

# コレラ菌の酵素活性に対する免疫血清の影響

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

岡 田 豊 二

〔昭和34年9月28日受稿〕

## 目 次

### 第1編 O<sub>2</sub>消費に対する免疫血清及び補体の影響

- I. 緒 言
- II. 実験材料及び実験方法
- III. 実験成績
  1. 免疫血清のみを加えた場合
  2. 補体を加えた場合
- IV. 総括及び考案
- V. 結 言

### 第2編 溶菌にともなう酵素活性の変化

- I. 緒 言
- II. 実験材料及び実験方法
- III. 実験成績
  1. 自家融解による溶菌と酵素活性の関係
  2. 免疫血清による溶菌と酵素活性の関係
- IV. 総括及び考案
- V. 結 言
- 参考文献

## 第1編 O<sub>2</sub>消費に対する免疫血清及び補体の影響

### I. 緒 言

Koch によつてコレラ菌が発見されて以来, その細菌学的研究は極めて多く, 又近年に至つては細菌化学の進歩につれ栄養要求, 物質代謝など酵素的性状についても漸次明らかにされつつある。<sup>1)-6)</sup>

又一方免疫学的研究特に抗原抗体の反応に関する報告も多数見られる。

コレラ菌は免疫血清により凝集するほか, 補体の存在においては容易に溶菌を起す点が他菌といささか異なる点である。

然しながらこの溶菌現象の詳細な機序については不明な点が多く, 又凝集, 或いは溶菌にともなう菌の酵素活性の変化に関する研究も少ない。<sup>7)-9)</sup>

そこで筆者はその一端をうかがうため, 静止菌の酵素活性に対する免疫血清, 又はこれに補体を添加した場合の影響を O<sub>2</sub>消費量を指標として検討して見た。

### II. 実験材料及び実験方法

供試菌: コレラ菌原型稻葉株, 中間型彦島株, 異型小川株の教室保存標準株を用い, 普通寒天に37°C, 18時間培養した。

免疫血清: 各供試菌を以つて家兔をくり返し, 免

疫し抗体価3,200倍となつた血清を用いた。

補体: 正常モルモット5匹の心臓よりの血清を56°C, 30分加熱し非働化して使用した。

O<sub>2</sub>消費量の測定: Warburg 検圧計を用い常法<sup>10)</sup>に従つた。

基質: 何れも市販品を蒸留水に溶解し, 必要により NaOH 又は HCl を以つて pH を修正して使用した。

### III. 実験成績

#### 1. 免疫血清のみを加えた場合

コレラ菌免疫血清の菌に対する影響は補体の有無により大いに異なると考えられる。

そこで補体を加えた場合と, 加えない場合とに分け, 先づ補体無添加に於ける免疫血清の静止菌の O<sub>2</sub>消費に対する影響を見た。

尚免疫血清は抗体の他に正常血清と同様の血清成分を多量に含むので, 対照として免疫血清と同様に処理した正常血清を用いた場合についても同時に実験した。

O<sub>2</sub>消費測定は Warburg 検圧計を用い, 主室に菌液, 側室に血清及び基質を入れ, 30分間の O<sub>2</sub>消費量を測定した。

基質としてはグルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸,

コハク酸, アスパラギン酸, シスチンとし, シスチンはM/500, 他はM/100となるようにし, 対照として基質の代りに水を加えた場合についても行なつた。

又免疫血清, 正常血清は10倍, 100倍, 1,000倍希釈の各段階とし, pH7.4とした。

菌量は各供試菌共湿菌量 40mg/cup とした。

原型菌に於ける各基質についての成績は第1表に一括して示した如くである。

実験例1の欄に見られる如く基質なしの場合には, 血清無添加 (endogenous respiration) での O<sub>2</sub> 消費 48 μl に対し, 正常血清を10倍, 100倍, 1,000倍稀

釈となるように添加した際の O<sub>2</sub> 消費はそれぞれ177, 112, 52 μl であり, 血清中には基質となりうる物質が多量含まれているため血清濃度の異なる程 O<sub>2</sub> 消費が大となつている。

免疫血清を10倍, 100倍, 1,000倍希釈となるよう添加した場合の O<sub>2</sub> 消費はそれぞれ124, 94, 56 μl であり, 低濃度では正常血清と大差ないが, 高濃度に於いては正常血清の場合に比し O<sub>2</sub> 消費はやや小となつた。

高濃度の免疫血清添加では菌は凝集する傾向が見られ, このため正常血清に於けるよりも O<sub>2</sub> 消費が小となるものと考えられる。

第1表 O<sub>2</sub> 消費に対する免疫血清の影響 (原型菌)

実 験 例 添加物 \ 基 質	1	2	3	4	5	6	7
	な し	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	シスチン
基 質 の み	48	184	143	117	183	102	106
正常血清 (10倍希釈) のみ	177	164	170	166	163	172	167
" (100 " ) のみ	112	110	98	95	112	94	90
" (1000 " ) のみ	52	56	62	60	57	62	61
基質+正常血清(10倍希釈)		254	246	230	248	235	207
" + " (100 " )	/	202	186	179	215	176	190
" + " (1000 " )		167	174	167	217	134	146
免疫血清 (10倍希釈) のみ	124	127	130	126	132	143	152
" (100 " ) "	94	108	106	97	185	90	115
" (1000 " ) "	56	52	60	53	61	67	62
基質+免疫血清(10倍希釈)		207	208	187	190	172	163
" + " (100 " )	/	186	162	160	172	156	175
" + " (1000 " )		158	170	154	187	150	132

第2表 O<sub>2</sub> 消費に対する免疫血清の影響 (中間型菌)

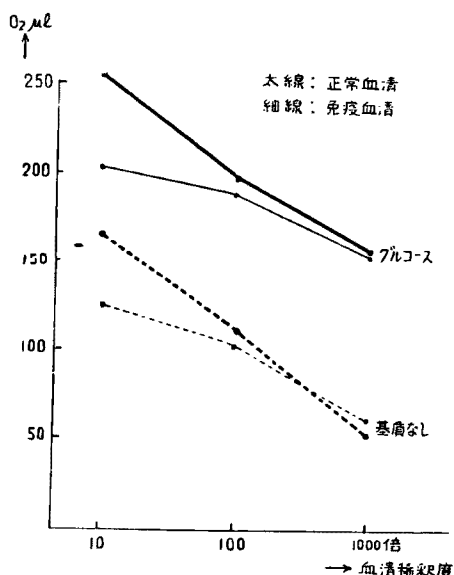
実 験 例 添加物 \ 基 質	1	2	3	4	5	6	7
	な し	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	シスチン
基 質 の み	57	174	197	170	184	117	104
正常血清 (10倍希釈) のみ	192	183	185	196	174	180	187
" (100 " ) "	143	137	141	165	143	156	172
" (1000 " ) "	76	70	81	75	73	62	91
基質+正常血清(10倍希釈)		262	243	250	237	215	231
" + " (100 " )	/	209	235	241	217	240	194
" + " (1000 " )		195	221	198	196	157	154
免疫血清 (10倍希釈) のみ	137	132	144	121	154	127	128
" (100 " ) "	104	112	123	110	133	108	119
" (1000 " ) "	62	65	71	67	81	70	63

