

溶連菌に於ける物質代謝，就中 Streptolysin S 産生に対する糖類の無関係性に就いて

第 1 篇

溶 連 菌 の 瓦 斯 代 謝 に 就 い て *

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

梅 崎 伸

（受付：昭和31年4月21日）

緒 論

1939年、岡本教授¹⁾が「核酸による溶連菌の溶血毒増産現象（核酸効果）」を指摘して以来、溶連菌溶血毒 Streptolysin S（以下“S”と略記）に関する研究は劃期的展開を示すに至つた。爾来，“S”の分離、精製及び安定化が試みられ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾、その本質並びに溶血機序に関する研究報告は今日既に数多い。一方核酸効果も各方面から吟味されると共に、溶連菌の“S”形成機構に関与する因子及び代謝経路の解明手段として利用されている。Bernheimer⁶⁾⁷⁾は“S”の前段階物質が“S”となるには、菌の含水炭素代謝過程を通してか、又はその他の代謝過程を通してかに就き検討し、核酸効果には含水炭素がエネルギー供給源として不可欠であると報告し、一方細谷、江上等⁸⁾は、含水炭素の存在が証明されない状態でも“S”産生が増強されると述べ、伊藤⁹⁾は核酸効果に含水炭素の必

要性を全く認めないと報告している。

私は検圧法を用い、溶連菌の各種基質代謝と核酸効果との関係につき検討を進めた処、核酸効果は含水炭素の存在を直接必要とせず、“S”増産現象と呼吸とは一応別箇の現象であり、加うるにブイヨン中に溶血毒増産に有効な微量の物質の存在を推定し、且つそのものは核酸又は含水炭素以外の物質であろうとの結論に達した。以下その成績を報告する。

溶連菌の物質代謝の解明は各方面からの総合的追求により始めて可能であるが、溶連菌の瓦斯代謝に関しての報告は極めて少ないので、私は先ず Warburg 氏検圧法により、基礎的研究として実験条件の吟味を行い、次いで種々の基質に対する好氣的及び嫌氣的条件下で瓦斯代謝を検索した。

実 験 方 法

1) 呼吸測定法^{10,11)}：Warburg 検圧法は、単一検圧計を使用して旧法に従い、酸素消費量或は炭酸ガス発生量を測定した。即ち、容量約 15ml の円錐状容器を用い、主室に通常 M/15 Soerensen 磷酸緩衝液(多

くの場合 pH7.4) 1.0ml 及び静止溶連菌浮游液 1.0 ml を、側室には供試添加物質溶液 0.5ml を入れた。尚好氣的代謝の場合は副室に 10% KOH 0.3ml 添加した。瓦斯腔は好氣的代謝の場合は空気、嫌氣

* 本論文の要旨は昭和30年10月、第9回日本細菌学会北陸地方支部集會に於て発表した。

的代謝の場合は5%の比率に炭酸ガスを含む室素ガスで充たし、38°Cの恒温槽で20分間予備振盪後、側室内容を主室に混和し、爾後120分間20分毎に圧の変化を観察した。測定時の検圧計の振巾は5cm、振動数毎分120回とした。酸素消費量 X_{O_2} (又は炭酸発生量 X_{CO_2})は10mg乾燥菌重量に換算して示した。

2) 供試菌株：溶血性連鎖球菌S株 (金沢大学医学部薬理教室より分譲)

3) 使用培地：10% Na_2CO_3 溶液を以てpH7.4~7.6に修正した普通ブイヨン。

4) 菌浮游液の調製：普通ブイヨン (pH7.4) 2.0ml に1白金耳の菌を接種し、24時間培養後、充分振盪し、その0.5mlを300mlのブイヨンに接種し、10~12時間37°Cにて培養した後、リングル氏液で2回遠心洗滌し、光電比色計を使用して、菌濃度が10mg乾燥菌重量/mlになる如くしM/15 燐酸緩衝液 (pH7.4)に浮游せしめた。

5) 濁度測定には島津光電分光光度計 QB-5D 型を使用した。

6) 供試添加物質溶液の調製：酵母核酸 (Merck)、グルコサミン (科研)、葡萄糖、果糖、マルトース、

乳糖、焦性葡萄糖ソーダ、エチルアルコール、n-ブチルアルコール、乳酸ソーダ、酪酸ソーダ、グルタミン酸ソーダ (何れも規格品) を添加物質とし、各M/15燐酸緩衝液 (pH7.4) によつて終末所要濃度より5倍濃く調製した。

7) 推計学的観察法：平均値の差の検定には、次式に拠つて $\alpha=0.05$ としてF分布の表により検定を行った。¹²⁾

i) 母分数の検定：

$$\mu^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{i=1}^M (x_i - \bar{x})^2$$

$$V^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$$

$$F_0 = \frac{u_2}{v_2} \quad n_1 = M - 1, \quad u_2 = N - 1$$

ii) 差の検定：

$$w^2 = \frac{n_1 u_2 + n_2 v^2}{n_1 + n_2}$$

$$F_0 = \frac{(\bar{x} - \bar{y})^2}{w^2} \left(\frac{MN}{M+N} \right), \quad n_1 = 1, \quad n_2 =$$

$$M+N-2$$

実験成績

[I] 実験条件の吟味

1) 連溶菌の増殖曲線の検討：島津光電分光光度計により、溶連菌を接種したブイヨンの濁度を逐時的に測定し、Table 1 及びFig. 1に示す増殖曲線を得た。即ち、菌接種4時間以後急激に対数的上昇を示し、菌接種後13時間にて略々一定値に達する。かくして得た増殖曲線は、Gale¹³⁾ も述べている如く、細胞物質の量を示すものと解すべく、且、酵素の消長は生細胞数の多寡に関係なく、細胞物質の量と関連するから、私はこの曲線を基として以下の実験では特に記さぬ限り12時間培養の静止菌を使用した。

