UDC 576.852.24.095.18 : 577.158.34 : 577.164.13

293. 平岡栄一：アンチビタミンの微生物に及ぼす影響（第1報**）

2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine の乳酸菌増殖阻害と
ビタミンによる回復

Eiichi Hiraoka : The Influence of Antivitamins on Microorganisms. I.

Inhibitory Effect of 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine
on the Growth of Lactic Acid Bacteria and its Reversal by
various Vitamins.

(National Hygienic Laboratory*)

In order to examine the effect of antipyridoxine substances on microorganisms, growth inhibition by 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) of five kinds of Lactobacteriaceae, *Lactobacillus arabinosus*, *L. casei*, *L. fermenti*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Streptococcus faecalis*, was examined in a vitamin-deficient medium containing a minimum amount of requisite vitamins. With the exception of *L. arabinosus*, growth of all four organisms of Lactobacteriaceae was inhibited by OMP in concentrations above 10~100 γ /tube. Recovery of growth inhibition was examined by adding various kinds of vitamins with OMP and it was found that only the pyridoxine group vitamins exhibited specific antagonism against OMP. Such observations agree with the results obtained so far with mice, rats, and yeast. It was considered that the reason why *L. arabinosus* growth was not inhibited by OMP is because this bacillus can biosynthesize pyridoxine.

(Received July 23, 1957)

ビタミン B₁ 及びニコルボキシナーゼのピリミジン部分である 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) がマウス¹⁾, ラット²⁾, 或る種の酵母³⁾ などに対して種々の障害例えば疾走痙攣, 成長阻害, 増殖抑制などを起させ, これらの障害がビタミン B₆ 群すなわち pyridoxine (PIN), pyridoxal (PAL), pyridoxamine (PAM) で回復除去されることが報告されている。

乳酸菌の栄養要求は微生物の中でも極めてきびしく, この性質を利用して殆んどすべてのアミノ酸及び B 群ビタミンのそれぞれの微生物学的定量が可能であり, またアミノ酸やビタミンの代謝拮抗の研究にも応用されている例が多い。この観点から OMP の研究に乳酸菌を応用する試みもあつたが, その目的を達しなかつた。

著者はアミノ酸やビタミンの定量に用いられている 5 種の乳酸菌について, 不必要なビタミンをできるだけその培地から除き, かつ必須または増殖促進ビタミンもその量を少なくした, いわゆるビタミン制限培地をつくり, この培地を使つて OMP の 5 種の乳酸菌に及ぼす影響を調べ興味ある結果をえた。

実験方法

菌 株 微生物定量に使用される 5 種の乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus* 17-5, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti* 36, *Leuconostoc mesenteroides* P-60 及び *Streptococcus faecalis*。

保 存 1 L 中粉末酵母エキス 5 g, ポリペプトン 10 g, ブドウ糖 10 g, 酢酸ナトリウム (3 H₂O) 10 g, 塩 A 液 5 cc (KH₂PO₄, K₂HPO₄ おのおの 50 mg/cc), 塩 B 液 5 cc (FeSO₄·7 H₂O, MnSO₄·4 H₂O, NaCl おのおの 1 mg/cc 及び MgSO₄·7 H₂O 20 mg/cc), 粉末寒天 20 g を含む保存培地 (pH 6.8; 15 ボンド, 15 分間滅菌) に上記乳酸菌の 1 種を 37° で 20~24 時間穿刺培養し, 1 ヶ月ごとに移植を行い氷室に貯える。

接種菌液 上記保存培地より寒天を除いた液体培地 2 cc を肉厚小試験管に分注し, 15 ボンド, 15 分間滅菌したものに接種し, 37° で 20 時間培養後遠沈し, 滅菌生理食塩水約 2 cc に懸濁する。この液約 0.5 cc を滅菌生理食塩水 10 cc に加えよくふりまぜて接種菌液とする (20 倍希釈菌液)。5 種菌株のうち *L. fermenti* 以外の

* Tamagawa-yoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo.

** 本論文の要旨は第 85 回ビタミン B 研究委員会 (昭和 31.3.3) で発表。

1) 牧野 : Nature **173**, 34(1954); ビタミン **9**, 85(1955).2) 新谷 : 本誌 **76**, 18(1956).3) 新谷, 川島 : 本誌 **76**, 23(1956).

4) 川島よりの私信。

Table I. Vitamins added to the Basal Medium (D.S. 100 cc.)

