イオン交換樹脂を用いる緑膿菌 autolysate よりの内毒素の分離精製

Application of Ion Exchange Resins for the Isolation and Purification of the Endotoxin of *Pseudomonas* *Aeruginosa* from Its fluid Culture Media

東京大学伝染病研究所第一細菌
現在 群馬大学医学部衛生学教室
芦 沢 義 郎
Yoshio Ashizawa

(First Division, The Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo.)

Present address: Department of Hygiene, School of
Medicine, Gunma University.

緒 言

グラム陰性桿菌より内毒素を分離する方法は周知のごとく Boivin の方法を始めとする化学試薬による菌体よりの抽出分離で、その意図するところは要するに菌体蛋白を変性あるいは破壊して糖脂体を主体とする内毒素を分離しようとするものであった¹⁻⁹⁾。

これに対してさきに細谷、本間らは緑膿菌を用い、その autolysate (自家融解液) から、なるべく菌体蛋白の変性をさけて内毒素を分離する方法を試みた。この方法は従来細谷宮田法として単純蛋白である菌体外毒素の分離精製に使用されていたものであるが、これを内毒素の分離に初めて応用したものである¹⁰⁻¹¹⁾。

更に本間、江上らは精製過程に electrodialysis, zone electrophoresis を応用することによつて lipopolysaccharide-protein complex (comp. I と命名) と nucleic acids-polyribose phosphate (comp. II と命名) をそれぞれ単離することが出来た。またこの結果 autolysate 中には comp. I と comp. II とが結合して存在し、これに更に塩基性物質が結合していることを明らかにした¹²⁻¹³⁾。

本論文は autolysate から直接にイオン交換樹脂を用いて有毒成分である comp. I の分離精製の可能性を検討したものである。この目的のためまず従来の細谷、本間らの方法でえられた精製内毒素のイオン交換樹脂による吸

着溶出をこころみた。ついでこのデーターを基礎として autolysate から直接に分離を試みこれに成功した。

実験材料

精製菌体内毒素：前報に記載した方法で分離した精製内毒素を使用した²⁰⁾。

土島株 (A 3 株) を下記組成の合成培地

組成：グルタミン酸ソーダ	2%
グルコース	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Ca(NO ₃) ₂	0.0001
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.000005
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.563
KH ₂ PO ₄	0.0252

pH 7.6

にうえ、37°C に30時間振盪培養しトルエンを重層し37°C に更に40時間静置する。濾紙濾過後シャープレス超遠心器で菌体を除き、その濾液を ZnCl₂-Na₂HPO₄ を用いる細谷法で濃縮し普通透析、電気透析をおこない、その内液よりアセトン沈降によつて精製内毒素を分離した。

これらは電気泳動的に均一である。また磷量を加減し培地 1 ml 当り 30μg とし、これに P³² を加え培養することにより同様の方法で P³² ラベル付内毒素を分離し¹⁴⁾ 実験に使用した。

イオン交換樹脂：Amberlite IRA 410, IRA 400, IR 4 B, Narcite WBR, Dowex 50, Amberlite IRC 50, XE64を使用した。

内毒素の定量：放射性内毒素の P^{32} 放射能を Geiger-Müller Counter により測定し比放射能から毒素量を算定した。同時に内毒素を Folin 反応により定量した²¹⁾。更に沈降反応もおこなって参考とした。

実 験

I. 精製内毒素のイオン交換樹脂による吸着と溶出

塩基性樹脂である Amberlite IRA 410, IRA 400, IR 4 B, Narcite WBR などの PO_4 型を用いた場合、中性溶液で内毒素は完全に吸着される。いろいろの条件での溶出を試みたが成功できなかった。酸性樹脂である Dowex 50, Amberlite IRC 50, XE64 に対しては中性乃至弱アルカリ性では吸着されない。酸性側では pH 1～2 附近で最もよく吸着される。Amberlite XE 64 を用いた成績は Fig. 1 に示した。また Dowex 50 を用いた成績は Fig. 2 に示した。吸着された毒素は 0.4 N-NaOH で pH 7 にすることによりほとんど完全に溶出てきた

