75. 荒井岩夫：チフス菌の発育素に関する研究（第1報）

ペプトン中のチフス菌発育素に就いて

Iwao Arai : Growth Factor for *B. Typhosus*. I. Growth Factor in Peptone.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo)

チフス菌に対するペプトン中の発育素に就て、草味及び著者¹⁾は前報に於て本因子が分子の比較的小にして鉱酸、アルカリ、或は過酸化水素に対して相当に安定なる物質たることを認め、更にペプトンを塩酸分解したる後エステル化し藪温蒸溜に附したる處、比較的低沸点にて溜出し來る部分に本因子の存在することを予報せり。其後引続き著者は本因子を追求せんとし、エステル化物質の低沸点溜分中より数種の結晶を分離することを得たり。これ等の結晶につき、從來の供試菌株とは別にチフス菌四方株²⁾（以下四方株と略称す）を用ひ発育支持能を試験せる結果、各個の発育効果は実験の都度相当に変動し確實なる成績を得ること能はざりき。ここに於て從來慣用せる実験方法、就中基礎培地の組成³⁾に對し再吟味を要するに至りたり。

Koser, Rettger⁴⁾ (1919), Fildes, Gradston, Knight⁵⁾ (1933), Burrows⁶⁾ (1939), Johnson, Rettger⁷⁾ (1942, 1943), 秋葉, 長林⁸⁾ (1945) 等はチフス菌のある菌株に對しトリプトファンが必須アミノ酸なることを報告せり。但しチフス菌中トリプトファンを必要とせざる菌株、及び最初之を必要とせるも馴致培養により之を必要とせざるに至る菌株の存在することは Van Loghem⁹⁾ (1911), Braun, Cahn-Bronner¹⁰⁾ (1921, 1922), Fildes et al.⁵⁾ (1933), Burrows⁶⁾ (1939), 秋葉, 鷹取 (未発表) 等の既に認め居る處なり。著者は四方株の発育に對し Saunders 合成培地中の各成分の演ずる役割を吟味したる結果、*L*-Tryptophan が主要なる意味を有することを認めたり。依て Saunders 合成培地より *L*-Tryptophan のみを減量せるものを基礎培地となし、ペプトンより得たる種々の分層につき四方株に對する発育効果を試験したる結果、有効なる分層は何れもトリプトファンの特異的呈色反應陽性なる事實を認めたり。

次で活性炭に對する吸着能の差によりペプトンを処理して得たる分層、及び牛乳カゼインのパンクレアチン消化物につき夫々の試料中のトリプトファン含量が四方株に對する発育促進効果に略々比例しある点よりペプトン中の発育因子はトリプトファンなることを推定せり。

Woolley 等¹¹⁾ (1945) は乳酸菌等の細菌に對する発育素としてカゼインのトリブシン消化物中に Strepogenin の存在を指摘せり。然れ共同氏等はカゼインのペブシン消化物中にその存在を認め居らざることは、著者が觀察せる同消化物の四方株に對する顯著なる発育効果と矛盾する事實にして、このことは Strepogenin が四方株の発育に何等關係なきことを立證するものなり。

ペプトンの酸分解物中低沸点エステル化分層の検索 草味及び著者¹⁾が既に報告せる方法に従ひポリペプトンの無水木精抽出物を濃塩酸にて加水分解し、常法によりエチルエステル化せるものを減圧分溜に附す。ここに得たる溜分中低沸点部を直ちに *p*-Nitro-benzoylchlorid と共に処理し *p*-Nitrobenzoat としたる後、アルミナを用いクロマトグラフ法により分割し、比較的多量の Fp 85° の微黃色針狀晶及び少量の Fp 110°, Fp 76° の夫々白色絹糸狀の結晶を得たり。

1) 草味, 荒井: 本誌 64, 277 [昭 19].

2) 東京大学微生物学教室保存

3) Saunders, Finkle: J. Am. Chem. Soc. 59, 170 [1937].

4) Koser, Rettger: J. Infect. Dis., 24, 301 [1919].

