原液の約 1/2 程度となった。

東京工業大学水口研究室

Summary

Effect of the removal of pyrogen through quinone treatment and its reaction course were studied by polarography and this result was used in elucidating the mechanism of pyrogen removal by this means.

1) Pyrogen culture filtrate, even in a dilute solution, was found to possess extremely great action of inhibiting maximum oxygen wave and the limit of detection was 1 γ /cc. as converted to the concentration of casein.

2) Pyrogen was separated into P_a and P_β (cf. next paper) by electrophoresis and maximum oxygen wave of each was measured. Both were found to show inhibitive action.

3) The solution obtained by the treatment of pyrogen culture filtrate or pyrogenic glucose parenteral solution with quinone, giving negative tetrabromophenolphthalein (TBP) reaction, is entirely devoid of suppression of maximum wave and did not indicate the presence of pyrogen by polarography. Polarographic examinations were made with sodium citrate and pyrogenic substances giving positive TBP reaction, such as egg albumin, casein, peptone, nucleic acid, brucine, and 8-hydroxyquinoline. They all gave similar results.

4) The foregoing samples were treated with quinone and the activated carbon thereby obtained was digested with redistilled water, affording solution giving positive TBP reaction and again showing suppression of maximum wave.

(Received May 17, 1955)

271. 鈴木周一：無発熱性医薬品の製造に関する研究（第6報） Pyrogen 並びにそのキノン処理の電気泳動的検討

Shuichi Suzuki: Studies on the Preparation of Non-pyrogenic Drugs for Injection. VI. Paper Electrophoretic Investigations on Pyrogen and the Quinone Treatment.

(Mizuguchi Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

第4報¹⁾でキノン処理による pyrogen の除去機構について推定を下し、広義の発熱性物質及び TBP 反応陽性物質のキノン処理における挙動が pyrogen と軌を一にするものであることを述べた。

本報においては、pyrogen 含有培養液、市販不適の発熱性葡萄糖液について、ワグネル電気泳動法²⁾を応用し、pyrogen の本態及びキノン処理を受けた pyrogen の挙動について検討した、又キノン処理による pyrogen 除去の過程についても考察した。その結果、pyrogen には電気的にはほぼ中性の P_a と陽荷電性の P_β との2種が

1) 鈴木：本誌 75, 420(1955).

2) A. Tiselius, P. Flodin: "Advances in Protein Chemistry", Vol. VIII. 466(1953); H. J. McDonald: Science, 112, 227(1950); H. L. Durrum: J. Am. Chem. Soc. 72, 2943(1950).

あること、 P_a は活性炭その他の吸着剤で吸着されるが、 P_b は除去され難いこと、更にキノン処理によつて pyrogen の性質が変化され、活性炭によつて除去され易くなること等が明らかにされた。

研究結果の概要を次に記す。

1) 電気泳動による pyrogen の分別認定： pyrogen 含有培養液を汚紙電気泳動に附した後、TBP で発色させた結果、Fig. 1. a に示すように原液中の pyrogen は原点附近に止る部分 (P_a) と陰極側に移動する部分 (P_b) との2種のものに分別せられた。

2) 各種吸着剤による P_a , P_b の吸着について： pyrogen が各種吸着剤によつて完全には除去され難いことは既に第1報³⁾ において報告したが、今回は P_a , P_b に着目してこれらと各種吸着剤として活性炭、活性白土、陰及び陽イオン交換樹脂等による処理の関係を電気泳動法により追求したところ、pyrogen 含有培養液並びに市販不適の発熱性葡萄糖液中の P_a は殆んど除去されるが、 P_b はいずれの場合でも残存することが証明され、従来から知られているこれらの吸着的精製方法が pyrogen 全部を除去する方法として完全ではなかつた理由が首肯されるに至つた。

3) pyrogen 含有培養液とキノン処理の関係について： pyrogen 含有培養液にキノンを加えて加温して得られた赤褐色液を直接泳動に附すると、上記の P_a と P_b に相当する位置の中間の唯1ヶ所 (Fig. 1, d) に赤褐色の泳動像が認められた。

この1個の泳動像が P_a 或いは P_b のいずれから由来するかを検討するために、上記1) と同様に P_a , P_b を汚紙上に分別してそれぞれの相当部分を切りとつてこれを抽出し、それらにキノン処理を施して得られる赤褐色液そのものについて直接泳動を試みた結果、Fig. 1, b, c に示すように、 P_a の場合は左側に、 P_b の場合は右側に移行し、両者は Fig. 1, a の場合よりも相寄つた位置に赤褐色の泳動像を呈した。このことは Fig. 1, d における1個の泳動像は P_a , P_b がキノン処理を蒙つた結果、それぞれ泳動して1個所に重なり見掛けの上で1個の泳動像となつたもののようである。

