放線菌々体抽出物の血清学的研究

特に C 反応性蛋白と類似の反応について

新 藤 潤 一

東京医科歯科大学口腔外科学教室（指導：伊藤秀夫教授）

東京医科歯科大学学生化学教室（指導：荒谷真平教授）

（昭和 38 年 10 月 15 日受付）

Serological Studies on the Extract of Actinomyces and the Similarity to the Reaction with C-Reactive Protein

Junichi Shindo

Department of Oral Surgery, Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. Hideo Ito)

Department of Biochemistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. Shimpei Araya)

緒 言

放線菌症の診断はその病巣から放線菌塊を証明することにより、あるいは菌を分離培養することによつて確定されるが、実際にはこの診断法が困難な場合も多く、それを血清学的方法に求める試みは古くからなされてきた。小池¹⁾は放線菌の培養濾液を抗原とし、東風²⁾、岡本³⁾、Neuber⁴⁾、板倉^{5) 6)}、Kwapinski⁷⁾らは菌体の抽出物を抗原として沈降反応^{2) 6)}、補体結合反応^{1) 2) 4) 7)}、皮内反応³⁾、血球凝集反応⁷⁾などを行つた。これらの反応は放線菌症に対し 70~100% の陽性率を示したが、他方それ以外の疾患に陽性反応がみられることがあり、特に結核^{2) 4) 7)}、梅毒⁴⁾、その他の炎症^{6) 7)}、悪性腫瘍^{3) 6)}などでかなりの陽性率になることが報告されている。

東京医科歯科大学口腔外科学教室においても常葉、那須ら^{8) 9)}が顎部放線菌症病巣から分離した通性嫌気性放線菌の菌体抽出物をもちいて沈降反応を試み、それが放線菌症に対し高い陽性率を示

すことを認めた。しかしこの反応もまた悪性腫瘍、梅毒、リウマチ、血液疾患などの患者、妊婦などに陽性例が認められた¹⁰⁾。またこれらの反応と臨床経過との関連について板倉⁶⁾は放線菌症の初期から反応が現われ、症状の軽快とともに急速に陰性化するとのべ、那須⁹⁾もまた同様の傾向を指摘した。

著者はこれらの現象を検討した結果、この反応がいわゆる非特異的血清反応群、なかでも肺炎球菌の C 多糖体と C 反応性蛋白 (CRP) の反応と多くの共通点をもつことに注目し、放線菌々体抽出物の血清学的性状を実際に CRP の反応と比較しながら検討するとともに、この反応性物質の精製を行い、2, 3 の知見が得られたので報告する。

実験材料および方法

1. 実験菌株および培養法

顎部放線菌症患者の病巣から分離した通性嫌気性放線菌ミノワ株をもちい、これを Brain-heart-infusion broth (Difco) と普通ブイヨン等を等量混合

し、ブドウ糖 0.5 % を加え、pH 7.4 に修正した液体培地に 37°C, 10 日間培養した。

2. 菌体成分の抽出法

那須⁹⁾、竹川¹⁰⁾の方法に従った。すなわち培養した菌体を 6000 RPM, 15 分間遠心し、沈澱した菌体をさらに生理的食塩水で洗滌し、上清が Mo-lisch 反応陰性になるまでくりかえした。この湿菌に約 5 倍容の 1 N NaOH 溶液を加え、80°C, 5 ~ 6 時間加熱して分解した。その間適時試料をグラム染色、PAS 染色し、グラム陽性の菌体が次第に陰性化し、同時に PAS 染色性が失われて菌体が崩壊する直前に分解を停止した。分解物は 3000 RPM で約 5 分間遠心し、その上清を 10 % トリクロル酢酸で pH 3.0 とした後、ふたたび 3000 RPM で 5 分間遠心して沈澱を除いた。上清は流水中で 24 時間透析した後 $1/10$ 容に濃縮、これに約 5 倍容の冷アセトンを加えて氷室に一夜放置した。生じた沈澱は少量の純エタノールおよびエーテルを加えて空气中で乾燥した後再溶解し、10 % トリクロル酢酸を加えて (pH 3.0) 沈澱の有無をたしかめ、以後同様の操作をくりかえして乾燥

表 1 菌体からの粗抽出法

* 菌体がグラム染色、PAS 染色性を失わない崩壊する直前まで分解する

粉末を得た (表 1)。

約 250 l の培地で約 530 g の湿菌が得られ、それから約 8.5 g の粉末が抽出された。この粉末を粗抽出物として以下の実験に使用した。

3. 沈降反応法

a) 重層法: 常法に従った¹¹⁾。

b) 寒天内沈降反応: Ouchterlony 法^{12) 13)} によった。ただし検体中に CM セルロースが含まれる時は血清周囲の寒天が白濁するので次の組成の寒天ゲルをもちいた。

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	33.2 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	2.96 g
J-Agar	12.0 g
NaN ₃	1.0 g
蒸留水	1000 ml

