The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A群連鎖球菌細胞壁に関する研究
Author(s)	浜田, 茂幸
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30229
rights	Copyright © 歯科基礎医学会
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

歯基礎誌 13：25-38, 1971.

A群連鎖球菌細胞壁に関する研究

3. 細胞壁の酵素的溶解産物よりえた高分子量画分の内毒素様の活性について

浜田茂幸（はまだしげゆき）
大阪大学歯学部口腔細菌学教室*

〔受付：昭和45年12月17日〕

序言

著者は本研究の第1報[1]において，A群連鎖球菌，12型（S.F. 42株）の細胞壁に *Flavobacterium* L-11酵素のある標品を作用させるとそのペプチドグリカン層が水解されて溶解すること，この溶解産物をセファデックスでゲルロ過すると可溶化された細胞壁のアミノ糖，ラムノースのすべてと少量のペプチドをふくむ高分子量画分とアミノ糖をふくまずペプチドあるいはアミノ酸よりなる低分子量画分とに分別されることを報告した。ついで第2報[2]において後者をさらにイオン交換クロマトグラフィー，電気泳動等によりペプチドグリカンの構築単位と考えられるペプチドユニットを単離してその化学構造を決定し，L-11酵素による細胞壁の溶解に伴って遊離するN-およびC-末端アミノ酸の分析結果をもあわせ考えて，供試細胞壁のペプチドグリカンのペプチド部分の構造を推定した。

第1報[1]の「序言」に述べたように，また本報で後に考察するように，A群連鎖球菌の細胞壁あるいは細胞壁をフォルムアミドやトリクロル酢酸などで処理をしてえられたペプチドグリカンには発熱作用，皮膚や関節腔の組織に急性および慢性炎症を惹起する作用，あるいは心臓に対する傷害作用などの種々の生物学的活性が集約されていることが報告されている。著者ら[3,4]もS.F. 42株および6型のS43/100株の分離した細胞壁にこれらの作用があることを確認している。

しかし細胞壁が示すこれらの生物学的作用は超音波処理などの物理的な手段によって適当な粒子サイズに分散させた細胞液の浮遊液について認められたものであり，そのためにこれらの活性を示す因子を純化して，活性発現にあずかっている化学物質の構造を決定し，あるいは観察される種々の活性が同一の化学構造に基づくものかどうかを明らかにするという重要な研究が進展しないままに放置されている。

この報告では，S.F. 42株の細胞壁のL-11酵素による溶解産物から分離した高分子量画分に供試細胞壁標品にみられる生物学的活性が損われずに温存されているかどうかを主として発熱作用を指標として検討した研究が記載されている。

材料と方法

1) 供試菌株およびその培養

第1[1]および2報[2]と同じくA群連鎖球菌，12型（S.F. 42株）を使用した。しかし培養には，前報とは異なり，動物由来の成分を含まないTrypticase soyブロース（B.B.L.）を用いた[5]。この培地にS.F. 42株を37°Cで18時間静置培養したものにフォルマリンを最終濃度が0.2％になるよう

Studies on the cell walls of group A *Streptococcus pyogenes*. 3. Endotoxin-like activities of the high molecular weight fraction isolated from an enzymatic digest of the cell walls
S. HAMADA (Department of Microbiology, Osaka University Dental School, Joan-cho, Kita-ku, Osaka)
* 大阪市北区常安町 32（〒530）
Jap. J. Oral Biol. 13：25-38, 1971.

に加え，18時間，4°C において殺菌したのち，4°C で連続遠心して菌体を分離した。集めた菌体は5倍容の pyrogen-free の蒸留水で10回洗滌し，付着している培地成分をできる限り除くことにつとめた。ちなみに上述の洗滌ならびに以下述べる実験にはすべて pyrogen-free の蒸留水を使用した。これは脱イオン水を全ガラス製の蒸留装置を用いて2回蒸留をくり返したものをただちに120°C，20分間高圧滅菌したもので，発熱物質を含んでいないことをウサギを用いて検定し，確認したものである。(以下単に「蒸留水」という)。洗滌した菌体の30g (湿重量) を「蒸留水」に浮遊して総量を120ml とし，4°C で一夜攪拌して均質とした。この菌浮遊液をガラスビーズとともに前報[1]に記載した条件で Braun の装置を用いて振とうし，菌体を破壊した。菌破壊用フラスコを数分間放置してガラスビーズを自然沈降させたのち，破壊された菌液を傾斜によって分け取った。えられた破壊菌液はそのままでは細胞質より溶出した核酸のために粘稠性を帯び，分画遠心によって未破壊菌を効率よく除くなどの操作が難かしいので，まず次のように核酸分解酵素による処理を行ない粘度を下げた。すなわち30g の破壊菌液に 1/4 容の0.2M リン酸緩衝液を加えて pH 8.0 とし，これにデオキシリボヌクレアーゼ1 (No. DN-100, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) およびリボヌクレアーゼ-A (type 1-A, 同) をいずれも最終濃度が10 μg/ml 菌液となるように加え，攪拌しながら37°C で2時間処理した。このように酵素処理した破壊菌液はついで450g で20分間遠心し，未破壊の菌を含む沈澱と細胞壁，細胞質膜および細胞質内物質を含む上液とに分けた。未破壊菌液よりなる沈渣は再び Braun の装置にかけ，再破壊菌液を450g で20分間遠心した初回および再破壊菌液の450g での遠心上液を合体し，グラム陽性に染まる未破壊菌の残存が無視しうる程度であることをグラム染色を行って確めたのち，FREIMER ら[6]の記載に従って 4,000g，60分間遠心し，細胞壁を含む沈渣と細胞質膜および細胞内物質を含む上液とに分別した。

沈渣は「蒸留水」(約5倍容) によって，洗液の紫外部吸収が低い一定の値を示すようになるまで (5回) くり返し洗ったのち，凍結乾燥した。湿重量30g の全菌から乾燥重量1.97g の粗細胞壁画分がえられた。つぎにこの画分を HEYMANN ら[7]の記載を参考にして蛋白質分解酵素によって処理した。すなわち粗細胞壁1.0g を100ml の0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に均等に浮遊し，プロナーゼP (科研化学 K.K., 東京) の10mg および防腐と脱色の目的でクロロフォルム1ml とトルエン3ml を加え，37°C で24時間処理した。消化産物を8,000g，30分間遠心し，得られた沈渣を100ml ずつの蒸留水で6回，ついで0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で1回洗ったのち，結晶トリプシン (トリプシリン，持田製薬，東京) の10mg を溶解した上記緩衝液の100ml に均等に浮遊し，37°C で2時間消化処理を行なった。処理後8,000g で30分間遠心し，沈渣を100ml ずつの蒸留水で5回，ついで同量の0.2M グリシン-塩酸緩衝液(pH 2.2) で2回洗滌した。こうしてえた沈渣を上記緩衝液の100ml に浮遊し，10mg の結晶ペプシン (Sigma) を加え，37°C で2時間消化した。8,000g，30分間遠心し，えられた沈渣を100ml の蒸留水で8回洗滌したのち，凍結乾燥した。乾燥重量387mg の精製細胞壁画分が得られた。

一方上記4,000g，60分間の遠心上清はさらに4,500g，2時間遠心し，沈渣は捨て，上液をさらに20,000g，1時間遠心し，沈渣(細胞質膜画分)は核酸分解酵素で処理後，凍結乾燥して他の実験目的に使用するため保存した (乾燥重量で約90mg).

