ジフテリア粗毒素液中に含まれているモロニイ反応 発現性物質の分離とその性状に就て

細 谷 省 吾 横 山 元 昭

東京大学伝染病研究所第一研究部

〔受付：10月13日1954年〕

緒 言

1927年 Moloney¹⁾はジフテリアアナトキシン(ジ・トキソイド)を注射する際アナトキシンに特に敏感に反応する人を見分ける反応としてアナトキシンの生理食塩水20倍稀釈液0.1 mlを前腕内に皮内注射し、24時間後その注射部位に径10 mm以上の発赤浸潤の発現するものを陽性と認め、陽性者にはその反応の程度によりアナトキシンの注射量を加減すべき事を記載した。この様なアナトキシン注射時の副作用は、乳幼児には殆んど起らないが年齢が進むにつれ不快な副作用の頻度を増してくる事は周知の事実である。Pappenheimer 及び Lawrence²⁾はショック反応陰性者に、高度に精製されたトキソイドを注射した場合、副作用の率は粗トキソイドの場合に比べ激減はするが絶無とはなし得ない。これはトキソイドそれ自体に対する反応と考えられると云っている。然しそれ以前1942年細谷等³⁾はモロニイ反応強陽性者に対し副作用を起す事なしにジ・トキソイドを接種し所謂 anamnestic response により非常に迅速に且つ確実に高い抗毒性免疫の成立つ事を百数十名の成人に就て実施しこれを報告したが、更に数千名の成人に就てこの方法は行われ確認されるに至つた⁴⁾。而してモロニイ反応発現のメカニズムに関してはジ菌の顕性或いは不顕性感染によつて獲得された人体のジ菌菌体蛋白(Pappenheimer等の所謂 P-fraction 即ち formalinized atoxic diphtherial proteins に相当する)に対するアレルギー性反応と従来解釈されていた。吾々は副作用物質としてのモロニイ反応惹起因子をジ毒素或いはジ・トキソイドから分け度い事を久しく念願してきたが、先年吾々の研究室に於て中村は(1942)⁵⁾同因子の多量を含む劃分をジ毒素から分ける実験に成功したが、吾々は今回毒素の微量さえも含まないモロニイ反応発現性物質自身を分離する事が出来たので、その分離法及びその性状に就て報告する次第である。

実験材料

1) ジフテリア粗毒素：

楊・永井培地⁶⁾(Taylor 培地の改良)にマルトーゼを0.5%に加え、ジ菌 Toronto 株を接種し34°Cに9日間培養せる無菌濾液(75 Lf/ml, Kf 18分, pH 8.4, MLD 0,001 ml, MRD 0,000001 ml)及び八洲化学より分与された上記と同様の方法によつて得られたジ菌培養濾液(105 Lf/ml, Kf 15分, pH 3.6, 30I以上)とを用いた。

2) 部分的精製毒素

上記ジ粗毒素30I,を細谷法⁷⁾に依り型の如く濃縮後流水に対して透析した内液を部分的精製濃縮毒素として用いた。(1,060 Lf/ml, Kf 7分, pH 7.4, MLD 0,0002 ml, MRD 0,0000002 ml)。

実 験

〔I〕ジ毒素からのモロニイ反応発現性物質の分離に就て 〔表1〕：

HOSOYA Seigo & YOKOYAMA Motoaki: On the separation of the Moloney reaction positive substance that included in the diphtherial crude toxin and that constitution. Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 10(3), 249~254, 1955.

本論文の要旨は以下に於てその大要を発表した。

第1報：昭和27年11月31日

伝染病研究所創立60周年記念学術講演会
講演要旨掲載「細菌学の新領域」149~173
昭和29年10月医学書院

第2報：昭和28年4月30日

伝研・予研学術集談会
抄録掲載「臨床」第6巻第6号(昭和28年6月)

