

# 細菌の不反応性電極電位に関する研究

## 第2報 好気菌の解糖時「電位—時間—曲線」の生成機轉

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷教授)

川 崎 浩

*Hiroshi Kawasaki*

(昭和29年12月6日受附)

### 第1章 緒 言

著者は前報<sup>1)</sup>において福見<sup>2,3)</sup>の実験を基礎として、好気菌の解糖時「電位—時間—曲線」をA, B, C, D, Eの5型に分類し、これと糖分解及び Cytochrome 系との関係及び菌の培養

条件との関係を報告した。今回は電位型を形成する因子に関して実験を行い多少の知見を得たのでここに報告する。

### 第2章 実験材料及び方法

#### 第1節 実験材料

1) 菌株 *Escherichia coli* (学生株), *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (寺島株), *Serratia marcescens* (旧I株), *Pseudomonas aeruginosa* (神木株), *Diplococcus pneumoniae* Type I, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (XY<sub>2</sub>株), *Proteus vulgaris* OX<sub>19</sub> (北研株), *Streptococcus pyogenes* (林株), *Bacillus mesentericus* (教室1株), *Gaffkya verneti* (金テトラ株)の10株を使用した。

2) 菌液 *E. coli*, *M. pyo.* var. *aureus*, *Serr. marcescens*, *Ps. aeruginosa*, *Coryn. pseudodiphtheriticum* は寒天平板又はブイヨン24時間培養の菌を, *Diplo. pneumoniae* は血液寒天平板24時間培養の菌を遠沈法(5,000 R.P.M. 30分)により3回洗滌後500 mgN/dlに蒸溜水に浮遊したものを使用した。

3) **Catalase** クエン酸ソーダ加家兎赤血球 5ml を

遠沈し、生理的食塩水にて3回洗滌後、沈渣を10mlの蒸溜水にて溶血をさせ、遠沈した上清液を catalase 溶液として使用した。

#### 第2節 実験方法

1) 電位測定法装置及び電位測定法。前報に記載した方法に準じてこれを行つた。

a) 一般的電位測定法は前報に述べた如く行つた。

b) 増殖時の電位測定法は Hewitt<sup>4)</sup>の方法によつた。

c) 嫌氣的電位測定法は Thumberg-Borsook<sup>5)</sup>管法を使用した。

2) **Glucose**の酸素吸収量及び解糖量測定。Warburg

<sup>6)</sup> 検圧法により行つた。

3) **Glucose**の定量。Hanes<sup>7)</sup>の方法により、行つた。

### 第3章 実験成績及び考按

#### 第1節 増殖菌の「電位—時間—曲線」

静止菌において Glucose を基質としたさい、電位が下降するが、このことはすでに前報にお

いて報告した。一方増殖中の細菌がやはり下降曲線を示すことは Hewitt<sup>4, 8-10)</sup>, 福見<sup>7)</sup>等の報告により明らかである。しかしその際の電位

の型については同一条件での増殖菌による「電位—時間—曲線」を比較したものはない。よつて著者は同一条件下で数種の細菌の緩衝肉汁ブイオン培養時の「電位—時間—曲線」を描かせて見た。

実験方法は Hewitt<sup>4)</sup>の方法を改良して行つた。即ち内径 2cm の U 字管に 10ml の緩衝肉汁ブイオンを入れ、これに肉汁ブイオン 24 時間培養の菌 0.1ml を接種し、37°C の水浴中にて培養し、35 時間迄測定を行つた。

実験成績は第 1 図に示す如くである。

1) A 型電位型菌

a) *E. coli* (学生株)

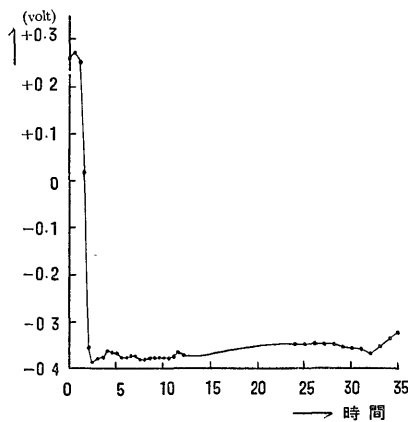
初発電位は +0.26 V で 1 時間迄下降せず、以後急激に下降し、2.5 時間で最低電位 -0.39 V となり、これより 12 時間ぐらい迄 -0.38 V で停り、以後稍々上昇し、24 時間で終末電位 -0.35 V となり、以後多少上下する (第 1 図 a 参照)。

b) *Pr. vulgaris* OX<sub>19</sub> (北研株)