Fig. 1 P^{32} ラベル付内毒素の Amberlite XE-64 への吸着

一定量の P^{32} ラベル付内毒素を磷酸ソーダあるいはクエン酸緩衝液で、それぞれの pH bufferize した XE 64 と共に振盪し上清に残った未吸着毒素量を P^{32} の比放射能から算出した。図は毒素とレジ振盪上清の未吸着毒素量を縦軸に示したものである。autolysate 中の抗原物質は沈降反応から概算した。矢印はその誤差範囲を示した。

△—△ P^{32} ラベル付内毒素

○—○ autolysate 中の抗原物質

Fig. 2 P^{32} ラベル付内毒素の Dowex 50 に対する吸着

Dowex 50 (Na 型) 2 g をいろいろの pH の buffer で処置し P^{32} ラベル付内毒素 150 μ g (0.5 ml) を加え、これに蒸留水を加えて全量を 10 ml とする、振盪 30 分後その上清 1 ml を測定皿にとり乾燥、放射能を測定した。上清の毒素量は比放射能から算出し、その未吸着量(%)を縦軸に pH を横軸に示した。

以下Amberlite XE 64を使用した実験成績を示す。まず XE 64をクエン酸緩衝液で pH 2.2とし内毒素溶液 (pH 2.2) を流して吸着させるとレジ 1 g 当り 4～6 mg の内毒素が吸着される。そこで本実験ではレジ 1 g 当り 3 mg の内毒素を使用した。溶出は 0.4 N-NaOH で置換クロマトの方法をとった。実験結果は Fig. 3 に示したが比放射能によつて算出された溶出毒素量はほとんど 100%に近く、別におこなった Folin 反応による比色定量の成績もほぼこれと一致した。また沈降反応によつて示される成績も大体これと一致したので内毒素はおそらく大した変化を受けることなく溶出されたと推定される。更に同様の実験を Fig. 4-1 に示したが溶出液の前半を a_1 とし後半を a_2 として集め、それぞれもう一度吸着溶出をおこないそれぞれ Fig. 4-2, Fig. 4-3 に示した結果いずれも同じ溶出曲線をえた。また流速を毎時 0.1 ml としても NaOH の濃度を 0.01 N として溶出をおこなったが溶出曲線に変化はみられなかった。

そこで次に吸着溶出前後における内毒素の生物学的、物理化学的性状の変化をみるために大量の毒素を用いておこなった。使用内毒素は Fig. 5 に示すように電気泳動的に均一である。吸着溶出は前記実験と同様におこなった。Fig. 6 に示したように溶出液は a_1 , a_2 , a_3 にわけそれぞれにアセトンを加え毒素を沈降させた後、凍結乾燥

Fig. 3 緑膿菌内毒素の Amberlite XE

64 に対する吸着, 溶出

Amberlite XE 64 1g に対して 3mg の割に P^{32} ラベル付内毒素を吸着させ 0.4 N-NaOH で溶出した。Column 5×0.8 cm, 流速 0.1 ml per minute, 1 tube 5 ml.

— P^{32} の比放射能から算出された内毒素量

□ 抗内毒素ウサギ血清と溶出された内毒素溶液との沈降反応から算出した毒素量の誤差範囲を示す。

Fig. 4 Amberlite XE 64 に吸着した

緑膿菌内毒素の溶出曲線

Amberlite XE 64 1g に対して 3mg の割に P^{32} ラベル付内毒素を吸着させ 0.4 N-NaOH で溶出した。内毒素は P^{32} の比放射能から算出した。

Column 5×0.8 cm, 流速 0.1 ml per minute, 1 tube 5 ml. Fig. 4-1 の前半である試験管 No. 2-6 を集めて a_1 とした。No. 7-13 を集めて a_2 とした。 a_1 を同様の操作で溶出させたものを Fig. 4-2 に示した。 a_2 を同様の操作で吸着溶出したものを Fig. 4-3 とした。

