

緑膿菌自家融解ワクチンの有効成分 に関する研究

佐藤平二・藤田景清*

(家畜微生物学研究室)

昭和63年 8 月10日 受理

Studies on Effective Component of *Pseudomonas aeruginosa* Autolysed Vaccine

Heiji SATO and Kagekiyo FUJITA

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

緑膿菌ワクチンの有効性についてはすでに多くの報告があり^{1,6,7,10,11,12,15,22,24}、免疫効果以外に種々の生物活性のあることも知られている^{1,5,8,14,21}。今回の実験は先に報告した MMAF ワクチン^{22,23} (以下 MMAF と略す) の感染防御の有効成分について調べたものである。

実 験 方 法

1. 供試菌株とワクチンの調製

供試菌株と MMAF ワクチン^{22,23} (以下 MMAF と略す) の調製は前報と同様であるが、防腐剤としてチメロサールの代わりに窒化ナトリウムを終末濃度 1:1000 になるように加えた。

2. 試料の調製

MMAF およびワクチンの作製菌株である *Ps. aeruginosa* 1300 株の培養菌から各種の試料を調製し、ゲル濾過、薄層クロマトグラフィーの試料とした。

(1) 濃縮 MMAF

MMAF を限外濾過膜 UM 2 (MW: 1000 cut off; アミコン社製) をセットした濾過器 (Model 52; アミコン社製) で、1.5 kg~2.0 kg/cm² の N₂ ガス陽圧下で濾過し 1/10 に濃縮したもの (以下 Conc. MMAF と略す) と MMAF を凍結乾燥し、用に臨みその 1 g を蒸留水 2 ml に溶解した濃縮 MMAF (以下

Lyoph. MMAF と略す) を調製した。

(2) OEP の調製

MMAF から本間らの方法^{7,8}) により OEP を調整した。その方法の概要は MMAF 130 ml に 50 % ZnCl₂ 溶液 2 ml を加えて塩析、3000 rpm 10 分間遠沈ののち、沈渣を集め 20 % Na₂HPO₄ 溶液を 20 ml 加えて OEP を溶出し、その溶出液を蒸留水に対して 24 時間透析後、0.22 μm ミリポアメンブランフィルターで濾過し、2 ml ずつアンプルに分注して凍結乾燥した。使用にさいしては滅菌蒸留水 2 ml に溶解した。これを以下 MMAF-OEP と略す。

(3) LPS の抽出と C-7 処理

LPS 抽出は Westphal 法により²⁷⁾ MMAF 100 ml に 90 % フェノール 100 ml を加え 65°C ~ 68°C で 45 分間攪拌、冷却後 30 分間 3000 rpm 遠沈を行い、水層とフェノール層を分取してそれぞれ蒸留水に対して 48 時間透析後凍結乾燥した。それらはそれぞれ、Water fraction, Phenol fraction とした。凍結乾燥試料はフェノール除去のため Sephadex G15 でゲル濾過を行い、再び凍結乾燥して用に臨み滅菌蒸留水 1 ml で溶解した。次に、Lyoph. MMAF 溶液に核酸・エンドトキシン除去剤 C-7 (大日本製薬社) 0.1 ml を加え、10 分間攪拌し、4°C に 4 時間静置した。その後、3000 rpm、10 分間遠沈し、上清を濾過滅菌した。これを以下、C-7 Treated MMAF とする。使用まで 4°C に保存し用に臨み 100 倍に希釈した。対照には Lyoph. MMAF の 100 倍希釈液を用いた。

(4) 脂質の抽出

Ps. aeruginosa 1300 株一夜培養菌と Lyoph. MMAF より Brigh-Dyer 変法³⁾ により脂質を抽出した。以下、これらはそれぞれ *Ps. lipid*, MMAF lipid と略す。また、脂肪酸定性のため上記二つの lipid を HCl-MeOH 法¹⁸⁾ によりメタノリシスを行った。それら

* 現在 熊本県畜産販売農業共同組合連合会

〒860 熊本市草場町 1-21

Animals Selling Agriculture Cooperative Association of
Kumamoto Prefecture, 1-21 Kusabacho, Kumamoto, 860
Japan

を Ps. lipid Met, Lyoph. MMAF lipid Met. とした。以上 4 試料のほかに Conc. MMAF, MMAF-OEP, Westphal 法の Water fraction, Phenol fraction についても薄層クロマトグラフィーにより Rf 値を測定した。薄層板は Silicagel 60 (Without Fluorescent Indicator, 0.25 mm: Merk 社製) を用い, 3 種類の展開溶媒により, 中性脂質, 複合脂質, 脂肪酸メチルエステルの検出を試みた^{9,18)} 検出には 0.05 % ローダミン B エタノール溶液を噴霧したのち, 赤紫色を呈し UV (360 nm) 照射で蛍光を発するスポットを脂質と認めた。