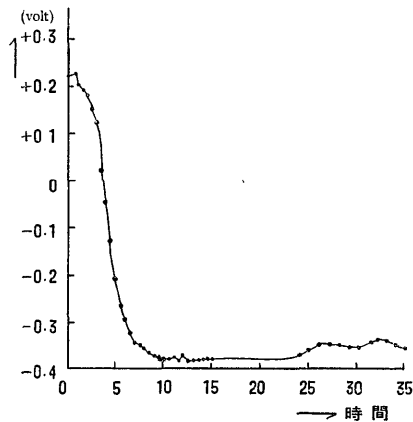
初発電位は +0.22 V で 1 時間迄下降せず、以後下降をつづけ、10 時間で -0.38 V となり、23 時間迄一定し、以後稍々上昇し、24 時間で終末電位 -0.35 V となり、以後多少上下す

第 1 図 各種細菌の肉汁緩衝ブイオン培養時「電位—時間—曲線」

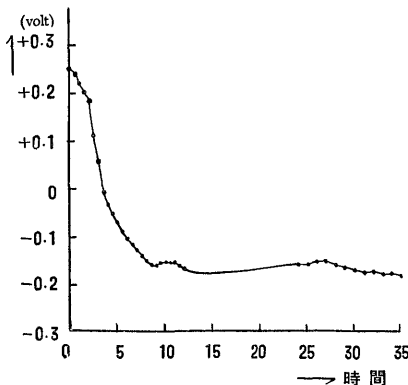
a. *Escherichia coli* (学生)



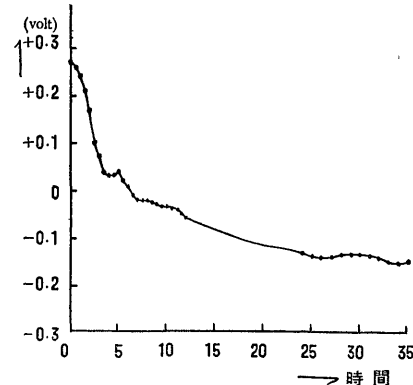
b. *Proteus vulgaris* OX<sub>19</sub> (北研)



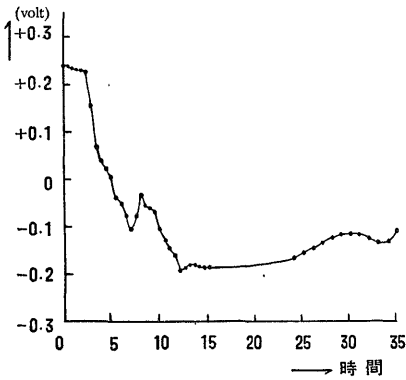
c. *Serratia maucescens* (旧1)



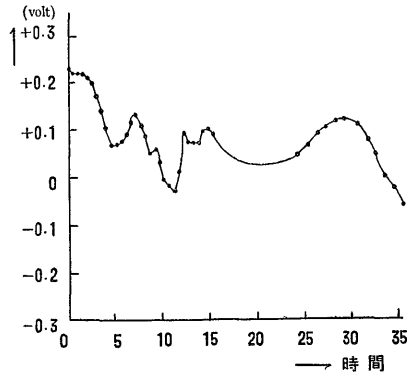
d. *Micrococcus pyogenes* var *aureus* (寺島)



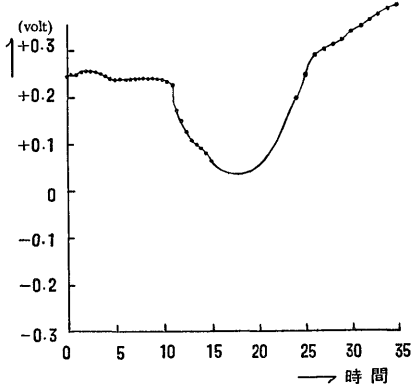
e. *Streptococcus pyogenes* (林)



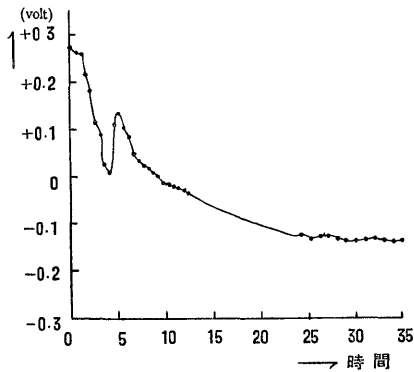
f. *Bacillus mesentericus* (教室)



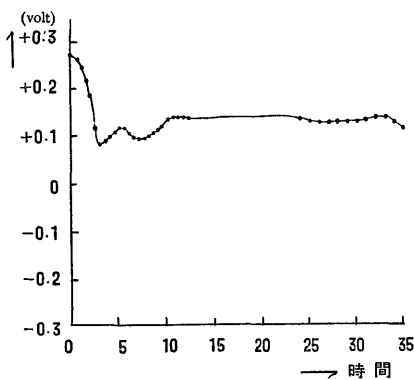
g. *Diplococcus pneumoniae* (Type I)



