

IV 報 文

A群溶連菌のMタンパクと血清中のM抗体について

—M-1, 6, 12型について—

山 脇 徳 美* 森 田 盛 大* 天 野 保 二**
石 田 名 香 雄***

I はじめに

本県において、法定伝染病である猩紅熱が多発していることから、我々は猩紅熱の病原菌であるA群溶連菌の細菌学およびA群溶連菌の型特異的Tタンパクに対するT抗体を指標とした血清疫学的調査^{1-14, 17)}を行ってきた。また、海外におけるA群溶連菌の侵襲状況を明らかにする目的の一環として、南米のエクアドルの住民のT抗体保有状況を調査した¹⁸⁾。さらに、県内住民のT抗体保有状況と感染症病原菌検索から検出されるA群溶連菌の菌型との間に相異がみられたことから、A群溶連菌の菌型ごとに病原指数（仮称）を求め、A群溶連菌を4群に群別する予防医学的研究にも着手した^{15, 16)}。

しかし、TタンパクはA群溶連菌の病原性には関与しないこと、T抗体は感染防御抗体として作用しないこと²³⁾、および感染初期にペニシリン等の抗生物質で治療をうけると抗体が産生されない⁷⁾という欠点があった。

そこで、A群溶連菌の細胞壁表面に存在し、A群溶連菌の病原性において重要な役割を担っているMタンパク^{20, 21)}に注目した。すなわち、酸加熱抽出粗Mタンパクから限外ろ過濃縮、DEAE, CMセルロースイオン交換クロマトグラフィーの手段を用いてM-12タンパクを精製して、受身赤血球凝集（PHA）試験用抗原を作製し、これを用いて県内住民の血清中のM抗体を測定し、T-12抗体保有状況とM-12抗体保有状況を比較検討した結果、Mタンパクを指標とした血清疫学調査が有用性が高いことを報告してきた¹⁹⁾。

今回は、A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者とT-1, 12型菌が咽頭ぬぐい液より分離培養された猩紅熱患者から採取した血清中におけるM抗体とT抗体について調査したのでその概要について報告する。

II 材料と方法

A. 被検血清

1. A群溶連菌保菌者の血清

昭和47～49年に秋田県平鹿郡十文字町と由利郡西

目町の幼稚園児と小学校児童の保菌調査をした際に、A群溶連菌T-1型菌保菌者29名、T-6型菌保菌者1名、T-12型菌保菌者28名計58名から血清を採取した。

2. 猩紅熱患者の血清

昭和56～57年に微生物感染症定点観測で猩紅熱と診断され、咽頭ぬぐい液からA群溶連菌T-1型菌（1名）または、T-12型菌（7名）が分離培養された患者から急性期と回復期に血清を採取した。

なお、被検血清は検査時まで-20℃に保存した。

B. A群溶連菌M-1, M-6, M-12タンパクの精製

A群溶連菌T-1, T-6, T-12型菌を用い、すでに報告した方法¹⁹⁾でMタンパクを精製し、さらにセファデックスG-200（Pharmacia）によるゲルクロマトグラフィーを行なってより高度に精製すると共に、分子量の測定を行なった。その概要を図1に示した。すなわち、A群溶連菌T-1, T-6, T-12型菌を1%ブドウ糖、0.8%炭酸水素ナトリウム、0.1%リン酸ナトリウムを加えたトッドヘット培地（Difco）で48時間培養後、3,000回転30分間の遠心により菌体を集め、-PBSで3回洗浄し、-PBSで25%菌体浮遊液とした。1N塩酸でpHを2.0に調整し、水浴中で95℃10分間加熱後、冷却し、1N水酸化ナトリウムでpHを7.2に調整し、10,000回転で1時間遠心して、その上清を採取した。この酸加熱抽出をもう一度繰り返して行ない、上清を合わせた。酸加熱抽出上清を-PBSに一夜透析し、限外ろ過膜YM-10（Amicon）で20mlまで濃縮し、0.02Mリン酸緩衝液（P.B.）pH8.0に一夜透析し、0.02MP.B. pH8.0で平衡化したDEAEセルロースカラム（1.6×40cm）にかけ、はじめに0.02MP.B. pH8.0、ついで、P.B. pH8.0で0.02Mから0.3Mまでの濃度勾配で溶出した。各分画のMタンパクの検出は加熱死菌を抗原として免疫したウサギ抗M-1, M-6, M-12血清を用いたゲル内沈降反応によって行なった。また、Tタンパクの検出はトリプシン消化した菌体を抗原として免疫したウサギ抗T-1, T-6, T-12血清を用い、Mタンパク同様、ゲル内沈降反応によって行なった。

