多発性筋炎および多発性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)

京都大学医学部外科学教室第2講座(指導:青柳安誠教授)

土　倉　一　郎

(原稿受付　昭和34年2月27日)

ENZYMOLOGICAL STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF POLYMYOSITIS AND POLYOSTEOMYELITIS, ESPECIALLY ON THE ORIGIN OF THE STAPHYLOCOCCAL TISSUE-AFFINITIES

by

ICHIRO DOGURA

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

The author tried to clarify the origin of the staphylococcal tissue-affinities on the occurrence of polymyositis and polyosteomyelitis. The F. D. A. strain of staphylococcus aureus was successively subcultured on the synthetic amino acid media containing the extracts of rabbit's skeletal muscles and bone-marrow. The bacterial alkaline phosphatase- and ATP-ase activities of these adapted strains and various strains isolated from the clinical cases of suppurative myositis and osteomyelitis were examined. The results obtained were as follows:-

(1) The so-called osteo-strain, such as the bone-marrow-adapted strain and the osteomyelitis strains showed remarkable alkaline phosphatase activities and they were strikingly activated by adding the bone-marrow extract to the reaction mixture, as compared with other strains. The enzyme activation after adding the comparatively pure coenzyme of phosphatase of the bone-marrow extract to the crude apoenzme of bacterial phosphatase of each adapted strain was also most remarkable in the bone-marrow-adapted strain. On the other hand, the determination of alkaline phosphatase activities comprised in each tissue of a normal rabbit showed that the metaphysis of the long tubular bone of the young rabbit carried the largest distribution. From these experimental results the author should like to conclude that the osteo-strain could show the easiest growth in the bone-marrow, especially in the metaphysis of the long tubular bone of a young rabbit, because of the possibility of its unique phosphoric metabolic mechanism being strongly utilized. Namely, it proved that for the occurrence of osteomyelitis, such chemical environment, as the ample distribution

of the alkaline phosphatase suitable for the growth of the osteo-strain, plays an important part.

(2) Comparative examination of the ATP-ase activities of various strains and the effect of the skeletal muscles extract on them resulted in the observation of a marked activation of the enzyme activity of the so-called myo-strain, such as the muscle-adapted strain and the myositis strains. The examination of the ATP-ase activities of various strains with the addition of the non-dialysable part or heating part (60°C, two hours) of the muscles extract, moreover, resulted in discovering that, by the addition of the former, the activating effect of the ATP-ase activity shows no change, while, by the addition of the latter, the activating effect shows a decrease. These facts show that the effect of the skeletal muscles to stimulate the growth of bacteria is due to the myosin which is the principal structural protein of the muscles and that, when the myo-strain affects the skeletal muscles, the ATP-ase function, preluding the composition of the protein of the bacterial body, is displayed especially strongly as compared with other strains, and thus, it is clarified that the myo-strain can grow more easily in the skeletal muscles than in other tissues. No activating effect on the bacterial ATP-ase activities of various strains was observed in adding the uterus muscles extract to the reaction mixture, while practically no ATP-ase activity was observed in the uterus muscles extract itself. Thus it was confirmed that such chemical environment as the myosin-ATP-ase system peculiar to the skeletal muscles is best suited for the growth of myo-strain.

(3) It is natural that a number of factors probably take part in the occurrence of acute suppurative polymyositis and polyosteomyelitis. It may be said that this interesting phenomenon is perhaps brought about by the so-called "HOST-PARASITE RELATIONSHIPS (Dubos)", that is, interrelation between the peculiar chemical environments comprised in the skeletal muscles or the bone-marrow and the formation of the adaptive enzymes in the staphylococcus against these tissues.

目　次

第1章　緒　言
第2章　黄色ブドウ球菌F.D.A.209-P株を家兎横紋筋および骨髄に適応せしめる培養上の基礎実験
第3章　各菌のアルカリ・フォスファターゼ能と，それらに対する骨髄浸出液の影響および正常家兎各組織のアルカリ・フォスファターゼ分布状態
第1節　緒　言
第2節　各菌のアルカリ・フォスファターゼ能と，それらに対する骨髄浸出液の影響
第3節　正常家兎各組織のアルカリ・フォスファターゼ分布状態
第4節　菌フォスファターゼ担持簇と骨髄フォスファターゼ活性簇との関係
第4章　各菌のATP-ase能と，それらに対する横紋筋，平滑筋各浸出液の影響
第1節　緒　言.
第2節　黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P株のATP-ase能
第3節　各適応菌，各起炎菌のATP-ase能と，それらに対する横紋筋，子宮筋各浸出液の影響
第5章　結　語
参考文献

第1章　緒　　言

われわれは臨床的に，急性化膿筋炎あるいは急性化膿性骨髄炎が血行性転移を起すにあたつて，ひとたび筋肉を侵したブドウ球菌はその後に骨髄を侵すことなく相次いで筋肉のみを侵して多発性化膿性筋炎を作り，またひとたび骨髄を侵したブドウ球菌はその後に骨髄のみを侵して多発性骨髄炎を起す事実を経験して

いる．血行性転移であるからには，筋炎に際して骨髄炎が合併し，またその逆の場合が起つてもよいわけであるが，事実は全くこのような症例を見ることは殆んどないのである．この問題について共同研究者真先は，同一菌株に出発した黄色ブドウ球菌を家兎の横紋筋浸出液および骨髄浸出液を含有する培地に継代培養して誘導した菌株が，前者は横紋筋浸出液を含有する培地に，後者は骨髄浸出液を含有する培地にそれぞれよく発育することを立証し，また動物実験では，各菌株を血行内注入または筋肉内，骨髄内に局所注入することによつて，最小菌量で家兎にそれぞれ典型的な筋炎および骨髄炎を惹起させることができた．この実験から真先は，従来考えられるように，黄色ブドウ球菌には筋炎を起し易い菌株 Myo-strain と骨髄に親和性のある菌株 Osteo-strain とがあつて，これらの菌株は元来から異るという多元説に対して，ブドウ球菌が最初侵入した宿所の環境状態によつて Myo-strain なり Osteo-strain なりに変化するという，ブドウ球菌一元論の成立を提唱した．

