*Pseudomonas aeruginosa*の溶原菌 (lysogenic bacteria) の產生するファージの研究

特に lysogenization による菌体内毒素抗原の血清学的特異性の変化について *

本 間 遜** 捧 箸 孝**

YUZURU HONMA, KO SAGEHASHI : STUDIES ON THE LYSOGENIC BACTERIA OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.
LYSOGENIZATION AND ITS EFFECT ON THE SEROLOGICAL SPECIFICITY OF THE ENDOTOXIN.

[受稿：7月22日，1954]

緒 言

溶原菌の菌体内で phage がどういふ“かたち”で存在するかということについては Lwoff の所説を始めとしていろいろの推測が行われている^{1,2)}。

しかし細菌が virulent 或は temperate phage の感染に際して、host controlled variation (或は host range mutation) とよばれている現象はあるにしても host に対しては常に constant の性状をもつた phage が產生されることは事實である。又細菌体内に侵入するものは主として phage の DNA であろうということも Hershey の実験によつて示され、略承認されている³⁾。

そこで私共は細菌体内に於てこの侵入した phage の genetic materials と菌体内物質との interaction を知るために、先づ lysogenization によつて果して菌体内抗原に血清学的変化がくるものかどうかを検討してみた。

実験材料及び方法

1. 溶原菌 (lysogenic strain) の分離方法

用いた菌株はすべて単個菌培養から出発した。溶原菌 A (α) の產生する phage α を高濃度に加えた普通ブイヨンにその感性菌である E (β)*** を少量接種し、30°C に一夜おき普通寒天平板に塗布すると図2に示すような特長ある集落に変る。(図1は E (β) の正常の集落)。この集落を20個ひろつて溶原性をしらべてみ

図1 *Pseudomonas aeruginosa* の E(β) 株の寒天平板上の集落。

図2 A(α)の產生するファージ α の溶原株となつた E(α, β) の寒天平板上の集落。

* 本研究は1954年6月18日細菌学会関東支部会で発表された。 ** 東大傳研一研 (部長：細谷省吾)

*** E(β) は phage β を產生する溶原菌。

ると何れも phage α 及び β を産生することがわかった。又この1つの集落をとり単個菌培養によつて12の菌株を分離しその溶原性をしらべてみたが何れも phage α 及び β を産生することを証明した。この phage α 及び β を産生する溶原株を EV (α_1, β) とした。EV (α_1, β) の集落は継代してゆく場合図1の形態にもどるものもあるが phage α 及び β 産生能には変りない。表1に示す system I はこのようにしてつくられたものである。

同様に A(α) 菌株の phage α の感染菌である R 株につき同様の分離方法によつて α の溶原菌株 RV (α_2) を分離した。この際も分離したすべての菌株について溶原性を証明した。これにより表1に示す system II をつくつた。ここに α_1, α_2 と記したのはこ

表 1

れが phage α の host controlled variants であろうと考えられるからであるが詳細は今後の研究にゆづる。以上を要約すると2つの systems の菌株は下記の如くなる。(I) A(α) $\rightarrow$ E(β) $\rightarrow$ EV (α_1, β)

(II) A(α) $\rightarrow$ R $\rightarrow$ RV (α_2)

2. 沈降反応の抗原の作製

沈降反応に用いた抗原の作製は細谷, 江上, その他の共同研究者と共に研究した *Pseudomonas aeruginosa*

の内毒素の分離精製法によつた。使用菌株は上記2つの Systems の菌株 A(α), E(β), R, EV (α_1, β), RV (α_2) の各々についてである。表2に示す様にグルタミ

表 2

ン酸ソーダ2%, グルコース 0.5%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.4%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.01% の合成培地に30時間振盪培養を行う。其際phage は 10⁸/ml の割合で産生される。ついでトルエンを重層し37°C に40時間静置し, 自家融解をおこさせる。温度4°C の氷室中で濾紙で濾過し, シャープレス超遠心機で 30,000r.p.m. で101を1時間乃至1時間半で遠心分離する。透明な濾液に50%塩化亜鉛を滴加し生ずる沈澱を集めてなるべく少量の第2磷酸ソーダ溶液を加えて磷酸亜鉛の沈澱を除くと毒素溶液は約20分の1に濃縮される。こゝで更にスピンス超遠心機で 20,000 r.p.m. 30分遠心して phage 及び菌体残渣を除去する。透明な上清にアセト

