細菌多糖体の化学的分析に関する研究

第6報 *Shigella flexneri* 2a のO抗原特異
多糖体の単糖構成について*

佐々木 禎一

札幌医科大学微生物学教室 (主任 植竹久雄教授)

〔受付: 9月14日1956年〕

緒 論

著者は既に, *Salmonella* 属に所属する4菌株から夫々同一抽出法で得られた精製O抗原特異多糖体の構成単糖を P. P. C. (Paper Partition Chromatography) で分析し¹⁾, 其の結果を中川²⁾, 伊勢³⁾の発表した菌株の場合の結果を含めて種々比較検討して来た。

今回は *Shigella flexneri* 2a (Ⅱ: 4……) と *Sh. flex. variant Y* (: 4……) の場合につき, 夫々の有する抗原性多糖体を抽出精製し, 構成単糖を分析比較して夫々の示す血清学的性状の差異との間の関連性について比較検討を加えたが, 本報では前者の分析結果に関して記載する。

実験方法並びに結果

実験は既報¹⁾の *Salmonella* の場合と殆んど同じである。

実験試料の調整

(1) 使用菌株: *Shigella flexneri* 2a 1675株 (日本腸内細菌委員会より分与されたもの)。

(2) 培養: Roux 瓶を用い, 平板寒天培地上37°C, 48時間培養した。

(3) 集菌: 既法通り集菌, 約130 gmの湿潤菌体を得た。

(4) 抗原性特異多糖体抽出法: *Salmonella* の場合と同様 Boivin 法⁴⁾に従い冷三塩化醋酸で抽出, 約190 mgの Boivin 抗原を得た。収量の少ないのは透析過程で減少したのではないかと考えられる。次に更に精製O抗原特異多糖体53mgを得た。

実験方法

(1) 沈降反応: 抗原としては, 分離した *Sh. flex. 2a* の Boivin 抗原及び精製多糖体を用い, 一方血清として

は *Sh. flex. 2a* 菌で免疫した家兎血清を使用した。尚後者多糖体試料では抗Ⅱ因子型血清及び抗4因子群血清を用いての沈降反応試験も行った。

(2) 分離多糖体単糖構成の分析: Boivin 抗原及び精製多糖体試料共, 0.1N H₂SO₄ で煮沸浴上6時間水解し, Ba(OH)₂ で中和後, 清澄な上清を減圧濃縮して P. P. C. の試料とする。① Phenol H₂O (4:1, v/v), ② n-Butanol-CH₃COOH-H₂O (9:1:7, v/v, 上層) 及び③ Ethylacetate-CH₃COOH-H₂O (3:1:3, v/v, 上層) の展開剤を用いて, 1次元 P. P. C. で分析した。一般発色剤としては Aniline Hydrogen Phthalate 液⁵⁾を用いたが, 更に特異反応⁶⁾としては常法通り, Elson & Morgan 反応⁶⁾及び Ninhydrin 反応⁷⁾ (Amino 糖), Naphthoresorcinol 反応⁷⁾ (Hexuronic Acid,) 並びに Orcinol 反応⁸⁾ (Ketose) を用いて特異的検出を行った。

実験結果—分離多糖体の血清学的性状

(1) Boivin 抗原: 此の試料を抗原として用いた場合, *Sh. flex. 2a* 免疫家兎血清との間の沈降反応試験の結果は, 10万倍稀釈まで陽性, 30万倍稀釈で疑陽性を示す事が認められた。

(2) 精製多糖体: 此の抗原は沈降反応試験で同上家兎免疫血清と3万倍まで陽性を示すが, 10万倍稀釈で疑陽性の結果を示した。即ち精製操作は此の際, 沈降反応能

SASAKI Teiichi: Chemical analysis of bacterial polysaccharides. VI Studies on the monosaccharide constituents of the antigenic specific polysaccharide of *Shigella flexneri* 2a. Department of Microbiology, Sapporo Medical College, — Jap. J. of Bact., 11 (12), 1093-1097, 1956.

