612.015.21：612.419：612.396.11

骨髄抽出多糖類物質に関する研究

第　1　編

骨髄多糖類物質の抽出分離法及びその性状と ペーパー・クロマトグラフイー

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木　潔教授）

専攻生　高　木　良　二

〔昭和30年2月20日受稿〕

内　容　目　次

第1章　緒　　言
第2章　実　　験
　第1節　骨髄多糖類物質抽出分離法
　　第1項　使用骨髄
　　第2項　抽出分離法
　第2節　骨髄抽出多糖類物質の理化学的性状
　　第1項　外観及び溶解性
　　第2項　Molisch 反応
　　第3項　Fehling 氏液還元力
　　第4項　Biuret 反応
　　第5項　Tiselius 試験
　　第6項　Xanthoprotein酸, Sulfosalicyl酸並に Ninhydrin 反応
　　第7項　加水分解後還元性物質の定量試験
　　第8項　元素分析成績
　第3節　毒性試験
　第4節　正常家兎末梢血液像に及ぼす影響
　　第1項　本物質注射実験
　　第2項　対照実験
　　第3項　熱，アルカリ及び酸に対する抵抗試験
　　第4項　保存実験
　第5節　ペーパー・クロマトグラフイー
　　第1項　実験方法及び材料
　　第2項　実験成績
第3章　総括並に考按
第4章　結　　言

第1章　緒　　言

一般に天然物に基因する生物学的物質，特に多糖類並に蛋白等の高分子化合物を取扱う場合，常に遭遇する困難の一つは如何にして本物質を純粋に抽出分離するかと云う事である．それ故，細菌学の領域に於ても，かなり古くから本物質の抽出が行われているにも拘らず，種々の方法が考案実施されている現状である．而して最近とみに之等の多糖類は生物学，生理学並に医学的にその重要性を認められて来たにも拘らず，骨髄中の多糖類物質に関しては，その抽出の困難なためか，研究が極めて少く，柳沢[69]が骨髄より多糖類様物質を抽出分離し実験的瀉血貧血家兎に応用しているに過ぎない．よつて私は骨髄多糖類物質の生物学的作用機転研究の第一階段として，仔牛赤色骨髄より多糖類物質の抽出分離を試みた．

扨て前述の如く抽出分離に際し蛋白質，塩類及びその他の夾雑物を如何にして分離除去するかと云う事は最も重要な問題であつて，之がため従来より除蛋白法として三塩化醋酸法，酸性加熱法，トリプシン消化法，尿素法或はヂエチレングリコール法等種々の方法が考案用いられている．私は可及的純粋に骨髄より，多糖類物質を抽出分離せんがために，従来行われて来た之等の分離法を比較検討し

た結果，人胎盤より抽出した加来[19)20)]の法を応用して，牛赤色骨髄より多糖類物質を抽出分離する事に成功し，その理化学的性状，家兎及びマウスに対する毒性の検討並に正常家兎末梢血液像に及ぼす影響をみた．

尚，多糖類物質等の高分子天然物は，未だ化学的に充分究明されておらず，その構成成分を完全に分離確定する事は甚だ困難である．処がこの困難は Martin[100)]（1944）等の創始したペーパー・クロマトグラフイーによつて著しく軽減せられるに至つた．即ち本法は微量の試料で足りるという事及び操作が比較的簡単で，而も高価な器具を要しない等の利点と相俟つて，特に最初アミノ酸の分離確定に見事な成功を収めた．その後 Partridge[106)707)108)]（1946）により糖類の分野に於ても，その分離検出に応用され，果汁，卵白，羊胎児の血液及び志賀菌の多糖類の加水分解物の構成成分の展開が行われ，急速の進歩を示した．然し乍ら，骨髄中の多糖類物質に就ては未だ之に関する研究報告を見ないので，私は之を応用して前記骨髄抽出多糖類物質の構成単糖の検索をも行つたので報告する．

第2章 実 験

第1節 骨髄多糖類物質抽出分離法

第1項 使用骨髄

赤色骨髄材料は生後1週間以内の雄性仔牛の長管状骨を死後直ちに可及的無菌的に破砕し，肉眼的に全く赤色乃至暗赤色を呈する部分を採取した．

第2項 抽出方法

上記赤色髄約500gを砕肉機にて，採取後直ちに乳剤となし，蒸溜水約1500ccを加え，水浴中にて振盪し乍ら，沸騰するまでに約1乃至2時間を要する如く火熱を加減して加温浸出した．室温にて冷却後ガーゼ5枚にて濾過し，その濾液を20%硫酸銅溶液と6%苛性ソーダ溶液によつて除蛋白した．即ちその濾液5cc宛を試験管6本に取り，夫々 $^1/_{50}$, $^1/_{40}$, $^1/_{30}$, $^1/_{20}$, $^1/_{10}$ 及び $^1/_5$量の20%硫酸銅溶液を加えて濾過し，その濾液が透明になる場合の最小濃度の硫酸銅液の量を見当をつけ，更にその量より少量で而も濾液が透明となる硫酸銅液の可及的最小適当量を決定し，その量の割に加温浸出液に硫酸銅液を加えて濾過する．更にその濾液に就て前述と同様に5cc宛6本の試験管に取り $^1/_{250}$, $^1/_{200}$, $^1/_{150}$, $^1/_{100}$, $^1/_{50}$, $^1/_{25}$ 量の6%苛性ソーダ溶液を加えて，その濾液の透明になる量を見当をつけ，尚更に細くその適当量を決定し，その割に苛性ソーダを加えて濾過し，本濾液に就て，ズルフホサルチル酸溶液にて蛋白陰性なるを確認後，イオン交換合成樹脂を用いて脱塩した．即ちカチオン交換合成樹脂としては Amberlite I. R. 120を直径4cm高さ45cmの円柱とし，アニオン交換合成樹脂は I. R. A. 410を直径4cm高さ50cmの円柱として，該液を1分間90滴の速度で通過せしめて，無機物を除去した．尚イオン交換合成樹脂再生の為には，カチオン交換樹脂には1.5規定塩酸，アニオン交換樹脂には1.5規定苛性ソーダ溶液を用いた．この除蛋白脱塩液は東洋濾紙製 pH指示用紙を用いて，中性に修正した後，約60°Cにて約20ccに減圧濃縮し，後純アルコール400cc，エーテル400ccを加えてよく振盪し，一昼夜氷室に放置し，白色絮状の含水炭素分劃を沈澱せしめた．本沈澱物は1分間3000回転にて10分間遠心沈澱して之を集め，減圧乾燥して得た粉末を更に20ccの蒸溜水に溶解し，上述同様再びアルコール，エーテルによつて沈澱せしめて乾燥し，約0.15gの粉末を得た．本物質は塩化カルシュウム除湿器中に貯蔵した．

第2節 骨髄抽出多糖類物質の理化学的性状

上記抽出分離法によつて得た粉末は次の如き性状を示し，又下記諸反応の結果，夫々以下の如き実験成績を得た．

第1項 外観及び溶解性

白色，非結晶性粉末にして，軽度の吸湿性を有する．水には易溶性で，非透析性である．蒸溜水，生理的食塩水，リンゲル氏液及び20%葡萄糖液には1%に於ても透明によく溶

解し，微淡黄色を呈し，且つ略々中性を示す．10%水溶液に於ては稍々粘稠なる膠質状を呈す．アルコール，アセトン及びエーテルには不溶である．

第2項 Molisch 反応

2mg Per cc の水溶液に就て常法に従つて Molisch 反応を試験した．本濃度では検体は陽性である．

第3項 Fehling 氏液還元力

検体はそのままでは還元性を有しないが，10%塩酸により1時間100°Cにて加水分解後は Fehling 氏液還元性を有する．

第4項 Biuret 反応

2mg Per cc 濃度では陰性である．

第5項 Tiselius 試験

10mg Per cc 水溶液では Tiselius 電気泳動性を証明せず．

第6項 Xanthoprotein 酸，Sulfosalicyl 酸並に Ninhydrin 反応

2mg Per cc 濃度では総て陰性である．

第7項 加水分解後の還元性物質の定量試験

検体100mgを1規定硫酸5ccに溶解し，硬質褐色アンプル中に封入し，100°C水溶液中で4時間加水分解後 Hagedorn-Jensen 氏法により，その還元性物質を葡萄糖に換算したところ，50乃至60%の値を示した．

第8項 元素分析

京大薬学科に依頼して検査した．窒素は Dumas 法により全く認められなかつた．炭素は48.73%，水素は6.36%，灰分は5.13%であつた．

第3節 毒性試験

検体1，3，6，10mg Per cc の生理的食塩水を作成し，100°C蒸気中にて30分間滅菌した後，その0.5ccを15g内外のマウス5匹宛，腹腔内に注射して症状及び生死を10日間観察したが何れの場合も異常を認めなかつた．

検体300，500mg Per 10cc の生理的食塩水を作成し，その10ccを2kg内外の白色雄性家兎2匹宛耳静脈内に注射し，15日間観察したが，何等の異常なく生存した．尚体温上昇も認められなかつた．

