

家兔腎臓及び肝臓より分離した Ribo- 核酸標本の核酸効果について

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本教授)

正 印 達
Susumu Shoin

得 田 与 夫
Tomoo Tokuda

伊 藤 佐
Tasuku Ito

山 本 助 五 郎
Sukegoro Yamamoto

北 川 秀
Shigeru Kitagawa

(昭和30年6月15日受附)

Susumu Shoin, Tomoo Tokuda, Tasuku Ito, Sukegoro Yamamoto, Shigeru Kitagawa : On the Streptolysin-S Formation Enhancing Activity of Ribonucleic Acids isolated from Kidney and Liver of Rabbits.

1939年岡本教授によつて「核酸による溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象、即ち核酸効果」が発見せられ、これを契機として、従来全く停頓状態にあつた Streptolysin-S 問題の研究は一大進展を来し、「今や内外学者の精緻な研究と相俟つて Streptolysin-S 問題の全面的解決を見るに至ると共に、核酸効果は Ribo-核酸のもつ特性的生物学的機能の標示として核酸の機能、代謝、構造を追求する好個・重要の手段となつてきたのである。処で核酸効果は酵母より分離した Ribo-核酸、所謂酵母核酸 (Yeast nucleic acid) を加えたブイオン或いは血液寒天に溶連菌を移植培養することによつて極めて容易、且

つ顯著に検証しうるのであるが、ここに当然、酵母核酸以外の Ribo-核酸では核酸効果如何の問題がおこつてくるのである。この問題に関し Bernheimer²⁾ は牛の肝臓、小麦胚及び溶連菌から分離した Ribo-核酸を以てした核酸効果の試験で何れも陽性成績が得られたに對し、煙草モザイクウイルス」から分離した Ribo-核酸は陰性成績を示したと報告している以外には、尙検索されていないという現状である。

私等は今回家兔の腎臓及び肝臓より分離した Ribo-核酸が果して核酸効果を呈するか否かについて検索の歩を進めた処、何れも陽性成績が得られたので以下その成績を報告する。

実 験 方 法

I. 家兔腎、肝よりの Ribo-核酸標本の分離

岡本教授等の核酸効果に関する研究は、当初

専らメルク製酵母核酸 (Yeast nucleic acid "Merck") が使用されていたのであるが、その後細谷、江上²³⁾等によつて「酵母核酸をつくる場合 Baumann²⁴⁾法や Levene²⁵⁾法のように精製過程にアルカリ性になる製法で作られた核酸は無効であるに反し、Clarke & Schryver²⁶⁾法のようにアルカリ性になる過程の無い製法で作られた核酸には溶血毒素増産作用が強い」ということが報告されたことに鑑み、私等は家兎の腎臓及び肝臓より Ribo-核酸を分離するに当つては、分離操作の比較的緩和なる Kerr & Seraidarian²⁷⁾法に準ずることとした。

即ち

1) 家兎 (2.4kg♂及び2.5kg♂) を頸動脈切断により殺し、直に腎臓 (24g)、肝臓 (80g) を取出し、結締織、脂肪組織等を除き、夫々の臓器に対し低温 (水中) 下、次の諸操作を行う。

2) Homogenizer により粥状となし、1.5倍量の 0.14M 食塩水を加え1時間攪拌、

3) 次で遠心分離 (3,000 r.p.m. 30') により上清液を分取す (第 I 上清液)、沈渣に対し更に粥状、遠心沈澱の操作を行つてここに得た上清液即ち第 II 上清液を第 I 上清液に混ず (ラクス中性)。

4) この混液を N-HCl にて pH 4.2 となし (白濁)、2.5時間水中に放置後、遠心分離 (4,500 r.p.m. 30') に附し沈渣に対し、次の操作を行う。

5) 沈渣の処理 :

0.14M 食塩水を肝沈渣には 60cc、腎沈渣には 18cc 加えた後、冷却下で10%炭酸ソーダを滴下して溶解せしめる (pH 6.8)、次で食塩を肝並びに腎溶液に夫々 10.8g、並びに 3.24g 宛を加えて半飽和食塩溶液 (3M) となし、氷室に放置、

