

強毒結核菌より抽出せる Sulfolipid の精製

伊藤 文雄*

Charles M. Coleman · Gardner Middlebrook**

* 大阪大学医学部第二内科学教室

** National Jewish Hospital at Denver

受付 昭和 36 年 7 月 11 日

緒 言

さきに Middlebrook ら²⁾³⁾ は強毒結核菌が中性赤に易染することを報告したが、近年さらにこの中性赤固定に関与する結核菌菌体成分の抽出を試みた結果、新しい型の脂質を得た¹⁾。本脂質は 0.05 % decylamine 含有 hexane で湿潤生菌より抽出され、強い抗酸性を示す。silicic acid-celite, silica gel あるいは silica gel-celite により精製した結果、本脂質は最初予想されたごとく phospholipid ではなく、硫酸基を有する sulfolipid であることが認められた。一部精製した sulfolipid は薄い褐色で、強い抗酸性を呈し、1.1 % の硫黄を含んでいた。さらに赤外線分光分析および核磁気共鳴検査の結果、本脂質の構造に関し、次のごとく点か明らかとなつた。

1. メチル側鎖脂肪酸の存在を示唆する相当数のメチル基が存在する。
2. 少数のアルコール性 OH 基をもつ。
3. 赤外線分光分析による $1,020\sim 1,060^{-1} \text{ cm}$ および $1,140\sim 1,200^{-1} \text{ cm}$ における吸収帯は硫酸基のそれに一致する。
4. $\alpha\text{-}\beta$ 不飽和脂肪酸を含まない。
5. カルボキシル酸エステルの吸収 ($1,740^{-1} \text{ cm}$) はあるが、遊離のカルボキシル酸 ($1,720^{-1} \text{ cm}$) のそれはないか、あつてもわずかである。

培地 1 l あて 1 millicurie の S^{35}O_4 を含む培地に培養した H_{37}Rv 株からの粗抽出物はかなりの量の S^{35} を含んでおり、本抽出物をクロマトグラフィーにて精製した結果では、その放射能と中性赤固定能とはよく平行していた。

本論文においては、 H_{37}Rv 株加熱死菌(湿菌)から抽出せる sulfolipid の精製方法について報告する。

実験方法および実験成績

Wong 変法培地* に 4 週間表面培養した H_{37}Rv 株を集菌し、 75°C 30 分間蒸気滅菌したものを材料とし、前報¹⁾ に報告した方法により粗抽出物を得た。ただし

最近では、decylamine の代わりに octylamine を用いている。

粗抽出物からの sulfolipid の精製は次の原理に従つて行なつた。

1. sulfolipid は -22°C において ethanol に可溶である。
2. sulfolipid の Na 塩あるいは NH_4 塩は、加温時には methanol または acetone に可溶であるが、 -22°C では比較的溶解し難い。

* Wong 変法培地

500 ml の蒸留水に下記のものをもその順に溶解し、後全量を 1,000 ml とする。

malic acid	3.0 gm
NH_4OH (28 %)	4.3 ml
$\text{NH}_4\text{-citrate}$	5.0 gm
KH_2PO_4	6.0 gm
Na_2CO_3 anhydrous	2.0 gm
NaCl	2.0 gm
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.0 gm
Fe-acetate	0.05 gm
glycerol	5.0 ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
Na-pyruvate	500.0 mg

28 % NH_4OH 約 1 ml で pH 6.8 に調整し、蒸気滅菌後、100 ml ずつに分注、各瓶に 50 % glucose 6 ml ずつを加える。