この事実からみると、キノン処理を蒙つた pyrogen (PQ) は正確には P_aQ と P_bQ と見るべきものであつて、これらはキノン処理を受ける以前の P_a , P_b とは界面的性質において変化していることを示すものと考えられる。

4) pyrogen 除去及び溶出 pyrogen について a) キノン処理による pyrogen 除去： pyrogen 含有培養液及び市販不適の発熱性葡萄糖液について、活性炭のみを以て吸着処理を行えば P_a の像は消失し、 P_b のみがなお陰極側に在ることは既に2) に述べた通りであるが、これら2種の試料に対してキノン処理を加え、加温して得られる赤褐色の液を活性炭を以て脱色した後、電気泳動に附したところ、汚紙は TBP 反応陽性を示さず、 P_b も完全に除去されていることが認められた。 b) 溶出 pyrogen： 上記 a) のキノン処理の際に使用した活性炭をとり、これに再留水を加えて加温したものを電気泳動に附し、TBP を以て発色させた結果は Fig. 5, a に示すように、原試料液における P_b の位置に TBP 反応陽性の斑点が認められたが、 P_a に相当する位置には何も現われなかつた。元来 P_a は活性炭によつて容易に吸着されるものであるから、溶出して来ないのである。

本研究は昭和29年度文部省科学試験研究「発熱性物質の除去並びに検定」(主任東大小林芳人教授)の一部として行われたものである。終始御指導、御鞭撻戴いた東京工業大学水口純先生に感謝する。また御教示、御支援下された東京大学医学部小林教授、浦口助教授及び同大学薬学科野上教授に感謝する。実験に協力された東邦大学尾崎朝男氏に感謝する。

実験の部

装置及び方法 小林⁴⁾ の装置及び方法に基づいて、泳動部全体を温度計及び湿度計を挿入したデンケーター内 (42×42 cm) に納め、内部は常に水蒸気飽和の状態におく。電極は陰陽両極共に Pt 板、Tiselius の定電圧装置を用い、必要により直列に 500 μ A 計を接続。4枚の汚紙片 (東洋汚紙, No. 50, 4×20 cm) を合成樹脂枠に水平に張り、汚紙の両端を再留水に浸し、1時間後汚紙の中央に試料液を 0.05~0.1 cc 滴下、250 V 定電圧の下に3時間泳動させる。泳動後 90°, 5分間乾燥、0.1% TBP エタノール液で染色、希酢酸に浸すと大部分が黄色に染まり、pyrogen 或いは TBP 反応陽性物質が存在する部分は青色またはこれに近い色の帯状または

3) 鈴木：本誌 73, 615(1948).

4) 小林：生物物理化学 2, 7(1954); G. Haugaard, T. Kroner: J. Am. Chem. Soc. 70. 2135(1948).

斑点として泳動像が現われる。キノン処理した液はそのままでは赤色に着色しており、かつ TBP 試薬に感じないので、処理液そのままの赤色乃至赤褐色の斑点の移動で判定する。なおこの泳動試験は初め緩衝液を用いたが、TBP 試薬による呈色法が難かしいので、常に新たな再留水を用いることとした。

1) pyrogen 含有培養濾液の電気泳動 培養濾液 (T 液†) 10 cc をセロファン紙を以て 1 日静水中で注意して透析、それを 40° で減圧濃縮し 5 cc にする。この液を上記の方法に従つて 250 V, 3 時間泳動、TBP で発色させる。その結果は Fig. 1 に示すように、pyrogen は原点附近 (P_α) と陰極側 (P_β) とに分別された。

次にこの濾紙をそれぞれ巾 1 cm 宛に切りとり、各片を 50%メタノール液 5 cc に 30 分間浸漬後、溶出して得られる着色液を分光光度計を以て波長 590 m μ における吸光度を測定し、Fig. 2 に示すような結果を得た。

Fig. 1. Pherograms of Pyrogenic Culture Filtrate and of P_α and P_β

- a: Pyrogenic culture filtrate
- b: Extract of P_α portion (treated with quinone)
- c: Extract of P_β portion (treated with quinone)
- d: Pyrogenic culture filtrate treated with quinone

Fig. 2. Optical Density of Extracts from Each Colored Portion of the Pherogram (590 m μ)

2) 吸着剤及びイオン交換樹脂処理による P_α , P_β の除去 活性炭、活性白土等の吸着剤或いは IR-120, IRA-400 等のイオン交換樹脂を以て pyrogen 培養濾液或いは市販不適の発熱性葡萄糖液を処理した液についてそれぞれ泳動を行つた。その結果 P_α は殆んど除去されるが、 P_β の泳動像はいずれの場合にも明瞭に認められた。それらの泳動像についてはいずれもその位置、巾、呈色度等が殆んど一致して同形であるので、その代表例として活性炭処理の場合の泳動結果を Fig. 3 に示す。

Pherogram of pyrogenic culture filtrate treated with other substances (active clay, IR-120 and IRA-400) gave similar figures as above.

