炭疽沈降素血清の特異性に関する研究

第14報 B. megatherium 類似菌 B. 21 の
抗原性物質について高木 静雄 尾藤 行雄
広直 武司 馬場 威

大阪府立大学農学部家畜微生物学教室

〔受付: 11月9日1956年〕

緒 言

吾々は前報¹⁾において B. anthracis の抗原性物質を抽出してその化学的並びに血清学的分析を行った結果、構造の異つた多くの種類の抗原性物質の存在することを認めた。教室で分離した B. megatherium 類似菌 B. 21 (土由来) はすでに報告²⁾³⁾⁴⁾したとおり抗体産生の態度においては B. anthracis と異っているが、抗炭疽血清に対する反応性においては極めてこれに近い性質をもっている。そこでその抗原性物質を分析することによって B. anthracis との異変の諸点を追求することは極めて興味深いと考えたので本実験を行った。

実験方法並びに実験成績

1. 抗原性物質の分離: 分離操作は前報にのべた B. anthracis の場合と同一方法によつた。各分割の収量は加熱乾燥菌体31.2gより, Fraction 1: 15.5mg, Fraction 2: 27.8mg, Fraction 3: 687mg, Fraction 4: 900mg (以下 Fr. 1, 2, 3, 4, と記す) であつて, B. anthracis と異り Fr. 3, 4 が Fr. 1, 2 に較べてはるかに多かつた。

2. 分離物質の抗原性: 前報の B. anthracis の抗原性物質の場合と同一の抗血清を用い, B. 21の抗原性物質の反応性を検べた (第1表)。まず自己の抗血清に対しては Fr. 1のみが反応を示したが, 又 B. anthracis, B. megatherium など他の菌の抗血清にも反応し, 殊に B. anthracis と B. megatherium 等の抗血清には Fr. 2 も又反応を示した。従つてこの B. 21の抗原性物質よりは自己の抗血清にのみ反応する特異性物質は得られなかつた。茲に興味あることは前報に報告したように B. anthracis の抗原性物質は B. 21の抗血清には極めて

弱い反応しか示さないのに B. 21の抗原性物質は抗炭疽血清に強く反応することである。次に B. 21の加熱乾燥菌体浸出液中の反応性物質はこの Fr. 1 だけであるかどうか, 吸収反応で検べた結果, 第2表に示すように菌体浸出液中には Fr. 1 とは異つた物質も存在するようである (第2表)。

更に抗炭疽血清と同じように反応する B. 21の抗原性物質 Fr. 1 と 2 とはどんな抗原関係にあるか又それらは B. anthracis の抗原性物質の各分割とは如何なる抗原関係を有するかを吸収試験で第3表に示す方法で検べた結果, B. 21の Fr. 1 と 2 とは全く同一の抗原性であり, そして B. anthracis の Fr. 3, 4 と極めて近い関係にあるもののように認められた (第3表)。これからみても B. anthracis 抗原性物質は当然 B. 21の抗血清に強く反応してよいはずであるが, 事実これはと反するのは興味があり, 且つ免疫現象の複雑さがうかがわれた。

3. 分離物質の化学的分析 (第1図)

1) 構成単糖について: B. anthracis の場合と同じ要領で検出した。第1図に示すように Fr. 1 では Xylose, Galactose, Fr. 2 では Ribose, Galactose, Fr. 3 では Ribose, Glucosamine, Fr. 4 では Ribose が認められた。それらの糖の組合せは各分割において異つており, 又 B. anthracis の各分割とも夫々異っている。このことはこの2株から分離されたどの分割も構造の異つたものであることを示している。 (第4表)

2) 構成 Amino 酸について: 第4表に示したように

TAKAGI Shizuo, BITO Yukio, HIRONAO Takeshi and BABA Tsuyoshi: Studies on the specificity of anthrax precipitin serum. XIV On the antigenic substance of B. 21 similar to B. megatherium. —Jap. J. of Bact., 12(3), 179-182, 1957.

