

## 赤痢菌族の「ヒスタミン」産生能に関する実験的研究

## 第I報 培養液の含有成分の影響, 特に「ヒスタミン」原の問題について

金沢医科大学小児科学教室(主任 泉 仙助教授)

吉 田 清 三

(昭和46年10月1日受付)

本論文要旨は昭和24年5月第52回日本小児科学会総会及び同年10月十全医学会第3回集会上において発表した。猶本研究の費用の1部は昭和24年度文部省科学研究費によるものである。

腸内感染を来す各種細菌が「ヒスタミン」(以下「ヒ」と略記する)を産生する事に関しては既に幾多の実験報告<sup>1)-32)</sup>があるが、その内赤痢菌に関するものは多くはない。

恩師泉教授は20年来疫痢様症状に対する治療法確立の為に、これが本態について研究せられ<sup>33)</sup>、『疫痢症状は、腸内感染を来せる病原菌の産生する非特異性毒素たる有毒アミン』、就中「ヒ」による中毒が主要原因なり』とし、吾教室においては今や本症状に対し、「アンチヒスタミン」療法を行い、極めて優秀な治療成績を得つつある<sup>34)-36)</sup>。而して本説の根拠たる腸内細菌の「ヒ」産生能については、既に一部を先輩西村<sup>28)-30)</sup>、館<sup>31)</sup>両氏が研究発表している所である。然し乍らその量的関係、或は産生時間、その他種々の条件を考慮に入れる時は、猶各種の問題が存し、必ずしも簡単ではない。従って一部本邦学者の間に否定的見解すら存する所以である<sup>37)-39)</sup>。

更に昭和23年夏米国より疫痢研究団が来朝し、病理学、細菌学、生化学的に調査研究して、疫痢患児の約90%において赤痢菌を証明し、一方患児血清「カルシウム」量の減少を認め疫痢は低「カルシウム」血+赤痢症なりと結論した<sup>40)</sup>。

敘上に鑑み、疫痢の病原菌と見做される赤痢菌族の「ヒ」産生の問題を再検討すべく、私は泉教授御指導の下にこれが産生能に関する実験的研究を行い、多少の知見を得た。

以下4報に亘りこれら知見について報告し、御批判を仰ぐものであるが、先ず本報においては、培養液成分中「ヒ」原の問題について攻究した。即ち赤痢菌の

「ヒ」産生に際し、先ず考うべきは「ヒ」原となる材料の問題である。「ヒ」は化学構造式上特有な Imidazolring を有する  $\beta$ -Imidazolyl- $\alpha$ -ethylamin であって、これが供給原を自然界に求めるならば、蛋白質或はその構成物質たる「アルブミン」、「ペプトン」、「ペプチド」及至は「アミノ酸」である。従って本報においては、生理的消化機構をも考慮し、蛋白質及び消化酵素によるこれら分解産物等を培養液中に添加して、赤痢菌の「ヒ」産生度を検討した成績について述べる。

## 実験方法

## 1. 使用菌株

本学細菌学教室より分譲を受けた伝研分譲赤痢菌株中の大原、大野(府中)を主として使用した。而して実験に際しては普通寒天平板 37°C、18~20時間培養のS型集落を、培養基 20c.c. につき1白金耳宛使用した。

## 2. 基本培養液

主として次の如き2種を使用した。

1) 牛肝臓浸出肝ブイオン: 牛肉使用弱「アルカリ性ブイオン」700c.c. に細挫した新鮮牛肝臓 300g を加え、煮沸30分間後濾過し pH 7.4 に修正して、100°C 15分宛 3日間間歇減菌したもの。

2) Eggerth 式合成培地(卵黄「アスパラギン」培地): Eggerth 記載<sup>15)</sup>の合成培地を変法したもので、次の如く作製する。即ち新鮮鶏卵黄に7培量の蒸留水を加え、よく攪拌し1時間温浸出後濾過した卵黄浸出液に、「アスパラギン」その他を下記の割合に混合する。

Experimental Studies on the Histamine Producing Activity of Bac. Dysenteriae. [I] Influence of the Contents of the Cultivating Medium, especially on the Source Materials of Histamine. Kiyozo Yoshida, Department of Pediatrics, (Director: Prof. S. Izumi), Kanazawa Medical College.

卵黄浸出液	300c.c.
Asparagin	1 gm
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.6gm
KCl	0.3gm
MgSO <sub>4</sub>	0.05gm

以上を pH7.4 にし、100°C 15分間 3 回滅菌したもの。

以上の培養液は直径約 1cm, 容量約 25c.c. の硬質中試験管に 20c.c. 宛分注して使用した。猶使用に際しては 20%滅菌葡萄糖液 (武田製薬) を、0.2%の割合に無菌的に添加した。

### 3. 培養液 pH

pH 修正には 10% NaOH または 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を用い、pH 決定には東洋濾紙会社製水素イオン濃度試験紙及び本学医科学教室早稲田助教授調製の万能 pH 試験紙 (pH4~7) を用いた。

培養液の起始 pH は 7.3 とした。培養後菌の発育につれて「メヂウム」が酸性となり、為菌の発育が阻止されるのを防ぐ目的で、培養後 3 日目からは毎日 pH 6 前後に修正した而して修正に際しては、駒込「ピベット」で充分培養液を混和し、液層の上下による pH の相違がないように努めた。

