

細菌多糖類の抗原性に関する研究

第 3 編

Proteus X19 菌多糖類のShwartzman 反応に就いて

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 大田原一祥教授)

専攻生 横 山 衛

〔昭和 32 年 11 月 1 日受稿〕

目 次

第1章 緒 論	Shwartzman 反応
第2章 実験材料	第3節 塩酸にて分割せる多糖類粉
第3章 実験方法	末と同蛋白粉末とによる
第4章 実験成績	Shwartzman 反応
第1節 培養濾液と三塩化醋酸抽出法	第4節 “Sprase” の Shwartzman 反
による多糖類の Shwartzman	応に対する影響
反応	第5章 考 按
第2節 塩酸にて分割せる多糖類溶	第6章 結 論
液と同蛋白溶液とによる	

第1章 緒 論

所謂 Shwartzman 反応は1928年 G. Shwartzman¹⁾ が腸チフス菌の培養濾液を用いて行つたが、その後多くの研究者によつて、他の多くの細菌培養濾液²⁾及び花粉³⁾、臓器エキス⁴⁾、腫瘍組織の抽出物⁵⁾等によつても起り得る事が明かにされている。

又、細菌並びに細菌培養濾液中の Shwartzman 反応 (以下 Sh 反応と略称) の有効因子に関しては、多くの研究が発表され、その有効因子の一つとして多糖類物質の存在する事は岡本⁶⁾、武田等⁷⁾及び渡辺等⁸⁾多くの研究者によつて明らかにされている。

1940年 Palmer⁹⁾ は所謂 Boivin 型抗原が Sh 反応を呈すると述べている。然しながら、Proteus X19 菌より分離した多糖類を以て行われる Sh 反応については、未だ充分なる検討が加えられていないようである。

著者は、Proteus X19 菌より三塩化醋酸抽

出法¹⁰⁾によつて分離精製した多糖類が Sh 反応陽性であり、かつ Hyaluronidase が Proteus X19 菌多糖類による Sh 反応を増強する事実を認めた。又、塩酸を以て本菌を分割して得た多糖類と蛋白とを用いて更に Sh 反応を行い、両者の Sh 反応に対する態度について検討したのでここに報告する。

第2章 実験材料

(1) 使用 菌 :

使用菌は岡山大学医学部微生物学教室保存の Proteus X19 菌の分与を受けて之を使用した。

(2) 動 物 :

実験のための動物はどれも体重3,000 gm 前後の家兎を使用した。

(3) 細菌培養濾液 :

前記 Proteus X19 菌を Bouillon 中で 37°C, 20時間培養後、これを滅菌生理的食塩水を用い4倍に稀釈した後、再びこれを Kolle 氏

瓶普通寒天平板培養基に流して 37°C, 24時間培養した。培養後これを生理的食塩水で洗滌し、この洗滌液を強力に遠心(4,000 r/Sec 60分)した後、上清を取り滅菌用 Seitz-Werke 氏濾過器で濾過した液を使用した。

(4) Proteus X19 菌多糖類 :

前記 Proteus X19 菌より、第1編に於て述べた如く、三塩化醋酸抽出法により抽出精製後使用した。

(5) 塩酸にて分割せる多糖類溶液及び蛋白 :

前記 Proteus X19 菌(湿菌)を生理的食塩水を加えて乳鉢中で磨碎し、これを強力遠心して得た上清に N/10-HCl 溶液を加え、再び強力遠心して得た上清を多糖類分屑とし、沈渣を蛋白分屑として使用した。

(6) 塩酸にて分割せる乾燥多糖類及び蛋白 :

前記 Proteus X19 菌(湿菌)を生理的食塩水を加えて乳鉢中で磨碎し、これを強力遠心して得た上清に N/10-HCl 溶液を加え、再び遠心して得た上清に Aceton を添加して生じた沈澱を乾燥せしめて多糖類粉末とした。又、N/10-HCl 溶液添加後の遠心沈渣は乾燥せしめて蛋白乾燥粉末として使用した。

(7) Hyaluronidase :

“Sprase”(持田製薬)を使用した。

第3章 実験方法

Sh 反応を行うには、前記培養濾液、多糖類及び蛋白を夫々第1~4表に示す如く生理的食塩水を以て稀釈し、これら各稀釈液を予め脱毛せる家兎の腹部皮内に 0.25 cc 宛準備注射し、惹起注射として24時間後前記培養濾液の 1:20 生理的食塩水稀釈液を家兎の体重 1 kg 当り 1 cc 宛耳静脈内に注射した。然して惹起注射後 4~5 時間に前記皮内準備注射箇所の変化を観察した。