2) L-11酵素の部分精製

第1報[1]に記載した実験に用いたのと同じロットの"粗 L-11酵素標品"を精製の出発材料としたが，予備実験の結果前報[1]に述べた条件でゲルロ過によって部分精製した酵素標品には発熱物質が含まれており，今回の実験目的には使用できないことが明らかにされた。そこで発熱物質を含まない L-11酵素標品を得ることを目標に検討を重ねた結果，以下述べる方法で満足しうる酵素標品を得ることに成功した。すなわち粗 L-11酵素の1.0g を pyrogen-free の0.01 M リン酸緩衝液(pH 6.0) の10ml に溶解し，4°C で10,000g，30分間遠心

し，沈渣を 10ml の同じ緩衝液に再溶解したものを同様に遠心して得た上清と最初の上液とを合体した。このようにしてえた L-11 酵素溶液を上記緩衝液と平衡化した CM-セルロースカラム（2.2 cmφ×15cm）にかけ，pH あるいはイオン強度の異なるリン酸緩衝液による段階的溶出を行った。すなわち 0.01 M リン酸緩衝液 pH 6.0，同 pH 7.0，同 pH 8.0の各100ml，ついで pH 8.0の0.05 M，0.1Mおよび0.2 M のリン酸緩衝液の各200，500 および 500 ml を流し，分取した 10 ml ずつの各フラクションについてA群連鎖球菌，S.F. 42株および *Staphylococcus aureus*, Copenhagen 株の全菌に対する溶解活性，蛋白質量(280 mμ での吸収を指標とした)，着色の程度(340mμ の吸収を測定した)を調べた。図1に示されているように S.F. 42 株の全菌浮遊液の O.D. を減少させるが，*S. aureus* 全菌には作用せず，蛋白質および褐色の着色物質を多量に含む溶出液量450ml から650ml までの部分と，両菌種の全菌に溶解活性を示し，着色物質をほとんど含まず，また蛋白質含量も低い溶出量 800 ml から 1,000ml までの部分とが分離された。後者に属するフラクションをプールし，0.005 M のリン酸緩衝液（pH 8.0）の 1 l に対して 4°C で 12 時間ずつ，くり返して 2 回透析した。こうしてえた L-11 酵素溶液は S.F. 42株の細胞壁に対して1.68単位/ml の溶解活性を示し，かつその 0.5 ml をウサギに静脈内注射しても認むべき

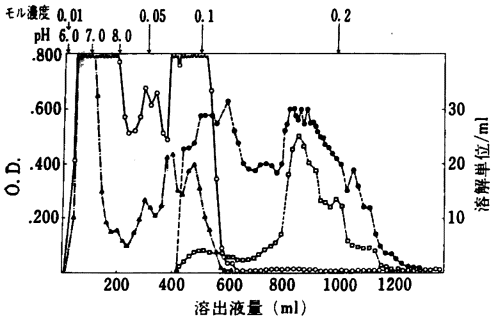

図 1　粗L-11酵素の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画・精製

○——○　280mμ での O.D.
▲-·-·▲　340mμ での O.D.
●……●　A群連鎖球菌の全菌に対する溶解活性
□……□　*Staph. aureus* の全菌に対する溶解活性

発熱活性を惹起しなかった。ちなみに牛血清アルブミンを標準として Lowry 法で測定したこの酵素溶液の蛋白質含量は 0.17mg/ml であった。

3)　化学分析

アミノ酸およびアミノ糖の分析は 6 N HCl 中で 100°C，12 時間加水分解した試料についてアミノ酸自動分析機（KLA-3 B，日立製作所，東京）を用いて行った。総ヘキソサミンの定量は GHUYSEN ら[8] が記載している方法に従った。またラムノースおよびウロン酸の定量は試料をあらかじめ水解することなく，それぞれ DISCHE と SHETTLES[9] の方法および DISCHE[10] の方法によって実施した。脂肪酸の分析はメチルエステル化した試料についてガスクロマトグラフィーを行なった。

4)　発熱作用の検定

体重約 2 kg のオスのウサギを試験動物として検体の浮遊液ないし溶液の1.0あるいは 2.0 ml を耳静脈内に注射し，時間を追って直腸温度を水銀体温計で測定した。この間供試ウサギはスチール製の固定器に入れ，温度調節した場所で極力安静な状態を保たせた。なお検温開始前 2 時間から検温終了時まで断食させた。原則として一匹のウサギは一回しか発熱作用の検定には使用しなかった。一部の実験では体温の測定と並行して経時的に辺縁耳静脈を穿刺して採血し，流血中の白血球数の算定を金井[11] の記載に従って行なった。

5)　その他

実験目的からみて当然のことながら，外来性の発熱物質が実験に使用する器材から発熱作用の検定に供する試料に混入することがないように，可能な限りの注意を払った。すなわち実験に用いる精製水としては 1）で述べたようにしてえた発熱物質を含まないことを確めた「蒸留水」を用い，緩衝液その他の水溶液の調製にはすべてこの「蒸留水」を使用した。またガラス器具は濃硝酸によって加熱処理後，上記「蒸留水」で十分に洗滌し，さらに 180°C，数時間乾熱滅菌したものを実験に供した。さらに細胞壁の酵素的溶解産物の分画に用いたセファデックス・カラム，CM-セルロース・カラムも pyrogen-free の「蒸留水」あるいは緩衝液で膨潤あるいは活性化を行ない，かつ試料添

加前にカラムの数倍容の pyrogen-free の出発溶媒によって徹底的に洗滌した。

結　果

1) S.F. 42株細胞壁の酵素的溶解産物からの高分子量画分（HMW）の分離とその化学組成

精製細胞壁標品の「蒸留水」浮遊液(10mg/ml) 35ml に L-11 酵素の35単位を含む 0.01 M のリン酸緩衝液の 35 ml と防腐剤としてアジ化ナトリウムの 7 mg とを加え，37°C で 96 時間反応させた。43%の O.D. 減少を示した反応系を40,000g で60分間遠心して上清（可溶性画分）と沈渣とに分け，沈渣は蒸留水で洗い，洗液は上清に合体した。洗った沈渣は凍結乾燥し（乾燥重量で185mg），後述するように L-11 酵素で再処理した。一方洗液を加えた上清はロータリーエバポレーターで約 2 ml に減圧濃縮し，これを前報[1] に記載した条件でセファデックス G-50 および G-25 (Pharmacia, スェーデン)の連結カラムでゲルロ過した。前報[1]に記載(図 4 参照)したのとほぼ同様な溶出パターンがえられた。高分子量画分(HMW) をプールして濃縮後，凍結乾燥して約110mg の白色粉末の標品を得た。一方上述の 40,000 g, 60 分間の遠心沈渣は第一回目と全く同一の条件下で L-11 酵素により，37°C で 96 時間再消化した結果 55 %に及ぶ O.D. 減少がみられた。反応液を 40,000 g で60分間遠心して得た可溶性画分を第 1 回目のそれと同様にしてゲルロ過を行い約 50 mg の HMW をえた。第 1 回および第 2 回の酵素処理によってえた HMW は，化学分析および後述する種々の生物学的活性のいずれについても，本質的に同一の結果を与えた。

