クレブジエーラ菌の K 抗原に関する研究 特に K 凝集反応の抑制について

富 沢 万 之 助

国立予防衛生研究所細菌部 (部長 福見秀雄)

〔受付 : 3 月 31 日・1958 年〕

著者は先に Vi 抗原について56°C 1時間の加熱を繰返えし行い、その間遊離して来る Vi 抗原量を測り、遊離 Vi 抗原の Vi 凝集反応におよぼす影響を報告した。今、クレブジエーラ菌群の K 抗原を生理食塩水に浮遊させてみると Vi 抗原と同様に容易に遊離して来る、この遊離の K 抗原が、遊離 Vi 抗原と同じように K 凝集反応を抑制するために、生菌液をもつて行つた場合 K 凝集反応が現われないか又は弱度に現われて来るのではないかと考えられるので、100°C 1時間の加熱を繰返えし行い、その間遊離して来る K 抗原量を沈降反応によつて測り、この遊離 K 抗原が K 凝集反応をどのように抑制するか、又この加熱によつて遊離した K 抗原を除去した後の菌体はどのような K および O 凝集反応を示すかをみてみた。

次に K 抗原は容易に遊離するが、加熱温度の異なることによつてどのような差異を生じて来るか、又凝集反応が終結した後のメヂウム中には、K 抗体と遊離 K 抗原とがどのように残存しているかをみてみた。

実験方法

菌株 : 山本菌株 (K 抗原の型は不明), KI 27 上清および沈澱菌の作り方 : 20時間培養した 1 ナす型培養管に生理食塩水 30cc を加えて菌浮遊液を作り、これを 1 時間煮沸後遠心沈澱して上清をとり、これを 1 回目の上清とし、次にその沈澱菌に原容量の生理食塩水を加えて再び浮遊液を作り、その 1 部をとり、これを 1 回目の沈澱菌とした、このような操作を 5 回繰返えして上清と沈澱菌とを得た。

K O 血清 : ブイヨン培養の生菌の 0.25, 0.5, 1.0, 2.0cc を 4 回にわたつて、5 日の間隔で家兎耳静脈内に注射し、最後の注射日から 1 週間後に全採血した。

O 血清 : 寒天培地に培養した O 型菌で 1 cc 約 10 億の菌浮遊液を作り、56°C 1 時間加熱殺菌して前者と同様にし

て作つた。

純 K 血清 : K O 血清を O 型菌で 2 回吸収して作つた。

沈降反応 : 重層法により、室温で 3 時間観察した。

凝集反応 : 抗血清は倍数稀釈してその 0.25 cc を用い、これに 0.25 cc の菌浮遊液を加え 37°C の孵卵器内に 2 時間次いで室温に 1 夜放置して成績を読んだ。

生菌液と 100°C および 120°C 1 時間の加熱菌液として行つた凝集反応

山本菌株の K 抗原の加熱による影響をみるために、100°C および 120°C で加熱してから K O 血清、O 血清および純 K 血清について凝集反応を行つてみた。その成績を 1 表に示す。

K O 血清に対する凝集反応

生菌液および 100°C 1 時間の加熱菌液では 20 倍まで凝集するに過ぎない、120°C 1 時間の加熱菌液では 2560 倍まで凝集するようになる、これは次の O 血清の項で判るように O 凝集価である、所で 100°C 1 時間加熱後の沈澱菌では 160 倍まで強く凝集するようになる、これは O 血清に凝集しないことから K 凝集価であることが判る。

O 血清に対する凝集反応

生菌液と 100°C 1 時間の加熱菌液およびその沈澱菌は何れも 20 倍陰性の成績を示す。120°C 1 時間の加熱菌液は 2560 倍まで凝集する、その沈澱菌に原容量の食塩水を加えて再び 120°C で 1 時間加熱したものとその沈澱菌は、1 回加熱後の沈澱菌と同様に強く 5120 倍まで凝集するようになる。

TOMISAWA Mannosuke : Studies on the K antigens of Klebsiella strains especially on inhibition of K agglutination. National Institute of Health of Japan — Jap. J. of Bact., 13 (8), 734-739, 1958.

