

結核菌物質代謝に関する研究

第 1 編

毒力並びに弱毒株の生菌浮游液による
脱水素酵素反応について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

岡 好 万

〔昭和32年5月9日受稿〕

目 次

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 緒 言 2. 実験材料並びに実験方法 3. 実験成績 <ol style="list-style-type: none"> A. 糖類, 糖アルコール類を基質とした場合 | <ol style="list-style-type: none"> B. 有機酸を基質とした場合 C. アミノ酸を基質とした場合 4. 総括及び考案 5. 結 論 |
|---|--|

1 緒 言

従来結核菌の毒力の決定は感受性動物に対する病原性に待つものが多かった。Rich (1944)¹⁾ は毒力は感受性動物の組織内に於ける増殖能力と比例することを述べ、金井 (1955)²⁾ もこれを支持する実験結果を得ている。最近毒力を生化学的に解析せんとする努力が払われるに至つたが歴史は極めて浅い。

Dubos(1949)³⁾ は DL-serine を 0.01~0.02% 濃度に培地に添加することにより毒力株の発育を阻害し、又彼⁴⁾(1948) は毒力株は neutral red と共に振盪することにより赤染するが、無毒株ではこれが認められないことを述べている。

又菌体成分と毒力を関係づけようとする努力はその重点が所謂抗酸性物質に見出される。Anderson(1941)⁵⁾ が H 37 株より mycolic acid を抽出し、Asselineau と Lederer(1950)⁶⁾⁷⁾ は mycolic acid を詳細に追究し、人型毒力株より抽出した mycolic acid は $-OCH_3$ 基を有するが、無毒株はこれを全く欠いているか又は極めて少いことを確認している。又 Middle-

brook, Dubos, Pierce(1947)⁸⁾ は cord 形成を毒力株にのみ認めることを述べているが Yegian, Kurung は streptomycin 依存株の実験でこれを反証している。しかし Bloch (1953)⁹⁾ は毒力株の比較的若い培養から cord 形成物質 "cord factor" を石油エーテルで抽出し、更に cord factor 抽出残渣は生活力を保有しているが毒力も cord 形成も欠けていることを述べ Middlebrook 等の考え方に同意している。

Bloch(1950)¹⁰⁾ は更に脱水素酵素反応により抗酸性菌の毒力の判定が可能であることを報告している。即ち非病原性抗酸性菌は 1~3 分以内に、無毒株又は BCG は 2~15 分以内に完全に methylen blau (以下 Mb と略す) を脱色するが若い毒力株は 60 分以内には脱色が起らないことを認めている。又 Desbordes, Fournier(1952)¹¹⁾ はこれと全く同一の成績を得、更にこの反応には lipid が重要な部分として役割を演じていると記述している。Patnode, Wrinkle, Beasley(1954)¹²⁾ は酸化還元色素の脱色試験と、感受性動物に対する病原性とは殆んど一致する結果が得られ臨床的

応用への可能性を暗示している。又 Wilson, Kalish, Fish(1952)¹³⁾は H37 Ra 株と BCG は酸化還元色素による脱水素反応で毒力株と同一の態度をとつた。このことは、これら弱毒株の起元が毒力株に由来しているためではないかと推察している。

以上の如く脱水素反応を通覧するに、各種基質との関係を検討した基礎的実験は極めて少なく、更に結核菌のみならず抗酸性菌の物質代謝に関する報告と範囲を拡大して見ても、その殆んどは鳥型菌、非病原性抗酸性菌を主体としたものであり毒力株を用いての系統的实验は稀である。このことは毒力株が一般に培養に長期間を要すること、更に危険性が高いためではないかと思われる。

著者は人型 H37 Rv, H37 Ra, 牛型 263, BCG の各株を使用し、各種基質について Thunberg氏(1934)¹⁴⁾法により脱水素反応を実施し成績を比較検討した。

以上の各株を撰んだ理由は毒力株である H37 Rv, 牛型 263 の両株に対するそれぞれの弱毒株である H37 Ra, BCG 両株を比較するためである。しかし牛型 263 に対し BCG を与えたことは必ずしも適当とは思っていない。

