

二、三細菌の赤血球に及ぼす影響について

第 1 編

各種動物血球，肺炎菌及び連鎖球菌のカタラーゼ，
ペルオキシダーゼ及び呼吸量

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

松 本 万 輔

〔昭和32年3月27日受稿〕

目 次

緒 言

第 I 章 実験材料及び方法

- 1) 実験材料
- 2) カタラーゼ測定
- 3) ペルオキシダーゼ測定
- 4) 呼吸量測定

第 II 章 実験成績

- 1) カタラーゼ
 - (a) 動物赤血球カタラーゼ量

(b) 細菌カタラーゼ量

2) ペルオキシダーゼ

- (a) 赤血球ペルオキシダーゼ量
- (b) 細菌ペルオキシダーゼ量

3) 呼 吸

- (a) 血球呼吸量
- (b) 細菌呼吸量

第 III 章 総括及び考按

結 語

緒 言

Schottmüller¹⁾ が溶血性連鎖球菌の動物血液に対する溶血現象を見てから連鎖球菌、肺炎菌の溶血現象に関する実験は枚挙にいとまがない程である。然しそれらの実験に用いられた血液は、何れも血中にカタラーゼを有する人、羊、家兎、牛、馬、山羊等であり、特にカタラーゼ欠乏血液を用いて溶血現象を研究したものは殆んど見うけられない。

最近当医学部耳鼻科教室、高原教授はカタラーゼを血液中に殆んどみとめない患者を発見し、すでに同教室宮本氏²⁾ はその詳細な臨床的報告をされ、その中に細菌学的検査も若干含まれている。

著者は細菌の溶血現象特にカタラーゼ欠乏赤血球の溶血現象に関する研究を行い興味ある結果を得た。而して本編に於ては主として種々の細菌並びに諸種の動物赤血球のカタラ

ーゼ、ペルオキシダーゼ量を測定した成績を述べる。

第 I 章 実験材料及び方法

カタラーゼが生体の酸化機構において重要な役を演じていることは言うまでもないが、之が存在しない場合にはペルオキシダーゼとの関係が大きな問題となるのである。カタラーゼを有しないとされている肺炎菌及び溶血連鎖球菌においては H_2O_2 の発生量多く³⁾、カタラーゼ欠乏血液の培地においては、細菌は代謝中に生ずる H_2O_2 のため発育が阻害され、溶血現象においても他のカタラーゼ血液培地とは異つた態度をとるのではないかと考えられる。そこで先ず、カタラーゼ保有血液（以下 K 血液と略す）とカタラーゼ欠乏血液（以下 A-K 血液と略す）、肺炎菌及び溶血連鎖球菌等のカタラーゼ（以下 K と略す）、ペルオキシダーゼ（以下 PO と略す）及び呼吸

量を測定し、その間における差異をしらべた。

1) 実験材料

現在動物界において、血液にカタラーゼを殆んど有しない動物としては家鴨、鳩、鶯鳥等のごとく僅かの種類にしか認められていない。本研究にはあひるの血液を使用した。カタラーゼを有する血液としては人、山羊、家兎、モルモットの4種類を用いた。

細菌では肺炎菌 I, II, III型 (以下 P_I, P_{II}, P_{III} と略す), 溶血連鎖球菌 (以下 H と略す), 緑色連鎖球菌 (V_i と略す) を使用した。このうち溶血連鎖球菌としては伝染病研究所より新に分譲された Cook 株及び患者より分離した「教室株」である。

2) カタラーゼ測定

K 測定法としてはワールブルグ検圧計を用い、藤田氏記述⁴⁾の方法によつた。

(1) 被検血液の処置：生理的食塩水による赤血球浮游液を作り、これを pH 7.2 の磷酸緩衝液にて3回遠心洗滌の後、この沈澱赤血球の 10⁴ 及び 10⁵ 倍稀釈液を作り K を測定した。

(2) 被検細菌の処置：ブルフリッヒ比濁計により 1 cc 中に 2 mg の細菌を含むように菌液を作つた。実験ではワールブルグ装置の主室に血液の場合は赤血球浮游液 2.5 cc, 細菌においては菌浮游液 2.5 cc を入れ、型の如く測定した。