5) Fildes, Gladston, Knight: Brit. J. Exptl. Path. 14, 189 [1933].

6) Burrows: J. Infect. Dis. 64, 145 [1939]; 65, 134 [1939].

7) Johnson, Rettger: J. Bact. 43, 103 [1942]; 45, 127 [1943].

8) 秋葉, 長林: 医学と生物学 9, 336 [昭. 21].

9) Van Loghem: Zent. Bat, Parasiten K., I. Orig. 57, 385 [1911].

10) Braun, Cahn-Bronner: Zent. Bakt., Parasiten K., I. Orig. 86, 196 [1921].

11) Woolley, Sprince: J. Am. Chem. Soc. 67, 1734 [1945].

次にエチルエステルとして比較的低温を示す数種のアミノ酸の Aethylester-*p*-nitrobenzoat を合成し、上述の3種の結晶と比較したるに Fp 85° のものは *l*(+)-Valin, Fp 110° のものは *l*(+)-Alanin, Fp 76° のものは *l*(-)-Leucin の各 Aethylester-*p*-nitrobenzoat なることを確認せり。

これ等3種の結晶を夫々 10%塩酸と共に水浴上加温加水分解し、対応するアミノ酸塩酸塩に誘導したる後、草味及び著者¹⁾が既に報告したる方法により Saunders 合成培地 (Na₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, NaCl 2.0, Asparagin 3.0, *l*-Cystin 0.1, *l*-Tryptophan 0.3, Glucose 2.0, H₂O 1000.0) を用いて四方株に対する発育効果を試験したるも恒一なる実験成績を得ること困難にして、又接種菌量を多くする時(菌体1白金耳量を 10 cc の生理食塩水に浮遊せしめその1白金耳量を 1.8 cc の試験液中に接種す。)検体無添加の対照液にても旺盛なる発育を示す為、検体の発育支持能を比較すること不可能なるを知りたり。依て本基礎培地の組成を吟味したる処、次述の如く *l*-Tryptophan の與る影響を確認し得たるを以て、上記 Saunders 合成培地より *l*-Tryptophan を 10⁻⁵% に減量せるものを基礎培地となし後述の細菌試験方法により実施せるに、ペプトンより得たるこれ等の諸物質は四方株に対し発育支持能全く陰性なることを認めたり。念の為、ポリペプトンより得たるエチルエステル化物質を分溜して得られたる粗溜分 [Kp₅ 48—59°, Kp₁₁ 53—75°, Kp₁₁ 75—76°, Kp₅ 59—63°, Kp₅ 64—110°, Kp₇ 110—131°] の各加水分解物及びエチルエステルとして比較的低温の單獨のアミノ酸 (*l*-Prolin, *dl*-Valin, *dl*-Norvalin, *dl*-Alanin, *l*-Leucin, Glycin) につき同様の方法にて試験せるも全く発育効果を認めざりき。次に上記基礎培地中の *l*-Tryptophan のみを 10⁻⁵% に増量したるものにて上に掲げた諸検体につき発育支持能を検したるに、検体無添加の対照液をはじめ悉くが旺盛なる発育を示し検体相互の発育効果の比較は困難にして、明かに *l*-Tryptophan 増量の影響なることを認めたり。

Saunders 合成培地の四方株發育に及ぼす影響の吟味 上述の如くポリペプトンより分離せる諸種の分層の四方株發育に及ぼす影響の比較は、Saunders 合成培地を基礎培地とする時極めて困難にして、本基礎培地組成の根本的吟味を必要とするに至りたり。依て個々の成分アミノ酸を増減し夫々の四方株發育に與る効果を比較せり。

第 1 表

培養時間 (hr)	<i>l</i> (-)-Tryptophan 添加量 (%)							
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	0
24	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
48	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
72	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
96	+++	+++	+++	+++	++	±↓	—	—
120	+++	+++	+++	+++	+++	±↓	—	—

培地処方 Na₂HPO₄ 1.4 KH₂PO₄ 1.0 NaCl 2.0 MgSO₄·7H₂O 0.1 Asparagin 3.0
l-Cystin 0.1 Glucose 2.0 Polypepton 10⁻⁴ g/dl PH 7.2