* 本論文の要旨は第7回日本公衆衛生学会総会 (於札幌, 昭27) で発表した。

を低下せしめて居る事が解る。一方抗 II 因子型血清とは 2000 倍稀釈で疑陽性、抗 4 因子群血清とは 5120 倍稀釈迄陽性を示した。此等の結果をまとめて第 1 表に掲示した。

第 1 表 *Sh. flex. 2a* 分離多糖体試料の
示す血清学的性状

抗原	Boivin 抗原	精製特異多糖体
抗血清		
<i>Sh. flex. 2a</i> 血清	10^{-5} (+), 3×10^{-5} (±)	3×10^{-4} (+), 10^{-5} (±)
抗 II 因子型血清		2×10^{-3} (±)
抗 4 因子群血清		5120 (+)

各沈降反応試験の際の実施条件は既法¹⁾の場合と全く同じである。

(+) は反応陽性を、且つ (±) は疑陽性を示す。

実験結果—分離多糖体単糖構成分析結果

(1) 1 次元 P. P. C に依る分析：展開剤 ①、②及び③中で示す *Sh. flex. 2a* の Boivin 抗原及び精製多糖体水解試料の各水解液の P. P. Chromatogram は夫々 1 図、2 図及び 3 図である。即ち両試料共、Rhamnose, Glucose, Galactose, Mannose, Glucosamine 及び Xylose (少量) に相当する Spots を示した他、原点近くに移動の遅い不明 Spot を認めた (両試料共同の P. P. Chromatogram を示すので図中の試料 4 は両方の場合を兼ねて居る)。此の Spots は①、②及び③の溶媒中で夫々 0.02, 0.015 及び 0.13 の移動率を示す Sharp Spots であり、Aniline Hydrogen Phthalate で Pentose 様の呈色を示す。而し水解時間を 7 時間にした場合には、此の Spots は P. P. Chromatogram 上消失し、尚新しい Spots が顕われないところから、構成糖として検出された上記 6 単糖の中の Xylose と他の何れかの単糖とから成る様な一種の寡糖類と見られる。

(2) 特異反応による同定：確認を正確にする為、4 種の特異反応を試みた。即ち Amino 糖には Ninhydrin 反応、Hexosamine 及び N-Acetylhexosamine には更に Elson & Morgan 反応を行って、両試料中に共に Glucosamine が検出された他、少量の N-Acetylglucosamine (①及び②溶媒系中で夫々 0.44 及び 0.26 の RF 値を示す) が検出された。一方 Orcinol 反応は陰性で、従つて Ketose は検出されなかった。然し乍ら Boivin 抗原水解試料の 1 次元 P. P. Chromatogram 上で行った Naphthoresorcinol 反応は微弱陽性を示した。即ち微量の Hexuronic Acid が検出された事になるが、

第 1 図 *Sh. glexneri 2a* 分離多糖体水解試料の
P. P. C (Phenol 系)

第 2 図 同上 P.P.C (Butanol 系)

第 3 図 同上 P. P. C. (Ethylacetate 系)

- 註]： 1. Arabinose 2. Glucose
3. Galactose 4. 水解試料
5. Mannose 6. Xylose
7. Rhamnose 8. Glucosamine
9. Ribose 10. Fructose

之に対して精製後の抗原多糖体試料の場合では此の反応は全く陰性で Hexuronic Acid は検出されない。従つて Boivin 抗原多糖体試料中で微量見出された Hexuronic Acid は夾雑物 (培地からの寒天成分) に由来するものと見られる。

総括並びに考察

赤痢菌の特異多糖体の化学的分析に関する研究は余り進捗してない。殊に其の単糖成分の分析に関しては、僅かに Olitzki et al¹⁰⁾, Morgan¹¹⁾ 及び Morgan & Partridge¹²⁾ の報告が見られる程度であつて、菌株間での分析結果の比較等は最近迄殆んど行われなかった。

