百日咳菌液状培養濾液成分の示す感染防禦性について

伊 藤 齊

東京大学伝染病研究所第一研究部 (部長 細谷省吾教授)

〔受付: 11月10日1954年〕

百日咳感染防禦性抗原に関し百日咳菌菌体よりこのものを抽出精製する試みが内外幾多の業績に於て示されている。

田上¹⁾ Elderling²⁾等の報告に見る本菌の多糖体抗原については後に至りその重要性は余り認められなくなり又凝集原が感染防禦性抗原として重要な役割を演ずると云う見解を Felton et al³⁾ Smolens et al⁴⁾ Evans⁵⁾等の人々によつて立てられたがその後本抗原の感染防禦性は次第に否定されるに至つた。百日咳感染防禦抗原と凝集原とは同一ではないと云う事は Pillmer 及び Robins⁶⁻⁷⁾ も加熱無毒化した百日咳菌体よりの抽出液を低温メタノール沈澱法で Protective antigen を分離し、次いで赤血球基質を用いて超音波処理菌液より Protective antigen を特異的に吸着分離し毒素及び凝集素とは全く別のものであらうと報告している。更に桑島氏は1951年⁸⁾ 百日咳菌体の尿素抽出液のメタノール50%で沈澱しない分劃を濃縮してN量が少く2.2%で、毒性も亦少い感性防禦性抗原を取出し凝集原と分離出来たと云う。この問題の裏付として抗血清の面から追究した Hinke and Johnson⁹⁾の報告によれば百日咳菌ワクチンで免疫した高度免疫人血清中の感染防禦抗体は主として γ_2 -globulin 中に存在するが、凝集素はこの分劃には少量しか存在しないとのことである。

又山本教授及び¹⁰⁾共同研究者の数次にわたる発表では百日咳菌体から抽出した毒性ある分劃は Agglutinin や多糖体分劃に比し感染防禦性が最も強く、又マウス脳内被動性免疫実験により血清中の感染防禦を支配する抗体は、K抗体や抗毒素とは別の何か易熱性抗原に対する抗体があるのではないかと推論している。

一方春日氏等¹¹⁾は莢膜物質即ち Kauffmann の所謂K抗原として LS 両抗原を、又菌体抗原として O 抗原の3者を提唱し、感染防禦性には LS 殊に L 抗原の密接な関係があることを力説している。

以上の結果よりすると百日咳菌感染防禦に与るものは菌体由来の毒性を示す分劃或は LS 抗原と関連を有する

分劃が之に相当するが之以外にも感染防禦能を多少なりとも有する因子が存在するのではあるまいか。この仮定の下に菌体とは別に培養濾液を取上げて見ると、本菌の易熱性毒素が抗毒性免疫に与つて居り感染並に免疫に重要な役割を演じているという報告が多くなされて居り、Toomy et al.¹²⁾ Trunchina¹³⁾ Robert et al¹⁴⁾ 等により培養濾液の易熱性毒素の重要性を認めて居り、又 Wood¹⁵⁾ 等も濾液成分が感染防禦効果を有する事を報告して居る。

更に本年度細菌学会百日咳シンポジウムに於て細谷教授並に協同研究者¹⁶⁾及び桑島教授¹⁷⁾により夫々何れも培養濾液の感染防禦性を認めて報告された。

私は今回百日咳菌型菌 I 型菌並 III 型菌培養濾液を濃縮精製し、得られた物質が試験管内での沈降反応性、免疫血清中の LS 及び O 抗体に対する吸収能、I 型並 III 型菌に対する凝集素産生能及び毒性を有しないに拘らず感染防禦能を有している事を認めこの物質の化学的性状をも追究したので、ここに報告致します。

実験材料及び方法

菌株並に培養菌量:

I 型菌としては 18-323 株 14 代 III 型菌としては坂入株 72 代を使用した。同菌を Bordet-Gengon 培地に移植し 37°C48hr 培養後次に示す無蛋白培地 (Cohen-Wheeler 培地) 150 ml に対して 2~3 öse 程度に移植した。

培地: Casamino acids 八洲化学製造のものを使用して表 1 に示す Cohen-Wheeler 培地を作り Roix の瓶に 150 ml 宛分注、高圧滅菌を行つた。

培養並に精製法:

Cohen-Wheeler 培地各々 2.5 l に I 型菌及び III 形

ITO Hitoshi: Studies on the protective-antigenicity of the component of the culture-filtrate of *H. putussis*, The Institute for Infections Diseases, University of Tokyo, Japan. — Jap. J. of Bact., 10(4), 371-377, 1955.

本論文の要旨は昭和29年10月28日伝研予研學術集談会に於て発表した

(その1)

Cohen-Wheeler 培地	
Casamino acids (八洲)	10gm
NaCl	2.5gm
KH ₂ PO ₄	0.5gm
MgCl ₂	0.4gm
Starch soluble	1.5Gm
Ca Cl ₂ (1 % Sol.)	1.0gm
Fe SO ₄ (0. % Sol.)	2.0ml
Cu SO ₄ (0.05% Sol.)	1.0ml
HCl-Cysteine (1 % Sol.)	2.5ml
Yeast dialysate	50.0ml
Distilled H ₂ O to make	1 kg pH 7.2

H. pertussis I 型菌 18-323 株 14 代 Bordet-Gengou 培地 48 時間培養より

2~3 öse/150ml

37°C 静置 3 日 (Lot V) 7 日 (Lot VI)

ウェストファリア遠心分離器

濾液	遠心分離	菌體
----	------	----

菌を 37°C 3 日間培養し、ウェストファリア遠心分離器を使用して菌体と濾液とに分ける。得られた培養濾液を充分攪拌し乍ら之に 10% 加里明礬溶液を $\frac{1}{20}$ 容加えると黄白色の沈澱を多量に生ずる。pH は 4.8 を示し上清部に更に「加里明礬溶液」を追加しても最早沈澱を生じない。遠心により沈澱を集め等濃度の加里明礬溶液で一回水洗して後 4% クエン酸ソーダ溶液を加えて溶出する。この際 NNa_2CO_3 を加えて pH に 7.0 に修正する。次いで 1 万回転高速遠心を行つて不溶性沈澱を除く。

この不溶性沈澱は少量の4%クエン酸ソーダ溶液で1回洗い洗液は上記高速遠心上清と合併する。尚この沈澱は蒸留水に浮遊させて流水透析後凍結乾燥を行い、免疫原性を検したが感染防禦能は存在しなかつた。(K-A 沈不溶部) さて不溶沈を除いたクエン酸ソーダ溶出液は原量の約 $\frac{1}{10}$ 容である。之をセロファン嚢に容れ流水透析2日後内液を凍結乾燥して原濾液1 l 当り白色粉末 440 mg を得た。

この粉末は後述の通り感染防禦能を具備しているが電気泳動的には未だ均一とは云えないので更に之を4%水溶液となし0~2°Cに冷却し、2M醋酸溶液を滴下pH4.8となし氷庫内に一夜静置して等電点沈澱法を試みたが微量の沈澱を生じこの沈澱は蒸留水の微量に浮遊させて NNa_2CO_3 を滴下して中性とすると殆ど溶解するが

第2表 抗原の作り方(その2)

濾液からの抗原の作り方

之を電気透析を 20 時間行い不溶沈を除いて凍結乾燥を行つと乾燥重量は 1 mg 以中であつた。

かくして等電点に於て生じた微量の沈澱を除いた溶液は NNa_2CO_3 を滴下して再び中性に戻し低温 ($0\sim 2^\circ\text{C}$) の下に 99% 冷アセトン を 5 倍容加えると多量の白色沈澱を生ずる。遠心によりこの沈澱を集め少量の蒸留水に溶解しセロファン嚢に容れ流水透析 24 時間後凍結乾燥を行つて原濾液 1 l 当り白色粉末 110mg を得た。(K-A 沈 CF) このものが後述の通り感染防禦能を持つてゐる。

