

# 精製細菌鞭毛に依る凝集反応の 電子顕微鏡的観察法に就て

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

志 田 次 夫  
福 島 里 志  
石 井 誠 一  
中 島 忠 厚  
仁 熊 浩 一 郎  
菅 昌 夫

[昭和33年10月6日受稿]

## 目 次

緒 言	
第1章 実験方法	
第2章 実験成績	
第3章 総括並びに考按	

結 語	
文 献	
写真説明	

## 緒 言

サルモネラ属の免疫反応は、診断及び抗原性の問題によく用いられる反応であるが、最もよく行われる凝集反応の中、菌体凝集反応は、光学像により明かにされている。

然し、鞭毛抗原による抗原性の相違は可成り重要であり、又細菌鞭毛の凝集反応像を、電子顕微鏡的に観察せんとする傾向があり、このためには菌体から分離した鞭毛のみを用いて観察する方法が望ましく、先づ鞭毛の精製が問題となってくる。

而して、細菌細胞から鞭毛を分離するには、単に器械的に振り動かすだけで充分であるが、完全な分離は遠心沈澱、又は鞭毛のみを通過し、菌体を遮る濾過管を用いての濾過で達成することが出来、これで免疫学的研究を行うに足りるだけの量の鞭毛を調製することが出来る。

然し、電子顕微鏡的にこの反応を観察する際には、更に純度の高く、適当濃度の調製が必要である。

次に鞭毛凝集反応の中で、特によく知られているのは、発疹チフスの血清診断法に用いられるプロテウス菌の場合に於ける。故に吾々は、この鞭毛の精製を試み、それによる凝集反応像を電子顕微鏡的に

観察することにした。

扱て、細菌鞭毛に抗血清を加えて行われる凝集反応を、電子顕微鏡的に観察することは、多くの人により試みられているようであるが、その報告にはあまり接していない。

それはまず第一に、鞭毛のみを自然の状態に近く精製することが困難であること、第二に、使用する抗血清中の蛋白が、電子線不透過性であるために、撮影が甚だ困難であり、その方法に大いに工夫を要すること、第三に、試料の自然乾燥に際して起るであろう自然凝集との鑑別が困難であること等である。

然し、第一の問題は、福見 (1952)<sup>1)</sup> により解決されたので、吾々は、その方法により得られた精製鞭毛を用いて、凝集反応を電子顕微鏡的に観察する方法を考慮するべく実験を行つた。

以下、得られた結果に就て報告する。

## 第1章 実験方法

教室保存の *Proteus* HX<sub>19</sub> 菌を普通寒天に18時間培養し、1 cc 中 2 mg の程度の生理的食塩水浮游液を作り、以下福見 (1952)<sup>1)</sup> の方法に従い、表1の如く、4000 r. p. m. で30分間遠心沈澱し、沈澱をもとの量まで再浮游し、ホモジナイザー 1000r. p. m.

で1分間以内軽く処理して鞭毛と菌体とを遊離させ、後これを再び 4000 r. p. m. で30分遠心沈澱し、上清を  $1/2$  硫酸アンモニア飽和溶液で1~2回洗滌し、その沈澱を蒸留水で稀釈した後、超遠心沈澱器で 44000 r. p. m. 30分間遠心した沈澱を再蒸留水に再浮遊、4000 r. p. m. に20分間再度遠沈、その上清を 44000 r. p. m. で30分間同様遠沈、この操作を3回繰返し洗滌した、その最後の上清が、いわゆる精製鞭毛液である。この際2回の洗滌でも充分であるが、その後の実験目的を考える時は、3回行つておく方が安全である。

図 1

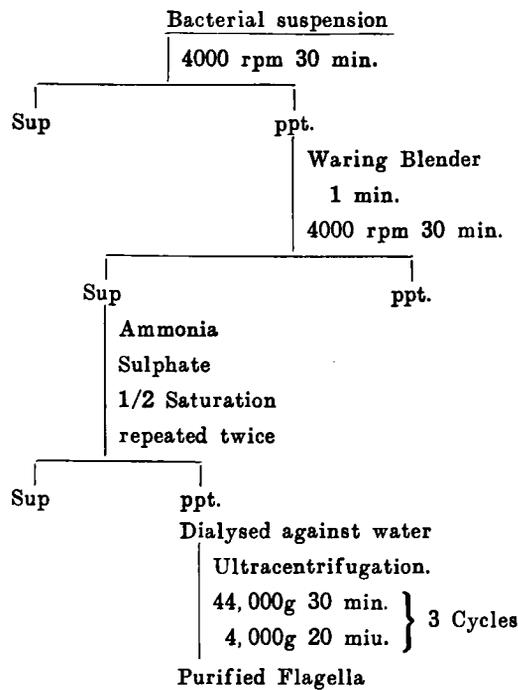


Figure. 1. Method for the purification of flagella

凝集反応像の撮影のための試料作製法は、倍数階段稀釈した血清と抗原の混合液を、メッシュに張つたコロチウム膜上に載せてその上で作用させ、これをシャーレ中に静置して乾燥を防ぎ、一定時間反応後乾燥する。