2) 生菌数の推移：溶連菌の外界に対する抵抗性は可成り弱く、ために実験中、細胞の活性が問題となつて来る。葡萄糖を基質として呼吸を観測すること、60分を限界として以後酸素消費量は激減する。このことは生菌数の減少が原因ではないかとの見地より (i) 溶連菌浮游

液作製直後 (ii) Warburg 検圧法に於いて予備振盪20分間の後 (iii) 検圧的観測60分間の後、(iv) 検圧的観測120分間の後、並びに(iii) 及び(iv)の対照として、夫々それと同じ時間孵卵器内に静置せるもの、計6つの場合につき血液寒天平板を使用して生菌数の測定を行い、Table 2の如き成績を得た。即ち、振盪の有無に拘らず、時間と共に生菌数は減少し、120分後の菌数は菌浮游液作製直後に比し、約1,000になることを認めた。この事実は溶連菌の抵抗性の弱さを示し、検圧法に於ける呼吸曲線の変動に対する一要因であることは想像に難くない。

3) 菌の浮游液を異にせる場合の呼吸曲線の比較：リングル氏液 (pH 6.8)、リングル燐酸緩衝液 (リングル氏液4容、燐酸緩衝液1容を混和したもの、pH 7.2) 及び燐酸緩衝液 (pH 7.4) の三者を浮游液に使用した場合の溶

連菌の内部呼吸を比較するに Table 3 及び Fig. 2 の如く大差なく, 僅かにリンゲル-磷酸緩衝液に浮游した場合, 他三者より酸素消費は多かつた。然しながら之等三者に葡萄糖を基質として添加すると, 磷酸緩衝液に浮游した場合, 他の二者よりも酸素消費量は大きであつた。一般に溶連菌の酸素消費量は基質の添加により内部呼吸に比し甚だしく増加し, 菌浮游液は漸次酸性に傾く。後述の如く, pH の呼吸に及ぼす影響は可成り強く, 且つ, 浮游液の緩衝能はリンゲル氏液<リンゲル-磷酸緩衝液<磷酸緩衝液であつたので, 菌体を磷酸緩衝液に浮游するのが, pH の安定の上に最適で, 以下之を使用することにした。

4) pHによる呼吸の変動: M/15 磷酸緩衝液を使用し, pH5.3, 6.2, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0及び 8.3 の菌浮游液を作り, 之に葡萄糖を添加して溶連菌の酸素消費量を検討した結果, pH7.2~7.6で最高酸素消費量を示し, pH 6.8及び8.0が之に次ぎ, pH8.3, 6.2及び5.3の順に低下を認めた。(Table 4, Fig. 3) pHは細菌の発育, 酵素活性に重大なる関係を有し, 溶連菌の至適 pH は7.4~7.6なることを認めたので, 以下の実験では比較的至適条件を保持するため, 菌浮游液は初期pHを7.4として使用した。

5) 菌濃度を異にせる場合の呼吸曲線の変動: 菌浮游液中の菌量と酸素消費量とは他の条件が一定なる場合, 理論的に比例すべきである。私は乾燥菌重量2.5, 5.0, 10.0, 14.0及び48.0mg について葡萄糖代謝を比較した。その成績は Table 5, Fig. 4 に示す如くで, 大体菌量に比例した酸素消費が認められたが, 乾燥重量 48.0mg の如く大量の菌を使用した場合は20分を過ぎると呼吸量の著しい低下が目立ち, 2.5及び5.0mg の如く少量の菌を使用した場合は Q_{O_2} が過大となる傾向があつた, 菌量の大きな場合, 代謝産物が速かに蓄積し, それが呼吸に対し抑制的に作用するものと推定される。又寡少の菌量使用の場合, Q_{O_2} が大きくなることに対しては適当な解釈を得ていない。ともあ

れ, 10.0~14.0mg の菌量が呼吸測定に最適であり, 次篇に述べる溶血試験に必要とする菌量と略々一致するので, 呼吸の検索及び他の実験共にこの菌量を使用することとした。

6) 浮游液の量を異にせる場合の呼吸曲線: 同一菌量を磷酸緩衝液の 2.0ml 及び2.5ml にそれぞれ浮游して葡萄糖代謝に於ける酸素消費量を比較するに, 後者に於て僅かに多く, pH の変動も少かつたので, 以下この量を使用した。2.5ml 以上の量は容器の大きさの関係上使用不可能であつた。(Table 6, Fig. 5)

7) 培養発育令による呼吸曲線の比較: 6, 12, 18 及び 30 時間培養溶連菌の酸素消費量は Table 7 及び Fig. 6, 7 の如くで, 基質の如何によらず12時間培養菌が最も高値を示した。

