百日咳菌の研究

第3報 菌体成分の抽出並に免疫学的性状について

山本郁夫 善養寺 浩 加藤 智

前橋医科大学 微生物学教室

〔受付: 9月29日, 1950年〕

百日咳病原体の発見は1906年 Bordet et Gongou の報告に始まり, *H. pertussis* が本病の眞の病原菌であることは先人の数々の業績によりも早疑うものはないであらうが, これが感染・発症・免疫の問題については未だ充分な検討が加えられていない。特に本病に特有な頑固な痙攣性咳嗽発作の発現に本菌の毒素が如何なる役割を演じているかは全く不明な点であり, 先人の犬・猿などを用いた人類同様な発症実験も生菌感染によつて行つたもので, 特に本菌毒素の分割について, これと本症状との関係に言及したものは稀である。

百日咳菌の毒素について, 本菌の発見者 Bordet et Gongou¹⁾は Besredka の方法で菌体毒素を抽出真空乾燥し, マウス・家兎を用いてその毒性を検すると共に本病によつて死亡した小児の病理所見と動物実験結果との相似性を推論しているが, 本毒素の抗毒原性については否定的であつた。その後, Evans and Maitland²⁾は菌体より凍融法により毒素を溶出して, これを凍結乾燥法により保存, この毒素を検した結果56°C 30分で破壊する易熱性毒素であることを認め, 次で, Evans³⁾は本毒素を用いて家兎に抗毒素を産生せしめ得たと報告している。その後, Sprunt and Martin⁴⁾及び Smolens and Flavel⁵⁾も菌体凍融抽出毒素の易熱性並に抗毒原性を証明している。本邦に於ても, 渡辺⁶⁾, 桑島^{7) 8) 9)}, 井口¹⁰⁾, 森¹¹⁾, 等は同様菌体内に菌体外毒素の存在を証明している。私共¹²⁾も菌体内に易熱性並に耐熱性の二種の毒素を認め桑島等の所見と同じ結果を得た。又, 液体培養濾液中に易熱性毒素を証明したものに Toomey et al¹³⁾, Truchina¹⁴⁾ Wood¹⁵⁾, Roberts and Ospeck^{16) 17)} 等及び本邦では池野¹⁸⁾, 野崎¹⁹⁾, 渡辺²⁰⁾, 遠藤²¹⁾, 中村²²⁾, 桑島^{23) 24)}, 善養寺²⁵⁾, の報告がある。然し, 本菌の易熱性毒素はその感染防禦抗体産生能に於て尙異論があり, Verwey and Elizabeth³⁰⁾は菌体免疫血清を用いて菌体の破壊溶液より凝集原を吸着除去した比較的純粋な易熱性毒素には抗毒素並に感染防禦抗体の産生能力は認められないが, 抗毒素と結合する能力を保持していると報告してい

る。

以上の多くの実験は全て菌体を破壊し可溶性にしたまゝの状態, 又液体培養に於ては培養液の遠心無菌上清をそのまゝの形で実験に供している。

菌体成分の分割抽出に就ての報告は極めて少いが, Eldering³¹⁾は百日咳菌, バラ百日咳菌並に *B. bronchiseptica* の三者から Boivin 法により多糖類を抽出し, 感染防禦能について交叉試験を行い, 百日咳菌多糖類は全菌ワクチンと同じ程度の感染防禦抗体産生能を有するが, 動物接種により著明な過敏性を與え脱感作を行わぬ時はアナフィラキシー・ショック死を起すと述べている。本邦田上³²⁾は同様 Boivin 抗原の優秀性を報告しているが, 過敏症については言及していない。又 Parfentjev et al^{33) 34) 35)}は百日咳菌の動物実験に見られる過敏症は, 核蛋白に由来するものであると報告している。

私共は幾分でも毒素を純粋に抽出し, これが免疫学的意義を究明せんとして腸内細菌等について行われた従来の化学的处理方法を踏襲して実験を行つて見た。本抽出に於ては特に易熱性毒素の分離に意を用い, 変性を避けるため, 加熱・溶媒の使用等は極力避け, 各成分の各段階に於て家兎皮内反應を検討しつゝ抽出精製を行つた。

実験材料並びに方法

菌株並に培養菌量: 分離後5代目で凍結乾燥した八木株をマウス脳内に接種し斃死せしめたる後 Bordet et Gongou 培地に移植しこれより直ちに液体培地に培養した。本菌は全ての点でS型の性状を保持している。菌量は概ね250 ccの液体培地に1 mg 程度を接種した。

培地: 善養寺³⁶⁾が報告した炭末加液体培地で, カゼインを塩酸で加水分解した液, KH_2PO_4 —0.5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0.01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0.01 g, $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

YAMAMOTO, Ikuo, ZENYOSI, Hiroshi, and KATO, Satoshi: Studies on *Hemophilus pertussis*. III. The extraction of the cell-components and their immunological properties. Jap. J. Bact. 6(1) 47—51, 1951.