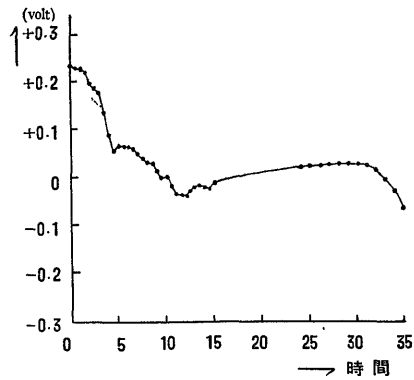
h. *Pseudomonas aeruginosa* (神木)



i. *Gaffkya verneti* (金テトラ)



j. *Coryneb pseudodiphtheriticum* (XY<sub>2</sub>)



る (第1図b参照).

2) A型電位型とB型電位型との中間型菌

a) *Serr. marcescens* (旧1株)

初発電位は +0.25 V で次第に下降して8時間  
 で -0.16 V となり、この電位で一応安定し、  
 以後僅かづつ下降して終末電位 -0.18 V とな

る (第1図c参照).

3) B型電位型菌

a) *M. pyo. var. aureus* (寺島株)

初発電位は +0.27 V で次第に下降し, 3.5時間にて +0.04 V 程度に下降し, 26時間にて -0.15 V の終末電位を示す. この際 +0.04 V 附近に緩衝点を示す (第1図d参照).

b) *Strept. pyogenes* (林株)

初発電位は +0.23 V で2.5時間迄変化なく, 以後下降を示し, 7時間で -0.11 V となり, これより又上昇を始め, 3時間で -0.04 V となり, 以後又下降し, 12時間で最低電位 -0.20 V となる. 以後ゆるやかに上昇し, 30時間で終末電位 -0.12 V となる. 以後多少の上下を見る. (第1図e参照).

c) *Bac. mesentericus* (教室1株)

初発電位は +0.21 V で2時間迄変化がなく以後下降す. しかるに増殖が均等でなく顆粒状に増殖を来すため, 電位は不安定で, -0.05 V より +0.15 V の間を上下する (第1図f参照).

4) C型電位型菌

a) *Diploc. pneumoniae* Type I

初発電位は +0.24 V であるが, 発育が非常に遅延するためか, 11時間迄下降を来さず以後下降し, 15時間で最低電位 +0.05 V となるも又上昇を始め, 25時間で初発電位に復し, 更に上昇を続け, 35時間で +0.38 V となる (第1図g参照).

5) D型電位型菌

a) *Ps. aeruginosa* (神木株)

初発電位は +0.27 V で, 1時間迄変化なく, 以後下降し, 4時間で 0 V となる. これより上昇して5時間で +0.13 V となり, 以後下降して25時間で終末電位となる. (第1図h参照).

6) E型電位型菌

a) *Gaffkya verneti* (金テトラ株)

初発電位は +0.27 V で, 次第に下降して3時間で最低電位 +0.08 V となり, 以後一つの山を描いて上昇し, 10時間で終

末電位の +0.12 V となる (第1図i参照).

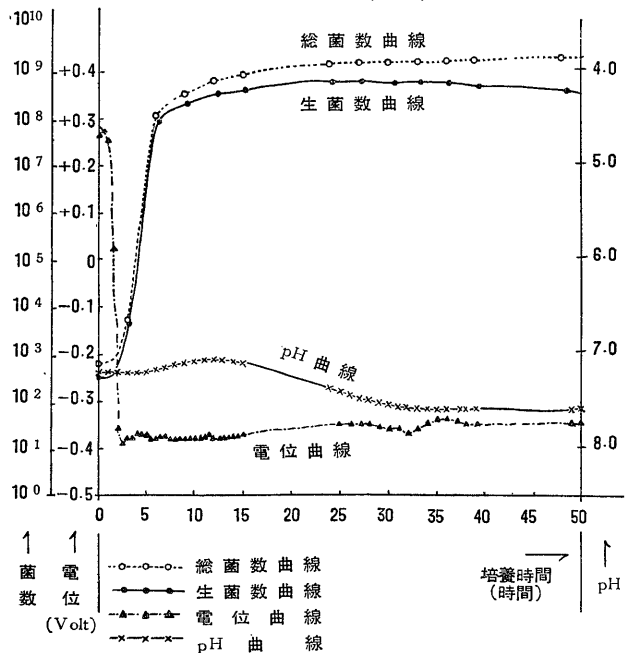
b) *Coryneb. pseudodiphtheriticum* (XY<sub>2</sub>株)

初発電位は +0.23 V で, 次第に下降し, +0.07 V, +0.030 V 及び 0 V の3つの緩衝点を示して下降し, 11時間で最低電位 -0.03 V となる. 以後次第に上昇し, 25時間で +0.03 V となり, この電位にて一応安定し, 30時間以後下降を始め, 35時間で -0.06 V となる (第1図j参照).

