

## 細菌代謝に対するオキシシン Cu, Co 錯塩の影響

## 第 2 編

オキシシン, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> の添加培地発育菌の酵素的性状

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

江 口 幸 雄

〔昭和 34 年 5 月 8 日受稿〕

## 目 次

I. 緒 言	剤の影響
II. 実験材料及び実験方法	3. 各菌の O <sub>2</sub> 消費に対する Cu <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup> の
III. 実験成績	影響
1. 各培地発育菌のカタラーゼ活性, 及びこれに対する阻害剤の影響	4. 各菌のグルコース酸化に於ける量的関係
2. 各菌の O <sub>2</sub> 消費, 及びこれに対する阻害	IV. 総括及び考案
	V. 結 言

## I. 緒 言

金属錯塩の抗菌性に関する研究の一端として, オキシシン (OXと略す) の Cu, 及び Co 錯塩を例として選び, 前編に於ては菌の発育, 並びに発育途次のグルコース分解に対する OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, OX+Cu<sup>++</sup>, OX+Co<sup>++</sup> の影響を検討し, OX と Cu<sup>++</sup> 或は OX と Co<sup>++</sup> の協力的発育抑制作用は, OX と金属イオンの濃度比が比較的接近した場合に顕著に現われ, 又発育途次のグルコース分解様式は OX+Cu<sup>++</sup> 或は OX+Co<sup>++</sup> 添加では OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> を各単独で添加した場合とは異なることを見, OX-Cu, OX-Co は Erlenmeyer<sup>5)</sup> の推定した如く錯塩自体として抗菌性を示すものと考えられることを述べた。

本編に於いては引きつづきそれらの作用を検討するため, OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, OX+Cu<sup>++</sup>, OX+Co<sup>++</sup> を添加した培地に継代して馴らした各菌の酵素的性状を比較することとした。

## II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: Sh. flexneri 2a (駒込 BIII), St. aureus (寺島株) の教室保存株

菌培養法:

ペプトン 10.0 g

グルコース	3.6 "
食塩	3.0 "
第二磷酸ソーダ	2.5 "
第一磷酸カリ	0.35 "
寒天	30.0 "
水	1.0 l
pH 7.2	

の組成の培地に OX  $4 \times 10^{-4}M$ , Cu<sup>++</sup>  $4 \times 10^{-4}M$ , Co<sup>++</sup>  $4 \times 10^{-4}M$ , OX ( $10^{-4}M$ ) + Cu<sup>++</sup> ( $1/2 \times 10^{-4}M$ ), OX ( $10^{-4}M$ ) + Co<sup>++</sup> ( $1/2 \times 10^{-4}M$ ) をそれぞれ添加したものに継代して馴らしてから, その24時間培養菌を静止菌として用いた。

尚各添加物は最初低濃度のものに継代し, 馴れるに従つて順次濃度を上げて行くようにした。

静止菌浮游液の調製: 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) で 2 回遠沈洗滌し, 再び同一組成の緩衝液に浮游せしめた。

菌量は光電比濁計により比濁し, あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

カタラーゼ活性の測定: Warburg 検圧計を用い<sup>10)</sup>, 容器の主室に菌液 2.0 ml (湿菌量 1 mg), 蒸溜水 0.7 ml を入れ, 側室より H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 ml を混入, 10分間の O<sub>2</sub> 発生量を測定して比較した。

阻害剤を用いる場合は主室に蒸溜水の代りに阻害

剤溶液を入れるようにした。

O<sub>2</sub> 消費量の測定： Warburg 検圧計を用い常法<sup>1)</sup>に従った。

基質，阻害剤，金属イオン： 何れも市販品を蒸留水に溶解して用いた。Cu<sup>++</sup> は硫酸銅，Co<sup>++</sup> は塩化コバルトとした。

グルコース及びその分解産物の定量：何れも前編同様にした。

### Ⅲ. 実験成績

1. 各培地発育菌のカタラーゼ活性，及びこれに対する阻害剤の影響

OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> は Fe その他の金属イオンと結合，或は拮抗すると考えられ，従つてこれらを添加した培地に発育した菌体では，含鉄酵素系の減弱する可能性が予想される。

そこで含鉄酵素の例としてカタラーゼを選び，

OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, OX+Cu<sup>++</sup>, OX+Co<sup>++</sup> を添加した培地に発育した菌体（それぞれ OX 菌，Cu 菌，Co 菌，OX・Cu 菌，OX・Co 菌と略す）のカタラーゼ活性を比較し，又同時にこれに対する KCN, NaN<sub>3</sub>, HXA の阻害効果の差異を見ることにより，それら阻害剤の菌体表面透過性，ひいては菌体表面構造の変化をうかがう一助とした。