1表 生菌浮游液と100°C及び120°C加熱菌液並びにこれらの沈澱菌で行った凝集反応

凝集原	血清稀釈度									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
KO 血清										
1	++	—								
2	++	—								
3	+++	++	+	+	+	+	+	(+)	—	
4	+++	+++	+++	+	—					
5	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	—
O 血清										
1	—									
2	—									
4	++	+	+	+	+	+	+	(+)	—	
3	—									
5	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	—
6	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	—
純 K 血清										
4	—									
5	++	++	++	+	—					
6	—									

1……生菌浮游液

2……100°C 1時間加熱菌液

3……2の沈澱菌

4……120°C 1時間加熱菌液

5……4の沈澱菌

6……120°C 1時間2回加熱の沈澱菌

純K血清に対する凝集反応

KO血清ではK凝集反応とO凝集反応とが重なり合つて現われるので、純K血清について凝集反応を行つてみた。120°C 1時間の加熱菌液では20倍陰性の成績を示すが、その沈澱菌は反応度こそ弱いながら160倍まで凝集するようになる。その沈澱菌を塩水に再浮遊させて再び120°Cで加熱するときは、その沈澱菌はもはや純K血清には凝集しなくなる。

100°C 1時間加熱処置を5回繰返えして得た上清と沈澱菌とで行った沈降反応と凝集反応

100°C 1時間の加熱菌液でK凝集反応を行つてみると、その凝集価は生菌液の場合と同じであるが、その沈澱菌では反応度も強く凝集価も高く現われることが判つたので、100°C 1時間の加熱操作を5回繰返えして得た沈澱菌で凝集反応を行つてみた。その成績を2表に示す。

2表 100°C 1時間の加熱を5回繰返えして得た沈澱菌で行った凝集反応

100°C 加熱沈澱菌	血清稀釈度									
	20	40	80	160	320	640	2560	5120	10240	
KO 血清										
1 回目	+++	+++	+++	++	—					
2 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)	—	
3 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	
4 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	
5 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
O 血清										
1 回目	—									
2 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	—	
3 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	
4 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	(+)	
5 //	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	(+)	
純 K 血清										
1 回目	+++	+++	+++	—						
2 //	++	+	+	+	+	—				
3 //	(+)	(+)	(+)	—						
4 //	—									

KO血清に対する凝集反応

1回目の沈澱菌は160倍まで強く凝集する。2回目の沈澱菌では5120倍まで凝集するようになる、これはO血清および純K血清に対する成績からO凝集価であることが判る。3回目以後の沈澱菌では10240倍まで凝集するようになる。これも勿論O凝集価である。

O血清に対する凝集反応

1回目の沈澱菌は20倍陰性、2回目以後の沈澱菌で行った成績は、KO血清について行つたものと略々同じようである。

純K血清に対する凝集反応

1回目の沈澱菌は80倍まで強く凝集する、2回目の沈澱菌では反応度は弱くなるが320倍まで凝集する、3回目の沈澱菌では更に反応度が弱くなるが尚80倍まで凝集する、4回目以後の沈澱菌になるとK凝集反応はみられなくなる、即ちK抗原はそのメヂウムをかねて加熱を繰返えしてみると3回目まで認められる。これに反してO凝集反応は2回目から現われ3回目頃からは強く凝集す

るようになる。

沈降反応

K抗原は豊富に含まれているので、100°Cの加熱を繰返すことによつてどのように遊離して来るか、又O抗原はどうかをみるためにKO血清O血清および純K血清について沈降反応を行つてみた。その成績を3表に示す。

3表 100°C 1時間の加熱を5回繰返して得た上清をもつて行つた沈降反応

上清	上 清 稀 釈 度									
	1	8	16	32	64	128	256	512	1024	4096
KO 血清 (1:10)										
1 回目	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
2 "	++	++	++	++	++	++	+	+	-	
3 "	++	++	++	++	(+)	-				
4 "	++	+	(+)	-						
5 "	++	+	-							
O 血清 (1:10)										
1 回目	++	++	++	++	+	(+)	-			
2 "	++	++	++	+	-					
3 "	++	++	+	(+)	-					
4 "	++	(+)	-							
5 "	+	(+)	-							
純K血清 (1:10)										
1 回目	++	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)
2 "	++	++	++	++	++	+	(+)	-		
3 "	++	(+)	-							
4 "	-									

