

## 細菌多糖類の抗原性に関する研究

## 第 5 編

## Streptococcus 多糖類に就いて

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	第 1 節 乾燥粉末の収量及び化学的性状
第 2 章 実験材料	第 2 節 沈降反応（重層法，混合法）及び細菌凝集反応
第 3 章 実験方法	第 5 章 考 按
第 1 節 Streptococcus 多糖類の精製法	第 6 章 結 論
第 2 節 免疫法	
第 4 章 実験成績	

## 第 1 章 緒 論

著者は第 1 編及び第 4 編に於て，所謂 Boivin 型抗原としての多糖類を Gram 陰性菌たる *Proteus* X19 菌及び *Proteus* XK 菌より，三塩化醋酸抽出法，Diethylene glycol 抽出法及び Trypsin 消化法の 3 法を用いて分離精製し，之を用いて免疫学的諸実験を行い其の成績を報告した。

これ等の方法はいづれも加熱除蛋白操作が無い為に，其の抗原物質を可及的自然の状態に於て分離し得る事が特徴であつた。

1951年，Schmidt<sup>1)</sup> は Gram 陽性菌たる連鎖状球菌多糖類を分離する方法として Pepsin 消化法を試み，加熱 Formamide 法と比較しているが，著者は此の Pepsin 消化法を検討し，これを簡易化して，*Streptococcus viridans* より其の多糖類を消化分離し，之を用いて 2～3 の免疫学的実験を試みたので，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 *Streptococcus viridans* の分与を受けて之を使用した。

(2) 動物：

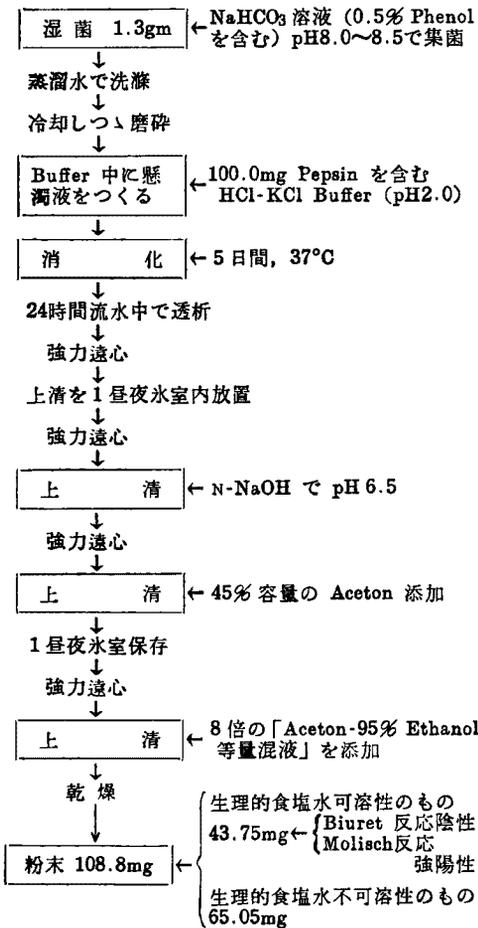
免疫のための動物は体重約 3,000 gm の家兔を使用した。

## 第 3 章 実験方法

## 第 1 節 Streptococcus 多糖類の精製法

前記 *Streptococcus viridans* を Kolle 氏瓶含肝臓エキス血液寒天平板培養基を用いて 24 時間培養した後，第 1 表に示す如く，0.5 % Phenol を含む重曹溶液 (pH 8.0～8.5) で集菌した湿菌塊 1.3 gm を蒸溜水を以て充分洗滌し，これを氷塊で冷却しつつ乳鉢中で磨砕した。次で，此の菌塊を HCl-KCl Buffer 90 cc (pH 2.0) に投入して懸濁液を作り，之に 100.0 mg の Pepsin 末（石津）を添加し，5 日間 37°C に保存した後，之をセロファン膜に包み 24 時間流水中に透析した。透析後の液量 90 cc を強力に遠心して其の上清を 1 昼夜氷室中に冷却した後，再び強力遠心し，其の上清 80 cc を N-NaOH 溶液を以て pH 6.5 とし，再び強力遠心した。然して，其の上清に

第1表 Streptococcus 多糖類消化順序  
Streptococcus viridans



45%容量の Aceton を加え、其の儘、1昼夜氷室内で多糖類を沈澱せしめた後、再び強力に遠心して其の上清に8倍容量の“Aceton-95% Ethanol 等量混液、”を加えて此れを送風乾燥した。

