 原 著

炭疽菌の栄養についての研究 (1)

サイアミンの発育促進作用について

国立衛生試験所細菌部 (部長 八田貞義博士指導)

日本歯科大学口腔外科教室 (主任: 宇賀春雄教授)

川 島 光 五 郎

Mitsugoro Kawashima

(この研究の概要は第 26 回日本細菌学会総会に公表した)。

ま え が き

はじめ Knight (1935)¹⁾ は、彼がパン酵母から抽出した „Staphylococcus Factor” が、炭疽菌の発育にも必要であるとのべ、更に 1937 年にはこの „Staphylococcus Factor” の本態がニコチン酸とサイアミンであることを実証している²⁾。しかし Landy (1939)³⁾ は、炭疽菌の発育有効因子はこの種の物質以外のものと考えており、Gladstone (1934)⁴⁾ は塩類、糖、アミノ酸からなる培地に発育素なしに炭疽菌を培養し、併せてアミノ酸相互の拮抗を報告している。一方 Brewen 等 (1946)⁵⁾ は、半合成及び合成培地でサイアミン、グルタミン及び酵母核酸が発育に必要であるとして、Landy, Gladstone の考え方に反対しており、岸田等 (1952) は大桿菌に対するサイアミンの態度を研究する一環として炭疽菌に対するサイアミンの発育促進作用を認めている。

著者は半合成培地について 7 株の炭疽菌を用いてサイアミン及びその構成要素の発育促進作用を検討したので、次にその実験のあらましを報告する。

I 実験の方法

a. 実験に使った菌株：実験に使ったのは 52 系、盛岡、川口、堀、東大、苗 1、苗 2 の 7 株の炭疽菌で、昭和 26 年 2 月順天堂大学医学部細菌学室小山恒太郎氏からゆずりうけ、以後隔週一度寒天斜面に継代保存していたものである。このうち苗 1 株と苗 2 株は弱毒菌株である。

b. 基本培地：基本培地としては次の組成のものをを用いた。

K_2HPO_4 2.61 g, KH_2PO_4 2.04 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.049 g, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.011 g, カゼインアミノ酸 5.0 g, L-グルタミン 0.149 g, ブドウ糖 (無水) 3.60 g, 再蒸留水 1,000 cc, pH 7.0 $\pm$ 0.2

この組成は Brewen et al (1946) の報告にある培地組成からサイアミン、酵母核酸及び重炭酸ソーダをぬいたものに相当する。カゼインアミノ酸は日之出製薬の製品を用いた。

c. 試験に用いた化合物：発育促進能力を試験した化合物は次の 10 種である。(カッコ内の数字は培地への添加量を γ /cc で表わしたものである。)

ニコチン酸 (5.0), ニコチン酸アミド (2.0), リボフラビン (10.0), ビリドキシン (10.0), パントテン酸 (1.0), 葉酸 (0.5), d-ビオチン (0.01), ピメリン酸 (1.0), コリン (20.0), サイアミン (5.0)。

別にサイアミンの構成要素であるピリミジン及びサイアゾールの誘導体各 3 種ずつを用いた。構造は第 3 表に示す通りである。この 6 種の化合物は武田研究所 (松川泰三氏) の合成になるものである。又発育素の実験と同時に酵母核酸の発育に及ぼす作用も併せて検討した。

d. 培養試験の方法：各化合物は単独に滅菌後無菌的に培地に加えるか、又は加えた後で 100°C, 30 分, 3 回滅菌してから菌を移植した。各菌株は寒天斜面に 35°C~37°C, 72 時間培養後滅菌生理食塩液で菌液をつくり、47°C に 2 時間放置してできるだけ胞子をよりわけ、3 cc の培地に大略 10⁴ 菌の胞子を移植した。菌をうえた試験管は 35°C~37°C, 7 日間培養し、毎日肉眼的に“にぎり”を観察し、一、土、+~卅の記号で発育度を標示した。なお苗 2、堀の各株について

