dibromobenzenon-indophenol

ものではないと言える。

1) Sauton 培地(菌未接種)の示すORP(図略)目を変えて2回測定したが2例ともわずかに下降の様相を示すが40分値あたりからほとんど水平に近い曲線であり最終値は+71mV, +65mVをそれぞれ示し, 図1~図5に見られる菌接種の Sauton 培養液の示すORP曲線

とは異なり、後者は当然のことながら発育菌の代謝産物により影響を受けてそれぞれ特有なORP曲線を示していることが明らかである。

図1 人型結核菌のORP曲線



2) 人型結核菌のORP曲線

実験に供した4株中、松本、H37Rv 2株は最初なだらかな下降を、青山B株は下降の後なだらかな上昇傾向を示し、人F株は急な上昇を示したが、いずれも30分値あたりから水平に近くなっている。しかし4株とも最終値は陽電位で+70mV~+130mVの間にある。すなわち人型菌は4株とも培養液の最終値は陽電位であることは一致しており、Wilsonの反応において人型菌が脱色において示す共通な態度とほぼ一致した成績であるといえよう。(図1参照)

3) 牛型結核菌のORP曲線

図2 牛型結核菌のORP曲線(1)

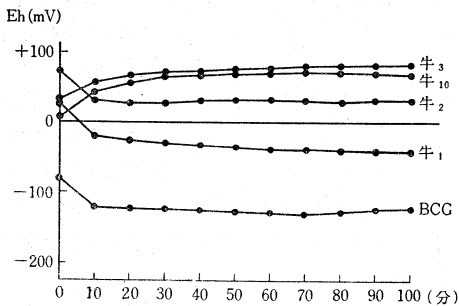
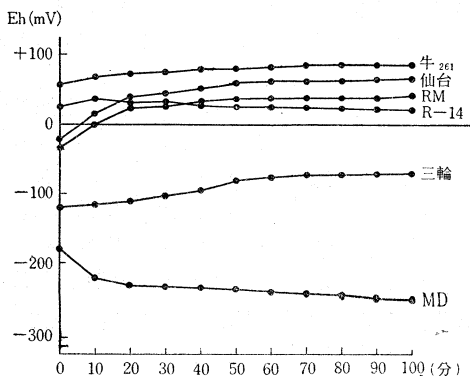


図3 牛型結核菌のORP曲線(2)



BCGは初めから目立つた陰電位を示し、最初はやや

急、後10分値以降水平に近い曲線を示し、最終値は陰電位である。滅毒株であるBCGとしては牛型菌の大部分が陽電位を示すことと対比して特徴的であるといえる。

他の牛型菌について見ると、10株中7株が陽の、3株が陰の最終電位値を与えている。しかし前者の中にも最初から陽電位で上昇して最終値陽電位であるもの4株(牛3, 牛10, 牛261, R-14)と、最初から陽電位で下降し、やはり陽電位の最終値をとるもの(牛2)、初め陰電位であるが直ちに上昇して陽電位になり、最終値が陽電位であるもの2株(RM, 仙台)がある。一方最終値陰電位である3株には、最初陽電位であるが直ちに陰電位に変わり、下降して最終値に到るもの(牛1)、最初から陰電位で下降して最終値に到るもの(MD)、上昇の傾向をたどりつつ最終値に到るもの(三輪)等かなり曲線の性状がまちまちであり、牛型菌全体として陽電位をとるものも多く、陰電位をとるものが少ないといえないようである。

ところで最終値とWilsonの反応を比較して見ると、Wilsonの反応において色素脱色を見ないかあるいは極くわずかに脱色を見るものについても陽の電位を示すもの6株、陰電位を示すもの2株とに別れ、Wilsonの反応で他の牛型菌株に比し脱色の強い牛3、MD両株がそれぞれ前者は陽電位、後者は陰電位を示す等、色素反応とORPの間には必ずしも一致した成績を見出しえない。(図2、3参照)

4) 鳥型結核菌のORP曲線

図4 鳥型結核菌のORP曲線(1)

