魚体成分の抗菌作用に関する研究—I. 銅塩添加に依る鮫肝臓の抗菌作用の出現

富 安 行 雄・豊 水 正 道

(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on the Antibiotic Action of Fish Components—I.
Production of the Antibiotic Action of the Shark Liver by Adding Cupric Salts

Yukio TOMIYASU and Masamichi TOYOMIZU

The following facts were found, (1) The shark liver inhibits the growth of *Debaryomyces membranaefaciens* when cupric sulfate has been added (Table 1, 2). (2) The antibiotic action is caused by fatty acids in the liver oil (Table 3, 4, 5). (3) The other cupric salts are also effective as cupric sulfate (Table 6).

I 緒 言

著者等は先に腐敗魚体中には微生物の発育を阻止する物質が存在することを報告した。¹⁾ 細菌の病原毒素生産に銅塩・鉄塩等の必要なことは既に報告せられ、^{2), 3), 4)} 又 WAKSMAN ⁵⁾ は糸状菌による抗菌性物質の生産に於て微量の鉄・銅・亜鉛及びマンガン等の金属塩がその生産を促進することを述べて居るので、サメ肝臓培地に是等の金属塩を微量に添加して腐敗魚体中の細菌を接種し、この抗菌性物質を生産する菌を分離しようと試みたところ、細菌は全く発育しなかつた。著者等はこの作用を研究した結果、サメ肝臓中の脂肪酸に対する銅塩の作用によることを明かにしたので報告する。

II 実 験 の 部

A 実 験 方 法

供試菌株： 下記基本培地で 30°C に於て 48 時間斜面培養を繰返した *Debaryomyces membranaefaciens* (以下 D.m. と略記する) を用いた。

培 地： 基本培地：——D.m. は HAYDUCK 氏培地では発育良好でないで、アスパラギンをペプトンでおきかえた次の如き培地を用いた。

Standard medium

Peptone	10 g.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g.	KH ₂ PO ₄	1 g.
Glucose	50 g.	Agar	20 g.	Distilled Water	1000 cc.

サメ肝臓培地：——蛹エキスのブイヨン培地に葡萄糖を加え、ペプトンの代りにシェモクザメ *Sphyrna zygaena* (LINNÉ) の肝臓を添加した。培地は次の如きものである。

Shark liver medium

Hammer-head shark liver	40 g.	Pupa extract	10 g.	NaCl	2 g.
Glucose	50 g.	Agar	20 g.	Distilled water	1000 cc.

検定方法： 試験管に流入した 10 cc の培地に被検油脂及び銅塩を添加し 95° の湯煎中で 10 分間加温

1951 年 5 月 10 日受理

後よく振盪して混和し、殺菌せるシャーレに流入して、寒天凝固後 D.m. の 2 白金耳を懸濁した 5 cc の無菌水より、1 劃線の巾 1 cm になる様に先端を直角に曲げた硝子棒 (径 3 mm) で菌を劃線した後 30° に培養し 24 時間後及び 48 時間後に菌の發育状態を観察する WAKSMAN の Agar streak method⁶⁾ によつて行つた。

B 実験結果

1. 硫酸銅添加によるサメ肝臓の抗菌作用の出現

サメ肝臓培地には D.m. は良好な發育をするが、前述の如くサメ肝臓培地 10cc に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , MnSO_4 及び $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ 1mg. 宛添加したところ D.m. の發育が全く阻止されたので、是等の塩類をサメ肝臓培地及び基本培地に別々に添加して D.m. を劃線培養した。その結果は第 1 表の如くである。

Table 1. Production of the antibiotic action of shark liver by adding inorganic salts.

Inorganic salts added 1mg./10 cc.	Cult. time (h.)	Shark liver medium		Standard medium	
		24	48	24	48
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		±	+++	±	+++
ZnSO_4		±	+++	±	+++
MnSO_4		±	+++	±	+++
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		—	—	±	+++
Control		±	+++	±	+++

即ちサメ肝臓培地に硫酸銅を添加すると抗菌作用を示すが他の金属塩の添加によつては抗菌力は表れず、又基本培地に硫酸銅を添加しても同様に全く抗菌性を示さなかつた。次にサメ肝臓培地に於て D.m. の發育を阻

止するのに必要な硫酸銅の濃度及び基本培地に於て硫酸銅のみによる阻止濃度を試験した。その結果は第 2 表の如くサメ肝臓培地に於ては 0.4g. のシュモクザメの肝臓の存在に於て硫酸銅の濃度 $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$ で D.m. の發育を完全に阻止するが、基本培地に於ては $5 \times 10^{-3}\text{M}$ であり、サメ肝臓培地に於ける場合の 20 倍の濃度の硫酸銅を必要とした。このことより肝臓培地中のある成分と硫酸銅とに依り抗菌作用が表れるものと考えられる。

Table 2. Concentration of CuSO_4 required in producing the antibiotic action of shark liver.