カタラーゼ活性は菌液に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して10分間の O<sub>2</sub> 発生量を以て比較した。阻害剤は Warburg 検圧計の容器の主室に菌液と共に入れ，よく接触せしめてから15分後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を混入するようにし，Sh. flexneri では KCN は 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, NaN<sub>3</sub>, HXA は 10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-5</sup>M とし，St. aureus では KCN, NaN<sub>3</sub>, HXA 共に 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M となるようにして用いた。

結果は Sh. flexneri では第1表の如くであり，阻害剤無添加では対照菌（阻害物質無添加培地発育

第 1 表 各菌のカタラーゼ活性に対する阻害剤の影響

Sh. flexneri

	対 照 菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
な し	182	47	178	171	176	180
KCN 10 <sup>-3</sup> M	20	21	42	64	89	74
" 10 <sup>-4</sup> M	69	57	120	176	181	192
NaN <sub>3</sub> 10 <sup>-4</sup> M	20	22	24	21	21	19
" 10 <sup>-5</sup> M	94	54	159	170	176	164
HXA 10 <sup>-4</sup> M	17	14	20	19	172	24
" 10 <sup>-5</sup> M	112	70	121	154	212	134

菌)の O<sub>2</sub> 発生量 182μl に対し OX 菌では 47 μl となり著明なカタラーゼ活性低下が見られ，Cu 菌，Co 菌，OX・Cu 菌，OX・Co 菌ではそれぞれ 178, 171, 180, 176 μl で対照菌と大差は見られなかつた。

而して KCN 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M 添加では対照菌で著明な O<sub>2</sub> 発生の阻害が見られたが，他菌では KCN 阻害は比較的少なく，NaN<sub>3</sub>10<sup>-4</sup>M では各菌共著明な阻害を受け，10<sup>-5</sup>M では対照菌のみが約50%の

第 2 表 各菌のカタラーゼ活性に対する阻害剤の影響

St. aureus

	対 照 菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
な し	129	82	117	191	119	136
KCN 10 <sup>-2</sup> M	51	42	67	36	39	58
" 10 <sup>-3</sup> M	186	120	141	181	121	139
NaN <sub>3</sub> 10 <sup>-2</sup> M	43	56	61	27	52	87
" 10 <sup>-3</sup> M	112	129	112	84	120	150
HXA 10 <sup>-2</sup> M	46	69	70	29	49	77
" 10 <sup>-3</sup> M	110	136	142	132	134	149

阻害を受けた他は殆んど影響は認められなかつた。

HXA は  $10^{-4}M$  で OX・Cu 菌以外の菌で著明な阻害を及ぼしたが、OX・Cu 菌では比較的影響は少く  $10^{-5}M$  では各菌共阻害は比較的少く、OX・Cu 菌ではむしろ  $O_2$  発生が増大が見られた。

St. aureus では第2表の如くであり、阻害剤無添加では対照菌の  $129 \mu l$  に対し、OX 菌では  $82 \mu l$  で Sh. flexneri に於ける程著明ではないが、やはりカタラーゼ活性の低下が認められ、Co 菌では  $191 \mu l$  で対照菌よりはかなり活性が大であつた。他菌では対照菌との間に著差は見られなかつた。

而して KCN による阻害は一般に極めて小であり、 $NaN_3$  は  $10^{-4}M$  で Co 菌のみでやや阻害が見られ、 $10^{-3}$  では各菌共かなりの阻害を受けるが、Co

菌に於ては特に著しかつた。HXA も  $10^{-4}M$  では各菌共著明な影響を与えず、 $10^{-3}M$  では対照菌、Co 菌のみがかなり著明な阻害を受けた。

2. 各菌の  $O_2$  消費及びこれに対する阻害剤の影響

先づ両供試菌につき、各培地発育菌体のグルコース、グルコン酸、リボース、乳酸、焦性ブドー酸、醋酸、コハク酸、フマル酸を基質とした  $O_2$  消費量 (1時間値) を比較した。

$O_2$  消費量は Warburg 検圧計を用いて測定し、菌量は Sh. flexneri では湿菌  $20 mg/cup$ , St. aureus では  $60 mg/cup$  とし、基質はすべて  $10^{-2}M$  となるようにして加えた。

結果は Sh. flexneri では第3表に示す如くであ

第3表 各菌の基質別  $O_2$  消費量

	Sh. flexneri				$O_2$ 消費量 $\mu l$	
	対照菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
なし	20	18	29	21	11	14
グルコース	267	165	226	147	150	181
グルコン酸	20	18	28	20	11	15
リボース	19	17	28	22	10	14
乳酸	260	204	247	127	169	112
焦性ブドー酸	92	39	147	37	74	67
醋酸	21	18	31	21	11	14
コハク酸	81	32	291	36	32	39
フマル酸	84	39	224	41	30	31

