諸種抽出法によつて得られるゲルトネル菌 内毒素の比較

緒 方 幸 雄

伝染病研究所第5細菌研究部 (部長 山本郁夫教授)

[受付: 7月3日・1958年]

菌体内毒素の研究は Boivin¹⁾, Goebel²⁾, Morgan³⁾, Westphal⁴⁾, 細谷⁵⁾, 黒屋⁶⁾, 武田⁷⁾等のすぐれた業績があるが、氏等の使用する毒素抽出法はそれぞれ異なっており、抽出法がことなれば、得られた内毒素の性状は同一でないことが当然考えられる。著者はそれらの間にどのような差があるかということを経ルトネル菌内毒素で確認したいと思い、ゲルトネル菌内毒素を Boivin 法, Morgan 法, Goebel 法, Westphal 法, 自己融解法 (細谷法) の5種類の方法で抽出し, Tiselius 電気泳動, Zone electrophoresis (澱粉)を用いて均質性の問題に検討を加えた。

それぞれの方法によつて得られた粗毒素はいずれも電気泳動的に均質でなく、均質な精製毒素を得ることは容易なことでないが、今回は Zone electrophoresis 法を適用して電気泳動的にほぼ均質な毒素を得たので、これらの化学分析値を出して、各抽出法によつて得られた毒素の比較を行つたので、その結果について報告する。

実 験

I) 培養および粗物質の分離

i) 培養法: 第2磷酸ソーダ 0.8%, 第1磷酸カリ 0.2%, クエン酸ソーダ 0.05%, 硫酸マグネシウム 0.01%, 硫酸アンモニウム 0.1%, チロシン 0.01%, フェニルアラニン 0.05%, トリプトファン 0.025%, メチオニン 0.01%, グルタミン酸ソーダ 0.1%, ブドウ糖 0.5% を含む合成培地に、Salmonella enteritidis 116—54 株 (S型強毒菌、予研福見博士より分与) を同培地に前培養したものを 30 l のステンレス・スティール製タンク (仕込み 10~15 l) で、37°C 18 時間攪拌通気培養を行つた。培養終了後フェノールで殺菌したのち、シャープレス遠心機で 3 万回 1 時間遠心して菌体を集めた。菌体は食塩水とアセトンで洗滌したのち凍結乾燥して保存し実験に供した。

ii) Boivin 法⁸⁾ (三塩化醋酸抽出法) による粗物質の分離。

上記の乾燥菌体を 5 倍量 (V/W) の氷冷蒸留水に浮べ、これに等量の冷 0.5M 三塩化醋酸を加え混液をよく振盪したのち 0°C に 3 時間放置する。これを 1 万回 30 分遠心して上清と沈澱に分ける。沈澱は 0.25M 三塩化醋酸で上記と同様に処理し、これを 2 回繰返す。計 3 回分の上清を 2 倍量の冷エタノールに注入して -5°C に一夜放置する。生じた沈澱を遠心してあつめ、水に溶かして低温で透析したのち凍結乾燥する。これを Boivin 法による粗物質とする。

iii) Morgan 法⁹⁾ (ジエチレングリコール抽出法) による粗物質の分離。

乾燥菌体に 10 倍量 (V/W) の新しく蒸留したジエチレングリコールを加え、一日に数時間あて振盪して室温で 3 日間抽出する。これを 1 万回 30 分遠心して上清と沈澱に分ける。沈澱にはさらにジエチレングリコールを加えて上記と同様に処理する。この操作を計 3 回繰返して得た上清に -10°C でアセトンを 5 倍量加える。生じた沈澱を遠心であつめ、沈澱を水に溶かして透析したのち凍結乾燥した。これを Morgan 法粗物質とする。

iv) Goebel 法 (含水ピリジン抽出法) による粗物質の分離。

乾燥菌体に 10 倍量 (V/W) の 50% ピリジンを加えて 37°C に 24 時間放置したのち 1 万回 30 分遠心する。沈澱にはさらに 50% ピリジンを加えて上記と同様に処理し、この操作を計 3 回繰返す。上清を合併して 40~50°C で減圧濃縮したのち、透析して凍結乾燥する。

