パラチフス B 菌々体内毒素に関する研究

(第 2 報)

栗 塚 一 男

東京大学傳染病研究所第 3 研究部(部長・教授 武田徳晴)

[受付: 11 月 28 日, 1950 年]

私は前報¹⁾に於いて, パラチフス B 菌の菌体内毒素を分離精製し, これを醋酸及びピクリン酸で分解して武田教授の X 物質及び Goebel の PT を得, これ等は化学的に略々同一組成の protein 様物質であるが, X 物質の方が PT よりも収量よく, 毒性も遙に強力であると報告し, 結局酸分解法としては醋酸分解の方が優つている事を指摘した。

さらに私はこの研究を継続するために, 前報で述べた方法と多少異なる順序で新に毒素を分離した処, 偶々その毒性が前毒素に比べて遙に強力であつた。

茲に於いて, 私は両毒素間の毒性の強弱が如何なる因子によつて左右されているかを究明するために, 両毒素の性状を比較するのみならず, これ等を夫々アルカリ分解して, 種々の見地より両者の成績を比較検討したので茲に報告したい。

I. 菌体内毒素の精製

菌体内毒素の分離精製は前報で述べた方法に大体準拠したが, 今回はアルコールによる沈澱の後, アセトンによる分割を行つた。

使用菌株は前報と同様 *S. paratyphi* B 8006 株で, そのマウスに対する最少致死量も腹腔内注射で 0.02 mg であつた。

使用菌体量は濕潤菌として 672 g であつて, これを前報で述べた方法と同様に, 2 l の 0.3% 醋酸水で 2 回振盪抽出し, その濃縮液 200 cc に 95% アルコールを 4 倍量注加して, 一夜氷室に放置後沈澱を遠心分離した。

沈澱は蒸溜水 120 cc に溶解させ, これに純アセトン等を等量注加して, 一夜氷室に放置後少量の沈澱を遠心除去し, その上清にはアセトンの全量が 2 倍量となる迄, さらに純アセトンを追加して一夜氷室に放置後沈澱を遠心分離した。これを精製するために, 再び蒸溜水 100 cc に溶解させ, このアセトンによる分割沈澱をさらに 1 回繰返して, 沈澱はアセトン, エーテルで洗滌後真空乾燥させ, 精製毒素 No. 37 を 2.0 g 得た。

II. 菌体内毒素の性状

本毒素は蒸溜水に可溶の灰白色粉末で, その糖並に蛋

白反應は前毒素 No. 27 の場合と殆んど同様に陽性であつた。

分析値として窒素は 3.32%, 燐は 1.17%, 還元性物質は 52.1% (水解 2 時間後), acetyl 基は 4.30% で, 比旋光度は水溶液に於いて $[\alpha]_D^{20} = +10.6^\circ$ であつた。

なお毒性はマウスに対して前毒素の場合と同様の方法で檢べたが, 0.1 mg の注射量では 3 匹中 2 匹, 0.2 mg では 3 匹中 3 匹共斃死させた。

III. 菌体内毒素のアルカリ分解

菌体内毒素のアルカリ分解に就いては, Goebel 等²⁾が Flexner 属赤痢菌毒素の分解に於いて, 冷時でアルカリ及びアルコールを作用させ, 有毒性の多糖体分割を離脱し得ると報告しているが, 我々の研究室でも河西³⁾が大腸菌毒素で, また武田教授及び花新発⁴⁾が大野赤痢菌毒素で同様に分解を行つてよい成績を得ているので, 私も大体この方法で前報の毒素 No. 27 及び今回の毒素 No. 37 を分解した。

1) 毒素 No. 27 のアルカリ分解

A) アルカリ分解法

原毒素 400 mg を蒸溜水 40 cc に溶解させ, そのコロイド状溶液を氷水中で 0°C . に冷却しつゝ, これに 20% 苛性ソーダ溶液を 2.4 cc 滴加し, 滴加後 5 分以内に予め冷却せる純アルコールを 80 cc 注加して, なお氷水中に 30 分間放冷後白色絮状の沈澱を直に遠心分離した。これを精製するために, 再び蒸溜水 40 cc に溶解させ, アルカリ性アルコールによる分解をさらに 2 回繰返して, 沈澱は蒸溜水 30 cc に溶解させ, 流水で 3 日間, 蒸溜水で 1 日間透析後, 純アルコールを等量注加して, 一夜氷室に放置後沈澱を遠心分離し, 沈澱はアセトン, エーテルで洗滌後真空乾燥させ, 水溶性の分割 No. 34 を 244 mg 得た。これは原毒素の 61.0% に相当する。

分割 No. 34 分離後の上清は合併して, 醋酸で中和後 $35\sim 40^\circ\text{C}$. で約 10 cc に減圧濃縮し, さらに pH 4.0 と

KURIZUKA, Kazuo: Studies on the endotoxin of *S. paratyphi* B (2nd. report) Jap. J. Bact. 6(2) 105—108, 1951.