第4表 各菌の基質別  $O_2$  消費量

	St. aureus				$O_2$ 消費量 $\mu l$	
	対照菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
なし	51	52	56	38	40	42
グルコース	252	266	222	186	284	284
グルコン酸	56	79	81	51	79	97
リボース	71	106	123	116	91	121
乳酸	124	112	171	89	208	221
焦性ブドー酸	126	59	139	71	67	68
醋酸	79	82	77	66	81	67
コハク酸	147	98	167	62	107	109
フマル酸	131	77	191	79	96	126

り、対照菌ではグルコース、乳酸を基質とした  $O_2$  消費が最も大でそれぞれ  $267 \mu l$ ,  $260 \mu l$  であり、次いで焦性ブドー酸  $92 \mu l$ , コハク酸  $81 \mu l$ , フマル酸  $84 \mu l$  で他の基質では殆んど  $O_2$  消費は見られなかつた。

これに対し OX 菌、Co 菌では焦性ブドー酸、コ

ハク酸、フマル酸を基質とした  $O_2$  消費が著しく小であり、OX・Cu 菌、OX・Co 菌でも対照菌に比しやや小であるが、Cu 菌では対照菌よりもむしろ大であつた。

St. aureus では第4表の如くであり、対照菌ではグルコースを基質とした  $O_2$  消費が最も大で、

次いで乳酸, 焦性ブドウ酸, コハク酸, フォーマル酸などであり, グルコン酸, リボース, 醋酸では比較的  $O_2$  消費量が小であつた。

これに対し, OX 菌, Co 菌, OX・Co菌, OX・Cu菌では焦性ブドウ酸を基質とした  $O_2$  消費は対照菌に比し小で, 特に OX 菌, Co 菌に於いて著しく, 又コハク酸, フォーマル酸を基質とした  $O_2$  消費もやや低い傾向が見られた。

然し Cu 菌では *Sh. flexneri* に於けると同様, 焦性ブドウ酸, コハク酸, フォーマル酸を基質とした  $O_2$  消費は対照菌よりむしろ大であつた。

以上の如く, 各培地に発育した菌の間に基質別  $O_2$  消費に於いて明らかに差異が認められた。

次に各菌の酵素的性状特に H 伝達系の差異をうかがう一助として, 含鉄酵素を阻害すると考えられる KCN, 及び SH 基を含む酵素反応を阻害すると考えられているモノヨード醋酸 (MIA と略す) の  $O_2$  消費に対する影響を比較した。

これら阻害剤は warburg 検圧計容器の室内に菌液と共に入れ, あらかじめよく接触せしめてから 15 分後に側室より基質を混入して 1 時間の  $O_2$  消費量を測定した。

基質はグルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸, コハク酸とし, 何れも  $10^{-2}M$  となるようにして用い, KCN, MIA は共に  $10^{-3}M$  とした。

*Sh. flexneri* では第 5 表の如き結果であり, グルコースを基質とした場合には, KCN による阻害は対照菌で最も著しく, Co菌, OX・Co 菌でもかなり

の阻害が見られるが, OX 菌, Cu 菌, OX・Co 菌では阻害は比較的小であり, 特に Cu 菌ではむしろ  $O_2$  消費促進が見られた。

又 MIA による阻害は OX 菌, Cu 菌, OX・Co 菌で最も大で, 次いで OX・Cu 菌であり, Co 菌では最も小であつた。

乳酸を基質とした場合には, KCN 阻害は対照菌, Co 菌, OX・Cu 菌で大であり, OX 菌, Cu 菌, OX・Co 菌では小であつた。MIA では OX・Co 菌に於て著明な阻害が見られるほかは阻害度は一般に小であつた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合には前述の如く OX 菌, Co 菌, OX・Cu 菌, OX・Co 菌の  $O_2$  消費は小であり阻害剤の影響も判別し難いが, 各菌共一般に KCN, MIA の阻害は他の基質に於けるよりは大であり特に対照菌に於ける KCN, MIA の阻害, Cu 菌に於ける MIA の阻害は顕著であつた。

コハク酸を基質にした場合にも, 対照菌, Cu 菌以外の  $O_2$  消費が小であり, 阻害剤の影響も分りにくい。KCN による阻害は対照菌, Co 菌で大であり, MIA 阻害は OX 菌, OX・Co 菌で大のようであつた。

*St. aureus* では第 6 表に示す通りで, KCN 阻害は各菌, 各基質共に小であり, MIA 阻害はグルコースを基質とした場合には対照菌, OX・Cu 菌で比較的大であり, 次いで Cu 菌, Co 菌, OX・Co 菌で, OX 菌では殆んど阻害はみられなかつた。