1) *l*-Tryptophan の役割 Saunders 合成培地より *l*-Tryptophan を除き、ポリペプトンを 10⁻⁴ g/dl の割合に添加せる基礎培地に *l*-Tryptophan を通減的に添加し四方株に対する発育効果を檢したるに第1表の成績を得たり。

2) Asparagin の役割 *l*-Tryptophan の添加量を発育効果示現の限界値迄減量したる Saunders 培地に於て Asparagin の添加量を増減したるものにつき第2表の成績を得たり。又第1表より *l*-Tryptophan 存在せざる時は Asparagin の発育効果認められざる点を併せ考察し、Asparagin のもつ役割は單なる窒素源なるべきこと明なり。

3) *l*-Cystin の役割 前項同様 *l*-Tryptophan を発育効果示現の限界値迄減量したる Saunders 培地に於て *l*-Cystin のみを通減的に添加し第3表の成績を得たり。この成績を考察するに発育示現濃度に於て存在する

第 2 表

培養時間 (hr)	Asparagin 添加量 (mol/l) (M.G. 132.08)							
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0
24	—	++	++	++	+	+	+	+
48	—	+++	+++	++	++	++	+	+
72	—	++↓	++↓	++	++	++	++	+

培地処方 Na₂HPO₄ 1.4 KH₂PO₄ 1.0 NaCl 2.0 MgSO₄·7H₂O 0.1 *l*-Tryptophan 10⁻⁵%
d-Cystin 0.1 Glucose 2.0 Polypepton 10⁻⁴% H₂O 1000.0 PH 7.2

第 3 表

培養時間 (hr)	<i>l</i> -Cystin 添加量 (mol/l) (M.G. 240.23)							
	2×10 ⁻²	2×10 ⁻³	2×10 ⁻⁴	2×10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁷	2×10 ⁻⁸	0
24	+	+	—	—	—	—	—	—
48	+++	+	+	—	—	—	—	—
72	+++	+	+	—	—	—	—	—

培地処方 Na₂HPO₄ 1.4 KH₂PO₄ 1.0 NaCl 2.0 MgSO₄·7H₂O 0.1 Asparagin 3.0
l-Tryptophan 10⁻⁵% Glucose 2.0 Polypepton 10⁻⁴% H₂O 1000.0 PH 7.2

l-Tryptophan も、たとえ充分なる窒素源と共存すると *l*-Cystin の一定量共存せざる場合には発育効果を現さざること明かにして、既に Fildes⁵⁾ 秋葉⁶⁾ 等の指摘せる見解と一致するものなり。

以上の諸成績を要約するに四方株の発育効果を吟味する為には *l*-Tryptophan の存否の深甚なる考慮を必要とすることが認められ得る。今回著者が Saunders 培地を用い、ペプトンより分離したる検体につき四方株に対する発育効果検定上遭遇せる種々の困難は、培地中の *l*-Tryptophan の存在及び接種菌量の不恒一性にあることを推定し得たり。依て Saunders 培地より *l*-Tryptophan を欠除せるものの基礎培地としての価値を検討する為、ポリペプトンを検体とし第4表の成績を得たり。これは草味及び著者¹⁾ が同検体につき得たる成績と略々一致するものにして、四方株の発育効果検討の為本方法の適当なることを立證するものなり。

第 4 表

培養時間 (hr)	Polypepton 添 加 量 (%)							
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0
24	+++	+++	++	+	—	—	—	—
48	+++	+++	++	+	—	—	—	—
72	+++	+++	++	+	—	—	—	—
96	+++	+++	++	+	—	—	—	—

培地処方 Na₂HPO₄ 1.4 KH₂PO₄ 1.0 NaCl 2.0 MgSO₄·7H₂O 0.1 Asparagin 3.0
l-Cystin 0.1 Glucose 2.0 H₂O 1000. PH 7.2