第3報：昭和28年5月14日

第26回日本細菌学会総会
抄録掲載、日本細菌学雑誌、第8巻、特別号、昭28、1953

ジ粗毒素を細谷法により型の如く処理し、硫酸安門飽和水溶液 (pH 7.0) をその半量加え 37°C に 1 時間放置後生じた沈澱を集めた硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和沈澱と、その上清とに分つ。この沈澱を硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和液で 1 回洗滌後、水に溶かし、再び飽和硫酸液を $\frac{1}{3}$ 飽和させ、生じた沈澱を集め少量の水に溶解し牛腸膜囊にいて流水透析し内液を Pauli 型電気透析器を用いて透析しその内液を「硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和沈澱部割分」とした。(この割分は Lf 価が比較的大であるに拘らず Kf が極めて長く、毒性は Lf 価に比して弱く、又その抗毒原性も極めて微弱である⁸⁾)。次いで硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和沈澱を除いた上清液に更に硫酸飽和液を加えて $\frac{2}{3}$ 飽和とし、pH 7.0 にて 37°C に 1 時間放置後、生じた沈澱を硫酸 $\frac{2}{3}$ 飽和溶液で洗い、以下前者と同様その沈澱を集めて少量の水に溶解し、流水透析し、内液を更に電気透析した後、その内液を「硫酸 $\frac{2}{3}$ 飽和沈澱部割分」とした。(この割分の Lf 価は高く、Kf 短く、毒性強く、抗毒原性も高い)。

この両割分のモ反応発現性を比較検討する為両者の一部を夫々凍結乾燥した粉末を生理食塩水で 1 mg/ml 濃度に pH 7.0 にて溶かし 100°C 20 分加熱後無菌的に稀釈して 1 mcg/ml (1 : 1,000,000) とし再度 100°C 20 分間加熱後この両割分粉末の 1 mcg/ml 溶液を成人 1 名 (横山) の左右前膊屈側皮内に 0.1 ml 宛注射し 24 時間後に判定を行つた処硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和割分では外輪 34×30 mm の著明な二重発赤 (内輪の紅斑は更に顕著な潮紅を示した) と共に種腫・硬結・自発痛・局所熱感等の局所反応と、更に体温 37.3°C、全身倦怠、違和感を覚えた。

然し対照の硫酸 $\frac{2}{3}$ 割分粉末の 1 mcg/ml 溶液 0.1 ml 皮内注射 (ジ粗毒素を破壊する為 100°C 20 分宛 2 回加熱した) では 24 時間後何等局所に反応を認めなかつたので

更に 0.01 mg 及び 0.1 mg/ml 加熱処理液を 0.1 ml 宛順次皮内注射した処、24 時間及び 48 時間後に何等の反応を認めず 1 mg/ml 濃度に至つて 6×6 mm の極めて境界不鮮明な淡紅色の小発赤斑を認めたにすぎず、他に何等の局所反応もみられなかつた。この実験は僅か 1 例の経験ではあるが、これによつてジ粗毒素中に含まれているモ反応発現性物質は硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和割分にその大部分が移行されている事が明かにされた。そこで更にモ反応発現性物質を追求する目的で硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和割分に Sevag 法⁹⁾ に準拠してクロロホルム・ゲル法を用い分割を行つた。即ち $\frac{1}{3}$ 飽和割分を 0.1 m 醋酸にて pH 6.5 とし、クロロホルムを原毒素量の $\frac{1}{5}$ 量加え、更に消泡の目的を以てアミルアルコールを $\frac{1}{40}$ 量混じ振盪機にて振盪混和後、遠心して分れた水層、ゲル層、クロロホルム層の三層を別々に分けて採り、水層部分に更にクロロホルム及びアミルアルコールを加えて振盪・遠心を反覆し、この操作を繰り返して最早ゲル層の生じなくなる迄これを繰り返す (10~13 回) 最後に残つた水層部を 0~1°C に冷却後、冷メタノール 4 倍量を加え、生じた絮状沈澱を 0°C 30 分間放置後、冷却遠心機にて沈澱を集めてこれを少量の蒸溜水 (0~2°C) に溶かした。次いで各回のゲルはこれを合併後冷メタノールで洗滌後同遠心機にて沈澱を集め、同じく少量の蒸溜水にて溶かした。この場合に Lf、毒性、免疫原性等毒素性状の大部分は後者のゲル部割分に移行し、水部にはジ抗毒血清との間にフロキュレーションの発現性全くなく、又海狸や家兎の皮下、皮内注射等により毒性の存在を認めなかつた。更にこれらの両割分のモ反応発現性は水部割分の凍結乾燥粉末 1 mcg/ml 溶液 (100°C 20 分加熱処理) 0.1 ml (即ち 0.1 mcg) を成人 1 名 (横山) の前膊屈側皮内に注射した処 24 時間

