防腐剤の作用機構に関する研究 (第1報)* Hexamethylenetetramine と Formaldehyde の殺菌並に静菌作用に就て

山 田 金 次 郎

(東海区水産研究所)

Studies on the Mechanism of Action of Preservatives. I.
Antibacterial Action of Hexamethylenetetramine and Formaldehyde

KINJIRO YAMADA

Earlier works on the antibacterial action of preservatives were chiefly concerned with studying the variation in toxicity from one member of a homologous series to the next and there was scarcely anything on the mode of the action.

Accordingly, the writer intend to report in this paper some observations which throw light on the mechanism of antibacterial action of hexamethylenetetramine and formaldehyde.

The results obtained are as follows;

- (1). The bactericidal and bacteriostatic actions of hexamethylenetetramine are attributed to the free formaldehyde in its solution (Table 1, 2 and Fig. 3).
- (2). The bacteriostatic efficiency of formaldehyde is not markedly increased by increases of hydrogen-ion concentration (Fig. 4).
- (3). The inhibitory effect of formaldehyde on the growth of *Escherichia coli* is repressed by cysteine (Fig. 7).

Hexamethylenetetramine は 1860 年に BUTCHEROW に依つて合成され 1890 年 NICOLAÏER に依り泌尿器管の消毒剤として使用されて来たものであり、之を食品防腐剤として使用することはドイツ及びソ聯に於て公に認められ水産食品にもその使用が許されている。之に反し Formaldehyde は燻製品中に通例 5~100 p.p.m. 含有せられ燻製品の防腐効果は一部 Formaldehyde に依るものと考えられているにも拘らず各国共 Formaldehyde を防腐剤として使用することは固く禁止している。

Hexamethylenetetramine の薬理学的な効果に就ては未だ確定した説がないが NICOLAÏER は Hexamethylenetetramine の摂取に依り Formaldehyde が分解生成物として出来、その Formaldehyde が菌の生育を阻害するものとしている¹⁾。Formaldehyde の防腐機構又は静菌機構に関しては見るべき研究がなく唯 WYSS²⁾ は防腐剤に依る菌の発育阻害作用に関する綜説に於て Formaldehyde が -S-S-基を活性基とする Disulfide 酵素を不活性にすることを記載しているに過ぎない。

Sulfonamide 剤の静菌機構に関する有名な WOODS—FILDES の説が発表せられたのは 1940 年のことであり³⁾、且 Formaldehyde は Amino 基, Imino 基, Amide 基, OH 基, SH 基 等に結合し又還元剤として時には酸化剤として作用する Active agent である為⁴⁾ その防腐機構又は静菌機構の解析が困

* 東海区水産研究所業績 B 第 43 号 (印刷費負担)
(昭和 26 年 3 月 10 日受理)

難である故であろう。著者は防腐剤の作用機構に関する研究を行うに当り先づ Hexamethylenetetramine と Formaldehyde の殺菌並に静菌作用に就て調べたのでその結果を此処に報告する。

実験 1. 殺菌試験

既に述べた如く Hexamethylenetetramine の泌尿器管に於ける消毒効果は分解生成物たる Formaldehyde に依ると考えられているので Hexamethylenetetramine 溶液中の遊離 Formaldehyde 量を測定し、それとほぼ同じ力価を有する Formaldehyde 溶液と Hexamethylenetetramine 溶液とに就て 15 種の菌に就きその殺菌力を調べた。被検薬品としては武田化学薬品会社の Hexamethylenetetramine と局方の Formalin を使用した。即ち 1.00 % Hexamethylenetetramine 溶液を 20 分間蒸気殺菌し 10 cc を滅菌試験管に採り被検液とし残液に就て遊離 Formaldehyde を Cyanide 法に依り測定した。別に局方 Formalin を適宜稀釈し Hexamethylenetetramine 溶液の遊離 Formaldehyde と略同濃度とし 20 分殺菌し被検 Formaldehyde 溶液とした。殺菌試験方法は、F.D.A. 法に準拠して行つた。即ち前記被検液 10 cc に継代培養せる細菌の培養液を 0.20 cc 加え一定時間毎に後培養して菌の生存を調べた。その結果は第 1 表、第 2 表の如くであつて、第 1 表は桿菌、第 2 表は球菌に対する結果である。

Table 1. Bactericidal action of hexamethylenetetramine and formaldehyde against various bacilli at 27~30°C

