Shwartzman 濾液の有効因子に関する研究* (第3報)

研究生 山下 照子

東京大學傳染病研究所第三研究部 (部長: 武田徳晴教授)

〔受付: 11 月 8 日, 1948〕

さきに私は⁽¹⁾大腸菌 *B. coli communis* 株を用い Shwartzman の原法に従い Shwartzman 濾液を作り, これを分割, 精製して, 毒性および Shwartzman 反應を詳細に調べた結果, その有効因子は多糖體の分割にあつて, 該菌の菌體內毒素に一致すべきことを指摘した。

よつて更に *B. coli communior* 株についても同様の事實を確認すべく, また各種の生物學的實驗及び化學的分析をなすために大量の Shwartzman 濾液を作り, これより前報と略同様の方法によつて有効因子を分割した。なおこの分割についてさきに武田, 山下⁽²⁾の報告した部分的加水分解を繰返し分解産物とくに X 物質について毒性及び Shwartzman 反應を調べ活性物質の作用基としての重要性を更に確認したのでここに報告する。

實驗方法

實驗方法として Shwartzman 濾液の製法分割物質の毒力, Shwartzman 反應の検査方法はすべて第1報に準據した。

A. 有効物質の分離

使用菌株は東大緒方富雄博士から分與を受けた大腸菌 *B. coli communior* 株で第1報におけると同様の方法で Shwartzman 濾液を作り使用した。有効物質の分離方法は第1報と略同様であつて濾液 6.6 l を 1.2 l に減壓濃縮後, 3倍量の純アルコールを加えて生じた沈澱を溜水 1.0 l で2回浸出し, 水に可溶部と不溶部に分ち, 可溶部は水道水で5日, 溜水で1日透析, 100 cc に濃縮後3倍量の純アルコールを加えて一夜氷室に放置後遠心沈澱する。沈澱はアセトン・エーテルで洗滌

後眞空乾燥器内で乾燥さす。収量 10.2 g, 物質5號とする。

次にその 2.0 g をとり 100 cc の溜水に溶して一夜室溫に放置後遠心沈澱して水に不溶の部を除き, 上清に3倍量の氷醋酸を加えて一夜氷室に放置後遠心沈澱する。沈澱は更に溜水 100 cc に溶し, 一夜室溫に放置後遠心沈澱し, 上清に3倍量の氷醋酸を加えて一夜氷室に放置後, 遠心沈澱する。沈澱はアセトン・エーテルで洗滌後眞空乾燥器内で乾燥さす。収量 1.28 g, 物質6號とする。

水に不溶の部は 0.3% 醋酸 250 cc で3回浸出し, 上清は水道水で5日溜水で1日透析後 70 cc に濃縮し, 3倍量の純アルコールを加えて沈澱さす。沈澱は前回同様アセトン・エーテルで處置後乾燥さす。収量 0.5 g, 物質7號とする。

B. 物質5號の部分的加水分解と X物質について

さきに武田, 山下の報告した様に本 Shwartzman 濾液の有効因子である物質5號を部分的加水分解して生じた X 物質は毒性を有し, かつ Shwartzman 反應發現能力を具備していることを述べたが, 物質少量のために充分の實驗ができなかつたので, 本實驗においては再び物質5號を前回同様に部分的加水分解をなすことにした。なお前報の成績では加水分解後得た多糖體がなお僅かに毒性を有していたが, その理由として加水分解が不完全で X 物質の離脱が充分に行われていない結果と考えられるので, 本實驗においては加水分解の時間と析出する X 物質量との相互關係を調べることにした。

即ち物質5號 0.5 g を 0.2 N 醋酸 50 cc に溶し 100 °C の水浴中で2時間加水分解を施し, 冷却後, 遠心沈澱し, 沈澱は 0.2 N 醋酸水で水洗後アセトン・エーテルで洗滌し乾燥させたが X 物質 7.5 mg を得た。上清 10 cc をとり, これに

* Teruko Yamasita: Study on active principles of Shwartzman filtrate, (Third report) Jap. Jour. Bact., 4(2): 61-64. 1949.