以上の結果を見るとA型電位型菌では電位の下降は著明でその電位も低く -0.35 V 程度迄下降を来す. その他の電位型の菌ではその菌種により異なつた「電位-時間-曲線」を示す. しかし一般に菌の増殖が電位の下降と関係があるように思われるので次の実験において増殖曲線との関係を見た.

実験方法は同時に同条件下に2つの測定装置をつくり, 各々に *E. coli* (学生株) を接種し, 一方において電位型を観察し, 他方において生菌数及び総菌数を測定した. その測定法は泉<sup>18-20)</sup>の方法に従つて行つた.

第2図 菌数と電位曲線との関係  
*Eschetichia coli* (学生)



実験成績は第2図の如くである。これを見ると *E. coli* においては菌の増殖曲線の上昇よりも電位曲線がいくぶん早目に下降を示し、増殖曲線の上昇に従い電位は下降する。即ち生菌数が増加すればするだけ電位が下降するように考えられる。

以上のことより、下降の原因につき次の3つの因子が考えられる。1) 細菌の菌自体の電位下降に支配される。2) 細菌の呼吸により培地内の酸素分圧の低下による。3) 細菌による代謝産物の蓄積、特に低電位物質の蓄積による。以上の3つの可能性ある因子につきその内のどれか又は全部が関係するかを明らかにするための実験をした。

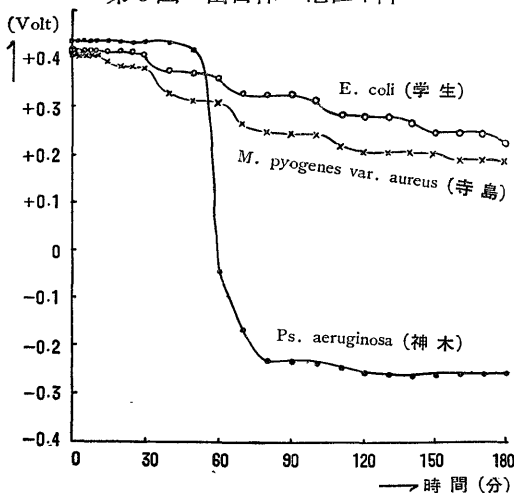
### 第2節 菌自体の電位下降

第1図に示せる如くA型電位型菌は電位降下が著明である点より考えて、A型菌自体が他の菌との間に異なつた著明な電位下降を来す可能性がある。その点を明らかにするため静止菌に基質を与えずに菌自体の下降曲線を求めることにした。*E. coli*, *M. pyo. var. aureus*, *Ps. aeruginosa* の3種の菌について実験を行った。

実験方法は解糖時「電位—時間—曲線」の測定法中 Glucose の代りに生理食塩水 1ml を加え同様の測定を行う。

その成績は第3図に示す如くである。即ち

第3図 菌自体の電位下降

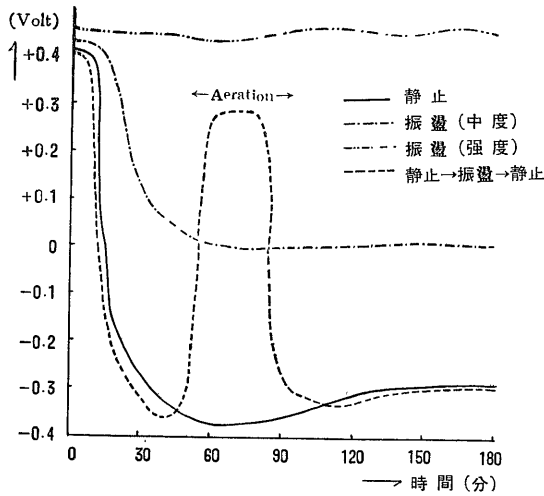


*E. coli* は初発電位が +0.4 V であるが数個の緩衝点を残して下降し、180分で +0.17 V となる。*M. pyo. var. aureus* もやはり初発電位が +0.4 V で *E. coli* よりやや低い値を示し、数個の緩衝点を残して下降し 180 分で +0.15 V となる。*Ps. aeruginosa* は初発電位が +0.45 V でこの電位で平衡しているが60分頃より急激に下降して -0.2 V ぐらいとなる(第3図参照)。以上の結果から見ると *coli* 及び *Staphylococcus* 等では電位の下降は見られるもその意義があまり重要性を有していないように考えられる。しかるに *Ps. aeruginosa* は急激な電位の下降を来し、このことはD型電位型を形成する最も有力なる因子の一つと考えられる。即ち分解産物の蓄積に加えて菌体自体の電位低下がかかる特異なるカーブを取るものと思われる。