著者は *Shigella flexneri* 2a (Ⅱ : 4 ……) 及び *Sh. flex. var. Y* (: 4 ……) との間の抗原因子の差異から示される血清学的性状の差異を, 各抗原特異多糖体構成糖の差異から検討すべく, 既報の *Salmonella* の場合¹⁾ と全く同じ実験方法で構成糖の分析を実施した。

O 抗原特異多糖体の抽出分離及び精製に際しては, 通常¹⁾ 通り冷三塩化醋酸抽出法を用いたが, 一般に赤痢菌から抗原特異多糖体を分離した例としては次の様な報告が挙げられる。即ち中性加熱法 (Morgan et al.¹³⁾) 酸性加熱法 (Olitzki & Leibowitz¹⁴⁾, Meyer & Morgan¹⁵⁾, 武田¹⁶⁾, Smolens et al.¹⁷⁾, 及び花新発¹⁸⁾並びに Alkali 性加熱法 (Olitzki & Leibowitz¹⁴⁾, 冷三塩化醋酸に依る抽出法 (Boivin & Mesrobian¹⁹⁾, Diethylene glycol 類に依る抽出法 (Morgan¹¹⁾) と此の抽出物を Formamide 処理 (Morgan & Partridge¹²⁾), 或いは Pyridine 処理 (Goebel, Winkley & Perlman²⁰⁾) する方法, 更に Phenol で抽出する方法 (Morgan & Partridge¹²⁾) 等種々²¹⁾ 報ぜられて居る。又用いる方法に依つて除去される, 或いは残存する構成々分が夫々異なる事, 及び其の示す血清学的性状が多様性である点^{20) 22)} が確認されて居る。Diethylene glycol 法及び Phenol 法等が赤痢菌の抗原多糖体抽出の場合に優れた方法である事は既に認められて居るが²³⁾, 分析比較を目的とする為極力同一方法で分析試料を得る事が望ましく, 著者は冷三塩化醋酸に依り抽出を行い, 以下 *Salmonella* の場合に準じた方法で *Sh. flex. 2a* O 抗原特異多糖体分割を得た。抽出に敗様な酸を用いた場合, 抗原多糖体の血清学的性状へ与える影響については, [Burger²⁴⁾ が述べる様に検討しなければならない問題ではあつたが, 本回の実験は寡くとも, 此の方法で, *Sh. flex. 2a* の場合, 抗原性を持った多糖体試料を得る事が出来る点を示して居る。最近 Davies^{23) 24) 25)} も矢張り冷三塩化醋酸抽出法で 3 菌株の赤痢菌から特異性細菌多糖体を分離して居るが此の際其の抗原性については記載してない。又一方三塩化醋酸抽出で得られた *Sh. flex. 2b* の O 抗原から劃分される核酸分割に毒性及び沈降原性が強く認められる事実から, 核酸が此等血清学的性状に関与しないと断定する事は出来ないという報告²⁶⁾ も見られて居る。

扱て上記方法で抽出精製された *Sh. flex. 2a* の抗原性多糖体の水解試料の P. P. C. 分析から構成糖として, Glucosamine (N-Acetylglucosamine の微量), Glucose, Galactose, Mannose Rhamnose 及び少量の Xylose が認められた。既報の *Salmonella* E 群の場合¹⁾ と定性的に殆んど同じ糖が検出されたが, Xylose 量が

若干少なかつた。又 N-Acetylglucosamine 微量と Glucosamine が共に検出されたが, 天然で N-Acetylglucosamine 残基として含有され, それが途中の操作で脱 Acetyl 化され, 其の結果 Glucosamine も一緒に検出されたのか, 或いは両糖が共に含有されて居たのかは今の処断定出来ない。

