

多発性筋炎の成因に関する実験的研究

-----とくに筋炎ビタミンB₁欠乏説(小沢)の酵素化学的検討-----

京都大学医学部外科学教室第2講座 (指導:青柳安誠教授)

藤 原 憲 和

(原稿受付 昭和34年6月19日)

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF ACUTE SUPPURATIVE POLYMYOSITIS, ESPECIALLY ENZYMOLOGICAL SUPPLEMENTARY INVESTIGATION CONCERNING VITAMIN B₁-DEFICIENCY THEORY (OZAWA)

by

NORIKAZU FUJIWARA

From the 2nd Surgical Department, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. YASUNASA AOYAGI)

In acute suppurative myositis, when the pathogenic staphylococcus invades the skeletal muscles, it does so in succession, and manifests the sign of polymyositis clinically. Why does this staphylococcus that has invaded the muscle once, form the metastasis in the muscle alone successively thereafter? Prof. Dr. Y. OZAWA (1927) has maintained that vitamin B₁-deficiency has a profound significance in the occurrence of myositis, as, in Japan, there are many cases of both beriberi and myositis, especially most of myositis cases show the beriberi-like clinical symptoms and the intravenous injection of the myositis strain into vitamin B₁-deficient rabbits or pigeons results in a more frequent occurrence of muscle abscesses, as compared with the normal animals.

The author, just like Masaki, one of our co-workers, basing our theory the nature of the tissue-affinities is the phenomena of the adaptation of microorganisms to the tissue environment, examined whether the occurrence of myositis would be more frequent in the state of vitamin B₁-deficiency or not. Staphylococcus aureus F·D·A·209-P of the same origin was subcultured successively every 24 hours at 37°C in such media (pH 7.0) as the skeletal muscles extract, the bone-marrow extract and the skin extract. These strains were called the *muscle-adapted strain*, the *bone-marrow-adapted strain* and the *skin-adapted strain* respectively. Besides them, the following strains; the myositis strain, the osteomyelitis strain, the furuncle strain and the carbuncle strain isolated from the clinical cases, were used.

Experimental results are summarized as follows:-

(1) For the vitamin B₁-deficient rats, myositis did occur following an intravenous injection of the staphylococcus, but muscle abscesses developed following its intramuscular injection. In addition, the minimum amount of the staphylococcus required for this occurrence was lower, as compared with the normal rats.

(2) By the intravenous staphylococcus injection, myositis occurred in the rabbits and the pigeons, though not in the rats. And it was considered that the regional difference of abscess caused in the organ, following the intravenous injections of the staphylococcus for these animals, was attributable to the sensitivity to the staphylococcus of the organ of each animal.

(3) The pyruvic acid content in the muscles of vitamin B₁-deficient rats was great and the muscle extract of these rats accelerated the growth of staphylococci very much, as compared with that of the normal rats.

(4) In the examination of the remaining amount of staphylococci in the muscles after the intravenous P³²-labeled staphylococcus injection, it was known that these amounts in the vitamin B₁-deficient rats had been not so great as those in the control rats, and that there was little difference between the skeletal muscle-adapted strain and its parent strain in the corresponding amount.

(5) Pyruvic acid, as well as glucose, accelerated the growth of each strain, especially in the skeletal muscle-adapted strain, the myositis strain, the skin-adapted strain, the furuncle strain and the carbuncle strain.

(6) In the skeletal muscle-adapted strain and the myositis strain, the dissimilation amount of pyruvic acid and the pyruvic dehydrogenase activity were both highly accelerated, and in the skin-adapted strain, the furuncle strain and the carbuncle strain, such activities were moderately accelerated. And although there was no difference in the carbolygase activity of each adapted strain, the acceleration was recognized in the myositis strain, the furuncle strain and the carbuncle strain among the pathogenic strains.

(7) In order to explain the acceleration in the dissimilation amount of pyruvic acid and the pyruvic dehydrogenase activity, the pyruvic acid content in the skeletal muscles was measured and its content was found to be great. The skin-adapted strain showed a comparatively high enzymatic activity, and the pyruvic acid content in the skin was approximately the same as that in the skeletal muscles. This fact indicated the possibility that the enzymatic system of the pyruvic acid metabolism is formed as an adaptive enzyme.

(8) After the staphylococcus injections into muscle, skin and bone-marrow, the changes of the biochemical environment of the inflammatory regions, especially the increase and decrease in the pyruvic acid content were investigated. The pyruvic acid content exhibited a slight decrease one hour after the injections into the muscle and the skin, but it increased markedly 24 hours later in the injected regions and in these neighbouring areas. The acceleration of the enzymatic activity of the pyruvic acid metabolism in the myositis strain, the furuncle strain and the carbuncle strain, resulted possibly from the formation of an adaptive enzyme owing to the increase of the pyruvic acid content in the growth environment of the

staphylococcus.

(9) In the enzyme of the pyruvic acid metabolism the dissimilation amount of the substrate and the pyruvic dehydrogenase activity could be actually formed as an adaptive enzyme, though the carboligase activity could not be.

(10) In the pyruvic acid metabolism of staphylococci, the dissimilation amount of the substrate and the pyruvic dehydrogenase activity could be hereditarily fixed due to the successive subculturing in the environment containing the substrate of the high concentration, though the carboligase activity could not be.

On the basis of the above-mentioned results, the author could examine enzymologically the myositis vitamin B₁-deficiency theory from the standpoint of the "HOST-PARASITE RELATIONSHIPS (Dubos)" and could prove the propriety of this theory.

結 言

急性化膿性筋炎においては、病原ブドウ球菌は、一たび横紋筋を侵すと、相ついで横紋筋のみを侵して、多発性筋炎の臨床像を呈する。なに故このように一たび筋を侵したブドウ球菌は引つづいて筋のみに転移巣を形成するのか。この点に関して、従来、病原体側と被感染個体側との両面より種々の研究が進められて来た。病原体側の研究は、その原因を菌の筋組織に対する親和性に求める考え方であつて、いわゆる Myostrain と呼ばれる菌株が好んで筋のみを侵し、又筋のみに転移すると考えるのである。これには更に多元論と一元論とがあつて、すなわち Martinotti (1898) は筋組織に親和性の強い菌株を臨床例から分離し、Staphylococcus polymyositicus と命名し、この菌の血行内注入によつて筋膿瘍の必発することを示し、石原(1955)は筋炎、骨髄炎などの起炎菌は、遺伝的に固定された強い組織親和性を有し、かつそれぞれ独自の化学的特性を有することを実証し、筋炎、骨髄炎などの起炎菌の組織親和性を多元論の立場から説明した。

最近の遺伝生化学研究によると、細菌の代謝、更にはその性格を決定する酵素構造は恒常的なものではなく、与えられた栄養分、その他の外圍の条件によつて特異的に変化し、しかも遺伝的にもこの関係が固定化されることが明らかとなつている。この観点から、さきに教室真先(まさき) (1956) は、同一菌株より出發したブドウ球菌を、家兎の横紋筋浸出液、骨髄浸出液を含む培地に継代培養、誘導して得た各菌株が、それぞれいわゆる Myostrain または Osteostrain と酵素化学的に相似た特性を有するようになり、又動物実験においてもそれらの菌株が家兎に定型的な筋炎または骨

髄炎を惹起せしめることを明らかにした。すなわち菌の組織親和性を一元論的に適応酵素の立場から理解することの合理性を強調した。

一方、被感染個体側の研究としては、小沢 (1927) の筋炎ビタミンB₁欠乏説がある。

この説は、筋炎が脚気とともにわが国にとくに多く発生する点、実験的に白米病家兎または鳩に人筋炎起炎菌を血行内注入すると、対照に比して著明に筋膿瘍を多発する点、および臨床的に筋炎患者の性、年齢、職業についての関係が、脚気のそれと一致し、かつ筋炎患者に脚気症状を呈するものが多い点、の三点から、多発性筋炎の発症には被感染個体のビタミンB₁欠乏が重要な意義を有すると考えたものである。しかしながら、この説については賛否両論があつて、西野 (1933)、奥田(1952)は統計的観察から筋炎とビタミンB₁欠乏との関係を否定し、また西脇 (1951) は筋炎患者の血中ビタミンB₁量を測定して、欠乏は認められなかつたと報告し、岩切 (1955) も家兎においては筋炎発症前後に血中ビタミンB₁量の低下を認めなかつたと報告している。これに対して小沢は、ビタミンB₁欠乏は筋炎発症にいたる過程においてのみ、意義があると反論している。さらに嶺 (1952) は腸チフス菌筋炎につきビタミンB₁欠乏の影響を検討し、ビタミンB₁欠乏はチフス菌筋炎発症を促進することを示し、荒木教授 (1952) はこの実験に関して、おそらくブドウ球菌筋炎においても、ビタミンB₁欠乏は筋炎発症促進の要因であろうと述べられた。

ビタミンB₁欠乏症に関連して、皮膚科領域においては、再発性化膿性皮膚疾患患者に、脚気様症状を呈するものが多く、これらの患者は潜在性ビタミンB₁欠乏状態にあることが認められており、斎藤(1952)、藤垣

(1953), 高宮 (1955) によつて, ビタミンB₁欠乏と化膿性皮膚疾患との関係が指摘されている。

ビタミンB₁は Cocarboxylase として, 焦性ブドウ酸 (以下焦ブと略す) 酸化酵素の重要な補酵素であり, Peters (1936) はビタミンB₁欠乏によつて, 組織焦ブの酸化が障害されることを明らかにし, Platt (1936) はビタミンB₁欠乏に際して, 組織内に焦ブの蓄積がみられることを明らかにした。

ビタミンB₁欠乏が筋炎発症を促進するとするならば, 被感染個体側においては, ビタミンB₁欠乏によつて筋組織にブドウ球菌をよりよく発育せしめる化学的環境を生じなければならないわけで, この点に関しては, Platt (1936) の示した, 組織焦ブ量の増加が意義を有するものと考えられるが, 更に実験的に検討される必要がある。

一方, 病原体側については, 筋炎起炎菌が, 単にビタミンB₁欠乏による, 感染防禦力の低下によつて, 元

来親和性を有する筋組織に止着, 発症しやすいのであろうと推定するのは, 早計と云わねばならぬ。なぜならば, 伊藤 (1948) が筋は皮膚について焦ブ量の多い組織であるとしている点, および石原 (1955), 真先 (1956) らが, 筋炎起炎菌, 横紋筋適応菌は焦ブによつて, 発育促進をうけるとしている点などより考えると, 筋炎菌の筋組織に対する親和性に関与した酵素として, 焦ブ代謝酵素系が成立し, ビタミンB₁欠乏による焦ブの増量は, かかる酵素系に対する基質の増量を来たすことになり, 適応酵素系として成立しない場合よりも一層筋組織における菌の発育を促進するものとも推定されるからである。

ビタミンB₁欠乏状態において筋炎の発症は促進されるか? 促進されるとするならば, その本態はなにか?

私は, これらの問題を解明せんとして, 以下の実験を行った。

実験第1 黄色ブドウ球菌F・D・A・209-P株を家兎横紋筋, 骨髄および皮膚に適応せしめるための培養上の基礎実験, ならびにこれに附随した2,3の実験

真先 (1956) は, ブドウ球菌を組織に適応させる方法として, 普通寒天培地に横紋筋, 骨髄各浸出液を加え, これらに菌を継代培養して各適応菌を作製し, 実験に供した。又土倉 (1959), 前田 (1959) はこれを改良し, 寒天培地の代わりに組成の明らかなアミノ酸合成培地を用いて適応菌を作製した。私は, まず, ブドウ球菌のような heterotrophic の細菌による炎症の場合には, 組織にはその発育を支えるに十分な栄養源がなければならぬと考へ, 組織浸出液のみにおける培養の可能性の有無と, 組織浸出液のみに継代して得られた菌の組織に対する適応状態などをまず吟味し, 更に各組織浸出液を培地とした場合の各菌株の発育度をみるることによつて, それらの組織親和性を直接比較検討した。

第1章 横紋筋, 骨髄および皮膚浸出液を培地とした際の, 黄色ブドウ球菌F・D・A・209-P株増殖曲線

(1) 実験材料

(i) 横紋筋, 骨髄および皮膚浸出液培地
体重約2kg前後の家兎を脱血死せしめ, 大腿部横紋筋, 大腿骨骨髄, 剃毛した軀幹部の皮膚を, それぞれ採

取秤量し, 同重量の海砂および30倍量の蒸留水を加えて乳鉢内で磨砕し, 遠心沈澱して上清をとり, 東洋濾紙JH試験紙, 1/10N NaOHをもつてpH 7.0に調整し, これらをSeitz濾過器で濾過滅菌し, 予め乾熱滅菌した試験管に10cc宛分注して培地とした。使用に際しては, 37°C, 24時間孵置して無菌状態であることをたしかめた。

(ii) 標準ブドウ球菌

本学微生物学教室保存の黄色ブドウ球菌F・D・A・209-P株。

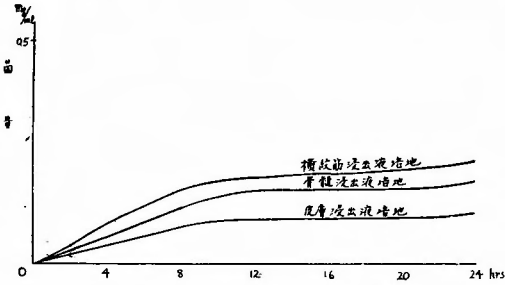
(2) 実験方法

各浸出液培地に, F・D・A・209-P株を鳥瀉沈澱計によつて, 菌0.2mgを蒸留水10ccに懸濁したものを, 0.1ccづつ接種し, 一定時間毎に培地の一部を採取して, ベックマン分光光度計, 波長660m μ をもつて比濁し, 予め作製した, 鳥瀉沈澱計によつて測定した菌量と濁度との標準直線によつて, 菌量に換算した。

