百日咳菌属の溶血性に関する研究

第1報 百日咳菌の溶血性と血清学的性状との関係 並びにワクチン用菌株に関する検討

野 沢 宏

国立公衆衛生院衛生微生物学部 (部長 染谷四郎博士)

[受付: 12月10日1955年]

緒 言

数年来におけるわが国の百日咳菌属に関する研究の進展は著しく、特に抗原構造については重要知見が得られた¹⁻⁶⁾。

しかしながら百日咳菌属の菌型と溶血性については、春日等⁷⁾の記載を除いては殆ど追求されていない。以下百日咳菌属の溶血性について著者の行った実験結果について報告する。

実験方法及び成績

実験材料: 使用菌株は、陳旧株としては当研究室において保存中の百日咳菌9株で、この中実験に主として用いた東浜株は北里研究所春日博士から分与されたものであつて分離後数年を経ており、当研究室で100代以上継代を重ねたものであるが、血清学的には未だⅠ相の性状を保持している。又新鮮株としては感染マウス脳内から分離直後の百日咳18—323株を用いた。

ワクチンとしては上記東浜株112代から後述の方法により平板培地上で分離した溶血集落、及び18—323株12代(新鮮なるも血清学的には既にⅡ相に移行したもの)の両者から作ったもので、何れも 15 bil per ml の菌浮游液に0.02%にマーズンを加え製造後1週間37°C孵卵器内におき以後氷室内に保存したものをを用い、対照として予研標準ワクチン(製造後6カ月間氷室内保存)を用いて各々を比較した。

動物実験には市販雑系白色マウスを使用した。

培地はすべて20%馬血液加B—G培地で、基礎培地のpH 5.6内外としたものをを用い、培養条件はすべて37°C 24時間培養である。菌株の継代保存はおよそ1週間毎に行つて来ている。

I. 百日咳菌の溶血現象

陳旧保存株を平板培地上に発育せしめて観察した結果、外観は全く同じでも、集落周縁の溶血現象に著しい差のある2種の集落が発見されたので、この2種の集落

について追求した。

溶血現象と血清学的性状について:

陳旧株あるいは新鮮株の5,000 per ml 生食水浮游液の0.2ml(菌数1,000)を平板培地上によくひろげて培養し、37°C72~96時間後生じた集落の外観及び溶血性を観察し、その血清学的性状を検討した。

本実験に用いた各菌株の血清学的性状は第1表に見る通りで、東浜株は115代においてなおK因子血清に対し終末価(10,240倍)まで凝集し、O凝集を示さない完全なⅠ相菌である。

所がこれを平板培地上で見ると、第1図に示す通り外観全く同一で正円半球状小型で内部均質白色半透明表面光沢を有するものであるが、溶血能のみが異り、周囲に著明な溶血環を伴うもの(以下溶血菌と称する)と、殆ど溶血を伴わないもの(以下非溶血菌と称する)との2種類の集落が混在することを見出した。この2種類の集落を血清学的に検討した所、第1表に明らかな通り溶血集落はⅠ相、非溶血集落は移行型即ちⅡ相であつた。東浜株以外の他の5株の菌株でも全く同様の現象が見られたが、その内非溶血集落の混在率の比較的高いものは原株自身の菌液も移行型としての凝集反応を示した。非溶血集落の混在率は継代数を重ねるに従い漸次増加する様に思われ、又この同集落を別々に継代して見ると、非溶血菌株から溶血集落は生じないが、溶血菌株からは非溶血集落が出現して来る。又新鮮菌株を平板培地上でその発生集落を観察するとすべて著明な溶血集落のみである。上記の諸事実から、非溶血菌は溶血菌から変異したもの

NOZAWA Hiroshi: Studies on the Hemolysis of Hemophilus group organisms. I. The relation between hemolytic activity and serological type of *H. pertussis* and experiments on the vaccine strains. Department of Public Health Microbiology of Institute of Public Health, —Jap. J. of Bact., 11(5), 399-404, 1956.