* 秋田県衛生科学研究所 ** 秋田大学医学部機器センター *** 東北大学医学部細菌学教室

Group A Strept. type 1, 6, 12 culture
(Todd Hewitt Broth pH 7.8 supplemented with
1 % Glucose, 0.8 % NaHCO_3 , 0.1 %
 Na_2HPO_4 37°C, 48h.)

Centrifugation at 3,000 rpm for 30 min.

whole cell, Acid extraction (pH2.0, 95°C, 10min.)

Dialysis against - PBS

Ultrafiltration (Amicon YM 10)

Dialysis against 0.02M, P. B., pH 8.0

DEAE cellulose column chromatography
(0.02M, P.B., pH8.0 - 0.3M, P.B., pH8.0)

Peak DE - I

Ultrafiltration (Amicon YM 10)

Dialysis against 0.005M, Ac. B., pH 5.5

CM cellulose column chromatography
(0.1M, Ac.B., pH 5.5, 0.1M, P.B., pH 7.0)

Peak CM - IV

Ultrafiltration (Amicon YM 10)

Gel filtration (Sephadex G - 200)
(- PBS)

Purified M - 1, 6, 12 protein

図1. Mタンパクの精製過程

0.02MP.B.pH 8.0で溶出されたMタンパク活性画分をプールして限外ろ過法により濃縮し、0.005 M酢酸緩衝液 (Ac.B.) pH5.5 に一夜透析して、CMセルロースカラム (1.6 × 40cm) クロマトグラフィーを行なった。溶出はまず0.1M Ac.B.pH 5.5で行ない、ついで0.1MP.B.pH 7.0で行なった。0.1MP.B.pH 7.0で溶出されたMタンパク活性画分を限外ろ過濃縮し、-PBSで平衡化したセファデックスG-200 カラム (2.2 × 85 cm) にかけて、ゲルろ過を行ない、精製Mタンパクを得た。

C. M抗体の測定法

血清中のM抗体の測定はすでに報告した方法¹⁹⁾で行なった。すなわち、至適量の精製Mタンパクをグルター

ルアルデヒドで処理した羊赤血球に感作し、PHA抗原を作製した。ついで、マイクロプレートで血清を2倍系列希釈し、0.3 %羊赤血球PHA抗原を加えて振とう混合後、室温に2時間放置し、赤血球の凝集像を判定した。M抗体価は75%以上赤血球の凝集のあった血清の最高希釈倍数の逆数で示した。

D. T抗体の測定法

森田らのマイクロプレート法^{2, 3, 7)}により、血清中のT凝集素価を測定し、T抗体価とした。

III 成 績

A. Mタンパクの精製

1. M-12タンパクの精製

a. DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

A群溶連菌T-12型菌を1%ブドウ糖、0.8%炭酸水素ナトリウム、0.1%リン酸ナトリウムを加えたトッドヘット培地60ℓで48時間培養後、遠心により集菌し、-PBSで3回洗浄して59g (湿重量)の菌体を得た。この菌体を2回酸加熱抽出し、-PBSに一夜透析後、限外ろ過濃縮した粗M-12タンパクを0.02MP.B.pH8.0に透析し、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーを行なった成績を図2に示した。M-12タンパク活性は0.02MP.B.pH 8.0で溶出されるピーク (DE-I)と、0.3MP.B.pH 8.0までの濃度勾配で溶出されるピーク (DE-II)に含まれたが、予備実験の結果から、Tタンパク活性画分を含むピークDE-Iを次の精製段階への材料とした。