(3) 実験成績および小括

組織浸出液のみを培地とした場合においても, 菌はよく発育した。横紋筋浸出液において最もよく発育し, 骨髄, 皮膚のそれらがこれについで (図1)。菌増殖が定常期に入るのは, ほぼ16時間であつて, 細菌の適応現象において, 酵素形成の最も盛んな時期は, 菌増

図1 横紋筋、骨髄、皮膚30倍浸出液を培地とせる黄色ブドウ球菌 F・D・A・209-P 株の増殖曲線



殖の対数期に一致するとされている点から、1世代24時間の継代培養によって、適応菌を作製した。

第2章 各適応菌の作製と、真先(まさき)の方法による適応菌との適応度の比較

(1) 実験材料

(i) 継代培養用組織浸出液培地

第1章に記載した方法によつてえた各組織の4倍浸出液を5ccづつ試験管に分注。

(ii) 適応度判定用組織20倍浸出液培地

(iii) 組織浸出液加寒天培地

家兔横紋筋、骨髄および皮膚4倍浸出液の各々0.5ccを普通寒天培地4.5ccに加えたが、普通寒天培地は、ポリペプトン(武田)10g、肉エキス(極東)10g、NaCl 2g、寒天(半井)20gを蒸留水1l中に溶解して、pH7.0に調整し、試験管に4.5cc宛分注し、オートクレーブによつて2気圧、120°C、15分間で滅菌したもので、これらが約50°Cに冷却した時に、上記浸出液をそれぞれ0.5ccづつ加え、よく混和して、冷却凝固せしめて作製した。

(iv) 標準ブドウ球菌

F・D・A・209-P株。

(2) 実験方法

(i) 継代培養

各組織浸出液培地ならびに各組織浸出液加寒天培地に、同一菌株に出発したF・D・A・209-P株を接種、37°C、24時間孵置培養し、各々40代継代培養した。

組織浸出液培地による継代培養に際しては、雑菌の混入を防ぐため、各代毎に、継代培地から菌液1白金耳をとつて、普通寒天培地上に培養して、菌集落を吟味し、更に塗抹鏡検した。以下横紋筋浸出液に継代して得た菌を横紋筋適応菌、骨髄浸出液のそれを骨髄適

応菌、皮膚浸出液のそれを皮膚適応菌と記載する。

(ii) 各適応菌と真先の方法による適応菌との適応度の比較

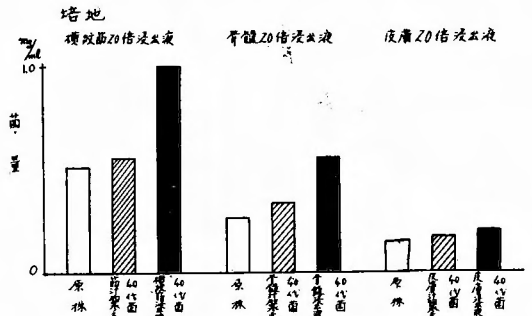
横紋筋20倍浸出液培地に原株、真先の方法による横紋筋適応菌および横紋筋浸出液のみに継代した横紋筋適応菌を接種し、又一方骨髄20倍浸出液培地に原株、真先の方法による骨髄適応菌および骨髄浸出液のみに継代した骨髄適応菌を接種し、他方皮膚20倍浸出液培地に原株、真先の方法による皮膚適応菌および皮膚浸出液のみに継代した皮膚適応菌を接種し、37°C、24時間培養し、比濁法によつて発育度を比較した。

(3) 実験成績ならびに小括

各組織浸出液培地において、組織浸出液のみに継代して得た適応菌は、真先の方法による適応菌よりも、強い増殖を示した。

原株と各適応菌との発育度の比は、各適応菌の、組織に対する適応の程度を示すと考えられるものであつて、これを適応度と呼ぶことにした(図2)。

図2 黄色ブドウ球菌 F・D・A・209-P 株を母菌とせる各組織汁加寒天培地継代菌および各組織浸出液培地継代菌の発育度の比較



第3章 各組織浸出液培地における各適応菌および起炎菌の交叉培養による菌発育度の比較

(1) 実験材料

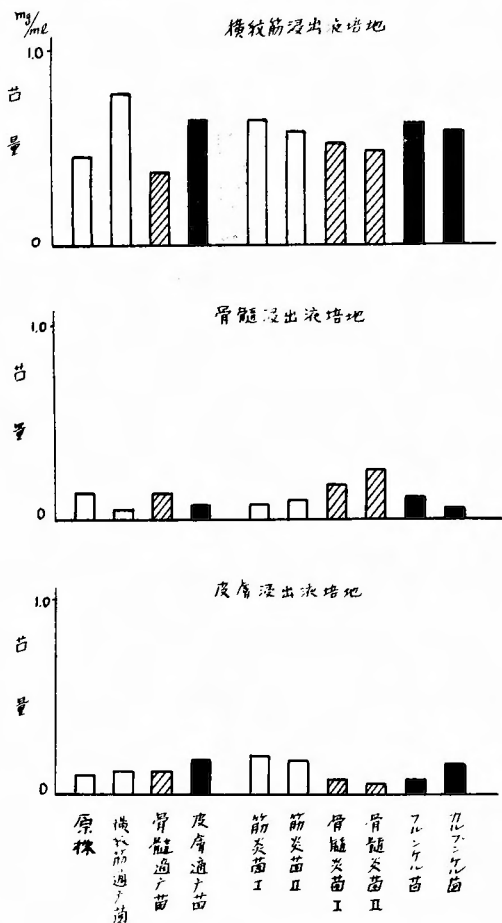
(i) 各組織30倍浸出液培地

(ii) 各適応菌

(iii) 各起炎菌

本院外科外来および入院患者の膿から分離した、筋炎、骨髄炎、およびフルンケル、カルブンケルの起炎菌を、それぞれ2株づつ使用したが、以下、筋炎起炎菌I、II、骨髄炎起炎菌I、II、フルンケル起炎菌、カルブンケル起炎菌と記載した。

図3 横紋筋、骨髄および皮膚浸出液培地における各適応菌、起炎菌の発育度の比較（交叉培養）



(2) 実験方法

各組織浸出液培地に原株、各適応菌、各起炎菌を接種し、37°C、24時間培養し、それらの発育度を比濁法によつて測定した。

(3) 実験成績ならびに小括

横紋筋浸出液においては、横紋筋適応菌、筋炎起炎菌はよく発育し、皮膚適応菌、フルンケル・カルブネル起炎菌はこれに近い発育を示した。骨髄浸出液においては、骨髄適応菌、骨髄炎起炎菌がよく発育し、横紋筋および皮膚適応菌、筋炎起炎菌、フルンケル・カルブネル起炎菌などの発育は不良であつた。皮膚浸出液では、皮膚適応菌、フルンケル・カルブネル起炎菌、筋炎起炎菌がよく発育し、骨髄炎起炎菌は発育が不良であつた(図3)。

以上の成績から、横紋筋適応菌、筋炎起炎菌は筋組織において、一方皮膚および骨髄適応菌、起炎菌はそれぞれ皮膚および骨髄において良好な発育を示すものと考えられ、又横紋筋適応菌と皮膚適応菌は比較的相似の性格を示しており、これは培地の側よりみれば、横紋筋および皮膚組織は、横紋筋および皮膚適応菌・起炎菌をとともに比較的よく発育せしめることを示している。

実験第2 ビタミンB₁欠乏白鼠を用いた筋炎発症実験、およびビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋はブドウ球菌の発育に対して有利か否かの吟味

一般にビタミンB₁欠乏実験に用いられる動物は白鼠および鳩である。家兎においては腸管内細菌によるB₁合成があるためか、典型的なB₁欠乏症状をみることは少ないとされており、千秋(1930)も50%にしか症状をあらわさないと述べている。鳩も又羽毛の色、季節によつて欠乏症状をあらわす率が異なり、典型的な痙攣発作をみるのは藤田(1948)によると40~50%、中川(1955)によると1/3であるという。したがつて私は白鼠を試験にえらび以下の実験を試みた。

第1章 ビタミン B₁ 欠乏白鼠における筋炎発症実験

幼若白鼠をビタミンB₁欠乏飼料をもつて飼育して、これにビタミンB₁欠乏症状を発現せしめた上、黄色ブドウ球菌 F・D・A・209-P 株原株、白鼠横紋筋適応菌ならびに各起炎菌を血行内に注入して筋炎発症の有無を檢した。

又ビタミンB₁欠乏白鼠大腿屈筋に原株および白鼠横紋筋適応菌を注入して、筋膿瘍を発症するに要する菌

量を比較し、ビタミンB₁欠乏白鼠筋が筋膿瘍をきたし易いかどうかを検討した。

(1) 実験材料

(i) 白鼠: Wister 系, 60~90g.

(ii) 被検菌

① 原株, 各起炎菌

② 白鼠横紋筋適応菌

実験第1における家兔横紋筋浸出液培地に準じて作製した白鼠横紋筋浸出液培地での20代継代菌を使用した。

(2) 実験方法

(i) ビタミンB₁欠乏白鼠の作製

白鼠雌雄10匹を2匹宛糞食防止のため二重金網底とした金網籠に入れ、恒温室において(表1)に示した

表 1

ビタミンB₁欠乏基礎飼料組成

澱粉	68 g
カゼイン	18
大豆油	8
混合塩	4
肝油	2

混合塩組成

NaCl	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	64
KH ₂ PO ₄	112
Ca-lactate	29
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	52
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	112
Fe-citrate	14

ビタミン混合組成 (1日1匹量)

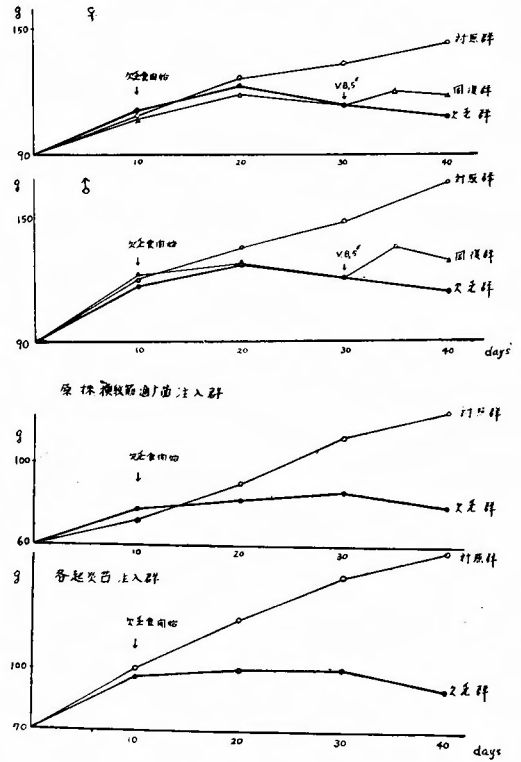
ビタミンB ₂	20γ
ビタミンB ₆	20γ
ニコチン酸	500γ
パントテン酸 Ca	150γ

ビタミンB₁欠乏飼料をもつて約30日間飼育し、対照群には1日20γのビタミンB₁を上記飼料に添加したが、飼料は加熱し、団子として与え、自由飽食せしめた。

ビタミンB₁欠乏の判定は最も簡便でしかも比較的正確とされる体重測定法によつた(図4)。ビタミンB₁欠乏食投与後約10日で発育は停止し、後漸次体重は下降した。ところが欠乏食投与後20日目に、ビタミンB₁5γ宛5日間投与すると、著明な体重の増加を来し、この体重の減少はビタミンB₁欠乏によることを確め得た。又動物の性によつては欠乏症状発現に大差のないこと

図 4

V B₁ 欠乏白鼠体重曲線



を知つた。

(ii) 菌血行内注入実験

ビタミンB₁欠乏群, 対照群各27匹を用い、それぞれ原株, 白鼠横紋筋適応菌, 各起炎菌を、白鼠体重100gあたり、1mg, 2mg, 4mg 宛尾静脈から注入し、72時間後剖検した。

(iii) 菌筋肉内注入実験

ビタミンB₁欠乏群, 対照群の6匹宛を一群とし、大腿屈筋に原株および白鼠横紋筋適応菌を0.5mg, 0.25mg, 0.125mg, 0.06mg, 0.03mg, 0.015mg のそれぞれを0.5ccの蒸留水に懸濁して注入し、48時間後剖検し、筋膿瘍の発症に要する最小菌量および筋膿瘍容積を測定した。

(3) 実験成績ならびに小括

(i) 菌血行内注入実験では、どの菌種を注入した場合においても、遂に全例筋炎の発症をみる事が出来なかつた(表2)。

(ii) 菌筋肉内注入実験では、筋膿瘍の発症に要する最小菌量について有意の差を認めた。すなわち F·D·A·209-P 株原株注入群では、対照群は0.03mg以下の菌量では膿瘍を発生しなかつたのに反して、ビタミンB₁