ンを加え、生ずる沈澱を少量の蒸留水にとかし電気透析を行う。電流 3mA 以下になるに及んで中止し内液を中和、アセトン分別を行うと（温度 3°C、醋酸ソーダ 0.5%）56~59% の狭い範囲で沈降する。これを 3 乃至 5 回反覆し、再び電気透析を行い、1 mA 以下で中止、内液中和後、凍結乾燥し 10 l から 800~1000 mg の毒素がえられる。この毒素は pH6~9 の範囲で電気泳動的に均一である。（図 3）又 Agar diffusion method によつても均一である。（図 4）これを「消化前内毒素」とし後述する「消化後内毒素」と区別した。化学的には蛋白色彩反応陽性。Dische の diphenylamine 反応、Bial の orcin-HCl 反応陽性。N 9.5

図 3 消化前内毒素の電気泳動圖

Phosphate buffer pH7.7

$\mu=0.2$ 10°C

図 4

%, P 2.9%. 核酸に対する上記呈色反応の結果から全磷の約半量近くは核酸によると考えられるが、残部については未だ明かでない。加水分解後、ペーパークロマトグラフィーにより、リボース、デゾキシリボース、ラムノース、アラビノース、グルコースを認める。更に核酸の存在はアルカリ加熱後、Sevag のクロロフォルムゲル法による核酸部分の分離 (N8.77%, P 6.07%) とその吸収スペクトル (260 m μ) によつて確めた。従つてこの内毒素は蛋白、多糖体、核酸の 3 つの結合からなつていふと考えられる。

この精製内毒素（消化前内毒素）に表 3 に示す条件でペプシンを作用させ精製すると消化によつて大部分の内毒素は 56~59% のアセトン分劃中にえられ、(Fr. I) 其他に少量ではあるが高濃度のアセトンで沈降する抗原物質の別の分劃を新たに生ずる。(Fr. II) Fr. I (消化後内毒素) は電気泳動的に均一であり化学分析値は N8%, P2.5%, Bial 反応陽性、であるが Dische の反応は陰性でペーパークロマトグラフィーの結果からもデゾキシリボースの存在は証明されないがグルコース、ラムノース、アラビノース、リボースは証明される。これに対して Fr. II は量が少いため化学的に十分明かにされないが Dische の diphenylamine 反応陽性であり、DNA-P として 0.5% 含んでいる。沈降反応は 8000 倍抗原稀釈まで陽性であり、Fr. I が 25 万倍抗原稀釈まで陽性であるのと著しい相違がある。

以上を要約すると「消化前内毒素」は蛋白、多糖体、核酸（デゾキシリボ核酸を含む）の 3 つの結合したものととして分離されたがペプシン消化によつてデゾキシ

表 3

図 5

リボ核酸は除かれたわけである。(図5) この様にして A(α) 株から「消化前内毒素」(a前と略称)及び「消化後内毒素」(a後と略称)をつくつた。又 E(β) 株

より同様にして e 前, R(α₂)株より γ 前; EV(α₁β) 株より ev前, ev後 RV(α₂)株より rv前, rv後を分離精製して使用した。

沈降反応は抗原稀釈による重層法によつた。

3. 抗血清の作製

沈降反応に用いた抗血清。

2.5~3.0kgの家兎の大腿皮下に内毒素 7 mg を約1ヶ月注射し最終注射後2週間目に全血した。他の1群には 10mg を50日間皮下に注射し、最終注射後10日目に全血した。

これらの内毒素抗血清は Dean & Webb 法により抗原抗体沈降最適比を求めた結果その 1ml は抗体量の最も多いもので内毒素抗原と 2mg と等量で、最も少ないもので 0.25mg と等量であつた。