反応は 37°C で 5 ~ 7 日間行い、沈降帯の判定は Ouchterlony の分類^{13) 14)}に従った。

4. 抗血清の作成

放線菌々体抽出物と反応する患者血清側の活性成分 (以下 ARP* と仮称する) で動物を免疫して抗血清を作成した。すなわち舌癌によつて死亡した患者の屍体から採取した血清 50 ml に放線菌の粗抽出物の 1 % 生理的食塩水溶液 10 ml を混和し、37°C, 12 時間放置して得た約 2.5 mg の沈澱を生理的食塩水に浮遊させて全量を 3 ml とした。Freund のアジュバント¹⁵⁾ 6 ml に浮遊液を加え、これを 3 等分して体重 2.2 ~ 2.6 kg の 3 羽の家兎の大腿筋に注射、さらに 10 日後等量の追加免疫を行った。第 2 回注射の 18 日後に明らかな抗体形成が認められたので全採血した。健康な 5 人の混合ヒト血清で正常血清成分に対する抗体を吸収した後、得られた血清を抗 ARP 血清とした。この抗血清は放線菌々体抽出物と反応する患者血清と沈降反応を示したが、健康なヒト血清や菌体抽出物とは反応しなかった。

抗 ARP 血清の対照として抗 CRP 血清 (Difco

* ARP (Actinomyces reactive protein) はいまだ蛋白質であると証明していないが、以下の実験にもちいる CRP と対比する便宜上このように仮称する。

製市販品)をもちいた。

5. イオン交換セルロースによる粗抽出物の精製法

イオン交換セルロースはヤترون製のCM (Carboxymethyl) セルロース, DEAE (Diethylaminoethyl) セルロースの粉末およびセルロース紙をもちいた。

a) ペーパークロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーによる精製の予備実験として反応活性成分局在の条件を検討した。CMセルロース紙(2 cm×40 cm)は常法によりH型としたものをもちい、DEAEセルロース紙はNa型のものをM/5 ホウ酸緩衝液(pH 10)¹⁶⁾で処理してからもちいた。粗抽出物 100 mg/ml 水溶液をスポットし、M/30 KH₂PO₄ 溶液で上昇法により約2時間展開した。

セルロース紙は風乾後縦に2分し、1片はニンヒドリンで染色、他片は1 cm 毎に細切し、Ouchterlony 法によつて寒天平板のくぼみの中で直接溶出させながら沈降反応を行つて反応活性成分の移動をしらべた。

b) カラムクロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーの結果をもとにして同じ製造番号のセルロースをもちいた。まず粗抽出物 20 mg を 2 ml の蒸留水に溶解し、0.013 M KH₂PO₄ 溶液(pH 4.6) に対して透析した。H型 CM セルロースは 0.013 M KH₂PO₄ 溶液とともに一夜平衡させた後、6000 RPM で15分間遠心した。この湿潤セルロース約10 ml に上記試料を混和攪拌してから室温に一夜放置した。6000 RPM 15分間遠心して分離した上清は粗抽出物と同様の沈降帯を示した。沈澱した線維を Ouchterlony のくぼみの中に直接いれて反応活性の有無をたしかめながら、それが陰性になるまで 0.013 M KH₂PO₄ 溶液で洗滌した。上清は減圧濃縮し、はじめ蒸留水に、次いで 0.013 M KH₂PO₄ 溶液に対して透析した後、全容を 2 ml に調整、DEAE セルロースのカラムに移した。

DEAE セルロースは Na 型のものを M/5 ホウ酸緩衝液(pH 10) で一夜平衡させてから直径 0.9

cm, 高さ 10 cm のカラムとした。これに試料を移し 0.013 M KH₂PO₄ 溶液で流出させ、フラクションコレクターにより 2 ml 宛 40 本の試験管に分画した。次いで 1 M NaCl 溶液 12 ml で溶出させ、さらに 2 M NaCl 溶液 3 ml で溶出させた。

7. 精製物の化学分析法

a) 紫外吸収曲線の測定: Cary の自記々録分光光度計を用いた。試料は粗抽出物 0.2 mg/ml の活性度に相当する濃度の精製分画で 200~400 m μ の範囲を測定した。本実験には東京大学薬学部海田、田巻両氏の御協力を得た。

b) 精製物の加水分解: 6 N HCl とともに封管し、110°C, 8 時間分解した。

c) 定量反応: 還元糖量は Somogyi 法¹⁷⁾, アミノ酸定量は Yemm-Cocking 法¹⁸⁾, アミノ糖は Belcher ら¹⁹⁾の変法, ビウレット反応は Gornall ら²⁰⁾の方法によつた。基準液はそれぞれブドウ糖, ロイシン, グルコサミン溶液, ヒト血清稀釈液をもちいた。

d) 加水分解物の DNP 化: Sanger の方法²¹⁾によりエタノール中で DNP (Dinitrophenyl) 化した。DNP 化物のペーパークロマトグラフィーは Levy²²⁾の方法によりトルエン系, 1.5 M リン酸緩衝液で2次元の展開をした。スポットの一部は 1 % NaHCO₃ 溶液で溶出し、390 m μ /360 m μ の吸収係数比を測定した。

