チフス菌菌体内毒素の研究(第一報)

細谷株抗原に関する研究

渡 辺 貞

東京大学傳染病研究所第3研究部(部長 武田徳晴教授)

[受付: 2月8日, 1952年]

緒 言

従来我々の研究室に於ては、グラム陰性の Colon-typhoid-salmonella-dysentery Group の菌体内毒素の研究を行い、チフス菌についても既に武田、太田、佐藤¹⁾の報告があり、其の他武田、太田、詹²⁾は志賀赤痢菌について、又最近河西³⁾は大腸菌について、栗塚⁴⁾はパラチフスB菌について何れも化学的性状に重点を置いて報告している。上述の武田等のチフス菌に関する報告は酸加水分解、トリプシン消化、又フォルムアמידによる処理実験に関しても述べられているが、使用した菌株は新鮮分離菌のみであつて特に菌型との関係については調べてない。又河西³⁾、栗塚⁴⁾の成績、又花新発⁵⁾の大野赤痢菌に関する成績から、これらの菌の毒素は何れも類似した化学的構成を有し、多糖体を主としてこれにリポイド、蛋白及び未知の毒性因子の結合した一種の複雑な複合多糖体であるとみなされるので、毒素の化学的本態についての解釈は Goebel 等⁶⁾の Flexner 菌についての成績と一致している。チフス菌の菌体成分に関する研究としては、以上の他本邦に於ては黒屋研究室の小泉⁷⁾、細谷教授等⁸⁾の業績があり、又芦田⁹⁾は Vi 抗原に関して興味深い報告をしている。又欧米に於ても Freemann 等¹⁰⁾は Ty₂ 株抗原の酸加水分解及びその生成物に関して詳細に報告し、Boivin¹¹⁾、Topley¹²⁾、Henderson¹³⁾等

は O 及び Vi 抗原特にそれらの毒素を用いて行つた感染防禦実験についてのべ両者の間に著明な差異がみとめられないと報じているが、Freemann 等¹⁰⁾の成績は Ty₂ なる一菌株のみにあつての報告であり、且つ V 相菌の酸加水分解実験については前述の他の研究者¹¹⁻¹³⁾等が不成功であつた成績と相反した結果になつてゐる。私は以上の諸家の研究成績を考慮して菌型と抗原物質の化学的性状との関係に特に留意して研究を進めることにした。即ち細谷、58、O 901、6 S' の 4 株の抗原毒素を分離精製し、化学的処置を加え、それらの抗原毒素及び分解生成物の生物学的及び化学的性状を比較検討した。これら菌

株のうち、細谷、58 の 2 株は傳研ワクチン室保存の菌株で、あとに述べる様に前者は VW 相、後者は V 相の菌株である。また O 901 及び 6 S 菌株は傳研第 5 研究部の保存株で前者は典型的な W 相菌であり、後者は所謂 Rauch Vi 菌で O 抗原を欠き Vi 抗原のみを有する菌株である。私は先づ第一報として細谷株についての実験成績を報告したい。

実 験

(I) 抗原毒素の分離精製

先づ使用した細谷株の (O+Vi) 血清、O 血清及び Vi 血清 (S. ballerup 免疫血清) に対する凝集反應をみると、(O+Vi) 血清及び O 血清に対して共に、一万倍血清稀釈で凝集がみとめられ、Vi 血清に対しても 1000 倍まで反應陽性である。これから細谷株は VW 相菌であるとみなしてよいと思う。菌体材料の採取は次の如くである。24 時間培養の 2 乃至 3 cc を金属性バットに入れた普通寒天に移植し 37°C に一日培養し、その菌体を大渦巻白金耳で集めトルオールを重層し、濃厚な菌浮游液にしガーゼ濾過後氷室に保存して適時抽出操作に移つた。

抗原毒素の抽出は、武田教授の行つてゐる 0.3% 醋酸水による抽出法¹⁴⁻¹⁵⁾を用いた。本菌株については抗原分離を二度略々同様の方法で行い二種類の分割を得た。これ等をそれぞれ Fr. 1 及び Fr. 7 とする。一例として Fr. 7 の場合についてのべる。

370 g の濕菌を 1.6 l の水で濃厚な菌浮游液として数枚のガーゼで濾過した後 60°C で 1.5 時間加熱し一夜氷室に保存し、翌日 0.3% の割合に氷醋酸を添加し約 8 時間振盪機にかける。遠心して菌体を分離し、これは更に 700 cc の水に浮游し醋酸を加え抽出操作を反復する。黄綠色螢光性の上清は第一回及び第二回抽出分を合併し、

WATANABE, Tadashi: Studies on the endotoxin of *S. typhosa*. 1. Studies on the somatic antigen of Hosoya strain. (The 2rd Division, The Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo, Jsp. J. of Bact., 7(5): 485-490, 1952.