Sh 反応の Hyaluronidase の影響に関する実験では、“Sprase”は惹起注射の 2 時間前に準備注射部位の皮内に各々 2,000 VRU(0.2cc 生理的食塩水溶液)宛て注射した。

又、培養濾液と三塩化醋酸抽出法による多糖類との Sh 反応実験は、両者の Sh 反応準備能力の有無を検するために行い、塩酸にて湿菌より分割せる多糖類と蛋白とを夫々同一量に溶解して行つた Sh 反応実験は、両者の同一量に於ける準備能力を検するために行い、又、塩酸にて分割せる多糖類粉末と同蛋白粉末との Sh 反応実験により、両者の単位当りの準備能力を検した。

各実験に当り、比較すべき検体を同一家兎の腹部に同時に夫々準備注射して、その比較を容易ならしめた。

なお、惹起注射はいつも培養濾液を用いた。

判定に当つては、緒方¹⁾の記載する判定規準に準じたが、正確を期するために著者は反応面積を測定する方法を考案し之を併記した。

第4章 実験成績

第1節 培養濾液と三塩化醋酸抽出法による多糖類の Shwartzman 反応

第1表に示す如く、Proteus X19 菌培養濾液と三塩化醋酸抽出法による多糖類との Sh 反応は、培養濾液に於ては、充血反応が最高 1:4 まで認められ、多糖類に於ては、出血反応が最高 1:500 まで、充血反応は全稀釈度に認められた。

第2節 塩酸にて分割せる多糖類溶液と同蛋白溶液とによる Shwartzman 反応

塩酸にて分割せる多糖類と蛋白溶液との Sh 反応では、第2表に示す如く、多糖類に於ては充血反応を最高 1:8 まで認め、蛋白に於ては壊死反応を最高 1:2、出血反応並びに充血反応は全稀釈度に認めた。

第3節 塩酸にて分割せる多糖類粉末と同蛋白粉末とによる Shwartzman 反応

塩酸で分割せる多糖類粉末と同蛋白粉末との Sh 反応では、第3表に示す如く、多糖類に於ては出血反応を最高 1:100 に認め、充

第1表 三塩化醋酸抽出法による Prot. X19菌多糖類と同菌培養濾液による Sh 反応

反応強度		Prot. X19菌多糖類						反応強度		Prot. X19菌培養濾液				
		稀釈度 家兎番号	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500			稀釈度 家兎番号	1:1	1:2	1:4	1:8
壊死	A	—	—	—	—	—	壊死	A	—	—	—	—		
	B	—	—	—	—	—		B	—	—	—	—		
出血	A	0.4	0.2	—	—	—	出血	A	—	—	—	—		
	B	0.8	0.2	0.1	—	—		B	—	—	—	—		
充血	A	6.2	2.0	0.1	0.1	0.05	充血	A	0.1	0.1	0.05	—		
	B	8.1	3.0	1.2	0.1	0.1		B	2.9	2.7	2.1	—		

表中の数字は反応面積 (平方糎)

第2表 塩酸にて分割せる多糖類溶液と同蛋白溶液とに依る Sh 反応

反応強度		Prot. X19菌多糖類					反応強度		Prot. X19菌蛋白				
		稀釈度 家兎番号	1:1	1:2	1:4	1:8			稀釈度 家兎番号	1:1	1:2	1:4	1:8
壊死	A	—	—	—	—	壊死	A	0.1	—	—	—		
	B	—	—	—	—		B	0.3	0.1	—	—		
出血	A	—	—	—	—	出血	A	0.7	0.6	0.5	0.2		
	B	—	—	—	—		B	0.4	0.3	0.2	0.1		
充血	A	0.4	0.4	0.3	0.15	充血	A	6.2	5.0	1.8	1.3		
	B	0.2	0.16	—	—		B	10.6	8.4	2.0	1.0		

表中の数字は反応面積 (平方糎)

第3表 塩酸にて分割せる Prot. X19菌多糖類粉末と同蛋白粉末とに依る Sh 反応

反応強度		Prot. X19菌多糖類							反応強度		Prot. X19菌蛋白						
		稀釈度 家兎番号	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000			稀釈度 家兎番号	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
壊死	A	—	—	—	—	—	—	壊死	A	0.1	—	—	—	—	—		
	B	—	—	—	—	—	—		B	—	—	—	—	—	—		
出血	A	—	—	—	—	—	—	出血	A	1.3	0.5	0.2	—	—	—		
	B	0.2	—	—	—	—	—		B	0.8	0.6	—	—	0.2	—		
充血	A	2.0	1.3	1.0	0.8	0.6	0.3	充血	A	2.6	0.6	0.4	0.2	0.2	0.15		
	B	0.8	1.1	0.3	0.3	0.3	0.1		B	1.2	1.0	0.4	0.2	0.3	0.2		

