

二、三細菌の赤血球に及ぼす影響について

第 3 編

細菌の溶血現象に及ぼす二、三血液毒の影響

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

松 本 万 輔

〔昭和 32 年 3 月 27 日受稿〕

目 次

緒 言

第 I 章 実験方法及び成績

第 1 節 血液毒剤のカタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

第 1 項 塩酸ヒドロキシルアミン血球カタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

第 2 項 KCN 血球カタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

第 3 項 HXA 及び KCN の細菌の呼吸に及ぼす影響

第 2 節 塩酸ヒドロキシルアミンの細菌の溶血現象に及ぼす影響

第 3 節 KCN の細菌の溶血現象に及ぼす影響

第 4 節 血液毒剤の細菌溶血現象に及ぼす影響の分光光度計による観察

- a) 基本的吸収曲線
- b) 好気性培養
- c) 嫌気性培養
- d) 塩酸ヒドロキシルアミンによる影響
- e) KCN による影響

第 II 章 総括及び考按

結 語

結 言

最近カタラーゼの阻害に関してはとくに多くの研究が行われ、Stern¹⁾, Blaschko²⁾, Keilin, Hartree³⁾, Agner, Theorell⁴⁾等の詳細な報告がある。然しこれらは何れも酵素化学的検討であり、カタラーゼ作用の抑制が細菌の溶血に対する影響については研究されていない。前実験でカタラーゼが細菌の溶血現象並びに MetHb 形成に大きな影響を有することが考えられる成績を得たのでカタラーゼ阻害剤のこれらの現象に及ぼす関係を追究した。

第 I 章 実験方法及び成績

カタラーゼ抑制剤として知られているものに、KCN、塩酸ヒドロキシルアミン、フェノ

ール型毒物、最近は尿素等があげられている。Keilin 及び Hartree はカタラーゼ作用の阻害物質を次の 2 群に大別している。a) 青酸、硫化水素の如くカタラーゼの 3 価のポリリルアミンの鉄の還元されるのを阻止するもの。b) アジド、ヒドロキシルアミンの如く、鉄の還元は阻止しないが酸素により 2 価の鉄が再び 3 価に酸化されるのを防ぐものとに分けた。この 2 つの反応様式をとるものの代表的薬物として、KCN 及び塩酸ヒドロキシルアミン（HXA と略す）を選んだ。

第 1 節 血液毒剤のカタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

第 1 項 塩酸ヒドロキシルアミン

- a) 血球のカタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

HXA 加K血液とA-K血液における細菌の溶血現象を比較検討するには、HXA が血球のカタラーゼ作用を抑制し、しかもその呼吸を阻止しない濃度を求めることが必要である。

i) 実験方法：第1編カタラーゼ測定法に従い、主室の人及び家鴨の赤血球浮游液にHXA を 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} Mol の割合に入れ、別に対照をおき、夫々の場合における O_2 の30分間の発生量を測定した。呼吸も之に準じて行い、 O_2 の消費量を測つた。

ii) 実験成績：(第1表 a, b)

第 1 表 (a)

HXAの血球カタラーゼに及ぼす影響

H X A の 終 濃 度	人 血 球 カタラーゼ量	あひる血球 カタラーゼ量
0	78.8	3.2
10^{-3}	0	0
10^{-4}	0	0
10^{-5}	3.0~5.0	1.2~0

(カタラーゼ量は30分間における O_2 発生量で示した)

第 1 表 (b)

HXA の血球呼吸に及ぼす影響

H X A の 終 濃 度	人 呼 吸 量	あひる血球 呼 吸 量
0	8.0	30.2
10^{-3}	0	0~2.4
10^{-4}	0~1.2	10.2
10^{-5}	5.0~6.4	26.2

第1表 a 及び b で示す如く 10^{-4} M までは、人血球のカタラーゼ及び呼吸共に強く阻止され、 10^{-5} M においては呼吸量は著るしく増加するが、カタラーゼは依然阻害されている。家鴨の血球カタラーゼは、元来之を欠除せるため、HXA の影響は殆んどないが、呼吸の方は、人の場合と同じく 10^{-4} M までは抑制され、 10^{-5} M で急激に回復する。HXA のカタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響は、他のカタラーゼ保有動物血液に対しても人におけると同様の結果をえた。

b) 血球ペルオキシダーゼに及ぼす影響

HXA の血球ペルオキシダーゼに及ぼす影

響を、第2編に既述した方法に準じて検した。人及び家鴨の血球ペルオキシダーゼ量は、HXA 10^{-3} , 10^{-4} Mol に於ては甚だ減少したが、 10^{-5} Mol では、ほぼ $1/2 \sim 1/3$ 減ずる。

第2項 KCN

a) 血球のカタラーゼ及び呼吸に及ぼす影響

i) 実験方法：HXA の場合と同様で、KCN を 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} Mol を加えて実験した。

ii) 実験成績：(第2表 a, b, 第1図)

第 2 表 (a)

KCNの血球カタラーゼに及ぼす影響

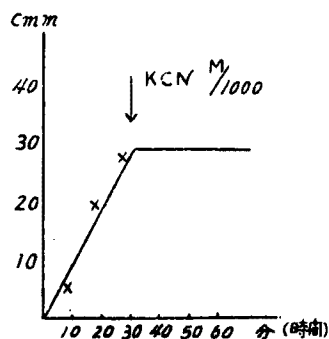
K C N の 終 濃 度	人 血 球 カタラーゼ量	あひる血球 カタラーゼ量
0	76.4	2.4
10^{-3}	0	0
10^{-4}	0	0
10^{-5}	3.0~5.0	1.4

第 2 表 (b)

KCN の血球呼吸に及ぼす影響

K C N の 終 濃 度	人 呼 吸 量	あひる血球 呼 吸 量
0	7.2	32.2
10^{-3}	0	0
10^{-4}	0	8.4
10^{-5}	3.0~4.5	20.2

第1図 呼吸中のあひるの赤血球に対する KCN の作用



KCN の場合も、 10^{-5} Mol の濃度において人の血球の呼吸作用を余り抑制せず、かつカ

カタラーゼ作用を阻害すると考えられる。A-K 血液の場合は、 10^{-4} Mol 迄は呼吸は強く阻止されるが、 10^{-5} Mol で正常に近く回復する。カタラーゼに対する影響は見られない。

次に第1図はあひるの赤血球に KCN を加えた場合の呼吸の変化を示したもので、あひるの赤血球は呼吸量が大きいため、かかる実験には適している。 10^{-3} Mol の KCN を加えた場合呼吸は殆んど完全に停止する。

b) 血球ペルオキシダーゼに及ぼす影響

10^{-3} Mol の KCN を加えた場合、人及びあひるの血球ペルオキシダーゼの測定は殆んど不能であつた。 10^{-5} Mol においては両者ともに、対照の約 $1/2 \sim 1/3$ に減ずるが、この場合もカタラーゼにおける程著減を見ない。

第3項 HXA 及び KCN の細菌の呼吸に及ぼす影響 (第3表)