b. CMセルロースカラムクロマトグラフィー

DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーで得られたピークDE-Iを集め、限外ろ過法により濃縮し、0.005MAc.B.pH 5.5に透析し、CMセルロースカラムクロマトグラフィーを行なうと、図3のようにCM-I, II, III, IVの4つのピークを示した。M-12タンパク活性は、ピークCM-IVにのみ含まれ、T-12タンパク活性は認められなかった。

c. セファデックスG-200 によるゲルろ過

CMセルロースカラムから溶出されたM-12タンパク活性画分 (ピークCM-IV)を集め、限外ろ過濃縮した後、-PBSで平衡化したセファデックスG-200 によるゲルろ過を行なった成績を図4に示した。M-12タンパク活性はピークSG-II, すなわち、フラクションNo.44~52のピークに含まれた。このピークの分子量は、ほぼ42,000に相当した。

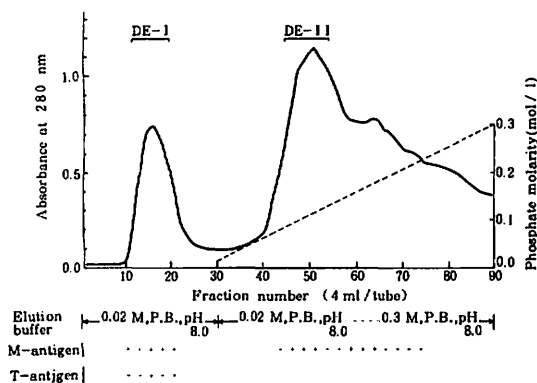


図2. 酸加熱抽出粗M-12タンパクのDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

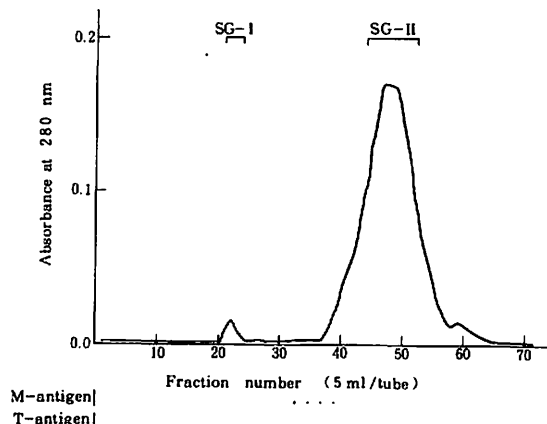


図4. M-12タンパクのセファデックスG-200 ゲルろ過

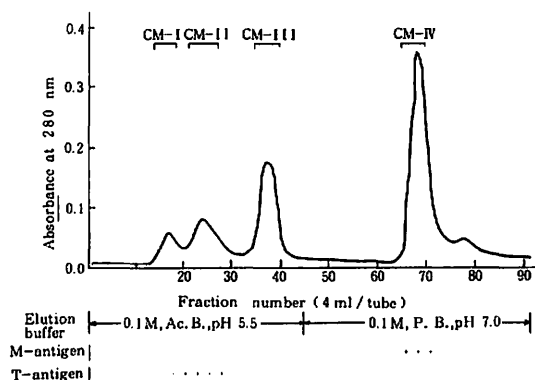


図3. M-12タンパクのCMセルロースカラムクロマトグラフィー

2. M-1, M-6 タンパクの精製

M-12タンパクと同様の方法で行ない、同様の結果を得た。

3. A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者のT抗体とM抗体保有状況

A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者の血清中のM抗体とT抗体の保有率を比較したのが表1である。T-1型菌保菌者の抗体保有率をみると、M-1抗体では72.4%、T-1抗体では79.3%であった。また、T-12型菌保菌者についてみると、M-12抗体は89.3%、T-12抗体は100%の抗体保有率であった。なお、T-6型菌保菌者は1名であったが、この保菌者はM-6、T-6の両抗体とも保有していた。一方、保菌菌型とは異なるM, Tタンパクに対する抗体の保有率をみると、T-1型菌保菌者では、M-6抗体51.7%、M-12抗体48.3%、T-12抗体89.7%、T-12型菌保菌者ではM-1抗体50.0%、T-1抗体17.9%、M-6抗体42.9%の保有率であった。