6) 38時間後この液を N-HCl で pH 4.2 とし、1.5時間水中に静置、後遠心 (4,000 r.p.m. 10') す。

7) ここに得た上清液に冷却・攪拌下で 96% 冷アルコール」の 3 倍量を加えて30分間放置、

遠心分離によつて沈渣を分取す (上清液は捨てる)。

8) 沈渣には原臓器の $\frac{1}{2}$ 相当量の冷蒸留水を加え、10%炭酸ソーダで中性となして完全に溶解せしめた後、0.2 N-HCl を加えて pH 4.2 となし暫時放置後、遠心分離 (4,000 r.p.m. 10') に附す。

9) 上清液に 3 倍量の 96% 冷アルコール」を加え1時間放置後、遠心分離して上清液を捨てる、肝沈渣につき再度 8) 以下の操作を施してから、次の 10) の操作に移つたが、腎沈渣に対しては少量のため直に 10) の操作を行う。即ち

10) 夫々の沈渣に対し再度アルコールによる洗滌操作を施した後、エーテル処理を行つてデシケータ中で乾燥す。得られた

核酸標本は淡褐色粉状で收量は

肝臓より 49.4mg (La-標本)

腎臓より 11.0mg (Ka-標本)

何れも Orcin 反応強陽性、蛋白反応陰性。

[附] 8) の行程で得られた沈渣に対しアルコール、エーテル、乾燥の諸経過を施して、肝からは Orcin 反応陽性の淡褐色粉末 11.8mg (Lb-標本) を得たが、腎では收得物は 1mg 以下であつた。

因に第 I 表は腎臓よりの Ribo-核酸分離過程を示したものである。

II. 腎及び肝から分離した Ribo-核酸標本についての核酸効果試験

1) 菌株 :

当研究室保存の溶血性連鎖球菌 "S" 株を使用。

2) 供試 Ribo-核酸標本 :

a) 肝臓より分離した La-標本及び Lb-標本

b) 腎臓より分離した Ka-標本

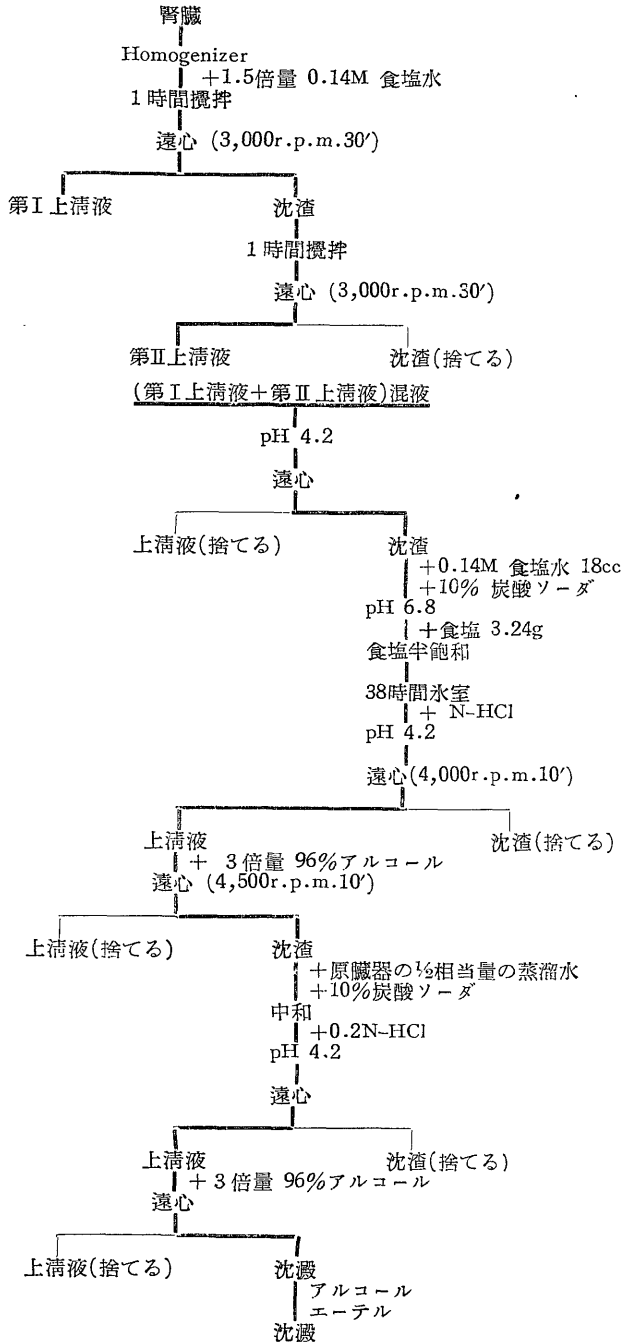
c) 酵母核酸 (Merck)