第2節 免疫法

前記 Streptococcus viridans を試験管含肝臓エキス血液寒天斜面培養基に24時間培養し、この1斜面を 10 cc の生理的食塩水に浮遊せしめ之を 60°C の重湯煎中で2時間加熱殺菌した。これを1週2回の間隔で第1回 1 cc、第2回 2 cc、第3回 3 cc、以後 3 cc を前記家兎の耳静脈内に注射し<sup>2)</sup>、18回注射後8日目に全採血して其の血清を分離し、1:100

Merthiolate を 1/100 容量添加して氷室内に保存した。

第4章 実験成績

第1節 乾燥粉末の収量及び化学的性状

第3章第1節に於て述べた方法に依つて得た乾燥粉末の収量は第1表に示す如く、湿菌 1.3 gm に対して 108.8 mg であり、生理的食塩水可溶性のもの 43.75 mg 不溶性のもの 65.05 mg であつた。可溶性のものに就いて行つた Biuret 反応は陰性、Molisch 反応は強陽性であつた。

第2節 沈降反応 (重層法, 混合法) 及び細菌凝集反応

第2表に示す如く、前記 Streptococcus

第2表 沈降反応

Streptococcus 多糖類 ↔ 抗 Streptococcus 家兎血清系

抗体稀釈	抗原稀釈								対照
	1:1	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	
1:1,000	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
1:2,500	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-
1:5,000	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
1:10,000	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
1:25,000	±	±	±	±	-	-	-	-	-
1:50,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

viridans 多糖類を生理的食塩水を以て稀釈し、これを抗原とし、第3章第2節に於て述べた抗 Streptococcus viridans 家兎血清を抗体として Uhlenhuth 氏法<sup>3)</sup> による沈降反応を行つた結果、抗原価 1:10,000 を得た。

又、抗原抗体稀釈法<sup>4)</sup> に依る沈降反応では、抗原価 1:10,000、抗体価 1:250、結合帯抗原価 1:2,500 の成績を得た。

又、混合法<sup>5)</sup> に依る沈降反応では、第3表に示す如く、抗体稀釈 1:50 に於て抗原価 1:10,000、抗体価 1:250、結合帯抗原価 1:2,500 の成績を得た。

次に本抗血清を用いて Streptococcus viridans 菌に対して行つた Griffith 氏スライド

第3表 混合法

Streptococcus 多糖類 ↔ 抗 Streptococcus 家兎血清系

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000
抗原稀釈					
1:1,000	+	+	±	-	-
1:2,500	+	+	+	±	-
1:5,000	+	+	+	-	-
1:10,000	+	+	+	-	-
1:25,000	±	-	-	-	-
1:50,000	-	-	-	-	-
対 照	-	-	-	-	-

凝集反応<sup>6)</sup>では、第4表Aに示す如く、凝集価 1:250 を得、又、Probe-Agglutination<sup>6)</sup>では、第4表Bに示す如く、凝集価 1:250 の成績を得た。

第4表 凝集反応

Streptococcus ↔ 抗 Streptococcus 家兎血清系  
A Griffith 氏スライド凝集反応

稀釈度	1:100	1:250	1:500	1:1,000	対 照
検 体					
抗 血 清	+	+	-	-	-

B Probe-Agglutination

検 体	時間	稀釈度	1:100	1:250	1:500	1:1,000	対 照
抗血清	2時間		+	+	-	-	-
	24時間		+	+	-	-	-

第5章 考 按

Streptococcus より多糖類を抽出分離する方法として Lancefield<sup>7)13)</sup> は稀塩酸を用い、Fuller<sup>8)</sup> 及び Zittle<sup>9)</sup> 等は Formamide を用いて行つたが、此等は各れも 100°C~150°C の高熱を加えて操作する為に其の抗原性に变化を与える可能性があると考えられている。

又、本菌体を破壊する為に音波を用いる方法が Chamber 等<sup>10)</sup> 及び Mudd<sup>11)</sup> 等に依つて行われているが、Folsdorf 等<sup>12)</sup> は卵白 Albumin が音波に依つて変性する事を認めているので、音波に依る菌体の破壊は蛋白のみ

ならず多糖類にも多少の影響があるのではないかと推定される。又温度を下げる為の大装置が必要である点も欠点であらう。

結局、Lancefield<sup>7)13)</sup>、Heidelberger 等<sup>14)~16)</sup> に依つて行われた菌体を冷却しつつ機械的に破碎すると云う方法が比較的温和な方法であらうと考えられる。この様な理由から、Schmidt<sup>1)</sup> が Streptococcus 多糖類を Pepsin で消化し分離精製するに当つて菌体を冷却しつつ Booth-Green mill で破碎している方法は、pH 2.0 の HCl-KCl Buffer を用いて細菌の汚染を防ぐ方法と共に優れた分離法であると思われる。