第3表 HXA 及び KCN による細菌の呼吸阻止率

	HXA 濃度			KCN 濃度		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
PI	18	5	0	26	5	0
PII	18	0	0	22	8	0
PIII	24	0	0	30	0	0
H	0	0	0	5	0	0
Vi	5	0	0	6	0	0
デフテリー菌	32	15	0	62	20	0
淋菌	94	68	36	100	74	44

浮遊液としては Bouillon, NaCl-Phosphat 同容混液を用う。

青酸の各種細菌の呼吸阻止に関する作用について、藤田氏によれば⁵⁾、グラム陽性菌は一般に青酸による呼吸阻止甚だしく、グラム陰性菌に於て著明であるという。肺炎菌各型及び連鎖球菌の如く嫌気性血液培地でも発育する菌においては、青酸等による呼吸阻止率は甚だ低いといわれている。各種濃度の HXA 及び KCN を加えて PI, PII, PIII, 溶連菌、緑連菌の呼吸を測定した。HXA 及び KCN の肺炎各型菌、溶連菌及び緑連菌に対する呼吸阻止率は第3表の通りである。なおカタラーゼ保有菌としてデフテリー菌及び淋

菌を比較対照とした。表における数字は、KCN 及び HXA を添加しないものに対し、添加した場合の呼吸阻止率を%にて現わしたもので、呼吸阻止率4%以下は実験誤差の範囲として全部0とした。この表より上記各菌に対し、HXA 及び KCN ともに 10^{-4} Mol 以下の濃度においては、肺炎各型菌や連鎖球菌の呼吸に及ぼす影響は殆んどないと考えてよい。これら薬物の細菌カタラーゼに及ぼす影響は、上記供試菌がカタラーゼを殆んど有していないので、今後実験に使用する薬物の濃度 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ Mol 程度では細菌カタラーゼに対する意義は殆んどないものとい得る。

第2節 塩酸ヒドロキシルアミンの

細菌の溶血現象に及ぼす影響

カタラーゼ (K) 作用を抑制する薬物として、ヒドロキシルアミンやアシド或は KCN が知られている。これらの毒物は一価の陰イオンとして水酸基と拮抗的にヘミン鉄に結合することによりカタラーゼ反応を阻害すると推測されている⁶⁾。しかし、これら薬物は細胞のカタラーゼ作用を抑制する以外に、同時にその呼吸をも阻止する作用を有している。そこで呼吸を阻止することなくして、カタラーゼ作用を阻止するものとして Loew はヒドロキシルアミンをあげている。なおヒドロキシルアミンはヘモグロビンの濃度が大であると、直接ヘモグロビンに作用し、HXA の損失が大となる⁷⁾。ヒドロキシルアミンは塩酸塩を用いたが、硫酸塩では $10^{-4} \sim 10^{-5}$ ではカタラーゼ抑制作用が認められないからである。実験はすべて塩酸ヒドロキシルアミン (HXA) を用いた。K 血液に HXA を加えカタラーゼ作用を阻止した場合における細菌の溶血作用或いは MetHb 形成の変化を検討するため、次の実験を行つた。

i) 実験方法：カタラーゼ保有血として人血を、アカタラーゼ血として鷺鳥或いは家鴨の血液を用いた。4%血液寒天培地を作り、pH を 7.4 とし、これに 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} Mol の濃度の HXA を加えて、PI, PII, PIII, H, Vi を培養し、24 時間後観察した。各々

好, 嫌気性培養を行つた。

ii) 実験成績

a) 好気性: (第2図)

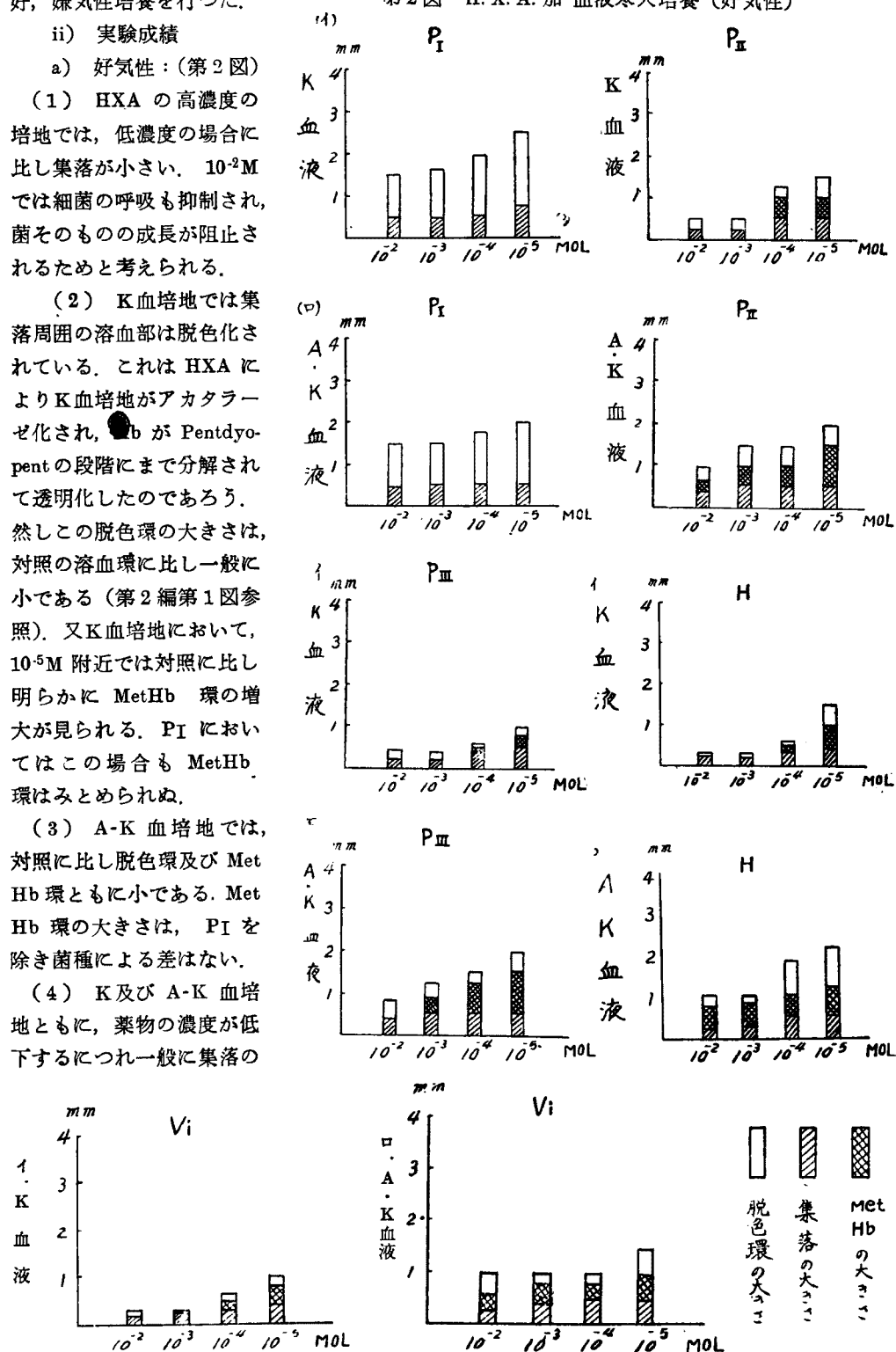
(1) HXA の高濃度の培地では, 低濃度の場合に比し集落が小さい。 $10^{-2}M$ では細菌の呼吸も抑制され, 菌そのものの成長が阻止されるためと考えられる。