3. sulfolipid の Na 塩あるいは NH_4 塩は、silicic acid-celite によるクロマトグラフィーにより精製する。

これらの原理を種々に組み合わせて応用した。

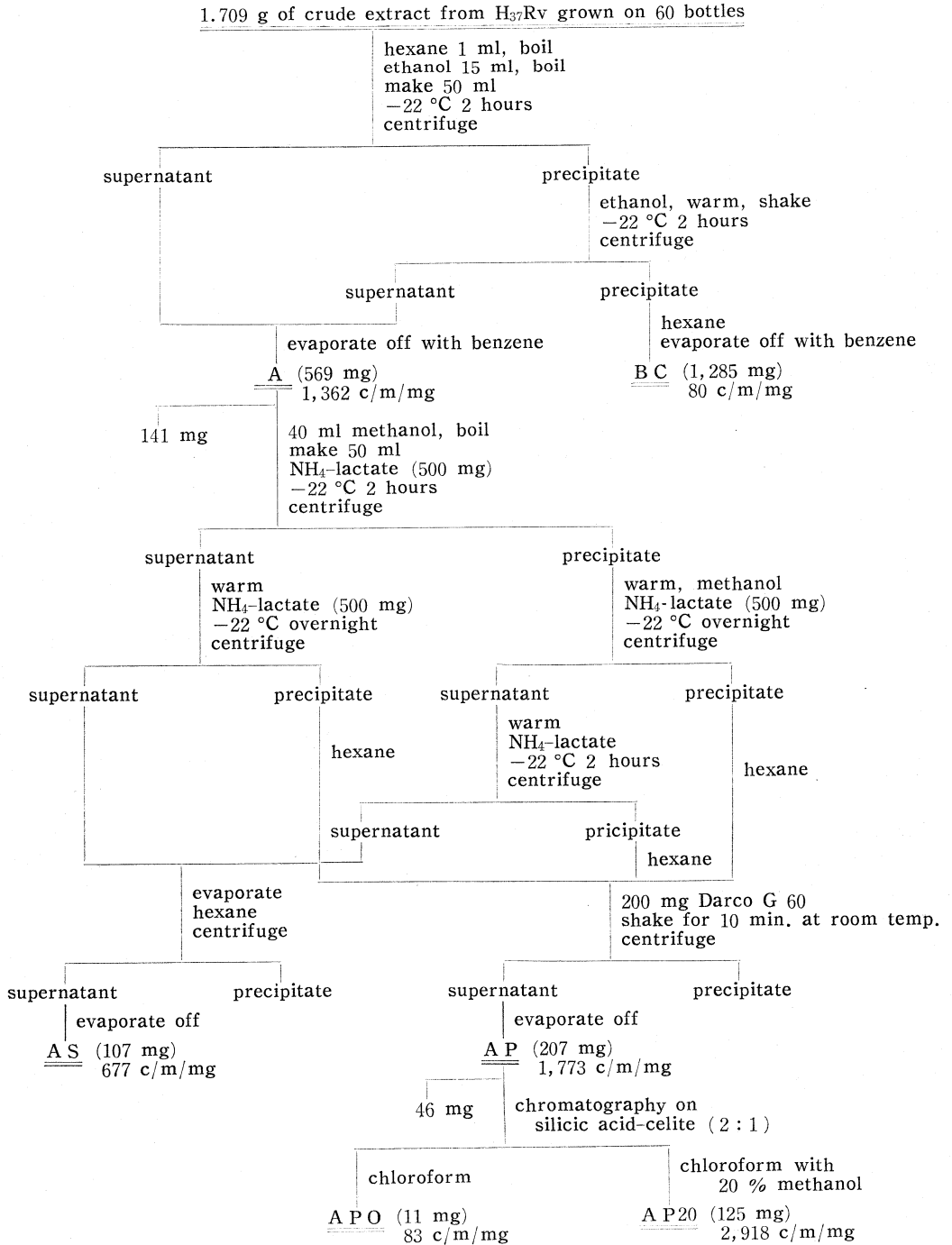
sulfolipid 精製度の追及には、通常赤外分光光度計による赤外線吸収を用いたほか、時には、 S^{35} による放射能測定を行なつた。