第1表 抗原毒素の分離精製

第2表 Fr 1 及び Fr 7 の性状

a) 分析値

Fr No.	N %	P %	還元糖%	[α] _D
1	1.60	1.37	28	+26°
7	3.30	1.68	25	

b) 毒性

Fr	Fr 1	Fr 7
注射量		
0.5 mg	3 D/3	
0.2	3 D/3	3 D/3
0.1	2 D/3	3 D/3
0.05	0 D/3	0 D/3

c) 沈降反応

抗原	抗血清	抗原稀釋				
		10 ⁴	10 ⁵	2・10 ⁵	5・10 ⁵	10 ⁶
Fr 1	O+vi	++	++	++	+	—
	O	++	+	+	—	—
	Vi	±	—	—	—	—
Fr 7	O+vi	++	++	++	+	+
	O	++	+	+	±	—
	Vi	+	—	—	—	—

ドラバール遠心器を通し更に除菌用ザイツ濾紙を通して菌体を除去し、牛腸膜に入れてトルオールを重層の上流水に対して3日間透析し大部分の色素が除去された後、40°C 乃至 45°C の温浴中で約 150 cc に減圧濃縮する。これを氷冷し半容量の冷アセトンを加え一夜氷室に放置後生じた比較的小量の沈澱を遠心分離して、これを 100 cc の蒸留水に溶かし、再び 50 cc の冷アセトンを加え、微量の沈澱を除去後、150 cc のアセトンを加えて抗原物質を沈澱させる。これを少量の蒸留水に溶解し、蒸留水中で透析後、凍結乾燥して 1.6 g の Fr. 7 を得た。なお Fr. 1 も同じ細谷菌株から略々同様の操作により分離精製した分割である。

(II) 抗原毒素の性状。

各毒素は何れも水に溶けて膠質状溶液をつくり、泡沫形成が著明である。主要な性状は第2表に示す如くで、Molish 反応は 0.1% 溶液に於ても著明であるが、Biuret 反応は弱陽性であつた。化学分析値については、窒素は Micro-Kjeldahl 法、磷は Allen¹⁴⁾ 法、還元糖測定は Somogyi¹⁵⁾ 法によつて行つた。先づ窒素では、Fr. 1 は

第3表 Fr 7 の酸加熱分解

1.6%で少いが、之に比して Fr. 7は3.3%で多少多い。Fr. 1のPは1.37%, Fr. 7のPは1.08%であり、水溶液は右旋性である。2N硫酸で3時間煮沸重湯蓋中で加水分解後の測定で、葡萄糖として Fr. 1は28%, Fr. 7は25%の還元糖値を示した。又0.5%溶液1ccに0.5ccの試薬を加えて沈澱反応を行つたが、何れも三塩化醋酸(10%), 塩化亜鉛(10%), 硫酸銅(20%)によつて沈澱せず、Fr. 1はVi抗原の沈澱剤^{10, 12, 13 b)}である醋酸ウラニウム(10%), 燐タングステン酸(5%)によつて濁濁を生じたが沈澱は確認できなかった。Fr. 7はこの二つのVi沈澱剤によつて何れも沈澱を生じた。尙おFr. 1の紫外線吸収スペクトルをN/100苛性ソーダの0.05%溶液についてみたが、2600 Å 附近の最大吸収は明瞭でなかつた。之に関連して0.5%溶液についてDischeのDiphenylamine反応¹⁷⁾, Feulgen¹⁸⁾, Murexide等の核酸反応も行つたが何れも明瞭な陽性反応はみとめられなかつた。

次に生物学的性状について述べる。毒性は体重12g乃至15gのマウスの尾静脈に抗原溶液を注射し、2日間の生死によつて判定した。その結果、Fr. 1の最小致死量は0.2mg., Fr. 7は0.1mgであつて後者の方が強い。Shwartzman 反応準備能力を有することも既に屢々大腸菌等について¹⁹⁾報告された通りで、25rの皮内準備注射で大腸菌のブイヨン培養濾液の比較的小量を惹起注射として用いた場合尙お充分に典型的な壊死反応をおこす。沈降反応は通常の方法によつて行つた。用いた(O+Vi)血清, O血清, Vi血清は夫々58株, O901株及びS. ballerupの生菌家兔免疫血清である。Fr. 1は