全く同じ条件の下に III 型菌培養液濾についても精製を行い最終段階のアセトン沈澱物 (K-A 沈 CF) として

原濾液 1 l 当り 185 mg を得た。又途中に於てクエン酸ソーダ不溶沈澱物 (K-A 洗不溶部) として原濾液 1 l 当り 80 mg を得た。

物質の性状

1 化学的性状

I 型菌並 III 型菌の液状培養濾液成分の化学的性状を

第 3 表 抗原の性状

抗 原	Molisch	Biuret	P.N.A.	D.N.A.	g N %	cg P %
I 型菌濾液 K.A. conc.	+	—	+	—	3.57	2.86
I 型菌濾液 K.A. conc. Aceton 洗	+	—	+	—	4.84	4.66
III 型菌濾液 K.A. conc.	+	—	+	—	2.47	4.80
III 型菌濾液 K.A. conc. Aceton 洗	+	—	+	—	3.07	2.78

検すると第 3 表の如き結果を得た。即ち培養濾液を加里明礬で沈澱させ、クエン酸ソーダ溶液で溶出して精製濃縮した段階に於ても又之を更にアセトンを加えて沈澱させて精製した最終段階に於ても、I 型菌、III 型菌両抗原ともにモーリフシュ反応陽性、ビュレット反応陰性、オルシン塩酸による R.N.A 反応陽性、デフェニールアミンによる D.N.A 反応陰性を示す。又総窒素量及び有機磷量の測定は夫々 Micro-kjeldahl 法及び Fiske-Subbarow 法に従い表記の分析値を得た。

電気泳動:

次の条件に従い Tiselius 電気泳動装置(日立)により行つた。抗原濃度 2%, M/20 Phosphate Buffer, イオ

第 1 図 電気泳動図

ン強度 0.12 泳動温度 12°C, 電流 7 mA, 電圧 70 Volt, その結果最終段階のアセトン沈澱部 (K-A 洗 CF) は略々 1 つの Component のみからなる事が示された。

(第一図参照)

紫外線吸収スペクトル:

次いで抗原を 0.05% 水溶液となし Beckman's Spectrophotometer を使用して紫外線吸収を検した処、I 型菌濾液成分並 III 型菌濾液成分共に 257~260 mμ に最大の吸収を示した。(第二図参照)

第 2 図 紫外線吸収スペクトル

第4表 吸収能 (その1)

1 I型菌培養濾液加里明礬による濃縮物の吸収能

血 清	吸収原の濃度	血清稀釈倍数	凝 集 価				試験菌
			吸 收 後		対 照		
I 型	5 mg/ml	400×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	I 18-323 株 12代
	5 mg/ml	1600×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	
	5 mg/ml	3200×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	
III 型	5 mg/ml	200×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	III 坂入 株 71代
	5 mg/ml	800×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	
	5 mg/ml	1600×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	

第 5 表

2 III型菌培養濾液加里明礬による濃縮物の吸収能

血 清	吸収原の濃度	血清稀釈倍数	凝 集 価				試験菌
			吸 收 後		対 照		
I 型	5 mg/ml	400×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	I 18-323 株 12代
	5 mg/ml	1600×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	
	5 mg/ml	3200×	51200× (+)	102400× (-)	51200× (+)	102400× (-)	
III 型	5 mg/ml	200×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	III 坂入 株 71代
	5 mg/ml	800×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	
	5 mg/ml	1600×	6400× (+)	12800× (-)	6400× (+)	12800× (-)	