それではこのように，ブドウ球菌が横紋筋または骨髄で増殖するうちに，それぞれの組織に対して獲得した親和性の本態がどのようなものであるかについて，なおさらに追求する必要があるわけである．

最近の遺伝生化学的研究によると，細菌の代謝，さらにはその性格を決定するものは菌体酵素によるのであつて，すべての適応現象においても酵素構造の変化が必須であり，かつその構造は恒常的なものではなく，いろいろな環境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されることが明らかにされている．著者はこのような酵素化学的観点に立脚して，共同研究者真先の研究をさらにおし進めて，多発性炎症成立における起炎ブドウ球菌の横紋筋および骨髄に対する組織親和性の本態を解明するため，以下の実験にただした．

第2章　黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P 株を家兎横紋筋および骨髄に適応せしめる培養上の基礎実験

いわゆる Myo-strain や Osteo-strain を実験的に作製するにはどのような方法によればよいか．真先はその最良の方法として，横紋筋および骨髄浸出液を加えた寒天培地上にブドウ球菌を約50代継代培養することによつて，各組織に適応せしめてえた菌株を実験的に作製した．

その結果このようにして作製した各適応菌は筋炎，骨髄炎等の患者からえた各起炎菌に殆んど相似の性格を有していることが判明した．

そこで著者は，この真先法をさらに改良して，ブドウ球菌の組織浸出液への適応獲得をより強くする目的で，寒天培地を用いずに組成の明らかなアミノ酸合成培地に各浸出液を加えたものを使用した．

1.　実験材料および実験方法

(1)　アミノ酸合成培地

Knight 氏ブドウ球菌合成培地を桑原氏が改良したものを使用した．培地の滅菌は Seitz 氏細菌濾過器によつて濾過滅菌を行つたが，合成培地の組成は第1表の通りである．

第1表　アミノ酸合成培地組成

Na_2HPO_4	5.5g	L-Proline	0.05g
KH_2PO_4	1.3	L-Lysine・HCl	0.05
NaCl	2.5	L-Leucine	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	L-Cystine	0.02
Glucose	2.0	Arginine・HCl	0.1
Niacin	5γ/cc	Histidine・HCl	0.05
Thiamine	5γ/cc	Valine	0.1

Aq. dest.　1000cc ; pH　7.0 ± 0.2

(2)　横紋筋および骨髄浸出液加アミノ酸合成培地

体重約 2kg の家兎の大腿部横紋筋および大腿骨骨髄を外科無菌的に採取し，同重量の海砂と4倍量の生理食塩水を加えて乳鉢内で磨砕し，遠心沈澱して上清をとり pH 7.0 に調整して Seitz 氏濾過器で濾過滅菌し，あらかじめ用意した上記アミノ酸合成培地 4.5cc に各浸出液 0.5cc 宛無菌的操作で加えた．さらに対照としてアミノ酸合成培地 4.5cc のものを用いた．

(3)　標準黄色ブドウ球菌

本学微生物学教室保存の黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P 株

(4)　継代培養

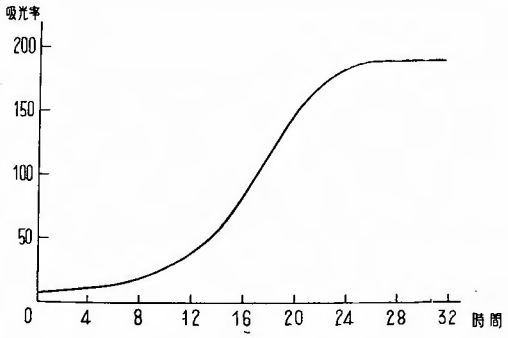
上述の横紋筋浸出液加合成培地，骨髄浸出液加合成培地および対照アミノ酸合成培地に単離してえた同一菌株に出発する黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P 株を37℃24時間各60代継代培養した．雑菌の混入を防ぐため各代毎に継代培地より菌体を一白金耳寒天培地に塗抹培養して菌集落を吟味し，さらに塗抹鏡検をもあわせ行つた．横紋筋浸出液加培地に継代培養したものを横紋筋適応菌，骨髄浸出液加培地に継代培養したものを骨髄適応菌，対照培地に継代培養したものを対照菌として記載した．

(5)　アミノ酸合成培地における黄色ブドウ球菌の発育曲線.

すでに準備したアミノ酸合成培地に黄色ブドウ球菌をその液 1.0cc 中鳥潟沈澱計 10度目の割合になるように接種培養し，菌発育を各時間毎に比濁法によつて測定した.

2.　実験成績および小括.

ブドウ球菌の発育は一般にアミノ酸合成培地においては普通ブイヨン培地におけるよりも悪く，これはアミノ酸中の重金属イオンが菌発育に影響をおよぼすためであるが，しかし接種菌量を十分多くして継代培養して行くと次第に菌の発育がよくなることが分つた. 細菌の適応現象において酵素形成の最も旺盛な時期は菌増殖の対数期に一致するといわれており，このアミノ酸合成培地におけるブドウ球菌発育曲線を測定した結果では，約24時間で十分に定常期にあることが分つたので（第1図），24時間毎に継代培養を行つた.



第1図　アミノ酸合成培地における黄色ブドウ球菌発育曲線

第3章　各菌のアルカリ・フォスファターゼ能と，それらに対する骨髄浸出液の影響および正常家兎各組織のアルカリ・フォスファターゼ分布状態

第1節　緒　言.

フォスファターゼは燐酸エステルの水解および合成を触媒する酵素で，生体内にひろく存在し，組織細胞の分化，新陳代謝に欠くことのできないものである. ことに骨髄組織では多量に存在し，しかも代謝の激しい部位にとくに多い事実から，その生理的あるいは病的代謝に密接な関係を有することが考えられる.

Boivin, 真先等の報告によると，黄色ブドウ球菌にはグリセロ燐酸を基質とし pH 10において Ortho-燐酸を遊離するアルカリ・フォスファターゼが存在することが明らかであつて，これは生体内各臓器のアルカリ・フォスファターゼと同様な条件のもとに活性を発揮するといわれている.