表 1 に示されているように，HMW はグルタミン酸，アラニン（グルタミン酸残基 1 モルあたり 3.6モル，以下同じ），リジン（1.2モル），ムラミン酸（0.9モル），グルコサミン（4.5モル）およびラムノース（9.0モル）から構成され，出発材料である細胞壁には少量ながら検出される上記以外のアミノ酸はいずれも検出されなかった。すでに報告したように，S.F. 42株の細胞壁では水解に伴うムラミン酸の破壊が著しく，グルタミン酸残基 1 モル当り 0.5 モルのムラミン酸しか検出されないこと[1] を考慮に入れると，HMW がなんらかの原因で（第 2 報の「考察」参照）で L-11酵素のムラミン酸→アラニンアミダーゼの作用を免れた部分を含み，しかしながら可溶性となったペプチドグリカンの一部（グリコペプチド）と，ラムノースとグルコサミンとによりなるおそらくは A群に特異なC多糖体との複合体であることが，上述の分析結果より推定される。またこの複合体のグリコペプチド部分のムラミン酸残基のかなりの部分がペプチドを結合していないことは第 2 報に述べたように供試細胞壁にふくまれる総アミノ基の約 85 %が，アミノ糖およびラムノースを含まない低分子量画分（LMW）として HMW とは別に分離される事実からも推定される。

表 1　HMW の化学組成

構成成分	mμモル/mg HMW	グルタミン酸 1.0 あたりのモル比	HMWに対する重量(%)
ラムノース*	1,900	9.0	31.2
総ヘキソサミン**	1,500	7.1	26.8
(グルコサミン)***	(940)	4.5	(16.8)
(ムラミン酸)***	(188)	0.9	(4.7)
グルタミン酸***	210	1.0	3.1
アラニン***	756	3.6	6.7
リジン***	254	1.2	3.7
結合アンモニア***	114	0.5	0.2
総リン	114	0.5	0.4

以上の他に微量の脂肪酸が検出された(本文参照)。また水解に伴なっておこる構成成分，特にムラミン酸の破壊に対する補正は行なわなかった。
* Dische と Shettles の方法による
** Ghuysen らの方法による
*** アミノ酸自働分析機による分析値

以上の成分の他に，リンとアンモニアとが検出されたが，前者は C多糖体とペプチドグリカンとの結合に関与し[12)13)]，後者はグルタミン酸残基のペプチド結合に与っていないカルボキシル基の一部をアミド化している結合アンモニア[2)] であろうと考えられる。なお重量を基準として考えた場合，供試 HMW 画分のかなりの部分（約 28%）が以上の成分のみでは説明できないので，脂肪酸ならびにウロン酸の検出を試みた。その結果 $C_{12:0}$

$C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ および未同定の2種類の脂肪酸の存在がみとめられたが，いずれも微量にすぎず，またウロン酸は全く検出されなかった。灰分の含量は，利用しうる試料の量が限られていたため測定できなかった。

2) 細胞壁浮遊液の発熱作用と流血中の白血球数に対する変動作用

まずA群連鎖球菌の細胞壁の音波処理浮遊液に発熱作用が認められたという ROBERSON と SCHWAB[14] の実験を追試確認するために，L-11酵素処理に供した細胞壁標品を「蒸留水」に浮遊したもの（1 mg/ml）を20K^c/s，音波発生装置(UR-150P，富永製作所，東京）を用いて，氷冷しつつ20分間超音波処理を行い均等浮遊液とし，その1あるいは2 ml を体重約2kg のウサギに静脈注射して体温および循環血流中の白血球数にどのような影響を与えるかをしらべた。図2に示すように，1時間以内に急速な体温の上昇と白血球数の減少とがみられた。その後数時間の経過中に上昇した体温は徐々に正常に復帰し，流血中の白血球数は逆に漸次増加の傾向を示し，注射後6時間目には注射前のそれの2倍以上に達した。対照実験として「蒸留水」の2 ml を注射したウサギでは体温，白血球数ともに認むべき変化はなかった。なお未処置の正常ウサギの一日を通じての体温の変動は本実験の体温測定の条件下では最大±0.3°C であったので，以下の実験では試料の静脈内注射により0.5°C 以上の体温の上昇が認められた場合を発熱作用陽性とした。

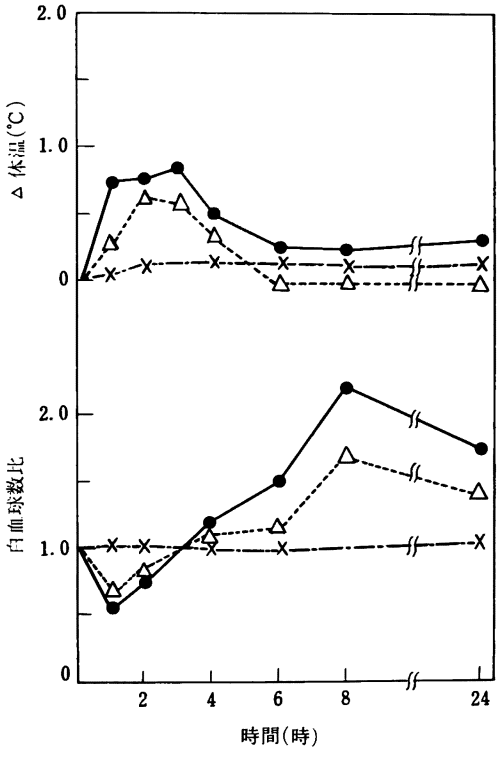

図 2 音波処理によって分散させた細胞壁浮遊液の静脈内注射によるウサギの体温と循環白血球数の変動
各点は各時点における3羽のウサギについての測定値の算術平均値
注射量；●——● 2 mg, △……△ 1 mg, ×-·-·× 0 mg（=「蒸留水」対照）

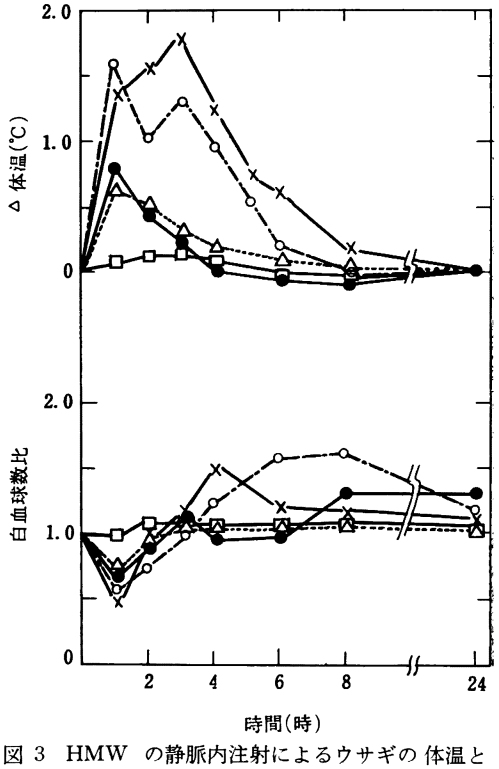

図 3 HMW の静脈内注射によるウサギの体温と循環白血球数の変動
各点は各時点における3羽のウサギについての測定値の算術平均値
HMW の注射量；○-·-·○ 1 mg, ×——× 0.5mg, △……△ 0.2mg, ●——● 0.1mg, □——□ 0.05mg