### 第3節 電位下降時の酸素の影響

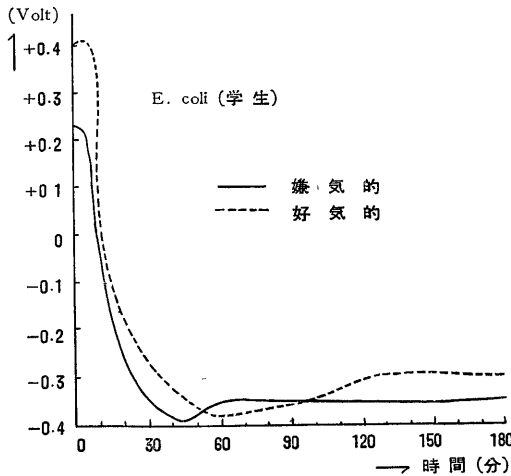
福見<sup>2)</sup>は酸素の欠亡が電位の低下を来すと考えて、Medium に空気を送り aeration を行つた場合酸素の欠亡がなく、このため電位が上昇すると考えた。著者も *E. coli* を使用して同様の実験を行つたが、aeration を最強度に行つた時泡がふきこぼれる程強く空気を送る時のみ福見のような +0.3 V 以上に戻るが中等度の aeration では、その強度により異なつた電位を示した(第4図参照)。このことは初発電位を維持するには酸素の欠亡を補うよりはるかに大きな aeration を必要とすることを示し、酸素分圧の上昇による電位の上昇によるものであつて酸素の欠亡が主体であるとは考えられない。更に酸素分圧の低い状態即ち嫌気的狀態で解糖を行つた場合はどうなるであろうかを見るために Thumberg-Borsook<sup>3)</sup>管を使用し、Glucose を基質として同様の実験を行つて見た。実験方法は Thumberg-Borsook 管の主室に磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml, M/10 Glucose 0.5ml 蒸溜水 0.5 ml を入れる。副室に *E. coli* 菌液 (学生株, 100mgN/dl) 1.0ml を入れ、空気を 5mm 水銀柱迄真空ポンプにて引き、これを 37°C の孵卵

第4図 振盪の電位下降に及ぼす影響



器に甘汞電池と共に入れその導線を電位差計につなぐ。30分後転倒して主室と副室をまぜ孵卵器に入れたまま電位差の測定を開始する。その成績は第5図に示す如くである。即ちその「電位—時間—曲線」は初発電位こそ低いがやはりA型電位型を示した(第5図参照)。このことはGlucoseが分解して産生される物質が電位を下降させることを示している。

第5図 嫌氣的状態の電位下降



しからば酸素の影響の多い表面の近くと深部とでもあまり差がないのではなからうかと考

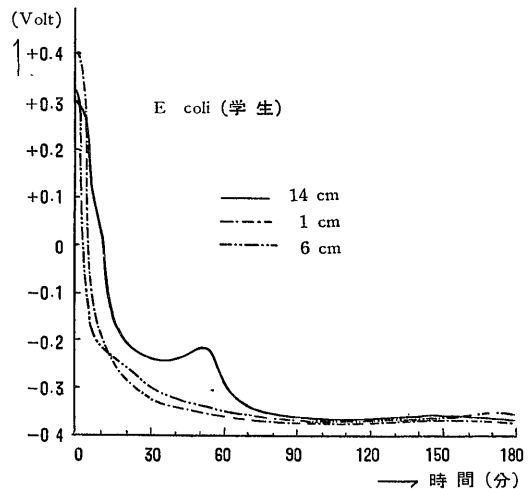
え、電極の深さを表面より1cm, 6cm, 14cmの3つの電極を入れてその電位を測定せるに1cm及び6cmでは初発電位に差を認めるのみで大なる意義が見られなかつた。しかるに14cmでは下降が稍々遅延するのは酸素の供給が悪いため分解が遅れその結果分解産物たる低電位物質の蓄積が少ないためと考えられる(第6図参照)。

