グラム陰性桿菌の表面構造とその生物活性物質

II. 緑膿菌表面構造構成物質, 特に所謂内毒素とその構成成分の発熱性について

本 間 遼・鈴木 奈智子

東京大学伝染病研究所

堀 江 喜 一

国立予防衛生研究所

[受付: 2 月 23 日・1961 年]

緑膿菌々体内毒素 Comp. I (lipopolysaccharide-protein complex) は従来の方法で菌体から分離される Boivin type の抗原とは蛋白含量の点でかなりの相違がみられ, これが lipopolysaccharide の生物活性の発現にもかなりの影響を及ぼしていることが考えられ, 更にその活性はそれ自身活性のない Comp. II (DNA-RNA-polyribose-phosphate) によつて安定化されていることは既に報告した¹⁾。

一般に菌体内毒素の蛋白部分を活性をもつまま分離することは今迄に成功していないが, 私共は Comp. I 及び表面物質 (BS) よりその蛋白部分をその活性を保持したまま電気泳動, 及び超遠心分析で均一の状態と分離することに成功した²⁾。そこで今回は発熱性に関して内毒素及びその構成成分がどの程度に活性を示すか, 又その個々の活性とそれから構成された高分子物質としての活性との相互関係はどうかという点についてえられた実験成績について考察してみた。

実験材料および方法

使用した菌体内毒素, 表面物質及びその構成成分は何れも前報²⁾でその分離方法, 免疫化学的性状, 生物学的性状を詳細に記したのでここでは略記するにとどめる。その純度は可溶性物質についてはすべて電気泳動, 超遠心分析によつて均一性を証明し, 血清学的にも抗原特異性を検査した。

Original endotoxin^{1,2)}: 緑膿菌 PI-III 株の合成培地の autolysate から私共の方法によつて分離した内毒素 Comp. I と Comp. II の複合体である。

Comp. I^{1,2)}: Orig. endotoxin から zone electrophoresis によつて分離した lipopolysaccharide protein complex。

88%含まれる。S_{20,w} 3.7。

Comp. II¹⁾: Orig. endotoxin から zone electrophoresis によつて分離した DNA-RNA-polyribose phosphate。12%含まれる。S_{20,w} 2.4。

Orig.-endot-P²⁾: Orig. endotoxin を lower phase solvent で処理してえられる蛋白部分。S_{20,w} 1.1。註1参照

Comp. I-P²⁾: Orig. endot.-P と同様の処理で, Comp. I から分離される Comp. I の蛋白部分で Comp. I に半量含まれる。

Orig. endot.-LC(zone): orig. endotoxin を lower phase solvent で処理し, その水溶部を出発材料として zone electrophoresis によつて分離された lipopolysaccharide。註1参照

Orig. endot-LCph(zone): 前項と同じく Orig. endotoxin の lower phase solvent 処理の水部を出発材料として phenol 処理し, それを zone electrophoresis を行い核酸を除いた単一物質。lipopolysaccharide。註1参照。

Comp. I-LC: 前項と同様の処理で Comp. I の lower phase solvent 処理の水部から zone electrophoresis によつて分離した lipopolysaccharide。註2参照。

Comp I-ph¹⁾: Comp. I を phenol 処理してえた lipopolysaccharide。S_{20,w} 1.3。

HOMMA Yuzuru J., SUZUKI Nachiko, HORIE Kiichi: Studies on the Bacterial Surface Structure of Gram-negative Bacteria and its Biological Active Substances. II. Pyrogenic properties of the Constituents Dissociated from the Bacterial surface Structure and the Endotoxin obtained from the Fluid Culture-media, Specially Pertaining to the Manifestations of Pyrogenic Properties of the High-molecular Substances. —Jap. J. of Bact., 16(9)827-833, 1961.