ポリペプトンより得たる分屑の四方株に対する発育効果とトリプトファンの分布との関係 草味及び著者¹⁾ が既に報告せる方法によりポリペプトンを無水木精にて処理し溶解度の相違により2分屑を得たり。又牛乳カゼインの硫酸分解物がポリペプトンに匹敵する発育効果を示すことを報告せり。今回著者は四方株を用いこれ等の発育効果を再検討すべく、殊にトリプトファンの四方株発育に及ぼす重要性を顧慮し各試料中のトリプトファンの存否をブロム水による呈色反應を以て検しつづ夫々の示す発育効果を比較したる処、第5表の如くブロム水反應

第 5 表

検 体	ブロム水 反 應	培養 時間	検 体 添 加 量 (%)				
			1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0
Polypepton	微紅色	24	+++	+++	+++	++	—
		48	+++	+++	+++	++	—
		72	+++	+++	+++	++	—
Polypepton 無 水 木 精 可 溶	微紅色	24	+++	++	±	—	●
		48	+++	++	±	—	
		72	+++	+↓	—↓	—	
Polypepton 無 水 木 精 不 溶	微紅色	24	+++	+++	+++	++	
		48	+++	+++	+++	+↓	
		72	+++	+++	++↓	+↓	
Casein 25%硫酸分解物	—	24	++	—	—	—	
		48	++	—	—	—	
		72	++	+	—	—	

陽性なる試料のみ發育効果顯著なる事実を認めたり。

草味及著者¹²⁾は又、ポリペプトン無水木精可溶部を直接エステル化後減圧分溜して得たる低沸点溜分がチフス菌に対し發育効果顯著なることを予報せり。今回著者は同様の操作によりエチルエステル化粗溜分 (Kp₁₂ 61—70° Kp₁₂ 71—73°, Kp₁₂ 114—125°, Kp₁₂ 129—130°) を得たり。これ等を夫々加水分解したるものにつき四方株に対する發育効果を検したるも悉く陰性にして、ブロム水反應も全く認められざることを知りたり。

ポリペプトンの活性炭處理によりて得たる試料の四方株に対する發育効果とトリプトファン含量に就て Wachtel, Carridy¹²⁾ (1943), Schramm, Primough¹³⁾ (1943), Jutiss, Lederer¹⁴⁾ (1947) 等はアミノ酸及びポリペプチドの活性炭による吸着能を吟味し、フェニールアラニン、チロゼン、トリプトファン等の芳香族アミノ酸及びそのポリペプチドが強く活性炭に吸着される事実を指摘せり。著者は活性炭によるクロマトグラフ法によりポリペプトンを2分層に分割し、各分層の四方株に対する發育効果を検したる處、第6表の如く活性炭吸着分層

第 6 表

検 体	培養 時間	検 体 添 加 量 (%)						
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0
Polypepton	24	+++	+++	++	—	—	—	—
	48	+++	+++	++	—	—	—	—
	72	+++	+++	++	—	—	—	—
活 性 炭 吸 着 物 質	24	+++	+++	+++	+	—	—	
	48	+++	+++	+++	+	—	—	
	72	+++	+++	+++	+	—	—	
活 性 炭 非吸着物質	24	+	—	—	—	—	—	
	48	+	—	—	—	—	—	
	72	+	—	—	—	—	—	

12) Wachtel, Carridy: J. Am. Chem. Soc., **65**, 665 [1943].

13) Schramm, Primough: Ber., **76**, 373 [1943]. 14) Jutiss, Lederer: Nature, **159**, 445 [1947].