一方，酸性およびアルカリ性フォスファターゼ能の強大な前立腺癌細胞が，特異的に多発性骨転移を営む事実が知られているが，この事実をそのまま多発性骨髄炎の成因解明に採用しえないだろうかという疑問がわいてくる. そこで，起炎菌と骨髄組織とのフォスファターゼの相関々係を究めることによつて，いわゆる Osteo-strainが骨髄に対して特異的組織親和性を発揮することの本態を解明できないだろうかと考えて，次の実験を行つた.

第2節　各菌のアルカリ・フォスファターゼ能と，それらに対する骨髄浸出液の影響.

1.　実験材料および実験方法.

(1)　酵素液.

生菌蒸留水浮遊液を使用. すなわち，pH 7.0普通ブイヨン培地に37℃ 24時間，さらに3%普通寒天培地に37℃ 18時間培養して生じた被検菌集落を生理食塩水で集め，生理食塩水と緩衝液でそれぞれ1回洗滌後，所要 pH の緩衝液中に懸遊し，鳥潟沈澱計で菌量を測定し酵素量を一定にし，作製直後のものを使用した.

(2)　基質溶液.

グリセロ燐酸ソーダ（メルク社製品）を使用の都度2.5%の濃度になるよう緩衝液に溶解して作製した.

(3)　緩衝液.

m/10glycocoll-N/10NaOH 緩衝液（Sφrensen).

(4)　被検菌.

a)　骨髄適応筋.

b)　横紋筋適応筋.

c)　対照菌.

d)　骨髄炎起炎菌（A），（B）. 本院外科入院中の慢性大腿骨々髄炎患者の病巣を掻爬した膿汁から分離培養した黄色ブドウ球菌.

e)　筋炎起炎菌（A），(B). 本院外科入院中の化膿性筋炎患者の病巣穿刺液から分離培養した黄色ブドウ球菌.

(5)　骨髄浸出液.

体重約 500g の幼若家兎大腿骨々髄を外科無菌的に採取し，同重量海砂と4倍量の生理食塩水を加えて乳鉢内で磨砕し，遠心分離して上清を浸出液として使用した.

(6)　実験方法.

主反応として「酵素液 1.0cc＋基質溶液5.0cc＋緩衝液5.0cc＋トルオール 0.5cc」全量 11.5cc という組成をとり，対照としては「基質溶液 5.0cc＋緩衝液 6.0cc＋トルオール0.5cc」と「酵素液1.0cc ＋緩衝液 10cc＋トルオール0.5cc」という反応組成をとつた.

また骨髄浸出液の影響を検する場合には，酵素液 1.0ccに骨髄浸出液1.0ccを加え，緩衝液を 1.0cc宛減量して全量を11.5ccとした. 反応組成混和直後および24時間，37°C孵置後，それぞれの反応組成から 1.0cc 宛をとり，5%三塩化醋酸で除蛋白し，Fiske-Subbarow 法によつて無機燐量を Beckmann 氏光電比色計で測定し，増加無機燐量から対照値をひいた値を酵素分解燐量として記載した.

2.　実験成績および小括.

各菌のアルカリ・フォスファターゼ能を測定した結果では，骨髄適応菌，骨髄炎起炎菌がわずかに他の菌株よりも強い値を示す程度であつて，しかもこれら各菌に幼若家兎大腿骨々髄浸出液を加えると，骨髄適応菌，骨髄炎起炎菌の酵素能は著明に亢進した（第2, 3, 4, 5表).

概して炎症の成立は起炎菌と被感染組織との戦いの総和によるものであるから，細菌自身の酵素能よりはむしろそれに組織浸出液を添加した結果を重視すべきである. 化骨現象は Robison (1923) によると，血液中に燐酸エステルが多量に含まれていて，それが化骨部位のフォスファターゼの多いところに行くと分解されて燐酸が多量に遊離し，これが$Ca^{\cdot\cdot}$と結合して不溶性の沈澱となり石灰沈着をきたすといわれる. 上記の成績は，骨髄適応菌，骨髄炎起炎菌等のいわゆる Osteo-strain が，このような骨髄組織の特異な燐酸代謝機構を強く利用しうるような性格＝酵素構造を具備していることを意味するものである. そしてとりもなおさずこのことが，細菌の骨髄への適応を裏付けるものであり，Osteo-strain が他の組織におけるよりも骨髄において最もよく発育するゆえん，すなわち Osteo-strain の組織親和性の本態を一部解明するものといえよう.

第2表　各適応菌のアルカリ・フオスファターゼ能

菌株 ＼ 継代代数	骨髄適応菌	横紋筋適応菌	対照菌
0	0.0153mg%	0.0153mg%	0.0153mg%
15	0.0190	0.0140	0.0163
25	0.0250	0.0044	0.0160
35	0.0210	0.0126	0.0120
45	0.0320	0.0186	0.0153
60	0.0230	0.0163	0.0140

第3表　各適応菌のアルカリ・フオスファターゼに対する骨髄浸出液の影響

酵素源	遊離P量 mg %
骨髄浸出液　1.0 cc	12.2
骨髄浸出液1.0cc＋骨髄適応菌150mg	45.0
骨髄浸出液1.0cc＋横紋筋適応菌150mg	18.0
骨髄浸出液1.0cc＋対照菌　150 mg	23.0
骨髄適応菌　150mg	3.1
横紋筋適応菌　150mg	2.3
対照菌　150mg	2.45

第4表　各起炎菌のアルカリ・フオスファターゼに対する骨髄浸出液の影響(A)

酵素源	遊離P量 mg %
骨髄浸出液　1.0cc	12.2
骨髄浸出液1.0cc＋骨髄炎起炎菌(A) 150mg	35.0
骨髄浸出液1.0cc＋筋炎起炎菌(A)　150mg	19.5
骨髄炎起炎菌　150mg	4.3
筋炎起炎菌　150mg	2.1

第5表　各起炎菌のアルカリ・フオスファターゼに対する骨髄浸出液の影響(B)

酵素源	遊離P量 mg%
骨髄浸出液　1.0cc	12.2
骨髄浸出液1.0cc＋骨髄炎起炎菌(B) 150mg	24.0
骨髄浸出液1.0cc＋筋炎起炎菌(B) 150mg	13.9
骨髄炎起炎菌　150mg	3.7
筋炎起炎菌　150mg	2.4

第3節　正常家兎各組織のアリカリ・フォスファーターゼ分布状態.