凝集反応に用いた血清。

2.5~3.0kg の家兎の大腿皮下注射50日間にわたり最初は加熱死菌、後に生菌を合計 20 mg 注射し最終注射後10日目に全血した。

実 験

1 lysogenization による凝集素抗原の変化

(I) A(α)→E(β)→EV(α₁β), (II) A(α)→R→RV(α₂) の2つの systems の菌の凝集反応にあづかる抗原の変化をしらべてみた。表4は各菌株の免疫血清と各菌の生菌浮游液を凝集原とした場合の凝集反応の成績である。これによると System (I) については A(α) とその感性菌 E(β) との凝集素抗原の1部を共有していたが、phage α の lysogenization によつてえられた EV(α₁, β)株は A(α) と共通抗原をもたな

表 4

抗 血 情	凝集原(生菌)	血 清 稀 釈								対 照 (生 理) (食 塩 水)
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
A 菌	A	卅	卅	卅	卅	十	十	—		—
	E	十	—	—	—	—	—	—		—
	EV	卅	—	—	—	—	—	—		—
	R	士	—	—	—	—	—	—		—
	RV	—	—	—	—	—	—	—		—
E 菌	A	卅	卅	卅	十	士	—	—		—
	E	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅		—
	EV	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅		—
	R	卅	卅	卅	士	—	—	—		—
	RV	卅	卅	十	士	—	—	—		—

E V 菌	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	EV	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	R	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	RV	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
R 菌	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	十	—	—	—	—	—	—	—	—
	EV	十	十	—	—	—	—	—	—	—
	R	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	RV	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
R V 菌	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	十	十	—	—	—	—	—	—	—
	EV	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
	R	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
	RV	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—

表 5

抗血清	吸収原 (生菌体)	凝集原 (生菌体)	血 清 稀 釈								対 照 (0.85 % 食塩水)
			40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
E	EV	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		EV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		RV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EV	E	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		EV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		RV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R	RV	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		EV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		RV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RV	R	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		E	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		EV	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		RV	—	—	—	—	—	—	—	—	—

い。又表5に示すように E (β) と EV ($\alpha_1\beta$) とは凝集素吸収試験によつて少くとも凝集反応によつて抗原特異性の変化は認められない。

System (II) については表4に示すごとく A (α) と R は凝集素抗原を共有せず phage α の lysogenization によつてえられた RV (α_2) と A (α) も凝集素抗原を

共有しない。又表5によつてRとRV(α_2)間の凝集素吸収試験によつてRとRV(α_2)との間に凝集反応にあづかる抗原特異性に変化は見出せない。表6は「消化前内毒素」と「消化後内毒素」抗原の抗血清と各生菌株との凝集反応であるが、この結果からも特に顕著な差を見出せない。以上要約すれば、lysogenizationによる特異性抗原の変化を凝集反応によつて検討した結果、A(α)とE(β)とは共通抗原をもつていたが、A(α)とEV(α_1, β)とは共通抗原をもたなくなつた

こと以外に顕著な変化は見出せなかつた。

2. 凝集反応にあづかる抗原と沈降反応に分離した内毒素抗原の抗原特異性の比較

内毒素抗原がその原菌株の凝集素抗原でもあることは表6によつて明かであるが、その原菌株のもつ凝集素抗原のすべてを代表しているものであるかどうか、又内毒素抗原の家兎抗血清は原菌株の凝集反応にあづかる抗体以外の抗体を含むものであるかどうか。以上2つを検討してみることは抗原特異性の変化を追究す

表 6

抗 血 清	凝 集 原 (生 菌)	血 情 稀 釈								対 照 (0.85 % 食塩水)
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
a 前	A	卅	卅	卅	—	—				—
	E	卅	卅	—	—	—				—
	EV	卅	卅	—	—	—				—
	R	—	—	—	—	—				—
	RV	—	—	—	—	—				—
a 後	A	卅	卅	十	—	—				—
	E	卅	—	—	—	—				—
	EV	卅	—	—	—	—				—
	R	—	—	—	—	—				—
	RV	—	—	—	—	—				—
e v 前	A	—	—	—	—	—				—
	E	卅	卅	卅	卅	十				—
	EV	卅	卅	卅	卅	十				—
	R	—	—	—	—	—				—
	RV	—	—	—	—	—				—
e v 後	A	—	—	—	—	—				—
	E	卅	卅	卅	卅	十				—
	EV	卅	卅	卅	卅	卅				—
	R	—	—	—	—	—				—
	RV	—	—	—	—	—				—
r v 前	A	十	—	—	—	—				—
	E	—	—	—	—	—				—
	EV	卅	十	十	—	—				—
	R	卅	卅	卅	—	—				—
	RV	卅	卅	卅	—	—				—
r v 後	A	卅	—	—	—	—				—
	E	—	—	—	—	—				—
	EV	十	十	—	—	—				—
	R	卅	卅	卅	十	—				—
	RV	卅	卅	卅	十	—				—