3. ゲル濾過

前記の試料のうち抽出脂質以外のものについて Sephadex G-50 (fine), G-15 (Pharmacia Fine Chemical 社製) を用い, 0.1M NaCl 加 0.02 M PB (pH 7.0) により法のごとくゲル濾過を行った。カラムサイズは G-50 の場合 1.3 cm×48 cm, G-15 では 1.2 cm×50 cm のガラス管を用い void volume は G-50, G-15 とともに 19 ml であった。既知分子量としてミオグロビン (Type 1 ウマ駆幹筋) MW: 17,800 (Sigma 社製) とビタミン B₁₂ MW: 1355 (半井化学薬品) を用いた。試料はいずれも 1 ml で流速は G-50 で 15 ml, G-15 で 13 ml, 採取量は 3 ml ずつであった。分取したサンプルについて以下の項目を調べた。

(1) タンパクの定量

各分画のタンパクの定量は 280 nm および 230 nm における吸光度を分光光度計 (日立 102 型) により測定, あるいは Folin-Ciocalteu 法により測定した。

(2) 核酸および核酸関連物質の定量

各分画の 260 nm における吸光度と 280 nm, 230 nm での吸光度との関係から推定した。

(3) 糖の定量

各分画の糖はフェノール硫酸法により発色させ 480 nm で吸光度を測定した。高濃度分画では 10 倍, 50 倍, 100 倍に希釈して測定し濃度を算出した。

(4) KDO (2-keto-3-deoxy-octonic acid) の定量

KDO の定量はゲル濾過に供した試料と Conc. MMAF のゲル濾過した分画について行った。すなわち, Warren の方法²⁶⁾ にしたがって過ヨウ素酸, チオバルビツール酸反応により呈色させ, 549 nm における吸光度を測定した。

(5) 脂質の検出

脂質の有無は, Conc. MMAF のゲル濾過分画では, それぞれを凍結乾燥したのち滅菌蒸留水 0.1 ml

に溶解してシリカゲルにスポットし, 2-(4) に述べた方法によりしらべた。

(6) 蛍光性の有無

試験管に分取したゲル濾過分画に, 暗室内で紫外線 (250 nm~400 nm) を照射し, 蛍光を発する部分を蛍光分画 (Fluor. fraction) とした。蛍光性の強さは肉眼的な印象で図に示した。

4. 感染防御試験

(1) 実験動物

当教室で繁殖させた JCL-ICR 系 Conventional マウス (体重 18 g~25 g) を用いた。使用マウス頭数の 10 % について, NAC 寒天培地によるふん便, 口腔の *Ps. aeruginosa* 検索を行ったが, すべて陰性であった。マウスは固形飼料 (日本農産工業社製) と水道水で飼育した。

(2) マウスの免疫と菌による攻撃

免疫に用いた分画は全て 0.22 μm フィルターで濾過滅菌し, 使用まで 4℃ に保存しその 0.5 ml を腹腔に注射, 4 日後に攻撃を行った。攻撃株は *Ps. aeruginosa* 1300 株をマウスに 3 代以上継代して強毒化したものを用い, 攻撃用菌液の調製は前報²³⁾ の通りである。攻撃菌量は LD₅₀ 菌量のほぼ 100 倍であった。

結 果

1. 濃縮 MMAF の有効成分

Sephadex G-50 により Conc. MMAF, Lyoph. MMAF をゲル濾過した結果の一部は Fig. 1 に示した。原 MMAF のゲル濾過では Fig. 1 の Peak1 に相当する部分が認められなかった。Conc. MMAF のゲル濾過では No. 7 管に UV 吸収のピークがあり, その吸光度は 260 nm > 230 nm > 280 nm であった。この No. 7, 8 管を Peak1 分画とした。この分画には糖, KDO のピークも認められた。No. 16~20 管を Peak2 分画としたが, ここには UV 吸収のほかに糖と KDO のピークとともに蛍光性も認められた。各種の KDO 値は Table 1 に示した。Lyoph. MMAF のゲル濾過パターンは Conc. MMAF と同様であるが, No. 15 管以降の幅が広がり No. 25 管にまで達した。Conc. MMAF では No. 9~No. 19 管までの各管に脂質が検出された。Peak2 分画を凍結乾燥した濃縮試料を Sephadex G-15 で溶出したところ, No. 9 管 (MW: 約 1355) に UV 吸収と蛍光性が認められ, No. 13 管に糖のピークが認められた。そこで No. 7, 8, 9 管を Peak2 (F1 fraction), No.