は平板培養によつて菌数計算を行つたこともある。

II 実験の成績

a. 各發育素及酵母核酸の發育促進作用：第一の実験として炭疽菌の發育促進物質をきめるため、I.c. にあげた化合物のうちピリミジン及びサイアゾール誘導体6種を除く10種の發育素及び酵母核酸(100 r/cc)を加えた培地を標準としてこれから1種ずつ化合物を除いた培地をつくり發育の変化を観察した。各菌株とも培養15時間位で菌塊又は“にごり”が明らかとなり、3～4日頃最大發育に達するようである。苗1，東大両株は他の株に比して發育がよわく、苗1，苗2及び堀株がやゝ均一な“にごり”を示した。他は顆粒状又は糸くず様の菌塊をつくつて發育した。川口株をのぞく各菌株はサイアミンを除いた培地では發育速度がかなりおくれると同時に發育量がきわめて低下し、酵母核酸は同じく川口株をのぞく各菌株の最終發育量にある程度関係するようである。川口株に対しては試験に使つたいずれの物質も發育に関係がない。以上の成績は第1表に示してある。しかし基本培地にサイアミンと酵母核酸だけを加えるよりは更にピリドキシンと葉酸を加えた方がやゝ發育が早いように思われたが、実験的にはつきり証拠づけることはできなかった。

第1表 炭疽菌に対する各種發育素の發育促進作用

菌株名	培地 培養日数	標準培地	標準培地 サイアミン	酵母核酸	ピリドキシン	葉酸	ピリドキシン + 葉酸	基本培地
52系	1	+	±	+	+	+	+	±
	2	++	±	++	++	++	++	+
	4	+++	+	++	+++	+++	++~+++	+
盛岡	1	+	±	+	+	+	+	±
	2	++	+	++	++	++	++	±
	4	+++	+	++	+++	+++	+++	+
川口	1	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+
	4	++	++	++	++	++	++	++
堀	1	+	±	+	+	+	+	±
	2	++	+	+	++	++	++	±
	4	+++	+	++	+++	+++	++~+++	+

東大	1	+	±	+	+	+	±	—
	2	+	±	+	+	+	+	±
	4	++	±	++	++	++	+	±
苗1	1	+	±	+	+	+	+	±
	2	+	±	+	+	+	+	±
	4	++	±	+	++	++	+	±
苗2	1	+	±	+	+	+	+	—
	2	++	±	++	++	++	++	±
	4	+++	±	++	+++	+++	+++	±

(註) 標準培地は基本培地に發育素の11種を含むもの

b. 發育促進に必要なサイアミンの添加量：次にサイアミンの最小有効量をきめるため、ピリドキシン、葉酸及び酵母核酸を含む基本培地にサイアミンを0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 r/ccの割合に加えた培地に川口株を除く各株を培養し比較観察した。第2表には培養96時間の發育度の一部が表

第2表 サイアミンの添加量と發育度

菌株名	培地 培養日数	基本培地 + ピリドキシン + 葉酸	+ サイアミン (r/cc)					
			0.020	0.05	0.1	0.2	0.5	5.0
52系	1	±	±	±	+	+	+	+
	2	±	±	+	+	+	++	++
	4	+	+	++	++	+++	+++	+++
盛岡	1	±	±	±	±	+	+	+
	2	+	±	+	+	++	++	++
	4	+	+	++	++	+++	+++	+++
苗1	1	±	±	±	±	±	+	+
	2	±	±	±	+	+	+	+
	4	±	±	±	+	++	++	++

示してある。苗1株がやゝはえにくく、0.2 r/ccで發育の増加が明かになつている他は、0.05 r/ccで促進作用が現われ、0.2～0.5 r/ccで最大になつている。サイアミン 0.5 r/cc, リボフラビン 5.0 r/cc, ピリドキシン 5.0 r/cc, 葉酸 0.1 r/cc, 酵母核酸 50 r/ccを含む培地と基本培地の發育度を培養96時間の生菌数

