

枯 草 菌 の 化 學 的 組 成

前 田 研 究 室

醫學博士 明 石 修 三

伊 丹 二 三 雄

緒 言

細菌の化學的組成を究明することは細菌の生物學的及び免疫學的研究を基礎附ける意味に於て必要缺くべからざる研究事項の一つである。かくの如き研究目的の下に研究對象として枯草菌が選ばれた理由は元來本菌は自然界に廣く分布せる卑近な非病原性菌であり、人體の消化管内にも棲息し營養素の分解を始め廣義の腐敗現象に關係し人類に交渉の多い細菌である。又培養が極めて容易であり爲めに研究材料として菌體を調達する上から見ても至極適當な細菌の一種であると云ひ得る。培養困難な細菌特に病原菌の化學的組成を解明し、或は又夫と比較検討する意味からしてもかゝる卑近な細菌を取扱ふことは必要である。若し比較する兩者に於て類似成分が見出されるならば夫に關する研究は一層容易となり又特異成分があれば研究上更に興味深いものとなる。

枯草菌は液體培養法に従ひ培養し乾燥菌體として 530g を得た、先づ灰分の定量試験を行ひ無機質の組成を明かにした、有機質に就ては中性脂肪、磷脂質、蠟、糖、核蛋白、遊離性核酸、菌體蛋白、菌體抽出殘渣等、の各成分を分離し各に就て化學的性狀を分析検査し、續いて其中の二、三成分に就て免疫學的檢索を試みた。

實 驗 成 績

I 菌體資料の培養並に採集

培養液として下記のブイオンを使用した。

肉エキス (亞鈴印).....	10g
ペプトン (照内).....	10g
食 鹽	30g
常 水	1000cc

此液に10%炭酸ソーダ液を追加し pH を 7.0 に修正し、約 180cc 宛を内容 500cc の圓錐フラスコに分注し陶製或はペークライト製帽子を以て蓋をなし、コツホ氏滅菌釜に入れて3日間間歇滅菌を行ひ、一夜孵卵器に納めて滅菌の完全なることを確認した後、寒天ブイオン斜面

に培養した菌を 1 白金目宛移植し、5 日間 37°C の孵卵器内にて培養する、取初液面に發育した菌膜は採集日には全部一樣に器底に沈下し沈澱の上層は透明である。若し不透明であるか又は菌膜及び沈澱の状態に異常なものを發見したならば雜菌の混入に依るものとして除外した、ついで内液を 12l の大型ビーカーに移し、集めた液はアルカリ性 (pH 8.6—9.0) であるから鹽濃酸を加へてラクムス弱酸性にすれば分散せる菌體は容易に凝集し、沈下する。靜置後褐色の上清液を傾瀉し、沈澱を同様傾瀉法に依り 3 回常水にて洗滌し最後にシャープルス遠心器に掛けて沈澱を分離し、陶土板に薄層となして塗布し 2 日間 37°C の孵卵器に入れる。かくすれば菌體は乾燥して陶土板より容易に剝離し暗褐色の薄片として得られ、之を更に硫酸干燥器中にて減壓乾燥する、ついで不銹鋼製ボールミルに入れ約 10 時間廻轉すれば灰白色の粉末となる。以上の操作方法に依り培養フラスコ總數 5477 本より菌體乾燥粉末 530g を收獲した。

II 菌體無機質の組成

1102mg の乾燥菌體を灰化すれば 49.2mg の灰分を残し即ち灰分含有率は 4.47% である。各無機質の定量分析を行ひ次表に掲げる成績を得た。

第 1 表 菌體無機質の組成 (%)

K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃
8.47	6.19	20.8	5.79	46.6	10.2

上表に依れば酸根は P₂O₅ が最も多く灰分の約半量に達し鹽基は CaO が斷然首位を占め其他の成分には著しき差違を認めない。

III 中 性 脂 肪

1) 中性脂肪の分離

菌體粉末 530g を 5l の廣口瓶に入れ之に豫め炭酸ガスを以て飽和した 95% アルコール、エーテル等容混合液 (各溶劑は何れも新しく精製蒸溜したものを用ふ) を菌體の 5 倍量加へ、時々振盪しつゝ室溫下に 5 日間放置する、ついで吸引濾過し菌體を前回と全く同様に溶劑を更新して浸漬抽出すること前後 3 回に及び最後に浸出液を合して中性脂肪及び磷脂體の分離に用ひ一方抽出残渣は其他の成分抽出に當てる、上記のアルコール、エーテル浸出液は炭酸ガスを通じつゝ先づエーテルを蒸溜し、ついで減壓下にアルコールを溜出すれば蒸溜残渣として赤褐色油狀物質が得られる、之に少量の水を加へエーテルを以て抽出し、エーテル浸出液を 3 回水洗後無水芒硝を加へて脱水しエーテル液を蒸溜すれば濃褐色泥狀物質 16.3g が残る、之を 15cc のエーテルに溶解し 4 倍容のアセトンを加へ氷室に一夜放置する、生成した沈澱を遠心分離し、上清を分ち沈澱を更に 3 回アセトンで洗滌し磷脂體割分 P とする。上清は之に洗液を合

