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].

著者はトリプトファン作用機序につき、次の如き観点よりこれを吟味し若干の知見を得たるを以て、ここに報告せんとす。

- (1) チフス菌の發育途上に於けるトリプトファンの代謝分解産物が、二次的に發育促進作用を有するに非ざるや。
- (2) トリプトファン自身が直接触媒的作用を有するものなりや。若し然りとせば活性中心は其の構造上如何なる部分に存在するや。

トリプトファンの生物學的代謝産物の四方株に対する發育効果

a) Kynurenin 及び Kynurensäure に就て チフス菌保菌者の胆汁中より屢々チフス菌の存在を證明し得ることは周知の事実にして、又チフス罹患初期の患者の血液中よりチフス菌を證明する為、先づ胆汁培地を用いて増菌する方法も屢々実施せらるる処なり。神品²⁾は流血中のチフス菌證明に應用せらるる胆汁の意義に関し、胆汁が血液の殺菌力を阻止し血液の凝固を抑止し、且チフス菌に対し栄養價を有する点を挙げたるもその本質につきては言及し居らず。古武等³⁾は家兎、犬等の動物体内に於ける *L*-Tryptophan の代謝過程に就き、次の変異を提唱せり。

然もこれ等の代謝物質が胆汁及び尿中より特に著明に検出し得らるることも同氏等の指摘する処なり。又大谷、本田⁴⁾は所謂インドール陰性細菌中チフス菌、パラチフスA菌及びB菌、鼠チフス菌等をトリプトファン添加培地に培養し其の培養液中にキヌレニン或はアントラニール酸の生成せる事実を呈色反應を以て證明せり。

如上の諸事実は *L*-Tryptophan がチフス菌發育上重要因子たる点と併せ考え、これ等のトリプトファン代謝産物が二次的にチフス菌の發育に意義を有するものなりや否やを検討すべき根拠を提供するものなり。

著者は先づ牛胆汁、家兎胆汁、家兎尿及び健康人尿につき四方株に対する發育効果を試験したるに、第1表の如く微弱乍らそれ等の有効なることを認めたり。次に松岡等⁵⁾の方法に従い、白米にて飼育したる家兎に *L*-Tryptophan を皮下注射せる後の24時間尿中より Kynurenin 及び Kynurensäure を抽出し、これ等2者の四方株に対する發育効果を檢したるも全く陰性にして、ただ *L*-Tryptophan のみ顯著なる効果を示すことを知れり。又 *L*-Tryptophan 皮下注射前及び後の家兎尿の四方株發育に対する効果は略々同等なることより、家兎尿中に排泄せらるるトリプトファン代謝物質は四方株の發育に対し何等影響を及ぼさざることを推論し得たり。

b) Oxyanthranilsäure, Anthranilsäure, Nicotinsäure に就て トリプトファンの生物學的代謝産物として Anthranilsäure, Oxyanthranilsäure, 及び Nicotinsäure が生成せらるることは文献上屢々報告せられある処なり。中山⁶⁾は家兎或は猫の肝臓泥に Kynurenin を作用せしめて Anthranilsäure の生成を證明し、又古武、本田⁷⁾は Kynurenin に Kynureninase を作用せしめ Anthranilsäure 及び Alanin の生成を認めたり。古武⁸⁾は家兎に Anthranilsäure を與えその尿中に Oxyanthranilsäure の生成せることを證明せり。佐々木⁹⁾は

2) 神品：衛生傳染學誌 20, 198 [大13].

3) 古武、政山：Z. physiol. Chem. 243, 237 [1936]; 板垣：大阪医誌 38, 1129 [昭14].

4) 大谷、本田：大阪医誌 37, 1 [昭13].

5) Matsuoka, Yoshimatsu：Z. physiol. Chem. 143, 206 [1925].

6) 中山：大阪医誌 36, 1673 [1937]; 38, 1903 [1939]. 7) 古武、本田：大阪医誌 41, 1720 [1942].

8) 古武：大阪医誌 41, 1028 [1942].

9) 佐々木：J. Biochem. 2, 251 [1923].

