

スピロヘータ及びトリパノゾーマの 菌体構成アミノ酸について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷友次教授)

田 上 三 雄

(昭和31年3月9日受附)

(本論文の要旨は第27回日本細菌学会に発表した。)

Amino-acid Compositions of Spirochete
and Trypanosome

Mitsuo Tagami

Department of Microbiology, School of Medicine,
Kanazawa University

(Director : Prof. Tomoji Tani)

緒 言

Consden¹⁾等によりペーパークロマトグラフが考案されて以来、普通培地或いは無蛋白培地より集められる細菌の菌体構成アミノ酸については種々^{2) 3) 4) 5)}報告されているが、人工培養困難なスピロヘータ及びトリパノゾーマの菌体成分についてはまだ報告を見ない。

これらの病原体を純粹にそして又大量に集めることは現在の所困難なことであるが、この病原体の組成を知ることはその物質代謝を知り、

更に人工培養を可能ならしめる上に意義あるものと考えられる。

又近年梅毒血清反応の抗原として Cardiolipin の非特異性について検討され、スピロヘータ自体が抗原として重要視されているとき、その構成成分を追求することは梅毒血清反應用抗原の本体を知るに何らかの役を果すものと思われる。

実験材料並びに実験方法

供試菌株

Borrelia duttonii (原発株)

Trypanosoma gambiense

Treponema pallidum No.36

Leptospira icterohaemorrhagiae

病原体蒐集法

1) *B. dutt.* 及び *Try. gamb.*

マウス累代接種により当教室において継株した *B. dutt.* 及び *Try. gamb.* を用いた。

a) 体重 15gr の健康な白色マウス25匹の腹腔内に1視野に6~7条の *B. dutt.* を含む *B. dutt.* 罹患マウス血液の生理食塩水浮遊液を各々 0.2ml 宛注射

し、接種後 *B. dutt.* の十分増殖せる2日目に全採血し(原発株)、その血液7mlを1%チトラート加生理食塩水 50ml にとる。直ちに1200回5分間遠心し、上清を更に1200回5分間遠心、その上清を4500回30分間遠心、沈渣を生理食塩水で洗滌再び4500回30分間遠心し、油浸鏡を利用して菌数を概算⁶⁾、総数29億条を得た。

b) 体重 15gr の白色マウス25匹の腹腔内に1視野に1~2条の *Try. gamb.* を含む *Try. gamb.* 罹患マウス血液の生理食塩水浮遊液を各々 0.2ml 宛注射し、3日目に全採血し、その血液7mlを1%チトラート加生理食塩水 50ml にとる。直ちに1200回5分間遠

心し、上清を更に1200回5分間遠心、その上清を4500回30分間遠心、沈渣を生理食塩水で洗滌、再び4500回30分間遠心し油浸鏡で菌数を概算し、総数9億条を得た。

c) 対照として健康白色マウス血液7mlを上と同様に処置する。

2) Tr. pall. の蒐集法

当教室において家兎睾丸接種により71代継株したTr. pall. No.36を1視野5条のTr. pall.を含む睾丸組織の生理食塩水浮游液として、0.5ml宛体重3kg前後の成熟家兎5頭の睾丸実質内に接種した。2週間後両側睾丸炎により睾丸の硬く触れる時期に頸動脈切断により全瀉血し、無菌的に睾丸実質をとり出し、梅毒免疫原の製造法⁷⁾に従つてTr. pall.を集めた。油浸鏡で菌数を概算し、総数28億3560万条のTr. pall.を得た。対照として正常家兎睾丸を上と同様に処置した。

3) L. ict. の蒐集法

コルトフ培地600mlで14日培養したL. ict.を4500回1時間遠心し、沈渣を生理食塩水で遠心洗滌し、油浸鏡で菌数を概算し、総数159億条を得た。対照としてコルトフ培地のみを同様に処置した。

加水分解及び試料調製

各試料に8N硫酸30mlを加え、24時間水解、飽和酸化パリウム水でpH6.6にし、遠心、濾過液を水浴上で蒸発乾固し、1mlの蒸留水にとかして試料とした。

総窒素量の測定

各試料につきAzotometrie⁸⁾で総窒素量を測定した。

アミノ酸分析法

2次元ペーパークロマトグラフィにより定性分析を行つた。

第1溶媒：0.5%アンモニア水：フェノール
= 23 : 77

第2溶媒：n-ブタノール：エタノール：水
= 60 : 15 : 25

呈色剤 0.2%ニンヒドリン水飽和ブタノール

展開温度 15°C

展開時間 第1溶媒 24時間

第2溶媒 12時間

メチオニン、シスチンは過酸化水素水で酸化して夫々メチオニンスルホンとシステイン酸にして同定した。又酸分解によりトリプトファンは破壊される⁹⁾ので、その検出は出来なかつた。2次元展開の際のスポットの消失限界量¹⁰⁾の決定により次の6段階の記号をもつてあらわした。