以上の実験より、下降させる最大の原因は糖の分解産物中の低電位物質によるもので、酸素の欠亡は重要な因子ではないことを示している。

第4節 糖消費量と電位型との関係

A, B, C, D, Eの各型の電位型が存在するのかを考えると、先ず第1に糖の分解速度が問

第6図 電位下降に対する電極の深さの影響

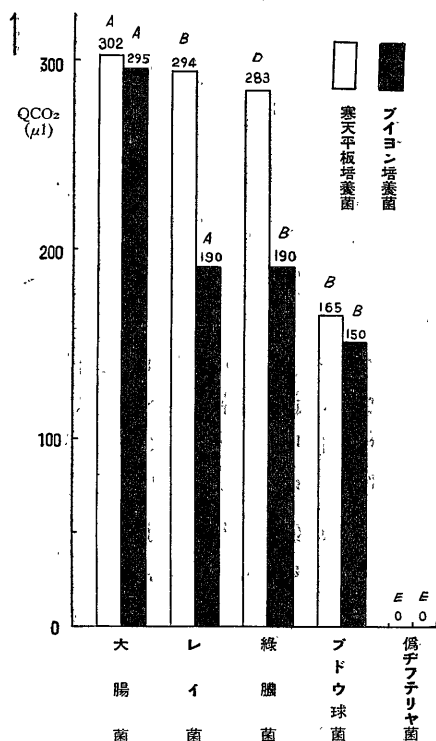


題となる。即ち電位を下降させる低電位物質を多量に産生する菌がA型、中低度のものがB型、全くないものがE型となり、C型及びD型は特異なものと考えるべきであろう。

E. coli (学生株), Serr. marcescens (旧1株), Ps. aeruginosa (神木株), M. pyog. var. aureus (寺島株), Coryneb. pseudodiphtheriticum (XY<sub>2</sub>株)の6株についてそのブイヨン培養及び寒天平板培養の菌を使用して Warburg<sup>6)</sup> 検

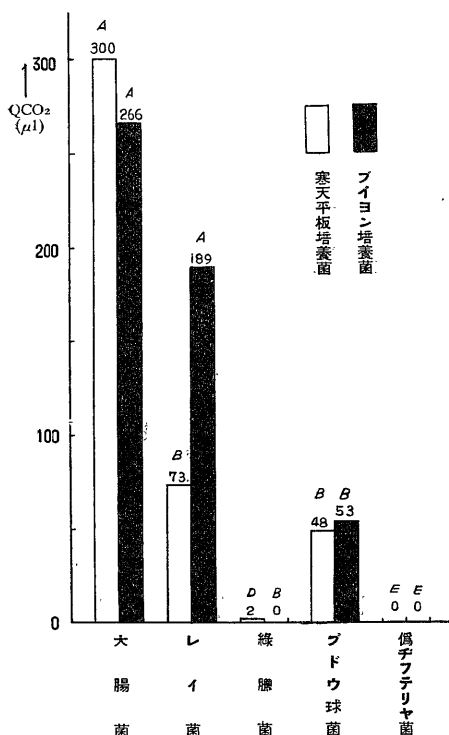
圧法により Glucose の酸素吸収量を見ると第7図の如くなる。これを見るに酸素の消費量の多い菌でも決してA型菌でないことより、酸素の消費により電位が下降するという福見の説は妥当とは思われない。酸素吸収は Glucose の眞の消費を示しているものではない。E型電位菌たる *Coryneb. pseudophtheriticum* において酸素吸収は全くなく、同時に Glucose を消費していない。

第7図 各電位型菌の酸素吸収量 (30分値)



次いで解糖量を同様 Warburg<sup>9)</sup> 検圧法により見ると第8図の如くなる。これを見ると30分値でA型菌は QCO<sub>2</sub> 150μl 以上の値を示すも、B型菌においては QCO<sub>2</sub> 100μl 以下である。又特に緑膿菌は発酵系がなく酸化酵素系のみを有しているため解糖は全くない。このことは既に2, 3の研究者<sup>21, 22)</sup>により報告されている。この現象は *Pseudomonas* 一般のものであ

第8図 各電位型菌の解糖量 (30分値)

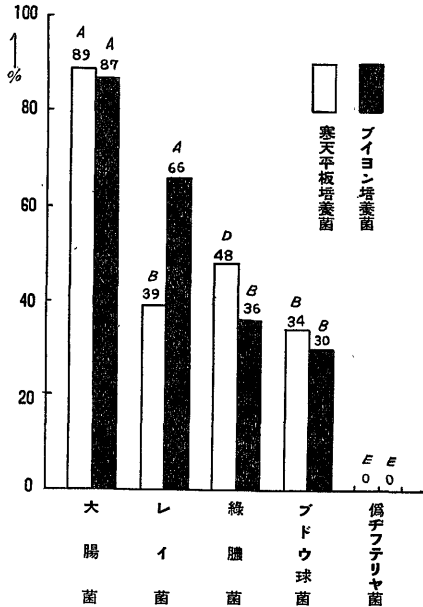


る。しかるに酸素吸収は盛んである点より考えると、Glucose は相当量消費されていることを示している。この消費系路の特異性のため電位型も他と異なつた型を示すのではなからうか。E型菌では解糖は全くない。

しからば Glucose の眞の消費量はどうかであるうかを見るため、糖を5時間後において定量したるに、第9図の如くなる。即ち5時間値でA型菌は60%以上の消費を行い、B型菌では40%以下であり、D型菌ではその中間の50%前後であり、E型菌は全く糖を消費していない。このことはA型菌の消費が早いいため低電位物質が多量に産生され電位の下降を早めると考えられる。B型菌ではそれ程でなく、除々に蓄積するためである。E型菌が陰電圧とならないのは Glucose の消費が全くないためであり、D型菌がA型及びB型の中間を行くこととなる。即ち