凝集素吸収能：

次にこの物質が果して百日咳免疫血清中の凝集素に対し吸収能を有するか否かについて実験を試み第四、五表の結果を得た。

I型因子血清には百日咳菌I型菌高度免疫馬血清をIII型菌により吸収したものを、又III型因子血清としてはIII型菌免疫遺家兎血清をI型菌で吸収して実験に使用した。

先づI型菌濾液物質並にIII型菌濾液物質を夫々5 mg/mlの濃度に食塩水溶液となし、之と等量のI型因子血清並III型因子血清の各稀釈倍数液と混じ（I型因子血清は之を200×800×1600×に、又III型因子血清は100×400×800×に食塩水で稀釈する）各混液を37℃水

浴中2時間静置右氷室に一夜置き、遠心により沈澱を除き、上清に対して、百日咳菌I型菌18-323株及びIII型菌坂入株を試験菌として使用して凝集価を調べて見たがI型並にIII型濾液物質共に全く凝集素吸収能を欠き何れの場合に於てもI型因子血清は51200×(+) III型因子血清は6400×(+)の凝集価を保持した儘であつた。

沈降反応性：

I型菌並III型菌濾液由来物質を10mg/mlの濃度の水溶液となしI型菌免疫馬血清(LS, O)並に吸収試験に使用したと同じI型因子血清(LS)及びIII型因子血清(O)との間に重畳法による沈降反応を行つたが第六表に示す結果を得た。

即ちLS, O因子血清並にLS因子血清に対しては全

第6表 沈降反応性

血清 沈降原	I 型馬血清	因子血清	因子血清
	LSO×1	LS×4	O×1
I 型菌培養濾液 K-A conc Aceton 沈	100(—)	100(—)	200
III 型菌培養濾液 K-A conc Aceton 沈	100(—)	100(—)	200

く沈降反応性を示さず、又O因子血清に対しても200×(+)と云う弱い沈降反応性を示したに過ぎなかつた。

凝集原性：

次に本物質で動物を免疫した場合に凝集素産生を見るか否かを実験を試み第7表に示す結果を得た。

即ち平均体重約3kgの家兎を用いI型菌並にIII型菌抗原物質(培養濾液を加里明礬法で精製した段階並に之をアセトン沈澱法で更に精製した段階の両者)を2～4mg/ml水溶液となし静脈内注射により表記の如き免

疫量、間隔並に免疫回数を以て免疫し、免疫の前後に於て一部採血によつて得た血清についてI型菌18～323株並にIII型菌坂入株を試験菌として凝集価を検したが免疫によるLS及びO凝集素の産生は何れの場合にも認められなかつた。

毒性：

次いで本物質の示す毒性についてマウス腹腔内注射並にモルモット皮内反応を試み第8表に示す結果を得た。即ちマウス腹腔内10mg注射を行うも何等異常を認めず、又モルモット皮内へ1mg注射すると軽度の発赤を認めたに過ぎない。

感染防禦能：

最後に本物質によるマウス感染防禦実験を行い第9表に示す如く感染防禦能の存在を確めた。即ちddD系マウス12～14grのものを使用して実験を行うと実験No.1に於てはI型菌培養濾液を加里明礬沈澱法により約1/10容に濃縮した溶液0.5ml宛マウス腹腔内注射を行い、14日間の免疫期間を経てより百日咳菌1型菌8～3

