緑膿菌内毒素及びファージ研究へのイオン 交換樹脂の応用*

本 間 遜・浜 村 憲 克・芦 沢 義 郎

東 大 伝 研

[受付: 9月19日・1957年]

緑膿菌内毒素については今迄にしばしば発表してきたので詳細は省略するが、緑膿菌を合成培地に振盪培養しその autolysate から内毒素は容易に電気泳動的にも均一の状態と分離精製される。化学的には lipocarbohydrate-protein complex であり、分子量は 100 万内外であると考えられている¹⁻⁵⁾

緑膿菌には溶原株 (lysogenic strain) が多く、今迄実験に使用した株も溶原菌であり、合成培地中に 10^3 乃至 10^7 のファージを産生する⁶⁾。したがって autolysate 中にはファージと内毒素とが混在しているわけで内毒素研究上のみならずファージ研究の立場からも、それぞれを分離する必要が生じ、この目的にイオン交換樹脂が使用できるかどうかをしらべた。

I. 精製内毒素のイオン交換樹脂による吸着と溶出

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⁴⁾。土島株を合成培地、組成

ククタミン酸ソーダ	2%
グルコース	0.5%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01%
Ca(NO ₃) ₂	0.0001%
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.000005%
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.563%
KH ₂ PO ₄	0.252%

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機で菌体を除き、その濾液を ZnCl₂-Na₂HPO₄ を用いる細谷法で濃縮し、普通透析、電気透析を行ない、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。又燐量を加減し、培地 1 ml 当り 30γ 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、実験

に使用した。イオン交換樹脂: Amberlite IRA-410, IRA-400, IR-4 B, Nalcite WBR, Dowex 50, Amberlite IRC-50, XE-64, 科研フェノキシ醋酸樹脂を使用した。

内毒素の定量: 放射性内毒素の P³² の放射能を Geiger-Müller Counter により測定し、比放射能から毒素量を算定した⁹⁾。又内毒素を Folin 反応により定量した⁷⁾。更に半定量的沈降反応も行つて参考とした。

実 験

塩基性樹脂である Amberlite IRA-410, IRA-400, IR-4 B, Nalcite WBR 等の PO₄ 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, XE-64, 科研フェノキシ醋酸樹脂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。又 Dowex 50 を用いた成績は Fig. 2 に示した。吸着された毒素は NaOH で pH 7 にすることにより殆んど完全に溶出できた。

以下 Amberlite XE-64 を使用した実験成績を示す。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ヂン 1g 当り 4 ~ 6 mg の内毒素が吸着される。本実験ではレヂン 1g 当り 3 mg の内毒素を使用した。溶出は 0.4N NaOH で置換クロ

HOMMA Yuzuru J., HAMAMURA Norikatsu & ASHIZAWA Yoshio: Use of ion exchange resin for chromatographs of Pseudomonas endotoxin and its phage Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo.—Jap. J. of Bact.,—12 (12), 973-977, 1957.

* 本研究は 1955 年 11 月東京で行われた日本生化学会総会で発表した。

Fig. 1 P^{32} ラベル付内毒素の Amberlite XE-64 えの吸着 (図は毒素とレヂン振盪上清の未吸着毒素量を示した)

P^{32} ラベル付内毒素を磷酸ソーダ、クエン酸緩衝液でそれぞれの pH で 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て示した (Autolysate 中の抗原物質は半定量的沈降反応から概算したもの)

Fig. 2

Dowex 50 (Na 型) 2g をいろいろの pH の buffer で bufferize し, P^{32} ラベル内毒素150 γ (0.5ml.) を加え, これに蒸留水を加えて全量を 10ml. とする, 振盪 30 分後, その上清 1ml 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.

マトの方法をとった. 実験結果は Fig. 3 に示したが, 比放射能によって算出された溶出毒素量は殆んど 100% 近く, 別に行った Folin 反応による比色定量の成績も

Fig. 3 緑膿菌内毒素の Amberlite XE-64 に対する吸着, 溶出

Amberlite XE-641g に対して 3mg の割に P^{32} ラベル付内毒素を吸着させ, 0.4N NaOH で溶出した. column 5 $\times$ 0.8cm, 流速 0.1ml per minute 1 tube 5ml.

— P^{32} の比放射能から算出された内毒素量
 ■ 抗内毒素家兎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-641g に対して 3mg の割に P^{32} ラベル付内毒素を吸着させ 0.4N 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 $\times$ 0.8cm, 流速 0.1ml per minute. 1 tube 5ml.