基質+免疫血清(10倍稀釈)		152	177	183	206	189	182
" + " (100 " )	/	186	184	210	191	207	186
" + " (1000 " )		212	197	217	190	152	143

第3表 O<sub>2</sub>消費に対する免疫血清の影響(異型菌)

実 験 例 添加物	基 質						
	1 なし	2 グルコース	3 乳 酸	4 焦 性 ブドー酸	5 コハク酸	6 アスパラ ギン 酸	7 システイン
基 質 の み	45	164	148	106	157	97	90
正常血清 (10倍稀釈) のみ	187	173	182	185	167	180	174
" (100 " ) "	112	120	118	122	109	117	121
" (1000 " ) "	64	60	57	54	61	58	60
基質+正常血清(10倍稀釈)		247	235	252	189	232	196
" + " (100 " )	/	197	206	215	182	182	157
" + " (1000 " )		174	167	124	175	137	124
免疫血清 (10倍稀釈) のみ	123	126	112	127	104	151	143
" (100 " ) "	93	113	107	95	106	92	97
" (1000 " ) "	52	54	50	61	62	49	55
基質+免疫血清(10倍稀釈)		164	172	190	162	173	156
" + " (100 " )	/	187	175	166	136	140	112
" + " (1000 " )		178	180	127	164	152	117

第1図 濃度別血清の O<sub>2</sub>消費に対する影響  
原 型 菌



実験例2は基質としてグルコースを用いた場合の成績であり、グルコース単独では O<sub>2</sub>消費184 μl であり、基質(グルコース)+正常血清(10倍稀釈)で

は254 μl となつて、グルコースのみ或いは血清のみの場合よりやや O<sub>2</sub>消費が大となり、血清濃度が100倍稀釈、1,000倍稀釈と小になるにつれて O<sub>2</sub>消費は小となつた。

これに対し基質(グルコース)+免疫血清の場合には、血清濃度10倍、100倍、1,000倍でそれぞれ207, 186, 158 μl の O<sub>2</sub>消費であり、血清濃度が大な場合の O<sub>2</sub>消費は正常血清に於けるよりもかなり小であつた。

この関係を図示すると第1図の如くである。縦軸に O<sub>2</sub>消費量、横軸に血清濃度(稀釈度)をとると、基質なしの場合、正常血清添加では太点線、免疫血清添加では細点線の如くであり、基質をグルコースとした場合、正常血清添加では太実線、免疫血清添加では細実線の如くである。

他の基質乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸、アスパラギン酸、システインの場合もそれぞれ実験例3~7の如く、グルコースを基質とした場合と大差ない傾向が見られ、又中間型菌、異型菌でも第2, 3表に示す如く原型菌とほぼ同様の成績であつた。

2. 補体を加えた場合

次に補体添加に於ける免疫血清の O<sub>2</sub>消費に対する影響を見た。

前実験同様 Warburg 検圧計を用い、主室に菌液

第 4 表 O<sub>2</sub> 消費に対する補体及び免疫血清の影響(原型菌)

実 験 例 添加物	基 質						
	1 なし	2 グル コース	3 乳 酸	4 焦性ブ ドー酸	5 コハク酸	6 アスパラ ギン酸	7 システ イン
基 質 の み	51	173	150	104	175	117	123
補 体 の み	232	227	234	215	193	206	226
補 体 + 基 質	/	254	263	240	223	216	257
補体+免疫血清(10倍稀釈)のみ	187	193	174	167	180	105	177
〃 + 〃 (30 〃) 〃	176	182	180	154	174	161	187
〃 + 〃 (100 〃) 〃	127	137	147	110	132	131	129
〃 + 〃 (300 〃) 〃	117	126	132	133	141	122	140
〃 + 〃 (1000 〃) 〃	196	216	205	180	192	196	185
補体+基質+免疫血清(10倍稀釈)		217	196	220	215	197	207
〃 + 〃 + 〃 (30 〃) 〃		186	212	206	197	226	215
〃 + 〃 + 〃 (100 〃) 〃	/	157	170	162	175	167	184
〃 + 〃 + 〃 (300 〃) 〃		140	162	145	181	156	176
〃 + 〃 + 〃 (1000 〃) 〃		262	258	284	252	225	243

第 5 表 O<sub>2</sub> 消費に対する補体及び免疫血清の影響(中間型菌)

実 験 例 添加物	基 質						
	1 なし	2 グル コース	3 乳 酸	4 焦性ブ ドー酸	5 コハク酸	6 アスパラ ギン酸	7 システ イン
基 質 の み	62	193	187	145	176	128	112
補 体 の み	227	254	213	247	205	250	247
補 体 + 基 質	/	274	280	297	276	284	285
補体+免疫血清(10倍稀釈)のみ	176	202	186	174	192	185	170
〃 + 〃 (30 〃) 〃	185	178	198	185	175	200	183
〃 + 〃 (100 〃) 〃	147	123	152	134	135	120	132
〃 + 〃 (300 〃) 〃	105	117	124	130	131	137	140
〃 + 〃 (1000 〃) 〃	186	197	204	167	190	216	195
補体+基質+免疫血清(10倍稀釈)		224	217	186	250	217	364
〃 + 〃 + 〃 (30 〃) 〃		217	225	205	236	224	247
〃 + 〃 + 〃 (100 〃) 〃	/	136	142	152	242	136	255
〃 + 〃 + 〃 (300 〃) 〃		128	137	133	252	145	242
〃 + 〃 + 〃 (1000 〃) 〃		246	250	217	265	231	271

(湿菌量 40mg/cup), 側室に補体, 免疫血清, 基質を入れ, 30分間の O<sub>2</sub> 消費を測定した (pH7.4).