Fig. 5 内毒素の電気泳動図

Phosphate buffer pH7.7 $\mu=0.2$ 5°C

Fig. 6 Amberlite XE 64 に吸着した

緑膿菌内毒素の吸着溶出

内毒素 200 mg, Amberlite XE 64 60 g, Column 6×40 cm, 流速 2 ml per minute, 0.4 N-NaOH で溶出, 各 tube 100 ml, 毒素は Folin 反応により Coleman の Spectrophotometer によつて比色し定量した。

Table 1 Amberlite XE 64 に吸着, 溶出前後の内毒素の二, 三の化学分析値, 生物学的性状

		Nitrogen %	Phosphorus %	Precipitin reaction	Minimum pre- paratory dose of Schwartzman reaction μg	Antibody production (Anaphylaxis)
The purified endotoxin before treatment		9.2	2.7	320,000	0.08	+
The purified endotoxin after treatment	a1	9.2	2.9	320,000	0.08	+
	a2	9.2	2.7	320,000	—	—

沈降反応: ウサギ抗内毒素血清に対する抗原稀釈倍数で示した (重層法)。

Shwartzman 反応: ウサギ皮内に, いろいろの濃度の内毒素を含む溶液 0.1 ml を準備注射し 18 時間後に静脈内に原毒素を注射, 5 時間後に判学した。

抗原性, アナフィラキシー性: 350 g のモルモットの皮下に 50 μg 注射後 7 日目に抗体産生を認めた。更に 200 μg 注射後 9 日目 3 mg を静脈内に注射したところ, 定型的アナフィラキシーショックで死亡した。

した。全収量は 76% で, えられた材料は電気泳動的に均一であつた。化学分析値, 生物学的性状の比較は Table 1 に示したが, XE 64 吸着溶出前後において著しい変化はみられなかつた。以上の実験結果からカラム法あるいはバッチ法により内毒素は pH 2.2 で Amberlite XE 64 に完全に吸着し, NaOH により pH 7 にすることによりほとんど完全に溶出できる。回収率は毎常 80% 前後であつた。又吸着溶出前後において物理化学的, 生物学的性状に変化はみられなかつた。

II. autolysate よりのイオン交換樹脂を用いる内毒素の分離精製

前記合成培地 51 を 150 ml づつ振盪コルベン (容量 500 ml) に分注し滅菌の後, 土島株をうえ 37°C に 30 時間振盪培養をおこなつた。ついてトルエンを重層し 48 時間 37°C に静置する。濾紙で濾過し Sharpless 超遠心機でこの autolysate より菌体残渣を除くと褐色透明の濾液をうる。これに 50% ZnCl_2 溶液を滴下すると白色沈澱を生ずる。よく攪拌し, もはや上清が白濁しないまで十分に且つ可及的少量加える。この沈澱を傾斜及び遠心によつて集め, 20% Na_2HPO_4 が $\text{Zn}(\text{PO}_4)_2$ の白沈と完全に置きかわるまで加えてこの沈澱を除き濃縮毒素溶液をうる。ついてセロファン囊あるいは牛腸膜を用いて低温で 2 日流水透析を行う。内液に稀苛性ソーダを滴加し, pH 8.5 とし Dowex 50 (Na 型) を加え 6 時間攪拌する。その濾液を Dowex 50 から分け稀塩酸で pH 2.2 とし Amberlite XE 64 (H 型) を加え 30 分攪拌する。ついて十分に水洗しこのレジンを Column につめて 0.4 N-NaOH で溶出するかあるいはこのレジんに 0.4 N-NaOH を加えて中性にして溶出する。溶出液は低温 (0—5°C) でアセトンを加えて沈降させ凍結乾燥する。収量は 51 の全培養から 230 mg えられる。(Table 2) この内毒素は電気泳動的に均一である (Fig. 7) 化学分析値は

Table 2

Fig. 7 レジンにより精製された内毒素の電気泳動図

Veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$, 12°C

Table 3

Nitrogen	8.45 %
Phosphorus	1.61
Reducing sugar (as glucose)	12.0
Folin test (as tyrosin)	8.0