2 実験材料並びに実験方法

供試細菌・人型 H 37 Rv, H37 Ra 及び牛型 263, BCG の各株で何れも伝研より分与されたもので、供試前は小川¹⁵⁾氏中性培地に継代培養せるものである。

培養法：上記各株を sauton 液体培地¹⁶⁾に發育せしめた比較的幼若菌(2週菌)と老令菌(6週菌)を供試した。

生菌浮游液の作製：發育菌を遠心管に集め、硝子棒で充分攪拌しながら 0.02mol. 磷酸緩衝液、pH 7.0 (0.85% NaCl を含む)を添加し 4000 r, p, m にて 20 分遠心沈澱し、その上清を捨て更に同様の装作を 4 回繰返し充分洗滌し、最後の沈澱部を濾紙上に集めて脱水し、次いで化学天秤にて秤量し前記緩衝液にて 1 ml : 20mg の生菌浮游液とした。浮游液

の作製は磨碎フラスコに秤量菌を集め氷冷しながら手振り法により作製した。

基質：各種糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸で何れも市販の最純品を撰び、再蒸溜水にて 0.1mol 濃度に溶解せしめ、溶液の pH は 7.0 に NaOH 液にて補正した。

酸化還元色素：0.0002mol 濃度の Mb を使用した。

試験は Thunberg 管主室に 0.02 mol 磷酸緩衝液、0.5ml, 基質、0.5ml, Mb, 0.25ml を、又副室に生菌浮游液、0.5ml を容れ、氷冷しながら真空ポンプにて 5 分間吸引排気(水銀柱 2~3 mm. Hg), 次いで 37°C の恒温槽にて 2 分間保温してから生菌浮游液を主室に速かに完全に流し込み、その時より Mb が脱色するまでに要する時間を測定し、その所要時間の逆数をもつて実験成績に示すことにした。

対照は基質添加の代りに 0.85% NaCl 液、0.5ml を添加した。

3 実験成績

A) 糖類、糖アルコール類を基質とした場合。

結核菌の發育に於て glycerol が炭素源(以下 C 源と略す)として重要な役割を演じていることは Proskauer, Beck, Long(1919)¹⁷⁾等が詳細に報告し、更に糖、糖アルコールは glycerol の代用にはなり得ないと述べているが、其の後多くの研究者の実験の結果、glucoses は C 源として利用されるが其の他のものについては確定的なものはない。

著者は 5 炭糖として arabinose, xylose, rhamnose, 6 炭糖として glucose, mannose, galactose, fructose を、2 糖類として sucrose, trehalose, maltose, lactose を、糖アルコールとしては sorbitol, inositol, adonitol, mannitol, dulcitol を基質として使用した。

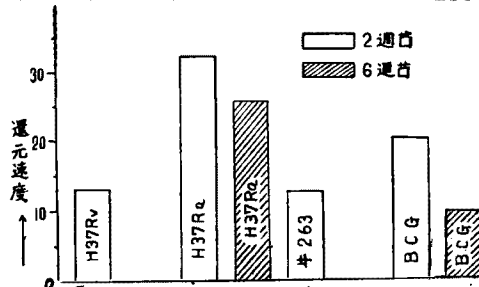
2 週菌の H37 Rv と H37 Ra との脱水素反応の比較は表 1 に示した。H37 Rv に於ては何れの基質を使用しても Mb 還元速度は一樣に低く、特に優れたと認めらるべき基質は見