3) ペルオキシダーゼ測定

血球中にペルオキシダーゼの含まれていることはすでに古くより知られている事である。即ち Linossier (1898) が過酸化水素の存在の下で、膿がグアヤック色素を青変するという事を発見してから白血球中にペルオキシダーゼが存在することが確認されている。一般に PO はカタラーゼと共存しているといわれているが、K 欠乏血液では果して存在しているか否かを検査した。PO の量は甚だ微量のため定量は困難とされ、その定量に関する報告は甚だ少い。測定法としては成書にあるオキシドールとピロガロール等を用い、発生したブルプロガリンを定量してペルオキシダー

ゼ量を算定する方法を行つた。

a) 赤血球ペルオキシダーゼ

K 測定に使用した各種動物血球より生理的食塩水の赤血球浮游液を作り、その遠沈せる赤血球の 100 倍稀釈液を作る。

赤血球 100 倍稀釈液	1.0 cc
1/5 Mol 醋酸塩緩衝液	0.3 cc
30% オキシドール 6 倍稀釈液	1.0 cc
1% ピロガロール	10.0 cc

以上の混合液を15分間氷水中に放置後6規定硫酸 5 cc 及びエーテル 10 cc で抽出、抽出液をエーテルで5倍にうすめ、発生せるブルプロガリンの発生量を光電光度計で測定してペルオキシダーゼ量を算定した。なお標準液としては重クローム酸カリ 0.075 g を 0.5 規定塩酸 100 cc にとかしたものをを用いた。

b) 細菌ペルオキシダーゼ量測定

細菌殊に肺炎菌や連鎖球菌の K 量については数多くの報告があるが、細菌の PO 量測定に関するものは殆んどない。K を殆んど有しない上記細菌と K を有する白色葡萄球菌の PO を測定した。肺炎菌 I, II, III型, 溶連菌は教室株及び Cook 株, 緑色連鎖球菌, 白色葡萄球菌の各々を 1 cc 中 3.5 mg を含む菌浮游液を作り、その 9 cc をとる。

菌浮游液	9.0 cc
30% オキシドール	
6 倍稀釈液	1.0 cc
5% ピロガロール	5.0 cc
1/5 Mol 醋酸塩緩衝液	0.3 cc

以上の混合液を作り氷水中に15分間放置、以後の処置は血球におけると同様である。

4) 呼吸量測定

(a) 血球呼吸量の測定

一般に K 保有血球の K 量と赤血球の呼吸量との間には直接深い関係はなく、両者間に平行関係は認められないといわれているが、K 保有血球と K を有しない血球の呼吸量の差異を検した。

前記各動物の静脈血を 1 cc 宛採取、之を磷酸緩衝液 (pH 7.2) で 3 回遠心洗滌し、沈澱した赤血球を元の容積にもどし、更に緩衝液

で2倍に稀釈して用いて、ワールブルグ検圧計でO₂の消費量を測定した。

主室：緩衝液 0.5 cc と上記2倍稀釈赤血球浮游液 2 cc

副室：10% KOH 0.5 cc

側室：グルコース (M/16.6) 0.5 cc

ガス腔は空気とする。

(b) 細菌呼吸量の測定

ブルフリッヒ比濁計を用い、各菌液 1 cc 中に 2 mg の菌量を含むよう調製し、この菌液 2 cc を主室に入れるが、他の操作は血球呼吸量測定時と全く同様である。

第二章 実験成績

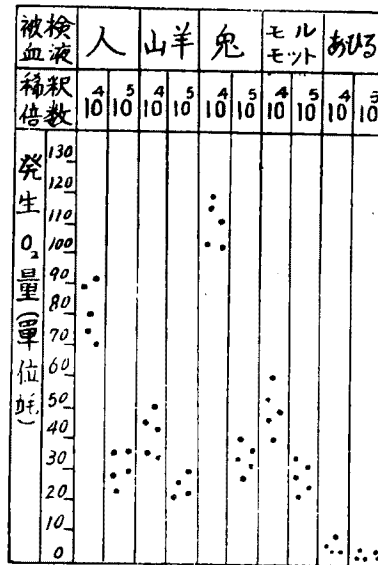
1) カタラーゼ

(a) 動物赤血球カタラーゼ量

30分間に発生せるO₂量を cmm で表わせば第1表の通りである。

各種臓器組織におけるカタラーゼ量は従来より多くの人達により研究されて来た。K量の測定は今迄 Juschtschenko⁵⁾ や Morgulis⁶⁾ の如く含有量の大小を決めたものが多い。又定量的に測定したものでは藤田氏の文献⁷⁾ が詳しいが、氏は人、兎、マウス等の赤血球のカタラーゼ量をカタラーゼ係数を以つて表わしている。それによれば人赤血球K係数は12000、兎6700、モルモットは3000である。著者の実験では赤血球の乾燥重量をもつて行