に於て特に顯著なる事実を認めたり。又ブロム水によるトリプトファン呈色反應は活性炭吸着分層のみ強陽性にして、板垣、政山¹⁵⁾の方法に準じトリプトファン含量を測定したる結果、吸着分層は原料ペプトンに比し 3.69 倍のトリプトファンを含有することを知れり。尙非吸着分層はトリプトファン呈色反應は認められざれどもビウレット反應は顯著なりき。

カゼインのパンクレアチン消化物に就き、消化時間とトリプトファン生成との關係及び四方株發育に及ぼす影響

第 7 表

第 8 表

検 体	培 養 時 間	検 体 添 加 量 (%)					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
Casein 24 hr. 消 化 物	24	+++	+++	+	—	—	—
	48	+++	+++	+	—	—	—
	72	+++	+++	+	—	—	—
	120	+++	+++	+	—	—	—
Casein 44 hr. 消 化 物	24	+++	+++	+	—	—	
	48	+++	+++	++	—	—	
	72	+++	+++	++	—	—	
	120	+++	+++	++	—	—	
Casein 66 hr. 消 化 物	24	+++	+++	+	—	—	
	48	+++	+++	+++	±	—	
	72	+++	+++	+++	±	—	
	120	+++	+++	+++	±	—	
Casein 138 hr. 消 化 物	24	+++	+++	++	±	—	
	48	+++	+++	++	±	—	
	72	+++	+++	++	±	—	
	120	+++	+++	++	±	—	
Polypepton	24	+++	+++	+	—	—	
	48	+++	+++	+	—	—	
	72	+++	+++	+	—	—	
	120	+++	+++	+	—	—	

15) 板垣、政山：大阪医誌，35，1743 [昭 11]。

上に述べたる如き諸事実より、ポリペプトン中の四方株発育に対する重要因子はトリプトファンなること概ね予想せらるる処なるも、Woolley, Sprince^{16), 17a)}等は*Lactobac. casei*, *Strept. faecalis*等の細菌に対する発育素としてカゼインのトリプシン消化物中にペプチドの性質を示すStrepogeninの存在を指摘しありて、此のものの四方株の発育に対する影響は検討を要すべき事項なり。依て著者は先づ牛乳カゼインをWoolley^{17b)}等の方法に準じパンクレアチンを以て消化し、其の時間的消化産物中のトリプトファン遊離度及びアミノ態窒素の消長を追跡し、これ等の測定値と各消化産物の四方株に対する発育効果とを比較することにより、発育因子は果してトリプトファンのみによるものなりや、或はStrepogenin等の如く時間的に蛋白母体より消化遊離し来る他の物質の影響を受くるものなりやを確證せんとせり。カゼイン消化物は時間的に取出し減圧下に蒸発乾燥せるものを試料となし、Sørensenのフオルモール滴定法によりてアミノ態窒素を測定し、同時に板垣、政山の方法に準じトリプトファン遊離度を測定し第7表に示す結果を得たり。又上記試料の四方株に対する発育効果は第8表の如し。これ等の結果を綜合考察するに各試料の発育支持能はトリプトファン生成量に略比例し、アミノ態窒素の消長は著しき影響を與えざること明なり。即ちポリペプトンの如きカゼイン消化産物中の発育因子としてはトリプトファンが主要なるものにして、蛋白母体より逐次消化遊離し来るべき他物質の影響は微弱なるものと考えらる。この結論を更に確證せんが為、著者はトリプトファンを構成因子として含有せざる蛋白質たるゼラチンにつき前記同様の方法にてパンクレアチンを以て消化したるものにつき四方株に対する発育効果を試験したるに、第9表に示す如く其の発育支持能は極めて微弱にしてトリプトファンの重要性を裏書きしあることを知りたり。

第 9 表

検 体	培 養 時 間	検 体 添 加 量 (%)					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
Gelatin 138 hr. 消化物	24	+	—	—	—	—	—
	48	+	—	—	—	—	—
	72	+	—	—	—	—	—
	120	+	—	—	—	—	—
Polypepton	24	+++	+++	+	—	—	—
	48	+++	+++	+	—	—	—
	72	+++	+++	++	—	—	—
	120	+++	+++	++	—	—	—

カゼインのペプシン消化物の四方株に対する発育効果とトリプトファン含量に就いて Woolley^{17b)}等はStrepogeninがカゼインのペプシン消化物中に存在せず、これを更にトリプシンにて消化する時はじめて生成せらるることを報告せり。著者はStrepogeninの四方株発育に及ぼす影響を更に吟味する為Woolley等の方法に準じ牛乳カゼインをペプシンにて消化せるものにつき発育効果を試験し第10表の成績を得たり。又この試料中のトリプトファン遊離度を測定したるに、ポリペプトンに比較し0.57倍にして発育効果も略々これに比例しあることを知りたり。