此の実験の行われた当時, 赤痢菌抗原特異多糖体構成糖を分析した報告としては, *Sh. dysenteriae* (Shiga) 菌体から中性加熱法で得られた所謂 S. S. S. (Specific Soluble Substance) は Galactose 及び Acetylglucosamine を含有して居ると言う Morgan の報告¹³⁾, 又 Flexner, Y 及び Shiga の各菌体の Hapten について構成糖を分析した結果, Hexose が全部の場合に, Pentose が Flexner 及び Y 株の場合に, Hexuronic Acid が Y と Shiga 株の場合に, そして Amino 糖が Shiga の場合に夫々含有される事及び Y 株の Hapten 中には Galactose 若しくは Galacturonic Acid が認められる事等を明らかにした Olitzki et al. の報告¹⁰⁾, 又 Glycol 抽出法で得られた抗原は Galactose, Rhamnose 及び N-Acetylhexosamine (恐らくは Glucosamine) を含有する事を報告した Morgan の研究^{11) 12)} 等があつた。1945年になつて Goebel 一派²⁰⁾ は Type V の赤痢菌の抗原多糖体中に 12% の Glucosamine を確認し, 更に Type W の特異抗原と同精製 Hapten とにつぎ分析を試るも, Acetyl基は前者では 6.00%, 後者では 7.62% (Glucosamine は 13.3%) 含まれて居る事を明らかにして居る。又 Partridge は *Sh. dysenteriae* (Shiga) の O 抗原特異多糖体中には Rhamnose, Glucosamine (及び N-Acetylglucosamine), Galactose の含まれる事を P. P. C. で示した報告²⁷⁻²⁹⁾ 等も見られて居たが此の種の系統的な分析研究は全然見当らなかつた。

然し乍ら, O 抗原特異多糖体を化学的に分析して行く研究は, 極めて重要であり, 且興味のある問題である為同種の実験報告が, 著者が分析を行つた 1952 年頃から増加して来た。即ち 1952 年 Jesaitis & Goebel^{30) 32)} は *Sh. sonnei* 第Ⅱ相菌につぎ研究を行い, 本菌から Phenol 抽出法で得た O 抗原特異多糖体中には Glucose, Galactose, Glucosamine 及び 1 種の Heptose (d-a-Gala-manno-heptose) が含有されて居るが, 一方其の抗 Phage 変異株の場合では, 精製 O 抗原特異多糖体の構成糖は P. P. Chromatogram 上一種の Hexosamine が認められるのみであると言う事を明かにした。更に同年 Slein & Schnell^{33) 35)} は *Sh. flexneri*, Type 3 の菌株の場合の詳細な分析結果を報告して居る。即ち Phenol

加死菌から水で加熱抽出, Alcohol 分割沈澱及び除蛋白操作等を組合わせて分離精製したO抗原特異多糖体は D-Glucose, L-Rhamnose, D-Glucosamine 及び D-Gala-L-mannoheptose から成る事を示した。1955年 Davies²³⁾は各種の Salmonella 及び Chromobacter と一諸に Sh. alkalescens, Sh. dispar 及び Sh. schmitzii の場合の分析結果を報告した。それに依ると著者と全く同じ理由から, 各O抗原特異多糖体を冷三塩化醋酸で抽出, 構成糖を P. P. C. で分析し, 夫々 Sh. schmitzii と Sh. dispar は Glucosamine, Galactose, Glucose 及び Rhamnose から成り, 一方 Sh. alkalescens は Glucosamine, Galactose, Glucose 及び Chondrosamine から成り, Rhamnose を欠いて居る事を報告した。同時に, Sh. dysenteriae²⁷⁾²⁸⁾, Sh. sonnei³⁰⁾ 及び Sh. flexneri²⁾³³⁻³⁵⁾ の場合の分析結果を比較して, 此等3菌種の場合は総て Acetylglucosamine を含有し, 他に Glucose, Galactose 及び Rhamnose の中から夫々異なる何れか1糖を欠いて居る事を指摘して居る。続いて Davies, Morgan & Record³⁶⁾ は Sh. dysenteriae の Phenol 加死菌から, 著者と同様 Boivin 抗原を経て, Phospholipid 及び蛋白質成分を除去して得た, 10 vols. Alcohol で沈澱した Degraded Polysaccharide Hapten は N-Acetylglucosamine (27.5%), L-Rhamnose (32.2%) 及び D-Galactose (27%) から成る事を明かにした。又同上 Boivin 抗原から Phospholipid 除去後, 除蛋白, 冷稀 Alkali 処理に依つて得られる所謂 Undegraded Polysaccharide も亦, 同じ糖組成を示したが, 一方 Lipopolysaccharide として分離せられた多糖体試料は Heptose を含有する事を明らかにし, Heptose の抗原物質分子中での結合状態について示唆を与えた。

