溶血性連鎖狀球菌毒素ノ精製ニ就テ

目黒研究所 (所長 目黒博士)

玉井 文三郎

Bunzaburo Tamai

(昭和13年1月 日受付)

【内 容 抄 録】

倉内, 西村氏等ノ酒精及ビ酸ヲ以テセル溶血性連鎖狀球菌毒素ノ精製法ヲ追試シ, 其ノ精製過程ニ於ケル毒素量及ビN量ニ就テ觀察ヲナセリ.

目 次

緒 言	第4章 酒精及ビ酸ヲ交互ニ各々3回使用セル6種溶血性連鎖狀球菌毒素ノ精製
第1章 毒素ニ加フル酒精量	第5章 總 括
第2章 毒素ノ酸ニヨル沈降物	結 論
第3章 酒精及ビ酸ヲ各々1回使用シタル場合	文 献

緒 言

細菌ノ培養濾液中ニハ細菌自體ノ產生物タル “Aktive Principien” ナルモノノ外幾多ノ夾雜物ヲ含ム. 該夾雜物ノ主ナルモノハ蛋白質ニシテ菌體及ビ培養基成分ニ由來セルモノナリ. 各菌種ノ培養濾液ノ夾雜物ヲ除去スルノ方法即チ毒素精製法ニ就キテノ數多ノ研究業績ハ既ニ諸先輩ニヨリテ發表セラレ就中酒精ヲ以テセル溶連菌毒素ノ精製ニ就テモ *Henry & Liwis*, *Mackie & Mc. Lachlin*, 倉内, 西村ノ諸氏ニヨリテ詳細ニ發表セラレタリ.

余ハ先ヅ溶連菌毒素ヲ Aluminiumsalz 又ハ Alaun ヲ以テ精製ヲ試ミテ不結果ニ終リ, 次ニ細谷, 宮田氏法ニヨリテモ其ノ精製毒素 I ニ於テ僅ニ20%ノ獲得度ヲ得タルニ過ギズ, 最後ニ倉内, 西村氏等ノ方法ニヨリテ簡易ニ之ヲ精製スルヲ得テ, 而モ獲得度ノ相當大ナルコトヲ經驗シタルヲ以テ其ノ精製過程ニ於ケル毒素量及ビN量ニ就テ觀察ヲナセリ.

第1章 毒素ニ加フル酒精量

0.3% 葡萄糖加まるたんぷいよんニ猩連菌 No.8 ヲ4日間培養ヲ行ヒタルモノヲ濾過紙及ビ Betkefeldt ヲ以テ濾過シタル無菌的濾液ニ次表ニ示スガ如ク種々ナル量ノ無水あるこほ一

ヲ加ヘテ觀察セルニ毒素量ノ半量ノ酒精ヲ加ヘタルモノニテハ濁濁ヲナサズ、從ツテ一夜之

第 1 表

毒素量ト酒精量ノ比		1 夜氷室ニ置キタルモノノ所見
1	2 : 1	全ク透明ニシテ沈澱ナシ
2	1 : 1	稍々白色ニ移行シ振盪スル時ハ多少ノ濁濁ヲ有ス
3	1 : 2	上清ト淡白色柔軟ナル沈澱トニ分ル
4	1 : 3	3ニ同ジ
5	1 : 4	液ハ淡乳白色不透明ニシテ沈澱ハ flockig ナリ
6	1 : 6	5ヨリハ稍々濃キ乳白色不透明ニシテ沈澱ハ flockig ナリ
7	1 : 10	液全體ハ乳白色ニテ沈澱ナシ

ヲ氷室ニ靜置シタル場合ニ於テモ沈澱ヲ見ズ然ルニ酒精量ヲ次第ニ増加スルニ從ヒテ濁濁ヲ生ジ、毒素量ノ2 倍量ニ達スル時ハ急激ニ完全ナル乳白色トナリ、小顆粒ヲ浮游セシム、而シテ其レ以上ノ酒精量ヲ増加スルトモ其ノ混和液ノ所見ハ異ナル所ナキノミナラズ毒素量ノ10×ヲ加ヘタルモノニテハ一夜氷室ニ靜置スレドモ最早沈澱ヲ生ゼズシテ液全體ハ乳白色ニ濁濁シタルママニ止ル。

溶連菌毒素ニ2 倍量ノ酒精ヲ加ヘ振盪混和シテ一夜氷室ニ靜置シタルモノヲ遠心器ニヨリテ上清ト沈澱トニ分チ、沈澱ヲ同容量ノ生理的食鹽水ニ溶解シ、上清ト共ニ種々ナル稀釋ヲ行ヒテ白豚ノ皮内反應ニヨリテ檢スルニ上清中ニハ僅少ノ毒素ノ存在ヲモ證明シ得ザルニ反シ沈澱溶解液ハ原毒素ニ近似ノ毒力ヲ示セリ。(第4表)