Lexer(1903)によると，骨髄炎が主として長管状骨の，ことに幼若期のメタフィーゼ骨髄に好発するのは，メタフィーゼ骨髄では血管が静脈瘤様に拡張していて，細菌が停滞し易く，したがつてここに炎症を起し易いとされている. 一方，Folley, Kay 等 (1936)によると，フォスフォモノエステラーゼは幼若長管状骨の化骨線部に多いとされている. そこでわれわれは骨

髄炎がメタフィーゼに好発する事実を酵素化学的に解明するため，まず正常家兎の骨髄各部を初めその他の臓器についてアルカリ・フォスファターゼ分布状態を検討した．

1. 実験材料および実験方法．

(1) 酵素液．

体重約500g の幼若家兎の大腿骨から，エピフィーゼ，メタフィーゼ，ディアフィーゼを分離して採取し，前節の骨髄浸出液作製法と同様にして浸出液を作製．さらに体重2kgの成熟家兎の大腿骨々髄（エピフィーゼとメタフィーゼは化骨しているため分離できずディアフィーゼのみ），肋骨々髄，大腿部横紋筋，心筋，子宮筋，肝臓，腎臓の各組織をそれぞれ採取して同様に浸出液を作製した．

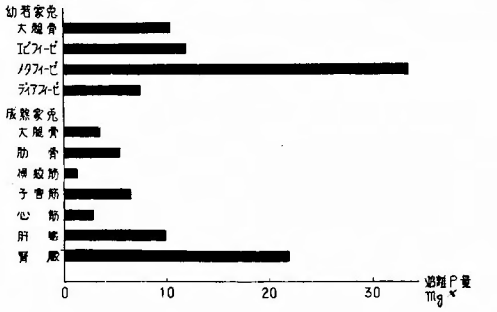
(2) 実験方法．

上記組織浸出液をそれぞれ酵素材料として，第2節の実験方法に従つてフォスファターゼ能を測定した．

2. 実験成績および小括．

正常家兎各組織のアルカリ・フォスファターゼ能は，骨髄，腎臓にとくに多く，同じ骨髄でも成熟動物よりも幼若家兎に，また短骨よりも長管状骨に多く分布し，また長管状骨ではメタフィーゼに最も多く，ついでエピフィーゼに多く，ディアフィーゼには少なく，横紋筋には殆んど証明されなかつた(第2図)．

（第2図）正常家兎各組織のアルカリフォスファターゼ分布状態

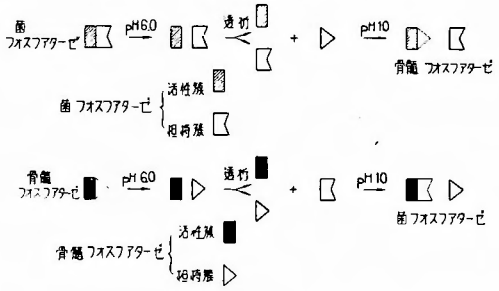


このように幼若期の長管状骨のメタフィーゼにアルカリ・フォスファターゼ能が最も強いことは，化骨現象の旺盛な化骨線部に燐酸代謝が強く行われていることから当然のことであつて，このような化学的環境を重視すれば前節の結果と関連して，骨髄の燐酸代謝機構を最も強く利用する Osteo-strain が化骨線部に炎症を惹起し易いことが首肯できるのである．

第4節　菌フォスファターゼ担持簇と骨髄フォスファターゼ活性簇との関係．

H. Albers 等 (1938) によると，アルカリ・フォスファターゼの活性簇と担持簇とは比較的ゆるく結合し，その結合は pH を酸性にして透析を行うと比較的容易に両者を分離することができ，さらに両者を混じて安定度の最大である pH におくと両者は結びついて著しいフォスファターゼ作用が現われるといわれる．またあるフォスファターゼの活性簇と他のフォスファターゼの担持簇とを，担持簇の由来したフォスファターゼの安定な pH におくと，できたフォスファターゼは担持簇の由来したフォスファターゼの性質をもつと考えられる(第3図)．そこで以上の知見にもとずき，各適応菌，骨髄浸出液のフォスファターゼから，比較的純粋な担持簇と活性簇とを分離し，各適応菌の担持簇と骨髄浸出液の活性簇との結合を，成立した酵素能より測定した．

第3図　フォスファターゼの活性簇と担持簇との関係
（H. Albers による模型図）



1. 実験材料および実験方法．

(1) 酵素液．

a) 被検菌の粗製フォスファターゼ担持簇．普通ブイヨン培地に24時間，さらに3%普通寒天培地に18時間培養して生じた被検菌集落を生理食塩水で集め，菌フォスファターゼの活性簇をできるだけ除去して比較的純粋な担持簇を作るため，pH 6.0で48時間透析用セロフアンで室温で透析し，遠心沈澱した沈渣を緩衝液に懸遊してpH 10に調整し，菌量を鳥潟沈澱計で計測し酵素量を一定にして使用した．

b) 骨髄浸出液粗製フォスファターゼ活性簇．

体重 500g の幼若家兎大腿骨々髄を外科無菌的に採取し，同重量海砂と4倍量の生理食塩水を加えて乳鉢内で磨砕し，pH 6.0で24時間氷室に放置後，毎分3000回転30分間遠心沈澱して上清をとり，pH 10に調整したものを便宜上使用した．理想的には透析性成分を濃縮したものを使用すべきものである．