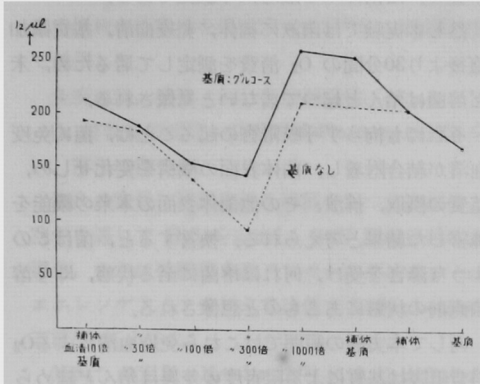
補体は 5 倍稀釈となるようにし, 免疫血清は 10 倍, 30 倍, 100 倍, 300 倍, 1,000 倍の 5 段階, 基質は前実験同様グルコース以下 6 種類とし, 対照として基質無添加の場合についても行なつた. 又比較のため基質のみ, 補体のみ, 補体+基質を添加した場合の O<sub>2</sub> 消費も同時に測定した.

原型菌に於ける各基質についての成績は第 4 表に一括して示した.

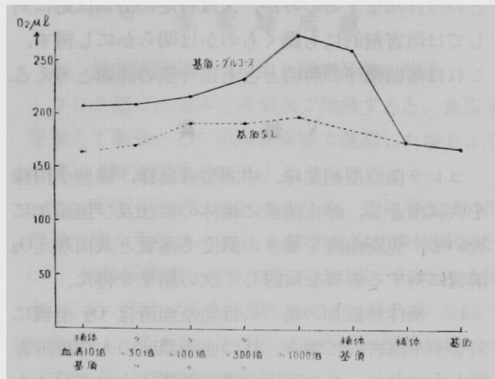
基質無添加の場合は実験例 1 の如くであり, endogenous respiration 51 μl に対し, 補体のみの O<sub>2</sub> 消費 232 μl であり, 補体の中に基質となりうる物質が多量含有されているために O<sub>2</sub> 消費が大となるものと見做される.

又補体+免疫血清添加に於いては血清稀釈度 10 倍, 30 倍, 100 倍, 300 倍, 1,000 倍に於ける O<sub>2</sub> 消費はそれぞれ 187, 176, 127, 117, 196 μl であつて, 10 倍稀釈血清添加によつても若干 O<sub>2</sub> 消費は補体のみの場合より低下するが, 血清濃度がやや小となつた 100

第2図 濃度別免疫血清及び補体の O<sub>2</sub> 消費に対する影響  
原型菌



第3図 濃度別免疫血清及び補体の O<sub>2</sub> 消費に対する影響  
異型菌



倍稀釈, 300倍稀釈の附近で最も O<sub>2</sub> 消費阻害が大となり, 更に血清濃度が小となると阻害は再び小となった。

グルコースを基質とした場合は実験例2の如くである。基質(グルコース)のみの O<sub>2</sub> 消費は173 μl, 補体のみでは227 μl であるのに対し, 補体+基質(グルコース)では254 μl となつて, グルコース或いは補体単独の場合の O<sub>2</sub> 消費と大差ない。

補体+基質+免疫血清添加では血清10倍, 30倍, 100倍, 300倍, 1,000倍稀釈に於ける O<sub>2</sub> 消費はそれぞれ217, 186, 157, 140, 262 μl であり免疫血清濃度が100倍~300倍の附近で O<sub>2</sub> 消費阻害はやはり最大となつた。

これらの関係を図示すると第2図の如くであり, 縦軸に O<sub>2</sub> 消費量, 横軸に添加物質をとると, 基質無添加では点線, 基質グルコースでは実線の通りとなる。

従つて前に記した補体無添加の場合とは免疫血清の O<sub>2</sub> 消費阻害の最も大な濃度が明らかに異なつてゐる。

基質として乳酸, 焦性ブドウ酸, コハク酸, アスパラギン酸, シスチンを用いた場合はそれぞれ実験例3~7に示す如くであり, グルコースに於けるとほぼ類似の傾向であつた。

以上原型菌に於ける成績と同様の傾向は中間型菌(第5表)に於いても認められた。

然し異型菌ではやや, 様相を異にしており, 第6表及び第3図の如く, 基質無添加の場合(第6表,

第6表 O<sub>2</sub> 消費に対する補体及び免疫血清の影響(異型菌)

実験例	1	2	3	4	5	6	7
	なし	グルコース	乳酸	焦性ブドウ酸	コハク酸	アスパラギン酸	シスチン
基質のみ	42	159	150	112	164	115	97
補体のみ	206	183	247	232	217	230	225
補体+基質	/	264	287	290	266	275	268
補体+免疫血清(10倍稀釈)のみ	161	156	177	162	153	165	166
〃 + 〃 (30 〃) 〃	162	167	173	152	157	163	152
〃 + 〃 (100 〃) 〃	187	177	180	205	176	177	195
〃 + 〃 (300 〃) 〃	182	182	226	241	182	199	232
〃 + 〃 (1000 〃) 〃	227	196	265	247	196	223	230
補体+基質+免疫血清(10倍稀釈)		202	211	205	227	224	211
〃 + 〃 + 〃 (30 〃) 〃		217	245	250	246	235	226
〃 + 〃 + 〃 (100 〃) 〃	/	226	244	251	233	255	232
〃 + 〃 + 〃 (300 〃) 〃		245	237	262	250	257	248
〃 + 〃 + 〃 (1000 〃) 〃		272	286	306	267	262	270

実験例 1) には endogenous respiration 42  $\mu$ l, 補体のみでは 206  $\mu$ l であり, 補体+免疫血清添加に於いて血清濃度 10 倍, 30 倍, 100 倍, 300 倍, 1,000 倍の場合の  $O_2$  消費はそれぞれ 161, 162, 187, 182, 227  $\mu$ l となつて  $O_2$  消費阻害は血清濃度の高い方が大きい結果であり, 他菌に見られたような 100~300 倍の附近に阻害度の最大があるという所見は著明には認められず又一般に阻害度は他菌に於けるよりも小であつた。又グルコースを基質とした場合 (実験例 2) にも免疫血清の阻害は血清濃度の高い方が大であつた。