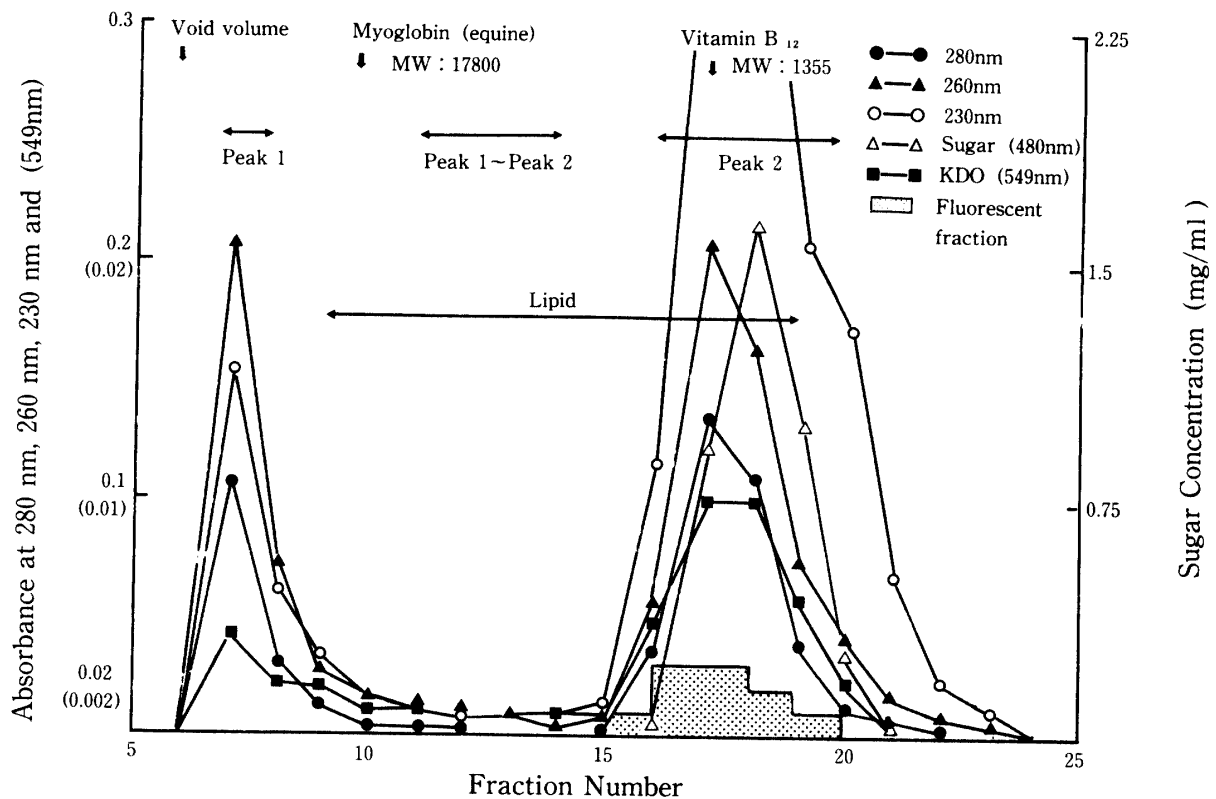


Fig. 1. Sephadex G-50 Column Chromatography of Conc. MMAF

12, 13, 14管を Peak 2 (Sugar fraction) とした。これらの試料についてマウスに対する感染防御能力を調べた成績は Table 2 に示した。ゲル濾過前の MMAF, Conc. MMAF, Lyoph. MMAF はいずれも強い感染防御能をもっているが, Conc. MMAF

の Peak 1 分画はマウス 3 頭中 1 頭を生き残らせたのみであり, Peak 2 分画では全例死亡したのに対し, その中間にある Peak 1~2 分画では全頭が生存した。Peak 2 の 2 つの分画にはいずれも感染防御能が無かった。しかしながら, Conc. MMAF の Peak