第7表 凝 集 原 性

抗 原	免 疫 方 法	使 用 菌 液	凝 集 価	
			免 疫 前	免 疫 後
I 型菌培養濾液 K-A conc	家 兎 静 注 0.5 mg/kg → 1.0 mg/kg 4 日 → 1.5 mg/kg → 4 日 6 日	I 型 菌	50×(—)	50×(—)
		III 型 菌	400×(+) 800×(—)	400×(+) 800×(—)
III 型菌培養濾液 K-A conc	家 兎 静 注 0.5 mg/kg → 1.0 mg/kg 4 日 → 1.5 mg/kg → 4 日 6 日	I 型 菌	50×(—)	50×(—)
		III 型 菌	400×(+) 800×(—)	400×(+) 800×(—)
I 型菌培養濾液 K-A conc Aceton 沈	家 兎 静 注 0.1 mg/kg → 0.2 mg/kg 5 日 → 0.2 mg/kg → 0.2 mg/kg 5 日 5 日 → 0.75 mg/kg → 5 日 7 日	I 型 菌	40×(+) 80×(—)	40×(+) 80×(—)
		III 型 菌	160×(+) 320×(—)	320×(+) 640×(—)
III 型菌培養濾液 K-A conc Aceton 沈	家 兎 静 注 0.1 mg/kg → 0.2 mg/kg 5 日 → 0.2 mg/kg → 0.2 mg/kg 5 日 5 日 → 0.75 mg/kg → 5 日 7 日	I 型 菌	40×(+) 80×(—)	40×(+) 80×(—)
		III 型 菌	160×(+) 320×(—)	320×(+) 640×(—)

第8表 抗原の毒性

抗 原	マウス腹腔内注射		モルモット皮内反応(1mg注射)	
	10mg	1 mg	発 赤	Gundel. R
I型菌培養濾液 K-A $\frac{1}{10}$ Vol. conc	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	mm 9×9	0
III型菌培養濾液 K-A $\frac{1}{10}$ Vol. conce	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	mm 9×10	0

323株による脳内攻撃を行い攻撃菌量1万、観察期間14日で総数5匹中4匹を生存を示した。之に対し非免疫群の対照マウスは総数5匹全部が感染発症死を見た。

実験 No. 2 に於ては I 型菌並 III 型菌培養濾液加里明礬沈澱法により精製した物質並にクエン酸ソーダ溶出の際不溶沈として生じた部分 (K-A 洗不溶部) により免疫量 2.5mg 免疫日数 10 日、攻撃菌量 68.7 LD₅₀ の攻撃に於て I 型菌培養濾液 K-A 洗クエン酸ソーダ溶出部は総数 6 匹中 3 匹の生存を、又 III 型菌培養濾液 K-A 洗クエン酸ソーダ溶出部では総数 6 匹中 2 匹生存の結果を得た。尚クエン酸ソーダ溶出の際生じた不溶沈には感染防禦能は証明されなかつた。実験 No. 3 に於ては既述のアセトン沈澱法により精製した培養濾液成分 1.0mg 並に 0.5mg 腹腔内注射し 15 日間の免疫期間を以て 15g

第9表 感染防禦実験

実験 番号	抗 原		免疫 日数	攻撃 菌量	判定	対 照
	種 類	注射 量				
No.1	I型菌培養濾液 K-A $\frac{1}{10}$ Vol. conc	ml 0.5	14日	1.0万	$\frac{4}{5}$ *	1.0万 $\frac{0}{5}$
No.2	I型菌培養濾液 K-A 洗クエン 酸ソーダ溶出部	mg 2.5	10日	68.7 LD ₅₀	$\frac{3}{6}$	
	同 上 クエン酸ソーダ 不 溶 部	mg 2.5	10日	同上	$\frac{1}{4}$	
	III型菌培養濾液 K-A 洗クエン 酸ソーダ溶出部	mg 2.5	10日	同上	$\frac{2}{6}$	
	同 上 クエン酸ソーダ 不 溶 部	mg 2.5	10日	同上	$\frac{0}{4}$	
No.3	I型菌培養濾液 K-A conc Aceton 沈	mg 1.0	15日	31.9 LD ₅₀	$\frac{3}{3}$	
	同 上	mg 0.5	15日	同上	$\frac{8}{8}$	
	III型菌培養濾液 K-A conc Aceton	mg 1.0	15日	同上	$\frac{8}{8}$	
	同 上	mg 0.5	15日	同上	$\frac{4}{4}$	