### 4. 培養方法

培養温度は 37 乃至 39°C, 主として 39°C とした。この理由については第 III 報で述べる。

培養方式として、先に西村<sup>28)</sup>-<sup>30)</sup>、館<sup>37)</sup>等は産生毒物の分解を可及的少くし強力な毒素を得る目的で、綿栓封臘による半嫌気性培養を採用したが、私もこれに倣った。

猶、培養途中において培養液の一部を随時平板培養し、菌の発育状態及び雑菌混入の有無を検した。

### 5. 「ヒ」証明法

上述の如くにして培養した液の一部を日を追って採り出し、滅菌に兼ねて真性毒素破壊の目的で 100°C 15 分間加熱後直ちに冷却し、その濾液について「ヒ」量を検した。

「ヒ」証明法としては主として薬学部的方法、即ち Guggenheim-Löffler<sup>41)</sup> 及び秋山<sup>42)</sup> 法に従い、海狸腸管に対する作用に依った。その方法の詳細は西村<sup>28)</sup> 論文記載の通りであるが、「ヒ」量決定には対照として塩酸ヒスタミン (1-Histamin-HCl 武田) 0.1 mg/dl 溶液 0.1~0.3c.c. を用い、腸管収縮度が一定した後、同量被検濾液の腸管収縮度を検し、その収縮値が対照単位収縮値と一致する迄被検液を希釈した。而してその希釈倍数決定には少くとも 3 回検定した。

「ヒ」証明法として薬理学的方法是極めて簡単であ

り、且つ甚だ鋭敏なものではあるが、一面海狸腸管収縮は「ヒ」特有の作用ではないという欠点がある<sup>41)42)</sup>。秋山氏法によれば「アセチルヒヨリン」または「ヒヨリン」様物質の影響は避け得るといふが、猶それ以外に腸管収縮物質があり得ない訳ではない。従って「ヒ」産生を確証するにはなお他の方法に依る必要があり、出来得べくんば「ヒ」の結晶を作出する事が望ましい。

私はその方法として、培養液の一部を瀬良一横山法<sup>44)</sup>により精製比色定量して腸管法による値に検討を加えた。

なお先に泉教授及び兼松、白藤<sup>45)46)</sup>等は疫痢患児尿、糞便中より「ヒ」を分離定量すべく Eggerth<sup>47)</sup> 法の変法として極めて優秀な「ヒ」分離定量法を確立されたが、一部培養液を同氏等に托し「ヒ」量を比色定量し且つ「ヒ」-「ピクラート」を作出していただいた。その詳細は既に発表されている所であるが、腸管法値との比較成績については項を改めて述べる。

## 実験成績及び考按

### 1. 蛋白質添加の影響

基本培養液として牛肝臓浸出肝ブイオン」を用い、これに比較的各種「アミノ酸を含有する卵白、及び「カゼイン」(片山化学)を 2%, 5%の割合に加え型の如く間歇滅菌後 0.2%の割合に葡萄糖を添加した。対照としては蛋白質無添加 0.2%の葡萄糖加牛肝臓浸出肝ブイオン」を用いた。

以上の各種培養基に夫々大原、大野菌を培養し、その「ヒ」産生度を検した。

その成績は表 1 及び表 2 の如くである。

即ち「ヒ」産生量の時間的変化には相違があるが、その最高産生量においては大原、大野両菌共卵白或は「カゼイン」添加の有無乃至はその濃度による差異は認め難い。また培養液 pH の変化も「ヒ」最高量産生時には一様に 5.3 前後の酸性であり、「ヒ」量減少と共に中性乃至は「アルカリ性に傾いて行く。猶以上の他牛血粉、「ヘモグロビン」、小豆について試みても同様な結果を得た。(成績は略す)

### 2. 蛋白質「ペプシン」分解物添加の影響

蛋白質の「ペプシン」分解物即ち「ペプトン」が赤痢菌の「ヒ」産生に如何なる影響を及ぼすかについては、和田<sup>26)</sup>は各種「ペプトン」中 Witte-Pepton が最も「ヒ」産生大で、且つ 3% 添加の場合が最もよく、2%これに次ぎ、1%は更に劣るとしている。また館<sup>31)</sup>は駒込菌につき、「カゼイン」、卵白等の「ペプトン」を 1~3%に添加して「ヒ」産生を検した結果

表1 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす蛋白質添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加蛋白質種類	培養日数		2	3	4
	同濃度				
無添加(対照)	0%		10	8	5
卵 白	2%		5	10	5
	5%		5	10	8
「カゼイン」	2%		5	10	5
	5%		8	10	5

(b) 同上培養液 pH の変化

添加蛋白質種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		7.3	5.3→6.3	6.0	6.5
卵 白	2%		7.3	5.6→6.3	5.3→6.3	6.7
	5%		7.3	5.5→6.2	5.3→6.3	6.5
「カゼイン」	2%		7.3	5.5→6.2	5.3→6.3	6.5
	5%		7.3	5.4→6.4	5.4→6.2	6.4

註 →は pH 修正を表わす。

表2 大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす蛋白質添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加蛋白質種類	培養日数		2	3	4
	同濃度				
無添加(対照)	0%		50	30	10
卵 白	2%		50	40	10
	5%		50	50	20
「カゼイン」	2%		50	30	10
	5%		40	45	20

(b) 同上培養液 pH の変化

添加蛋白質種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		7.3	5.3→6.2	6.5	7.5
卵 白	2%		7.3	5.0→6.3	6.2	7.5
	5%		7.3	5.0→6.3	6.3	7.2
「カゼイン」	2%		7.3	5.1→6.4	6.3	7.5
	5%		7.3	5.1→6.3	6.1	7.3

