

# ノカルディアの研究

## 〔第2報〕 ノカルディアの発育及び抗酸性に及ぼすカゼイン水解物及びアミノ酸の影響

(米国ジョージア大学細菌学教室)

N. M. McClung

(京都大学結核研究所細菌血清学部 主任 植田教授)

上 坂 一 郎

第1報<sup>1)</sup>に於て著者はグリセリン、ブドウ糖の様な炭素源はノカルディアの抗酸性に左程影響せず、蛋白が極めて有効である事を確めた。茲に於て、それでは蛋白を構成するアミノ酸の中の何れが抗酸性増強作用に参与して居るのであらうかといふ疑問が起る。本実験はこの疑問を解決するために行つたものである。

### 実験方法

被検菌株：*Nocardia asteroides* 47菌株，*N. brasiliensis* 10菌株，*N. madurae* 2菌株並にその他の *Nocardia species* 10菌株を1%グリセリン寒天斜面に継代(30°C)したものを用いた。

使用培地：有機の窒素源を含まない基礎培地として次の組成を用いた。NaNO<sub>3</sub> 2.0g, MgSO<sub>4</sub> 0.05g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, KCl 0.5g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, 乳糖 10.0g, 蒸留水 1ℓ. この基礎培養液に0.2%の割合に被検アミノ酸を加へ pH7.0 に修正，5c.c 宛分注し滅菌した。cystine はこの濃度では溶解しない為，添加加熱後，濾紙で濾過し更に滅菌した。

使用アミノ酸：次の16種のL型のアミノ酸を用いた。glutamic acid, aspartic acid, lysine, methionine, tryptophane, threonine, histidine, arginine, glycine, serine, phenylalanine, cystine, alanine, leucine, isoleucine, valine 尚 Casein 水解物としては Bacto casamino acids (Difco) を用いた。

ノカルディアを接種された培養液は総て 30°C に2週間培養し，発育した菌膜から塗抹標本を作成，Ziehl-Neelsen 染色を施して検鏡した。

抗酸性の Grade の表示：第1報<sup>1)</sup>で行つたと同じ表示法に依つた。即ち

Grade 0：抗酸菌が全く見られない場合。

“ 1：抗酸菌の全菌数に対する比が1%以下の場合。

“ 2：同比が1乃至10%。

“ 3：同比が10乃至30%。

“ 4：同比が30乃至80%。

“ 5：同比が80%以上。

### 実験結果

#### (1) ノカルディアの発育に及ぼすカゼイン水解物及びアミノ酸の影響

第1表に見る如く窒素源として NaNO<sub>3</sub> のみを含む基礎培液に69株中44株が発育した(63.8%)。処がこの基礎培液に casamino acids, glutamic acid, aspartic acid, lysine, leucine, isoleucine 或は valine を0.2%加へると発育する菌株の数が増加し(chi-square test で highly significant), 且 glutamic acid の場合は殆んどどの菌株が液面をうづめ更に管壁によち上る旺盛な発育を示した。又 methionine 或は histidine によつても対照の基礎培養液よりは significantly に発育を促進された。之に反して tryptophane と arginine を加へると統計学的には non-significant ではあつたがノカルディアの発育をやや阻害するかの感があつた。これは唯，単に発育した菌株の数が少ないばかりでなく菌膜の大きさ，厚さなども貧弱であつた。

(2) カゼイン水解物並にアミノ酸のノカルディア抗酸性に及ぼす影響  
抗酸性について検した結果は第2表に示して

**第1表** カゼイン水解物及びアミノ酸のノカルディアの発育に及ぼす影響 (2週間 30°C 培養)

	発育菌株数	未発育菌株数	雑菌混入	計
Casamino acids	66**	3	0	69
glutamic	68**	1	0	69
aspartic	65**	4	0	69
lysine	65**	4	0	69
methionine	55*	14	0	69
tryptophane	37	32	0	69
threonine	52	17	0	69
histidine	56*	13	0	69
arginine	39	29	1	69
glycine	51	18	0	69
serine	47	22	0	69
phenylalanine	50	19	0	69
cystine	52	17	0	69
alanine	54	15	0	69
leucine	64**	5	0	69
isoleucine	63**	6	0	69
valine	58**	11	0	69

註:\*\* 基礎合成培液との差が highly significant  
\* 同上 significant (chi-square test).

**第2表** カゼイン水解物及びアミノ酸のノカルディア抗酸性に及ぼす影響

	抗酸性の Grade						計
	0	1	2	3	4	5	
基礎合成培液	24	1	3	5	10	1	44
Casamino acids	5	0	4	11	34	12	66
glutamic	7	1	11	12	28	9	68
aspartic	16	3	8	12	20	6	65
lysine	15	7	11	10	15	7	65
methionine	20	6	5	8	11	5	55
tryptophane	11	0	3	4	16	3	37
threonine	20	5	5	10	10	2	52
histidine	16	5	5	9	14	7	56
arginine	12	4	3	7	13	0	39
glycine	6	5	1	11	16	12	51
serine	8	1	4	6	19	9	47
phenylalanine	4	3	6	9	12	16	50
cystine	8	9	5	12	10	8	52
alanine	9	5	10	10	13	7	54
leucine	4	5	6	8	22	19	54
isoleucine	7	4	6	14	28	4	63
valine	3	7	5	13	18	12	58

**第3表** カゼイン水解物及びアミノ酸のノカルディア抗酸性に及ぼす影響

	抗酸性の Grade		計
	0—2	3—5	
基礎合成培液	28	16	44
Casamino acids	9	57**	66
glutamic	19	49**	68
aspartic	27	38*	65
lysine	33	32	65
methionine	31	24	55
tryptophane	14	23*	37
threonine	30	22	52
histidine	26	30	56
arginine	19	20	39
glycine	12	39**	51
serine	13	34**	47
phenylalanine	13	37**	50
cystine	22	30*	52
alanine	24	30	54
leucine	15	49**	64
isoleucine	17	46**	63
valine	15	43**	58