3)　HMW 溶液の発熱作用と流血中の白血球数に対する作用

0.05～1.0mg の HMW を 1 ml の「蒸留水」に溶解したものを静脈内に注射された体重約 2 kg のウサギが示す体温ならびに循環白血球数の変動が図 3 に示されている。急激かつ著明な体温の上昇，ならびに一時的ではあるが明確な白血球数の減少と続いておこる白血球数の増加が観察された。供試動物数が各注射量につき 3 羽にすぎないので，注射量と体温ないし白血球数の変動の大きさとの間にきれいな相関関係は認められないが，最少有効量は約 0.1mg であり，0.05mg の投与では体温，白血球数ともにほとんど影響を受けず，また 0.5mg の HMW の注射では最高 1.5°C 以上で，かつ数時間持続する体温の上昇がみられた。超音波処理してえた細片の浮遊液では 2 mg の注射によって最大 0.8°C の発熱しか示さなかったから，重量あたりでは可溶性の HMW の方が細胞壁そのものよりも発熱作用が明らかに強い。しかし白血球数減少に継起する白血球数の増多は細胞壁細片を静注した場合の方が著しいようであった。

ここで吟味を要するのは，HMW に認められた上記の作用が HMW の出発材料である細胞壁溶解物を得るのに用いた L-11 酵素のこの画分への混入によるものではないかとの可能性である。この可能性を排除するために，細胞壁の消化に用いた L-11酵素のすべてが HMW 画分に回収されると仮定し，HMW の調製に用いたのと同一の酵素標品溶液の200μl 分（上記の仮定にたつと 1 mg の HMW に含まれる酵素量に相当する）について発熱作用および流血中の白血球数に対する作用を調べた。その結果，酵素溶液を静注されたウサギの体温および白血球数には有意の変化は認められず，HMW が示す発熱作用および流血中の白血球数に対する作用は混在しているかも知れない酵素溶液に基くという可能性は除外され，酵素的に解体された細胞壁成分そのものによることが明かにされた。

3)　HMW の発熱作用に対する耐性(tolerance)の発現および耐性よりみた HMW と内毒素との関係

HMW の1.0mg を一日おきに体重約 2 kg のウサギに静脈内注射し，各回注射時の発熱反応を比べたところ（図 4；(1), (2), (3)），次第に発熱応答のレベルが低下することが示された。第 3 回目の注射から 1 日おいて *Escherichia coli* の内毒素（Lipopolysaccharide B, *E. coli* O : 128 : B12, Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA）の 1 μg/ml「蒸留水」溶液の 1 ml を耳静脈内注射したところ，HMW の発熱作用に対しては完全ではないが明確な耐性が成立していた供試ウサギに，著明な，しかも持続的な発熱応答が認められた（図 4, LPS）。この事実は HMW が示す発熱作用がこの画分に混入しているグラム陰性菌の内毒素様の発熱物質によるものではないことを示す証拠の一つと考えられる。なお図には示されていないが，HMW に（部分的に）耐性となったウサギに，最後の注射から 2 週間後に 1 mg の HMW を注射して調べたところ，耐性出現前と同じレベルの発熱応答が認められ，耐性が消失していることが示された。

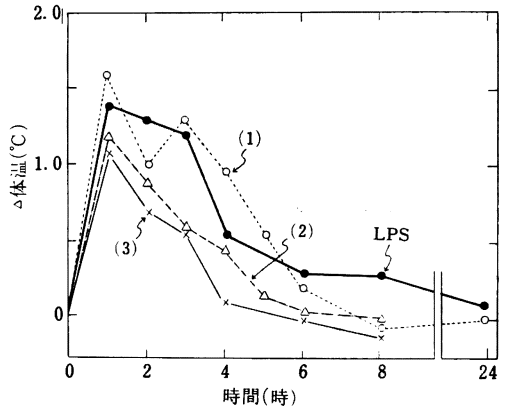

図 4　HMW の連続注射による HMW の発熱作用に対する耐性の成立，および HMW に耐性となったウサギの *E. coli* 内毒素の注射に対する発熱応答
各点は各時点における 3 羽のウサギについての測定値の算術平均値。実験方法は本文参照

次に上記の場合とは逆に，*E. coli* の内毒素の反復注射によって耐性[15]にしたウサギに HMW を注射し，交叉耐性の有無を調べた。すなわち *E. coli* 内毒素を最初の 3 日間には *E. coli* 内毒

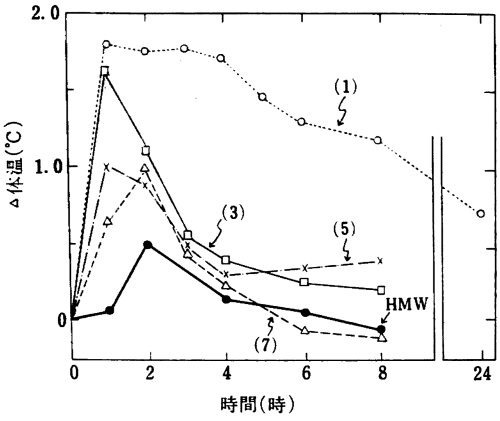

図 5 *E. coli* 内毒素の連続注射によって内毒素の発熱作用に耐性になったウサギに対する HMW の発熱作用
各点は各時点における3羽のウサギについての測定値の算術平均値。実験方法は本文参照

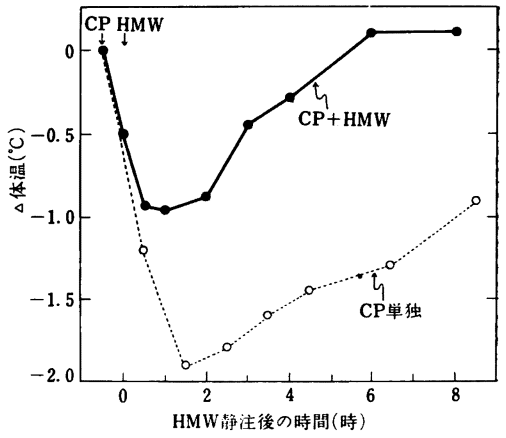

図 6 クロールプロマジン（2 mg/kg）注射後のウサギに対する HMW の体温に及ぼす効果
各点は各時点における3羽のウサギについての測定値の算術平均値
CP： クロールプロマジン

素の1 μg ずつを毎日，つづく4日間には2 μg ずつを毎日耳静脈内に反復注射し，毎回の発熱を比べたところ，図5に明らかなように，発熱応答が漸次低下し（図を簡略にするために1，3，5および7日目の注射時の発熱応答のみを図5に示した），明確な耐性の発現が認められた。このようにして *E. coli* 内毒素に耐性としたウサギに内毒素の最後の注射（7日目）から1日おいて0.5mgの HMW を注射したところ，有意の発熱反応は観察されるが，応答のレベルは同量の HMW を未処置のウサギに注射した場合（たとえば図3を参照）に比べて，著しく低く，*E. coli* の内毒素に耐性となったウサギは HMW に対して交叉耐性を示すことが明らかとなった。

4) クロールプロマジンによって HMW の発熱を抑制する試み

体重約2 kg のウサギにクロールプロマジン（コントミン，吉富製薬，大阪）を2 mg/kg の割合[16]に耳静脈内注射し，30分後に0.5mg の HMW を投与したときの体温の変動が図6に示されている。クロールプロマジンのみの注射によって最大約2°C，8時間以上続く体温の降下がみられるのに対して，クロールプロマジン投与後 HMW を静脈内注射したウサギでは体温の降下は約1°Cに留まり4～6時間後には注射前の体温にもどることがわかる。クロールプロマジンの投与が HMW の発熱作用に全く影響しないとはいえないが，クロールプロマジンの投与によって正常体温のレベルが低下したウサギに対しても HMW に発熱作用を有することを示すものと解釈されよう。