第 1 表 百日咳保存菌株の溶血性と血清学的性状

原株の 菌 相	菌 株	代数	非溶血 集落の 混在率	凝 集 反 応	
				K	O
I	東 浜	115	34%	+10,240倍	—
	" (溶 血)	112	0	+10,240	—
	" (非溶血)	114	100	+ 5,120	+5,120倍
	18-323C ₂	4	0	+10,240	—
	尾 崎 I	41	58	+10,240	—
	" (溶 血)	45	0	+10,240	—
II	" (非溶血)	45	100	+10,240	+ 160
	18-323C	6	38	+ 5,120	+ 160
	" (溶 血)	28	0	+ 5,120	± 10
	" (非溶血)	34	100	+ 80	+5,120
	尾 崎	95	60	+ 5,120	+ 80
	" (溶 血)	94	0	+10,240	—
III	" (非溶血)	94	100	+10,240	+ 320
	平 沢	44	64	+10,240	+ 80
	" (溶 血)	43	0	+ 5,120	—
	" (非溶血)	43	100	+ 5,120	+ 320
	10636	42	83	+ 2,560	+ 160
	" (溶 血)	41	0	+10,240	—
相	" (非溶血)	41	100	+ 5,120	+ 320
	菅 田	105	100	—	+5,120
	東 浜 III	75	100	—	+5,120
	蔭 山	34	100	—	+5,120
中 条	中 条	26	100	—	+5,120

であると考えられる。しかし非溶血集落の混在率は菌株により、又継代数により全く区々であつて、早いものでは分離後 6 代にして既に非溶血集落の出現を見た。

但し非溶血集落は全く溶血能を有していないのではなく、溶血集落に比し溶血能が微弱なだけであつて、集落が充分大きいときはそれを除いたあとに極めて小さい点状の溶血斑を遺し、又多数集落が集合した所では瀾満性の溶血が見られる。即ちこれは量的の問題であり、培養条件によつても種々の差異があるものと予想される。しかし同一条件においては兩型の溶血性の差異は一見して明瞭に区別出来る。又溶血集落でも、培養時間72時間以内では集落があまりに小さいため溶血能の判定は困難であり、96時間以上では培地そのものが変質してやはり判定困難となる恐れがある。この際、従来の如く基礎培地

第 1 図 一菌株から現れた 3 種の異なる集落 (B-G 平板培地)

- I : I 相菌(著明な溶血環を伴う)=溶血菌
 II : II 相菌(溶血環を伴わず、外観 I と同じ)
 =非溶血菌
 III : III 相菌(溶血環を伴わず、外観粗)
 (東浜 116 代, 96 時間培養)

の pH を 7.0 に補正したものは 37°C 72 時間程度で既に黒褐色に変色し培地全般が溶血を来すので好ましくない。この点本実験に用いた基礎培地 pH 5.6 内外のものは 37°C 120~148 時間まで変色せず、集落が充分大きく発育してから判定することが出来る。又培養に用いる菌液の濃度は、1 枚の平板に約 200 個以下の集落を生ずる程度が上記の観察に適している。

次に、血清学的に III 相であつた 4 株からはこの様な溶血集落は得られず、その外観も亦扁平大型周辺不規則や、不透明で乾燥感があり光沢度少く粗て、I 相菌又は II 相菌の集落とは一見して区別することが出来る。

尚菌株によつては 1 株中に上述した 3 種類の集落を混えたものが見られる (第 1 図)。

以上で百日咳の溶血現象と血清学的性状とは密接な関係有することが明らかになった。

II. 溶血菌の in vitro 及び in vivo における性状

1) 定量凝集反応

第 1 表に示した如く、原株が I 相或は II 相の凝集反応を示す 7 株から得た溶血集落は、原株の示す菌相に拘りなく何れも凝集反応上は I 相菌である。

2) 凝集素吸収試験

10, 20, 40 倍の 3 段階に稀釈した K 因子血清にそれぞ

れ等量の菌液 (40 bil per ml) を加える方法により, 溶血菌の K 凝集素吸収能を新鮮菌と比較した。これによると K 凝集素吸収能は第 2 表の如く K 因子血清の何れの段階においても, 東浜溶血菌の方がむしろ 18—323 新鮮菌よりも優れている。

第 2 表 K 凝集素吸収試験

菌 株	血清 稀釈	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120
東浜95代 40bil/ml	20倍	++	++	++	++	—	—	—
	40	++	++	—	—	—	—	—
	80	—	—	—	—	—	—	—
18-323C ₂ 11代 40 bil/ml	20	++	++	++	++	++	—	—
	40	++	++	++	—	—	—	—
	80	—	—	—	—	—	—	—
K 因子血清		++	++	++	++	++	++	—

第 3 表 Gundel 反応

0.1 ml 皮内, 72 時間後の壊死 (mm)

菌 株	濃 度	4 bil/ml	2 bil/ml	1 bil/ml	0.5 bil/ml	0.25 bil/ml
東浜 (溶 血) 109 代		13×16	15×15	15×21	10×12	10×12
東浜 (非溶血) 109 代		8×16	11×13	9×20	—	—