第 1 表 抗原性物質の各分割の反応性

抗 血 清			溶 血	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
反 応 原			B. 21	Anthrax (馬)	(馬)	Megatherium	Pseudoanthrax	Cereus	Subtilis	Aureus	B. 1	B. 16	B. 19
多 糖 体	乾燥菌体 10 mg/cc 浸出液中の濃度	Fr. 1	卅 (32)	++ (64)	卅 (32)	卅 (16)	—	—	—	—	卅 (8)	++ (2)	—
		Fr. 2	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
		Fr. 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Fr. 4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	溶液 各分割 0.1 mg/cc	Fr. 1	卅 (64)	++ (64)	卅 (64)	卅 (32)	—	—	—	—	卅 (16)	++ (8)	—
		Fr. 2	—	++ (32)	卅 (8)	++ (4)	—	—	—	—	++ (4)	—	—
		Fr. 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Fr. 4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	乾燥菌体 10 mg/cc 浸出液		卅 (32)	++ (128)	卅 (64)	卅 (64)	±	+	+	—	卅 (16)	++ (8)	—
								(1)	(1)				

卅〜+……各反応原の原液の示す反応の強さ
(32) ……各反応原の原液の 32 倍稀釈迄反応陽性

第 2 表 各分割と菌体浸出液中の反応性物質との関係

吸収血清	反応原	Fr. 1	菌体浸出液
抗 21 血清 (1:2) 1 cc より			
Fr. 1 (乾燥菌体 100 mg/cc 浸出液中) 2 cc	—	+	
B. 21 (乾燥菌体浸出液 10 mg/cc) 2 cc	—	—	
(対照) 2 cc	++	++	

B. anthracis の場合と同じ要領で分析したのであるが、これに用いた試料の量は Fr. 1, 2 が 0.625 mg, Fr. 3, 4 が 12.5 mg である。これによりどの分割も相当量の蛋白乃至ペプチドと思われるものをもっていることが判明した。又 B. anthracis の分割に比較して有意義の差は認められなかった。

3) 濾紙電気泳動による分析 : B. anthracis にならつて分離物質を濾紙電気泳動でしらべた。本分析は常に B. anthracis の試料を同一の濾紙につけ同時に行つた。泳動図 (第 2 図) をみると Fr. 1 は陽極へ動く多糖体と原点から動かない糖蛋白と、陰極へ大きく動く多糖体、更に進む糖蛋白が検出できた。陽極へ動くもの及びそ

第 3 表 Fr. 1, 2 と炭疽菌抗原性物質との抗原関係

吸収血清	反応原	B. 21		Anthraxis			
		Fr. 1	Fr. 2	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4
抗 Anthracis 血清 (1:2) 1 cc より		—	—	卅	+	—	—
B. 21 Fr. 1 (0.1 mg/cc) 2 cc		—	—	卅	+	—	—
" Fr. 2 "		—	—	卅	+	—	—
" Anthracis Fr. 1 (0.1 mg/cc) 2 cc		—	—	—	—	—	—
" " Fr. 2 "		—	—	+	—	—	—
" " Fr. 3 "		—	—	+	+	—	—
" " Fr. 4 "		—	—	+	+	—	—
(対照) 食塩水 2 cc		++	+	卅	++	++	—

れに連なつて原点附近にまたがつているものは、Toluidin Blue による染色から Acid Mucopolysaccharide ではないかと考えられる。Fr. 2 は陰極へ大きく動く糖蛋白 1 種類だけである。Fr. 3 は動かない蛋白と陰極へ少し動く蛋白がみとめられ、多糖体は検出されない。Fr. 4 は原点から陰極へ向つて三つの著明な蛋白の

第1図 抗原性物質の水解物の P.P.C. による単糖分析

第4表 抗原性物質の水解物の P.P.C. による Amino 酸分析

Fraction	1	2	3	4
Amino acid				
Cystine	—	—	+	—
Aspartic acid	— (++)	— (++)	+++	+++
Serine	—	—	++	+
Glycine	—	—	++	+
Threonine	—	—	+	tr.
Alanine	— (+)	— (+)	+++	++
Proline	—	—	— (+)	— (+)
Tyrosine	—	—	+	— (+)
Valine	—	— (tr.)	++	+
Leucine & Isoleucine	—	— (tr.)	++	+
Phenylalanine	—	—	—	—
Lysine	—	—	—	—
Methionine	—	—	—	—
Glutamic acid	— (+)	— (+)	+++	++
Arginine	—	— (+)	—	—