Glucose の分解速度が電位型の変化をもたらす主要因子と考えるのが妥当と思う。

第9図 各電位型菌の糖消費量百分率 (5時間値)



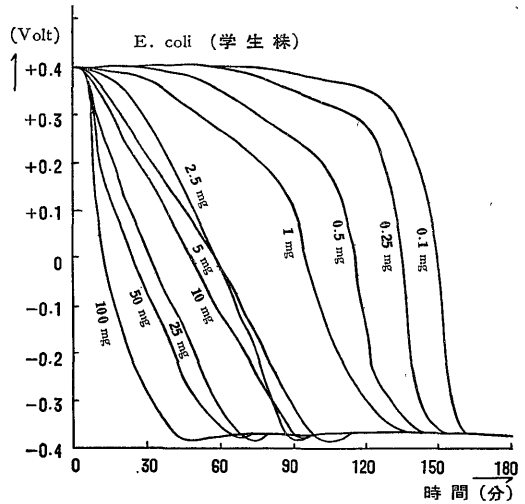
第5節 A型電位型菌の菌濃度と電位型

Glucose の分解速度がA型B型の電位型を作る主要因子であるとするれば、A型電位型の菌を稀釈して接種することにより、B型電位型に変化する可能性が考えられる。

著者は E. coli (学生株) を使用して実験を行った。E. coli の終末濃度が 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0.3, 0.25, 0.1mgN/dl となる如く加えた。以上の実験の結果は第10図に示す如くなる。これによると 100mgN/dl ではA型電位型であるが、菌の濃度が薄くなるに従ってB型電位型に変化する。更に濃度が稀薄になり 0.25, 0.1mgN/dl となると初発電位から +0.3 ~ 0.25 V になる迄の Lag phase が延長し、+0.25 V ぐらいより急激に下降を来し、下降開始時より30分内外で終末電位となる。このことは単に下降を来すものの産生物質が急激に蓄積

するのではなく、下降を遅延させる物質、例えば菌体蛋白等が少ないため、その緩衝作用少なく、急激な下降が起ると考えるのが妥当であろう。

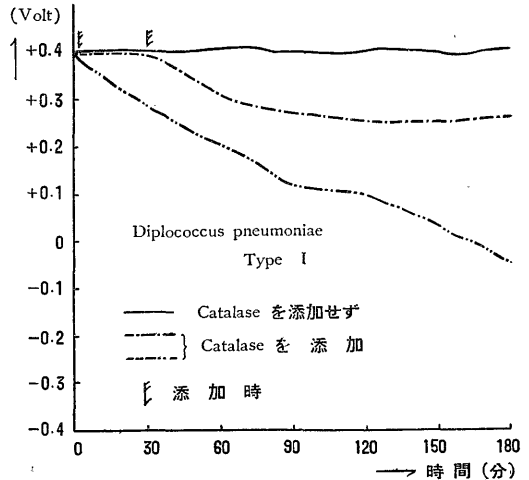
第10図 電位下降に対する菌液濃度の影響



第6節 C型菌の Catalase の影響

C型電位型の菌は前報で述べた如く、Lactobacteriaceae の菌中 Catalase を持たない菌であり、比較的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に耐性のある菌である。

第11図 C型菌に対するCatalase の影響





福見<sup>2)</sup>によれば Catalase の添加により C 型電位型の菌が B 型に近い電位型を示すようになった、著者も同様に Catalase を添加して、その電位型を見たるに第11図の如くなる。即ち Glucose により Catalase 分解中に産生される  $H_2O_2$  が分解され、Glucose より出来た低電位物質により下降するのである。

即ち C 型電位型の菌は  $H_2O_2$  の産生と Glucose 分解中産生される低電位物質が平行関係にある

#### 第 4 章 総 括

解糖時の電位型については前報に述べたが今回は、電位型を決定する因子につき研究した成績を述べた。肉汁緩衝ブイオン中での増殖菌の電位曲線を見ると、増殖菌においても C 型電位型以外においては電位の下降が見られ、又 A 型電位型菌においては電位の下降は著明であつた(第 1 図参照)。

以上のことより、解糖時の電位下降の因子を考えると、次の 3 つの原因が考えられる。1) 細菌自体の電位の下降に支配される。2) 細菌の呼吸により培地内の酸素分圧の低下による。3) 細菌による代謝産物の蓄積、特に低電位物質の蓄積による。

以上の因子につき種々の実験を行つたが、その結果を総括すると次の如くなる。即ち解糖時の電位の下降は菌体自身の影響をあまりうけず解糖中に出来る低電位物質によるものと考えられる。福見<sup>2)</sup>等のいう如き、酸素の欠亡により電位の低下を来すということよりも、低電位物質の影響がより強く作用し、強い振盪時においてのみ空気の影響を受け、静止状態では全く受けない。