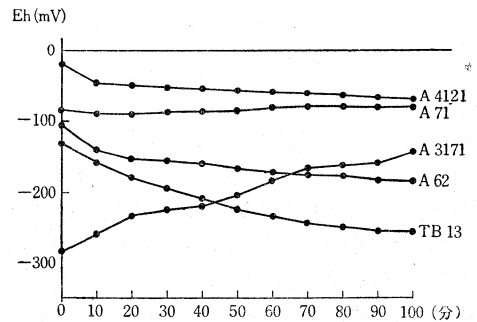
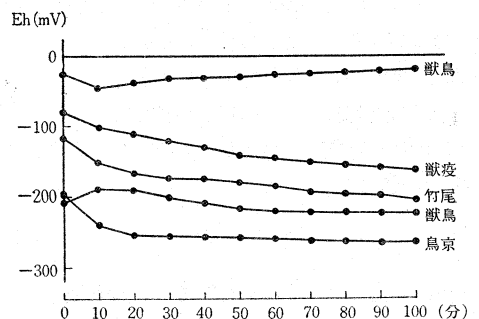


図5 鳥型結核菌のORP曲線(2)



供試10株すべて測定直後から陰電位で最終値も陰電位であるが、そのうち7株は下降の傾向を示し、やや急な下降4株(A62, TB13, 竹尾, 獣疫), 緩かな下降3株(A4121, 鳥京, 獣調)があり、他方上昇の傾向を示す3株のうち2株は緩かで(A71, 獣島), 1株はかなり急な電位の上昇を示す(A3171)。しかし最終値としてはすべての株が陰電位であるが、 $-18mV$ から $-264mV$ とかなり広い範囲の値をとっている。

Wilson の反応との関係を見ると、その電位の値ないしはその曲線と同反応における脱色度との間には一定の関係は見出されないようである。すなわち陰電位の絶対値が大なるほど脱色が強いとはいえないことが知られる。(図4, 5参照)

5) 非病原性抗酸性菌のORP曲線(図略)

非病原性抗酸性菌は18株中、最終値において陰電位を示すもの15株、陽電位を示すもの3株である。しかし前者すなわち陰電位を示すものについてもその値は区々であり、 $-10mV$ (長崎ケドロフスキー)から $-562mV$ (木村II)までの広い範囲にある。曲線の性状も、測定開始直後から陰電位で、最終値も陰電位にあるものの中にも、水平に近い傾斜で最終値に到るもの(長崎ケドロフスキー, 木戸黄, S50B, チモテー, B102A, 920(2), 549, 木村II), 緩かに下降して最終値に到るもの(学非, 石川), 緩かに上昇するもの(B101A), 急な下降を示して最終値に到るもの(H麦), 測定開始直後は陽電位であるがすぐに陰電位側に移り、下降して陰電位の最終値に到るもの(肋滲黄, 肋滲赤), 一方陽電位の最終値を示すものは、いずれも初めから陽電位であるが、上昇して最終値に到るもの(920(1), 人非33), 下降して最終値に終るもの(Duval)等前述の陰電位のものと同様、多様な相が見られる。

これを Wilson の反応との対比において見ると、陽電位を示すものにも Wilson の反応において脱色の度合の低いものもあり、その反対に脱色がかなり強いものもある。一方陰電位を示すものにおいても同様である。しかしながら陰電位を示すものについて、そのうちやや高い電位を示すもの(絶対値の小なるもの)に脱色の弱いもの多く、それに比しやや低い電位のもの(絶対値の大なるもの)の中には脱色の強いものが多いという傾向が見られなくはないようである。しかし前述のように、非常に低い電位(絶対値大なもの)で強い脱色を示さないものもあるので(木村II, $-562mV$)全体的にいつて Wilson の反応における脱色と、ORPとの間に平行関係が認められるとは言い難い。

考 案

Wilson の反応は、酸化還元色素が、抗酸性菌の有する酵素に由来するORPの差に基き、比較的ORPの低

い菌株によつて還元されて脱色され、ORPの比較的高い菌株によつては還元され難く、脱色されないことを予測して行われたものであり、Wilson らの菌浮游液について測定した結果は脱色反応とよく一致した成績が得られている。そこでききに著者が、Dubos, Desbordes, Wilson 3反応について比較検討した菌株の大部分について、菌の発育に伴うその代謝産物による培養液の変化によりORPの差として現われると考え、それと主として Wilson の反応との間になんらかの関係を見出しうるのではないかとの考えのもとに実験を行い、人型結核菌の Sauton 培養液がすべて陽電位を示し、鳥型結核菌のそれが全部陰電位を、牛型結核菌の大部分において陽電位、非病原性抗酸性菌の大多数において陰電位を示したという結果を得たが、これらの菌株の1つ1つについて見るならば、それぞれ特異なORP曲線を示していると言え、人型、牛型、鳥型、非病原性抗酸性各菌のおおのの群に共通な絶対的に特異な曲線の性状というものは認められなかつた。Wilson の反応との対比においても脱色の見られる株において陰電位をとるものが多く、反対に脱色の起らないものあるいは弱いものに陽電位を示すものが多いということはいえなくはないが、これも個々について絶対的とはいえず、電位の高低と脱色との間に平行は見られない。(表参照)