第4節 正常家兎末梢血液像に及ぼす影響

実験動物は体重2kg内外の白色雄性健康家兎を用い，購入後10日以上一定の場所に於て，一定の食餌を以て飼育し，生活環境に馴致せしめた後，実験に使用した．

実験材料としては前記骨髄抽出多糖類物質を家兎体重 Per kg 0.5mg，1mg 及び2mgを10ccの生理的食塩水に溶解し30分間100°Cにて滅菌後家兎耳辺縁静脈に注射し，時間的経過を追つて末梢血液像を観察した．

血液諸検査法として，採血は耳辺縁静脈を軽く摩擦し，血管の怒張するのを待つて，注射針を用い穿刺し，湧出する血液を用いた．

赤血球数，血球素量（ザーリー法），白血球数は型の如く測定すると共に塗沫標本を作り，ギムザ染色による白血球種別百分率を算定し，更に網赤血球は1%ブリラント・クレシールブラウ酒精溶液並にギムザ染色を以て染色し，千分率にて表示した．

第1項 本物質注射実験

1. 正常家兎体重 Per kg 1.0mg 1回静脈内注射の場合

4頭の正常家兎を用いた．その成績は第1表，第2表，第3表及び第4表の如く，尚赤血球数（R），血球素量（Hb），網赤血球（Ret）及び白血球数（W）に就て，4例の平均値を曲線に表わせば第1図の如くである．

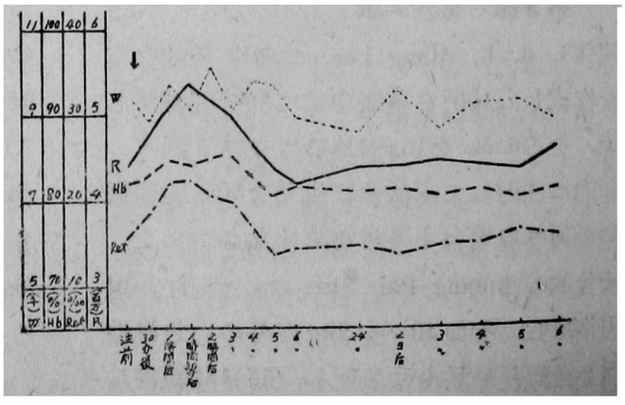
1) 赤血球数．全例に於て注射後漸次増加を示し1時間乃至2時間後最高値を示し，以後次第に減少して4乃至6時間目には略々注射前値に近ずき，爾後6日間に亙り観察するも著変を認めない．即ちNo. 1に於ては注射後1時間30分後に151万，No. 2は1時間30分後に54万，No. 3は1時間後に102万，No. 4は2時間後に103万の増加を示している．

第 1 表　家兎体重 Per kg 1mg. 1回静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 1	注射前	420	78	14	10000	0	1.5	31.5	0.5	5.0	3.0	58.5
	30分後	481	80	15	7900	0.5	1.5	41.5	1.0	3.5	3.0	49.0
	1時間後	520	82	21	9400	0	5.0	55.0	1.0	3.5	3.0	32.5
	1時間30分後	571	83	25	9500	0	3.0	66.0	1.5	3.5	1.0	25.0
	2時間後	520	83	16	10800	0	5.5	68.0	0.5	0.5	0.5	25.0
	3 〃	500	83	18	9900	0	3.5	63.5	1.0	3.5	1.0	27.5
	4 〃	462	80	16	10600	0	2.0	68.0	1.5	1.5	1.5	25.5
	5 〃	430	76	13	10100	0	2.5	57.5	1.0	2.5	1.5	35.0
	6 〃	425	76	15	9000	0	3.0	61.5	1.0	2.0	1.0	31.5
	24 〃	425	76	15	8800	0	2.5	55.0	2.0	2.5	1.0	37.0
	2日後	417	72	14	10400	0	3.0	33.5	1.5	3.0	1.0	58.0
	3 〃	433	75	13	9500	0	0.5	34.5	1.0	3.0	2.5	58.5
	4 〃	414	75	12	10600	0	0.5	39.5	2.0	3.5	2.0	52.5
	5 〃	412	73	16	9600	0	1.0	30.5	2.0	2.5	2.5	61.5
	6 〃	423	73	10	9200	0	1.0	39.5	1.0	2.5	3.0	53.0

第 2 表　家兎体重 Per kg 1mg. 1回静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 2	注射前	440	81	12	8600	0	1.5	30.0	0.5	2.0	1.5	64.5
	30分後	460	81	15	9200	0	2.0	37.5	0	3.0	2.0	55.6
	1時間後	480	82	17	9600	0	2.0	39.5	1.0	1.5	1.0	55.0
	1時間30分後	494	82	16	9200	0	1.0	56.0	0.5	4.0	1.5	37.0
	2時間後	491	84	17	9300	0	1.5	64.0	0	1.0	1.0	32.5
	3 〃	450	82	15	9000	0	1.0	60.0	0	1.5	1.0	36.5
	4 〃	446	79	10	9200	0.5	1.0	56.5	1.5	3.5	2.0	35.0
	5 〃	404	80	9	7800	0.5	1.5	53.0	1.0	2.0	2.5	39.5
	6 〃	392	80	13	9000	0	2.5	53.0	0.5	2.0	0.5	41.5
	24 〃	425	81	11	9500	0	3.5	51.0	0.5	3.5	1.5	40.0
	2日後	435	80	12	8800	0	1.0	37.5	0.5	2.0	2.0	57.0
	3 〃	403	80	13	8400	0.5	3.5	35.0	0	1.5	0.5	59.0
	4 〃	415	80	9	8500	0	1.0	35.5	1.5	2.0	2.0	58.0
	5 〃	428	79	11	9000	0	2.0	31.0	1.0	2.0	2.0	62.0
	6 〃	435	80	12	8000	0	1.5	33.5	0	1.5	2.0	61.5



第1図　本多糖類物質家兎体重 Per kg 1mg静脈注射（4例平均）

第 3 表　家兎体重 Per kg 1mg. 1 回静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 3	注射前	435	75	18	9000	0	2.0	11.0	1.0	2.0	1.5	82.5
	30分後	491	76	24	8200	0	1.5	16.0	1.0	1.0	2.0	78.5
	1時間後	537	79	33	8200	0	3.0	18.5	1.0	3.0	2.0	72.5
	1時間30分後	509	76	28	9600	0	2.0	22.5	0.5	1.0	3.5	70.5
	2時間後	470	77	26	14000	0.5	2.5	40.0	2.0	1.0	2.0	52.0
	3 〃	459	76	24	12000	0	3.0	51.0	1.5	1.5	3.0	40.0
	4 〃	417	75	22	10600	0.5	1.5	52.0	1.0	2.0	3.5	39.5
	5 〃	410	76	13	8400	0	3.0	31.0	1.0	1.5	3.5	60.0
	6 〃	421	75	12	8600	0	2.0	34.5	2.0	1.5	2.0	58.0
	24 〃	402	74	16	7000	0.5	1.5	24.5	0.5	2.5	3.0	67.5
	2日後	412	75	11	10000	0	1.5	10.5	2.0	2.0	1.5	82.5
	3 〃	430	76	13	8000	0	3.0	15.0	0.5	1.0	0.5	80.0
	4 〃	434	74	18	9000	0	1.5	11.0	2.0	1.5	1.5	82.5
	5 〃	432	75	19	9400	0	1.5	14.5	2.0	1.5	2.0	78.5
	6 〃	448	75	22	8600	0	1.5	8.0	2.5	1.5	1.5	85.0

第 4 表　家兎体重 Per kg 1mg. 1 回静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 4	注射前	477	95	18	10300	0	1.5	21.5	0.5	2.5	2.0	72.0
	30分後	480	95	19	10000	0	2.0	36.0	0	1.5	0	60.5
	1時間後	496	96	18	11600	0	4.0	24.0	0	1.5	2.0	68.5
	1時間30分後	570	96	20	8000	0	3.0	31.0	0	2.0	1.5	62.5
	2時間後	580	96	23	6300	0	4.0	44.5	0	1.5	2.0	48.0
	3 〃	576	100	22	5500	0	3.5	59.0	0	1.0	1.0	35.5
	4 〃	518	96	18	8800	0	3.5	42.0	1.5	2.0	1.5	49.5
	5 〃	497	90	19	12400	0	2.5	35.5	1.0	2.0	1.0	58.0
	6 〃	441	95	17	9300	0	3.0	24.0	0.5	2.0	0	70.5
	24 〃	493	92	16	8800	0	1.0	31.0	0.5	2.0	0	65.5
	2日後	485	95	17	9000	0	1.5	27.0	0	2.0	1.0	68.5
	3 〃	509	94	19	8500	0	1.0	24.5	0.5	1.5	0.5	72.0
	4 〃	485	95	19	8700	0	1.0	20.0	1.0	2.0	0.5	75.5
	5 〃	463	93	18	9000	0	1.0	22.5	1.0	2.0	1.0	72.5
	6 〃	495	96	17	9300	0	1.0	22.5	0.5	2.0	1.0	73.0

2) 白血球素量. 赤血球数に略々平行して増減し，注射後1時間乃至3時間後最高に達している. 即ちNo. 1では1時間30分後5%, No, 2では2時間後3%, No. 3では1時間後4%, No. 4では3時間後5%の増加を示している.