〔Ⅱ〕 溶連菌の各種基質に於ける好気性瓦斯代謝に就いて

前に述べた実験条件の検討により最適実験条件は普通ブイオン (pH7.4) 12時間培養の静止溶連菌を乾燥重量で10.0mg 採り, pH7.4の磷酸緩衝液 2.5ml に浮游させたものであることが判つた。かかる条件にて種々の基質添加時の酸素消費量を測定した成績は次の如くである。添加基質最終濃度は糖類及びグルコサミンでは0.2%, 酵母核酸は1%, 他の物質はM/25である。

1) 溶連菌の内部呼吸: 120分間の酸素消費量 X_{O_2} は10乃至20cmmを越えず, デニトロフェノール($5 \times 10^{-5}M$)添加によつても何ら呼吸曲線に変化はなかつた。(Table 8, 9 Fig. 8, 9)

2) 含水炭素を基質とした場合 (Table 8, Fig. 9)

(a) 葡萄糖: 酸素消費量は検圧開始後40分間は略々直線的に増加し, 60分頃より減退が見られた。120分間の酸素消費量は約 180cmm であつた。又120分後の菌浮游液の pH は5.8乃至6.2であつた。溶連菌の葡萄糖代謝に於いて, 肺炎双球菌に於ける Sevag の理論¹⁴⁾ が適用されるかどうかを検討するために血液カタラーゼ¹⁵⁾ を1%に加えた処, 僅かに呼吸量の増加を

認めたのみで、葡萄糖代謝産物として H_2O_2 が産生され呼吸を阻害すると見做すべき成績は得られなかつた。又、同様な意味で血液カタラーゼの代りに焦性葡萄糖ソーダを 0.2% に加えたが、同じ結果を得た。次に各種の酵素阻害剤が葡萄糖代謝に如何なる影響を及ぼすかを検する為に KCN ($2 \times 10^{-2}M$)、 NaN_3 ($5 \times 10^{-3}M$)、NaF ($1.5 \times 10^{-2}M$)、 $HgCl_2$ ($3 \times 10^{-6}M$)、ジニトロフェノール ($5 \times 10^{-5}M$) 及びモノ沃度醋酸 ($4 \times 10^{-5}M$)^{註1)} を夫々添加して酸素消費を見た所、ジニトロフェノールは殆んど酸素消費を阻害せず、増加をも招来しなかつた。モノ沃度醋酸と KCN は約 40%、 $HgCl_2$ は 50%、 NaN_3 は約 60% の阻害を示し、NaF は徐々に阻害度を減ずるも、120 分間での阻害率は約 70% に達し、最も著しかつた、(Table 10, Fig. 11)

なほ、溶連菌 S 株はスペクトル分析により、Cytocrome 系を全く欠いていることを確認した。

(b) 果糖：酸素消費量及びその呼吸曲線は略々葡萄糖の場合と似ている。

(c) マルトース：葡萄糖、果糖と同様な呼吸曲線を示したが、60 分後も呼吸の減弱は前二者に比し少く、酸素消費量は 120 分間に約 260 cmm を示し、供試した含水炭素中最大の酸素消費を示した。

(d) 乳糖：供試糖類中、最も酸素消費少く 120 分間で約 120 cmm を示し、80 分迄は略々直線的に増加したが、以後増加率は僅かに減減した。

(e) グルコサミン：溶連菌溶血毒産生に密接な関係を有するとされている⁶⁾⁷⁾ グルコサミンを基質として添加した場合の酸素消費量は、120 分間で 90~100 cmm で、上記 4 種の糖類に

比し、最低値を示したが、検圧時間 (120 分間) 内では後期に呼吸の減退を示すことはなかつた。

3) アルコール類を基質とした場合 (Table 8, Fig. 10)

(a) エチルアルコール：酸素消費量は約 40 cmm で時間の経過と共に呼吸量が徐々に減退した。

(b) n-ブチルアルコール：エチルアルコールに比し、酸素消費量は僅かに多く、120 分間に 50 cmm を越した。

4) 乳酸ソーダ及び焦性葡萄糖ソーダを基質とした場合：酸素消費量は、乳酸基質の場合 120 分間に約 30 cmm を示したが、焦性葡萄糖基質時では僅少であつた。(Table 8, Fig. 10)

5) 酪酸ソーダ及びグルタミン酸ソーダを基質とした場合：何れも焦性葡萄糖の場合と同じく、酸素消費量は 120 分間で僅かに 10 cmm を越える程度で、基質代謝による酸素消費に帰するには疑問があつた。(Table 8, Fig. 10)

6) 核酸を基質とした場合：核酸ソーダを基質とした 120 分間の酸素消費量は 70~80 cmm であつた。(Table 8, Fig. 10)

〔Ⅲ〕 溶連菌の各種基質に於ける嫌気性瓦斯代謝に就いて

燐酸緩衝液の代りに重炭酸ソーダ (0.1M) — 燐酸緩衝液を菌浮游液とし、瓦斯発生を測定した成績が Table 11 及び Fig. 12 である。炭酸ガス発生量は 0.2% に葡萄糖添加の場合約 50 cmm (120 分間) で、同濃度のマルトースの場合は 40 cmm を示し、グルコサミンでは殆んど瓦斯発生が認められなかつた。1% に核酸ソーダを添加した場合は約 30 cmm の炭酸ガス発生を認めた。

註 1) 之等阻害剤の濃度は Bernheimer が核酸効果阻止率 50% と報告しているものである。

総括並びに考按

幾多諸家¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾は、一般細菌の物質代謝に関する広範な研究に於て、菌種によつては独自の代謝系を有すると指摘している。