略これと一致した. 又沈降反応によって示される成績も誤差範囲でこれと略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, 夫々もう一度吸着・溶出を行い, 夫々 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。又流速を毎時 0.1ml とし、NaOH の濃度を 0.01N とし溶出を行つたが溶出曲線に変化はみられなかつた。

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行つた。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行つた。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、毒素を沈降した後冷結乾燥した。全収量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。

Fig. 5 内毒素 (e) の電気泳動図
phosphate buffer pH 7.7 $\mu=0.2$ 5°C

小括：カラム法或はパ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 にすることにより殆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. ファージ感染菌の lysate よりイオン交換樹脂によるファージの分離精製

Fig. 6 Amberlite XE-64 に吸着した緑膿菌内毒素の吸着溶出

内毒素 200mg, Amberlite XE-64 60g, Column 6×40cm, 流速 2 ml per minute, 0.4N NaOH で溶出, 各 tube 100ml, 毒素は Folin 反応⁷⁾ 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

		N	P	沈降反応抗原 稀釈	Shwartzman 準備最少量	抗原性	アナフィラキシー
1	原毒素	9.2%	2.7%	320,000	0.08 γ	+	+
2	e_1	9.2%	2.9%	320,000	0.08	+	+
3	e_2	9.1%	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。

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 0.1ml を準備注射し、18時間後に静脈内に原毒素を注射、5時間後に判定した。

抗原性、アナフィラキシー性：350g のモルモットの皮下に 50 γ 注射後 7 日目に抗体産生をみとめた。更に 200 γ 注射後、9 日目に 3mg 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。

実験材料

ファージ液：緑膿菌 E 株の合成培地に 37°C に 18 時間培養し、ファージ α (溶原菌土島株の産生するファージ) を感染させ 37°C 20 時間作用し、32,000 g で菌体及び菌体残渣を除き、その濾液を 1F Chamberland で濾過し 2×10⁸ per ml のファージ液をえ、使用した。

イオン交換樹脂：Amberlite IRA-400, IRA-410,

		Volume ml	Infective centers			N μg/ml	P μg/ml	Precipitin reaction
			plaques/ml	Total plaques	percent			
lysate		61	2.01×10^8	1.22×10^{10}	100	1150.0	9	8
Effluent		63	0	0	0	1110.0	2	4
Washer Solution		59	0	0	0			
Eluent	1	16.5	3.55×10^7	5.85×10^8	4.8	3.8	< 1	0
	2	16.4	2.8×10^7	4.59×10^8	3.8	340.0	< 1	0
	3	17.3	2.8×10^8	1.52×10^{10}	125.0	8.8	< 1	2
	4	16.2	2.95×10^7	4.77×10^8	3.9	4.3	< 1	0
	5	20.1	8.85×10^6	1.77×10^8	1.4	2.2	< 1	0
	6	18.9	3.65×10^6	6.79×10^7	0.5	1.1	< 1	0
	7	21.3	5.5×10^6	1.17×10^8	0.9	< 1.0	< 1	0
	8	18.0	2.75×10^6	4.95×10^7	0.4	< 1.0	< 1	0
	9	19.5	2.59×10^6	5.05×10^7	0.4	< 1.0	< 1	0
	10	19.0	1.37×10^6	2.6×10^7	0.2	< 1.0	< 1	0

Table 2 緑膿菌ファージ α_1 2×10^8 per ml, 61ml, を Amberlite IRA-410 (PO₄ 型, 200mesh) 1.5×14cm. 流速 0.8ml. per minute. これを蒸留水で水洗後, 1N NaOH で溶出した。

Fig. 7 Table 2 の eluent の容量 ml. を横軸に各 ml. 中の Infective centers を縦軸にとつた。

IR-4 B, IRC-50, Dowex50.

ファージの定量：パイオンを用いて稀釈し，寒天重層法によつて⁸⁾ plaques を算出した。

実 験

ファージ液を中性で樹脂と振盪し，その上清の Infec-

tive centers を測定した結果 Amberlite IRA-400(PO₄ 型)，は 100%，IRA-410 (PO₄ 型)は 100%，IR-4 B (Cl 型)は 94%，IRC 50 (H型)は 5.8%，Dowex 50 (H型)は 50.7%消失した。これらの消失したファージは IRA-400，IRA-410 の場合は 1N NaCl で完全に溶出される。

以下 Amberlite IRA-410 を使用した吸着溶出の一例を示す。ファージ液 (lysate) 61ml を IRA-410 (PO₄ 型, 200mesh) のカラムを 0.8ml/min の速度で通過させ吸着させた。これを水洗後 1N NaCl で溶出した。lysate, 濾液, 洗液, 溶出液の Infective centers, N, P の定量分析, 及び各液に含まれる抗原物質の有無をみるために菌体免疫血清との間に重層法による沈降反応を行った。この結果は Table 2 及び Fig. 7 に示したが，ファージ α はレヂンに 100%吸着され，溶出液に 100%以上回収された。この実験は数回反覆したが，しばしば 100%以上の収量をえた。