表2 原株, 横紋筋適応菌および各起炎菌の白鼠血行内注入成績

対 照 群		膿 瘍 形 成 部 位						B ₁ 欠 乏 群		膿 瘍 形 成 部 位							
白鼠 No.	菌 株	菌量	横紋 筋	骨髄	肝	腎	肺	関節	白鼠 No.	菌 株	菌量	横紋 筋	骨髄	肝	腎	肺	関節
1	F·D·A·209- P原株	1				+			1	F·D·A·209- P原株	1				+		
2		2				+	+		2		2						
3		4							3		4				+		
4	R-M	1				+			4	R-M	1				+		
5		2				+			5		2				+		
6		4				+			6		4				+		
7		1				+			7		1				+		
8		2				+			8		2				+		
9		4				+			9		4				+		
10	M _I	1				+			10	M _I	1				+		
11		2				+			11		2				+		
12		4				+			12		4				+		+
13	M _{II}	1				+			13	M _{II}	1				+		
14		2				+			14		2				+		
15		4				+			15		4				+		
16	O _I	1				+			16	O _I	1				+		
17		2				+	+		17		2				+		
18		4				+			18		4				+		
19	O _{II}	1				+			19	O _{II}	1				+		
20		2				+			20		2				+		
21		4				+			21		4				+		
22	H _I	1				+			22	H _I	1				+		
23		2				+			23		2				+		
24		4				+			24		4				+		
25	H _{II}	1				+			25	H _{II}	1				+		
26		2				+			26		2				+		
27		4							27		4				+		+
計			0	0	0	25	2	0	計			0	0	0	26	0	2

R-M: 白鼠横紋筋適応菌, M_I, M_{II}: 筋炎起炎菌

O_I, O_{II}: 骨髄炎起炎菌, H_I, H_{II}: フルンケル・カルブンケル起炎菌

欠乏群は0.015mgの菌量ですすでに筋膿瘍を発生した(表3), (図5)。

白鼠横紋筋適応菌注入群では, 対照群は0.015mg以下の菌量では筋膿瘍を発生しなかつたのに反して, ビタミンB₁欠乏群は0.015mgの菌量ですすでに筋膿瘍を発生した(表3), (図5)。

このように, ビタミンB₁欠乏群においては対照群に比して少量の菌量でも筋膿瘍を発生したのであつて, 筋炎ビタミンB₁欠乏説を白鼠実験においても追試確認し得たものと考えられる。

又白鼠横紋筋適応菌が対照群において原株に比して

半量の0.03mgでもなお膿瘍を発現し得たことは, 試験管内で白鼠横紋筋浸出液に20代培養して誘導した筋適応菌が筋肉中において原株より強く発育することを示しており, 一元論的な立場から Myostrain を説明することの合理性を裏書きしているものと考えられる。

第2章 ビタミン B₁ 欠乏白鼠の横紋筋, 皮膚の焦性ブドウ酸, 乳酸およびブドウ糖含有量の定量, ならびにビタミン B₁ 欠乏白鼠横紋筋, 皮膚浸出液中における黄色ブドウ球

B₁₂欠乏群

図

5

対 照 群



↘印は膿瘍形成部位を示す

菌 F・D・A・209-P 株の発育度

第1章においてビタミンB₁₂欠乏白鼠横紋筋においては対照白鼠横紋筋におけるよりも筋膿瘍を発症しやすいことを示したが、その本態を追求するため、以下の実験を試みた。

(1) 実験材料

- (i) ビタミンB₁₂欠乏白鼠および対照白鼠各5匹
- (ii) 焦性ブドウ酸定量用試薬
 - ① 10%三塩化醋酸溶液
 - ② キシロール：濃硫酸とともに振盪した後、固型アルカリを加えて蒸溜したもの。
 - ③ 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNP 試薬)：2N HCl 100cc に 2,4-dinitrophenylhydrazin 0.5g を加え、還流冷却器をつけて加熱溶解したもの。
 - ④ 10%炭酸ソーダ溶液
 - ⑤ 4N NaOH
 - ⑥ 1N HCl
 - ⑦ 焦性ブドウ酸ソーダ
- (iii) 乳酸定量用試薬
 - ① 20%硫酸銅溶液
 - ② 4%硫酸銅溶液
 - ③ 化学用消石灰
 - ④ 濃硫酸
 - ⑤ 1.5% p-ヒドロキシ・ジフェニル溶液
 - ⑥ 乳酸亜鉛
- (iv) ブドウ糖定量用試薬
 - ① 5%硫酸亜鉛溶液
 - ② 0.3N 水酸化バリウム溶液

③ Somogyi 氏試薬

④ Nelson 氏試薬

⑤ ブドウ糖

(2) 実験方法

(i) 焦性ブドウ酸定量法

Friedmann-Haugen (1942), 清水 (1950) の方法によつた。また島菌(1953), 伊藤(1948), Lu (1939), 井本 (1957) らの報告を参考とした。

試料 1g を手早く氷冷三塩化醋酸溶液20ccに投じ、細切磨砕し、遠心分離して除蛋白を行い、上清 8cc を内容約25ccの遠沈管にとり、25℃水浴中で DNP 試薬 0.7ccを加えて5分間反応せしめ、キシロール 8ccを加え、毛細管で空気を送入し3分間はげしく攪拌した後、遠心分離で2層に分離し、下層を除き、上層キシロール層を水で3回洗滌し、さらに水 3ccを加え、水層のpHを2~3とするため 1N HCl 2滴を添加し、24時間氷室に放置、しかる後水層を除去し、10%炭酸ソーダ溶液 6ccを加え、毛細管から空気を送入して3分間強く攪拌し、遠心機で2層に分離、水層 5ccをとつて、これに4N NaOH 2ccを添加し、発色する色を5分ないし90分以内に、470m μ でベックマン比色計により比色した。基準溶液作製にあつては、正確な濃度を Clift-Cook (1932) の方法で滴定法により定めた。

(ii) 乳酸定量法

Barker-Summerson (1941), 石井 (1950) の方法により、さらに島菌 (1953) および Lu (1939) の報告を参考とした。

焦性ブドウ酸定量用に除蛋白した上清 1cc を共径沈澱管にとり、20%硫酸銅溶液 1ccを加え、更に水を加

表3 F・D・A・209-P 原株および白鼠横紋筋適応菌の白鼠横紋筋内注入による筋膿瘍形成に要する最小菌量の比較

	No.	体重	菌 株	菌量 mg	膿瘍容積 mm ³			
					mm	mm	mm	
ビタミンB ₁ 欠乏群	1	110	F・D・A・209-P 原株	0.5	2×	2×	10	40
	2	100	〃	0.25	2×	1×	10	20
	3	130	〃	0.125	1×	1×	10	10
	4	108	〃	0.06	1×	1×	10	10
	5	115	〃	0.03	1×	4×	8	32
	6	117	〃	0.015	1×	1×	2	2

膿瘍形成最小菌量 <0.015mg

対照群	1	176	〃	0.5	2×	6×	8	96
	2	197	〃	0.25	2×	7×	5	70
	3	185	〃	0.125	2×	10×	3	60
	4	188	〃	0.06	3×	3×	5	45
	5	178	〃	0.03			0	0
	6	180	〃	0.015			0	0

膿瘍形成最小菌量 = 0.06mg

	No.	体重	菌 株	菌量 mg	膿瘍容積 mm ³			
					mm	mm	mm	
ビタミンB ₁ 欠乏群	1'	130	白鼠横紋筋適応菌	0.5	4×	7×	5	140
	2'	135	〃	0.25	2×	7×	4	56
	3'	135	〃	0.125	2×	3×	5	30
	4'	102	〃	0.06	1×	3×	6	18
	5'	117	〃	0.03	1×	3×	8	24
	6'	170	〃	0.015	1×	1×	2	2

膿瘍形成最小菌量 <0.015mg

対照群	1'	205	〃	0.5	2×	7×	15	210
	2'	205	〃	0.25	2×	12×	5	120
	3'	200	〃	0.125	2×	14×	4	96
	4'	170	〃	0.06	1×	7×	5	35
	5'	205	〃	0.03	1×	1×	1	1
	6'	180	〃	0.015			0	0

膿瘍形成最小菌量 = 0.03mg

えて10ccとして、これに消石灰約1gを加えて強く振盪混和し、30分間放置した後、遠心沈澱し、その上清1ccを試験管にとり、これに4%硫酸銅溶液0.05ccを加え、更に硫酸6ccを静かに混和しつつ加え、加え終つてからよく混和して、直ちに沸騰水浴中で5分間加熱し、ついで冷水中で20℃以下に冷却し、冷却後1.5% p-ヒドロキシ・ジフェニール溶液0.1ccを加え、折出するp-ヒドロキシ・ジフェニールを一様に分散せしめて、

30℃、30分間放置、次に沸騰水浴中で90秒間加熱し過剰のp-ヒドロキシ・ジフェニールを溶解せしめた後、冷水で室温に冷却し、2時間以内に560m μ でベックマン比色計によつて比色した。

(iii) ブドウ糖定量法

Somogyi (1945) の方法によつた。

試料200mgを氷冷水7cc中で細切磨砕し、0.3N水酸化バリウム溶液0.4cc、5%硫酸亜鉛溶液0.4ccを混和し、毎分2000回転、5分間遠心沈澱し、15cc目盛りつき試験管に上清2ccをとり、これにSomogyi氏試薬1ccおよび水1ccを加え、20分間煮沸し、冷却後Nelson氏試薬1ccを添加、水で15ccまでうすめ、660m μ でベックマン比色計によつて比色した。

(iv) ビタミンB₁欠乏白鼠ならびに对照白鼠を脱血死せしめ、大腿屈筋、剃毛した背部皮膚を各200mgづゝとりブドウ糖定量に供し、更に1g宛とり焦性ブドウ酸および乳酸の定量に供した。

又ビタミンB₁欠乏群ならびに对照群の横紋筋および皮膚の10倍浸出液培地を作製し、これにF・D・A・209-P原株を接種し、37℃、24時間孵置後、比濁して、それらの発育度を検した。

(3) 実験成績ならびに小括

ビタミンB₁欠乏群においては对照群に比べて、横紋筋、皮膚ともに焦性ブドウ糖含量の著明な増加が認められ、乳酸は横紋筋、皮膚において、ブドウ糖は皮膚において、増量していた。また一方、ビタミンB₁欠乏群の横紋筋または皮膚浸出液は、对照群のそれらに比べて、F・D・A・209-P原株に対して著明な発育促進作用を有することが明らかとなつた(表4)。

第3章 P³²標識黄色ブドウ球菌 F・D・A・209-P 原株ならびに白鼠横紋筋適応菌の血行内注入法による、ビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋における菌止着度の検討

(1) 実験材料

(i) ビタミンB₁欠乏白鼠および对照白鼠各6匹

(ii) P³² 5mc

(iii) 半合成培地

Knight (1931)の半合成培地を参考とし、

カザミノ酸 (ニツサン)	5.0g
KH ₂ PO ₄	5.0g
トリプトファン	10 mg

表4 ビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋の焦性ブドウ酸, ブドウ糖および乳酸値ならびにビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋浸出液を培地とする F・D・A・209-P 原株の発育度

	臓器	焦性ブドウ酸値 mg%	ブドウ糖値 mg%	乳酸値 mg%	菌発育度 mg/ml
ビタミンB ₁ 欠乏群 体重平均 110 g	横紋筋	4.5	40	96	0.22
	皮膚	2.0	30	44	0.11
対照群 体重平均 160 g	横紋筋	2.5	40	66	0.09
	皮膚	1.5	20	38	0.015

5例平均

表5 P³²標識 F・D・A・209-P 原株および白鼠横紋筋適応菌のビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋止着度の比較

F・D・A・209-P 原株注入群					白鼠横紋筋適応菌注入群				
	No.	体重 g	横紋筋 (1.0g) cpm	肝臓 (1.0g) cpm		No.	体重 g	横紋筋 (1.0g) cpm	肝臓 (1.0g) cpm
ビ タ ミ ン B ₁ 群	1	85	14	35	ビ タ ミ ン B ₁ 群	1'	77	7	41
	2	112	0	50		2'	110	8	33
	3	90	9	76		3'	80	7	38
	平均		7.7	52		平均		7.3	37
対 照 群	1	161	16	66	対 照 群	1'	154	0	49
	2	160	0	66		2'	146	5	41
	3	140	2	33		3'	161	1	42
	平均		6	55		平均		2	44

Natural count 33 cpm

Natural count 33 cpm

シスチン 10 mg
 ビタミンB₁ 10 mg
 ニコチン酸 10 mg
 ウラシル 10 mg (1l)

のような培地処方を用いた。pH 7.0 に調整し、オートクレーブによつて2気圧, 120°C, 15分間滅菌。

(2) 実験方法

半合成培地 500ccにP³² 2.5mc 宛を添加して磷酸塩の一部をP³²で置換し, これにF・D・A・209-P原株および白鼠横紋筋適応菌を接種し, 37°C, 24時間培養の後, 遠心沈澱によつて集菌し, 蒸溜水を加えて遠心沈澱, 洗滌を3回行つて, 上清に放射能のないことを確かめた後, 菌量1mg/ccの割合の懸濁液を作製し, 各白鼠に1cc宛尾静脈から注入, 48時間後脱血死せしめ, 横紋筋および肝臓を1g宛採取し, 軟膏罐中で電気炉によつて灰化した後, カウントを測定した。

(3) 実験成績ならびに小括

F・D・A・209-P 原株および白鼠横紋筋適応菌のいずれを血行内に注入した場合でも, 横紋筋における止着は極めて小であつたが, 原株においては, ビタミンB₁欠乏群と対照群における止着率に差異が認められな