(2) 基質溶液．

グリセロ燐酸ソーダ（メルク社製品）を，使用の都度2.5%の濃度になるよう緩衝液に溶解して作製した．

(3) 緩衝液．

m/10glycocoll-N/10NaOH 緩衝液（Sørensen）．

(4) 被検菌．

a) 骨髄適応菌．

b) 横紋筋適応菌．

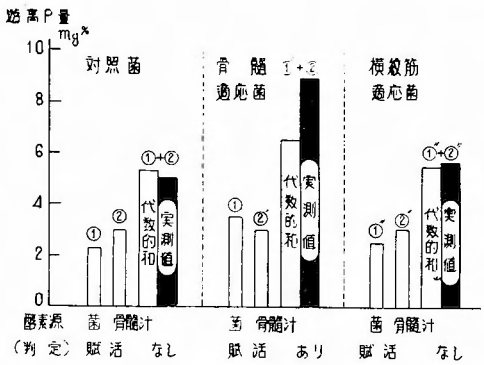
c) 対照菌．

(5) 実験方法．

本章，第2節の実験方法に従つた．

2. 実験成績および小括．

活性簇を一部除去した各菌フォスファターゼに，比較的純粋な骨髄浸出液フォスファターゼ活性簇を加えたさいの酵素能賦活は，骨髄適応菌の場合が最も著明であつた(第4図)．すなわちこの事実から骨髄適応菌の担持簇は，対照菌のそれよりも骨髄浸出液の活性簇とより容易に結合することがわかつた．骨髄フォスファターゼには，lyo-enzyme が多くかつ他の臓器のそれに比較して酵素の両画分が解離し易いといわれている点を考慮すると，骨髄適応菌が骨髄においてはとくに菌体外に存在する酵素画分を利用することができ，ひいてはその発育が容易になることが考えられる．



第4図　活性簇を一部除去した骨髄適応菌，横紋筋適応菌および対照菌のフォスファターゼに対する骨髄浸出液フォスファターゼ粗製活性簇画分添加の影響

第4章　各菌の ATP-ase 能と，それらに対する横紋筋，平滑筋各浸出液の影響

第1節　緒　言．

ATP-ase とは ATP（Adenosine triphosphate の略）を分解して Ortho- 燐酸を遊離する酵素をいうのであつて，ATP はLohmann および Fiske-Subbarow (1929) により初めて筋肉抽出物質中から発見されたが，当時は生体内での生理的意義は不明であつた．その後 Engelhardt, Ljubimova (1939) はこの物質が筋肉収縮機構に大きな意義をもつことを発見し，筋収縮蛋白ミオシンが ATP を分解して Ortho-燐酸を遊離させる酵素であることを立証した．すなわち筋肉の ATP-ase はミオシン画分に集ること，ミオシンの変性により ATP-ase 活性は消失すること，どのような条件下でもミオシンと ATP-ase は分離できないことなどから，筋肉の ATP-ase はミオシンに帰せられると結論した．さらに Szent-györgyi 等によつても，ATP-ase がミオシンに属することが結晶ミオシンおよびその他の精製ミオシンについて明らかにされた．また Lipmann (1941)は，ATP が分解して Ortho- 燐酸を遊離するとき約12 Kcal のエネルギーを放出することを実証して，生体内で ATP がエネルギー源として重要な役割を演じていることを報告した．

一方，筋炎起炎ブドウ球菌が ATP を添加した培地や，横紋筋浸出液を加えた培地で，その発育が強く促進される事実と，ATP-ase が菌体蛋白合成の前提となる高エネルギー燐酸化合物の代謝に重大な意義をもつこととをあわせ考えて，いわゆる Myo-strain の横紋筋親和性の本態を ATP-ase を中心に解明するため次の実験を行つた．

第2節　黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209·P株のATP-ase 能．

生体各臓器の ATP-ase 能についてはすでに幾多の報告があるが，ブドウ球菌のそれについての報告はまだ見出しえない．ATP-ase は細胞内で行われる合成反応のエネルギーを供給する ATP の脱燐酸反応を触媒する酵素であるから，生細胞であるブドウ球菌にも ATP-ase が多量に認められてよいわけであつて，まず母菌について ATP-ase の各至適条件を吟味した．

1. 実験材料および実験方法．

(1) 酵素液．

普通ブイヨン培地および3% 普通寒天培地を通じて増菌した被検菌集落を生理食塩水で集め，遠心沈澱してさらに緩衝液で洗滌したのち，所要 pH の緩衝液に懸遊し，菌量を鳥潟沈澱計で測定して酵素量を一定にし，作製直後のものを使用した．

(2) 基質溶液.

ATP-Na_4（和光純薬株式会社製品）を，使用の都度所要の濃度になるよう緩衝液に溶解して作製した.

(3) 緩衝液.

m/10Veronal-N/10HCl 緩衝液（Michaelis).

(4) 被検菌.

本学微生物学教室保存の黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P株.

(5) 実験方法.

測定は Du-Bois Potter 法に準じて施行した.

主反応として「酵素液 1.0cc＋基質溶液 1.0cc＋緩衝液8.0cc」全量 10cc という組成をとり，対照としては「基質溶液1.0cc＋緩衝液 9.0cc」と「酵素液 1.0cc ＋緩衝液9.0cc」という組成をとつた．反応組成混和直後および所要時間，所要温度水浴後直ちに氷中におき，各組成液から 1.0cc宛をとり，5%三塩化醋酸で除蛋白し，その上清について遊離燐量を Fiske-Subbarow 法で発色せしめ Beckmann 氏光電比色計で測定し，増加無機燐量から対照値をひいた値を酵素分解燐量として記載した.

2. 実験成績および小括.

(1) 至適 pH.

一般に生体内の ATP-ase 活性は pH 6.0と pH 9.0 の2つに極大を有し，後者は前者の約2倍大であるといわれている．ブドウ球菌においても pH 9.0 に極大値を認めた（第6表).

第6表 ATP-ase, 至適 pH

pH	遊離P量 mg%
7.0	0.00129
7.5	0.00263
8.0	0.00389
8.5	0.00512
9.0	0.01350
9.5	0.01010
10.0	0.00290

(2) 至適温度.

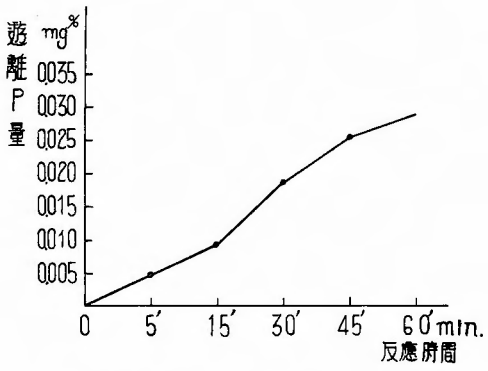
ミオシンは熱に不安定といわれるが，その安定性は種々の要因に関係し，ことに ATP および Actin の結合で著しく安定性を増す．Barrenscheen, Láng 等（1932）によると，37℃ で極大値を示し，60℃～65℃においても勿論酵素能は低下するが，なお活性の存在することが報告されており，著者の実験でもこれと同じ結果を示している（第7表).