「ペプトン」添加が直接「ヒ」産生に重大な意義を有するものとは思はないとした。

私は前節の卵白、「カゼイン」及び牛血粉の「ペプトン」を用い、大原、大野菌の「ヒ」産生に及ぼす影響を追試した。

「ペプトン」調製法は館論文所載の高橋の方法を若干改変して用いた。即ち卵白は半凝固とし、「カゼイン」はその儘、牛血粉は凝固牛血液から血清を分離した後の血餅よりなるべく繊維素を去り、重湯煎上で加熱凝固せしめた後充分に細分して日光で乾燥して原料

とした。これ等を材料として次の如く作製した。即ち

可検材料	40g
10%稀塩酸	7.2c.c.
溜 水	440c.c.
「ペプシン」	0.44g

を充分混和後、約18時間 39°Cの孵卵器中に置き、時々振盪混和し、更に 0.6 c.c. の濃塩酸及び 0.2g の「ペプシン」を加え約16時間消化した後、10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で中和し、pH を大体 7にして Kaolin を入れて、

表 3 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす各種「ペプトン」添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加「ペプトン」種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		3	10	8	5
卵 白 - 「ペプトン」	0.5%		3	10	6	5
	1%		3	10	5	3
	2%		3	5	10	8
「カゼイン - ペプトン」	0.5%		3	10	10	5
	1%		3	8	10	5
	2%		3	10	12	8
血 粉 - 「ペプトン」	0.5%		3	10	8	5
	1%		3	5	10	5
	2%		3	5	8	3

(b) 同上培養液 pH の変化

添加「ペプトン」種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		7.3	5.3→6.3	6.0	6.5
卵 白 - 「ペプトン」	0.5%		7.3	5.3→6.3	6.0	6.7
	1%		7.3	5.4→6.4	6.2	6.7
	2%		7.3	5.6→6.3	5.5→6.3	6.5
「カゼイン - ペプトン」	0.5%		7.3	5.2→6.3	6.0	6.6
	1%		7.3	5.3→6.3	5.6→6.3	6.5
	2%		7.3	5.3→6.3	5.6→6.3	6.5
血 粉 - 「ペプトン」	0.5%		7.3	5.4→6.3	6.0	6.6
	1%		7.3	5.5→6.3	5.4→6.3	6.5
	2%		7.3	5.5→6.4	6.0	6.6

Nutsche で濾過し, これを 50~60°C の温度で減圧乾燥して得た粉末を「ペプトン」として使用した.

これらを 0.5%, 1%, 2% の濃度に基本培養液 (0.2% 葡萄糖加肝ブイオン) に添加し, 大原, 大野菌を培養し, その「ヒ」産生度を日を追って比較検討した.

その成績は表 3, 表 4 の通りである. 即ち各種「ペプトン」加培養液とこれを加えない対照と比べると, 大原, 大野菌共にその「ヒ」産生度において殆ど差異は認め難く, 又添加濃度による「ヒ」産生度の差異も

認め難い. 培養液の pH の変化も第 1 節同様「ヒ」産生時には酸性を示し, 「ヒ」の減量と共に中性乃至「アルカリ」側に傾いている.

### 3. 蛋白質分解「アミノ酸添加の影響

前同様蛋白質として牛血粉, 卵白及び「カゼイン」を用いた. これらの成分を考えてみるに, 血粉ではその含有する複合蛋白質「ヘモグロビン」中に「ヒチ」を約 8~11% 含んであり<sup>48)</sup>, Hanke u. Koessler<sup>54)</sup>等は血餅 500c.c. より Histidinmono-chlorhydrat として約 25g の「ヒチ」を得ている. また卵白は殆

表 4 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす各種「ペプトン」添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加「ペプトン」種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		3	40	50	20
卵白 - 「ペプトン」	0.5%		3	40	50	30
	1%		3	50	30	20
	2%		3	50	40	20
「カゼイン - ペプトン」	0.5%		3	50	30	20
	1%		3	50	40	20
	2%		3	50	50	20
血粉 - 「ペプトン」	0.5%		3	50	60	20
	1%		3	50	40	20
	2%		3	50	50	30

(b) 同上培養液 pH の変化

添加「ペプトン」種類	培養日数		0	2	3	4
	同濃度					
無添加(対照)	0%		7.3	5.0→6.3	5.2→6.3	6.3
卵白 - 「ペプトン」	0.5%		7.3	5.0→6.3	5.1→6.3	6.5
	1%		7.3	4.8→6.3	5.2→6.3	6.3
	2%		7.3	4.5→6.3	4.8→6.3	6.4
「カゼイン - ペプトン」	0.5%		7.3	4.8→6.3	5.2→6.3	6.5
	1%		7.3	4.5→6.3	6.0→6.3	6.4
	2%		7.3	4.3→6.3	4.5→6.3	6.2
血粉 - 「ペプトン」	0.5%		7.3	4.8→6.3	5.0→6.3	6.8
	1%		7.3	4.5→6.3	4.8→6.2	6.2
	2%		7.3	4.3→6.3	4.8→6.3	6.3

んど大部分が卵白アルブミンであり、約 1.7%の「ヒチ」を含有する。乳汁中の主な蛋白質たる「カゼイン」はすべての必須「アミノ酸及びその他20種類に亘る各種「アミノ酸を含有し、その内「ヒチ」は約2.5~4.3%を占める<sup>49)50)</sup>。

