

菌体核酸系物質の免疫学的性状と これに対する培地組成の影響

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

秋 山 健 二
西 井 笑 美 子
中 尾 保 郎
梶 谷 英 也

[昭和35年8月17日受稿]

I. 緒 言

最近免疫化学の分野では各種細菌の菌体成分を取出し、その抗原としての特異性を検討した研究が多く、結核菌、百日咳菌、インフルエンザ菌、ブドウ球菌、チフス菌、赤痢菌、プロテウス菌などに関する報告が種々みられる¹⁾⁻¹⁰⁾。

又一方菌体成分を取り出す以前の操作過程として、培養条件と菌体成分の関係も充分考慮せねばならないことは勿論であり、S型よりR型への変異促進物質を取り出す研究¹¹⁾⁻¹²⁾、菌体内ペプチド、蛋白、核酸に及ぼすCO₂分圧の影響の検討¹³⁾¹⁴⁾、菌体内多糖体量と培地中の血清、糖類との関係¹⁵⁾¹⁶⁾についての研究などが報告されている。

筆者等は *Sh. flexneri* 2a, *Staphy. aureus* を供試菌としペプトンを主体とした培地にグルコースを添加し、或いは Fe⁺⁺ を除去する αα'-チピリヂルを添加して菌を培養し、各菌体内の粗製核蛋白、核酸分割を取り出して、それらについて溶血反応など免疫学的性状を比較検討した。

II. 実験材料及び実験方法

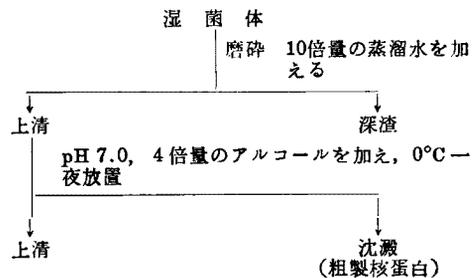
供試菌: *Sh. flexneri* 2a, *St. aureus* の教室保標標準株を下記組成の培地 (対照培地)、及びこれにグルコース (5 g/l) を加えた培地、グルコース

ペプトン	10.0 g
第一磷酸カリ	0.35 "
第二磷酸ソーダ	2.5 "
食塩	3.0 "
寒天	30.0 "
蒸溜水	1.01

と αα'-チピリヂル (*Sh. flexneri* 2a では 50 mg/l, *St. aureus* では 200 mg/l) を加えた培地に継代して馴らして使用した。

粗製核蛋白、核酸の抽出: 第1表の如く各培地24時間培養菌体を同量の石英砂、及び少量の水を

第1表 アルカリ抽出法¹⁷⁾

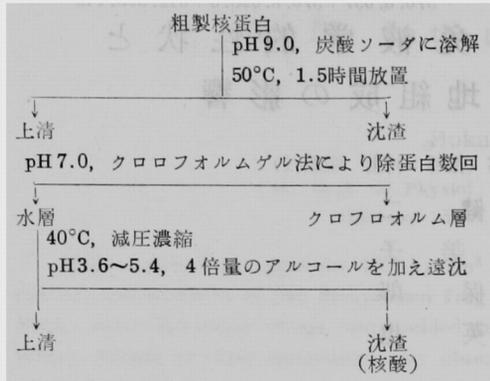


加えて氷冷下に1時間磨碎し、10倍量の水を加えNaOHを以てpH 8.0に補正して氷室に一夜放置した後、10000 r. p. m, 30分間遠沈した上清をpH 7.0とし、4倍量のアルコールを加えて更に1夜氷室に放置してから遠沈し、沈澱を粗製核蛋白として乾燥保存して実験に供した。

又第2表の如くこの粗製核蛋白を水に浮游し、炭酸ソーダを加えpH 9.0として50°Cに1時間保つた後遠沈し、上清をpH 7.0としてからクロロフォルム、オクチルアルコールを加えて数回除蛋白し、水層を40°Cで減圧濃縮後pH 3.6~5.4としてから4倍量のアルコールを加え、遠沈して沈澱を集め、これを核酸分割として使用した。

この粗製核蛋白分割はミロン反応、ピウレット反応による蛋白の反応は強陽性であり、チフェニルアミンによるDNAの反応²⁰⁾、オルシンによるRNA

第2表 クロロフォルム除蛋白⁽¹³⁾⁽¹⁹⁾



の反応⁽²¹⁾も陽性であり、各種蛋白、核蛋白の混合物と考えられ、又核酸分割は蛋白反応は極めて微弱であり、DNA、RNAの反応は陽性である。

抗原：抽出した各分割を赤血球感作には1mg/cc、沈降反応には2mg/ccの割合に生理食塩水に溶解し一度遠沈してその上清を使用した。

免疫血清：前記対照培地に培養した *Sh. flexneri* 2a, *St. aureus* で家兎をくり返し免疫、凝集価3200倍となった血清を56°C 30分非働化して用いた。

