閉器中の底部に入れ密閉器中の水、アンモニア、ブタノール飽和に用いた。展開後濾紙を乾燥し 0.2%ニンヒドリンブタノール溶液（酢酸少量添加）を噴霧し、70~80° に加温して呈色を行った。

(3) ヒスタミン、チラミンの定量 各試料について (1) の方法で得た一定量のブタノール抽出液及び下記 6 種の標準液の各 1 cc (抽出液 1 cc は元の加水分解液 10 cc に相当する) を 0.1 cc のビベットを用いて濾紙 (巾 1 cm, 長さ 50 cm) 上の原点の区劃 (1 cm²) へ夫々均等に塗布し 10%アンモニア水飽和のブタノールを溶媒として同時に展開後乾燥し、0.2%ニンヒドリンブタノール溶液を均等に噴霧し各濾紙片を同時に加温して発色せしめて比較定量を行った。比較標準に用いたヒスタミン二塩酸塩又はチラミン一塩酸塩の標準液は 1 cc 中に夫々 2 γ, 5 γ, 10 γ, 20 γ, 50 γ, 100 γ を含むものについて行った。

金沢大学薬学部

Summary

Histamine and tyramine are assumed to be one of the substances responsible for side-effects attending the intravenous administration of protein hydrolysate preparations^{1,2)}. Detection of histamine and tyramine and approximate determination of their contents in various protein hydrolysates and marketed parenteral preparations were carried out by paper chromatography in reference to the method of Urbach³⁾. The results obtained are shown in Figs. 1 and 2, and in Table I. These results indicated that histamine and tyramine were present in casein hydrolysate prepared with toluene as the antiseptic and the marketed parenteral preparations in larger amounts than was expected. It was also found that there were a difference in the amount of histamine formed by the manner of hydrolysis and that in protein hydrolysate preparations obtained by alkaline hydrolysis, care must be taken to remove these harmful amines.

(Received May 29, 1953)

217. 福田幸平*, 村岡三郎, 小島 淳**: 蛋白酵素分解物の薬学的研究 (第 6 報) 各種蛋白加水分解物についての乳酸菌増殖度の比較 その 1.

Kouhei Fukuda, Saburo Muraoka, and Atsushi Kojima: Pharmaceutical Studies
on Enzymatic Hydrolysates of Proteins. VI. Comparison of Growth of
Lactic Acid Bacteria on Various Protein Hydrolysates. (1).

(Pharmaceutical Faculty, University of Kanazawa* and Pharmaceutical Institute,
Medical Faculty, University of Kyoto**)

人間及び動物のアミノ酸要求に関しては必須アミノ酸の種類を始め、アミノ酸相互間の転移等の関連性について種々の事実が明かにされて居り、又体内に於ける蛋白合成には血液中にその蛋白合成に必要な総てのアミノ酸が適当な混合比で同時に存在する事が必要な事等も明かとなつてゐる¹⁾。従つて蛋白源の補給を目的とする蛋白加水分解物製剤の効果はその中に含まれるアミノ酸の種類とその量的組成に左右される事は論を俟たないのであるが、蛋白加水分解物はその加水分解法の異なるに従つて、アミノ酸の二次的分解によるアミノ酸組成の変化、ラセミ化の度合、或は加水分解度等に相異があり、たとえ窒素量が同一の加水分解物でもその生物学的効果には差のある事が当然考えられ、又二次的分解を受けた二、三のアミノ酸を添加補正するだけでは良好な製品に改良する事の困難な点等も考えられる。さて人間に就ての D 型アミノ酸の有効度²⁾ 或はペプチッドの利用率とその影響

1) Ernst Geiger: J. Nutrition 34, 97 (1947); ibid. 36, 813 (1948).

2) Albanese: "Advances in Protein Chemistry" III, 227 (1947).

等³⁻⁵⁾ については種々の報告があるが、尙未だ充分明かでない点が多い⁶⁾。従つて此等諸因子の総合的結果である蛋白加水分解物製剤の生物学的効果は従来の化学的なアミノ酸の分析のみでは明確に定め難く、現在の所その生物学的効果は蛋白質の生物価の決定と同様に動物による窒素平衡試験或は生長試験などによらねばならないものと考えられるが⁷⁾、此等の方法は相当の期日を要し簡単に行う事は困難で、又研究者により異つた結果も生じ易い。そこで著者等は加水分解法及び加水分解度の相異が蛋白加水分解物製剤の生物学的効果に及ぼす影響を推定する一の試みとして加水分解法の異なる種々の加水分解度のカゼイン加水分解物に就て、夫々をアミノ酸源とする培地に於ける一定窒素量に対する乳酸菌の増殖度を比較検討した。本実験では先ず微生物としてその栄養要求が人間の栄養要求に近い乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus* 17-5 を用いたが、そのアミノ酸要求及び DL 型アミノ酸の利用に関しては一部は明かにされて居り⁸⁾、蛋白加水分解物の生物学的効果を推定する上に根拠を与えるものと考えられる。尙最近著者等と同様の観点より田村氏等⁹⁾ は乳酸菌の培養試験より蛋白質の栄養価を測定しようと試み又 Dun 等¹⁰⁾ は Protozoa の一種 *Tetrahymena Geleii*, H を用いその増殖度と蛋白質の栄養価との関連性について報告しているが、共に動物実験に代用し得る可能性のあることを認めている。

