百日咳菌の定量的重金属イオン反応

水 沼 寛

国立公衆衛生院衛生微生物学部 (部長 染谷四郎)

〔受付: 2月25日1955年〕

I. 緒 言

百日咳の免疫においては百日咳菌のK抗原が重要な役割を演じ、従つてそれに対応するK凝集価を測定する事は極めて重要な問題であると考えられる^{1)~6)}。その測定には完全なるI相菌を用うべきであるが現在の所チフスVi菌株の様な一定の菌株を各術者が使用する迄には到っていない。Vi抗体の測定においても使用する菌株によつてかなり著しい相違のある事は既に周知であり⁷⁾、一方百日咳菌は菌株の相違の外に継代数や培養条件によつてK凝集の差異が著しいので⁸⁾、K抗体を測定する際には一定のK凝集を示すI相菌液を作成する事が必須の条件となつてくる。

現在、百日咳I相菌はK因子血清とO因子血清によつて検討され確認されているが厳密に考えるならば上述の目的の爲にはこの両因子血清も一定にすべきである。

著者は硫酸銅溶液によつて百日咳菌のI相菌とIII相菌を定性的に識別し得る事を見たが、一般に重金属イオン反応による細菌解離相の識別はすべて定性的なもので定量的に取扱われた事がない。著者は百日咳菌について之を定量的に行つて血清反応によるK凝集と併行せしめ得る事を発見した。重金属イオン反応は勿論特異的抗原抗体反応ではないと思われるが、抗原の被凝集性を検討する一手段を提供するものと考えられるのでこゝに報告する。

II. 実験成績

(1) 6種の重金属塩による凝集

始め種々の濃度の硫酸銅溶液がI相菌を著明に凝集しIII相菌を凝集しない事を発見し、その凝集列が当所において標準血清として用いているK因子血清の両菌凝集列と終末凝集価の一致するのは10%硫酸銅溶液である事を見出した。この場合倍数希釈にはpH 6.6の生理的食塩水を用いたが之はpHが6.6以上であると水酸化銅の沈澱を生じて凝集の判定が困難となるためである。更にCuSO₄・5H₂Oの他に、FeCl₃、Pb(NO₃)₂、ZnSO₄、MnSO₄・4H₂O、FeSO₄の各重金属塩の各10%(重量%)

溶液を作り、之等をK因子血清と同様に生理的食塩水を用いて倍数希釈し判定20倍から20480倍迄を見た。37°C 2時間後一夜放置し判定した所、硫酸銅溶液による凝集反応はI相菌とIII相菌を識別する範囲が最も広く、又重金属塩溶液と菌液混合後のpHは東洋濾紙により大体を測定したが従来報告されている百日咳菌の酸凝集域⁹⁾とは大分距つているので酸凝集はこの場合考慮する必要がないと考えられる。(第1表)

(2) 種々の菌濃度による硫酸銅凝集

菌濃度が硫酸銅溶液との凝集において判定の相違を来すかを見るために、I、III相菌共5, 10, 20各billion/ccの菌液を作り之を用いた所第2表に見る通り血清凝集反応と同じく判定の相違はなく、又10billionが最も判定し易く扱い易い。(第2表)

(3) 反応条件を100°C, 30分とした場合

37°C, 2時間後一夜放置というのは条件を一定にするためであるが之に代えるに100°C, 10分としても終末凝集価は同じであつた。しかし終末凝集価附近は前法に比し判読し難い。

以上はI相菌に東浜株70代、III相菌には小瀬川株を用いた。(第3表)

(4) 百日咳菌の血清凝集価と硫酸銅凝集価との関係

百日咳菌のI相菌3株、移行型4株、III相菌4株、バラ百日咳菌1株を以つて各々、当所の標準K因子血清、O血清、10%硫酸銅溶液に対する定量凝集を行つた。結果は第4表に見る様にK凝集と硫酸銅凝集は多くの菌株において一致した。以上の結果からこれらの凝集反応にあづかる抗原は何れもK抗原であると考えられる。尙第4表においてI相菌が40倍迄O凝集を示すのはO血清中にあるK抗体によるものであつてI相菌のO凝集性の喪失ではないと考える。又、バラ百日咳菌がK

MIZUNUMA Hiroshi: Quantitative agglutination of *H. pertussis* for heavy metal ion. Dept. Microbiology. National Institute of Public Health. —Jap. J. of Bact., 10(8), 707-712, 1955.

