血清, 尿, 食品中のシスチン定量用合成培地条件 の設定について (第1編)

A Minimal Medium for Analysis of Cystine in Serum, Urine and Foods. (Part 1)

滅菌時のシスチンの破壊について

The decomposition of cystine at the time of sterilization

国立栄養研究所 (The National Institute of Nutrition)

一之瀬 幸男 (Yukio Ichinose)

On the determination of amino acid contents in serum, urine and foods, minimal medium for the microbioassay was established except cystine.

There are two questions in the case of cystine.

- (1) The standard curve is low.
- (2) The recovery is no good.

As it is thought that the fall of standard curve was due to the decomposition of cystine in the time of sterilization, the author observed the decomposition of cystine at the usual condition of sterilization (15 pounds, 10 minutes; autoclaving). And the decomposition of cystine was certified even in the exact condition of sterilization (15 pounds, 3 minutes, autoclaving).

緒言 血清, 尿, 食品中のアミノ酸を定量する場合, 微生物法は正確に微量 (γ の桁) 迄はかれるという点で化学的方法に優っている。

しかも Henderson, L. M., Snell, E. E.¹⁾; Sauberlich, H. E., et al.²⁾; 田村学造等³⁾の多年の努力によりシスチン以外はアミノ酸定量用の合成培地が設定される段階にきた。

然るにシスチンの場合のみは多くの研究者達の集中的追求にもかかわらず, 合成培地条件が設定されず, 未だに天然培地 (H_2O_2 処理カゼイン⁴⁾, H_2O_2 処理ペプトン⁵⁾, ランチオナイズドカゼイン⁶⁾) が用いられている現状である。

従来の文献及び, 著者の予備実験からして, シスチンの場合の問題点は, (1) 標準曲線が低いこと, (2) 回収率が悪いことの2点になることを知った。

シスチン定量用合成培地という最後に残された煉瓦を積み上げることにより, アミノ酸定量用合成培地の完成を期した著者は, まづ問題点(1)から検討を進めた。

実験方法

- (1) 使用菌株 シスチンに対して最も敏感とされている *Leuc. mesenteroides* P-60 を用いた。
- (2) 接種菌数 慣行の方法によつて前培養, 無菌的遠心分離後, 滅菌生理的食塩水中に懸濁した。従来は自製の毛細管から1滴宛懸濁液を滴下していたが, 今回以後は次の如く接種条件を厳密にした。即ちあらかじめ乾燥

第1表 接種菌数

菌数	調査回数	第 1 回	第 2 回
総菌数/0.01 cc		15×10^6	17×10^6
生菌数/0.01 cc		13×10^6	15×10^6

37°C, 培養時間72時間で行った。培養終了後5分間煮沸し, 増殖菌が代謝生成した酸量をN/20 NaOH で滴定した。

実験結果 われわれが培地を滅菌する場合, 通常15ポンド10分の条件を使っているが, Maxine E. Hutchin⁷⁾等によると, シスチンを含んだ培地を15ポンド15

第 1 図

第 2 図

の破壊をきたすことを知った。

Seitz filter 処理群と10ポンド5分滅菌(培地とシスチン標準液と一しよに)群とを比較したところ, かさなり合うカーブを得た。再度くりかえしたがやはり同様な成績が得られた。第4図に記す。

考察 高等動物においては「シスチンの必須性は第二義的(Secondary)である」という, R. B. Fisher⁸⁾の説を先人はことごとく信じたし, 著者も研究の初期には, やはりそうかと思つた。この説を発展的に解釈すると

滅菌した2cc注射筒より1滴(0.01ccにあたる)を滴下し接種した。これにより菌数条件がほぼ一定した。第1表に記す。

(3)使用培地及び培養³⁾ 田村等が設定した標準培地よりシスチンを抜いたものの倍量(Double strength)を用いて培地をつくり, 2cc(培地1cc+シスチン標準液及び蒸留水1cc)培養を行つた。アミノ酸は主としてG. B. I. 製品を用いた。培養温度

