Alkalescens-Dispar Group の K 抗原に関する研究 赤血球凝集反応について

上 野 一 恵 鈴木 祥 一 郎 栗 本 珍 彦

岐阜県立医科大学微生物学教室 (教授 栗本珍彦)

〔受付: 8月9日 1955 年〕

緒 言

Keogh¹⁾ 等が *Hemophilus influenzae* の菌体から Phenol 抽出法で得られた多糖体で感作した赤血球と抗血清は特異的な凝集反応を起す事を報告して以来, Middlebrook²⁾ 等が結核, Warburton³⁾ 等が *H. influenzae* type b, Kirby⁴⁾ が *Streptococci*, 又 Amines⁵⁾ が *Pasteurella pestis*, に対する抗体の証明に赤血球凝集反応が用いられた。腸内細菌についても Neter⁶⁾ 等が *E. coli* の O 抗体の証明に, 又 Landy⁷⁾ 等, Chu⁸⁾ 等は Vi 抗体の証明に本凝集反応を行い, 非常に特異的で且つ Vi 抗体の証明については従来の菌凝集反応よりも 3 倍から 6 倍も高い凝集価を示す事を報告している。

著者等は *Alkalescens-Dispar* Group の K 抗原についてまずその生理食塩水及び菌浮游液等を感作抗原として用いて赤血球凝集反応を実施し, 極めて特異的な凝集反応を起す事を知り興味ある所見を得たので茲に報告する。

実験方法

1. 感作物質の抽出方法

Alkalescens-Dispar type 1 東株^{9) (10) (11)} の普通寒天培地 18 時間培養の Acetone 乾燥菌体 1g に生理食塩水 100ml を加えて, 3 時間振盪機で振盪後, 3500 r.p.m. で 2 時間遠心分離しその上清を用いた。此の上清は稍々黄色味のある粘張性の液である。

2. 赤血球の感作方法

0.4% クエン酸ソーダ加家兎血液を約 10 倍量の生理食塩水を加えて 1500 r.p.m. 5 分間で 2 回洗滌し 3 回目は 10 分間遠心して 10% 赤血球浮游液を調製した。次に上記抽出液と 10% 赤血球浮游液の等量を混合し 37°C の恒温水槽で時々振つて所要時間感作した後, 約 10 倍量の生理食塩水を加えて 1500 r.p.m. 5 分間 2 回洗滌して最後に 1% 赤血球生理食塩水浮游液を調製した。

3. 赤血球凝集反応術式

Landy⁷⁾ 等の方法に準じた。即ち所要濃度に稀釈した免疫血清の 0.2ml を Wassermann 反应用小試験管に分注しそれに上記 1% 感作赤血球浮游液の 0.1ml を加えてよく振つて混合し, 37°C の恒温水槽中で 2 時間作用させて後, 室温に 1 夜放置して成績を判定した。

判定方法は肉眼的又は Agglutinoscope によつて明らかに凝集を認めるものをもつて陽性とした。

4. 菌を抗原とする凝集反応

厚生省衛生検査指針の術式に従つた。

実験成績

赤血球感作と時間の関係:

赤血球と生理食塩水抽出液を接触させて, その直後から 3 時間までを調べた。

第 1 図に示す様に接触直後で既に 640 倍の凝集価を示し以後 30 分から 3 時間まで 1280 倍とその End-point に

第 1 図 赤血球感作と時間の関係

は変化なく, 赤血球はこの感作抗原としての生理食塩水

UENO, Kazue, SUZUKI, Shoichiro and KURIMOTO, Uzuhiro: On the K-antigen of *Alkalescens-Dispar* Group. Hemagglutination reaction. Department of Bacteriology, Gifu Prefectural Medical College — Jap. J. Bact., 11(2), 115-119, 1956.

抽出液に対して敏感である事が認められる。併し凝集の程度は感作時間の延長と共に強くなり2時間後からは非常に固い凝集を認めた。よつて以後の実験は全て感作時間は2時間とした。

尙お凝集の速度は感作赤血球と抗血清を接触して後数分にすでに凝集を認めるがその後時間と共に強度になつて行く。

又同時にO抗血清について上述の抗原で赤血球凝集反応を行つてみると20倍と云う低い凝集価を示し、此の時の生菌凝集価はK抗血清に対して160倍であつた。

赤血球感作の温度による影響：

第1表に示す如く37°Cと室温とは殆んど差がない。氷室中(4°C)では320倍の凝集価を示しているがこれは第1図からわかる如く室温に対して接触させた直後の価であつて、以後氷室中で長時間作用しても感作が進まない事を知る。