Vitamins (γ)	<i>L. arabinosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermenti</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>St. faecalis</i>
B ₁			200	20	
B ₂		20	"	"	
PIN			"		
PAL		0.5		0.5	10
Nicotinic acid	40	20	200	20	20
Ca pantothenate	20	"	"	"	"
Folic acid		2			2
Biotin	2	"	2	2	"
PABA	40		20	10	

4 種はこの 20 倍希釈菌液を用いるが、*L. fermenti* のみは菌の濃度を濃くした 5 倍希釈菌液を用いる。

基礎培地 炭素源、窒素源、塩類及び塩基は通常のビタミン定量用 uniform medium を使用したが、ビタミン類は Table I に組成を示した。

定量方法 基礎培地 2 cc に阻害剤、ビタミンなどを加え、さらに水を加えて全量を 4 cc とした液に前記接種菌液を 1/2 皮下用注射針で 1 滴ずつ接種し、37° のふらん器中で一定時間培養する。即ち *L. arabinosus*, *Leuc. mesenteroides* 及び *St. faecalis* は約 24 時間、*L. casei* 及び *L. fermenti* は約 48 時間培養した後、ベックマン分光光度計または比色計を用い波長 610 m μ で濁度を測定する。対照液には未接種培地を用いる。

実験結果

基礎培地の検討 通常のビタミン定量用基礎培地から当該菌に必須でないビタミンを除き、必須または増殖促進ビタミンはできるだけ少量加えるようにして、種々の濃度の OMP の添加における菌の増殖に必要な最少限の培地の組成を検討し次のような結果をえた。

1) *L. arabinosus* 用基礎培地：この菌の必須ビタミンはニコチン酸、パントテン酸、ビオチン及び PABA で、これらの常用量よりはるかに少ない量を同時に加えても、本菌は充分に生育する。ビタミン B₆ 群は加える必要がない。

2) *L. casei* 用基礎培地：*L. casei* の必須ビタミンはビタミン B₂、ニコチン酸、パントテン酸、葉酸、ビオチン及び PAL である。動物実験から OMP は B₆ 群と拮抗することがわかっているため、PAL の添加の適量について検討した結果、Table II に示すように基礎培地 100 cc 中には PAL 0.5 γ を添加するのが適当であることを知った。

Table II. Effect of PAL on the Growth of *L. casei**

OMP (γ /tube)	PAL(γ /100 cc.)			
	0	0.5	1	2
0	0.06	0.90	0.92	0.96
1	0.04	"	0.97	0.98
10	0.03	0.84	"	1.00
100	0.02	0.06	0.86	0.93
1,000	"	0.03	0.03	0.03

* Expressed by turbidity

3) *L. fermenti* 用基礎培地：必須ビタミンであるビタミン B₁、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチンを加えたのみでは全く生育しない。B₂ 及び PABA をこれに追加してもなお生育しない、さらに B₆ を加えて初めて生育した。Table III に PIN の量の変化による OMP 阻害の状態を示す。すなわち基礎培地 100 cc 中には

Table III. Effect of PIN on the Growth of *L. fermenti**

OMP (γ /tube)	PIN (γ /100 cc.)		
	0	20	200
0	0.02	0.07	1.10
1	"	0.06	0.53
10	"	0.02	0.13
100	"	0.03	0.06
1,000	0.01	0.01	0.05

* Expressed by turbidity.

PIN 200 γ を必要とする。

4) *Leuc. mesenteroides* 用基礎培地：この菌の必須ビタミンはニコチン酸、パントテン酸、PABA 及びビオチンであり、B₁ 及び B₂ は生育を促進するが、これらの添加のみでは十分に生育しない。さらに B₆ を加えることが必要であつた。Table IV に PAL の量を検討した結果を示したが、この表から基礎培地 100 cc 中に PAL 0.5 γ を加えるのが適当であることが判る。

Table IV. Effect of PAL on the Growth of *Leuc. mesenteroides**

OMP (γ /tube)	PAL (γ /100 cc.)			
	0	0.25	0.5	1
0	0.20	0.62	0.62	0.67
1	0.05	0.57	0.65	0.70
10	0.03	0.34	0.44	0.60
100	0	0.19	0.28	0.47
1,000	//	0.12	0.25	0.37

* Expressed by turbidity

5) *St. faecalis* 用基礎培地：カゼインの酸分解物をアミノ酸源として加えると OMP の阻害は 1 mg/管でも全く見られない。これはアラニンが B₆ の代用をするためと思われる。そこでカゼイン酸分解物の代りに結晶アミノ酸の混合液（アラニンのみ除く）を使用した。本菌の必須ビタミンはニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、葉酸及び B₆ である。OMP 阻害に最適の PAL 量を検討したが、Table V に示すように基礎培地 100 cc 中に PAL 10 γ を添加するのが適当である。

Table V. Effect of PAL on the Growth of *St. faecalis**

OMP (γ /tube)	PAL (γ /100 cc.)				
	2	6	10	14	20
0	0.09	0.98	1.10	1.20	1.25
1	0.07	0.84	//	1.15	1.10
10	0.01	0.52	0.82	1.10	//
100	//	0.04	0.12	0.45	0.65
1,000	0	0.03	0.09	0.09	0.33