—0.0005 g, Cystein-HCl—0.01 g 酵母透析液 40 cc, 精製活性炭末—0.7 g, 以上に蒸溜水 1 l を加えて溶解し, pH 7.2 とし Roux の毒素瓶に 250 cc 宛分注高压滅菌した。

菌体分割法: 培養 5 日後遠心集菌した全菌体量は 20 l より凡そ 42 g であつた。分割抽出法は図表の如く行い説明を略すが, 始終できる限り低温で操作し特に透析時は 0°~1°C の氷室中で大量の蒸溜水で行い時々水を交換した。凍融は—37°C~75°C で行い, 毒素の減弱を恐れて 35 回で一旦遠心し, 残渣を更に 30 回行つた。この程度で菌体は辛うじて破壊し得るようである。尙前凍融上清は—75°C に凍結しておいた。この凍融上清

の醋酸酸性 pH 4.4 附近で特異的に沈降した部分を PF_I とした, 上清は Gundel²⁶⁾ 氏反應陰性である。次に更に醋酸を加え pH を低下せしめたが特異的に沈降を起す pH を知ることができなかつたので三塩化醋酸を加えて残余蛋白を完全に沈降させた, これを PF_{II} とし, その上清より 95 % メタノールで沈降した部分を CF とした。

菌体分割成分の性状

家兎及海狸の皮内反應に就て: 百日咳菌の易熱性・耐熱性の二種毒素がどの分割に存するかを検するため, 家兎並に海狸の皮内による Gundel²⁶⁾ 氏反應を行つた。

白色健康 3 kg の家兎の背部を脱毛した後, PF_I, PF_{II}, CF を適宜食塩水で稀釈して皮内に 0.2 cc 宛接種した。

圖表 菌體分割抽出法

同一材料に就て3頭の兎を用いこれに平行して海狗をも使用した。

PF_I 接種では5時間目頃より円形蒼白が著明となり10時間後より点状出血を認め、次第に融合して24時間後より壊死に陥つた。この場合週辺は蒼白にして発赤は余り著明でなく浮腫は認められたが硬結は判然としなかつた。動物の差によりその出現度も変化があり家兎の最小壊死量(MND)は0.05~0.015 mg 程度である。海狗のMNDは約0.02 mg で個体差は家兎程認められない。

PF_{II} では2 mg で家兎・海狗共全く変化を與えず、24時間後に至るも痕跡をも残さないが、5 mg の接種では局所に点状の壊死を認めたがMNDを測定し得なかつた、尙24時間後に至るも遂に発赤・硬結・腫脹は認められなかつた。

CF に就ては5 mg の接種で皮内反應は全く認められない。

以上の如く、百日咳菌の壊死反應を起す成分はPH 4.4で特異的に沈降するPF_I 劃分に存在し、その他の部分には殆んど認められなかつた。PF_{II} の5 mg 接種による点状壊死は恐らく非特異的なものであるか又はPF_I の混在によるものであろう。耐熱性発赤硬結毒に就てはPF_{II}・CF 成分に就ても遂に認めることはできなかつたが、特にCF に就ては以下述べる如く、本抽出法によるCF は免疫学的に全く不活性で沈降反應も起し得ず只血球凝集反應のみが認められる程度であり、恐らくこの場合はある程度の変化を起して毒性を示し得なくなつていたのであろう。この点本菌のBoivin法等の抽出多糖類に就いて更に追究し、耐熱性発赤・硬結毒について明らかにしたい。

マウスに対する毒性に就て：PF_I, PF_{II}, CF を適宜食塩水で稀釈し10 g 前後のマウスの脳内並に腹腔内に接種した。

PF_I の脳内による最小致死量(MLD)は0.01 mg, 腹腔内では0.1 mg で、高濃度では24時間以内に死亡したが、MLDに於ては大体5日前後で死亡した。剖見上生菌の場合の如き点状出血が認められる。脳所見は肉眼的には余り顯著な変化を認め得なかつた、この点病理組織学的に更に検討中である。