第1表 動物赤血球カタラーゼ量



ていないので厳格な意味での絶対量を示していないが、相対的量の比較で充分と思われたので実用的で容易に行われる方法を採用した。

第1表で見られる通り兎、人、モルモット、山羊の順にカタラーゼを多く含むが、相互間に特に絶対的な差異は見出し難い。然しあひるの血液では前4者と異り、絶対的な差がみとめられ、殆んどアカタラーゼの状態に近いといつてよい。各血液のK量を十数回測定しその平均値を示したものが第2表である。

第2表 動物赤血球カタラーゼ量平均値

	人		山羊		兎		モルモット		あひる	
稀釈倍数	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵
30'O ₂ (cmm)	85.0	28.4	35.7	18.4	92.0	30.7	52.0	22.0	3.4	1.5

同時に鷺鳥の血液のK量を測定したが、あひるの場合と殆んど同程度である。なおこれら動物の赤血球のK量と、同様にして測定した血液のK量との間には殆んど有意の差をみとめなかつた。又動物間においてその赤血球数及び血色素量の差によるK量の変化は殆んどみとみられなかつた。即ち正常範囲内の赤血球数と血色素量を有する同一種動物の血液のK量は大体一定しているものと考えられ

る。

(b) 細菌カタラーゼ量

細菌のカタラーゼ量についてはすでに Gottstein (1893) 以来屢々諸家により研究され、Stapp⁸⁾ 等の報告があるが細菌の増殖の時間的変移を考慮しなかつたり、或はカタラーゼ反応の際の pH を顧みなかつたり、過酸化水素消費量とK量と正比例しない条件で行つたりしているため、その値も器具の不完全

さとともに定性的な価値しか有しないものが多かつた。この方面で定量的と思われる業績は Virtanen & Karström⁹⁾及び本邦の前記藤田氏⁷⁾以外には余りないようである。K量の単位としては次の如き係数が用いられる。

$$\text{係数} = \frac{\text{反応速度恒数K}}{\text{菌 数}}$$

第 3 表 各種細菌カタラーゼ量 (30分間に発生せるO₂量cmm)

	Pi		PII		PIII		H(教室株)		H(Cook)		Vi	
重量 (mg)	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1
30'O ₂ (cmm)	1.4	0	1.5	0	8.5	1.8	34.8	3.6	13.1	1.2	85.7	12.5

[註] 同一菌種を同一状態において5回測定しその平均値を示す。P=肺炎菌, H=溶血連鎖球菌, Vi=緑色連鎖球菌

この表で見られる通りPは各菌型ともKを殆んど有しない。次でHのCook株, 教室株であるがこれらも非常にKは少く, 実際的には余り問題にならない。ただViでは若干Kを含んでいるようである。

2) ペルオキシダーゼ

(a) 血球ペルオキシダーゼ量

成績は第4表に示す通りである。

第4表 血球ペルオキシダーゼ量

	人	山羊	兎	モルモット	あひる
ペルオキシダーゼ量	0.24	0.24	0.24	0.24	0.34

[註] 500倍稀釈1cc中含有量, 単位 mg

Kを有する動物の血球中のPO量は人間も他の動物も殆んど同じ量を有する。然しKを有しないあひるの血球中のPOは前者よりやや多い。今人血球中のPO量を100とすれば, K保有動物群のそれは100となり, K欠乏動物では140となる。この程度の差に意義をみとめることは危険であるが, K欠乏血においてもPOの存在は確実で, かつ他のK保有血液と等しいか或いはそれ以上保有することは注目すべきである。

(b) 細菌ペルオキシダーゼ量

成績は第5表に示す。

細菌の中にも痕跡程度であるがPOを有す

然し, 速度恒数は時間とともに変化し易く, かつ菌数計算はかなり誤差が多いのでさほど正確とは思われない。著者は細菌のK量を測定するにあたりpHはすべて厳に7.2に一定し測定時間も可及的短時間とするため30分間とした。実験の結果えた数値の平均値を第3表に示した。

第5表 各細菌ペルオキシダーゼ量

	Pi	PII	PIII	H	Vi	St.al
ペルオキシダーゼ量	0.011	0.011	0.011	0.0098	0.0096	0.0094

[註] 6.1mg 菌量中の含有量 (単位 mg) 略符号はカタラーゼ測定表と同じ St.al は白色葡萄球菌

ることは事実である。表中のHはCook株及び教室株の溶連菌をさすが両者間に殆んど差を認めなかつた。溶連菌及び緑連菌とK保有菌たる白色葡萄球菌との間にはPOの量的差異は殆んどないが, 肺炎菌の各型は他の菌に比しやや多いようである。