KO血清に対する凝集反応

10倍稀釈のKO血清に、上清を倍数稀釈して重層してみた。その沈降素価は1回目の上清が4096、2回目上清が512、3回目上清が64、4回目上清が16、5回目上清が8というように段階的に低下して来る、殊に1回目および2回目上清において著しい。

O血清に対する凝集反応

10倍稀釈のO血清に、上述の倍数稀釈した上清を重層してみた、1回目上清は128、2回目および3回目上清は共に32、4回目および5回目上清は何れも8の沈降素価を示す。このように1回目の上清が最高のO沈降素価を示すことはK抗原をもっている菌株故に理解し難い。

純K血清に対する凝集反応

KO血清中には、K抗体とO抗体とがあり、従つて2つの沈降反応が重なつてみられるので、純K血清について上述の上清を用いて沈降反応を行つてみた。1回目上清は2048、2回目上清は256、3回目上清は8の沈降素価を示し、4回目および5回目上清は何れも反応しなくなる。以上の成績から、100°C 1時間の加熱操作をその都度食塩水をかえて5回繰返し行つてみると、3回目の上清まではK抗原が証明されるが、4回目の上清になると認められなくなる。今、KおよびO抗原の遊離する量も比較してみると、1回の加熱によつて大部分のK抗原がそのメヂウム中に遊離してうようである。O抗原はこれと異なり徐々に遊離し、5回目の上清中にも尚証明される。次に反応の発現の速さおよび強さを比較してみるとK沈降反応の方は重層後直ちに現われ且つ強い反応を示すが、O沈降反応の方は発現が遅れ且つ反応は弱い、又沈降素価もK抗原の方が非常に高く現われるようである。

22°C, 60°C 及び 100°C で1時間処置された場合遊離する K 抗原量の比較

K抗原は Vi 抗原と同様に単に生理食塩水に浮遊されたゞけて容易に遊離して来るものである。今、どの位の量が遊離して来るものであるかをみるために、山本菌株と KI 27 の両菌株を用いて実験を行つてみた。山本菌株は MKO 型で粘稠性であり、KI 27 は KO 型で非粘稠性である。この両菌株の1寒天斜面の菌量を10ccの生理食塩水に浮遊させ、これを3等分して、22°C, 60°Cおよび

4表 種々の温度で処理して得た上清の沈降素価

菌 株 及 び 上 清 の 種 類	血 清	上 清 稀 釈 度					
		32	64	128	256	512	1024
山 本	22°C 上清	++	++	+	+	(+)	-
	60°C 上清	++	++	++	+	+	(+)
	100°C 上清	++	++	++	+	+	(+)
KI 27	22°C 上清	(+)	-				
	60°C 上清	++	++	++	+	+	-
	100°C 上清	++	++	++	++	+	(+)

100°Cに各1時間放置後すぐ遠心沈澱して上清をとり、沈降反応を行つて遊離して来たK抗原量を測つてみた。その成績を4表に示す。

山本菌株の22°C上清の沈降素価は512, 60°Cおよび100°Cの上清は共に1024の価を示し, 3者の沈降素価は略々等しい, 即ちこの型の菌株のK抗原は22°Cで容易に而も多量に食塩水中に遊離することが判る, このことはK凝集反応に影響をおよぼして来るようである。次にKI 27の22°C上清は32, 60°C上清は512, 100°C上清は1024の沈降素価を示す。特に22°C上清の沈降素価が非常に低い。即ちこの型の菌株のK抗原は, 22°Cのような低い温度では, 遊離するK抗原量は前者に比して非常に少ないようである。

凝集反応終結後のメチウム中に残存している K 抗原と K 抗体

上述の実験でK抗原が室温で容易に遊離の抗原となることが判つた。次に凝集反応の術式をみるに, 抗血清は倍数稀釈されてゆくが, 凝集原としては同濃度の菌浮游液が等量ずつ加えられる, それ故に, 抗血清が或程度稀釈(ここでは40倍以上)された所では, この遊離K抗原によつて凝集反応を起す以前にK抗体が吸収されて了