Organism			Disinfectant	Time to kill, in hours							
Species	Spore formation	Gram staining		3	5	7	10	15	24	48	72
<i>B. subtilis</i>	+	+	H*	+	+	-	-	-	-	-	-
			F*	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. mesentericus</i>	+	+	H	+	+	+	-	-	-	-	-
			F	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. megatherium</i>	+	+	H	+	+	+	-	-	-	-	-
			F	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli communis</i>	-	-	H	+	+	+	+	+	+	-	-
			F	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	-	-	H	+	+	+	+	+	+	+	+
			F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	H	+	+	+	+	+	-	-	-
			F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. schuylkilliensis</i>		-	H	+	+	+	+	-	-	-	-
			F	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	H	+	+	+	+	+	+	+	-
			F	+	+	+	+	+	+	+	-

* H: 1.00 % hexamethylenetetramine solution containing 49.5 γ free formaldehyde per cc

* F: Formaldehyde solution diluted to the concentration desired (46.8 γ formaldehyde per cc)

+, growth; -, no growth in 48 hours

Table 2. Bactericidal action of hexamethylenetetramine and formaldehyde against various cocci at 29~30°C

Organism		Disinfectant	Time to kill, in hours							
Species	Gram staining		3	5	7	10	15	24	48	72
<i>Micrococcus subflavus</i>	+	H*	+	+	+	—	—	—	—	—
		F*	+	+	+	+	—	—	—	—
<i>M. No. 2</i>	+	H	+	+	+	+	+	+	+	+
		F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. No. 11</i>	+	H	+	+	+	—	—	—	—	—
		F	+	+	+	+	—	—	—	—
<i>M. No. 12-1</i>	+	H	+	+	+	+	—	—	—	—
		F	+	+	+	+	—	—	—	—
<i>M. No. 12-2</i>	+	H	+	+	+	+	+	—	—	—
		F	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>Serratia marcescens</i>	—	H	+	+	+	—	—	—	—	—
		F	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>Staph. aureus</i>	+	H	+	+	+	+	+	—	—	—
		F	+	+	+	+	+	+	+	—

*H: 1.00 % hexamethylenetetramine solution containing 68.9 γ freeformaldehyde per cc*F: Formaldehyde solution diluted to the concentration desired (42.4 γ formaldehyde per cc)

+, growth; —, no growth in 72 hours

桿菌に於ては Hexamethylenetetramine と Formaldehyde の殺菌力が可成一致しているも球菌の場合には多少の相異が認められる。之は供試 Formaldehyde と Hexamethylenetetramine の力価の差異に基くものと考えられる。従つて之等の結果より Hexamethylenetetramine の殺菌力は *Pseudomonas fluorescens* を除き他の菌は総て遊離 Formaldehyde に依るものと断ずることが出来る。被検菌 15 種の内 *Pseudomonas fluorescens* のみが異つた結果を示すことは実験過誤に依るものかとも一応考えられるので追試験を行つたが再び第 1 表と同様な結果を得た。故に Hexamethylenetetramine の *Pseudomonas fluorescens* に対する殺菌機構は他の菌に対すると異なるものであらうと考えられこの点に関しては他の機会を俟つて研究を行う予定である。

実験 2. 静菌試験

静菌作用に及ぼす Hexamethylenetetramine と Formaldehyde との関係を見る為次の如き実験を行つた。被検菌としては Hexamethylenetetramine の殺菌作用が全く遊離 Formaldehyde に帰せられると見做される菌即ち桿菌としては大腸菌を、球菌としては *M. subflavus* を使用した。被検液としては 10.0 %, 1.00 % 及び 0.100 % Hexamethylenetetramine 溶液並に 0.5 %, 0.05 % 及び 0.005 % Formaldehyde 溶液を用い之をプイヨン 10.0 cc (Peptone 10 g, 肉—extract 10 g, 食

Fig. 1. Circuit of photo-electric nephrometer

塩 5g, 水 1l; pH 7.0) に夫々 0.20, 0.40~1.00 cc 宛加え前記継代培養せる菌液を一白金耳接種し 30°C に放置し 18 時間後に菌の発育度を光電光度計に依つて測定し透過率で表した。尙作製した光電光度計の回路を示すと第 1 図の如くである。

先づ大腸菌に対する Hexamethylenetetramine と Formaldehyde の静菌作用を調べたがその結果

Fig. 2. Growth of *Micrococcus subflavus* in relation to the concentration of hexamethylenetetramine and formaldehyde added to broth