* Expressed by turbidity

OMP による乳酸菌増殖の阻害 上記のビタミン制限基礎培地を用い、5 種の乳酸菌の増殖に対する OMP の影響を検討し、その結果を Table VI に示す。すなわち *L. arabinosus* 以外の 4 種の乳酸菌の増殖は、OMP 濃度 10~100 γ /管以上で著明に阻害を受けるが、*L. arabinosus* のみは OMP の高濃度でむしろ増殖促進の傾向がある。

Table VI. Inhibitory Effect of OMP on the Growth of Lactic Acid Bacteria*

	OMP (γ /tube)				
	0	1	10	100	1,000
<i>L. arabinosus</i>	1.30	1.30	1.35	1.45	1.50
<i>L. casei</i>	1.14	1.00	0.72	0.05	0.01
<i>L. fermenti</i>	1.15	//	0.19	0.06	0.05
<i>Leuc. mesenteroides</i>	0.58	0.53	0.32	0.15	0.11
<i>St. faecalis</i>	1.00	1.00	0.80	0.35	0.02

* Expressed by turbidity

OMP 阻害のビタミンによる回復 OMP は *L. arabinosus* を除く 4 種の乳酸菌の増殖を著明に阻害するが、OMP 1 mg/管と同時に各種のビタミンを添加して OMP と拮抗するビタミンを見出そうと試みた。これらの結果は一括して Table VII に示した。すなわち 4 種の乳酸菌のいずれについても、B₆ 群のみが OMP と特異的に拮抗作用を有することが明らかに示されている。OMP を 100 γ /管の割合に添加したときも 1 mg/管のときと殆んど同じ結果を示し、B₆ 群のみと拮抗した。

考 察 アンチビタミンの研究には培地中のビタミンの量を可及的に少なくすることが必要である。上に

Table VII. Reversal of OMP-Inhibition by Vitamins*

Vitamin added (γ/tube)		<i>L. casei.</i>	<i>L. fermenti</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>St. faecalis</i>
No OMP added		0.92	1.10	0.68	1.30
None	0	0.05	0.06	0.10	0.02
B ₁	10	0.03	0.05	0.09	〃
B ₂	〃	〃	〃	〃	〃
PIN	〃	1.35	0.12	0.33	〃
PAL	〃	1.70	1.40	0.76	1.45
PAM	〃	〃	0.78	0.68	〃
Nicotinic acid	〃	0.06	0.04	0.04	0.01
Ca pantothenate	〃	0.05	0.03	0.07	0.03
Biotin	1	0.04	0.07	0.08	0
Folic acid	〃	0.03	0.05	0.11	0.03
PABA	10	〃	0.06	0.06	0.01
B ₁₂	1	0.07	〃	0.02	0.02
Inositol	1,000	0.04	0.05	0.10	〃
Base**	100	1.25	0.02	0.07	〃
Th***	1,000	0.05	0.05	0.09	〃
Leucovolin	1	—	0.06	—	0.04

* Expressed by turbidity.

** Mixture of adenine, guanine, uracil, and xanthine in equal amount.

*** Thiazole portion of thiamine.

述べた基礎培地は少なくとも OMP などのアンチビタミン B₆ 物質の研究に適当なものであろう。著者の用いた培地においては *L. arabinosus* のみが B₆ を必要としなかつたし OMP 阻害も見られなかつた。このことは *L. arabinosus* が B₆ を生合成する能力を有しているために、OMP 阻害を回復するに必要な量の B₆ を合成しその結果増殖阻害が見られないのではないかと考えられる。

OMP による増殖阻害をうけた 4 種の乳酸菌に対して、B₆ 群のみが特異的に OMP と拮抗することは注目すべき事実で、乳酸菌が栄養要求の点で極めてきびしいという一般的知見と一致する。B₆ 群の中では PAL と PAM が極めて強力で、PIN はこの両者に比して弱いまたは菌によつては *St. faecalis* のように全く拮抗力を示さないものもある。これらの関係については後報で詳述する。なお *L. casei* は OMP による阻害がアデニン、グアニン、キサンチン、ウラシルの混合物によつてかなりの回復を示し、乳酸菌の中でも特異の地位を占めるが、本報ではこの事実を示すにとどめる。

上に述べたことからマウス、ラット、酵母などで見られた OMP と B₆ の拮抗現象は乳酸菌の増殖についても明らかであつて、この現象が広い範囲の生物種についてみられる一般的なものであることが示される。

終りに終始懇篤なる御指導を賜つた恩師秋谷七郎先生、この研究に御鞭撻、御配慮を賜つた国立衛生試験所刈米達夫所長、小川俊太郎部長、野崎泰彦部長に深く感謝する。

国立衛生試験所