註 \*\*及び\*: 第1表脚註参照

ある。併し、この表はやや複雑で分りにくい為、Grade 0, 1, 2 即ち抗酸性がないか或は弱いものを1群とし、Grade 3, 4, 5 即ち抗酸性の強い場合を他の1群として都合2群に大別して簡単にしたのが第3表である。第3表に見る様に基礎培液に発育した44株の中、28株はGrade 0から2迄、即ち抗酸性がないか或は弱い群に属し、16株はGrade 3から5の群に属して居る。これに比べて Casamino acids, glutamic acid, glycine, serine, phenylalanine, leucine, isoleucine 及び valine は顕著に抗酸性を促進し、aspartic acids, tryptophane, 及び cystine も亦、好影響を及ぼす (chi-square test で前者は highly significant, 後者は significant)。その他のアミノ酸はノカルディアの抗酸性に特に作用するとは考へられない成績であつた。

次に各菌株別に見ると被検18培養液の何れでも Grade 2 以下の弱い抗酸性しか示さない菌株は No.6 (*N. polychromogenes*), No.82 (*N. leishmanii*) 及び *N. madurae* の1株の合計3株であつた。又、被検18培養液の何れでも

Grade 3 以上の抗酸性を常に示した菌株は *N. asteroides* で No.132 及び 206, *N. brasiliensis* で Nos. 145, 169 及び 197 並に *N. transvalensis* No. 193 の合計 6 菌株あつた。又 *N. blackwellii* は Bergey の分類<sup>2)</sup>では非抗酸性となつて居るが No. 81 株 (*N. blackwellii*) は被検 18 培養液中実に 10 培養液で Grade 3 以上の抗酸性を示した。この様にノカルディアの抗酸性は Species に固有の性状といふよりもむしろ多く Strain に固有の性状の様に思はれる。

考 察

以上の結果から Casamino acids, aspartic acid, glutamic acid, leucine, isoleucine 及び valine はノカルディアの発育及び抗酸性の両方に対して好影響を与える。又 lysine, methionine, 及び histidine は発育に対しては好影響を与えるが抗酸性に対しては影響しない様である。反対に tryptophane, glycine, serine, phenylalanine 及び cystine は発育には影響しないか或は tryptophane の如く僅か乍ら阻止的に働くのではないかと思はれる場合もあるが何れも抗酸性を増強した。threonine, arginine 及び ala-

nine は発育にも抗酸性にも影響を及ぼさない。以上の結果は第 4 表にまとめてある。

さてノカルディアの抗酸性がミコバクテリウムの夫と同様に mycolic acids 或はその類似物質が関与するものであるか否かは未だ明かにされて居ないが, glutamic acid や aspartic acid は勿論の事, leucine, isoleucine 或は valine が mycolic acids の合成に利用される可能性は推測される。

threonine, arginine 及び alanine が発育にも抗酸性にも影響しないのはこれらのアミノ酸がノカルディアの菌体内で十分に生合成されるために, より以上を培養液に添加しても影響しなかつたのではないかと考へられる。

尚, l-glutamic acid を基礎培養液に 0.2% の濃度に添加し PH7.0 に修正 (NaOH にて) すると, Casamino acids を添加した場合よりも更に発育がよくなる事は興味ある事柄であつて, この培養液はノカルディアの所謂 chemically defined media として使用できるであらう。

最後に前報<sup>2)</sup>に於ても述べた処であるが, 本回の実験に於てもノカルディアの抗酸性は Species に固有といふよりはむしろ strain に可成り固有の性状である事が確められた。この事は Bergey<sup>2)</sup>に於て抗酸性の有無をノカルディア分類の第 1 の Key として居る事に疑問を投げるものである。

結 論

69 株のノカルディア各 Species の発育及び抗酸性に及ぼすカゼイン水解物及び 16 種のアミノ酸の影響を合成液体培養基を用いて検した。

(1) カゼイン水解物, glutamic acid, aspartic acid, lysine, leucine, isoleucine, 及び valine はノカルディアの発育を highly significantly に促進し, methionine と histidine は significantly に促進する。

(2) カゼイン水解物, glutamic acid, glycine, serine, phenylalanine, leucine, isoleucine, 及び valine はノカルディアの抗酸性を highly significantly に促進し, aspartic acid, tryptophane 及び cystine は significantly に促進する。

第 4 表 カゼイン水解物及びアミノ酸のノカルディアの発育及び抗酸性に及ぼす影響綜括

	発育に対する影響	抗酸性に対する影響
Casamino acids	**	**
glutamic	**	**
aspartic	**	*
leucine	**	**
isoleucine	**	**
valine	**	**
lysine	**	
methionine	*	
histidine	*	
tryptophane		*
glycine		**
serine		**
phenylalanine		**
cystine		*
threonine		
arginine		
alanine		

註: \*\*, \*……第 1 表脚註参照

(3)  $\text{NaNO}_3$ , 乳糖及び無機塩類から成る基礎培養液に l-glutamic acid を0.2%の濃度に添加し PH7.0 に修正すれば優秀なノカルディア用の合成培養液となる。

(4) ノカルディアの抗酸性は Species に固有ではなく、寧ろ strain に固有であることが再び立証された。

本学薬学部鈴木教授の御助言を深謝する。

#### 引用文献

- 1) 上坂一郎：京大結研紀要, 9:113 昭和35年.
- 2) R. S. Breed et al Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Ed., 1951