以上の蛋白質を材料とし、館論文所載の須藤氏法<sup>51)</sup>に従って、大日本臓器研究所製「パンクレアチン」或は「トリプシン」を用いて「アミノ酸を調製した。

今卵白「アミノ酸の製法を挙げると、

半熟卵白 (細挫)	25g
蒸溜水	350c.c.
「パンクレアチン」	5g

を混和し、10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で pH8 とし、「クロロフォルム」約 2.5c.c. ならびに「トルオール」の適量を加え、孵卵器に入れ時々振盪して一昼夜放置後 pH を 8 に修正し、更に一昼夜孵卵器内放置後再び「パンクレアチン」1g を加え pH 修正、時々振盪しつつ約 2

日間血温放置し、その一部を取り「ブローム水により「トリプトファン」反応を検し、陽性なるを確めた後濃縮した。即ち醋酸で弱酸性として加熱し、析出した沈澱を濾過し、その濾液を重濃煎上で濃縮し、更に析出した沈澱を濾過しつつ濃縮した。斯くして芳香を有する褐色銜色様「アミノ酸混合物を約 10g 得た。

本混合物は Sørensen の Formaltiration<sup>52)</sup> によりその「アミノ窒素量を検するに、2g 中 0.29g であった。

牛血粉も同様操作により「パンクレアチン」分解を行った。

「カゼイン」は前の「ペプシン」作用液 220c.c. (「カゼイン」20g 含有) に、「トリプシン」0.3g を60時間作用させて調製した。

これら各種「アミノ酸混合物を基本培養液 (0.2% 葡萄糖加牛肝臓浸出肝ブイオン) に夫々表記 (表 5, 6) の濃度に添加したものに、大原、大野菌を培養し

表 5 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす各種蛋白質分解「アミノ酸」添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加「アミノ酸種類」	同濃度	培養日数			
		0	2	3	4
無添加(対照)	0%	5	10	5	5
卵白 - 「アミノ酸」	2%	5	30	80	50
	5%	5	50	100	60
	10%	5	50	150	100
「カゼイン - アミノ酸」	2%	5	100	80	50
	5%	5	100	130	50
	10%	5	150	200	100

(b) 同上培養液 pH の変化

添加「アミノ酸種類」	同濃度	培養日数			
		0	2	3	4
無添加(対照)	0%	7.3	5.3→6.3	6.2	6.5
卵白 - 「アミノ酸」	2%	7.3	5.1→6.3	5.5→6.2	6.3
	5%	7.3	5.7→6.3	5.3→6.5	7.3
	10%	7.3	5.2→6.3	5.0→6.3	6.7
「カゼイン - アミノ酸」	2%	7.3	5.0→6.2	6.3	6.7
	5%	7.3	5.5→6.5	5.5→6.3	6.5
	10%	7.3	5.2→6.3	5 →6.2	6.8

その「ヒ」産生度を検討した。

その成績は表5表6の如くである。

即ち、大原菌においては、卵白分解「アミノ酸及び「カゼイン」分解「アミノ酸を夫々 2%, 5%, 10% に添加した培養基で「ヒ」産生を検するに、「アミノ酸無添加の対照に比し、何れも「ヒ」産生量増大を示してあり、且つ添加濃度に比例して「ヒ」量増大するようである。又大野菌においても、上記2蛋白以外に牛血粉分解「アミノ酸の 0.5%, 1%, 2% 添加をも試みたるに、これらはいずれも大原菌の場合と同様成

績を得、等しく「ヒ」原たり得る事を認めた。

#### 4. 「カルノシン」添加の影響

前節の「アミノ酸混合物中には、「アミノ酸以外に Peptide が混在している事は当然考えられる所である。従って Peptide 中「ヒ」原たり得るものがあるや否やについて攻究すべく、Peptide 中最も簡単な Dipeptide の一である「カルノシン」を培養基中に添加し、「ヒ」産生の有無を検討してみた。

Carnosin は Gulewitsch 及び Amiradizibi<sup>53)</sup> により哺乳類の筋肉から発見されたが、構造式上  $\beta$ -

表6 大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす各種蛋白質分解「アミノ酸添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

添加「アミノ酸種類	同濃度	培養日数			
		0	2	3	4
無添加(対照)	0%	5	40	50	30
卵白 「アミノ酸	2%	5	80	130	100
	5%	5	100	180	150
	10%	5	170	250	200
「カゼイン アミノ酸	2%	5	80	150	120
	5%	5	150	250	200
	10%	5	200	330	250
血粉 「アミノ酸	2%	5	70	100	50
	5%	5	90	60	30
	10%	5	100	80	50

(b) 同上培養液 pH の変化

添加「アミノ酸種類	同濃度	培養日数			
		0	2	3	4
無添加(対照)	0%	7.3	4.7→6.2	5.4→6.3	6.3
卵白 「アミノ酸	2%	7.3	5.0→6.2	4.8→6.3	6.5
	5%	7.3	4.5→6.5	5.0→6.2	6.4
	10%	7.3	4.5→6.5	5.0→6.2	6.5
「カゼイン アミノ酸	2%	7.3	5.2→6.5	5.4→6.3	7.0
	5%	7.3	5.0→6.3	5.3→6.3	6.5
	10%	7.3	4.5→6.3	5.2→6.3	6.7
血粉 「アミノ酸	0.5%	7.3	4.7→6.0	4.5→6.0	6.2
	1%	7.3	4.5→6.0	4.8→6.0	6.3
	2%	7.3	4.0→6.0	5.2→6.0	6.3