3) 網赤血球数. 赤血球，血球素量と略々平行して増加を認める. 即ちNo. 1に於ては1時間30分後11‰, No. 2に於ては1時間後5‰, No. 3に於ては1時間後に15‰, No. 4に於ては2時間後5‰の増加を示している.

4) 白血球数並に種別百分率. 赤血球増多時にも一定の傾向を認め難い. 尚百分率は注射後30分より好中球の増加を示し，淋巴球と好中球の比が逆になるのが目立つ.

2. 家兎体重Per kg 2mg 1回静脈内注射した場合

その成績は第5表の如く，その平均値を以て図示すれば第2図の如くである.

第 5 表　家兎体重 Per kg 2mg. 1回静注例

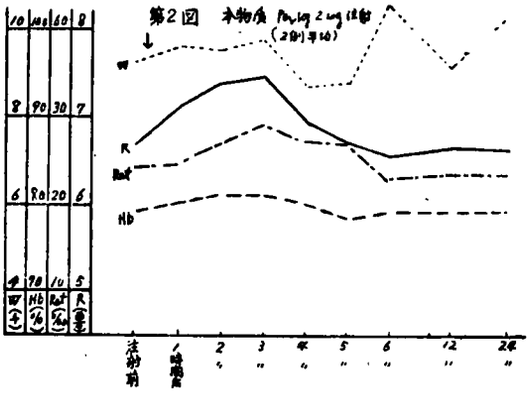
家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 5	注射前	726	77	23	9950	0	1.5	23.5	1.0	1.5	2.5	7.0
	1 時間後	771	78	22	11000	0	1.0	44.5	0.5	2.0	1.5	50.5
	2 〃	813	79	25	10350	0	2.5	64.0	0	1.0	2.0	30.5
	3 〃	807	79	29	11500	0	3.0	53.0	0	3.0	1.0	40.0
	4 〃	772	77	27	9700	0	2.5	29.5	0.5	2.5	1.5	63.5
	5 〃	741	76	27	7800	0	0.5	37.0	0.5	1.5	2.0	58.5
	6 〃	709	77	20	12500	0	1.0	28.5	1.0	1.0	3.0	65.5
	12 〃	711	77	21	10000	0	2.0	25.5	0	1.5	2.5	68.5
	24 〃	720	77	21	12500	0	3.0	24.5	1.0	2.0	1.5	68.0
No. 6	注射前	613	81	25	8500	0	0.5	14.0	1.5	1.5	2.0	80.0
	1 時間後	651	82	27	8200	0	1.0	48.5	2.0	2.0	1.5	45.5
	2 〃	661	83	29	8750	0.5	2.0	73.5	1.0	1.0	1.5	20.5
	3 〃	690	83	29	8000	0	3.5	44.0	3.0	3.0	1.0	48.5
	4 〃	621	83	27	7700	0.5	1.0	27.5	2.0	2.0	0.5	68.5
	5 〃	602	81	27	9750	1.0	1.0	33.5	1.5	1.5	2.0	60.5
	6 〃	604	81	26	8700	0	1.5	31.5	1.0	1.0	1.5	64.5
	12 〃	619	81	26	8250	0	1.5	24.5	1.0	1.0	2.0	69.0
	34 〃	607	81	26	8100	0	0.5	17.0	1.0	1.5	2.0	78.0

1) 赤血球数. 前者同様, 注射後2乃至3時間で最高に達し, 以後漸次減少し旧に復している. 即ちNo. 5に於ては2時間後に最高に達し813万となり87万の増加を示し, No. 6に於ては3時間後に最高690万を示し77万の増加を認める.

2) 血球素量. 赤血球数に略々平行して増減を示している.

3) 網赤血球数. 赤血球数並に血球素量に略々平行して増減を示している.

4) 白血球数並に百分率. 2例共に一定の傾向を認め難い.



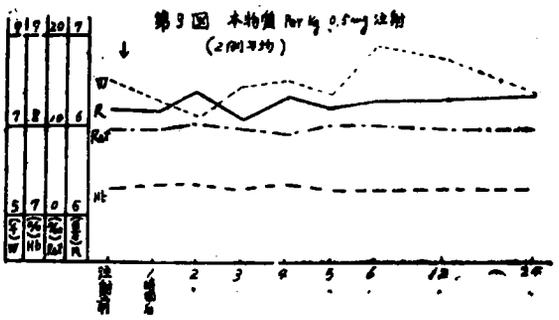
第 6 表　家兎体重 Per kg 0.5mg. 1回静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 7	注射前	635	64	11	8750	0	1.0	27.0	1.0	1.5	2.0	67.5
	1 時間後	631	65	12	8700	0	1.5	35.5	1.5	0.5	2.0	59.0
	2 〃	652	65	11	6650	0	1.0	37.0	0.5	0	1.5	60.0
	3 〃	621	64	13	7400	0	2.0	33.0	0.5	1.0	1.0	62.5
	4 〃	647	65	10	7400	0	1.0	33.0	1.0	1.0	2.0	62.0
	5 〃	630	64	9	7900	0	1.5	18.5	1.5	1.5	2.0	75.0
	6 〃	650	64	12	9100	0	1.5	27.5	1.5	0.5	1.5	67.5
	12 〃	632	64	12	8850	0	1.5	25.5	2.0	1.0	1.0	69.0
	14 〃	640	64	12	7500	0	0.5	30.0	1.5	1.0	1.5	65.5

No. 8	注射前	602	82	8	7250	0	0.5	22.0	0.5	2.0	3.0	72.0
	1時間後	600	82	7	6500	0	1.0	24.5	0.5	2.0	1.5	70.5
	2 〃	623	82	9	7700	0	1.0	34.0	1.0	1.5	3.0	59.5
	3 〃	597	82	6	8300	0	0.5	31.0	1.0	1.5	2.5	63.5
	4 〃	616	82	8	8650	0	1.0	22.5	0.5	2.0	3.0	71.0
	5 〃	607	82	11	7500	0	1.0	29.0	0.5	2.0	2.0	65.5
	6 〃	601	82	8	8400	0	0.5	29.0	1.5	2.0	3.5	63.5
	12 〃	623	82	7	8200	0	1.0	19.5	0.5	3.0	1.0	75.0
	24 〃	625	82	7	7950	0	1.0	23.0	1.0	2.0	1.5	71.5

3. 家兎体重 Per kg 0.5mg 1回静脈内注射した場合

その成績は第6表の如く，その平均を図示すれば第3図の如くである．



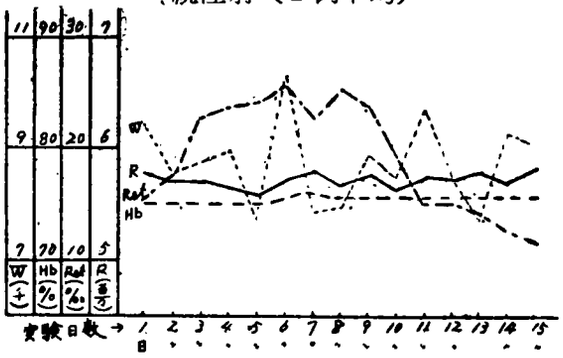
赤血球数，血球素量，網赤血球数，白血球数並にその百分率は何れも生理的動揺範囲内を上下し，著変を認めない．

4. 家兎体重 Per kg 1mg毎日1回宛10日間連続注射した場合

血液検査は何れも毎日注射前に行い，注射修了中止後も尚5日間に亘り観察した．その成績は第7表及び第8表に示す如くであり，その平均を図示すれば第4図の如くである．

即ち赤血球数，血球素量，白血球数に於ては著明な変化を認めないが，網赤血球数は実験日数と共に漸次増加し，実験第10日目頃まで増加を示すが，爾後再び減少し旧に復している．

第4図　本物質 Per kg 1mg 10日連続注射（2例平均）



第 7 表　家兎体重 Per kg 1mg. 毎日1回10日間静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数（万）	血球素量（%）	網赤血球（‰）	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 9	注射前	519	69	10	7650	0	1.5	34.5	0.5	3.0	3.0	57.5
	1日後	532	69	12	8200	0	2.5	43.5	1.5	2.5	1.0	49.0
	2 〃	504	69	17	8800	0.5	2.5	64.0	0.5	2.0	1.0	29.5
	3 〃	516	69	18	8300	0	1.5	47.5	0.5	2.0	1.0	47.5
	4 〃	504	69	17	9300	0.5	2.0	71.0	1.0	2.5	0.5	22.5
	5 〃	513	70	17	9400	0.5	2.5	65.5	1.0	2.5	0	28.0
	6 〃	512	70	17	6950	0	3.0	68.5	0.5	2.0	2.5	23.5
	7 〃	501	69	17	7800	0	2.5	65.0	0.5	2.5	2.0	27.5
	8 〃	523	69	17	9750	0.5	1.0	64.0	1.0	2.0	0	31.5
	9 〃	500	69	17	7600	0.5	2.5	61.5	1.0	2.0	2.5	30.0
	10 〃	511	69	13	10000	0.5	2.0	65.0	0.5	2.0	1.5	28.5
	11 〃	529	69	13	9050	0	1.5	56.5	1.0	3.0	2.5	35.5
	12 〃	513	69	9	8200	0	2.0	46.5	0.5	2.0	2.0	47.0
	13 〃	509	69	5	8500	0	2.0	51.0	1.0	2.5	2.0	41.5
	14 〃	521	69	5	8400	0	2.0	42.5	1.0	2.5	2.0	50.0