3倍量の純アルコールを加えて遠心沈澱しアセトン及びエーテルで洗滌し乾燥して多糖體 73.0mg を得た。残り 40 cc は更に 1 時間分解して X 物質 43mg を得て上清 10 cc を前記同様處置して多糖體 60.0mg を得た。

残り 30 cc を更に 2 時間分解し、X 物質 8.0 mg を得て上清 10 cc より多糖體 58.0 mg を得た。残り 20 cc は更に 3 時間分解し、X 物質 2.4 mg を得て上清 20 cc より多糖體 120 mg を得た。なおこの多糖體については毒性及び Schwartzman 反應發現能力の有無を確認する必要があるので更に精製を重ねることとし、その 100 mg を少量の溜水にとかし、純アルコールを加えて沈澱後更に少量の溜水にとかし、アセトンで沈澱せしめエーテルで洗滌後乾燥せしめた。收量 60.0mg でこれを物質 9 號とする。

粗製 X 物質は總量 22.2 mg であるが、これを pH 9.4 の生理食鹽水にとかし鹽酸で pH 5.0 として沈澱せしめ精製すること 2 回 11.6 mg を得た。

實驗成績

A. 各分割の物理化學的性状

物質 5 號, 7 號及び 9 號は何れも帶褐白色の粉末で 6 號は帶白色の粉末であり、何れも 1.0% 溶液で Biuret 反應陰性, 0.1% 溶液で Molisch 反應陽性であり、物質 5, 6, 9 號は水, 生理食鹽水, 酸, アルカリに溶解する。しかるに 7 號は水, 生理食鹽水に難溶, pH 2.6 以上の酸性にのみ溶解し、アルカリ性により沈澱する。なお素素含有量は物質 5 號 2.59%, 6 號 2.23%, 7 號 1.42% 9 號 1.2 % であつた。

B. 各分割の毒性と Schwartzman 發現能力

各分割のマウスに對する毒性を検すると、物質 5 號 0.5 mg の靜脈内注射では 3 匹中 1 匹, 0.8 mg では 3 匹中 2 匹を 24 時間以内に斃死せしめ 1.0 mg 及び 1.5 mg では 3 匹中 3 匹を斃死せしめた。物質 6 號は 0.5 mg の靜脈内注射で 3 匹中 1 匹を, 0.7 mg 及び 1.0 mg では 3 匹中 3 匹を斃死せしめた。又物質 7 號 0.3 mg, 腹腔内注射では 3 匹中 1 匹を, 0.4 mg 及び 0.5 mg では 3 匹

中 3 匹を斃死せしめた。又精製 X 0.3 mg の腹腔内注射では 3 匹共斃死せしめ得ず 0.5 mg 及び 1.0 mg では 3 匹中 3 匹を斃死せしめた。