Table I Extent of Hydrolysis ($\frac{\alpha\text{-Amino-N}}{\text{Total-N}}\%$)

Time of hydrolysis (hr.)	1/4	1/2	1	2	3	5	7	10	20	30
Casein hydrolysate by HCl (A)	28.7	49.7	59.3	68.9	76.0	76.5	84.0	84.1	84.2	86.1
Casein hydrolysate by NaOH (B)	7.6	17.1	24.7	30.6	51.4	59.0	68.5	73.6	78.0	82.9

Days of digestion	1	2	5	8	12
Casein hydrolysate by pancreas extract (C)	31.0	35.2	45.7	49.0	50.7

先ず本実験では試料を調製する為にかゼインの酸分解、アルカリ分解並びに豚の脾臓プロテアーゼの抽出液による酵素分解を行い、Table I に示した様な加水分解法の異なる種々の加水分解度の溶液を得、夫々について総窒素量が総て同一となる如く稀釈すると共に、pH 6.8 として各試料とした。更に又種々の加水分解度の酸分解物(試料 A) に酸分解過程に於て二次的分解により消失又は減少すると考えられる重要なアミノ酸であるトリプトファン、シスチンを夫々補足したもの(試料 D)、及びアルカリ分解物(試料 B) にその加水分解過程に於て消失又は減少すると考えられる重要なアミノ酸であるアルギニン、シスチン、スレオニンを夫々補足したもの(試料 E) 等を調製した。次に此等多数の試料について夫々をアミノ酸源とし Table II の如き組成の基礎培地を用

Fig. 1 Comparison of Growth of *Lact arabinosus* 17-5 on various Protein Hydrolysates

- 3) Beckman: "Year Book of Drug Therapy" (1949); Eckardt: J. Nutrition 68 (March, 1948).
- 4) Chow, Allison, White: J. Nutrition 36, 231 (1948).
- 5) Cox, Mueller: ibid. 31, 581 (1946); Woolley, Sprince: J. Biol. Chem. 157, 447 (1945).
- 6) Elman: "Advances in Protein Chemistry" III, 274 (1947).
- 7) Allison: ibid. V, 155 (1949); N. N. R. 339 (1951).
- 8) "醸酵学の進歩" 第1集 (産業図書) 147 頁, 154 頁.
- 9) 田村, 角田, 桐村, 坂口, 有馬: 農化 272, 422 (1951).
- 10) M. S. Dunn: J. Biol. Chem. 168, 1 (1947).

- A.....Casein hydrolysate by HCl
 B.....Casein hydrolysate by NaOH
 C.....Casein hydrolysate by pancreas extract
 D.....Casein hydrolysate by HCl + tryptophan + cystine
 E.....Casein hydrolysate by NaOH + arginine + threonine + cystine

Fig. 2 Comparison of Growth of *Lact. arabinosus* 17-5 on various Protein Hydrolysates

いて *Lact. arabinosus* を培養しその増殖度を比較したのであるが結果は Fig. 1, 2 に示す如くであつた。

此等の結果に就て考察するに A 曲線の急激な降下は酸分解初期のトリプトファン或はシスチンの速かな二次的分解を示すものと考えられ、又 D 曲線は酸分解では増殖に必要な加水分解度が加水分解開始後速やかに得られる事を示している。一方アルカリ分解の初期に於けるアミノ酸の二次的分解は緩かで、加水分解開始後 1~3 時間の間のアルカリ分解物の増殖度は酸分解物に比べて大である。又 D 或は E 曲線によつて酸或はアルカリ分解に於て二次的分解により消失又は減少が考えられるアミノ酸の添加補強の効果が示されている。又 D 曲線と E 曲線の差は主として酸分解とアルカリ分解に於けるラセミ化の度合の差によるものと考えられ、又一部は恐らくアミノ酸相互の量的組成の変化の相違等によるものと推定される。そしてアルカリ分解物は補正強化を行つた場合に於てもその生物学的活性度は、酸分解物よりも劣る事を示すのと考えられる。又酸分解物にトリプトファン、シスチンを補えば 72 時間培養に於ける増殖は、膵臓抽出液による酵素分解物と殆んど同一なる事が C, D 曲線で示されている。尚酸分解物、アルカリ分解物に於ては *Lact. arabinosus* の最大の増殖には約 50%以上の加水分解度が必要である。

Table II Basal Medium (Final Concentration)

Glucose	20 g/L	Adenine	5 mg/L
Na acetate	20 "	Guanine	5 "
Nicotinic acid	500 γ /L	Uracil	5 "
Ca pantothenate	500 "	K ₂ HPO ₄	500 "
Thiamine	5000 "	KH ₂ PO ₄	500 "
Riboflavine	5000 "	MaSO ₄ ·7 H ₂ O	200 "
Biotin	2.5 "	NaCl	10 "
Pyridoxine	1000 "	FeSO ₄	10 "
p-Aminobenzoic acid	500 "	MnSO ₄ ·4 H ₂ O	40 "
Folic acid	5 "		