總 括 以上の諸事実を綜合するに、チフス菌四方株の発育促進上重要なペプトン中の主因子はトリプトファンなることを断定し得るものと信ず。最近秋葉、鷹取¹⁸⁾は任意のチフス菌24株につきトリプトファンの必要性を吟味したる処、それ等の内18株が増殖上特にL-Tryptophanを必要とする事実を認めたり。これ等の結論はチフス菌培養の目的に供せらるべきペプトンの製造上、その原料蛋白質の選択並びに製造工程につき留意すべ

16) Woolley : J. Exp. Med., 73, 487 [1941]; J. Biol. Chem., 162, 363 [1946]; 166, 783 [1946]; 171, 443 [1947].

17a) Woolley, Sprince : J. Exp. Med., 80, 13 [1944].

17b) Woolley, Sprince : J. Am. Chem. Soc., 67, 1734 [1945].

18) 秋葉, 鷹取 : 未発表.

第 10 表

検 体	培 養 時 間	検 体 添 加 量 (%)					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
Casein Pepsin 消化物	24	+++	++	—	—	—	—
	48	+++	++	+	—	—	—
	72	+++	++	+	—	—	—
	96	+++	++	+	—	—	—
	120	+++	++	±↓	—	—	—
Polypepton	24	+++	+++	+	—	—	
	48	+++	+++	+	—	—	
	72	+++	+++	++	—	—	
	96	+++	+++	++	—	—	
	120	+++	+++	++	—	—	

き着眼点を提供せるものと信ず。

本研究は落合教授並に秋葉教授の懇篤なる御指導によるものにして、又本研究遂行に当り有益なる御助言を賜りたる秋谷教授、中原博士に対し深甚なる謝意を表明すると共に元素分析を担当せられたる平井、宮原、早津諸氏に併せて感謝するものなり。

実 験 の 部

細菌試験 (1) 試験液調製：精密に秤量したる検体を一定量の基礎培地中に溶解したる後 10 倍稀釈法にて基礎培地を以て稀釈し、所望の試験管系列を作る。滅菌は通常 100°, 30 分、3 回蒸気滅菌するも、若し検体が熱に不安定なる時は細菌濾過器を用い無菌的操作により所望の稀釈系列を調製す。各試験管中の検体量は夫々 1.8 cc とす。

(2) 菌株及び接種法：普通寒天斜面培地上 37°, 24 時間培養したる供試菌株 1 標準白金耳量を滅菌生理食塩水 10 cc 中に浮遊せしめ、その 1 白金耳量を被検液 (1.8 cc) 中に接種す。