第1表 6種の重金属塩による凝集

条 件	重 金 属 塩	菌	判 定 2	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	Cont.
37°C 2時間	CuSO ₄ ・5H ₂ O	I	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FeCl ₃	I	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++		
		III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++		
	Pb (NO ₃) ₂	I	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-		
		III	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
更に 一 夜 放 置	CuSO ₄ ・5H ₂ O	I	5.0 ++	5.2 ++	5.2 ++	5.4 ++	5.6 ++	++	5.8 ++	++	6.0 ++	+	6.4 +	-	-
		III	5.0 -	5.2 ±	5.2 ±	5.2 -	5.6 -	-	5.8 -	-	6.0 -	-	6.4 -	-	-
	FeCl ₃	I	-	5.4 -	-	-	-	-	-	5.6 ++	5.8 ++	6.0 ++	6.4 ++		
		III	-	5.4 -	-	-	-	-	-	5.6 ++	5.6 ++	6.0 ++	6.4 ++		
	Pb (NO ₃) ₂	I	++	5.4 ++	++	++	++	++	6.0 ++	+	-	-	6.4 -		
		III	++	5.4 ++	++	++	++	+	6.0 -	-	-	-	6.4 -		
更に 一 夜 放 置	ZnSO ₄	I	6.0 ++	++	++	6.0 ++	++	+	6.2 +	±	-	-	6.4 -		
		III	6.0 -	-	-	6.0 -	-	-	6.2 -	-	-	-	6.4 -		
	MnSO ₄ ・4H ₂ O	I	6.4 -	-	-	6.4 -	-	-	6.4 -	-	-	-	6.6 -		
		III	6.4 -	-	-	6.4 -	-	-	6.4 -	-	-	-	6.6 -		
	FeSO ₄	I		++	++	++	+	+	-	-	-	-	-		
		III		++	++	++	+	-	-	-	-	-	-		
	K.F.S.	I		++	++	++	++	++	++	++	+	+	-		
		III		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

K. F. S. : : 当所の標準K因子血清

5.0~6. 4 etc: pH (東洋濾紙による)

第2表 各種菌液濃度による硫酸銅凝集反応

条 件	菌 液 濃 度	判定 20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	Cont.
37°C 2時間	I 20 bil.	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
	I 10 "	++	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
	I 5 "	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	III 20 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III 10 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III 5 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I 20 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	-	-
	I 10 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
	I 5 "	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
更 に 一 夜 放 置	III 20 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III 10 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III 5 "	判 読 不 能											

第3表 反応条件を100°C, 10分とした場合

菌 10 bil.	判定 20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	Cont.
I 相 菌 (東浜 70)	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
III 相 菌 (小瀬川)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

因子血清と凝集するのは両菌間の共通抗原によるものである¹⁴⁾。(第4表)

(5) I相菌及び移行型菌によるK血清及び硫酸銅溶液の吸収試験

K因子血清及び硫酸銅溶液(重量10%)の各10倍, 40倍, 160倍, 各稀釈液を作り, 之等からI相菌(東浜77代)及び移行型(移34)対照としてIII相菌(小瀬川株)の100, 50, 25各billionの菌液を以て吸収した。吸収条件は37°C 2時間後一夜氷室放置, 翌朝遠心して上清を凝集反応に用いた。この凝集にはI相菌東浜株79代の10billion菌液を用いた。結果は第5表に見る如く血清の場合は明らかに吸収されているが, 硫酸銅溶液のI相菌凝集能力は減少していない。更に移行型菌はその凝集価に比しK抗体吸収能が著しく悪い事を知った。第5表から直ちに移行型菌のK抗体吸収能を定量的に云々する事は出来ないが, 血清稀釈, 菌濃度, 吸接管数から見て著しく悪い事は明らかである。之は移行型菌の保有するK抗原量が著しく減少している事を示すものと考えられる。凝集反応における凝集の高さと凝集の強さという事は明確な意義づけがされていないが之は凝集反応そのものの、技術的限界の問題であろう。