第 2 章 毒素ノ酸ニヨル沈降物

溶連菌毒素ヲ酸ヲ以テ pH4.0ニ修正シ、一夜氷室ニ靜置スル時ハ沈降物ヲ生ズ。其ノ沈降物ト上清トヲ遠心器ニヨリテ分離シ、沈降物ヲ同量ノ生理的食鹽水ニ溶解シ、上清ト共ニ生理的食鹽水ヲ以テ稀釋ヲ行ヒ、白豚ノ皮内反應ニヨリテ毒力ヲ比較シタルニ上清7ニ對シ沈降物溶液2ノ割ヲ示セリ、即チ沈降物ニハ約20%、上清ニハ約70%ノ毒素ヲ有セリ。

第 2 表

白豚感受性 2H. T. D.

種 類	陽性反應ヲ示シタル最高稀釋倍數	毒 力 H.T.D. Perc	原毒素トノ毒力ノ比
上 清	700×	14000	70%
沈降物溶解液	200×	4000	20%
原 毒 素	1000×	20000	

第 3 章 酒精及ビ酸ヲ各1回使用シタル場合

前記培養濾液ノ濾過シタルモノニ2 倍量ノ酒精ヲ加ヘテ一夜氷室ニ靜置シ、次ニ上清ト沈

澱トヲ遠心分離ヲナシ、其ノ沈澱ノ全量ヲ量同容量ノ生理的食鹽水ニ溶解シ、次ニ其ノ溶解液ノ一部ヲ別容器ニ採リテ pH4.0 ニ修正シ一夜氷室ニ置キタル後ニ生ジタル沈降物ヲ遠心分離ニヨリテ除去シテ得タル上清ト前記ノ溶解液及ビ原毒素トノ各所有ノ毒力及N量ヲ測定シテ第3及ビ第4表ニ記セリ。

第 3 表

種 類	5cc 中ノN量 (G)	原毒素トノN量 ノ比
毒素ニ2倍量ノ酒精ヲ加ヘテ 生ジタル沈澱物ヲ同等ノ生理 的食鹽水ニ溶解シタルモノ	0.00034	3.1%
同上液ヲ PH4.0トシテ生ジ タル沈降物ヲ除キタルモノ	0.00019	1.8%
原 毒 素	0.0108	

毒素ニ2倍量ノ酒精ヲ加フルコトニヨリテ約9.7%ノNヲ除キ更ニ酸ヲ使用スル時ハ殘餘ノNノ約半量ヲ除去シ得タリ。即チ酒精及ビ酸ヲ各1回使用スルノミニテ實ニ毒素中ノ98%餘ノN。

ヲ除去セルナリ。

第 4 表

白豚感受性H. T. D.

種 類	陽性反應ヲ示シタル 最高稀釋倍數	毒 力 H. T. D. Percc	原毒素トノ 毒力ノ比
毒素ニ2倍量ノ酒精ヲ加ヘテ1 夜氷室ニ置キタルモノノ上清	—	—	—
同上ノ沈澱物ヲ原毒素ト等量ノ 生理的食鹽水ニ溶解シタルモノ	1800×	18000	90%
同上ノ溶解液ヲ PH4.0トシテ 沈降物ヲ除キタルモノ	1500×	15000	75%
同上沈降物ヲ原毒素ト等シキ量ノ 生理的食鹽水ニ溶解シタルモノ	200×	2000	10%
原 毒 素	2000	20000	

毒素ニ2倍量ノ酒精ヲ加ヘテ一夜氷室ニ置キタル場合ニ生ズル上清、沈澱等ノ所有スル毒力ヲ檢スルニ上清ニハ僅少ノ毒素ヲモ有セズ、之ニ反シテ其時ニ生ジタル沈澱中ニハ原毒力ノ90%ノ毒力ヲ有シ、次ニ酸ノ使用後ニ於テ75%ニ減ジ其ノ酸ニ依ル沈降物中ニハ10%ノ毒素ヲ有スル物質ヲ夾雜物トシテ含メルナリ。

第 4 章 酒精及ビ酸ヲ交互ニ各3回使 用セル6種猩連菌毒素ノ精製

6株ノ猩連菌ヲ0.3%葡萄糖加まるたんぶいよんニ4日間培養ヲ行ヒテ濾過紙及ビ Berkefeldtヲ通過セシメタルモノヲ白豚ニテ標準毒素トノ間ニ毒力ノ比較ヲナシ、次ニ *Kyeldahl*