Nitrogen: Micro Kjeldahl method

Phosphorus: R. J. L. Allen, Biochem. J., 34, 858, 1940

Reducing sugar: A. Fujita and D. Iwatake, Biochem. Z., 242, 43, 1932

Folin test: O. H. Lowry, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951

Table 3 に示した。加水分解後ペーパークロマトグラフィーにより、リボース、デゾキシリボース、ラムノース、グルコース、アラビノースを認めた。したがってこの内毒素 (comp. I) と同様の性状を示し化学的には Lipopolysaccharide-protein complex と考えられる。また紫外部吸収曲線は Fig. 8 に示したが、これも従来の comp. I と変りない。毒性は LD_{50} 0.3 mg で Shwartzman 反応はその準備最少能力は $2\mu\text{g}$ であった。この内毒素はウサギ抗菌血清と重層法で沈降反応をおこなったところ

Fig. 8 紫外線吸収スペクトル

Beckmann Spectrophotometer Model DU

抗原稀釈で 28,000 倍まで陽性を示した。以上の実験結果から緑膿菌 autolysate よりイオン交換樹脂を用いてその内毒素を分離精製することが出来た。又この内毒素は従来の autolysate から分離される comp. I と化学的に同一のものと考えられる。

考 察

緑膿菌を合成培地で 37°C 30 時間振盪培養すると、その autolysate 中にはいわゆる内毒素である Lipopolysaccharide-protein complex (comp. I と命名) は nucleic acids, polyribose phosphate (comp. II と命名) 及び塩基性物質と結合した状態で存在していると考えられている。lipopolysaccharide-protein complex (comp. I) の水溶液に 50 % ZnCl_2 を滴下しても沈降物は生じないが、前記 comp. I-comp. II-塩基性物質複合体の状態では容易に沈降する。従つて内毒素 lipopolysaccharide-protein complex (comp. I) の精製に従来の蛋白の精製分離法である塩化亜鉛による沈澱法を用いることが出来る。ついで comp. I は Dowex 50 に対し pH 4 乃至 10 の範囲で吸着されないことを利用し (Fig. 2) この濃縮された comp. I-comp. II-塩基性物質を Dowex 50 と弱アルカリ性で振盪すると、これらの各成分を解離させることが出来、塩基性物質は変性し水に不溶となる。次に comp. I は Amberlite XE 64 に対しては pH 2 乃至 7 の間で吸着され弱アルカリ性では吸着されない (Fig. 3) Dow-

ex 50 によつて分離した毒素液を濾別し、その濾液を稀塩酸で pH 2.2 として Amberlite XE 64 (H 型) を加えると comp. I は之に吸着される。そこでこれを 0.4 N-NaOH で中性にして溶出すれば comp. I が単離されるわけである。

この方法は従来の方法と比較すると、その精製過程で electro dialysis, zone electrophoresis をおこなう必要なく容易に電気泳動的に均一な材料がえられる点に特長がある。又 comp. I と核酸成分 comp. II との分離も容易であることは内毒素の精製に好都合である。

イオン交換樹脂はリボヌクレアーゼ、リゾチーム及びその他の蛋白質の精製に応用されているが緑膿菌の菌体内毒素は分子量 100 万位の蛋白糖脂質複合体であり、このような高分子物質がレジンに対してその化学的生物学の活性を失うことなく吸着溶出が可能であることは興味あることである。

本間、浜村及び著者らは緑膿菌ファージの精製に本論文に使用したと同じレジンを用いて成功した。従来ファージの精製に当つては超遠心分離硫酸分画あるいは有機溶媒による分画沈澱法がおこなわれてきたが、この場合内毒素などの高分子物質との分離は非常に困難であつた。今回このような高分子菌体内毒素がイオン交換樹脂に対して、その吸着溶出の態度が明らかにされたためにファージと内毒素との分離がイオン交換樹脂によつて容易に達成することが出来た。

結 論

合成培地に培養した緑膿菌培養濾液を濃縮し、之に Dowex 50, Amberlite XE 64 を用いて内毒素 (lipopolysaccharide-protein complex) を精製分離することが出来た。

