炭疽沈降素血清の特異性に関する研究

18. 炭疽菌と極めて類似の抗原を有する *Bacillus* 属の抗血清による炭疽の診断についての研究 補遺

高 木 静 雄・広 直 武 司

大阪府立大学農学部家畜微生物学教室

[受付：2月28日・1960年]

先に抗 *Megaterium* 血清（以下抗 Meg 血清）が炭疽抗原と強い沈降反応を示す¹⁾ことから、この血清が炭疽の診断に充分用い得る可能性のあることは既に報告²⁾した。

今回は主として抗原の側から、即ち炭疽感染モルモット臓器から加熱抽出によつて得た Ascoli 抗原を用いて、本抗原に含まれる共通類属抗原並びに特異抗原につき2, 3の方法によつて検べ、益々抗 Meg 血清の炭疽診断への利用可能の確信を得たのでその結果を報告する。

材料ならびに方法

使用菌株. *Bacillus anthracis* Sakai 株及び *Bacillus megaterium* (TU 株, 東京大学農学部家畜細菌学教室より分与, 抗炭疽血清と極めて強い類属反応を示し, 便宜上 TU 株と呼ぶ)。

抗原. 体重 350~400 g のモルモットに炭疽菌幼弱寒天培養の少量を皮下注射し斃死させ、その新鮮な臓器から、通常 Ascoli 反応に用いると同じ方法で5倍生食水加熱抽出抗原A-1を得、これを更に50~60°Cの浴上で加温濃縮、生食水に対して透析後、4容のエタノール添加によつて生じる沈澱部分を集め、エタノール及びエーテルで洗滌乾燥、灰白色粉末の抗原A-2を得た。

正常臓器抽出物. 対照として健康なモルモットを麻酔死させ、それから上の抗原の場合と同じ方法で正常臓器抽出物を得た。

抗血清. 使用菌株の幼弱寒天培養菌を 0.5% フォルマリン生食水に浮遊、死菌とし、うさぎの静脈内に注射して得た。

沈降反応. a) 重層法. 大体既報^{3,4)}に従った。b) 寒天内法. Wilson 及び Pringle⁵⁾の方法を少々改変して行つた。c) 免疫電気泳動法. 次に述べる。

電気泳動. Veronal, pH 8.6 を緩衝液に用い、a) 濾

紙泳動の場合、 $\mu=0.1$ 、東洋濾紙 No. 51を、b) 寒天及び上の免疫泳動の場合、 $\mu=0.05$ 、2%寒天を用い、Williams 及び Grabar⁶⁾、Courcon 及び Uriel⁷⁾らの方法を参考にし、泳動後の処理もこれらの方法^{6,7,8)}に準じた。

定量沈降反応. Kabat 及び Mayer⁹⁾の記載に従つた。

結 果

重層法. 分離抗原の反応性は表1のようて、抗炭疽血清とは勿論、抗 Meg 血清とも強く反応し、前報²⁾の結果とよく一致している。

寒天内沈降反応. 重層法の結果を更に寒天内沈降反応で検べると、図は省くが、抗原A-1、A-2 何れも抗炭疽及び抗 Meg 血清に対して極めて強い共通反応帯を形成した。この他、抗炭疽血清に対しては少々抗血清溜寄りに別の反応帯がみられた。

電気泳動. 抗原の電気泳動的分析を行う目的でA-2を；濾紙で泳動させると、原点から少々陰極に動く（多分電気浸透のため）部分と陽極に動く1つの部分、計2つの大きな部分があり、これらは何れも蛋白、糖、脂質染色が陽性であつた。但しこの泳動像は正常臓器抽出物でも略々同じように現われ、両者を混合泳動しても抗原と正常抽出物とを泳動によつて明瞭に分別することはできなかつた。次に寒天を支持体とした場合、図1 A及び図1 Bのように原点から少々陰極に動く（多分電気浸透

TAKAGI Shizuo and HIRONAO Takeshi: Studies on the specificity of anthrax precipitin serum. 18. A supplement to studies on diagnosis of anthrax by antisera prepared against members of the genus *Bacillus* which are antigenically closely related to *Bacillus anthracis*. Dept. of Veterinary Microbiology, College of Agriculture, Univ. of Osaka Pref. —Jap. J. of Bact. 15 (8), 780-784, 1960.