その他の基質に於いても実験例 3~7 の如くグルコースの場合と類似の傾向であつた。

#### IV. 総括及び考案

コレラ菌では免疫血清を働かすと凝集反応の他, 補体の存在に於いては溶血現象が見られることは周知の通りである。

本編では上述の順序に従つて補体の存在する場合と, 然らざる場合とに分ち, 種々の濃度の免疫血清の各種基質に於ける菌体酵素活性に対する影響を比較検討した。

先づ補体無添加の場合の成績について見る。免疫血清は抗体の他, 正常血清と同様の多くの血清成分を含むので, 正常血清を対照として比較すると, 正常血清添加では基質の如何を問わず血清濃度の大きなほど  $O_2$  消費は大であり, これは勿論血清中の基質となりうる多くの成分の存在によるが, 免疫血清添加では一般に  $O_2$  消費は阻害される傾向が見られ, 血清濃度が大きなほど正常血清添加の場合との  $O_2$  消費阻害の差が大となり, これは抗元抗体反応による菌凝集のためと考えられる。

これに対し補体添加に於いては, 各菌共免疫血清濃度 100~300 倍稀釈の附近に  $O_2$  消費阻害の最大が

見られ, 明らかに補体無添加の場合とは阻害の最大の血清濃度を異にしている。この濃度は次編にも記す如く, 溶菌作用の最も大な濃度である。

然し本実験では菌液に補体, 免疫血清, 基質添加直後より 30 分間の  $O_2$  消費を測定して居るため, 未だ溶菌は殆んど起つて居ないと見做される。

それにも拘らず呼吸阻害の起ることは, 菌に免疫血清が結合附着し, 菌体表面の機構を変化せしめ, 基質の摂取, 排泄, その他菌体表面の本来の機能を障害した結果と考えられる。換言すると, 菌はこのような障害を受け, 何れは溶菌に至る状態, 即ち溶菌直前の状態にあるものと想像される。

而して本実験の範囲ではこれら免疫血清による  $O_2$  消費阻害は基質による阻害度の差異は殆んど認められず, 抗体はただ単に菌体表面に結合して凝集せしめ, 或いは次に起るべき溶菌への態勢をととのえるという作用をするのみか, 又は特定の酵素反応に対しては阻害剂的にも働くものかは明らかにし得ず, これは溶菌機序の解明とともに今後の課題と考える。

#### V. 結 言

コレラ菌原型稻葉株, 中間型彦島株, 異型小川株を供試菌とし, 静止菌液に補体の添加及び無添加に於いて, 免疫血清を種々の濃度で基質と共に加え  $O_2$  消費に対する影響を検討して次の結果を得た。

1. 補体無添加の場合には免疫血清は  $O_2$  消費に対しやや阻害的に働き, 且つ血清濃度の大きな程阻害度も大となり, この阻害は菌の凝集によつて起るものと考えられる。

2. 補体添加の場合にも  $O_2$  消費は免疫血清により阻害され, この場合には血清濃度が比較的低いところ (100~300 倍稀釈) で特に強く現われる。

而してこの場合は菌が溶菌を起す直前の準備期としての阻害と考えられる。

## 第 2 編 溶菌にともなう酵素活性の変化

### I. 緒 言

コレラ菌は菌体表面が粘稠な物質によつておおわれて居り, 一見保護作用を受けて居るかに見受けられるが, 事實は洗滌操作, 特に蒸溜水など不適当な媒質による洗滌によつて容易に酵素活性を失ひ, ひいては自家融解を起し, 又免疫血清及び補体の添加によつて容易に溶菌することもこの菌の特徴である。

前編では静止菌液に免疫血清, 及び補体を基質と同時に添加した場合の影響を検討し, 免疫血清は溶菌に至る以前からすでに酵素活性を若干低下せしめることを認めた。

本編ではこれに引きつづき, 菌液に免疫血清, 及び補体を加え溶菌に至る迄, 時間を追つて酵素活性の変化を追求した。

II. 実験材料及び実験方法

供試菌：コレラ菌原型稻葉株，中間型彦島株，異型小川株の標準株を普通寒天に37°C，18時間培養して使用した。

免疫血清，補体：何れも前編同様

O<sub>2</sub> 消費量の測定：前編同様 Warburg 検圧計を用い，常法に従った。

H<sub>2</sub>S の定量：試料溶液を磷酸を以つて弱酸性とし，空気を通じて H<sub>2</sub>S を追出し，1-N 醋酸亜鉛溶液に導き，これに硫酸第2鉄アンモン，ヂメチル-p-フェニレンジアミンを加えて比色する St. Lorand の方法<sup>11)</sup> によつた。

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の定量：Nessler 法<sup>12)</sup> により比色した。

インドールの定量：Ehrlich のアルデヒド試薬を用いる方法<sup>13)</sup> によつた。

III. 実験成績

1. 自家融解による溶菌と酵素活性の関係

コレラ菌では菌体を蒸留水で洗滌すると，食塩水を加えて等張とした磷酸緩衝液で洗滌した場合よりも著しく酵素活性が低下する。

これを更に詳細に検討するため，普通寒天18時間培養菌体を集菌後，(1) 0.85%食塩加磷酸緩衝液，(2) 磷酸緩衝液(食塩無添加)，(3) 0.85%食塩水，(4) 蒸留水の各媒質(何れも pH 7.4)を以つて洗滌し，再びそれに浮遊せしめて，数種基質についての O<sub>2</sub> 消費量を測定した。

基質はグルコース，乳酸，焦性ブドウ酸，コハク酸，アスパラギン酸，グルタミン酸，システインを選びシステイン以外は M/100，システインは M/500

第7表 菌体洗滌の基質と酵素活性低下の関係

	洗 滌 媒 質			
	食塩加緩衝液	緩衝液	食塩水	蒸留水
なし	57	6	8	3
グルコース	216	7	14	7
乳酸	147	28	20	21
焦性ブドウ酸	112	8	10	5
コハク酸	154	21	25	22
アスパラギン酸	198	14	11	7
グルタミン酸	164	13	14	5
アラニン	125	7	9	6
システイン	137	78	78	62

第8表 菌体洗滌媒質と酵素活性の低下の関係  
中間型菌

	洗 滌 媒 質			
	食塩加緩衝液	緩衝液	食塩水	蒸留水
なし	63	8	10	3
グルコース	212	7	15	3
乳酸	198	21	25	20
焦性ブドウ酸	134	9	14	4
コハク酸	157	27	34	19
アスパラギン酸	142	10	19	5
グルタミン酸	174	9	12	3
アラニン	195	11	13	4
システイン	138	57	65	40

第9表 菌体洗滌媒質と酵素活性低下の関係  
異型菌

	洗 滌 媒 質			
	食塩加緩衝液	緩衝液	食塩水	蒸留水
なし	47	18	22	6
グルコース	188	21	28	7
乳酸	195	29	35	27
焦性ブドウ酸	114	20	29	7
コハク酸	132	32	46	25
アスパラギン酸	109	19	24	8
グルタミン酸	147	19	25	7
アラニン	150	21	24	9
システイン	136	64	77	53

