合成培地においてはアミノ酸の添加により ChE 阻害度はさほど高くないが, *L*-cystine は tryptophan よりも高い阻害度を示した。

ブイオンにおいては tryptophan が特に高い阻害作用を示したが, その他 alanine, isoleucine 等もかなりの阻害を示した。これらの ChE 阻害作用の機構については明らかでないが, 細菌によるアミノ酸の分解を考えてみた。

即ちアミノ酸に対する脱アミノ及び脱カルボキシル作用は, それぞれの酵素によつておこり, 前者は中性またはアルカリ性の medium で, 後者は酸性の medium でおこることが知られている。従つてブイオンの場合は pH 7.0 であるから脱アミノ作用が, 合成培地では pH 5.4 であるから脱カルボキシル作用がおこつたことが考えられる。この際に生じた代謝産物としては前者では酸及びアンモニア, 後者ではアミンが考えられるから, これらが ChE 阻害作用をもつと思われるが, その詳細は今後の検討にまきたい。

この研究に当り御指導御鞭撻を頂いた中村所長に深謝の意を表し, また実験に協力された熊谷 満, 唐島田 隆多賀光彦の諸氏に感謝する。

北海道立衛生研究所

U.D.C. 577.153.3.025 : 576.851.48.095 : 613.28-099

192. 岩本多喜男, 安藤芳明, 井上勝弘: 細菌代謝産物のコリンエステラーゼ活性に及ぼす影響 (第3報*) イカを培地とした場合の実験

Takio Iwamoto, Yoshiaki Ando, and Katsuhiko Inoue: Effect of Microbial Metabolites on the Activity of Cholinesterase. III. Experiments in a Squid Medium.

(Hokkaido Institute of Public Health)

Homogenate, extract, and proteins of a squid were used as a medium for the culture of various bacteria and the changes in pH, amount of volatile basic nitrogen, trimethylamine-nitrogen, and degree of cholinesterase inhibition of each culture filtrate with passage of time were measured. It was thereby found that both the pH and basic nitrogen increased with passage of time, while trimethylamine-nitrogen and cholinesterase inhibition reached the maximum after 48 hours and decreased by 72 hours later. There were no cholinesterase inhibition or the presence of trimethylamine-nitrogen when squid protein was used as the medium, while these were extremely high when the squid homogenate and extract were used as the culture medium. Further, there was a significant relativity between these. The inhibition of cholinesterase activity by the culture filtrate using squids must be due to the trimethylamine formed by the bacterial reduction of trimethylamine oxide contained in the squid. Liberation of histamine was also measured in some of these culture media but the amount was extremely minute.

(Received April 16, 1956)

第1, 2報では各種の培地に各種細菌を培養した場合の培養液の血清 ChE に対する阻害作用をしらべ, 菌の種類, 培地の種類及び培養時間の差によつて ChE 阻害度に差があることを認めたが, この基礎的実験では ChE 阻害度の最も高いものでも tryptophan 添加ブイオン培地の場合における 31.7%であつて他はすべて 10~20%程度の阻害度を示したにすぎない。

そこで今回は实际的に食中毒と関連のある食品のうち, 昭和30年の夏期に全国的に多発したイカ中毒の原因と思われるイカを対象とした実験を行つた。

著者らはイカを培地として各種の菌を培養した場合に, 発生する trimethylamine と ChE 阻害作用との関

* 第76回日本薬学会年会 (1956) で発表。

係からみて、食中毒の原因として trimethylamine を有力な一因子とみなしたりが、その後の詳細な研究によりますますその感を深くしつつある。

前報までの基礎的実験からは、細菌の代謝産物として Ch E 阻害作用を示すものとして確実にとりあげられたものはないので、今回は実際に食中毒をおこしたイカを培地としてとりあげ、その細菌による代謝産物、特にアミンと Ch E 阻害との関係を検討したのである。

実験方法 市販の秋イカの内臓をとり出し皮つきのまま同量の水を加え、ホモジナイズしてフラスコに入れ高圧滅菌したものを培地とした。これに大腸菌群および腐敗菌群の 14 株を各 1 白金耳ずつ接種し、前者は 37°, 後者は 30° で 0~72 時間培養した。0, 24, 48, 72 時間の 4 回ずつ一部をとりだし、高速遠沈した培養液の上清につき、pH, 揮発性塩基窒素, trimethylamine 体窒素及び ChE 阻害度を測定した。