即ち各分割のマウスに對する最少致死量は物質 5 號 1.0 mg 6 號 0.7 mg 7 號 0.4 mg 精製 X 0.5 mg であつた。

第 1 表 準 備 能 力

家兎 番號	體重 (g)	準 備 注 射		惹起注射	Schwartz- mann 反 應の大きさ (m. m.)
		物質 番號	注 射 量		
34	2350	5 號	20000×0.25cc	原液 2× 4.7cc	20×20
		"	40000× "		15×10
		"	80000× "		10×10
		原液	"		25×28
35	2100	5 號	80000×0.25cc	原液 2× 4.2cc	(-)
		"	100000× "		(-)
		"	300000× "		(-)
		原液	"		25×15
36	2300	6 號	10000×0.25cc	原液 2× 4.6cc	20×20
		"	20000× "		15×10
		"	50000× "		7×7
		原液	"		20×25
37	2000	6 號	50000×0.25cc	原液 2× 4.0cc	7×10
		"	80000× "		(-)
		"	100000× "		(-)
		原液	"		15×15
39	2600	7 號	10000×0.25cc	原液 2× 5.2cc	20×18
		"	20000× "		15×17
		"	50000× "		5×5
		原液	"		30×25
40	2200	7 號	50000×0.25cc	原液 2× 4.4cc	(-)
		"	80000× "		(-)
		"	100000× "		(-)
		原液	"		20×17
42	2300	9 號	100×0.25cc	原液 2× 4.6cc	(-)
		"	200× "		(-)
		"	500× "		(-)
		原液	"		30×30
43	2000	9 號	100×0.25cc	原液 2× 4.0cc	(-)
		"	200× "		(-)
		"	500× "		(-)
		原液	"		20×25
44	2000	精製 ×	5000×0.25cc	原液 2× 4.0cc	15×15
		"	10000× "		10×8
		"	20000× "		(-)
		原液	"		40×30
45	2500	精製 ×	20000×0.25cc	原液 2× 5.0cc	10×10
		"	50000× "		7×8
		"	80000× "		(-)
		原液	"		20×20

備考：家兎 33, 38, 41 號は實驗例の重複したもので紙面の都合上省略す

又その Schwartzman 發現能力は第1及び第2表に示す如くで準備能力の最少量は物質5號80000

第2表 惹起能力

家 兔 體 重 番 號 (g)	準 備 注 射		惹 起 注 射 射		Shwar- tzman 反應の 大 き (m.m.)
	物質 番號	注 射 量	物質 番號	注 射 量	
47 2400	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	5號	5000×2.4cc (prokilo 0.2mg)	10×10 10×10 8×9 30×25
48 1800	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	5號	10000×1.8cc (prokilo 0.1mg)	(-) (-) (-) (-)
49 2000	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	5號	10000×2.0cc (prokilo 0.1mg)	10×7 8×9 9×9 15×20
50 2100	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	5號	20000×2.1cc (prokilo 0.05mg)	(-) (-) (-) (-)
51 2200	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	5號	20000×2.2cc (prokilo 0.05mg)	(-) (-) (-) (-)
53 1500	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	6號	5000×1.5cc (prokilo 0.2mg)	10×15 10×13 10×10 15×25
54 2100	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	6號	10000×2.1cc (prokilo 0.1mg)	(-) (-) (-) (-)
55 2300	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	6號	10000×2.3cc (prokilo 0.1mg)	(-) (-) (-) (-)
57 1800	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	7號	10000×1.8cc (prokilo 0.1mg)	10×10 10×10 7×7 15×15
58 1700	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	7號	20000×1.7cc (prokilo 0.05mg)	(-) (-) (-) (-)
59 2250	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	7號	2000×2.3cc (prookil 0.05mg)	(-) (-) (-) (-)
60 2500	5號 6號 7號 原液	1000×0.25cc " " "	9號	500×4.0cc (prokilo 8.0mg)	(-) (-) (-) (-)

62 2100	5號 6號 7號 精製 X 原液	1000×0.25cc " " " " "	精製 X	10000×4.2cc (prokilo 0.2mg)	20×12 15×12 15×12 15×15 20×25
63 2300	5號 6號 7號 精製 X 原液	1000×0.25cc " " " " "	精製 X	10000×2.3cc (prokilo 0.1mg)	(-) (-) (-) (-) (-)

備考 家兔 46, 52, 56, 61號は各分割のマウスに對する最少致死量により惹起注射を行つたもので何れも Schwartzman 反應強陽性であるが紙面の都合上省略す

倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.003 mg, 6號は 50000 倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.005 mg, 7號は 50000 倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.005 mg, 精製 X は 50000 倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.005 mg であり, その惹起能力の最少量は物質 5號 prokilo 0.1 mg, 6號 0.2 mg, 7號 0.1 mg, 精製 X 0.2 mg であつた。

なお物質 9號は體重 10 g のマウスに對し 10 mg, 即ち原毒素の 10 倍量の靜脈内注射によつてもこれを斃死せしめ得ず, 又 2.5 mg でも Schwartzman 準備能力なく prokilo 8.0 mg でも惹起能力を認められなかつた。