して溶媒を蒸溜すれば後に褐色軟固體のアセトン可溶性中性脂肪 10.96g が得られる。中性脂肪の分析結果は次表の如くである。

第2表 中性脂肪

P%	N%	酸 價	沃 素 價	鹼 化 價
0.09	0.25	96.10	47.65	197.8

従来諸種細菌から分離された中性脂肪を見るのに其酸價が著しく高いことが常である、本菌の中性脂肪も其例に漏れず高い酸價を示し遊離脂肪酸を多量に含むことを示す。

2) 中性脂肪の鹼化

脂肪 10.68g を 5%アルコール性カリ 150cc と共に逆流冷却器下に 5 時間煮沸し、ついでアルコールの大部分を溜出し残液にエーテルを加へて抽出する、エーテル浸出液を水洗、乾燥後、溶媒を蒸溜して不鹼化物 1.107g を得た。不鹼化物は褐色軟泥状物質であつて、沃素價 71.69、冷アルコール不溶性物質を少量含む、リーバーマン氏ステリン呈色反應は陰性であり、デギトニンとも不溶性沈澱物を生じない。

次に不鹼化物を除いたアルカリ性鹼化液に $2n-H_2SO_4$ 約 50cc を加へ酸性にすれば脂酸の大部分が液面に浮遊する。之を捕集し、尙酸性液中に溶存する脂酸をエーテルを以て抽出し先に捕集した酸に加へかくの如くして濃褐色軟固體の外観を呈する混合脂酸 7.65g を得た。

脂酸を抽出除去した酸性水溶液は炭酸バリウムを加へて硫酸を除き、更に必要ならば少量の硫酸を加へて液を全く中和した後、水浴上にて濃縮し濕氣を僅かに含む程度の乾燥状態に達せしめ、更に硫酸乾燥器内に減壓下に充分乾燥する、次に乾燥硫酸バリウムを加へ混和し、ソックスレー浸出器を用ひ乾燥アセトンで二晝夜抽出を續行し、アセトン浸出液を蒸溜すれば残渣として赤褐色の粘稠液 0.56g を得た、之をマイクロ真空蒸溜管に移し蒸溜精製し精製物より融點 74° のベンゾイル誘導體を得てトリベンゾイル、グリセリンであることを混融試験により確認した。ソックスレー浸出器の浸出筒内に残された内容は之を水に分散し水浸出液を製した。此液はモーリツシュ氏糖反應が陽性であるので鉛鹽アムモニヤ法により糖の單離を企てたが微量の吸濕性飴状物質を得たに過ぎず精査することが出来なかつた。

3) 混合脂肪酸より固體酸、液體酸の分離

前記混合脂酸 7.50g をアルコール 30cc に溶解し $\frac{n}{2}$ アルコール性カリを以て中和し水 100cc を添加し、之に熱醋酸鉛液 (10%醋酸鉛液 60cc + 水 40cc) を攪拌しつつ徐々に注加し、暫時放置後、難溶性鉛鹽の沈澱を吸引濾過し、沈澱を熱湯にて洗滌後乾燥する。濾液には色素が存在しアルカリ性に於て赤色、酸性に於て灰色である、酸性水溶液をエーテルと共に振盪すれ

ば色素はエーテルに移行して之を黄染し、又此エーテル液をアルカリ液と共に振盪すれば水溶液を赤變する。従つて色素は一種の酸性物質と考へられるが微量なるため精査することが不可能である。上記の乾燥した脂肪酸鉛鹽はエーテルに對する溶解度の差違に従ひ便宜上難溶、可溶、易溶の3部分に分割し易溶部分は更に少量のアルコール難溶部分と多量のアルコール可溶部分とに區別し、かくの如くして A, B, C, なる3種の固體酸と D なる1種の液體酸とを得た操作の大要は次の如くである。