5表 凝集反応終結後の上清で行つた沈降反応

血 清	沈 降 原	血 清 稀 釈 度					
		5	10	20	40	80	160
山 本	1の上清	—	—	+++	+++	+++	+++
	2の上清	—	—	+++	+++	+++	+++
1の上清	山 本 100°C上清	+++	++	±			
2の上清		+++	++	—			
KI 27	3の上清	—	—	—	—	+	+
	4の上清	—	—	—	+	+++	+++
3の上清	KI 27 100°C上清	+++	+++	++	—		
4の上清		+++	+++	++	—		

1の上清……山本抗血清とその生菌液で行つた凝集反応の上清

2の上清……山本抗血清とその100°Cの加熱菌液で行つた凝集反応の上清

3の上清……KI 27 抗血清とその生菌液で行つた凝集反応の上清

4の上清……KI 27 抗血清とその100°Cの加熱菌液で行つた凝集反応の上清

うから凝集反応が現われて来ないが, 抗血清の濃い所では, K抗体が豊富に存在しているために遊離抗原(凝集反応に用いられる程度の菌量から遊離したもの)によつて吸収しつくされないで残存しているからK菌体抗原によつてK凝集反応が起るものと考えられる。そこで生菌

液と1時間の煮沸菌液とて凝集反応を行つて反応が完結(37°C 2時間—1夜氷室に放置)してから遠心沈澱して上清をとり, これを沈降原或は抗血清として沈降反応を行つて, 抗血清5倍から160倍までの一連の稀釈液中に抗体と遊離K抗原とがどのように残存しているかをみてみた。その成績を5表に示す。

山本菌株の抗血清に対して, その生菌液および煮沸菌液で凝集反応を行い。反応完結後各試験管を遠心沈澱して上清をとり, 山本菌株の抗血清(1:10)で沈降反応を行つてみると, 1-2管中に即ち抗血清稀釈5-10倍までの所では, K抗原はK抗体に吸収しつくされて残存しない。K凝集反応もこの抗血清稀釈の所で一番強く反応し特異の円板状の凝集を呈するようである, 抗血清稀釈が20倍以上になると遊離のK抗原が認められるようになる, K凝集反応もここから弱まるようである。

次にKI 27についても上述同様にして得た上清を沈降原として沈降反応を行つてみると。80-160倍の所で弱く反応するのがみられるが40倍より濃い抗血清中には遊離のK抗原が認められない。煮沸菌液の場合は, 生菌液の場合と異なり, 抗血清40倍の所から陽性に反応し, 80-160倍の所では強く反応して来るのがみられる。即ち煮沸によつて遊離抗原量が豊富になり, それが抗血清5-20倍の所では抗体に吸収しつくされて了うがそれ以上の稀釈になると抗体量が少なくなるためにK抗原が残存しているものと思われる。

今度は反対に凝集反応を行つた各試験管の上清を抗血清とし, 沈降原としては1時間煮沸菌液の上清を用いて沈降反応を行つてみた。山本菌株の生菌液で行つた凝集反応の場合, 抗血清20倍まで, 煮沸菌液の場合は, 抗血清10倍稀釈まで抗体が証明される。KI 27についても同様にして実験を行つてみたが, 何れも抗血清20倍まで反応するのがみられる。以上のように生菌液および煮沸菌液で凝集反応を行つて反応完結後のメチウム中に残存している抗体を測つてみると殆んど同じ価を示す。その理由は凝集反応には菌体抗原が主役を演ずるのであるが抗体消費の面からみると遊離抗原も一役を演ずるので総K抗原量を考えねばならない。

K 凝集反応に抑制的に働く遊離 K 抗原

100°C 1時間加熱菌液で凝集反応を行つてみると, 生菌液で行つた場合と同様に20倍まで凝集するにすぎないが, 上述の加熱菌液の沈澱菌で行つてみると160倍まで強く凝集するようになる。このようなことはVi抗原においても認められる。