揮発性塩基窒素の定量は Conway の微量拡散法²⁾, trimethylamine 体窒素の定量は Conway のホルムアルデヒド法³⁾で行った。また一部では histidine decarboxylase をもつ菌の場合にその産生する histamine の定量を梶本氏法⁴⁾で行った。

Escherichia coli 及び No. 6 菌 (*Ach. iophagum* と思われる) については、イカのエキス部分と蛋白部分に分けた培地をつくりそれぞれについて比較検討した (エキスは同量の水で 50°, 40 分加熱抽出したもの、蛋白はホモジネートを透析したもの)。Ch E に対する阻害度の測定法は前報と同様である。

実験結果 結果は Table I, II に示したが、*Escherichia coli* 及び *Klebsiella* の場合はそれぞれ Fig. 1, 2 に図示した。Table I の結果からみると大部分の菌は何れも時間の経過と共に pH, 揮発性塩基窒素, trimethylamine 体窒素の上昇がみられ、同時に Ch E 阻害度も上昇するが、trimethylamine 体窒素及び Ch E 阻害度は 48 時間を頂点として 72 hr では殆んど下降を示している。然し *E. coli* 及び *Serratia* では Ch E 阻害度は 72 hr 後も上昇している。また trimethylamine 体窒素は *B. mesentericus* No. 9 菌では 72 hr 後も上昇

Table I.

Species of microbes	Culture duration (hr.)	pH	Volatile basic amine N mg. %	Trimethylamine N mg. %	ChE inhibition %	Histamine mg. %
<i>Escherichia coli</i> -621	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	7.6	96.53	27.78	33.07	—
	48	8.4	139.87	37.41	37.91	—
	72	"	140.00	27.78	40.33	0.7
<i>Escherichia coli</i> -123	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	7.2	93.45	35.50	36.30	—
	48	8.3	117.07	33.95	35.49	—
	72	"	126.32	28.55	43.55	—
<i>Arizona</i>	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	6.4	116.66	40.13	43.27	—
	48	8.4	116.05	39.35	35.65	—
	72	"	118.10	34.72	34.68	0.6
<i>Ballerup</i>	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	8.0	119.33	41.67	40.32	—
	48	8.4	115.02	"	32.26	—
	72	8.3	125.29	38.58	38.23	—
<i>Alkalescens dispar</i>	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	8.0	26.70	37.04	41.94	—
	48	8.4	126.73	38.58	39.48	—
	72	8.3	129.81	35.81	32.26	—
<i>Klebsiella</i>	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	7.6	84.21	18.21	30.65	—
	48	8.0	103.72	24.69	38.23	—
	72	8.2	109.88	18.21	33.07	—
<i>Alkaligens</i>	0	6.2	28.07	11.60	17.75	—
	24	6.8	51.96	15.43	22.59	—
	48	"	73.94	18.52	23.89	—
	72	7.4	100.64	13.58	22.59	—
<i>Proteus sp.</i>	0	6.3	30.50	17.28	16.91	—
	24	7.8	106.92	37.80	—	—
	48	8.2	137.06	39.35	55.50	—
	72	8.3	144.06	38.58	29.44	trace

1) 岩本, 飯田, 安藤: 医学と生物学 35, (5) 155(1956).

2) Conway: 邦訳“微量拡散法” 82(1952). 3) Conway: Ibid. 161(1952).

4) 梶本, 下久, 森岡: 医学と生物学 35, 206(1955).