となるようにした。菌量は湿重量 40mg/cup とし，測定時間30分間とした。

原型菌では第7表に示す結果であり，食塩加緩衝液で洗滌，浮遊した菌体は各基質共に著明な O<sub>2</sub> 消費を示すのに対し，他の媒質で洗滌，浮遊した菌体の酵素活性は殆んど基質に於いても極めて低く，特に蒸留水で洗滌，浮遊せしめたものはこの傾向が著しかった。ただシステインの酸化能の低下は比較的少ない傾向であつた。

中間型菌，異型菌でもそれぞれ第8，9表の如く同様の傾向が見られたが，ただ異型菌では緩衝液，或いは食塩水を用いた場合の低下が他の2菌程著しくなかつた。

以上の如く，菌体を蒸留水などで洗滌浮遊すると酵素活性が著しく低下したが，次に蒸留水で2回洗滌した菌体を食塩加緩衝液に浮遊した場合，食塩加緩衝液で洗滌した菌体を蒸留水に浮遊した場合につ

いて O<sub>2</sub> 消費を測定した。尚比較のため、蒸溜水で洗滌、浮游した場合についての測定値をも附加した。菌量その他は前実験と同様にし、基質はグルコースのみとした。

原型菌に於ける結果は第10表の如くであり、各菌

第10表 O<sub>2</sub> 消費に対する菌洗滌及び浮游媒質の影響 基質：グルコース

洗滌媒質	浮游媒質	原型菌	中間型菌	異型菌
食塩加緩衝液	食塩加緩衝液	224	256	237
	蒸溜水	36	28	67
蒸溜水	食塩加緩衝液	3	5	6
	蒸溜水	2	2	3

共一度蒸溜水で洗滌すると、再び食塩加緩衝液に浮游しても酵素活性の回復は見られず、又食塩加緩衝液で洗滌しても、蒸溜水に浮游すると酵素活性は失われてしまう。他菌でも表示は省略したがほぼ同様の傾向が見られた。

以上の如くコレラ菌では蒸溜水などに一旦浮游せしめると不可逆的な酵素の失活が起るものと考えられ、従つてこのような媒質に菌を浮游放置すると比較的短時間の間に菌は死滅すると予想される。

そこで次に培地より集めた菌体を無菌的に食塩加緩衝液、緩衝液、食塩水、蒸溜水に 1mg/cc となる

第11表 各種媒質処理による菌の死滅

		24時間後のコロニー数		
		原型菌	中間型菌	異型菌
食塩加緩衝液	30分処理	∞	∞	∞
	60 "	∞	∞	∞
	90 "	∞	∞	∞
	120 "	∞	∞	∞
緩衝液	30	247	209	∞
	60	132	92	240
	90	96	67	126
	120	38	20	97
食塩水	30	∞	∞	∞
	60	242	196	320
	90	95	76	205
	120	40	42	127
蒸溜水	30	237	290	370
	60	56	48	97
	90	37	31	36
	120	20	19	14

ように浮游せしめて室温に放置し、30分毎に1ccづつを取り出し生菌数の測定を行なつて見た。

菌数測定は試料1ccを9cc普通寒天と混和してから平板とし、37°C、24時間放置してからコロニー数を計算する常法によつた。

結果は第11表の如くであり、各菌共食塩加緩液に浮游させたものは120分に至つても生菌数の減少は殆んど起らないと見做される。

然し他の媒質に浮游させて放置すると、30分頃よりすでに菌の死滅が起り、特に蒸溜水浮游では60~90分間の放置で生菌数は著明に減少した。

菌別に見ると異型菌は他菌に比しやや抵抗性が大きいようであり、菌の死滅は前述の O<sub>2</sub> 消費の低下と大体平行的関係であつた。

従つて蒸溜水その他菌にとつて不適当な媒質に浮游させて置くと、菌の酵素活性の低下、即ち新陳代謝の停止が起り、菌は死滅しやがて自家融解が起るものと推定される。

2. 免疫血清による溶菌と酵素活性の関係

菌に免疫血清及び補体を加え放置すると酵素活性は低下し、やがては溶菌に至るが、これにともない酵素活性は如何に変化して行くかを見た。即ち先づ

菌液 (食塩加緩衝液に浮游, 湿菌量 40 mg/cc)	10.0cc
補体 (5倍稀釈)	1.5cc
免疫血清	1.5cc
食塩加緩衝液	2.0cc
全量	15.0cc pH7.4

上の如く菌液に免疫血清 (10, 30, 100, 300, 1,000倍稀釈となるようにする)、及び補体を加えて30, 60分及び90分放置してから、その2ccづつを Warburg 検圧計容器に入れ、グルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸、アスパラギン酸、システインを基質とした O<sub>2</sub> 消費量、並びに対照として基質なしの O<sub>2</sub> 消費量 (endogenous respiration) を測定した。基質はシステインは M/500, 他は M/100 となるようにし、測定時間30分とした。

結果は原型菌については第12表に一括して示した如くであり、100~300倍稀釈附近の濃度の免疫血清により処理した菌体が最も O<sub>2</sub> 消費能の低下を来して居り、それより高濃度、及び低濃度の血清で処理したものは酵素活性低下が比較的少なかつた。

処理時間について見ると、30分間処理ではそれ程著しい酵素活性低下は見られないが、60分では急激に活性低下が見られた。



第12表 免疫血清処理菌体のO<sub>2</sub>消費 (原型菌)

菌処理方法	基質	なし	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	システイン
		なし	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	システイン
対 照 血清無添加	30分間処理	198	257	265	234	268	212	224
	60 "	159	216	206	207	224	156	182
	90 "	130	178	180	157	172	98	180
10倍稀釈 免疫血清 添 加	30 "	157	194	208	187	175	160	175
	60 "	120	150	160	158	145	126	148
	90 "	87	112	132	120	124	91	108
30倍 "	30 "	150	186	213	170	162	172	180
	60 "	130	151	174	147	151	106	151
	90 "	82	107	143	117	130	75	112
100倍 "	30 "	107	118	142	115	152	108	168
	60 "	51	60	127	67	140	56	145
	90 "	37	35	96	40	112	38	108
300倍 "	30 "	96	117	136	121	138	117	130
	60 "	48	51	112	57	107	65	112
	90 "	35	35	107	40	86	41	100
1000倍 "	30 "	221	267	251	196	257	205	209
	60 "	160	208	215	200	216	142	165
	90 "	129	170	177	163	182	77	146