表 7 凝集反応と沈降反応凝集反応 沈降反応 (重層法)

番 号	抗 血 清	吸 收 抗 原	沈 降 原	抗 原 稀 釈											対 照
				500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000	
1	EV 菌	—	ev前	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
2		—	ev後	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
3		ev前	ev前	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4		ev後	ev後	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表 8 凝 集 反 応

番号	抗血清	吸収抗原	凝集原	抗原稀釈											対照
				20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240		
1	EV 菌	—	EV 生菌	+	+	+	+	+	+	+	+	±			—
2		ev前		+	+	+	+	+	+	+	±	—	—		—
3		ev後		+	+	+	+	+	+	+	±	—	—		—

る上に必要である。

先づ前者の場合の解答は簡単であつて、表 7 に示す如く、EV 菌で免疫した家兎抗血清は、EV 菌からえられた「消化前内毒素」ev 前及び「消化後内毒素」ev 後と夫々抗原稀釈で 64,000 倍まで沈降反応を示すが、菌体免疫血清を上記の夫々の内毒素で吸収した後は 500 倍抗原稀釈でも反応を示さない。この様な内毒素で吸収した後の抗血清は表 8 に示す通り凝集反応により EV 生菌を 1280 倍の血清稀釈まで凝集している。つまり内毒素抗原は菌体のもつ凝集素抗原の 1 部を共有しているにすぎない。又後に示す様に内毒素抗原だけに關しても消化前内毒素と消化後内毒素とは吸収試験により抗原特異性は同一でない。

次に第 2 の内毒素抗血清がその原菌株の凝集素以外の抗体を含むかどうかであるが、これは(1)内毒素は原菌株の自家融解液から分離精製されているから凝集素吸収試験の際、菌体で吸収すれば生菌浮游液には微量の内毒素を含むから当然内毒素の抗体も吸収されてしまうこと及び(2)原菌株の凝集反応にあづかる抗原だけの分離が不可能であることの 2 つの理由からこの問題を明かにすることは困難である。

そこで表 9 に示したように抗内毒素血清の一定量に菌量を次第に増して加え、37°C に 1 時間おき吸収し、その血清について凝集反応と沈降反応を行つてみた。その結果凝集反応を示さない血清中に猶沈降反応にあ

表 9

試験管番号	抗 ev 前血清	吸収 EV 菌 (mg)	備 考
0	1.5cc	0	37° C 1 時間
1	1.5cc	10	
2	1.5cc	30	
3	1.5cc	50	
4	1.5cc	70	
5	1.5cc	90	
6	1.5cc	110	
7	1.5cc	130	

づかる抗体が残存することを証明した。

以上を要約すると抗菌血清を内毒素抗原で吸収してもすべての凝集素は吸収されない。又内毒素抗血清は恐らく凝集反応にあづかる菌体の「表在性抗原」とは

表 1 2

実験番号	抗血清	吸収抗原	沈降原	抗原稀釈											対照	
				500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000		1024000
1	a ₂ 前	e 前 (0.4 mg/cc)	a 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
			e 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 前	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	a ₂ 前	r 前 (0.4 mg/cc)	a 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
			e 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 前	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	a ₂ 前	a ₂ 後 (0.1 mg/cc)	a 前	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			a 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e 前	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			e v 前	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r v 前	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			r v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	a ₂ 前	a ₂ 後 (0.1 mg/cc) で吸収後 e 前 (0.1 mg/cc) で再吸収	a 前	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			a 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e 前	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 前	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r v 前	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			r v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 1 4

