Shwartzman 濾液の有効因子に関する研究* (第4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 27 日, 1948年〕

私はさきに Shwartzman 濾液の有効因子の研究⁽¹⁾⁽²⁾においてこの濾液より出發して活性物質を分離し, この物質は菌體內毒素に一致すべきことを報告した。よつてこの事實を他の立場より立證すべく大腸菌の菌體より菌體內毒素を分離してその毒性和 Shwartzman 反應との關係を調べ前述の研究成績と比較検討することとした。

なお, 第1報及び第2報において Shwartzman 濾液より分割した蛋白性物質は毒性を有するも Shwartzman 反應を起し得ないことを報告したが, 更に本研究において菌體より核蛋白の分割を得てその毒性及び Shwartzman 反應の強さとの關係を調べたのでここに報告する。

實 驗 方 法

A. Shwartzman 反應, 毒力の如き生物學的検査及び化學的分析は第3報における方法に準じた。

B. 菌體內毒素の分離

前報において使用した大腸菌 *B. coli* communior 株の Shwartzman 濾液 6.6 l を作るにさいし得られた菌體 105 g (乾燥状態) を用い, 菌體內毒素の分離精製方法はすべて武田等⁽³⁾の報告に準據した。即ち 0.3% 醋酸 2.0 l で3回浸出し, pH 7.0 に修正後これを 1.2 l に濃縮し, 3倍量の純アルコールで沈澱さす。これに 200 cc の溜水を加えて水に可溶部と不溶部に分ち, 可溶部は Berkefeld で濾過し, 50 cc に濃縮後, 3倍量の純アルコールを加えて沈澱させアセトン・エーテルで洗滌後眞空乾燥器内で乾燥する。

收量 1.28 g, 物質 10 號とする。

水に不溶部は更に 0.3% 醋酸 150 cc で2回浸

出後, 上清は Berkefeld で濾過し pH 7.0 に修正後, 50 cc に濃縮し, 3倍量の純アルコールで沈澱させ, アセトン・エーテルで洗滌後前回同様乾燥する。收量 1.07 g, 物質 11 號とする。

C. 核蛋白の分離精製

菌體醋酸浸出残渣 45 g (乾燥状態) を 0.5% 苛性ソーダ 500 cc で3回浸出遠心沈澱して上清をとり, 濾紙で濾過し, 鹽酸で pH 4.4 とし生じた沈澱は溜水 500 cc を加えて苛性ソーダを滴下しつつ液が透明になる迄加えて充分溶解せしめ濾紙で濾過し, 鹽酸で pH 4.4 となして沈澱さす。

この方法を5回繰返し精製した後, アルカリ性の溶液を Berkefeld で濾過し, 水道水で10日, 溜水で2日透析後, 50 cc に濃縮し, 3倍量のアセトンを加えて沈澱させ前回同様乾燥さす。

收量 0.35 g 物質 12 號とする。

實 驗 成 績

A. 各分割の物理化學的性状

物質 10 號は帶褐白色粉末で 11 號は白色粉末であり, 何れも 1.0% 溶液で Biuret 反應陰性, 溶液で Molisch 反應陽性であり, 10 號は水, 生理食鹽水, 酸, アルカリに溶解する。11 號は水, 生理食鹽水に難溶 pH 2.6 以上の酸にのみ溶解し, アルカリ性により沈澱する。12號は茶褐色粉末でその 1.0% 溶液で Biuret 反應陽性 Molisch 反應陰性であり水, 生理食鹽水に難溶, アルカリ性により溶解する。なお, 窒素含有量は物質 10 號 1.80%, 11 號 0.36%, 12 號 6.73% であつた。

B. 各分割の毒性和 Shwartzman 發現能力

各分割のマウスに對する毒性を検すると, 物質 10 號 2.0 mg の靜脈内注射では3匹中2匹を, 2.5 mg 及び 3.0 mg では3匹中3匹を 24 時間内に斃死せしめ, 物質 11 號は 1.0 mg の腹腔内

* Teruko Yamasita: Study on active principles of Shwartzman filtrate (Fourth report). Jap. Jour. Bact., 4(2): 65-67, 1949.

注射では3匹中1匹, 1.2mg 及び 1.5mg では3匹中3匹を斃死せしめた。又物質 12 號は 1.0mg の腹腔内注射では3匹中2匹を, 1.5mg 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 10號 2.5mg, 11號 1.2mg, 12 號 1.5mg であつた。

Shwartzman 反應發現能力は第1及び第2表に示す如くで準備能力の最少量は物質 10號 50000倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.005mg, 11 號は 10000倍稀釋液 0.25 cc 即ち 0.025mg であつた。

又惹起能力の最少量は物質 10 號 prokilo 0.5mg, 11 號 prokilo 0.8mg であつた。なお 12 號は 5.0mg, 即ち當物質のマウスに對する最少