なるまで醋酸を滴加して灰白色絮状の沈澱を遠心分離した。これを前報で述べたX物質の場合と同様に、弱酸及び弱アルカリによる等電点沈澱を3回繰返して精製し、沈澱はアセトン、エーテルで洗滌後真空乾燥させ、酸不溶性の分割 No. 35 を 40 mg 得た。これは原毒素の 10.0 % に相当する。

分割 No. 3 分離後の上清は等量の精製エーテルで3回抽出を繰返し、エーテル層は水洗、脱水後エーテルを溜去して、エーテル可溶性の分割 No. 36 を 10 mg 得た。これは原毒素の 2.5 % に相当する。(第1表参照)

第1表 アルカリ分解法

B) 各分割の性状

分割 No. 34 は蒸溜水に稍々難溶、弱酸に可溶の帯黄白色粉末で、その蛋白反応は全て陰性であつたが、糖反応は前報で述べた多糖体分割 No. 30 及び No. 33 の場合と同様に陽性であつた。その分析値として窒素は 2.92 %, 磷は 1.26 %, 還元性物質は 45.2 % (水解3時間後), acetyl 基は 4.05 % で、比旋光度は N/10 硫酸溶液に於いて $[\alpha]_D = +10.1^\circ$ であつた。なおその毒性は

マウスに対して 3.0 mg の注射量では 3 匹中 2 匹, 4.0 mg では 3 匹中 3 匹共斃死させた。

分割 No. 35 は弱アルカリに可溶の褐色粉末で、その糖反応は全て陰性であつたが、蛋白反応は前報で述べた protein 様の X 物質及び PT の場合と同様に陽性であつた。その分析値として窒素は 9.25 %, 磷は 0.34 % で、比旋光度は N/10 苛性ソーダ溶液に於いて $[\alpha]_D = -44.2^\circ$ であつた。なおその毒性は物質が少量のためマウスを 2 匹を 1 群として検べたが、10.0 mg の注射量でも 2 匹共全部生存していた。

2) 毒素 No. 37 のアルカリ分解

A) アルカリ分解法

毒素 No. 37 に就いても前述の毒素 No. 27 の場合と全く同様にアルカリ分解を行つた。

即ち原毒素 400 mg より水溶性の分割 No. 38 を 290 mg 酸不溶性の分割 No. 39 を 18 mg 及びエーテル可溶性の分割 No. 40 を 4 mg 得た。これ等は夫々原毒素の 72.5 %, 4.5 % 及び 1.0 % に相当する。

B) 分割の性状

分割 No. 38 は分割 No. 34 同様弱酸に可溶の帯黄白色粉末で、その呈色反応も殆んど同様であつた。その分析値として窒素は 1.28 %, 磷は 1.42 %, 還元性物質は 69.0 % (水解3時間後), acetyl 基は 3.22 % で、比旋光度は N/10 硫酸溶液に於いて $[\alpha]_D = +16.0^\circ$ であつた。なおその毒性はマウスに対して 0.6 mg の注射量では 3 匹中 2 匹, 0.8 mg では 3 匹中 3 匹共斃死させた。

IV. 総括並に考按

私は前報で述べた方法と多少異なる順序で、同株のパラチフス B 菌より新に菌体内毒素 No. 37 を分離精製したが、その毒性は 0.1~0.2 mg であり、前毒素 No. 27 の毒性 0.8 mg に比べて遙に強力であつた。

毒素の分離に当り、今回の実験では始め 4 倍量のアルコールで沈澱させた後、等量及び 2 倍量のアセトンで分割沈澱を行つたが、前報では始めから 2.5 倍及び 4 倍量のアルコールで分割沈澱を行つている。しかしこれ等の分割法が直に両毒素間の毒性に差異を来したものととも考えられず、今のところその原因は明でない。