実験番号	抗血清	吸収抗原	沈降原	抗原稀釈											対照		
				500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000		1024000	
1	rv前 (2倍稀釈)		a 前	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			a 後	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			e 前	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 前	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			e v 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
			r v 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
			r v 後	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

2	rv 前	r 前 (2mg/cc)	a 前	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			a 後	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			e 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ev 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ev 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			rv 前	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
			rv 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	ev 前	e 前 (1mg/cc)	a 前	-	-	-	-	-	+	+	±	±	±	±	-	-
			a 後	-	-	±	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-
			e 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ev 前	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
			ev 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			rv 前	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
			rv 後	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

表 1 3

実験 番号	抗 血清	吸 收 抗 原	沈 降 原	抗 原 稀 釈											対 照
				500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000	
1	a ₂ 前	r 前 (0.5 mg/cc)	a 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
			e 前	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ev 前	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			ev 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			r 前	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			rv 前	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			rv 後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	a ₂ 前	a ₂ 後 (0.1 mg/cc)	a 前	+	+	+	+	+	-	-					-
			a 後	-	-	-	-	-	-	-					-
			e 前	+	+	+	+	+	+	+					-
			ev 前	+	+	+	+	-	-	-					-
			ev 後	-	-	-	-	-	-	-					-
			r 前	+	+	+	+	-	-	-					-
			rv 前	+	+	+	+	+	-	-					-
			rv 後	-	-	-	-	-	-	-					-
3	a ₂ 前	a ₂ 後 (0.1 mg/cc) で吸収後 r 前 (0.1 mg/cc) で再吸収	a 前	+	+	+	+	±	-	-					-
			a 後	-	-	-	-	-	-	-					-
			e 前	+	±	-	-	-	-	-					-
			ev 前	+	+	+	+	±	-	-					-
			ev 後	-	-	-	-	-	-	-					-
			r 前	+	-	-	-	-	-	-					-
			rv 前	+	+	+	+	+	-	-					-
			rv 後	-	-	-	-	-	-	-					-

消化前内毒素と交叉反応を示すことがわかった。逆に ev 前の抗血清を e 前で吸収して a 前及び a 後との血清学的関係をしらべてみると表14の paragraph 3 に示す通り明らかに交叉反応を示した。従つて A(α) 菌株の「消化前内毒素」は phage α を共有した溶原菌株 EV(α_1, β) の「消化前内毒素」と phage α の感性菌株 E(β) のもつていない新たな共通抗原をもつに至つたことがわかった。

同様の関係を System II についても検討した。即ち A(α) 菌株がその感性菌株 R と共有しなかつた新たな抗原を RV(α_2) 菌株と共有するに至つたかどうか検討した。表13 paragraph 1 に示すように A(α) 菌株の「消化前内毒素」A₂ 前の抗血清を R 菌株の内毒素 r 前で吸収したものは a 前及び rv 前及び ev 前と沈降反応陽性である。逆に rv 前血清から抗 r 前抗体を吸収したものは rv 前と a 前、a 後と沈降反応陽性である。このことから A(α) 菌株の a 前抗原はその感性菌 R 菌株の r 前抗原と共有している抗原以外に新たな共通抗原を RV(α_2) 菌株の rv 前抗原ともつに至つたことを証明した。

以上のことから phage α を共有することにより A(α) と EV(α_1, β)、及び RV(α_2) とは夫々「消化前内毒素」として分離される核蛋白多糖体複合体部分に血清学的に新たな共通抗原をもつに至ることが明かになつた。