註1 Orig. endotoxin に lower phase solvent を作用させ、その上清を透析後、凍結乾燥したもの(B)を出発材料として分離を行った。その方法の概略は表1に記した。すなわち Orig. endoto-LC はBを zone electrophoresis

表1 Original endotoxin より蛋白部分(Orig. endot.-P) および多糖体部分(Orig. endot.-LC, Orig. endot.-LCph) の分離

* シクロヘキシルアミン	2.7 ml
n-プロパノール	17.0 ml
85% 磷酸	6.0 ml
苛性カリ	7.26 g
水	72.0 ml

図1 Orig. endot. LC の zone electrophoresis

horesis (図1) にかけることにより単一物質として分離出来た。N 5.42%, P 3.18%で Orig. endotoxin の lipopolysaccharide の抗血清と12万倍抗原稀釈まで陽性に反応する。

一方 Orig. endotoxin-LCph はBを phenol 処理したのち、透析後凍結乾燥してえられるがこれは図2に示す

図2 Orig. endot.-LCph, Orig. endot.-LCph (zone) の UV 吸収

ように 260m μ に吸収を示し Comp. II が混在していることを示した。これを更に zone electrophoresis (図3) を行い、単一物質として Orig. endot.-LCph (zone) を分離した。これは Orig. endotoxin の lipopolysaccharide の抗血清と12万倍抗原稀釈まで反応陽性であり、N 4.31%, P 3.11%であつた。このものは図2にみられるようにもはや 260 m μ の吸収はない。

図3 Orig. endot.-LCph の zone electrophoresis

Orig. endot.-LCph 200 mg
 Veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$ 濃粉
 7×1.5×40 cm セル 15 mA, 17時間
 orcin-HCl 反応 660 m μ で比色 (O.D.)

註2, Comp. I-LC も同様に精製される。

CB¹: 菌体より T C A 抽出の lipopolysaccharide.

BS²: 細胞壁, 細胞質被膜を含む物質で表面物質 (B S) と名付けた。その分離方法, 形態, 化学分析値は前報²⁾ に記した。

NP²: B S に lysozyme, EDTA 作用後の不溶部分。

NPLS²: NP に lysozyme, EDTA を作用させ水溶性になった部分を zone electrophoresis を行い単一の物質として分離したもの。

LS²: B S より lysozyme, EDTA 作用で可溶性になる部分で zone electrophoresis で不溶性となる (図 4)。

図 4 LS の zone electrophoresis

Veronal buffer, pH 8.6 $\mu=0.05$

1.5 × 3 × 40 cm セル, 濃粉

9 mA 16 時間

○—○—○ orcin-HCl

●·····●·····● Folin-Ciocalteu

LSNS²: L S を Nagarse 処理した水溶部を zone electrophoresis にかけて分離した。

LSAS²: L S より lower phase solvent で分離した L S A を更にアルカリ性で 105,400 × g で遠心した上清で単純蛋白と考えられ Orig. endot.-P と血清学的特異性を共通する。S_{20,w} 1.7

PS: プロトプラスト表面物質。プロトプラスト被膜とされているものである。

PSNP: PS を Nagarse 処理したもので RNA は 90% 以上失われる。

発熱の測定: 生物学的製剤基準に準じて行つた。すなわち, 2.0~2.5 kg の白色ウサギを入荷し, 飼育箱に一匹宛入れて固型飼料と水で飼育しながら, 2 週間程環境と飼料に馴れさせた後, 同じ環境で首枷式固定器を用いて直腸内体温を測定した。その方法は, 固定器に固定したまま 2 時間毎に 4 回体温を測定し, 4 回共に 38.8°C から 39.8°C までの体温を示したウサギのみを選び出した。

この間飼料も水も与えなかつた。選ばれたウサギは翌日同様に首枷式固定器に固定し 30 分後に体温を測定して 38.9°C より 39.8°C までの体温 (正常体温) を示したウサギに可及的速かに各試料を 1 kg につき 3 cc の割に耳静脈内に注射した。その後, 1, 2, 3 時間目に夫々体温を測定して, その最高体温を示したものを正常体温より低い場合はその最低の体温を正常体温と比べてマイナスで示した。