OGATA Sachio: Comparison of endotoxins of *Salmonella enteritidis* obtained by various methods of extraction. Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo—Jap. J. of Bact., 13 (12), 1117-1122, 1958.

v) Westphal 法^{11,12)} (熱含水フェノール抽出法) による粗物質の分離。

乾燥菌体10 gを65~68°Cに加熱した水 350ml に浮べ、これに68°Cに加熱した90%フェノールを等量加え20~80分放置する。ついで5°Cに冷却して遠心して水層をとる。フェノール層(下層)にはさらに300 mlの水を加えて60°Cとしたのち冷却して遠心する。この水層と前に得た水層と合併し、透析後10~15 mlになるまで減圧濃縮する。この遠心上清に少量の醋酸ソーダ(0.5%)を加えたのちエタノールを10倍量加えて生じた沈澱をあつめエタノールとアセトンで洗滌したのち乾燥する。これを Westphal 法粗毒素とする。

vi) 自己融解液から濃縮する方法¹³⁾

腸炎菌タンク培養液にクロロホルムを0.15%の割合に加えて、35°C 48時間自己融解させた。これを ZnCl_2 沈澱・ Na_2HPO_4 溶離法(細谷・出口・利部法)で処理して得られた濃縮液を透析したのち、アセトン4倍量を加えて生じた沈澱をあつめ、水に溶かしたのち硫酸を加えて $\frac{1}{2}$ 飽和とする。生じた沈澱をあつめて透析したのち凍結乾燥した。これを自己融解法による粗毒素とする。

II) 粗物質の精製

i) アセトン分画による精製

上記5種類の方法で得られた粗物質のうち Boivin 法, Morgan 法, Goebel 法, 自己融解法の4方法によつて得た粗物質はさらにアセトン分画法によつて精製した。すなわち各粗物質の1%水溶液をつくり、これを0~2°Cに冷却し、-10°Cのアセトンをゆつくり加えてアセトン含有量を50%とする。生じた沈澱を遠心して除去し、上清にアセトンを加えてアセトン含量を66%にまであげると内毒素が沈澱するから、これを水に溶かしさらに50~60%アセトン分画をあつめる。この操作をもう1回繰り返して生じた沈澱を水に溶かし、透析後凍結乾燥する。これをアセトン分画毒素とする。

ii) 超遠心による精製

つぎに Westphal 法粗物質については、これを1%水溶液として30,000回転(Spinco L型)で1時間半遠心した。沈澱をとり、再び水に溶かして30,000回転1時間半遠心した。その沈澱を水に溶かして凍結乾燥した。

III) 粗毒素および精製毒素の電気泳動

i) 濾紙電気泳動

実験Iの方法で得られた粗毒素の各々について濾紙電気泳動を行った。濾紙は東洋濾紙 No. 51を用い、ペロナール緩衝液(pH 8.6, $\mu=0.05$, 0.3~0.4 mA/cm,

0.175~0.35 V/cm, 3~4°C)で17~20時間泳動を行った。泳動後の濾紙上のスポットは、蛋白は bromphenol blue で、多糖体は過沃素酸で酸化後 Schiff の試薬¹⁴⁾で、脂質は Sudan black¹⁵⁾で発色させ濾紙光電光度計で曲線を描いた。その結果これらの粗毒素(Westphal 法粗毒素を除く)はいずれも蛋白、多糖体、脂質の三成分からなり、いずれも均質でないことが分つた。しかも各成分の相対的含量がそれぞれことなり、たとえば自己融解法粗毒素は蛋白量が非常に多く、Goebel 法粗毒素は脂質の含有量が非常に多い。一方 Westphal 法粗毒素は多糖体と脂質は発色するが、bromphenol blue (蛋白)では発色せず、濾紙電気泳動法でも Westphal 法毒素は lipopolysaccharide であることが証明された。

iii) 澱粉を支持体とする Zone electrophoresis によ

第1図 Boivin 法毒素

(1) Boivin 法粗毒素

(実験Iのii)の

Zone electrophoresis

試料: 30 mg.