乳酸を基質とした場合には OX・Co 菌でやや著明

第 5 表 各菌の  $O_2$  消費に対する KCN, MIA の影響  
*Sh. flexneri*

	対 照 菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
グルコース	279	187	304	115	174	169
"    + KCN	35	96	346	52	51	122
"    + MIA	56	15	27	106	68	21
乳        酸	251	147	303	131	127	120
"    + KCN	39	112	296	47	39	146
"    + MIA	217	109	251	98	112	47
焦性ブドウ酸	104	43	162	38	37	46
"    + KCN	29	31	97	21	18	26
"    + MIA	37	22	29	24	23	19
コ        ハ        ク        酸	84	56	228	53	56	44
"    + KCN	21	52	237	29	40	51
"    + MIA	66	19	161	30	51	14

第 6 表 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する KCN, MIA の影響

St. aureus

	対 照 菌	OX 菌	Cu 菌	Co 菌	OX Cu 菌	OX Co 菌
グルコース	247	259	214	104	276	291
“ +KCN	316	372	282	276	282	326
“ +MIA	96	240	97	56	91	112
乳 酸	106	97	162	99	217	206
“ +KIN	93	91	174	112	220	261
“ +MCA	119	81	127	74	207	76
焦性ブドウ酸	147	56	166	70	91	67
“ +KCN	130	60	152	62	82	60
“ +MIA	66	51	90	39	41	38
コハク酸	81	77	82	71	118	106
“ +KCN	89	76	78	92	122	114
“ +MIA	72	74	30	38	97	34

な阻害が見られた他は影響は比較的小であり、焦性ブドウ酸を基質とした場合は *Sh. flexneri* 同様、これら阻害剤の影響は他基質に比し大であつたが各菌間に著差は見られず、コハク酸を基質とした場合には Co 菌, Cu 菌, OX・Co 菌で阻害が見られた他は小であつた。

以上の如く両供試菌共、各培地発育間に阻害剤の影響に差異があることは明らかに認められたが、その差異は基質によつてまちまちであり、又 *Sh. flexneri* と *St. aureus* とによつても異り、その間に一定の傾向を見出すことは出来なかつた。

3. 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> の影響  
 両供試菌に於いて、各培地に発育した菌体、特に Cu 菌と OX・Cu 菌, Co 菌と OX・Co 菌の間の差異を見出す一助として、OX 菌, Cu 菌, OX・Cu 菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Cu<sup>++</sup> の影響、並びに OX 菌, Co 菌, OX・Co 菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Co 菌の影響を比較した。

Cu<sup>++</sup> は 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, Co<sup>++</sup> は 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-3</sup>M の濃度とし、これらイオンは Warburg 検圧計容器の主室に菌液と共に入れ、15分間よく接触せしめてから側室より基質を混入し1時間の O<sub>2</sub> 消費量を測定した。基質はグルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸の4種とした。

*Sh. flexneri* に於ける Cu<sup>++</sup> の影響は第7表の如くであり、グルコースを基質とした場合対照菌では Cu<sup>++</sup> 無添加の O<sub>2</sub> 消費 266 μl であるのに対し、Cu<sup>++</sup> 10<sup>-6</sup>M 添加では 207 μl, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M 添加で

第 7 表 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Cu<sup>++</sup> の影響

*Sh. flexneri*

	対 照 菌	OX 菌	Cu 菌	OX Cu 菌
グルコース	266	178	240	184
“ +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	207	154	231	136
“ + “ 10 <sup>-5</sup> M	86	89	134	92
“ + “ 10 <sup>-4</sup> M	50	52	69	61
乳 酸	237	211	254	182
“ +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	194	176	224	160
“ + “ 10 <sup>-5</sup> M	178	106	112	89
“ + “ 10 <sup>-4</sup> M	37	50	67	56
焦性ブドウ酸	126	50	142	37
“ +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	96	51	127	36
“ + “ 10 <sup>-5</sup> M	50	36	94	29
“ + “ 10 <sup>-4</sup> M	29	30	59	20
コハク酸	102	47	151	40
“ +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	87	44	136	37
“ + “ 10 <sup>-5</sup> M	52	32	112	30
“ + “ 10 <sup>-4</sup> M	30	29	47	26

はそれぞれ 86, 56 μl となつて著明な阻害が見られるが、Cu 菌に於ける阻害は小であり、OX 菌 OX・Cu 菌では Cu 菌よりもはるかに阻害は大であつた。