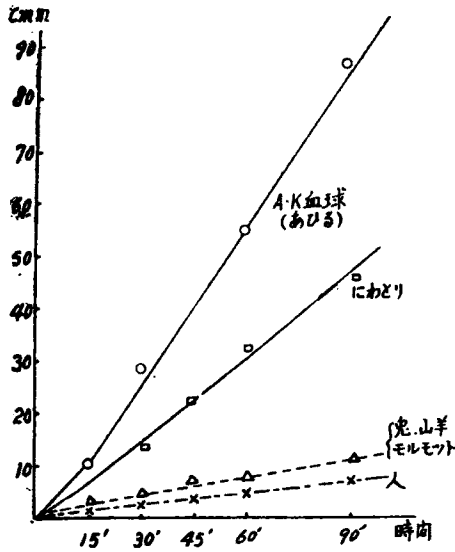
3) 呼吸

(a) 血球呼吸量

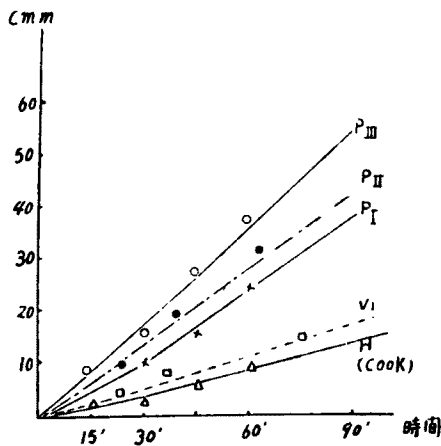
結果は第1図に示す。

K非保有動物たるあひるの呼吸量はK保有群に比し著るしく大である。鳥類は一般に有核赤血球であり, 代謝機能が大きい事が考えられる。K群は殆んど同程度の呼吸量を示している。なお同時に鶏の有核赤血球で呼吸量を測定したが, それは人等の血球呼吸量より大であるが, あひるには及ばない。又有核赤血球の呼吸量は一般に安定しているが, 哺乳動物では時により測定値にかなりの変動がある。例えば人においては疾病を有しなくても赤血球の交替現象は繁く, 新旧の複雑な混在

第1図 動物赤血球呼吸曲線



第2図 各細菌の呼吸曲線



性によりその数値の変動性は不可避である。

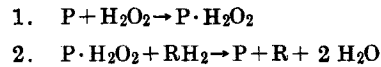
(b) 細菌の呼吸量

成績は第2図に示す。

図表に見る如く各菌種間に著明な差は認められないが、Kを保有しない肺炎菌群は、Kを僅かにより多く含む連鎖球菌群よりやや大きい呼吸量を有する。然し細菌は菌種及び菌株の異なるに従つて各々の要求する栄養素の関係に相異があるので呼吸量の測定結果をKの有無と直ちに関連づけることは難かしい。

第三章 総括及び考按

1) カタラーゼは植物よりも動物に特徴的なものであり、好気性菌や多くの嫌気性菌にも含まれている。これは H_2O_2 を水と分子状酸素に分解する反応を触媒し、他の酸化反応で生じた H_2O_2 を無害にすることにより保護機構の役割をしているものと考えられる。然し最近 Keilin & Hartree によつて或る種のオキシダーゼによる基質の酸化過程に少量のカタラーゼを加えることにより種々のアルコール類が酸化されることが見出された。かくの如くカタラーゼは生体の酵素系に重要な役割を果していることも明かになった。一般に K と PO とは共存するといわれているが、K を所有しない動物赤血球及び細菌における PO の量は、K を保有するそれらのなかの PO 量と殆んど同程度か或いはそれ以上存在することを知つた。PO の生理学的意義に関しては現在なお不明な点が多い。PO は H_2O_2 の存在の下に多価フェノール類、色素類を酸化するが、特殊の場合として還元チトクローム C、トリプトファン、チロシン、アスコルビン酸等も酸化の基質となりうる。それで細胞に生ずる過酸化水素の分解にも役立つと考えられる。何れにせよ A-K 血液の動物においては PO の存在は極めて重要であろう。PO の H_2O_2 や被酸化物 (R) とその反応は次の如く表わしうる (次式の P はペルオキシダーゼをあらわす)。