Alanylhistidin なる Dipeptide で, Guggenheim<sup>54)</sup>によれば, 人筋肉中には0.164%, 馬筋肉中に0.182%, 牛では 0.264%, 含有されており, 殊に新鮮筋肉中に多いとされている。また吉村<sup>55)</sup>は鰯及び「まいか」から 1 kg につき 2g 及び 2.24 g を得ており, 鈴木等は鮭, 鮪等の筋肉抽出物中から遊離状態の「カルノシン」を証明している。

而して Baumann u. Ingvaldsen 等に拠れば, 硫酸で処理する事により70%の「ヒチ」を収得し得ると

いう。

実験に用いた「カルノシン」は本学医科学教室早稲田助教授から恵与されたものである。今これを表示の如く 0.2% 及び 0.5% の割に基本培養液 (0.2%葡萄糖加牛肝臓浸出肝ブイオン) に添加し, 大原菌桃井株 (教室保存株) 及び大野菌の「ヒ」産生量を検したるに表7及び表8の如くである。

即ち大原桃井株, 大野両菌とも「カルノシン」無添加の対照に比し, 添加培養基の方が「ヒ」産生量大で

表7 大原菌桃井株の「ヒ」産生度に及ぼす「カルノシン」添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

培養日数 添加濃度	2	3	4
0% (対照)	5	10	7
0.2%	10	30	20
0.5%	20	50	30

(b) 同上培養液 pH の変化

培養日数 添加濃度	0	2	3	4
0%	7.3	5.3→6.0	5.4→6.0	5.8
0.2%	7.3	5.4→6.0	4.8→6.0	6.0
0.5%	7.3	5.4→6.0	4.5→6.0	5.7

表8 大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす「カルノシン」添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

培養日数 添加濃度	2	3	4
0% (対照)	40	50	20
0.2%	60	100	50
0.5%	100	150	70

(b) 同上培養液 pH の変化

培養日数 添加濃度	0	2	3	4
0%	7.3	4.7→6.0	5.4→6.0	6.8
0.2%	7.3	5.0→6.0	5.3→6.0	6.5
0.5%	7.3	5.3→6.0	5.2→6.0	6.0



あり、且つ 0.2% よりも 0.5% 添加の方がより多く「ヒ」を産生する。従って「カルノシン」も「ヒ」原たり得ると考へべきであろう。

#### 5. 「ヒスチジン」添加の影響

「ヒチ」は Imidazolring を有する「アミノ酸で、構造式上最も「ヒ」に近く、脱炭酸する事により容易に「ヒ」となる。従って赤痢菌が「アミノ酸混合物、或は Dipeptide を分解して「ヒ」を産生するならば当然「ヒチ」より「ヒ」を産生すべきである。斯る推察の下に、本節においては、純粹の「ヒチ」結晶を添加した場合の「ヒ」産生度を検した。

「ヒチ」結晶は 武田化学の 化学用 1-Histidin-HCl を用いた。

第 1 実験として、基本培養液に 0.2% 葡萄糖 10% 牛肝加肝ブイオン」を用い、大原、大野菌を 37°C、半嫌氣的培養し、その「ヒ」産生度を検した。その成績は表 9 及び表 10 如くである。

即ち表 9 大原菌培養にあっては、「ヒチ」無添加の基本培養液 2 日培養で僅に 10mg/l であるのに比し、「ヒチ」0.05% 添加では 3 日目、0.1% 添加では 2 日目に 100mg/l の値を示し、また 0.2% 添加では 2 日目に 120mg/l で、明に「ヒ」産生度の増大を示している。また表に示す如く、添加「ヒチ」濃度による「ヒ」産生度の相違は 0.05% と 0.1% 間には認め得なかつたが、0.2% 添加では前者等に比し僅乍ら増している。

表 10 大野菌培養においても、「ヒチ」無添加の対照培養基が最高 40 mg/l であるに比し、0.05% 添加の場合は 3 日目 110mg/l、0.1% 添加は 3 日目 250mg/l、0.2% には 3 日目 270 mg/l、更に 0.5% 添加するに及んで 2 日目 350mg/l の最高値を得た。即ち「ヒチ」添加により、明に「ヒ」産生度の増大を認め、且つ添加濃度の大きくなるに依りて「ヒ」産生量は増大している。

次に第 2 実験として、Eggrth 式合成培地 (Egg-yolk-asparagin-glucose-medium) に 0.1% の割合に 1-Histidin-HCl を添加し、大原、大野菌を 39°C で培養し、その「ヒ」産生度を検するに表 11 の如くである。

即ち大原、大野菌培養共、「ヒチ」添加の方が、「ヒチ」無添加対照よりも「ヒ」産生量が大きい。

以上の 2 実験により、明に大原、大野菌は「ヒチ」を分解して「ヒ」を産生する能力を有するものと考へられる。然し乍ら既に第 2 章において述べた如く、腸管法による値が直ちに産生「ヒ」量に一致するや否やについては検討を要する所である。

