いるのを識つた。

2) Quinaldine 酸による微量鐵測定法に上記抽出法を組合せて臓器内 non-Hemin 系鐵微量測定法を考案した。

3) 本法は操作容易で測定誤差が少く短時間に終了する微量法である。

拙筆に當り種々御注意を給つた日本醫科大學生化學教室上代教授に深謝する。

文 献

- (1) Brückmann et al., J. Biol. chem., 135: 23 (1940).
- (2) Nennat, Newyork Grune et Stratton (1949).
- (3) Laufberg, Bull. soc. chem. Biol., 19: 1575 (1937).
- (4) Michaelis, Advance in protein. chem., 3: 53 (1947).
- (5) Finch et al, Blood, 11: 183 (1950).
- (6) Cook, J. Biol. chem, 82: 595 (1929).
- (7) Greenberg, J. Biol. chem, 165: 397 (1946)
- (8) Darby, J. Am. med. Assoc, 142: 1287

(1950).

- (9) 山田政太郎, 日醫大誌, 19(3): 32 (1952).
- (10) Starkenstein u. weden: Arch. exp. path. u. pharma, 137: 274 (1928).
- (11) Borgen et al, J. Biol. chem, 119: 725 (1937).
- (12) Hill, Proc. Roy. Soc. London. Series B. 107: 205 (1931).
- (13) Lintzer, Ergebn. physiol., 31, 844 (1931).
- (14) Heuber, klin. Wschr., 5, 588 (1926).
- (15) Tompsett, Bioch. J, 28: 1902 (1934).
- (16) Starkleton, et al Bioch. J., 30: 582 (1936).
- (17) Kohler et al, J. Biol. chem., 113: 49 (1936).
- (18) Tompsett, Bioch. J., 29: 480 (1935).
- (19) Barkan, Z. physiol. chem., 171: 194 (1926).
- (20) Bodansky, Biochemistry of Disease, 40 (1940).
- (21) Barkan, J. Biol. chem., 135: 37 (1940).

偽ジフテリア菌及び乾燥症菌の栄養についての研究

Studies on the Nutrition of *Corynebacterium pseudodiphtheriae* and *C. xerosis*

日本醫科大學衛生學教室(主任 八田貞義教授指導)

研 究 生 渡 邊 次 雄

Watanabe Tsugio

Mueller 1 派の 10 年餘にわたる業績によつてジフテリア菌の栄養についての知識はほとんどあます所もないほどに充實したものとなつている。それは單に基礎的に細菌の生理化學に大きな力をあたえたばかりでなく, Mueller (1940)¹⁾ がその業績のしめくくりとして發表した毒素產生用の「再現できる培地」(reproducible medium)は實用的にもきわめて大きな恵みを細菌研究者にあたえている。

さてわれわれはこうして得られた知見の内容から, ジフテリア菌——ひいてはコリネバクテリウム屬全般の栄養からみた地位について考えてみなければならない。現代代謝研究の進歩はほとんどすべての病原細菌についてその發育素と窒素源, 炭素源の範圍を大まかながらつかむに足る材料を提供している。細菌全般から見て, 無芽胞グラム陽性桿菌の栄養要求は一般にかなりきびしい(exact)部屬に入る。すなわち

(ミコバクテリウムは別として)ジフテリア菌にしても乳酸桿菌にしても相當多種のアミノ窒素と種々の發育促進物質が必須である。しかしこゝで問題になるのは兩者の病原性である。ジフテリア菌はいうまでもなくヒトの呼吸系に病原性を示すと共に、ウマ・モルモットその他廣い範圍の動物にかなり強い毒性を示すのに対して、乳酸桿菌は全く病原性を示さない。