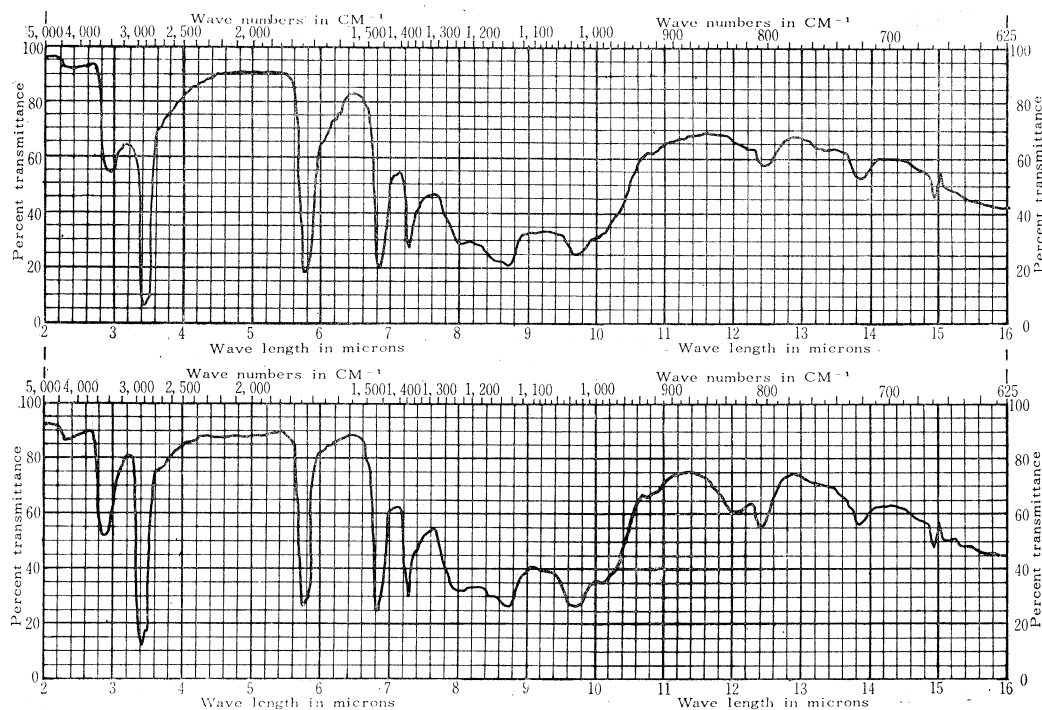
われわれは多くの実験を反復施行したが、ここでは次

の2つの実験成績について述べる。1つは S^{35} を用いたものであり、他の1つは赤外吸収スペクトルのみにより追及したものである。

〔実験 1〕
精製の過程ならびに精製物の収量については Table 1 に示した。

Table 1
Purification from Hexane-Decylamine Crude Extract from Cells of the $H_{37}Rv$ Grown on Wong's Medium Containing S^{35}





(Above fraction A, Below fraction AP20)
 Fig. 1. Infrared absorption spectrograph of fraction A and AP20.

本実験においては、 S^{35} を 1 mc/l の割りに含む培地 (1本 100 ml) 60本に培養せる $H_{37}Rv$ 株から hexane-decylamine により抽出した粗抽出物 1.709 g を用いた。この粗抽出物を 15 ml の ethanol で反復加温抽出し、これを4つの 50 ml 有栓遠心管に分注、この抽出溶液を2時間 -22°C に放置後遠心沈澱し、その上清を分離、沈澱は再度熱 ethanol で抽出、再び -22°C に2時間放置後遠心沈澱した。この両上清を合して、benzene 添加のもとに窒素ガス下で蒸発乾燥せしめ、これを Fraction A とした。沈澱は hexane に溶解後、蒸発乾燥せしめ、これを Fraction BC とした。かくして得られた Fraction A 428 mg を、 40 ml ついで 10 ml の methanol で加温抽出し、可溶成分を 50 ml の有栓遠心管にとり、これに ammonium lactate 500 mg を加えて、 -22°C 2時間放置後遠心沈澱した。この操作を Table 1 のごとく、反復施行したのち、これらの上清を蒸発乾燥せしめ、剰余の ammonium lactate を除くため hexane に溶解して、低温で遠心沈澱し、その上清を再び蒸発乾燥せしめ、この劃分を Fraction AS とした。このさい得られた Fraction AS は 107 mg であった。一方前述の沈澱を hexane に溶解、活性炭 (Darco G 60) で室温処理することにより着色物質をできるだけ除去し、遠心して上清をとり、これを乾燥せしめて Fraction AP とした。このさ