第 8 表　家兎体重 Per kg 1mg. 毎日1回10日間静注例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率						
						met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 10	注射前	632	81	21	11000	0	2.0	21.5	1.0	2.0	1.0	72.5
	1日後	613	81	23	8900	0	3.0	25.0	0.5	1.0	0.5	70.0
	2 〃	640	81	28	8700	0	4.5	48.5	0	1.5	2.0	43.5
	3 〃	611	81	29	9700	0.5	4.0	41.5	0	1.0	0.5	52.5
	4 〃	608	81	31	6100	0	3.5	55.5	0.5	2.0	1.0	37.5
	5 〃	629	81	34	11100	0.5	4.0	55.0	0	1.5	1.0	38.0
	6 〃	644	82	28	8700	0	2.0	64.0	0.5	1.5	1.0	31.0
	7 〃	632	82	33	8100	0	2.5	35.0	0	1.5	1.0	60.0
	8 〃	630	82	30	8000	0.5	2.5	33.0	0.5	1.5	0.5	61.5
	9 〃	629	82	22	9250	0	3.5	48.5	1.0	2.0	1.5	43.5
	10 〃	637	82	17	9450	0	3.0	54.5	0	0.5	1.0	41.0
	11 〃	613	82	17	7750	0	2.0	46.0	0.5	1.0	1.0	49.5
	12 〃	640	82	19	7200	0	1.0	39.5	0.5	0.5	1.0	57.5
	13 〃	623	82	20	10000	0	1.5	36.0	0.5	1.0	0.5	60.5
	14 〃	639	82	18	9750	0	1.5	36.0	0.5	1.0	0.5	60.5

第2項 対照実験

1. 生理的食塩水10ccを1回静脈注射した場合

その成績は第9表に示す如くであり，その平均は第5図に示す如くである．

即ち赤血球数，血球素量，網赤血球数，白血球数何れも生理的動揺範囲内にあり，認むべき著明な変化がない．又白血球種別百分率に於ても一定の変化を認め難い．

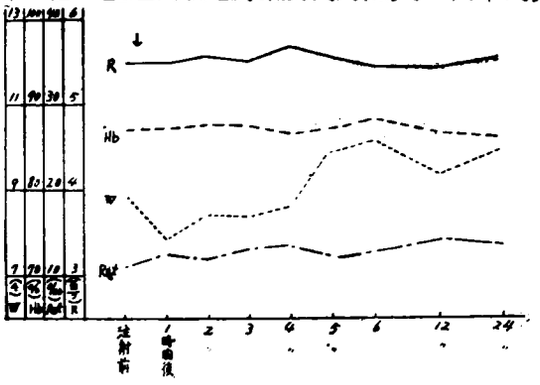
第 9 表　生理的食塩水 10cc 静注例（対照）

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率						
						met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 11	注射前	513	85	12	8950	0	2.0	29.0	1.0	2.5	2.0	63.5
	1時間後	503	84	13	7350	0	1.5	32.5	0.5	3.0	2.0	60.5
	2 〃	510	85	12	7000	0	1.5	24.5	0.5	2.5	2.0	69.0
	3 〃	532	85	13	8800	0	2.0	35.0	1.0	1.0	2.5	58.5
	4 〃	538	86	15	7300	0	0.5	36.0	0	0.5	1.0	62.0
	5 〃	502	85	13	11000	0	1.0	32.5	1.0	2.5	3.0	60.0
	6 〃	498	87	13	9250	0	1.0	42.0	0.5	0.5	2.5	53.5
	12 〃	506	84	14	8900	0	1.5	35.0	0.5	3.0	2.0	58.0
	24 〃	525	84	13	10500	0	0.5	37.5	1.0	2.0	2.0	57.0
No. 12	注射前	585	89	10	8800	0	1.5	14.0	0.5	2.0	1.5	80.5
	1時間後	592	90	12	8250	0	1.5	22.0	0	2.0	1.0	73.5
	2 〃	601	90	12	9800	0	1.0	28.0	0	1.5	0.5	69.0
	3 〃	568	90	13	7950	0	1.0	23.5	0.5	0.5	1.5	73.0
	4 〃	593	87	12	9900	0	2.0	24.0	1.0	2.0	0.5	70.5
	5 〃	600	89	11	8750	0	1.5	16.5	0	1.5	0.5	80.0
	6 〃	584	89	12	11000	0	1.0	21.5	0.5	0.5	1.0	75.5
	12 〃	575	89	14	9750	0	1.0	20.5	0	1.0	1.0	76.5
	24 〃	577	88	14	9200	0	1.0	20.5	1.0	1.0	0.5	76.0

第 10 表　グリコーゲン家兎体重 Per kg 1mg. 静注例（対照）

家兎番号	検査時間	赤血球数（万）	血球素量（%）	網赤血球（‰）	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 13	注射前	505	80	21	9800	0.5	2.5	23.5	1.0	2.0	3.0	67.5
	1 時間後	508	79	23	7200	0	2.0	30.5	0.5	2.0	5.0	60.0
	2 〃	500	80	21	9800	0	3.0	38.0	0.5	3.0	2.0	53.5
	3 〃	517	80	22	8250	0.5	2.0	39.0	1.0	1.5	2.5	53.5
	4 〃	502	81	19	7750	0	2.5	35.0	0.5	2.0	2.0	58.0
	5 〃	498	80	28	10000	0	2.5	37.0	2.0	2.0	3.5	53.0
	6 〃	511	80	21	9000	0	1.0	34.0	0.5	2.0	3.5	59.0
	12 〃	501	80	21	8800	0	2.0	28.0	0	3.0	2.0	65.0
	24 〃	488	80	17	8950	0	2.0	31.5	0.5	1.5	2.5	62.0
No. 14	注射前	621	83	5	8500	0	2.0	19.0	0.5	3.0	3.0	72.5
	1 時間後	602	83	5	8000	0	2.0	24.0	1.0	1.5	3.0	68.5
	2 〃	597	84	4	9500	0	2.5	26.5	0.5	3.0	2.5	65.0
	3 〃	608	83	3	8800	0	2.5	16.0	0	2.0	2.0	77.5
	4 〃	589	83	6	8800	0	2.0	22.0	0	1.5	2.0	72.5
	5 〃	599	82	3	7900	0	3.0	17.5	1.0	1.5	2.0	75.0
	6 〃	625	83	5	8700	0	2.5	15.0	0.5	2.0	2.5	77.5
	12 〃	613	83	4	8350	0	1.0	17.0	1.0	2.0	2.0	77.0
	24 〃	606	83	7	8900	0	2.0	14.0	1.0	2.0	2.0	79.0

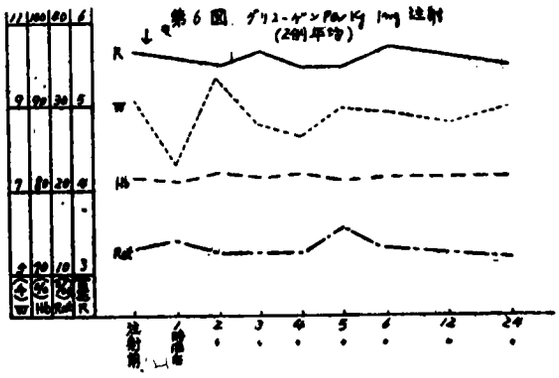
第5図　生理的食塩水注射(対照)(2例平均)



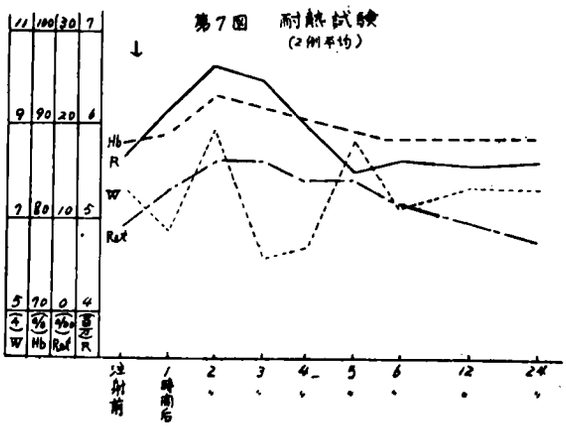
2. グリコーゲン家兎体重 Per kg 1mg 静脈内注射の場合

グリコーゲンを家兎体重 Per kg 1mg の割に滅菌生理的食塩水に溶解し，耳静脈内に注射し，後時間的に血液諸検査を行つた．その成績は第10表の如く，その平均は第6図の如くである．