(2) K血培地では集落周囲の溶血部は脱色化されている。これは HXA によりK血培地がアカタラーゼ化され, Hb が Pentdyopent の段階にまで分解されて透明化したのであろう。然しこの脱色環の大きさは, 対照の溶血環に比し一般に小である (第2編第1図参照)。又K血培地において, $10^{-5}M$ 附近では対照に比し明らかに MetHb 環の増大が見られる。PI においてはこの場合も MetHb 環はみとめられぬ。

(3) A-K 血培地では, 対照に比し脱色環及び MetHb 環ともに小である。MetHb 環の大きさは, PI を除き菌種による差はない。

(4) K及び A-K 血培地ともに, 薬物の濃度が低下するにつれ一般に集落の

第2図 H. X. A. 加血液寒天培養 (好気性)

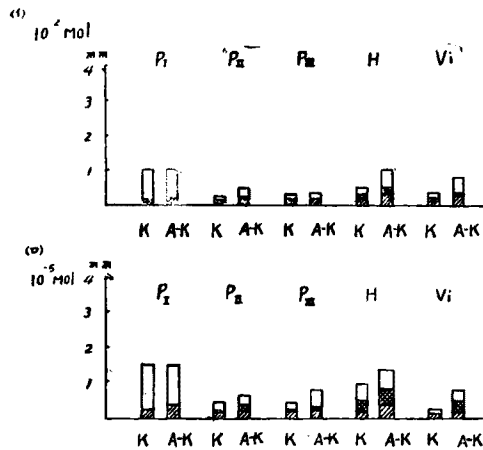


大きさ、脱色環及び MetHb 環が大きくなっている。

(5) MetHb 環形成は、HXA を添加した場合、 10^{-5} Mol 前後においては K 及び A-K 血両培地間に、対照に見られたような著しい差は認められなかつた。

b) 嫌気性：(第3図)

第3図 H. X. A. 加血液寒天培養(嫌気性)



HXA 10^{-3} 及び 10^{-4} Mol の所見は夫々 10^{-2} 及び 10^{-5} Mol の所見に類似しているため、図表の複雑化をさけるため 10^{-2} M と 10^{-5} M の結果を対比せしめて記載した。

(1) A-K 血培地のみならず、K 血培地での集落周囲の溶血部は殆んど脱色化されている。 10^{-2} Mol 培地では一般に集落及び脱色環ともに甚だ小である。

(2) 好気性時に比し、K 及び A-K 培地ともに各菌とも MetHb 環は甚だ小、或は殆んど認められない程度である。又集落及び脱色環の大きさも好気性の場合より小である。但し K 及び A-K 培地間に著差はない。

第3節 KCN の細菌の溶血現象に及ぼす影響

KCN はシアン型カタラーゼ反応抑制物質であるが、同時に強い呼吸阻止作用を細胞に対して有している。動物の赤血球に対しては、そのヘモグロビンと結合しシアンメトヘモグロビンを形成し、血球の呼吸を困難ならしめる。このシアンメトヘモグロビンの形成もそ

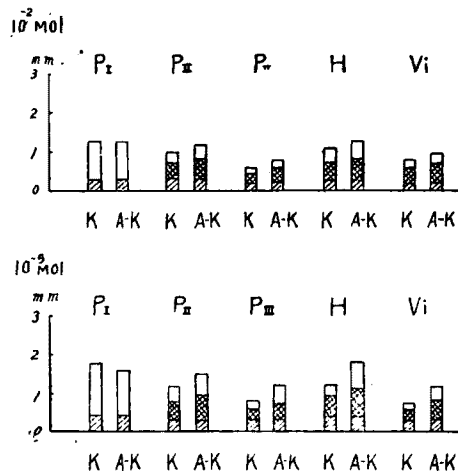
の濃度如何が関係する。 10^{-5} Mol 附近では既述の如く血球呼吸量には著しい変化を与えない。この濃度では MetHb の生成は多少あるとしても、細胞の生存を危くする程度のものではないと考えられる。而も K 反応は抑制されている。又 10^{-5} Mol では供試菌の呼吸に対しても殆んど影響を与えない。

i) 実験方法：KCN の濃度は 10^{-2} ~ 10^{-5} Mol とし、HXA の実験に準じて行つた。

ii) 実験成績

a) 好気性：(第4図)

第4図 KCN 加血液寒天培養(好気性)



KCN 10^{-2} 及び 10^{-5} Mol を対比して第4図に示した。対照は第2編第1図にほぼ同様の結果を得た。

(1) 菌の発育は KCN の濃度の低い方において稍良好。 10^{-5} Mol の場合、集落は対照より一般に小であるが、著しい阻害はうけていないと思われる。

(2) 集落周囲の緑褐色調の MetHb 環は、P1 を除く各菌にみられるが、この場合 K 培地と A-K 培地の間には対照にみられた如き著差はない。然し、一般に A-K 培地の方が稍大である。

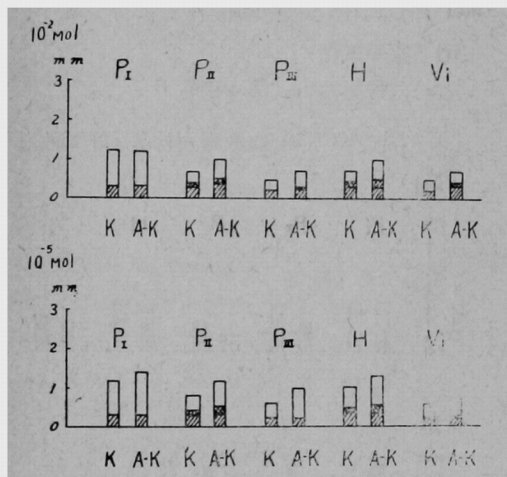
(3) 所謂溶血部は A-K 培地は勿論、K 培地においても、透明化され、HXA の場合に見られたような Pentdyopent 反応が推測される。

(4) KCN 加培地では、K 及び A-K 培地ともに、HXA の場合に比し集落、MetHb 環及び脱色環の大きさは一般に小である。

(5) 各菌間の差を見ると、脱色環は P_I が依然最も大きく、MetHb 環は H と P_{II} が著明である。

b) 嫌気性：(第5図)

第5図 KCN加 血液寒天培養(嫌気性)