これら各核酸標本の10%中性水溶液 (Na₂CO₃ にて中和) を調製し、100°C、20分の処置を 2 回施す。

3) 核酸加ブイオン培地の調製 :

普通ブイオン (pH=7.6) を以て、無菌的操作のもとに前記各供試 Ribo-核酸標本の10%中性水溶液を10倍に稀釈したもの、即ち 1%核酸加ブイオン (pH=7.6) を調製す。

第 I 表



4) 培養 :

- a) 1% La-核酸加ブイオン培養 (pH=7.6) 1cc
- b) 1% Lb-核酸加ブイオン培養 (pH=7.6) 1cc

- c) 1% Ka-核酸加ブイオン培養 (pH=7.6) 1cc
- d) 1%酵母核酸加ブイオン培養 (pH=7.6) 1cc
- e) 普通ブイオン (pH=7.6) 1cc

以上5つの培地に溶連菌“S”株の24時間普通ブイオン培養の1白金耳宛を接種し、37°Cの孵卵器中に30時間培養す。

5) 溶血試験 :

上記5つの溶連菌培養液を遠心沈澱に附し、菌体並びに沈澱物を除去せしめ、ここに得られた5つの上清液について、夫々の溶血力の有無強弱如何を試験した。而して溶血試験は従来当研究室で採用して来た被験上清液の生理的食塩水による通下稀釈液 1cc に対し1%家兎脱纖維血球浮游液 1cc を加え、37°C に2時間静置後、一旦成績の判定を行い、更に22時間水室に納めて溶血成績を判読する方法によつた。

実験成績

第II表は家兎肝、腎より分離したRibo-核酸即ちLa、Lb及びKaの各標本、並びに酵母核酸を以ての核酸効果を試験し得た成績である。

今溶血試験24時間目の成績について見るに何ら核酸を加えない普通ブイオン(対照)に溶連菌を培養したものでは僅かに1:8稀釈迄しか溶血作用を呈しないに対し、1%酵母核酸加ブイオン培養では1:8, 192という高稀釈迄溶血作用が起つている。而して家兎の肝より分離したRibo-核酸標本(即ちLa及びLb)並びに腎より分離したKa-標本を1%に加えたブイオン培養では、其の何れにあつても1:4,096倍迄溶血作用が起つている。即ち此の成績は肝、腎何れの臓器から分離したRibo-核酸でも顕著な核酸効

果を呈することを明示するものである。

第II表 溶血試験

溶連菌培養	判定時間	培養上清液の希釈倍数													対照 (清を含まず)			
		2 1:	4 1:	8 1:	16 1:	32 1:	64 1:	128 1:	256 1:	512 1:	1,024 1:	2,048 1:	4,096 1:	8,192 1:		16,384 1:	32,768 1:	
1%酵母核酸加 ブイオン (pH=7.6)	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
1%腎 Ribo-核酸 (Ka) 加ブイオン (pH=7.6)	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
1%肝 Ribo-核酸 (La) 加ブイオン (pH=7.6)	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
1%肝核酸 (Lb) 加ブイオン (pH=7.6)	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
	24	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
普通ブイオン (pH=7.6)	2	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

卍=完全溶血； 卍, 卍, +, ±=不完全溶血； —=非溶血

結 論

家兎の肝並びに腎から分離した Ribo-核酸について、これが何れも溶連菌の溶血毒産出を高

度に促進増強することを実証した。

文 献

1) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 12, 167, 1940. 2) Bernheimer, A. W. and Rodbart, M. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948. 3) 細谷・林・森・江上・鈴木 : 基礎と臨床, 1, 205, 1948. 4) Baumann, E. : J. Biol. Chem., 61, 1, 1924.

5) Levene, P. A. : Z. Physiol. Chem., 45, 370, 1905. 6) Clarke, G. and Schryver, S. B. : Biochem J., 11, 319, 1917. 7) Kerr, S. E. and Seraidarian, K. : J. Biol. Chem., 180, 1263, 1949.

Summary

Ribonucleic-acid preparations were isolated from kidney and liver of rabbits according to the Kerr & Seraidarian's method and it was

demonstrated that both ribonucleic-acid preparations are about as active in causing streptolysin-S formation as yeast nucleic acid "Merck".