又前項 I にのべたように菌体内毒素は IRA-410 に吸着され，1N NaCl では溶出されないが，Table 2 に示すように lysate 中の抗原物質も殆んど溶出液には検出されなかつた。ファージは溶出液 No. 3 に濃縮して溶出され，こゝだけで収量 125%を認めた。同時に N 分析の結果非抗原物質に由来する N とファージの分離も可能であることがわかつた。

小括：緑膿菌ファージ lysate を Amberlite IRA-400，IRA-410 (PO₄ 型)に中性で吸着させ，1N NaCl

で溶出するときはファージの活性を失うことなく 100% の収量をえた。

考 察

近年イオン交換樹脂は Ribonuclease, Lysozyme 其他の蛋白質精製に応用されているが、私共の菌体内毒素は核蛋白多糖体複合体であり、且つ分子量は50~100 万位と考えられているので、このような高分子物質がレヂンに対してどういう態度をとるか検討してみた。その結果化学的性状、生物学的活性を失うことなく Amberlite XE-64による吸着溶出が可能であった。

一方ファージの精製は従来主として超遠心、或は硫酸分割、有機溶媒による分割沈澱等によつて行われてきたが、内毒素等の高分子物質との分離は非常に困難な問題であった。今回レヂンを用いて非常に容易にこれらの高分子物質との分離が可能となつたばかりでなく、溶出条件により非抗原物質由来のNとの分離も可能で、この点ファージの精製には好都合である。従つて今後超遠心とレヂンの二つを応用して効果的にファージの精製を行うことができると思う。

従来ウイルスの精製にレヂンが用いられていたが、ファージに対しては Puck 等¹⁰⁾がTファージの吸着機構の研究に用いている。私共の場合抗原物質を除く目的で行つたものでファージは ghost になることなく却つて 100%以上の収量をえている。この原因についてはまだわからないが、lysate 中の抑制物質の除去によるファージの活性化ということも考えられるし、或は最近 Northrop¹¹⁾が報告しているような reversible inactivate phage に関連した問題があるのかもしれない。

総 括

1. 緑膿菌内毒素の各種レヂンに対する吸着溶出を試みた。その結果 Amberlite IRA- 400, IRA- 410, では 100%吸着されるが溶出できなかつた。

Amberlite IRC-50, XE-64, Dowex 50では酸性で吸着し、中性乃至弱アルカリ性で溶出できた。XE-64を用い大量の毒素を用いて行つた結果、吸着溶出によつて内毒素の化学的、生物学的性状に変化はなく殆んど 100%吸着溶出が行われることがわかつた。

2. 緑膿菌ファージを Amberlite IRA-410 で吸着溶出を行い、内毒素等の抗原物質と容易に分離できた。又ファージはその活性を失うことなく、却つてしばしば 100%以上の収量を収めた。

文 献

- 1) Hosoya, S. Homma, J. Y. Egami F. and Yagi Y.: Jap. J. Exp. Med., 20, 55, 1949.
- 2) Homma Y. J., Sagehashi K., Hosoya S., Yagi Y., Sugino Y. and Egami F.: Jap. J. Exp. Med., 21, 361, 1951.
- 3) Homma Y. J., Katsura T., Hosoya S., Miyazaki Y., Kimura K. and Saito N.: Annual Report of the Research Committee on the application of artificial Radioactive Isotopes in Japan, Vol. 2, Part I, 91, Plate I, 1952.
- 4) 本間遜, 棒箸孝, 細谷省吾, 江上不二夫, 下村道夫, 石原宏: 日細誌, 9 (11), 1013, 1954.
- 4) Egami F., Shimomura M., Ishihara H., Homma Y. J., Sagehashi K. and Hosoya S.: Bull. sté. Chim. Biol., Nos 6-7, 36, 779, 1954.
- 6) 本間遜, 棒箸孝: ウィルス, 4 (3), 264, 1954.
- 7) Lowry O. H.: J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 8) Adamus M. H.: Method in Medical Research, 2, 7, 1950.
- 9) 本間遜, 曾良忠雄, 棒箸孝, 細谷省吾: アレルギ- , 3 (2), 136, 1954. 本間遜, 曾良忠雄, 棒箸孝, 細谷省吾, 宮崎吉夫, 若林保司: アレルギ- , 3 (3), 177, 1954.
- 10) Puck T. and Sagik B.: J. Exp. Med., 97, 807, 1953; J. Exp. Med., 93, 65, 1951.
- 11) Northrop J. H.: J. Gen. Physiol., 39 (2), 225, 1955.