第7表 ATP-ase, 至適温度

水浴温度 ℃	遊離P量mg%
26	0.0075
37	0.0149
50	0.0105
60	0.0094

第8表 ATP-ase, 反応時間

反応時間min.	遊離P量 mg%
5	0.0042
15	0.0091
30	0.0179
45	0.0257
60	0.0290



第5図 反応時間（ATP-ase)

(3) 反応時間.

反応時間が長い程酵素能は大である（第8表，第5図）．Lohmann は ATP の全有機燐量の正確に 2/3 が7分間で Ortho- 燐酸に変るといつているが，Fiske, Kerr および Krishnan 等は15分を主張している．ATP-ase 能は反応時間が長い程大であるが，反応時間が長くなるといろいろな条件が加わつてくるので，5分ないし15分反応をとるべきである.

(4) 基質濃度.

ATP 濃度について Weber (1952)は，至適ATP濃度以上ではかえつて酵素能が抑制されると報告している．終濃度0.1%に極大値を認めた（第9表).

(5) 菌発育期と酵素能.

一般に細菌酵素能は，菌発育の初期には小であり，その後は直線的に増大して対数期に最大となるといわれるが，菌 ATP-ase も同様に18時間培養の菌が最

第9表 ATP-ase, 基質濃度

反応組成10cc中 ATP-Na_4濃度mg	遊離P量 mg%
2.5	0.0095
5.0	0.0130
10.0	0.0149
20.0	0.0128

第10表 菌の発育時期と ATP-ase 能

培養時間 hrs.	遊離P量 mg%
13	0.0046
18	0.0162
24	0.0084

第11表 菌ATP-aseへの$Ca^{\cdot\cdot}$の影響

$CaCl_2$ 終濃度	遊離P量 mg%
0	0.0090
m/10	0.0132
m/50	0.0108
m/100	0.0120

大の酵素能を示した（第10表）.

(6) $Ca^{\cdot\cdot}$ の影響.

一般に ATP-ase は $Ca^{\cdot\cdot}$ により賦活されることが知られている. 反応組成につき終濃度が 1/10M, 1/50 M, 1/100M の割合になるよう $CaCl_2$ を加えると, いずれの場合も酵素能の亢進を認めた(第11表).

第3節 各適応菌, 各起炎菌の ATP-ase 能と, それらに対する横紋筋, 子宮筋各浸出液の影響.

前節の実験により, 黄色ブドウ球菌 F. D. A. 209-P 株にはATPを基質とし, pH 9.0において Ortho-燐酸を遊離する ATP-ase 能が存在することが明らかになつたが, この基礎実験をもとに, 各適応菌, 各起炎菌の ATP-ase 能と, それらへの横紋筋浸出液, 非透析性横紋筋浸出液, 加熱横紋筋浸出液および子宮筋浸出液の影響についてさらに検討した.

1. 実験材料および実験方法.

(1) 酵素液.

生菌蒸留水浮遊液を使用. 作製法は前節の(1)と同様.

(2) 基質溶液.

ATP-Na_4（和光純薬株式会社製品）を, 使用の都度 0.1% の終濃度になるよう緩衝液に溶解作製した.

(3) 緩衝液.

m/10 Veronal-N/10 HCl緩衝液(Michaelis.).

(4) 被検菌.

a) 横紋筋適応菌.

b) 骨髄適応菌.

c) 対照菌.

d) 筋炎起炎菌 (A), (B), (C). 本院外科入院中の化膿性筋炎患者の病巣穿刺液から分離培養した黄色ブドウ球菌.

e) 骨髄炎起炎菌 (A), (B). 本院外科入院中の慢性大腿骨々髄炎患者の病巣を掻爬した膿汁から分離培養した黄色ブドウ球菌.

(5) 横紋筋浸出液.

体重約2kg の成熟家兎の大腿筋を外科無菌的に採取し, 同重量の海砂と4倍量の緩衝液とを加えて乳鉢内で磨砕し, 遠心分離してえた上清を使用した.

(6) 非透析性横紋筋浸出液.

(5)の横紋筋浸出液を室温で24時間透析用セロファンで透析したものを使用した.

(7) 加熱横紋筋浸出液.

(5)の横紋筋浸出液を 60℃, 2時間加熱したものを使用した.

(8) 子宮筋浸出液.

体重約2kg の成熟家兎子宮筋を採取し, (5)の横紋筋浸出液作製法と同様にして作製した.

(9) 実験方法.

第2節, (5)実験方法に従つて実施した. 酵素能測定の条件は, ATP-Na_4 終濃度0.1%, 温度37℃, 15分間反応, pH 9.0, 被検菌培養時間18時間で測定した.

2. 実験成績.

各菌の ATP-ase 能測定の結果では, 横紋筋適応菌, 筋炎起炎菌が他の菌株に比較してごく軽度の酵素能の亢進を示した（第12表）.

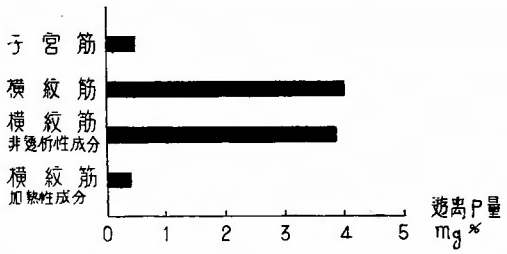
第12表 各菌の ATP-ase 能

菌株	遊離P量 mg%
F.D.A. 209-P株	0.0155
横紋筋適応菌	0.0275
骨髄適応菌	0.0217
対照菌	0.0215
骨髄炎起炎菌 (A)	0.0076
骨髄炎起炎菌 (B)	0.0050
筋炎起炎菌 (A)	0.0085
筋炎起炎菌 (B)	0.0045
筋炎起炎菌 (C)	0.0150