実験結果および考察

1. 抗 ARP 血清の臨床成績

放線菌々体抽出物と反応する患者血清成分 (ARP) で家兔を免疫して得た抗血清 (抗 ARP 血清) をもちい、それと種々の患者 142 例の血清との反応をしらべた。なお対照として従来の粗抽出物および抗 CRP 血清による反応も行つた。

その成績は表 2 の通りで、抗 ARP 血清の陽性率は粗抽出物のそれに比して大幅に高く、急性炎症の大部分のほか、悪性腫瘍や口内炎にも陽性例がかなり認められた。粗抽出物による反応が陽性で、抗 ARP 血清では陰性の例はなかつた。抗 CRP 血清とは大多数 (142 例中 138 例) が一致し

表2 粗抽出物, 抗 ARP 血清, 抗 CRP
血清の臨床成績

	例数	粗抽出物 陽性例 (重層法)	抗ARP血清 陽性例 (Ouchterlony 法)	抗CRP血清 陽性例 (Ouchterlony 法)
急性炎症	37	19(51.4%)	33(89.4%)	34(92.0%)
慢性炎症	20	1(5.0)	5(25.0)	6(30.0)
悪性腫瘍	40	8(20.0)	29(72.5)	29(72.5)
口内炎	45	3(6.2)	21(46.7)	19(42.3)
計	142	31(21.9)	88(62.0)	88(62.0)

た。

2. ARP の非特異性と均一性

a) 菌体抽出物による反応

Ouchterlony 法により図1のように中央のくぼみに粗抽出物(0.1 mg/ml)溶液をおき, 周囲に4~6例ずつ計18例の患者血清(急性炎症5例, 放線菌症2例, 結核1例, 悪性腫瘍9例, 口内炎1例)をおいて沈降帯を観察した。その結果大部分の例では1本の沈降帯を形成し, それらがたがいに融合した。ただし時に第2の沈降帯が現われる例もあった。また図2のように中央に患者血清をおき, 周囲のくぼみにいろいろな稀積度の抽出物をおいて反応させると, 濃度によって沈降帯が2本に分かれる場合もあった。

図1 粗抽出物による反応の均一性

中央(G): 粗抽出物 0.1 mg/ml 溶液

周囲: 患者血清

A: 上顎癌 B: 上顎悪性黒色腫
C: 舌癌 D: 上顎癌
E: 舌癌(屍体血清) F: 上顎癌

図2 粗抽出物の稀積度による沈降帯の変化

中央(K): 膝部肉腫患者血清

周囲: 粗抽出物 0.5 mg/ml 溶液を原液した
倍数稀釈液

A: 原液 B: $\times 2$ C: $\times 8$
D: $\times 16$ E: $\times 64$ F: $\times 128$

b) 抗 ARP 血清による反応

前項と同様中央に抗 ARP 血清をおき, 周囲に計26例の患者血清(急性炎症14例, 悪性腫瘍4例, 口内炎8例)をおいて反応させた。多くの症例では1本の明瞭な沈降帯が現われ, たがいに融合したが, 図3のK血清, I血清のようにこれが2

図3 抗 ARP 血清による反応の均一性

中央(A): 抗 ARP 血清

周囲: 患者血清

O: 急性智歯周囲炎 K: 急性顎下リンパ節炎
I: 下顎癌 I': 急性腹膜炎
Y: 再発性アフタ K: 腹部膿瘍

本に分かれるもの、別個に不明瞭な沈降帯の現われるもの、部分的一致の融合を示すものもあつた。

付) 抗 CRP 血清による反応

対照として抗 CRP 血清をもちいて同様の実験を試みた。中央に抗 CRP 血清、周囲に 25 例の患者血清(急性炎症 17 例, 悪性腫瘍 7 例, 口内炎 1 例)をおいた。約半数は明瞭な 1 本の沈降帯が認められたが 2~3 本もみられるものもあつた。それらはたがいに融合したが、図 4 の O 血清と T 血清のように部分的一致の像を示すものもあつた。

図 4 抗 CRP 血清による反応の均一性

中央(C): 抗 CRP 血清

周 囲: 患者血清

O: 下顎骨々髄炎 T: 急性頸部リンパ節炎

K: 耳下腺癌 N: 急性下顎骨炎

M: 下顎癌 S: 急性歯槽骨炎

c) ARP と CRP の沈降帯比較

図 5 のように 3 個のくぼみに陽性患者血清、抗 ARP 血清、抗 CRP 血清をおいて反応させたところ表 3 のように多数は双方の沈降帯が一致したが、部分的一致の例も少数存在した。沈降帯が交叉する例はなかったが、一致例のなかに 2~3 本の沈降帯が現われ、複雑な形を示すものもあつた(表 3)。