にて外輪 45×32 mm, 内輪 15×14 mm の顕著な二重発赤を発し, 腫脹・硬結・自発痛・局所熱感等を伴い体温 37.4°C に上昇し全身違和倦怠を覚えた。48 時間では発赤や縮小し局所反応及び全身反応は軽減した。然るにゲル部劃分の凍結乾燥粉末 1 mg/ml 溶液 (100°C 20 分加熱) を 0.1 ml (即ち 0.1 mg) 注射したが局所に何等異常を認めなかつた。又劃分の乾燥粉末を 10% 溶液とし Bial 反応を試みたが水部劃分は強陽性, ゲル部劃分は陰性を示した。

江上等¹⁰⁾は水酸化ランタンゲルに依り酵素核酸が分解され, その磷酸基の脱離する事を記載したが, 吾々は同教授より分与された精製炭酸ランタンを用いて更にモロニイ反応発現性物質を追求した。即ち炭酸ランタンを塩酸に溶解後, NaOH で中和した水酸化ランタンゲル液を前記硫酸 1/3 飽和劃分の Sevag 法劃分による水部劃分に混じり 0.1 m 醋酸緩衝液 (pH 6.5) を加え振盪混和しつゝ 37°C に放置 60 分後遠心し, 集めた沈澱を上記緩衝液にて 2 回洗滌後, 10% 醋酸カリウム溶液を加え pH 7.0 にて 1~3°C に冷放 24 時間の後, 遠心して醋酸ランタンの沈澱を除き, 上清をセロファン囊にいれ 5°C の冷室で蒸留水に対し透析後, 内液を更に電気透析してこれを凍結乾燥し, 白色の粉末を得た (この粉末の収量は極めて微量で粗毒素 1 l, 当約 5 mg にすぎない)。この粉末を生理食塩水にて 1 mg/ml に溶かし, 更に十進稀釈 (ピペットは各稀釈毎に交換した) を行つて 1 mcg/ml 及び 0.1 mcg/ml の稀釈液となし, その 0.1 ml 宛 (即ち 0.1 mcg 及び 0.01 mcg) を成人 1 名 (細谷) の前膊屈側皮内に注射したが 24 時間後前者は外輪 67×47 mm, 内輪 12×9 mm で, 後者は外輪 34×23 mm, 内輪 8×7 mm の非常に顕著な二重発赤を認め, 共に腫脹・硬結・自発痛・圧痛を伴い局所の熱感強く全身違和倦怠を覚え注射翌日には反対側腕関節に数十秒間宛続くリューマチ様激痛を数回覚え, 翌々日は 1 回で, 3 日後消褪した。猶注射局所の色素沈着は 3 週間以上も残つた。かくの如くこの粉末の有するモロニイ反応発現性は極めて強い。猶又この粉末を 1% に溶かして硫酸 1/3 飽和或は 2/3 飽和となし 37°C に加温 60 分間放置してみたが濁濁や沈澱等は生じなかつた。

〔II〕 モロニイ反応発現性物質の性状:

以上の如き方法によつてジ毒素からモロニイ反応を極めて強く発現する物質を分離したので, その本態を明かにするために次の実験を行つた。

(A) 免疫学的性状

a) モロニイ反応陽性を示す成人皮内に対する反応度〔表 2〕

該物質 10 mg を生理食塩水に溶解し, 100°C 20 分加熱後, 無菌的に稀釈を行い 1 mcg/ml 濃度とし, 再び 100°C 20 分加熱し細谷, 横山及び同室の成人計 6 名に就て前膊屈側皮内にその 0.1 ml 宛を注射 (即ち 0.1 mcg) した処〔表 2〕に示すように何れも 24 時間後に著明な局所反応と共に発熱を伴つた全身反応を呈した。この場合同時に注射した対照のモロニイ反応 (60 Lf/ml ジ・粗トキソイドを生理食塩水にて 20 倍に稀釈し 100°C 20 分間加熱後その 0.1 ml を前膊屈側皮内に注射) より何れも強い反応を示している