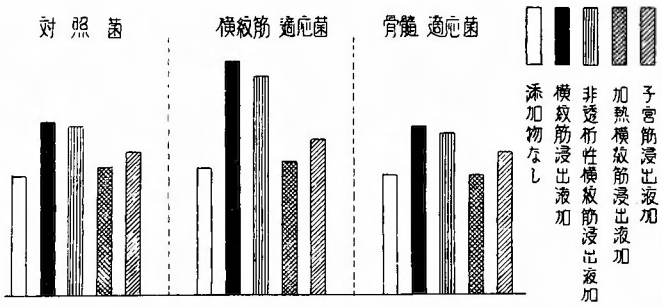
一方，反応組成に横紋筋浸出液を加えると，横紋筋適応菌，筋炎起炎菌等のいわゆる Myo-strain が著明な酵素能の亢進を示した．また Myo-strain に対するこのような横紋筋浸出液の賦活物質の本態をつかむために，横紋筋浸出液の非透析性成分および60℃2時間加熱したものを添加して酵素能を測定した結果では，前者では賦活作用に変化がなく，後者では賦活作用の減少を認めた．さらに子宮筋浸出液を加えたさいの各菌の酵素能を測定した結果では，その賦活作用は殆んど認められず，また子宮筋浸出液自身にも殆んど ATP-ase 作用を証明しえなかつた(第6, 7, 8図)．

3. 小　括．

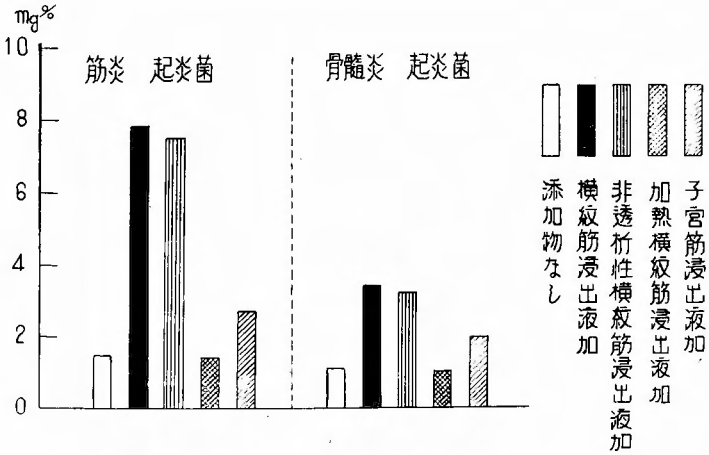
本実験の結果が示すように，横紋筋浸出液の酵素能賦活作用は，非透析性成分では変化がなく，加熱成分では減少することから，横紋筋の菌発育促進作用が筋肉の主要な構造蛋白質であるミオシンに起因するのであろうということが明らかになつた．一方，いわゆる Myo-strain の ATP-ase 能が横紋筋浸出液の添加によつて著明に亢進したことは，Myo-strain が横紋筋に止着するとき，その菌体蛋白合成の前提となる菌 ATP-ase 作用が他の菌株に比較してとくに強く発揮されることを意味するものであつて，Myo-strain の



第8図　子宮筋，横紋筋各浸出液の ATP-ase 能



第6図　各適応菌の ATP-ase 能とそれらにおよぼす横紋筋浸出液，非透析性横紋筋浸出液，加熱横紋筋浸出液，子宮筋浸出液の影響



第7図　各起炎菌の ATP-ase 能とそれらにおよぼす各因子の影響

発育が他の組織におけるよりも横紋筋においてとくに促進されるゆえんを説明するものである．

さらにSzent-györgyi(1951)が，平滑筋のミオシンBは横紋筋のそれよりもアクチンの量が少なく，ATP分解酵素能も弱いと報告しているが，著者の実験でも平滑筋浸出液自身にはATP-ase作用が少なく，さらにMyo-strainへの酵素能賦活作用も殆んど認められなかつた．このことは横紋筋，平滑筋各浸出液を加えた培地に各適応菌を培養すると，横紋筋適応菌は横紋筋浸出液加培地によく発育するが，子宮筋浸出液加培地には発育しがたいという，共同研究者前田の細菌学的実験の結果を酵素化学的に裏付けるものであつて，化膿性筋炎が平滑筋には発生しがたく，横紋筋のみに好発するという臨床的事実のよつて起るゆえんを説明するものでまことに興味深いのである．

第5章　結　　語

多発性筋炎および多発性骨髄炎の発生原因において，とくに起炎ブドウ球菌の発育組織環境に対する親和性の本態について，実験的吟味を行い次の結論をえた．

1)　いわゆるOsteo-strainのアルカリ・フォスファターゼ能とそれに対する骨髄浸出液の影響を，他の菌株の場合と比較検討し，また正常家兎各組織のアルカリ・フォスファターゼ分布状態を測定し，またさらにOsteo-strainフォスファターゼ担持簇と骨髄浸出液フォスファターゼ活性簇との関連を他の菌株の場合と比較検討し，これらの結果を総合して，骨髄炎の発生にはOsteo-strainの発育に好適なアルカリ・フォスファターゼの分布という骨髄の化学的環境が重要な役割を演じていることを立証した．

2)　いわゆるMyo-strainのATP-ase能と，それに対する横紋筋浸出液，非透析性横紋筋浸出液，加熱横紋筋浸出液，子宮筋浸出液等の影響を，他の菌株の場合と比較検討した結果，横紋筋に特異なミオシン・ATP-ase系のような化学的環境がMyo-strainの発育に最もよく適していることを確認した．

3)　これを要するにわれわれは次のように理解したいのである．すなわち，多発性筋炎および多発性骨髄炎の成因には多くの因子が関与しているであろうが，起炎ブドウ球菌の横紋筋なり骨髄なりに対する適応酵素の形成と，これら組織のもつ化学的環境との相互の関連において，いわばDubosの"host parasite relationships"でこの興味ある現象が発現するものである，と．