即ち赤血球数，血球素量，網赤血球数，白血球数何れも著変なく，生理的動揺範囲を上下している．



第3項　熱，アルカリ及び酸に対する抵抗試験



1. 耐熱試験

体重 Per kg 1mg を生理的食塩水10ccに

第 11 表　耐 熱 試 験 例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 15	注射前	532	87	10	8750	0	1.5	23.5	1.5	2.0	1.0	70.5
	1 時間後	582	89	13	7500	0	1.0	44.0	1.0	2.0	2.0	50.5
	2 〃	629	93	17	8800	0	2.0	63.5	0.5	1.5	2.5	30.0
	3 〃	600	92	17	6750	0	2.5	52.5	0.5	2.5	1.5	40.5
	4 〃	577	89	15	7250	0	2.0	29.0	0.5	2.5	2.0	64.0
	5 〃	521	89	13	8500	0	1.0	38.5	0	1.5	1.5	57.5
	6 〃	513	89	11	7700	0	1.5	28.0	1.0	1.5	2.0	66.0
	12 〃	520	89	13	8350	0	1.5	27.5	0.5	1.0	1.0	67.5
	24 〃	532	89	11	9750	0	1.0	28.0	1.0	1.5	1.5	67.0
No. 16	注射前	599	89	8	6550	0	1.0	23.5	1.5	2.0	2.0	70.5
	1 時間後	653	89	13	6000	0	1.5	44.0	2.5	1.5	1.5	50.0
	2 〃	700	93	15	8950	0	2.5	63.5	1.5	2.0	2.0	30.0
	3 〃	700	92	15	5500	0	3.0	52.0	3.5	1.0	1.0	40.5
	4 〃	621	92	13	5750	0	2.0	29.0	2.5	2.0	2.0	62.5
	5 〃	580	90	15	8750	0	0.5	35.5	1.5	2.5	2.5	59.0
	6 〃	610	88	12	6700	0	1.5	28.5	1.0	2.5	2.5	66.0
	12 〃	592	88	6	7000	0	1.5	26.5	1.5	2.0	2.0	68.0
	24 〃	587	88	4	5550	0	1.0	21.0	1.5	2.5	1.5	72.5

第 12 表　耐アルカリ試験例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 17	注射前	668	91	82	9800	0	0.5	22.0	1.5	2.0	2.5	71.5
	1 時間後	699	90	02	9450	0.5	0.5	45.0	1.0	1.5	1.5	50.0
	2 〃	739	93	51	10000	0	2.0	66.0	0.5	0.5	1.5	29.5
	3 〃	710	95	11	10000	0	2.5	51.0	0.5	3.5	2.0	40.5
	4 〃	682	93	41	9800	0.5	2.0	29.5	0	2.0	1.5	64.5
	5 〃	681	94	41	9750	0	1.5	36.5	1.0	1.0	0.5	59.5
	6 〃	654	90	11	8750	0	1.5	28.0	0.5	1.5	2.0	66.5
	12 〃	652	90	11	8100	1.0	2.0	25.5	0	1.5	3.0	67.0
	24 〃	660	91	11	7550	0	1.5	21.0	0.5	1.5	2.0	73.5
No. 18	注射後	643	88	18	6700	0	1.5	29.0	0	2.0	2.0	67.5
	1 時間後	682	88	23	6650	0	2.0	55.0	1.0	1.5	2.0	38.5
	2 〃	727	91	25	5950	0.5	3.0	66.5	1.5	2.5	3.0	23.0
	3 〃	700	92	25	7900	0	3.0	59.0	1.0	1.0	3.0	33.0
	4 〃	651	91	21	6100	0	2.0	62.0	0.5	2.5	1.5	31.5
	5 〃	634	88	21	8100	0	1.5	45.0	0	2.0	3.0	48.5
	6 〃	638	87	17	8250	0	2.0	44.5	0	2·0	1·0	50.5
	12 〃	628	87	19	8500	0	1.5	48.0	1.0	0.5	2.0	47.0
	24 〃	655	87	17	7700	0	2.0	44.0	1.0	1.0	2.0	50.0

溶解し100°Cにて1時間加熱し冷却後家兎耳静脈に注射してその後の血液像の推移を逐時に検査した．その実験成績は第11表の如く，その平均を図示すれば第7図の如くである．

1) 赤血球数．注射後漸次増加を来しNo. 15に於ては24時間後最高に達し97万の増加を，No. 16に於ては2乃至3時間後最高値を示し101万の増加を認め，何れも5時間後には旧値に復している．

2) 血球素量．何れも赤血球数と平行して増減傾向を示している．

3) 網赤血球数．前者同様共に赤血球数と平行して増加を認める．

4) 白血球数．一定の傾向を認め難い．

2. 耐アルカリ試験

家兎体重 Per kg 1mg の割に生理的食塩水10ccに溶解し，N/10規定苛性ソーダにてフエノールフタレンを目標としてアルカリ溶液として，アンプル中に封入し沸騰せる温浴中にて1時間加熱し，冷却後N/10塩酸にて中性として用いた．

その成績は第12表の如くであり，平均すれば第8図の如くである．

1) 赤血球数．共に2時間後最高値を示し，後次第に減少し旧に復している．即ちNo. 17に於ては71万，No. 18に於ては84万の増加を認める．

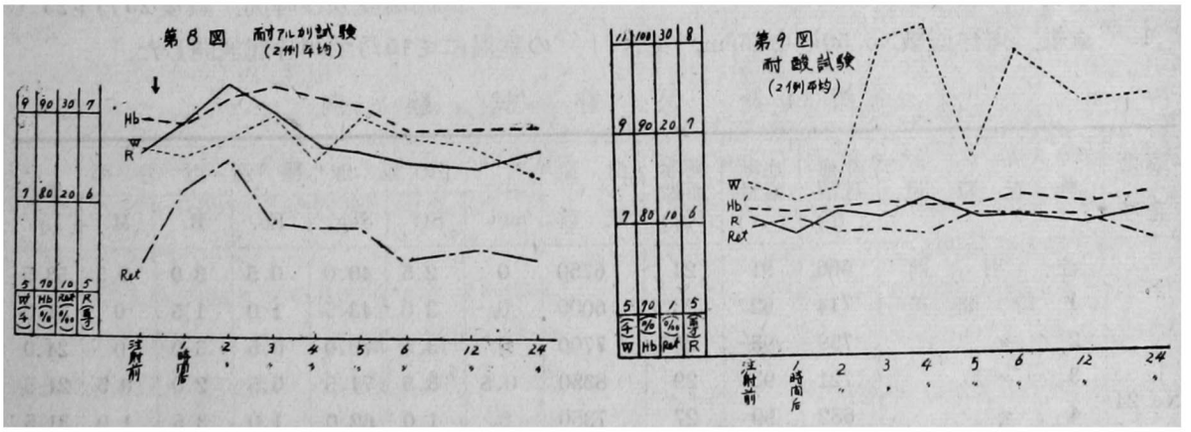
2) 血球素量．略々赤血球数と平行して増減する．

3) 網赤血球数．注射後直ちに増加して後次第に減少している．

3. 耐酸試験

前記同様注射液を作製し，コンゴロート試験紙を目標として，1/10規定塩酸にて酸性液となし沸騰している温浴中にて1時間加熱し冷却後1/10規定苛性ソーダ溶液を用いて，pH指示用紙にて中性となし使用した．その成績は第13表の如く，平均は第9図の如くである．

即ち赤血球数，血球素量，網赤球数及び白血球数何れも著明な変化を認めない．



第13表　耐酸試験例

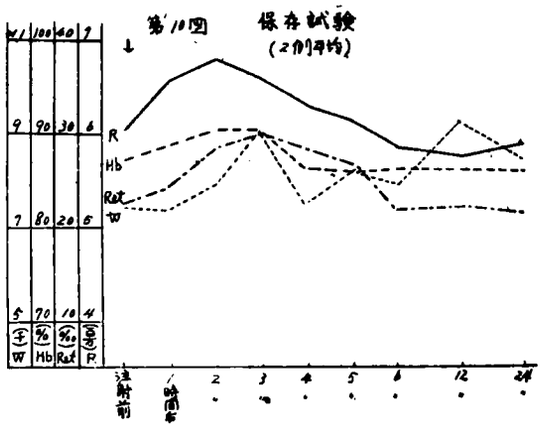
家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	Mo.	Ly.
No. 19	注射前	587	78	11	9450	0	3.0	31.0	2.0	1.5	2.0	60.5
	1時間後	577	77	13	8750	0.5	2.5	39.0	1.5	1.5	2.0	53.0
	2〃	591	77	13	9900	0	3.0	42.5	1.0	1.5	2.0	50.0
	3〃	583	79	11	15000	0	2.5	62.5	1.0	1.0	1.5	31.5
	4〃	603	78	8	16750	0	3.0	65.0	2.0	0.5	1.0	28.5
	5〃	565	76	12	10800	0	2.5	67.5	0.5	1.5	1.0	27.0
	6〃	554	78	12	14350	0	1.0	58.0	2.0	0.5	1.5	37.0
	12〃	555	78	10	12600	0	2.0	56.5	2.0	1.5	1.5	36.5
	24〃	565	78	8	11000	0	2.0	39.5	1.0	1.5	1.5	54.5