かつたのに反して, 適応菌においてはビタミンB₁欠乏群における止着率が誤差範囲ながらゝ大であつた(表5)。

これによつて, ビタミンB₁欠乏筋に筋炎が発生しやすいのは, 止着後の菌発育に好適な筋の化学的環境を重視すべきであつて, 止着菌数の大小は大した役割を演じておらないことが明らかとなつた。

第4章 正常家兎, 鳩および白鼠の筋炎発症度, および各動物横紋筋浸出液における黄色ブドウ球菌F・D・A・209-P 原株および各動物横紋筋適応菌の発育度

小沢(1927)は正常家兎や鳩に筋炎起炎菌を血行感染せしめて筋膿瘍を発症せしめている。しかし私は, 第1章において述べたように, 白鼠を実験動物として使用したときは, たとえビタミンB₁欠乏症状を起しめても, 菌の血行内注入によつては筋炎を発症せしめ得なかつた。

この点に関し, 私は動物の種類によつて, 同一臓器

についても、菌に対する感受性が異なるのではないかと考え、以下の実験でこれを匡した。

(1) 実験材料

- (i) 家兎 1kg前後雄性家兎16匹
- (ii) 鳩 12羽
- (iii) 白鼠 12匹
- (iv) 被検菌

F・D・A・209-P 原株、家兎、鳩、白鼠横紋筋適応菌、筋炎起炎菌。

鳩横紋筋適応菌は家兎横紋筋適応菌と同様の方法で

20代継代して作製した。家兎横紋筋適応菌は20代菌を用いた。

(2) 実験方法

(i) 家兎には体重 500g につき1mg, 3mg, 5mg, 鳩には同300gにつき1mg, 3mg, 5mg, 白鼠には同 100g につき1mg, 3mg, 5mgの上記各菌を、家兎においては耳静脈から、鳩においては翼下静脈から、白鼠においては尾静脈から注入した。

(ii) 家兎、鳩、白鼠各横紋筋10倍浸出液培地を作製して、F・D・A・209-P 原株および各動物横紋筋適応菌

表 6 正常家兎、鳩および白鼠の筋炎発症度の比較

動物種	No.	体重 g	注入菌株	菌量 mg	膿瘍形成部位						
					肝	腎	心	肺	横紋筋	関節	
家 兎	1	730	F・D・A・209-P	1	+						+
	2	860		3	+						
	3	600		5	+	+					
	4	800	M	1	+						
	5	880		3	+					+	+
	6	780		5	+						
	7	900	M _I	0.25							+
	8	800		0.5	+	+				+	
	9	900		1	+						+
	10	800		3	+	+					
	11	910		5	+						
	12	760	M _{II}	0.25	+						
	13	850		0.5	+						
	14	900		1	+	+					+
	15	900		3	+						
	16	910		5	+	+					
計					15	5	0	0	3	4	
鳩	1	310	F・D・A・209-P	1							
	2	305		3							
	3	320		5							
	4	320	P-M	1							
	5	290		3						+	
	6	360		5							
	7	310	M _I	1							
	8	305		3						+	
	9	300		5							
	10	310	M _{II}	1							
	11	305		3							
	12	320		5							
計					0	0	0	0	2	0	

白 鼠	1	145	F·D·A·209-P	1	+				
	2	150		3	+				
	3	156		5	+				
	4	150	R-M	1	+				
	5	156		3	+				
	6	151		5	+				
	7	121	M _I	1	+				
	8	130		3	+				
	9	145		5	+				
	10	132	M _{II}	1	+				
	11	135		3	+				
	12	148		5	+				
計				0	12	0	0	0	1

M: 家兎横紋筋適応菌, P-M: 鳩横紋筋適応菌, R-M: 白鼠横紋筋適応菌, M_I, M_{II}: 筋炎起炎菌 I, II

を接種し, 37°C, 24時間孵置後比濁して菌発育を検した。

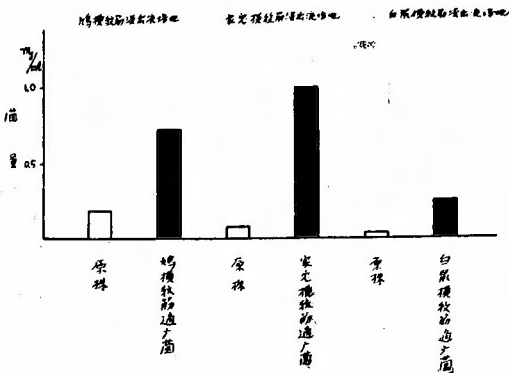
(3) 実験成績ならびに小括

(i) 家兎では3例/16例, 鳩では2例/12例, 白鼠では0例/12例の筋炎発症をみた。

(ii) 膿瘍発現部をみると, 家兎では肝臓, 鳩では横紋筋, 白鼠では腎臓に最も多かつたが, これは臓器の黄色ブドウ球菌に対する感受性が動物の種類によつて異なることを示しており, 白鼠に筋炎の発症しない理由も, こゝにあると考えられる(表6)。

(iii) F·D·A·209-P 原株は鳩横紋筋浸出液に最もよく発育し, 家兎横紋筋浸出液がこれにつぎ, 白鼠横紋筋浸出液中ではほとんど発育しなかつた。適応度では家兎横紋筋適応菌が最も強く適応しており, 鳩横紋筋適応菌これにつぎ, 白鼠のそれは比較的弱かつた(図6)。

図6 鳩, 家兎, 白鼠横紋筋浸出液培地における原株および各横紋筋適応菌の発育度の比較



第5章 討 論

(1) 血行感染によつて正常家兎や鳩が筋炎を発症するにもかゝらず, 白鼠においては, たとえビタミンB₁欠乏を起させても, 筋炎を発症させることができなかった。又家兎では肝膿瘍, 鳩では筋膿瘍, 白鼠では腎膿瘍を発生しやすかつたが, この事実は動物の種類によつて各臓器のブドウ球菌に対する感受性が異つてゐることを示しており, 白鼠横紋筋の低い感受性は, ビタミンB₁欠乏による発症促進をもつてしても, なお筋膿瘍発生にいたらなかつたものと考えられる。

(2) P³² 標識菌の筋止着度測定によると, ビタミンB₁欠乏筋に菌が特に多く止着するというはなく, 又筋適応菌も筋に多く止着しないことを確めた。しかし筋肉内注入実験によると, ビタミンB₁欠乏筋は筋膿瘍発生を促進する傾向を示していた。このことから, ビタミンB₁欠乏筋においては, 一定菌量が止着した際, 対照の筋に比べて菌が発育しやすいため, 筋膿瘍が発生しやすいものと考えられ, 筋浸出液における菌の発育度の状態もこれを裏づける成績を示した。そしてその原因としては, 被感染個体の感染防禦力の低下, 筋組織の変性(間島1941)による局所抵抗力の減弱なども考えられるが, ビタミンB₁欠乏筋浸出液によつて菌発育が促進されるという事実は, ビタミンB₁欠乏筋における代謝異常, とくに焦性ブドウ酸の増量が無視すべきからざる要因であることを示唆している。

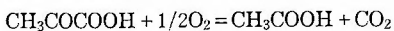
(3) ビタミンB₁欠乏時の皮膚浸出液による菌発育の促進は, 筋炎と同様に, 皮膚焦性ブドウ酸の増量が再発性化膿性皮膚疾患発症に対する促進因子となることを示している。

実験第3 各適応菌および起炎菌の発育に及ぼす焦性ブドウ酸、ブドウ糖、乳酸および2,3 TCA cycle メンバーの影響、ならびに各適応菌および起炎菌の焦性ブドウ酸代謝酵素能

笹川(1957)によれば、微生物の解糖系、TCA cycle の諸酵素が適応酵素であるか否かの解析には、① growing cell の培養において、基質が菌発育を促進するか否かの検討、② resting cell による粗酵素実験、逐次適応(須田)による適応菌の粗酵素実験、③ dry cell による酵素実験などが順次行われるべきであるとされているが、この中の適応現象ならびに遺伝的固定については、実験第4において述べる。

黄色ブドウ球菌の焦性ブドウ酸代謝経路としては、次の4経路が明らかにされている。

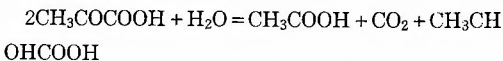
(1) 酸化経路



Lipmann (1937) によつて見出されたものである。

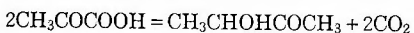
ブドウ球菌については、Barron, Lyman(1939) が好気条件下においてこの反応が行われることを明らかにした。本反応に与る酵素は焦性ブドウ酸酸化(脱水素)(脱炭酸)酵素である。

(2) Dismutation 経路



Krebs (1937) によつて見出され、ブドウ球菌については、Barron, Lyman (1939) が嫌気条件下においてこの反応が起ることを明らかにしたが、本反応の一部に焦性ブドウ酸酸化酵素が関与すると考えられている。

(3) A・M・C・経路



Neuberg (1921) によつて見出され、ブドウ球菌については、Watt, Werkmann (1951) が嫌気条件下、低いpHでブドウ糖を含む培地においてこの反応が行われることを明らかにした。本反応にあずかる酵素はカルポリガーゼと呼ばれ、Strecker, Ochoa (1954) によれば脱炭酸酵素が一部関与すると考えられている。

(4) TCA cycle 経路

Stedmann, Kravitz (1955) によつて、ブドウ球菌の焦性ブドウ酸代謝の一般的な経路としてTCA cycle の関与することがほぼ実証された。

(1), (2), (3)の酵素系においては、ビタミンB₁が補酵素として重要な意義を有していることは、いうまでもないことである。

第1章 焦性ブドウ酸、ブドウ糖、乳酸ならびに2,3 TCA cycle メンバーの菌発育に及ぼす影響

(1) 実験材料

(i) 半合成培地 実験第2第3章記載のもの。

(ii) 焦性ブドウ酸ソーダ、焦性ブドウ酸、ブドウ糖、乳酸ソーダ、醋酸ソーダ、コハク酸ソーダ、クエン酸ソーダ、マロン酸ソーダ

(2) 実験方法

半合成培地を基礎培地として、焦性ブドウ酸ソーダ、ブドウ糖、乳酸ソーダはそれぞれ0.025M, 0.05M, 0.1M が最終濃度となるよう、また焦性ブドウ酸は0.006M, 0.012M, 0.025M, 0.05M, 0.1M となるよう、またコハク酸ソーダ、クエン酸ソーダ、醋酸ソーダ、マロン酸ソーダは0.025M となるよう添加して、Seitz 濾過器で濾過滅菌し、これらの培地に各菌株を0.002mg 宛接種して、37°Cに24時間孵置した後、菌発育度を比濁測定した。

(3) 実験成績ならびに小括

焦性ブドウ酸ソーダ、ブドウ糖は全菌株の発育を著明に促進した。したがつて実験第2においてのべたようにビタミンB₁欠乏白鼠横紋筋浸出液が菌発育を促進し、一方ビタミンB₁欠乏筋が筋膿瘍発生を促進する本態として、B₁欠乏筋における焦性ブドウ酸の増量が重要な意味をもっていることが考えられる。

焦性ブドウ酸ソーダ0.025M, 0.05M, 焦性ブドウ酸0.006M, 0.012M 添加各培地では、横紋筋適応菌、皮膚適応菌、筋炎起炎菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌は原株および骨髓適応菌、骨髓炎起炎菌に比べて軽度の発育促進を示した。石原(1955)、真先(1956)は焦性ブドウ酸によつて筋炎起炎菌、カルブンケル起炎菌、および横紋筋適応菌は発育促進をうけることを示したが、私の成績もこれらの成績とはほぼ一致した。

これらの成績によつて、ビタミンB₁欠乏筋における焦性ブドウ酸の増量は、ブドウ球菌各菌株の発育を促進するが、中でも横紋筋および皮膚適応菌、筋炎またはフルンケル・カルブンケル起炎菌などの発育をとくに促進することが推定される。

乳酸ソーダ、コハク酸ソーダ、醋酸ソーダ、マロン

表7 原株, 各適応菌, 起炎菌の発育におよぼす焦性ブドウ酸, ブドウ糖, 乳酸および2,3-TCA cycle メンバーの影響

菌 株	培 地															
	B	P	P	P	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	M			
F・D・A・209-P 原株	0.36	1.17	1.36	1.36	0.42	0.10	0.04	0.05	0.1	1.29	1.15	1.40	0.25	0.28	0.18	0.38
横紋筋 適応菌	0.41	1.29	1.53	1.53	0.79	0.23	0.07	0.07	1.74	1.06	1.40	1.74	0.25	0.24	0.18	0.28
骨髄 適応菌	0.38	1.04	1.19	1.39	0.47	0.10	0.06	0.06	1.19	1.15	1.22	1.19	0.25	0.31	0.12	0.20
皮膚 適応菌	0.32	1.22	1.32	1.49	0.79	0.14	0.06	0.07	1.48	1.52	1.33	1.48	0.25	0.27	0.23	0.32
筋炎起炎菌 I	0.45	1.49	1.69	1.79	1.52	1.06	0.03	0.04	2.00	2.00	1.79	2.00	0.25	0.36	0.25	0.46
筋炎起炎菌 II	0.39	1.65	1.79	2.00	1.48	1.06	0.07	0.06	2.44	2.44	2.33	2.26	0.25	0.27	0.27	0.39
骨髄炎起炎菌 I	0.49	1.17	1.44	1.79	1.40	1.00	0.03	0.03	2.40	2.40	2.12	2.03	0.25	0.41	0.19	0.32
骨髄炎起炎菌 II	0.39	1.28	1.45	1.79	1.06	0.80	0.02	0.02	2.40	2.40	1.95	2.26	0.25	0.32	0.27	0.39
フルンケル起炎菌 I	0.41	1.46	1.65	1.79	1.60	1.03	0.06	0.06	1.97	1.97	2.48	2.26	0.25	0.38	0.15	0.36
カルブケンケル起炎菌 II	0.62	1.84	2.07	1.84	1.44	1.06	0.06	0.04	2.66	2.66	1.74	2.03	0.25	0.47	0.20	0.39
PH	7.0	7.0	7.0	7.0	5.2	3.0	2.4	2.2	1.8	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
V.P 反 応	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

B : 半合成基礎培地
 L : 乳酸ソーダ添加培地
 M : マロン酸ソーダ添加培地
 P : 焦性ブドウ酸ソーダ添加培地
 S : コハク酸ソーダ添加培地
 PA : 焦性ブドウ酸添加培地
 A : 糖酸ソーダ添加培地
 G : ブドウ糖添加培地
 C : クエン酸ソーダ添加培地

酸ソーダは菌発育に対して軽度の阻害傾向を示した(表7).