各型の電位型を作る根本的因子は低電位物質であるが、この物質の蓄積速度が電位型を決め

ため、電位の下降が見られないのであろう。C 型菌同様に  $H_2O_2$  に比較的耐性の菌である Streptococcus 等で見られる  $H_2O_2$  の産生は同時に産生された Pyruvate により抑制されるために B 型を呈するものと考えられる。Hewitt のブイオンにおける実験でも又 Klein<sup>23)</sup> 等の Streptococcus の電位型による分類からも頷ける。

る重要な因子である。いい変えれば、Glucose の消費速度がこの電位型を規定するものである。以上のことを各電位型について見ると、

a) A 型電位型は Glucose を 5 時間で 60% 以上消費し、解糖量は 30 分値で  $QCO_2$  150  $\mu$ l 以上である。又 A 型電位型の菌液を稀釈して行くことにより、B 型電位型に変化させることも可能である。

b) B 型電位型は Glucose を 5 時間で 40% 以下しか消費せず、解糖量は 30 分値で  $QCO_2$  100  $\mu$ l 以下である。

c) C 型電位型は Glucose を消費する B 型電位型の菌であるが、 $H_2O_2$  の産生が盛んであるため、 $H_2O_2$  が低電位物質による電位の下降を妨げているものと考えられる。

d) D 型電位型は Glucose を 5 時間で 50% 程度消費し、解糖が全くない菌であり、元来は B 型電位型の菌であるが、その酵素系の特異なためその影響を受け、又菌体自体の電位の影響を受け、独自の電位型をとるものと考えられる。

e) E 型電位型はいかなる方法にても Glucose を消費せず、全く菌体自体による下降のみで電位型を形成する。

#### 第 5 章 結 論

肉汁緩衝ブイオン培養中の「電位—時間—曲線」を 10 種類の菌で観察したが、それは解糖時

の電位曲線と一致しなかつたが、電位の下降は一般に見られた。

解糖時の「電位—時間—曲線」の本態につき次の結論を得た。

1) 解糖時の電位の下降は菌体電位の影響をあまり受けるように思われない。

2) A型菌では電位の下降は振盪時に空気の影響を受けるが、静止状態では全く空気の影響を受けないと考えられる。

3) A, B, D各型の電位の下降は Glucose の代謝産物たる低電位物質の蓄積速度、いい変えれば Glucose の消費速度によるものである。

4) A型菌を稀釈して接種することにより B型電位型を作り得る。

5) C型電位型は Catalase の添加により、電位の下降を来す。即ちC型菌の電位は  $H_2O_2$  産生により電位の下降が妨げられているものと考えられる。

6) D型電位型は Glucose の消費速度以外に菌体自身の電位により低下も因子として加わっているように考えられる。

7) E位型電位型は Glucose を全く分解せず、菌自体の電位の下降である。

稿を終るにのぞみ御指導御校閲をたまわつた恩師谷教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) 川崎浩：十全会雑誌，57，515 (昭30, 1955).
- 2) 福見秀雄：実験医学雑誌，25，515 (昭16, 1941).
- 3) 福見秀雄：実験医学雑誌，26，18 (昭17, 1942).
- 4) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 24, 512 (1930).
- 5) Borsook & Schott : J. Biol. Chem., 92, 535 (1931).
- 6) 藤田秋治：医学生物学研究領域に於ける検圧法と其応用 (第2版)，(昭24, 1949)，岩波，東京。
- 7) Hones, C. S. : Biochemic. J., 23, 99 (1929).
- 8) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 24, 669 (1930).
- 9) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 24, 676 (1930).
- 10) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 24, 1551 (1930).
- 11) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 169 (1931).
- 12) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 858 (1931).
- 13)

- Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 1447 (1931).
- 14) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 1452 (1931).
- 15) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 1641 (1931).
- 16) Hewitt, L. F. : Biochemic. J., 25, 2068 (1931).
- 17) 福見秀雄：実験医学雑誌，24，969 (昭15, 1940).
- 18) 泉俊一：十全会雑誌，46，3016 (昭16, 1941).
- 19) 泉俊一：十全会雑誌，46，3042 (昭16, 1941).
- 20) 泉俊一：十全会雑誌，46，3252 (昭16, 1941).
- 21) Enter, N & Stanier, R. Y. : J. Bacter., 62, 181 (1951).
- 22) Lockwood, L. B., Tabenkin, B. & Ward, G. E. : J. Bacter., 42, 51 (1941).
- 23) Klein, P., Engelhardt, H. & Altenbach, G. : Z. Hyg. u. Inf., 130, 436 (1950).