Fig. 3. Pherogram of Pyrogenic Culture Filtrate treated with Carbon

3) pyrogen 含有培養濾液のキノン処理 同条件の濾紙 2 枚について上記同様に培養濾液 T 液をそれぞれ濾紙の中央に滴下、同時に並列に泳動を行つた。泳動後 1 枚の濾紙については 0.1% TBP エタノール液を噴霧、発色させ、 P_α と P_β の泳動位置を判定するための対照用とする。他の 1 枚についてはこれを風乾し、対照用濾紙の P_α , P_β を参照して該当する 2 個所をそれぞれ巾 1 cm に切りとり、これらの濾紙片にそれぞれ再留水 10 cc を加え、浴温 40° で緩やかに 1 時間加熱した後濾過、次いで各濾液にキノン 10 mg を加えて 40~50°, 2 時間加熱し、減圧濃縮して 0.3 cc とする。得られた P_α , P_β のキノン処理液を上記と同条件で泳動させた結果は Fig. 1, b, c に示すように、キノン処理を施さぬ場合の泳動像 P_α , P_β に相当する位置には発色はなく、 P_α 処理液 ($P_\alpha Q$) では少し左 (陰極側) に、 P_β 処理液 ($P_\beta Q$) では少し右 (陽極側) にずれた 1 個所に赤褐色の泳動像があらわれた。

次いで別に T 原液、即ち P_α と P_β とを含む液を濃縮したものを 5 cc とし、キノン 10 mg を加え 40~50°, 2 時間反応させた後、濃縮して 1 cc とする。この PQ 液を泳動させた結果は Fig. 1, d に示すように、陰極側にやや巾の広い 1 個の赤褐色の泳動像となり、恰も $P_\alpha Q$ と $P_\beta Q$ とが互いに近接して一帯となつたものである。

4) キノン処理による pyrogen 除去及び溶出 pyrogen について i) pyrogen 含有培養濾液: T 液 5

† 東大薬理学教室浦口助教授より分与せられたもの。

cc にキノン末 50 mg を加え、浴温 40~50°, 2 時間加温、赤褐色の液を得る。この赤褐色液 4 cc をとり、これに活性炭 0.1 g を加えて 22°, 15 分後濾過、TBP 反応陰性のキノン-活性炭処理液を得た。この液について上記同様に泳動を行つた。その結果は Fig. 4. c に示すように、濾紙は一樣に黄色であり青色の斑点を示さなかつた。このことはキノン及び活性炭処理によつて TBP 反応が陰性となつたことを示し、またこの際僅かに残っているかも知れない pyrogen が電気泳動的に或る個所に集中されるような現象も認められなかつたことを示す。更に上記キノン処理に用いた活性炭 (CPQ) に再留水 20 cc を加え、50~56°, 3 時間加温した後濾過して溶出液を得た。また別に上記 T 液 4 cc に活性炭 0.1 g を加えて 15 分後濾過して活性炭のみの処理液を得た。これらの溶出液及び活性炭のみの処理液について泳動を行つた結果を Fig. 5 に示す。同図 a 及び b は、それぞれ CPQ から遊離された pyrogen は P_β であり、活性炭処理で吸着されない pyrogen もまた P_β であることを示す。

Fig. 4. Pherograms of Pyrogenic Culture Filtrate

Removal of Pyrogen by Quinone and Carbon Treatment.

- a: Pyrogenic culture filtrate
- b: Pyrogenic culture filtrate treated with quinone (the excess of quinone is not removed by carbon)
- c: b. Solution treated with carbon

ii) 市販不適の発熱性葡萄糖注射液：試料葡萄糖注射液及びそのキノン処理については、第5報⁵⁾、実験の部、キノン処理による pyrogen の除去の項を参照。

この試料について、原試料液、キノン反応液、キノン-活性炭処理液、溶出液及び活性炭のみの処理液の5種の場合について前同様泳動を行つた。それらの結果は、泳動像の位置、巾、呈色度等において Fig. 4 及び Fig. 5 に示した pyrogen の場合とそれぞれ全く同様であつた。

Fig. 5. Pherograms of Pyrogenic Culture Filtrate

Liberation of Pyrogen from the Carbon employed in the Process of Quinone and Carbon Treatment.