先づ鉛鹽を約 600cc のエーテルに分散し、加温すれば容易に溶け、冷却すればゲル狀に析出する沈澱を遠心器に掛けて沈澱 R と上清 F とに分離する。R は毎回 60cc 宛の冷エーテルを以て4 回洗滌し沈澱を鉛鹽 A とし、4 回の洗液を合して其中に溶存する鉛鹽を B とする。先の上清 F は溶媒を溜出し残渣にアルコール 300cc を加へて加温溶解し、冷却すれば鉛液を析出す之を C とする。C の濾液中に溶存するものは冷エーテル冷アルコール何れにも易溶であつて之を鉛鹽 D とする。鉛鹽 A 及び B は何れも熱アルコールより再析出せしめて精製する。こゝに於てエーテル難溶の A、エーテル可溶アルコール難溶の B、エーテル易溶アルコール難溶の C 及びエーテル、アルコール何れにも易溶の D の4 種の脂肪酸鉛が得られたことになる。各鉛鹽から遊離した脂酸の性状及び收量を次表に掲げる。

第 3 表 中性脂肪より分離した固體酸並に液體酸

脂 酸	融 點	中 和 價	沃 素 價	收 量 g
固 體 酸 A	40—41°	225.3	1.79	1.57
〃 B	(軟固體)	268.6	12.86	1.18
〃 C	(軟固體)	189.2	39.96	0.25
液 體 酸 D	(液 體)	205.7	47.29	3.48

上記の分析數値就中中和價から各劃分の主體をなす脂酸を推定すれば、A はパルミチン酸 (C₁₆) B はラウリン酸 (C₁₂) D はパルミトオレイン酸 (C₁₆) 及びオレイン酸 (C₁₈) の加くである。最も量の少い C は判然と云ひ難い、各成分は夫々單離を行つて確證する積りである。

IV 磷脂體の精製

前記の磷脂體劃分 P を 60cc のエーテルに溶解し、同量のアセトンを加へて沈澱せしめ、遠心分離後再び沈澱をエーテルに溶解し、アセトンを加へて沈澱する、かくの如き精製操作を前後10回に互り反覆施行し、最後に得た沈澱を P_I とする。各回の洗液を全部合して溶媒を蒸溜して、残渣を前回の半容即ち 30cc のエーテルに溶解し、30cc のアセトンを加へて沈澱を生ぜしめ、此沈澱について全く同じ操作を數回反覆して沈澱 P_{II} を得る、P_{II} の洗液を悉く集めて溶媒を蒸溜し残渣を 20cc のエーテルに溶し、5 倍容の氷冷アセトン中に注加して析出する沈澱を

P_{III} とする、P_{III} の上清は極微量の蒸發残渣を留めるに過ぎず混入した脂肪と見做される。磷脂體各劃分の分析値及び收量を次に表記する。

第 4 表 磷 脂 體

磷 脂 體	融 點	P%	N%	モーリツシュ氏 糖 反 應	收 量 g
P _I	194—195°	3.93	0.64	—	2.14
P _{II}	194—195°	3.09	0.61	±	1.20
P _{III}	189—190°	3.68	0.58	+	1.15

此表より明かなる如く 3 劃分の分析値の間には著しい差違を認めない。たゞ之等磷脂體の特異點を指摘すれば P の含有量は一般磷脂體に一致するが N が甚だしく少いことである。又本磷脂體劃分には糖反應が殆んど陰性であることからしてグリコリピッドの存在を否定し得られる。

V 蠟

1) 蠟 の 分 離

前掲のアルコール、エーテルを以て處理した菌體抽出残渣を炭酸ガスを以て飽和したクロホルム 3l 中に浸漬し、時々振盪しつつ 5 日間光を遮り室溫に放置する。クロホルムを濾別し菌體を尙 2 回同様にしてクロホルム抽出を行ひ、3 回のクロホルム浸出液を合して溶媒を溜出すれば蒸溜残渣として淡黃色セロファン膜様の硬固體 19g を得た。之を再びクロホルムに加溫溶解し、冷却後微量の不溶物を去り、透明濾液にメタノールを 4 倍量加へて沈澱を析出せしめ、沈澱を遠心分離して乾燥すれば粉末化し難い白色硬質の蠟物質 17.5g を得た。尙沈澱の上清を蒸溜して 1.5g の蠟物質が得られた。

2) 蠟 の 性 狀

本物質は、クロホルムには冷時溫時共に可溶であるが其他の有機溶媒には極めて難溶か或は不溶である。即ち熱ベンゼール、トルオール、アルコール、メタノール、四鹽化炭素等には難溶であり、エーテル、アセトン石油エーテル等には不溶である。分析した結果を次に掲げる。