第13表 免疫血清処理菌体のO<sub>2</sub>消費 (中間型菌)

菌処理方法	基質	なし	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	システイン
		なし	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	システイン
対 照 血清無添加	30分間処理	253	307	295	274	268	242	250
	60 "	204	269	273	242	235	216	242
	90 "	187	232	204	186	217	193	234
10倍稀釈 免疫血清 添 加	30 "	204	255	253	235	236	203	226
	60 "	176	182	227	152	215	154	227
	90 "	143	150	195	98	203	120	211
30 "	30 "	211	264	240	216	247	225	232
	60 "	165	197	236	187	206	163	226
	90 "	140	161	204	107	215	136	198
100 "	30 "	206	232	238	204	210	208	207
	60 "	52	74	186	86	186	77	181
	90 "	45	58	112	53	134	50	154
300 "	30 "	180	217	237	211	206	186	192
	60 "	60	172	182	76	178	80	146
	90 "	41	55	120	62	140	56	123
1000 "	30 "	235	296	302	250	277	253	276
	60 "	187	234	246	216	254	218	256
	90 "	167	192	182	172	209	186	220

第14表 免疫血清処理菌体のO<sub>2</sub>消費 (異型菌)

菌処理方法	基質	な	し	グルコース	乳 酸	焦 性 ブドー酸	コハク酸	アスパラ ギン 酸	システイン
		なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
対 照 血清無添加	30分間処理	186	232	263	227	256	202	238	
	60 "	140	190	206	175	205	181	190	
	90 "	97	127	165	127	178	158	167	
10倍稀釈 免疫血清 添 加	30 "	146	184	221	191	224	172	116	
	60 "	100	146	197	137	205	706	81	
	90 "	73	92	130	112	147	119	35	
30 "	30 "	168	167	205	184	237	206	190	
	60 "	107	120	164	129	175	150	189	
	90 "	85	108	152	106	164	127	152	
100 "	30 "	157	180	204	167	175	158	178	
	60 "	77	103	151	98	134	126	134	
	90 "	68	74	103	79	101	65	106	
300 "	40 "	134	167	184	164	188	147	190	
	60 "	72	110	143	81	150	87	151	
	90 "	61	76	120	64	136	60	110	
1000 "	30 "	160	217	270	212	250	233	221	
	60 "	132	166	183	166	182	198	204	
	90 "	94	125	152	134	163	175	187	

又基質別に見るとグルコース, 焦性ブドー酸, アスパラギン酸を基質とした O<sub>2</sub> 消費の低下は著しく60~90分間の処理により殆んど完全に O<sub>2</sub> 消費能を失うが, 乳酸, コハク酸, システインを基質とした O<sub>2</sub> 消費能の低下は比較的少ないようであつた。

中間型菌, 異型菌でも第13, 14表の如く原型菌とほぼ同様の結果であつたが, ただ異型菌では他菌に比し免疫血清処理による酵素活性低下がやや少ない傾向が見られた。

以上の如く免疫血清及び補体を加えて処理した菌体は, 処理時間と共に酵素活性が低下するが, これは勿論, 免疫血清による菌の死滅内至は溶菌と関係があると考えられる。

そこで前記と同様の割合で菌液に免疫血清, 補体を添加し, 30分, 60分及び90分間放置した後その0.1ccを10ccの普通寒天に混合し37°C, 24時間培養した後, コロニー数を計算した。

結果は第15表の如くであり, 免疫血清濃度が100~300倍稀釈の場合菌の死滅が著しく, それより高濃度及び低濃度では致死効果はやや少である。

100~300倍稀釈血清では, 30分間の処理によりかなりの生菌数の減少が見られ, 60~90分の処理によつては生菌数は著明に減少した。

第15表 免疫血清処理による菌の死滅

		24時間培養後のコロニー数		
		原型菌	中間型菌	異型菌
血清無添加		∞	∞	∞
10倍稀釈免 疫血清添加	30分処理	∞	∞	∞
	60 "	∞	∞	∞
	90 "	275	204	340
30倍 "	30 "	330	300	∞
	60 "	262	240	∞
	90 "	156	212	216
100倍 "	30 "	217	256	∞
	60 "	135	177	340
	90 "	39	40	111
300倍 "	30 "	280	315	∞
	60 "	146	117	320
	90 "	46	37	142
1000倍 "	30 "	∞	∞	∞
	60 "	∞	∞	∞
	90 "	246	204	312

又菌別に見ると異型菌は他菌に比し抵抗性がやや大きいようであつた。

前述の如く、免疫血清及び補体を添加して放置することにより一般に酵素活性は低下するが、乳酸、コハク酸、システインの酸化能は尚かなり残存する。

そこでこれら基質の酸化酵素が溶菌後媒質中に溶出するものか否かを見るため、前記同様の割合で菌液に免疫血清(100倍希釈)及び補体を加えて60分間放置し、一部はそのまま、一部は10,000 rpm, 30分間遠沈して上清と沈渣に分ち、これらを各々検圧計容器に入れ、乳酸、コハク酸、システインを基質とした O<sub>2</sub> 消費量を測定した。

尚この遠沈沈渣は完全に溶菌せずに残存した菌、又は菌の破片と考えられる。

結果は原型菌について第16表に示す如くであり、遠沈上清、及び沈渣共に O<sub>2</sub> 消費能を有し、これら基質の酸化酵素は溶菌後媒質中に溶出するものと見做される。

第16表 免疫血清(100倍希釈)添加60分処理後の遠沈上清及び沈渣の酵素活性  
O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 30min.