(O+Vi)血清に対して50万倍, Fr. 7は100万倍稀釈で陽性反応をみとめる。又O血清に対しては共に20万倍であるが、Vi血清に対してはFr. 1は1万倍でも明瞭な反応をみとめられなかつたが、Fr. 7は陽性であつた。但しFr. 1も1000倍では明瞭な沈降輪をみとめた。生体内抗原性は各物質の20, 60, 200及び400rを5日乃至7日間隔で家兔の静脈内に注射し、最後の注射から1週間後に採血してその血清の58, O901, S. ballerupの各菌に対する凝集反応をみた。Fr. 1の1例についていうと、その凝集素価は夫々6400, 3200, 及び3200乃至1600倍であつた。

(III) 抗毒素の分解実験。

(A) 醋酸及びピクリン酸による加水分解。

先づ一例として先に分離法を記した細谷株抗原 Fr. 7について述べたい。

500mgのFr. 7を30ccの0.2N醋酸に溶解し煮沸重湯蓋中で還流冷却器を附し、約3時間加熱するに酸不溶性分劃が析出する。更に約2時間加熱を続けてのち遠心して上清と沈澱を分離する。沈澱部は約10ccの微弱アルカリ性の水にとかし、不溶部を遠心除去後少量の10%塩酸で再沈澱する。この操作を数回反復して精製し最後に蒸留水に浮遊してセロファン膜に入れ蒸留水中で透析し凍結乾燥して使用した原毒素の8%に相当する40mgのFr. 7aを得た。上清は液体抽出器によりエーテル可溶性リポイド Fr. 7cを抽出除去後、クロロホルム, アミルアルコール混液による除蛋白法を施し、蒸留水中で透析し凍結乾燥して200mgのFr. 7bを得た。これは原毒素の40%に相当する。

同様にFr. 1の酸加熱分解を行つたが、この場合はGoebel⁶⁾の用いたピクリン酸で行つた。即ちFr. 1の500mgを30ccの飽和ピクリン酸溶液にとかし、重湯蓋中で加熱した。大部分の沈澱は約1時間後に生じたが更に半時間加熱後遠心し、上述のFr. 7の場合と同様な方法で酸不溶性蛋白分劃 Fr. 1a, 55mg(原毒素の11%), その上清部から2倍量のアセトン沈澱により多糖体分劃 Fr. 1b, 110mg(原毒素の22%)及びリポイド Fr. 1cを得た。

以上により酸加熱分解によりFr. 1. 及びFr. 7の両者共その構成成分である蛋白性分劃, 多糖体分劃及びリポイドの3成分に分解できた。

(B) アルカリ分解。

先づ細谷株抗原 Fr. 1についてアルカリ性アルコール処置⁴⁾を行つた。500mgのFr. 1を50ccの水に溶解し冷却後3ccの20%苛性カリを加え直ちに100ccの冷

第4表 Fr 1 のアルカリアルコール分解

メタノールを追加し、30 分後遠心して上清と沈澱とを分ける。沈澱は同様の処置を二度反復しその際の上清は前者と合併する。かくして最後の沈澱部は水に溶解し、蒸溜水中で透析後等量のアセトンを加えて沈澱させ乾燥して 250 mg (使用原毒素の 50 %) の多糖体性分割 Fr. 1d を得た。上清は中和濃縮しエーテル可溶性のリポイド分割 Fr. 1f を分離し水層部は醋酸酸性にして蛋白分割を沈澱させる。これを酸分解の時と同様に稀アルカリに溶解し酸によつて再沈澱させる操作を反復して精製し、アセトン洗滌後乾燥して 90 mg (18 %) の蛋白性分割 Fr. 1e を得た。即ちアルカリアルコール処置に対してもこの細谷株抗原 Fr. 1 は大腸菌³⁾、パラチフス B 菌⁴⁾、大野赤痢菌⁵⁾ 等の場合と同様な結果を示すことが分る。之に反して同じ細谷株から分離した毒素でも Fr. 7 の場合はこれと異つた結果になつた。即ち Fr. 7 の 500 mg を 30 cc の水に溶解し 1.8 cc の 20 % 苛性ソーダを加え、次いで 60 cc の冷エタノールを加え 0°C で 30 分間作用させて後沈澱と上清を分け、更に二度同様の処置を反復

し、最後の沈澱からは前述の如くして Fr. 7(d) の 270 mg を得たが、合併した上清を中和後濃縮し、醋酸で酸性にしても、又塩酸により更に強い酸性にしても沈澱を生じない。この溶液は Biuret 反應は陽性であるが、アルコール或はアセトン(約 5 倍量)によつても又三塩化醋酸或は塩化亜鉛等の蛋白沈澱剤によつても沈澱を生じなかつた。そこでこの上清部は透析後凍結乾燥して 70 mg の Fr. 7(e) を得た。