No. 20	注射前	623	85	8	6300	0	1.5	14.5	0	2.0	3.0	79.0
	1時間後	600	85	8	6200	0	1.5	17.0	0.5	1.5	2.5	77.0
	2 〃	629	86	5	5500	0	2.0	7.5	0	0.5	3.0	87.0
	3 〃	631	85	7	6950	0	1.0	36.5	1.0	0.5	2.5	58.5
	4 〃	643	85	9	5250	0	0.5	32.5	0	2.0	3.0	62.0
	5 〃	647	87	9	5650	0	1.0	27.5	1.0	1.0	3.0	66.5
	6 〃	650	87	9	7000	0	2.0	40.0	1.0	1.5	1.5	54.0
	12 〃	637	85	10	6450	0	1.5	16.0	1.0	2.0	1.0	78.5
	2 4〃	646	87	7	6450	0	2.5	20.0	0.5	2.0	3.5	71.5

第4項 保存試験

昭和27年8月に抽出分離した検体粉末を昭和29年8日迄の2年間に亘り除湿器中に保存し，前述の如く注射液を作製し使用した．その成績は第14表に示すが如くであり，平均を図示すれば第10図の如くである．

即ち赤血球数，血球素量，網赤血球数の増加が認められ，その作用に保存による変化が認められない．



第5節 ペーパー・クロマトグラフィー

第1項 実験方法及び試料

1. 濾紙．東洋濾紙No. 50の巾15cm，長さ40cmのものを使用した．

2. 展開温度及び時間．温度20乃至25°Cの室温にて15乃至30時間展開した．

第14表 保 存 試 験 例

家兎番号	検査時間	赤血球数(万)	血球素量(%)	網赤血球(‰)	白血球数	白血球種別百分率 met.	St.	Seg.	Eo.	B.	M.	Ly.
No. 24	注射前	666	91	21	6750	0	2.5	40.0	0.5	3.0	0.5	53.5
	1時間後	714	92	23	6000	0	3.0	43.5	1.0	1.5	0	51.0
	2 〃	759	95	28	7700	0	3.5	70.0	0.5	3.0	0	24.0
	3 〃	721	93	29	8350	0.5	3.5	71.5	0.5	2.0	0.5	21.5
	4 〃	682	90	27	7350	0	1.0	62.0	1.0	3.5	1.0	31.5
	5 〃	677	90	23	9750	0	2.0	71.0	0	2.0	0	25.0
	6 〃	639	91	23	8000	0.5	3.0	44.5	0.5	1.5	0.5	49.5
	12 〃	647	91	22	8500	0	2.5	39.0	0.5	2.0	1.0	55.0
	24 〃	648	91	23	8000	0	3.0	31.5	1.0	3.0	0.5	61.0
No. 25	注射前	537	83	24	8100	0.5	1.0	15.5	1.5	2.0	3.0	76.0
	1時間後	601	85	26	8800	0	1.5	41.5	1 0	1.0	1.5	53.5
	2 〃	615	86	29	8200	0	3.0	62.0	0	1.5	2.5	31.0
	3 〃	603	88	31	9750	0	2.0	50.0	0	1.5	2.5	44.0
	4 〃	582	83	30	7700	0	0.5	32.5	1.5	2.5	2.0	61.0
	5 〃	555	82	31	6750	0	1.0	33.5	1.0	2.5	1.5	60.5
	6 〃	540	82	21	7900	0	0.5	31.5	2.0	0	2.0	63.5
	12 〃	511	82	23	10100	0.5	2.5	26.0	0.5	0.5	1.0	69.5
	24 〃	534	82	24	6050	0	1.0	17.0	1.0	1.0	1.5	78.5

3. 展開溶媒. 使用した溶媒及びその精製法は次の如くである. 之等は単独で水を飽和させ, 或は適宜混合して使用した.

a) フエノール. 日本薬局方のフエノールを再蒸溜しb. p. 180°Cの留分を取つて単独で水飽和し使用した.

b) コリヂン. 市販品の純良なコリヂンに固形水酸化ナトリウムを投入し, 24時間放置して, 脱水後濾過し, 全すり合せ蒸溜装置でb. p. 172°Cで蒸溜精製して, 水飽和後単独で使用した.

c) nブタノール・醋酸混合液

i) n-ブタノール：b. p. 117°Cにて蒸溜精製した.

ii) 氷醋：b. p. 116°Cで蒸溜精製した.

iii) 水：再蒸溜水を用いた.

上記 n-ブタノール4部, 氷醋1部, 水5部を分液漏斗中にてよく振盪混和し, 3乃至4日静置後, 下層を捨て上層を使用した.

4. 呈色法. 呈色試薬として次のものを用いた.

a) アンモニヤ性硝酸銀

5規定アンモニヤ水と0.1規定硝酸銀水溶液の同量混和溶液を噴霧し, 室温にて乾燥後, 105°Cにて5分間加温呈色せしめた.

b) フエノール類

α-ナフトレゾルミンの0.2%エタノール溶液と三塩化醋酸の2.0%水溶液を等量混和後, 直ちに噴霧し, 室温にて乾燥後, 100°C乃至105°Cにて5乃至10分間加熱して, ケトーゼの検出を行つた.

c) Ehrlich 試薬

i) アセチールアセトン試薬

溶液Ⅰ：アセチールアセトン0.5ccをブタノール50ccに溶解す.

溶液Ⅱ：50%苛性カリ水溶液5ccとエタノール20ccの混合液.

溶液Ⅰの10ccと溶液Ⅱの0.5ccを使用直前に加える.

ii) p-ヂメチーアミノ・ベンズアルデヒード試薬

p-ヂメチールアミノ・ベンズアルデヒード1gをエタノール30ccに溶解し, 濃塩酸30ccを加え更に再蒸溜ブタノール180ccを加える.

展開濾紙を乾燥後溶液 i) 試薬を噴霧し105°Cで5分間加熱し, 更に溶液 ii) 試薬を噴霧して, 90°Cで5分間加熱してアミノ糖の検出を行つた.

5. 試料. 前記骨髄抽出多糖類物質500mgを一規定硫酸5ccに溶解し, 硬質褐色アンプルに封入し, 水浴中にて100°C 5時間加水分解せしめた後, 蒸溜水を加えて100ccとなし, イオン交換合成樹脂の高さ20cm直径3cmの円柱を通過せしめて無機物を除いた. この場最初の通過液10ccを捨て, 後蒸発皿にて60°Cにて約1ccに濃縮し使用した. 因みにカチオン交換樹脂は Amberlite I. R. 120, アニオン交換樹脂は I. R. A. 410を用いた.

6. 方法. 検体試料0.001乃至0.003ccを毛細管にて濾紙の下端より7cmの所に, 直径約3mmの円形点としてつけた. 即ち巾15cm長さ40cmの濾紙に原点（上記円形点）を, 濾紙の下端より7cmに引かれた水平線上に1.5cmの間隔をもつてつけ, ペーパー・クロマトグラフ装置（東洋濾紙株式会社製C号器）にて, 濾紙下端が2cm溶媒中に浸る様に上記展開溶媒を入れ, 装置室内を固定相の蒸気で飽和させた後, 上記濾紙を円筒型に巻いて, 一次元上昇法にて可及的同一条件を保つて展開後, 濾紙を取出し, 溶媒前進境界を鉛筆にて記し室温にて乾燥後, 上記各種呈色試薬を夫々一様に素早く噴霧し, 室温乾燥後炉にて夫々の適当温度に加熱し呈色せしめて, 濾紙上の糖の位置を明らかにし, 試料斑点の移動率即ちR_F値$\left(\frac{\text{試料の移動距離}}{\text{溶媒前端の滲透距離}}\right)$を測定した.

7. 判定. 既知各種単糖（グルコーゼ, マンノーゼ, ラムノーゼ, 塩酸グルコサミン）を1%水溶液となし, 単独又はその混合物の状態で, 同様の方法で0.003乃至0.004ccを展開して各種のR_F値を測定し, その値と呈色剤の種類及びその色合から試料の糖の種類を判断した.