〔表 2〕 成人に対するモロニイ反応発現症

項目	局 所 所 見										全身所見			
	可 検					対 照					体 温	倦 怠 感	そ の 他	
	* 発赤 斑	赤 内 斑	腫硬 自 局 所 熱 感	硬 自 局 所 熱 感	局 所 熱 感	発赤 斑	赤 内 斑	腫硬 自 局 所 熱 感	硬 自 局 所 熱 感	局 所 熱 感				
被験者	外斑	内斑	斑	斑	斑	外斑	内斑	斑	斑	斑				
細 原 山 緒 馬 横	○	+++	+	++++	++++						—	+	関節痛	
	○	+++	+	—	—	+	—	—	—	+	37.4	+		
	○	+++	+	—	—	+	—	—	—	+	37.2	+++	頭痛	
	○	+++	±	+	+	+	+	+	+	+	36.9	++		
	○	+++	—	++	—	+++	++	+	±	—	+	37.7	++	頭痛
	○	+++	+	+++	+	+++					37.2	+		

* 発赤の径

+++ 40 mm 以上 ++ 20~30 mm ± 5~10 mm
 ++ 30~40 mm + 10~20 mm — 5mm 以下

b) 幼児に対する反応度〔表 3〕

ジ菌による顕性或は不顕性感染を経ない乳幼児に於てモロニイ反応陽性を示すものゝ殆んど無い事は周知の事実である。吾々は本物質が本来のモロニイ反応を起すや否やを知らんとして幼児 5 名 (但し中 2 名は咽頭ジフテリア回復期にあるもの) につき本物質の 1 mcg と, 対照として加熱 20 倍稀釈粗トキソイドの 0.1 ml とを前膊屈側皮内に注射した処〔表 3〕に示すように幼児 3 名中 1 名がモロニイ物質に僅かに反応を示した他異常なく, ジ回復期患者 2 名中 1 名が粗トキソイドに反応を示し, 該物質 1 mcg にても僅かな発赤を認めた。この結果より本物質はモロニイ反応発現因子の有力な一つであると考えられる。

c) ジ抗毒馬血清との間に於けるフロキュレーション発現性

モロニイ物質の 0.1 及び 1.0% 生理食塩水溶液を作り, このものゝ一定量を一系列の試験管にとりたる後, Lf 価既知の標準血清を 1 Lf より 100 Lf に至る種々なる量を添加し 37~42°C におき型の如くフロキュレーションを

〔表3〕 幼児に対するモロニイ反応発現性

被 験 者	項目	局 所 所 見						全身所見		
		可 検			対 照			体 温	倦 怠	そ の 他
		発 赤	腫 硬	自 圧 熱	発 赤	腫 硬	自 圧 熱			
		外 斑	内 斑	発 熱	外 斑	内 斑	発 熱			
田○4歳	—	—	—	—	—	—	36.8	—	—	
栗○5歳	+	+	±	—	+	+	36.9	—	—	
徳○2歳	—	—	—	—	—	—	36.9	—	—	

以下咽頭ジフテリア恢復期患者

平○3歳	±	—	—	—	++	+	++	—	+	—
村○5歳	—	—	—	—	—	—	—	36.4	—	—

行い72時間観察したが毒素・抗毒素結合に基づく floccule の発現は認められず、又間接法フロキュラシオン（所謂混合法）¹¹⁾にてもフロキュラシオン現象は起らなかった。

d) ジ菌体免疫家兎血清との間に於ける沈降反応

ジ菌 Toronto 株のレフレル培地 24 時間培養菌を 1ml 中に 2.5mg 含む生理食塩水菌浮游液を作りホルマリン 0.5% 添加殺菌後、家兎 (2.5kg) 静脈内に 7 日間隔に 1ml 宛 10 回免疫注射して得た血清と、ジ毒素各劃分及びモロニイ反応発現性物質（何れも乾燥粉末を生理食塩水に溶解せるもの）との間に行つた沈降反応の結果では硫安 $\frac{1}{3}$ 飽和沈澱部に沈降反応原性は強く移行しているのが認められた。更に Sevag 法劃分による水部、そして更に水酸化ランタンゲルの吸着部分即ちモロニイ反応発現性物質（抗原稀釈 10 万倍迄陽性）に最も高度の沈降原性が移行されている事が立証された。

e) ジ部分的精製濃縮トキソイドを硫安 $\frac{2}{3}$ 飽和して得られた劃分を以て免疫した家兎血清との間に於ける沈降反応。

上記劃分を流水及び電気透析を行い凍結乾燥した粉末を生理食塩水 1ml 中に 20mg (60Lf 相当量) 宛を含ませ 5 日間隔に家兎 (2.5kg) 静脈内に 12 回注射を行い、得られた血清を以てモロニイ反応物質及び他の各劃分との間に沈降反応を行つた結果では、硫安 $\frac{2}{3}$ 飽和沈澱部に強く反応（抗原稀釈 1 万倍迄陽性）しているのに反しモロニイ反応物質（同 10 倍にて陰性）及び硫安 $\frac{1}{3}$ 飽和沈澱部（同 10 倍にて疑陽性）には殆んど沈降原性は示していない。