さて毒素 No. 27 及び No. 37 の化学的性状を比較すると、何れも蒸溜水に可溶で、その糖並に蛋白反応は殆んど同様に陽性であつたが、それ等の分析値として窒素は 4.49 % 及び 3.32 %, 磷は 0.93 % 及び 1.17 %, 還元性物質は 9.6 % 及び 52.1 %, acetyl 基は 3.78 % 及び 4.30 %, 比旋光度は $[\alpha]_D = +7.2^\circ$ 及び $+10.6^\circ$ であり、毒性の強い毒素 No. 37 は他方よりも窒素量少く、

第2表 毒素並に各分割の性状

物 質		毒 素 No. 27	アルカリ分解			毒 素 No. 37	アルカリ分解		
			分 割 No. 34	分 割 No. 35	分 割 No. 36		分 割 No. 38	分 割 No. 39	分 割 No. 40
性 状	量(%)		61.0	10.0	2.5		72.5	4.5	1.0
糖 反 應	Molisch 反應	++	++	—		++	++		
	Indol 反應	++	++	—		++	++		
	Orcin 反應	+	+	—		+	+		
	Phloroglucin 反應	+	+	—		+	+		
	Fehling 反應	—	—	—		—	—		
蛋 白 反 應	Biuret 反應	+	—	++		+	—		
	Ninhydrin 反應	+	—	+		+	—		
	坂口反應	+	—	+		+	—		
	Diazo 反應	+	—	+		+	—		
	Millon 反應	+	—	+		+	—		
	α -Nitroso- β -naphthol 反應	+	—	+		+	—		
分 析 値	Hopkins-Cole 反應	—	—	—		—	—		
	窒 素(%)	4.49	2.92	9.25		3.32	1.28		
	磷 (%)	0.93	1.26	0.34		1.17	1.42		
	還元性物質(%)	38.6	45.2			52.1	69.0		
	Acetyl 基 (%)	3.78	4.05			4.30	3.22		
最 少 致 死 量(mg)	比旋光度 $[\alpha]_D$	+7.2	+10.4	-14.2		+10.6	+16.0		
		0.8	0.0~4.0	>10.0		0.1~0.2	0.6~0.8		

磷, 還元性物質及び acetyl 基量が多い結果となつている。

なおこの成績と比較して興味ある事は, さきに武田教授等⁷⁾が毒素を氷醋酸で精製する際, 窒素の含有量は減少するが, 毒性は反つて増強すると報告している事であり, この関係の究明は目下同教授等が行いつゝある。

次に両毒素のアルカリ分解による成績を比較すると, 有毒性の分割 No. 31 及び No. 38 は何れも弱酸に可溶, 糖反應陽性, 蛋白反應陰性, それ等の分析値として窒素は 2.92% 及び 1.28%, 磷は 1.26% 及び 1.42%, 還元性物質は 45.2% 及び 69.0%, acetyl 基は 4.05% 及び 3.22%, 比旋光度は $[\alpha]_D = +10.4$ 及び $+16.0$ であり, これ等も原毒素の場合と同様に, 毒性の強い分割 No. 38 は他方よりも窒素量少く, 磷及び還元性物質量の多い事がわかる。しかし acetyl 基量は反つて稍々減少しているが, この事実のみからみても, acetyl 基自身が毒性を支配する因子でない事は略々明瞭である。また毒素のアルカリ処理に際して, acetyl 基が全部離脱していない事から, acetyl 基のある部分が多糖体の成分

として相当強固な結合状態にあるものと窺われる。

なおこれ等の分割と前報で述べた多糖体分割 No. 30 及び No. 33 を比較するに, 何れも呈色反應は略々同様であり, その分析値は多少相異なるが, 分割 No. 34 及び No. 33 が多糖体と毒性物質の結合体であると考えれば, 酸並にアルカリ分解の成績を綜合して, これ等は恐らく化学的には同一組成に基く多糖体であろうと考えられる。

また分割 No. 34 及び No. 38 の毒性に就いてみれば, 毒性の強い毒素 No. 37 より毒性の強い分割 No. 38 が得られているが, 何れも原毒素の約 $1/4 \sim 1/5$ に減弱している。これを前報の醋酸分解に於いて得られた X 物質の毒性が原毒素より僅に減弱している程度であつたのに比べれば, アルカリ分解に於いては毒素の毒性因子に及ぼす影響が相当大きい事がわかる。