私は溶血毒産生の特異性を有する溶連菌の物質代謝を核酸効果との関連性に於て検索せんとして、先ず、基礎的研究として実験条件の撰定並びに各種基質添加時の瓦斯代謝につき検討した。その成績を総括すると、

〔I〕 実験条件：培地より得る生菌体の発育令（菌の培養せる時間）は発育減退期から極静止期に相当する12時間のものが好ましく、酸素消費能や溶血毒産生能（第2篇参照）からも培養時間は12時間が最適で、6時間、18時間及び30時間培養菌に比し優つていた。

細菌の発育には至適条件があり、Hall and Fraser²⁵⁾は溶連菌の発育可能pHは4.5~8.0であるとし、多くの成書でも至適pHは7.4~7.6としている。

一方静止菌ではpH 7.2の浮游液が使用される場合が多いが⁹⁾、種々のpHに於ける葡萄糖代謝による酸素消費量はpH 7.2~7.6が最高であり、pH 6.8及び8.0は若干劣つた。糖代謝の結果は可成り酸性に傾き、酸性度が増すと酸素消費が低下するので、検圧法を使用する場合はpH 7.4が望ましい。又、静止溶連菌体浮游液の種類もリンゲル氏液とリンゲル-磷酸緩衝液の場合、両者の差少く、磷酸緩衝液の場合が前二者より優るのは、pH調節能力差によるものであろう。一ケの円錐容器中に入れる菌量は葡萄糖酸化より見るに、少なきに過ぎると不正確となり、大量では呼吸の急激な低下が検圧途次に認められる。溶血試験（次篇参照）に用いる菌量は大体10mg乾燥重量であるとされている⁹⁾が、この濃度の菌液では酸素消費量は概ね時間と比例し、検圧的測定には最適と思われる。

〔II〕 溶連菌の物質代謝：溶連菌の内部呼吸は甚少で、含水炭素添加により、酸素消費量は増大する。菌は発育に必要なエネルギーを主として環境中の炭水化物代謝より得ているが、この代謝には好氣的酸化過程と嫌氣的過程とがある。含水炭素基質時の酸素消費量は可なり多量とはいえ、理論値一添加した27.7 μ M葡萄糖が完全に酸化すれば約3,700cmmの酸素を消費する一に比較すると遙かに少なかつた。

Sevag¹⁴⁾は肺炎双球菌の葡萄糖代謝に於て、理論値より遙かに少い酸素消費量が、カタラーゼ又は焦性葡萄糖を加えることにより著しく増加する事実を指摘し、この呼吸阻害はH₂O₂の蓄積に起因していると報告した。

本実験に於てはカタラーゼ及び焦性葡萄糖を添加しても、殆んど呼吸曲線に変化なく、H₂O₂蓄積による呼吸阻害は考えられなかつた。

Avery and Morgan²⁶⁾は23株の溶連菌について Peroxidase 反応を調べ、中35%は陰性であつたと報告している。然し、細菌によつて作られるH₂O₂が極めて微量でも毒性を示して代謝に影響する可能性は否定出来ない。

葡萄糖が細菌により焦性葡萄糖となり、更にKrebsのCycle¹⁸⁾に移行するかどうかは現在明かでないが、大多数の溶連菌は簡単な葡萄糖酸酵を行い、理論的に略々等しい乳酸を発生している¹³⁾註2)。

又、葡萄糖が好氣的な酸化過程を通つて分解されるのならば、その代謝は一層複雑となつて来る。

検圧120分後の菌浮游液の酸性化はGale¹³⁾が述べている如く、各種の代謝終末物質の産生を推察させ、メヂウムの酸性化及び生菌数の減退—勿論生菌数と酵素活性が緊密に平行するとは限らないが—が共に菌の代謝を阻害するものと思考する。デニトロフェノール添加により内部

註 2) *S. faecalis* を用いての実験で、乳酸は水解反応（不同変化）により焦性葡萄糖から作られることが証明されている。¹⁵⁾

呼吸及び葡萄糖酸化に於ける酸素消費量の増加をみず、酸化的同化 (oxidative assimilation) の過程も否定出来る。溶血毒自体の影響は核酸効果によつても(後述)、呼吸量の減退を見ない点から阻害性は否定される。

以上溶連菌の葡萄糖代謝を一括して見るに、(i) Cytochrome 系を有しないこと。(ii) 種々の酵素阻害剤により、多少の差はあれ、阻害されること。(iii) 酸素を消費して可成りの酸発生を見ること。(iv) 嫌氣的過程では CO_2 の発生は少いこと。等を考え合わせると、所謂 Embden-Meyerhof 径路より Cytochrome 酸化系に向う代謝様式とは異つた酸化過程一例えば Embden-Meyerhof 径路に於て O_2 を受容し CO_2 を発生する如き一を認めざるを得ないが、その解明には尚幾多の検討が必要であらう。

他の含水炭素として、マルトース、果糖、乳糖及びグルコサミンを夫々基質とした場合に就いての検討でも、葡萄糖の呼吸曲線と大同小異で、酸素消費量は理論値より少なかつた。