表 1 分離抗原の反応性*

血 清		抗 原				対 照	
		A-1			A-2		正常臓器 抽出液 (1:5)
		1:5	1:10	終末価	1:400	終末価	
抗炭疽	No. 210	+++	++	400	+++	102,400	—
	No. 211	++	±	5	+++	1,600	—
抗 Megaterium	No. 156	+++	+++	100	+++	12,800	—
	No. 212	++	±	5	++	3,200	—
	No. 213	+++	++	20	+++	3,200	—
正 常	No. 210	—	•	•	—	•	—
	No. 213	—	•	•	—	•	—

* 室温 20 分後の成績

図 1 抗原 A-2 の寒天及び免疫電気泳動像

(A) Amidoschwarz 10B 染色; (B) Schiff 染色; (C), (D) 免疫電気泳動像; (E), (D) からの分画抽出部位

のため) 部分と陽極に動く 2 つの部分, 計 3 つの大きな部分がみられ, これらは何れも濾紙の場合と同じく蛋白, 糖, 及び図には示さないが脂質染色が陽性であった。これらの泳動像は正常臓器抽出物でも略々同じように現われ, 従つてこの場合も濾紙泳動の場合と同じく泳動像だ

けて抗原部分の識別はできなかった。なお抗原の場合, かなり陽極寄りにも Schiff 染色で陽性に染まる部分が余り明瞭ではないがみられた。又免疫電気泳動によつて, 寒天泳動時にみられた泳動部分の抗原性を検べると, 図 1 C のような沈降反応帯がみられた。即ち先の図 1 A 及び 1 B でみられた原点から少々陰極に動く部分に略々一致して抗炭疽及び抗 Meg 血清とかなり強い反応帯の形成がみられた。この他, 抗炭疽血清に対しては陽極側に少々弱く, 図では余り明瞭でないが 1~2 本の特異部分ではないかと思われる反応帯の形成がみられた。

寒天泳動分画の反応 上の寒天及び免疫電気泳動の結果をもとにし, 抗原部分を分画抽出する目的で更に大型の寒天支持体を用いて予備試験を行うと, 図 1 D (この図は比較の便宜上縮写してある) のように先の図 1 C と似たような沈降反応帯がみられ, 特異と思われる部分及び非特異共通抗原部分が充分分離抽出できることがわかつたので, 大量の抗原を泳動させ, 図 1 E に示す区分で抗原を抽出し, 寒天内沈降反応で出現する反応を検べる (F-4 は抽出後の重層法による試験でも極めて弱い反応しか示さなかつたので省略) とともに, 各分画を H_2O に対して透析除塩後, 凍結乾燥したものについて重層法でその反応性を検べると夫々図 2 及び表 2 のようであつた。即ち寒天内沈降反応では原点附近の F-1 は抗炭疽及び抗 Meg 血清に対して反応帯を形成し, しかもこの部分は炭疽菌及び Megaterium 由来の抗原の形成する共通反応帯とも連続するものであつた。F-2 は抗炭疽血清に対してだけ反応帯の形成がみられ, F-3 は抗原濃度が低かつたためかどちらの抗血清とも認め得る反応帯は形成されなかつた。次に重層法で分画の反応性を検べる

図 2 寒天電気泳動抽出分画の寒天内沈降反応像

AE……炭疽菌抗原；ME……*B. megaterium* 抗原；F-1, F-2, F-3……抽出分画；AS……抗炭疽血清；MS……抗 *Megaterium* 血清

表 2 抽出分画の反応性

試験 No.	分 画 (1 : 2000)	血 清*			正 常
		抗炭疽	抗 Megaterium		
			No. 210	No. 156	
I	F-1	++	++	++	—
	F-2	++	—	—	—
	F-3	++	—	—	—
	F-4	+	—	—	—
II	F-1	++	++	++	—
	F-2	++	—	—	—
	F-3	+	—	—	—
	F-4	+	—	—	—

* 正常血清以外は 2 倍に稀釈

と、大体寒天内沈降反応の結果と一致して F-1 は抗炭疽及び抗 *Meg* 血清両方に強く反応し、F-2 は抗炭疽血清だけに比較的強く、F-3, F-4 も弱い抗炭疽血清だ