もちろんジフテリア菌の營養要求は病原菌の中でもかなりきびしい方であろう。たとえば腸管系病原菌である腸チフス菌、シゲラ属は最小限度1種のアミノ酸、發育素、又は數種のアミノ酸によつて充分生活現象を営み得るし、コレラ菌も大體同様である。これに比べれば、ブドウ球菌、ジフテリア菌、敗血症菌属はアミノ窒素も、發育素も相當多數を要する點からみではるかに高位にあるとみられる。非病原菌は一般に病原菌よりも營養要求度がひくく、大腸菌群、好気性有芽胞桿菌(枯草菌、ジャガイモ菌など)マイクロコックスはいずれも無機窒素化合物(NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- など)を有機窒素化合物につくりかえるに足る複雑な合成酵素系をもつと見られる。これらの菌群にくらべると同じく非病原性である乳酸菌属がなぜはるかに高い營養要求を示すのであろうか? それに対しては次のような想像がある程度満足な答を出してくれる。すなわち「乳酸菌属は一般に營養のきわめて豊かな物質と共生しているため、病原菌の宿主依存性と同じような環境依存性ができたのであろう」と。

問題を再びコリネバクテリウムにもどしてみる。コリネバクテリウム属の中にはジフテリア菌の外に偽ジフテリア菌と乾燥症菌が日常ヒトに關聯性をもっている。この兩種の菌は病原性の點を別とすればほとんどジフテリア菌と共通しているが、その營養要求度についての調査はまだない。この兩種の菌の營養要求がジフテリア菌よりもきびしいか、きびしくないかは、これらの菌種の進化の度合を知ると共に、進化についての理論をつくる上はかなり役立つように思われる。なぜならば、もしこれらの菌種の營

養要求がジフテリア菌のそれよりも低ければ、「病原菌は非病原菌が寄生性を増すと共に、その合成酵素系が脱落して營養要求がきびしくなつたものである」という見方を支持することになるであろうし、逆にジフテリア菌よりも營養要求がきびしければ、「非病原菌の少くとも一部は病原菌が毒性を失つて宿主との共生性を増したものである」とかもしれないという考えもできるからである。

この報告では、ヒトから分離された偽ジフテリア菌3株と乾燥症菌2株について、アミノ酸及び發育要求の程度を調査した結果をジフテリア菌のそれと比較したものである。

I. 實驗の方法

a) 使用した菌株

實驗に使つた菌株は次の6株である。

偽ジフテリア菌	唐 R
	C-No.16, C-No.20;
乾燥症菌	C-No.40, C-No.56;
ジフテリア菌	Toronto-Harvard;

この中唐R株は著者が健康者の咽喉から分離したもの、Toronto-Harvard株は教室保存株、他の4株は東大立研鈴野氏が眼結膜から分離したものを國立衛試桑原技官を通してゆづり受けた。

各菌株はレフレル凝固血清培地に1週1回繼代保存した。Toronto-Harvard株を除く5株の生物學的性狀はいずれも當該菌種に定型的であることが確かめられている。

b) 培地の材料

無機鹽はすべて再結晶を行つたものを使用した。アミノ酸は和光純藥又は日出製藥の製品をそのままつかつた。

試験管は1.2cm×11cmのもの、綿栓はすべてガーゼで被つた。試料が少ないため、培地量は最終3ccになるようにした。

c) 培地の構成

基本培地としては次の3種類のものを用いた。培地の構成はすべてMuellerがその研究の経過中につかつた培地と似たものである。

培地A.²³⁾

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5g
2. KH_2PO_4	0.35g
3. NaCl	5.0g
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g
5. カゼインアミノ酸(日之出)	5.0g
6. <i>l</i> -チスチン	0.1g
7. <i>l</i> -トリプトファン	0.1g
8. ブドウ糖	1.0g
9. 乳酸ソーダ	10g
10. グリセリン	10g
11. ニコチン酸	2.0mg
12. β -アラニン	1.0mg
13. ピメリン酸	1.0mg

蒸溜水で 1000cc とする。

PH: 7.6 とし、分注後 100°, 30分, 3回間歇滅菌して使用する。

培地B¹⁾

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5g
2. KH_2PO_4	0.35g
3. NaCl	5.0g
4. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1g
5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0mg
6. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.5mg
7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.0mg
8. <i>l</i> -チスチン	0.6g
9. <i>dl</i> -バリン	2.0g
10. <i>dl</i> -メチオニン	0.6g
11. <i>l</i> -チロシン	0.5g
12. <i>l</i> -プロリン	0.75g
13. <i>l</i> -アスパラギン酸	5.0g
14. <i>d</i> -グルタミン酸	7.5g
15. ニコチン酸	2.3mg
16. ピメリン酸	0.15mg
17. β -アラニン	2.3mg
18. 乳酸ソーダ	17.5g
19. グリセリン	10g
20. 蒸溜水	全量 1000cc