第2章 各適応菌ならびに起炎菌のresting cell による焦性ブドウ酸分解度

(1) 実験材料

- (i) 焦性ブドウ酸ソーダ
- (ii) 1/10M 磷酸塩緩衝液

(iii) 被検菌 F・D・A・209-P 原株および各適応菌ならびに起炎菌.

(2) 実験方法

焦性ブドウ酸ソーダ 50γ/cc 1cc に F・D・A・209-P 原株蒸溜水懸濁液 6mg/cc を 1cc, 一定 pH 磷酸塩緩衝液 2cc を加え, 37°C に孵置し, 一定時間後 10% 三塩化醋酸溶液 5cc を加えて反応停止ならびに除蛋白を行い, 遠心沈澱上清 8cc をとって焦性ブドウ酸量を Friedmann-Haugen - 清水の方法で測定し, その分解量を測定した.

(3) 実験成績

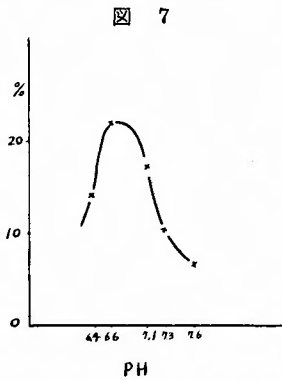
(i) 基礎実験によつて, F・D・A・209-P 原株による焦性ブドウ酸分解の至適 pH は pH 6.8~7.0 の間にあつて, 孵置時間 37°C で分解が最大となり, 菌令 12~18 時間の菌が最大の分解度を示し, 反応時間としては 2 時間以上を要すること, および 0°C に菌を貯蔵すると 48 時間後には酵素能が半減することが明らかとなつた(図 7~11).

(ii) 上記の条件において, 各菌株の分解度を比較すると, 横紋筋適応菌, 筋炎起炎菌が最高の分解度を示し, 皮膚適応菌, フルンケル・カルブケンケル起炎菌がこれにつき, 骨髄適応菌, 骨髄炎起炎菌では分解度が小であつた(図 12).

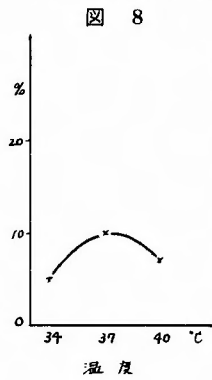
第3章 各適応菌ならびに起炎菌 dry cell の焦性ブドウ酸脱水素酵素能

(1) 実験材料

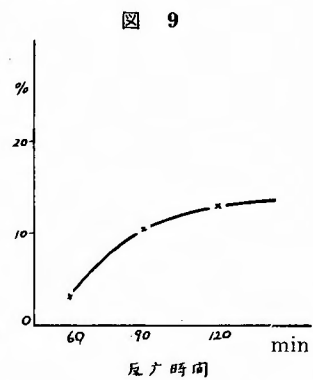
焦性ブドウ酸分解度基礎実験 (図7~11)



菌量6mg, 焦性ブドウ酸ソーダ50γ/cc 1cc, 反応時間2時間, 温度37°C

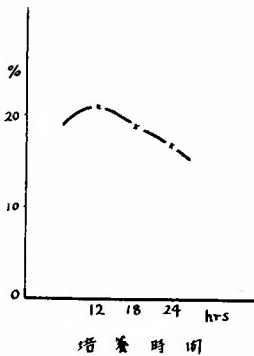


菌量3mg, 焦性ブドウ酸ソーダ50γ/cc1cc, pH7.0, 反応時間2時間



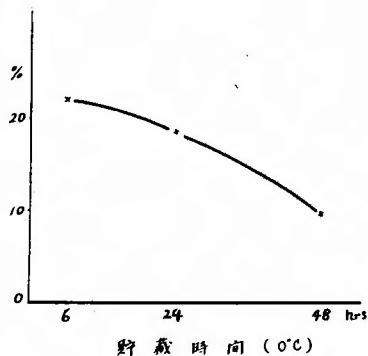
菌量3mg, 焦性ブドウ酸ソーダ50γ/cc1cc, pH7.0

図 10



菌量6mg, 焦性ブドウ酸ソーダ50γ/cc 1cc, pH7.0, 反応時間2時間, 温度37°C

図 11



菌量6mg, 焦性ブドウ酸ソーダ50γ/cc 1cc, pH7.0, 反応時間2時間, 温度37°C

- (i) 焦性ブドウ酸ソーダ 0.1M溶液
- (ii) メチレンブラウ 0.001%溶液
- (iii) 被検菌 F・D・A・209-P 原株, および各適応菌ならびに各起炎菌.

(2) 実験方法

加藤, 須田(1953), 石本(1957)の記載を参考とし, Thunberg管によるメチレンブラウ脱色時間測定によつた.

原株菌をルー培養管普通寒天培地において一定時間培養し, これを蒸溜水によつてあつめ, 遠心沈澱を2回くりかえした後, 減圧デシケーター中で乾燥せしめて, dry cellとした. Thunberg管の主室に1/10M 麟

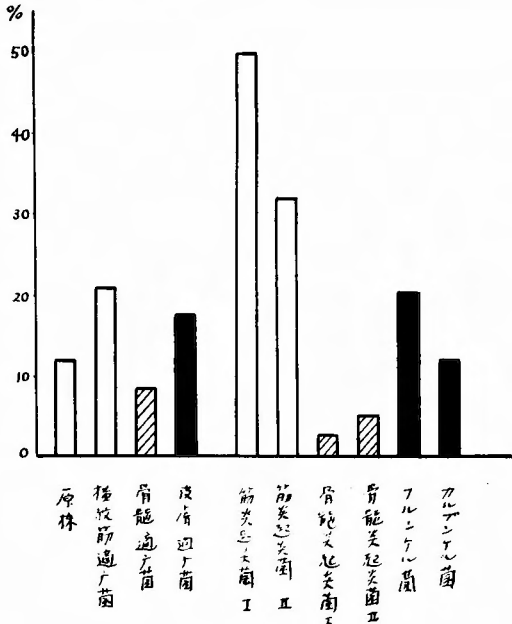
酸塩緩衝液2cc, および dry cell の一定量を入れ, 側室に0.1M焦性ブドウ酸ソーダ1ccと0.001%メチレンブラウ1ccを入れ, 真空ポンプによつて減圧脱気3分間の後, 定温水浴中に3分間浸し, 温度平衡を来たさしめた後, 転倒して側室液を主室液と混和せしめ, メチレンブラウの脱色時間を測定した.

(3) 実験成績

(i) 基礎実験によつてF・D・A・209-P原株の本酵素能の至適pHはpH7.1~7.3, 至適温度は37°Cであり, 菌量5~10mg, 菌令12~18時間菌を使用するのがよいことを知つた. 又減圧貯蔵によつて酵素能の著明な低下をみないことが明らかとなつた(図13~17).

(ii) 上記の条件において, 各適応菌ならびに起炎菌

図12 原株, 各適応菌および各起炎菌の焦性ブドウ酸分解度



の脱水素酵素能を測定したところ、横紋筋適応菌、皮膚適応菌ともに高い酵素能を示し、筋炎起炎菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌が起炎菌の中では高い酵素能を示し、骨髄適応菌、骨髄起炎菌は比較的弱い酵素能を示した(図18)。

第4章 各適応菌ならびに起炎菌の dry cellのカルボリガーゼ能

(1) 実験材料

- (i) 焦性ブドウ酸ソーダ 50γ/cc溶液
- (ii) 被検菌 F・D・A・209-P 原株, 各適応菌ならびに起炎菌の dry cell.
- (iii) 10N H₂SO₄
- (iv) 30% FeCl₂ 溶液
- (v) Fe SO₄
- (vi) 飽和クレアチン溶液
- (vii) α-ナフトール・アルカリ液
- (viii) ジアセチル
- (ix) ブドウ糖加半合成培地

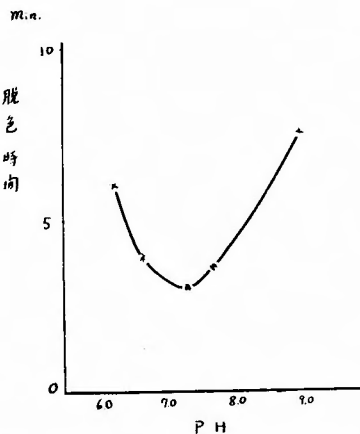
(2) 実験方法

(i) dry cell を基質 (焦性ブドウ酸ソーダ) に加え、反応せしめ、生じたアセチルメチルカルピノール (A・M・C) をジアセチルとして、クレアチン、α-ナフトールによつて発色せしめ、A・M・C 生成量をカルボリガーゼ能となした。而して Eggleton (1943), Westfeld (1945), 山村 (1952) の方法によつてジアセチルの定量を行った。

焦性ブドウ酸ソーダ 50γ/cc, 5cc および一定 pH 磷酸塩緩衝液 5cc に一定量 dry cell を混和懸濁せしめ、37°C,

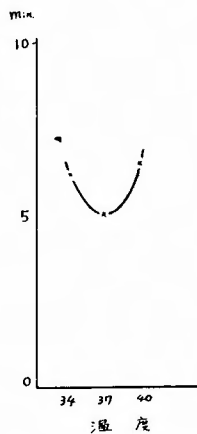
焦性ブドウ酸脱水素酵素能基礎実験 (図13~17)

図 13



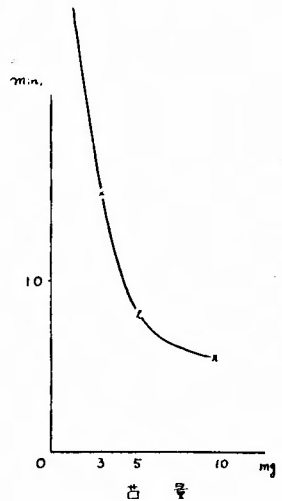
菌量 5mg, 焦性ブドウ酸ソーダ 0.1M 1cc, 温度 37°C

図 14



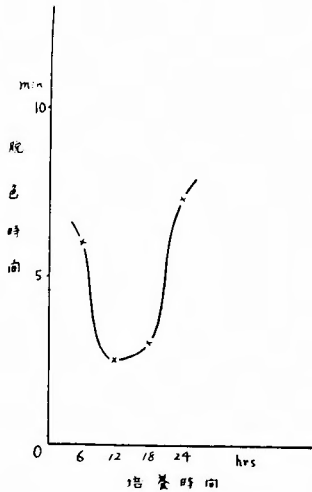
菌量 5mg, pH 7.2

図 15



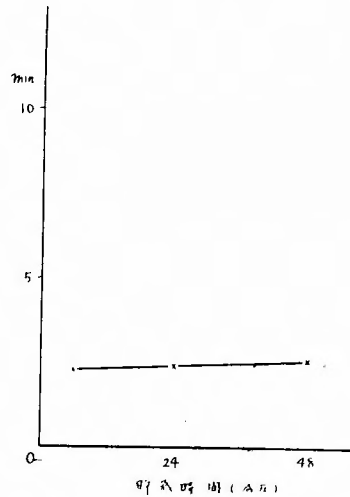
pH 7.1, 温度 37°C

図 16



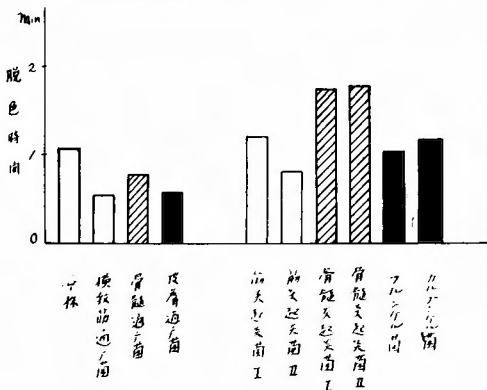
菌量5mg, pH7.1, 温度37°C

図 17



菌量5mg, pH7.1, 温度37°C

図18 原株, 各適応菌ならびに起炎菌の焦性ブドウ酸脱水素酵素能



できる所から, 実験第3第1章の実験に附随してV.P 反応を行い, 又別に Watt, Werkmann (1951) の嫌気条件下における培地pHとA・M・C経路との関係についての成績を補足するため, ブドウ糖存在下, 好気条件下でのV.P反応を検査した。ブドウ糖加半合成培地をpH6.5, 7.0, 7.5に調整し, 各菌株を接種, 24時間37°Cに培養後, 1g CuSO₄・1H₂Oを40cc濃アンモニア水中に溶解し, これに10% KOH 960ccを加えて作製した試薬を加え, 30分後の呈色をみた。