第1表 赤血球感作の温度による影響

凝集価 処 置	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
37°C	++	++	++	++	++	+	+	+	±	-
室 温 (18°C)	++	++	++	++	++	+	+	(+)	±	-
氷 室 (4°C)	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-

〔註〕 作用時間2時間

赤血球の種類について：

尙お兎の赤血球以外に綿羊、人O型赤血球についても比較したが大きな差は認められなかつた。

抗原稀釈の血球感作に及ぼす影響：

第1図において赤血球はこの抗原に対して非常に敏感である事を知つたが、更にこの抗原を稀釈してその感作

第2図 抗原稀釈の血球感作に及ぼす影響

能力を調べてみると第2図の如く100倍までの稀釈においてはその凝集価に著るしい変化は認められないが、500倍、1000倍の稀釈によつて急激に低下し10000倍で全くその感作能力は認められなくなつた。尙お凝集の程度は10倍稀釈までは殆んど原液と変りない反応を示したが以後稀釈と共に多少弱くなつた。

特異性について：

感作してない正常な赤血球ではK、O各抗血清共に全然凝集は認められない。逆に正常家兎血清について感作赤血球で凝集反応を行つてみても凝集は起らなかつた。Alkaescens-Dispar type 1 東株の24°C培養菌及びGlucose 1%含有培地上の培養菌の生理食塩水抽出液感作赤血球については凝集反応は起らなかつた。

又 Alkaescens-Dispar type 1 東株の生菌の家兎免疫K抗血清を免疫に用いた東株生菌で吸収した血清については本反応は陰性であつた。尙お教室保存の Salmonella, のO,H,各抗血清、及び赤痢抗血清についても凝集は起らなかつた。又逆に Alkaescens-Dispar GroupのK抗血清について Salmonella, E. coli 及び Alkaescens-Dispar 株の各数株を用いてその前法による抽出液を作りそれを感作抗原として赤血球を感作し凝集反応を行つたが全く陰性の結果を得たがそのうち同一因子K抗原をもつ数株については交叉反応が認められた。即ち赤血球凝集反応の特異性を疑う先人もあるが吾々の本反応は強い特異性を持つものである。

「ためし」凝集：

この感作赤血球は一応試験管内凝集反応において特異的で且つ菌凝集反応よりも高い価を示す事を知つたがこれについてスライドガラス上で「ためし」凝集を生菌と比較してみた。第2表の如く生菌を用いては20倍まで凝集が認められたが50%感作赤血球浮游液では160倍ま

第2表 スライドガラス上の血球凝集反応

凝集価 抗 原	10	20	40	80	160	320	640
生 菌	++	+	-	-	-	-	-
感作血球 1 %	++	+	+	±	-	-	-
10 %	++	++	+	+	(±)	-	-
50 %	++	++	++	++	+	-	-

で明らかにその凝集が認められた。その凝集速度も生菌の場合と殆んど差はなかつた。即ちスライド上の「ためし」凝集反応も菌凝集より優れている事がわかつた。

生菌感作赤血球の時間との関係:

生理食塩水抽出液は、赤血球を強く急速に且つ非常に低濃度においても感作したが、次に生菌そのものと赤血球を直接混合、感作して実験した。第3図の如く接触直後では全く感作されていないが30分後で凝集価は320倍となり1時間後からは1280倍となり end-point には変りないが凝集の程度は3時間後から非常に強くなり振つても血球は膜状になつて離れない。尙お同時に生菌と赤血球の混合液を室温及び氷室に5時間放置して、温度の影響を「ためし」凝集によつて調べてみると室温では弱い乍ら明らかに凝集を起すが氷室中保存(4°C)では全く凝集反応を起さなかつた。これは恐らくK抗原は37°Cでは容易に遊離するが低温では遊離し難いために起きたものと考えられる。

第3図 生菌感作赤血球の時間との関係

感作に用いる菌液は10⁻⁴mg/mlの濃度でも赤血球を感作する能力は認められた。

培養液遠心上清による感作:

普通ブイヨン18時間培養液を3000r.p.m.で2時間遠心して菌体を分離しその上清を感作源としても、やはり高い凝集を示した。尙おこの培養液遠心上清中にはK抗原は培養8時間後から72時間迄、逐次増加するが72時間後からは急速にO抗原が出現する事を知つた。この上清を120°C 30分加熱したものはK抗原は減少し反対にO凝集が高い価を示した。この加熱による影響は生理食塩水抽出液によつても全く同様な成績が得られた。然しこの際K抗原は減少するが全く消失する事はない。