の攻撃菌量(31.9 LD₅₀)で攻撃し 14 日間の観察期間中何れの場合も総数感染発症死を見なかつた。

総括並に考察

1) 百日咳菌 I 型菌並に III 型菌の液状培養濾液より加里明礬沈澱法並にアセトン沈澱法を行つて電気泳動的に殆ど均一な一成分を精製し得た。

2) この物質はモーリシュ反応(+)ビュレット反応(一)オルシン塩酸反応(+)デフェニールアミン反応(一)で Beckman's Spectrophotometer による紫外線吸収は 257~260 mμ に於て最大を示す。即ち R.N.A を含む割合であろうと推定される。

3) この物質は試験管内に於ける LSO 各因子血清との沈降反応性が無く、I 型菌並に III 型菌に対する凝集素吸収能を欠き、又この割合で家兎を免疫しても I 型菌並に III 型菌に対する何れの凝集素産生も認めない。

4) 本物質にてマウスを免疫した場合 I 型菌培養濾液由来割合に於ても、又弱い乍ら III 型菌培養濾液由来割合に於ても百日咳菌脳内攻撃に対し感染防禦能を示す。

百日咳の免疫に於てワクチン製造の場合力価の高いものを作る為には春日氏等は I 型菌を選択する事即ち IS 抗原が感染防禦抗原として重要な役割を演じている事を証明したが以上の結果より見て感染防禦性抗原は一つの因子のみからなるものではなくて、他にも感染防禦に与る因子がある事を証明した。

このものは恐らく菌体表面に存在する所謂可溶性抗原と云う事が出来、又之等が毒素分割並に凝集原とも別の抗原であると考えらる。

終りに臨み御提案並に御指導を賜つた恩師細谷教授に深甚なる感謝を捧げ、種々有益なる御助言を戴いた三橋助教多田教室に感謝致します。

文 献

- 1) 田上博：熊本医学会雑誌，Vol. 17, 11, p 2135~2138, 昭16, 1941.
- 2) G Eldering: Amer. J. Hyg. Vol. 36, p 294~302, 1942.
- 3) H. M. Felton & F. W. Flosdorf: P. Pediat. Vol. 22, p 259~263, 1943.
- 4) J. Smolens and E. H. Flavell: J. Immunol. Vol. 47, p 173, 1947.
- 5) D. G. Evans: J. Path. Bact. Vol. 51, P 49 1940.
- 6) K. C. Robbins and L. Pillmer J. Immunol. Vol. 65, p 393, 1950.
- 7) L. Pillmer: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol. 75, p 704, 1950.
- 8) 桑島謙夫，増井正幹，志村のぶ，日本細菌学雑誌，Vol. 6, p 75~78, 1951.

- 9) J. H. Hinke and F. F. Johnson: J. Immunol Vol. 64-(2) p 39~43, 1950.
- 10) 山本郁夫: 日本細菌学雑誌, Vol. 9, p 558~561, 1954.
- 11) 春日忠善, 中瀬安清, 浮島光威, 高津邦芳: 日本細菌学雑誌, Vol. 9. p 99~107, 1954.
- 12) J. A. Toomy, J. E. McOlelland and L. E. Lleder: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol. 31, p 403, 1933.
- 13) E. F. Truchina, W. J. Pechletzky and O. S. Murawjewa: Z. F. Imm. forsh Vol. 83 p 124, 1934.
- 14) M. E. Roberts and A. G. Ospeck: J. Infect. Dis Vol. 74, p 47~51, 1951.
- 15) M. L. Wood: J. Immunol. Vol. 39, P 25, 1940.
- 16) 細谷省吾: 日本細菌学雑誌, Vol. 9, 8, p 562, 1954.
- 17) 桑島謙夫, 増井正幹, 浅野浅雄, 松井利隆: Vol. 9, 8, p 562~564, 1954.