酸不溶性の分割 No. 35 と前報で述べた protein 様分割の X 物質及び PT を比較するに, 前述の多糖体分割に於ける関係と同様に考えれば, これ等も恐らく化学的には同一組成に基く protein であろうと考えられる。

なお分割 No. 39 に就いては資料が少量しか得られなかつたので、化学的検索を行う事が出来なかつたが、これも同種の protein である事は疑い余地がない。

またエーテル可溶性の分割 No. 36 及び No. 40 に就いても資料が少量しか得られなかつたので 前報の lipid 分割 No. 29 及び No. 32 と共に化学的検索は今後の研究に譲りたいが、これ等も恐らく化学的には同一組成に基づくエーテル可溶性の lipid であろうと考えられる。

毒素 No. 27 及び No. 37 のアルカリ分解による各分割の収量を比較すると、有毒性の多糖体分割は 61.0% 及び 72.5%, 無毒性の protein 分割は 10.0% 及び 4.5%, lipid 分割は 2.5% 及び 1.0% であり、毒性の強い毒素 No. 37 に於いては他方よりも有毒性の多糖体分割が稍多く、protein 及び lipid は約 $\frac{1}{2}$ 以下である事がわかる。

一方毒素のアルカリ分解に関する報告をみるに、Goebel 等²⁾は赤痢菌より毒性 0.25 mg の毒素を得、その分解により毒性 0.5 mg の多糖体分割 60%, protein 21% 及び lipid 5% を得ているが、私の成績より protein 及び lipid の収量が 2~4 倍となつており、アルカリ処理による毒性の減弱が少い。河西³⁾は大腸菌より毒性 0.5 mg の毒素を得、その分解により毒性 1.0 mg の多糖体分割 52.6%, protein 14.4% 及び lipid 2.0% を得ているが、私の成績より多糖体分割の収量は稍々少いが、protein の収量多く、毒性の減弱も少い。また武田教授及び花新発⁴⁾は大野赤痢菌より毒性 0.2 mg の毒素を得、その分解により毒性 1.0 mg の多糖体分割 58.4%, protein 2.0% 及び lipid 0.5% を得ているが私の成績より protein 及び lipid の収量が少い。

茲に於いて以上の成績並に前報の成績を総合すると、パラチフス B 菌の菌体内毒素の化学的構成は無毒性の多糖体、protein 及び lipid の外に、毒性を支配する物質からなる結合体である事は略々明であるが、この有毒性物質が化学的に如何なる物質であるかは、未だ遊離状態で分離する事が出来ないのので、その本態の究明は今後の

研究に俟たねばならない。しかしこの物質が毒素の分解法如何によつて、或る場合は protein と、或る場合は多糖体と結合せる状態で分離されるという事は甚興味ある事実である。

V. 結 論

1) パラチフス B 菌の菌体内毒素を前報で述べた方法と多少異なる順序で分離精製したが、前毒素よりも毒性が遙に強力で、窒素量少く、磷及び還元性物質量が多かつた。

2) 両毒素のアルカリ分解に於いて、両者共有毒性の多糖体が得られた外に、無毒性の protein 及び lipid が分離された。この際毒性の強い毒素から毒性の強い多糖体が得られ、それは窒素量少く、磷及び還元性物質量が多かつた。なおアルカリ分解は、毒素の有毒性物質に及ぼす影響が前報の酸分解の場合よりも強く滅毒的に作用していた。

3) パラチフス B 菌の菌体内毒素の化学的構成は未知の有毒性物質の外に、多糖体、protein 及び lipid からなり、就中多糖体が主成分となつていた。また acetyl 基がこの結合体に存在するが、毒性に及ぼす影響は認められず、そのある部分は acetyl 多糖体として相当強い結合状態にあつて、酸及びアルカリ分解では容易に離脱し難いものであろう。

拙筆に臨み御懇篤な御指導並に御校閲を賜つた武田教授に深く感謝する。なお本研究は文部省科学研究費の補助を得たので茲に謝意を表する。

(本報は前報と共に昭和 25 年 11 月 30 日東京大学傳染病研究所集談会に於いて発表した)。

文 献

- 1) 栗塚：日本細菌学雑誌 6, 89 (1951)
- 2) Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E.: J. exp. Med. 81, 315 and 331 (1945)
- 3) 河西：日本細菌学雑誌 5, 385 及 437 (1950)
- 4) 武田, 花新発：日本細菌学雑誌 5, 449 (1950)
- 5) 武田, 太田：Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 262, 171 (1939)