第2項　実験成績

1.　予備実験

前記既知単糖の前述3種溶媒に於けるRF値を一括して表に示せば第15表の如くであり，この溶媒によつて得られた濾紙クロマトグラムは第11図に掲げる．

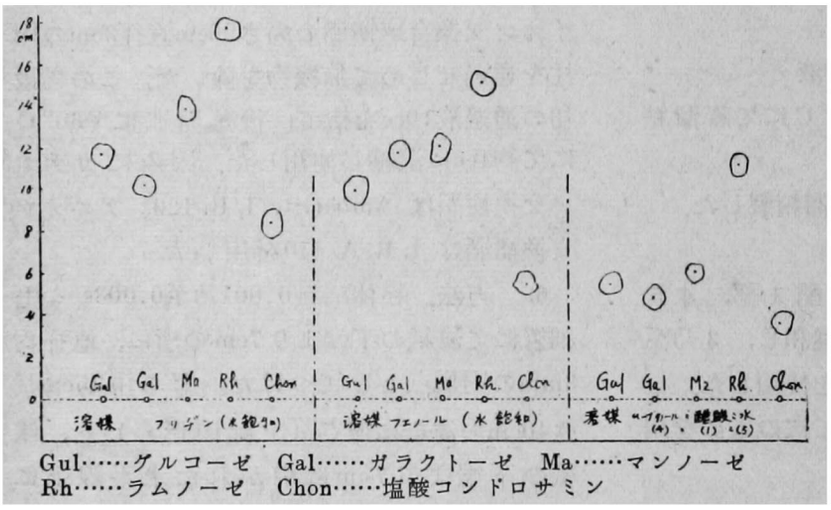
即ち予備実験に用いた対照参考糖のRF値は従来の諸家の知見と全く一致している．

2.　主実験

第15表　対照単糖類のRF値

糖＼展開溶媒	コリヂン（水飽和）	フェノール（水飽和）	n-ブタノール：酢酸：水（4：1：5）
D—グルコーゼ	0.39	0.33	0.18
D—ガラクトーゼ	0.34	0.39	0.16
D—マンノーゼ	0.46	0.40	0.20
L—ラムノーゼ	0.59	0.50	0.37
塩酸コンドロサミン	0.28	0.18	0.12

第11図　各種単糖類（対照）のペーパー・クロマトグラム



Gul……グルコーゼ　Gal……ガラクトーゼ　Ma……マンノーゼ
Rh……ラムノーゼ　Chon……塩酸コンドロサミン

註　溶媒の上昇前端と原点間距離30cmの場合のクロマトグラムを縮小せるもの○原点位置

予備実験と同一条件により検体試料の展開を行つた．そのクロマトグラムは第12図に示す如くである．

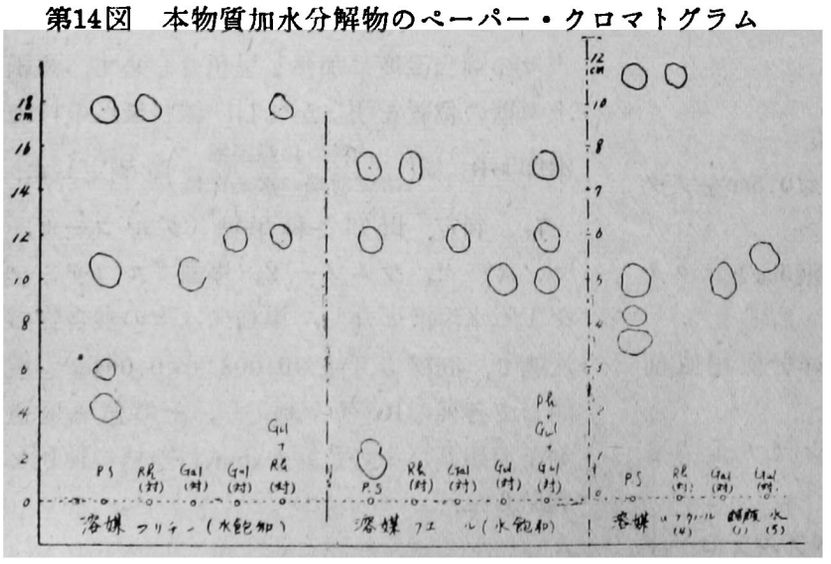
1）溶媒コリヂンの場合．クロマトグラムはRF値0.59，0.34，0.16，0.14の4斑点を示した．即ち夫々はラムノーゼ，ガラクトーゼ，ガラクトウロン酸及びグルコウロン酸に相当する．

2）溶媒フエノールの場合．展開クロマトグラムは次の4斑点を示した．即ちRF値0.50のラムノーゼ，RF 0.39のガラクトーゼRF 0.07のガラクトウロン酸及びRF 0.06のグルコウロン酸の存在を認めたが，後二者は，その端に於て融合していた．

3）溶媒ブタノール酢酸の場合．このクロマトグラムはRF値 0.37，0.16，0.14，0.12の4斑点を示し夫々はラムノーゼ，ガラクトーゼ，ガラクトウロン酸，グルコウロン酸に相当する．

尚その各々に就てα-ナフトレゾルシン・エタノール溶液及びエールリヒ試薬を用いたが，ケトーゼ並にアミノ糖特有の反応は示さなかつた．

第14図　本物質加水分解物のペーパー・クロマトグラム



第3章　総括並に考按

天然の多糖類物質成分の抽出分離に当つて，従来諸研究者が最も努力を傾注しているのは，その多糖類物質と蛋白質或はその分解産物及び無機物等の混合物との分離方法であつて，かゝる目的のために従来より種々の方法が考案されている．即ち前述した様に細菌学の領域に於ては菌体の1構成成分として，その菌

体多糖類物質が種々の方法で抽出分離され，免疫血清学的並に生物学的研究に広く応用され，その化学的構成と生物学的性状との関係もある程度解明せられるに至つた．即ち Boivin 並にその共同研究者[76]は三塩化醋酸により蛋白質を沈澱させその上清より抽出分離し，Raistnick 及び Topley[109]はアセトン乾燥菌体にトリプシンを作用させて菌体蛋白を消化分解し去り，その分解液より目的の抗原性多糖類物質を分離したと報告している．Morgan[104]等は志賀菌の完全抗原性多糖類物質を分離するのにヂエチレングリコールを用い，Fuller[86]は連鎖状球菌に於てフオルムアミドを用い，Walker[120]はチフス菌及び鼠チフス菌に於て2.5Mol. 尿素液を用いている．これ等の三者は何れも上記特殊溶媒を用いて菌体を浸出するに当り，初めから多糖類物質のみを特異的に溶出し，蛋白その他を残存せしめ，その抽出分離を容易ならしめたと報告している．又 Sevay[116]はクロロホルム，アミールアルコール振盪除蛋白法を行い，細谷及び川島[62]は抽出液のpHを塩酸によつて2.0にする事により小谷[27]等は醋酸によつてpHを4.6にする事により多糖類物質を溶存する抽出液を得たと報告している．又黒屋[26]等は硫酸アンモン全飽和溶液で除蛋白し多糖類物質を抽出し，林[47]は酸性加熱法を応用し至適pH に於て加熱することにより蛋白を凝固濾別した．かくの如く抽出分離法に於て最も重要な過程は除蛋白であるためにその方法も内外諸学者によつて種々研究施行されているが，本実験はこれ等の方法を充分に比較検討し，比較的穏和でしかも最も合理的な抽出法を採用応用し，目的物質たる多糖類物質の分解乃至変質を最小限に止め，純粋に且つ収量を最大にすべく努力したものである．即ち前述の方法は何れも操作が非常に複雑であり，Sevay[116]の方法はクロロホルム，アミールアルコール等の高価な試薬を多量に必要とする欠点を有し，又林[47]の酸性加熱法の如きは多糖類物質の分解を可成り強く惹起する虞れがあり，或はpHを至適酸性にする方法も可急的純粋な多糖類物質を得るには適当な方法とは考えられない．又特殊溶媒を使用して撰択的に多糖類物質のみを溶媒中に浸出するというも比較的穏和な方法ではあるが，それも程度の問題であつて，その成績が示す如く窒素の含有量も可成り多く，他の複雑な物質も混入することは当然考えられるところであり，何れも一長一短の恨みがある．そこで本実験に用いた抽出分離法は中性蒸溜水中に加熱抽出することにより，最も穏和にして目的物たる多糖類物質の分解乃至変質を最小限に止め，重要な過程である除蛋白法には硫酸銅液と苛性ソーダを用い，予備実験によりその適当量を決定し除蛋白に附随する多糖類物質の損失を最小限に止め，且つ脱塩には従来透析法が用いられていたのであるが，イオン交換合成樹脂を応用することにより，それに要する期間を著しく短縮してその間に変質する虞れを除き，且つ残存アミノ酸等もこれにより完全に除去する事が出来た．即ち本抽出物の化学性状より見ても，本物質が諸種蛋白反応陰性で元素分析の結果も窒素を含まず多糖類物質として相当純度の高いものと考えられる．

次に本物質を正常無処置家兎耳静脈に注射するに家兎体重 Per kg 0.5mgの時はその末梢血液像を検するに何等の認むべき変化を顕さないが，Per kg 1mg の時は注射後数時間に亘る著明な血球増加が認められる．この場合更に Per kg 2mgに増量しても同様の作用を認める．最近清水[35]等は仔牛赤色骨髄よりポリペプチードと考えられるミエロンと名付けた物質を精製したが，該物質は赤血球増多作用がなくその作用の点からも本多糖類物質とは全く異つたものと考えられる．又林[48]はサルモネラ属細菌多糖類物質は家兎に注射するに白血球増多は招来するが赤血球数には変化を与えないと述べている．以上よりして赤血球増加作用は私の抽出した骨髄多糖類物質特有のものと考えられる．本物質を家兎体重 Per kg 1mg毎日連続10日間注射するも赤血球数に認むべき変化はないが，網赤血球のみは著明な増加を認める．更に本物質の血球