Table 1. KDO value of different fractions separated from MMAF

Fractions	Absorbance at 549nm*	Note
MMAF	0.15	
Conc. MMAF	0.17	concentrated to 1/10
Lyoph. MMAF	1.10	1 g of Lyoph. MMAF/2 ml
MMAF-OEP	0.00	130 ml of MMAF → 2 ml of the sample
Westphal's		
Water fraction	0.40	100ml of MMAF → 1 ml of the sample
Phenol fraction	0.025	100ml of MMAF → 1 ml of the sample
C-7 treated MMAF		2 ml of Lyoph. MMAF+0.1 ml of C-7
No. 7~No. 12 fraction	0.075	applied 1 ml of sample to gel
No. 15~No. 20 fraction	0.45	applied 1 ml of sample to gel

* : Tiobarbituric acid method²⁶⁾

Table 2. Protection of mice with MMAF fractions separated by gel filtration (See Fig.1-1 and Fig.1-2)*

Fractions	No. of survivors/ Mice challenged	Related Figure
Concentrated MMAF		
Peak1	1/3	Fig. 1-1
Concentrated Peak1	3/3	
Peak 1~2	3/3	Fig. 1-1
Peak 2 (Fluorescent fraction)	0/3	Fig. 1-2
Peak 2 (Sugar fraction)	0/3	Fig. 1-2
Concentrated Peak 2	0/3	
MMAF-OEP		
MMAF-OEP whole	3/3	Fig. 2
No. 8 tube	3/3	Fig. 2
No. 11 tube	3/3	Fig. 2
No. 18 tube	0/3	Fig. 2
Westphal's fractions		
Water fraction	0/5	Fig. 3-1
Phenol fraction (Whole)	5/5	Fig. 3-2
Phenol fraction (No. 8, 9 tube)	4/5	Fig. 3-2
C-7 treated MMAF		
C-7 treated MMAF (Whole)	0/5	Fig. 4
C-7 treated MMAF (No. 7~12 tubes)	0/5	Fig. 4
C-7 treated MMAF (No. 15~20 tubes)	0/5	Fig. 4
MMAF Whole	5/5	

* : Mice were injected intra peritoneally with 0.5ml of cell suspended mucine containing 100LD₅₀ dose of *Pseudomonas aeruginosa* strain 1300.

1を凍結乾燥し5倍に濃縮溶解した液では3頭全部が生残したが, Peak 2は濃縮しても感染防御能はなかった。

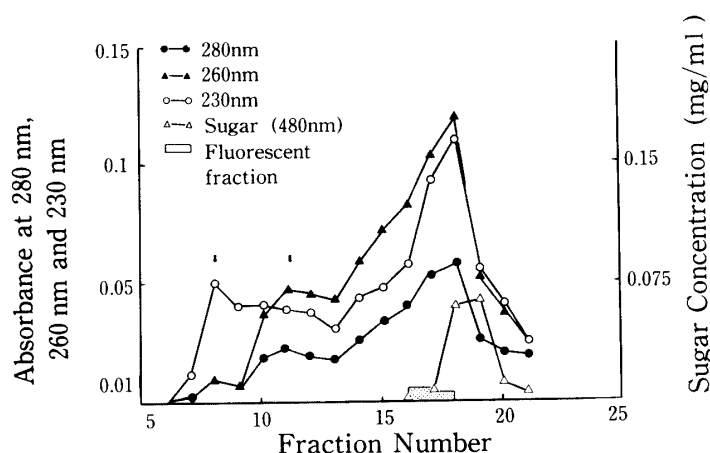


Fig. 2. Sephadex G-50 Column Chromatography of MMAF-OEP

2. MMAF-OEPの有効成分

MMAF-OEPのゲル濾過パターンはFig.2に示したようにFig.1とはやや異なり, No.8管に230 nmの吸収ピークがあり, No. 11, No. 18管に260 nmの吸収ピークが認められたが, この分画の吸収パターンは260 nm>230 nm>280 nmであり Conc. MMAFのそれとは異なる。蛍光性, 糖は共に減少し, KDO及び脂質は認められなかった (Table 2, Table 3)。これらの分画のマウスに対する感染防御能はTable 1に示したように, MMAF-OEP原試料では全頭生存し, No. 8管, No. 11管もそれぞれ3/3の生存率であった。

3. MMAFに含まれるLPSの有効成分

Westphal法によりMMAFから抽出された水層, フェノール層由来試料のゲル濾過パターンはFig. 3-1, Fig. 3-2であるが, 水層では, No. 10管にピークがあり, 核酸関連物質が疑われ, フェノール層で