Concentration of CuSO_4 (M)	Shark liver medium		Concentration of CuSO_4 (M)	Standard medium	
	24h	48h		24h	48h
0.75×10^{-4}	—	++	1.0×10^{-3}	±	+++
1.0×10^{-4}	—	±	2.5×10^{-3}	±	+
2.5×10^{-4}	—	—	5.0×10^{-3}	—	—
5.0×10^{-4}	—	—	7.5×10^{-3}	—	—
Control	±	+++	Control	±	+++

2. サメ肝臓中の有効成分

硫酸銅添加によるサメ肝臓の抗菌作用がサメ肝臓成分の何れの部分に基くかを明かにするために第 3 表の如く磨砕した新鮮なヨシキリザメ *Prionace glauca* LINNÉ の肝臓をアセトン、石油エーテルを用いて分別し、アセトン不溶部・石油エーテル可溶部及び石油エーテル不溶部に分けて各部分 0.5 g をそれぞれ 10cc の基本培地に添加し硫酸銅の濃度 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ に於て抗菌性を検定した。その結果は第 4 表の如くである。

Table 3. Fractionation of blue shark liver

Table 4. Antibiotic action of each fraction of blue shark liver.

Concentration of CuSO ₄	5.0 × 10 ⁻⁴ M		None	
Each 0.5 g. applied	24h.	48h.	24h.	48h.
Acetone insoluble	±	+++	±	+++
Petroleum ether insoluble	±	+++	±	+++
Petroleum ether soluble	—	—	±	++

石油エーテル可溶部に硫酸銅を添加したものは明かに抗菌性を示し D. m. は全く発育しないが他の部位に於ては正常な発育をなした。即ち硫酸銅の添加によるサメ肝臓の抗菌作用は肝油に基くことが明かである。

次にヨシキリザメの肝油 10 g. を常法により鹼化し、鹼化物はエチール化して脂肪酸エチールエステルとして 8.1 g., 又不鹼化物は 0.5 g. を得た。鹼化物及び不鹼化物をそれぞれ基本培地を用いて硫酸銅の濃度 5×10^{-4} M に於て抗菌作用を検定した。その結果は第 5 表の如くである。

Table 5. The fraction in which the antibiotic action of blue shark liver oil exists.

Concentration of CuSO ₄	5.0 × 10 ⁻⁴ M		None	
	24h.	48h.	24h.	48h.
Blue shark liver oil 0.5g.	—	—	±	+++
Unsaponifiable matter 0.1g.	—	—	±	+++
" 0.1g.	±	++	±	+++
Fatty acid ethyl ester 0.5g.	—	—	±	++
" 0.25g.	—	—	±	++

硫酸銅を添加した場合は不鹼化物、鹼化物共に抗菌作用を示したが脂肪酸エチールエステルは 0.25 g. で完全に D. m. の発育を阻止し、不鹼化物は 0.1 g. でも完全に阻止し得なかつた。0.1 g. の不鹼化物は 2 g. の原肝油に相当するが、原肝油を用いた場合には 0.5 g. で完全に発育を阻止することより考えると硫酸銅添加による抗菌作用は主に脂肪酸に基くものと考えられる。

3. 他の銅塩添加による抗菌作用

サメ肝油中の脂肪酸に硫酸銅を添加すると抗菌作用を示すが、この作用は硫酸銅のみの作用であるか又は銅塩共通の作用であるかを明かにするために銅塩として硫酸銅、硝酸銅、塩化第二銅及び醋酸銅を用いて 5×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 及び 1×10^{-4} M の濃度に於てアブラザメ *Squalus suckleyi* GIRARD の肝油 0.05g. を基本培地 10 cc. に添加して抗菌作用を検定した。その結果は第 6 表の如くである。

Table 6. Production of the antibiotic action of dog fish liver oil
by adding cupric salts (Dog fish liver oil 0.05 g./10 cc.).

	CuSO ₄		Cu(NO ₃) ₂		CuCl ₂		Cu(CH ₃ COO) ₂	
	24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.
$5.0 \times 10^{-4} M$	—	—	—	—	—	—	—	—
$2.5 \times 10^{-4} M$	±	±	—	—	—	±	—	±
$1.0 \times 10^{-4} M$	±	++	±	++	±	++	±	++

シュモクザメの肝臓 0.4 g. では硫酸銅の濃度 $2.5 \times 10^{-4} M$ に於て D. m. の發育を完全に阻止したが、アブラザメの肝油 0.05 g. では $5 \times 10^{-4} M$ を必要とした。然し硫酸銅、硝酸銅、塩化銅及び醋酸銅の差異は全然なく何れの塩塩類を用いても $5 \times 10^{-4} M$ を必要とし、アニオンによる影響は全く表れなかつた。

Ⅲ 総 括

1. サメ肝臓に微量の硫酸銅を添加したところ *Debaryomyces membranefaciens* に対し抗菌作用を示した。
2. 硫酸銅の添加によつて生起される抗菌作用はサメ肝油中の脂肪酸に基くものであることを証明した。
3. 硫酸銅、硝酸銅、塩化第二銅及び醋酸銅は同一の効果を示し、基本培地 10 cc. 中にアブラザメの肝油を 0.05 g. 添加した場合は何れの銅塩に於ても $5 \times 10^{-4} M$ の濃度を必要とし、アニオンによる影響は認められなかつた。

文 献

- 1) 富安・豊水：日本農芸化学会西日本支部例会 (20. V. 1950).
- 2) A. M. PAPPENHEIMER and S. J. JOHNSON: *Brit. Jour. Exp. Path.*, **17**, 335, 342 (1936).
- 3) A. LOCKE and E. R. MAIN: *Jour. Infect. Dis.*, **48**, 419 (1931).
- 4) G. SCHEFF and I. P. SCHEFF: *Jour. Infect. Dis.*, **54**, 221 (1934).
- 5) S. A. WAKSMAN: "Microbial Antagonism and Antibiotic Substance", p. 64 (1945).
- 6) S. A. WAKSMAN: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **17**, 556 (1945).