グルコサミン代謝に関しては Bernheimer⁷⁾ は、90分で75%が消費され、その中の65%に相当する乳酸が認められ、一方葡萄糖は60分で利用されたと述べ、この事実は“S”が合成培地に現われる間の溶連菌の活性的含水炭素代謝を示すものとして、含水炭素を“S”産生に必要なエ

ネルギー源であると結んでいる。之に就いては私は些か見解を異にする成績を得ているが、詳細に関しては次篇で述べる。

又、アルコール類、焦性葡萄糖、乳酸、酪酸及びグルタミン酸を基質とした場合の酸素消費量は含水炭素のそれに比し遙かに低い値を示した。

動物組織、酵母及び或種の細菌が葡萄糖代謝に於いて焦性葡萄糖を生じ、¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾溶連菌に於いては乳酸菌及び一部の細菌と同じく単純なる葡萄糖代謝が行われ、乳酸を生ずるといわれており、¹³⁾ 乳酸や焦性葡萄糖が更に酸化されて所謂 TCA-Cycle に移行し得るかどうかは甚だ注目される所であるが、実験成績は寧ろ否定的であり、酸素消費が如何なる機構によるかは本実験範囲では残念乍ら明かにし得なかつた。この点に関する詳細な検索は今後に俟たなくてはならない。

尚、酵素阻害剤が葡萄糖酸化を或る程度阻害したことは、溶連菌には硝酸還元酵素がないとされている知見²⁷⁾ と併せ考えると、葡萄糖代謝に於ける酸素消費が所謂 “intact cell” に於ける複雑な酵素系の化学変化に基いており、幾多の複雑な問題を含んだものと解しなければならぬ。

結 論

私は静止溶連菌 S 株浮游液を用いて各種基質の代謝を検圧法にて検索し、次の成績を得た。

1) 溶連菌物質代謝の検圧法的実験条件としては、普通ブイヨン (pH7.4) 12時間培養菌 10 mg(乾燥菌量)を 2.5ml の磷酸緩衝液 (pH7.4) に浮游するのが最も適切であつた。

2) 溶連菌の内部呼吸は僅少であつた。

3) 含水炭素を基質とした時の酸素消費量は他の物質を基質とした時に比し大であつたが、理論値より甚だ少く、相当量の酸発生を伴つた。該酸素消費は、カタラーゼ、焦性葡萄糖及びデニトロフェノール添加により増大せず、

KCN, NaN_3 , NaF, HgCl_2 及びモノ沃度醋酸添加により減少した。

4) 嫌氣的過程では、葡萄糖及びマルトースを基質とした場合少量の瓦斯代謝を認めたが、グルコサミンを基質とした場合は殆んど認められなかつた。

5) アルコール類、乳酸、焦性葡萄糖、グルタミン酸等を基質とした場合、酸素消費量は、含水炭素基質時に比し少なかつた。

6) 核酸を基質とした時の酸素消費量は可成り大であつたが、含水炭素を基質とした時に比し少なかつた。

文 献

1) Okamoto, H. : Jap. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 12, 167, 1940. 2) Okamoto, H., Kyoda, S. und Ito, R. : Jap. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 14, 99, 1941. 3) Cinander, B. and Pillemer, L. : J. Exp. Med., 92, 129, 1950. 4) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 92, 129, 1950. 5) 岡本肇 : 細胞化学シンポジウム, 3, 1954. 6) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948. 7) Bernheimer, A. W. : ibid., 90, 373, 1949. 8) Hosoya, S. et al. : Jap. J. Exp. Med., 20, 25, 1949. 9) Ito, R. et al. : Jap. Med. J., 1, 253, 1948. 10) 藤田秋治 : 医学微生物学領域に於ける検圧法とその応用, 岩波書店, 1949. 11) Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. : Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 1949. 12) 増山元三郎 : 少数例の纏め方と実験計画の立て方, 河出書房, 1949. 13) Gale, E. F. : The Chemical Activities of Bacteria, 1951. 14) Sevag, M. G. : Biochem. Z., 267, 211, 1933. 15) 大谷武男 : 実験酵素化学, 271, 1944. 16) 奥貫一男 : 醗酵, 河出書房, 1949. 17) Baldwin, E. : Dynamic Aspect of Biochemistry, Cambridge University press., 1946. 18) Krebs, H. A. : Adv. in Enzymol., 3, 191, 1943. 19) Meyerhof, O. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 45, 377, 1944. 20) Meyerhof, O. und Kiesseling, W. : Biochem. Z., 276, 239, 1935. 21) Stephenson, M. : Bacterial Metabolism, 1949. 22) Barker, H. A. and Doudorff, M. : Ann. Rev. Biochem., 15, 475, 1946. 23) Clifton, C. E. : Adv. in Enzymology, 6, 269, 1946. 24) Stotz, E. : Adv. in Enzymology, 5, 129, 1945. 25) Hall, I. W. and Fraser, A. D. : J. Path. and Bact., 25, 19, 1922. 26) Avery, O. T. and Morgan, H. J. : J. Exp. Med., 39, 275, 1924. 27) Egami, F. and Murakami, E. : J. Biochem., 37, 73, 1950.