第 5 表 蠟

融 點	[α]	鹼 化 價	P%	N%	灰 分 %
200—205°	0	124*	0.09	0.0	0.33

* $\frac{n}{2}$ アルコール性カリを以て 15 時間煮沸して得た値である。

本蠟のクロホルム溶液は 5—10% の濃度に於て既に粘性を示し宛もコロジウム液の如き觀を呈する。此溶液を放置して自然蒸發せしめると後に不透明な、角質様の硬い、強靱な物質を残す。又稀薄溶液を用ひた場合には菲薄透明なフィルムを作成することも出来る。斯様な性質

は従來の天然蠟には見受けられないのであつて、此點からして或は蠟とは化學的構成を全く異にした一種の重合性高分子化合物ではなからうかと推測する。

尙又本物質が抗酸染色性であることを次の如き試験法により認めた。先づ叙上の如くして蠟の薄膜を作り、之をチール氏石炭酸フクシン液に浸漬して2—5分間加温すると淡紅色に染る。次に之を5%硫酸中に入れて脱色を試みるのに色調に變化を來さない。因に此染色法は芽胞染色に用ひられるものであつて、又元來枯草菌が代表的芽胞性細菌であること等を考へ合せると本蠟は恐らく芽胞に含まれる特種成分ならんかと想像される。

VI 糖

1) 糖 の 分 離

クロ、ホルム抽出残渣を再び不銹鋼製ボールミルに納め、延時間80時間廻轉して菌體を充分磨碎する。次に60%メタノール2l中に浸漬して時々振盪しつゝ室温に2日間放置後、メタノール浸出液を濾別する。更に同様の抽出操作を2回反覆施行し、3回の浸出液を合して減壓蒸溜を行ひ蒸溜残渣を硫酸乾燥器中にて減壓乾燥すれば黃褐色の飴狀物質が得られる。收量 34g之をメタノールにて處理すると粗粉固狀體を生じ、夫を濾別した濾液は黃褐色を呈し強く綠色螢光を放つてゐる。粗粉狀固體は更めて 200cc の水に浸し、醋酸鉛液を加へ生ずる少量の沈澱物を濾過し濾液に次醋酸鉛液及びアムモニヤ水を沈澱が生じなくなる迄加へる。集めた沈澱は水洗後水に分散して硫化水素を通じ、硫化鉛の沈澱を濾過し、濾液を減壓蒸溜し残渣をメタノールを以て處理すれば白色の細末を得る。收量5.1g

2) 糖 の 檢 索

糖に就て行つた定量分析の結果を次に表記する。

第 6 表 糖

融 點	$[\alpha]_D^{20}$	酸 當 量	P%	N%	アセチール N%
235—237°	+47.0°	621	0.16	5.58	3.48

アセチール N は Kuhn-Roth 法に依りアセチール價を測定しアセチールが悉く N に結合したものと假定して計算した値である、測定に先だち糖を5%硫酸と共に2.5時間加熱分解し、ついで硫酸の濃度を Wenzel 硫酸と等濃度となし更に30分間沸騰水浴中に加温後、蒸溜を行つた。表に示されたアセチール N 値は總 N 値に比べると遙かに少いが總 N の半數よりは餘程大である。之は測定條件を吟味して精測するならば或ひは總 N に接近するのではないかと思ふ。次に還元力を Hagedorn-Jensen 法に従ひ定量すると其儘では弱い還元性があつて葡萄糖として6.7%であるが、5%硫酸と共に煮沸すると次第に増加して2.5時間後には大體恒數

に達し 87.3% を示す様になる。又アミノ N を van Slyke 法に依り検すると其儘では證明されないが酸で水解すると現れて来る。更に種々の成分の検出反応を行つたが其成績を總括的に述べると次の如くである。陰性反応を列挙すると沃度反応、フロ、グルチン酸及びオルチン鹽酸による五炭糖反應、レゾルチン鹽酸による果糖反應、 α -ナフトレゾルチンによるヘキシウーロン酸反應、フェニールヒドラゾン生成によるマンノーゼ反應、粘液酸生成によるガラクトーゼ検出試験、ニンヒドリン反應等である。陽性反應としてはフェニールグルコサゾンによる葡萄糖の證明及びアミノ糖反應のみである。後者は糖を水解しアセチルアセトンで以てアセチル化し次にエールリツヒ試験薬を作用して呈する色彩反應である。

以上糖に關して試みた檢索の結果を綜合考察するならば本物質は恐らくアミノ糖 2 分子、葡萄糖 1 分子、不明の糖酸 1 分子より構成せられる四糖類であつて、其アミノ糖のアミノ N がアセチル化されてゐるであらうと推定する。