而して乾燥間近になつた所で、コロチウム膜の一端に濾紙を接触させ、他の一端から再蒸留水を流しつつ、他端の濾紙で吸引しつつ洗滌してゆく時は、血清をある程度除去することが出来、凝集鞭毛のみがコロチウム膜上に残り、電子顕微鏡試料として観察することが出来る。

## 第2章 実験成績

細菌の鞭毛はその性質上基だ切断されやすいため、ホモジナイザーにかける時は最も注意を要し、過剰に処理する時は、小切片となり過ぎるので、軽く行う方がよく、15秒位が最良である。しかる時はかなり自然の状態に近い長い鞭毛状態で純粹に得られる。

写真1は、2分間ホモジナイザー処理をしたもので、鞭毛は切断され過ぎたため、抗血清による凝集反応には不適である。

写真2は、20秒処理で、幾分長い鞭毛として精製されている。この程度であれば、鞭毛の微細構造の観察等を目的とするには不適當であると思われぬ。この写真2の一部を拡大した写真は、写真3に示すもので、1本の鞭毛は、捩れた恰もローブ状の構造を示しているのが見られる。

然しこの捩れの巾は約 20  $\mu$  であるため詳細を知るには、電子顕微鏡の分解能が問題となつてくるし、金属蒸着条件も可成り制限を受けることになる。

写真4は、ホモジナイザーにて約15秒処理したもので、この程度の長さを保つ程度ならば、鞭毛凝集反応の実験には適當であろう。而して、この写真は、本凝集反応に対する対照として行つた食塩水対照で、鞭毛は一樣に分布されている。これによつて、自然凝集反応との区別に対する恐れを除くことが出来る。

写真5は、この精製鞭毛抗原と、320倍稀釈抗血清との凝集像である。十数本の鞭毛が、互に平行して凝集している。この凝集度は対照とは全く異なる像であるし、抗血清の稀釈度の低い、つまり濃度の高い血清ほど著明なる点から確かに凝集像を示しているものである。但し対照に比して差程、鞭毛が肥大しているとも思われぬ。

写真6は、人の  $\gamma$ -グロブリン 3.0 mg 1 cc を同様作用させた対照であるが、 $\gamma$ -グロブリンが鞭毛の表面によく附着しているのがよく判るが、附着するのみで凝集像は呈していない。

次に、この電子顕微鏡像が果して眞の鞭毛凝集像を示すものなりや否やの検討をする必要があるが、それは抗血清の稀釈度と、この像に見られる如き凝集像の程度とが平行して、抗血清の稀釈度の高い程、鞭毛の集る程度が粗であり、その逆の場合は密であること、又対照の健康血清に於てはこの凝集像は全く認められず、写真4に示す生理的食塩水対照と同じであることから、一応眞の鞭毛凝集像であると思う。

又、試料作製時に濾紙を使用して再蒸溜水による洗滌を行うために、凝集像が蒙るであろう被害によつて誤つた結果をもたらすのではないかという心配も生ずる。この事は試験管による凝集反応の凝集価と一致するのみならず、電子顕微鏡による結果の方が、2倍程むしろ上位にあり、結果の判定はより正確であるように思われる。

### 第3章 総括並びに考按

細菌鞭毛の性質に関しては、運動性と直接関係があるらしいということと、鞭毛が特異的な抗原性を示すことが知られているのみで、その他の事は殆んど知られていない。

又、細菌の抗血清による凝集反応は、特に *Enterobacteriaceae* のある菌属では（菌体自身の示す抗原性と鞭毛の抗原性の組合せで）極めて特異的で菌体によるO凝集と鞭毛によるH凝集の区別も行われていて、前者は、光学的に容易に認め得るため研究観察されているが、後者のH凝集の機構を知ることは光学的には困難なるため、最近では電子顕微鏡的に観察することが望まれてきた。この種の実験は、やはり鞭毛のみを精製して実験を行うことが肝要であり、既に福見（1952）<sup>1)</sup>の報告している、硫酸アンモニヤを用いた超遠心沈澱法による精製法で完全に行われた。

但し、凝集反応を目的とするためには、鞭毛をなるべく自然に近い長さの状態で純粹に得る必要がある。それにはホモチナイザーの使用はせいぜい15秒程度で長時間の使用は、鞭毛が細切されすぎるため、結果を誤らす像となる恐れがある。

次に得られた鞭毛凝集像であるが、文献的には有鞭毛チフス菌を鞭毛抗体をもつた媒質中に再浮遊させると、鞭毛は顆粒状の沈澱物で被われ、それは鞭毛に完全に殻をかぶせてしまい、この肥厚した螺旋状構造物は、偶然にもつれがおこると接着し、そして細菌はくつつき合つてルーズな形の凝集をおこす。