4. A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者の保有抗体価

表1. T-1, 6, 12型菌保菌者の抗体保有率の比較

保有菌型 (n)	保有菌型に対する 抗体保有率(%)	非保有菌型に対する 抗体保有率(%)	
T-1 (29)	M-1: 72.4 T-1: 79.3	M-6: 51.7 T-6: NT	M-12: 48.3 T-12: 89.7
T-6 (1)	M-6: 100 T-6: 100	M-1: 100 T-1: 100	M-12: 100 T-12: 100
T-12 (28)	M-12: 89.3 T-12: 100	M-1: 50.0 T-1: 17.9	M-6: 42.9 T-6: NT

NT—not tested

表2. T-1.6.12型菌保菌者の検出抗体価 (GM) 比較

保 有 菌 型 (n)	保有菌型に対する 抗体価の GM 値	非 保 有 菌 型 に 対 す る 抗 体 価 の G M 値	
T - 1 (29)	M-1: 46 T-1: 1,242 (27.0)	M-6: 44 T-6: NT (-)	M-12: 113 T-12: 338 (3.0)
T - 6 (1)	M-6: 40 T-6: 20 (0.5)	M-1: 40 T-1: 160 (4.0)	M-12: 160 T-12: 1,280 (8.0)
T - 12 (28)	M-12: 132 T-12: 1,050 (8.0)	M-1: 51 T-1: 243 (4.8)	M-6: 53 T-6: NT (-)

(T/M ratio) NT—not tested

検出されたT抗体価とM抗体価のそれぞれの幾何平均 (GM) 値を保菌菌型ごとに比較した成績を表2に示した。T-1, T-12型菌保菌者の保菌菌型と同じT, M抗体価のGM値を比較すると、いずれの場合も、T抗体の方が8~27倍高い値を示した。T-6型菌保菌者は1名だけであったが、M抗体価がT抗体価より高かった。また、保菌菌型と異なるT抗体価とM抗体価を比較してみると、いずれもT抗体価が3~8倍M抗体価より高い値を示した。

表-3 猩紅熱患者血清におけるM抗体とT抗体

No	T type of isolate	Age (years)	Days after onset	Type 1		Type 6		Type 12	
				M	T	M	T	M	T
1	T-12	4	2 9	-	-	-	-	80	-
2	T-12	5	1 8	-	-	-	-	40	-
3	T-12	5	3 11	-	-	-	-	80	-
4	T-12	5	6 13	-	-	-	-	160	-
5	T-12	6	4 12	-	-	-	-	40	-
6	T-12	7	2 9	-	-	-	-	40	-
7	T-12	8	3 10	-	-	-	-	-	-
8	T-1	10	3 46	40	-	-	-	-	-

5. 猩紅熱患者のM抗体とT抗体

A群溶連菌T-1型菌とT-12型菌が分離培養された猩紅熱患者のベア血清中のM抗体とT抗体を測定した成績を表3に示した。猩紅熱患者8名中7名の血清から、咽頭ぬぐい液から分離されたA群溶連菌の菌型と同じ型のM抗体のみが検出され、T抗体および他の型のM, T抗体は検出されなかった。また、6名の患者の急性期(1~6病日)の血清中にすでにM抗体が産生されており、回復期(9~46病日)の血清中にも同程度のM抗体があった。そして、他の1名の患者(Na3)においては、急性期(3病日)の血清中にはM抗体が検出されなかったが、回復期の血清中には80倍のM-12抗体が検出され、抗体価の有意上昇がみられた。1名の患者(Na7)については、T-12型菌が分離培養されたにもかかわらず、ベア血清中には、いずれの型のM, T抗体とも検出されなかった。

