A 群溶血レンサ球菌の cell wall に関する研究

— 特に T 抗原を中心として —

第二報 A 群溶血レンサ球菌の cell wall の免疫学的性状

中 沢 信 ・ 中 村 悠 哉 ・ 堀 越 嵩

東京大学，伝染病研究所，第6細菌研究部（指導 工藤正四郎教授）

〔受付：12月25日・1958年〕

緒 言

著者は前報¹⁾において，A群溶血レンサ球菌（以下A群溶連菌と略す）1型のT1株について，その菌体を sonic oscillator を用いて破壊し，それより分画遠心法によりこの菌の cell wall（以下CWと略す）を取出す方法について述べた。

今回は，そのようにして取出されたCWの免疫学的性状を，主としてT抗原を中心として調べたので，それについて報告する。

実験材料

1. 使用菌株

A群溶連菌のT1株（1型），J17D株（19型），およびJ137株（31型）を用いた。

2. TI株CW

前報¹⁾において報告した方法により，T1株菌体より得たもの。図1，及び図2はこのCWの電子顕微鏡写真である。

3. 免疫血清

前報¹⁾において報告したT1株のR1及びR3免疫血清（1型）と，J17D株のJ17D免疫血清（19型）を用いた。

即ち，R1免疫血清は，T1株の matt variant の60°C 30分加熱ワクチンで，R3免疫血清は，T1株の matt var. を1%ペプシンで2.5時間消化し，60°C30分加熱したワクチンで，それぞれ家兎を免疫して得たもので，今回は，これらをJ17D株で吸収して群特異C抗体を除いたものを用いた。

J17D免疫血清（19型）はJ17D株（19型）を免疫原

図 1

図 2

TI 株 CW の電子顕微鏡写真，倍率は共に11200倍

NAKAZAWA Makoto, NAKAMURA Yuya and HORIKOSHI Takashi: Studies on the cell wall of group A streptococcus, with special reference to T antigen. II. Immunological characteristics of the cell wall of group A streptococcus. The Institute for Infectious Diseases, The University of Tokyo.—Jap. J. of Bact., 14(8), 668-671, 1959.

として作成したもので、この免疫血清については、そのC抗体を用いるため吸収は行はなかつた。

4. T1株STA

前報²⁾において報告した方法により、T1株菌体より得た液状T抗原 (Soluble T Antigen) である。

5. 使用薬剤

ペプシン、タンニン酸、ともに前報²⁾に記したものをを用いた。

実験方法及び成績

1 TI株CWよりT抗原の証明

1. T1株CW-Dig. 及びT1株STA感作赤血球とR1及びR3免疫血清との凝集反応。

方法：T1株CWを1%ペプシンで20時間消化した外液について、STAを抽出したときと同様の操作²⁾を行って得た分画（以下この分画をCW-Dig. と呼ぶ）を用いて、前報と同様の方法でタンニン酸処理人O型赤血球を感作し、これを凝集原としてR1及びR3免疫血清と赤血球凝集反応を行つた。

なお、STA感作赤血球を用いて同様にR1及びR3免疫血清と凝集反応を行い、CW-Dig. とSTAの態度を比較した。

CW-Dig. の製法を略記すれば：

a. N/50HCl で作った1%ペプシン液にCWを浮游（濃度は2gの湿菌より得たCWを5ccのペプシン液に浮游する程度）し、37°C20時間消化する。

b. ペプシン消化の後、CW浮游液にN/5NaOHを加えて中性とし、10000rpm10分遠心してCWを除き、上清をとり出す。

c. 上清にN/5HClを加えてpH3.5とし、生じた沈降物を遠心して集め、新しい蒸留水に浮游、N/5NaOHを加えて中性とし、沈降物を溶解する。この、新しい蒸留水、N/5HCl、及びN/5NaOHによる沈降・溶解の操作を3回行い、最終回の沈降物を原量のM/10リ