—	
±	
+	原液が消失限界量のもの
++	2倍希釈液が消失限界量のもの
+++	4倍 "
####	8倍或いはそれ以上 "

実 験 成 績

B. dutt. の構成アミノ酸は第1表に示す如く17種のニンヒドリン呈色斑を認め、その中、比較的多く含まれるものは、グルタミン酸、セリン、 α -アラニン、リジン、バリンで特にセリンの含量多くアスパラギン酸は少ない。

Try. gamb. の構成アミノ酸は第1表に示す如く18種のニンヒドリン呈色斑を認め、その中、比較的多く含まれているのは、セリン、 α -アラニン、チロジン、リジン、アルギニン、バリンで、特にチロジン、セリン多く、グルタミン酸は少ない。又 $Rf\left(\begin{matrix} \text{フェノール} & 0.32 \\ \text{ブタノール} & 0.24 \end{matrix}\right)$ の未同定のスポットを認めた。

Tr. pall. の構成アミノ酸は第2表に示す如く19種のニンヒドリン呈色斑を認め。その中、比較的含量の多いと考えられるのはグルタミン酸、チロジン、アルギニンであり、 $Rf\left(\begin{matrix} \text{フェノール} & 0.74 \\ \text{ブタノール} & 0.00 \end{matrix}\right)$ $Rf\left(\begin{matrix} \text{フェノール} & 0.11 \\ \text{ブタノール} & 0.22 \end{matrix}\right)$ の未同定の2スポットを認めた。

L. ict. は第3表に示す如く、18種のニンヒドリン呈色斑を認め、その中、比較的多く含まれるのはチロジン、リジンで弱度ではあるが、 $Rf\left(\begin{matrix} \text{フェノール} & 0.62 \\ \text{ブタノール} & 0.22 \end{matrix}\right)$ に未同定のスポットを認めた。

第 1 表

実 験 例	B. dutt.			Try. gamb.		対 照 マウス正常血清	
	1	2	3	1	2	1	2
総窒素 γ	—	—	310	—	527	—	116
アミノ酸							
シ ス チ ン	±	+	+	±	+	—	—
アスパラギン酸	±	+	+	++	++	—	—
グルタミン酸	++	+++	+++	+	+	—	—
セ リ ン	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
グ リ シ ン	+++	++	++	++	+++	+	++
スレオニン	±	+	±	+	+	—	—
α -アラニン	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
チロジン	+	++	+	+++	+++	±	—
リ ジ ン	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
アルギニン	++	++	++	+++	+++	—	+
ヒスチジン	+	+	+	+	++	—	±
プロリン	++	+++	++	++	+++	—	+
メチオニン	+	++	+	++	++	—	±
バ リ ン	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
ロイシンイソロイシン	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
フェニールアラニン	++	++	++	++	++	—	±
X (フェノール0.32 ブタノール0.24)	—	—	—	+	++	—	—
トリプトファン	()	()	()	()	()	()	()

第 2 表

総窒素 γ	Tr. pall.	対 照
	535	433
アミノ酸		
シ ス チ ン	++	±
アスパラギン酸	++	+
グルタミン酸	+++	±
セ リ ン	+++	+++
グ リ シ ン	+++	+++
スレオニン	+++	++
α -アラニン	+++	+++
チロジン	+++	++
リ ジ ン	+++	+++
アルギニン	+++	++
ヒスチジン	+++	++
プロリン	+++	+++
メチオニン	+++	+++
バ リ ン	+++	+++
ロイシンイソロイシン	+++	+++
フェニールアラニン	++	++
X ₁ (フェノール0.74 ブタノール0.00)	+	+
X ₂ (フェノール0.11 ブタノール0.22)	++	++
トリプトファン	()	()

