腐敗アミンの細菌発育に及ぼす影響 (第 III 報)

Ethanolamine による *Proteus morganii* の発育促進

Effect of the Putrefactive Amines on Bacterial Growth (Report III)

Growth Promoting Effect of Ethanolamine on *Proteus morganii*

千葉大学腐敗研究所 (指導 宮木高明教授)

榎 山 浜 子

Hamako Momiyama

Institute of Food Microbiology, Chiba University

(Director: Prof. K. Miyaki)

Proteus morganii はアレルギー様食中毒の原因菌であることが最近明らかにされた。

即ち, *Proteus morganii* は histidine の豊富な魚肉に繁殖して, histidine の脱炭酸により histamine を生成し, これを異常に蓄積させるものである。この菌はまた histidine に限らず, 極めて強い他のアミノ酸脱炭酸酵素を形成することも宮木¹⁾, 安藤により明らかにされている。従つて, 腐敗アミンが菌の発育, 生理にいかに関与するかを検討する場合, *P. morganii* は好個の対象となりえよう。

著者は第 I 報²⁾ と同じ方法で腐敗アミン 12 種の *P. morganii* の発育に及ぼす影響を合成液体培地を用い静置培養で比濁法により調べた。

更に発育促進を示したアミンについて, Monod³⁾ 振盪培養により発育曲線を調べた。

実験材料と方法

1. 使用菌 *Proteus morganii* (阪大微研株)

2. 使用アミン (第 I 報参照)

methylaniline, trimethylamine, trimethylamine oxide, choline, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine 以上塩酸塩, ethanolamine hydrobromide, agmatine sulfate, arcaine sulfate, γ -amino butyric acid の 12 種がこの実験に用いられた。

3. 培地 pH 7.4 の合成液体培地を用いた。組成は次に示す。

Na-glutamate	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.0 g

KCl	0.5 g
チスチン	32mg
glucose	4.0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
nicotinic amide	25mg

蒸留水を加えて 1,000 ml とする。別に Ca-pantothenate を Seitz 濾過して, 培地 1,000 ml に対し 100 γ の割合に加えて使用する。

4. 実験方法 普通斜面に 20 時間培養した菌を, 更に上記合成培地で 20 時間培養し, 使用時約 5×10^5 個/ml の割合に培養液に移植する。滅菌した比濁用試験管に次の 3 者を分注する。

(a) 培養液 6.0 ml。

(b) pH 7.4, M/15 phosphate buffer でのそれぞれのアミン塩の溶液。これは終末濃度が遊離アミンとして 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} M になるような濃度にする。これを 0.7 ml。

(c) 菌浮遊液 0.3 ml。

対照には pH 7.4, M/15 phosphate buffer を使用。

1 種のアミンについてそれぞれの濃度 3 本ずつの組合せを作った。

37°C で 20 時間静置培養。これを比濁して発育度を測定した。測定値は 3 回繰返し の平均値を用いた。

なお, 菌数計算は平板培養法によっている。

実験成績

I. 静置培養によるスクリーニングの実験成績

結果は第 1 表と第 1 図に示す通りで, *P. morganii* に対して methylaniline, ethanolamine, agmatine,

arcaine それぞれ 10^{-3} M 濃度で対照に比し発育促進を認めた。その程度は ethanolamine が対照に比して約3.7 倍の促進効果を示し, methylamine が 2.1倍, agmatine arcaine はそれぞれ 1.6倍促進を示している。

この場合 methylamine には NH_4^+ の存在が明らかなので, methylamine そのものの効果とはいえない。また agmatine, arcaine の促進効果は僅かなものである。

もし効果があると許容しても *Aerobacter aerogenes* の場合と異なつて, 全く agmatinase を本菌は有していないことが認められたのでその促進機作は不明である。

第 1 表

control	1	1)
methylamine 3)	2.1	2)
trimethylamine	0.8	
trimethylamine oxide	0.8	
ethanolamine	3.7	
choline	0.8	
putrescine	0.9	
cadaverine	0.9	
agmatine	1.6	
arcaine	1.6	
histamine	0.8	
tyramine	0.9	
r-amino butyric acid	0.8	

註: 1) 数字は対照を 1 として換算した値を示す

2) 下に線を引いた数字が発育促進を認めたもの

3) アミン濃度はいずれも 10^{-3} M

第 1 図 amines の *Proteus morganii* の発育に及ぼす影響

縦軸: 比濁計の吸光係数の読みの対照を 1 とした時の値を示す

横軸: amines それぞれ 10^{-3} M

II. 発育曲線について

実験条件は静置培養の時と同じであるが, Monod 振盪用試験管を用いた。これに菌を比濁計の読みで 0.04 ~ 0.06 位接種する。培養は 30°C の恒温槽で振盪数 1 分間 30 回で行い, 発育に伴う濃度を比濁測定した。

1) methylamine, ethanolamine, agmatine, arcaine 10^{-3} M 添加の影響

第 2 図のごとく ethanolamine 10^{-3} M 添加は対数期の発育促進と定常期の高さが対照より高いことが認められる。agmatine, arcaine, methylamine は対照とほとんど差がないように認められる。

2) アミノ酸よりのアミン生成と発育曲線

(i) histidine 10^{-3} M 添加の影響

宮木¹⁾, 安藤の実験により同菌が glutamate, ornithine, lysine, histidine の脱炭酸を行うことが認めら

第 2 図

第 3 図

れている。これらのアミノ酸を添加した場合の発育曲線の影響を調べた。アミノ酸は histidine を用い、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-3}M 添加を同時に行つた。