表1 R1及びR3免疫血清におけるTI株CW-Dig. 及びTI株STA感作赤血球凝集反応

免疫血清	凝集原	血 清 稀 釈							対 照
		50	100	200	400	800	1600	3200	
R1	CW-Dig.	++	++	++	+	+	-	-	-
	STA	+++	++	++	+	+	±	-	-
R3	CW-Dig.	++	++	++	+	+	+	-	-
	STA	+++	++	++	+	+	+	-	-

ン酸塩緩衝食塩水 (pH 7.0) に溶解した。

成績 (表1)：CW-Dig. 及びSTAの各々で感作した赤血球は、表1に示した如く、R1及びR3免疫血清とそれぞれ強く凝集反応を起した。

2. T1株CWで吸収したR3免疫血清におけるT1株CW-Dig. 及びT1株

STA感作赤血球凝集反応

方法：R3免疫血清を生理食塩水で100倍に稀釈し、その2ccに10gのT1株湿菌より得たCWを加えて37°Cに2時間、次で氷室に1夜放置し、翌日10000rpm10分遠心してCWを除いたものについて、T1株CW-Dig. 感作赤血球及びT1株STA感作赤血球による凝集反応を行つた。

成績 (表2)：表2に見る如く、T1株CWで吸収したR3免疫血清においては、CW-Dig. 感作赤血球及びSTA感作赤血球の双方に対する凝集価が著明に低下した。

表2 TI株CWで吸収したR3免疫血清におけるTI株CW-Dig. およびTI株STA感作赤血球凝集反応

免疫血清	凝集原	血 清 稀 釈				対 照
		200	400	800	1600	
R3 (CWで 吸収)	CW-Dig.	-	-	-	-	-
	STA	-	-	-	-	-
R3 (吸収せず)	CW-Dig.	++	+	+	-	-
	STA	++	+	+	+	-

3. 各種処置T1株菌体で吸収したR1免疫血清におけるT1株CW-Dig. 及びT1株STA感作赤血球凝集反応

方法：前報²⁾において用いた各種処置T1株菌体吸収R1免疫血清、即ち、R1免疫血清を酸性加熱T1株菌体で吸収して、C抗体、M抗体その他を吸収してT抗体を残したもの、及びR1免疫血清をペプシンで2.5時間消化したT1株菌体で吸収して、C抗体、T抗体その他を除きM抗体を残したもの、について、T1株CW-Dig. 及びT1株STA感作赤血球凝集反応を行つた。

成績 (表3)：表3に示した如く、酸性加熱T1株菌体で吸収したR1免疫血清では、T1株CW-Dig.、T1株STA両感作赤血球凝集反応は陽性であつたが、ペプシン消化T1株菌体で吸収したR1免疫血清では、両反応は陰性であつた。

**表3 各種処置 TI 株菌体で吸収した R1 免疫血清
における TI 株 CW-Dig. 及び TI 株 STA
感作赤血球凝集反応**

免疫血清	凝集原	血 清 稀 釈						対 照
		100	200	400	800	1600		
R 1 ペブシン菌 で吸収*	CW-Dig.	—	—	—	—	—	—	—
	STA	—	—	—	—	—	—	
R 1 酸熱菌で 吸 取*	CW-Dig.	++	++	+	+	—		
	STA	++	++	+	+	—		

* 本文中に説明あり

4. T1株CW-Dig., とT1株STAのR3免疫血清
における交叉抑制反応

方法：方法は前報⁹⁾で報告した通りである。但し抑制
原として、T1株CW-Dig. 及びT1株STAを各々0
.4cc用いた。

成績(表4)：表4に示した如く、T1株CW-Dig.
もT1株STAも、共にそれ自身及び他のものの反応を
完全に抑制した。

**表4 R3 免疫血清における TI 株 CW-Dig. 及び
TI 株 STA による交叉抑制反応**

免疫 血清	抑制原	凝集原	血 清 稀 釈						対 照
			50	100	200	400	800	1600	
R3	CW- Dig.	CW-Dig.	—	—	—	—	—	—	—
		STA	—	—	—	—	—	—	—
	STA	CW-Dig.	—	—	—	—	—	—	
		STA	—	—	—	—	—	—	
	生 理 食塩水	CW-Dig.	++	++	+	+	+	—	
		STA	++	++	++	+	+	—	