成績は第5図の通りである。

(1) 菌の発育、脱色環等の大きさは、好気性の場合と殆んど同程度乃至はやや小さい。

(2) 集落の周囲には殆んど脱色化された溶血環が認められるのみで、好気性培地に見られた如き MetHb 環は極めて一部に見られるだけである。例えば K 及び A-K 培地の H や P_{II} に僅かにこれを見る。

(3) この嫌気性の KCN 加培地における各菌の集落、脱色環の大きさも、K 培地と A-K 培地との間では、対照で見られたような著差はみとめられない。

第4節 血液毒剤の細菌溶血現象に及ぼす影響の分光光度計による観察

前節において、KCN 及び HXA を用い、固形培地における細菌の溶血現象がいかに影響せられるかを、カタラーゼ保有血及び欠乏血において観察した。然し之らは何れも肉眼的観察にすぎず、問題の MetHb 環形成の有無に関しても単なる推測にすぎない点もある。

この点を更に追求するため、液体培養において固形培養におけるほぼ同様な実験を行い、溶血部を採取、ベックマン型自記式分光光度計により観察した。固形培地と液体ブイヨン培地とでは、メデイウムが自ら異り、後者の検査の結果を以つて直ちに固形培地の変化の裏付けを行うということではできないが、細菌の溶血作用により生ずる物質或は薬物添加による変化等が、かなり判然と把握できるのではないかと推測される。

第1項 実験材料及び実験方法

ベックマン型自記式分光光度計を用いて観察した。血液は、K 保有血として人或いは兔を用い、A-K 血として鷺鳥の血液を用いた。供試菌としては、肺炎菌 I、II、III 型、溶連菌 (Cook 株)、緑連菌を用いた。ブイヨン 8 cc (pH 7.4) に血液 (人又は鷺鳥) を 0.32 cc 加えて培養基を調整し (血液の最終濃度 4%)、前記 5 種の供試菌の用い、各々 1 mg/cc の菌液を作成して 0.1 cc を上記培養基に培養した。なお嫌気性培養の場合は、培養基の上に流動パラフィンを重ねて培養を行つた。培養時間は共に 24 時間行い、直ちに高速遠沈 8000 r/min で上清のみ分離しこれらを蒸留水で 5 倍稀釈を行つた後、ベックマン型自記分光光度計にて吸収線を求めた。対照には常に同成分のブイヨンを 5 倍稀釈せるものを用いた。

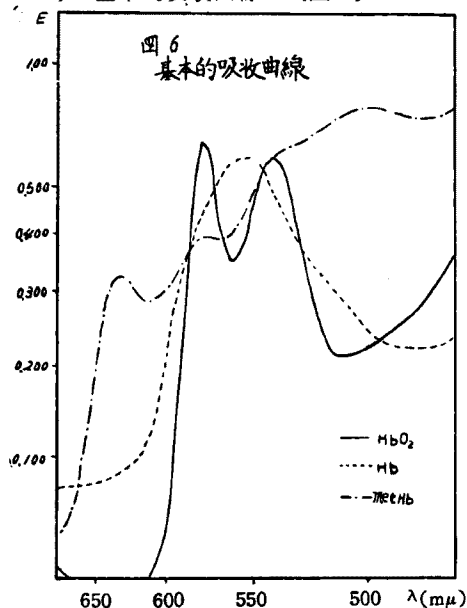
メトヘモグロビン形成に及ぼす KCN、塩酸ヒドロキシルアミンの影響を見るため、最終濃度が前者は 10^{-2} 、 10^{-5} Mol、後者は 10^{-3} 、 10^{-5} Mol になるよう加えた実験を行つた。この際の供試菌として、固形培養でメトヘモグロビン形成を殆んど認めなかつた肺炎菌 I 型 (P_I) とメトヘモグロビン形成を明らかに認めた溶連菌 (H) とを用いた。

基本曲線 (図 6) の作成に於ては酸素ヘモグロビンは新鮮血液を蒸留水で 100 倍稀釈せるもの、還元ヘモグロビンはこれを稀アンモニア水でアルカリ性にし、 $Na_2S_2O_4$ の粉末を極く少量加えて吸光度を見た。メトヘモグロビンの場合は酸性側とアルカリ性側では吸収

曲線に差異を見出すのであるが、著者の実験では測定試料が pH 7.0~7.1 の間にあるため、新鮮血液を 50 倍稀釈せるもの 5 cc に 5% $K_3Fe(CN)_6$ 2 滴を加え pH を 7.05 に調整したものの吸収曲線を求めた⁸⁾。

第2項 実験成績

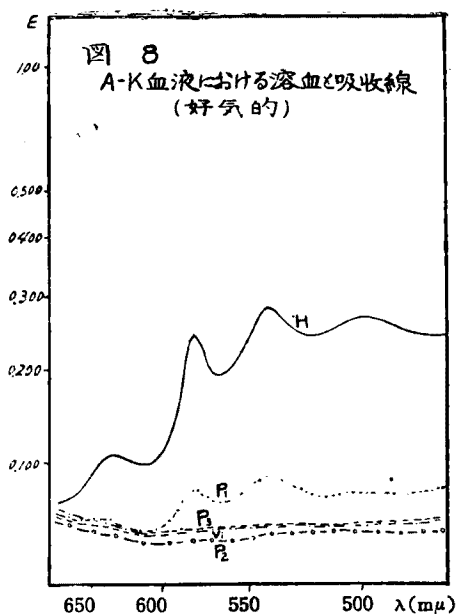
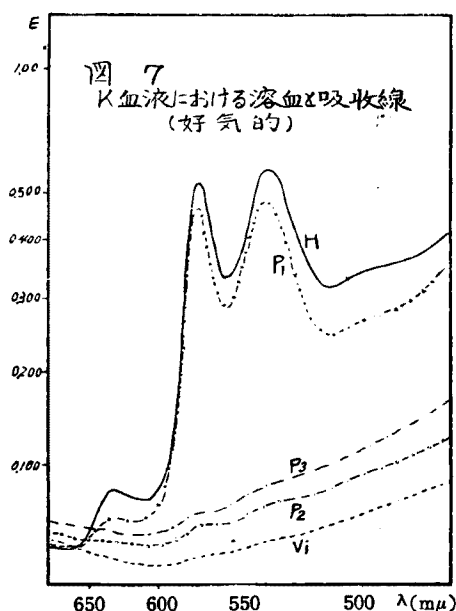
a) 基本的吸収曲線：(図 6)



K 保有血である人及び兎の血液と K 欠乏血である家鴨乃至鷺鳥の血液の基本的吸収曲線には有意な差違は認めず、兎の血液の場合を図 6 に示した、酸化ヘモグロビン (HbO_2) は 542 mμ 及び 580 mμ の 2 ケ所に極大の吸収線を示す。還元ヘモグロビン (Hb) は 540~570 mμ の間で 555 mμ 附近に極大を示す単一な吸収線が認められる。メトヘモグロビン ($MetHb$) は pH により異なり、酸性側では 630 mμ で吸収線が著明であるが、アルカリ側では、540, 570 mμ に極大をもつ 2 つの吸収線を見るのが常であり、又 500 mμ 前後の部分にも一つの吸収線が見られる。

