Difference on the Polarogram of the Metabolic Materials from Pathogenic and Non-pathogenic Dysentery Bacillus.

Koichi Matsushima

Shizuoka Public Health Department.

I. ま え が き

1898年志賀の *Shigellae shigae* 発見以来細菌学、疫学、或いは毒素、抗毒素検索について多くの学者の優れた業績が多数報告されて居る。然し、その後続々発見された *Sh. flexneri*, *sonnei* 菌等の毒素は勿論血清学的型 (sero-type) の生化学的検索¹⁾、及び患者より検出の病原性菌代謝物質即ち毒素と保菌者より検出の非病原性菌代謝物質の相違に就ての研究業績は少ないと考えられる。「*Sh. flexneri* の毒素は少なくとも多糖類の毒性と特異性を有しており、O antigen の毒性と抗原性をおそらくもっている結合蛋白質にはトリプシン耐性のものがある。」²⁾と云われているが、これとても非病原性菌の代謝物質との比較研究は見当らない。筆者は真正赤痢患者及び保菌者より検出の *Sh. flexneri* 1b, 2a, 3a, 4a の培養濾液より蛋白質、及び〔脱ステアリン酸磷脂質＋多糖類〕の分画結晶を生成せしめ、これにつきポーラログラフで半波電位を求め、病原性、非病原性並びに血清学的型の成分の相違に就て知見を得たので記すことにする。

II. 実験方法ならびに材料

1) 実験方法

真正赤痢患者及び保菌者より検出の菌培養濾液及び硫酸分画³⁾により析出せしめた結晶の組成をペーパークロマトグラフ⁴⁾や光電比色計で検索し、結晶の毒性を動物で実験し、これら真正患者菌の病原性毒素並に保菌者菌の非病原性代謝物質の半波電位をポーラログラフで求め相違を認めることを実験目的とした。

病原性、非病原性赤痢菌代謝物質 のポーラログラムの相違性

松 島 耕 一

静岡県衛生部

2. 実験材料

Sh. flexneri 菌はいずれも普通ブイヨン液体培地即ち

肉汁 (牛肉 500 瓦を水 1 立で
煮沸滲出濾過した液) 1 立
ペプトン 10 瓦
食 塩 5 瓦
寒天 (精製) 1.5 瓦

pH=7.0~7.2

に 10 日間 37°C で培養する。菌体内毒素でも菌体外毒素でもオールド・カルチャーを行えば毒素は培養濾液中に析出する。培養濾液に約 1/2 容の 99.5%のエタノールを添加し、80~100°C に加熱し、55%に飽和硫酸を添加せしめる。更に加熱すれば溶液は向流分配により黄色の下層と橙色の上層に分離する。上下両層を分取し、濾過する。下層を加熱し、エタノール分を放冷する。真正患者菌の培養濾液からは (a) 扁平六角形結晶、(b) 柱状六面体、(c) 柱状四面体、(d) 柱状円錐型及び (e) 扁平四角形結晶の析出がみられる。保菌者菌の培養濾液では各結晶が析出しても、扁平六角形結晶は真正患者菌の場合の数十分の一の量に過ぎない。上層を加熱し、エタノール分を放冷するに、保菌者の菌培養濾液からは殆んど析出物質が認められないが、真正患者の菌培養濾液では放冷前にも極めて粘性があり、放冷によつて (f) 正方形六面体の結晶が析出する。結晶 (a) は酵素レンチナーゼ A がレンチンを分解して生成するモノ・アチール・グリセリール・ホスファタイディルコリンに鉄、ニッケル、エヌ・アセチール・ディー・グルコースミン及び 2-アミノ-グルコース (4a の場合は

マンノ・サッカリク酸)より成る結晶である事がペーパークロマトグラフで証明できる。

結晶 (b)(c)(d)(e) は卵黄燐脂質の分解, Dorfman 及び Ott のヒアルロニダーゼの活性度測定法⁹⁾, 過酸化水素水の分解発泡等で酵素レシチナーゼ A, ヒアルロニダーゼ, 及びパーオキシダーゼなる事が証明される。結晶 (f) はペーパークロマトグラフで 2・4-ダイ・ニトロフェニール・パプチドなる事が証明せられる。