VII 核蛋白及び核酸

1) 核蛋白の分離

糖を抽出した菌體殘渣を 20l の磷酸鹽緩衝劑 (pH 6.4) 中に細く分散し、器を氷水中に浸して液を低温に保ちつゝ電動攪拌器を以て 5 時間連續的に激しく攪拌する一夜氷室に靜置後シェアブルス遠心器を用ひ浸出液と抽出殘渣とに分け、後者は菌體蛋白の分離に保存する。浸出液は稍濁してゐる爲め 10% 膠狀鐵液 120cc を水を以て 5 倍稀釋して強く攪拌しながら加へ暫時靜置後襷付濾紙を以て濾過する。沈澱は 2 回水洗し洗液を濾液に合して得たる透明な液に氷醋酸を加へ pH を 4.0—3.8 にすると白色絮狀沈澱を生成する。氷醋酸の所要量は約 120cc であつて沈澱は氷醋酸の過剰の添加によつて溶けるから注意を要する。核蛋白の沈澱は醋酸水を以て 3 回水洗して緩衝劑に由來する磷酸鹽を充分除き、ついでメタノール、及びエーテルにて處理して粉末にする。收量 16.0g 此粗製核蛋白の分析値は N 13.9%, P 2.8% である。

2) 核蛋白より核酸及び核酸脫蛋白の分離

Sevag 法に従つて行ふ、核蛋白 3g を 0.5% 無水炭酸ソーダ液 840cc に溶解し、50—55° の水浴中に屢攪拌しながら 2 時間放置する。液中には不溶物を認めない。次に氷醋酸を加へて先づ中和し更に追加して pH 5.6 (中和點と蛋白等電點との中間 pH) にする。こゝに得た稍濁した液を分液漏斗にとり $\frac{1}{10}$ 容のクロ、ホルム及び $\frac{1}{10}$ 容のアミールアルコールを加へ、6 時間激しく器械的に振盪する。混合液を其儘遠心分離すると 3 層に分れ、上層は透明な水溶液、中層は白色のクロ、ホルム蛋白ゲル、下層は透明なクロ、ホルムから出來てゐる。クロ、ホルムゲル層を上清から分取し、分液漏斗を用ひて 2 回水洗する。水洗液は上清に加へ苛性ソーダに

て中和後、300cc 迄減壓濃縮し、再び氷醋酸を加へて pH 5.6 とし、クロ、ホルム及びアミールアルコールと共に、前回と同様に振盪する。こゝに生じた第2回のクロ、ホルム蛋白、ゲルを上清から分離し第1回のゲルに加へ一方上清及び、ゲルの洗液を合して中和後 150cc 迄減壓濃縮し pH を調整してクロ、ホルムによる除蛋白操作を更に1回反覆する。最後に得た上清及び洗液は合して核酸の単離に當てる。又3回の振盪によつて得たクロ、ホルム蛋白ゲルは集めて之に4倍容のメタノールを加へ解膠して遠心分離する。沈澱をメタノール及びエーテルにて處理すると白色粉末の核酸脱蛋白 1.56g が得られる。一方上記の核酸含有液を中和後濃縮して約 30cc とし、析出する微量の不溶物を遠心除去して透明液に3倍容の氷醋酸及び2倍容のアルコールを加へると核酸が沈澱する。白色粉末で收量は 0.78g である。此核酸は更に1回稀アルカリに溶解し、少量の不溶物を除き、氷醋酸及びアルコールを以て再沈澱して精製し分析に供した。其結果を次に記す。

第 7 表 核酸及び核酸脱蛋白

	P%	N%	收量 g (%)
核 酸	8.6	13.6	0.78 (26)
核酸脱蛋白	0.36	14.8	1.58 (52)

上表を見ると核蛋白はクロ、ホルム振盪法を3回施行することに依り可成りの純度を有する核酸と蛋白とに分別せられ且其總收量は約80%であることが理解せられる。

3) 遊離性核酸の單離

核蛋白とは無關係に即ち核蛋白沈澱の濾液から別個に取出された核酸を假に遊離性核酸と名づけておく。之が菌體內で果して最初から遊離状態にあつたものか、或は分離操作中に核蛋白から遊離したものであるかに關しては言明出来ない。核蛋白の濾液に飽和硫酸銅液を淡青色の沈澱が起らなくなる迄注加する、こゝに生じた核酸銅の沈澱を遠心分離し水洗後、鹽酸含有アルコールにて數回處理して銅鹽を分解する。銅を離した核酸の沈澱を少量の稀アルカリに溶解し、少量の不溶分（膠狀鐵液に由來する水酸化鐵）を除き上清に6倍容の氷醋酸と2倍容のアルコールとを順次に加へ核酸を充分に析出せしめる。收量 3.0g、此核酸を尙1回アルカリに溶解、氷醋酸、アルコールによる析出の精製操作を繰返し行ひ分析に供する。