氏法＝ヨリテ各々ノ有スルN.量ヲ測定シタル後酒精及ビ酸ヲ交互＝各3回作用セシメテ精製シタルモノノ各毒力及ビN.量ヲ前同様ニ測定シテ各原毒素トノ間ニ比較ヲナセル＝ A_3 ＝於テ獲得度ハ60%，N.量ハ約1%ニシテ， K_2 ＝於テハ其ノ獲得度ハ40%，N.量ハ2%ヲ示シ，其他ノ毒素ハ其等2毒素＝於ケルモノノ中間ニ位セリ。

第 5 表

毒素種類	原毒素ノ毒力 H. T. D. Perc	精製毒素ノ毒力 H. T. D. Perc	獲得度	原毒素 5cc 中 ノN量 (G)	精製毒素 5cc 中 ノN量 (G)	精製毒素ノN ノ原毒素ノ其 ニ對スル比
A 1	15000	7000	47%	0.0131	0.00014	1%
A 2	15000	8000	53%	0.0129	0.00019	1.5%
A 3	20000	12000	60%	0.0108	0.00012	1.1%
K 1	10000	5000	50%	0.0127	0.00015	1.2%
K 2	10000	4000	40%	0.0134	0.00028	2%
K 3	8000	4000	50%	0.0125	0.00016	1.3%

第 5 章 總 括

溶連菌毒素＝酒精ヲ加ヘ其ノ量ガ毒素ノ2倍量ニ達スル時ハ其ノ混合液ハ急激＝乳白色トナリテ小顆粒ヲ浮游セシメ，其ヲ靜置スル時ハ沈澱ヲ生ジテ上清ヨリ分離ス。而シテ上清＝ハ微量ノ毒素ヲモ含ムコトナシ，即チ全毒素ハ完全ニ沈澱セルコトヲ示セリ。然レドモ沈澱物溶解液ガ原毒素＝比シテ僅ニ其ノ毒力ノ弱キ結果ヲ得タルハ操作中ニ於ケル沈澱物ノ幾分ノ損失ト注射＝際シテノ稀釋ノ粗ナリシニ歸セザルベカラザルナリ。

酒精ノ量ニ就キテハ毒素ノ3×，4×，乃至6×ニストモ2倍量ニ於ケル場合ト異ナル所ナク，10×量ニ於テハ反ツテ沈澱ヲ生ズルコトナク，一夜氷室ニ靜置スルモ混合液ハ乳白色ノママニ止ルモノノ如シ。

毒素ヲPH4.0ニ修正シテ一夜氷室ニ置クトキハ沈降物ヲ生ジ，其ノ沈降物ヲ生理的食鹽水ニ溶解スル時ハ原毒素ノ約20%ノ毒力ヲ有セリ。即チ毒素中ニハ酸＝ヨリテ沈降スル物質ヲ含ミ其ノ物質ハ一部ノ毒素ト結合セルモノト解サルナリ。

毒素ニ酒精及ビ酸ヲ各1回ヅツ作用セシメテ得タルモノハN.量ニ於テ原毒素ノ1.0%内外ニ過ギザルニ毒力ニ於テ75%ヲ保有セリ。即チN.量ニ於テ99%ヲ失ヒ，毒力ニ於テ25%ヲ減少セリ，而シテ酒精及ビ酸ヲ交互ニ反復使用スルコトニヨリテ尙幾分ノN.量ト毒力ヲ減ジ得ルモ大部分ノN.量ハ實ニ酒精ノ初回ノ使用ニヨリテ除去シ得ルナル。

結 論

溶連菌毒素ノ精製ハ酒精及ビ酸ニヨリテ至極簡單ニナシ得タリ。

稿ヲ終ルニ際シ目黒所長ニ御指導ト御校閲ヲ深謝ス。

文 献

- 1) **Schmidt, S.**, Zeitschr. f. Immunitätsf. 1931. 71. Bd.
- 2) **Tasman u. Pondman**, Zeitschr. f. Immunitätsf. 1931. 72 Bd.
- 3) **Pondman, u. Tasman**, Zeitschr. f. Immunitätsf. 1931. 73 Bd.
- 4) **Henry, H. and Lewis, F. C.**, Lancet, 1925, 1, 710.
- 5) **Mackie, J. and Mac. Lachlin, D. G. S.**: Brit. J. Eexp. Path., 1926, VI, 41.
- 6) **Hartley, P.**: Brit. J. Eexp. Path., 1928, IX, 259.
- 7) 細谷, 宮田: 實驗醫學雜誌, 第14卷, 第8號.
- 8) 細谷, 宮田: 實驗醫學雜誌, 第14卷, 第10號.
- 9) 倉内: 細菌學雜誌, 昭和2年, 第376號.
- 10) 西村: 滿洲醫學雜誌, 昭和4年, 第11卷, 第2號.