PH: 7.6 滅菌は前と同じ。

培地C

この培地のアミノ酸構成だけは Evans, Happold & Handley (1939)²⁾ の報告と大體似た

ものを用いた。

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5g
2. KH_2PO_4	0.35g
3. NaCl	5.0g
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g
5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0mg
6. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.5mg
7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.0mg
8. グリシン	0.5g
9. <i>l</i> - α -アラニン	0.1g
10. <i>dl</i> -バリン	0.5g
11. <i>l</i> -ロイチン	0.5g
12. <i>d</i> -イソロイチン	0.1g
13. <i>l</i> -チスチン	0.1g
14. <i>l</i> -チロシン	0.1g
15. <i>l</i> -ヒスチジン HCl	0.1g
16. <i>d</i> -アルギニン HCl	0.1g
17. <i>dl</i> -メチオニン	0.1g
18. <i>l</i> -プロリン	0.1g
19. <i>l</i> -リジン 2HCl	0.1g
20. <i>l</i> -トリプトファン	0.1g
21. <i>l</i> -アスパラギン酸	0.1g
22. <i>d</i> -グルタミン酸	5.0g
23. ニコチン酸	2.3mg
24. β -アラニン	2.3mg
25. ピメリン酸	0.15mg
26. 乳酸ソーダ	15.0g
27. 蒸溜水	全量 1000cc

とする。 PH: 7.6

以上3種の培地を基本にしてこれから成分をぬきとり、又は他の物質を加えて培養を試みた。

d) 移植、観察

移植を行なうには菌をレフレル培地に 37° 18. ~24時間培養し、これを滅菌生理食鹽水10ccに對し1白金耳量浮游よく振つて平等に混ぜてから 2cc の駒込ピペットで1滴ずつ試験管培地にうえるようにした。

どの菌種も培地に發育した場合、ワタ状又は板狀の沈殿になつたので、發育度は多くは肉眼で判定したが、時にはマイクロキャーダール法

で菌體窒素を定量した場合もあつた。

第1表 各培地における各菌株の發育

菌 株	A	B	C
Toront-Harvard	3.02	0.15	1.65
唐 R	0.98	0.08	0.71
C-No.16	0.22	0.05	0.06
C-No.20	0.18	0.02	0.02
C-No.40	0.09	0.03	0.03
C-No.56	1.13	0.42	0.66

數字は培地 10cc 當りの菌N量を mg で示したものの

II. 實驗の成績

a)各菌株の培地 A, B, C における發育

はじめにジフテリア菌と偽ジフテリア菌及び乾燥症菌の發育度を比べるため、各株を上へのべた3種の培地にうえて、48時間培養後、菌體窒素量を測つてみた。實驗の結果は第1表に示してある。

Toronto-Harvard 株は培地A及びCではよく増殖し、大量の沈澱をつくるが、Bではきわめて發育がよわい。唐Rと C-No.56 とはA培地にはある程度増殖するが、B, Cではきわめてよわく、特に唐Rは培地Bにはほとんどはえない。C-No.16, 20, 40 の3株はどの培地にも痕跡的發育しか示さない。

b)Toronto-Harvard, 唐 R, C-No.56 株の發育素について

Toronto-Harvard(T.H. と略)

唐 R, C-No.56(56と略) の3株は培地Cで肉眼的に(+)~(++)の發育を示すので、この培地をもとにして、發育素の検討を行つた。

1.ニコチン酸をぬいた培地では3株とも全く増殖は起らない。ニコチン酸を $10^{-3}M$ 濃度から 10 倍階段稀釋量になる様に培地に加えると $10^{-5}M$ 濃度までは發育に變りがないが、 $10^{-6}M$ 濃度でははるかに効果がよくなる。

ニコチン酸の代りにニコチン酸アミドを使うと成績はかなり不定であるが、大體 $10^{-3}M$ 濃度だけで効果を示した。特にアミドの効力は類ジフテリア菌2株では一層よわいようであつた。

