百日咳菌の合成培地に関する研究 (3)

新 井 俊 一

前橋医科大学微生物学教室 (指導 山本郁夫教授)

[受付: 12 月 15 日, 1951 年]

まえがき

既に発表した二つの報告¹⁾²⁾に於て私は、百日咳菌の合成培地のアミノ酸の質的並に量的検討を行つて来た。即ち第1報では、先づ必須アミノ酸として、塩酸チス테인、グルタミン酸、アスパラギン酸を、之に極めて近接するアミノ酸として、アスパラギン、塩酸アルギニンを選定した。第2報では、此の塩酸チス테인を種々な角度から観察しその重要性を確認すると共に、このアミノ酸と他のアミノ酸との間の協同又は拮抗的な関係の有無、及びその程度について論じ、更にチス테인が、グルタミン酸及びグリシンの存在に於て、著しく発育促進的な結果をもたらすことを知つた、グルタミン酸、チス테인、グリシンはグルタチオンの構成要素であり、グルタチオンが、一般細菌の呼吸酵素系に重大な役割を演じていることは、近時次第に明になつて来て居り、又本菌の液体培養の際の有効性についても既に報告されている。今回の報告では、グルタミン酸、チス테인、グリシン混合物と、他のアミノ酸との関係を追求すると共に、グルタミン酸及びアスパラギン酸に対し、他のアミノ酸の立場をも検討し、以下の如き実験を行つた。

実験方法

I. 基礎培地

第1報の通り。

II. アミノ酸

イ、使用アミノ酸の種類及び個々の用量は全く第1報と同様である。

ロ、使用アミノ酸の組合せ

実験 1. 対照の培地はグルタチオンを構成する三つのアミノ酸、即ちグルタミン酸、チス테인、グリシンを混合し、之に他の6種のアミノ酸を各一個宛添加した6種類の培地を使用した。

実験 2. この実験では、グルタミン酸と他のアミノ酸との間に拮抗又は協同作用があるかどうかを見る目的であり、従つて対照はグルタミン酸単独にすべきである

が、之では発育は認められず、阻止的な結果を鑑別することが不可能となるおそれのあるため、チス테인、グルタミン酸を対照とした。之はチス테인と他のアミノ酸との関係が既に検討してあるので、やゝ間接的な結果となる恐れはあるが、結局グルタミン酸と他のアミノ酸との関係を類推することが出来るであろうという仮定に基く。従つて使用培地はアスパラギン酸からロイシン迄、各一種宛を加えた7種類となる。

実験 3. アスパラギン酸と、他のアミノ酸との関係を見るための実験であるが、対照とすべきアスパラギン酸単独では、やはり発育が認められないため、実験2と同様な意味から、チス테인を加えたものを対照とした。以下添加したアミノ酸は残りの7種類の一つ宛である。[培地は、pH 7.2-7.4 中試験管に5cc宛分注、100°C20分3回滅菌]

III. 菌株及び菌量

菌株は教室で分離した佐治株の Bordet et Gengou 培地11代継代菌及び渡辺株の13代及び14代菌で、共に第I相を保持している。

菌量は、第1報と同様滅菌生理的食塩水1cc2ミリグラムの菌液の1白金耳宛を接種した。

IV. 培養方法

第1報に準ずる。

実験成績

実験 1. グルタミン酸、チス테인、グリシンの混合物と、他のアミノ酸との関係は第1表に見られる通りである。即ち他のアミノ酸を一個宛添加した培地では、対照の培地に比して總体的に発育が劣つている様である。対照の培地では既に報告しているように、かなり発

ARAI Shun-ichi: Studies on the synthetic media of *Haemophilus pertussis*. (3)
The Microbiological Department of the Maebashi Medical College. — Jap. J. of Bact., 7 (6): 557-560 1952.