次に第二の問題であるがこの核蛋白多糖体複合体としての構成成分を有する内毒素の如何なる部分に共通抗原を生じたのであろうか。

System I について検討してみると、表12の paragraph 3 に示す様に A(α) 菌株の消化前内毒素 a 前抗血清を消化後内毒素 a₂ 後で吸収したものは a 前、e 前、ev 前と猶沈降反応を示すが、a 後、ev 後とは反応しない。a₂ 前抗原は前述の如く(図4参照)、多糖体、蛋白、核酸(DNAを含む)複合体であるが a₂ 後抗原はペプシン消化によつて DNA を失つている。即ち抗 a₂ 前血清を a₂ 後で吸収した後の抗体は主としてデゾキシリボ核蛋白部分に対する抗体であるから A(α)、E(β)、EV(α_1, β) の内毒素 a₂ 前、e 前、ev 前の共通抗原はデゾキシリボ核蛋白と共に解離する部分にあるということが出来よう。そこで表12 paragraph 4 に示す如く抗 a₂ 前血清を a₂ 後で吸収したものを更に e 前で吸収すると a 前と ev 前抗原とのみ反応することが証明された。即ち A(α) と EV(α_1, β) との間に新

たに生じた共通抗原は A(α) 及び EV(α_1, β) の「消化前内毒素」である a₂ 前及び ev 前のデゾキシリボ核蛋白と共に解離される部分にあることが立証された。

同様の関係を System II について証明した。表13の paragraph 2, 3 がそれで、抗 a₂ 前抗体を a₂ 後で吸収したものは a 前、r 前、rv 前と反応するが、a 後、rv 後、とは反応しない。即ち A(α) の内毒素のペプシン消化によつて失われるデゾキシリボ核蛋白部分に R 菌株及び RV(α_2) 菌株の内毒素に対する共通抗原があることがわかった。そこで抗 a₂ 前抗体を a₂ 後で吸収し更に r 前で吸収すると、なお a 前、rv 前、と反応することがわかった。つまり A(α) 菌の内毒素と phage α を共有する RV(α_2) 菌株の内毒素とはその内毒素のデゾキシリボ核蛋白と共にペプシン消化によつて解離する部分で共通抗原をもつに至つたことが明かになつた。

考 察

抗原の特異性を論ずるに當つてその使用する抗原が単一のものであるかどうかという純度は常に問題にされ且つ、最も重要な問題であると思う。Avery の肺炎双球菌の型変換因子 DNA に対する mirsky⁵ の批判に徹してもこの問題の困難さが痛感される。私共もその意味で抗原の均一性について出来る限りの注意を払つた。沈降反応に用いた内毒抗原は多糖体、蛋白、核酸(DNAを含む)の複合体で均一の物質と考えておりこの DNA は free の phage の混合物でないことについて次の吟味を行つた。

即ち(1)内毒素は pH 6~9 の範囲で電気泳動的に均一であること。(2) agar diffusion method でも均一性が証明された。(3) free の phage は 101 全部で 10⁷ である。これにシャープレス 30,000 r.p.m 1 時間、スピニョ 20,000 r.p.m 30 分の超遠心で殆んど除かれていると考えられるが、かりに全部が 875 mg の内毒素中に含まれるとしてもその量は極めて微量である。(4)この内毒素抗血清は Deen & Webb 法による混合法で 2mg 乃至 0.25mg の内毒素と最適比にあるが、80倍稀釈でも free の phage を全く中和しない。(5)この内毒素はアセトン分別で 56~59%の狭い範囲で沈降し、他の分別では沈降しないが、ペプシン消化後 DNA は失われ別に 76~77%附近に DNA を含む新しい沈降反応性を示す分割が分離された。これは加熱ペプシンではその作用はない。以上の理由から「消化前内毒素」は少く

とも不均一を示す証拠はえられなかつた。又 free の phage DNA と混在していると言う証拠も見出せなかつた。そこでペプシン消化により、蛋白部分の消化によつて DNA を指標とする部分が分離したと考えられる。つまりペプシン「消化後内毒素」は「消化前内毒素」の構成々分の一部である主としてデゾキシリボ核蛋白を指標とする部分を失つたものであり、血清学的にも「消化前内毒素」とは特異性が變つてゐる。

今回の実験で lysogenization により A(α) 菌株とその phage α の lysogenization による溶原菌, EV (α_1, β) 菌株, 或は A(α) 菌株と phage α の lysogenization による溶原菌 RV (α_2) 菌株との内毒素が共通抗原をもつた至ることが明かになつたが、その共通抗原は主として内毒素の構成々分であり、ペプシン消化によつて分離する DNA を指標とする部分にあることがわかつた。これは phage の genetic materials と菌体成分との interaction によつて内毒素として分離される蛋白部分が血清学的に modify されたと考えられる。又一方 A(α) はその phage α の感性菌 R とは凝集反応では共通抗原が認められないが、内毒素抗原では明かに共通抗原をもっている。しかもこれは消化前内毒素 a 前とはもっているが、a 後とはもっていない。