表中の数字は反応面積 (平方糎)

血反応を最高 1:5,000 まで認めた。又蛋白に於ては壊死反応を 1:100 に認め、出血反応を最高 1:500 に、充血反応を全稀釈度に認めた。

第4節 “Sprase” の Shwartzman 反応に対する影響

“Sprase” の影響を観察せる Sh 反応では、第4表に示す如く、“Sprase” を注射せる甲

第 4 表 “Sprase” の Sh 反応に対する影響

“Sprase” を注射せる場合 (甲群)							“Sprase” を注射せざる場合 (乙群)								
反応強度	稀釈度 家兎番号	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	生理的食塩水	反応強度	稀釈度 家兎番号	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	生理的食塩水
	B	—	—	—	—	—	—		B	—	—	—	—	—	—
出血	A	—	—	—	—	—	—	出血	A	—	—	—	—	—	—
	B	1.0	—	—	—	—	—		B	—	—	—	—	—	—
充血	A	5.1	4.5	1.8	1.7	1.4	—	充血	A	0.9	0.5	0.3	0.1	0.1	—
	B	3.9	0.7	0.6	0.6	0.1	—		B	1.0	0.3	0.1	0.1	—	—

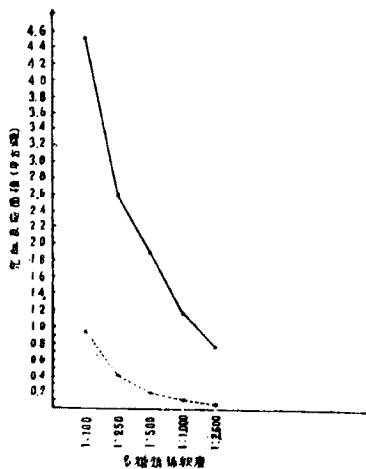
表中の数字は反応面積 (平方糎)

群家兎では出血反応を 1:100 に認め、充血反応は全稀釈度に認めた。他方、“Sprase” を注射しない乙群家兎では充血反応を最高 1:2,500 に認めた。

又、甲群家兎の充血反応面積は乙群家兎の充血反応面積に比し著しく大であつて、第 5 図に示す如く、甲乙両群家兎の充血反応面積を比較すれば、“Sprase” の注射による Sh (充血) 反応面積の増強率は約 1:8 であつた。

第 5 図 “Sprase” の影響による Sh 反応比較図

- は “Sprase” を注射せる場合の充血反応面積 (平均値)
- …… は “Sprase” を注射せざる場合の充血反応面積 (平均値)



第 5 章 考 按

細菌多糖類が Sh 反応の有効物質の一つである事は以前より多くの学者によつて知られているが、Proteus X19 菌多糖類による Sh 反応に関しては未だ充分なる検討が行われていない。

著者は、三塩化醋酸法を用いて Proteus X19 菌より多糖類を抽出精製し、これを用いて Sh 反応を行つた。又、塩酸によつて本菌より多糖類及び蛋白を分割して、これらの Sh 反応準備能を比較して蛋白の優位にある事を認め、かつ三塩化醋酸抽出法により得た本菌多糖類による Sh 反応 (充血) の面積が Hyaluronidase の注射によつて増強される点を認め得た。

Glick¹²⁾ 等は B. Proteus の強アルカリで分離した含水炭素分屑は惹起能をもっているが、準備能は有しないと述べているが、武田等⁷⁾ が大腸菌濾液より醋酸を以て分離した多糖類は準備能を有する。著者の行つた実験では Proteus X19 菌の多糖類は準備能を有する事が判明した。

塩酸を以て菌体を処理し分割した多糖類と蛋白とを以て行つた Sh 反応では、この分割方法がいささか精製度に欠ける方法である点は考慮されねばならぬとしても、両者の Sh 反応準備能に著しい差異があつたので、本菌多糖類に比し本菌蛋白の準備能についての優

位性は充分認められると考えられる。

Sh 反応に対する Hyaluronidase の影響については、Bier¹³⁾、McClellan¹⁴⁾ 及び Duran-Reynals¹⁵⁾ 等が Testicle extract を用い、又、村上¹⁶⁾は“Sprase”を用いて、その反応面積の増強する事を認めている。著者が“Sprase”を用いて行つた実験では、Sh 反応面積の増強率は約 1.8 であつたが、これは村上の実験成績に概ね一致すると思われる。

第 6 章 結 論

Proteus X19 菌培養濾液及び三塩化醋酸抽出法により本菌より分離精製して得た多糖類、並びに本菌の塩酸による多糖類及び蛋白分屑を用いて、Sh 反応を行い、かつ Hyaluronidase