図 3 抗原 A-2 抗炭疽及び抗 *Megaterium* 血清との定量沈降反応曲線

けに反応した。

定量沈降反応. 以上の結果から炭疽動物臓器抗原中にはかなりの量の非特異共通抗原が含まれていることがわかったが、それでは同じような方法で作製した抗炭疽及び抗 *Meg* 血清によって沈降される抗原-抗体沈降物の量はどれ程か検べると図 3 のようであつた。即ち同一抗原量を添加した場合に生ずる沈降物の量を比較すると抗 *Meg* 血清の場合は大体いつも抗炭疽血清の場合より多い結果を得た。又この時得られる上液について試験すると表 3 のように、抗 *Meg* 血清の共通類属抗体の含有量は極めて多く、抗原 A-2 のかなりの添加量のところまでこの抗原と反応し、又寒天泳動で得た共通抗原分画 F-1 ともやはり A-2 と同じような反応性を示した。又先の寒天泳動抽出分画で抗炭疽血清だけに反応したもののうち F-3 を上液試験に用いると、抗炭疽血清に対しては反応するが抗 *Meg* 血清に対しては未だ充分共通抗体が残っている部分に対しても反応しなかつた。

考 察

通常炭疽の診断の場合に用いられる Ascoli 反応用の動物臓器抽出抗原をモルモットを用いて実験的に作製し、種々試験してみると、重層法の場合、前報²⁾の結果と同じように抗炭疽血清とも、又炭疽菌と類縁関係にある *Megaterium* の抗血清ともかなり強い沈降反応を示すことから、この抗原中にはそれが比較的新鮮な材料から得られたものであつても、かなりの量の非特異抗原が含まれていることがわかる。又この抗原を寒天内沈降反

表 3 抗原 A-2 による定量波降反応の上液試験

抗原添加 mg/0.4ml 抗血清	血 清*											
	抗炭疽 (No. 210)				抗 Megaterium (No. 156)				抗 Megaterium (No. 213)			
	抗血清 (No. 210)	A-2	F-1	F-3	抗血清 (No. 156)	A-2	F-1	F-3	抗血清 (No. 213)	A-2	F-1	F-3
0.15	—	++	++	+								
0.5	+	+	+	+								
1	+	+	—	+	—	++	++	—	—	++	++	—
2	++	±	—	+	—	++	++	—	—	+	++	—
3	++	—	—	+	—	++	++	—	—	+	+	—
4	++	—	—	±	—	++	++	—	±	±	±	—
5	++	—	—	—	—	++	++	—	+	—	—	—
6	++	—	—	—	—	++	++	—	++	—	—	—
8	++	—	—	—	—	+	+	—	++	—	—	—
10	++	—	—	—	—	±	+	—	++	—	—	—

* 最終稀釈 1:2

応で検べても重層法の場合と同じく両菌の抗血清との間に共通反応帯を形成し、しかもこれがかなり強いものであつて、これらの結果から、炭疽動物臓器から抽出されるこの共通類属抗原部分は、診断の場合重要な役割を演じているのではないと思われる。しかるに実際に当つては抗炭疽血清だけが診断に用いられ、抽出される抗原の種類なり或は量なりに関しては殆ど考慮が払われていない。従つて今この共通抗原部分に注目すると、これと強く反応する抗血清があればそれは別に抗炭疽血清でなくても充分役立つ筈であり、この観点からすれば、本実験に用いた抗 Meg 血清のような炭疽共通抗原と強く反応する類縁菌の抗血清を用いても一向に差支えないと思われる。

さて炭疽動物臓器から抽出される抗原中の共通反応部分の存在は上の通りであるが、この部分の電気泳動的な性質をみると、免疫電気泳動で主として原点附近に留まる部分がそれであつて、この部分を抽出して重層法及び寒天内沈降反応で検べても抗炭疽及び抗 Meg 血清とも強い沈降反応を示す。この部分は寒天電気泳動で蛋白、糖、脂質染色が陽性であるのでこれら 3 種、或は 2 種、或はそのうちの 1 種がその抗原部分を成していると思われるが、正常臓器抽出物でもこれと同じような泳動性及び染色性を示す部分がみられるので、本実験だけでは抗原部分を構成する物質がどれかはわからない。この点に関しては別の機会にゆずるが、たゞ Smith 及び Zwartouw¹⁰⁾ はやはり炭疽感染モルモットから多糖体を分離し、濾紙電気泳動で検べ、これが原点から少々陰極

に寄る部分（電気浸透のためとしている）に糖反応で検出される（蛋白染色も陽性に出るとしている）ことを記しており、又われわれが先に報告¹¹⁾した結果でも原点から少々陰極寄りに schiff 染色で染まる部分が共通反応を示したことから、本実験でみられた共通抗原部分は多分これらと一致し、従つて多糖体がその主体をなすのではないかと考えられる。