表 1 Mb 脱色時間の比較 (糖, 糖アルコール)

substrate	2週菌		6週菌		2週菌		6週菌	
	H37Rv	H37Ra	H37Rv	H37Ra	牛263	BCG	牛263	BCG
non substrate	77' "	31' "	—' "	39' "	80' "	50' "	—' "	105' "
glycerol	77	25	—	25	34	38	—	50
arabinose	78	31	—	36 30	28	41	—	82
xylose	61	27	—	26	43	53	—	42
rhamnose	67	23	—	38	40	40	—	87
glucose	62	17 30	—	30	38	23	—	68
mannose	67	19	—	28	34	24	—	75
galactose	65	21 30	—	34	34	25	—	78
fructose	60	24	—	36	32	36	—	60
sucrose	66	28	—	38	35	37	—	72
trehalose	62	27	—	26	28	22	—	75
maltose	75	27	—	34	45	37	—	87
lactose	73	28	—	42	35	36	—	78
sorbitol	72	30	—	38	55	34	—	138
inositol	69	33	—	30	64	42	—	—
adonitol	67	34	—	32	55	35	—	—
mannitol	63	32 30	—	37	50	36	—	75
dulsitol	65	28	—	33	57	40	—	—

当らない。換言すれば各基質添加時に於ける還元速度と対照のそれとは大同小違である。又対照の還元速度を H37 Ra の対照と比較すると遙かに速度は低下している。(図1)。

図1 無基質(対照)に於ける Mb 還元速度



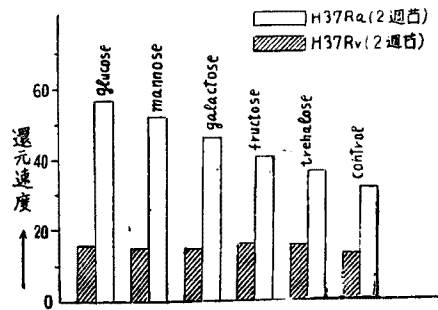
注: H37Rv, #263の6週菌は脱色が見られない。
還元速度は脱色時間の逆数で示した。
以下2~6まで同様である。

H37 Ra の基質添加時に於ける成績は H37 Rv と異り, glucose 添加時は対照に比して倍近く速度が高められ, 次いで mannose, galactose の順で glycerol, 5 炭糖, 2 糖類, 糖アルコールの場合は対照と比し大差を見なかつた。

以上のことより 2週菌の H37 Rv では基質添加の効果は認め難いが, 同一条件の H37

Ra では glucose を最良とし 6 炭糖に幾分効果認められた (図2)。

図2 6炭糖及び trehalose の Mb 還元速度に及ぼす影響



次いで 6 週菌の H37 Rv は 140 分間の観察に於て; 基質添加, 対照の何れの場合にも脱色は起らなかつた。このことは脱水素酵素能の不活化と認むべきであろう。然るに同一条件の H37 Ra では, 活性度は 2 週菌に比して全般に低下は来しているが充分認められ glycerol, xylose, trehalose は 2 週菌の還元速度との間に余り差が見られない (表1)。

牛型 263 と BCG の 2 週菌はともに, 基質

添加時の還元速度が対照よりも一般に高い。又両株の対照の比較は、H37 Rv と H37 Ra の比較に於けると同様弱毒株である BCG が還元速度は高い(表1, 図1及び3)。牛型263では6炭糖も利用効果は認められるが arabinose, trehalose の効果は更に高い。BCG

図3 6炭糖及び trehalose の Mb 還元速度に及ぼす影響

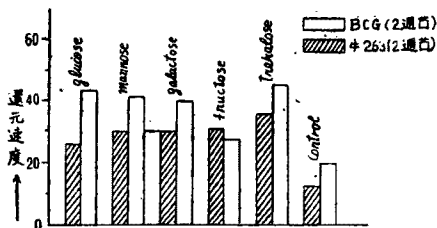
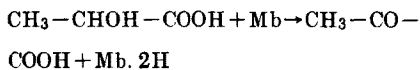


表2 Mb 脱色時間の比較 (有機酸)

substrate	2週菌		6週菌		2週菌		6週菌	
	H37Rv	H37Ra	H7Rv	H37Ra	牛263	BCG	牛263	BCG
non substrate	77'	"	31'	"	—'	"	39'	"
pyruvate	8	8	50	6 30	8 30	16	15 30	8 30
lactate	6	4 30	65	5	9 30	19	65	42
acetate	76	30	—	27	60	35	—	104
citrate	67	24	—	23 30	67	32	—	95
succinate	45	14 30	—	24	33	18	—	47
malate	47	16	—	26	40	20	—	52
fumarate	50	19	—	30	39	25	—	56
tartrate	73	19 30	—	30	59	34	—	102
oxalate	72	23 30	—	38	60	40	—	66
n-butyrate	75	29	—	25 30	50	48	—	133