第 8 表 遊 離 性 核 酸

P%	N%	ペントーゼ反應	デスオキシリボーゼ反應	プリン總N	%
8.9	16.0	+	+	71	

本物質が確かに核酸であり、しかも純度が高い標品であることは上表の $\frac{\text{プリン總N}}{\text{N}}$ の値から自ら明かである。糖の反應からすると本核酸にはリボーゼ及びデスオキシリボーゼの両者が存

在し、従つて糖の種類に基いて核酸を分類する見解に従へば混合型或ひは複合型核酸であると言ひ得られる。先に核蛋白から分別した核酸も亦遊離性核酸と同様の糖反應を與へる。

VIII 菌體蛋白、及び菌體抽出殘渣

1) pH 9.0 抽出蛋白

核蛋白を抽出分離した菌體殘渣を 10l の水中に分散し n-NaOH を加へて液の pH を 9.0 となし核蛋白抽出の場合と同様に氷冷下に 5 時間攪拌後一夜氷室に靜置する。ついで遠心分離すれば僅かに濁濁した浸出液が得られ之に 15% 鹽酸を加へて pH を 4.8—5.0 にすれば多量の絮狀沈澱を析出し、沈澱を分離してメタノール、エーテルにて處理して粉末とする。

2) n-NaOH 抽出蛋白

前記の蛋白を分離した抽出殘渣に 10l の n-NaOH を加へ同様に攪拌して一夜氷室に放置する、次に氷冷しつゝ濃鹽酸を加へ pH が約 10、になれば夫迄分離混雜であつた菌體が凝集沈下し始める。よつて之を遠心分離し沈澱を 2 回水洗し、洗液を上清に合し、こゝに得た殆んど透明な浸出液に稀鹽酸を加へて pH 4.0 にすると極めて多量の沈澱が生成する。之を集めメタノール、エーテルにて處理して粉末とする。

3) 2.5n-NaOH 抽出蛋白

n-NaOH 抽出蛋白の抽出殘渣を毎回 3l 宛の 2.5 n-NaOH を以て反覆抽出する。此場合にも殆んど透明な上清が得られる 3 回の浸出液には夫々氷冷しつゝ濃鹽酸を加へて pH 約 3.6 にすると沈澱が充分に析出し過剰の酸を加へると一部分溶解し去る、沈澱を集めてメタノール、エーテルを以て粉末とする。

4) 菌體抽出殘渣

以上の抽出操作を受けて最後に残つた抽出殘渣は最早アルカリ被抽出性物質を含まず、アルカリ液に遭ふと強く抱水膨化する。之に鹽酸を加へて酸性にすると疎水性に變じ、沈澱粒子が微細に分散して分離が不可能となる。よつて強アルカリ性の儘遠心分離して沈澱をメタノール、エーテルを以て脱水粉末にする。

次に各種劃分の菌體蛋白及び菌體抽出殘渣の N, P 含有量及び收量を次に表示する。

第 9 表 菌體蛋白及び抽出殘渣

劃 分	P%	N%	收量g
PH 9.0 抽出蛋白	0.39	14.5	39.0
n-NaOH 〃	0.02	14.9	88.9
2.5n-NaOH 〃	0.27	13.0	11.6
菌體抽出殘渣	1.60	5.7	42.0

前記の表に依れば浸出液のアルカリ濃度を順次に高めて抽出された各劃分の蛋白相互分析値の間には著しい差違を示さないが抽出残渣とは截然と區別される。此菌體抽出残渣は精製すれば P, N. は更に減少する見込みであり、強アルカリに對して不溶性なこと又 N 含有量の少いこと等からして一種の複雑な多糖類に屬し細菌の支柱質を構成する物質と見做してよからうと思ふ。

IX 菌體成分一覽

以上菌體から分離された各成分を總括して各收量の乾燥菌體に對する百分率を求めると次表に示す如くである。

第 10 表 菌體成分一覽表

成 分	乾燥菌體 530g g	より得た收量 %
中 性 脂 肪	10.9	2.0
磷 脂 體	4.5	0.8
蠟	17.5	3.3
糖	5.3	1.0
核 蛋 白	16.0	2.0
遊 離 性 核 酸	3.0	0.5
PH 9.0 抽出蛋白	39.0	7.3
n-NaOH ヲ	88.9	16.8
2.5n-NaOH ヲ	11.6	2.2
菌體 抽 出 殘 渣	42.0	7.9
灰 分	—	4.5
合 計	238.7	48.3