先ず大原、大野菌の 0.1% 「ヒチ」0.2% 葡萄糖加肝ブイオン」2 日培養濾液を、瀬良一横山法により比色定量して次の値を得た (表 12)。

即ち両菌共腸管法値の約 50% の「ヒ」を本法により分離抽出し得たに過ぎず、一見腸管法値には、「ヒ」

表 9 大原菌の「ヒ」産生度に及ぼす 1-Histidin HCl 添加の影響

(a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

培養日数 添加濃度	2	3	4
	0% (対照)	10	8
0.05%	50	100	40
0.1%	100	50	
0.2%	120	80	

(b) 同上培養液 pH の変化

培養日数 培養濃度	0	2	3	4
	0% (対照)	7.3	5.2→6.0	6.2
0.05%	7.3	4.9→6.0	5.3→6.0	6.7
0.1%	7.3	4.7→6.0	6.5	
0.2%	7.3	4.5→6.0	6.5	

表10 大野菌の「ヒ」産生株に及ぼす 1-Histidin HCl 添加の影響

## (a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

培養日数 培養濃度	培養日数		
	2	3	4
0% (対照)	25	40	25
0.05%	100	110	50
0.1%	180	250	100
0.2%	250	270	200
0.5%	350	250	150

## (b) 同上培養液 pH の変化

培養日数 添加濃度	培養日数			
	0	2	3	4
0%	7.3	4.7→6.0	4.3→5.8	5.7
0.05%	7.3	4.5→6.0	4.6→6.0	6.0
0.1%	7.3	4.5→6.0	4.5→6.0	6.5
0.2%	7.3	4.3→6.0	4.7→6.0	6.3
0.5%	7.3	4.5→6.0	4.7→6.0	6.5

表11 大原、大野菌の「ヒ」産生度に及ぼす 1-Histidin HCl 添加の影響

## (a) 「ヒ」産生量 (mg/l)

接種 菌種	培養日数 添加濃度	培養日数		
		2	3	4
大原菌	0% (対照)	4	2	
	0.1%	70	100	40
大野菌	0% (対照)	4	8	5
	0.1%	130	200	150

## (b) 同上培養液 pH の変化

接種 菌種	培養日数 添加濃度	培養日数			
		0	2	3	4
大原菌	0% (対照)	7.3	6.0	6.5	
	0.1%	7.3	5.6→6.0	5.2→6.0	6.7
大野菌	0% (対照)	7.3	5.4→6.0	5.1→6.0	6.4
	0.1%	7.3	5.4→6.0	5.2→6.0	6.4

外の所謂腸管物質による収縮値の混入大なるものあるを思はしめる。然し本法は操作可なり複雑で、且つ長時間を要し、上記実験と同時に「ヒ」標準液による対照抽出試験においても 55.2% の抽出成績を得た事実より推し、大原、大野両菌濾液の腸管法値は産生「ヒ」量に略々一致すると考うべきであろう。

更に表13に示す如き培地に、大原、大野菌を培養し、その培養濾液を教室同僚兼松、白藤両君に依頼し泉教授及び同君等改良の Eggerth 法変法<sup>45)46)</sup>により、その「ヒ」量を測定し、且つ抽出液から「ヒ・ピクラー」結晶を作出し、化学的に「ヒ」なる事の証明を乞うた。その成績は次の如くである。(表13)

即ち本分離定量法値と腸管法値とは90~98%に一致する。

而して「ヒ」測定残液より「ピクリン酸結晶として得た淡黄色針状結晶は、融点 233~234°C (235°C) で「ヒ・デピクラー」に一致し、且つ塩酸「ヒ」結晶より作った「ピクリン酸結晶と混和しても、その融点の変化を認めない、更に本学附属薬学専門部析化学教室に依頼した本結晶の元素分析成績では、N量は 22.48%となり、「ヒ・デピクラー」の計算N量 22.14%に殆ど一致する。

以上の成績を総合考察する時は、本結晶が「ヒ・デピクラー」なる事は疑う余地なく、従ってまた大原、大野両菌は「ヒチ」を分解して「ヒ」を産生するものであり、且つその培養濾液の示す腸管収縮値は、

「ヒ」そのものの作用によるものと確信し得る。

### 総 括

赤痢菌が「ヒ」を産出するとすれば、当然「ヒ」原たるべき材料を必要とする。Eggerth<sup>15)</sup>は本菌の「ヒ」産生には遊離の「ヒチ」を必要とするとし、和田<sup>26)</sup>は牛肝片加「ブイオン」に赤痢菌(Y菌、駒込B菌、シュミット菌、志賀菌、駒込A菌)を培養し「ヒ」の産生を認めた。また西村<sup>28)</sup>は大原菌及び駒込B菌の「ヒ」産生培地として、5%家兎血清1%「ウキッテペプトン」加肝ブイオン、及び5%家兎血清1%「ウキッテペプトン」10%牛肝片加肝ブイオンを使用して好成績を得た。館<sup>31)</sup>も同様に10%牛肝片加肝ブイオンに赤痢異型菌或は「バラ赤痢菌を培養して「ヒ」の産生を認め、これに「カゼイン」、卵白等から製した「ペプトン」を1~3%に添加した場合、僅に「ヒ」産生量は増加するが、添加濃度による差異は認められぬとした。更に同氏は卵白、「カゼイン」、小豆、照内ペプトン等を牛睪臓或は「パンクレアチン」で分解した「アミノ酸添加により、「ヒ」産生量が甚だ増大する事を認めた。

以上の文献より按ずれば、赤痢菌の「ヒ」産生には少くとも「ヒチ」を必要とし、更に複雑な構造式を有する Polypeptide 乃至はそれ以上の高分子化合物を分解して「ヒ」を産生するやもしれない。この間を些か究明すべく、絃上の如き一連の実験を行った。

