

結核感染動物の生体内に発生する 溶血性物質に関する研究

第 2 編

結核感染動物の臓器より抽出した溶血性物質の精製

岡山大学医学部病理学教室専攻生 (指導: 妹尾左知丸教授)

小 林 実

〔昭和33年9月4日受稿〕

緒 言

前編に於て著者は、結核感染動物の病変を伴う淋巴腺及び脾臓に相当強力な溶血性物質が抽出された事を報告し、更に本溶血性物質は破壊された組織に於けるレシチンの分解に依つて生ずるリゾレシチン及び不飽和脂酸と想像される事を述べた。本編に於ては溶血価を指標としてアセトン不溶性溶血物質の精製を試みた結果に就いて報告する。対象として白米より抽出したリゾレシチン結晶を用いた。

実験方法

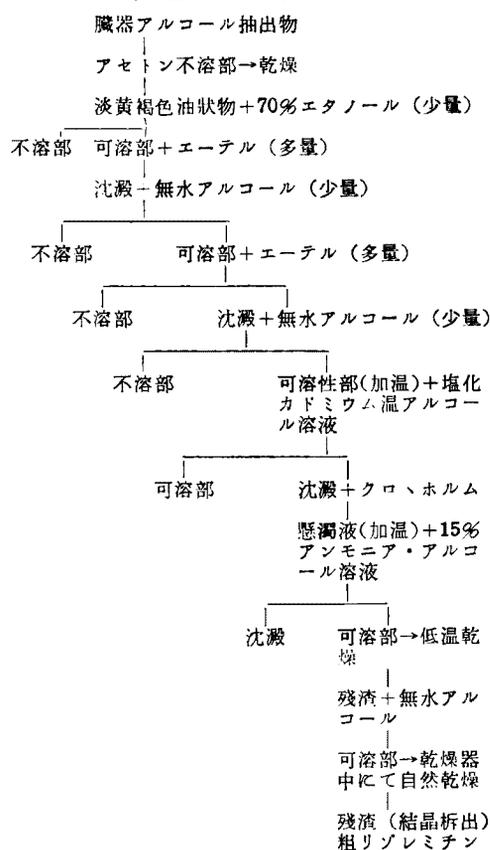
1) 実験材料

合計30匹の海猿に人型毒力菌 H. 37 RV 株 4 mg を両側下腹部皮下に接種して6~8週目に屠殺し、病変著明なる淋巴腺 140 g, 脾臓 170 g を得た。

2) 精製方法

第1編で述べた方法と同様な操作に依り之等からエタノール可溶、アセトン不溶の物質を抽出。この物質10倍量の70%エタノールに溶解し、多量のエーテルを加え分液漏斗で振り冷室中に放置すると2層に分れる。下層を取りこの操作を数回反覆した。エーテル不溶部を集め、減圧乾燥させ無水アルコールにて抽出。抽出液に50%塩化カドミウム水溶液とエタノール等量混合液を滴下し沈澱が生じなくなる迄加えた。遠沈して沈澱をクロロホルムに懸濁させ15%アンモニアアルコールを滴下し、カドミウムをCa(OH)₂として沈下させた。遠沈して沈澱を除き可溶部を乾燥。之を数回繰り返し得られた物質を無水アルコールに溶解して乾燥器中で低温乾燥し淡灰白色針状の結晶を得た。

第1図 溶血性物質の精製



エーテル可溶部は蒸発乾固すると黄褐色の粉末が得られた。

3) 白米中のリゾレシチン抽出方法

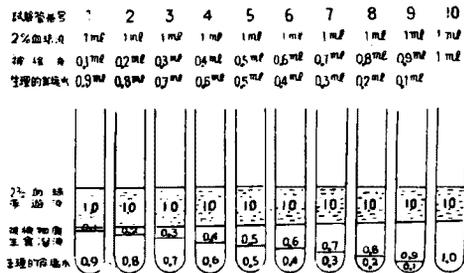
白米 1.5 kg をエタノールで抽出、之を濃縮し抽出物中のエーテル可溶部を分離させ、残った液に塩化カドミウム温アルコール溶液を加え、沈澱をクロ