以上の実験によつて本赤血球凝集反応は感作原として生理食塩水抽出液、生菌及び培養液遠心上清を用いても菌凝集反応より高い凝集価を認めた。6羽の家兎の抗K免疫血清について比較してみると第5表の如く食塩水抽出液感作赤血球と生菌感作赤血球とはその end-point は殆んど変りなく菌凝集反応よりも4倍から7倍の高い凝集価を示す。併し生理食塩水抽出液感作赤血球の方が生

菌感作血球よりも凝集の程度は強い。

第3表 K抗原血清に対する凝集反応

免疫家兎番号	抗原 生理食塩水抽出液感作赤血球	生菌感作赤血球	菌液
1	1/1280	1/640	1/40
2	1/160	1/160	1/10
3	1/2560	1/1280	1/40
4	1/160	1/80	1/10
5	1/320	1/320	1/20
6	1/2560	1/1280	1/20

【註】 赤血球感作生菌濃度は約5mg/ml.
数字は凝集価を示す。

正常人血清の「ためし」凝集:

51名の正常人血清について、生理食塩水抽出液で人O型赤血球を感作した抗原で「ためし」凝集を検査した処、3名の陽性者を検出したが生菌による「ためし」凝集では判定に苦しむ程非常に弱い感作赤血球の「ためし」凝集では明らかに強い凝集を示した。更にこの3名の中2名に糞便から東株と同一のK抗原を持つ菌を分離した事は重要な事実と思われる。

抽出液及び感作赤血球による免疫能力:

K抗原を持つ intact な細菌の代りに抽出液だけやそれで感作した家兎赤血球を家兎に注射する事による免疫抗体の産生の有無を実験した。第6図に示す如く生理食塩水抽出液だけでも弱い乍ら抗体は産生せられ、それを以て感作した家兎赤血球においてはK抗原において生菌免疫と同じ位の免疫効果がある事が認められた。

第4表 各抗原による免疫

抗原 抗血清	生菌	感作赤血球	加熱菌	加熱菌抽出液感作赤血球
生菌免疫	1/80	1/2560	1/320	1/320
抽出液免疫	1/20	1/160	1/640	1/1280
感作赤血球免疫	1/80	1/1280	1/160	1/160

考 察

Alkalescens-Dispar Group のK抗原の研究はKauffmann⁽¹²⁾, 鈴木⁽⁹⁾, 栗本⁽¹⁰⁾等, 藤井⁽¹¹⁾等多くの人によつて詳細に研究されて来たが本報ではK抗原を赤血球に吸着する事によつてその本態を追究した。K抗原は生理食塩水に振盪によつて容易に遊離し又37°Cにおいては振盪しなくても容易に遊離するが温度の低下に従つてその菌体との結合は強く遊離し難くなる。又ブイヨン培養基中にもK抗原は培養中に容易に移行する。そしてその遊

離したK抗原は人、兎、綿羊の赤血球に敏感に且つ急速に吸着する。そしてこの感作された赤血球は抗血清と極めて特異的に反応し又菌凝集反応と比較して常に高い凝集価が認められた。

同様の成績を Landy⁷⁾ 等は、E. coli の精製 Vi 抗原について報告している。次に熱に対するK抗原の態度であるが実験に使用した東株の生理食塩水抽出液、培養菌、又は培養液遠心上清は 120°C 30 分の加熱によつてその含有するK抗原の大部分は破壊されるが一部は残るものである。K抗原に対する加熱の影響はKauffmann¹²⁾ の基本型即ち A, B, L の区別以外には余り研究されないが、Vi 抗原については先人の業績がある。即ち Felix¹⁴⁾ は種々の Salmonella の Vi 抗原の熱に対する不安定性は異なり又その上環境によつても異なる事を報告している。又 Chu⁸⁾ 等は V 型チフス菌の N/1 HCl で凍結融解した抽出 Vi Haptene は耐熱性で且つ赤血球を感作し、これを抗原として用いた時免疫原性の有する事を報告している。本実験において上記の如く耐熱性の抗原の一部が残る事を認めたが Chu 等の Vi Haptene は全く耐熱性でその感作赤血球はK抗血清と急速な強い凝集を起す事を報告しているが、この耐熱性の強弱の違いは Felix¹⁴⁾ の云う環境によるものか、抗原 (Vi と L) の違いか、又は抗原抽出法の異なるためによるものかは今後の実験に待ちたい。尚お私信によれば Felix は Kauffmann の K 抗原は彼の Vi 抗原の一部と考えるべき事を強調している。