この過程は電子顕微鏡により Mudd & Anderson (1941)<sup>2)</sup>が確めている。そして顆粒状の沈澱物は菌体をも鞭毛をも覆っている。鞭毛と細胞表面とに或る共通な成分の存在することを示唆している。

然し、彼により示された電子顕微鏡は、この実験の欠点として、鞭毛のみを精製して、菌体と別々のものに分けて実験を行わなかつたことであり、又附着している顆粒もさほどはつきりと認めることは出来ない。

更に、Mudd & Anderson (1941)<sup>2)</sup>に示した、抗鞭毛抗体で感作された細菌の電子顕微鏡写真は、たしかに鞭毛の肥厚を示している、感作された鞭毛と感作されていない鞭毛の巾を比較し抗体層の厚さを測っているが、この厚さはちょうどグロブリン分子が鞭毛のまわりに放線状に排列した場合に相当すると述べている。然しこの写真は、Shadowingを行っていないため、この範囲の大きさを知る事は少々困難である。

吾々の得た鞭毛凝集像は、試験管内実験の凝集価と併行した変化を示し、なお幾分優秀なる傾向すらある結果を得た。そして Mudd & Anderson の述べる被着顆粒等の観察は、電子顕微鏡の分解能の問題もあつて、正確に決定する事は現在なお困難と考える。

次に、鞭毛のロープ状構造に関しては、Starr & Williams (1951)<sup>3)</sup>が、Congo diptheroid bacterium の鞭毛に、かかる構造を認めて、実に見事な写真を示した。

吾々もプロテウス菌の鞭毛でこのような構造を認めたものと思う。

いずれにせよ、吾々は、細菌の鞭毛を精製し、それによる凝集反応を電子顕微鏡的に観察することに成功したものと考える。

### 結 語

変形菌の鞭毛を福見の方法により精製した。この精製鞭毛に抗血清及び人 $\gamma$ -グロブリンを作用せしめ、その形態を電子顕微鏡的に追究した結果、次の如き所見を得た。

- 1) 鞭毛精製の際のホモチナイザー使用時間は、15秒程度が最も適當であつた。
- 2) 変形菌鞭毛は、ロープ状構造を呈していた。
- 3) 抗血清作用による、鞭毛の凝集像が観察せられた。
- 4) 抗血清作用による、鞭毛の肥大像は認め難かつた。
- 5) 抗血清の稀釈度と、鞭毛凝集像の程度は平行する。
- 6) 人 $\gamma$ -グロブリン作用に於ては、鞭毛の凝集像は見られず、グロブリン粒子の附着像のみを観察した。

## 文 献

- 1) 福見, 内田: 電子顕微鏡, 2, 42—44, 1952.      3) Starr, M. P. and Williams, R. C. : J. Bact.  
 2) Mudd, S. and Anderson, T. F. : J. Immunol., 63, 701—706, 1942.  
 42, 251—266, 1941.

## 写 真 説 明

- 写真 1) *Protens* HX<sub>19</sub> 鞭毛,  
 2 分間ホモチナイザーで処理.  
 写真 2) *Proteus* HX<sub>19</sub> 鞭毛,  
 20秒間ホモチナイザーで処理.  
 写真 3) 写真 2 の一部拡大.  
 写真 4) *Proteus* HX<sub>19</sub> 鞭毛,  
 15秒間ホモチナイザーで処理.  
 写真 5) *Proteus* HX<sub>19</sub> 鞭毛,  
 免疫血清 (×320) 5 分間作用.  
 写真 6) *Proteus* HX<sub>19</sub> 鞭毛,  
 γ-グロブリン (3.0mg/cc) 5 分間作用.

## Electron-Microscopic Study on the Agglutination Reaction with Purified Bacterial Flagella

By

Tsuguo SHIDA  
 Satoshi FUKUSHIMA  
 Seiichi ISHII  
 Tadaatsu NAKASHIMA  
 Kohichiro NIKUMA  
 and  
 Masao SUGA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
 (Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

The flagella of *Bacillus Proteus* were purified according to Fukumi's method. To these purified flagella, antiserum and human γ-globulin were added, and the morphological change was electron microscopically observed. The results were briefly summarized as follows:

- 1) For the purification of flagella, homogenation for 15 seconds is the best.
- 2) The purified flagella of *Bacillus proteus* had a rope structure.
- 3) After the addition of antiserum, agglutination figure of flagella was electron-microscopically observed.
- 4) The enlargement of flagella, however, could not be observed after the addition of antiserum.
- 5) The grade of agglutination of flagella goes in parallel with the grade of dilution of antiserum
- 6) The addition of human γ-globulin did not cause agglutination, and there was observed only the adsorbing figure of globulin particles on them.

志田・福島・石井・中島・仁熊・菅論文附図