ロホルムに溶かしアンモニアアルコール液を加えカドミウム塩を除き乾燥してリゾレシチン結晶 3g を得た。(岩田の文献参照)¹⁾

4) 溶血価測定方法

先きに平尾が白米中のリゾレシチンの溶血価を測定したと同じく Kofler⁴⁾ のサポニンの溶血測定方法を多少改めて用いた²⁾。即ち家兎血液 10 ml を脱繊維素して血球を生理的食塩水にて洗滌したる後、生理的食塩水を加えて 10 ml としたものを原血球浮遊液とす。原血球液の 2% 生食浮遊液を 1 ml 宛 10 本の試験管にとつた。次に第 2 図の如く被検物質の生食溶液及び生理的食塩水を順次加える。被検液の濃度は予め一定量の被検物の水溶液一定量を 1 ml

第 2 図 溶血価測定法



第 1 表 精製溶血性物質の溶血価

被 検 物 質	原液濃度 (g/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	完全溶血時の濃度 (g/ml)	溶血価
淋巴腺磷脂質	0.024	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.012	8.333
脾 結 脂 質	0.024	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.012	8.333
淋巴腺精製物	0.00158	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.000632	158.826
脾 精 製 物	0.00158	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.000632	158.826
米リゾレシチン	0.00066	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.000264	375.000
アセトン可溶部中の脂肪酸	0.00814	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	0.00814	12.284
エーテル可溶部	0.204	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.0816	1.224
チギトニン												Kofler	174.000
サポニン													19.000

(Kofler の法に依る)

考 按

結核性病竈から抽出されたアセトン不溶性の溶血性物質はリゾレシチンである事はほぼ確実と思われるが著者は本実験に於て溶血価及び化学的性質を指標にして更にそれを精製した。その結果精製物質は 18 万倍の溶血価を示し、前編で述べたものの約 20 倍

の血液にピペットにて滴下し、滴数に依つて大体の溶血力を知つて定めた。観察は 38°C に 1 時間、次に氷室中に 24 時間置いて検した。溶血価は完全溶血を起す最初の試験管中の被検液の濃度を以て 100 を除したる価を溶血価とした。

実 験 結 果

1) 抽出物の性状

抽出精製して得られた物質の量は、淋巴腺からのものは約 83 mg、脾臓からのものは約 98 mg であつた。その性状淡灰白色針状の結晶で、水、エタノール、メタノール、クロロホルム、温ピリジンに可溶、アセトン、エーテルに不溶で、水に溶かして加温すると激しく泡立つ、フェノールフタレンに依つて中性反応を示す。之等の性状は米から抽出したりゾレシチンと極めて類似している。

2) 溶血価

各被検物質の溶血価は第 1 表に示した。エーテル不溶部からの抽出物は何れも 18 万倍の溶血価を示し、米から抽出したりゾレシチンの約 1/2 の溶血力である。エーテル可溶部は 1.200 倍の溶血価を示したが之はおそらく脂酸或はリゾレシチンの混入している為と思われる。

の溶血力を示した。又この価は白米より抽出したりゾレシチン結晶の溶血価に比較して稍々ひくく約 1/2 程度であるが、先に吉岡³⁾ が淋巴腺、脾その他の臓器を孵卵器内で自己融解させて得たものと略々同程度である。この事から考えると本物質は組織の自己融解に依つて生じたりゾシチンである事は明かである。

結 論

チンである事を確定した。

第1編に於て結核病竈中に発見された溶血性物質を精製して行くとその溶血性が10倍迄高められ、針状結晶物として折出され白米からとられたリゾレシチンと比較し之が組織破壊に依つて生じたりゾレシ