- a: The solution containing pyrogen liberated from the carbon employed in Fig. 4. c
- b: Pyrogenic culture filtrate treated only with carbon

東京工業大学水口研究室

Summary

The true nature of pyrogen and changes in the behavior of pyrogen after quinone treatment were studied through filter paper electrophoresis.

1) Electrophoresis of pyrogen-containing culture filtrate showed that pyrogen with positive TBP reaction was composed of electrically almost neutral portion (P_α) and positively charged one (P_β).

2) P_α is removed well by adsorptives and ion exchange resins but the removal of P_β is difficult. This fact well explains the observations (cf. previous paper) that some existing method of purifications were not necessarily effective in removing pyrogen.

3) The solution obtained by the treatment of pyrogen-containing culture filtrate

5) 鈴木：本誌 75, 1099(1955).

with quinone and then activated carbon gives negative TBP reaction and such image is not detected by electrophoresis.

4) Electrophoretic examination of pyrogenic glucose injections gave the same results as those with the culture filtrate.

(Received May 17, 1955)

272. 鈴木周一：無発熱性医薬品の製造に関する研究（第7報）キノン処理反応の分光化学的検討

Shuichi Suzuki: Studies on the Preparation of Non-pyrogenic Drugs for Injection. VII. Spectrophotometric Investigations on the Reaction of the Quinone Treatment.

(Mizuguchi Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

前報迄に、キノン処理による pyrogen 除去機構の解明のためにポーラログラフ及び濾紙電気泳動法を応用した検索の結果が TBP 反応による成績とよく一致したので、引続き更に分光化学的見地からこの問題を検討して同様の結論に達し、また pyrogen に対するキノンの反応について若干の知見を得た。

研究結果の概要を次に記す。

1) pyrogen とキノンの反応における吸収スペクトルの変化：pyrogen 含有培養液にキノンを加えて反応させると赤色ないし赤褐色に着色する。このキノン処理液について吸収スペクトルを調べると Fig. 1 及び 3 に示すように、紫外部におけるキノン固有の吸光度¹⁾は若干減少し、可視部については Fig. 2 に示すように、キノン特有の 410~415 m μ とは異なる位置の 390 m μ に新しい吸収が認められた。これは pyrogen とキノンとが反応して生ずる PQ なる着色物の存在を示すもので、培養液、広義の発熱性物質ないし各種の TBP 反応陽性物質のキノン処理の際にみられる赤色ないし赤褐色の発色現象に符合するものと考えられる。

卵アルブミンは TBP 反応陽性物質であるが、これをキノンと反応させた場合にも赤褐色の液が得られ、その際、紫外部における原液の 285 m μ の吸収極大が減少し、又可視部 420 m μ における吸収極大の吸光度が時間と共に増加し、最後には 340~500 m μ の波長領域に亘るゆるやかな吸収を示すに至つた。

以上の実験結果から、pyrogen がキノンと反応して PQ なる新吸光物質を生ずることは明らかである。

2) pyrogen 除去過程について：今回用いた pyrogen 含有培養液[†]のスペクトルグラムは Fig. 3 に示した通り、僅かに 260 m μ 附近に小さな吸収の肩が認められるが、pyrogen に特有と断ずるには未だ不十分である。

培養液をキノンで処理した赤色液の紫外部吸収スペクトルグラムは、キノン単味液のそれと比較して全般的に吸光度減少の傾向にある。

次にそのキノン処理液を活性炭を以つて吸着脱色すれば、紫外部及び可視部領域における吸収帯は全く消失することが証明された (Fig. 3, c)。この結果は TBP 反応による検出²⁾、ポーラログラフ³⁾及び濾紙電気泳動⁴⁾等の成績とよく一致しており、pyrogen の除去を証明するものである。

3) TBP 反応陽性物質のキノン処理：TBP 反応陽性物質として、卵アルブミン、ヌクレイン酸ナトリウム等について、pyrogen の場合と同様にキノン-活性炭処理を施した。その結果いずれの処理液も、TBP 反応陽

1) L. Michaelis, S. Granick: J. Am. Chem. Soc. **66**, 1023(1944); 長倉, 久保山: 日化 **74**, 499(1953); E. Berliner: J. Am. Chem. Soc. **68**, 49(1946); M. G. Evans: Trans. Faraday Soc. **45**, 312(1949).

† 東大薬理学教室浦口助教授より分与せられたもの。

2) 鈴木: 本誌 **74**, 90(1954).

3) 鈴木: 本誌 **75**, 1099(1955).

4) 鈴木: 本誌 **75**, 1104(1955).