7) Maxine E. Hutchin等によると, シスチンを含んだ培地を15ポンド15分オートクレイブするとシスチンの破壊が起ることを報じている。

そこで慣行法である15ポンド10分滅菌(培地と標準液と一しよに)時のシスチンの破壊の有無をみたところ, 一部破壊することを知つた。第1図に記す。

7) Maxine E. Hutchin等はさらに加圧条件を検討し, 10ポンド5分滅菌(培地と検体と一しよに)ではシスチンの破壊は起らないとのことゆえ, 10ポンド5分滅菌(培地と標準液と一しよに)時のシスチンの破壊の有無をたしかめたところ, 思いがけなくも10ポンド5分滅菌群のカーブが基準群(15ポンド3分滅菌)を上まわる成績を得た。もう一度くりかえしたがやはり同様の成績が得られた。(第2図)

この時の基準群は, シスチン標準曲線作製の際最も厳格に取扱う時の方法, 即ち培地とシスチン標準液とを別々に15ポンド3分滅菌し, 無菌的に加え合せたものである。

そこで加圧処をさけ, シスチン標準液をSeitz filter でこし, 培地は15ポンド3分滅菌し, 無菌的に加え合せ, 基準群と比較したところ, 基準群のカーブの下降を認めた。第3図に記す。

シスチン標準液の15ポンド3分の加圧処理はシスチン

「メチオニンとカリジンとに較べると, シスチンの場

第 3 図

合は生体に対する感受性が相当低いので, 必然的にシスチンの標準曲線も低くなる」との推論に落込んでしまふ。シスチンはメチオニンの従属的存在であるとの解釈から, 培地中のメチオニン含量を色々変えてみたが何等の糸口もつかめず, 先人達と同じく壁につきあたってしまった。たまたま, 15ポンド10分滅菌中, タイムスイツチのベルの故障のため, 15ポンドで29分間も滅菌したことがあつた。この時のシスチン標準曲線は完全にねてしまつて, 使いものにならなかつたが, このグラフを見て

いるうちに, シスチンが滅菌中にこわれるのではなからうかとの予感におそわれた。これが本課題解明の糸口となつた。第3編において, 徹底的に究明したが, 高等動物の場合と異なり, 「Leuc. mesenteroides P-60 においては, シスチンは第一義的に必須である」事実を強調したい。

第 4 図

総括 本検討で次のことを知つた。

- (1) 通常の滅菌条件である15ポンド10分加圧ではシスチンの破壊が起る。
- (2) シスチンの標準曲線が低いのは, あらかじめシスチン標準液を15ポンド3分滅菌する際のシスチンの破壊に由来する。

稿を終るに当り, 終始御懇篤なる御教導を戴いた大阪医科大学教授, 杉本好一博士に深く感謝致します。また終始御指導御鞭撻を戴いた所長, 有本邦太郎博士, 食品化学部長 速水決博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Henderson, L. M., Snell, E. E. : J. Biol. Chem., 172, 15 (1948)
- 2) Sauberlich, H. E., Reynolds, M. S. et al : J. Biol. Chem., 177, 533 (1949)
- 3) 田村, 角田, 桐村, 宮沢 : 農化, 26, 465 (1952)
- 4) Toennies, G. : J. Biol. Chem., 145, 667 (1942)
- 5) Gerald D. Shockman, Joseph J. Kolb, Gerrit Toennies : Anal. Chem., 26, 1657 (1954)
- 6) Millard J. Horn, Amos E. Blum : Cereal Chem., 33, 18 (1956)
- 7) Maxine E. Hutchin, Harold A. Harper, Sheldon Margen, Laurance W. Kinsell : J. Biol. Chem., 185, 839 (1950)
- 8) R. B. Fisher : Protein metabolism, 98 (1954)

(受付: 昭和35年7月31日)