3) Gundel 反応

定法に従い溶血株及び非溶血株の Gundel 反応を行った。第 3 表の如く溶血株は 1 bil per ml の生菌浮游液 0.1 ml 皮内接種により 72 時間後に 15×21mm の壊死を生じ, 充分な壊死毒を有する。又これは非溶血菌のそれより明らかに大である。

4) マウスに対する毒力

1 群 5 匹のマウス (体重約 15 g) を用い脳内及び腹腔内攻撃によつて, 溶血菌株新鮮株の毒力を比較した。第 4 表に示す如く脳内, 腹腔内何れの攻撃方法においても, 溶血株の毒力は新鮮株と同程度である。

以上でこの溶血菌は, 継代数を重ねているに拘らず血清学的のみならず in vivo においても, 従来の意味での I 相菌としての特質を具備していることが証明された。

III. 溶血株の免疫実験

以上述べた如く溶血株は 25 代以上を経た陳旧株であるにも拘らず, 尚 I 相の性状を保持しているものであるが, これから作ったワクチンの免疫効果を新鮮菌株及び標準ワクチンを対照にして力価試験を行い, それぞれを比較した。

1) ワクチンの定量凝集反応

第 5 表に見る如く東浜溶血菌ワクチン及び標準ワクチンは O 凝集性である。しかし 18—323 新鮮菌ワクチンは分離後 12 代の新鮮菌ではあるが 160 倍において軽度の O 凝集が見られた。

2) ワクチンの毒性

各ワクチンを 10 bil per ml に稀釈したものを各 25 匹 (接種時体重約 17 g) のマウスの腹腔内に 1 ml 宛接種後 14 日間, マウスの体重変化及び斃死を観察し, これによつて各ワクチンの毒性を比較して見た。結果は第 6 表の如く何れのワクチンも著しい相違はないが, 唯標準ワクチンがやや斃死率が高く, 且つ体重増加が遅れるようであつた。

3) 凝集素産生能

各ワクチンを 10 bil per ml に稀釈し, その 1 ml 宛を各 25 匹 (標準ワクチンのみ 15 匹) のマウス (体重約 17 g) の腹腔内に接種し, 14 日後採血して K 凝集素産生能

第 4 表 毒 力 試 験

数字は死亡迄の日数

菌 株	菌 数	脳 内	菌 数	腹 腔 内
東浜 (溶血) 110 代	100 mil	● ₂ ● ₃ ● ₃ ● ₄ ● ₁₁	20 bil	● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₃ ○
	1 mil	● ₃ ● ₄ ● ₈ ○ ○	10	● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₃ ● ₄
	10,000	○ ○ ○ ○ ○	5	● ₂ ● ₃ ● ₇ ○ ○
	100	○ ○ ○ ○ ○	2.5	● ₄ ● ₆ ○ ○ ○
18-323 C ₂ 6 代	100 mil	● ₃ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ○	20	● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₄
	1 mil	● ₇ ● ₁₆ ○ ○ ○	10	● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₂ ● ₂
	10,000	● ₈ ● ₈ ○ ○ ○	5	● ₂ ● ₂ ● ₃ ● ₃ ● ₅
	100	○ ○ ○ ○ ○	2.5	● ₃ ● ₄ ● ₆ ○ ○

第 5 表 ワクチンの定量凝集反応

ワ ク チ ン	凝集素	稀 釈										対 照
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	
東浜 (溶血) 112 代	K O	+++ —	+++ —	+++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	—
18-323 C ₂ 12 代	K O	++ ++	++ +	++ +	++ +	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	—
予 研 標準ワクチン	K O	+++ ±	+++ —	+++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	—

第 6 表 ワクチンの毒性

ワク チン	日 数	マウス体重変化率					斃 死 率 %
		0	4	8	12	14	
東浜(溶血) 112 代		100%	92.6	103.3	113.9	104.5	24.0
18-323 C ₂ 12 代		100	93.6	86.3	120.8	88.8	28.0
予 研 標準ワクチン		100	93.4	86.6	92.6	109.2	46.7

を比較した(第7表)。尚このような1回免疫法に対し同一菌量を2回に分割して14日間隔で2回接種し、それから10日後に採血する2回免疫法でも検討した。

第7表は20倍から10,240倍までの各凝集素価を示すマウス数を記載し、凝集を示した試験管数(全く凝集を示さないものを0、20倍を2とし以下1段階毎に番号を附した)の単純平均を算出したものである。これによつて見ると溶血菌株ワクチン及び標準ワクチンのK凝集素産生能は優れ、18—323ワクチンは相当劣る結果が得られた。