(3) 発育効果判定：24 時間毎に肉眼により濁濁度を比較す。濁濁度記載は次の如き標準に従う。

(+++)………検液著明に濁濁し振盪するに管底に菌体の沈渣を認むるもの。

(++)………検液相当に濁濁するも管底に菌体の沈渣を認めざるもの。

(+)………試験管を動揺せしむる時陽炎の如く菌体の存在を認むるもの。

(±↓)………検液中に菌体の存在を認め得ざるも試験管を振盪するに菌体の沈渣を認むるもの。

(-)………濁濁及び沈渣を全く認めざるもの。

ポリペプトン酸分解物中低沸点エステル化物質の *p*-Nitrobenzoat のクロマトによる分割 常法によりポリペプトンを濃塩酸にて分解し、無水酒精及乾燥塩酸ガスにてエチルエステル化後分溜して得たる低沸点溜分 [Kp₅ 38—50°] 1.8 g を *p*-Nitrobenzoylchlorid 2.8 g と Schotten-Baumann 法により処理して得たる微黄色結晶性の *p*-Nitrobenzoat をベンゾール 100 cc を用い層厚 30 cm のアルミナ層を通し Flüssige Chromato 法により分割す。アルミナ層は酒精にて溶出し中層より Fp 109—110° の無色絹糸状結晶、下層より Fp 74—75° の無色針状晶を夫々 0.3 g 得たり。流出液より得たる結晶は未だ単一物質に分離しあらずる為、ベンゾール、ヘキサン (1:1) 混合溶媒 70 cc にて再度クロマトにかけたる処、流出液よりは何等の物質をも捕捉し得ざれ共アルミナ上層より比較的多量の Fp 85° の微黄色針状結晶を得たり。C₁₄H₁₅O₅N₂ 計算値 C 57.14, H 6.12, 実験値 C 57.33, H 6.11。

これを d(+)-Valin-äthylester-*p*-nitrobenzoat と混融するも融点降下なし。又さきに得られたる Fp 109—110° の結晶は l(+)-Alanin-äthylester-*p*-nitrobenzoat と、又 Fp 74—75° の結晶は l(-)-Leucin-äthylester-*p*-ni-

trobenzoat と夫々混融するも融点降下を認めず。

Glycin, Alanin, Valin, Norvalin, Leucin の Aethylester-*p*-nitrobenzoat の合成 無水酒精及び乾燥塩酸ガスにより常法に従いエステル化せる各アミノ酸のエチルエステル 1 Mol に *p*-Nitrobenzoylchlorid 1.2 Mol を加え Schotten-Baumann 法により *p*-Nitrobenzoat となしエーテル及びヘキサンより再結晶す。

Äthylester- <i>p</i> -nitrobenzoat	Fp	結 晶 形	C %		H %	
			計算値	実験値	計算値	実験値
Glycin-	140.5°	無色絹糸状	52.36	52.90	4.80	4.70
<i>dl</i> -Valin-	75.5°	微黄色針状	57.14	57.59	6.12	6.42
<i>l</i> (+)-Valin-	85°	微黄色針状	57.14	57.48	6.12	5.97
<i>dl</i> -Norvalin-	82°	無色絹糸状	57.14	57.33	6.12	6.49
<i>l</i> (+)-Norvalin-	102.5°	無色絹糸状	57.14	57.60	6.12	6.12
<i>l</i> (+)-Alanin-	110°	無色絹糸状	54.11	54.47	5.30	5.42
<i>l</i> (-)-Leucin-	76°	無 色 針 晶	58.41	58.51	6.54	6.26

ポリペプトンの活性炭を用いたクロマト法による分割 ポリペプトン 25%水溶液を層高 30 cm の活性炭層を通過せしめ流下液は減圧蒸発乾固無色の非吸着物を得。活性炭は水洗し洗液ビウレット反応消失を限度とす。然る後メタノールにて温浸し、浸出液より溶媒を溜去乾燥し黄橙色の吸着物を得る。吸着物はブロム水によるトリプトファン呈色反応顕著なるも非吸着物は全く陰性なり。但し両分層共ビウレット反応陽性なり。

トリプトファン含量の測定 試料 100 mg を精秤し 1 cc の蒸溜水に溶解す。これに 2% フォルマリン 0.1 cc を加へよく混和後 66 % 硫酸を攪拌しつつ注加し全液量を 10 cc とす。然る時はトリプトファン存在せば紫紅色に呈色するを以て原料ポリペプトンを同様に操作せるものを対照液となしドゥボスク比色計にて 5 分後の色調を比色す。活性炭吸着分層は 3.69 倍のトリプトファンを含有すれども非吸着分層は全くトリプトファン呈色反応なし。

牛乳カゼインのパンクレアチン消化 大試験管 5 本に夫々牛乳カゼイン 2 g を秤取し、0.8% 重炭酸ソーダ溶液 19cc 及局方パンクレアチン 10 mg を 0.8% 重炭酸ソーダ溶液 1 cc に溶解せるものを注加し均一の溶液となしたる後トルオールを積層せしめ綿栓を施し 37° 恒温器中に納む。24 時間、44 時間、66 時間、138 時間後に順次試験管を一本宛とり出し要すれば醋酸及び炭酸ソーダにて液性を中性となしたる後減圧蒸発乾固し試料となす。