第1表 準備能力

家兎 番號	體重 (g)	準備注射		Shwartz- man 反應 の大きさ (m.m.)
		物質 番號	注 射 量	
64	2000	10號	4000×0.25cc	10×10
		"	10000× "	5×7
		"	30000× "	5×3
		原液	"	30×25
65	1900	10號	30000×0.25cc	15×15
		"	50000× "	10×10
		"	100000× "	(-)
		原液	"	20×30
66	2100	10號	100000×0.25cc	(-)
		"	200000× "	(-)
		"	500000× "	(-)
		原液	"	20×25
67	2000	11號	1000×0.25cc	18×17
		"	2000× "	15×15
		"	5000× "	7×8
		原液	"	20×15
68	2400	11號	10000×0.25cc	5×7
		"	20000× "	(-)
		"	50000× "	(-)
		原液	"	10×15
69	2100	11號	10000×0.25cc	10×13
		"	20000× "	(-)
		"	50000× "	(-)
		原液	"	20×25
70	2000	12號	100×0.5cc	(-)
		"	200× "	(-)
		"	500× "	(-)
		原液	"	25×25
71	2300	12號 原液	100×0.5cc 0.25cc	(-) 20×25
72	2250	12號 原液	100×0.5 cc 0.25cc	(-) 25×28

第2表 惹 起 能 力

家兎 番號	體重 (g)	準備注射		惹起注射		Shwartz- man 反應 の大きさ (m.m.)
		物質 番號	注 射 量	物質 番號	注 射 量	
73	2000	5號	1000×0.25cc	10號	1000×1.0cc (prokilo 0.5mg)	15×15
		10號	" "			12×10
		11號	" "			8×9
		原液	" "			20×25
74	1800	5號	1000×0.25cc	10號	1000×0.73cc (prokilo .0.4mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)
75	2300	5號	1000×0.25cc	10號	1000×9.2cc (prokilo 0.4mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)
76	1900	5號	1000×0.25cc	11號	1000×1.9cc (prokilo 1.0mg)	10×15
		10號	" "			10×17
		11號	" "			5×5
		原液	" "			15×15
77	2000	5號	1000×0.25cc	11號	1000×1.6cc (prokilo 0.8mg)	15×20
		10號	" "			20×20
		11號	" "			10×13
		原液	" "			25×25
78	2300	5號	1000×0.25cc	11號	1000×1.2cc (prokilo 0.5mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)
79	2200	5號	1000×0.25cc	11號	1000×1.1cc (prokilo 0.5mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)
80	2500	5號	1000×0.25cc	12號	100×1.25cc (prokilo 5.0mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)
81	2100	5號	1000×0.25cc	12號	100×1.1cc (prokilo 5.0mg)	(-)
		10號	" "			(-)
		11號	" "			(-)
		原液	" "			(-)

致死量の3倍量でも準備能力なく, prokilo 5.0mg でも惹起能力を認めなかつた。

總 括 及 び 考 察

大腸菌 *B. coli communior* 株の菌體より武田等の方法に準じて菌體內毒素なる複合多糖體即ち物質 10 號を分割し, その物理化學的性狀, 毒性及び Shwartzman 反應發現能力を詳細に調べたが, 何れもその性狀 Shwartzman 濾液より分割した複合多糖體即ち物質 5號及び6號と一致していた。但し毒力は濾液より分割した物質より幾分

弱く, Schwartzman 反應は, その準備能力は略同程度であるが, 惹起能力は幾分弱度であつた。

これらの成績から物質 10 號は物質 5 號及び 6 號に相當するものと認められる。

又物質 11 號は pH 2.6 以上の酸性にのみ溶解する物質であるが Biuret 反應陰性, Molisch 反應陽性で, マウスに對し毒性を有し, 又 Schwartzman 反應發現能力を有する點, 全くその性状濾液より分劃した物質 7 號に相當するものと認められるが, 毒力及び Schwartzman 反應發現能力は幾分劣つていた。

又物質 12 號は Biuret 反應陽性, Molisch 反應陰性の物質で水, 生理食鹽水に難溶, アルカリ性に溶解し, 窒素含有量 6.73% の蛋白性物質であるが, 5.0 mg の準備注射によるも又 prokilo 5.0 mg の惹起注射によるも Schwartzman 反應陰性であり, 従つてこれが有効因子とは考えられない。

結 論

1. 大腸菌の菌體より複合多糖體である菌體內毒素を分離精製して, その化學的性状, 毒性, Schwartzman 發現能力等を大腸菌 Schwartzman 濾液より得た活性物質と比較検討したところ, 兩者は全く類似性を有するので, Schwartzman 濾液の有効因子が菌體內毒素に由來することを更に確認した。

2. なお核蛋白は毒性を有するも Schwartzman 發現能力を認めない。

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 獻

- 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) 山下照子: 日本細菌學雜誌 4 (2), 65, 1949.
- 3) 武田, 太田, 佐藤: J. Bioch., 36, 407, 1944