2. β -アラニン抜いた培地でも、3株とも發

育を起さない。その効果は $10^{-5}M$ 濃度でははつきりしているが、 $10^{-6}M$ 濃度では全く現れない。 β -アラニンの代りにパントテン酸を用いると 1 γ /cc (カルシウム鹽として)では β -アラニンの 1 γ /cc 添加に比べてかなり發育がよくなる。たゞし T.H. 株では著しい變化はみられない(第2表参照)。

第2表 C-培地から β -アラニンをぬいたものに、 β -アラニン、パントテン酸を加えた時の效果

添 加 量	株 名	T.H.	唐R	56
β -アラニン	0	—	—	—
	0.5 γ /cc	—	—	—
	1.0	++	+	+
	10.0	++	+	+
	100.0	++	+	+
パントテン酸	0	—	—	—
	0.5 γ /cc	+	+	—
	1.0	++	+	+
	10.0	++	+	+
	100.0	++	+	+

第3表 パントテン酸及び構成要素の發育效果

培 地	菌 株	T.H.	唐R	56
C 培 地		1.91	1.03	0.82
C 培地- β アラニン +パントテン酸 1 γ /cc		1.89	1.68	1.37
C 培地+ブチロラ クトン 5 γ /cc		1.78	1.25	1.06

數字は培地 10cc 當りの菌N量を mg で示す

次にパントテン酸をアルカリ加水分解してつくれたブチロラクトンを β -アラニンの代りにあたえてみたが、50 γ /cc までは T.H.株には全く作用がなく、唐 R, 56 兩株も β -アラニンに比してはるかによわい發育しか示さない。しかしブチロラクトンと β -アラニンとを同時にあたえると β -アラニン單獨の場合に比べて、唐 R, 56 ではよい成績が得られた(第3表参照)。

3. ピメリン酸をぬいた培地では T.H. 株はやゝ發育がよくなるが、唐 R, 56 ではあまり影

響がない。なおピメリン酸の代りに同量又は10倍量のアデピン酸、アゼライン酸を用いてみたが、どの菌株にも作用がない。

c) C-No.16, C-No.20, C-No.40 の發育の増強
(以下 16, 20, 40 と略記)

16, 20, 40, の3株は前にのべたように培地 A, B, C のいずれにもほとんど増殖しないので、これに他の發育促進物質を加えてその効果をしらべてみた。

1. まず培地 A にビタミン B₁, B₂, B₆, 葉酸, パラアミノ安息香酸, メソイノシット, コリンをそれぞれ單獨に 1~100r/cc に加えて培養してみたが、いずれにも發育促進能は認められなかつた。又インドール酢酸カリ, α -ナフタリン酢酸カリも 10~300r/cc で効果を示さなかつた。

2. 次に各種の浸出物を培地 A に加えて發育を効果をしらべてみた。浸出物のつくり方は次の通りである。浸出材料には新鮮なウシの肝, 脾, 腎, 肺及びパン用乾燥酵母を用い、臓器の場合は細かくきざみ、流水でなるべく血液をよく洗いとり、蒸溜水を加え、PH: 7.0 にして 100°C 30分加熱後、濾過して 1cc 中に 1g 分のエキスを含まれるようにし、乾燥酵母の場合は直接蒸溜水を加え、臓器と同様に浸出し、1cc 中に酵母 0.1g 分のエキスを含まれる様にした。

實驗の結果は第4表に示してある。肺及び腎臓は一般に發育促進力がややよく、酵母がもつとも強く、肝臓がこれに次でいた、酵母浸出液を 100 倍に加えた場合の各菌株の増殖菌量は第6表に示してある。

基本培地として C 培地を用いると 3 株とも發育は A 培地を用いた時よりも一段とよくなり、酵母は 200 倍以下、その他の臓器は 100 倍以下では効果が現はれなかつた(第5表)。

d) 唐 R, C-No.56 株の發育に必要なアミノ酸

唐 R, C-No.56 株は完全合成培地にある程度増殖するので、培地 C についてアミノ酸の抜きとり試験を行ない、必要なアミノ酸の種類をしらべ、同時に Toronto-Harvard 株について行なつた實驗結果と對比してみた。實驗の結果は