第 3 表

総窒素 γ	I. ict.	対 照 (コルトフ培地)
	290	100
アミノ酸		
シ ス チ ン	++	—
アスパラギン酸	+	—
グルタミン酸	++	—
セ リ ン	+++	++
グ リ シ ン	+++	+
スレオニン	+	—
α -アラニン	+++	++
チロジン	+++	—
リ ジ ン	+++	—
アルギニン	+++	+
ヒスチジン	+	—
プロリン	+++	+
メチオニン	++	+
バ リ ン	+++	++
ロイシンイソロイシン	+++	+++
フェニールアラニン	++	±
X (フェノール0.62 ブタノール0.22)	+	—
トリプトファン	()	()

総括及び考按

B. *dutt.* 及び Try. *gamb.* は血液に寄生する病原体として、血液成分を欠く状態では増殖困難であるが、このことはこれら病原体の栄養要求や代謝を知る上に障碍となつている。この菌体構成アミノ酸を検討することはこの病原体のアミノ酸代謝及び栄養要求を知るための基礎として意義あるものと考えられる。

著者はこれら病原体感染マウス血液より分離遠心法により病原体を蒐集し、同様の方法で正常マウス血液を処置した際に混入すると考えられる血液成分を対照として、これら病原体の構

成アミノ酸を推定した。

血球成分を含まないコルトフ培地で発育する L. *ict.* の菌体構成アミノ酸も同様に検討した。

この方法によると勿論純粹に病原体のみ集まるとは考えられない。窒素量から考えると被検試料に約 $\frac{1}{3}$ から $\frac{1}{5}$ の正常血液成分が含まれているとしなければならない。

Tr. *pall.* では現在の方法では被検試料に幾分鞏丸組織成分が含まれるから対照との差は余り著明ではなかつた。従つて Tr. *Pall.* の蒐集法には更に検討の余地があるものと考えられる。

結 語

人工培養困難なスピロヘータ及びトリパノゾームについて2次元ペーパークロマトグラフィにより菌体構成アミノ酸の定性分析を試みた。

感染マウス血液より集めた B. *dutt.* (原発株) 及び Try. *gamb.* 並びに梅毒家兎鞏丸より蒐集した Tr. *pall.* の硫酸加水分解を行い、菌体構成アミノ酸について対照試料と比較検討した結果、

a) B. *dutt.* では17種のニンヒドリン呈色班中、比較的多く含まれるのは、グルタミン酸、セリン、 α -アラニン、リジン、バリンで特にセリンの含量多くアスパラギン酸は少ない。

b) Try. *gamb.* では18種のニンヒドリン呈色班中、比較的多く含まれるのはセリン、 α -アラニン、チロジン、リジン、アルギニン、バリ

ンで特にチロジン、セリン多く、グルタミン酸は少ない。又 Rf(フェノール 0.34 / 酢酸ノール 0.24) の未同定のスポットを認めた。

c) Tr. *pall.* ではその蒐集法の改善が必要であるが、19種のニンヒドリン呈色班の中、比較的グルタミン酸、チロジン、アルギニンの含量が多いと考えられる。

d) L. *ict.* はコルトフ培養のものを検討した結果18種のニンヒドリン呈色班中、チロジン、リジンの含量が多く、弱度であるが Rf(フェノール 0.62 / 酢酸ノール 0.22) の未同定のスポットを認めた。

稿を終るに当り御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師谷教授に深く感謝の意を表します。又総窒素量の測定に御援助下さつた谷野学兄に感謝します。

文 献

- 1) Conden, R., Gordon, A. H., and Martin, A. J. P. : Biochem. J., 38, 224, (1944).
- 2) Franklin L. Davis, JR and O. B. Williams : J. Bacteriol. 64, 766, (1952).
- 3) 米村寿男・飯塚三喜 : 日新医学, 39, 621, (1952).
- 4) 飯沼昌男 : 京都府立医科大学雑誌, 52, 543, (1953).
- 5) W. Kellner u. H. Martin : Die Naturwissenschaften, 41,

- 6) 谷友次 : 医学微生物学, 第4版, 307頁, (昭和29), 南山堂.
- 7) 谷友次等 : 日本医事新報, 第1590号, 4295頁, (昭和29).
- 8) 大月理 : 十全医学会雑誌, 42, 7号, (昭和12).
- 9) 赤堀四郎 : アミノ酸及び蛋白質, 第5版, 60頁, (昭和24), 共立出版株式会社.
- 10) 武田スミ・柴谷篤弘 : 科学, 21, 136, (1951).