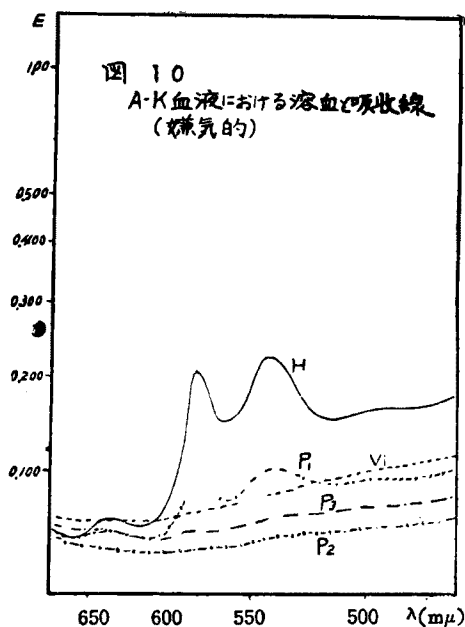
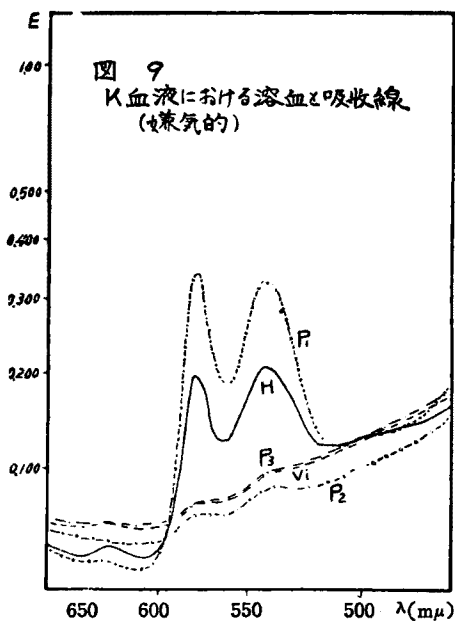
b) 好気性培養：(図 7, 8)

各供試菌を K 及び A-K 血液培地に好気性培養して求めた吸収曲線を図 7, 8 に示す。PII, PIII, VI では菌発育悪く溶血が著明に起きないためか、吸収曲線は明らかでない。K 血培地では PI に於て $MetHb$ の吸収曲



線を殆んど認めず、H に僅にこれを見る (630 mμ)。A-K 血培地では、H の $MetHb$ 形成は明らかであるが、PI では之を認めない。なお A-K 固形培地に於て、PI, H 等は Pentdyopent の形成が推測され、これは 525 mμ 附近に吸収曲線を示す筈であるが、本実験では、僅にそれらしき吸収曲線が認められたにすぎなかった。

c) 嫌気性培養 (図9, 10)



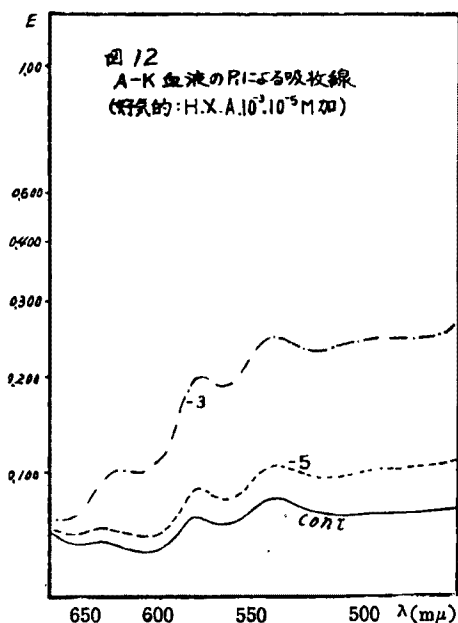
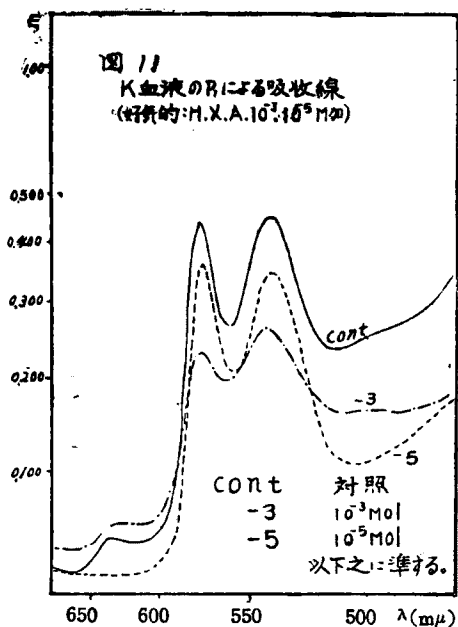
吸収曲線をよく認めるのは主として P_1 と H で、他の菌でも溶血がおきていることは判るが何れも弱い。 P_1 は K 及び $A-K$ 培地ともに、 $MetHb$ の吸収線はみとめない、 H も、 K 培地では殆んど $MetHb$ の吸収線を見ず、 $A-K$ 培地で僅かにこれを見とめるにすぎない。液体培地においても、固形培地同様、

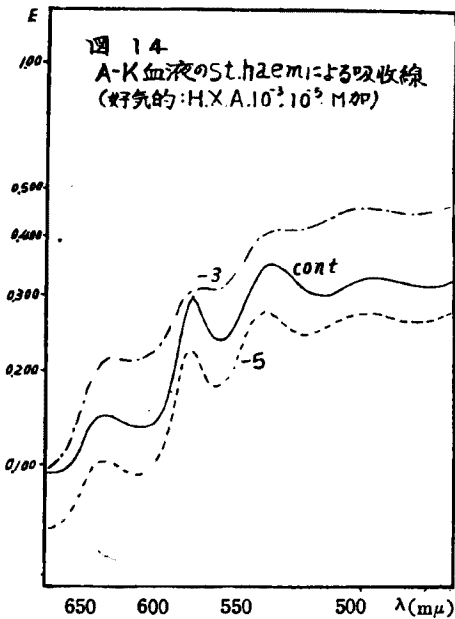
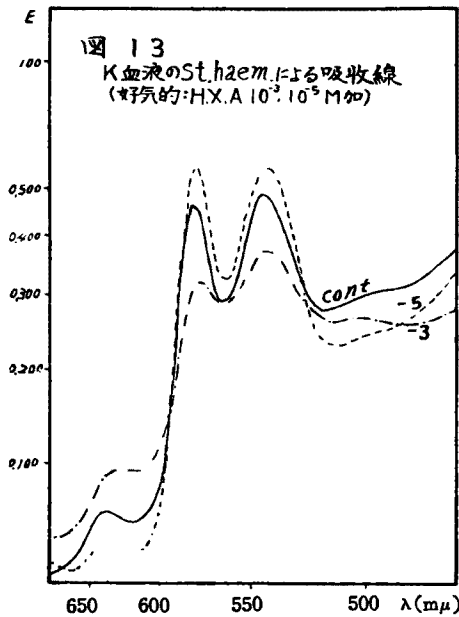
嫌気性培養では好気性時に比し、 $MetHb$ の形成の甚だしい事を証明しうる。

d) 塩酸ヒドロキシルアミン (HXA) による影響

i) 好気性: (図11~12)