補体：5匹以上のモルモットの心臓より得た血清の10倍稀釈液を、必要に応じ寒冷飽和により正常溶血素を吸収除去して使用した。

感作赤血球浮游液：抗原溶液1ccを中試験管に分注し、鶏、家兎の5%赤血球浮游液2.1ccを加え、37°Cで1時間、次いで4°Cで1時間放置して感作させた後、生理食塩水で3回遠沈洗滌し、赤血球沈渣に生理食塩水を加え0.5%赤血球浮游液として使用した。

溶血反応：2倍階段稀釈の抗血清0.5ccに補体0.25ccづつ、更に鶏或いは家兎感作赤血球0.5ccづつを加えよく振盪した後37°Cで1時間、4°Cで翌朝迄放置して判定した。対照として食塩水、抗血清、補体のみを添加血したものも同時に行つた。

沈降反応：3倍稀釈の抗血清を沈降管に分注し、2倍階段稀釈の抗原溶液をそれぞれ重層して室温に放置し、15分、30分、1時間、2時間後の4回判定を行つた。

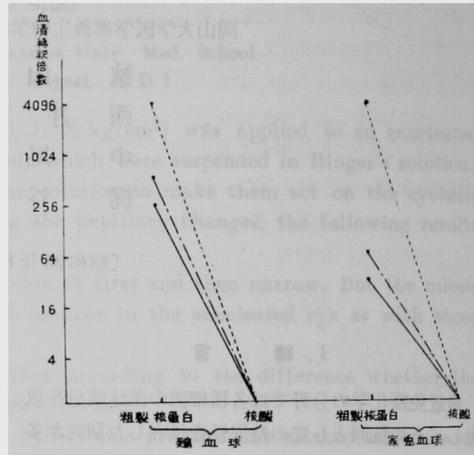
III. 実験成績及び考察

1. 溶血反応

対照培地、及びこれにグルコースを加えた培地、グルコース+aa'-チピリヂルを加えた培地に発育

した菌体より得られた粗製核蛋白分割、核酸分割を抗原とし、前記免疫血清を使用して鶏、家兎赤血球を仲介とした溶血反応を行つたところ、*Sh. flexneri* 2a では第3表の成績であつた。

第3表 溶血反応 *Sh. flexneri* 2a



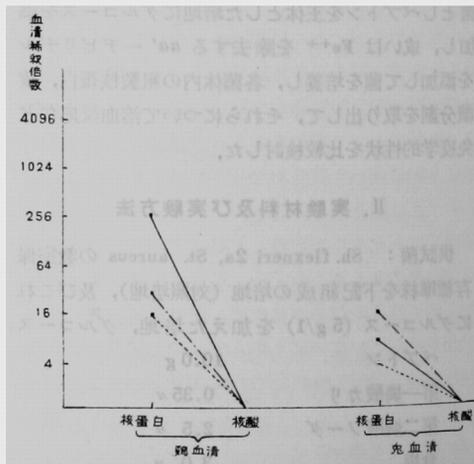
—：対照菌，……：グルコース加培地発育菌
- · -：グルコース+aa'-チピリヂル加培地発育菌

鶏血球、家兎血球の何れに於いても粗製核蛋白の分割は溶血反応陽性であり、特にグルコース加培地発育菌よりのものが最も溶血価が大である。

而して除蛋白を行つた核酸分割では溶血反応は殆んど見られなくなり、従つてこの反応には蛋白の部分が重要であると見なされる。

St. aureus では第4表の如く、*Sh. flexneri* 2a

第4表 溶血反応 *St. aureus*



—：対照菌，……：グルコース加培地発育菌
- · -：グルコース+aa'-チピリヂル加培地発育菌

の場合よりは溶血価は小であるが、やはり粗製核蛋白分割では溶血がみられ、核酸分割では陰性である。

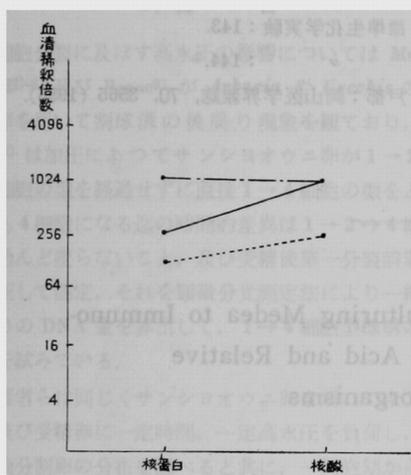
グルコース加培地発育菌体よりのものは *Sh. flexneri 2a* の場合とは異なり他の培地に発育した菌体よりのものより溶血は小である。