に依ると Formaldehyde に於ては 0.005 % 溶液で明かに静菌作用を示すが Hexamethylenetetramine では 10 % 溶液でもその静菌作用は明かでなかつた。次に *M. subflavus* に対する Hexamethylenetetramine と Formaldehyde の静菌作用を調べた結果は第 2 図の如くであり Hexamethylenetetramine に於ても大腸菌の場合と異り 1 % 以上の溶液を加えると明瞭な静菌効果が見られた。

この結果より Hexamethylenetetramine

溶液の静菌作用を遊離 Formaldehyde に基き Formaldehyde 溶液のそれと対比すると第 3 図の如くとなる。

則ち遊離 Formaldehyde の量が同じになる様に加えれば Hexamethylenetetramine も Formaldehyde も全く同様の静菌作用を示すことが判る。従つて Hexamethylenetetramine の静菌作用も殺菌作用と同様遊離 Formaldehyde に帰せられることが判る。先に述べた如く *Pseudomonas fluorescens* に対する殺菌作用が他の菌と異り従つてその静菌作用も又異ると推論され得るが、Hexamethylenetetramine の静菌機構を明かにする為には先づ以て Formaldehyde の静菌機構を明かにする必要があるものと考え之に関し、二の実験を行つた。

Fig. 3. Comparative bacteriostatic powers of hexamethylenetetramine and formaldehyde solution added to broth based on free formaldehyde

実験 3. Formaldehyde の静菌作用に及ぼす pH の影響

防腐剤の防腐効果は pH に依り可成大きな差異を示すことがあるので^{5) 6)} Formaldehyde の静菌作用が pH に依り如何なる差異を示すかを見る為並に今後の機構解析に対処する為に本実験を行つた。ブイオン培地に 1N 苛性ソーダ又は 1N 塩酸を加え pH を調整し、この培地を 10.0cc 宛滅菌試験管に採り加圧殺菌し、之に 0.05 % Formaldehyde 溶液 0.10 cc 加え、継代培養せる大腸菌を一白金耳接種し 30°C 18 時間後に菌の生育度を調べた結果は第 4 図の左端に示す如くであり、0.50 cc の Formaldehyde 溶液を加えた場合は右端に示す如くである。この結果より Formaldehyde の静菌作用は pH の増大と共に減少する傾向にあるがその影響は安息香酸、サルチル酸、亜硝酸の場合⁷⁾ の如く大きなものでないことが判る。

Fig. 4. Relation of pH value to the bacteriostatic action of formaldehyde against *Escherichia coli communis* at 30°C

I a: Added 0.1 cc of formaldehyde solution (486 γ per cc) to 10 cc broth

I b: Added 0.5 cc of formaldehyde solution

II: Not added

Optical density was determined with cultures after 18 hours' incubation

/ 実験 4. Formaldehyde の静菌作用に及ぼす Amino 酸の影響

第 2 図より明かな如くブイオン培地 10 cc に対し Formaldehyde は 66 γ で明瞭な静菌効果を示す。10 cc のブイオン培地中には 8.24 mg の Formol 態窒素を含み之が総て Formaldehyde と結合して Schiff の塩基を形成するものとすれば之に要する Formaldehyde は 17.6 mg となる。然るに明瞭な静菌効果を与える Formaldehyde の濃度はその約 4/1,000 に過ぎない。従つて Formaldehyde の静菌作用は菌の特定の必須代謝物質又は酵素の活性基に Formaldehyde が作用する為に生ずるものと考えられる*。既に述べた如く Formaldehyde は Amino 基以外 Imino 基, Amide 基, OH 基, SH 基等に結合し又還元剤として時には酸化剤として働き且大腸菌は無機窒素化合物より Amino 酸を合成することが出来得る。従つて特定の Amino 酸が必須代謝物質として当然考え得られるので菌の生育に及ぼす Formaldehyde と種々の活性基をもつた Amino 酸の拮抗作用を調べた。使用せる Amino 酸は 12 種則ち Glycine, β -Alanine, l-Leucine, d-Glutamic acid, l-Glutamic acid, Histidine 塩酸塩, Arginine 塩酸塩, l-Tryptophan, d, l-Methionine, l-Cysteine 塩酸塩, Cystine 及び Tyrosine であつてこの外に Asparagine に就ても実験を行つた。