本研究に終始御指導を賜つた京都大学高木誠司教授、鈴木友二教授、並びに金沢大学平本 実教授に厚く感謝する。又微生物定量に際し種々御便宜を賜つた武田薬工研究所大村栄之助氏に深謝する。尚本研究の一部は文部省科学研究費によつた。ここに謹謝する。

実 験 の 部

1) カゼイン酸分解液 (試料 A) の調製 カゼイン 60 g を 20%塩酸 240 cc に1夜浸漬後、砂浴上で還流冷却器をつけて加熱加水分解し、加水分解開始より各一定時間毎に加水分解液 20 cc ずつをとり同量の蒸留水を加え、次で水酸化ナトリウムにて pH 3 となし全容を 80 cc とする。これに 0.6 g の活性炭を加えて 15 分間振盪後濾過し、濾液をキンヒドラン電極にて pH 6.8 に調製。キエルダール法にて総窒素を定量して約 3 mg/cc になる様に希め再び総窒素を定量して正確に総窒素 3 mg/cc の溶液とし、又バンスライク法によりアミノ態窒素

素を定量して加水分解度を定めた。かくして得た各種の加水分解度を有する総窒素 3 mg/cc の各酸分解液にトルオールを加えて保存し試料に用いた。

2) カゼインのアルカリ分解液 (試料 B) の調製 カゼイン 60 g を 2 N NaOH 540 cc に 1 夜浸漬し、ついで砂浴上で加熱加水分解し一定時間毎に加水分解液 40 cc づつをとり出し pH 6.8, 全容を 80 cc とする。これに活性炭 0.6 g を加えて脱色し滲液を再び pH 6.8 に調製後、酸分解の場合と同じく総窒素 3 mg/cc とし加水分解度を測定して試料とする。

3) カゼインの酵素分解液 (試料 C) の調製 本研究第4報¹¹⁾ に於て述べた所の膵臓抽出液によるカゼイン酵素分解液の夫々について、総窒素 3 mg/cc にすると共に pH 6.8 に調製し試料とする。

4) 培地の調製 通常のビタミン B 群の微生物定量用培地からカゼイン酸分解物を除いた所の基礎培地 (組成 Table II) を用いて、前述の各試料の夫々について各試験管に次の如く培地の分注を行つた。(A) カゼインの酸分解物……酸分解液 (総窒素 1 mg/cc) 2 cc+基礎培地 1 cc+水 1 cc. (B) カゼインアルカリ分解物……アルカリ分解液 (総窒素 1 mg/cc) 2 cc+基礎培地 1 cc+水 1 cc. (C) 膵臓抽出液によるカゼイン酵素分解物……酵素分解液 (総窒素 1 mg/cc) 2 cc+基礎培地 1 cc+水 1 cc. (D) カゼイン酸分解物にトリプトファン及びシスチンを添加したもの……(A) に於ける水 1 cc の代りに DL-トリプトファン 20 mg, L-シスチン 10 mg を水 50 cc にとかした溶液 1 cc を加えたもので、4 cc 培養に於ける最終濃度は DL-トリプトファン 100 mg/L, L-シスチン 50 mg/L である。(E) カゼインアルカリ分解物にアルギニン, シスチン, スレオニンを添加したものの……(B) に於ける水 1 cc の代りに, L-アルギニン 10 mg, L-シスチン 5 mg, DL-スレオニン 10 mg を水 25 cc にとかした溶液 1 cc を加えたもので、4 cc 培養に於ける最終濃度は L-アルギニン 100 mg/L, L-シスチン 50 mg/L, DL-スレオニン 100 mg/L である。

5) 培養及び測定法 15 ボンド, 15 分間滅菌後, 接種菌を接種し 30°, 72 時間培養し, 産出したる乳酸を N/10 NaOH で滴定して増殖度を測定した。接種菌は保存培養せる *Lactobacillus arabinosus* 17-5 をカゼイン酸加水分解物をアミノ酸源とした培地で 24 時間培養後, 菌体を集め常法により 0.9% 食塩水に懸濁せしめたものである。

金沢大学薬学部

Summary

In order to determine the effect of the difference in the method and extent of hydrolysis of proteins on the biological activity of protein hydrolysate preparations, *Lactobacillus arabinosus* 17-5 was cultured in basal media (Table II) containing various casein hydrolysates (Table I) as the source of amino acid, and multiplication of the bacillus against the same amount of total nitrogen of various hydrolysates was comparatively determined. As the results shown in Figs. 1 and 2 indicate, the multiplication on the hydrolysate by alkali was inferior compared to those on enzymatic and acid hydrolysates, even with the addition of chief amino acids which were assumed to disappear or decrease by secondary destruction during hydrolysis. These results were thought to indicate the effect of racemization by alkaline hydrolysis.

(Received May 29, 1953)

11) 福田: 本誌 73, 330 (1953).