第1表 チステイン・グルタミン酸・グリシン
混合物と他のアミノ酸との協同又は拮
抗作用

培養日数 添加アミノ酸	I	II	III	IV	V	VI	VII
アスパラギン酸	—	—	±	+	++	+++	+++
アスパラギン	—	—	±	+	++	+++	+++
HCl-アルギニン	—	—	±	+	++	+++	+++
チロジン	—	—	±	+	++	++	++
HCl-ヒスチジン	—	—	±	+	+	+	+
ロイシン	—	±	+	++	+++	+++	+++
対照 (3種のみ)	—	±	+	++	+++	+++	+++

註 一、+・++・+++は第一報の規準に據る
(以下各表共通)

育が良く、全部のアミノ酸を含むものより僅に劣る程度であるが²⁾、添加培地では、試験管内の炭末の凝固性及び白濁度、又 B.G. 培地移植後の集落数等に明瞭な差がある。此の差はヒスチジンの添加に於て著明で、発育開始が既に 24 時間以上遅れる上に、培養日数が進んでも、発育程度があまり増加して行かない。殊に培養日数の後半(第 V 日頃より後)では、対照に比し格段の差が出来てしまい、接種菌は増殖すると言うよりむしろ保存されているに過ぎない様で、確実に阻止性が認められる。次にチロジンも、発育阻止的に働くことは表の通りであるが、此の作用はヒスチジンより幾分か劣る。(+)程度) 此の場合には、培養第 VI 日目位から阻止作用は著明となり、以後第 VII~X 日に至つても菌の発育状態は依然として++程度で、対照に比してかなり発育状態は悪い。

アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニンは、夫々添加すると菌の発育はやゝ不良となる。即ち之等の培地では、第 VI 日の発育状態が対照の第 V 日目のそれに相

第2表 チステイン加グルタミン酸と他のアミ
ノ酸との協同又は拮抗作用

培養日数 添加アミノ酸	I	II	III	IV	V	VI	VII
アスパラギン酸	—	—	±	+	++	+++	+++
アスパラギン	—	—	±	+	++	+++	+++
HCl-アルギニン	—	—	±	+	++	+++	+++
グリシン	—	±	+	++	+++	+++	+++
チロジン	—	—	—	—	±	+	+
HCl-ヒスチジン	—	—	—	±	+	++	++
ロイシン	—	—	—	—	±	+	+
(グルタミン酸 HCl-チステイ ンのみ)	—	—	±	+	++	+++	+++
対照	—	—	±	+	++	+++	+++

当するようで対照培地では猶増殖を継続するため、その差が最後迄見られる。之等三者の間には、厳密には個々の実験中、幾分かの差を生ずることは認められたが、数回の実験を総合すると大体に於て同等と考えられる。少くともヒスチジンとチロジンとの差異、又はチロジンと之等との差程著しくは無かつた。ロイシンは表の如く対照と全く同様な発育を見せ、この限りでは無関係のようである。

次に実験 2 では、添加して最も発育のよいのはグリシンで、之は対照のグルタミン酸とチステインとの混合の場合より、遙かに好成績を示している。即ち対照では第 2 報に述べた如く、発育は第 III 日頃より始り、その程度は徐々に増加して(++)程度の最高発育を示すのであるが、グリシン添加では、他の発育のよい、即ちアミノ酸 9 種又は 5 種を含む培地にみられる如く、第 II 日頃に始り、逐日的に著しい増加を示して(+++)程度に達する。以下アスパラギン酸及びアスパラギンがやゝ劣り乍ら之に続き、アルギニンは対照より幾分か良い感を與えている。之等のうち、グリシン、アスパラギン酸及びアスパラギンは、明かに発育促進的と考えてよいが、アルギニ

第3表 チステイン加アスパラギン酸と他のア
ミノ酸との協同又は拮抗作用

培養日数 添加アミノ酸	I	II	III	IV	V	VI	VII
グルタミン酸	—	—	±	+	++	+++	+++
アスパラギン	—	—	±	+	++	+++	+++
HCl-アルギニン	—	—	±	±	+	++	++
グリシン	—	—	⊕	⊕	±	±	±
チロジン	—	—	⊕	⊕	⊕	±	±
HCl-ヒスチジン	—	—	±	+	+	+	+
ロイシン	—	—	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
(HCl-チステイ ンアスパラギ ン酸のみ)	—	—	±	+	+	+	+
対照	—	—	±	+	+	+	+