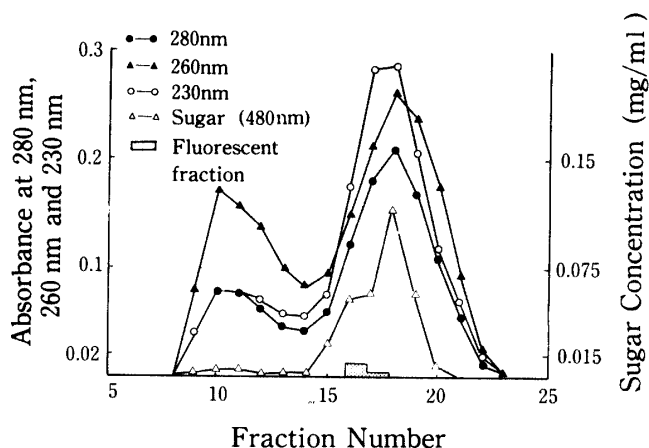


Fig. 3-1. Sephadex G-50 Column Chromatography of MMAF Water Fraction

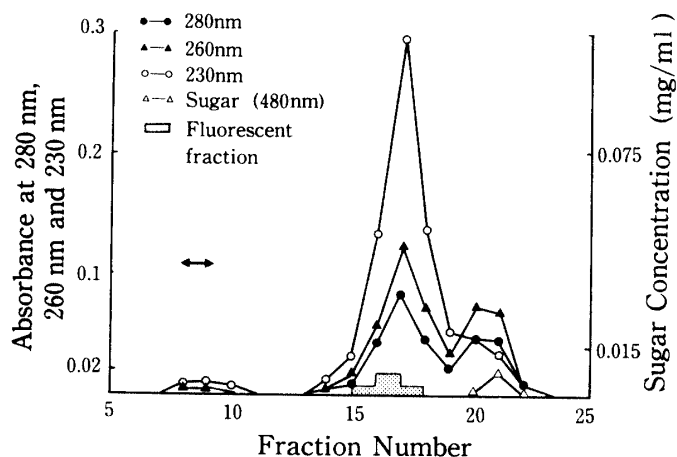


Fig. 3-2. Sephadex G-50 Column Chromatography of MMAF Phenol Fraction

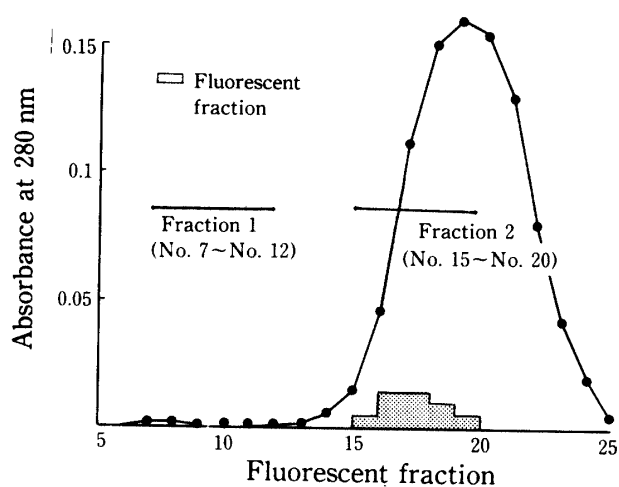


Fig. 4. Sephadex G-50 Column Chromatography of C-7 Treated MMAF

はタンパクが No. 8, No. 9 管に微量認められた。脂質は両試料に存在が認められた。マウス感染防御能は Table 1 に示したように、水層よりの試料には防御能が無かったのに対し、ゲル濾過前のフェノール層試料では全例生存し、No. 8, No. 9 管分画を与えたマウスは80%が生残した。C-7 処理した MMAF のゲル濾過パターンは Fig. 4 に見るように Fig. 1 の Peak 1 は殆ど消失したが、Peak 2 分画の減少は少く、KDO、脂質も検出された。KDO と脂質については Table 2, Table 3 に示した。C-7 処理 MMAF には全く感染防御能を認めなかった。

Table 3. Characterization of lipid separated from MMAF and variable fractions by thin-layer chromatography

Fractions	Rf value		
	A* ¹	B* ²	C* ³
Ps. lipid	0.00	0.30~0.45, 0.61	NT**
Lyoph. MMAF lipid	0.00	0.29, 0.64	NT
Ps. lipid Met.	0.58, 0.87	0.30	0.45, 0.50, 0.90
Lyoph. MMAF Met.	0.58	0.30, 0.60	0.40~0.55
Conc. MMAF	0.00	0.25, 0.45~0.50	NT
MMAF-OEP	No lipid	No lipid	NT
Westphal's			
Water fraction	0.00	0.30	NT
Phenol fraction	0.00	0.30	NT
C-7 treated MMAF	0.00	0.32	NT

* 1 : Petroleum ether/ethyl ether/acetic acid (80 : 30 : 1, v/v/v).