著者は、Schmidt の方法に準じ、Streptococcus viridans を用いて其の多糖類を消化分離して、其の Pepsin 消化法を検討すると共に、其の方法を簡易化したのであるが、著者の分離した多糖類を以て行つた前記諸実験に於て、其れが抗原として充分使用に耐え得るものと考えられる。

又、細菌凝集反応に於ては、Streptococcus viridans の均等菌浮游液を得る事が甚だ難しく、従つて其の反応判定は困難であつた。其れ故、本菌では細菌凝集反応よりも沈降反応の方が有利であると思われる。

第6章 結 論

Pepsin を用いて Streptococcus viridans を消化して得た多糖類を以て、抗 Streptococcus 家兎血清と沈降反応を行つて、次の如き成績を得た。

(1) Streptococcus viridans 湿菌 1.3 gm より 43.75 mg の生理的食塩水可溶性の多糖類を得た。

(2) 沈降反応に於ては Uhlenhuth 氏法では抗原価 1:10,000 であり、抗原抗体稀釈法では抗原価 1:10,000、抗体価 1:250、結合帯抗原価 1:2,500 であつた。又、混合法では抗体稀釈 1:50 に於て抗原価 1:10,000、抗体価 1:250、結合帯抗原価 1:2,500 であつた。

(3) 細菌凝集反応に於ては、Streptococcus

viridans の均等菌浮游液を得難い為、其の反応の判定が困難であつた。

(4) 本多糖類は長期保存が可能である。

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。

### 主 要 文 献

- |   |  |
|---|--|
| 1) Schmidt · J. Exper. Med., 95, 105, 1952.                                 | 1942.  |
| 2) 須之内：岡山医学会雑誌, 41, (1) 1, 昭4年.   | 10) Chamber, Weil : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 924, 1938. |
| 3) Uhlenhuth . Prkt. Anleit. zur Ausführ. biolog. Eiweissdiff. (Jena) 1909. | 11) Mudd, Wiener · J. Immunol., 45, 21, 1942.                  |
| 4) Ogata : Z. f. Immunität Forschung. Org. Bd. 39, 270, 1924.               | 12) Folsdorf, Chamber : J. Immunol., 28, 297, 1935.            |
| 5) Dean Webb · J. path. and Bact., 29, 473, 1926.                           | 13) Lancefield . J. Exper. Med., 42, 377, 1925.                |
| 6) 中村豊：細菌学免疫学講本. 克誠堂書店,   | 14) Heidelberger, Kendall : J. Exper. Med., 54, 515, 1931.     |
| 7) Lancefield . J. Exper. Med., 47, 91, 481, 1928.                          | 15) Heidelberger, Kendall : J. Immunol., 30, 267, 1936.        |
| 8) Fuller · Brit. J. Exp. path., 19, 130, 1938.                             | 16) Heidelberger, Scherp · J. Immunol., 37, 563-1939.          |
| 9) Zittle, Harris : J. Biol. Chem., 142, 823,                               |  |

## Studies on the Antigenicity of Bacterial Polysaccharides

### Part 5:

### On the Streptococcus Polysaccharide

By

Mamoru Yokoyama

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

With the use of pepsin the author has extracted a polysaccharide by digesting *Streptococcus viridans*. Having carried out precipitation between this polysaccharide and anti-streptococcal rabbit serum, the following results have been obtained.

1) From 1.3 gm of wet bacilli of *Streptococcus viridans* 43.75 mg. of polysaccharide has been obtained, which is found to be soluble in physiological salt solution.

2) In the precipitation reactions titers are; antigen titer, 1 : 10,000 by Uhlenhuth method; and antigen titer, 1 : 10,000, antibody titer 1 : 250 and antigen titer of binding zone 1 : 2,500 by antigen-antibody-dilution method. Furthermore, Antigen titer has been found to be 1 : 10,000 in antibody-dilution 1 : 50 and antibody titer 1 : 250 and antigen titer of binding zone 1 : 2,500 by mixprobe method.

3) In the agglutination of bacillus, owing to the difficulty in getting uniform bacillus emulsions of streptococcus, it has been found quite difficult to determine definitely the agglutination.

4) A long storage of this polysaccharide is also possible.