上表から新に指摘される事柄は分離成分の總量が乾燥菌體の約半量を占めるに過ぎないことである。喪失した他の半量が如何なる理由によつて記したかに就ては之を分離に漏れた未知の成分に歸せしめるよりはむしろその原因が大部分乾燥菌體に残存してゐた水分にあるものと考えへるのが至當である。不明の減量は特に蛋白抽出操作中に觀察されたのであつて其際各抽出液中に残留する物質があつたとしても決して多量である筈はなく其總量を高く見積つても乾燥菌體の10%を越えないでらうと思ふ。若し之が眞實であるならば最初見掛上乾燥状態にあつた菌は尙40%の含水量を有することになる。又此水に就ては其大部分が容易に菌性から離脱出来ない状態恐らく抱水性の支柱質及び蛋白等に吸着された所謂結合水として存在するのであらうと想像する。一般に細菌は組織細胞と異り微細な單獨個性として廣大な體表面を有し、然かもよく乾燥に耐へて生活するものであつて生存上必要な一定量の水分を保持し得る機構を具備するのがむしろ當然であらう。

X 免疫學的試驗

菌體から分離した諸成分が生菌を以て免疫した免疫血清に對して試験管内抗元性を示すかど

うか、又示すならば其強さを検べる目的を以て沈降反應及び補體結合反應の兩免疫反應に就て調べた。

1) 抗枯草菌免疫血清の調製

a) 細菌浮游液

普通寒天斜面に24時間培養した菌體5白金耳（50mg 濕菌）を瑪瑙乳鉢にとりよく磨碎してから生理的食鹽水 50cc に分散して 0.1% 生菌微細浮游液をつくり之を免疫原とした。

b) 免 疫 法

2.0-2.5kg の白色家兎5匹を用ひ夫々上記免疫原を3日の間隔を置いて3回耳靜脈に注射した。注射量は第1回 1cc 第2回 1.5cc 第3回 2cc である。最後の注射日から7日後に於て豫備採血に依り高度の免疫價を確めた動物を選び頸動脈切斷によつて全採用を行ひ血清を分離し56°に30分間加温し、之を非働性免疫血清として以下の試験に使用した。

2) 沈 降 反 應

a) 抗 原 液

抗原としては核蛋白、核酸、核酸脫蛋白、遊離性核酸、pH 9.0 抽出蛋白、n-NaOH 抽出蛋白、糖等を用ひ之等を生理的食鹽水に1%の割合に溶解した。蛋白は何れも生理的食鹽水には完全に溶けないから、少量の苛性ソーダを添加して透明液として更に稀鹽酸を滴下して pH を7.2—7.4にした。又糖は酸性反應を呈するから、溶液に苛性ソーダを少量加へ前記の pH に調整した。

b) 試 驗 法

Uhlenhuth 輪環試験法に従つて施行した。各種抗原液を生理的食鹽水を以て遞減的に稀釋し、各液を沈降試験管にとり前記免疫血清を重疊して生成する白濁環を觀察した。試験成績の判定は10分以内に著明に反應するものをH、30分以内に著明に現れるものをTとし以下之に準じ觀察時間は室温に於て60分を限度とした。尙對照試験として免疫血清の代りに正常家兎血清を用ひて同様の操作を行ひ陰性なることを確めた。

本試験の結果を次に表記する。

第 11 表 沈 降 反 應

抗 元	抗 元 稀 釋 倍 數								H : 100 T : 1000
	1H	2H	5H	1T	2T	5T	10T	20T	50T
核 蛋 白	卅	卅	卅	卅	+	+	+	±	±
核 酸 脫 蛋 白	卅	卅	卅	+	+	+	+	—	—
PH9.0抽出蛋白	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—

抗 元	抗 元 稀 釋				倍 數					H: 100 T: 1000
	1H	2H	5H	1T	2T	5T	10T	20T	50T	
n-NaOH抽出蛋白	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—	
核 酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
遊 離 核 酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
糖	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

上表を通覧すると核蛋白及び夫より分離した蛋白は殆んど同じ強度の抗原性を示すけれども、核酸には全く抗原性のないことが認められる。菌體蛋白は兩種とも核蛋白よりは可成り劣つてはゐるが抗原性を現してゐる。之が果して混在してゐる核蛋白に依るのか或は蛋白の非特異的類屬反應に原因するのかは明かでない。尙注目すべき點は糖に抗原性が缺如してゐることであつて即ち此糖は菌體の特異性含水炭素でないことが理解される。