増加作用は熱及びアルカリに対しては相当抵抗の強いものであるが，これに反し酸に対しては弱く1/10規定塩酸にて1時間100°C加熱すれば完全に効力を失うことが判明した．その増血作用に就ては次編に於て更に精細な検討を加えることとする．尚本物質の毒性に就て家兎及びマウスに就て実験するに，その成績からして毒性のないものと思われる．

ペーパー・クロマトグラフイーは1944年Consden, Gorden, Martin[100]によつて考案され，アミノ酸の分離定性に適用されたのを端緒とするもので，試料を塗布した濾紙に溶剤を流下させる方式である．爾来装置やその操作法にいろいろ工夫が加えられたが，その試料が極く微量で定り，使用する装置が比較的簡便で，而も操作が容易な点から今日化学及び生物学の領域に新しい研究手段として最も普及され利用されて，主に有機化合物の微量定性分析法として重要視され，多数の物質に応用され，驚くべき効果をあげている．本法は本多糖類物質の加水分解物の定性分析に対する方法として，その構成単糖の検索に最も適切な方法であることは改めて述べるまでもない．

扨てペーパー・クロマトグラフイーの実験条件下では，被検試料の分配は濾紙線維に結合している水分と線維表面を移動する溶媒との間で起り，その溶質の動いた距離は次の機能によるとされる．即ち

(1) 水と溶媒の間の溶質の分配係数
(2) 濾紙の単位面積に結合した水分の量
(3) 濾紙の単位面積に保たれた溶媒の量

然し実際の実験に於ては，濾紙の紙質は一様で湿度，水容量は大体一定不変なので(2)と(3)は無視してよく，各々の溶質の動いた比較距離R_Fは主としてその分配係数によるといえる．即ち試料斑点の移動率R_Fは$\frac{\text{溶質（試料）の移動距離}}{\text{溶剤前端の滲透距離}}$の定義が与えられている．

一般に天然物たる複雑な物質をペーパー・クロマトグラフイーによつて分析するに当り，そのR_F値は実験操作により可成りの動揺が認められるので，その展開中に留意すべき条件として次の諸項が挙げられる．

(1) 展開を始める前に装置室内を外気と完全に遮断して，展開溶媒の蒸気で飽和させ，濾紙に出来るだけ均等に固定相を保持させる．さもなければ濾紙の各部に固定相と移動相が一定した比率に分布するかどうか疑問である．濾紙の各部単位面積内に含まれる両相の比が若し部分によつて差異があると物質の分配状況が部分によつて異り，そのR_F値に若干の差異を生ずる．

(2) 全装置が一定の温度（21±1°Cが最適）を保ち，操作中に出来るだけ温度の変動がない様にする．通常展開進行中の室温に於ける変化は寛される範囲内にあるが，しかし最小限にかゝる温度の変動を止めるために，本実験に於ては前装置を外被した．夏と冬の温度の相違は多かれ少かれ或程度にすべての糖のR_F値に影響するから，温度t°で得られたR_F値は20°Cに於けるグルコーゼのR_F値をそのt°に於けるグルコーゼのR_F値で除した$\left(\frac{\text{20°に於けるグルコーゼの}R_F\text{値}}{\text{t°に於けるグルコーゼの}R_F\text{値}}\right)$をその温度に於ける$R_F$値に乗じて得られる．この修正を応用する事により$R_F$値は著しく一定となる

以上は展開中守らねばならぬ事項であるが，その他に濾紙の撰択，展開溶剤の調製法なども重要な条件に入つて来る．

(1) 展開用濾紙：ペーパー法に用いる濾紙の紙質は，その成果に極めて重要な意義を持つので，我が国でも東洋濾紙からペーパー・クロマトグラフイー用の濾紙を供給し，その優秀性は諸家の認めるところである．

(2) 展開溶剤：分配を行わせるに要する溶剤の組合わせはペーパー・クロマトグラフイーに於ける最も重要な条件で，その撰び方如何によつて実験成否の前階段が決定される．本実験に使用したフエノール水飽和，コリヂン水飽和，及びn-ブタノール，氷醋，水混合溶媒の糖類展開に適切であることは既にPartridge[106][107][108]及び檜山[55]，佐竹[83]等に

よつて証明されたところであり，本予備実験成績からも充分信頼に足ることが分る．

試料の塗布量は定性的分析の目的に用いられる時は余り精密な必要はないので，本実験では自製のガラス毛細管にて約0.001乃至0.003ccを濾紙上原点へ塗布した．

而してその試料が可及的純粋なことは最も望ましい事であり，特に多糖類物質等の天然物を試料とする場合，殆んど常にそれ以外の各種有機或は無機物質を共存している事が考えられるので，前以てそれ等を完全に除去する事が必要である．従来多糖類物質の加水分解に用いた硫酸除去には飽和バリタ水を用いていたが，本実験では最も簡便でしかも確実な方法としてイオン交換樹脂を用い硫酸のみならず他の無機イオンの除去を完全ならしめた．但しその際イオン交換樹脂による還元糖の附着吸収が考えられるため，本実験では充分な量に試料を稀釈して通過せしめ，後濃縮して使用する事により，その可能性を最小限に止めた．この前処置をほどこして脱塩したものには本実験で明らかの如く，糖のR_F値に干渉する阻碍物質は全く認められなかつた．

呈色剤として本実験に用いたアンモニヤ性硝酸銀溶液はアミノ酸，クレアチニン，乳酸等には不活動であるが，遊離糖以外にもチメル糖ビタミン等の還元性誘導体にも反応するが，一般に最も鋭敏な試薬として珍重されている．その他にも夫々の糖特有な反応を与える試薬として，α-ナフトレゾルシンのエタノール溶液を用いてケトーゼを検したが，このものは認められなかつた．又次に Elson, Morgan[84]により案出され Partridge[106][107][108]により改良されたアミノ糖特有の反応を与えるエールリヒの試薬を使用したが，その存在は認められなかつた．

扨て骨髄抽出多糖類物質の加水分解物中に含まれる糖は本実験成績から判る様に，上述の注意された条件下ではクロマトグラム上に，ガラクトーゼ，ラムノーゼ，グルコウロン酸及びガラクトウロン酸に相当する四斑点として，お互に干渉する事なく，極めて信頼し得る正確なR_F値を示した．

第4章　結　　言

1)　仔牛赤色骨髄より中性蒸溜水中に加温振盪浸出し，硫酸銅液及び苛性ソーダ溶液により除蛋白し，イオン交換合成樹脂によつて脱塩後，アルコール，エーテルにより沈澱せしめる方法にて骨髄多糖類物質を抽出分離した．

2)　本物質は白色粉末，非給晶性で，軽度の吸湿性を有す．水，生理的食塩水及び葡萄糖溶液には容易に溶解するが，アルコール，エーテル及びアセトンには不溶である．又 Molisch 反応陽性，Biuret 反応，Sulfosalicyl 酸反応，Xanthoprotein 反応及び Ninhydrin 反応は全て陰性である．Tiselius 試験により電気泳動性を証明せず．

尚加水分解後は Fehling 氏液を還元し，還元糖は50乃至60%で，元素分析の結果窒素を認めない．

3)　本物質の適当量（Per kg 1mg）を正常家兎耳静脈内に注射するに注射後，数時間に亙り赤血球増多を認める．

本作用はアルカリ及び加熱に対して抵抗が強いが，酸で加熱することにより失われる．尚2年に亙り保存するも該作用に変化を認めない．

4)　ペーパー・クロマトグラフイーにより本質の構成単糖として，ガラクトーゼ，ラムノーゼ，グルコウロン酸及びガラクトウロン酸の存在を認めた．

（本論文の要旨は日本血液学会第15回及び第17回総会に於て発表した）

擱筆に当り懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師平木教授並に大藤助教授，岡本前講師に深甚の謝意を表す．

（引用文献：巻尾に一括掲載）

Dept. of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Dr. K. Hiraki)

Studies on Polysaccharides Extracted from Bone Marrow Part I : Methode to Extract Polysaccharides of Bone Marrow ; its Property and Paper Chromatography

By

Ryoji Takagi

1) I have succeeded in the extraction of bone marrow polysaccharides out of red bone marrow of a calf due to method in which first of all I make them issue out into the water after it have been heated into the distillated water, remove the protein content owing to $CuSo_4$ and NaoH ; then, removing the salt by ion-exchange resin, cause it to precipitate due to alcohol and ether.

2) This substance is exhibited as white powder with non-crystal nature, which sustains a slight degree of wet-absorbing property, and able to dissolve easy in water, but is indisoluble toward ether, alcohol and aceton.

Also, it invariably has proved to be (+) in Molisch reaction, but to be (−) in any these reactionse of Biurt, Sulfosalicyl acid, Xanthoprotein and Ninhydrin.

Furthermore, by hydrolysis, it has reduced to Fehling solution and after analysis of element I cannot detect any nitrogen.

3) In case a proper amount of this aubstance (per Kg lmg) be injected into ear veins of a normal rabbit, an increase of erythrocytes has been detected for a few hours after the injection. This function has proved rather tough toward alkali or heat, but is lost by being heated due to acid.

4) I could detect Galactose, Rhamnose, Glucuronic acid and Galacturonic acid for its constituent sugars, owing to paper chromatography.