Table 1 Growth of *Streptococcus haemolyticus* in bouillon as measured by densimeter

Age of culture (hrs)	2	4	6	8	9	10	11	12	15	20	24
Density (%)	0	0.6	4.0	10.6	14.6	16.2	19.3	25.5	23.5	23.0	23.5

Fig. 1 Growth curve of *Str. haemolyticus* (culture medium : bouillon (pH 7.4))

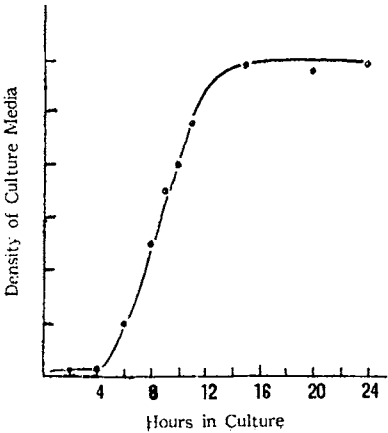


Table 4 Relation of glucose oxidation to
 pH of media

Reading taken after (min.)	pH	Oxygen up-take X_{O_2} cmm						
		5.3	6.2	6.8	7.2	7.6	8.0	8.3
20		13.5	26.6	39.7	49.6	50.5	45.0	33.0
40		26.0	63.2	81.2	97.8	98.5	79.5	66.8
60		30.1	75.5	113.7	132.6	132.0	113.0	92.4
80		31.0	81.7	143.0	158.8	158.0	142.5	110.6

Fig. 3 Relation of glucose
 oxidation to pH of media

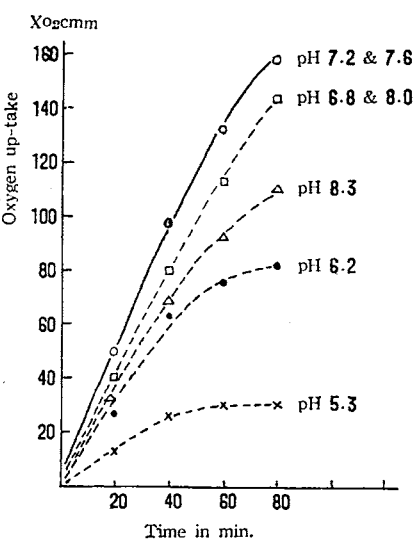


Table 5 Relation of glucose oxidation to
 concentration of cocci
 (Substrate : Glucose)

Reading taken after (min.)	Dry weight (mg)	Oxygen up-take X_{O_2} cmm				
		2.5	5.0	10.0	14.0	48.0
5		•	•	•	•	70.5
10		26.0	30.5	55.5	63.0	93.0
20		41.2	43.5	78.0	91.0	113.0
40		57.5	62.5	100.5	114.5	127.5
60		70.0	76.0	124.0	138.0	137.5
80		75.0	86.0	144.0	159.0	147.0

Fig. 4 Relation of glucose
 oxidation to concentration
 of cocci

(Substrate : Glucose)

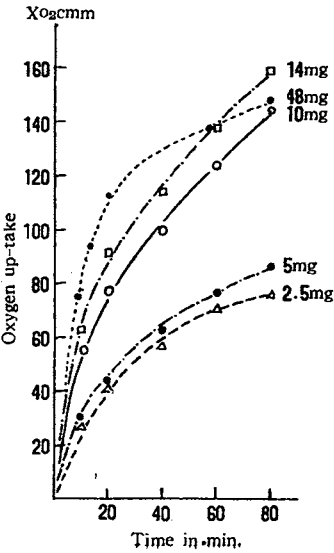


Table 6 Relation of respiration to total volume of medium (Substrate : Glucose)

Reading taken after (min.) \ Volume of fluid in vessel (ml)	Oxygen up-take X_{O_2} cmm	
	2.2	2.7
10	23.2	24.5
20	51.5	50.1
30	78.1	77.6
40	96.2	99.7
50	104.1	113.2
60	108.1	120.2
80	111.8	127.2

Fig. 5 Relation of respiration to total volume of medium

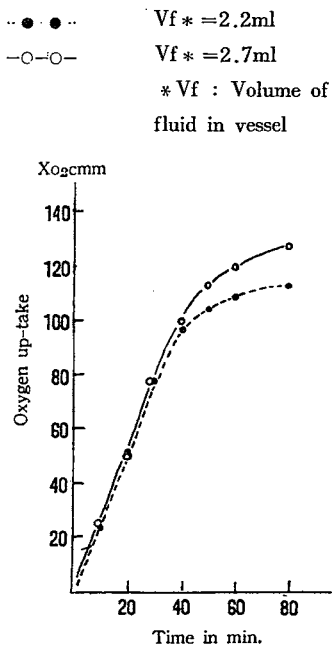


Table 7 Alternation of respiration with different aged *Str. haemolyticus*

Substrates tested → Age of culture (hrs) → Reading taken after (min.) ↓	Oxygen up-take X_{O_2} cmm									
	Glucose				Maltose			Nucleic acid		
	6	12	18	30	12	18	30	6	12	30
20	31.0	48.5	36.0	32.2	58.6	35.7	37.5	10.0	17.0	11.2
40	55.7	98.3	70.0	68.6	118.8	82.0	75.5	16.0	30.5	24.7
60	79.8	130.4	90.0	98.4	158.8	122.0	114.7	21.2	41.0	38.0
80	97.5	153.4	110.5	112.6	203.3	148.0	149.0	25.3	55.0	49.8
100	109.2	168.0	130.5	125.2	234.2	168.7	175.8	28.2	65.4	59.8
120	121.3	179.8	149.5	137.0	254.4	186.2	192.3	30.0	71.0	66.0