いの Fraction AP の収量は 207 mg で、sulfolipid は本劃分中に含まれていた。ついでこの Fraction AP の 161 mg につき、クロマトグラフィー (silicic acid 16.1 gm と celite 8.05 gm を混合使用) を行ない、chloroform のみで溶出される劃分を Fraction APO、 20% methanol を含む chloroform で溶出される劃分を Fraction AP20 とした。これら劃分を乾燥せしめ、それぞれ 11 mg 、 125 mg の収量を得た。これら各劃分の放射能を検した結果は、Table 1 に示したごとくで、精製とともに放射能は上昇した。赤外分光分析の成績は実験2で得た Figure 1 と同様であり、放射能の上昇と平行して精製されており、sulfolipid は Fraction AP20 中に含まれているのが認められた。

〔実験 2〕

精製方法ならびに各劃分の収量は Table 2 に示した。本実験においては、 254 本の培地に培養した $H_{37}Rv$ 株からの hexane-octylamine 粗抽出物 6.88 g を用いた。まず 200 ml の有栓遠心管を用いてさきの実験1と同様の処理を行ない、Fraction A $2,135\text{ mg}$ および Fraction BC $4,196\text{ mg}$ を得た。sulfolipid は methanol に溶解加温するとき、その濃度が高すぎると破壊されやすいことを認めていたので、Fraction A は4つの beaker に分けて採取し、そのおのおのから 40 ml 、ついで 10 ml の methanol で加温抽出し、

これらの抽出液を 200 ml の有栓遠心管に合し、これに 300 mg の sodium lactate を添加して、 -22°C に 2 時間以上放置した。この操作を Table 2 のごとく反復施行して、沈渣および上清をそれぞれ別に合併した。この上清を benzene 添加のもとに窒素ガス下で蒸発乾燥せしめてのち、再び hexane に溶解、遠心して剰余の sodium lactate を除去し、再び同様に蒸発乾燥せしめて Fraction A S を得たが、この劃分中には赤外分光分析により sulfolipid を発見できなかった。

一方沈渣は hexane に溶解、50 ml 遠心管に移してのち、sodium lactate を除去するため低温で遠心し、その上清を活性炭で処理し、これを benzene 添加のもと、窒素ガス下で蒸発乾燥せしめた。かくして得られた Fraction A P は 783 mg であつた。この Fraction A P を silicic acid-celite (それぞれ 78.3 g, 39.15 g を混合使用) でクロマトグラフィーにかけ、614 mg の Fraction A P 20 を得た。sulfolipid は本劃分に含まれ、他の劃分中には見だされなかつた。さらに本劃分の 10% hexane 含有 acetone 溶液に sodium iodide を加えて -22°C で沈澱せしめ、この沈渣を前と同様、hexane に溶解後乾燥せしめ、かくして Fraction A P 20 P 532 mg を得た。精製された sulfolipid の大部分は、この Fraction A P 20 P 中に含まれており、上清から得られた Fraction A P 20 S にはわずかしき含まれていなかった。

Fraction A および Fraction A P 20 の赤外分光分

析の成績は Figure 1 に示したごとくである。

これらの操作中、methanol 中で加温するとき以外は、sulfolipid は安定であつた。それゆえ methanol 中で加温する場合には、多量の methanol を使用することが必要である。

総 括

人型結核菌 $H_{37}\text{Rv}$ 株の加熱死菌菌体からの hexane-decylamine または hexane-octylamine 粗抽出物より、sulfolipid の精製を試み、ethanol, methanol あるいは acetone による沈澱、silicic acid-celite によるクロマトグラフィーを応用し、かなり純度の高い sulfolipid を得た。

本研究は U. S. P. H. S., National Institute of Health, Institute of Allergy and Infectious Disease よりの grant, No. E-3455 によつて行なつた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) Middlebrook, G., Coleman, C. M. & Schaefer, W. B.: Proc. Nat'l. Acad. Sci., 45: 1801, 1959.
- 2) Dubos, R. J. & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 58: 698, 1948.
- 3) Middlebrook, G.: Bull. N. Y. Acad. Med., 26: 498, 1950.