5) HMW の発熱作用に対する加熱の影響

HMW の「蒸留水」溶液（1 mg/ml）を100°Cで10分間加熱処理した後，その1 ml をウサギに静脈内注射して発熱の有無を調べた。加熱 HMW は未処理のそれと同程度の発熱作用を保持していることがわかった。ちなみに HMW の出発材料で細胞壁はプロナーゼ処理の段階で60°C，16時間の加温をうけたものであることを付記しておく。

6) HMW のエピネフリン試験および局所 Shwartzman 現象における活性

THOMAS[17]，STETSON ら[18]の記載に従ってエピネフリン試験を試みた。すなわち2 mg の HMW を体重2 kg のウサギに静脈内注射し，1時間後にエピネフリン(Adrenalin, Merck, ドイツ)の10, 50, 100μg を0.2ml の「蒸留水」溶液として皮内に注射した。図7に示すように，注射後5～6時間を経た頃からエピネフリンの注射量に応じた強さと拡がりを持った点状出血斑が注射部位を中心として出現し(その拡がりは直径数 cm に及ぶ)，その後次第に壊死に陥り24時間後には極期に達した。

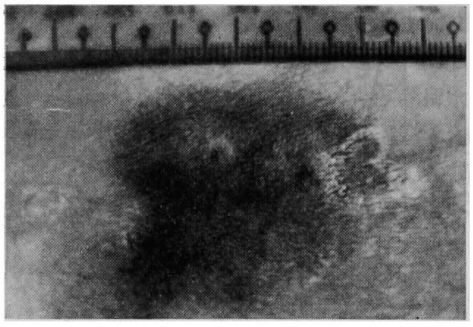

図 7 HMW の2mg を静脈内注射したウサギに，注射1時間後に100μg のエピネフリンを皮内注射した際にみられる皮膚の反応（皮内注射後24時間目に撮影）

この部分を病理組織学的に検索したところ，皮膚の結合織線維間に核の崩壊を示す細胞（その由来は必ずしも判然としないが，リンパ球や好中球で構成されているようにみえる）が浸潤した散在性の限局した壊死病巣が認められた。ただし細胞の浸潤は筋肉層には及ばず，化膿性の皮膚病巣とはその病理所見を異にしていた。

次に HMW と HMW，あるいは HMW と *E. coli* 内毒素とを準備因子あるいは惹起因子として組み合わせ，HMW が局所 Shwartzman 活性を有するか否かを調べた。すなわち準備注射として HMW の2.0mg，1.0mg および0.5mg（いずれも0.2ml 中）を皮内注射したウサギに，18時間後に HMW の2.0mg，1.0mg あるいは *E. coli* 内毒素の200μg を静脈内注射（惹起注射）し，皮内注射部位における Shwartzman 現象の有無をみたが，いずれの組み合わせにおいても結果は陰性であった。対照の目的で内毒素の 25，50，100 μg（0.2ml 中）を皮内注射し，18時間後に 200μg の内毒素を静脈注射した場合には，いずれの準備注射部位にも典型的な局所 Shwartzman 現象の出現がみられた。

考　察

微生物由来の発熱物質として種々のグラム陰性菌の内毒素およびミキソウイルスに含まれている発熱因子などがよく知られており，とくに前者については種々の面から広範な研究が行われ，また実験的発熱反応のモデルとして内毒素を利用している研究も多い[19)20)]。一方グラム陽性菌についても，その菌体あるいは菌体成分のあるものが発熱作用を有することを示した研究は必ずしも少なくないが，その作用はグラム陰性菌内毒素の場合のように著明ではなく，また発熱をおこす活性因子の化学的実体あるいは発熱機序についての研究も内毒素の場合に比べると著しくたち遅れている[21)]。

第1報[1)]で述べたようにA群連鎖球菌はきわめて多彩な疾患をひきおこし，またこの事実と対応してきわめて多種類の生物学的に活性な菌体成分あるいは菌体外産物を産生する点で特徴的な菌であるが，発熱因子についても STETSON[18)]，ROBERSON と SCHWAB[14)]，ROTTA と BEDNÁŘ[22)] および KIM と WATSON[23)] らの研究がある。STETSON[18)] はA群連鎖球菌（1，3，12型）をガラスビーズと共に Mickle の装置で振とう破壊し，破壊菌液を高速遠心してえた上液に発熱作用をはじめとする種々の内毒素様活性（局所および全身 Shwartzman 現象，エピネフリン反応を惹起する作用）が存在することを報告している。彼はこの画分を "endotoxic streptococcal lysate" と記載しているのみであり，おそらく細胞の原形質画分および音波処理で細片化された細胞壁，細胞質膜を含むと考えられるが，活性因子が細胞のどの部分から由来したものか，あるいはどのような化学性状のものかは明らかではない。その後，ROBERSON と SCHWAB[14)] はA群連鎖球菌（1型）を音波処理によって破壊したものをしょ糖密度勾配遠心などの方法で分画して細胞壁画分を分離し，これをパパイン消化した後超音波処理して細片化した細胞壁の浮遊液をつくり，これに STETSON[18)] の "endotoxic lysate" と同様な発熱作用をはじめとする内毒素様活性が存在することを報告した。さらに ROTTA と BEDNÁŘ[22)] はA群連鎖球菌の分離した細胞壁をフォルムアミド抽出し，残渣として得られるペプチドグリカン画分（彼らのいうムコペプチド）には発熱惹起能が存在するが，抽出されるC多糖体には発熱作用は認められなかったと主張した。また彼らはA群以外のB，L群の連鎖球菌の細胞壁ペプチドグリカンにもA

群のそれとほぼ同程度の発熱作用がみられたと報告している。ROBERSON ら[14]，ROTTA ら[22]のいずれの実験においても重要な所見として指摘されているのは，細胞壁自身あるいはペプチドグリカン画分のいずれについても，被験動物に静脈内注射する供試材料の粒子サイズが作用の発現に重要な要因であり，超音波処理を行なってコロイド状としなければ十分な活性が現われないということである。なおA群連鎖球菌の培養ロ液にみとめられる易熱性の発熱作用は猩紅熱発赤毒素蛋白質によるものであることが KIM と WATSON[23]の研究によって明らかにされた。

ちなみに連鎖球菌以外のグラム陽性菌については，ATKINS ら[21]が *Staphylococcus aureus, S. albus, Diplococcus* (type IV), *Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes* などの全菌体がその10^8個をウサギの静脈注射したとき，明瞭な発熱反応をひきおこすことを観察している。グラム陽性菌の全菌体を静脈注射したさいに観察される発熱はグラム陰性菌内毒素のそれ[24]とは，一般に発熱のパターンが異なり，有意の体温上昇がみられるまでの潜伏期が長く，また内毒素による典型的な発熱にさいしてみられるような二峰性の発熱応答がみられず，時間の経過と共に徐々に上昇する発熱が認められる。ATKINS ら[19][20]は，このような発熱はたとえばデキストラン，メチルセルロース，リン酸カルシウム，イオウ，カオリン，石英，二酸化トリウム，酸化鉄および金のような有機あるいは無機のコロイド粒子とをウサギに注射した際にみられる発熱反応と類似しており，したがってこれらのコロイド類とグラム陽性菌の菌体との間には分子サイズや荷電など，両者に共通するなんらかの物理化学的特性があり，この特性に発熱作用は依存している可能性があることを指摘している。また上述の可能性を支持する事実として *Staphylococcus* の分離した細胞壁を卵白リゾチームで溶解すると発熱作用が消失することを挙げている[19]。なおA群連鎖球菌細胞壁あるいはペプチドグリカンの発熱作用が超音波処理を行うと著明に増強されるという前述の ROBERSON ら[14]，ROTTA ら[22]の所見は発熱因子の化学的特性の重要性を否定するものではなく，必ずしも ATKINS の見解[19][20][21]を全面的に支持するものとはいえないが，供試材料の物理化学的性状がその発熱作用の発現に重要な関連を持っていることを示している。