の本菌多糖類による Sh 反応に対する影響を検討した結果、次の如き成績を得た。

(1) Proteus X19 菌培養濾液並びに三塩化醋酸抽出法による本菌多糖類は Sh 反応陽性である。

(2) 本菌を塩酸にて分割して得た多糖類は同蛋白より Sh 反応準備能が低い。

(3) Hyaluronidase は Sh 反応面積を増強せしめる。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師大田原教授に深謝するとともに、種々御助言を戴いた緒方助教授に謝意を捧げる。

(本論文の要旨は昭和31年4月第26回日本衛生学会総会に於て発表した)

主 要 文 献

- 1) Shwartzman: Phenomen of local tissue reactivity and its immunological, pathological and clinical significance. P. B. Hoeber. New York, 1937.
- 2) 山根: 岡山医学会雑誌, 44 (2) 495, 昭和7年.
- 3) 酒井: 岡山医学会雑誌, 46 (8) 1891, 昭和9年.
- 4) Antopol: J. Infect. Dis., 61, 334, Nov-Dec.
- 5) 今尾: 血清学免疫学雑誌, 1 (3) 359, 昭和15年.
- 6) 岡本, 久津見: 実験医学雑誌, 25 (6) 596, 昭和16年.
- 7) 武田, 山下: 日本細菌学雑誌, 4 (1) 45, 昭和24年.
- 8) 渡辺, 栗林: 日本細菌学雑誌, 5 (3) 141, 昭和25年.
- 9) Palmer, Gerlough: Science, 92, 155, 1940.
- 10) Boor, Miller: J. Infect. Dis., 35, 47, 1944.
- 11) 緒方: 血清学実験法(その手ほどきから)南山堂, 昭和19年.
- 12) Glick, Antopol: J. Infect. Dis., 64, 22, Jan-Feb.
- 13) Bier: Compt. rend. Soc. Biol., 112, 407, 1933.
- 14) Mc Clean: J. path. and Bact., 33, 1045, 1930.
- 15) Duran-Reynals: J. Exp. Med., 58, 451, 1933.
- 16) 村上: 東京医学雑誌 60, (5~6) 287, 昭和28年.

Studies on the Antigenicity of Bacterial Polysaccharides**Part 3:****On the Shwartzman Phenomenon by B. Proteus X19
Polysaccharide**

By

Mamoru Yokoyama**Department of Public Health Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. K. Ohtahara)**

The author has carried out Shwartzman phenomenon by using culture filtrate of B. Proteus X19, refined polysaccharide separated from this bacillus by hydrochloric acid. And also influences of hyaluronidase on Shwartzman phenomenon by polysaccharide of this bacillus have been examined. The results of which are as follows.

- 1) The Shwartzman phenomenon is positive in the cases of culture filtrate of B. Proteus X19 and polysaccharide of this bacillus by trichloracetate abstraction method.
 - 2) Polysacchride obtained by dividing this bacillus with hydrochloric acid is less able to prepare Shwartzman phenomenon than protein by the same method.
 - 3) By the present experimental method hyaluronidase has increased the area of Shwartzman phenomenon.
-

横山論文附図

第 1 図



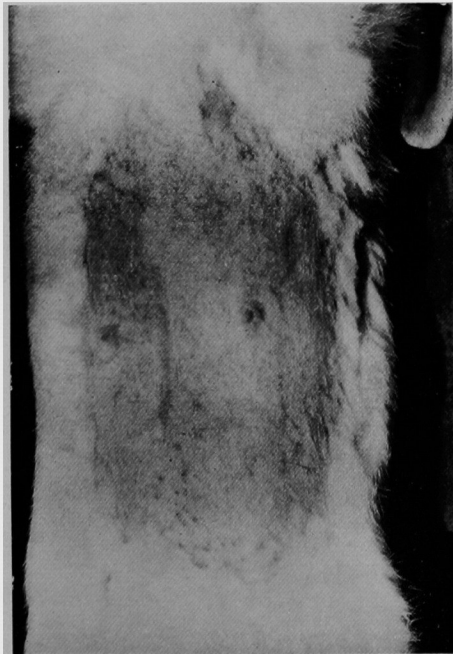
(1) Proteus X19 菌培養濾液 (向つて右側) と Proteus X19菌多糖類 (左側) による Schwartzman 反応, ←(イ) は充血反応, ←(ロ) は出血反応.

第 2 図



(2) 塩酸で分割した Proteus X19菌多糖類溶液 (向つて左側) と同蛋白質溶液 (右側) による Schwartzman 反応, ←(イ) は充血反応, ←(ロ) は出血反応.

第 3 図



(3) Schwartzman 反応準備注射を行つたまま (惹起注射施行前) の状態.