<i>Serratia mar.</i>	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	6.6	36.30	25.45	12.96	—
		48	7.8	128.41	41.16	37.19	—
		72	8.3	161.29	39.24	52.68	1.2
<i>B. subtilis</i>	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	6.8	49.70	15.05	20.43	—
		48	7.8	116.07	18.52	16.77	—
		72	8.3	158.20	14.66	16.06	—
<i>B. megatherium</i>	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	6.8	—	13.00	21.70	—
		48	8.2	94.15	11.11	28.74	—
		72	8.4	129.65	11.57	—	—
<i>B. mesentericus</i>	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	6.8	63.59	10.83	40.71	—
		48	7.4	150.02	15.43	45.78	—
		72	7.8	195.71	16.20	38.61	—
No. 6 (<i>Ach. iophagum</i>)	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	8.0	113.47	40.75	45.22	—
		48	8.3	142.00	42.60	49.16	—
		72	—	158.98	38.58	—	—
No. 9 (<i>F. okaeanoikoites</i>)	{	0	6.3	30.50	12.78	16.91	—
		24	7.8	108.35	35.65	36.48	—
		48	8.3	142.00	38.58	—	—
		72	—	151.26	40.90	23.10	—

Table II.

Species of microbes	Culture duration (hr.)	Medium	Volatile basic amine N mg. %	Trimethylamine N mg. %	ChE inhibition %
<i>Escherichia coli</i> —621	0	extract of squid	31.64	24.07	4.36
	24		109.89	94.15	23.71
	48		115.76	98.78	45.26
	72		116.22	122.70	44.92
	0	protein of squid	15.43	0	0
	24		18.52	0	4.36
No. 6 (<i>Ach. iophagum</i>)	48		17.28	0	2.04
	72		20.37	0	5.94
	0	extract of squid	31.64	24.07	4.36
	24		155.12	103.10	27.75
	48		122.70	97.24	39.33
	72		123.48	108.04	40.17
	0	protein of squid	15.43	0	0
	24		22.22	0	4.36
	48		20.37	0	3.23
	72		20.99	0	5.26

Fig. 1. Volatile Amine and ChE Inhibition (*Escherichia coli* in squid medium) Fig. 2. Volatile Amine and ChE Inhibition (*Klebsiella* in squid medium)

している。菌種による差は甚だしくはないが、ただ ChE 阻害度は他の培地の場合にくらべてきわめて高く、殆んど 30%以上を示している。histamine の定量を行った結果では、4 種の菌について 72 hr 培養で最大 1.2 mg%, 最小は痕跡にすぎなかつた。イカのエキスを蛋白とを分けた培地における実験では、Table II に示すようにエキスの方が著明に trimethylamine 体窒素及び ChE 阻害度が高かつた。

考察及び結論 通常水産食品の腐敗過程では、その進行と共に揮発性アミンの増量がみられるが、以上の実験結果からも、何れの菌の場合も同様の結果がみられた。ただこの場合はイカ培地を高圧滅菌しているので通常の場合と比較することは困難であるが、揮発性塩基窒素はいずれも 24 時間で約 100 mg% に達し、いわゆる腐敗の現象をおこしている。揮発性塩基窒素量と ChE 阻害度との関係をみると 48 hr まではすべて平行関係にあるが、72 hr には大部分は前者の増量に拘らず後者は減少している。trimethylamine 体窒素と ChE 阻害度との関係は、一、二の例外を除いては平行関係を示している。また histamine の量はきわめて少く、これが ChE 阻害を示すとは考えられない。

イカエキスと蛋白培地の場合は、エキスの場合は蛋白の場合にくらべて著明にすべての量が多くなっている。

これらのことからイカの細菌による腐敗過程においては trimethylamine が生成し、これが ChE の阻害をおこすものと考えられる。

この trimethylamine 生成の起源を考えてみると、海産動物にはアンモニアの解毒形式として trimethylamine oxide をもつものが多いという⁵⁾。この trimethylamine oxide を還元する菌も研究されているが、*E. coli* をはじめ種々の菌がこの作用をもち、trimethylamine を発生するものと考えられる。なおイカの生体はその 100 g 中に約 100 mg の trimethylamine oxide をもつという⁶⁾。

その他著者らが行った実験で⁷⁾、ChE 阻害物質の 1 つとして trimethylamine がきわめて有力であると思われる証拠があるが、これらについては次報で報告する。

本研究に当り御指導御鞭撻を頂いた中村所長に深謝の意を表し、実験に協力された多賀光彦氏に感謝する。

北海道立衛生研究所

5) E. Baldwin: 邦訳“動的生化学”(岩波書店) 281, 285(1954).

6) 吉村, 藤瀬: 日化 50, 109(1929).

7) 岩本, 飯田, 安藤: 未発表.