f) ジ粗トキソイドにより感作された海狸に対するアナフィラキシ-の発現性¹²⁾

健康海狸 9 匹にジ粗トキソイドを数回注射し、シク

反応陰性に至らしめた後、該物質によりアナフィラキシ-現象を生ずるや否やにつき実験を行つた。即ち該物質 1mg を生理食塩水 1.0ml に溶解し、感作海狸 3 匹の静脈内に注射したが何れも何等異常を認めなかつた。対照として透析したジ部分的精製濃縮毒素の 5, 10, 25, 50 Lf/ml 含有液を注射した結果は何れも不安、痙攣、呼吸困難、体温急墜等のショック現象を示し或いはショック死を来した。即ちこれにより該物質はジ・トキソイドにより感作された動物に対してはアレルギー現象を現さない。

(B) 生物学的性状

a) 毒性

モロニイ反応物質それ自体が動物に対し毒性を有するや否やを驗べるためモロニイ反応陽性成人皮内に於て著明な発赤を示す量 (0.01 mcg) の 1 万倍量である 1mg を生理食塩水 0.1ml に溶解し、加熱処理する事なく健康海狸及び家兎の皮内に夫々注射せる処、24 時間及び 48 時間後に於て何等発赤その他の異常を認めなかつた。更に又 1mg の生理食塩水溶液を海狸に皮下注射したが 4 日間に体重減少その他の異常を認めなかつた。故に該物質それ自体には毒性はないものと思われる。

b) ジ麻痺発現性

細谷・小沢・田中¹³⁾及び小沢¹⁴⁾はジ毒素の微量 (250 gr) 内外の海狸に対する 1MLD の $\frac{1}{3}$ 乃至 $\frac{1}{20}$ 量) を鶏又は幼鶏の大腿部筋肉内に注射すると間違いなく人間のジ後麻痺と機作を同じくする弛緩性麻痺を、又細谷、小松¹⁵⁾は海狸についても同様な現象を起し得る事を記載した。かくの如き事実からジ毒素の微量が後麻痺の主因の一因子である事は明かである。従つてこの物質中に微量の毒素が存在するや否やを確め様として感受性の高い幼鶏に本物質 1mg (粗毒素約 300ml より得) の食塩水溶液を大腿部筋肉内に注射したが何等変化なく 3 週間以上を耐過し、而もその体重は日々漸増するのが認められた。従つて本物質中には殆んど全くジ毒素を含有していないものと考えられる。対照として細谷法濃縮後更に硫安 $\frac{2}{3}$ 劃分沈澱を行つた精製ジ毒素の微量 (0.05, 0.025 MLD 各海狸量) を幼鶏 4 匹に注射して、注射側下肢の運動緩慢、跛行、弛緩性麻痺、内臓等の顯著なジ麻痺を起すことが出来た。

(C) 理化学的性状

a) 電気泳動図

モロニイ反応物質 30mg を Phosphate buffer¹⁾ (pH7.7, イオン強度 0.2) 3ml に溶解 (易溶) して 1.0% 濃度とし 5°C の氷室内でセロファン紙嚢を用い、同じ buffer の

外液に対して24時間透析した後、その内液を Tiselius 型装置により電気泳動 (液温 2°C , 125 V, 4 mA) を行つたが泳動開始後両端に至る間77分にして、この間終始単一な山を以て持続した図型が得られた。

第 1 図

b) 紫外外部吸収スペクトル

該物質1mgを蒸留水1mlに溶解後、更に稀釈して5 mcg/ml 濃度とし、Beckmann 光電分光光度計を用いて験べたが $260\text{ m}\mu$ 附近に於て吸収極大を示した。

c) 化学的性状

名大江上研究室を煩わし該物質の化学的性状を験べて載いた結果は次の如くである。即ちN: 13.2%, P: 1.44%, N/P: 9.16で又該物質1%濃度に於てOrcin 反応(+), Morisch 反応(+), Dische 反応(±), Biuret 反応(-)等である。

〔III〕 FeSO_4 過剰添加培地によるジ菌培養濾液より得られたモ反応物質の性状:

Pappenheimer (1948) は FeSO_4 を 25 mg/l の割に加えた Mueller & Miller 培地に Toronto 株を培養し、その濾液 (2MLD/ml) を型の如くホルマリンで処理して得た所謂 P-fraction はモ反応を強く示すと記した。吾々はこれを複試し、更にその性状を明かにする目的を以て次の様な実験を行つた。即ち楊・永井培地 (毒素産至適鉄濃度 5 mcg/20ml) に Pappenheimer の行つたと

同様 25 mg/l の割合に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加え (鉄イオン濃度 500 mcg/20 ml) ジ菌 Toronto 株を 34°C に9日間培養して得られた無菌濾液はジ抗毒素血清との間にフロキュレーションを現わさず、又原液1mlを海猿皮下に接種したが4日間にやゝ体重減少をみたのみで他に異常なく、MRD 0.0001 ml. , pH 8.4を示すものであつた。これを型の如く細谷法で精製濃縮し、更に硫酸、クロロホルム、炭酸ランタン等によつて分割した。猶同時に対照として 5 mcg/20ml の毒素産生に至適の鉄濃度を以て培養して得られた毒素についても同様に分割した。これらによつて得た両者のモ反応物質を成人2名 (細谷, 横山) の前膊屈側皮内に 0.01 mcg (100°C 20分加熱) を注射し、24時間及び48時間後の観察によれば発赤その他の局所反応に大差を認めなかつた。又ジ菌体免疫家兎血清との間に於ける沈降反応に於て、両モ反応物質を 1 mg/ml の割に生理食塩水に溶解し、倍数稀釈によつて得られた沈降反応性の比較結果にては FeSO_4 過剰添加培養濾液のそれは41,200倍迄陽性であり対照毒素に於ては12,800倍迄陽性であつた。

考 察

年長の少年、青年殊に成人に高率に起るジ・トキソイド注射時の副作用はジ菌菌体蛋白に対するアレルギーとして従来漠然と考えられていた。為にジ毒素やジ・トキソイド中に含まれる該物質の合理的な除去方法は勿論、該物質の化学的性状に至つては全く知られていなかったが今回吾々がジ菌濾液より分離したモ反応物質はその副作用発現の有力因子と思われる。従つてジ毒素からこの物質をかくる操作によつて完全に除いた精製トキソイドは成人に注射しても不快な副作用は起さない筈である。この意味に於てジ毒素の硫酸 $1/3$ 飽和沈澱を除いた上清より硫酸 $2/3$ 飽和沈澱をとり Sevag の法により処理してそのクロロホルムゲルを集め、更に水酸化ランタンゲルによる非吸着部分 (即ち上清) は流水透析及び電気透析し、その内液を凍結乾燥すれば比較的精製されたジ毒素を得る事が出来る。

このものは毒性強く、ジ抗毒血清との間にフロキュレーションを起し、且つ Kf も数分にすぎない。又加熱により無毒化された成人皮内に注射した場合副作用は極めて少ない。これらの実験諸成績によつてジ毒素より分離されたモ反応発現性物質は毒素それ自体とは全く異なる劃分に存する事が確認されたのでこの物質とジ毒素とは可分の関係にあると結論出来る。

結 論

1) ジフテリア粗毒素液からモロニイ反応を極めて強

く発現する物質を分離する事が出来た。

2) ジ粗毒素からの分離方法として先づ粗毒素を細谷法にて濃縮したが該物質はこの濃縮毒素中に共存しているが、次に硫酸安門を以て分割沈澱を行う時、該物質は低濃度劃分である硫酸 $1/3$ 飽和沈澱部に殆んどが移行し、次いでこの劃分をクロロホルムと共に振盪し、生じたゲルを除去した上清部分の水酸化ランタンゲルを用いて吸着し、その蔭酸カリウム水溶液による溶出液を普通透析及び電気透析し、内液を凍結乾燥した結果、極く微量の白色粉末としてモロニイ反応を強く発現する物質を分離することが出来た。