本稿を終るにのぞみ，本研究について終始御懇篤な御指導と御助言を載いた本学外科学教室石上浩一講師に深甚の謝意を表する．

なお本論文の要旨は，昭和33年10月25日第84回近畿外科学会において発表した．

主　要　文　献

1)　赤堀四郎編：酵素研究法．Vol. 1, 2, 3, 朝倉書店，東京，昭31.
2)　安東洪次：感染と免疫．初版，丸善株式会社，東京，昭28.
3)　安平公夫：感染症の病理．最新医学，**13**, 5, 1156-1172, 昭33.
4)　Barrenscheen, H. K. & S.Láng: Zur Kenntnis der Adenosintriphosphatase der Leber. Biochem. Z., **253**, 395-407, 1932.
5)　Boivin, A. & L. Mesrobeau: Les subtances phosphorées au cours de l'autolyse bacterienne. Compt. Chim. Bact. Soc. Biol., **112**, 611, 1933.
6)　Buchanan & Eulmer: Physiology and Biochemistry. Vol. 3, New York, 1923.
7)　江上不二夫，他：標準生化学実験．初版，文光堂，東京，昭28.
8)　Engelhardt, W. A. & M. N. Ljubimova: Myosine and Adenosinetriphosphatase. Nature, **144**, 668-669, 1939.
9)　Fiske, C. M. & Y. Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**, 375-400, 1925.
10)　Fiske, C. M. & Y. Subbarow: Phosphorus compounds of muscle and liver. Science, **70**, 381-382, 1929.
11)　Folley, S. J. & H. D. Kay: The phosphatases. Erg. Enzymf., **5**, 159-212, 1936.
12)　Gale, E. F.: The chemical activities of Bacteria. 3rd Ed., England, 1951.
13)　Gale, E. F.. Factors influencing the enzymic activities of bacteria. Bact. Rev., **7**, 139-173, 1943.
14)　Häbler, C.: Physikalisch=chemische Probleme in der Chirurgie. Julius Springer, Berlin, 1930.
15)　Hanzawa, S.: Zur Statistik der Myositis purulenta acuta mit besonderer Berücksichtigung ihres Erregers. Mitteil. allg. Path. u. path. Anatom., **6**, 333-344, 1931.
16)　平山遠：骨髄内における諸種細菌の運命．日外会誌，**23**, 254, 大正11, 12.
17)　Honsell, B.: Zur Kenntnis der sogen. primären Myositis purulenta. Brun's Beitr., **31**, 1, 117-138, 1901.

18) 石上浩一：ペニシリン耐性菌の酵素作用に関する実験的研究．抗菌物質研究，**5**，1・2，1-50，昭27.
19) 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**，1，136-137，昭31.
20) 石上浩一，真先敏邦：急性化膿性筋炎．最新医学，**12**，6，1303-1313，昭32.
21) 石原恵三，他：化膿性ブドウ球菌の多元性について．日外会誌，**56**，5，574-575，昭30.
22) Kay, H. D.: The phosphatases of mammalian tissues. Biochem. J., **22**, 855-866, 1928.
23) Kay, H. D.: Plasma phosphatase. J. Biol. Chem., **89**, 235-266, 1930.
24) 神前武和：酵素学．初版，至文堂，東京，昭25.
25) Kielley, W. W. & O. Meyerhof: Studies on adenosinetriphosphatase of muscle. J. Biol. Chem., **176**, 2, 591-601, 1948.
26) 古賀順一：骨格筋挫滅の化学的研究．外科の領域，**5**，3，234-255，昭32.
27) 桑原章吾：各種細菌の合成培地について．最新医学，**3**，7，45-52，昭23.
28) 桑原章吾：私信，昭32.
29) Lexer, E.: Die Entstehung entzündlicher Knochenherde und ihre Beziehung zu den Arterienverzweigung der Knochen. Arch. Kl. Chir., **71**, 1-30, 1903.
30) Lipmann, F.: Advances in Enzymology. Vol. 1, 1941.
31) Lohmann, K.: Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. Naturwiss., **17**, 624-625, 1929.
32) 前川孫三郎，他：ATP-ase と臨床．綜合医学，**12**，12，927-942，昭30.
33) 前田敏郎：多発性筋炎および多発性骨髄炎の成因に関する実験的研究．日外宝，未発表.
34) Martinotti, C.: Über Polymyositis acuta, verursacht durch einen Staphylococcus, Ztlblt. Bakt. Origin., **28**, 877-880, 1898.
35) Masaki, T.: Experimental study on the pathogenesis of polymyositis and polyosteomyelitis. 日外宝，**25**，1，464-493，昭31.
36) 水野伝一編：細菌の生理．Vol. 1，共立出版社，東京，昭30.
37) Myrvik, Q. N. & R. S. Weisser: Studies on antibacterial factors in mammalian tissues and fluids. I. A. serum bactericidin for Bacillus subtilis. J. Immun., **74**, 1, 9-16, 1955.
38) 永井寅男：筋収縮の物理化学．初版，医学書院，東京，昭33.
39) 緒方章，他：化学実験操作法．20版，南江堂，東京，昭30.
40) Robison, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification., Biochem. J., **17**, 286-293, 1923.
41) 斉藤正行：光電比色計による臨床化学検査．5版，南江堂，東京，昭30.
42) 下田新一：無機燐酸定量の改良法について．北関東医学，**6**，1，25，昭31.
43) Straub, F. B.: Muscle, Ann. Rev. Bioch., **16**, 371-388, 1950.
44) 須田正己：適応酵素研究．酵素化学シンポジウム，**1**，73，1949，**4**，11-31，1950.
45) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction. Acad. Press, 1951.
46) 手島宰三：長管状骨軟骨近接血管の構造及び作用に就いて．日外宝，**24**，4，377-389，昭30.
47) Theorell, T.: Spektrophotometrische Mikrobestimmung des Phosphorus., Biochem. Z., **230**, 1, 232, 485, 1931.
48) Thompson, R. H. S. & R. J. Dubos: Production of experimental osteomyelitis in rabbits by intravenous injection of staphylococcus aureus., J. Exp. Med., **68**, 2, 191-206, 1938.
49) 若山要二：化膿性筋炎の発生について，東京医学会雑誌，**38**，334-348，大13.
50) Warren, S.: Osseous metastasis of carcinoma of the prostate. Arch. Path., **22**, 139-160, 1936.
51) 山村雄一，他：感染症の生体反応．最新医学，**13**，5. 1241-1252,. 昭33.