第 1 表

検 体	培 養 時 間	検 体 添 加 量 (vol %)				
		1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0
家 兎 胆 汁	24	++	+	—	—	—
	48	++	++	—	—	—
	72	++	++	—	—	—
	120	++	++	—	—	—
家 兎 尿	24	+	—	—	—	—
	48	++	—	—	—	—
	72	++	—	—	—	—
	120	+↓	—	—	—	—
牛 胆 汁	24	++	+	—	—	—
	48	++	+	—	—	—
	72	++	+	—	—	—
	120	++	+	—	—	—
健 康 人 尿	24	+	+	—	—	—
	48	+	+	—	—	—
	72	+	+	—	—	—
	120	+	+	—	—	—

l-Tryptophan に *B. subtilis* を作用せしめて Anthranilsäure を得、大谷等¹⁰⁾ は緑膿菌、螢光菌、及び枯草菌の如きインドール陰性細菌による *l*-Tryptophan の代謝産物として Anthranilsäure を捕捉せり。又 Mitchell¹¹⁾ は *Neurospora* がトリプトファンを分解し Kynurenin 及び 2-Amino-3-oxy-benzoessäure を経て Nicotinsäure を合成することを報告せり。

此処に於て著者は上記の如きトリプトファンの生物学的代謝産物の何れかが2次的にチフス菌の発育を促進するに非ざるやと考え、Anthranilsäure, Oxyanthranilsäure, 及び Nicotinsäure の3者につき四方株に対する発育効果を試験したるも悉く陰性なることを認めたり。

これ等の諸成績並に Kynurenin, Kynurensäure の発育陰性効果を綜合考案するに、*l*-Tryptophan の生物学的代謝産物は夫々の化学構造上何れも Indol 核の開裂、或は2次的閉環を生起せるものにして、これ等の悉くが四方株の発育上 *l*-Tryptophan を代償し得ざることは、発育素としての役割を演ずべき作用中心として Indol 核の重要性を想像せしむるものなり。

インドール醋酸及びナフタリン醋酸の四方株に対する発育効果 Woolley, Sebrell¹²⁾ (1945) はチフス菌 T-63 株に対し Indol-3-essigsäure が微弱乍ら発育効果を有することを報告せり。著者も亦本物質が四方株に対しても 10⁻¹% の濃度に於て発育支持能を有することを認めたり。一方 α -Naphthalin-essigsäure が植物生長ホルモンとして Indol-3-essigsäure と同様の作用を有することは既に Koepfli¹³⁾ (1938) 等の認めたる事実にして、上述の如き結果を併せ考え四方株の発育に対するこれ等両者の及ぼす影響を比較することにより、発育促進作用機作につき何等かの手がかりを得べしと考え、之を試験したるに α -Naphthalin-essigsäure は何等の発育促進性なきことを知りたり。

10) 大谷, 西野, 今井: 大阪医誌 38, 557 [昭 14]; 大谷: 大阪医誌 30, 3583 [昭 6].

11) Mitchell: J. Am. Chem. Soc. 70, 1847 [1947].

12) Woolley, Sebrell: J. Biol. Chem. 157, 141 [1945].

13) Koepfli, Thimann, Went: J. Biol. Chem. 122, 763 [1938].

この結論は四方株の發育に対しては Indol 核が重要な役割を演じあることを證明するものにして前項の推論を裏書きするものなり。

Indol 及びその誘導体の四方株に対する發育効果 上述の推論に基づき、Indol 及びその誘導体数種につき四方株に対する發育効果を試験したる結果、第3表の成績を得たり。

第 3 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
l-Tryptophan	24	+++	+++	+++	+++	++	++	—
	48	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
	72	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
	120	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Indol	24	—	+++	+++	+++	+++	++	
	48	—	+++	+++	+++	+++	+++	
	72	—	+++	+++	+++	+++	+++	
	120	—	+++	+++	+++	+++	+++	
Indol-3- essigsäures-K	24	—	—	—	—	—	—	
	48	++	±	—	—	—	—	
	72	++	±	—	—	—	—	
	120	++	±	—	—	—	—	
Skatol	24	/	+	—	—	—	—	
	48		++	—	—	—	—	
	72		++	+	—	—	—	
	120		++	± ↓	—	—	—	
Indol-2- carbonsäure	24	—	—	—	—	—	—	
	48	—	+	±	—	—	—	
	72	—	+	±	—	—	—	
	120	—	± ↓	±	—	—	—	
2-Methyl-indol, 2-Carbäthoxy-3-methyl-5-äthoxyindol		10 ⁻¹ —10 ⁻⁶ % にて培養 時間 120 hrs. に至るも 何れも (—)						
2,3-Dimethyl-indol, 5-Äthoxyindol-2-carbonsäure-3								
-essigsäure, Indoxyl-2-carbonsäure, Isatin								