III. 考 按

種々の有機無機塩類の溶液中における細菌の凝集が培養菌の性状を示す一つの現象として用いられて来たが, 之は細菌がどの発育相(解離相)にあるかによって著しく異なり, 細菌の種によつて定常的なものでない事がArkwright¹⁰⁾によつて記載されている。一般にグラム陰性桿菌のR型はその表面にある食塩水に溶けない磷脂質によつて疎水性を与えられ安定性が悪く, S型は更に表在する親水性で強く負に荷電しているO抗原によつて安定性を有しているといわれている¹¹⁾。

ミロン反応を始めとする種々の重金属イオン反応が主にグラム陰性桿菌のS型とR型を識別する方法の一つとして用いられて来たが, イオンが細菌を凝集させる力はそのイオンのHofmeister系列中で占める位置に関係し又イオンは細菌細胞の表面では交換反応により互に定量的に入れ代わる事が出来るので媒質のイオン構成は菌浮游液の安定性を条件づけるものとして重要であり¹²⁾, 又細菌とその周囲とのイオン交換はイオン濃度と被吸着性の度により条件づけられ, この場合陽イオンの活性はそのシステム中にある陰イオンの種類によつて大きな影響を受ける事はない¹³⁾とされている。又細菌の表在抗原の化学的性状により重金属イオンの親和性が異り, 例えば

第4表 百日咳菌の K, O 血清凝集と硫酸銅凝集

	I 相 菌	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	C
CuSO ₄	長 沢 7	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
	東 浜 78	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	尾 崎	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
K.F.S.	長 沢 7	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	
	東 浜 78	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	
	尾 崎	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	
O.S.	長 沢 7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	東 浜 78	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	尾 崎	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	移 行 型													
CuSO ₄	移 34	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	蔭 山 24	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
	秋 本 23	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	10536, 19	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
K.F.S.	移 34	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	
	蔭 山 24	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	
	秋 本 23	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	
	10536, 19	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	
O.S.	移 34	-	-	-	±	+	+	+	+	+	±	-	-	
	蔭 山 24	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	
	秋 本 23	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	
	10536, 19	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	III 相 菌													
CuSO ₄	中 条	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	小 瀬 川	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	管 田	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	東 浜 W	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K.F.S.	中 条	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	小 瀬 川	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	管 田	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	東 浜 W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
O.S.	中 条	-	-	-	+	++	++	++	++	+	+	-	-	
	小 瀬 川	-	-	-	+	++	++	++	++	+	±	-	-	
	管 田	-	-	-	+	++	++	++	++	+	±	-	-	
	東 浜 W	-	-	-	+	++	++	++	++	+	±	-	-	
	バラ百日咳菌													
CuSO ₄	〃	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±	-	-	-
K.F.S.	〃	++	++	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
O.S.	〃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K.F.S. : 当所の標準K因子血清, O.S. : 同O血清

第5表 K 因子血清及び硫酸銅溶液よりの I 相菌及び移行型菌による吸収試験

K.F.S.稀釈	吸 收 原	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	Cont.
× 10	I 100bil.	++	++	++	+	+	+	±	—	—	—
	I 50	++	++	++	++	++	++	+	—	—	
	移 100	++	++	++	++	++	++	++	+	+	
	移 50	++	++	++	++	++	++	++	+	+	
× 40	I 100			+	±	—	—	—	—	—	
	I 50			++	++	+	±	—	—	—	
	移 100			++	++	++	++	+	+	±	
	移 50			++	++	++	++	++	+	+	
× 160	I 50					—	—	—	—	—	
	I 25					+	±	—	—	—	
	移 100					++	++	++	+	—	
	移 50					++	++	++	++	—	
× 100	移 25				400 ++	800 ++	1600 ++	3200 ++	6400 +	12800 +	
	III 100				++	++	++	++	+	+	
10%CuSO ₄	吸 收 原	40	80	160	320	640				10240	
× 10	I 100bil.	++	++	++	++	++	++	++	+	+	
	I 50	++	++	++	++	++	++	++	++	+	
	移 100	++	++	++	++	++	++	++	++	+	
	移 50	++	++	++	++	++	++	++	++	+	
× 40	I 100			++	++	++	++	++	+	—	
	I 50			++	++	++	++	++	++	—	
	移 100			++	++	++	++	++	++	±	
	移 50			++	++	++	++	++	++	±	
× 160	I 50					++	++	++	+	—	
	I 25					++	++	++	+	±	
	移 100					++	++	++	+	—	
	移 50					++	++	++	+	—	
× 100	移 25				400 ++	800 ++	1600 ++	3200 ++	6400 ++	12800 +	
	III 100				++	++	++	++	++	+	