總 括 及 び 考 察

本實驗においては大腸菌 *B. coli communior* を用いて *B. coli communis* の場合と略同様の實驗を試み Schwartzman 反應有效因子について研究したが, 前報と略同様の結果を得ている。

即ち Schwartzman 濾液から多糖體の分割を得て, これについて詳細な生物學的實驗をなしてみると, 物質 5號の如く單に純アルコールで沈澱せしめた物質は毒性はやゝ弱い, 相當に強い準備能力即ち 0.003 mg で足り又惹起能力は prokilo 0.1 mg で足りるので他の何れの分割よりも強い成績となつている。しかるにこれを氷醋酸で精製するとマウスに對する最少致死量は 0.7 mg となり物質 5號の 1.0 mg に比し上昇しているが, Schwartzman 反應は準備能力は 0.005 mg, 惹起能力は prokilo 0.2 mg で共に逆に減退している。

即ち毒力と Schwartzman 反應の強さとは必ず

しも一致しないことは第1, 2報の場合と同様であつて興味ある事實である。

なおこのことは物質7號についてみても面白い結果が現れている。即ち物質7號は多糖體の分割の内酸性の溶液にのみ可溶の物質であつて、毒力は0.4mgであり他の多糖體の分割に比し最も強く、窒素の含有量は前二者のそれよりは低いが、Shwartzman 反應の強さは大體前二者の中間にあるので、毒力と Shwartzman 反應の強さとは必ずしも一致しない結果となつて現れている。

なお物質5號についてこれを部分的加水分解を施してみると、マウスに對する毒力は腹腔内注射で0.5mgであつて原毒素より遙に強く、かつ Shwartzman 準備能力は0.005mg 惹起能力はprokilo 0.2mg で原毒素のそれに略近い能力を有する物質と、物質9號の如き毒力も無く Shwartzman 反應發現能力もない多糖體とにわかれる。

武田、山下⁽²⁾の部分的加水分解の成績では多糖體の分割になお微量ながら毒力と Shwartzman 發現能力とを有して居り、これはこのX物質の離脱が不完全であるためであらうと述べているが、本實驗において實證された譯であり、加熱時間を更に5時間繼續するとX物質は約2倍量析出している。かくの如くしてもはやX物質の析出しない状態に至つた溶液より分割した多糖體はもはや毒力も Shwartzman 反應發現能力も消失している。即ちこの成績はさきに述べた武田等⁽³⁾⁽⁴⁾のチフ

ス菌、志賀赤痢菌の菌體內毒素について行つた部分的加水分解の成績と一致して居る。

結 論

大腸菌 *B. coli communior* 株を用いて Shwartzman 濾液を作り、その有効因子の研究をなしたが、その成績は *B. coli communis* を用いてなした第1及び2報のそれと殆んど一致した成績をあげている。即ち Shwartzman 有効因子が菌體內毒素なる複合多糖體であることは更に確認されたことになる。又これを弱酸性溶液で加水分解すると、有毒性でかつ Shwartzman 反應發現能力を有する生物學的に活性なるX物質と、この二つの性状を具備しない多糖體とにわかれる。

Shwartzman 反應活性物質はこのX物質と多糖體との結合によつてその根本的構成が成されていることは毒素の場合と軌を一つにして居り興味深い事實と思う。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導を賜りたる武田徳晴教授に衷心より謝意を表す。

(本研究は文部省學術研究會議補助費によつた。謹んで謝意を表す。)

文 献

- 1) 山下照子：新潟醫學會雜誌第62年，2號，64頁，昭23，同誌（印刷中）
- 2) 武田，山下：日本細菌學會雜誌 4⁽¹⁾，45，1949.
- 3) 武田，太田，佐藤：J. Bioch., 36, 407, 1944
- 4) 武田，太田，詹：J. Bioch., 36, 415, 1944