実験方法はブイオン培地 10.0 cc に 0.05 % Formaldehyde 溶液 0.50 cc 加え之に 0.200 % Amino 酸液を 0.10 より 1.00 cc まで無菌的に加え継代培養せる大腸菌を一白金耳接種し 30°C, 18 時間後に菌の生育度を調べた。但し Tyrosine と Cystine は難溶性であるのでこの Amino 酸をブイオン培地に 0.020 % 加え之を 1.00 cc より 10.00 cc 宛滅菌試験管に採り之にブイオン培地を加えて全量を 10.00 cc としたものを殺菌し之に 0.05 % Formaldehyde 溶液を 0.50 cc 加え大腸菌を接種し 30°C, 18 時間後に菌の生育度を調べた。之等の結果に於て Cysteine 及び Cystine は Formaldehyde の静菌作用に対し拮抗作用を有する傾向が認められたので (第 5, 第 6 図), 更に高濃度則ち 2.00 % の Amino 酸液に就てこの間の関係を調べた。

但し Cystine は難溶性であるので Cysteine のみに就て行つた。その結果は第 7 図の如くである。

Cystine と Formaldehyde の関係は別の角度より解析を行う予定である。

* Formaldehyde に依る菌毒素の toxoid 化又は Virus の virusoid 化は Amino 基の Formol 反応に依るものであると云はれている⁸⁾。

Fig. 5. Antagonistic action of cysteine on formaldehyde inhibition of *E. coli*

I: Added 0.5cc of formaldehyde solution (599 γ per cc) to the broth

II: Not added

* 0.200 % cysteine hydrochloride solution was used

第7図より Cysteine と Formaldehyde との間には明瞭な拮抗関係が存在することが判る。この様な関係は昇汞⁹⁾及び Quinone 化合物¹⁰⁾の抗菌作用に於ても見られ FILDES は Cysteine の他に Glutathione 及び Thiolactic acid が昇汞に対し拮抗作用を示すが、この拮抗作用が昇汞と SH 基との結合に依るものとは簡単に断定し難いとし、林も亦 Quinone に於て同様な事実を指摘している。今 Formaldehyde と Cysteine が反応し Thiazolidine-4-carboxylic acid を形成する為に拮抗作用を生ずるものとする。Formaldehyde 1 Mol に対し Cysteine 1 Mol を必要とする (1式)。

Fig. 6. Antagonistic action of cysteine on formaldehyde inhibition

I. Added 0.5cc of formaldehyde solution (590 γ per cc) to the broth

II. Not added

Fig. 7. Effect of large amounts of cysteine on the formaldehyde inhibition

I: Added formaldehyde solution (581 γ per cc) to the broth

II: Not added

* 2.00% cysteine hydrochloride solution was used

処が明瞭な拮抗作用が示される Cysteine 塩酸塩の添加量を第7図の如く 2 %溶液 0.2 cc とすると Cysteine として 3.08 mg である。則ち添加 Formaldehyde 290 γ に対する Cysteine の Mol 比は

1:2.6 となる。このことは昇汞及び Quinone の場合と同様単に Formaldehyde と Cysteine との結合則ち Thiazolidine-4-carboxylic acid の生成に依るものとは考え得られないのではなからうか。然し乍らこの 1 式の反応は脱水反応である点亦考慮に入れる必要がある**。この点に関しては目下研究継続中であり後報に於て報告する予定である。

終りに臨み御指導並に御校閲を賜わった故大谷武夫博士、右田正男博士、鉄本総吾博士及び天野慶之氏に深謝の意を表する。

- 1) McCULLOCH, E. C.: Disinfection and Sterilization, 375, 1936.
- 2) MRAK, E. M. & STEWART, G. F.: Advances in Food Research, Vol. 1, 385, 1948.
- 3) NORTHEY, E. H.: The Sulfonamide Allied Compounds, 466, 1948.
- 4) ANSON, M. L. & EDSALL, J. T.: Advances in Protein Chemistry, Vol 2, 277, 1945; Vol. 3, 201, 1947.
- 5) McCULLOCH, E. C.: Disinfection and Sterilization, 2nd Ed., 233, 1946.
- 6) JACOBS, M. B.: Chemistry and Technology of Food Products, Vol. 2, 398, 1944.
- 7) RAHN, O. & CONN, J. E.: Ind. Eng. Chem., 36, 185, 1944.
- 8) SCHULTZ, E. W. & GEBHARDT, L. P.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 32, 1111, 1935.
- 9) FILDES, P.: Brit. J. Exptl. Path., 21, 67, 1940.
- 10) 林: 薬学, 4, 60, 1950.
- 11) RATNER, S. & CLARKE, H. T.: J. Am. Chem. Soc., 59, 200, 1937.

** RATNER 等¹¹⁾ に依ると 0.07 M の溶液に於て平衡は殆ど右に寄っていると云われている。