なお, 注射器, 注射針, 使用ガラス器具は試験前日にマッフル炉中で 280°C~300°C に 30 分間以上加熱したものをを用いた。

発熱の判定: 実験の都合上試料の各稀釈につき 3 匹ずつのウサギを用いて発熱の状況を判定した。すなわち, 3 匹の中 2 匹以上が 1°C 以上の発熱度を示した場合, および 3 匹の発熱度の合計が 2.1°C 以上の場合は発熱陽性とした。3 匹の発熱の合計が 1.8°C~2.0°C の場合には, その中 2 匹が 0.7°C またはそれ以上の発熱度を示した場合に発熱陽性とし, その他の場合はすべて発熱陰性と考えた。稀に 1 稀釈量に 3 匹以上のウサギを用いた場合があるが, この際もおおむね上記の記載に準じて判定した。その 1 例を表 2 に示した。

実験

個々の発熱試験成績は省略するが, 同じ試料を数回反覆試験したものはすべて全く同一の結果をえた。それらの結果は表 3 に総括して示した。

I. 表 3 に示したように Orig. endotoxin の発熱性は 0.3 μ g であるが, その 88% は Com. I で 12% が Comp. II である。Comp. I の発熱性は 3 μ g, Comp. II は 300 μ g であるからその構成々分から算出される量と実際の最小発熱量には非常なへだたりがみられた。表 2 計算値欄に示したように構成々分から算出された最小発熱量は 39~63 μ g であるからそれによつて構成された Orig. endotoxin 自体の最小発熱量の 130~220 倍に相当する。従つて Orig. endotoxin から Com. I 及び Comp. II を分離する際に発熱有効因子の消失がおこらなかつたとすると, Orig. endotoxin の発熱性は その構成々分より算出される量より非常に強く出ていることと, 逆に分離された構成々分の活性が低下したとも考えられる。これと全く逆に高分子物質自体の活性がその構成因子の活性より低下している場合は Comp. I とその構成成分 Comp. I-ph の関係にみられる (実験 III を参照)。

II. Orig. endot.-P は 3 μ g, Comp. I-P は 80 μ g で蛋白部分はその分離程過でやや変動がみられた。Orig. endot-

表 2 original endotoxin の発熱試験成績

被験試料	家兎番号	体重 (g)	注 射 量	注 射 前 温 (°C)	注射後体温(°C)			体温の 変 動 (°C)	判定
					1 時間	2 時間	3 時間		
0.001 $\mu\text{g/cc}$	1439	1940	5.3	39.3	39.4	39.1	39.0	+ 0.1	—
	1444	2450	7.4	39.2	39.4	39.1	39.0	+ 0.2	
	1454	2490	7.5	39.7	39.3	89.3	39.3	— 0.4	
0.01 $\mu\text{g/cc}$	1420	2690	8.1	39.4	39.8	39.2	39.1	+ 0.4	—
	1462	2490	7.5	39.2	40.0	39.7	39.2	+ 0.8	
	1465	2410	7.2	39.6	70.0	39.8	39.5	+ 0.4	
0.1 $\mu\text{g/cc}$	1469	2800	8.4	39.5	40.4	40.0	39.5	+ 0.9	+
	1470	2840	8.5	39.6	40.6	40.0	39.3	+ 1.0	
	1473	2630	7.9	39.7	40.9	40.1	39.6	+ 1.2	
1 $\mu\text{g/cc}$	1476	2900	8.7	39.3	40.9	40.9	41.0	+ 1.7	+
	1481	2450	7.4	39.2	41.3	40.8	41.1	+ 2.1	
	1482	2350	7.1	39.4	41.1	40.5	41.2	+ 1.8	
生理食塩水	1432	2920	8.8	39.4	39.5	39.4	39.3	+ 0.1	—
	1452	2930	8.8	39.2	39.3	39.3	39.4	+ 0.2	
	1483	3000	9.0	39.5	39.6	39.5	39.6	+ 0.1	

P は sodium dodecylsulphate (SDS), 加熱 (100 °C 30 分) で発熱性の低下がみられなかった。Orig. endotoxin を冷アルカリ, エタノール法で分離した蛋白部分 Orig. endot.-P 1 には 150 μg でも活性はみとめられなかった。