澱粉ブロックの大きさ: 1×2×36 cm, 3.5 mA,

400 V, 18 hr.

(3) (実験Iのii)の

Tiselius

電気泳動

(2) Boivin 法アセトン分画毒素(実験IIのi)の Zone electrophoresis

試料: 104 mg.

ブロックの大きさ: 1×15×40 cm
15 mA, 500 V, 22 hr.

第2図 Morgan 法毒素

(1) Morgan 法粗毒素(実験 I の iii) の Zone electrophoresis

試料: 20 mg
ブロックの大きさ: $1 \times 2 \times 36$ cm
2 mA, 250 V, 18 hr

(3) (実験 I の iii) の Tiselius 電気泳動

(2) Morgan 法アセトン分画毒素(実験 II の i) の Zone electrophoresis

試料: 100 mg.
ブロックの大きさ: $1 \times 5 \times 40$ cm.
15 mA, 500 V, 22 hr.

第3図 Goebel 法毒素

(1) Goebel 法粗毒素 (実験 I の iv) の Zone electrophoresis.

試料: 20 mg
ブロックの大きさ: $1 \times 2 \times 36$ cm
3.5 mA, 375 V, 22 hr.

(3) (実験 I の iv) の Tiselius 電気泳動

(2) Goebel 法アセトン分画毒素(実験 II の i) の Zone electrophoresis.

試料: 110 mg
ブロックの大きさ: $1 \times 5 \times 40$ cm
15 mA, 500 V, 22 hr.

第4図 Westphal 法毒素

(1) Westphal 法粗毒素(実験 I の v) の Zone electrophoresis.

試料: 30 mg
ブロックの大きさ: $1 \times 2 \times 35$ cm
4 mA, 300 V, 22 hr.

(3) (実験 I の v) の Tiselius 電気泳動

(2) Westphal 法精製毒素(超速による)の Zone electrophoresis.

試料: 20 mg
ブロックの大きさ: $1 \times 2 \times 360$ cm.
4 mA, 300 V, 22 hr.

第5図 自己融解法毒素

(1) 自己融解法粗毒素 (実験 I の vi) の Zone electrophoresis.

試料: 17.5 mg
ブロックの大きさ: 1×2×36cm, 5mA, 400V, 20hr.

(3) (実験 I の vi) の Tiselius 電気泳動

(2) 自己融解法アセトン分画毒素 (実験 II の i) の Zone electrophoresis.

試料: 170 mg.
ブロックの大きさ: 1×5×40 cm
15 mA, 620 V, 22 hr.

る分析および精製。

実験 I の粗毒素および実験 II の精製毒素 (アセトン分画毒素および超遠心によつて精製した Westphal 法毒素) の各々について, Zone electrophoresis を適用してそれらの均質性について検討するとともに, Zone electrophoresis によつて毒素を精製した。

Zone electrophoresis の方法は小松等¹³⁾の記載に従つた。泳動終了後の各切片抽出液について Folin 試薬による蛋白反応¹⁴⁾, Dische 等¹⁷⁾のメチルペンチース反応 (多糖体) を行つて曲線を描くとともに O 血清との沈降反応 (重層法) を行つて内毒素の所在部位を決めた。

それらの結果は第 1~5 図に示される通りである。各図の 1 (上段) は粗毒素の Zone electrophoresis 図であり, 各図の 2 (下段) は精製毒素 (実験 II の方法によつて得られた毒素) electrophoresis 図である。図によ

つて明かなように, 前記の諸種の抽出法で得られた内毒素試料は電気泳動的に均一とはいいがたく, 抽出法が異なるにしたがつてその泳動図をことにし, 又同一抽出法でも性状をことにする二種以上の内毒素を含んでいるものがある。なお Westphal 法毒素は lipopolysaccharide であるために Folin 試薬によつては呈色しない。