第4表 組織浸液の發育效果

浸出液	菌株 稀釋 倍數	19	20	40	T.H.
肝	20	++	++	++	+++
	50	++	++	++	+++
	100	++	++	++	+++
	200	±	+	+	+++
	500	±	±	±	+++
脾	20	++	++	++	+++
	50	++	++	++	+++
	100	+	+	±	+++
	200	±	±	±	+++
腎	20	++			+++
	50	++	++	++	+++
	100	±	+	±	+++
	200		±	±	+++
肺	20	++	++	++	+++
	50	++	++	++	+++
	100	+	±	±	+++
	200	±	+++		+++
酵母	50	+++		+++	+++
	100	++	++	++	+++
	200	+	+	+	+++
	500	+	+	+	+++
A 培地のみ		±	±	±	+++

第6表に示してある。

表の結果をまとめてみると

1. Toronto-Harvard 株

必須なもの L-ロイチン, L-チスチン, L-トリプトファン, d-グルタミン酸, L-プロリン

重要なもの L-ヒスチジン, L-アスパラギン酸。

第5表 酵母エキスの發育效果

培地	菌株	T.H.	唐 R	16	20	40
A 培地		2.98	0.79	0.26	0.13	0.06
A 培地 + 酵母エキス (100×)		4.03	1.95	1.53	1.39	1.46
C 培地		1.80	0.62	0.06	0.04	0.03
C 培地 + 酵母エキス (100×)		2.79	1.22	0.95	0.81	0.97

2. 唐 R 株

必須なもの グリシン, L-チスチン, L-リジ

第6表 各菌株のアミノ酸必要度

	唐R	56	T.H.
完全培地	++	++	+++
グリシン	—	++	+++
<i>l</i> - α -アラニン	+	++	++
dl-バリン	++	—	+++
<i>l</i> -ロイチン	++	±	±
dl-イソロイチン	++	++	+++
<i>l</i> -チスチン	—	—	—
<i>l</i> -チロシン	+	++	+++
<i>l</i> -ヒスチジン HCl	++	+	+
d-アルギニン HCl	++	++	+++
dl-メチオニン	+	++	+++
<i>l</i> -リジン-2 HCl	—	—	+++
<i>l</i> -トリプトファン	—	++	±
<i>l</i> -アスパラギン酸	+	+	+
d-グルタミン酸	—	±	±
<i>l</i> -プロリン	—	—	±

ン2HCl, *l*-トリプトファン, d-グルタミン酸, *l*-プロリン。

重要なもの *l*- α -アラニン, *l*-チロシン, dl-メチオニン, *l*-アスパラギン酸。

3. C-No.56 株

必須なもの d-グルタミン酸, *l*-プロリン, *l*-リジン, *l*-チスチン, dl-バリン, *l*-ロイチン,

重要なもの *l*-ヒスチジン, *l*-アスパラギン酸, という結果になる。

次に上の成績と照し合せて, C培地のアミノ酸組成の単純化を工夫してみた。

T.H. 株 培地Bの組成からバリン, チロシンを除き, ヒスチジンを0.3gにロイチンを0.5gトリプトファンを0.05g加えると發育はきわめてよくなり, 培地Bでは48時間培養の菌體N量は0.15mg/10ccであつたものが, 改變により3.06mg/10ccと著しく増加した。この中からどの1種を除いても發育はかなり低下し, グルタミン酸, チスチン, プロリンの場合はほとんど發育が起らなかつた。アスパラギン酸は同量のアスパラギンと代えてもほとんど發育に變りがない。

l-チスチンを*l*-チステイン-HCl に變えても大して發育は落ちないが, チオグリコール酸ソ

ーダにすると發育量は70%くらい減少した。

唐B株 培地Bからバリンを除き, リジン0.1g, トリプトファン 0.05g, グリシン 0.5gを加え, β -アラニンをパントテン酸に變えても發育はきわめてわづかで, 培地Cよりはかえつてわるく, 著者が用いた15種のアミノ酸の大部分が何らかの意味で發育に役立つようであつた。培地より抜いて變りのなかつたのはバリン, ロイチン, イソロイチン, アルギニン, ヒスチジン中1種のみを抜いた場合で, 2種を同時に抜くといずれの場合にも相當發育の損失が認められた。