(3) 実験成績

(i) 基礎実験・ジアセチル回収実験によると, 回収率は95.4%であった。この操作によると焦性ブドウ酸ソーダもわずかに分解し, 166γ焦性ブドウ酸ソーダより0.3γジアセチルを生成した(表8)。

至適条件として, pH6.2附近, 菌量100mgが適当であることを知った(図19~20)。

表8 Diacetyl 回収率

	添加量 *	再検量	回収率
Diacetyl	27.5γ	26.5γ	96 %
	61.0γ	58.0γ	95 %
	115.0γ	110.0γ	95.6%
	200.0γ	190.0γ	95.0%
平均			95.4%
焦性ブドウ酸	166 γ	0.3γ	

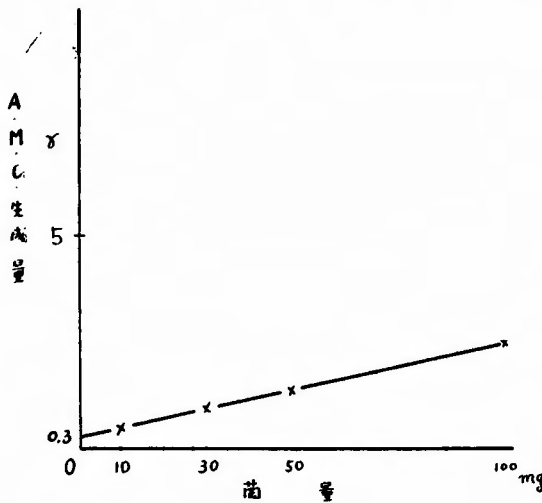
* 添加量はその都度濃度を測定した。

24時間孵置した後, 10NH₂ SO₄ 5ccを加えて反応停止ならびに除蛋白を行い, 遠心沈澱の後, 上清10ccを内容50ccのナス型蒸溜コルペンにとり, 30% FeCl₂溶液5cc, 結晶 FeSO₄ 0.5g, および蒸溜水を加えて全容を25ccとなし, 密栓のまゝ沸騰水浴中で20分間加熱した後, 油浴中で130°C附近まで加熱, 蒸溜し, 初溜10ccをとり, これに飽和クレアチン1cc, 使用直前に作製したα-ナフトールアルカリ液3ccを加え, 20分間放置して発色せしめ, ベツクマン比色計, 530mμで比色した。別に予め, 精溜ジアセチルを同様操作によつて発色せしめて作製した標準直線よりジアセチルの量を求めた。これによつてA・M・C生成量を知ることができる。

(ii) A・M・CがV.P反応として簡単に発色定性

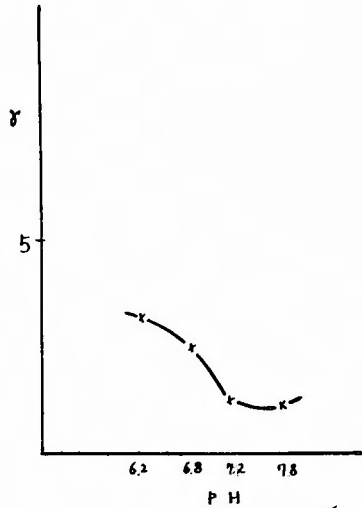
カルボリガーゼ基礎実験 (図19~20)

図 19



焦性ブドウ酸ソーダ 50γ/cc 5cc,
pH7.0, 反応時間24時間

図 20



菌量100mg,
反応時間24時間

(ii) 上記条件において、各適応菌ならびに起炎菌の A・M・C 生成度をみると、横紋筋、皮肉、骨髄各適応菌の間には A・M・C 生成量にほとんど差異を認めなかつたが、起炎菌では、筋炎起炎菌が著しく多量の A・M・C を生成した。生成 A・M・C 量は計算値166γ/焦性ブドウ酸より 100mg の dry cell によつて生成される量を示した(図21)。

との関係を見ると、基質ではブドウ糖、焦性ブドウ酸ソーダにおいて陽性、pH では6.5,7.0 においては陽性であつたが、高い pH では陰性であつた(表7), (表9)。

図21 原株、各適応菌および起炎菌のカルボリガーゼ能

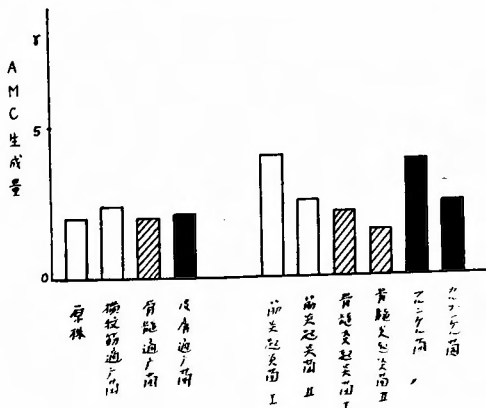


表9 V.P 反応と培地 PH

菌 株	PH 6.5	PH 7.0	PH 7.5
F	+	+	-
M	+	+	-
O	+	+	-
H	+	+	-
M _I	+	+	-
M _{II}	+	+	-
O _I	+	+	-
O _{II}	+	+	-
H _I	+	+	-
H _{II}	+	+	-

F : F・D・A 209-P 株

M : 横紋筋適応菌

O : 骨髄適応菌

H : 皮膚適応菌

M_I, M_{II} : 筋炎起炎菌 I, II

O_I, O_{II} : 骨髄起炎菌 I, II

H_I, H_{II} : フルンケル起炎菌, カルブンケル起炎菌

(iii) V. P 反応によつて培地 pH, 基質と A・M・C 生成

実験第4 ブドウ球菌の焦性ブドウ酸代謝酵素が組織親和性に関与した適応酵素として成立しうるか否かの検討, 更に遺伝的に固定されうるか否かの検討

実験第3にのべたように、横紋筋適応菌ならびに筋炎起炎菌においては焦性ブドウ酸代謝酵素活性が亢進しており、皮膚適応菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌がこれにつき、骨髓適応菌、骨髓炎起炎菌においては酵素活性が低下していた。同一菌株に出発して、各組織浸出液に継代培養し、適応せしめた各適応菌の間に、なに故このような酵素能の差異をもたらすのであろうか。この点を解明する手がかりとして、適応酵素、適応的変異（適応酵素が遺伝的に固定される）という考え方、すなわち基質量が多ければ、その基質を代謝する酵素能は亢進し、このような環境が何代も続くことによつて、この酵素能の亢進が遺伝的に固定されるという考え方が妥当か否かを検討するため、以下の実験を行つた。

第1章 家兎の横紋筋、骨髓および皮膚における焦性ブドウ酸、ブドウ糖、および乳酸の含有量

(1) 実験材料

家兎 2kg 前後の雄性家兎 14匹

(2) 実験方法

家兎を約12時間絶食せしめた後、頸動脈切断によつ

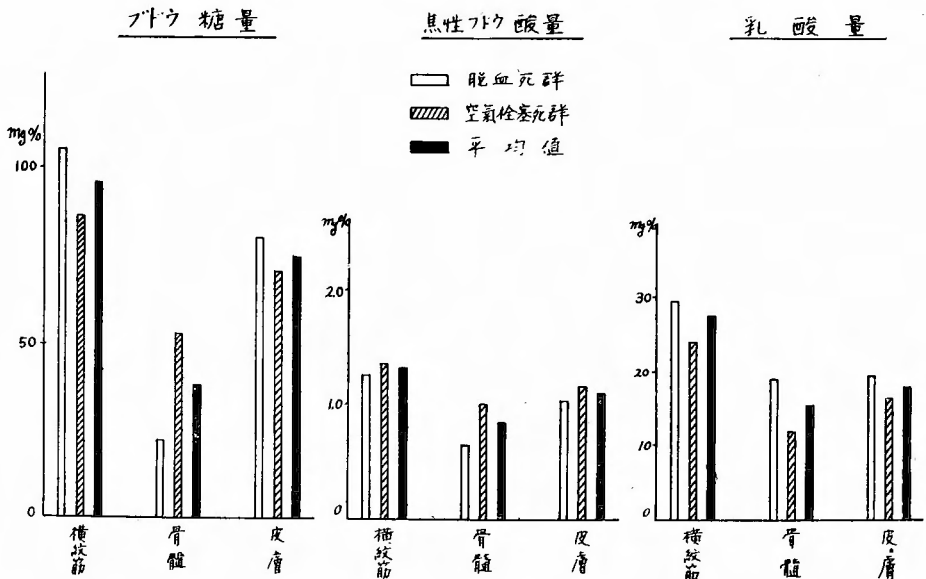
て脱血死せしめた脱血死群、および同様絶食の後、耳静脈より空気約3ccを注入して空気栓塞死せしめた空気栓塞死群の2群に分け、それぞれ大腿屈筋、大腿骨骨髓、剃毛した背部皮膚を2g宛採取し、秤量し、内1gを糖定量に用い、他の1gを焦性ブドウ酸および乳酸定量用に供した。ブドウ糖はSomogyi法、焦性ブドウ酸はFriedmann-Haugen-清水法、乳酸はBarker-Summerson-石井法によつて定量した。

(3) 実験成績ならびに小括

焦性ブドウ酸量は横紋筋に最も多く1.32mg%、皮膚では1.1mg%とこれにつき、骨髓では0.84mg%で比較的少なかつた。この成績は伊藤(1948)がモルモットの各臓器について測定した値、すなわち皮膚1.33mg%、横紋筋0.52mg%にくらべると、皮膚については、やゝ低値であつたが、筋では逆に高値を示している。しかしLu(1939)の家兎筋における測定値0.84~2.1mg%にはよく一致した。井本(1957)は家兎の皮膚焦性ブドウ酸量を平均5.17mg%としているが、私の実測でははるかに低値を示した。

ブドウ糖量は横紋筋に最も多く95.7mg%皮膚71.7mg%でこれにつき、骨髓は37.0mg%で比較的少なかつた。家兎筋ブドウ糖量については、Lu(1939)は103~129

図 22



mg%と報告しており、犬、鼠については、Soskin (1956) は、犬筋40~60mg%、犬皮膚38~71mg%、鼠筋50~70mg%、鼠皮膚39~77mg%と報告している。

乳酸量については Lu (1939) は家兎筋について19~28.8mg%と報告している。

私の成績では横紋筋 27.5mg% で最も高く、皮膚 18.0mg%、骨髄 15.5mg% とこれにつぐ値を示した。

以上の成績によつて、各適応菌の焦性ブドウ酸代謝酵素能の差は、各組織の基質濃度の差の關係とよく一致していることが明らかとなつた(図22)。

第2章 ブドウ球菌性炎症における組織化学的環境の時間的变化、とくに焦性ブドウ酸および乳酸含有量の変化と組織コハク酸脱水素酵素能

炎症巣での組織の化学的環境は炎症の進展とともに時々刻々に変化するものであろうことは想像に難くない。無菌炎症(テレピン油注入による筋の炎症)については、田坂(1958)、荒木(1957)の総合的な研究があるが、細菌性炎症についての生理化学的研究は極めて少ない。

そこで私は家兎の横紋筋、皮膚および骨髄内にブドウ球菌を注入して、細菌性炎症を惹起せしめ、化学的環境の変化、とくに焦性ブドウ酸、乳酸の含有量について時間的消長を検索して、炎症を生起しつゝある細菌において、焦性ブドウ酸代謝酵素活性の亢進を来たすような基質の増量を招来するか否かを検討した。又同時に、チトクロムCとならんで重要な呼吸酵素であるコハク酸脱水素酵素能の炎症巣における変動をも検討した。

(1) 実験材料

- (i) 家兎 2kg前後の雄性家兎 30匹
- (ii) コハク酸ソーダ 0.1M溶液
- (iii) メチレンブラウ 0.005%溶液
- (iv) 1/10M 磷酸塩緩衝液

(2) 実験方法

F・D・A・209-P 原株 10mg を含む菌懸濁液1ccを、菌注入部を明らかにするために墨汁0.1cc とともに、家兎大腿筋、背部皮膚皮内、下腿骨メタフィーゼに注入し、一定時間後に脱血せしめ、菌注入部(墨汁着色部)、その1cm周辺部、2cm周辺部および対側健常部から、骨髄のみにおいては菌注入部、対側健常部から、各組織を1g宛採取して焦性ブドウ酸および乳酸含有量の定量に供した。又横紋筋から各部位500mgをとり、コハク酸脱水素酵素能測定に用いた。

コハク酸脱水素酵素能測定は荒谷(1957)の記載に

よつて、Thunberg 管を用いて行つた。すなわち組織500mgに冰冷蒸溜水5ccを加え、Potter-Elvehjem のホモゲナイザーによつて冰冷しつゝホモゲナイズし、内2ccをpH7.0の磷酸塩緩衝液2cc とともに Thunberg 管の主室に入れ、側室には0.005%メチレンブラウ1cc および0.1Mコハク酸ソーダ1cc を入れ、以後焦性ブドウ酸脱水素酵素能測定と同様操作の下に脱色時間を測定した。