註 1. ○印は發育不揃を示す

2. +以下は Bordet et Gengou 培地上の
コロニーの多寡により + > ++ > +++ の順
で示す

ンは次のヒスチジンと同様作用の点から言えば、対照に比し(±)と見た方がよい様である。ヒスチジンは表によれば、対照より幾分か発育は限止された形であるが、発育阻止という明確な線を引くことは危険であらう。明かに阻止的であるのは、チロジンとロイシンで、之等は発育開始が、約 48 時間遅れる上に、発育の程度も僅少であり対照より劣ることが認められた。

実験3では、かなりばらばらの結果が出て居る。成績を大きく分けると、グルタミン酸、アスパラギン及びアルギニンは、添加すれば何れも発育促進的な結果をもたらし、ロイシン、チロシン、グリシンは阻止的であり、ヒスチジンがあまり関係ないということになる。最もよいのはグルタミン酸で、培養第VI, VII日では、対照にくらべて著しく勝つて居り、アスパラギン、アルギニンは夫々僅かずつではあるが、グルタミン酸にくらべて劣つた結果を現している。之等は培養第IV~V日では、対照とあまり差が認められない点は、共通した現象であろう。ロイシンは添加すると非常に悪い結果を示し、発育は極めて弱く且つ不揃となり、塩酸チステイン、或はアスパラギンを各単独に使用した結果と殆んど変りのない程度に迄低下してしまう。此の様に著しく悪い影響を興えるアミノ酸は、之れ迄の報告には見られなかつたことであつた。チロジンも之によく似た影響を及ぼし、添加した結果は少くとも菌の増殖とは認め難い。グリシンも之より僅によいという程度であつた。ヒスチジンは添加しても大した影響を興えない様である。

考 察

実験1に於て、我々の注意をひく最も著しいことは、6種類のアミノ酸を夫々一つ宛加えると、対照より却つて発育が弱くなるということである。或る種のアミノ酸が、単独では毒性を有し、そのみの添加では発育阻止的に作用することがあるということは、J. R. Porterの説く所であり、又細菌の増殖が比較的簡単な構造を有する少数のアミノ酸を土台として、酸化、還元作用により一方で増殖分裂に必要なエネルギーを得ると共に、他方では之等のアミノ酸を菌体蛋白にとりこんで行くためには、極めて複雑な生物化学的变化があろうし、従つて他の過程に、或るアミノ酸が之等の化学的結合、分離等を阻止して有害に作用することは、十分考えられる所であろう。しかしこの実験では、使用した6種のアミノ酸が何れも多少ともに上述の如き阻止作用を示していると言えるかどうか、之はそのまゝでは我々にはいさゝか納得し難い点がある。少くとも、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニン等は、従来他の細菌に於ても発育上よい影響を興える場合の多いことが知られて居り、又私の実験でも第1報で示した如く、之等は夫々一つ宛除去すると発育が著しく低下するか、又は全く発育しなくなる結果を示しているし、又チステイン単独に之等を加えても、夫々或る程度有効であつたことも認めている。之等の事実から考えると、此の三つのアミノ酸は大体に於て本菌の発育には有効でこそあれ、阻止的であるとは