本研究の一部は 1957 年 4 月松本でおこなわれた日本細菌学会関東支部会で発表された。また 1955 年 11 月東京でおこなわれた日本生化学総会で発表した。

終にのぞみ御校閲の労をとられ、その後の研究の御指導に当たられている恩師群馬大学医学部沢田利貞教授に対し深謝する。又本論文の御指導をいただいた東京大学伝染病研究所本間遜助教授に感謝の意を表し、同研究室の浜村憲克氏その他の方々の御助力を感謝する。

引用文献

- 1) Boivin, A. and Mesrobian, L. : Rev. Immunol., 1, 553, 1935, 2, 113, 1936.
- 2) 細谷省吾, 川島四郎 : 実験医学雑誌, 20, 913,

- 1936.
- 細谷省吾, 進藤宙二, 門馬顕義 : 実験医学雑誌, 20, 1334, 1936.
- 細谷省吾, 川島四郎, 進藤宙二, 田中哲之助 : 第 11 回連合微生物学会記録, 119, 1937.
- 3) Morgan, W. T. J. : Biochem. J., 31, 2003, 1937.
- 4) Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M. : Biochem. J., 35, 1140, 1941.
- 5) Palmer, J. W. and Gerlough, T. D. : Science, 92, 155, 1940.
- 6) Walker, J. : Biochem. J., 34, 325, 1940.
- 7) 黒屋政彦, 小泉和 : 東北医誌, 29, 231, 1941.
- 8) 武田徳晴, 大田達男, 佐藤稔 : 第 16 回連合微生物学会記録, 116, 1942. J. Biochem., 36 '407, 1944.
- 9) Perlman, E., Binkley, F. and Goebel, W. F. : J. Bact., 47, 476, 1944.
- Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E. : J. Exp. Med., 81, 315, 331, 349, 1945.
- Tal. C. and Goebel, W. F. : J. Exp. Med., 92, 25, 1950.
- 10) 細谷省吾, 本間遜, 林喬義 : 基礎と臨床, 1, 52-58, 1947.
- 11) Hosoya, S., Homma, Y., Egami, F. and Yagi, Y. : Japan J. Ep. Med., 20, 55-68, 1948.
- 12) Homma, Y., Hamamura, N., Naoi, M. et Egami, F. : Imprimé avec le périodique « Bulletin de la Société de Chimie biologique » Extrait du Tome XL, n°4, 647-664, 1958.
- 13) Homma, J. Y., Sagehashi, K., et Hosoya, S. : Japan. J. Exp. Med., 21, 375, 1951.
- 14) Homma, J. Y., Katsura, T., Hosoya, S., Miyazaki, Y., Kimura, K. et Saito, N. : Annual Report of the Research Committee on the Application of Artificial Radioactive Isotopes in Japan, 2-1, 91, 1952.
- 15) Homma, J. Y. : Jap. J. Exp. Med., 22, 17, 1952.
- 16) Homma, J. Y., Katsura, T., Sagehashi, K. et Hosoya, S. : Jap. J. Allergy, 3, 136, 1954.
- 17) Homma, J. Y., Katsura, T., Sagehashi, K., Hosoya, S., Miyazaki, Y. et Wakabayashi, Y. : Jap. J. Allergy, 3, 177, 1954.
- 18) Egami, F., Shimomura, M., Ishihara, H., Homma, J. Y., Sagehashi, K. et Hosoya, S. : Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 779, 1954.
- 19) Naoi, M., Egami, F., Hamamura, N. und Homma, J. Y. : Biochemische Zeitschrift, 330, 421-427, 1958.
- 20) 本間遜, 樺橋孝, 細谷省吾, 江上不二夫, 下村道夫, 石原宏 : 日本細菌学雑誌, 9, 1013, 1954.
- 21) Lowry, O. H. : J. Biol. Chem., 193, 265, 1951
- 22) Allen, R. J. L. : Biochem. J. 34, 858, 1940.

(受付 : 1959 年 12 月 4 日)