III. Comp. I-ph は $\leq 0.3 \mu\text{g}$ で菌体より抽出した lipopolysaccharide (CB) は 0.03 μg であった。これに lysozyme, EDTA を作用させたが, その前後で活性の変動はみられなかった。lipopolysaccharide は Comp. I に半量含まれているが, Comp. I の発熱性は 3 μg であるからこの場合 lipopolysaccharide の活性は全くマスクされている。

IV. Comp. I-LC は 30 μg を示したが, これを phenol 処理した lipopolysaccharide 部分 (Comp. I-LCph) は 3 μg であった。

Orig. endot.-LC (zone) は 0.9 μg の値をえたが, phenol 処理により Orig. endot.-LCph(zone) は 3 μg を示した。

V. 表面物質 (BS) に lysozyme, EDTA を作用させた水溶性部分 (LS) は 30 μg であった。

VI. LS, Comp. I, に Nagarse を作用させてえられる LSNS, Comp. I-NS, 及び NP に Nagase を作用させてえられる NP LS は何れも 3 μg であった。

VII. LS に lower phase solvent を作用させ更に稀アルカリで超遠心することにより分離される蛋白質 (LSAS) は Orig. endot.-P と血清学的に抗原特異性を共通にするが, 発熱性も共に 3 μg であった。

VII. プロトプラスト表面物質 (PS) 及びその Nagarse 処理物質 PSNP (PNA を含まず) は共に 30 μg であった。

考 察

Autolysate よりえられる Original endotoxin は zone electrophoresis により表 4 に示したように, Comp. I と Comp. II に別れるが, Orig. endotoxin のもっている毒性, 沈降反応性は単離された 2 つの成分では非常に低い。このように活性の低い Comp. 1 は 1 例をあげるとマウスに対する LD₅₀ 1.8mg となり, 同時に沈降反応も抗原 1 mg/cc の液でも認められなくなっている。これを

表 4 自家融解液から内毒素 “Original endotoxin” の構成と活性¹⁾

“Original endotoxin”	ゾーン	電気泳動	Comp. I + Comp. II (DNA-RNA- polyribose- phosphate)
(抗原性, 毒性) (あり, 安定性)			
Comp. I	フェノール		変性蛋白質 + Comp. I-ph (抗原性, 毒性) (あり, 安定性)
(抗原性, 毒性) (あり, 易変性)			

表 3 緑膿菌表面構造構成物質特に内毒素とその構成成分の発熱性

実験 番号 (No)	菌体内毒素, 表面物質及びその構成成分		化 学 構 成	最小発熱量 (μ g)	
	略 号	構成成分(%)		実験よ りの値	構成成分より算 出された計算値
1	Original endotoxin	Comp. I 88 Comp. II 12	lipopolysaccharide-protein complex nucleic acids polyribose phosphate (DNA, RNA)	0.3	33.6 (No.2, 7, より算出) 62.6 (No.3, 5, 7 より算出) 41.9 (No.3, 6, 7 より算出)
2	Comp. I	Comp. I-ph 50 Comp. I-ph 50	lipopolysaccharide protein	3	15.2 (No.3, 5 より算出) 1.6 (No.3, 6 より算出)
3	Comp. I-ph		lipopolysaccharide	≤ 0.3	
4	C B		“Boivin type” 抗原	< 0.03	
5	Comp. I-P		protein 部分	30	
6	Orig. endat-P		protein 部分	3.0	
7	Comp. II		DNA-RNA-polyribose phosphate	300	
8	Orig. endot.-P1		Orig. endot.-P のアルカリ処理の蛋白部分	$150 <$ < 750	
9	Comp. I-NS		Comp. I Nagarse 処理	3	
10	Orig. endot.-LC (zone)		Orig. endot. の LPS* 処理	0.9	
11	Comp. I-LC		Comp. I の LPS* 処理	30	
12	Comp. I-LCph		Comp I-LC の phenol 処理	3	
13	Orig. endot.-LCph		Orig. endot.-LC の phenol 処理	3	
14	LS			30	
15	LS (zone)			30	
16	LSNS		LS の Nrgase 処理	3	
17	NPLS		NP の Nagarse 処理	3	
13	PS			30	
19	PSNP			3	
20	LSAS		protin	3	
21	Orig. ecdot.-P 2		Orig. endot.-P のアルカリ処理の非蛋白部分	90	
22	CompI-ph-ly.E.		Comp I-ph に lysozyme, EDTA を作用させたもの	≤ 0.3	
23	Orig. endot.-P-h		Orig. endot.-P 加熱試料	3	
24	Orig. endot.-P-SDS		Orig. endot.-P を SDS** 処理試料	≤ 30	