以上のように放線菌々体抽出物と反応する血清成分の検出は抗血清をもちいることによつて一段と鋭敏になった。そして陽性率の増加とともに陽性を示す疾患の種類も増し、血清学的特異性はさらに弱まり、抗 CRP 血清の臨床成績と近似する結果となつた。しかしその沈降帯は単一のものでなく、2~3 本の沈降帯を示すものや、隣接する

図 5 抗 ARP 血清と抗 CRP 血清の沈降帯比較

I: 急性腹膜炎患者血清

A: 抗 ARP 血清

C: 抗 CRP 血清

表 3 抗 ARP 血清、抗 CRP 血清の沈降帯比較

沈降帯*	急性炎症	慢性炎症	悪性腫瘍	口内炎	計
1 例	0	2 例	0	3 例
1	1	1	2	5
11	2	8	7	28
5	2	4	3	14
2	0	1	0	3
0	0	2	0	2
2	1	0	0	3
4	0	0	0	4
計	26	6	18	12	62

* Duchterlong 法による沈降帯模図

⊙: 患者血清

⊙: 抗 ARP 血清

⊙: 抗 CRP 血清

沈降帯が部分的一致の像を示すものもあつた。CRP が血清学的に 3 種類の物質の混合物で、それぞれの比も一定していないことは Libretti ら²³⁾ によつてすでに指摘され、また西村²⁵⁾ によつてそれらの免疫電気泳動による泳動度が異なると報告されている。したがつて抗 ARP 血清と抗 CRP 血清の沈降帯を融合させた場合に複雑な像を示す

ものもあることは当然であろう。そして沈降帯が交叉する例が全くないのであるから、ARP と C RP は一致——少なくとも一部は一致すると考えられる。

以上の結果にもとづいてこの現象をさらに追求するために、抽出物の活性成分の精製とそれに付随する 2, 3 の実験を試みた。

3. 粗抽出物の精製

a) イオン交換セルロースによるペーパークロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーの予備実験として行ったペーパークロマトグラフィーでは図 6 に示すような結果が得られた。すなわち CMセルロースでは展開液の先端部に反応活性成分を分画した。DEAE セルロースでは先端部と原点部に分離することを認めた。なお活性物質に相当する部分にはニンヒドリン反応が認められたが、図にみられるようにそれ以外の部分にもいくつかのニンヒドリン陽性のスポットを認めた。

図 6 イオン交換セルロースによるペーパークロマトグラフィー

b) イオン交換セルロースによるカラムクロマトグラフィー

実験方法の部で詳しく記したように粗抽出物をまず CMセルロースで処理して、これに吸着されなかつた活性成分を DEAE セルロースのカラムで分画した。その結果 3~17 番の試験管に活性が現れた(これを分画 E とする)。しかし展開液を 40 番まで流出させた後のセルロースになお強い反応活性が認められたので、これを 1 M NaCl 溶液 12 ml で溶出させた(分画 R)。さらになおセルロースに残った活性分画は 2 M NaCl 溶液 3 ml で溶出させた(分画 RR)。このように処理したセルロースにはもはや活性は認められなかつた。以上の各分画は蒸留水に対して透析された。

3 分画の活性量は図 7 の通りである。活性度の基準は粗抽出物 0.1 mg/ml の反応活性に相当する濃度を基準濃度とした。

次にこれらの各分画が形成する沈降帯を比較した。図 8 のように CMセルロースから流出しただけの分画、および DEAE セルロースによる 3 分

図 7 DEAE セルロースによるカラムクロマトグラフィー

活性度：粗抽出物 0.1 mg/ml の反応活性に相当する活性度を単位とする

全活性量：活性度×収量(ml)

図8 精製物の沈降反応

中央(Y): 癌による屍体血清

A: 粗抽出物 C: CM セルロースを通過した分画

E: 分画E R: 分画R RR: 分画RR

画を Ouchterlony の周囲のくぼみにおき、中央に患者血清をおくと、たがいに融合した等しい沈降帯が現われた。

以上の結果から知られるように精製条件の選定はイオン交換セルロース紙をもちいることによつて非常に容易になった。すなわちこのペーパークロマトグラフィーは展開時間が短かく、また Ouchterlony 法との併用によつて紙をそのままくぼみの中で溶出させながら沈降反応を行い、微量の試料を検出することができるからである。その結果反応活性成分はCMセルロースに吸着されないことがわかり、不純物の除去にはバッチ法が有効であろうと推察された。また DEAE セルロースについては通常の Na 型のもものではペーパーのほぼ全面に反応成分が拡つたが、ホウ酸緩衝液 (pH 10)¹⁶⁾ で前処理することによつて活性成分を局在させることができ、同様にカラムによつて集中的に分画することができた。