Indol がチフス菌のある菌株に対し發育効果を有することは既に Fildes¹⁴⁾ (1940), Woolley, Sebrell¹²⁾ (1945) 等の指摘せる処にして、Woolley 等は更に 3-Indolaldehyd, 3-Indolhydantoin, 3-Indolthiohydantoin, γ -(Indol-3)-*n*-buttersäure, β -(Indol-3)-propionsäure につきては發育効果なきことを報告せり。これ等の結果を第3表の成績と比較考案するに、Indol 誘導体がチフス菌に対し發育支持能を示す為には

i) Indol 核の α 位が空位なること。

ii) Indol 核の β 位が空位なるか或は β 位置換基が特異的構造を有すべきこと。

の諸條件を少くとも具備すること必要なり。

Indolizin 誘導体 Pyrrol 及び其誘導体の四方株に対する發育効果 Indol と化学的性質に相似性を有する Indolizin 及び Pyrrol 誘導体中下記のものにつき四方株に対する發育効果を試験せるに Indolizin 誘導体につ

14) Fildes : Brit. J. Exp. Path. 21, 315 [1940].

きては全く陰性なるも Pyrrol 誘導体につきては第4表に示したる3種のは微弱ながらその効果を有することを知れり。

R ₁	H	-COCH ₃	-COCH ₃	-COCH ₃	-COCH ₃
R ₂	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
R ₃	H	H	-NO	-N:N--SO ₃ Na	-NH ₂ ·HCl

R' ₁	H	-COCH ₂ -COOC ₂ H ₅	-CH ₂ ·CO·CO ₂ R	-COCHCO ₂ C ₂ H ₅ NH ₂ HCl	-COCH ₂ CO ₂ R	-CH ₃
R' ₂	H	H	H	-CH ₃	-CH ₃	-COOC ₂ H ₅
R' ₃	H	H	-CH ₃	H	H	H
R' ₄	H	H	-COOR	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
R' ₁	-COCH ₃	-CH ₃	-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	-CH ₃	-CH ₃	-COOC ₂ H ₅
R' ₂	-CH ₃	H	-CH ₃	-COOH		-CH ₃
R' ₃	-CH ₃	-CH ₃	H	-COOH	-CH ₃	-COOH
R' ₄	-COOR	COOC ₂ H ₅	-CH ₃	-COOH	-COOC ₂ H ₅	-CH ₃

第 4 表

Pyrrol 誘 導 体	培 養 時 間	検体添加量 (%)			備 考
		10 ⁻¹	10 ⁻²	0	
(R' ₁) -CO·CH ₂ ·COOC ₂ H ₅	24	++	—	—	Fp 70—71°
(R' ₂) H	48	++	—	—	
(R' ₃) H	72	++	—	—	
(R' ₄) H	96	++	—	—	
(R' ₁) -COOC ₂ H ₅	24	—	++		Fp 125° 水に難溶
(R' ₂) -CH ₃	48	+	++		
(R' ₃) H	72	+	+++		
(R' ₄) -CH ₃	96	+++	+++		
(R' ₁) -COOC ₂ H ₅	24	—	+		Fp 273° 水に難溶
(R' ₂) -CH ₃	48	++	+		
(R' ₃) -COOH	72	++	+		
(R' ₄) -CH ₃	96	+++	+		

菌株による Indol の発育促進効果の特異性に就いて Burrows¹⁵⁾ (1939) 等の指摘せる如きトリプトファンを必須アミノ酸として要求する一群のチフス菌株に対し、インドールが四菌株に対すると同様にトリプトファンに代償し得るや否やを吟味することは両者の作用機作の関連性を考察する上に一資料を提供するものなり。依て著者は抗元性を異にし且発育上トリプトファンを必要とする数種のチフス菌株につきインドール及びトリプトファ