他の基質に於いても同様の傾向が見られ、又 *St. aureus* に於いても第9表の如く同様であつた。

第8表 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Cu<sup>++</sup> の影響

St. aureus				
	対照菌	OX 菌	Cu 菌	OX Cu 菌
グルコース	248	217	261	182
" +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	204	192	252	160
" + " 10 <sup>-5</sup> M	121	156	216	134
" + " 10 <sup>-4</sup> M	39	51	72	57
乳 酸	150	127	191	202
" +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	98	95	183	121
" + " 10 <sup>-5</sup> M	67	76	124	81
" + " 10 <sup>-4</sup> M	33	48	74	40
焦性ブドウ酸	146	81	167	77
" +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	91	70	159	65
" + " 10 <sup>-5</sup> M	67	56	134	43
" + " 10 <sup>-4</sup> M	39	36	67	32
コハク酸	176	92	141	88
" +Cu <sup>++</sup> 10 <sup>-6</sup> M	143	74	136	79
" + " 10 <sup>-5</sup> M	61	50	107	58
" + " 10 <sup>-4</sup> M	48	39	70	40

Sh. flexneri に於ける Co<sup>++</sup> の影響は第9表の如くであり、グルコースを基質とした場合対照菌では Co<sup>++</sup> 無添加の O<sub>2</sub> 消費 248 μl, Co<sup>++</sup> 10<sup>-5</sup>M,

第9表 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Co<sup>++</sup> の影響

Sh. flexneri				
	対照菌	OX 菌	Co 菌	OX Co 菌
グルコース	248	186	151	174
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	162	143	146	126
" + " 10 <sup>-4</sup> M	52	87	127	74
" + " 10 <sup>-3</sup> M	34	52	81	54
乳 酸	216	179	127	158
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	161	124	107	103
" + " 10 <sup>-4</sup> M	94	89	77	63
" + " 10 <sup>-3</sup> M	38	50	62	34
焦性ブドウ酸	106	54	61	77
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	72	46	57	56
" + " 10 <sup>-4</sup> M	36	37	40	34
" + " 10 <sup>-3</sup> M	20	21	39	26
コハク酸	97	46	39	42
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	81	39	30	31
" + " 10 <sup>-4</sup> M	52	32	26	25
" + " 10 <sup>-3</sup> M	28	20	25	23

10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-3</sup>M 添加ではそれぞれ 162, 52, 34 μl となつて10<sup>-4</sup>M 以上で著明な阻害が見られ, OX 菌, OX・Co 菌でもかなりの阻害が見られるのに対し, Co 菌では Co<sup>++</sup> 阻害は小であつた。

他の基質に於ても同様で, 対照菌での阻害が最大であり, Co 菌では阻害は少く, OX 菌, OX・Co 菌ではそれらの中間の阻害度であつた。

St. aureus では第10表の如く, Sh. flexneri に比し Co<sup>++</sup> の影響は一般にやや小であるが, 特に Co 菌での阻害度は最も少く, 対照菌で最大であつた。

第10表 各菌の O<sub>2</sub> 消費に対する Co<sup>++</sup> の影響

St. aureus				
	対照菌	OX 菌	Co 菌	OX Co 菌
グルコース	237	256	174	232
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	209	230	180	207
" + " 10 <sup>-4</sup> M	134	171	154	164
" + " 10 <sup>-3</sup> M	81	112	131	126
乳 酸	146	123	107	181
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	127	106	112	167
" + " 10 <sup>-4</sup> M	92	84	92	102
" + " 10 <sup>-3</sup> M	46	58	66	47
焦性ブドウ酸	116	67	70	64
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	98	58	67	56
" + " 10 <sup>-4</sup> M	66	40	57	44
" + " 10 <sup>-3</sup> M	37	32	50	31
コハク酸	127	102	69	97
" +Co <sup>++</sup> 10 <sup>-5</sup> M	102	91	67	85
" + " 10 <sup>-4</sup> M	76	72	56	70
" + " 10 <sup>-3</sup> M	47	46	48	52

以上の如くOX菌, Cu 菌, OX・Cu 菌は Cu<sup>++</sup> に対する態度(抵抗性)を異にし, 又OX菌, OX・Co 菌では Co<sup>++</sup> に対する態度を異にすることが認められた。

#### 4. 各菌のグルコース酸化に於ける量的関係

各培地に発育した菌のグルコースの酸化様式に差異があるか否かを見るため, Warburg 検圧計を用い, 菌液にグルコース (30 μM/cup) を加え, 2時間振盪して O<sub>2</sub> 消費量を測定し, 更に遠沈上清中のグルコース消費量, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積量をそれぞれ測定した。