III. 動物実験

真正患者菌培養濾液より析出した結晶(a)(b)(c)(d)(e)の0.1gを2.5ccの水溶液とし、その0.5cc(結晶として20mg)宛を約16gのハツカネズミに金属ゾンデーで経口投与するに暫時にして運動停止、呼吸困難、腸の蠕動の症状を呈し全部致死し、毒性を示すが、保菌者菌の培養濾液より析出した結晶では同様な実験で何等の症状をも呈しない。結晶(f)の水溶液をモルモットに皮下注射すれば発赤を呈し、その毒性が証明される。

IV. ポーラログラフ実験

真正患者菌培養濾液よりの結晶 a を島津製作所製 RP-I 型自記方式のポーラログラフを使用し、支持塩として、0.1N-NH₄Cl+純エタノール(1:4)を、極大抑制剤として、0.01%ゼラチン溶液を採用し、除酸素の上 Span volt. 2V. (vs. S.C.E.), Initial volt. Ov, Full scale 20μA, Damping 3 でポーラログラムをとれば半波電位 $E_{1/2} = -1.12 \pm 0.02$ を示す。保菌者菌培養濾液よりの結晶 a では同条件で、ポーラログラムをとるに、半波電位 $E_{1/2} = -1.28 \pm 0.02$ を示す。

モノアセチル・グリセリール・ホスファティ

ディルコリンが生成する場合、分子内転位¹⁰⁾が起り得る。

α, β 型ともに双極子能率を有し、共鳴混成体をなす。即ち真正患者菌培養濾液よりの結晶 a は β 型で溶血性を有し、β トキシンであり、結晶 b, c, d, e は酵素で、特に b は α トキシンである。

保菌者菌培養濾液よりの結晶 a は α 型で溶血性がない。結晶 f は γ トキシンに相当す。結晶 a を (1) 0.1M-Na₃PO₄(PH=10.0), (2) 0.1N-LiCl(pH=2.6) を支持塩として, Span volt. 2V. (vs. S.C.E.), Initial volt. 0, Full scale 10μA, Damping 3 でポーラログラムをとれば半波電位

(1) $E_{1/2} = -0.98$ 及び -1.44 の二段波,

(2) $E_{1/2} = -0.96$ を得、(1) は D-マンノイク酸即ち $[\text{HO}_2\text{C}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}(\text{---}++)]$ でセロタイプ-4 a の場合に示し、(2) は D-グルコサミン即ち $[\text{CHO}\cdot\text{CHNH}_2(\text{CHOH})_3\cdot\text{CH}_2\text{OH}(\text{---}++)]$ でセロタイプ-1 b, 2 a, 3 a の場合に示される。

更に結晶 a を (1) 0.1N-N(CH₃)₄Cl, (2) 0.1N-NH₃+0.1N-NH₄Cl を支持塩として、ポーラログラム¹¹⁾をとれば半波電位

(1) $E_{1/2} = -0.90$ (2) $E_{1/2} = -1.02$ を得、鉄イオン (Fe³⁺) 及びニッケルイオン (Ni²⁺) を示す。結晶 f を 8%エタノールを支持塩として、ポーラログラムをれば半波電位

$E_{1/2} = -1.02 \pm 0.02$ を得、即ち 2・4-ダイニトロフェニール・パプチドを示す。

V. あとがき

筆者は赤痢菌の他、ジフテリア菌、チブス菌、大腸菌、サルモネラ菌、クロフカ菌、ボットリムス菌、枯草菌、葡萄球菌、連鎖球菌等の病原

性毒素及び食中毒の検索，中毒患者の血液，胃液の生化学的研究にポーログラフをペーパークロマトグラフ，光電比色計，光電光度計，電位差滴定法等と併用し，病原性代謝物質は非病原性のものとはその電位に相違があり，食中毒の中毒期間の血液でも正常時，快復後の血液とはその血清中に毒素の場合と同様に化学分子式は同一なるに，電位の異なつた共鳴混成体物質が存在する事を知り得た。更に赤痢菌では各菌の血清学的に特異性を附与する多糖類に相違があり，セロタイプの分類の差異がうかがわれる。細菌学でモルホロギイ，セロロギイ及び糖の分解だけでは解決難解で，生化学の分野が，ミクロバイオロジイとして取入れられている現今，他の機器と共にポーログラフの導入は他に見られない特徴のある事が感ぜられる。