* LPS: Lower phase solvent ** SDS: sodium dodecylsulphate

phenol 処理して約 40 % の収率で lipopolysaccharide を分離出来るが, これは $4 \mu\text{g/cc}$ 抗原稀釈まで, 沈降反応陽性であつた (重層法, 抗 Comp. I 血清)。又マウスに対する毒性は, LD_{50} 0.8 mg を示し, 重量当り増強し

た。この現象から考えられる事は, (1) Comp. I が分離された場合, その中に含まれる約半量の lipopolysaccharide の活性がマスクされたこと, (2) Orig. endotoxin を zone electrophoresis で Comp. I. と Comp. II

とに分離した場合、未知の活性部分の消失がおこつたか
或いはこの操作で活性の低下が生じたかである。

今回はこの事実を再確認するために、微量で測定可能な発熱性について、これらの関係を調べてみたわけである。この結果、毒性、沈降反応性の場合に考えられていたと同様に、Orig. endotoxin は強い発熱性を示し、分離された Comp. I, Comp. II の値から算出されるものよりも遙かに強力であつた。この事実は毒性と同様に、Orig. endotoxin より Comp. I 及び Comp. II を分離する時に有効因子が失われるのではないかとの疑問が生ずるが、Comp. I から分離される lipopolysaccharide (Comp. I-ph) の発熱性は非常に強いので、Orig. endotoxin の発熱性を Comp. I-ph から算出するにそれ程の不都合はない。即ち orig. endotoxin から分離された Comp. I の発熱性が低いために、この値から活性を算出すると著しい差が生ずる。又 Comp. I から分離された蛋白部分 Comp. I-P は $30\mu\text{g}$ の発熱性を示したが、Orig. endotoxin から直接分離した蛋白部分 Orig. endot-P は常に $3\mu\text{g}$ の発熱性を示した。しかし加熱、SDS に対して安定であり、冷アルカリ-エタノール法により蛋白部分のみにした Orig. endot-P1 に活性がないことは、蛋白部分の発熱有効因子が単純蛋白のみによるものではない事を考えさせられる。

一方 lipopolysaccharide の発熱性は、菌体から直接分離されたものも、Comp. I を phenol 処理して分離したものも、共に強力で何年にもわたつて安定であり、本実験によつても lysozyme, EDTA の作用を受けないことが明らかになった。このことから Comp. I の活性が低下した場合、安定した活性を示す lipopolysaccharide は常に phenol 処理により分離出来るのであるから、発熱性は蛋白部分 (Comp. I-P) によつてマスク されていると考えられる。

菌体内毒素の活性は、従来主として lipopolysaccharide 部分のみについて研究され、蛋白部分は実際に顧みられなかつた。その理由として Boivin type の抗原には普通 5~25% しか蛋白は含まれていない事が考えられる。私共の緑膿菌の autolysate からえられる内毒素は約半量の蛋白質を含むことが実証されたが、これ自身活性をもつと共に、lipopolysaccharide 部分に多大の影響を及ぼすことが示されたわけである。同時に Comp. II というそれ自身活性のない物質が、所謂内毒素の活性保持に役立っていることがわかつた。