C-No.56株 唐R株とはほとんど同じ傾向で, β -アラニンの代りにパントテン酸を用いても, 培地Cからぬけるものはグリシン, アラニン(α), イソロイチン, チロシン, アルギニン, メチオニン, トリプトファンの中でいずれか1種だけであつた。

第7表 炭素源と發育度

炭素源	唐 R	56	20
ブドウ糖	0.65	0.57	0.05
しよ糖	0.52	0.68	
マルトース	0.72	0.63	0.05
グリセリン	0.43	0.55	0.02
乳酸ソーダ	0.53	0.61	0.04

數字は培地 10cc 當りの菌體N量を mg で示す

e) 各菌株の炭素源について

ジフテリア菌についてはすでにかかなり古くから炭素源と毒素産生の關係が問題にされマルトースが最適であることが知られている, 著者は著者の試験した菌株について發育の面からどれが役に立つかを調べてみた。

基本培地としては培地Cの β -アラニンをパントテン酸(2r/cc)に代え, 酵母エキスを1000倍に加えたものから乳酸ソーダを除いたものを用いた。炭素源として用いたものは, ブドウ糖, しよ糖, マルトース, グリセリン, 乳酸ソーダで, 濃度はいずれも 1.0%を用いてある。實驗の成績は第7表に示してある。表に示されたように5種の炭素源の効果にはそれほど大したちがいがなく, ブドウ糖, マルトースがわずかに

よいようにもみえるが、はつきりした差かどうかは明かでない。

f) 合成培地における各菌株の安定性

T.H. 株を除く 5 株の中唐 R 及び 56-株は培地 C の β -アラニン をパントテン酸に置きかえたものに 1 代は中等度に増殖できるが、他の 3 株はいずれも初代の増殖もきわめてよわく、又 5 株とも 2 代目に継代できない。唐 R 及び 56-株は C 改変培地に酵母エキスを 500 倍に加えると 12 代まで完全に継代ができた。しかし他の 3 株はすべて 3 代目から發育がわるくなり、5 代目ではほとんどはえなくなつた。

これに對して T.H. 株は前にのべた B 改変培地に發育を損することなく 10 代継代ができた。唐 R 及び 56-株の合成培地 10 代継代菌を染色してみると、レフレル培地継代株に比べるとやや不明瞭になつてゐるが、血清ブイオン継代株よりはむしろはつきり残つてゐることが確められた。

III. 考 察

a) 類ジフテリア菌の發育素について

ジフテリア菌の必要な發育素群としては、ニコチン酸、 β -アラニン⁶⁾、ピメリン酸⁷⁾、パントテン酸⁸⁾、オレイン酸⁹⁾、ポリビニルアルコール¹⁰⁾などが報告され、大部分は完全に性狀の明かな培地に継代できるようである (*Corynebacterium diphtheriae* factor-Chattaway¹¹⁾ についてはまだはつきりした性狀はわかつていない)。このうちニコチン酸、 β -アラニンはほとんどすべての株に必須であるが、ピメリン酸その他は菌株によつてかなり要求度にちがひがあるようである。私が調べた中で偽ジフテリア菌は 3 株の中 1 株だけが完全合成培地 (ニコチン酸、 β -アラニン、又はパントテン酸、ピメリン酸) にある程度の發育を示すが、他の 2 株はほとんど増殖せず、3 株とも継代培養は不可能であつた。乾燥症菌についてもほとんど同様で 1 株だけが完全合成培地にある程度發育した。これらの株を継代するには臓器又は酵母浸出液の微量を添加することが必要な條件になつてゐる。次にそれぞれの發育素について検討してゐる。

1. ニコチン酸

ニコチン酸がコチコーゼの基體になることはだれも疑いをかける餘地はない。そうすればニコチン酸とニコチン酸アミドの效力をくらべた時、ニコチン酸アミドの力は當然ニコチン酸のそれより強くなくてはならない筈である。たしかにブドウ球菌、シゲラ屬についてはニコチン酸アミドはニコチン酸の 5~10 倍有効であり、パスツレラのあるものではアミドは效力を示すが、酸の方には全く發育促進力がない。