文 献

- | | |
|--|--|
| <p>1) 岩田元只：白米中の Lyaolecithin に就て，日農化誌，6，759 (1930)</p> <p>2) 平尾菅雄：Lysolecithin の溶血作用に就いて，日農化誌，6，739 (1930)</p> <p>3) 吉岡正夫：体内に発生する溶血性物質及びその</p> | <p>生体に及ぼす影響に關する研究，日体質誌，17～1，16 (1953)</p> <p>4) L. Kofler：Ber. d. Deuch. Phanmaz. Ges. 22，203 (1912)</p> |
|--|--|

Studies on the Hemolytic Substance from the Animals Infected
with Tubercle Bacillus

Part 2. Chemical Studies on the Hemolytic Substance

By

Minoru KOBAYASHI

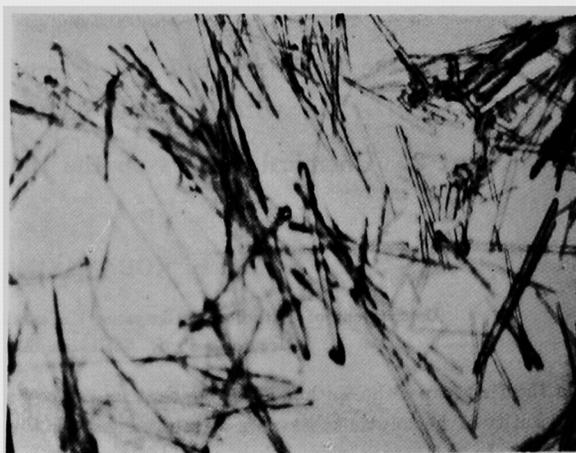
Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Satimaru SENO)

In the first paper the author reported that in the course of tuberculous infection a fairly large quantity of hemolytic substances were produced in the organs, especially in lymph nodes and spleen. In this paper the author reports the studies on the chemical nature of them. Dissolving the brownish viscous substance from the acetone insoluble fraction in pure ethanol, the substance was precipitated as the Cd-salt by adding cadmium chloride solution. Precipitant was dissolved in chloroform and removed Cd by centrifugation after adding ammonium alcohol. The supernatant was dried and dissolved in pure ethanol. By drying again under a low pressure white needle-like crystals have been obtained. This substance proved to hemolyze completely the rabbit erythrocytes suspended in the saline solution in the concentration of $55 \times 10^{-5}\%$. Comparing these crystal forms, hemolytic activity and the solubility in the organic solvents with those of the pure lysolecithin obtained from the rice grain, it is proved that these hemolytic substances are nothing but lysolecithin. The substance from the acetone soluble fraction is fatty acids produced by the decomposition of lecithin.

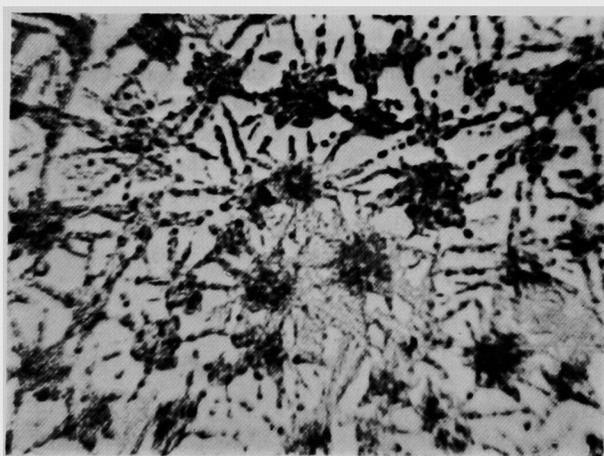
小 林 論 文 附 図



(1) 脾から抽出した Lysolecithin 結晶



(2) 白米から抽出した Lysolecithin 結晶



(3) 淋巴腺から抽出した Lysolecithin Cadmium 塩結晶