この Comp. I は菌の表面物質中にあつて lysozyme, EDTA の作用で溶出する LS 部分に約 $\frac{1}{3}$ 含まれる筈で

あるが、この発熱性は $30\mu\text{g}$ である。この部分の Nagarse 処理により $3\mu\text{g}$ の LSNS がえられたが lipopolysaccharide 及び Orig. endotoxin の活性に比べると、まだ低いようである。この原因については今後研究する必要がある。

Orig. endot-P を直接表面物質から分離する試みは成功したが、取り出された LSAS は Orig. endot.-P (S_{20} , w 1.1) と共通抗原をもち、より高分子 (S_{20} , w 1.7) で共に発熱性 $3\mu\text{g}$, Schwartzman 活性 $0.2\mu\text{g}$ (準備最小量) で“内毒素”としての活性を示した。又 LSAS は更に Pyocine 活性を持つている。このことは Orig. endot.-P は autolysis によつて得られたものであるから、菌体内では LSAS の状態で存在していることを示すものである。

従来内毒素の有効因子として“toxic component T”或いは“Lipoid A”とされた物質が知られているが、このものはグラム陰性桿菌々体の持つ最も強い活性因子である。しかしながら内毒素という言葉が Pfeiffer が autolysate 中にある特異有毒因子について名付けたものとする、私共の内毒素 Orig. endotoxin が最もこれに近いものと考えられる。この Orig. endotoxin 自体の活性はその構成因子 Comp. I, Comp. II とは如何なる関係にあるか、更に Comp. I はその構成因子 Comp. I-ph, Comp. I-P 等の活性と如何なる関係にあるかは今回の実験で明らかになつたように、極めて複雑なものであつて、内毒素といわれる高分子作用物質の活性は、その構成成分の活性とは一応別個に考慮されなければならないことがいえるのではないかと思う。

なお発熱試験は同一試料について数回反覆したが全く同じ結果をえたことから再現性は極めて高いものと考えられる。

結 論

Autolysate よりの内毒素 Orig. endotoxin とその構成因子 (Comp. I, Comp. II) の発熱性を研究し、Orig. endotoxin の示す発熱性は分離された構成成分 Comp. I (lipopolysaccharide-protein complex) と Comp. II (DNA-RNA polyribose phosphate) からは説明出来ない。又 Comp. I はその構成成分 Comp. I-ph (lipopolysaccharide) と Comp. I-P (protein) にわけられるが、lipopolysaccharide の活性は Comp. I では全くマスクされて現われない。又 Orig. endotoxin は Comp. II のように全く活性のない物質を含むことにより、活性は安定していると考えられる。

以上のことから、一般に内毒素のような高分子作用物質の活性は、その有効因子の活性と共に、その構成成分の影響を考慮する必要がある。又高分子物質自体の活性は別個に考えられるのが妥当である。

発熱試験に際し、国立予防衛生研究所一般検定部島崎義男、入沢純開両氏の御協力に深謝する。

本論文の一部は昭和34年11月伝研予研集談会（東医新誌, 77 (1), 12, 昭35), 昭和35年5月, 7月伝研予研集談会（東医新誌, 77 (7), 449, 昭35: 77 (9), 509, 昭35), 昭和35年7月第33回日本細菌学会総会（日細誌, 15(10), 1054, 1960), 昭和35年11月第15回日本細菌学会関東支部総会, 第33回日本生化学会総会（生化学,

32(9), 659, 1960) で発表した。

文 献

- 1) 本間遜, 浜村憲克, 直井万里子, 江上不二夫: Recherches chimiques sur l'endotoxine de *Pseudomonas aeruginosa* II Cull. Soc. chim. biol., 40, 647-664, 1958.
- 2) 本間遜, 鈴木奈智子, 伊藤ふみ子: グラム陰性桿菌表面構造とその生物活性物質, I. 緑膿菌表面構造について, 日本細菌学雑誌, 16, 579, 1961.
- 3) 生物学的製剤基準: 厚生省, 122-123, 昭34年.
- 4) 鈴木奈智子, 本間遜: グラム陰性桿菌表面構造とその生物活性物質, III. pyocine L について, 日本細菌学雑誌, 投稿予定, 1961.