PF_{II} のMLDは脳内0.8 mg, 腹腔内10 mg 程度であり、特異的致死作用が認められず又腹腔内の点状出血も著明ではない。

CF に於ては脳内0.8 mg, 腹腔内10 mg を接種するも遂にマウスを斃すことはできなかつた。

この結果から見ると、本菌の致死作用の主役はPF_I が演じておるものゝ如くである、然しCFの変性等検討を要する点があり更に追究したい。

化学的性狀：PF_I は白色無定形粉末でpH 8.0以上で溶解し、非透析性、加熱により凝固し、等電点はpH 4.4前後(東洋濾紙製比色紙を用う)である。0.5%溶液についてビウレット、キサントプロテイン、ミロン、ズルフォサルチール酸、ホブキンスコール、坂口、三塩化醋酸の諸反應いづれも(+)、モーリッシュ反應(+), 更に核酸反應としてのペントーズの検出について行ふにオルチン反應並にDischeのジフェニールアミン反應は弱度ながらはつきりと陽性を示した。収量少きため、P, Nの定量は行なわなかつたが以上の結果からあえて推論するならば、本PF_I は核蛋白を主体とするものと思う。

PF_{II} は灰白色無定形pH 7.0~8.0の蒸留水に溶解する。0.5%溶液についてミロン、ズルフォサルチール酸、ビウレット、三塩化醋酸の諸反應はいづれも(+)、モーリッシュ反應(+), 非透析性であるが、オルチン並にジフェニールアミンの反應は極めて微弱にして陽性と断定し得ず、即ちPF_{II} は核蛋白以外の糖蛋白並にその他の蛋白質が共存しておるのか、あるいは多糖類を狭雜した蛋白質であろう。然しこの程度の抽出方法ではこの中に多分にPF_I が混入しておるものと考えられる。

CF は白色無定形、中性水に易溶で蛋白反應は完全に陰性、モーリッシュ反應強陽性、非透析性、アルコールで沈降する多糖体である。

沈降反應並に血球凝集反應：使用免疫血清a)八木菌免疫血清(凝集價82,000倍)b)培養無菌遠心上清免疫血清(凝集價10,000倍)本血清は八木菌5日間培養液を12,000 r. p. m. 30分間2回遠心した上清を1 cc 宛アンプレーに分注後直に凍結乾燥し、これをもつて家兎を免疫して得たものである。遠心上清中には当然菌体の融解した抗原性物質並に善養寺²⁰⁾がすでに報告した如く、易熱性毒素が存在している。c) PF_I トキソイド免疫血清(凝集價2,560倍)。以上の3種の血清に対して各分割成分を50倍より階段稀釈を行い、重層法により沈降反應を検するに、結果は第2表の如くPF_{II} のみ特異的な沈降反應を示すがPF_I に極めて微弱であり、CF では全く沈降反應を示すことはなかつた。多くの菌に見られる多糖類性抗原は沈降反應は極めて特異性が高いのであるが本菌の場合本抽出法による抗原は全く反應の現われぬ点極めて興味ある問題である。

次にKeoghは百日咳菌はインフルエンザウイルスと同様に特異的に人並びに鶏等の血球を凝集し、この反應

第2表 沈降反應・血球凝集反應

抗血清 菌體成分	抗血清	抗培養遠 心上清血 清	抗 PF _I ト キソイド 血清	血球凝集反應
PF _I	128	128	128	(-)
PF _{II}	32,000	32,000	32,000	(-)
CF	(-)	(-)	(-)	64,000
MeCF※	(-)	(-)	(-)	128,000

註) 数字は最高沈降原價及血球凝集原價を示す。

※ 培養無菌濾液より得た多糖類性成分(蛋白反應(-), Molisch-反應(+))で詳細は續報に述べる。

と菌の毒力との間に相關關係が存在し、尙免疫血清により凝集は阻止されると報告している。

私共は本反應がどの分割によつて行われるかを検討して見た結果第2表の如く CF 並に MeCF は特異的に血球を凝集し、PF_I, PF_{II} では100倍に於ても全く本反應を認めることはできなかつた。

次で、CF 並に MeCF の最低血球凝集價の3倍(3 MH AD)量に対して八木菌免疫血清並に免疫前の同一家兎血清を階段稀釈して加え血球凝集阻止反應を検するに免疫前の正常血清では全く阻止現象は見られなかつたが、菌体免疫血清に於ては512倍稀釈迄特異的に本反應を阻止し得ることができた。

血球凝集反應に就て本実験では全て鶏血球を用いたが、更に各種の動物血球について、又全菌体を用いての凝集実験は更に詳細に追究中である。

考 察

私共は以上の如く、液体培養菌体より易熱性壊死毒を粗毒素であるが抽出することに成功した。本物質は一應核蛋白成分と見做し得るもので、この点志賀赤痢菌等の菌体外毒素と相似して居り、極めて興味ある点と思う。