		なし	乳酸	コハク酸	システイン
原型菌	遠沈せず	60	141	154	137
	遠沈上清	31	92	96	107
	〃 沈渣	3	26	30	29
中間型菌	遠沈せず	59	197	175	190
	遠沈上清	37	104	97	124
	〃 沈渣	3	34	39	47
異型菌	遠沈せず	54	167	135	131
	〃 上清	36	62	60	96
	〃 沈渣	12	57	63	47

次にシステインの酸化(分解)様式が蒸留水、又は免疫血清により溶菌した後のものと、無処理の菌体によるものとで相違するか否かを見た。

- ① 菌体を蒸留水に浮游させ80 mg/cc 60分放置
- ② 菌体を食塩加緩衝液に浮游し、免疫血清(100倍希釈とする)、補体を加えて60分放置(菌は80 mg/cc となるようにする)

上の2つの方法により処理した後遠沈して上清と沈渣に分ち、沈渣は食塩加緩衝液を加えてもとの容量とし、その各々を酵素液とし次の割合で検圧計容器に入れて60分間の O<sub>2</sub> 消費量と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、H<sub>2</sub>S 生成量とを測定した。

主室：酵素液 2.0 cc  
緩衝液 0.7 cc

側室：システイン(又は水) 0.3 cc

原型菌に於ける結果は第17表の如くであり、対照として用いた無処理菌体、即ち培地より集菌し、食塩加緩衝液で洗滌した直後の菌体では O<sub>2</sub> 消費、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>生成、H<sub>2</sub>S 生成はそれぞれ10.7、3.2、4.9  $\mu$ M であるのに対し、60分間蒸留水に浮游せしめたもの

第17表 処理方法とシステインの分解の関係  
原型菌

菌 処 理	O <sub>2</sub> 消費 $\mu$ M	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 生成 $\mu$ M	rhs 生成 $\mu$ M	
蒸留水浮游60分	遠沈上清	1.8	1.0	1.6
	〃 沈渣	2.4	1.5	1.0
免疫血清補体添加60分	〃 上清	3.2	3.2	3.6
	〃 沈渣	5.7	2.8	3.0
無 処 理 菌 体	10.7	3.2	4.9	

では遠沈上清、沈渣菌に O<sub>2</sub> 消費は著しく少であるが、免疫血清により溶菌せしめたものの上清、沈渣は、これよりやや O<sub>2</sub> 消費が大であり、又何れの場合も O<sub>2</sub> 消費に対する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、H<sub>2</sub>S の生成量の割合は対照(無処理菌体)よりも大であつた。

中間型菌、異型菌でもほぼ同様の成績であり、これは対照菌体ではシステインの脱アミノ、脱 H<sub>2</sub>S 反応の次に続いて他の酸化反応が起り、又 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> は他のアミノ酸生成に一部使われるが、溶菌後の遠沈上清或いは沈渣ではこのような副反応が起り難いためと想像される。

次にコレラ菌の特徴の1つであるトリプトファンよりのインドール生成反応について見る、即ち前実験と同様にして処理した溶菌後の遠沈上清及び沈渣、並びに対照として未処理菌体を用い、トリプトファンを M/500 となるように添加して2時間振盪してからインドールの生成量を比較した。

結果は原型菌について第18表に示す如くであり、

第18表 処理方法とトリプトファンよりインドールの生成能の関係

菌 処 理	インドール生成能	
蒸留水浮游 60'	遠沈上清	—
	〃 沈渣	±
免疫血清、補体添加 60'	〃 上清	—
	〃 沈渣	±
無 処 理 菌 体	++	

対照菌体では著明なインドール生成が認められるに  
対し、蒸溜水に浮遊せしめて放置した菌体、或いは  
免疫血清、補体を加えて溶菌せしめた遠沈及び上清  
では何れもインドール生成は極めて微弱であつた。

中間型菌、異型菌でも同様であり、トリプトファン  
よりインドールを生成する酵素、トリプトファナーゼ  
の適応的産生はこのように処理した菌では起りに  
くいものと見做される。

#### IV. 総括及び考案

コレラ菌は免疫血清により容易に溶菌し、又菌浮  
游液を放置するか、或いは不適當な媒質に浮遊せし  
めると容易に酵素活性の低下を来す点が他の多くの  
細菌と異なつている。

供試菌原型、中間型、異型の各菌に於いても食塩  
加磷酸緩衝液で洗滌すると酵素活性の低下は比較的  
少ないが、食塩無添加緩衝液、生理的食塩水、或い  
は蒸溜水で洗滌すると急速に酵素活性の低下を来し、  
特に蒸溜水の場合に著しい。

而して食塩加緩衝液で洗滌した菌体も、不適當な  
媒質に浮遊せしめると直ちに不活化を来し、又一旦  
不活化した菌は再び食塩加緩衝液に浮遊せしめても  
回復はされず、この失活は不可逆的なものと見做さ  
れる。

一方これら不適當な媒質に浮遊せしめると30分頃  
よりすでに生菌数は減少し、60~90分にして著明な  
減少が認められる。

一般に酵素は基質と結合した状態に於いて最も安  
定であるとされているが、これと同様な意味でコレ  
ラ菌では、磷酸の存在が酵素の安定に必要であり、  
これを欠く媒質への浮遊は菌の酵素活性の不活化を  
来すと考えられ、又食塩無添加の緩衝液への浮遊で  
は滲透圧の低下によつて不活化が起るものと見做さ  
れる。

従つてこれら不適當な媒質に於いては全般的な菌  
体酵素活性の低下にともない、菌は死滅し、やが  
ては自家融解によつて溶菌するに至ると考えられる。

次に免疫血清及び補体添加による溶菌と、これに  
ともなう酵素活性の変化について見る。

菌液に免疫血清濃度を10~1,000倍稀釈の範囲で  
種々変えて、補体と共に加えて作用せしめ、時間を  
追つて酵素活性の推移を見ると、血清濃度100~300  
倍稀釈に於いて酵素活性の低下は最も著しく、又活  
性低下は一般に血清作用時間に平行して著しくなる。

又血清作用後生菌数を測定すると、生菌数の減少

は酵素活性の低下を平行して著しくなつて居る。

而して菌液に補体、及び溶菌作用の最大の濃度に  
血清を加え、60分作用せしめた後の酵素活性 ( $O_2$  消  
費能) を基質別に見ると、グルコース、焦性ブドー  
酸、アスパラギン酸などの酸化能の低下は極めて著  
しく、乳酸、コハク酸、システインなどの酸化能の  
低下は比較的少ない。

これは菌を磨碎し cell free exytract とした場合  
と類似の所見であつて、1つには酵素自体の安定度  
にも起因しようが、1つには菌体が機械的に、或い  
は溶菌により破壊され、酵素系が媒質中に溶出、分  
散するため、多くの酵素或いは補助因子を必要とす  
る酸化反応は急激に衰え、乳酸、コハク酸、システ  
インなどの酸化の如く比較的簡単な酵素系によるも  
のの低下は少ないものと考えられる。

このことは溶菌後の遠沈上清もこれら基質の酸化  
能を有することからもうかがわれる。

従つて免疫血清処理によつては溶菌現象が比較的  
早期に起り、菌体内部の酵素は比較的安定したまま  
外液中に溶出し、その後もある種酵素は活性を維持  
するのに対し、蒸溜水等不適當な媒質に浮遊した場  
合には溶菌(自家融解)が起る以前に菌体内部でか  
なりの失活を来すものと想像される。