P_1 : (図11, 12) K 血では $MetHb$ の吸収線を殆んどみとめないが、 $A-K$ 血において、





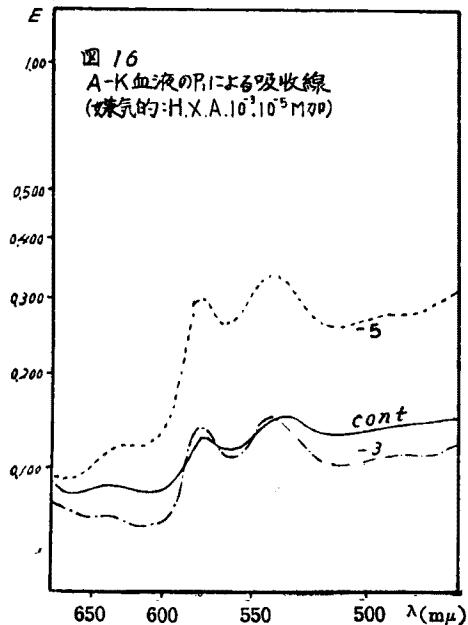
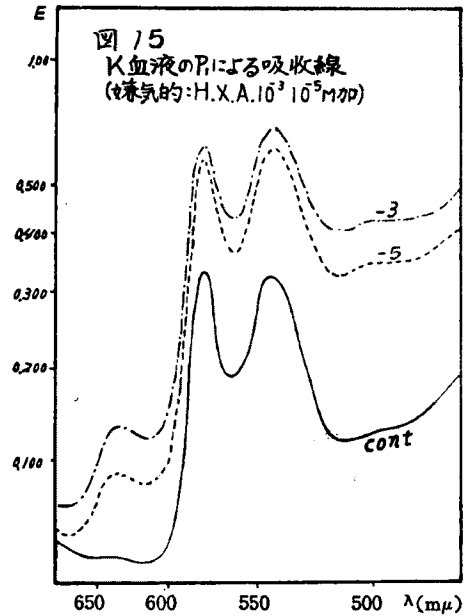
10^{-3} Mol の際 MetHb の吸収線を見る。但し、対照及び 10^{-5} Mol では認め難い。

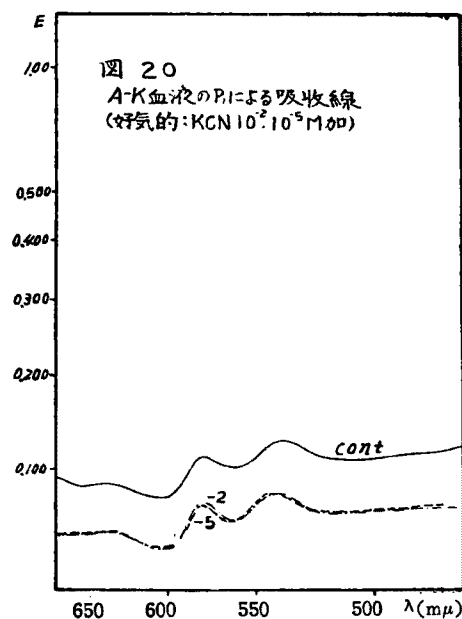
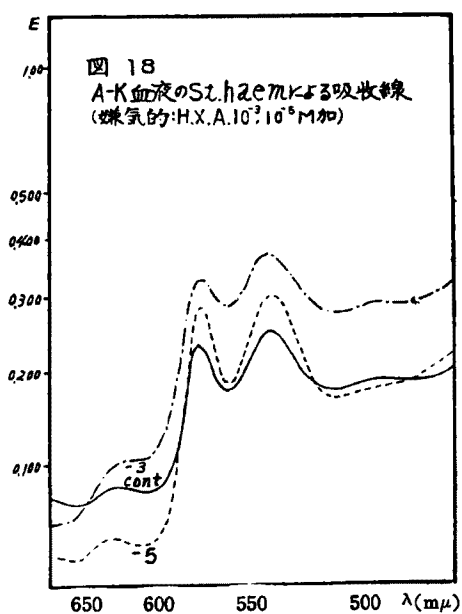
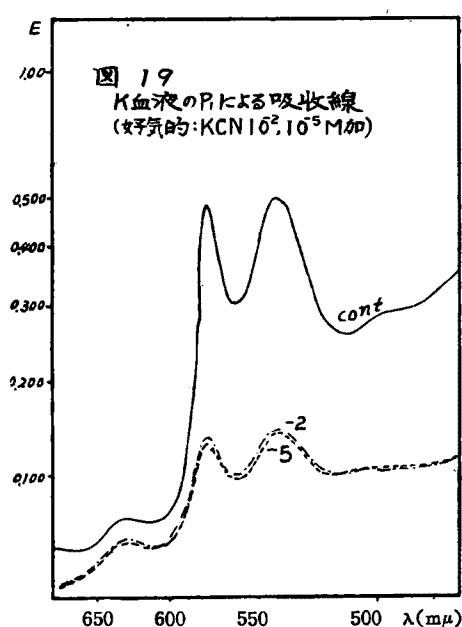
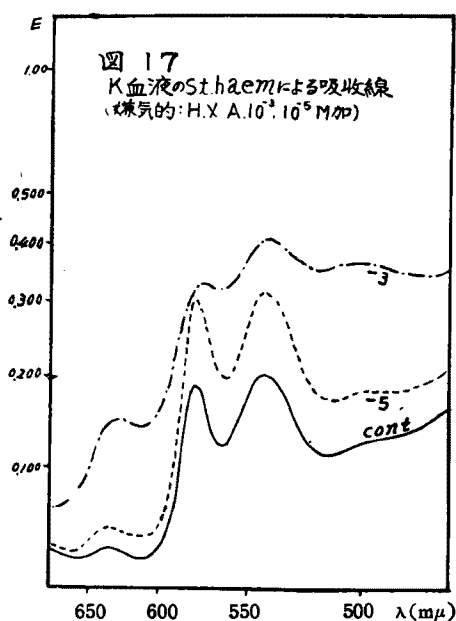
H: (図 13, 14) K 培地において MetHb を僅かに見るが、A-K では、両濃度においても又対照においても明かに MetHb の吸収線が見られる。A-K 培地では H の MetHb 形成の著明であることがこれで知られる。

ii) 嫌気性: (図 15~18)

PI: K の有無に不拘, MetHb の吸収線は殆んどみとめられない (図 15, 16)。

H: K 培地では 10^{-3} Mol において, MetHb がみられるが、対照及び 10^{-5} Mol では殆んどこれを見ない。A-K 培地でもほぼ同様である。HXA を加えた場合でも、嫌気性時には MetHb の形成が極めて少い (図 17, 18)。





e) KCN による影響

i) 好気性: (図 19, 22)