尚これらの反応は -CN により阻害される。恐らく上記の反応で A-K 動物内の H_2O_2 の一部は処理されていると推測される。

2) Warburg¹⁰⁾ によれば哺乳動物の赤血球の呼吸量は非常に少く、鷲鳥の如き有核赤血球は甚だ大きいといっている。鷲鳥もあひるも共にその血球中の K 量は甚だ微量で殆んど無きに等しい。又未成熟哺乳動物の赤血球の呼吸量もかなり大きい。然し Harrop 等¹¹⁾ は、赤血球の呼吸量が種類の異なるにつれこ

のように大きな差を示すことを赤血球の核の存否に帰することに不満足の意を表わし、哺乳動物の赤血球の中には呼吸を抑制するような或る物質が作られているように推測されると述べている。

細菌の呼吸は、肺炎菌諸型と連鎖球菌との間には殆んど差がない。又カタラーゼ量の大小と呼吸量との間には直接の相互関係があるようには考えられない。

結 語

1) 人、山羊、兎、モルモットの血液はカタラーゼを有し、その間に著差は認めないが、あひる、鷺鳥の類はカタラーゼを殆んど有し

ない。

2) 上記カタラーゼ保有動物血球とカタラーゼを所有しない動物血球との間ではペルオキシダーゼ含有量に大差はないが、後者においてやや多い。

3) あひるの赤血球呼吸量はK保有動物群のそれより遙に大である。

4) 肺炎菌I, II, III型ではカタラーゼは陰性、溶連菌、緑連菌では僅かに之を証明しうる。

5) 上記各細菌は、他のK保有菌と殆んど同程度のペルオキシダーゼを有する。

6) 各供試菌の呼吸量には著差を認めなかつた。

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) Schottmüller, H. M. m. W. 20/21, (1903) | 7) 藤田秋治：東京医事新誌, 2699, 2549, (1930) |
| 2) 宮本久雄：岡山医学会誌, 64, 4, 817, (1952) | 8) Stapp: Zbl. Bakt., 92, 160, (1924) |
| 3) McLeod & Gordon: Bioch. J., 16, 499, (1922) | 9) Virtanen & Karström: Bioch. Z., 161, 9, (1925) |
| 4) 藤田秋治：検圧法とその応用 (冊24) | 10) Warburg, O.: Z. phys. Chem., 112, (1909) |
| 5) Juschtschenko: Arch. Seibiol. Peterb., 16, 51, (1911) | 11) Harrop, G. A.: J. Exp. Med., XLVIII, 2, 212, (1928) |
| 6) Morgulis & Levine: J. Biol. Chem., 41, 42, (1920) | |

Studies on the Action of Some Bacteria on Erythrocytes.

Part 1: Catalase and Peroxidase Activities, and Respiration of Pneumococci, Streptococci and Erythrocytes.

By

Mansuke Matsumoto

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Murakami)

The studies on the hemolytic action of pneumococci and streptococci have been conducted principally with the use of catalase carrier blood. Prof. Takahara has recently encountered the patients whose blood carried hardly any catalase. For the fundamental investigation for acatalasemia, some experiments have been attempted about actual hemolytic picture of some bacteria acting upon the catalase and non-catalase carrier blood.

In the present report, blood of man, goat, guinea pig, and rabbit were used as catalase carrier, and that of domestic duck as non-catalase carrier. As for the bacteria, *Pneumococcus* type I, II and III, *Streptococcus hemolyticus* (Cook strain), and *Streptococcus viridans* have

been employed for the experiments. And by measuring the catalase and peroxidase activity and respiration of each experimental materials, the following results have been obtained.

1. Erythrocytes and blood of man, goat, rabbit and guinea pig contains catalase, but there is practically no substantial difference in their contents; whereas that of domestic duck hardly possesses any catalase.

2. Peroxidase activities both in the catalase carrier and the non-catalase carrier erythrocytes and blood are approximately the same.

3. O_2 uptake during respiration of domestic duck erythrocytes are far more than those of the catalase carriers, and this can be assumed to be dependent upon the presence or absence of nuclei as well as upon the amount of stroma.

4. Catalase activities in *Pneumococcus* type I, II and III are negative, and are slightly positive in *St. hemolyticus* and *St. viridans*.

5. Peroxidase activities in these bacteria nearly coincide.

6. No marked differences can be found in O_2 uptake among the bacteria employed in the experiments.