(IV) 酸及びアルカリ分解産物の性状。

Fr. 1 の分解産物の分析値を第 5 表に示す。先づ酸加熱分解の際の酸不溶性分割 Fr. 1a は窒素 3.6 %, 磷 1.9 %, 還元糖は 8 % であつてマウスに対する致死量は 0.5 乃至 1.0 mg であつた。沈降反應は一萬倍迄みとめられた。上清部から得られた Fr. 1b は窒素含量は少く 1.3 % であるが還元糖量が 45 % の多糖体分割で毒性を有しない。沈降反應は先の蛋白部分よりも著明であつて 5 万倍でもみとめられた。

第5表 Fr 1 の酸及びアルカリアルコール分解産物の性状

分解操作	酸 加 熱		アルカリアルコール處置	
Fr No.	Fr 1a	Fr 1b	Fr 1d	Fr 1e
N %	3.60	1.30	0.38	3.42
P %	1.9	1.9	/	0.9
還元糖 %	8	45	60	2
毒性 mg	0.5~1.0	>5	0.1~0.2	>5
沈降反應	10 ⁴	5.10 ⁴	2.5・10 ⁵	10 ⁴

次に Fr. 1 をアルカリアルコールで処理して得られた分割についてのべると、Fr. 1d は窒素含量は 0.38 % で低いが還元糖値は 60 % であつてマウスに対する致死量が 0.2 乃至 0.1 mg の有毒性多糖体分割である。Fr. 1e は窒素 3.42 %, 磷 0.9 %, 還元糖は 2 % で毒性はない。

Fr. 7 については、酸分解産物 Fr. 7a はマウス最小致死量 2 mg で Fr. 1a に比して弱いが有毒性の蛋白分割であり、Fr. 7b は毒性を有しない多糖体分割である。所が前述したように、この Fr. 7 はアルカリアルコール処置によつてその際の上清部から酸沈澱性の分割を得ることができなかつたのであるが、凍結乾燥して得られた Fr. 7(e) には著明な毒性がみられなかつた。即ち 5 mg を腹腔内に注射してもマウスは異常を示さなかつた。又沈澱部 Fr. 7(d) にも著明な毒性はみられなかつたのでこの場合有毒性の分解産物は得られなかつたことになる。尙お Fr. 7 の酸分解産物については夫々 O 及び Vi

血清に対する沈降反應をみたが、その何れに於ても Vi 血清との反應はみとめられなかつた。抗 58 或は抗 O 901 血清に対しては何れも多糖体性の Fr. 7b がよく反應し 100 万倍或は 50 万倍で陽性であつたが、蛋白分割 Fr. 7a は 20 万倍或は 1 万倍に於て初めて明瞭な反應がみられた。

総括及び考察

特に菌型との関連に注目してチフス菌菌体内毒素の研究を行い、先づ凝集反應からみて VW 相菌であるとみなされる細谷株から稀醋酸抽出法を用いて抗原毒素を分離精製した。略々同様の再度の分離操作により Fr. 1 及び Fr. 7 を得たが、Vi 血清に対する沈降反應では、Fr. 1 は 1 万倍では陽性反應はみとめられなかつたが、Fr. 7 は陽性であり、又 Vi 沈澱剤¹⁰⁾である醋酸ウラニウム、醋酸鉛に対しても Fr. 1 は濁濁を生ずるのみで沈澱に迄は至らなかつたが、Fr. 7 は明瞭に沈澱を生じた。これらの事實は、Fr. 1 の方が Fr. 7 よりも Vi 含有量が少いのではないかと思わせる。

次にこれらの毒素の酸分解及びアルカリ分解実験を行った。即ち Fr. 1 は 0.2N の醋酸により、又 Fr. 7 は飽和ピクリン酸中で加熱し分解産物として夫々リポイドの他に、有毒性蛋白分割 Fr. 1a, Fr. 7a 及び無毒の多糖体性分割 Fr. 1b, Fr. 7b を得た。これらの分解成績は従来当教室から報告された大腸菌³⁾、パラチフス B 菌⁴⁾、赤痢菌⁵⁾等の場合の成績と一致し、チフス菌抗原毒素も lipo-carbohydrate-protein complex⁹⁾と考えられる。