又阻害剤として KCN, 亜硫酸を添加した影響をも検討した。KCN は Sh. flexneri では 10<sup>-3</sup>M,

第 11 表 各菌のグルコース酸化とこれに対する KCN, 亜砒酸の影響  
Sh. flexneri

菌	定量値 $\mu\text{M}/3\text{ ml}$		O <sub>2</sub> 消費	グルコース 消 費	焦性ブ蓄積	乳酸蓄積	醋酸蓄積
	基質阻害剤						
対 照 菌	グルコース		17.9	12.1	1.7	0.8	0.9
	" +KCN		3.6	8.3	3.4	11.6	1.4
	" +亜砒酸		12.7	13.2	10.2	7.4	2.9
OX 菌	グルコース		14.1	12.9	6.8	0.6	0.8
	" +KCH		9.2	11.2	7.9	12.8	1.9
	" +亜砒酸		12.6	13.4	12.4	8.1	2.1
Co 菌	グルコース		11.3	11.9	6.6	2.9	0.9
	" +KCN		4.1	8.9	7.3	8.6	1.4
	" +亜砒酸		9.1	10.7	12.4	7.0	1.9
Cu 菌	グルコース		16.3	13.1	0.9	0	1.1
	" +KCN		13.0	12.9	13.6	6.1	2.6
	" +亜砒酸		14.8	15.2	15.9	9.6	2.6
OX・Co菌	グルコース		12.9	10.8	1.1	3.4	0.9
	" +KCN		6.2	9.6	4.6	12.4	1.6
	" +亜砒酸		8.1	10.2	10.7	7.8	2.0
OX・Cu菌	グルコース		13.7	11.1	1.1	2.4	0.9
	" +KCN		9.3	10.9	6.8	11.7	1.4
	" +亜砒酸		11.6	11.2	10.1	7.6	1.8

第 12 表 各菌のグルコース酸化とこれに対する KCN, 亜砒酸の影響  
St. aureus

菌	定量値 $\mu\text{M}/3\text{ ml}$		O <sub>2</sub> 消費	グルコース 消 費	焦性ブ蓄積	乳酸蓄積	醋酸蓄積
	基質阻害剤						
対 照 菌	グルコース		16.8	14.9	1.7	1.6	1.3
	" +KCN		12.4	13.6	2.3	11.0	2.1
	" +亜砒酸		8.1	11.4	8.7	2.7	3.7
OX 菌	グルコース		14.7	14.1	5.6	3.2	0.9
	" +KCN		10.8	11.7	8.8	4.3	1.8
	" +亜砒酸		9.6	10.1	7.9	3.6	2.7
Co 菌	グルコース		14.4	14.9	5.8	2.7	1.3
	" +KCN		9.8	11.0	3.9	10.6	1.8
	" +亜砒酸		8.8	9.8	7.4	3.2	2.9
Cu 菌	グルコース		16.9	14.7	0.8	0.6	2.6
	" +KCN		11.6	12.1	7.3	5.2	2.8
	" +亜砒酸		12.1	12.9	9.6	3.1	3.7
OX・Co菌	グルコース		15.2	15.1	2.3	3.1	1.7
	" +KCN		12.8	13.7	4.0	9.2	1.9
	" +亜砒酸		11.3	12.0	8.7	3.4	2.4
OX・Cu菌	グルコース		13.8	14.1	2.1	2.7	1.6
	" +KCN		12.0	13.2	3.9	8.8	1.8
	" +亜砒酸		12.3	13.7	8.9	3.4	1.9

*St. aureus* では  $10^{-2}M$ , 亜硫酸は両菌共  $10^{-3}M$  とし, Warburg 検圧計の容器の室内に菌液と共に入れてあらかじめよく接触せしめ, 15分後に側室よりグルコースを混入するようにした。

*Sh. flexneri* では第11表の如き結果であり, 阻害剤無添加では, 対照菌に於いては  $O_2$  消費  $17.9 \mu M$ , グルコース消費  $12.1 \mu M$ , 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積はそれぞれ  $1.7, 0.8, 0.9$  であるのに対し, OX 菌ではそれぞれ  $14.1, 12.9, 6.8, 0.6, 0.8 \mu M$  となつて  $O_2$  消費に対するグルコース消費の割合は対照菌に於けるよりも大であり, 又焦性ブドウ酸蓄積の割合も大であつた。

Cu 菌ではそれぞれ  $16.3, 13.1, 0.9, 0, 1.1 \mu M$  で, 分解産物蓄積は対照菌よりも著しく小であり, OX・Cu 菌ではそれぞれ  $13.7, 11.1, 1.1, 2.4, 0.9 \mu M$  で  $O_2$  消費に対するグルコース消費の割合は, 対照菌よりはやや小であるが, OX 菌よりは大であり, 分解産物は乳酸蓄積がやや大となつて対照菌, OX 菌, Cu 菌とは何れも異なることが認められた。

又 Co 菌ではそれぞれ  $11.3, 11.9, 6.6, 2.9, 0.9 \mu M$  であつて,  $O_2$  消費に対するグルコース消費の割合は対照菌よりは著しく大であり, 焦性ブドウ酸, 乳酸蓄積も著明に大であるのに対し, OX・Co 菌ではそれぞれ  $12.9, 10.8, 1.1, 3.4, 0.9 \mu M$  であつて分解産物としての乳酸蓄積は対照菌よりもやや大であるが, 焦性ブドウ酸蓄積は大差なく, OX 菌, Co 菌とは明らかに様相を異にしていた。