反応活性成分は上記のように3分画として得られたが、それらが等しい沈降帯を形成することから考えると、以上の3分画は同一の物質が菌体抽出時いろいろな程度に分解されて、種々の大きさのものとなつたために得られたのであらうと想像される。それでこの可能性を確かめるために次の実験を試みた。

4. 精製物の分解継続

分画RおよびRRを再び菌体抽出時の条件で処理した。すなわち分画RおよびRRを1N NaOH 溶液中、80°C で3時間、6時間および12時間加水分解した。これを流水に、次いで0.013M KH_2PO_4 溶液に対して透析し、精製時と同じ条件で DEAE セルロースのカラムに通した。

その結果 水解前は0.013M KH_2PO_4 溶液で流出しなかつた両分画が3時間または6時間の分解追加で一部が流出するようになった。しかしどちらも0.013M KH_2PO_4 溶液で流出せず、1M および2M NaCl 溶液ではじめて溶出される活性物質がなお存在した。さらに12時間の追加分解の際には活性がすべて消失することを知つた。

5. 精製物の化学的性状

a) 紫外吸収曲線

上記の精製された3分画について紫外吸収をしらべたところ、分画Eでは255m μ 付近に極小値

図9 精製物の紫外吸収曲線

272 m μ 付近に極大値があり、分画 R は 260 m μ 付近に変曲点があるが極小、極大を示さなかった。分画 RR は 247 m μ 付近に極小値、265 m μ 付近に極大値があつた。なお 3 分画とも pH 3~10 の範囲で吸収曲線の変化はなかつた (図 9)。

b) 定量成績

精製物の基準濃度 (粗抽出物 0.1 mg/ml の活性度に相当する) 1 ml 当りの定量結果は表 4 の通りである。

c) DNP 化物のペーパークロマトグラフィー

表 5 のような結果が得られた。

表 4 精製物の定量成績

	E	R	RR
	$\mu\text{g/ml}^*$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
還元糖 (ブドウ糖換算)	16.5	109.2	23.7
ニンヒドリン陽性物質 (ロイシン換算)	18.5	100.0	37.7
アミノ糖 (グルコサミン換算)	10.5	114.0	27.8
蛋白質	—	—	—

* 粗抽出物 0.1 mg/ml の反応活性に相当する活性をもつ溶液 1 ml 中の重量 (μg)

表 5 水解 DNP 化物のアミノ酸組成

	E	R	RR
グリシン	+	+	+
アラニン	+	+	+
セリン		+	+
ロイシン またはイソロイシン		+	
アスパラギン酸 またはグルタミン酸	+	+	+
ヒスチジン			+
リジン	+	+	+

3 分画の化学的性状はたがいに異つた結果を示した。その組成は還元糖が板倉⁵⁾ の抽出物 (最も活性の高い分画で 43 %), Kwapinski ら^{26) 7)} の診断用分画 (58~96 %) に比較してやや少なく、その大部分がアミノ糖由来のものであつた。ニンヒドリン陽性物質は約半量がアミノ糖由来のもので、他はアミノ酸と推定されるが、ビウレット反応は基準濃度の 400 倍の濃度でなお陰性であつた。

紫外吸収曲線でも蛋白質と異つた曲線を示し、むしろ核酸関係の物質の混在を思わせるものがあつた。

放線菌の属特異性または種特異性の物質は Kwapinski²⁶⁾ によると細胞壁の多糖体分画にあるといわれ、細菌分類学上の興味から放線菌々体成分の分析がいくつか行われている。Cummins ら^{27) - 29)} は細胞壁成分の差異によって放線菌および類縁菌の分類を試み、*Actinomyces israelii* ではガラクトース、グルコサミン、ムラミン酸、アラニン、リジン、グルタミン酸が存在し、なかでもガラクトースの存在とセリン、グリシン、ロイシン、フェニルアラニンおよび糖のリン酸エステル欠如が特徴的であるとのべている。一方 *Actinomyces bovis* では構造の異なる 3 群があり、*Actinomyces israelii* と全く構造の変らないもの、ラムノース、フコース、糖を構成するリン、アスパラギン酸、などを含むもの、ラムノース、リン、フコース、アスパラギン酸、リジンなどがなく、かわりにアラビノースを含むものなどに分類しようとしている。著者の得た活性物質には常にグリシンが認められ、セリン、ロイシンなどもしばしば認められる。この抽出物と Kwapinski, Cummins らの特異的物質との間にいかなる関係があるかを明らかにするまでに至っていないが、Kwapinski ら⁷⁾ の抽出物による臨床成績は著者の成績と類似しているので、同一の物質が重複した作用をもっているか、部分的に同一構造をもつ物質がたがいに混在している可能性も考えられる。