(3) 実験成績ならびに小括

焦性ブドウ酸量は時間的にみると、菌注入1時間後では、菌注入部において健側に比べて僅かに減少した。これは1時間後の菌注入部のコハク酸脱水素酵素能が僅かに亢進することよりすると、好気解糖が促進されたためと理解される。12時間後では、菌注入部および1cm周辺部の焦性ブドウ酸量は著明に増量した。これは同部においてコハク酸脱水素酵素能の著明な阻害のみられたことより、同部においては嫌気解糖が営まれ、これによつて焦性ブドウ酸の増量をきたしたものと理解される。ところが24時間後では、菌注入部においては、健側よりはなお高値ではあるが焦性ブドウ酸の減量をきたした。コハク酸脱水素酵素能は菌注入部および1cm周辺部では依然阻害されており、この部分は嫌気解糖が営まれているものと考えられ、普通なら焦性ブドウ酸の増量は持続する筈である。すなわち1時間、12時間後の所見は無菌炎症の場合とよく一致していたが、24時間後では異つた様相を呈した。これは生菌による焦性ブドウ酸の代謝によるものと理解される。

乳酸の含有量についても焦性ブドウ酸とほぼ一致した傾向がみられた。

横紋筋および皮膚については焦性ブドウ酸、乳酸の分布、および時間的推移による変化の Pattern はほぼ一致していたが、骨髄では著明な差を認めなかつた(図23~25)。

以上の成績から、横紋筋および皮膚においては、菌注入後の炎症巣に焦性ブドウ酸の増量がみられることが明らかとなつた。すなわち起炎菌が同一菌株に出發すると仮定しても、横紋筋、皮膚、骨髄の間では起炎時の發育環境における焦性ブドウ酸量が異つており、横紋筋において最も多いため、筋炎起炎菌は次第にこれに適應し、焦性ブドウ酸代謝酵素の活性がたかまり、遂にはこれが遺伝的に固定されうる可能性が大であることを示している。

又筋炎が多発する条件として、菌が一つの筋炎巣から血中に入る場合には、血管閉塞を起した中心部より入るものとするよりは、やゝ周辺の、焦性ブドウ酸

図 23
菌注入後の組織化学環境の変動 (1時間後)

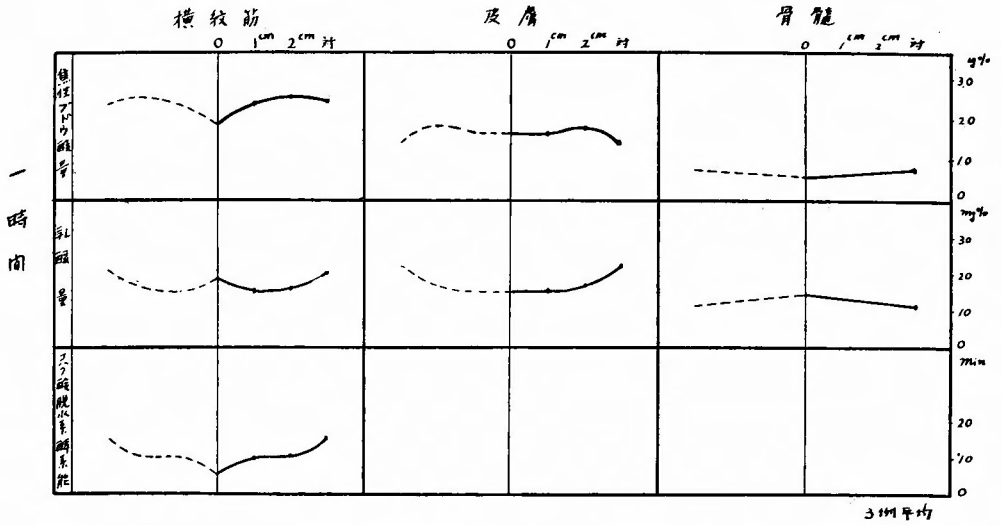
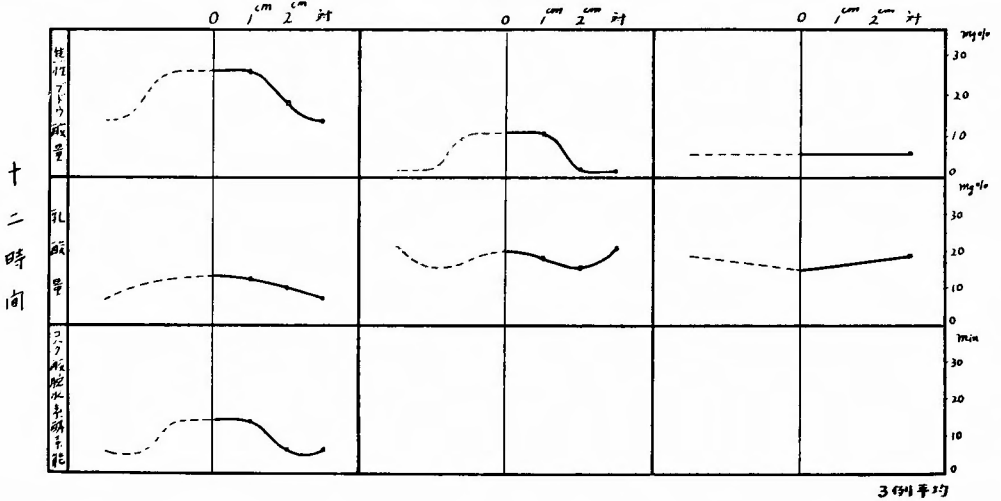


図 24
菌注入後の組織化学環境の変動 (12時間後)



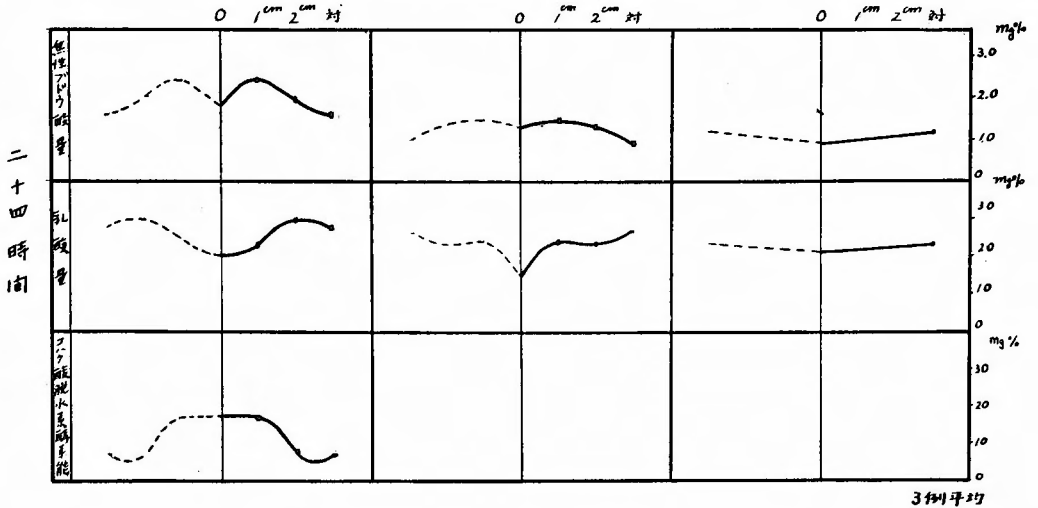
が著明に増量し、血管が閉塞の途次にある部分から侵入すると考える方が合理的であろう。このように考えると、筋炎病巣から血中に入る細菌は焦性ブドウ酸代謝酵素を適応酵素としているものと考えられ、一方これが血行を介して他の組織に止着した際には、焦性ブドウ酸の多い横紋筋において、とくに良好な発育を示すものと考えられる。又フルンケル・カルブンケル起炎菌が血行を介して筋に止着する際にも同様の機転が成立するものと考えられる。

第3章 焦性ブドウ酸代謝酵素が適応酵素として成立しうるか否かの検討

焦性ブドウ酸代謝酵素が適応酵素として成立するか否かは未だ確認されていない。このことは基礎培地に基質焦性ブドウ酸を一定量入れ、これに培養した菌が原株より高い代謝酵素能を示すか否かを検討することによつて確められる。基質分解度、脱水素酵素能、カルボリガーゼ能について検討した。

(1) 実験材料

図 25
菌注入後の組織化学環境の変動 (24時間後)



- (i) 普通寒天培地(ルー管)
- (ii) 焦性ブドウ酸加寒天培地
乳酸加寒天培地
ブドウ糖加寒天培地

培地に添加する焦性ブドウ酸ソーダ, 乳酸ソーダ, ブドウ糖は溶液としてpH7.0に調整し, Seitz 濾過器によつて濾過滅菌し, 寒天培地を加熱溶解し50°Cに冷却後, 寒天ブイヨン 200ccについて, それぞれ 0.25g, 0.5g, 1.0g 相当量を混和した.

(iii) F·D·A·209-P 原株

(2) 実験方法

各培地に F·D·A·209-P 原株を接種し, 18時間培養菌を集菌して, 蒸留水をもつて 2 回遠心沈澱, 洗滌後 resting cell の 10mg をとり基質分解度の測定に用い, 残りを dry cell として, その 10mg を脱水素酵素能測定に用い, 100mg をカルボリガゼ能測定実験に用いた.

(3) 実験成績

基質分解度については, 焦性ブドウ酸および乳酸加培地における培養菌はともに対照菌より亢進していた.

脱水素酵素能では, 焦性ブドウ酸加培地培養菌が最も強く, 乳酸加培地培養菌がこれにつぎ, ブドウ糖加培地培養菌では対照菌と変わらない酵素能を示した.

A·M·C 生成度では, 焦性ブドウ酸および乳酸加培地培養菌は生成量少なく, ブドウ糖加培地培養菌では生成量が多かつた(表10).

この成績から, 焦性ブドウ酸代謝諸酵素のうち, カルボリガゼは適応酵素として成立しがたいことが考

表 10

培地組成	基質分解度 %	脱水素酵素能 脱色時間 sec.	カルボリガゼ能 A. M. C. 生成 γ
B	66.0	105	2.5
B + G _{0.25}	65.8	75	
B + G _{0.5}	65.9	90	
B + G _{1.0}	55.0	105	6.0
B + P _{0.25}	73.8	67	
B + P _{0.5}	73.4	65	
B + P _{1.0}	72.9	65	1.5
B + L _{0.25}	71.9	70	
B + L _{0.5}	71.9	70	
B + L _{1.0}	71.9	67	1.5

5 例平均

B : ブイヨン寒天 200cc

B + G_{0.25}: ブイヨン寒天200cc + ブドウ糖0.25g

B + P_{0.5}: ブイヨン寒天 200cc + 焦性ブドウ酸ソーダ 0.5g

B + L_{1.0}: ブイヨン寒天200cc + 乳酸ソーダ1.0g

えられる。ブドウ糖加培地培養菌では A·M·C 経路が焦性ブドウ酸代謝の主路となるものと思われ, このことは嫌気条件下, 低pH, ブドウ糖含有培地発育菌は焦性ブドウ酸異化に際し A·M·C 経路をとることを示した Watt, Werkmann (1950) の成績にかんがみ興味深いものである.

一方 Seveg, Swart (1947) らはブドウ糖加培地に生育した黄色ブドウ球菌は, 無ブドウ糖培地生育菌

が2～8時間で完全に焦性ブドウ酸を代謝するのに対して、20時間を要し、又 Dismutation 能も20%に低下していると述べている。この Seveg 等の成績は、基質分解度、脱水素酵素能に関する私の実験成績ともよく符合している。

以上の成績によつて、焦性ブドウ酸脱水素酵素などは適応酵素として成立するが、カルボリガーゼではそれが成立しないことが明らかとなつた。

第4章 焦性ブドウ酸代謝酵素における適応現象が更に遺伝的に固定されるか否かの検討

(1) 実験材料

(i) 焦性ブドウ酸ソーダ、乳酸ソーダ、ブドウ糖加半合成培地

半合成培地に焦性ブドウ酸ソーダ、乳酸ソーダ、ブドウ糖をpH 7.0に補正し濾過滅菌の上、それぞれ0.1M濃度となるよう添加した。

(ii) 普通寒天培地(ルー管)

(iii) F・D・A・209-P 原株

(2) 実験方法

F・D・A・209-P 原株を半合成培地、焦性ブドウ酸ソーダ、乳酸ソーダ、ブドウ糖加半合成培地にそれぞれ20代継代培養し、継代に際しての操作は実験第1記載のように行つた。このようにして得られた菌を普通寒天培地で増菌し、更にルー管普通寒天培地に培養して得た菌につき、各酵素能を測定した。2代普通寒天培地を経過することによつて、遺伝的に固定されている酵素系の変動のみが残存していると考えられる。ルー管から蒸溜水をもつて集菌し、2回遠心沈澱、洗滌後、resting cell を基質分解度測定に用い、残りをdry cellとして脱水素酵素能、カルボリガーゼ能測定に用いた。

(3) 実験成績ならびに小括

基質分解度では、焦性ブドウ酸加培地継代菌、乳酸加培地継代菌はやゝ亢進しており、ブドウ糖加培地継代菌では阻害されていた。脱水素酵素能についても、焦性ブドウ酸ソーダおよび乳酸ソーダ加培地継代菌はともに活性がたかまつていた。

A・M・C 生成度すなわちカルボリガーゼ能については、ブドウ糖および焦性ブドウ酸加培地継代菌においてはともに活性が低下していたが、乳酸ソーダ加培地継代菌では活性は対照菌と変らなかつた(表11)。