文 献

- 1) William Burrows, Ph.D. Textbook of Microbiology, 16, 495, 1959.
- 2) Martin Burger, Bacterial Polysaccharide, 1, 159, 1950.
- 3) Ernest F. Gale, The Chemical Activities of Bacteria, 3, 65, 1952.
- 4) Edgar Lederer & Michael Lederer, Chromatography, 1957.
- 5) 赤堀，水島：酵素研究法 II.
- 6) Verkade (1940), Fulton(1943), Dolman(1943), Surgalle & Hite (1945)., The Journal of the Bacteriology, etc.
- 7) I.M. Kolthoff and James J. Lingane, Polarography. Vol. 1~2.

(1960 年 4 月 20 日受理)

Summary

From 1898, *Shigellae shigae* was discovered by Shiga, there are many excellent data, which are best reference on the bacteriology, epidemiology, toxicology. But we know a few data that are on the reference of biochemistry, serology, and difference of the metabolic materials from pathogenic and non-pathogenic dysentery bacillus. I have studied on these points by polarography, and the results are as follows:

1. The methods of exercise and thier materials.

1) By countercurrent of ethanol and water with saturated ammonium sulfate, produced crystals from the liquid medium of old cultured bacillus, detected from patients and germ-carriers. Paperchromatographed, measured by use of spectrophotometer and tested by use of experimental animals. Thus, we can observe the difference between the metabolic materials from pathogenic and those from non-pathogenic dysentery bacillus by the half wave potential of their polarogram.

2) *Sh. flexneri* bacillus was cultured in the suitable liquid medium for 10 days at 37°C. Then, the filtrate of the cultured medium is added 1/2 vol. of 99.5% ethanol, heated at 80°C and added ammonium sulfate at 55% and saturated. After further heating, extracted liquid is separated into two phase, upper being yellow and lower being orange. Flat six-angle crystals, six-surface columnar, four-surface columnar, conic columnar and octahedron crystals are produced from the lower phase.

3) Polarogram.

$E_{1/2}$ of flat six-surface columnar from cultured medium of pathogenic bacillus in the supporting electrolyte of 0.1 N-NH₄Cl+ethanol abs. (1:4) is $-1.12 \pm 0.02v.$ and $E_{1/2}$ of flat six-surface columnar from cultured medium of non-pathogenic bacillus is $-1.28 \pm 0.02v.$

The former is β -monoacylglycerolphosphatidylcholin and the latter is α -monoacylglycerolphosphatidylcholin.

Using 0.1M-Na₃PO₄ (pH=10.0) and 0.1N-LiCl (pH=2.6) as electrolyte, $E_{1/2}$ of the flat six-surface columnar from pathogenic bacillus 4a is $-0.98v.$ and $-1.44v.$, and $E_{1/2}$ of the 1b is $-0.96v.$ The former is D-mannonic acid and the latter is D-glucosamine.

Using 0.1N-N(CH₃)₄Cl and 0.1N-NH₃+0.1N-NH₄Cl as electrolyte, $E_{1/2}$ of the flat six-surface columnar from pathogenic bacillus is $-0.90v.$ and $-1.02v.$ The former is Fe³⁺ and the latter is Ni²⁺.

Using 8% ethanol as electrolyte, $E_{1/2}$ of the octahedron crystals from cultured medium of pathogenictive bacillus is $-1.02 \pm 0.02v.$ This is 2·4-dinitrophenyl-peptide. Thus we can identify the metabolic materials of pathogenic from those of non-pathogenic dysentery bacillus by the polarographic method. This method may be able to use for test on other toxins of bacteria and toxins from food poisoning.