3) 補體結合反應

a) 豫 備 試 験

山羊血球を以て家兎を免疫して得た溶血素血清の溶血價、補體の最小溶血價即ち絶對量、免疫血清及び抗原（核蛋白、磷脂體 I 及び II）の溶血阻止作用等の測定を行ひ各液の使用量を決定した。

i 抗原液 核蛋白は 0.1% 液の 5 倍稀釋が阻止下量であつて、其半量即ち 10 倍稀釋液を用ひた。磷脂體 P_I 及び P_{II} は何れも 0.1% アルコール液の 30 倍稀釋が阻止下量であつて 60 倍稀釋液を使用した。

ii 免疫血清 阻止下量の半量即ち 10 倍稀釋液をとる。

iii 補體 新鮮海獺血清の 5.7 倍稀釋液 0.2cc が 2 單位 (2E) に相當した。

iv 2.5% 感作山羊血球浮游液

25 倍稀釋溶血素血清（溶血價 800 倍）1cc を 2.5 % 山羊血球浮游液 100cc に加へて調整した

b) 本試験 (Browning 法)

一列の試験管をとり先づ抗原液 0.5cc 宛を入れ非働性免疫血清 0.5cc を加へ更に補體を 2E より始め 2E 宛増量的に加へ以上をよく振盪混和して 37°C の水浴中に時々振盪しつゝ 1 時間浸漬する。ついで 2.5% 感作血球浮游液 0.5cc を加へ再び混和し 37°C の水浴中に 1 時間置き一夜氷室に貯へ溶血反應を観察した。同時に二種の對照試験を行つた。即ち A) 抗原を 2 倍量入れ免疫血清を加へず補體 2E を加へる B) 免疫血清を 2 倍量入れ抗原を加へず補體 2E を加へる。而して A) B) は何れも完全溶血なることを確めた。本試験の成績を次表に掲げる。卅は完全溶血、卅は一部溶血、一は完全非溶血である。

第 12 表 補體結合反應

抗 元	補 體 單 位					對 照 試 驗	
	2E	4E	6E	8E	10E	抗 元 +補體	抗血清 +補體
核 蛋 白	—	±	+	卅	卅	卅	卅
磷 脂 體 I	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅
II	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅

上表に依れば何れの場合にも補體結合反應が高度ではないが陽性である。即ち之等の物質は補體結合性抗原であることを示してゐる。

總 括

- 1) 研究材料として枯草菌をブイヨン培養して乾燥菌體 530g を採集した。
- 2) 乾燥菌體の 4.5% を占める無機質中にはカルシウム及び磷が斷然多いことが認められる。
- 3) 中性脂肪を鹼化した結果グリセリン及び脂酸を分離した。不鹼化物中にはステリンを見出さなかつた。脂酸の主なるものは分析値より推定してパルミチン酸ラウリン酸パルミトオレイン酸オイレン酸等である。
- 4) 磷脂體の特異點としては P に比較して N の含有量が著しく低いことである。又本判分には糖が殆んど含まれてゐない。
- 5) 特種な硬質蠟物質を分離した。本物質は高分子化合物の通有性を示し又抗酸染色性を有してゐる。芽胞成分であることを推論した。
- 6) 酸性反應を呈する非結晶性の糖を單離した。檢索の結果葡萄糖二分子、アミノ糖一分子、糖酸一分子よりなる四糖類であることを推定した。
- 7) 核蛋白は脱脂菌體をボールミルを用ひ充分磨碎した材料を PH 6.4 磷酸鹽緩衝劑を以て抽出して良き收量で收得された。核蛋白から分離した核酸はリボゼ、デスオキシリボゼの兩種の糖反應を與へ、従つて複合型或は混合型核酸と見做される。
- 8) 核蛋白とは別個に遊離性の核酸が單離された。核蛋白の核酸と性状は略一致してゐる。
- 9) 菌體蛋白は 2.5 n-NaOH で殆んど悉く抽出分離され後に残された菌體抽出殘渣は一種の複雑な N 含有多糖類に屬し、菌體の支柱質と考へられる。
- 10) 免疫學的試験を行ひ抗枯草菌免疫血清に對し沈降反應、補體結合反應に就て菌體成分の試験管内抗原性を檢査した。沈降反應に於ては核蛋白及び夫から分離した蛋白は何れも最強度の抗原性を發揮し、pH 9.0 抽出蛋白、n-NaOH 抽出蛋白は之に劣るがやはり抗原性を示す。乳酸及び糖は全く抗原性を認めない。補體結合反應に於ては核蛋白及び

磷脂體を試験に供し何れも反能陽性なることを確めた。

本稿を擲筆するに臨んで本研究は恩師前田教授の直接御指導の下に行はれ且つ費用の大半は文務省科學研究費に依つて支辨されたことを附記して此處に深甚の謝意を表す。

(昭和十五年十二月七日 京大化學研究所講演會に於て發表)