6. 考察

放線菌症の血清学的診断の困難さは放線菌症以外の疾患にもかなりの陽性反応が現われることであつた。しかもこの反応は疾患の初期から出現し、臨床症状の改善とともに速かに消失する。これらの点からこの反応は真の抗原抗体反応ではなく、肺炎球菌の C 多糖体と CRP との反応のような非特異的反應ではないかとの疑問が生じてくる。

C 反応性蛋白は肺炎球菌の C 多糖体と反応する物質で、炎症の急性期や組織の崩壊、変性をともなう疾患の患者血清に広く出現する^{30) - 35)}。この物

質の検出には CRP をもちいて抗 CRP 血清がつくられ、その反応を鋭敏なものにしている³³⁾。著者はその方法を参考にして抗 ARP 血清を作成し、臨床検査に使用したが、その結果抗 ARP 血清の反応と抗 CRP 血清の反応とは 142 例中 138 例が一致した。しかし Ouchterlony 法によると、ARP は血清学的には単一な物質といえないことが明らかになったが、一方 CRP も従来の報告によると 3 本の沈降帯を形成するといわれる^{23) 24)}。したがって ARP と CRP の沈降帯を比較すると両者が一致する例のなかにも、その沈降帯が複雑な形を示すものがかなり認められたのも当然といえよう。この所見は Ouchterlony の解釈¹⁴⁾にしたがうと、ARP, CRP とともに 2~3 種類の反応性成分の混合物で、個々の症例によりそれらの量比や濃度が異なり、また抗 ARP 血清、抗 CRP 血清とも 2~3 種類の抗体の比が異なっているため、それらの組合せの変化によつていろいろな像を示すのであろうと説明しうるし、同時に抗 ARP 血清、抗 CRP 血清の反応が一致しない 4 例についても説明しうると思う。

CRP はリン脂質をもった複合蛋白であるといわれ、McCarty³⁴⁾により斜方晶系の結晶としてとり出されているが、それが電気泳動的に血清蛋白のどの分画に属するか異論が多い^{25) 35) 38)}。ARP についてはいまだ同様の実験を行っていないので両者の異同を決定するまでには至らないが、少なくとも一部は同一のものである可能性は非常に大きいと考えられる。

C 多糖体は莢膜をもたない R 型肺炎球菌からの抽出物で、Goebelら³⁹⁾によると窒素 5.91%，還元糖 50.6%，グルコサミン 21.8% を含み、紫外吸収曲線では 252.5 m μ に極小値、267.5 m μ に極大値をもち、Tiselius 電気泳動で単一のピークをもつ物質であるとされている。これを著者の放線菌抽出物と比較してみると、後者にはアミノ糖以外の還元糖が少ない点は前者とやや異なるが、C 多糖体にはその窒素量から推してこのなかにもおそらく放線菌抽出物と同様にアミノ糖以外の窒素含有物が相当存在していると思われるし、紫外吸

収曲線などは両者相似した結果を示している。しかし著者の抽出物のなかには等しい沈降帯を形成する 3 分画が存在し、それぞれの化学組成がいくらか異なっていることから考えると、反応活性には一定の活性部分があれば、他はあまり厳密な特異構造を要求しないとも考えられるが、現在の精製段階で両者の組成を比較しても積極的な意味づけは期待できないように思われる。

最後に CRP や ARP のような蛋白がなぜ炎症や腫瘍に際して血清中に現われるかという問題があるが、それについては CRP や CxRP⁴⁰⁾ がどのような組織で、どのような時期につくられるかという論議が従来いろいろなされてきた^{41) 48)}。しかしなぜ肺炎球菌の菌体成分と反応する物質が高等動物の血中に非特異的に生ずるかという論議はほとんどなされていない。しかもこの論文で扱った放線菌は肺炎球菌とは分類学上隔った位置にあるにもかかわらず、上記のように血清学的にほとんど同じ作用をもつた物質が分離されたことは大変興味深い事実である。このことから同様の物質が他の細菌にも、さらには高等動物の細胞にも存在しているかもしれないと想像される。ことに C 多糖体も著者の抽出物も紫外吸収で 260~270 m μ に吸収極大があり、核酸の吸収極大 (260 m μ) や吸収曲線全体の型を比べてみると、これらの菌体成分に核酸などと関係ある物質が混在しているかもしれないと推察させる。そしてこのことからこれらの物質が細胞のなかで蛋白合成のようなことに関して何らかの機能を営み、あるいは営みうるものであつて、もしそうだとすると CRP, ARP のような特徴ある蛋白が非特異的な原因で産生される機構と、これらの菌体成分との内的関係が明らかにされる時がくるかもしれないと思われる。

総 括

1) 顎部放線菌症の病巣から分離した放線菌ミノワ株の菌体から、炎症、悪性腫瘍などの患者血清と反応する分画を抽出した。またこの抽出物と反応する患者血清側の活性成分 (ARP) をもちいて抗 ARP 血清を作成した。