A(α) と E(β) の内毒素の共通抗原も同様の部分に認められる。この理由は明かでないが内毒素抗原の共通抗原の存在する場所が一定していることは興味深い。

次に内毒素の DNA が菌体内にある phage, 例えば Lwoff のいう prophage に由来するものかどうかについては今のところ、それを立証する実験データはない。唯内毒素に含まれる DNA-P が 0.5~0.7% であるから全部が phage 由来のものとすれば少くとも Lwoff の言うような prophage の概念とは量的に違ふようである。私共は今後この点を明かにすべく実験を進める積りである。

総 括

1. *Pseudomonas aeruginosa* の溶原菌 A(α) の產生する phage α を感受性菌 E (β) 及び R に夫々感染させ phage α の lysogenization による溶原菌 EV (α_1, β) 及び RV (α_2) を夫々分離した。

2. lysogenization によつてその抗原特異性に變化がくかどうか血清学的に追究するために凝集反応と沈降反応 (重層法) を用いた。沈降反応用の抗原とし

ては多糖体、核蛋白複合体である内毒素 (消化前内毒素) を電気泳動的に均一の状態で分離した。又この内毒素にペプシン消化を行いデゾキシリボ核蛋白部分を除いた内毒素 (消化後内毒素) を精製し、共に沈降反応に用いた。

3. 凝集反応にあづかる抗体の全部を内毒素抗原で吸収することは出来ない。又内毒素抗体は恐らく菌体の“表在性抗原”では吸収出来ない抗体を含んでいる。内毒素についても「消化前内毒素」と「消化後内毒素」とではその特異性は同一でない。

4. lysogenization により一つの phage α を共有するに至つた A(α) とその溶原菌 EV (α_1, β), 及び A (α) とその溶原菌 RV (α_2) の消化前内毒素は夫々新たに共通抗原を獲得するに至る。又その共通抗原は内毒素 (消化前内毒素) をペプシン消化することによつて失われるから、ペプシン消化によつて分離されるデゾキシリボ核蛋白を指標とする部分に存在すると考えられる。

此の研究を遂行するに當つて *Pseudomonas aeruginosa* の内毒素の基礎研究を応用したが、その共同研究者である細谷省吾、江上不二夫、両教授、八木康夫助教授、下村道夫、杉野幸夫、石原宏の諸氏に厚く謝意を表する。

又終始御激励と御忠告を頂いた細谷省吾教授に厚く謝意を表する。又第 4 研究部の長野泰一教授生物物理化学の曾良助教授の御激励と御忠告を感謝する。猶、単菌培養については第 6 研究部佐藤和男博士、栗原孝子氏のお世話に感謝する。

文 献

- 1) A. Lwoff: Bact. Rev., **17**, 269 1953
- 2) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 18, Viruses. The Biological Laboratory Cold Spring Harbor, L. I., New York. 1953
- 3) Hershey, A.D. & Chase, M.: J. Gen. Physiol., **36**, 39, 1952
- 4) 細谷省吾, 本間遜, 江上不二夫, 八木康夫: Japan. J. Exp. Med., **20**, 55, 1949. °本間遜 捧箸孝, 細谷省吾, 八木康夫, 杉野幸夫, 江上不二夫: Japan J. Exp. Med., **21**, 361, 1951. °本間遜, 捧箸孝, 細谷省吾, 江上不二夫, 下村道夫, 日本細菌学雑誌, 印刷中. °江上不二夫, 下村道夫, 本間遜 捧箸孝, 細谷省吾: IIe Congrès International de Biochimie. Resume des Communications p. 388, 1952 °江上不二夫, 下村道夫, 石原宏, 本間遜, 捧箸孝, 細谷省吾: Bull. Soc. Chim. biol., **36** (1954) in press.
- 5) A.N. Belozersky: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **12**, 1, 1947.