+++~+は Spot の大きさを示す

() は 1 次元でのみ現れたものを示す

tr. は極めて微量なることを示す

バンドがみられ、多糖体は認められなかった。Toluidin Blue にそまる Acid Mucopolysaccharide と思われるもののバンドは Fr. 1 にのみ検出されて他の分劃では現われなかった。

第2図 抗原性物質の濾紙電気泳動による分析

A: Shiff 試薬にて染色

B: Bromphenol Blue にて染色

C: Toluidin Blue にて染色

↓: 試料をつけた位置

総括並びに考察

1. *B. megatherium* 類似菌 B. 21 より三塩化醋酸法並びに Aceton 分劃沈澱により4つの分劃を抽出した。

2. 各分劃の反応性は自己の抗血清には Fr. 1 だけ、然るに *B. anthracis*, *B. megatherium* の抗血清には Fr. 1, 2 が反応を示した。結局自己の抗血清にだけ反応する特異的な分劃はえられなかった。

3. Fr. 1 と Fr. 3 とは全く近似の抗原性であり、且つ前報の *B. anthracis* の Fr. 3, 4 と極めて類似したものであった。これから考えると *B. anthracis* の抗原性物質は当然 B. 21 抗血清に強く反応する筈であるが、事実はこちらに反する結果を得た。

4. 抗原性物質の水解物には Ribose, Xylose, Galactose, Glucosamine がみられ、夫々の分劃における糖の組合せは各分劃によって異っていた。

5. 夫々の分劃の水解物には多くの種類の Amino 酸が検出された。

6. 濾紙電気泳動による分析においては種々の多糖体・糖蛋白・蛋白質と思われるものが認められたが、多糖体及び糖蛋白については Fr. 1 が最も多く Fr. 2 では糖蛋白1種類が検出され Fr. 3, Fr. 4 では認められなかった。

以上の成績を通覧すると Fr. 1 は多糖体成分が多くて

血清反応も強く Fr. 2 は多糖体成分が少くて血清反応はごく弱く, Fr. 3, 4 は濾紙電気泳動では多糖体成分が認められず又抗血清には反応しない。このような並行関係から多糖体および糖蛋白が抗原性物質ではないかと考えられる。又 B. anthracis と B. 21 の抗原性物質の濾紙電気泳動による分析の結果を総合的に判断すると、両者から抽出せられた分劃には同一物質と考えられるものと異った物質と考えられるものが混在している。Fr. 1 の陽極へ動く多糖体や陰極へ大きく動く糖蛋白は夫々同一物質ではなかろうかと考えられるし、Fr. 2 の陰極へ大きく動く糖蛋白は同じ物質のように思われる。それ以外の物質は同一とは考えにくい。従つてこのような同一物質が類属反応を起すのであらうと考えられ易いが、次のような矛盾した現象がみられたのである。即ち炭沈血清に対する各分劃の吸収試験による抗原性をみると、B. 21 の Fr. 1, 2 は B. anthracis の Fr. 1, 2 ではなくして

Fr. 3, 4 に近い態度を示しているのである。又 B. 21 の Fr. 1 と Fr. 2 とは化学的には異った物質であるはずであるが、吸収試験によると同一の抗原性を示している。このように化学分析結果と血清学的分析結果とが矛盾したように思われることが、どのような原因によるかは、より純粹に抽出された物質を分析した上でなければ容易に判定しえないと思うが、それらの抗原性物質は化学的には異った物質でありながら共通の基をもっていることに起因しているのではなかろうかとも推察される。

文 献

- 1) 高木静雄, 尾藤行雄, 広直武司, 馬場威: 日本細菌学雑誌, 12(2), 101, 1956. 昭32.
- 2) 高木静雄: 日本細菌学雑誌, 9(10), 885, 昭29(1954).
- 3) Takagi, S.: Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B., 6, 1956.
- 4) Takagi, S.: Bull. Univ. Oerka Pref., Ser. B., 6, 1956.