ところが Mueller の研究によるとジフテリア菌ではこの比が全く逆になり酸がアミドの 10 倍の效力を示すという¹²⁾。この傾向の更に極端なものとして Koser & Kasai(1950)¹³⁾、その他の研究によつて *Leuconostoc mesenteroides* のあるものは、アミドに對して全く反應を示さず、酸のみが發育促進力を示す點でパスツレラと全く逆の状態にあることがわかつた。私がしらべた 5 株の中 3 株は完全合成培地にほとんどはえないのでよくわからないが、他の 2 株ではニコチン酸が 10^{-5} M、アミドが 10^{-3} M で明確な效果を示すから、ニコチン酸の效力はニコチン酸アミドのその約 100 倍である。すなわち類ジフテリア菌のアミド利用能力の減少はジフテリア菌よりも一そう著明である。培地 C に唐 R 株を培養した濾液はインフルエンザ菌 (教室保存株) の發育を支持できることからみて、ニコチン酸もアミドもコチマーゼになることは確實であろうが、ニコチン酸の方が利用されやすい理由はよくわかつていない。

2. パントテン酸

Mueller(1937) ははじめてジフテリア菌の發育素として β -アラニンを發表したが、Evans, Handley and Happold (1939) は Mueller's essential によく發育できない Gravis 型の 1 株が β -アラニンをパントテン酸に変えることによつてよく増殖させることができた。すなわちジフテリア菌の大部分は β -アラニン丈が供給されればこれにブチロラクトンを附加してパントテン酸をつくることが出来るが、他の株はこの

化成能が缺けていると見られる。著者のしらべた株の中唐R, C-No.56 兩株はパントテン酸の構成成分の單獨添加ではいずれの部分もきわめて作用がよわく、兩者を一しよにあたえたと効果が現われ、パントテン酸自身の場合がもつとも効力が強い。すなわち類ジフテリア菌は一般にジフテリア菌よりもパントテン酸合成能が衰えているとみてよいであろう。

3. ビメリン酸

唐 R, C-No.56 兩株ともビメリン酸を加えなくても發育にはそれほど大きな差を示さなかつた。もともとジフテリア菌でもニコチン酸、 β -アラニンはほとんどすべての株が必要とするが、ビメリン酸についてはまちまちで、一部には必要としない株もあるようである。Du Vigneaud et al (1942)¹⁴⁾ がジフテリア菌に對するビメリン酸の發育促進作用はビオチンによつて完全におきかえられることを報告していることからして、ビメリン酸はビオチンの前驅體と考えられる。私はこの實驗では不幸にもビオチンを持合せなかつたため實驗の機會がなかつたが、著者の實驗した類ジフテリア菌がビオチンを發育素として必要とする可能性は少くない。もしそうだとすればビメリン酸が類ジフテリア菌の發育を促進しないことは、類ジフテリア菌ではビメリン酸 $\rightarrow$ ビオチン の化成能が缺落していると考えてよいことになる。

4. その他の發育素

類ジフテリア菌の發育がジフテリア菌のそれに比べてはるかに低いことは、ニコチン酸、パントテン酸の外に發育促進物質のあることを示している。B₁, B₂, B₆, 葉酸, パラアミノ安息香酸, コリン, メソイノシットの7種の發育素は全く効果を示さなかつたが、組織浸液は相當強い發育促進力を持つている。この促進作用の原因はかんたんには分析できないが、前項にのべたようにビメリン酸に對する關係から考えて、ビオチンが發育素として要求される可能性が多く、組織浸液はビオチン供給源となつているとみればもつとも説明しやすいように思う。いずれにしてもビオチンがないことは問題解決

のカギを固くしているともいえよう。

b) アミノ酸の必要度

ジフテリア菌のアミノ酸必要度についてはすでに Mueller & Kapnik(1935)¹⁵⁾¹⁶⁾ の研究があるが、アミノ酸の必要度は株によつてやゝ異なるようである。