Purification of Sulfolipid from Virulent Tubercle Bacilli. Fumio ITO (The Third Department of Internal Medicine of Osaka University Medical School) Charles M. COLEMAN and Gardner MIDDLEBROOK (National Jewish Hospital at Denver)

Introduction

Middlebrook *et al*¹⁾ have reported a new type of chemical substance from virulent tubercle bacilli, which was obtained during the course of attempting to get a material responsible for the fixation of neutral red^{2,3)} by these organisms. This substance was extracted from moist living bacilli with hexane containing 0.05% of decylamine and was sulfolipid. Further analyses showed the following about the structure of this material: The material contained a high proportion of methyl groups, a small proportion of alcoholic hydroxyl groups, no α - β unsaturated fatty

acids, and it contained a prominent carboxylic acid ester but little or no free carboxylic acid. Furthermore, it contained sulfonic acid.

In this paper, methods for purification of sulfolipid extracted from heat-killed moist cells of the $H_{37}\text{Rv}$ strain will be reported.

Experimental Methods and Results

Cells of the $H_{37}\text{Rv}$ were harvested from four-week-old surface cultures on Wong's medium and were killed by steaming at 75°C for 30 minutes. Crude extracts were prepared as described in the original paper¹⁾. But more recently octylamine has been used instead of decylamine.

The following principles were applied for purification of sulfolipid: Solubility in ethanol at -22°C , insolubility of sodium or ammonium salts in methanol or acetone at -22°C and separation by chromatography on silicic acid-

selite.

The purification of sulfolipid was checked mainly by infrared spectrophotometry and sometimes by radioactivity.

Two experiments were described in this paper. One of them is an experiment in which S^{35} has been used and the other has been checked only by infrared spectrophotometry, but in this abstract, only one experiment will be described.

6,880 g of hexane-octylamine crude extract from cells of the $H_{37}Rv$ grown on 254 bottles of the medium were used for this experiment. The crude extract was extracted with hot ethanol and pooled to a 200 ml screw-cap centrifuge tube and centrifuged after 2 hours at $-22^{\circ}C$. These procedures were repeated twice. Both supernatants were evaporated with benzene under nitrogen gas, and were called "Fraction A" (2135 mg). The precipitates were dissolved in hexane and evaporated as above. This fraction (Fraction BC) was 4,196 mg. 40 ml and then 10 ml of methanol were added to each beaker of Fraction A divided into four beakers and heated. The extracts were pooled to a 200 ml screw-cap centrifuge tube. 300 mg of sodium lactate were added and the solution was centrifuged after 2 hours at $-22^{\circ}C$. These procedures were repeated twice, and supernatants and pre-

cipitates were collected, respectively. The precipitates were dissolved in hexane and centrifuged in order to remove sodium lactate. The supernatant was treated with activated charcoal and evaporated to dryness with benzene. 783 mg of Fraction AP were obtained. Fraction AP was chromatographed through silicic acid-celite with chloroform and then eluted with chloroform containing 20 % of methanol. Each fraction was evaporated and "APO" and "AP20" (614 mg). Sulfolipid was contained in this Fraction AP20 and not in any other fraction. The precipitation with sodium iodide from solution in acetone containing 10 % hexane of Fraction AP20 was done at $-22^{\circ}C$ for two hours. The precipitate obtained was dissolved in hexane and evaporated to dryness. This fraction was called "Fraction AP20P" and weighed 532 mg. Purified sulfolipid was contained in this fraction.

During these procedures sulfolipid was stable except when boiling with methanol. Much methanol was required for the extraction process.

Summary

Purified sulfolipid was obtained from crude extracts of heat-killed cells of the $H_{37}Rv$ strain of human type tubercle bacilli by precipitation from ethanol, methanol or acetone and chromatography on silicic acid-celite.