凝集反応の術式をみるに、抗血清は倍数稀釈されて次第にうすくなるが、凝集原として用いられる菌液は一樣な濃さである。このために、特に血清濃度のうすい所では、凝集反応を起す前にK抗体が遊離のK抗原によって吸収されて了うために凝集反応が起らなくなるものと考えられるので、次の実験を行つてみた。即ち山本菌株の生理食塩水浮游液を 100°C で 1 時間加熱後遠心沈澱して上清と沈澱菌とに分け、沈澱菌を食塩水で 1 回洗つてから再浮游液を作り、これを、原液、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に稀釈した上記の上清に等量ずつ加え、これを凝集原として KO 血清および純 K 血清について凝集反応を行つてみた。その成績を 6 表に示す。

6 表 K 凝集反応を抑制する遊離 K 抗原

処置凝集原		抗 血 清							
100°C 上清稀釈	100°C 沈澱菌	KO 血清稀釈度				純 K 血清稀釈度			
		20	40	80	160	20	40	80	160
1:1		+++	—			+	—		
1:2	上清と 等量の 加熱菌 浮游液	+++	+	—		++ (+)	—		
1:4		+++	++ (+)	—		+++ (+)	—		
1:8		+++	+++	+	—	+++	+++	+	—
1:16		+++	+++	+++ (+)		+++	+++	+++ (+)	
100°C 加熱沈澱菌		+++	+++	+++ (+)		+++	+++	+++ (+)	

2 倍稀釈の上清に加熱菌体を加えたもので行つた凝集反応の成績は、生菌液で行つたものと略々同じである、上清稀釈が 4 倍以上になると K 凝集価が次第に高くなる、上清稀釈が 16 倍になると対照の 100°C 加熱沈澱菌と略々等しい凝集価を示すようになる。以上の成績から遊離 K 抗原は K 凝集反応に抑制的に働くことが判る。それは K 凝集反応を現わす以前に、菌浮游液中にある遊離 K 抗原によって K 抗体が吸収されて了うためであると考えられる。

総括及び考察

山本菌株を生理食塩水に浮遊させて、100°C 1 時間の加熱操作をその都度食塩水をかえて 5 回繰返えしてみると、1 回目の加熱によって K 抗原の大部分は遊離して、2 回目の加熱では残りの大部分が遊離して来るようであるが尚 3 回目までの上清中に証明される。これに反して O 抗原の方は 5 回以後の上清中にまでも証明される。又 K 沈降反応は O 沈降反応に比して早期に且つ強く発現する、そして K 沈降素価は O のそれに比して非常に高い価を示すようである。

K 凝集反応によるときは、加熱 3 回目までの沈澱菌中に K 抗原が認められる、生菌液では凝集価が非常に低いが、この生菌液を 100°C 1 時間加熱後遠心沈澱して遊離 K 抗原を取り除いた後の沈澱菌で行つてみると、凝集価が高く且つ強く現われるようになるが、O 凝集反応は全然現われて来ない。このような成績は 56°C 1 時間の加熱を繰返えして行つた腸チフス菌および Ballerup 菌の Vi 凝集反応においてもみられる。即ち腸チフス V 型菌の 56°C 1 時間の加熱沈澱菌の凝集価は、生菌液のそれに比して非常に高く現われるようになる。但し Vi 抗原の発育は K 抗原程でないので 2 回目の加熱沈澱菌になると微弱の Vi 凝集反応を示し、3 回目の沈澱菌ではもはや反応しなくなる。これに反して、Vi 抗原の発育の良い Ballerup 菌は 5 回目の沈澱菌中にまで Vi 抗原が認められる。以上の成績から凝集反応による K 抗原の分類も考えられるが、然し総べての菌株がこのような成績を示すものでなく、クレブジエーラ菌群中には、100°C の加熱によって O 凝集反応を呈するものもみられるので凝集反応による分類は困難のようである。山本菌株は 100°C 1 時間の加熱によって O 凝集反応を現わして来ないが、2 回目の加熱によって現われて来るようになる。Brooke は 100°C において 2.5 時間加熱しても尚 O 凝集性であることを報告している。120°C で加熱されると 1 時間で O 凝集反応が現われて来るようになる。然し K 凝集反応も微弱ながらみられる。これは著者の先の報告から、一旦遊離した K 抗原が 120°C の加熱によって再び菌体に吸着されたためとも考えられるが、K 抗原は Vi 抗原のように吸着されないようであるから、尚残存している K 菌体抗原によるものと考えられる。生菌液では K 凝集反応を現わさない抗血清でも、K 沈降反応によるときは非常に高い価を示すので、現在この方法による分類法を研究中である。