で比べてみると*, 基本培地では堀株 $1.7 \sim 2.3 \times 10^7$ /cc, 苗2株 $0.9 \sim 1.5 \times 10^7$ /cc, 川口株 $1.3 \sim 2.0 \times 10^6$ /cc, 苗1株 $2.5 \sim 4.6 \times 10^6$ /cc, ビタミン加培地では堀株 $8.2 \sim 11.9 \times 10^6$ /cc, 苗2株 $5.5 \sim 7.9 \times 10^6$ /cc, 川口株 $1.6 \sim 2.3 \times 10^6$ /cc, 苗1株 $0.8 \sim 1.3 \times 10^6$ /cc, で, 川口株の他は著しく菌量が増している。同様の促進効果は上記の合成培地に2.0%に寒天を加えて固形にした場合にも明かに観察される。

c. サイアミンの構成成分と発育促進作用: サイアミンの炭疽菌に対する発育促進作用は上の実験から確

第3表 ピリミジン及びチアゾール誘導体のサイアミン代用効果

	52系			盛岡			苗1		
	1	2	4	1	2	4	1	2	4
サイアミン	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<chem>Nc1ncnc2c1ncn2</chem>	±	+	+	±	+	+	±	±	±
<chem>CN1C=NC(=N1)C(=O)N</chem>	±	+	+	±	+	+	±	±	±
<chem>CN1C=NC(=N1)C(=O)N</chem>	±	±	+	±	±	+	±	±	±
<chem>CN1C=NC(=N1)C(=O)N</chem>	±	±	+	±	±	+	±	±	±
<chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)N</chem>	±	±	+	±	±	+	±	±	±
<chem>CN1C=NC(=N1)C(=O)N</chem>	±	±	+	±	±	+	±	±	±
<chem>CN1C=NC(=N1)C(=O)N</chem>	±	±	+	±	±	+	±	±	±
原培地	±	±	±	±	±	±	±	±	±

(註) 原培地は第1表の基本培地に葉酸 0.5 r/cc, ピリドキシン 10 r/cc を含むもの, サイアミンの培地添加量は 0.5 r/cc, 他の化合物は 20 r/cc に添加した。発育度は培養4日のものが表示してある。

実であるので, サイアミンの化学構造と発育との関係についていくつかの実験を試みた。

1. ピリミジン及びサイアゾール誘導体の単独作用: まず6種の誘導体を単独に, b. 実験と同じ基本培地に加え, その発育をサイアミン加培地と比較した。第3表から明かなようにピリミジン誘導体の中では2-メチル-4-アミノ-5-アミノメチル-ピリミジンが 5.0 r/cc 以上でかなり発育促進作用を示したが, サイアゾール誘導体は4-メチル-5-ヒドロキシエチル-サイアゾールが 20 r/cc でわずかに発育の増加を示したに止まり, ピリミジン誘導体よりも発育促進作用がはるかによわいことがわかった。

2. 両者の併用効果: ピリミジン誘導体とサイアゾール誘導体各1種を同時添加した際の効果についての試験の一部は第4表に示してある。2-アミノ-ピリミ

第4表 ピリミジン及びサイアゾールを併用した時の発育効果

試料	濃度 (r/cc)	2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyr.						
		0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0
4-Methyl-5-hydroxyethyl-thiazole	0.01				±	±	±	+
	0.02				±	±	+	+
	0.05	±	±	±	±	±	+	+
	0.1	±	±	±	±	+	+	+
	0.2	±	±	±	+	+	+	+
	0.5	±	±	±	+	+	+	+
	1.0	±	±	±	+	+	+	+

使用菌株: 盛岡株

培養: 72 時間

ジン, 2-メチル-4-アミノ-5-チアノ-ピリミジンと2-アミノ-4-メチル-5-エチルカルギシル-サイアゾール, 2-アミノ-4-アミノフェニルサイアゾールの結合は効果がないので省略した。最も効果の大きいのは2-メチル-4-アミノ-5-アミノメチルピリミジンと4-メチル-5-ヒドロキシエチル-サイアゾールの結合で両者 0.5 r/cc ずつの量とサイアミン 0.5 r/cc と大差ない効力を示す。サイアゾール核を他の2種に変えると発育に必要な量が増加し最大発育が減少するが, ピリミジン誘導体を単独に用いるよりは発育促進作用が大きい。