著者はA群連鎖球菌（12型，S.F. 42株）細胞壁をL-11酵素で消化した溶解産物から分離した高分子量画分（HMW）が強い発熱作用を有することを明かにした。化学分析の結果，この画分はA群連鎖球菌の群特異C多糖体の構成成分であるラムノースとグルコサミン，およびA群連鎖球菌細胞壁ペプチドグリカンの構築要素であるアミノ糖ならびにアミノ酸からなり，微量の脂肪酸を除き，他の物質は存在するとしてもきわめて微量にすぎないことが示された。ここで強調しておかねばならないのは，この研究でとり上げた細胞壁由来の発熱物質が，従来報告されているグラム陽性菌の発熱物質が，上述の菌体外物質性のものを除き，全菌体そのもの，あるいは菌体を物理的手段のみによってのみ細片化して，コロイド状としたものとは異なり，細胞壁を酵素的に加水分解してえた真の溶液（solution）とみなしうることである。しかも重量単位で比べると，この可溶性の発熱物質の活性は出発材料として用いた細胞壁を超音波処理によって微細粒子としたものにくらべると数倍も強いことが示された。したがってグラム陽性菌が示す菌体性の発熱作用がコロイド粒子としての物理化学的特性に依拠しているという ATKINS らの主張は，少なくとも HMW については妥当でないと考えられる。ちなみに HMW の最少有効量が0.1mg であるのに対して有機あるいは無機のコロイド粒子が発熱をひきおこすのに必要な量が大きく，たとえばデキストランでは最低10mg[25]であることは HMW による発熱がコロイド粒子のそれとは異なることを裏書きしている。もっともこのような考察は0.1 mg で有意の発熱作用を示す超音波処理でえたA群連鎖球菌の細胞壁細片の浮遊液の発熱作用についても同様にあてはまる。（ちなみに ROTTA と BEDNAR[22]は音波処理によって「可溶化」したペプチドグリカンは1 μg の少量で有意の発熱作用を惹起すると

主張しているが，本研究における著者の経験にてらしてみると今後の確認を要すると考えられる)。

さて HMW 画分が示す強い発熱作用を担う活性因子の化学的実体は何であろうか。化学分析の結果は，HMW が細胞壁構成成分と微量の脂肪酸以外の調べた限りの物質を少なくとも化学的方法で検知しうるほどには含んでいないことを示したが，自然界に広く存在するグラム陰性菌の内毒素がきわめて微量で発熱作用を示すことはよく知られた事実である。例えば *Salmonella typhosa* の内毒素の有効最少必要量は0.0002μg/kg[26]，*E. coli* のそれは0.002μg/kg[24)27)] であることが報告されており，菌種や実験方法によってまちまちではあるが，内毒素の最少有効発熱量はだいたい10^{-3}μg のオーダーと考えられる。また KIM と WATSON[23)] によると易熱性の猩紅熱発赤毒素の最少有効発熱量は0.07μg/kg である。後者が HMW に夾雑している可能性は HMW の発熱作用が 100°C，10 分間の加熱によっては減弱しないという事実によって排除することができる。一般に発熱作用を示す物質がみつかったさい，特にその活性因子が耐熱性を示す場合には，BENNETT と BEESON[28)] が指摘しているように，その作用が外部から混入したグラム陰性菌の内毒素の作用によるものではないことを確認することが必要である。しかし観察している発熱作用が混入した内毒素の作用によるものでないことを積極的に実証することは実際にはしばしば困難であり，むしろ実験材料を調製する段階において内毒素が混入することがないよう最大限の注意をはらうことによって，観察している発熱作用が内毒素によるものではないかとの批判を回避している場合が多い。本研究においても HMW に外来性の発熱物質が夾雑することがないよう細心の注意を払い，また実験の性質上 HMW に混入する可能性を除外できない L-11 酵素については対照実験を行って供試した酵素標品に発熱作用がないことを確認した。加えて HMW の連続注射によって耐性としたウサギも *E. coli* 内毒素には耐性を示さないこと，HMW の発熱反応はその持続がグラム陰性菌内毒素のそれに比べて短時間であること，さらにまた HMW は局所 Shwartzman 反応の成立に，準備因子としても惹起因子としても与らないことなどの事実は，HMW の発熱作用が混入した内毒素によるものではないことを示す傍証となりえよう。なお *E. coli* の内毒素に耐性となったウサギに HMW を注射した時 HMW の発熱作用が著しく抑制されたが，この所見は HMW の発熱作用が夾雑する内毒素によることを示すものと受けとられなくもないが，内毒素が示す複雑で幅広い病理ないし生理作用を考えると，内毒素による非特異的な作用の一つの現われと考えるのが妥当であろう。もっとも ROTTA と BEDNÁŘ[22)] は0.5μg の *E. coli* 内毒素を16日間続けて耐性にしたウサギに，20 μg および50 μg のペプチドグリカンを注射したところ，20μg では発熱はみとめられなかったが，50μg を注射した場合には内毒素によって成立した耐性に抗して十分な発熱がみられたと報告しているので，HMW についてもより大量を使用すれば内毒素に耐性としたウサギにも発熱作用をひきおこしえたかも知れない。

HMW が示す発熱作用が細胞壁の構成成分そのものの作用であることはほぼ誤りないと考えられるが，それでは活性発現に必要な化学構造はどのようなものであろうか。ROTTA ら[22)] の研究によれば，A群連鎖球菌をフォルムアミドで抽出してC多糖体を除去したペプチドグリカンにも発熱作用が認められ，抽出されたC多糖体は不活性であったという。この実験の結果が正しいとすると，C多糖体ペプチドグリカン複合体と考えられる HMW の発熱作用に関与している構造は，第1報[1)] および第2報[2)] の研究成績を考え合わせると，ムラミン酸→グルコサミンを反復単位とするグリカン部分のムラミン酸残基の一部に L-11酵素のムラミン酸→L-アラニンアミダーゼ作用を，なんらかの理由でまぬがれた L-アラニン→D-グルタミン酸→L-リジン→D-アラニンのペプチドユニットが結合したグリコペプチドということになろう。そうであるとすれば，基本的な構造においては類似しているが，構成アミノ酸の種類やペプチドユニット間の架橋の有無，種類などについて多少ずつ異なる他の細菌種のペプチドグリカン[29)] に