而して KCN 添加では各菌共  $O_2$  消費に対するグルコース消費の割合は増大し, 又分解産物特に乳酸蓄積が大となり, グルコース消費  $1M$  に対する焦性ブドウ酸, 乳酸蓄積の合計は  $1M$  以上となり, 各菌間に量的関係の差異は殆んど見られなくなつた。

又亜硫酸添加に於いては焦性ブドウ酸蓄積が増大し, グルコース消費  $1M$  に対する焦性ブドウ酸, 乳酸蓄積の合計は  $1M$  以上となつて各菌間の差はやはり見られなくなつた。

*St. aureus* では第12表の如くであり, *Sh. flexneri* に於けると同様の傾向が見られ, 従つて両供試菌共各培地発育菌間に焦性ブドウ酸以下の酸化能には差異があり, OX 菌, Co 菌では焦性ブドウ酸の完全酸化が不円滑と考えられるが, グルコース焦性ブドウ酸間の酸化経路には差異はないものと見做された。

## VI. 総括及び考案

*Sh. flexneri*, *St. aureus* を供試菌とし, OX,

$Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$ , OX+ $Cu^{++}$ , OX+ $Co^{++}$  の作用を前編に引きつづき比較検討するため, これら添加物を含む培地に継代して馴らした菌体(静止菌)の性状を比較した。

OX は種々の金属イオンと錯塩を形成してこれを捕捉し,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$  は菌の発育に必要な金属イオンと拮抗すると考えられる。又 OX-Cu, OX-Co 錯塩は OX,  $Cu^{++}$ , 或いは  $Co^{++}$  とは別な機構で菌の発育を阻害すると推定されている。

従つてこれら添加物質を含む培地に馴らした菌体は, それらの作用に応じて性状に変化を来していると考えられる。

これら添加物質は何れも金属イオンを捕捉, 或は拮抗すると推定されることから, これらを含む培地に発育した各菌は, 金属を含む酵素系, 例えば含鉄酵素系の欠除内至は衰弱を来している可能性もあると思われる。

そこで, 先づ各菌についてカタラーゼ活性を比較すると, OX 菌のみが活性低下を来しており, 特に *Sh. flexneri* に於いて著しく, OX が Fe 捕捉力が最も強いと想像される。

次に菌体表面構造の差異を推察する一助として, カタラーゼ作用に対する KCN,  $NaN_3$ , HXA の阻害効果を比較すると, *Sh. flexneri* では KCN,  $NaN_3$  による阻害は対照菌で著しく, 他の菌では比較的小であり, HXA による阻害は OX・Cu 菌では比較的小である。又 *St. aureus* では  $NaN_3$  による阻害は Co 菌で大であり, HXA による阻害は対照菌, Co 菌で大である。

このような阻害効果の差は, それら阻害剤の菌体表面透過性の差によると見做され, 各培地発育菌間に表面構造に或程度差異があることがうかがわれる。

又各菌の  $O_2$  消費に対する KCN, MIA の阻害を比較すると, 各培地発育菌間に阻害度の差異が見られ, これら阻害剤の菌体表面透過性の差異とは別に, 酵素的性状特に H 伝達系にも何らかの差異があるものと想像される。

更に OX 菌, Cu 菌, OX・Cu 菌の  $O_2$  消費に対する  $Cu^{++}$  の影響を見ると OX 菌, OX・Cu 菌に於ける  $Cu^{++}$  の阻害は Cu 菌よりもはるかに大であり, 同様に OX, OX・Co 菌の  $O_2$  消費に対する  $Co^{++}$  の阻害は Co 菌に於けるよりも大であつて, Cu 菌, Co 菌は OX 菌, OX・Cu 菌又は OX・Co 菌とは明らかに状態を異にすると見做される。

次に各菌の基質別  $O_2$  消費量を比較すると, 両供



試菌共に OX 菌, Co 菌では焦性ブドウ酸, コハク酸, フマル酸を基質とした O<sub>2</sub> 消費は対照菌に比し著しく低下しており, OX・Cu 菌, OX・Co 菌では低下は比較的少く, Cu 菌では対照菌よりもむしろ大である。

而して各菌のグルコース酸化に於ける量的関係, 及びこれに対する KCN, 亜硫酸の影響を比較すると, Co 菌では O<sub>2</sub> 消費に対するグルコース消費量の割合は対照菌に比し大であり, 且つ分解産物, 特に焦性ブドウ酸の蓄積が大である。又 OX・Cu 菌, OX・Co 菌では対照菌と著差はなく, Cu 菌ではむしろ分解産物蓄積は小である。

