

第30話 グラム陰性菌とリムルス試薬の反応性

エンドトキシンとはグラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖である…と一般にいられています。リポ多糖と一言で言っても、物質として種類という訳ではありません。菌株によってその構造は様々です。また、一つの菌株から精製したエンドトキシンでも、O抗原多糖の繰り返し数が異なる分子が存在するため、種々の分子量のリポ多糖の集合体となっています。これらのことから考えても、グラム陰性菌とリムルス試薬の反応性は、菌株によって異なることが予想されます。今回は、リムルス試薬と菌体との反応性について考えてみたいと思います。

各種細菌の乾燥菌体を用いて検討を行いました。すなわち、乾燥菌体を生理食塩水で洗浄し、注射用蒸留水にけん濁させた後、リムルス ES-II テストワコーとトキシノメーター ET-201 を用いて測定しました。菌体数は、それぞれのけん濁液の濁度より、McFarland 比濁法により算出しました。測定値 (EU/mg) を菌体数 (cells/mg) で割って、菌体あたりのエンドトキシン活性 (EU/cell) を求めました。

検討結果を Table 1 に示します。*E. coli* や *Salmonella* のように臨床的によく見かける菌株では、1 個あたりのエンドトキシン活性はおおよそ 10^{-4} EU のオーダーでした。エンドトキシンの比活性はまちまちなので、この活性から菌体のリポ多糖量を正確に計算することはできませんが、おおよその重量は推測することができます。例えば、米国標準エンドトキシンは 1 バイアルあたり $1\mu\text{g}$ のリポ多糖が入っており、その活性が 10000 EU ですから、1 EU の重量は 100 pg となります。この値から計算するとグラム陰性菌 1 個が持

つりポ多糖量は、 $10\text{ fg}(=10^{-14}\text{ g})$ となります。一般的なグラム陰性菌の持つリポ多糖は数十 fg のオーダーなのかもしれません。グラム陽性菌では $10^{-9}\sim 10^{-10}$ EU/cell と活性が低く、培地からのエンドトキシン混入 (洗浄不十分) のレベルと思われるかもしれません。グラム陰性菌の中でも、

Sphingobacterium、*Flavobacterium*、*Cytophaga*、*Sphingomonas* は活性が低く、グラム陽性菌と同等の活性しか示さないものがありました。

グラム陰性菌の菌体では、エンドトキシンは蛋白と共に細胞壁の外側に分布しています。今回の結果から、この状態のエンドトキシンも LAL に反応するように思われます。もちろん、菌体から遊離したエンドトキシンが反応しているのかもしれませんが、洗浄を行っていることを考えると菌体上のエンドトキシンも反応していると考えたいところです。また、*Sphingobacterium* のようにリポ多糖の代わりにスフィンゴ脂質を細胞壁に持っているグラム陰性菌もあります。このような場合、菌体の LAL に対する反応性は非常に低くなることが予想されます。実際 *Sphingobacterium*、*Flavobacterium*、*Cytophaga* といった近縁の株で LAL に対する反応性が低かったことは、これらの菌がリポ多糖以外の物質を細胞壁に持っている可能性を示唆しているの

Table 1. Reactivity of bacteria with endotoxin-specific LAL

Bacteria	Endotoxin (EU/cell)
Gram-negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	1.4×10^{-4}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO14940T	2.3×10^{-4}
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO13245	5.5×10^{-4}
<i>Serratia marcescens</i> IFO3046	4.2×10^{-4}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO12689T	1.4×10^{-4}
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> IFO14948T	6.4×10^{-8}
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> IFO12535T	9.7×10^{-10}
<i>Cytophaga johnsonae</i> IFO14942T	7.4×10^{-9}
<i>Cytophaga succinicans</i> IFO14905T	2.4×10^{-6}
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> IFO13635T	7.1×10^{-9}
Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO13276	7.3×10^{-10}
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO3202T	2.5×10^{-10}
<i>Bacillus subtilis</i> IFO13719T	2.5×10^{-9}
<i>Micrococcus luteus</i> IFO3333T	6.0×10^{-10}

かもしれません。菌株によっては、さらにその外側に荚膜を持っている場合がありますから、これも LAL との反応性に影響を与えそうです。

エンドトキシンは、水溶液中でミセルを形成しています。このミセルの大きさがエンドトキシンの活性に大きく影響しています。一方、エンドトキシンの分子は菌株によって異なります。従って、エンドトキシンのミセルの作り方も菌株によって異なると考えられます。そのうえ、菌株の状態でも LAL に対する反応性が違うとなると、もう何を測定しているのかわからなくなってきました。このようなことから、エンドトキシンと取り組むときは、どのような活性を測りたいか、測定の目的や対象が何かをよく考えて、使用する標準品や測定法を選ぶ必要があると思います。

今回は「第 31 話 パイロセップ法の応用」の予定です。