もA群連鎖球菌のそれと本質的には同様な発熱作用が認められるかどうかを調べることによって解明されるべき興味ある研究課題といえる。また作用点を異にするペプチドグリカン水解酵素[30]を利用することによって，発熱作用の発現にペプチドグリカンのどのような構造が必要かを明かにし，あわせて HMW にみとめられる発熱作用が内毒素によるものではないことを決定的に実証することができよう。今回の研究においても HMW を卵白リゾチームあるいは *Chalaropsis* 酵素[30]を作用させて発熱活性がどのように影響されるのかを調べようとしたが，HMW はこれらの酵素に明確な感受性を示さず，さしあたってはこの種の実験を断念した。なお KARAKAWA ら[31]がペプチドグリカンの抗原決定基の研究に利用している D-および L-グルタミン酸，リジン，D-および L-アラニンよりなる種々の分子量，種々のアミノ酸構成の合成ポリペプチドをこの方面の研究に導入できれば，細胞壁ないしペプチドグリカンが示す発熱作用をはじめとする生物学的活性をめぐる問題の解明に役立つかもしれない。

つぎに HMW の静脈内注射による発熱の機序については，この研究では十分な検討を加えなかったので，推測をめぐらすことしかできない。内毒素のみならず発熱物質の多くは，それ自体体温調節中枢に作用するよりはむしろ被験動物の顆粒白血球その他に作用していわゆる内因性発熱物質が産生，遊離され，これが中枢に作用することにより発熱を惹起させるという説[32]が一般的に承認されているようである。このような観点からみると，HMW を静脈内注射したウサギにみられる発熱応答が STETSON[18]，ROBERSON と SCHWAB[14]，ROTTA ら[22]，ATKINS ら[21]によって報告されている連鎖球菌やその他のグラム陽性菌を注射したさいの発熱応答に比べて，発熱のはじまりがすみやかであり，持続時間も短いという事実は，HMW が可溶性であるために顆粒白血球との接触が喰作用とそれに伴う菌体，細胞壁の解体などの過程を必要とせずに行われ，そのために内因性発熱物質の産生も急速に行われるのではないかと考えることによって一応説明されうる。また微生物由来の物質による発熱を抗原抗体反応に基くアレルギーの表現の一つとみなす考え方もある。たとえば BCG を感染させたウサギに旧ツベルクリンを静脈内注射すると著明な発熱作用がみられるという事実が知られている(たとえば HALL と ATKINS[33])。また FAN ら[34]は牛血清アルブミンについて，ROOT と WOLFF[35]は人血清アルブミンについていずれも免疫反応に基くと考えられる発熱を報告している。HMW を構成しているグリコペプチドおよびC多糖体はいずれも抗原性を有することが知られており前者については KARAKAWA ら[36][37][38]の研究があげられる)，また供試ウサギ一般がA群連鎖球菌，あるいはグリコペプチドないしC多糖体と交叉反応を有する抗原をふくむ微生物の感染によって感作されている可能性を想定することはあながちありえないことではないが，アレルギー反応に基く発熱反応はHMW によるそれとはそのパターンが異っていることを指摘しておかねばならない。

HMW の注射をうけたウサギがエピネフリンの皮内注射に対して強い反応性を有することを示したが，このいわゆるエピネフリン試験は STETSON[18]，THOMAS[17]らによって記載され，その所見が少くとも肉眼的には局所 Shwartzman 現象と非常によく似ている点が注目されている。しかしその反応のメカニズムは全く異ったものであるらしく[17]，組織学的所見も炎症性循環障害（血栓の形成など），出血，出血壊死，多型核白血球の浸潤等によって特徴づけられる Shwartzman 現象のそれとは異なる。一方 HMW には局所 Shwartzman 現象を準備し，あるいは惹起する作用は，試みた限りの量ではいずれも検出できなかった。STETSON[18]，ROBERSON と SCHWAB[14]，ROTTA と BEDNÁŘ[22]は彼らが実験に用いたコロイド状に分散した細胞壁ないし細胞壁の浮遊液はエピネフリン試験においても局所 Shwartzman 現象を準備しあるいは惹起する活性についても陽性の成績を与えたと報告している。したがって HMW がエピネフリンに対する皮膚の反応性を高めるが，局所 Shwartzman 現象を成立させる活性を欠いているという所見は，単に量的な問題に起因する

のか，あるいは化学構造に起因する本質的なものであるのかについては現在のところ明かではなく，今後の検討を要する。

以上 HMW の発熱作用を中心とする生物学的活性について論じたが，この画分は本論文に記した以外にもいくつかの生物学的活性を有することが明かにされている。すなわち HMW をウサギの皮内に注射すると，注射個所を中心にして注射時間前後に腫張，発赤を伴った炎症反応が現われ，この急性反応は一旦次第に消退し，ついで注射後 9～13日目頃に多結節性の病変 (multinodular lesion) が生じる[3,4]。もっとも HMW の多結節性病変を惹起する作用は音波処理してえた細胞壁浮遊液のそれに比べては弱い。しかし多結節性病変の病理組織学的所見は有形の細胞壁を注射した際にみられるそれとほぼ同様であり，異好性白血球，リンパ球，マクロファージの浸潤によって特徴づけられる慢性炎症像を呈する[3]。またマウスの腹腔内に HMW を注射すると，心臓に対する傷害作用がみられる[3,4]。これらの病理作用と発熱作用との関連も今後検討を要する重要な研究課題と考えられる。

結　論

1) A群連鎖球菌，12型(S.F. 42株)の細胞壁を，発熱物質が含まれないように注意して部分精製したL-11酵素標品を用いて可溶化し，溶解産物をセファデックスでゲルロ過してラムノース，グルコサミン，ムラミン酸，グルタミン酸，アラニン，リジンを主成分とし，この他に微量の脂肪酸を含む高分子量画分 (HMW) をえた。

2) HMW をウサギの耳静脈内に注射することにより，この画分が急速に現われ，かつ 0.5 mg 以上の注射では数時間持続する強い発熱作用ならびに循環中の白血球数をまず減少ついで増加させる作用を有することを示した。HMW の発熱作用の最少有効量は体重約 2 kg のウサギに対して 0.1 mg であった。

3) HMW の 1.0 mg ずつをウサギに一日おきに 3 回反復注射することによって HMW の発熱作用に対する耐性を成立させることができた。しかし HMW に対して耐性を獲得したウサギも 1 μg の *E. coli* の内毒素の注射によっては明確な発熱応答を示した。逆に *E. coli* の内毒素の 1～2 μg を 7 日間毎日注射して内毒素の発熱作用に耐性としたウサギでは 1 mg の HMW の注射に対する発熱応答が著しく抑制された。

4) HMW の 2.0mg をウサギに静脈注射し，その 1 時間後にエピネフリンを皮内注射したところ，未処理のウサギに対してはなんら作用のない量のエピネフリンの皮内注射によって，注射後数時間で現われ 24時間前後に極期に達するきわめて強い出血，壊死の出現が観察された。

5) しかし HMW には，少なくとも試みた限りでの用量(準備，惹起注射とも最大 2 mg) では，対照として用いた *E. coli* 内毒素とは異なり，局所 Shwartzman 反応を準備しあるいは惹起する活性はみとめられなかった。

以上の実験事実に基いて，細胞壁を酵素的に溶解してえた HMW の発熱作用，エピネフリンに対する感受性を出現させる作用を担う活性因子の化学的実体あるいは作用機序などを，グラム陰性菌の内毒素あるいはA群連鎖球菌をはじめとするグラム陽性菌の発熱因子のそれとを比較しつつ考察した。

終るに臨み懇篤なる指導と校閲の労をとられた小谷尚三教授に深謝する。

また共同実験者として終始援助をいただいた成田俊彦君と，実験にさいして多大の教示と配慮を与えられた加藤慶二郎助教授にお礼を申し上げる。

なお脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる分析は岡山大学医学部微生物学教室金政助教授に，またエピネフリンによる皮膚反応の病理組織標本の作製とその所見に関する記載にさいしては本学口腔病理学教室の畏友，長谷川清，石田武の両氏に負った。記して謝意を表する。

文　献

1) 浜田茂幸：A群連鎖球菌細胞壁に関する研究 1. *Flavobacterium* L-11酵素による細胞壁の溶解機序について. 歯基礎誌, **12**：142-152, 1970.
2) 浜田茂幸：A群連鎖球菌細胞壁に関する研究 2. L-11 酵素による溶解産物の低分子量画分より分離したペプチドサブユニットの化学構造に

ついて．歯基礎誌，**12**：213-222，1970.