従つて *Sh. flexneri 2a* と *St. aureus* では培地に加えたグルコースの菌体成分に反ぼす影響がやや異なるものと考えられる。

2. 沈降反応

家兎免疫血清と粗製核蛋白、核酸分割の沈降反応をみると *Sh. flexneri 2a* では第5表の如くである。

第5表 沈降反応 *St. flexneri 2a*



— : 対照菌, : グルコース加培地発育菌
-.- : グルコース, aa'-チピリヂル加培地発育菌

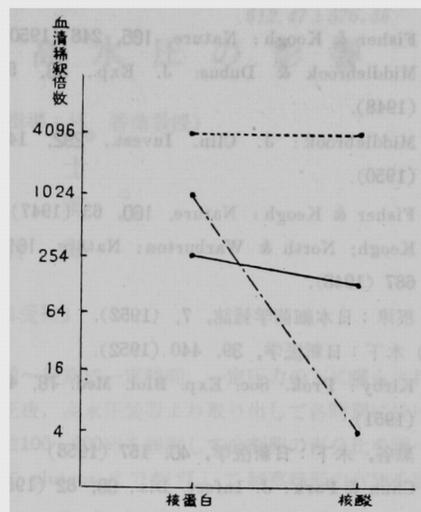
り、各培地発育菌体より得られたものは何れも 100~1000倍の沈降価を有し、且つ核酸分割も粗製核蛋白と大差ない点が溶血反応に於ける所見と異つたところである。

St. aureus では第6表の如くであり、粗製核蛋白のみならず核酸分割も同程度の沈降反応を有するが、ただグルコース, aa'-チピリヂル加培地発育菌体よりのものは核酸分割の沈降反応が著しく小であり、対照培地、或いはグルコース加培地発育菌よりのものとは異つている。

aa'-チピリヂルは Fe^{++} と結合してこれを除去し、このための培地に発育した菌体はグルコース分解に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化が不円滑となつていると推定される²²⁾。

このことが菌体成分に差異を来し、上の結果となつたものと考えられる。

第6表 沈降反応 *St. aureus*



— : 対照菌, : グルコース加培地発育菌
-.- : グルコース, aa'-チピリヂル加培地発育菌

IV. 結 言

1. 上述の如き方法で得られた核酸分割は溶血反応は陰性であるが、沈降反応は陽性であり、この両反応は何れも抗原と抗体との反応でありながらこのような差異があることは抗原としての核酸、蛋白の役割を解明する一つの端緒となると考えられる。

2. 培地にグルコースを加えると *Sh. flexneri 2a* では溶血反応が大となり、*St. aureus* ではむしろ小となつて、菌体成分の変化に対するグルコース添加の影響が菌により異なることがうかがわれる。

3. Fe^{++} を除き、グルコースの完全酸化を不円滑にするaa'-チピリヂルを加えた培地に発育した菌 (*St. aureus*) よりの核酸分割は他の培地のものとは異つて沈降反応が陰性であつて、この阻害剤の添加により菌体成分に差異が生じることがうかがわれる。

参 考 文 献

- 1) Fisher & Koogh: Nature, 165, 248 (1950).
- 2) Middlebrook & Dubus: J. Exp., 88, 521 (1948).
- 3) Middlebrook: J. Clin. Invest., 292, 1480 (1950).
- 4) Fisher & Keogh: Nature, 160, 63 (1947)
- 5) Keogh, North & Warburton: Nature, 161, 687 (1948).
- 6) 根津: 日本細菌学雑誌, 7, (1952).
- 7) 木下: 日新医学, 39, 440 (1952).
- 8) Kirby: Prok. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 486 (1951).
- 9) 黒谷, 木下: 日新医学, 40, 157 (1958)
- 10) Chun & Park: J. Infect. Dis., 98, 82 (1956)
- 11) Crossly, Ferguson & Brydson: J. Bact., 52, 367 (1946).
- 12) Davis & Dubos: J. Exp. Med., 86, 215 (1947)
- 13) Bolton, Abelson & Aldons: J. Biol. Chem., 198, 179 (1952).
- 14) Thorne, et al.: J. Bact., 63, 363 (1952).
- 15) Pierce & White: J. Bact., 63, 301 (1952).
- 16) 菊池: 東北医学雑誌, 31, 553 (1942).
- 17) Feulgen: Physiol. Chem., 90, 261 (1914).
- 18) Sevag: Biochem. Z., 273, 419 (1934).
- 19) Sevag, Lackman & Smolens: J. Biol. Chem., 124, 425 (1938).
- 20) 標準生化学実験: 143.
- 21) " : 144.
- 22) 戸部: 岡山医学界雑誌, 70, 3565 (1958).

The Influences of Composition of Culturing Medea to Immunological Properties of Nucleic Acid and Relative Substances of Microorganisms

By

Kenji AKIYAMA,
Emiko NISHII,
Yasuo NAKAO
and
Hideya KAZITANI

Hemolytic and precipitin reaction of nucleic acid and nucleoprotein fractions from *Sh. flexneri* 2a and *St. aureus* were studied and the results as follow are obtained.

1 In these microorganisms, hemolytic reactions of nucleic acid fractions were negative, and precipitin reactions were positive.

2 Nucleoprotein fraction from *Sh. flexneri* 2a grown on glucose added medea showed a stronger positive hemolytic reaction, whereas that from *St. aureus* tended to negative.

3 Nucleic acid fractions from these microorganisms grown on Fe^{++} deficient medea by adding α, α' -dipyridyl showed a negative hemolytic reactions.

4 From these results it could be seen that the immunological properties of nucleic acid or nucleoprotein fractions were affected by the composition of culturing medea.