II. T1 株 CW より C 抗原及び M 抗原の証明

T1株CWの塩酸加熱抽出物について、沈降反応によ
りC抗原及びM抗原の存在をしらべた。

方法：Swift等⁹⁾の方法に従って行つた。即ち、T1
株CW、T1株菌体J17D株、J137株より塩酸加熱抽
出物を取り出し、これとR1免疫血清、及びJ17D免疫
血清と沈降反応を行つた。R1免疫血清はJ17D株で吸
収して群特異C抗体を除いたが、J17D免疫血清につい
ては吸収を行わず、C抗体を含むものを用いた。

成績(表5)：表5に示した如く、R1免疫血清は、
T1株CW、及びT1株菌体の塩酸加熱抽出抗原とのみ

沈降反応陽性を示したが、他のものとは反応陰性であつ
た。また、J17D免疫血清は用いた全ての抗原に対して
沈降反応陽性を示した。

**表5 R1, 及び J17D 免疫血清における TI 株 CW
その他の塩酸加熱抽出物によるC及びM沈降反応**

菌 型	菌 株	免 疫 血 清	
		R 1	J 17 D
1	TI-CW TI	+	+
		+	+
19	J17D	—	+
31	J137	—	+

R1 免疫血清は J17D 株で吸収して C 抗体を除いた
J17C 免疫血清は吸収せず、C 抗体を含む。

考 按

A群溶連菌のC抗原及びM抗原が、A群溶連菌菌体内
の如何なる部位に存在するかについては、既に多くの研
究者の研究により、或る程度まで明かになっている。

まず、Pauli & Coburn¹⁾は、A群溶連菌のスライド凝
集反応に関する研究に際し、その凝集反応の態度と結果
から、“C抗原もM抗原も菌の表面に存在するに違いな
い、”と云い、Lancefield²⁾は、A群溶連菌をトリプシン
で消化すると、菌の生活力に影響することなくM抗原を
破壊することが出来ることから、“M抗原は菌の表在性
の抗原であらう”³⁾と述べている。更に、Harris⁴⁾は、
A群溶連菌を sonic oscillator を用いて破壊して得たR
fraction (CWを含む) からM抗原を証明し、Salton⁵⁾
は、Mickle tissue disintegrator を用いてA群溶連菌を破
壊し、分画遠心により得たCWについてM抗原及びC抗
原の存在を証明している。また、McCarty¹⁰⁾は ball. mill
を用いて数株のA群溶連菌を破壊してCWを取り出し、
Streptomyces albus より得た或る種の酵素でこのCWを
溶解したところ、その溶解物に多量のC抗原が含まれて
いることを示した。

これ等の研究から見て、A群溶連菌のC抗原及びM抗
原はCWに存在するものとして差支えない。

一方、T抗原に関しては、そのA群溶連菌菌体内にお
ける存在部位について論じた報告は見られていない。

Spooner¹¹⁾は、或る菌体抗原が次の様な条件を充すな
らば、その抗原は菌の表面に存在しているものと考えて
良い、と述べている。即ち、1) 全菌体を用いて免疫す
るとその抗原に対する特異抗体が容易に形成され、2)

この様にして作られた抗血清がその菌の浮游液（菌の生死を問わず）を凝集し、3)その全菌体の濃厚浮游液を用いると抗血清からその抗原に対する特異抗体が吸収される、である。A群溶連菌のT抗原はこれ等の条件を極めて十分に満足するうえ、A群溶連菌を長時間蛋白分解酵素で処理し、そのT抗原の多くを外液に抽出し去った菌体も、形態学的に余り変化が見られない、等のことを考えると、T抗原も恐らく表在性の抗原ではあるまいかと想像され、前報¹⁾の方法で得たCWについて今回の実験を行つたわけである。