著者の Sh. flex. 2a のO抗原多糖体構成糖分析結果と他研究者のそれと比較すると, 何れの場合も共通に N-Acetylhexosamine (或いは Hexosamine, Glucosamine として) が認められたが, 而し Chondrosamine が Sh. alkalescens²³⁾²⁴⁾ でしか認められてない。Rhamnose の存在の有無については, Sh. alkalescens と Sh. sonnei³⁰⁾ の場合には認められなかったが, 一方 Sh. dysenteriae (Shiga)²⁷⁾²⁸⁾, Sh. flexneri³⁵⁾, Sh. schmitzii,²³⁾ 及び Sh. dispar²³⁾ の場合には検出されて居り, 此の点 Sh. flex. 2a の場合も矢張り Rhamnose が認められて居り, Sh. flexneri, Type 3 (Slein & Schnell)³⁹⁾ の報告と比較して首肯出来る。又 Pentose に関しては Olitzki et al¹⁰⁾ が Flexner 及び Y 株の Hapten 中に

夫々其の存在を報じて居るのみで, 他では何れも Pentose の検出を報じてなかった。著者は少量ではあるが, 矢張り同じく Pentose (Xylose) を Sh. flex. 2a の場合, 前述通り認める事が出来た。而し一方 Slein & Schnell³⁹⁾ は Sh. flex., Type 3 の場合では Pentose の存在を報じてない様である。著者は Aldohexose としては Sh. flex. 2a で, Glucose, Galactose 及び Mannose を認めたが, 他に赤痢菌O抗原特異多糖体中に Mannose を認めた報告は見当たらない。此の点に関しては, 慎重に定量的手段も含めて更に検討し度いと思う。Sh. flex., Type 3 の場合には, Galactose の存在が認められなかったが, 著者の Sh. flex. 2a の場合, 又 Olitzki et al¹⁰⁾ の Y 菌株の場合等では Galactose を検出して居り, 差異が認められて居る。

結 論

- 1) Shigella flexneri 2a 菌から冷三塩化醋酸で Boivin 抗原を抽出し, 次に之から精製O抗原特異多糖体を得た。
- 2) Sh. flex. 2a 免疫血清と Boivin 抗原及び精製多糖体との間の沈降反応は, 夫々10万倍及び3万倍稀釈まで陽性を示した。
- 3) 本菌O抗原特異多糖構成糖として N-Acetylglucosamine (Glucosamine), Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose 及び少量の Xylose を確認した。
- 4) 赤痢菌の他菌型の抗原多糖体分析結果と比較, 検討を加えた。