以上の成績から、カルボリガーゼ能はブドウ糖存在下においてのみ亢進するが、遺伝的には固定されない

表 11

菌株	酵素能	基質分解度 %	脱水素酵素能 sec.	カルボリガーゼ能 A. M. C. 生成
対 照 菌		71.0	95	2.0
ブドウ糖添加培地継代菌		69.0	105	1.5
焦性ブドウ酸添加培地継代菌		75.7	65	1.0
乳酸添加培地継代菌		76.7	65	2.0

5例平均

ことが理解され、又基質分解度および脱水素酵素能はいずれも遺伝的に固定されることが明らかとなつた。

総括ならびに結語

ビタミンB₁欠乏状態において多発性筋炎が発生しやすい(小沢)か否かについて、まず被感染個体側の要約として、ビタミンB₁欠乏白鼠を用い、ブドウ球菌による筋膿瘍発症の促進の有無、同一動物の横紋筋浸出液における菌発育促進のいかんおよび焦性ブドウ酸の増量の有無などを検討し、一方病原体側の要約として、同一菌株に出発したブドウ球菌を横紋筋、骨髄、皮膚浸出液にそれぞれ継代培養して、その結果得られた各組織親和性獲得菌(適応菌)および臨床例から得られた筋炎、骨髄炎およびフルンケル・カルブンケル起炎菌について、それらの発育に及ぼす焦性ブドウ酸の影響およびそれらの菌の焦性ブドウ酸代謝酵素能を吟味し、次の成績を得た。

(1) ビタミンB₁欠乏白鼠は菌の血行内注入によつて必ずしも筋炎を発症しないが、菌の筋肉内注入によつて他の対照白鼠よりも筋膿瘍を発症し易く、しかもその発症に要する最小菌量は対照動物のそれに比べて低い値を示した。

(2) 菌の血行内注入によつて、家兎、鳩においては筋炎を発症したが、白鼠では筋炎を発症しなかつた。これは動物によつて臓器のブドウ球菌に対する感受性が異つているためと考えられる。

(3) ビタミンB₁欠乏白鼠筋においては焦性ブドウ酸の含有量が大きであつて、又その浸出液は対照白鼠筋の浸出液に比べてブドウ球菌に対する発育促進作用が大きであつた。

(4) P³² 標識菌を用いて、菌の血行内注入による筋止着度を検討すると、ビタミンB₁欠乏白鼠筋では対照に比べて、とくに著明に多量に菌が止着はしなかつたし、白鼠横紋筋適応菌と原株との間に筋止着度に大差

がなかつた。

(5) 焦性ブドウ酸はブドウ糖とともに各菌株の発育を著明に促進し、中でも横紋筋適応菌、筋炎起炎菌、皮膚適応菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌などの発育を比較的強く促進した。

(6) 横紋筋適応菌、筋炎起炎菌においては焦性ブドウ酸分解度、焦性ブドウ酸脱水素酵素能がともに亢進しており、皮膚適応菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌がこれについだが、カルポリガーゼ能は各適応菌の間に差異がなく、起炎菌では筋炎およびフルンケル・カルブンケル起炎菌において亢進を認めた。

(7) 横紋筋適応菌における焦性ブドウ酸分解度および焦性ブドウ酸脱水素酵素能の亢進を説明するため、横紋筋の焦性ブドウ酸の含有量を測定し、その含有量が大きいことを知った。皮膚適応菌も比較的高い酵素能を示し、皮膚焦性ブドウ酸含有量も横紋筋のそれに近い値を示した。このことはすなわち焦性ブドウ酸代謝酵素が適応酵素として成立することの可能性を示唆したものである。

(8) ブドウ球菌を横紋筋、皮膚および骨髄内に注入して炎症を惹起せしめ、時間的に炎症巣の化学的環境の推移、とくに焦性ブドウ酸含有量の消長を追求すると、その含有量は横紋筋および皮膚においては1時間後にやや低下したが、12、24時間後には菌注入部、周辺部においてともに増量した。筋炎起炎菌、フルンケル・カルブンケル起炎菌における焦性ブドウ酸代謝酵素能の亢進も菌発育環境における基質量の増加による適応酵素の生成にもとずく可能性のあることが判明した。

(9) 菌の焦性ブドウ酸代謝酵素の中で、基質分解度(総代謝酵素能)、脱水素酵素は実際に適応酵素として成立するが、カルポリガーゼは適応酵素として成立しないことを示した。

(10) 菌の焦性ブドウ酸代謝酵素の中で、基質分解度(総代謝酵素能)、脱水素酵素は、基質を高濃度に含有する環境における継代培養によつて、その高い活性を遺伝的に固定されうるが、カルポリガーゼ能の変動は遺伝的に固定されないことが実証された。

すなわち以上、私は筋炎ビタミンB₁欠乏説を“host-parasite relationships (Dubos)”の立場から酵素化学的に検討して、その妥当性を有することを実証したわけである。

閣筆するにあたり、終始御指導を賜つた講師石上浩一博士、並びに御助言を戴いた京大公衆衛生学教室西

尾教授、実験上種々便宜をはかつて下さつた公衆衛生学教室諸兄姉に心から感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 荒木千里：外科疾患とアレルギー。診断と治療，40, 9, 1942,
- 2) 荒木嘉隆：炎症の生化学。日本血液学会誌，20, 3, 53, 1957.
- 3) 荒谷真平：医化学実験入門。南山堂，1957.
- 4) Barker, S. B., & W. H. Summerson: The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941.
- 5) Barron, E. S. G. & C. M. Lyman: Studies on biological oxidations. IV. The metabolism of pyruvic acid by animal tissues and bacteria. *J. Biol. Chem.*, **127**, 143, 1939.
- 6) Clift, F. P. & R. P. Cook: A method of determination of some biological important aldehydes and ketones, with special reference to pyruvic acid and methylglyoxal. *Biochem. J.*, **26**, 1788, 1932.
- 7) Eggleton, P., S. R. Elsdon & N. Gough: The estimation of creatine and of diacetyl. *Biochem. J.*, **37**, 526, 1943.
- 8) 藤垣亀雄，他：各種皮膚疾患に於ける糖代謝と肝機能，ビタミンB群との関係。皮膚科紀要，49, 1, 26, 1953.
- 9) 藤田秋治：動物によるB₁の定量法。学術研究会議，ビタミンB研究特別委員会編，ビタミンB₁，創元社，91, 1948.
- 10) Friedmann, T. E. & G. E. Haugen: Pyruvic acid, (1) Collection of blood for the determination of pyruvic acid. *J. Biol. Chem.*, **144**, 67, 1942.
- 11) Gale: 細菌の化学的活性。米田正彦訳，本田書店，1955,
- 12) 井本勢太郎：自律中枢と皮膚ビタミン代謝に関する実験的研究。ビタミン，12, 5, 443, 1957.
- 13) 石原恵三，他：化膿性葡萄球菌の多元性について。日外会誌，56, 5, 574, 1955.
- 14) 石上浩一，真先敏邦：多発性筋炎ならびに骨髄炎の発生に関する実験的研究。日外会誌，57, 1, 136, 1956.
- 15) 石上浩一，真先敏邦：急性化膿性膿性筋炎—とくに多発性筋炎の成因を中心として—。最新医学，12, 6, 63, 1957.
- 16) 石井暢：乳酸比色定量法について。医学と生物学，16, 317, 1950.
- 17) 石本真：Thunberg 管の使い方。赤堀四郎編，酵素研究法(I)，606, 1957.
- 18) 伊藤真次：モルモット諸臓器の焦性ブドウ酸量。日生理誌，11, 1・2, 18, 1948.
- 19) 岩切章：急性化膿性多発性筋炎の実験的研究

- (そのアレルギー性成因への考察). 大阪市大医誌, 4, 3, 203, 1955.
- 20) Knight, B. C. J. G.: The nutrition of staphylococcus aureus; Nicotinic acid and vitamin B₁. Biochem. J., **31**, 731, 1931.
 - 21) 加藤昭, 須田正己: 脱水素酵素. 江上不二夫, 他編, 標準生化学実験, 文光堂, 293, 1953.
 - 22) Krebs, H. A.: Dismutation of pyruvic acid in gonococcus and staphylococcus. Biochem. J., **31**, 661, 1937.
 - 23) Lipmann: Die Dehydrierung der Brenztraubensäure. Enzymologia, **4**, 65, 1937.
 - 24) Lu, G. D. & D. M. Needham: Studies on the metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B₁ deficient states. Biochem. J., **33**, 1544, 1939.
 - 25) Maeda, T.: Experimental studies on the pathogenesis of polymyositis and polyosteomyelitis. Arch. Jap. Chir., **28**, 4, 1197, 1959
 - 26) Martinotti, C.: Über Polymyositis acuta, verursacht durch einen Staphylococcus. Ztbl. Bact., Originale, **28**, 877, 1898.
 - 27) 丸尾文治, 他: 放射性同位元素, 赤堀四郎編, 酵素研究法(I), 朝倉書店, 616, 1957.
 - 28) Masaki, T.: Experimental study on the pathogenesis of polymyositis and polyosteomyelitis with special reference to the role of the altered staphylococcal tissue-affinities induced by adaptation to the environment where they developed, and to the role of the chemical constitutions of bone marrow. Arch. Jap. Chir. **25**, 1, 464, 1956.
 - 29) 間島喜好: 実験的 V. A, B, C, 各欠乏症に於ける骨格筋変化の比較観察. 京都府医大誌, **32**, 555, 1941.
 - 30) 嶺高雄: ビタミンB₁欠乏と腸チフス菌性筋炎. 日本体質学雑誌, **17**, 1, 3, 1952.
 - 31) 中川一郎, 中村勳: 動物実験法. 中川一郎編, 栄養学実験書, 朝倉書店, 281, 1955.
 - 32) Neuberg, C. & J. Hirsch: Über ein Kohlenstoff-ketten Knüpfendes Ferment (Carbolygase). Biochem. Z., **115**, 282, 1921.
 - 33) 西野芳久: 原発性急性化膿性筋炎の統計的観察. 北越医誌, **48**, 893, 1933.
 - 34) 西脇郁三: 急性化膿性筋炎における血中ビタミンB₁量について. 日外会誌, **52**, 1, 47, 1951.
 - 35) 奥田幹三: 化膿性筋炎の統計的観察. 日外会誌, **53**, 3, 202, 1952.
 - 36) 小沢凱夫: 化膿性筋炎の発生について. 大阪医学学会誌, **26**, 12, 3219, 1927.
 - 37) Platt, B. S. & G. D. Lu: Chemical and clinical findings in beriberi with special reference to V. B₁ deficiency. Quart. J. Med., **5**, 355, 1936.
 - 38) Peters, R. A.: Pyruvic acid oxidation in brain. (1) Vitamin B₁ and the pyruvate oxidase in pigeon's brain. Biochem. J. **30**, 2206, 1936.
 - 39) 斎藤忠夫: 化膿性皮膚疾患とビタミンB₁. 皮膚科紀要, **48**, 342, 1952.
 - 40) 笹川泰治: TCACycle系の解析法, (1)微生物の intact cell による解析. 赤堀四郎編, 酵素研究法(III), 朝倉書店, 129, 1957.
 - 41) Seveg, M. G. & E. A. Swart: Metabolism of pyruvic acid by bacteria. Arch. Biochem., **13**, 401, 1947.
 - 42) 島菌順雄, 春日誠次: ケト酸及びオキソ酸定量法. 江上不二夫, 他編, 標準生化学実験, 文光堂, **31**, 1953.
 - 43) 清水康三: 血中及び尿中 α -Keto 酸, (1) 焦性ブドウ酸及び α -Ketoglutar 酸定量法. 医学と生物学, **17**, 102, 1951.
 - 44) Somogyi: A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., **160**, 61, 1945.
 - 45) Soskin, S. & R. Levine: 糖代謝. 吉岡一訳, 医歯薬出版, **9**, 1956.
 - 46) Stedmann, R. L. & E. Kravitz: Evidence for a common pathway for pyruvate and acetate oxidation by micrococcus pyogenes var. aureus. Arch. Biochem. Biophys. **59**, 260, 1955.
 - 47) Strecker, H. J. & S. Ochoa: Pyruvate oxidation system and acetoin formation. J. Biol. Chem., **209**, 313, 1954.
 - 48) 直野司郎, 須田正己: 細菌の適応, 適応現象と代謝経路への利用. 江上不二夫, 他編, 標準生化学実験, 文光堂, 434, 1953.
 - 49) 高宮正: 皮膚科領域に於けるビタミンB₁の実験的研究. 皮膚科紀要, **51**, 1, 56, 1955.
 - 50) 田坂定孝, 荒木嘉隆: 炎症の生理化学的機転. —細胞の代謝と血管反応—炎症. 最新医学社, 137, 1958.
 - 51) 千秋弘道: 家兎及び猫B₁欠乏症特にその神経系統及び筋肉の組織的变化. 神経学誌, **32**, 393, 1930.
 - 52) 土倉一郎: 多発性筋炎および骨髄炎の発生原因に関する酵素化学的研究(特に起炎ブドウ球菌の組織親和性の本態について). 日外宝 **28**, 4, 1384, 1959
 - 53) Watt, D. & C. H. Werkmann: Modification of the enzyme system of micrococcus pyogenes. Arch. Biochem. Biophys. **31**, 383, 1950.
 - 53) Westerfeld, W. W.: A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. **161**, 495, 1945.
 - 54) 山村雄一, 生田重雄: Carbolygase. 赤堀四郎編, 酵素研究法(II), 朝倉書店, 701, 1957.