表 12

接種菌種	培養 日数	腸管法による 「ヒ」産生量	比色法による 「ヒ」産生量	一 致 率
大 原 菌	2	100mg/dl	54mg/dl	54%
大 野 菌	2	170mg/dl	86mg/dl	50.6%

表 13

培 養 基 種 類		接 種 菌 種	培養 日数	腸管法値	Eggerth法 改良法によ る検出値	検出率 (%)
a	Eggerth 氏 Egg-yolk-asparagin-histidin-glucose medium	大原菌	3	40mg/dl	39mg/dl	97.5
b	肝浸出肝ブイオン]+a) 培地	大原菌	3	100mg/dl	94.6mg/dl	94.6
c	10%片肝片加肝ブイオン]+0.2%ブドウ糖	大野菌	3	280mg/dl	252mg/dl	90.0

註：「ヒチ」量はすべて0.1%に添加

今これを総括して述べれば次の如くである。

先ず蛋白質添加の影響について検討を加えた。即ち 0.2%葡萄糖加牛肝臓浸出液「ブイオン」に、卵白、「カゼイン」、牛血粉、小豆、「ヘモグロビン」を夫々2及び5%の割合に添加し、大原、大野菌を各培養して、その「ヒ」産生量を検した。その成績は、蛋白質無添加の対照培養基による「ヒ」産生量に比して、いずれも産生量の時間的相違はあるが、最高産生量自体は勝るものではなく、従って両菌はこれら蛋白質より「ヒ」を産生するとは考えられない。

次に吾人の消化機構に従って、上記蛋白質中卵白、「カゼイン」及び牛血粉を「ペプシン」で分解し、これら「ペプトン」添加の影響について検討した。即ち基本培養 1.2%葡萄糖加肝肝「ブイオン」に上記「ペプトン」を 0.5, 1, 2%の割合に添加し、大原、大野両菌を各々培養した。その成績は蛋白質添加の場合と全く同様で、いずれの「ペプトン」添加の場合においても、無添加対照に比し「ヒ」量は増大して居らず、また添加濃度と「ヒ」産生量とは関係がない。従って赤痢菌においては、「ペプトン」も「ヒ」原たり得ないと考えられる。

更に消化を進めて、「アミノ酸混合物を添加し、その影響を検討した。即ち牛血粉及び卵白は「パンクレアチン」により分解し、「カゼイン」は前記第2節実験において「ペプシン」分解を受けたものを、更に「トリプシン」分解した。大原菌培養においては、卵白「アミノ酸」及び「カゼイン・アミノ酸」を夫々2, 5, 10%の割合に添加して対照無添加培養と比較するに、「ヒ」産生量は著明に増量し、且つ添加濃度に比例して居る。大野菌においてもまた上記2蛋白質及び牛血粉「アミノ酸」を同様濃度に添加培養した成績は、大原菌と一致して居る。

然し乍らこの所に考うべきは、添加アミノ酸の純度の問題である。蛋白質加水分解に通常最も用いられるのは強鉍酸に依る方法で、特別の「アミノ酸分離」以外では、該法が最も確実且つ比較的短時間で実行得る。然し私は生体の消化機構に準ずべく、該法に依らず、蛋白質分解酵素類を用いた。本法によれば中間分解物を生じ、全部を「アミノ酸」に迄分解する事は出来ない。即ち私の作った「アミノ酸混合物は、高分子の蛋白質は除去してあるが、猶「ビウレット」反応弱陽性を呈し、Polypeptideの若干残って居る事は否定し得ない。然し乍ら「トリプトファン」反応陽性に出る事よりして、「アミノ酸」が生成されている事も事実であり、且つ「パンクレアチン」による卵白分解物 2gm 中に Sørensen の Formaltitration に依り「アミノ

窒素 0.29 gm を明記し得ている。また Dunn & Lewiss<sup>56)</sup>によれば、「カゼイン」の分解に際し、「ペプシン」による「アミノ窒素の遊離は約10%であり、更に「トリプシン」を添加する事により略々80%に達する。従って本実験に供した「パンクレアチン」乃至は「ペプシン」及び「トリプシン」による分解物は、かなりの純度の「アミノ酸混合物と考えてよい。

斯る見地よりすれば、赤痢菌は「ペプトン」を「ヒ」原とする事は出来ぬが、「アミノ酸」迄に分解されたものを「ヒ」原とする能力を有すると考えてよいであろう。この考察は、第2節実験で「カゼインペプトン」を大原、大野両菌共「ヒ」原となし得なかつたが、第3節実験で、それを更に「トリプシン」で分解したものを添加した場合著明に「ヒ」を産生する事実によって是認し得る。

前述の如く蛋白質分解「アミノ酸混合物中には、少量ではあるが Peptide 含有されている。

斯る Peptide 中赤痢菌の「ヒ」原たり得るものがあるや否やについては遽に論断し得ない所であるが、次にその一裏書たるべき第4節実験を行った。即ち、Peptide 中最も簡単な Dipeptide たる Carnosin を実験に用いた。本試料は吾人が動物性蛋白として摂る哺乳類或は魚類筋肉中に含有され、且つ屢々遊離の状態に含まれて居る点まことに興味がある。