に次式を与えている。



大林等(1947)²⁰⁾は BCG で脱水素反応を検し lactate が最も還元され易く succinate, malate, pyruvate も基質として優れていることを述べている。

著者が基質として使用した有機酸は直接 TCA. cycle と関係のある pyruvate, lactate, acetate, citrate, succinate, malate, fumarate と, その他 oxalate, tartrate, n-butyrate の計10種である。

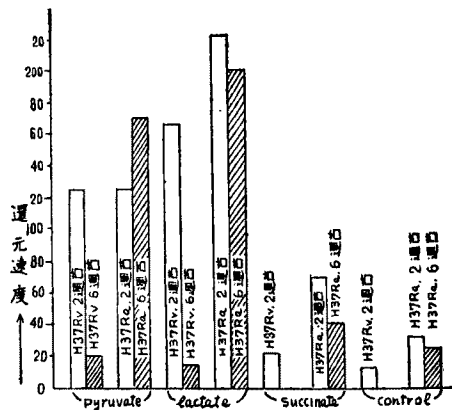
では arabinose の効果は低く, fructose を除いた6炭糖, trehalose に於て高い, xylose は両株ともに効果は低い。

牛型263の6週菌では H37 Rv のそれと同様全く活性が認められない。然るに同一条件の BCG に於ては還元速度の低下は著しいけれども, H37 Ra の6週菌の如く脱色は起り得る。BCG の6週菌に xylose を添加場合は, 2週菌のそれと比較して脱色時間に著差を認めなかつた(表1)。

B) 有機酸類を基質とした場合

Loeber等(1931)¹⁸⁾は lactate が結核菌でよく利用されることを認め, Edson (1943, 1947)¹⁹⁾は M. phlei で同様に lactate が Mb の存在下で嫌氣的に脱水素されて pyruvate となる為

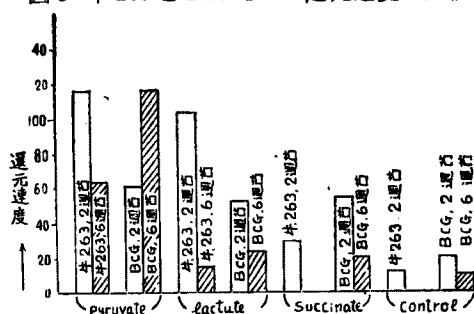
図4 H37R と H37Ra の Mb 還元速度の比較



注 H37Rv. 6週菌は succinate, control に於て脱色を認めない。

H37 Rv の 2 週菌に lactate を添加した場合約 12 倍, pyruvate で 9 倍, succinate で 1.6 倍対照の還元速度よりも高められた。しかしその他の有機酸に於ては対照との間に余り差は認められなかつた。同一条件に於ける H37 Ra では基質が lactate の場合 7 倍, pyruvate で 4 倍, succinate で 2 倍, tartrate で 1.6 倍還元速度は高められた(表 2, 図 4)。

図 5 牛 263 と BCG の Mb 還元速度の比較



注 牛 263, 6 週菌は succinate, control に於て脱色を認めない。

牛型 263 の 2 週菌では lactate で 10.5 倍, pyruvate で 11.6 倍, succinate. 2.7 倍, n-butyrate. 1.8 倍, malate. 1.6 倍, 同一条件の BCG に於ては lactate. 2.6 倍, Pyruvate, 3.1 倍, succinate. 2.7 倍, citrate. 1.5 倍, tartrate で 1.4 倍それぞれの対照よりも還元速度が高められた(表 2, 図 5)。