* 2 : Chloroform/methanol/water (65 : 20 : 0.5, v/v/v).

* 3 : Hexane/ethyl ether (85 : 15, v/v).

* 4 : Not tested.

4. MMAF 含有脂質と緑膿菌菌体脂質

MMAF の感染防御能の有効成分として LPS の Lipid A を検討するため、分離脂質の TLC による展開を試みた。その成績は Table 3 に一括して示した。展開溶媒として、石油エーテル/エーテル/酢酸を用いた場合 *Ps. lipid Met.*, *Lyoph. MMAF lipid Met.* 以外は原点からの移動スポットはみとめられなかった。クロロフォルム/メタノール/水で展開したところ、MMAF-OEP 以外は Table 3 に示すような位置にスポットが認められた。ヘキサン/エチルエーテルによる脂肪酸メチルエステルの展開では *Ps. lipid Met.* に 3 スポット、*Lyoph. MMAF lipid Met.* では 1 個のスポットが認められた。

考 察

本実験において感染防御能を示したものは *Conc. MMAF* では Peak 1 と Peak 1~2 であったが、予想に反して強い免疫能は Peak 1~2 (MW:4000~15000) に存在した。この Peak 1~2 分画は MMAF-OEP の有効成分とその一部がかさなる (No. 11 管など) が、成分は必ずしも同じとは考えられなかった。すなわち MMAF-OEP では *Conc. MMAF* に認められるようなはっきりした二峰性は明らかでなく、重金属沈殿による component の変化があったのでないかと考えられた。また、脂質も認められなかったことから、OEP の免疫原性と MMAF の免疫原性には質的に異なる部分があるものと考えられた。MMAF-OEP の感染防御には核酸の関連が疑われたのに対し、*Conc. MMAF* では核酸・タンパクが有効成分に認められず KDO も微量であった。しかし、脂質が認められ、その内の特定のものが感染防御に関与するのではないかと考えられた。Peak 2 に感染防御能が認められなかったことは前報²³⁾と異なったが、その理由は明らかでない。また、Peak 2 に認められた KDO と脂質には感染防御への関与は考えられなかった。

グラム陰性菌のエンドトキシン、LPS は自家融解ワクチンである MMAF にも含まれ、感染防御能の一端を担っていることが考えられる。Westphal 法により MMAF から抽出した水層、フェノール層試料での実験では、両者のゲル濾過パターンは異なっており、感染防御能はフェノール分画にあった。Cryz ら⁴⁾は Westphal 法における LPS の分配は、LPS の構成成分である親水性 O-特異多糖の構造の長短により分配される層が異なることを述べ、O-特

異多糖が短い場合は LPS はフェノール層に分配することを認めている。また、Amano ら²⁾、Ribi ら²⁰⁾はエンドトキシン分子の構造変化による無毒化利用法を研究し、菌の自家融解過程でおこる Lipid A の構造変化産物の生化学活性も当然予想されるとしている。Ng ら¹⁶⁾の O-特異多糖欠損グリコリピッドの非特異的早期発現性免疫、無パイロゲニシテイ効果などは諸文献^{5,11,22)}と符合するものがある。本実験では LPS の証明法として各分画の KDO の検出、定量を試みたが KDO の広い分布パターンから、自家融解液中には LPS のみならず O-特異多糖欠損グリコリピッド、KDO を解離した Lipid A、遊離 KDO など多様な LPS 断片が含まれることを想造させるとともに、Lipid A の指標としての KDO の意義も検討の余地があるものと思われた。しかしこれらの LPS 断片は、それぞれが、あるいは組み合わせられて免疫刺激をふくむ諸種の生物活性を示すことは十分にかんがえられる^{1,13,19,25)}。エンドトキシン・核酸除去剤 C-7 で処理した MMAF では MW:5000 以上のピークは殆ど認められなくなり、感染防御能も消失していた。このことは MMAF の感染防御にはエンドトキシン・核酸が強く係わっていることを示したが、前報²³⁾ではヌクレアーゼ処理によっても MMAF 感染防御能が失われなかったことから、LPS の役割の方が大きいと思われる。しかし、C-7 処理による凝集・沈殿の詳細が不明なので、さらに脂質やその他の成分にたいする影響を検討する必要がある。