今 Carnosin を基本培養基に 0.2, 0.5%の割合に添加して大原、大野両菌の「ヒ」産生量を検してみるに、いずれも無添加対照に比し「ヒ」の増量を示し、且つ添加濃度に応じて増量している。従って赤痢菌は Dipeptide たる Carnosin を分解して「ヒ」を産生し得るとすべきであろう。

最後に構造式上最も「ヒ」に近似した「ヒチ」に対する赤痢菌の態度について検討した。既に第1章において述べた如く、「ヒチ」より「ヒ」を産生する能力については種々の細菌について報告されている。然し赤痢菌に関しては甚だ尠く、大腸菌は「ヒ」を産生するも、赤痢菌は産生せずとする者すらある<sup>37)</sup>。私は上述の第1節より第4節迄の実験成績より、赤痢菌は当然「ヒチ」を分解して「ヒ」を産生すると確信し、種々工夫実験を重ねた結果、或条件下では盛に「ヒ」を産生する事を実証し得た。その条件については第II報以下において報告するが、「ヒ」産生成績の一端を第5節実験において示した。

即ち 0.2%葡萄糖肝片加肝「ブイオン」を基本培養基とする時、大原、大野両菌共「ヒチ」添加により「ヒ」産生量は増大し、且つ添加濃度に応じて増して居る。今大野菌の場合をみるに、「ヒチ」無添加対照で

は最高「ヒ」産生量は 40 mg/1 であるに比し, 0.05%「ヒチ」添加では最高 110 mg/1 で 70 mg/1 増量している。これは添加 1-Histictin-HCl より生成する「ヒ」計算量の約 19%に相当する。0.1%「ヒチ」添加の場合には対照よりも 210 mg/1 増量し, 計算量の約30%に相当する。0.2%「ヒチ」添加では 230 mg/1 増量し, 計算量の約15%に相当し; 0.5% 添加では略々 8%の 310 mg/1 増量している。大原菌の場合でも「ヒチ」添加量に応じて「ヒ」産生絶対値は多くなるが, 計算量よりみた比は一定程度迄比例するが, それ以上は却って低下して居る, 即ち「ヒチ」の一定濃度以上の存在は却って赤痢菌の発育代謝に悪影響を及ぼし, 「ヒ」産生量の低下を来すものと思惟せられる。然し乍らこれは培養基容量, 菌量その他に制約のある試験管内成績であって, 斯る制約のない生体腸管内では自ら異なるものと考えられる。

本「ヒチ」分解産物が「ヒ」である事は, 瀬良一横山法により精製定量し, また泉教授考案の新定量法による比色定量, 且つ作出「ヒ・ピクラート」の融点及び分析N量決定により証明するを得た。

猶最後に附言すべきは, 「ヒ」産生時の培養基の pH であるが, 各節において示した如く等しく酸性で 5~5.5 前後となっている。もっとも「ヒ」産生の殆どない対照の場合でも赤痢菌の発育により酸性となって居るのであって, 寧ろ随伴的な現象と考えられる。然し乍ら疫痢症状患児の糞便及び尿は「ヒ」を含有して居り, その pH は 5.5 前後である事実<sup>45)46)</sup>, 或は「ヒ」中毒家兎の尿も同様酸性で且つ「ヒ」を証明される事実と符合する事は甚だ興味深い。

以上の如く赤痢菌の「ヒ」産生には, 「ヒ」原たるべき材料を必要とするのであって, この点を考慮しない実験において「ヒ」の産生をみないのは蓋し当然と云うべきである。

猶従来疫痢症状発現機構として食餌の原因が重視されてはいるものの, 暴飲暴食或は不消化物摂取による

腸管の機械的損傷を以って主とし<sup>57)17)</sup>, 摂取食品の内容については殆ど論及されていない。然し乍ら以上の実験成績より按ずれば, 「ヒ」原の豊富な食品を摂取せる場合においては大量の「ヒ」が産生され, 疫痢症状が発現するものと考えられる。而して第II報において述べる方面においても食品内容が「ヒ」産生に重大な関係を有するものであって, 従って大太平洋戦争末期から終戦後の食糧難時代では, 赤痢は少なくないにも拘らず疫痢の発生が少く, 食糧事情好転と共に増加して来た事実<sup>57)58)59)</sup>の一端も敘上により解明し得るものである。

## 結 論

吾人の生理的消化機構を考慮し, 蛋白質及びその消化酵素分解物或は「カルノシン」「ヒチ」を培養基中に添加して, 大原, 大野菌の「ヒ」産生度を検討し, 次の成績を得た。

1) 赤痢菌は蛋白質を分解して「ヒ」を産生する能力はない。

2) 赤痢菌は蛋白質分解「アミノ酸混合物より「ヒ」を産生する。

3) 赤痢菌は「ペプトン」より「ヒ」を産生しない。

4) 赤痢菌は「カルノシン」添加により「ヒ」産生をみる。

5) 赤痢菌は「ヒチ」より「ヒ」を産生する。

即ち赤痢菌の「ヒ」産生には, 「ヒ」原たるべき材料を必要とし, 「ヒチ」より「ヒ」を産生するが, これを含む蛋白質も一定程度分解されて始めて「ヒ」原たり得る。

猶「ヒ」産生時の培養液の pH は 5~5.5 前後で, 「ヒ」の減量と共に「アルカリ」側に傾く。

拙筆するに当り, 終始御懇篤な御指導並に御鞭撻を辱うし, 御校閲の労を賜った恩師泉教授に万歴の謝意を表します。

文献第IV報にのせる。