各図の 2 (下段) の斜線でかこんだ部分がそれぞれの内毒素試料の主成分であつて, この部分の抽出液をあつめて透析したのち凍結乾燥した。これを Zone electrophoresis による精製毒素とする。

iii) Tiselius 型装置による電気泳動

各種抽出法によつて得られた粗毒素についてペロナル緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を使用して Tiselius 型電気泳動を行つた。その泳動図は第 1~5 図の 3 (上段の右) に示される通りで, いずれも電気泳動的に均一とはいいがたい。これを前述したようにアセトン分画法および超遠心 (Westphal 法毒素) によつて精製したのち Zone electrophoresis 法によつて内毒素の主成分を抽出精製した毒素につき Tiselius 型電気泳動を行つと, 各毒素試料ともほぼ均一な電気泳動像を示した。

iv) 内毒素の性状

Zone electrophoresis で精製するまえの各毒素 (実験 II の方法によつて得られた毒素) および Zone electrophoresis 精製毒素の紫外外部吸収曲線は第 6 図に示される通りで, Zone electrophoresis 処理前の毒素は程度の差はあるが, いずれも波長 260m μ 附近に吸収があり, 核

第6図 内毒素の紫外線吸収曲線

(1) Zone electrophoresis 処理前の各種内毒素の吸収曲線	(2) Zone electrophoresis による精製毒素の吸収曲線
濃度: 500 γ /ml 溶媒: 0.5% Na ₂ CO ₃ (pH 7.0)	濃度: 500 γ /ml 溶媒: 0.5% Na ₂ CO ₃ (pH 7.0)

第1表 内毒素の性状

抽出法		沈降反応 (抗原稀釈倍数)	毒性 (LD ₅₀ /マウス)	分析値					
				C%	H%	N%	P%	メチルペン トース (ラムノース)	灰分%
Boivin 法毒素	※	1:160,000	224 γ	44.26	7.33	2.30	1.15	25.8	7.48
	*	1:320,000		47.97	7.21	6.13	0.84	22.6	7.44
Morgan 法毒素	※	1:320,000	164 γ	43.10	7.08	3.25	1.16	12.8	6.85
	A	1:320,000		43.72	6.62	5.46	0.75	15.4	8.82
	* B	1:320,000		41.42	6.60	4.02	0.80	16.2	8.57
Goebel 法毒素	※	1:160,000	178 γ	50.90	7.78	4.69	1.20	19.3	6.17
	*	1:320,000		45.24	6.42	6.95	0.51	10.4	10.00
Westphal 法毒素	※	1:160,000	164 γ	41.21	6.66	1.76	1.44	23.9	12.18
	*	1:320,000		42.64	7.13	1.08	0.84	19.5	6.68
自己融解法毒素	※	1:320,000	224 γ	41.19	7.02	8.93	0.76	12.9	5.66
	*	1:320,000		43.56	7.00	3.63	0.75	10.9	5.15

※ Zone electrophoresis 前の毒素 * Zone electrophoresis 精製毒素

酸が混在していると考えられる。しかし, Zone electrophoresis によつて精製した毒素はいずれも 260mμ に吸収を示さない。

次に Zone electrophoresis による精製前および精製後の各毒素の沈降反応価(重層法), 毒性, 化学分析値の比較を行つたが, その結果は第1表に示される通りである。

各毒素のO血清にたいする重層法による沈降価は, 抗原稀釈で160,000 倍から320,000 倍まで陽性である。マウスに対する毒性は体重17~18g の dd 系マウス(4週)にたいして, 腹腔内注射でマウス1匹あたりの LD₅₀ が164 γ から 224 γ である。炭素・水素・窒素・磷およびメチルペントースの化学分析値は第1表の通りである。