次に O 難凝集性について考えてみたい。

生理食塩水抽出液、ブイオン培養遠心上清液は加熱後に赤血球凝集反応で O 抗血清に対する凝集価の著しい上昇を見るのであるが、これは菌凝集反応の場合と全く同様であり即ち、赤血球凝集反応においても O 難凝集性の現象の認められた事は興味がある。

Kauffmann¹²⁾ は K 抗原は Surface 或は Envelope 抗原であつて、細菌細胞の表面に存在するために O 抗原と O 抗体の結合作用を不可能にするが、K 抗原が熱によつて不活性されると、O 抗原は O 抗体と接触する事が出来るようになると主張している。

併しながら此処に報告した如く生理食塩水抽出液、或はブイオン培養遠心上清液についても、加熱によつて赤血球凝集反応で O 抗原の著しい活性となるのであるから、菌凝集反応の O 難凝集性に対する K 抗原の役割は intact な細菌細胞の表面での Topographic arrangement のみによるとは云えないように考えられる。

intact な細菌細胞表面に存在する K 抗原と O 抗原は

生理食塩水抽出液中、又は培養液中でも同様に 1 つの複合体として存在していてその K 抗原が O 抗原を妨害する可能性も考えられるであろう。

次にこの生理食塩水抽出液は免疫学的には弱い乍ら完全抗原であり又感作赤血球も生菌と同様な免疫効果を認めた。

又細菌性抗原が in vivo においても K 抗原が赤血球に吸着されるかどうかは今後研究を続けたいが若し吸着されるならば非常に興味ある事であろう。

結 論

Alkalescens-Dispar type 1 東株の K 抗原に関して赤血球凝集反応により次の如き成績を得た。

① K 抗原は容易に生理食塩水中に遊離するがこの遊離は 37°C において最も早く、室温之に次ぎ、4°C においては行われぬ。又本 K 抗原はブイオン培地中にも培養中に移行する。

② この遊離 K 抗原は兎、綿羊、人等の赤血球を 37°C において急速に感作し対応する血清と極めて特異的な凝集反応を起し、その凝集価は菌を抗原とする凝集反応よりも常に 4~7 倍高い。

③ 赤血球の感作原として生菌浮游液を用いても菌を抗原とする凝集反応よりも高い価を示す。この場合 K 抗原は一度遊離してその遊離 K 抗原によつて感作されると思われる。

④ 本赤血球凝集反応においても既に菌を抗原とする凝集反応にみられたと同様の O 難凝集性の現象がある。

⑤ 生理食塩水抽出 K 抗原はそれ自体弱い乍ら完全抗原であり又この抽出液を以て感作した赤血球は免疫原性が更に強い。

⑥ 以上の成績より、K 抗原の加熱に対する態度、O 難凝集性に対する役割につき若干考察した。

附記：

本研究の一部は文部省科学研究費の補助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Keogh, E. V., North, E. A. & Warburton, M. F.: Nature, 160, 63, 1947.
- 2) Middlebrook, G. & Dobos, R. J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 3) Warburton, M. F., Keogh, E. V. & Williams, S. W.: Med. J. Australia, 1, 135, 1949.
- 4) Kirby, W. M. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 78, 519, 1951.
- 5) Amines, C. R.: Brit. J. Exp. Path., 32, 259, 1951.
- 6) Neter, E., Bertram, L. F. & Arbesmam, C. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 79, 255,

- 1952.
- 7) Landy, M. & Lamb, E. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 82, 593, 1953.
- 8) Chu, D. C. & Hoyt, R. E. : J. Hyg., 52, 100, 1954.
- 9) 鈴木祥一郎: 医学と生物学, 22, 200, 昭 27.
- 10) Kurimoto, U., Suzuki, S. & Fujii, R. : Acta. Sch. Med. Gifu, 2, 143, 1954.
- 11) Fujii, R., Kurimoto, U. & Suzuki, S. : Acta. Sch. Med. Gifu, 2, 149, 1954.
- 12) Kauffmann, F. : "Enterobacteriaceae" Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1951.
- 13) Webster, M. E., Landy, M. & Freeman, M. E. : J. Immu., 69, 135, 1952.
- 14) Felix, A. : J. Hyg., 50, 515, 1952.