辻らは Kirchner の無血清培地に菌を培養したさいの目を追つて測定し、チモテー, A71, BCG, H₃₇Rv の順に陰の電位の絶対値が小さくなるという結果をえているが、著者の Sauton 培地28日培養液についての結果はチモテー, BCG, A71, H37Rv の順に絶対値が小さくなっている。BCGは牛型菌の1つであるが大多数の牛型菌と異なり培養液のORPは陰電位であつたことは減毒株としての性格を現わしているのかも知れないが、これも陰電位のORPを示す牛型菌もあるから絶対的といわれない。

著者の行つた実験は前述のように菌株の差により、代謝産物の差による影響から培養液のORPの差を求め、毒力株と無毒株との違いを比較せんとしたものであるが、Wilson ら、辻らが菌浮游液を用いて得た結果とは一致しなかつた。

由来細胞が生活を営んでいるのは、複雑な酵素系が動的平衡状態において働いているのであるが、それが培地中の被酸化物、被還元物に接触することによつて、また代謝産物の混入によつて培養液の電位をあるいは陽の、あるいは陰の電位の変化として現わすことは当然であるけれども、それを化学的にもなお本態の究明されていない抗酸性菌の複雑な毒力物質、ないしは毒性と直ちに結びつけえないのではなからうか。

結 論

抗酸性菌の試験管内病原性試験としての呈色反応、主として Wilson の反応の強さと、Sauton 培地に菌膜発育せしめたさいの代謝産物による培地の酸化還元電位の変化との間の関係の有無を知ろうと試み、apparent O R P は人型結核菌は陽電位、牛型結核菌は陽電位を示すもの多く、鳥型結核菌は陰電位を、非病原性抗酸性菌においては陰電位を示すもの多く、また Wilson の反応において脱色の傾向強いものに陰電位を示すもの多く、脱色の傾向の弱いものには陽電位をとるものが多いという傾向は覗われた。しかしながら個々の菌株について見るならば、その O R P 曲線はかなり特異な相を示し、人型牛型、鳥型、非病原性抗酸性菌の各群のおのおのに共通で、他群に対し特有と思われる O R P 曲線の型は認め難く、おのおのの菌株の示す電位の値も区々であつた。したがつて Wilson の反応ないしは、Dubos, Desbordes の両反応との間に絶対的な関係は認められなかつた。

御指導と御校閲を得た高木教授に感謝すると共に、多大の御助言を頂いた飯塚幹夫助手に感謝致します。

文 献

1) Aksianzew, M.I. : Zbt. Tuberk., 68:249, 1933.

- 2) 辻岡滝之助：医学研究, 15: 2193, 昭15.
- 3) 内田 正：福岡医誌, 41: 48, 昭25.
- 4) Wilson, F.J., Kalish, C. & Fish, C.H. : Am. Rev. Tuberc., 65: 187, 1952.
- 5) Hauduroy, P. & Cevey, M. : Ann. Inst. Pasteur, 84: 1034, 1953.
- 6) Wrinkle, C.K. & Patnode, R.A. : Am. Rev. Tuberc., 66: 99, 1952.
- 7) Patnode, R.A., Wrinkle, C.K. & Beasley, C. : Am. Rev. Tuberc., 69: 599, 1954.
- 8) Toyohara, M. : Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., 1: 41, 1956.
- 9) 松尾 仁：結核, 31: 651, 昭31.
- 10) 松尾 仁：結核, 31: 728, 昭31.
- 11) Dubos, R.J. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58: 698, 1948.
- 12) Desbordes J. : Ann. Inst. Pasteur, 83: 809, 1952.
- 13) 松原豊章・辻 讓・武井 盈：共済医報, 5: 181, 昭31.
- 14) 辻 讓・松原豊章・武井 盈：共済医報, 5: 390, 昭31.