ド、大腸菌培養濾液を *M/20-phosphate buffer*, pH 8.0, 250 V で 2.5 hr 濾紙イオン泳動法にかけて得た *pherogram* をしらべるとすべて原点に B. P. B. 呈色部があり、陰極側に青白色の螢光発現部分が1ヶ所あつてこの部分の生理食塩水溶出液はいずれも家兎体温を上昇させるが、なおその他にニンヒドリン呈色部分も家兎体温を上昇させる。

小林、浦口の蛋白説、八田、青山の螢光説は各々蛋白部分及び螢光発現部分の *pyrogen* を分離したのであつて、それぞれ当を得たものとするが、家兎体温を上昇させる物質はそればかりではなく、更にもつと広汎なものであろう。ただここで興味ある発見の一つは八田、青山のいう螢光発現部分にニンヒドリン呈色部がかさなつており、且つそれは1ヶの時と2ヶの場合とがあり、又紫紅色の時と青白色に呈色する場合とのあることである。

本研究に際し御鞭撻を賜つた当研究所長桑田 智博士に謹謝し、試料を提供された阪大微研森永 茂博士に厚く御礼申し上げる。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Isolation of several kinds of bacterial *pyrogen* was attempted by paper ionophoresis. *Pyrogenic* substances were found in portions coloring with bromophenol blue and ninhydrin, and in a fluorescent portion.

(Received June 20, 1953)

246. 小林忠之, 新谷 茂, 木村正章: 諸種薬物の家兎体温に及ぼす影響 (第7報) 発熱性物質の分離 その2*

Tadayuki Kobayashi, Shigeru Shintani, and Masaaki Kimura: Effects of Various Medicines on Rabbit Temperature. VII.
Separation of *Pyrogen*. (2).

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

著者等は前報で paper ionophoresis により数種の細菌性 *pyrogen* の分離を行つたことを述べたが、引続き同様の方法で注射用ブドウ糖末あるいはその溶液中に存在しているか否かを確める為、ブドウ糖液で培養可能な微生物のうち、比較的熱に強い *pyrogen* を産生する数種のもを合成培地に純粋培養し、この培養濾液を種々の方法で抽出濃縮した後 paper ionophoresis によつて発熱部分を分離した。

I. 実験方法 前報と同様 paper ionophoresis には東洋濾紙 No. 131 の 5×40 cm を用い、新たに調製した *M/20-phosphate-buffer*, pH 8.0 で 250 V, 2.5 hr 泳動後 ninhydrin (以下 nin と略す), bromophenol blue (以下 B.P. B. と略す), 螢光の発色部分及び不発色部分を 5 cm 以内に切断し, *pyrogen-free* 生理食塩水 10 cc で溶出して日本薬局方記載の方法で発熱試験を施行した。なお aniline hydrogen phthalate 及びレゾルシン塩酸による糖類の検出を行つたが、いずれの試料も反応陰性であつた。

Saccharomyces cerevisiae (S 7), *Bacillus subtilis* (Bs 24), *Proteus vulgaris* (Eb 51), *Sarcina ventriculi* Goodsir (Mi 55), *Micrococcus subflavus* Cohn (Mi 3), *Cladosporium herbarum* Link (Dm 11), *Fusarium roseum* (Fu 12), *Penicillium chrysogenum* (P 73) のうち細菌は pH 7.5, 37° で、酵母、黴は pH 5.5, 24° で合成培地に 10 日間それぞれ純粋培養し、15 lb, 15 min 滅菌後濾紙で濾過する。その濾液は家兎に 5 cc/kg 投与で発熱陽性であつたが、対照培地は発熱陰性であつた。この培養濾液をそれぞれエーテル処理、透析処理後 paper ionophoresis にかへ、各呈色試薬による発色部分の発熱度を検べた。