又2回免疫法では血中凝集素価が2倍以上に飛躍的に上昇することがこれで判る。なおこの際、溶血菌株ワクチンでは全数27匹の中第1回接種後第2回までの間に斃

死した4匹を除いて23匹中14匹という多数のマウスが第2回接種直後乃至1～2日間に斃死した。又18—323ワクチンでは同じく第1回接種後生残った10匹全部が第2回接種後に斃死したため充分な結果は得られなかった。

4) 感染防禦能

現行百日咳ワクチン検定基準に定められた方法に従ひ各、10匹のマウス(免疫時体重約12.5g、攻撃時体重約16.5g)を用いて感染防禦実験を行い、各ワクチンのED₅₀を算出した。攻撃には分離後第4代の18—323株生菌0.3ml(液量0.025ml)を用いて脳内攻撃を行った。

ED₅₀によつて各ワクチンの感染防禦能を比較して見ると、第8表に見る通り溶血菌株ワクチンは標準ワクチンに比して同等以上の良好な成績を示し、18—323ワクチンではその力価は非常に低い。尚攻撃菌のLD₅₀は1,650で、この実験に対し妥当なものであつた。

以上の実験により東浜溶血株ワクチンはこの実験範囲内では充分な力価を有すると考えられる。又18—323新鮮株ワクチンの成績は明らかに劣つていた。これらの事実から、百日咳ワクチンの免疫効果は使用菌の継代数とは関係なく、100代以上の陳旧株でも血清学的にI相であるものは充分ワクチン製造に用いることが出来るということが立証されたものと考ええる。又逆に新鮮株でもI

第 7 表 K 凝 集 素 産 生 能

接 種 法	血清稀釈 試験 管番号 ワクチン	20 40 80 160 320 640 1,280 2,560 5,120 10,240											平 均
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1 回 法	東浜(斃血) 102代	1	3	3	7	4	1						3.63
	18-333 C ₂ 12 代	5	4	2	5								2.13
	予研標準ワクチン			5	3								3.38
2 回 法	東浜(斃血) 102代						1	2	2	1		1	8.00

第 8 表 感 染 防 禦 試 験

数字は死亡迄の日数

ワ ク チ ン	稀 釈	マ ウ ス 生 死	ED ₅₀
東 浜 (溶 血) 112 代	5 倍	● ₁₁ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	411.7 mil
	25	● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	
	125	● ₄ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ○ ○	
18-323 C ₂ 12 代	5	● ₄ ● ₄ ● ₅ ● ₅ ● ₆ ● ₆ ● ₆ ○ ○ ○ ○	6.19 bil
	25	● ₄ ● ₄ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₆ ○	
	125	● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₅	
予 研 標 準 ワ ク チ ン	5	● ₄ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	600.0 mil
	25	● ₄ ● ₈ ● ₈ ● ₁₃ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	
	125	● ₄ ● ₄ ● ₄ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅ ● ₅	
	濃度/ml		LD ₅₀
対 照 (攻撃菌の毒力)	12,000	○ ○ ○ ○ ○	1,650
	12,000	● ₁₃ ○ ○ ○ ○	
	0.12 mil	● ₈ ○ ○ ○ ○	
	1.2 mil	● ₆ ● ₇ ● ₉ ● ₁₀ ○	
	12 mil	● ₆ ● ₇ ● ₇ ● ₁₀ ○	

相でないものによるワクチンは力価が劣るという結論は従来の報告⁸⁾と一致する。

IV. 菌の収量

一般に菌は分離後継代を重ねるに従い、その培地に対して発育がよくなるが、この見地から溶血菌株（東浜株 101代から分離後16代継代せるもの）及び新鮮菌株（18—323株4代）の37°C24時間培養連続2回直後のものを光電比濁計により 1,000 bil per ml の生食水浮游液とし、その0.05ml（菌数 50bil）宛を各20本のなす型斜面培地に塗って37°C24時間培養後掻きとって、光電比濁計により菌量を算定して両株の収量を比較した。これによると、東浜溶血菌はなす型コルベン1本につき平均1,364.25 bil, 18—323新鮮菌は 386.33bil で前者の方が遙かに収量は大である。よってワクチン製造の場合、収量の点から見ても陳旧株から得た溶血菌株を用いる方が有利であるのみならず、培養時間も24時間で充分であるので、菌の変異を防ぐ上でも有利となる。

考 察

百日咳菌の溶血現象はその血清学的性状と密接な関係があり、上述の如き著明な溶血性はⅠ相菌の極めて重要

な一特性である。春日等⁷⁾によれば、百日咳菌はⅠ、ⅡⅢ型共分離後の継代数に拘らず全く同様の強さと大いさに溶血を呈し、R型のみ各型共溶血を起さないといわれるが、これは本実験の成績とは相違する所であり、この点首肯し難い。従来も集落の諸性状によつてⅠ相菌を選定することは行われているが、溶血現象がその拠り所とされたことはない。