Sh. flexneri, St. aureus 両供試菌に於いて, 各菌共, グルコース酸化に於けるグルコース→焦性ブドウ酸の酸化経路<sup>12,13)</sup>には差異はないが, OX 菌, Co 菌ではグルコース酸化に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化が不円滑であり, これは OX は焦性ブドウ酸の完全酸化に必要な Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> などと結合し, 又 Co<sup>++</sup> はこれらと拮抗することにより焦性ブドウ酸酸化を阻害すると推定され, 又 Cu<sup>++</sup> は Co<sup>++</sup> とは異り, 酵素蛋白質を変性することにより菌の発育を阻害するものと想像される。

而して OX-Cu 又は OX-Co 錯塩は OX, Cu<sup>++</sup>, 又は Co<sup>++</sup> とは別の機構で作用し, 恐らく Erlen-

myer<sup>5)</sup> の推定した如く, 錯塩の中心金属が酵素反応に必要な金属イオン, 又は酵素と結合した金属と入れ代ることにより抗菌性を示すものと想像される。

## V. 結 言

Sh. flexneri, St. aureus を供試菌とし, OX, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, OX+Cu<sup>++</sup>, OX+Co<sup>++</sup> を添加した培地に継代してならした各菌の性状を比較検討して次の成績を得た。

1. OX 添加培地発育菌はカタラーゼ活性が低下しており, 他の菌は対照菌と大差ない。
2. 各培地に発育した菌の間に阻害剤の菌体表面透過性に若干差異がある。
3. OX 菌, Cu 菌, OX・Cu 菌は O<sub>2</sub> 消費に対する Cu<sup>++</sup> の阻害度を異にし, OX 菌, Co 菌, OX・Co 菌も Co<sup>++</sup> による阻害度を異にする。
4. 各培地発育菌はグルコース酸化にグルコース酸化に於けるグルコース→焦性ブドウ酸の経路に於ける焦性ブドウ酸の経路に差異はないが, 焦性ブドウ酸以下の完全酸化能を異にする。

## 参 考 文 献

- 1) Albert, A. : Med. J. Aust., 1, 245, (1944)
- 2) Albert, A., Rubbo, S. D., Goldacre, R. J., Balfour, B. G. : Brit. J. Exp. Path., 28, 69, (1947)
- 3) Rubbo, S. D., Albert, A., Gibson, M. I. : Brit. J. Exp. Path., 31, 4125, (1950)
- 4) Sorkin, E., Roth, W., Erlenmyer, H. : Helv., 35, 1736, (1952)
- 5) Erlenmyer, H., Bäumlner, J., Roth, W. Helv., 36, 941, (1953)
- 6) 標準生化学実験 : 18
- 7) 標準生化学実験 : 36
- 8) 標準生化学実験 : 35
- 9) 北村 : 岡山医学会雑誌, 第 卷 号, , (昭和 34年)
- 10) Umbreit, et al. : Manometric Techniques,
- 11) Umbreit, et al. : Manometric Techniques,
- 12) 藤本 : 岡山医学会雑誌, 第69巻9号, 2455, (昭和32年)
- 13) 武田 : 岡山医学会雑誌, 第70巻10号, 3591, (昭和33年)

The Effects of Oxine,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  and these Oxine Complexes  
on Metabolism of Bacteria

Part II. The enzymatic properties of bacteria cultured  
on Oxine,  $\text{Cu}^{++}$ , or  $\text{Co}^{++}$  added media

By

Yukio EGUCHI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Sakae MURAKAMI)

With the use of standard strains of *Sh. flexneri* and *Staphy. aureus* taken from the departmental stock, the author carried out the serial transplantation through generations on the media that was added oxine,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ , the combination of oxine and  $\text{Cu}^{++}$  or that of oxine and  $\text{Co}^{++}$  in order to obtain bacteria adapted to respective media. Then the investigation was made on the properties of the bacteria thus obtained. The results are following.

1) It was found the decreased activity of catalase by the bacteria grown on oxine added media, but that activities of other other bacteria were maintained nearly normal.

2) It was revealed slight differences between the permeabilities of inhibitor through the surface of bacterial cells cultured on different media.

3) The inhibitory effects of  $\text{Cu}^{++}$  on  $\text{O}_2$  uptake were varied by the bacteria cultured on different media added respectively oxine,  $\text{Cu}^{++}$  or oxine+ $\text{Cu}^{++}$ . That effects of  $\text{Co}^{++}$  were also varied by the bacteria on different media added respectively oxine,  $\text{Co}^{++}$  or oxine+ $\text{Co}^{++}$ .

4) There was found no difference on the pathway of glucose metabolism resulting in pyruvate, but was noticed some difference in further oxydation of pyruvate.

---