考え難い。問題はむしろ対照培地のアミノ酸にあるのではなからうか。即ち細菌の酸化還元系に有効なトリペプチドであるグルタチオンの構成要素としてのグルタミン酸、チステイン、グリシンが、直接此のトリペプチドに合成されるのでないとしても、非常に緊密に関係し合つて一つの平衡状態を保ち、之が他の単独のアミノ酸の混入により、平衡が破られて発育が低下するとも考えられまいか。此の考え方によれば、当然他のアミノ酸は唯一種宛では阻止的に見えてもよいと思われる。発育を促すためには、他のアミノ酸は単独でなくやはり一つの平衡を保つ様に組合せて添加したらよいのではないかも考えられる。然しチロジン又はヒスチジンを添加して、発育が悪くなるのは之とやや異つた意味を有する様に思う。殊にチロジンは、次の二つの実験にも見られる如く、此の報告の全実験を通じて、発育阻止的に作用している。之はチロジンが、それ自身で毒性を示している一つの例示のようにも考えられる。ヒスチジンもやゝ之に似通つた成績を示している。この点についての詳細は次の報告に譲るが、その後の実験で、チロジン及びヒスチジンを夫々量的に増加した所、高濃度では明かに発育を阻止することが認められている。ロイシンは、本実験では優劣何れの影響も認められないが、次の二つの実験では又興味ある問題を呈している。実験2では、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニン及びグリシンが、夫々好結果を示している。此の中グリシンの意味は既に繰返し考察を加えて来た所であるが、他の三つのアミノ酸は従来私の行つて来た除去及び添加の実験結果から、大体に於てそれ自身発育促進的なアミノ酸として考えられる状況にあつたので、此の実験の場合にも、良好な結果が得られるのも当然と考えられよう。之は実験3でグルタミン酸、アスパラギン、アルギニンが有効であつたこととも同様に考えられる点である。こゝで第1の実験に於けるアスパラギン酸、アスパラギン、アルギニンの態度が全く逆の、即ち阻止的であつた点と考え合せると興味がある。此の相違は既に述べた如く、之等のアミノ酸の添加された対照の培地が皆異つて居り、第2, 第3, の実験の対照培地が、それ自身では特別な構成の考えられないアミノ酸同志の組合せであつたに反し、第1の実験では、グルタチオンに相当する構成と言う特殊な組合せであつたためではないだろうか、言い換えるならば、之等のアミノ酸は本来発育上有効なものであり、一般には添加すれば利用され発育促進的な結果を得るが、一定のバランスを持つた特殊な組合せに、新に個々で投入されると有害となると云うことで、従つて之等のアミノ

酸だから有害だつたと云うのではなく、バランスを乱したという点で有害な結果を示したのであろう。チロジン、ヒスチデンは、第2、第3の実験を通じては、上記とは異つたそれ自身の毒性の考えられることは既に述べた。ロイシンも、この二つの実験では本来有害な側に属する様に思われるが、猶おこのものは論議の余地があるように思われる。即ち第2、第3の実験を通じて、最も著しく変つた態度を示すものはロイシンで、これの添加された対照の培地から考えて特にバランスを破つたとも見えず、このもの自身が相反する実益両面の性質を保持したアミノ酸の一つで、條件に應じてどちらの作用をも呈すると仮定すれば、之れ亦興味のある問題と言えよう。

要するにこの三つの実験を通じて、本菌の発育上、有効な側にあるアミノ酸と、有害な側のそれ、この両者を兼ねたアミノ酸、全く無関係なアミノ酸とに分け得られるかどうか、更に追求されるべき問題であらう。

結 論

- 1) グルタミン酸、チス테인、グリシンの共存する

場合、ロイシンは影響なく、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、チロジン、ヒスチデンは、有害な結果をもたらす。

- 2) チス테인、アスパラギン酸の場合には、グルタミン酸、アスパラギン、及びアルギニンは、夫々有効、グリシン、チロジン、ロイシンは有害であり、ヒスチデンは、殆んど影響がみられない。

- 3) チス테인、グルタミン酸では、グリシンが最も有効で、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニンは良く、チロジン、ヒスチデンは、ロイシンは夫々有害である。

終りに、終始御懇篤な御指導を頂いた、恩師山本郁夫教授に深く感謝すると共に、種々適切な御助言を與えられた善養寺講師並に御助力下さった岸、湯浅の両君に心から謝意を表します。(本研究の要旨は昭和26年11月22日の百日咳委員会で発表した。)

文 献

- 1) 新井俊一：日本細菌学雑誌，7巻4号，1952.
- 2) 新井俊一：日本細菌学雑誌，7巻5号，1952.