次にシステインの分解に於ける量的関係を溶菌前  
後で比較する。

システインは種々の細菌に於いて、一種類の酵素  
で<sup>14)</sup>、或いは別々の酵素で<sup>15)16)</sup> 脱アミノと脱硫化  
水素を受けるとされている。

コレラ菌に於いても溶菌前(無処理菌体)、及び溶  
菌後共に脱アミノ、脱硫化水素が認められる。然し  
これが同一酵素によるが、別々の酵素によるかは判  
明しなかつた。

而して溶菌前では  $O_2$  消費に対する  $NH_4^+$ 、 $H_2S$   
生成量の割合は比較的小であり、これはシステイン  
が脱アミノ、脱硫化水素反応を受けた後、更に続い  
て次の酸化反応が起るためと考えられるのに対し、  
溶菌後では  $O_2$  消費に対する  $NH_4^+$ 、 $H_2S$  生成量が  
大であり、これは脱アミノ、脱硫化水素に続く二次  
的反応が起り難いためと考えられる。

次にトリプトファンよりのインドール生成反応に  
ついて見る。

インドール生成酵素(トリプトファナーゼ)は一  
般に適応酵素であり、コレラ菌に於いても菌体をト  
リプトファンに接触せしめることにより適応的に生  
成する。

然し溶菌後に於いてはこのインドール生成反応が起り難く、適応酵素産生能は溶菌によつて失われると見做される。

### V. 結 言

前編同様コレラ菌3株を供試菌とし、菌体を種々の媒質に浮遊せしめた場合の酵素活性の変化、及び菌液に免疫血清、補体を加え溶菌に至る迄時間を追つて酵素活性の変化を検討して次の結果を得た。

1. 菌体を食塩加磷酸緩衝液で洗滌すると酵素活性は余り低下しないが、食塩無添加緩衝液、食塩水、蒸留水などで洗滌すると急激に酵素活性が低下すると共に生菌数は減少する。

2. 菌液に免疫血清及び補体を加えると、時間と

共に酵素活性は低下し、溶菌が起る血清濃度100~300倍稀釈でこの傾向が最も著しい。

3. 基質別に見ると、グルコース、焦性ブドウ酸、アスパラギン酸などの酸化能は溶菌によつて著しく低下し、乳酸、コハク酸、システインなどの酸化能は比較的低下が少なく、溶菌後の遠沈上清にもこれら酸化能は残存する。

4. システインの脱アミノ、脱硫化水素反応は共に溶菌後も残存するが、トリプトファンよりのインドール生成能は溶菌によつて失われる。

終りに臨み、御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚なる謝意を表します

### 参 考 文 献

- 1) Peterson, W. H. & Peterson, M. S.: *Bact. Rev.* 9 (1945).
- 2) 水野, 小坂: *日本細菌学雑誌*, 7, 229 (1952).
- 3) 水野, 入江: *日本細菌学雑誌*, 7, 227 (1952).
- 4) 鷹取: *日本細菌学雑誌*, 7, 251, 253 (1952).
- 5) 新井: *日本細菌学雑誌*, 7, 343 (1952).
- 6) 刈屋: *日本細菌学雑誌*, 9, 147 (1954).
- 7) Haris, J. O.: *J. Bact.*, 56, 3 (1948).
- 8) Sevag, M. G. & Miller, R. E.: *J. Bact.*, 55 (1948).
- 9) 新井: *神戸医科大学紀要*, 6巻, 4号, 1 (1956).
- 10) Umbreit, et al.: *Manometric Techniques*.
- 11) 齊藤: *光電比色計による臨床化学横査*, 95.
- 12) St. Lorland: *Z. Physiol. Chem.*, 228, 300 (1930).
- 13) 後藤: *大阪医学会雑誌*, 37, 2413 (1938).
- 14) Desnuelle, P. & Fromageot, C.: *Enzymol.*, 6, 80 (1939).
- 15) Fromageot, C. & Kium, P. K.: *Bull. Chem. Biol.*, 23, 147 (1941).
- 16) Desnuelle, P., Wookey E. & Fromageot, C.: *Enzymol.*, 8, 225 (1940).

## Effect of Immune Serum on the the Enzyme Activity of Vibrio Cholera

By

Toyozaki OKADA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Sakae MURAKAMI)

### Part I Effect of Immune Serum and Complement on O<sub>2</sub> Uptake

Using the 3 strains of *Vibrio cholera*, original strain (INABA's strain), intermediate variant strain (HIKOZIMA's strain) and variant strain (OGAWA's strain), the author studied the effect of immune serum and complement on O<sub>2</sub> uptake of the resting cells of these microorganism. Immune serum was added into the resting cell suspension, in which complement

was added in an experiment and was not in another experiment, in a various concentration with substrate. And obtained the following results

1) With absence of complement  $O_2$  uptake was inhibited to a slight degree by the addition of immune serum. The inhibition was increased, correspondingly with the concentration of the serum. This findings was supposedly due to the agglutination of bacteria by the action of the immune serum.

2) In the presence of complement,  $O_2$  uptake was also inhibited by the addition of immune serum; especially, strongly inhibited at a low concentration of that, i. e. in dilutions of 1:300—1:400. The inhibition was supposed to be arisen from the lesion on the cells being to be bacteriolysis shortly after that.

## Part II Enzyme Activities Affectèd by Bacteriolysis

Using the 3 strains of *Vibrio cholera* as in the part I, the author observed the changes on the enzyme activities of the bacterial cells by affecting the cells by means of suspension into various media or immune reaction. The following results were obtained.

1) The enzyme activities were not so decreased by the washing of the cells with saline added phosphate buffer. But the activities and the numbers of surviving cells were markedly decreased in the case of the washing with saline unadded phosphate buffer, saline solution or distilled water.

2) The enzyme activities were decreased proportionally to the affection time of immune serum and complement, and eventually bacteriolysis occurred. This finding was most distinctive in dilutions of 1:100—1:300 of serum.

3) The decrease of oxidation capacity by bacteriolysis was differ in the substrate oxydized. That was very prominent in the case of glucose, pyruvate and aspartate, while that was rather slight at the oxidation of lactate, succinate and cysteine, and the presence of the oxidation capacities was also found in the centrifuged supernatant of bacteriolysed cells.

4) The deaminative and the desulfhydrative abilities for cysteine were retained after the lysis of bacteria, but these for formation of indol were not found at that state.

---