第3図のごとく histidine 10^{-3}M のみでは発育促進作用は認められない。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-3}M とともに加えた時に促進作用を示す。

histidine の形成される時期は発育曲線よりみるとこの実験の場合には対数期の終り頃から認められた。しかしこの histidine の発育に対する影響は認められない。

(ii) serine 10^{-3}M 添加の影響

林¹⁾は最近 *P. morganii* が serine, threonine を脱炭酸することをみつけたが、serine 10^{-3}M 添加は第4図のごとく $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-3}M の添加がなくても発育促進作用を示すことが認められる。

3) 第5図には ethanolamine, serine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

第4図

第5図

urea 添加の影響を示す。urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のそれぞれ 10^{-3}M は非常に対数期の発育を促進し、定常期の高さが高い。ethanolamine, serine 10^{-3}M は urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ より劣るが発育促進を認める。しかしそれぞれ 10^{-5} , 10^{-7}M は対照とほとんど変わらない発育曲線を示す。

考 察

Proteus morganii の発育に対するアミンの影響は、静置培養において ethanolamine の促進効果が顕著に見出され、これについて methylamine, agmatine, arcaine にもそれぞれ僅かに発育を促進することが認められたが、この3つのアミンの効果は疑わしい。いずれも濃度は 10^{-3}M であつて、 10^{-5} , 10^{-7}M では効果がない。

また、Monod 法の振盪培養を行つた結果では ethanolamine のみによつて特に発育促進のあることが認められた。発育に対してはその対数期の発育促進と定常期の高さの低いことは *Aerobacter aerogenes* の発育促進を示す agmatine, arcaine, putrescine の態度と同じようにみられる。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea は *A. aerogenes* の場合と同様に非常に発育を促進するが ethanolamine も glucose, Na-glutamate の存在する時に窒素源として利用されるものと思われる。しかし *Proteus morganii* の静止菌を用いて Warburg 呼吸計で測定してみると、ethanolamine は酸化分解を受けない。第I報における発育促進を示したアミンの代謝過程とは異なることが考えられる。その機構は今研究中であるが、transamination が一応推定されている。

これについては別に報告する。

次に ethanolamine の母体とみられる serine は明らかに発育を促進することが Monod 法で明らかにされた

第2表 *Proteus morganii* の発育に対するアミンなどの促進効果

methylamine	—	trimethylamine	—
trimethylamine oxide	—	ethanolamine	+
choline	—	putrescine	—
cadaverine	—	agmatine	±
arcaine	±	histamine	—
tyramine	—	γ-amino butyric acid	—
urea	++	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	++
serine	+	serine + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	++
histidine	—	histidine + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+

(いずれも glucose, Na-glutamate, 無機塩培地 $\sim 10^{-3}\text{M}$ を加える)

が、これが ethanolamine 生成を経て促進効果を現わすのかどうかはまだ明らかでない。

なお、histidine はN源となりえず、 NH_4^+ 存在で初めて発育を促進する。そして脱炭酸は対数期後半に起つて histamine を生ずる。もし、serine 脱炭酸も同様とすれば必ずしも ethanolamine の生成を待たずに利用されることが推定できる。

また、Proteus morganii を(a) glutamate 培地(基礎培地)、(b) glutamate + serine 10^{-3}M 培地と (c) glutamate + ethanolamine 10^{-3}M 培地で前培養し、それぞれ同一量の菌を a,b,c 培地に接種したところ(即ち9種類)、前培養にほとんど影響なく b 培地に最もよく発育し、次に c 培地、次に a 培地の順であつた。これは serine, ethanolamine を加えれば発育によいのは今までに述べてきたことで当然の事実であるが、その順序(b>c>a)と発育度の程度には前培養での影響はほとんどみられなかつた。即ちこの場合適応にはあまり関係ないものと思われる。

なお、glucose、無機塩培地に窒素源として、glutamate の代りに serine, ethanolamine をそれぞれ同濃度、即ち $1.2 \times 10^{-2}\text{M}$ 加えた時、窒素源として利用されるかどうか静置培養を行つてみたが約 5×10^5 個/ml 程度の菌量の接種では発育は認められなかつた。この場合 ethanolamine と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の両方を混ぜて $1.2 \times 10^{-2}\text{M}$ になるように加えた時は、軽度で発育が認められた。このことについてはまた別に述べるが、どのような機構で窒素源として使われるかということは実に興味

あることである。

結 論

1) 腐敗アミン12種の Proteus morganii の発育に及ぼす影響を合成液体培地を用い、静置培養で比濁法により調べたところ、 10^{-3}M 濃度で ethanolamine が対照に比し発育を促進した。

静置培養で発育を促進したアミンは更に振盪培養によつて調べた。その結果 ethanolamine 10^{-3}M 濃度は対照に比し対数期の発育の促進と、定常期の高さの高いことが認められた。

2) serine 10^{-3}M 濃度も ethanolamine と同様に発育を促進した。

3) ethanolamine の促進効果は glucose, Na-glutamate の存在において、菌の窒素源として利用されるものと思われる。

終りに臨み本研究に御懇篤な御指導、御校閲を賜つた東大衛生学教室の羽里教授、千葉大学腐敗研究所微生物化学部の林助教授に心より感謝の意を表する。

文 献

- 1) 宮木高明・林誠・安藤宗八・叔山浜子：科学，26，470(1956).
宮木高明・林誠：腐敗研究所報告，10，135~144(1956).
- 2) 叔山浜子：日本衛生学雑誌，10，238~243(1956)
- 3) Jacques Monod：Ann. Rev. Microbiol., 3，371~394(1949).

(受付：1956年12月20日)