H37 Rv の 6 週菌では pyruvate, lactate を添加した場合に僅かに酵素活性が認められるが, その他の基質添加の場合並びに対照に於ては活性は認められなかつた。同一条件に於ける H37 Ra では oxalate, tartrate 特に succinate に対する活性の低下は起るが, acetate, citrate, n-butyrate 特に pyruvate, lactate に対する活性度は 2 週菌と殆んど変わるところがない。即ち H37 Ra の 6 週菌に於ける対照の還元速度は, 2 週菌のそれに比較して低下しているにかかわらず pyruvate, lactate 等の還元速度に変化はなく見掛上では pyruvate, lactate の還元速度は 2 週菌より高められている(図 4)。

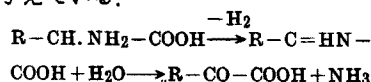
牛型 263 の 6 週菌の Mb 脱色は前記 H37

Rv と同様 pyruvate, lactate のみに起る。しかしその程度は 2 週菌に比して著しく低下している。同一条件に於ける BCG を酵素液とした場合は対照を始め, 各基質添加時の酵素活性の低下は認められるが, 興味あることに pyruvate のみは 2 週菌に比し活性度は著しく高められた(図 5)。

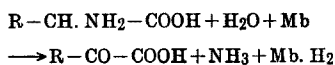
即ち H37 Rv, H37 Ra の 2 週菌では lactate, pyruvate は還元速度が同程度か, むしろ lactate を基質とした場合高くなるが, 同一条件の牛型 263, BCG に於ては lactate は pyruvate よりも還元速度は低い。この傾向は 6 週菌の比較に於て特に著明である。又毒力株(H37 Rv, 牛型 263)の 6 週菌では lactate, pyruvate を除き Mb の脱色は全く起らないが, 弱毒株(H37 Ra, BCG)に於ては殆んど各基質に対し活性の低下は起るが消失は見ない。興味あるのは弱毒株の 6 週菌では pyruvate, lactate の添加時に於ける還元速度は 2 週菌と何等変るところはない。特に H37 Ra に於てこの傾向が強い。又 2 週菌の毒力株は succinate に対する還元速度が弱毒株よりもやや低いようである。

C) アミノ酸類を基質とした場合

Wieland (1924)²¹⁾の脱水素酵素説が多くの研究者の間に認められるに至り, 生体内でアミノ酸より最初に生ずるものはケト酸であり, オキシ酸は二次的に還元されて生ずると述べた Neubauer (1910)²²⁾の考えが支持されるにいたつた。赤堀²³⁾は又酸化的アミノ基脱は加水分解のアミノ基脱よりも遙かに容易に起ることを述べている。Krebs(1933)²⁴⁾は細菌による酸化的アミノ基脱はアミノ酸々化酵素により一旦脱水素されイミノ酸となり自動的に加水分解されてケト酸になることを確認し次式を与えている。



この反応を見るとアミノ酸脱水素酵素の一つとも見ることが出来る。即ちこれを Thunberg 法による Mb を acceptor とした反応に置換すれば,



なる式が与えられる。

代居 (1951)²⁵⁾は結核菌の無酸素状態に於けるアミノ酸脱水素反応の至適 pH は相当アルカリ側にあり、又結核菌によるアミノ酸のアミノ基脱は酸化的並びに分子内的アミノ基脱

によると述べている。

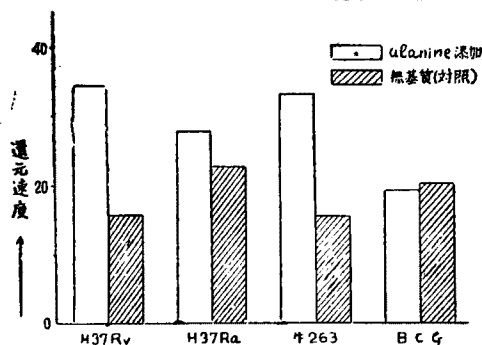
著者が供試したアミノ酸は glycine. DL- α -alanine. DL-valine. L-leucine. DL-serine. L-methionine. L-lysine. L-arginine-HCl. L-proline. L-histidine-HCl. DL-tryptophan. 及び glutamate の12種のアミノ酸と asparagine である。