IV 考 察

Mタンパクの精製はLancefield²⁰⁾やFox²⁴⁾らによって行なわれたが、その精製過程は、酸加熱抽出粗Mタンパクを硫酸アンモニウムによる塩析を行ない、その33~60%硫酸アンモニウム飽和沈殿画分についてCMセルロースカラムクロマトグラフィーを行ない、精製Mタンパクとしていた。我々は、すでに報告したように、¹⁹⁾塩析を行わず、精製の第一段階として酸加熱抽出粗Mタンパクを限外ろ過濃縮とDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、Mタンパク活性画分はピークDE-IとDE-IIの二つのピークに含まれていたことから、ピークDE-IとDE-IIのそれぞれをグルタルアルデヒド処理羊赤血球に感作し、PHA抗原を作製し、抗M血清と反応させた結果、ゲル内沈降反応でMタ

ンパク活性のみを示したピークDE-Ⅱを用いたPHA試験では、明瞭な赤血球凝集像が得られなかったが、ピークDE-Ⅰを用いたPHA試験では、明瞭な凝集像が得られたことから、このTタンパク画分をも含むピークDE-ⅠをCMセルロースカラムクロマトグラフィーにかけるMタンパク精製材料とした。

CMセルロースカラムクロマトグラフィーで得られたMタンパクをさらに精製するとともに、その分子量の測定を行なう目的でセファデックスG-200によるゲルろ過を行なった結果、ピークSG-Ⅰはvoid volumeで溶出し、Mタンパクを含むピークSG-Ⅱは分子量42,000に相当した。酸加熱抽出で得られるMタンパクの分子量としては、19,000~31,000²⁵⁾と32,000~63,000²⁶⁾との2つの報告があるが、今回分離精製されたMタンパクは後者の報告と類似しているものと思われる。

A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者の血清中のM抗体とT抗体保有状況をみると、保菌菌型に対する抗体保有率は、T-1およびT-12型菌保菌者ともT抗体保有率とM抗体保有率の間には有意の差がなかったのに対して、保有しているT抗体価とM抗体価のGM値をみると、T抗体の方がM抗体より8~27倍高いGM値であった。このことは、A群溶連菌の菌体表面に存在するMタンパク量とTタンパク量とにかなりの差があることを反映しているものと考えられた。また、M-12抗体のGM値が113~132と高いのに対してM-1とM-6抗体のGM値は44~53と低くなっており、菌型によりMタンパクの存在量が異なることが示唆された。

一方、猩紅熱患者のベア血清中のM抗体とT抗体を測定した成績をみると、咽頭ぬぐい液から分離培養されたA群溶連菌の菌型と同タイプのM抗体が型特異的に、また、感染早期に産生されることがわかった。

このように精製したA群溶連菌のM-1, 6, 12タンパクと、A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者の血清とT-1とT-12型菌を病原とする猩紅熱患者のベア血清を用いて、M抗体を測定し、M抗体の保有状況や抗体の産生時期などをかなり明確にすることができた。

V 結 論

A群溶連菌のM-1, 6, 12タンパクの精製を試み、得られたMタンパクを用い、A群溶連菌T-1, 6, 12型菌保菌者58名の血清とA群溶連菌T-1, 12型菌の分離培養された猩紅熱患者8名のベア血清中のM抗体とT抗体を調査した結果、以下のような成績を得た。