試 料	アミノ窒素 (フォルモール滴定法)				トリプトファン含量 (板垣, 政山法)		
	秤取量	$\frac{N}{10}$ NaOH(cc)	アミノ窒素(mg)	アミノ窒素(%)	標準液平均層厚	試料液平均層厚	含 量
牛乳カゼイン	0.2g	2.367	3.31	1.66			
24h. 消化物	"	2.556	3.58	1.79	3.35	1.62	2.07 A
44 h. 消化物	"	3.263	4.57	2.29	3.53	1.75	2.02 A
66 h. 消化物	"	3.661	5.13	2.57	3.61	1.71	2.11 A
138 h. 消化物	"	4.060	5.68	2.84	3.25	1.88	1.73 A
ポリペプトン	"	6.799	9.52	4.76	1	1	A

牛乳カゼインのペプシン消化 牛乳カゼイン 10 g をよく粉碎し蒸留水 100 cc 中に分散せしめ稀塩酸を加へ pH 1.8 に調整す。之に局方ペプシン 0.2 g を加へトルオールを積層せしめ 37° にて 5 日間消化せしむ。然る後未消化物を濾去し濾液を炭酸ソーダにて中和後減圧蒸発乾固し真空デシケーター中にて充分乾燥す。ここに得たるペプシン消化物は桃色のビウレット反応を呈し、トリプトファン反応著明なり。アミノ窒素：試料 100 mg N/10 NaOH 0.5000 cc, アミノ窒素 0.70 mg (0.70%)。トリプトファン含量：標準液平均層厚：1.96, 試料液平均層厚：3.44, トリプトファン含量：0.57 A (但し A はポリペプトン中のトリプトファン含量),

東京大学医学部薬学科 (昭和 24 年 10 月 10 日受理)

Summary

The conclusion was drawn that the chief growth factor in peptone against Shikata strain of typhoid bacillus was tryptophane, from following reason:

1) The fraction obtained by the solvent extraction of peptone and its treatment by esterification, etc., possessed the most growth promoting effect in the one giving positive reaction to tryptophane coloration.

2) The fractionation of peptone by the adsorptive affinity to active charcoal showed that those having adsorptive affinity possessed growth promoting effect, the affinity being in direct proportion to the content of tryptophane.

3) The rise and fall of tryptophane in the pancreatin digested product of casein is approximately in direct proportion to the growth promoting effect and the rise and fall of amino form nitrogen has little, if any, effect.

4) Pancreatin digest product of gelatine, a protein not containing any tryptophane, does not have any effect of growth promotion.

5) The growth promoting effect of the pepsin digested product of casein is also in approximate proportion to the tryptophane content. Moreover, streptogenin has no relation to the growth of typhoid bacillus.

(Received October 10, 1949)

76. 荒井岩夫：チフス菌の発育素に関する研究 (第2報)

トリプトファンの発育素としての作用機序 (其の1)

Iwao Arai: Growth Factor for *B. Typhosus*. II.

Mechanism of Growth Promoting Action of *l*-Tryptophane. (1).

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty University of Tokyo)

チフス菌の或菌株に対し *l*-Tryptophan が顕著なる発育促進作用を有し、而もペプトンの如き複合せる組成を有する蛋白分解産物中に於てひとりトリプトファンのみが卓越せる発育効果を有する事実は既に前報に於て指摘せる如なり。*l*-Tryptophan がチフス菌四菌株に対し 10^{-8} Mol/l 程度の微量にて充分発育効果を発揮し得る点より考え、本物質は菌体の発育過程に於ける窒素源たるの意義よりむしろ触媒的意義を有する如く想像せらる。Burrows¹⁾ (1939) がチフス菌発育過程に於けるトリプトファンの役割につき “trigger action” なる表現を用いたることも如上の見解を肯定しあるものと認めらる。

1) Burrows: J. Inf. Dis., 64, 145 [1939]; 65, 134 [1939].