表 3 Mb 脱色時間の比較 (アミノ酸)

substrate	2週菌		6週菌		2週菌		6週菌	
	H37Rv	H37Ra	H37Rv	H37Ra	牛 263	BCG	牛 263	BCG
non substrate	62' "	44' "	—' "	57' "	64' "	50' "	—' "	60' "
glycine	48	42	—	60	60	46	—	48
alanine	29	35 30	—	51	30	52	—	69
valine	57	39	—	52	50	59	—	63
leucine	53	34 30	—	51	50	37	—	51
serine	56	36	—	50	49	53	—	55
methionine	55	38	—	52	49	43	—	58
lysine	57	38	—	67	60	40	—	71
arginine	54	45	—	60	65	56	—	55
proline	53	42	—	47	46	53	—	66
histidine	50	42	125	50	50	34	—	51
tryptophan	45	34 30	104	50	47	45	118	47
glutamate	41	42	—	56	50	36	—	51
asparagine	46	39	—	58	56	46	—	64

アミノ酸を基質とした場合 Mb 脱色に要する時間は一般に長い (表 3)。

図 6 各株 2週菌で alanine を基質とせる場合の Mb 還元速度の比較



H37 Rv の 2 週菌で alanine を基質とした場合は、その還元速度が対照より約 2.1 倍高められ特色を示しているが glutamate では 1.6 倍、更に tryptophan. asparagine. glycine. histidine では 1.4~1.2 倍と還元速度は低下

し、alanine 以外では基質添加による効果は認め難い。同一条件の H37 Ra に於ては alanine を含む全基質に於て著明な効果は見られなかつた (図 6)。

H37 Rv の 6 週菌では histidine, tryptophan 添加時に長時間の観察で脱色が起つたが其の他の基質では認められない。同一条件の H37 Ra は 2 週菌よりは活性は低下しているが全基質で脱色が見られる。しかし基質添加による効果的脱色は見られなかつた (表 3)

次に牛型 263 と BCG の 2 週菌、6 週菌の比較に於ても前記 H37 RV と H37 Ra の関係と同一の傾向が見られた (表 3, 図 6)。

以上の如くアミノ酸を基質とした場合の Mb 脱色に於ける特色は各株の 2 週菌の alanine に対する態度である。即ち alanine は毒力株により還元速度を高めるが弱毒株では効果は殆んど見られない。

代居(1951)²⁵⁾は Mb の還元速度の最も高いのは phenylalanine であるとし、川畑(1934)²⁶⁾は histidine を良としているが各々実験条件を異にしているので完全な比較は出来ない。

4 総括及び考按

pH. 7.0 の状態で各種基質の単独添加時に於ける結核菌浮遊液による脱水素酵素反応を検討し、これより毒力株と弱毒株の関係を追究した。

毒力株、弱毒株の2週菌の無基質(対照)に於ける Mb 還元速度を比較すると、毒力株よりもそれに対応する弱毒株が速度は常に高い。これは Bloch (1950)¹⁰⁾の説と全く一致する。更に毒力株の6週菌は無基質の場合に脱色は全く起らないが、弱毒株のそれでは充分に認め得られる。このことは供試した弱毒株の発育は毒力株より弛かたで酵素活性が長期に互り存続するためではないかと思われる。

H37 Rv の2週菌では使用した糖、糖アルコール中還元速度に於て、無基質の対照との間に有意の差が見られるものはなかつた。然るに同一条件の H37 Ra では glucose を最良とし6炭糖(fructoseを除く)に於て還元速度を高めることが出来た。この傾向は牛型 263、BCG の両者の比較に於ても見られた。更に牛型 263、BCG に於ては trehalose が glucose と同程度有効である。BCG が trehalose を速かに酸化することが出来ることは Fitzgerald, Bernheim (1947)²⁷⁾も述べている。