3) 成田俊彦，浜田茂幸，小谷尚三，加藤慶二郎：A群 *S. pyogenes* 細胞壁の生物学的活性について．日細誌，**25**：449-450，1970.

4) 小谷尚三，浜田茂幸：リウマチ性心臓病の成立機転—細菌学および免疫学の立場から—．日本臨床，**28**：1717-1736，1970.

5) KAPLAN, M. H.: Immunologic studies of heart tissue. I. Production in rabbits of antibodies reacted with an autologous myocardial antigen following immunization with heterologus heart tissue. *J. Immunol.*, **80**: 254-267, 1958.

6) FREIMER, E. H.: Studies of L forms and protoplasts of group A streptococci. II. Chemical and immunological properties of the cell membrane. *J. Exp. Med.*, **117**: 377-399, 1963.

7) HEYMANN, H., MANNIELLO, J. M. and BARKULIS, S. S.: Structure of streptococcal cell walls. I. Methylation study of C-polysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **238**: 502-509, 1963.

8) GHUYSEN, J. M., TIPPER, D. J. and STROMINGER, J. L.: *Methods in Enzymology* (edited by Neufeld and Ginsburg), Vol. VIII., pp. 685-699, Academic Press, New York, 1966.

9) DISCHE, Z. and SHETTLES, L. B.: A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, **175**: 595-603, 1948.

10) DISCHE, Z.: A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, **167**: 189-198, 1947.

11) 金井泉：血液一般検査法，3-II．白血球計算，臨床検査法提要，改訂第20版，金原出版，東京，1961.

12) HEYMANN, H., MANNIELLO J. M. and BARKULIS, S. S.: Structure of streptococcal cell walls V. Phosphate esters in the walls of group A *Streptococcus pyogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **26**: 486-491, 1967.

13) MUÑOZ, E., GHUYSEN, J. M. and HEYMANN, H.: Cell walls of *Streptococcus pyogenes*, type 14. C polysaccharide-peptidoglycan and G polysaccharide-peptidoglycan complexes. *Biochemistry*, **6**: 3659-3670, 1967.

14) ROBERSON, B. S. and SCHWAB, J. H.: Endotoxic properties associated with cells of group A streptococci. *J. Inf. Dis.*, **108**: 25-34, 1961.

15) BEESON, P. B.: Tolerance to bacterial pyrogens. 1. Factors influencing its development. *J. Exp. Med.*, **86**: 29-38, 1947.

16) HAAN, J. und MEYER, H. J.: Zur Wirkung des Chlorpromazin auf das Lipopolysaccharid-Fieber des Kaninchens. *Z. Ges. Exp. Med.*, **146**: 125-138, 1968.

17) THOMAS, L.: The role of epinephrine in the reactions produced by the endotoxins of gram-negative bacteria. I. Hemorrhagic necrosis produced by epinephrine in the skin of endotoxin-treated rabbits. *J. Exp. Med.*, **104**: 865-880, 1956.

18) STETSON, C. A., Jr.: Studies on the mechanism of the Shwartzman phenomenon. Similarities between reactions to endotoxins and certain reactions of bacterial allergy. *J. Exp. Med.*, **101**: 421-436, 1955.

19) ATKINS, E. and SNELL, E. S.: Fever. *The Inflammatory Process* (edited by Zweifach, B. W., Grant, L. and McCluskey, R. T.), pp. 495-534, Academic Press, New York, 1965.

20) SNELL, E. S. and ATKINS, E.: The mechanisms of fever. *The Biological Basis of Medicine* (edited by Bittar, E. E.), Vol. 2, pp. 397-419, Academic Press, New York, 1968.

21) ATKINS, E. and FREEDMAN, L. B.: Studies in staphylococcal fever. 1. Responses to bacterial cells. *Yale J. Biol. Med.*, **35**: 451-471, 1963.

22) ROTTA, J. and BEDNÁŘ, B.: Biological properties of cell wall mucopeptide of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, **130**: 31-47, 1969.

23) KIM, Y. B. and WATSON, D. W.: A purified group A streptococcal pyrogenic exotoxin. Physicochemical and biological properties including the enhancement of susceptibility to endotoxin lethal shock. *J. Exp. Med.*, **131**: 611-628, 1970.

24) WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., EICHENBERGER, E. und KEIDERLING, W.: Über bakterielle Reizstoffe I. Mitt.: Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogenes aus *Bacterium coli*. *Z. Naturforsch.*, **7 b**, 536-548, 1952.

25) BENNETT, I. L.: Production of fever and the Shwartzman phenomenon by native dextran. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**: 266-268, 1952.

26) LANDY, M. and JOHNSON, A. G.: Studies on the O antigen of *Salmonella typosa*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**: 57-62, 1955.

27) WESTPHAL, O. und LÜDERITZ, O.: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegative Bakterien. *Angew. Chem.*, **66**: 407-417, 1954.

28) BENNETT, I. L., Jr. and BEESON, P. B.: Studies on the pathogenesis of fever. 1. The

effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. *J. Exp. Med.*, **98** : 477-492, 1953.

29) 小谷尚三：細菌細胞壁の構造と機能 II. 表面, **5** : 285-297, 1967.

30) 小谷尚三：細菌細胞壁を溶解する微生物由来の酵素, **13** : 1136-1149, 1968 ; **14** : 38-54, 1969.

31) KARAKAWA, W. W., MAURER, P. H., WALSH, P. and KRAUSE, R. M. : The role of D-alanine in the antigenic specificity of bacterial mucopeptides. *J. Immunol.*, **104** : 230-237, 1970.

32) WOOD, W. B., Jr. : Studies on the cause of fever. *New Eng. J. Med.*, **258** : 1023-1031, 1958.

33) HALL, C. H., Jr. and ATKINS, E. : Studies on tuberculin fever. 1. The mechanism of fever in tuberculin hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, **109** : 339-359, 1959.

34) FARR, R. S. : Fever as a manifestation of an experimental allergy. *J. Allergy*, **30** : 268-269, 1959.

35) ROOT, R. K. and WOLFF, S. M. : Pathogenetic mechanisms in experimental immune fever. *J. Exp. Med.*, **128** : 309-323, 1968.

36) KARAKAWA, W. W. and KRAUSE, R. M. : Studies on the immunochemistry of streptococcal mucopeptide. *J. Exp. Med.*, **124** : 155-171, 1966.

37) KARAKAWA, W. W., LACKLAND, H. and KRAUSE, R. M. : An immunochemical analysis of bacterial mucopeptides. *J. Immunol.*, **97** : 797-804, 1966.

38) KARAKAWA, W. W., BRAUN, D. G., LACKLAND, H. and KRAUSE, R. M. : Immunochemical studies on the cross-reactivity between streptococcal and staphylococcal mucopeptide. *J. Exp. Med.*, **128** : 325-340, 1968.