Fig. 6 Relation of respiration to
 age of culture (1)
(Substrates : Nucleic acid and Maltose)

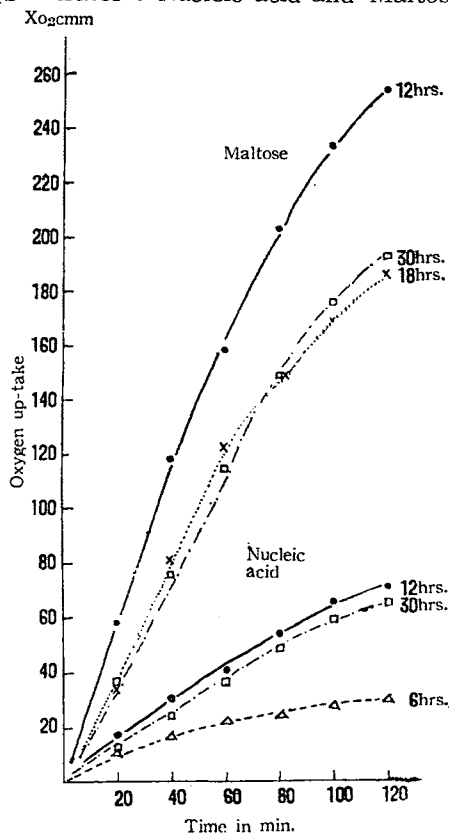


Fig. 7 Relation of respiration to age of culture (2)
(Substrate : Glucose)

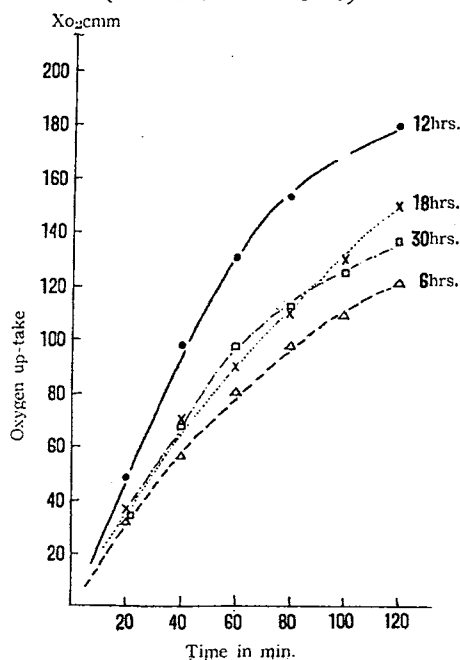


Table 8 Respiration of *Str. haemolyticus* in media containing various substrates

Substrates tested		Oxygen up-take X_{O_2} cmm											
Reading taken after(min.)	Endogenous respiration	Glucose	Maltose	Glucosamine	Fructose	Lactose	Nucleic acid	Lactic acid	Ethyl-alcohol	n-Butyl-alcohol	Pyruvic acid	Butylic acid	Glutamic acid
20	3.0	48.5	58.6	9.7	59.0	28.0	17.0	11.9	16.2	15.8	3.7	1.5	2.5
40	5.0	98.3	118.8	23.5	102.0	52.8	30.5	21.3	20.4	28.1	6.4	3.7	5.5
60	8.0	130.4	158.8	38.4	138.2	74.0	41.0	24.6	28.1	37.1	8.5	8.9	7.0
80	9.0	153.4	203.3	56.0	160.2	95.8	55.0	26.1	31.9	43.5	10.0	8.9	8.0
100	10.0	168.0	234.2	69.4	175.0	112.2	65.4	29.0	35.5	48.5	12.0	9.1	8.9
120	11.0	179.8	254.4	87.8	187.0	123.0	71.0	30.2	35.8	52.3	12.5	11.0	10.9

Table 9 Influence of Dinitrophenol upon endogenous respiration of *Str. haemolyticus*

Regding taken after (min.)	Endogenous respiration (Xo ₂ cmm)	Dinitrophenol added (Xo ₂ cmm)
20	1.4	1.4
40	2.5	2.6
60	3.7	3.6
80	5.0	4.6
100	5.7	5.7
120	6.8	6.1

Fig. 8 Influence of Dinitrophenol upon endogenous respiration of *Str. haemolyticus*

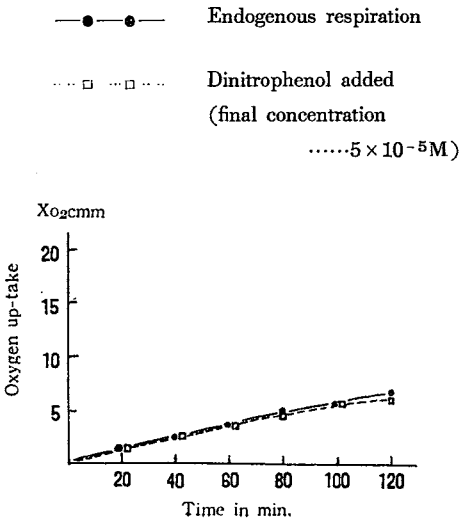


Fig. 9 Respiration of *Str. haemolyticus* in media containing various substrates I.

The final concentration of carbohydrates added was 0.2%.