2) 抗 ARP 血清の臨床成績は菌体抽出物による反応に比べて高い陽性率を示したが、疾患による特異性が少なく、抗 CRP 血清の成績と近似したものであつた。

3) Ouchterlony 法による寒天内沈降反応で抗 ARP 血清は単一の沈降帯を形成するものが多かったが、2～3本の沈降帯を示すものもあつた。抗 CRP 血清についても同様であつた。

4) 抗 ARP 血清の沈降帯と抗 CRP 血清の沈降帯はたがいに融合一致したが、一部では部分的一致の例もあつた。

5) 放線菌々体抽出物はその精製過程で DEAE セルロースのカラムによつて3成分に分画された。それらは Ouchterlony 法でいずれも等しい沈降帯を形成したが、化学組成は多少の差異が認められた。この各分画と肺炎球菌 C 多糖体の組成との間に大きな差異はみられなかつた。

6) 以上血清学的、化学的にみて放線菌の菌体中には肺炎球菌 C 多糖体と類似の作用を示す成分が存在すると考えられる。

本論文の要旨の一部は第 35 回 日本生化学会総会および第 16 回、第 17 回 日本口腔科学会総会において発表した。

終りにあたり御指導、御校閲をいただいた荒谷真平教授、伊藤秀夫教授、本学教養部原一郎教授、御校閲いただいた東京大学血清学教室鈴木鑑教授、本学口腔外科学教室上野正教授、直接御指導くださった東京大学血清学教室川西康博氏、本学口腔外科学教室常葉信雄助教授、現在 Rochester 大学留学中の斉藤滋氏、ならびに御援助、御協力くださった東京大学血清学教室、本学生化学教室の方々、また研究の機会を与えられた日本育英会各位に心からの謝意を表します。

参考文献

- 1) 小池百蔵：放線状菌病 知見補遺，日本外科学会雑誌，22：663，1921，1922.
- 2) 東風睦之：放線状菌症の血清学的反応に関する研究，補体結合反応及び絮状反応(Ausflockungsreaktion)に就て(第1報)，口病誌，11：385，1937.
- 3) 岡本繁：放線状菌症の皮膚反応に就て，日本医事

新報，922：1713，1940.

- 4) Neuber, E.: Spezifische Diagnostik und Therapie der Aktinomykose, Klin. Wschr., 19: 736, 1940.
- 5) 板倉文弥：嫌気性放線状菌の含水炭素分劃と其沈降反応抗原としての血清診断的意義，第1回報告，其分離方法と化学的性質に就て，実験医学雑誌，26：799，1942.
- 6) 板倉文弥：嫌気性放線状菌の含水炭素分劃と其沈降反応抗原としての血清診断的意義，第2回報告，沈降反応抗原としての血清診断的意義，実験医学雑誌，27：632，1943.
- 7) Holm, P., Kwapinski, J. B.: Studies on the detection of actinomyces antibodies in human sera by using pure antigenic fractions of Actinomyces israeli, Acta Path. Microbiol. Scand., 45: 107, 1959.
- 8) 中村平蔵，常葉信雄，那須英司：顎部放線菌症の診断法に関する研究(会)，口科誌，8：324，1959.
- 9) 那須英司：顎部放線菌症の診断法に関する研究，特に血清学的診断法について，口病誌，26：425，1959.
- 10) 竹川桂：放線菌々体成分による悪性腫瘍の血清学的研究について，口病誌，27：411，1960.
- 11) 伝染病研究所学会：細菌学実習提要，東京，丸善，昭37，244頁.
- 12) Ouchterlony, Ö.: In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria, Acta Path. Microbiol. Scand., 25: 186, 1948.
- 13) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion, Acta Path. Microbiol. Scand., 32: 231, 1953.
- 14) Ouchterlony, Ö.: Interpretation of comparative immune precipitation patterns obtained by diffusion-in-gel techniques, Immunochemical approaches to problems in microbiology, Rutgers, The State University Press, 1961, P. 5.
- 15) Freund, J.: Some aspects of active immunization, Ann. Rev. Microbiol., 1: 291, 1947.
- 16) Atkins, W.R.G., Pantin, C. F. A.: A buffer mixture for the alkaline range of hydrogen ion concentration determinations, Biochem. J., 20: 102, 1926.
- 17) Somogyi, M.: A new reagent for the determination of sugars, J. Biol. Chem., 160: 61, 1945.
- 18) Yemm, E. W., Cocking, E. C.: The determination of amino-acids with ninhydrin, Analyst, 80: 209, 1955.
- 19) Belcher, R., Nutten, A.J., Sambrook, C.M.:

- The determination of glucosamine, *Analyst*, 79 : 201, 1954.
- 20) Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.*, 177 : 751, 1949.
 - 21) Sanger, F. : The free amino groups of insulin, *Biochem. J.*, 39 : 507, 1945.
 - 22) Levy, A. L. : A paper chromatographic method for the quantitative estimation of amino acids, *Nature*, 174 : 126, 1954.
 - 23) Libretti, A., Kaplan, M.A., Goldin, M. : Precipitin analysis of C-reactive protein by gel diffusion, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 90 : 481, 1955.
 - 24) Libretti, A., Goldin, M., Kaplan, M. A. : Immunologic relationships of C-reactive protein from various human pathologic conditions, *J. Immunol.*, 79 : 306, 1957.
 - 25) Nishimura, K. : Gel diffusion and immunoelectrophoretic studies of C-reactive protein with particular reference to its presence in hemoglobin SS disease, *J. Kyoto Pref. Med. Univ.*, 65 : 1193, 1959.
 - 26) Kwapinski, J.B. : Researches on the antigenic structure of actinomycetales. IV. Chemical and antigenic structure of *Actinomyces israeli*, *Path. Microbiol.*, 23 : 158, 1960.
 - 27) Cummins, C. S., Harris, H. : The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character, *J. gen. Microbiol.*, 14 : 583, 1956.
 - 28) Cummins, C. S., Harris, H. : Studies on the cell-wall composition and taxonomy of actinomycetales and related groups, *J. gen. Microbiol.*, 18 : 173, 1958.
 - 29) Cummins, C. S. : Chemical composition and antigenic structure of cell walls of corynebacterium, mycobacterium, nocardia, actinomyces and arthrobacter, *J. gen. Microbiol.*, 28 : 35, 1962.
 - 30) Tillet, W. S., Francis, T. Jr. : Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus, *J. Exp. Med.*, 52 : 561, 1930.
 - 31) Abernethy, T. J., Avery, O. T. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus, *J. Exp. Med.*, 73 : 173, 1941.
 - 32) MacLeod, C. M., Avery, O. T. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II. Isolation and properties of the reactive protein, *J. Exp. Med.*, 73 : 183, 1941.
 - 33) MacLeod, C. M., Avery, O. T. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. III. Immunological properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins, *J. Exp. Med.*, 73 : 191, 1941.
 - 34) McCarty, M. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. IV. Crystallization of the C-reactive protein, *J. Exp. Med.*, 85 : 491, 1947.
 - 35) Wood, H. F., McCarty, M., Slater, R. J. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. V. Physical-chemical properties of the C-reactive protein crystallized by modified technique, *J. Exp. Med.*, 100 : 71, 1954.
 - 36) Pearlman, E., Bullova, J. G. M., Goodkind, R. : An immunological and electrophoretic comparison of the antibody to C-polysaccharide and the C-reactive protein of acute phase serum, *J. Exp. Med.*, 77 : 97, 1943.
 - 37) Schultze, H. E., Schwick, G., Sonnet, J., Hereman, J., Michaux, J.L. : Gamma-x-globulin, ein immunoelektrophoretisch nachweisbare γ -globulin-komponente mit beziehungen zum C-reaktiven Protein, *Klin. Wschr.*, 38 : 62, 1960.
 - 38) Hornung, M., Morris, T.M. : Electrophoretic determination of C-reactive protein which appears following surgery, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 111 : 25, 1962.
 - 39) Goebel, W. F., Shedlovsky, T., Lavin, G. I., Adams, M. H. : The heterophile antigen of pneumococcus, *J. Biol. Chem.*, 148 : 1, 1943.
 - 40) Anderson, H. C., McCarty, M. : The occurrence in the rabbit of an acute phase protein analogous to human C-reactive protein, *J. Exp. Med.*, 93 : 25, 1951.
 - 41) Wood, H. F. : The relationship between the acute phase response and antibody production in the rabbit. I. Correlation between the early appearance of Cx-reactive protein and subsequent antibody production, *J. Exp. Med.*, 98 : 311, 1953.
 - 42) Wood, H. F. : The relationship between the acute phase response and antibody production in the rabbit. II. The stimulation of Cx-reactive protein response by certain adjuvants and the relation of this response to the enhancement

- of antibody formation, J. Exp. Med., 98 : 321, 1953.
- 43) Montella, S., Wood, H. F. : Studies on the Cx-reactive protein. II. Inhibition of the Cx-reactive protein response in rabbits by blockade of the reticulo-endothelial system, J. Exp. Med., 106 : 321, 1957.
- 44) Hokama, Y., Coleman, M.K., Riley, R.F. : Effect of drugs on Cx-protein responses in the rabbit, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 105 : 510, 1960.
- 45) Rapport, M. M., Schwartz, A. E., Graf, L. : C-reactive protein in patients following operation, Ann. Surg., 145 : 321, 1957.
- 46) 大堀英二 : 内藤物質とC-反応性タンパク質との関連性, 東京医学雑誌, 70 : 30, 1962.
- 47) Kushner, I., Kaplan, M.H. : Studies of acute phase protein. I. An Immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions, J. Exp. Med., 114 : 961, 1961.
- 48) Gottlieb, A.A. : Kinetics of formation of Cx-reactive protein, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 110 : 568, 1962.