Mueller & Kapnik (1935) の成績と著者の成績を比較すると第8表のようになる。ジフテリア菌の3株はかなり共通した成績を示し、グルタミン酸, チスチン, バリン, トリプトファン, ヒスチジンは2株の發育に必要な¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。

これに比べると唐R, C-No.56 はともに8~10種のアミノ酸が必須または重要で、かなりアミノ酸要求度もきびしいように思われる。他の3株は完全合成培地でほとんどではえないので検査しなかつた。

以上の成績から見て、類ジフテリア菌の栄養要求度はジフテリア菌の水準よりもかなりきびしいように思われる。

第8表 各菌株のアミノ酸要求度

*H.Y.	*P.W.8	T.H.	唐 R
グリシン	ロイチン	ロイチン	グリミン
バリン	バリン	チスチン	チスチン
メチオニン	メチオニン	トリプトファン	リジン
トリプトファン	チスチン	グルタミン酸	トリプトファン
チスチン	グルタミン酸	プロリン	グルタミン酸
ヒスチジン		ヒスチジン	プロリン
グルタミン酸		アスパラギン酸	アラニン
			チロシン
			メチオニン
			アスパラギン酸

* Mueller の成績

はじめにのべたように概念的には非病原性から病原性にうつるにつれて、寄生性の高まりと平行して栄養要求もきびしくなると考えられているが、著者の試験した類ジフテリア菌はいずれもジフテリア菌よりも高い要求度を示した。しかしこれは前にふれたように、寄生性を得た菌が更に進化のすじみちで病原性を失つて共生性を得たものとみればよく説明ができればよい。

乾燥症菌と偽ジフテリア菌の間に栄養要求の差は見られなかった。

IV. 結 び

著者は3株の偽ジフテリア菌, 2株の乾燥症菌の栄養をジフテリア菌(Toronto-Harvard 株)と對比しつつ検討した。類ジフテリア菌は總てジフテリア菌と比べて高い要求度を示した。

類ジフテリア菌の發育を充分に支持するような完全な合成培地はこの實驗からは得られなかった。

終りに本研究の御指導と御校閲を賜つた恩師八田貞義教授に深甚の敬意を表しますなお實驗に御援助をいただいた桑原博士にも感謝します。

文 献

- (1) Mueller, J.H., & Miller, P.A.: J. Immunol., **40**, 21-32, 1940.
- (2) Mueller, J.H., & Subbarow, Y.: J. Bact., **34**, 153-162, 1937.
- (3) 秦, 横井: 大坂醫雜, **41**, 1584-1592, 1942.
- (4) Pappinheimer, A.M. Jr., Mueller, J.H., & Cohen, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **36**, 795-796, 1937.
- (5) Evans, W.C., Happold, F.C., & Handley, W.R.C.: Brit. J. Exp. Path., **20**, 41-48, 1939.
- (6) Mueller, J.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **36**, 706-708, 1937.
- (7) Mueller, J.H.: J. Bact., **34**, 163-178, 1937.
- (8) Evans, W.C., Handley, W.R.C., & Happold, F.C.: Brit. J. Exp. Path., **20**, 396-408, 1939.
- (9) Cohen, S., Snyder, J.C., & Mueller, J.H.: J. Bact., **41**, 581-589, 1941.
- (10) Cohen, S.: J. Bact., **58**, 783-790, 1949.
- (11) Chattaway, F.W., Happold, F.C., & Sandford, S.: Biochem. J., **37**, 298-302, 1943.
- (12) Koser, S.A., Berkman, S., & Dorfman, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **47**, 504-507, 1941.
- (13) Koser, S.A., & Kasai, G.I.: J. inf. Dis., **86**, 95-102, 1950.
- (14) du Vigneaud, V., Dittmer, K., Hague, E., & Long, B.: Science, **96**, 186-187, 1942.
- (15) Mueller, J.H., & Kapnick, I.: J. Bact., **30**, 525-534, 1935.
- (16) Muetter, J.H.: J. Bact., **29**, 515-530, 1935.
- (17) 桑原: 日新醫學, **35**(11-12), 506-509, 1948.
- (18) 米田: 日細雜, **5**(6), 401-405, 1950.
- (19) Mueller, J.H.: Bact. Rev., **4**, 97-134, 1940.