総 括

ゲルトネル菌内毒素を Boivin 法(三塩化醋酸抽出法), Morgan 法(ジエチレングリコール抽出法), Goebel 法(含水ピリジン抽出法), Westphal 法(熱含水フェノール抽出法), 自己融解法(自己融解液から細谷法で濃縮)でそれぞれ抽出して, 濾紙電気泳動, Tiselius 型電気泳動, Zone electrophoresis (澱粉を支持体とする)を用いて均質性の問題に検討を加え, Zone electrophoresis 法で精製して得た電気泳動的にほぼ均質な各毒素試料の主成分について化学分析値を出した。粗毒素はいずれも電気泳動的に均質でなく, 毒素にかかわりのない不純物

を含んでいるとともに毒素そのものも必ずしも一種類のみでない。

1) Boivin 法によつて得られた毒素: C, 47.97%; H, 7.21%; N, 6.13%; P, 0.84%; メチルペントース, 22.6%; LD₅₀/マウス, 224 γ; 沈降価, 1:320,000 (沈降価および毒性はいずれの法による毒素でも大体同じ)

2) Morgan 法毒素: 分画A (Zone electrophoresis による); C, 43.72%; H, 6.62%; N, 5.46%; P, 0.75%; メチルペントース, 15.4%; LD₅₀, 224 γ。

3) Goebel 法毒素: C, 45.24%; H, 6.42%; N, 6.95%; P, 0.51%; メチルペントース, 10.4%; LD₅₀, 178 γ。

4) Westphal 法毒素: C, 42.64%; H, 7.13%; N, 1.08%; P, 0.84%; メチルペントース, 19.5%; LD₅₀, 164 γ。

5) 自己融解法毒素: C, 43.56%; H, 7.00%; N, 3.63%; P, 0.75%; メチルペントース, 10.9%; LD₅₀, 224 γ。

以上の法によつて得られた精製毒素はいずれも波長 260mμ 附近に吸収を示さない。

稿を終るに臨み終始御懇篤な御指導ならびに御校閲を賜つた山本郁夫教授並びに小松信彦博士に対し深謝致します。

文 献

- 1) Boivin, A. and Mesrobianu, L. : Ann. Inst. Pasteur., 64, 428, 1938.
- 2) Jesaitis, M. A. and Goebel, W. F. : J. Exp. Med., 96, 409, 1952.
- 3) Davies, D. A. L., Morgan, W. T. J. and Record, B. R. : Biochem. J., 60, 290, 1955.
- 4) Westphal, O. and Lüderitz, D. : Ang. Chem., 66, 407, 1954.
- 5) 細谷省吾 : 日本臨床, 8(No. 7), 1, 1950.
- 6) 黒屋政彦, 森川卓夫, 木村盛雄 : 綜合医学, 9, 35, 1952.
- 7) 武田徳晴 : 日本細菌学雑誌, 8(特), 441, 1953.
- 8) Webster, E., Sagin, J. F., Landy, M. and Johnson, A. G. : J. Immunol., 74, 455, 1955.
- 9) Davies, D. A. L. Morgan, W. T. J. and Mosimann, W. : Biochem. J., 56, 572, 1954.
- 10) Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E. : J. Exp. Med, 81, 315, 1945.
- 11) Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. and Keiderling, W. : Zeitschr. Naturforsch., 7 b, 536, 1952.
- 12) Braun, O. H., Specht, H., Lüderitz, O. and Westphal, O. : Zeitschr. f. Hygiene, 139, 565, 1954.
- 13) 小松信彦, 緒方幸雄, 三橋進, 川上正也 : 日本細菌学雑誌, 1958(印刷中).
- 14) Köiw, E. and Grönwall, A. : Scand. J. Clin & Lab. Invest, 4, 244, 1952.
- 15) Swahn, B. : Scand. J. Clin & Lab. Invest., 2, 98, 1952.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Cheme., 193, 265, 1951.
- 17) Dische, Z. and Shettles, L. B. : J. Biol. Chem., 175, 595, 1948.