前述のように感染防御有効成分として Lipid A に興味をもたれたので、緑膿菌と MMAF より抽出した脂質を比較検討したところ、両者には同様の複合脂質が含まれていることがわかった。メタノリシスを行っての比較では、MMAF 由来のものは菌体脂質よりも中性脂質、脂肪酸エステルの展開スポットが少なく自家融解の影響が考えられた。*Ps. lipid Met.* の複合脂質に $R_f=0.6$ のスポットが認められなかったのは、その含量がごく微量だったためと考えられた。また、Lipid A の構成脂肪酸である 3 ヒドロキシ脂肪酸 (3-OH-FA) 検出のためヘキサン・エーテルで展開したところ、*Ps. lipid Met.* では 3 スポットを認めたが、 $R_f=0.45$ は 2-OH-FA, $R_f=0.50$ は 3-OH-FA, $R_f=0.90$ は非極性脂肪酸と推定した^{18,28)}。しかし、*Lyoph. MMAF lipid Met.* の $R_f=0.40\sim0.55$ のスポットは微弱なものであった。以上の試料の他のものについて複合脂質を検討したところ、*Conc. MMAF* では $R_f=0.25, 0.45\sim0.50$

の2スポットを認めたが、MMAF-OEPにはスポットは認められず、その他の3試料ではいずれにも $R_f=0.30$ 付近にスポットが認められた。以上の結果をマウス感染防御試験と重ねてみると、 $R_f=0.30$ の脂質は有効成分である可能性は少なく、 $R_f=0.60$ のスポットが有意なのではないかと考えられた。またWestphal法のフェノール層分画とMMAF-OEP分画の感染防御能には、脂質の係わりは少ないものと思われた。今回の実験では、3-OH・FAからLipid Aの存在を必ずしも明確に示し得なかったが、今後別な方法により検討を加えたい。

緑膿菌由来物質には免疫原としての性質のほかに種々の生物活性があり、その有効成分は多様であり単離は必ずしも容易ではない。また、有効成分の、生体に対する反応別解析も全て明らかにされている段階ではないが、はなはだ興味深い問題を含んでおり、今後エンドトキシンを無毒化して生体に利用しようとする試みの一環としてさらにMMAFの研究に努めたい。

結 論

1. 濃縮MMAFワクチンのゲル濾過分画のうち感染防御能を持つものはMW:17000以上の分画とMW:4000~15000の分画であった。

2. MMAFワクチンより調製したOEPにも感染防御能が認められたが、タンパク分画以外にMW:8000核酸関連物質を含む分画にも感染防御能が認められた。

3. MMAFワクチンからWestphal法により抽出した水層試料には感染防御能はなく、フェノール層試料に感染防御能が認められた。

4. MMAFワクチンはエンドトキシン・核酸除去剤であるC-7処理により感染防御能を失う。

5. MMAFワクチンの感染防御には脂質成分の関与が考えられ、シリカゲルTLCによる脂質の成分分析の結果より、 $R_f=0.60$ の複合脂質が有効成分の一つではないかと考えられた。

文 献

- 1) 阿部千代治, 棚元憲一: 緑膿菌内毒素の生物活性と化学構造. 日本細菌誌, **36**, 565-571 (1981)
- 2) Amano, K., Ribí, E. and Cantrell, J. I.: Structural requirements of endotoxic glycolipid for antitumor and toxic activity. *J. Biochem. (Tokyo)*, **93**, 1391-1399 (1983)
- 3) Brigh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem.*