実験Iに属する(1)より(4)までの諸実験は、すべて、Lancefield & Dole¹²⁾の方法で菌体より抽出したSTAと、STAを抽出する方法でCWより抽出した分画CW-Dig.について、その免疫学的性状を前報²⁾で報告した感作赤血球凝集反応を反応して比較検討したものである。

まず、(1)でCW-Dig.及びSTA感作赤血球が抗T血清と凝集反応を起すことを確かめたので、(2)ではCWでその免疫血清を吸収し、それについてCW-Dig.及びSTA感作赤血球凝集反応を行つたところ、CW-Dig.及びSTAに対する抗体は、共にCWで吸収されることがわかつた。(3)では、CWによらずに、菌体で吸収した免疫血清、即ち酸性加熱によりT抗原を破壊した菌体及びペプシン2.5時間消化によりM抗原を破壊しT抗原を残した菌体で免疫血清を吸収し、これについてCW-Dig.及びSTA感作赤血球凝集反応を行つたが、いずれもT抗体の存在している抗血清では反応陽性に、存在しない抗血清では反応陰性にあらわれた。(4)では、CW-Dig.及びSTAを用いて相互に交叉抑制反応を行つたが、その結果、CW-Dig.及びSTAはそれ自身は勿論、互に他のものを完全に抑制し合つた。

以上のことから、CW-Dig.とSTAとは免疫学的に全く同一の性状を示すものであることが明らかになり、CW-Dig.の由来したCWにT抗原物質が存在することがわかつた。

また、先にも述べた如く、C抗原及びM抗原はCWに存在することが多くの研究者により明らかにされたが、著者も実験IIにおいてCWの塩酸加熱抽出物を用いて沈降反応を行い、この点について検討した。その結果、先人の知見と同様に、CWの塩酸加熱抽出物はCW抗原及びM抗原を含むこと、即ち、CWにC抗原及びM抗原が存在することを確かめた。

総 括

A群溶連菌1型のT1株のCWについて、その免疫学的性状をしらべた。

T1株菌体より抽出したSTA（液状T抗原）と、STAを抽出する方法を用いてT1株CWより抽出した分画CW-Dig.について、その免疫学的性状を感作赤血球凝集反応を用いて比較検討した。その結果、STAとCW-Dig.とは全く同一の性状を示し、CW中にT抗原物質が存在することが明らかとなつた。

また、CWの塩酸加熱抽出物について沈降反応を行つた結果、先人の示した如く、CW中にC抗原及びM抗原の存在することが確かめられた。

終りにあたり、御指導御校閲を賜つた恩師工藤正四郎教授に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 中沢 信・中村悠哉：日本細菌学雑誌，14巻，10号，1959に掲載予定。
- 2) 中沢 信：日本細菌学雑誌，14巻，8号，1959，に掲載予定。
- 3) Swift, H. F., Wilson, A. T. & Lancefield, R. C.: J. Exp. Med., 78, 127-133, 1943.
- 4) Pauli, R. H. & Coburn, A. F.: J. Exp. Med., 65, 595-612, 1937.
- 5) Lancefield, R. C.: J. Exp. Med., 78, 465-476, 1943.
- 6) Lancefield, R. C.: Streptococcal Infections, 6, (edited by McCarty, M.) Columbia Univ. Press, N. Y., 1954.
- 7) Harris, T. N.: J. Exp. Med., 87, 41-56, 1948.
- 8) Salton, M. R. J.: Biophys. Biochem. Acta 9, 334-335, 1952.
- 9) Salton, M. R. J., Biophys. Biochem. Acta, 10, 512-523, 1953.
- 10) McBarty, M.: J. Exp. Med., 96, 569-580, 1952.
- 11) Spooner, E. T. C.: The Nature of the Bacterial Surface, 106-122, (edited by Miles, A. A. and Pirie, N. W.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1949.
- 12) Lancefield, R. C. & Dole, V.: J. Exp. Med., 84, 449-471, 1946.