今日まで菌株の検討は菌液とした場合のO凝集の発現を目標として行われ、O凝集の現われたものはⅡ相或はⅢ相に移行したものとしてその菌株全体を棄て去っていたのである。これらの際にこの溶血性を指標として集落を選択すれば、菌株を永くしかも非常に容易に、Ⅰ相菌として保存出来ることが本実験によつて明らかになった。

次に従来百日咳ワクチンは25代までの新鮮分離菌を用いて製造することになっており、陳旧株から作ったものは予防効果が甚しく劣ることは米国の諸研究者¹⁰⁻¹³⁾及び英国¹⁴⁾の野外実験等において知られた所である。しかし最近のわが国における細菌学的知見によつて、従来の Leslie & Gardner の4相説が血清学的に極めて明瞭な

ものとなつた。即ち百日咳免疫においてはK抗原が必須であつて、これが百日咳ワクチンの免疫効果を支配するものであることが明らかとなつた(春日その他⁴⁾)。しかしこれが本実験において用いられたような陳旧株についても当てはまるかどうかについては知られていなかった。本実験によつて従来強調されていた継代数とは無関係に、いかなる陳旧株であつても血清学的にI相、換言すればK抗原を充分に有している菌株であればワクチン製造に用い得ることが確証された。なおこの実験においてはワクチンの毒性を減ずるために37°Cに1週間処理したが、かかるワクチンの力価保存が従来通りのものかどうかについては今後検討したい。

なお本実験において見られた如く、凝集素産生能と感染防禦能とは並行するようであり、このことはEvans等¹⁶⁾も、K凝集素とは確認していないが、その事実を報告している。又2回免疫法の実験に際し、第2回接種の直後に非常に多数のマウスが斃死することを観察したがその原因は恐らくアレルギーによるものと考えられる。

(Evans等¹⁶⁾, Parfentjev等¹⁷⁾)。

以上の知見は限られた百日咳保存株について、馬血液のみを用いて行つた実験であるので、更に他の百日咳菌株及び牛、羊などの血液についても検討を要すると考える。

結 論

1) I相菌は集落周縁に著明な溶血環を伴う。これを指標として集落を選択し、菌株を永くしかも容易にI相菌として保存することが出来る。

2) 陳旧株でも血清学的に見てI相の性状を有しているものは、継代数に関係なくワクチン製造に使用することが出来る。しかも陳旧株を用いる方が収量等の点で有利である。

本研究を行うに当り、終始御懇篤な御指導を賜つた部長染谷四郎博士並びに金子義徳博士に対し深甚なる感謝を捧げると共に、マウス攻撃実験に当り御援助を頂いた予研竹原氏に対しても衷心より謝意を表する。

なお本研究は文部省科学試験研究費の補助を得た。こゝに謝意を表する。

本論文の要旨は1955年4月第29回日本伝染病学会総会において報告した。

文 献

- 1) 春日忠善その他：文部省科学研究費百日咳班昭和27年度研究業績，1，1953.
- 2) 春日忠善その他：日本細菌学雑誌，8，841，1953
- 3) 春日忠善その他：日本細菌学雑誌，8，927，1953
- 4) 金子義徳：文部省科学研究費百日咳班昭和27年度研究業績，51，1953.
- 5) 金子義徳：日本細菌学雑誌，8，753，1953.
- 6) 金子義徳：日本細菌学雑誌，9，733，1954.
- 7) 春日忠善その他：日本細菌学雑誌，9，53，1954
- 8) 春日忠善その他：日本細菌学雑誌，9，99，1954
- 9) 春日忠善その他：文部省科学研究費百日咳班昭和27年度研究業績，33，1953.
- 10) Madsen, T.: J. A. M. A., 101, 187, 1933.
- 11) Sauer, L.: J. A. M. A., 100, 239, 1933.
- 12) Kendrick, P. L.: Am. J. Hyg., 29, 133, 1939.
- 13) Bell, J. A.: Pub. H. Rep., 56, 1535, 1941.
- 14) Brit, M. Res, C.: Brit. M. J., 30, 1463, 1951.
- 15) Leslie, P. H. & Gardner, A. D.: J. Hyg., 31, 423, 1931.
- 16) Evans, D. G. & Perkins, F. T.: J. Path. Bact., 66, 479, 1953.
- 17) Parfentjev, I. A., Goodline, M. A. & Virion, M. E.: J. Bact., 53, 613, 1947.