PI: (図 19, 20) 両培地ともに, MetHb の吸収線は殆んどみとめられない。

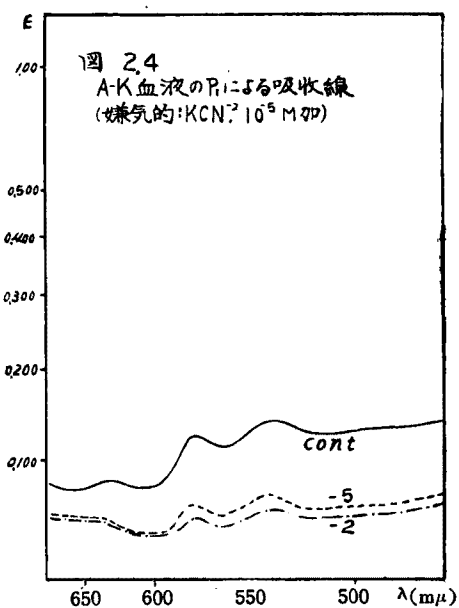
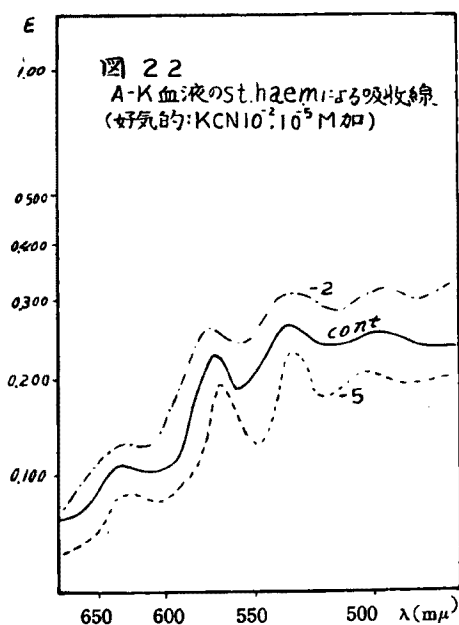
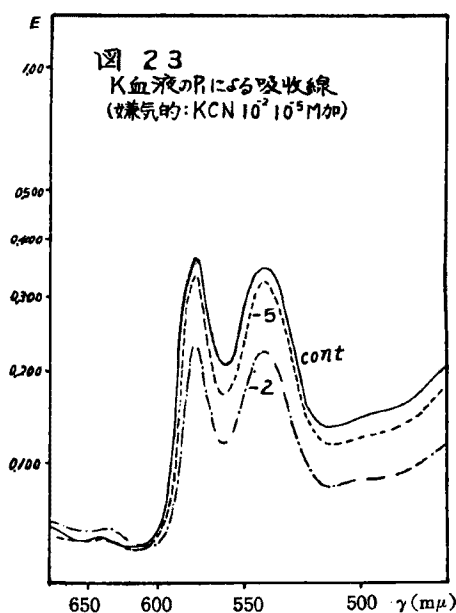
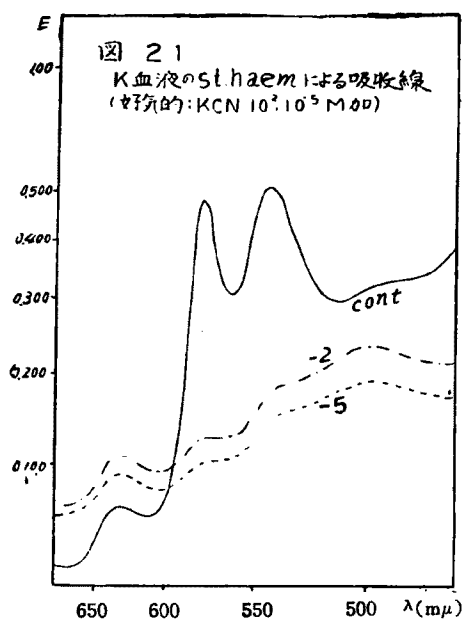
H: (図 21, 22) K培地においては, 対照に比し 10^{-2} , 10^{-5} Mol に於て MetHb の吸収線を見る。A-K 培地では, 対照において明な MetHb の吸収線を見るが, KCN 加培地では

僅に之をみとめるにすぎない。これは KCN による菌発育が抑制されるため, MetHb 形成が充分でないためであろう。

ii) 嫌気性: (図 23~26)

PI は両培地において対照及び各濃度ともに MetHb が吸収線を残し認めない (図 23, 24)。

Hでも対照と同じく各濃度とも, K培地に

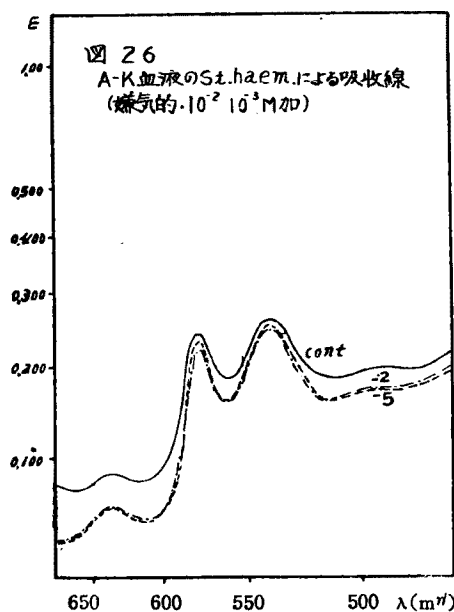
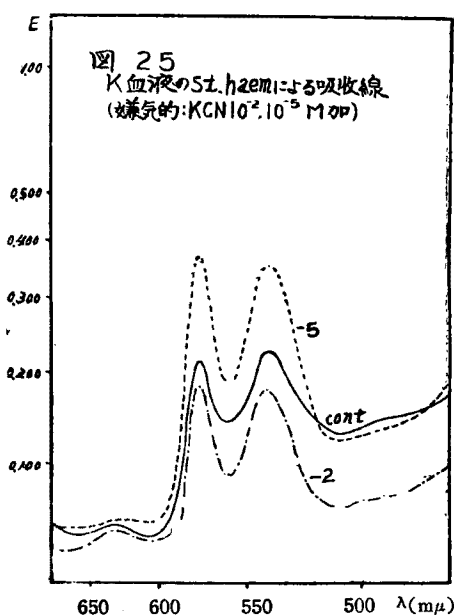


において MetHb の吸収線を殆んど見ない。
A-K 培地で僅に認める程度である (図 25,
26)。

嫌気性培地では, KCN の場合でも一般に
MetHb 形成は, 好気性時に比し少い。

第II章 総括及び考按

カタラーゼ保有血液 (人) 及び無カタラー
ゼ血液 (あひる, 鷺鳥) を加えた培地に, 肺
炎菌 (PI, PII, PIII), 溶連菌 (H), 緑連菌
(Vi) の各菌を培養した際の溶血, MetHb 生
成, 脱色の各現象に対する塩酸ヒドロキシル
アミン (HXA), KCN 添加の影響を検討する。