チフス型のV型3株とW型H 901株を以つて硫酸銅凝集を行つた所第9表に見る様に百日咳菌とは逆にO抗原に対し高稀釈迄凝集した。安東によればチフス菌のVi抗原に比較的特異的に凝集を示すのは塩化第二鉄であるという。

IV. 結 論

1. 百日咳I相菌の被凝集性を硫酸銅溶液により定量的に検討する事が出来る。即ちI相菌のK凝集反応と硫

酸銅凝集反応はその終末凝集価を併行せしめる事が出来る。この場合凝集の強さは異なる。この硫酸銅による凝集はK抗原を有するI相菌に特異的であつて、K抗原を失つてO抗原のみとなつたIII相菌には見られない。

2. I相菌に対し終末凝集価の等しいK因子血清と硫酸銅溶液を同一の条件においてI相菌で吸収試験を行つた所、吸収後のK因子血清の凝集能力は著しく低下しているのに関らず、硫酸銅溶液のそれは殆んど不変であ

第6表 V 型及び W 型チフス菌の硫酸銅凝集

	菌	判定 20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	Cont.
サルモネラ O-V 血清	S. 57 (H901)	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
	S. 60 (V 型)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. 62 (")	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. 115 (")	Tr	Tr	Tr	Tr	-	-	-	-	-	-	-
サルモネラ Vi 因子血清	S. 57	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. 60	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	S. 62	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	S. 115	++	++	++	++	++	++	±	-	-	-	-
10%CuSO ₄	S. 57	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	S. 60	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. 62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. 115	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

る。

3. 移行型百日咳菌は終末凝集価がI相菌とあまり変わらないに關らずK抗体吸収能力は著しく劣る。之は保有するK抗原量の少き為と思われ恐らくはK抗体産生能においても著しい差のある事が考えられる。

本稿の概要は文部省科学研究費総合研究百日咳研究班の昭和29年春の研究委員会において発表した。

御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた染谷部長並びに金子博士に深謝致します。

V. 主要文献

- 1) 春日忠善他： 各型百日咳菌ワクチンのマウスに於ける感染防禦力，日本細菌学雑誌，9，99~108，1954.
- 2) 金子義徳： 百日咳のK抗原に関する研究，日本細菌学雑誌，8，753~758，1953.
- 3) 山本郁夫： 百日咳菌の免疫化学的研究，日本細菌学雑誌，9，558~561，1954.
- 4) H. M. Felton etc： J. Bact., 49, 520~521, 1946.
- 5) J. Smolens etc： J. Immunol., 57, 367~368, 1947.
- 6) D. G. Evans： J. Path and Bact., 56, 49~

54, 1944.

- 7) 下条寛人： Vi 凝集に用いる菌株の検討，日本伝染病学会雑誌，28，101~103，1954.
- 8) 春日忠善他： 日本細菌学雑誌，9，345~347，1954.
- 9) 春日忠善他： 各型百日咳菌の諸性状（菌型と酸凝集性），9，54，1954.
- 10) Arkwright： Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and by specific sera, J. Path. and Bact., 23, 358~360, 1920.
- 11) White： Further notes on spontaneous agglutination of bacteria, J. Path. and Bact., 31, 423~433, 1928.
- 12) Eggerth and Bellows： The flocculation of bacteria by proteins, J. Gen. Physiol., 4, 669~680, 1922, (In J. R. Marrack, Chem. of antigens and antibodies, 2nd ed., 1938, p. 39).
- 13) McCalla, T. M.: The adsorption of H⁺ by bacteria as measured by the glass electrode, J. Bact., 41, 775~784, 1941.
- 14) 春日忠善： 百日咳菌パラ百日咳菌気管支敗血症菌の相互の抗原に関する研究，文部省科学研究費総合研究百日咳研究班昭和28年度研究業績集，14~15，昭29.