毒力株の6週菌は何れの糖、糖アルコールに於ても脱色は起らないが、弱毒株の6週菌ではこれが起り得る。しかし2週菌に比して速度は低下しているし又低下度は H37 Ra よりも BCG に於て著しい。

嫌気条件に於ける Mb 還元速度のみから Embden-Meyerhof の経路の個々について論ずることは出来ないが、糖類に於て Mb 還元が活潑でないことは Ebina, Nakamura (1937)²⁸⁾の述べている如く結核菌の嫌氣的解糖の極めて弱いことによるものと思われる。

基質に有機酸を撰んだ場合には極めて興味

ある成績が得られた。

pyruvate, lactate は使用した糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸中何れの株にも最良の基質であり、このことは特に H37 Rv, H37 Ra, 牛型 263 で云える。

H37 Rv, H37 Ra の2週菌は共に lactate を基質とした場合最も還元速度は高く pyruvate がこれに次ぐが両者間に著差は認められない。然るに H37 Rv の6週菌では lactate, pyruvate とともに著明な速度の低下を来すが H37 Ra の6週菌は2週菌と比して全く低下が起らない。次に牛型 263 と BCG の2週菌は H37 Rv, H37 Ra とは逆に pyruvate 添加時に還元速度は最も高く lactate はやや低くこれに次ぐ。又 BCG に於ける pyruvate, lactate の還元速度は牛型 263 のそれに比して著しく低い。

又牛型 263 の6週菌に於ては pyruvate 特に lactate は還元速度が著しく低下する(H37 Rv 程ではない)が、BCG の6週菌では pyruvate はむしろ2週菌より速度は高められ lactate のみ低下した。

即ち pyruvate, lactate に対し H37 Rv と H37 Ra の示した関係と、牛型 263 と BCG の態度は同一の傾向のものと思われ毒力株と弱毒株に於ける有意の差と思われる。

又 succinate は弱毒株の2週菌に於て毒力株よりやや還元速度が高い結果を示した。

アミノ酸を基質とした場合の Mb 還元速度に於ては有機酸で見られた如き有効な基質は見当らなかつた。glutamate, asparagine が結核菌培地に N 源として好んで使用されるにもかかわらず、嫌氣的条件に於ける還元速度は他のアミノ酸と比して何等優劣は決せられない。

但し毒力株の2週菌に於て alanine が基質である場合には、無基質の対照よりも還元速度は高められたが同一条件の弱毒株に於てはかかる現象は見られなかつた。

毒力株の6週菌では何れのアミノ酸でも Mb 還元は起らないが、弱毒株に於ては還元は見られる。しかし速度は著しく低い。

5 結 論

結核菌毒力並びに弱毒株で各種糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸を基質として Thunberg 法により脱水素酵素反応を比較検討し次の結果を得た。

1) 弱毒株の2週菌は無基質に於て毒力株のそれよりも Mb 還元速度が高く、又6週菌の毒力株は無基質では還元が見られない。

2) 基質として糖、糖アルコールを求めた場合は毒力株と弱毒株、又基質相互の間に著差は認めないが弱毒株の2週菌は毒力株のそれに比し、glucose を始め6炭糖で還元速度が高められる。

3) 毒力、弱毒株に関係なく pyruvate,

lactate は供試基質中最も還元速度を高めた。

4) 毒力株の6週菌は2週菌に比し pyruvate, lactate を基質とした場合還元速度が著しく低下するが弱毒株では殆んど低下を見ないか或いは低下が著明でない。

5) succinate は弱毒株の2週菌で毒力株のそれよりも還元速度がやや高められる。

6. 毒力株の2週菌は alanine を基質とした場合還元速度が高められるが、弱毒株ではこれが見られない。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて研究に種々便宜を計つて下さつた北村博士に感謝する次第です。