II. 実験成績

1. 螢光性 20%ブドウ糖注射液

1) 水道水: 透析に水道水を用いるので予めその発熱性を検べたところ家

* 日本薬学会近畿支部例会 (1953 年 5 月 16 日) 講演。

兎に 10 cc/kg 投与で 1.5° , 5 cc/kg で 1.0° , 2 cc/kg では 0.9° の最高体温上昇を認めたが, 100° , 2 hr 煮沸したものは 10, 5, 2 cc/kg 投与で発熱陰性であつた. 一方水道水 1 L の減圧濃縮物の paper ionophoresis による pherogram は Table I のように陰極側に nin 呈色部 1 ケ所, 陰極, 陽極側に各々 1 ケ所の螢光発現部があり, B. P. B., aniline phthalate 反応は陰性であつたが, 各部分の発熱試験の結果発熱もまた陰性であつた. 2) エーテル抽出部: 20%ブドウ糖注射液 (27 年 12 月~28 年 1 月の製品) は螢光性強く, 家兎に 10 cc/kg 投与で発熱陰性 (0.1 , 0.4 , 0.3°) であつたが, この 400 cc を 200 cc のエーテルで 3 回 (合計 600 cc) 抽出後エーテルを留去した残留物は黄色針状晶又は樹脂状で水には殆んど溶けず, エーテル, メタノールによく溶ける. これを 0.5 cc の Pyrogen-free 蒸留水に溶解し, 可溶部を paper ionophoresis にかけたところ nin 呈色 3 ケ所, そのうち陰極側の淡青色呈色部には螢光が発現した. Pyrogen test の結果各部分いずれも発熱陰性であつた. 3) 糖液部: 次いでこのエーテルで抽出後の糖溶液 400 cc を約 1/3 に減圧濃縮し 3 日間透析後内液を更に減圧で蒸発乾固し, Pyrogen-free 蒸留水 0.5 cc に溶解して paper ionophoresis にかける nin 呈色部 2 ケ所を得た. この部分は夫々発熱陽性であつたが, 他の部分は発熱陰性で, 螢光性, B. P. B. 反応は陰性であつた. 即ち螢光部はエーテルに易溶性であるが, この螢光物質は発熱陰性である. 4) 総糖液部: 次にこの螢光性 20%ブドウ糖注射液 400 cc を減圧濃縮し 3 日間透析後内液を再び減圧で蒸発乾固し, Pyrogen-free 蒸留水 0.5 cc に溶解して paper ionophoresis にかけたところ, 螢光発現部分が 2 ケ所あり, 陰極側のものは nin で紫紅色に呈色し, 原点は B. P. B. により青色に呈色した. そしてこれらの部分に発熱を認めたが, 他の部分は発熱陰性であつた.

2. 発熱性ブドウ糖末 注射用ブドウ糖末を Pyrogen-free 蒸留水に 20%に溶解して Pyrogen test の結果発熱陰性 (0.2 , -0.4 , 0.3°) であつたが, この糖末は 1952 年 9 月 9 日出品 590 kg の中のもので前回発熱試験第 1 回 (0.5 , 0.8 , 0.3°), 第 2 回 (0.2 , 0.6 , 0.6 , 0 , 1.0°) の家兎体温上昇で不適品であつた. この糖末を Pyrogen-free 蒸留水で 5%に溶解し pH 5.5 で 24° および pH 7.5 で 37° に夫々 1 ケ月間放置したところ pH 5.5, 24° 培養の方に緑色ないし白色の糸状菌 1 種が繁殖した. 夫々の発熱度は家兎に 10 cc/kg 投与で pH 5.5 の方は 0.4 , 0.4 , 1.3° , pH 7.5 の方は 0.4 , -0.4 , 0.5° で発熱陰性であつた. この培養液 200 cc を減圧濃縮後 3 日間透析し内液を減圧濃縮して paper ionophoresis にかけたところ B. P. B., ninhydrin, aniline phthalate による呈色像及び螢光性は次の如くであつた. 1) pH 7.5, 37° の培養液: pH 7.5, 37° で 1 ケ月培養したものは螢光, B. P. B., aniline phthalate による反応陰性で, nin により 2 ケ所淡紫紅色に呈色し, この部分は発熱陽性であつた. 2) pH 5.5, 24° の培養液: pH 5.5, 24° で 1 ケ月培養したものは螢光, B. P. B., aniline phthalate による反応は同様に陰性, nin により原点は紫紅色に呈色し, この部分は発熱陽性であつた.

3. *Penicillium chrysogenum* (P 73) P 73 を合成培地 (pH 5.5) に 24° , 10 日間培養し, 15 lb, 15 min 減菌した液 200 cc を減圧下に濃縮し, 3 倍量のエーテル (150 cc) で抽出し, エーテルを留去した残留物を蒸留水 0.3 cc に溶解し paper ionophoresis にかけたところ螢光及び nin 反応は Table I のように発色し, Pyrogen test の結果各部分いずれも発熱陰性であつた.

4. *Saccharomyces cerevisiae* (S 7) S 7 の培養液 200 cc を等量のエーテルで抽出し, エーテルの蒸留残留物を蒸留水 0.3 cc に溶解し paper ionophoresis にかけたところ螢光発現部分及び nin 呈色部分に発熱を認めた.

5. *Bacillus subtilis* (Bs 24) Bs 24 の培養液 200 cc を等量のエーテルで抽出し, S 7 の如く操作して得た pherogram は Table I のようで, 陽極側にある nin 反応陽性部分に弱い発熱を認めた. Pyrogen のエーテル抽出においては原点にあるべき蛋白部分がなく, 螢光は非常に強い.

6. *Fusarium roseum* (Fu 12) Fu 12 の培養液 200 cc を減圧下に濃縮し, 3 日間透析後内液を再び減圧下に乾固し, 蒸留水 0.5 cc に溶解して paper ionophoresis にかける, 各部分の Pyrogen test の結果原点の蛋白部分及び陰極側の青白色螢光発現部分に発熱を認め他は発熱陰性であつた.

7. *Proteus vulgaris* (Eb 51) Eb 51 の培養液を減圧下に濃縮し, 透析処理後 paper ionophoresis にかける Table I の pherogram を得たが, 各部分の Pyrogen test の結果原点の蛋白部分及び螢光発現部分, nin 反応陽性部分に発熱を認めた.