1. M-1, 6, 12タンパクをA群溶連菌T-1, 6, 12型菌菌体より、酸加熱抽出-DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー-CMセルロースカラムクロマ

トグラフィーゲルろ過により精製することができた。

2. 精製Mタンパクを用いて血清中のM-1, 6, 12抗体をPHA法により測定することができた。

3. A群溶連菌保菌者のM抗体とT抗体の保有状況はほぼ同じであったが、M抗体価とT抗体価はかなり異なっていた。

4. 猩紅熱患者の場合、M抗体は血清中に型特異的に、感染早期に産生されることがわかった。

文 献

- 1) 白取剛彦たち：猩紅熱に関する疫学的研究，感染症学雑誌，47，510—513（1973）
- 2) 森田盛大たち：角館町に発生したT-12型菌による猩紅熱の流行とその血清疫学，秋田県衛生科学研究所報，18，67—72（1973）
- 3) 森田盛大たち：猩紅熱の流行を起したT-12型A群溶連菌に関する血清学的研究，感染症学雑誌，49，121—127（1975）
- 4) 森田盛大たち：猩紅熱多発要因に関する調査報告書—西目地区と十文字地区における3ケ年の溶連菌調査—未発表成績（1975）
- 5) 森田盛大たち：本荘市で流行した猩紅熱の細菌学的及び血清学的調査報告書，未発表成績（1976）
- 6) 森田盛大たち：細菌性伝染病の代表選手—見なおされるべき溶連菌感染症—，メディカルトリブーン，昭和51年4月8日号
- 7) 森田盛大たち：A群溶連菌T抗原に対する抗体産生とその検出意義，感染症学雑誌，51，128—135（1977）
- 8) 森田盛大たち：A群溶連菌に対する年令別T凝集素保有状況について，秋田県衛生科学研究所報，21，47—49（1977）
- 9) 山脇徳美たち：A群溶血性連鎖球菌に対する年令別T凝集素保有状況について（第2報）—秋田市住民について—，秋田県衛生科学研究所報，22，43—47（1978）
- 10) 山脇徳美たち：県内住民のA群溶連菌に対するT凝集素保有状況について（第3報），秋田県衛生科学研究所報，23，39—43（1979）
- 11) 森田盛大たち：A群溶連菌の血清疫学，感染症学雑誌，53，517—522（1979）
- 12) 森田盛大たち：秋田県における猩紅熱および溶連菌感染症について，感染症学雑誌，53，523—529（1979）
- 13) 山脇徳美たち：県内住民のA群溶連菌に対するT凝集素保有状況について（第4報）秋田県衛生科学研究

所報, 24, 57—60 (1980)

- 14) 山脇徳美たち：本荘市住民のA群溶連菌に対するT凝集素保有状況について，秋田県衛生科学研究所報，25, 51 — 55 (1981)
- 15) 森田盛大たち：A群溶連菌 (*S. pyogenes*) の群別に関する試行的研究，秋田県衛生科学研究所報，25, 57—61 (1981)
- 16) 森田盛大たち：溶連菌感染症とA群溶連菌に関する疫学的研究，特に，A群溶連菌の群別について，感染症学雑誌，56, 26—36 (1982)
- 17) 森田盛大たち：猩紅熱多発および非多発地区におけるA群溶連菌の侵襲状況，感染症学雑誌，57, 1067—1074 (1983)
- 18) 森田盛大たち：エクアドルにおける *S. pyogenes* の侵襲に関する血清疫学的研究，感染症学雑誌，投稿中
- 19) Yamawaki, T., et al : A passive hemagglutination test for detection of antibodies against M antigen of group A type 12 streptococci in human sera. *Microbiol. Immunol.*, 26, 611—615 (1982)
- 20) Lancefield, R.C. : The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.*, 47, 91—103 (1928)
- 21) Fox, E.N. : M proteins of group A streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 38, 57—86 (1974)
- 22) Fox, E.N., et al : Antigencity of the M proteins of group A streptococci. III. Antibody responses and cutaneous hypersensitivity in humans. *J. Exp. Med.*, 124, 1135—1151 (1968)
- 23) Lancefield, R.C., et al : The properties of T antigens extracted from group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 84, 449—471 (1946)
- 24) Fox, E.N., et al : The multiple molecular structure of the M proteins of group A streptococci. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 1118—1125 (1965)
- 25) Fox, E.N., et al : New observations on the structure and antigenicity of the M proteins of the group A streptococcus. *Immunochemistry*, 6, 11—24 (1969)
- 26) Vosti, K.L., et al : Further characterization of purified fractions of M protein from a strain of group A, type 12 streptococcus. *J. Immunol.*, 107, 104—114 (1971)