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

第 5 表

検 体	接 種 菌		培養 時間	検 体 添 加 量 (Mol/l)						
	菌株	抗元		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0
l-Tryptophan	四方	Vi	24	+++	+++	+++	+++	++	++	—
			48	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
			72	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
			120	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	T58	VW	24	+++	++	++	++	+	—	—
			48	+++	+++	+++	++	+	—	—
			72	+++	+++	+++	++	+	±↓	—
			120	+++	+++	+++	++	+	±↓	—
	T63	VW	24	+++	+++	+++	++	+	—	—
			48	+++	+++	+++	++	+	+	—
			72	+++	+++	+++	++	+	+	—
			120	+++	+++	+++	++	+	±↓	—
	T287	W	24	+++	+++	+++	++	+	—	—
			48	+++	+++	+++	++	+	—	—
			72	+++	+++	+++	+++	+	±↓	—
			120	+++	+++	+++	+++	+	±↓	—
Indol	四方	Vi	24	+++	+++	+++	++	±	—	
			48	+++	+++	+++	+++	++	—	
			72	+++	+++	+++	+++	++	±↓	
			120	+++	+++	+++	+++	++	±↓	
	T58	VW	24	+++	+++	++	+	—	—	
			48	+++	+++	+++	++	+	—	
			72	+++	+++	+++	++	+	—	
			120	+++	+++	+++	++	+	±↓	
	T63	VW	24	+++	+++	+++	+++	±	—	
			48	+++	+++	+++	+++	+	—	
			72	+++	+++	+++	+++	+	±↓	
			120	+++	+++	+++	+++	+	+	
	T287	W	24	+++	+++	+++	++	—	—	
			48	+++	+++	+++	+++	+	—	
			72	+++	+++	+++	+++	+	±↓	
			120	+++	+++	+++	+++	+	±↓	

ソの示す発育促進性を比較したる結果、第5表に示す如く両者の間には菌株の如何に関せず殆ど差異の認められざることを知れり。

總 括 以上の諸成績を綜合するに、一群のチフス菌株に対する発育促進物質として Indol の有する意義は特に注目すべきものもあり。Skatol 及び Indol-3-essigsäure 等が微弱乍ら発育効果を有することより、Indol の発育促進性の機構に対し Tatum, Bonner¹⁶⁾ (1943), Umbreit 等¹⁷⁾ (1946) が Indol 及び Serin より Tryptophan

16) Tatum, Bonner: J. Biol. Chem. **151**, 349 [1943].

17) Umbreit, et al.: J. Biol. Chem. **165**, 731 [1946].

を合成せる *Neurospora* の作用に関して報告せる知見をそのまま適用するに稍々難点あり。これ等の作用機序につきては今後の研究に俟つ所大なるものあり。又これに関連して Kuhn¹⁸⁾ (1940) 或は Woods, Fildes¹⁹⁾ (1940) の提唱せる拮抗物質に関する仮説の適用し得るや否やを吟味することはチフスの化学療法剤研究に対する一指針を與ふるものと信ず。更に又、チフス罹患者の腸内に於て Indol 産生細菌たる大腸菌とチフス菌との共棲の意義に関しても上述の諸成績は一つの示唆を與ふるものなり。

本研究は落合教授及び秋葉教授の御指導によるものにして深甚なる謝意を表明すると共に、本研究遂行に当り助言を賜りたる秋谷教授、並に標本を分與せられたる菅沢教授に対し深謝するものなり。

實 験 の 部

細菌試験

- (1) 基礎培地：Saunders 等 (J. Am. Chem. Soc. 59, 170 (1937)) の使用せし培地より *l*-Tryptophan のみを欠除したるものにして次の組成を有す。

Na₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, Asparagin 3.0, Cystin 0.1, Glucose 2.0, H₂O 1000.0 (pH 7.2).

- (2) 試験調製法、菌株及び接種法、発育効果判定：前報に記載したる方法と同様。

東京大学医学部薬学科 (昭和 24 年 10 月 10 日受理)

Summary

As a result of the observations of the action mechanism of tryptophane against growth of the Shikata strain of typhoid bacillus from the following 2 points, the importance of indole nucleus was determined.

1) In order to determine whether the physical metabolic products of tryptophane manifested a secondary growth promoting action during the growth of bacilli, experiments were conducted with kynurenine and kynurenic, anthranilic, hydroxyanthranilic and nicotinic acids but all were found to be ineffective.

2) Since the above-mentioned compounds are those in which the indole nucleus of tryptophane had been destroyed or secondarily cyclized, assumption was made that the reaction centre of tryptophane lay in the indole nucleus. Upon this assumption, experiments were made with 10 derivatives of indole and it was found that those derivatives in which the α -position was vacant and a specific substituent was present in the β -position, or those in which both positions were vacant, alone possessed growth promoting effect. Experiments conducted with 17 derivatives of indolizine and pyrrol, chemical properties of which are similar to those of indole, showed that 3 derivatives of pyrrol possessed weak effect. Indole was found to be approximately equally effective as tryptophane, being 10^{-7} to 10^{-8} mol./l, and those strains which were susceptible to tryptophane, regardless of their antigenic properties, possessed about an equal amount of susceptibility to indole.

(Received October 10, 1949)

18) Kuhn: Die Chemie 55, 1 [1940].

19) Woods, Fildes: Chem. Ind., 59, 133 [1940].