8. *Sarcina ventriculi* Goodsir (Mi 55) Mi 55 の培養液を透析処理後 paper ionophoresis にかける各部分の Pyrogen test の結果原点に発熱を認め, 螢光発現部分は発熱陰性であつた.

9. *Micrococcus subflavus* Cohn (Mi 3) Mi 3 の培養液を透析処理後 paper ionophoresis にかける, 各部分の Pyrogen test の結果 B. P. B., 螢光, nin 反応陽性部分に発熱を認めた.

10. *Cladosporium herbarum* Link (Dm 11) Dm 11 の培養液を透析処理後 paper ionophoresis にかける, 各部分の Pyrogen test の結果螢光, B. P. B. 反応陽性部分及び nin 反応陽性部分に発熱を認めた.

IV. 総括及び考察 P 73, S 7, Bs 24, Fu 12, Eb 51, Mi 55, Mi 3, Dm 11 等の酵母, 黴, 細菌はブドウ糖液中で生長し易いが, これらを夫々合成培地に純粋培養し, 培養液を透析処理後 M/20-phosphate buffer pH 8.0 で 250 V, 2.5 hr paper ionophoresis にかけて得た pherogram には原点に B. P. B. 呈色部分があり, 陰極側, 時に陽極側にも青白色の螢光発現部分があつて, この部分の生理食塩水溶出液は家兎体温を上昇さ

Table I Paper ionophoresis による Pherogram

		原 臭											
水通水	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度 (°C)	0.7	0.3	-0.2	0.3	0.2	-0.1	0.1	0.4	0.7			
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.5	0.5	0	0.3	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5	0.4	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	0.4	-0.3	0.1	1.0	1.1	0.5	0.3	0.5	0.5	0.3	
I-テル部	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.5	0.5	0	0.3	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5	0.4	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	0.4	-0.3	0.1	1.0	1.1	0.5	0.3	0.5	0.5	0.3	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	0.2		2.0	1.8	1.1	0.2	0.2				
糖液部	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.8	0.7	1.1	1.1	0.2	0.2	0.9	0.9				
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.1	0.5	0.4	0.8	0.9	1.1	0.3	-0.2	-0.1	0.5	0.5	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.4	0.5	0.2	0.3	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2		
pH 7.5	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	0.8	1.4	1.0	0.8	0.8	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.4	0.4	0.4	0.4	2.3	-0.3	0.2	0.6	-0.1	1.4		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	-0.5	0.1	4.3	0.8	0.5	0.1	0.5	0.4	0.5		
37°C	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	-0.2	0.2	0.9	1.6	1.8	2.1	0.7	0.1			
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	0.5	0.5	1.5	0.8	0.5	-0.3					
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	1.3	0.9	0.6	1.4	0.3	0.9					
pH 5.5	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		
糖末	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.4	0.5	0.2	0.3	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	0.8	1.4	1.0	0.8	0.8	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.1	0.5	0.4	0.8	0.9	1.1	0.3	-0.2	-0.1	0.5	0.5	
pH 7.5	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.8	0.7	1.1	1.1	0.2	0.2	0.9	0.9				
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.1	0.5	0.4	0.8	0.9	1.1	0.3	-0.2	-0.1	0.5	0.5	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.4	0.5	0.2	0.3	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2		
pH 37°C	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	0.8	1.4	1.0	0.8	0.8	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.4	0.4	0.4	0.4	2.3	-0.3	0.2	0.6	-0.1	1.4		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.5	-0.5	0.1	4.3	0.8	0.5	0.1	0.5	0.4	0.5		
pH 5.5	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	-0.2	0.2	0.9	1.6	1.8	2.1	0.7	0.1			
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	0.5	0.5	1.5	0.8	0.5	-0.3					
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.3	1.3	0.9	0.6	1.4	0.3	0.9					
糖末	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		
	Nin.												
	BPB (陰性)												
	Flu.												
	発熱度	0.2	0.4	0.3	0.8	1.4	0.8	0.2	-0.1	0.4	0.5		

Flu.: Fluorescence.

■ 紫紅色, ■ 青紫色, ■ 青白色, ■ 褐色.

Flu.: Fluorescence. ■ 紫紅色. ■ 青紫色. ■ 青白色. ■ 褐色.

せるが、なおその他に nin 呈色部分も家兎体温を上昇させる。培養液から Pyrogen を抽出する時、透析法によると蛍光及び蛋白部分が見出されるが、エーテルによる抽出法では蛍光発現部分は強く出現するが、蛋白部分からは抽出されない。

本研究に際し御鞭撻を賜った研究所長桑田 智博士に謹謝し、菌種を戴いた醗酵研究所 長谷川、藤井氏、糖末を分与された市川氏に厚く御礼申し上げる。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Several kinds of microorganisms which are liable to be occluded in glucose solution were cultured in synthetic medium. Filtrate of such a culture medium was extracted and condensed by various methods and pyrogenic portion was isolated by paper ionophoresis. It was found that the substances which act as pyrogen varied by the method of extraction, sometimes the substance being a protein, at others, non-protein fluorescent substance, or substances giving positive ninhydrin reaction.

(Received June 20, 1953)