これが抗原性に就ては次報に詳述する。PF_{II} 分割は毒性極めて微弱にして壊死も殆んど認められないのに沈降原價が特異的に高い点は Smolen and Mudd 等の皮内反應抗原としてのアレルギーに一致するものと信ずる。本抽出法によつて得た多糖類性抗原は、従来多くの菌に見られた多糖類性抗原とは全くその趣を異にしており、これは抽出過程特に弱アルカリ性凍融によつてハプテン化したのであるか否かは更に検討を要する点であるが、血球凝集反應並びに免疫血清を用いての阻止現象等、極めて乏しい実験ではあるが、一應免疫現象の範ちゆうに属する反應の見られることは本菌の諸性狀中注目すべき点の一つであると思う。

各分割共収量は極めて少いがこれは凍融法によつては充分に菌体成分が溶出して来ないためであり、遠心菌体残渣を更に強烈な方法で処理することにより PF_I・PF_{II}・CF 等に該当する分割を多量に得ることができた。これらは毒性を除く全ての点に於て前三者と同じ態度を示している。然し本菌の易熱性毒素の如き極めて不安定なものを抽出するには熱及び強い化学薬品の使用はその変性をともなうものである故極力避けねばならず、又室溫に水溶液として放置しても比較的早期に毒性の減弱が認められるのであつて、本毒素の抽出には常に5°C以下の低温で操作する等注意を要するものである。

文 献

- 1) Bordet, J. et Gengou, O.: Ann. Inst. Pasteur, 20, 415, 1906.
- 2) D. G. Evans and H. B. Maitland: J. Path. Bact. 47, 715, 1937.
- 3) D. G. Evans: J. Path. Bact. 51, 49, 1940.
- 4) Sprunt, D. H. and Martin, D. S.: Amer. J. Path. 19, 225, 1943.
- 5) J. Smolens and E. H. Flavell: J. Immun., 47, 173, 1947.
- 6) 渡辺一郎: 実験医誌, 20, 1364, 1936.
- 7) 桑島謙夫・大村寛俊: 日本医学, No. 3403, 12, 1946.
- 8) 桑島謙夫: 日本医学, No. 3406, 7, 1946.
- 9) 桑島謙夫: 日本医学, No. 3408, 12, 1946.
- 10) 井口 光: 基礎と臨床, 2, 164, 1949.
- 11) 森 禧子: 予研傳研學術集談会, 昭和24年9月29日.
- 12) 山本郁夫・善養寺浩: 日新医学, 36, 158, 1949.
- 13) Toomey, J. A., McClelland, J. E. and Lieder, L. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31, 403, 1933.
- 14) Truchina, E. F., Peehletzkay, W. J. and Murawjewa, O. S.: Z. f. 1 mm, forsh., 83, 124, 1934.
- 15) M. L. Wood: J. Immun., 39, 25, 1940.
- 16) Roberts, M. E. and Ospeck A. G.: J. Inf. ec. Dis. 71, 264, 1944.
- 17) Roberts, M. F. and Ospeck, A. G.: J. Inf. ec. Dis. 74, 14, 1944.
- 18) 池野喜一: 兒科誌, No. 407, 486, 1934.
- 19) 野崎英勝: 細菌誌, No. 506, 279, 1938.
- 20) 渡辺一郎: 実験医誌, 20, 1371, 1936.
- 21) 遠藤 賢: 満洲医学会誌, 38, 441, 1943.
- 22) 中村喜代治他二名: 兒科誌, No. 403, 2133, 1933.
- 23) 桑島謙夫他二名: 日傳病誌, 23, 35, 1950.
- 24) 桑島謙夫他二名: 日傳病誌, 23, 41, 1950.
- 25) 善養寺浩: 第三回細菌学会関東地方会, 昭和24年11月15日.

- 26) Gundel, M. and Schlüter, W.: Zbl. Bakt, 129, 461, 1933.
- 27) 細谷省吾・江上不二夫: 日本医学及健康保険, No. 3320, 290, 1943.
- 28) 細谷省吾・江上不二夫: 日本医学及健康保険, No. 3369, 333, 1944.
- 29) 細谷省吾他三名: 基礎と臨床, 1, 185, 1947.
- 30) Verwey, W. E. and Elizabeth, T. H.: J. Immun, 61, 27, 1949.
- 31) G. Eldering: Ame. J. Hyg., 36, 294, 1942.
- 32) 田上博士: 熊本医会誌, 17, 2135, 1941.

- 33) A. Parfentjev, M. A. Goodline, and M. E. Virion: J. Bact. 53, 597, 1947.
- 34) A. Parfentjev, M. A. Goodline, and M. E. Virion; J. Bact. 53, 603, 1947.
- 35) A. Parfentjev, M. A. Goodline, and M. E. Virion: J. Biol. 53, 613, 1947.

(本研究の要旨は昭和25年4月, 第23回日本細菌学会に於て報告した。)