3) この物質の性状は

a) 0.01 mcg の極めて微量を含む水溶液をモ反応強陽性の成人に 100°C 20 分加熱後皮内注射すると顕著な腫脹、硬結、自発痛、局所熱感等を伴う二重発赤を起し、更に発熱、関節痛、頭痛、倦怠等の全身反応をも伴った。これを顕性或いは不顕性ジ菌感染を未だ経過しないと思われる幼児に対して注射した処、対照のモ反応と同様該物質 1 mcg にても殆んど発赤を示さなかつた。この物質はジ抗毒素血清との間にフロキュレーションを起さずジ菌体免疫家兎血清との沈降反応に於ては極めて高度稀釈迄反応する沈降原性を有し、又該物質を殆んど含まないジ・トキソイド硫酸 $2/3$ 飽和劃分を以て免疫した家兎血清との間に於ける沈降反応に於ては全く反応を示さない。更にジ・トキソイド感作海狸に対してアナフィラキシー発現性も有さない。

b) この物質は健康海狸及び家兎の皮内・皮下に注射して何等の毒性を示さず、又幼鶏大腿部筋肉内に注射を行つてもみたが極く微量のジ毒素存在によつて起るべき筈のジ麻痺をも起し得なかつた。

c) 電気泳動的には単一であり、紫外外部吸収スペクトルにては $260\text{ m}\mu$ 附近に極大を有する曲線を示し、又化学的には N 13.2%, P 1.44%, N/P 9.16 であつた。

4) 過剰の鉄イオンを含む培地にジ菌を培養して得られたる濾液、及び至適鉄イオン濃度の培地に於けるジ菌培養濾液の両者から得られたモ反応発現性物質を、同反応陽性成人皮内注射による反応及びジ菌体免疫家兎血清との間に於ける沈降反応価の両者について比較したがその間に殆んど大差を認めなかつた。

終りに当り種々御便宜を戴いた名大、江上教授、都立

荏原病院長、長岐博士、伝研、服部氏、予研、黒川、緒方両氏並びに大量の毒素を御提供戴いた八州化学株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Moloney, P. T. & Fraser, C. J.: Amer. J. Publ. Health 17(1027), 1927.
- 2) Pappenheimer, A. M. Jr. & Lawrence, H. S.: Amer. J. Hyg. 47, 226(I)1948. ibid 47,233 (II) 1948. ibid 47, 241(III) 1948.
- 3) 細谷, 林, 渡辺, 中村(精): 日本医学健康保険 3290, 1461, 昭17, 1942.
- 4) 細谷: 第11回日本医学会総会誌, 昭17, 1942. 高橋, 五十嵐, 丹羽, 保母, 佐藤: 軍医団雑誌. 361, 715, 昭18, 1943.
- 5) 中村: 実験医学雑誌, 第26巻下(第1報)第12号1004. 昭17, 1942. 実験医学雑誌, 第27巻上(第2報)第1号, 61, 昭18, 1943.
- 6) Chun Chich Young: Chinese Med. J. Suppl. I, 1936. ibid II, 1938.
- 7) Hosoya et Miyata: Compt rend. Soc. biol. 99, 1927. ibid 99, 1928. Hosoya et Stéfánopoulo G. J. et Miyata: ibid 99, 1928. Hosoya et Stéfánopoulo G. J.: ibid 99 et 100 1922. 細谷, 出口, 利部: 実験医学雑誌, 28(4), 420, 昭19, 1944. 日本医学, 3405, 99, 昭21, 1946.
- 8) Kurokawa, M., Murata, R., Nakano, T., Kubota, K., Yokota, T. & Yamada, T.: Jap. Med. J. 4 (1) 1951. ibid 4 (1) 1951. ibid 5 (4) 1952. 横山: 伝研・予研學術集談会(昭和28年2月). 臨床第6巻第4号(昭28.4)
- 9) Sevag, M. G., Lockemann, D. B. & Smolens, J.: J. Biol. Chem. 124, 425, 1938.
- 10) 江上, 下村, 小林: 化学の領域 5 (12) 及び 6 (1), 昭27, 1952.
- 11) Glenny, A. T. & Waddington, H.: J. Path. Bact. 31, 403, 1928.
- 12) 石坂: 日本細菌学雑誌, 第7巻第2号昭27, 1952.
- 13) Hosoya, S., Ozawa, E. & Tanaka, T.: Jap. J. Exp. Med. 12(1), 1, 昭9, 1934. 細谷, 小沢, 田中: 実験医学雑誌, 18(3), 昭9, 1934.
- 14) Ozawa, E.: Jap. J. Exp. Med. 14(2), 105, 昭11, 1936.
- 15) 細谷, 小松: 日本臨床, 第6巻第1号, 昭23, 1948.