HXA, KCN は何れも呼吸及びカタラーゼ反応をとともに阻害するものであるが、その濃度により阻害度を異にし、 10^{-5} Mol 附近では HXA, KCN はともに菌及び赤血球の呼吸には殆んど影響を与えず、カタラーゼ反応が殆んど完全に阻止される。従つてカタラーゼ保有血液 (K血) 培地に HXA, KCN を添加することにより、無カタラーゼ血液 (A-K血)

培地にその性状が類似することが予想されるが、事実上記実験によりこのことが確認された。

先ず固形培地について、K血培地に HXA, KCN を添加することにより、各供試菌とも一般に脱色環、MetHb 環の増大が見られ、A-K 血培地に於ける所見に接近するのが認められる。これは HXA, KCN の添加によりカタラーゼ作用が阻止されるため、菌により生成される H_2O_2 が処理されず、Hb の酸化が起るためと考えられる。上記K阻害添加培地では MetHb 環の生成がかなり見られるが、脱色環の生成は A-K 血培地のそれに比し小となつている。これは阻害剤添加により菌の発育自体が幾分抑制され、従つて H_2O_2 の生成も減少するため、Hb の酸化は主として MetHb の段階で止まり、脱色には至らないことによると想像される。これに対し A-K 血培地では、HXA, KCN 添加による影響は極めて少く、これら阻害剤の添加により発育が抑制される結果として脱色環の生成が減少するにすぎない。かくの如く HXA, KCN の添加に於ては A-K 血培地、K血培地上の所見は甚だ近似したものとなる。

以上の固形培地における HXA, KCN の影響は液体培地についても認められる。液体培地を実験では分光的検討が可能であるため、菌培養後遠沈した上清、及び沈渣に蒸留水を加え溶血せしめ更に遠沈した上清を分光光度計でみるに、HXA, KCN 添加のK血培地では、A-K血基地におけると同様に、MetHb の吸収曲線が認められ、阻害剤無添加のK培地に比し MetHb の生成が顕著であることが証明された。Barkan⁹⁾¹⁰⁾は KCN 存在下に Hb に直接 H_2O_2 を作用せしめ α -pseudohe-moglobin (618 μm) が生成されることを述べ、又菊池¹¹⁾は無カタラーゼ血液を用い、種々の条件下に Hb に H_2O_2 を作用せしめて Choleglobin (630 μm) の生成を証明しているが、筆者の実験では何れも MetHb の吸収曲線と重なり、その存在は明らかにしえなかつた。

次に嫌気性培養では、K 血培地、A-K 血

培地ともに HXA, KCN 添加によつて Met Hb の生成は殆んど増大しない。これは前報でものべた如く、嫌気性状態では菌による H_2O_2 の生成が少く、カタラーゼ作用の存否が問題とならないためと想像される。

結 語

カタラーゼ保有血液及び無カタラーゼ血液培地における肺炎菌 (PI, PII, PIII), 溶連菌及び緑連菌の溶血現象及び MetHb 生成に及ぼす塩酸ヒドロキシルアミン (HXA) 及び KCN の影響を検討した実験を行い次の結果をえた。

1) HXA 及び KCN とともに 10^{-5} Mol の濃度においては、血球カタラーゼ作用を殆んど阻止し、かつその呼吸には重大な影響を与えない。又この濃度では供試菌の呼吸にも殆んど影響を与えない。

2) 上記濃度の HXA を K 血培地に加え、前記各菌を固形培養するに、PII, PIII, 溶連菌、緑連菌の MetHb 環は対照より著明に大

となり、A-K 血培地の所見に近づく。又各菌集落周囲の溶血環は脱色化される。

3) KCN 添加の場合も HXA の成績とほぼ同様であるが、KCN 添加の方が MetHb 環、脱色環ともに一般に小さい。

4) A-K 血培地では前記濃度の HXA 及び KCN により影響されることは甚だ少く、菌の発育が稍劣るだけで、質的变化は殆んどみとめられない。

5) HXA, KCN 添加の際も、嫌気性培養では、好気性時に比し、MetHb 生成が殆んどないか或は極めて僅かである。

6) 前記実験を液体培養にて行い、自記分光光度計により MetHb 生成の有無を観察したが、その成績は上記固形培地のそれにはほぼ一致し、溶連菌等の A-K 培地、HXA, KCN 添加 K 血培地における MetHb 生成が確認された。

[終りに臨み、御指導と御校閲を賜つた村上教授及び御助力をいただいた松浦氏、金政講師に深甚なる謝意を表します]

文 献

- 1) Stern, K. G.: Z. Physiol. Chem., **209**, 176 (1932)
- 2) Blaschko, H.: Bioch. J., **29**, 2303 (1935)
- 3) Keilin, D., Hartree, E. F.: Proc. Roy. Soc. L. B., **124**, 397 (1938), Bioch. J., **39**, 124 (1945)
- 4) Agner, K., Theorell, H.: Arkiv. Bioch., **10**, 321 (1946)
- 5) 藤田秋治, 児玉威: 日本細菌雑, **461**, 475 (1933)
- 6) 赤堀四郎, 田宮博: 酵素化学の進歩第 1 集, 135 (1948)
- 7) 藤田秋治, 児玉 威: 日本細菌学雑, **462**, 555 (1934)
- 8) 標準生化学実験, P. 116 (文光堂)
- 9) Barkan, G., Schales, O.: Z. Physiol. Chem., **253**, 83 (1938)
- 10) Barkan, G., Walker, B. S.: J. Biol. Chem., **135**, 803 (1940)
- 11) 菊池吾郎: 日生化, **24**, 1, 55 (1952)

Studies on the Action of Some Bacteria on Erythrocytes.

Part 3: Influences of some Hematoxins upon the Hemolytic Phenomena.

By

Mansuke Matsumoto

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

The experiments have been conducted in order to investigate the effects of hydroxylamin and KCN upon *Pneumococci*, *St. hemolytics*, and *St. viridans* in the catalase carrier and the acatalasemic blood; and the following results have been obtained:

1. Hydroxylamine (HXA) and KCN at the concentration of 10^{-5} Mol. inhibit the catalase reaction of blood cells without interfering the blood respiration. Furthermore, hardly any influence is exerted on the respiration of bacteria at this concentration.

2. When HXA at the above-mentioned concentration is added to K blood, the Met-Hb rings of P_{III}, H, and Vi become markedly larger than those of the control; and they approach to those of the AK medium. Moreover, the hemolytic rings of each colony become discolored.

3. In the case when KCN has been added, they give results rather similar to those of HXA, on the other hand, the size of each ring is smaller.

4. HXA and KCN little affect AK blood, and almost no qualitative changes can be recognized.

5. Even in the case when HXA and KCN are added, the Met-Hb formation in the anaerobic medium as compared with that in the aerobic case can hardly be recognizable or extremely little if any.

6. The results obtained on the observation of the Met-Hb formation in the liquid medium, with the aid of automatic spectrophotometer, coincide rather closely to those revealed in the solid medium.