文 献

- 1) Rich, A. R.: The pathogenesis of tuberculosis, Charles, C. Thomas, 101, 1944.
- 2) 金井: 日本細菌学雑誌, 10, 427, 1955.
- 3) Dubos, R. J.: Am. Rev. Tuberc., 60, 385, 1949.
- 4) Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 58, 698, 1948.
- 5) Anderson, R. J.: Chem. Rev., 29, 255, 1941.
- 6) Asselineau, J.: C. R. Acad. Sci., 230, 1620, 1950.
- 7) Asselineau, J. and Ledere, E.: Nature., 166, 782, 1950.
- 8) Middlebrook, G., Dubos, R. J. and Pierce, C. H.: J. Exp. Med., 86, 175, 1947.
- 9) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67, 629, 1953.
- 10) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 61, 270, 1950.
- 11) Desbordes, J. and Fournier, E.: Am. Rev. Tuberc., 66, 382, 1952.
- 12) Patnode, R. A., Wrinkly, C. K. and Beasley, C.: Am. Rev. Tuberc., 69, 599, 1954.
- 13) Wilson, F. J., Kalish, C. and Fish, C. H.: Am. Rev. Tuberc., 65, 187, 1952.
- 14) Dixon, M.: Biochem. J., 28, 237, 1934.
- 15) 小川: 結核菌の基礎と応用.
- 16) Jensen, K. A.: Sub-Committee of Laboratory Method, 105.
- 17) Long, E.: Am. Rev. Tuberc., 3, 86, 1919.
- 18) Loeber, R. O., Schorr, E. and Richardson, H. B.: Trans. Nat. Tbc. Assoc., 26, 196, 1931.
- 19) Edson, N. L. and Hunter, G. J. E.: Biochem. J., 37, 536, 1943, 41, 139, 1947.
- 20) 大林他: 医学と生物学, 10, 311, 314, 1947.
- 21) Wieland, H. and Bergel, F.: Liebigs Annalen Der Chemie., 439, 196, 1924.
- 22) Neubauer, O.: Zs. physiol. Chem., 67, 219, 1910.
- 23) 赤堀: アミノ酸及蛋白質, 283.
- 24) Krebs, H. A.: Zs. physiol. Chem., 217, 191, 1933.
- 25) 代居: 福岡医誌, 42, 323, 1951.
- 26) 川畑: 福岡医誌, 27, 833, 1934.
- 27) Fitzgerald, R. J. and Bernheim, F.: J. Bact., 54, 671, 1947.
- 28) Ebina and Nakamura: Tohoku. J. Exp. Med., 31, 60, 1937.

Studies on the Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*I. Dehydrogenase reactions by intact cell suspensions
of virulent and avirulent strains

By

Yoshikazu Oka

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

With the use of intact cell suspensions of virulent and avirulent strains of 2 and 6 weeks old cultures in the Sauton media, comparative studies on the dehydrogenating reaction of each substrate, sugars, sugar alcohols, organic acids, were carried out by Thunberg method. The results were as follows.

1) In the case of the 2 weeks old cells of avirulent strain without addition of substrate, the rate of methylene blue reduction is faster than that in the case of the virulent strain; and the 6 weeks old cells of virulent strain without substrate do not cause decoloration of methylene blue.

2) When sugar or sugar alcohol is used as a substrate, no significant difference in the reduction time can be seen between the virulent and avirulent strains, nor any marked difference among each of the substrates. The rate of reduction by the 2 weeks old cells of avirulent strain, however, is more accelerated than that by the virulent strain by the addition of such substrate as glucose or other hexose.

3) Regardless of the virulence of bacteria, of all the substrates used, pyruvate and lactate accelerate the reduction most markedly.

4) When pyruvate or lactate is used as a substrate, the rate of reduction by the 6 weeks old cells of virulent strain is markedly decreased compared with that by the 2 weeks old cells, but with avirulent strain the decrease in the rate of reduction is not or hardly noticeable.

5) When succinate is used as a substrate, in the case of 2 weeks old cells, the avirulent strain seems to have somewhat stronger methylene blue reducing activity than the virulent strain.

6) The rate of reduction by the 2 weeks old cells of virulent strain is accelerated when alanine is used as a substrate, but this does not occur in the avirulent strain.