III 考 え 方

まえがきでのべたように、炭疽菌の発育素については、(1) サイアミンがその主要なものであるという見方 (Knight, Brewer et al), (2) 既知の発育素は効果がなく、別の発育素が必要であるという見方 (Landy), (3) 特殊の発育素を要求しないという見方 (Gladstone) の3種の実験結果が示されている。これは菌株のちがいによるのであろうが、炭疽菌がアミノ酸、糖、塩類を含む培地にある程度増殖できること、炭疽菌の多くの株が顆粒状、糸くず状発育を示して増殖度の精確な比較がかなり難かしいことなどにもよるものと思われる。著者らの実験では株の中、苗1株は基本培地における増殖がきわめてよく川口株はかなり良好であつたが、他の株は大体4日培養で 10^7 /cc 程度で、ブイヨンに比べると $1/100$ に近い発育量であつた。これに発育素群を加えると発育は大体50倍以上に増加したが、川口株だけは全く反応を示さなかつた。この促進作用はほとんどサイアミンによるものであつたが、その他ピリドキシン、葉酸、及び酵母核酸はあつた方がよいように思われた (上にのべた成績からもわかるようにこの実験の生菌数計算は、はなはだ動きが多いので細かい発育の差を問題にすることができなかった)。

Brewer 等は、サイアミンの有効濃度を 0.02τ /cc としているがこのオーダーは大体著者らの実験結果と一致している。

サイアミンの構造と発育促進作用の関係については、黄色ブドウ球菌についてくわしい研究がある⁶⁾⁷⁾。それによると (1) サイアミンのピリミジン成分とサイアゾール成分を別に同時にあたえてもサイアミンと同じ作用があり、(2) ピリミジン核もサイアゾール核も共に必須であり、(3) ピリミジン核では2-メチル基、4又は6-アミノ基、5-メチル基 (ヒドロオキシメチル、アミノメチルでもよい) が必要、(4) サイアゾール核では4-メチル基、5- β -ヒドロオキシエチル基、2-H が必要である。Koser & Wright (1942)⁸⁾ によると、ブルセラに対するサイアミンの作用はもつぱらピリミジン核によるもので、サイアゾール核は不要だという。著者の使った化合物はごく少数であるが、2-メチル-4-アミノ-5-アミノメチル-ピリミジンがサイア

ミンの作用の大部分を代表し、2-アミノ-ピリミジン、2-メチル-4-アミノ-5チアン-ピリミジンはいずれも無力であつた。この点からみてピリミジン核の重要基は大体ブドウ球菌の場合と同様と考えられる。サイアゾール核の重要性は比較的少く、ブドウ球菌ほど附属基に対する撰択性がない点が注目された。なお黄色ブドウ球菌の場合核の結合が切れていてもいなくても発育に必要なモル濃度は大体同じであるが、炭疽菌の場合は、両核を別々に併用するとサイアミン単独を用いた時よりもかなり大量が発育に必要であつた。

サイアミン加カゼインアミノ酸培地における炭疽菌の最終増殖量は普通寒天と大して変りがないが、発育速度はかなりおそく更に初期発育を促進する物質の検討が必要であると思われた。

結 び

著者らは7株の炭疽菌の発育素を半合成培地について検討し次の結論を得た。

(1) 7株中6株にはサイアミンが著しい発育促進作用を示した。サイアミンの有効濃度は 0.05τ /cc で、最適量は $0.2\sim 0.5\tau$ /cc である。この成績は Brewer et al (1946) の知見を再確認したものと見える。

(2) サイアミンの炭疽菌に対する発育促進作用はその大部分をピリミジン核に負うもので、サイアゾール核の作用は比較的よい。ピリミジン及びサイアゾール核の附属基についていくらかの検討を試みた。

文 献

- 1) Knight, B.C.J.G.: Brit. J. Exp. Path., **16**, 315-326 (1935)
- 2) Knight, B.C.J.G.: Biochem. J., **31**, 731-737 (1937)
- 3) Landy, M.: J. Bact., **37**, 232-233 (1939)
- 4) Gladstone, G.P.: Brit. J. Exp. Path., **20**, 189-200 (1939)
- 5) Brewer, C.R., McCullough, W.G., Mills, R.C., Roessler, W.G., Herbst, E.J., Howe, A.F.: Arch. Biochem., **10**, 65-75 (1946)
- 6) Knight, B.C.J.G.: Biochem. J., **31**, 966-973 (1937)
- 7) Knight, B.C.J.G., & McIwain, H.: Biochem. J., **32**, 1241-1251 (1938)
- 8) Koser, S.A., & Wright, M.H.: J. Inf. Dis., **71**, 86-88 (1942)