文 献

- 1) 佐々木: 日本細菌誌, 10, 997(1955); 11, 11(1956); 11, 107(1956); 11, 211(1956); 11, 321(1956).
- 2) 中川(武): 札幌医誌, 5, 220(1954).
- 3) 伊勢: 札幌医誌, 5, 101(1954).
- 4) Boivin, A., Mesrobianu, I. & Mesrobianu, L.: Compt. Rend. Soc. Biol., 112, 76(1933); 113, 490(1933); 114, 307(1933); Arch. Roum. Path. Exptl. Microbiol., 8, 45(1935).
- 5) Partridge, S. M.: Nature, 164, 443(1949).
- 6) Elson, L. A. & Morgan, W. T.: Biochem. J., 27, 1824(1933).
- 7) Partridge, S. M.: Biochem. J. 42, 238(1948).
- 8) Toennies, G. & Kolb, J. J.: Anal. Chem., 23, 823(1951).
- 9) Hough, L., Jones, J. K. N. & Wadman, W. H.: J. Chem. Soc. 1702(1950).
- 10) Olitzki, L., Leibowitz, J. & Berman, M.: Brit. J. Exptl. Path., 18, 305(1937).

- 11) Morgan, W. T. J.: *Biochem. J.*, 31, 2003 (1937).
- 12) Morgan, W. T. J. & Partridge, S. M.: *Biochem. J.*, 34, 169 (1940); 35, 1140 (1941).
- 13) Morgan, W. T. J.: *Brit. J. Exptl. Path.*, 12, 62 (1931); 13, 342 (1932).
- 14) Olitzki, L. & Leibowitz, J.: *Brit. J. Exptl. Path.*, 16, 523 (1935).
- 15) Meyer, K. & Morgan, W. T. J.: *Brit. J. Exptl. Path.*, 16, 476 (1935).
- 16) 武田: 台湾医誌, 43, 72 (1944).
- 17) Smolens, J., Halbert, S. P., Mudd, S., Doak, B. & Gonzalez, L.M.: *J. Immunol.*, 52, 41 (1946).
- 18) 花新発: 日本細菌誌, 8, 727 (1953).
- 19) Boivin, A. & Mesrobian, L.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 115, 304 (1934); 124, 442 (1937).
- 20) Goebel, W. F., Binkley, F. & Perlman, E.: *J. Exptl. Med.*, 81, 315; 331; 349 (1945).
- 21) Burger, M.: *Bacterial Polysaccharides Their chemical and immunological aspects*, Charles Thomas, Springfield, Illinois (1950).
- 22) Tal, C. & Olitzki, L.: *J. Immunol.*, 58, 337 (1948).
- 23) Davies, D. A. L.: *Biochem. J.*, 59, 696 (1955).
- 24) Davies, D. A. L., Morgan, W. T. J. & Mosimann, W.: *Biochem. J.*, 56, 572 (1954).
- 25) Davies, D. A. L. & Morgan, W. T. J.: 6th. Intern. Congr. Microbiol., Rome, Abst., Vol. p. 457 (1953).
- 26) 多田: 細菌毒素シムポジウム, 1, 104 (1955).
- 27) Morgan, W. T. J.: *Biochem. J.*, 30, 309 (1936).
- 28) Morgan, W. T. J.: *Helv. Chim. Acta.*, 21, 469 (1938).
- 29) Partridge, S. M.: *Biochem. J.*, 42, 251 (1948).
- 30) Jesaitis, M. A. & Goebel, W. F.: *J. Exptl. Med.*, 96, 409 (1952).
- 31) Goebel, W. F. & Jesaitis, M. A.: *J. Exptl. Med.*, 69, 425 (1952).
- 32) Goebel, W. F. & Jesaitis, M. A.: *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 66 (1953).
- 33) Slein, M. W. & Schnell, G. W.: *Bact. Proc.*, 110 (1952).
- 34) Slein, M. W. & Schnell, G. W.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 80, 646 (1952); 82, 734 (1953).
- 35) Slein, M. W. & Schnell, G. W.: *J. Biol. Chem.*, 203, 837 (1953).
- 36) Davies, D. A. L., Morgan, W. T. J. & Record, B.: *Biochem. J.*, 60, 290 (1955).