ここに注目すべきことは、アルカリアルコール分解を行った際、Fr. 7 においては沈澱部からの多糖体分割は Fr. 1 の場合と略々同様の量を得ることができたが、上清から酸沈澱により蛋白分割を得ることが出来なかつた点である。併し酸分解から得られた結果からすると、Fr. 7 も多糖体、蛋白、脂質の結合体と考えられるのであつて、しかも蛋白分割の収量は Fr. 1 と略々同程度である。そうしてみると、アルカリアルコール処置においてのみこうした差異があらわれるのは如何なる理由によるのであろうか。その一つとして考えられることは、前述したように、Fr. 1 と Fr. 7 との間の Vi 含有量の相違ということであつて、これは両分割 Fr. 1 及び Fr. 7 の Vi 血清に対する沈降反應或は Vi 沈澱剤に対する態度等から推察される。Vi 含有量の少いと考えられる Fr. 1 は通常の Vi を含まない O 抗原のように容易に分解されるが、Vi をより多く含有するとみられる Fr. 7 は分解方式を異にしているものと考えられる。

Vi を含有する毒素がこのように分解され難いという

点については、その典型的な例として第 2 報に 58 株抗原の場合の実験を報告する。この点については同報告において詳論したいが要するに O 抗原と Vi 抗原相互の量的関係及びその結合状態によつておこる差違と考えられる。しかし本例の様に、同一菌株を用い且つ略々同様の操作によつて分離した場合でもかかる差違がみられるということとは僅かの培養条件の差等によつてもこの抗原の本質にかなり影響を與えることがわかるのでこの点興味ある所見と考える。

結 論

1) VW 相の細谷株から二回にわたり抗原毒素を分離精製した。本抗原は高度の稀釈で免疫血清と沈降反應を呈し、生体内抗原性を有し O 及び Vi 抗原の性状を有する完全抗原であつて又強い毒性を有する菌体内毒素である。

2) 本抗原毒素は酸加熱分解の成績から lipo-carbohydrate-protein complex と考えられる。

3) 本抗原毒素について各々アルカリアルコール分解処置を行うと一方の抗原毒素からは、有毒性多糖体、無毒性蛋白分割及びリポイドの 3 成分を容易に分離することができたが、他の毒素については分解が同様に行われない。両者について Vi 抗原の性状を比較してみると差違がみられるのでこの分解方式の相違は要するに Vi 含有量及びその O 抗原部分との結合の仕方と密接な関係があると考えられる。

終りに終始御指導御鞭撻を賜つた武田教授及び種々御援助下さつた教室員諸兄姉傳研培養基室第七研究部の方々に深く感謝する。尙お本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) 武田, 太田, 佐藤: J. Bioch., 36, 407, 1944.
- 2) 武田, 太田, 詹: J. Bioch., 36, 415, 1944.
- 3) 河西: 日本細菌學雜誌, 5, 385 及び 437, 1950.
- 4) 栗塚: 日本細菌學雜誌, 6, 99 及び 105, 1951.
- 5) 花新発: 日本細菌學雜誌, 5, 449, 1950.
- 6) Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E.: J. exp. Med., 315, and 331, 1945.
- 7) 小泉: 東北医学雜誌, 30, 3, 1942.
- 8) 細谷, 川島: 実験医学雜誌, 20, 913, 1936.
- 9) 芦田: Japan. J. exp. Med., 20, 181, 1949.
- 10) Freemann, G. G. and Anderson, T. H.: Bioch. J., 35, 564, 1941.
- 11) Boivin, A.: Compt. Rend. Soc. Biol. Med., 130, 403, 1939. Boivin, A. et Mesrobianu, L.: Ibid., 130, 683, 1939.
- 12) Raistrick, H. and Topley, W. W. C.: Lancet, 1937, 1, 252.

- 13) a. Henderson, D. W. : Brit. J. Exp. Path., 20, 11, 1939. b. Henderson, D. W. and Morgan, W. T. J. : Ibid., 19, 82, 1938.
- 14) Allen, R. J. L. : Bioch. J., 34, 858, 1940.
- 15) Shaffer, P. A. and Somagyi, M. : J. Biol. Chem., 100, 695, 1933.
- 16) Boivin, A. et Mesrobianu, L. : Compt. rend. Soc. Biol. Med., 128, 5, 1938.
- 17) Dische, Z. : Microchemie, 8, 4, 1930.
- 18) Feulgen, R. and Rosenbeck, H. : Hoppe-Seyler Zshr. f. physiol. Chem., 135, 203, 1924.
- 19) 山下 : 新潟医学会誌, 62, 64, 1948, 63, 6, 1949. 日本細菌学雑誌, 4, 61 及び 65, 1949.
(本研究の大要は昭和 26 年 6 月日本細菌学会関東支部総会に於て発表した。)