次にこの抗原に対する抗体についてみると、定量沈降反応の結果から抗 Meg 血清は抗炭疽血清に比較して同一抗原量に対しかなり多量の抗原—抗体沈降物を生じた。これは炭疽菌或は Megaterium で免疫した場合に形成される抗体分子量に差があり、後者の方が大きいためか、或は後者の抗体蛋白中の tyrosine, tryptophane 含量、或はその他 phenol 試薬に反応する物質の含量が多いからかも知れないが、上液試験の結果から明らかに反応に与る共通抗体量が多いためであることがわかる。これと似たような成績は Ivánovics 及び Földes¹²⁾の報告にもみられる。即ち彼らが得た炭疽菌多糖体は *B. cereus* のある株の抗血清と極めてよく反応し、その沈降物 N 量が抗炭疽血清とのそれよりはるかに多い結果を出している。これからみると、われわれの場合も Ivánovics ら¹²⁾の場合も、炭疽菌共通抗原部分に対する共通類属抗体の産生の点では、炭疽菌よりむしろこれと血清学的類縁性をもつ菌を用いた方がはるかに良いように思われる。しかもこの抗体は前述の通り診断に用いる炭疽動物臓器抽出抗原とも非常に強く反応する。

なお汚染等の心配のある陳旧臓器については実験しな

かつたので、この点に関しては言及し得ないが、少なくとも比較的新鮮な炭疽動物材料であれば炭疽類縁菌抗血清でも充分診断の代用に供し得るという前報²⁾の妥当性を証明することができた。

実験中免疫電気泳動でみられた炭疽特異的と思われる分画は、抽出後の重層反応或は寒天内沈降反応でも抗 Meg 血清とは反応しなかつたが、これは本実験に用いた抗 Meg 血清中にたまたまこの部分に対する抗体が含まれていなかったか、或は含まれていても量的に極めて少かつたので反応しなかつたのかも知れない。

本実験でみられた抗原部分、その他類属部分として既に知られている莢膜の polypeptide^{13,14,15)} についてそれらの関係等更に実験を進める考えである。

要 約

実験的炭疽動物材料を用いて炭疽菌と類縁関係にある *Bacillus* 属菌の抗血清による炭疽の診断の可否について実験し、その結果について考察してみた。抽出した抗原中には特異的と思われる抗原の他、類縁菌抗血清とも極めて強く反応する共通抗原が含まれていることが重層法、寒天内沈降反応、免疫電気泳動及び定量沈降反応の各試験によつて証明され、従つて新鮮な動物材料については、この共通抗原部分に対して類縁菌抗血清によつても炭疽の診断が充分可能であるという確信が得られた。

文 献

- 1) Takagi, S. and Hironao, T. : Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B, Vol. 6, 59, 1956.
- 2) 高木静雄, 広直武司 : 日本細菌学雑誌, 12(5), 385, 1957.
- 3) 高木静雄 : 日本細菌学雑誌, 9(10), 885, 1954.
- 4) 高木静雄 : 日本細菌学雑誌, 9(12), 1063, 1954.
- 5) Willson, L. W. and Pringle, B. H. : J. Immunol., 73, 232, 1954.
- 6) Williams, C. A. and Grabar, P. : J. Immunol., 74, 158, 1955.
- 7) Courcon, J. et Uriel, J. : Ann. Biologie Clinique, No. 3-4, 1, 1958.
- 8) Uriel, J. et Grabar, P. : Bnn. Inst. Pasteur, 90, 427, 1956.
- 9) Kabat, E. A. and Mayer, M. M. : Experimental Immuno-chemistry, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1948.
- 10) Smith, H. and Zwartou. H. T. : Biochem. J., 63, 447, 1956.
- 11) 高木静雄, 広直武司 : 日本獣医学雑誌, 21(6), 3, 1959.
- 12) Ivánovics, G. and Földes, J. : Acta Microbiol. Hung., 5(1), 89, 1958.
- 13) Ivánovics, G. und Bruckner, V. : Zeitschr. f. Immunitätsf., 90, 304, 1937.
- 14) Record, B. R. and Wallis, R. G. : Biochem. J., 63, 443, 1956.
- 15) Watson, D. W., Cromartie, W. J., Bloom, W. L., Heckly, R. J., McGhee, W. J. and Weissman, N. : J. Inf. Dis., 80(2), 421, 1947.