- Physiol.*, **37**, 911-917 (1959)
- 4) Cryz, S. J. Jr., Pitt, T. L., Fürer, E. and Germanier, R.: Role of LPS in virulence of *P. aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **44**, 508-513 (1984)
- 5) Fukui, G. M., Honna, J. Y. and Abe, Choyoji: Non-specific protective properties of *P. aeruginosa* endotoxin and its component. *Japn. J. Exp. Med.*, **41**, 489-492 (1971)
- 6) Gilleland, H. E. Jr., Parker, M. G., Matthews, J. M. and Berg, R. D.: Use of purified outer membrane protein (Porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine. *Infect. Immun.*, **44**, 49-54 (1984)
- 7) Homma, J. Y. and Suzuki, N.: The protein moiety of endotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. Newyork Acad. Sci.*, **133**, 508-526 (1966)
- 8) 本間遜, 小酒井望, 滝上 正: 緑膿菌とその感染症 p. 137-144, 文光堂, 東京 (1981)
- 9) 石川正幸, 中沢泰男: 薄層クロマトグラフィー, 135-151, 南山堂, 東京 (1972)
- 10) Jones, R. J.: Protection against *Ps. aeruginosa* infection by immunization with fractions of culture filtrates of *Ps. aeruginosa*. *Brit. J. Exp. Path.*, **49**, 411-420 (1968)
- 11) Jones, R. J.: Early protection by vaccines in Burns. *Brit. J. Exp. Path.*, **52**, 100-109 (1971)
- 12) Jones, R. J.: Passive protection of mice against *Ps. aeruginosa* by serum from recently vaccinated mice. *Brit. J. Exp. Path.*, **52**, 264-270 (1971)
- 13) 河西信彦: Endotoxinの構造と機能に関する最近の知見. 日本細菌誌, **34**, 489-504 (1979)
- 14) Kojima, Y., Homma, J. Y. and Abe, C.: Property to induce interferon of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin and its components. *Japn. J. Exp. Med.*, **41**, 493-496 (1971)
- 15) Montie, T., Craven, R. and Holder, I. A.: Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.*, **35**, 281-288 (1982)
- 16) Ng, Ah-Kau, Butler, R. C., Chen, C. H. and Nowotny, A.: Relationship of structure to function in bacterial endotoxins. IX. Differences in the lipid moiety of endotoxin glycolipids. *J. Bact.*, **126**, 511-515 (1976)
- 17) 日本生化学会編: 生化学実験講座 3, 脂質の化学, p. 13-50, 東京化学同人, 東京 (1974)
- 18) 日本生化学会編: 生化学実験講座 3, 脂質の化学, p. 189-200, 東京化学同人, 東京 (1974)
- 19) Pier, G. B., Pollack, M., and Cohen, M.: Immunochemical characterization of high-molecular-weight polysaccharide from Fisher immunotype 3 *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **45**, 309-313 (1984)
- 20) Ribí, E.: Beneficial modification of the endotoxin molecule. *J. Biol. Resp. Modif.*, **3**, 1-9 (1984)
- 21) Sasaki, M., Ito, M., and Homma, J. Y.: Immunological studies on the Original Endotoxin Protein (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*—Adjuvant effect of OEP in vivo. *Japn. J. Exp. Med.*, **45**, 335-347 (1975)
- 22) Sato, H., Diena, B. B., and Greenberg, L.: A polyvalent *Pseudomonas* vaccine. *Rev. Can. Biol.*, **33**, 93-97 (1974)
- 23) 佐藤平二, 坂田雅哉, 古賀久視, 望月雅美: 緑膿菌自家融解ワクチンの感染防御効果について. 鹿大農学術報告, No. 35, 133-139 (1985)
- 24) Tabuchi, K., Sato, H. and Diena, B. B.: Pathogenic

- and immunological properties of culture filtrates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canad. J. Microb.*, **20**, 1417-1422 (1974)
- 25) Takayama, K., Qureshi, N., Raetz, C. R. H., Ribi, E., Peterson, J., Cantrel, J. I., Pearson, F. C., Wiggins, J. and Johnson, A.: Influence of fine structure of lipid A on Limulus amoebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infect. Immun.*, **45**, 350-355 (1984)
- 26) Warren, L.: Tiobarbituric acid assay of sialic acid. *Methods in Enzymol.*, **Vol. 6**, 463-465, Academic Press, New York (1963)
- 27) Westphal, O. and Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenol water and further application of the procedure. in Whistler, R. L. (ed.), *Methods Carbohydr. Chem.* **5**, 89-91, Academic Press Inc., New York (1965)
- 28) 矢野郁也: 細菌におけるハイドロキシ脂肪酸の分布と代謝に関する研究, 阪大医学誌, **23**, 153-169 (1970)

Summary

Numerous biologically active factors stemmed from *Pseudomonas aeruginosa* have been reported elsewhere, and they are believed to be contributive not only to immunization but also to other biological activities, such as tumor-necrotic effect, interferon inducing effect, stimulation of immune system and so on.

This paper deals with the protective substances in our autolysed *Pseudomonas* vaccine which is hereafter referred to as MMAF.

Alliquots of MMAF concentrated by ultra-filtration, original endotoxin protein (OEP) prepared from MMAF, phenol-water extract of MMAF and C-7, which removes bacterial endotoxin and nucleic acid treated MMAF were separated by Sephadex G-50 column chromatography. Detection of KDO and lipid analysis were also carried out, expecting to elucidate the role of Lipid A which might be contained in MMAF. Protection of mice was demonstrated by fraction of MW: 4000~15000 in concentrated MMAF and by fraction of 8000 dalton containing nucleic acid related substance. In phenol-water extracted sample, only phenol-phase fraction reveals protection. Mice were not protected by administration of C-7 treated MMAF vaccine. The results obtained suggest that the conjugated lipid having 0.6 of R_f value on silica gel TLC may pertain to protection of mice.