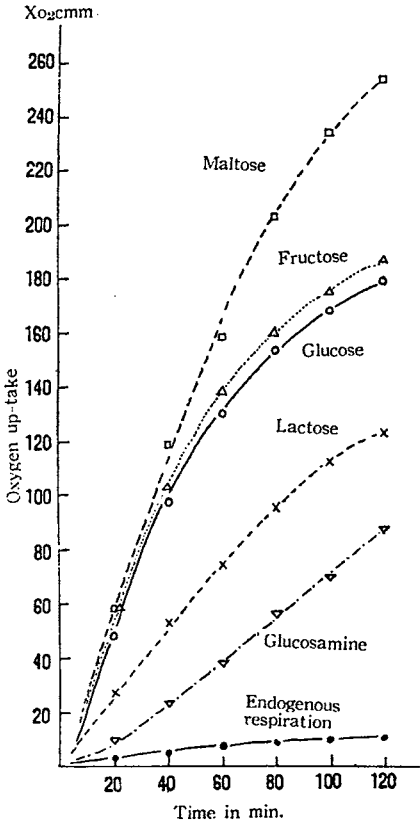


Fig. 10 Respiration of *Str. haemolyticus* in media containing various substrates II.

The final concentration of substrate added was as follows :

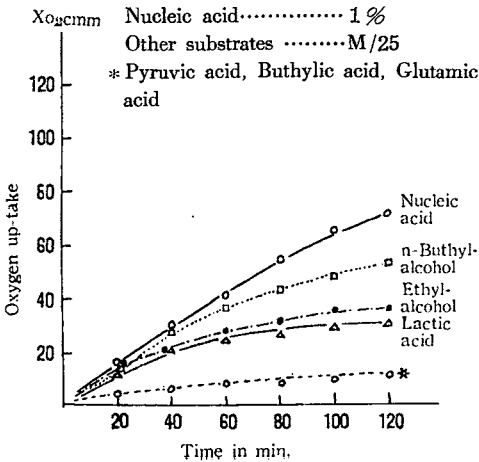


Table 10 Influence of various enzyme inhibitors upon glucose oxidation

Reading taken after (min.)	Oxygen up take X_{O_2} cmm						
	Control	KCN	NaN_3	NaF	$HgCl_2$	Dinitrophenol	ICH_2COOH
20	43.7	26.4	21.4	1.5	33.0	44.2	35.8
40	86.5	56.5	40.7	5.7	53.7	83.3	64.9
60	120.5	80.7	49.5	14.7	65.9	114.8	80.4
80	149.9	86.1	59.8	26.1	73.9	137.8	88.3
100	168.0	92.5	68.0	36.9	79.4	157.3	95.2
120	182.1	93.6	72.0	50.8	85.5	172.3	99.9

The final concentration of inhibitors added was as follows :
KCN..... $2 \times 10^{-2}M$ NaN_3 $5 \times 10^{-3}M$ NaF..... $1.5 \times 10^{-2}M$
 $HgCl_2$ $3 \times 10^{-6}M$ Dinitrophenol..... $5 \times 10^{-5}M$ Monoiodoacetic
acid..... $4 \times 10^{-5}M$

Fig. 11 Influence of various enzyme inhibitors upon
glucose oxidation of *Str. haemolyticus*

The final concentration of inhibitors added was
as follows : KCN... $2 \times 10^{-2}M$ NaN_3 ... $5 \times 10^{-3}M$
NaF... $1.5 \times 10^{-2}M$ $HgCl_2$... $3 \times 10^{-6}M$
Dinitrophenol... $5 \times 10^{-5}M$
Monoiodoacetic acid... $4 \times 10^{-5}M$.

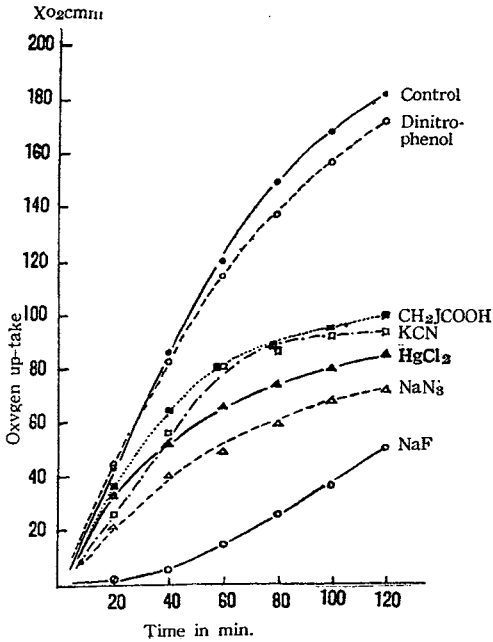


Table 11 Respiration of *Str. haemolyticus* in various substances
under anaerobic condition

Substrates added Reading taken after(min.)	Carbon dioxide given off Xco ₂ cmm			
	Glucose	Maltose	Glucosamine	Nucleic acid
20	12.4	6.8	11.7	19.3
40	26.2	13.8	11.7	20.2
60	38.1	21.3	10.6	23.2
80	47.9	28.7	10.6	23.2
100	53.2	36.3	11.0	25.8
120	54.4	41.2	12.2	27.3

*The final concentration of substrates added was as follows :
Carbohydrates 0.2%, Nucleic acid 1%.

Fig. 12 Gasexchanges of *Str. haemolyticus* in various
substrates under anaerobic condition

The final concentration of substrates added...
...Carbohydrates 0.2%, Nucleic acid 1%,