K 抗原の分類法をみるに Kauffmann 一派は Swelling test により、Edwards などは凝集反応によつて、沈降反応によるときはより簡単に K 抗原の分類が出来るように思われる。

次に処置温度によつて、遊離する K 抗原量がどのように異なつて来るかをみるために、生理食塩水菌浮游液を 22°C、60°C および 100°C において 1 時間放置してから直ぐ遠心沈澱して上清をとり、遊離 K 抗原量を沈降反応によつて測り、その成績を比較してみると、MK O 型の菌株では 3 者は何れも略々等しい沈降素価を示す。即ちこの型の K 抗原は生理食塩水に浮遊されただけで容易に且つ多量に遊離して来るようである。K O 型の菌株では 22°C

Cの処置によつて遊離して来るK抗原量は前者に比して非常に少ない。然し60°Cおよび100°Cで加熱されるとMKO型の菌株と同様に多量に遊離して来る。Kauffmann, EdwardsなどはK凝集反応を48°C, 50°Cの恒温槽中で行つてゐるが、上述の実験から考えて不適当な方法であると思われる。生菌液と1時間の煮沸菌液とで凝集反応を行つて反応が完結してから遠心沈澱して上清をとり、この上清中に残存しているK抗体および遊離K抗原を沈降反応によつて測つてみると、菌株によつても多少異なるが抗血清の濃い所（5～20倍）では抗体の残存しているのが認められるが、抗血清が或程度稀釈された所（20倍以上）では反対に遊離K抗原の残存しているのが認められる。

生菌液をもつてK凝集反応を行つた際、その価の低いのは、K凝集反応を起す以前に沈降反応によつてK抗体と遊離K抗原とが結合しK抗体が消費されるためと考えられるので、100°Cの上清を倍数稀釈して、それに100°C 1時間の加熱洗滌菌体を加え、これを凝集原としてK凝集反応を行つてみると、上清の稀釈が進むに従つて即ち遊離K抗原の量が少なくなるにつれてK凝集価の上昇するのがみられる。

結 論

山本菌株を生理食塩水に浮遊させ、100°C 1時間の加熱を5回繰返し行つて上清と沈澱菌とに分け、その各々について沈降反応と凝集反応とを行つてみた。1回の

加熱で多量のK抗原が遊離してゐることが判る。即ちその沈降素価は2048である、2回目上清のそれは256、3回目のそれは8を示す、4回目の上清になるともはや認められなくなる、而してK沈降素価はO沈降素価に比して非常に高く且つその反応は速かにそして強く発現する。

次にK凝集反応についてみるに、1回加熱後の沈澱菌は生菌液に比して反応度も強く凝集価も相当高く現われるようになる。反応度は弱くなるが尚加熱3回目までの沈澱菌体にK抗原が認められる。

K抗原は食塩水中において低温度でも容易に遊離する。この遊離のK抗原はK凝集反応を抑制するようである。

山本菌株は故細谷博士から KI 27 は家畜衛験の坂崎博士から御分与されたものである、こゝに厚く感謝します。

文 献

- 1) Brooke, M. S.: Acta Path. et Microbiol. Scandinav., 28, 313, 1951.
- 2) Edwards, P. R. & Fife, M. A.: J. Bact., 70, 382, 1955.
- 3) Edwards, P. R. & Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae, 167, 1955.
- 4) Kauffmann, F.: J. Immunol., 57, 71, 1947.
- 5) Kauffmann, F.: Enterobacteriaceae, 2nd. Edit., 1954.
- 6) Shimizu, M.: Jap. J. M. Sc. & Biol., 5, 387, 407, 1952.