百日咳菌のK抗原に関する研究

金子 義 徳

国立公衆衛生院・衛生微生物学部 (部長: 染谷四郎)

〔受付: 8 月 8 日 1953 年〕

百日咳菌の変異に関しては過去 50 年間、幾多の研究報告があるが、要するに菌株の新旧によつて凝集反応上差があるという事、及びその変異過程を S-R 変異で説明しようとするのが殆んどで、今日の所謂 K 抗原の O-凝集阻止という見地から凝集反応を検討する試みは殆んど行われていない。云うまでもなく LS-R 変異を K 抗原喪失変異とは全く異なつた範疇に属する変異であり、凝集反応の観察においても劇然とした相違のある事は周知である。百日咳菌の変異に関する研究も、先ず此の点が解明されねばならなかつたのであつて、今日まで多くの困乱があつたのも当然であろう。然しながら百日咳菌の O-凝集阻止という事は既に昭和 12 年野崎¹⁾によつて注目され、昭和 15 年山川²⁾が同様の観察をしている。昭和 12 年野崎は“易熱性抗原が耐熱性抗原の凝集反応を抑制していると思われる”現象があると記載している事がそれ以上の追求は行われなかつた。

昭和 27 年春日³⁾は所謂 L-, S-, III-, 因子血清によつて百日咳菌の抗原分析を行い百日咳菌の変異に関して重要な研究を発表した。余は其の研究を追試し大体において確認したが、結局百日咳菌は抗原構造上は所謂 K 抗原を有する腸内細菌等と同様に理解すべきことを見出し、その面から研究をすすめいささか知見を得たのでこゝにその概略について報告する。各変異段階における菌の名称については今後の検討を待つべきであつて、こゝでは一般に普及している Leslie & Gardner⁴⁾の I~IV 相の呼称にしたがい、唯その内容において I 相菌とは Kauffmann¹⁰⁾の所謂 K 抗原を有し、O-凝集性の菌、III 相菌とは O-凝集性の菌とする。使用した菌株は北研春日博士、済生会小山博士より分與されたもので、患者から分離後 5~6 代から研究経過中 27~28 代までのものを実験に供した。

実験成績

1. 凝集反応における K 抗原の O-凝集阻止現象。

春日の研究を追試中、毎常第 1 表に示すように、所謂 O-凝集性という現象に気付いた。以下本実験においては、第 2 表に示した I 相フォルマリン菌液免疫血清と

第 1 表 百日咳菌凝集反応に対する加熱の影響

血 清*	L	S	III	対 照
加熱条件				
生 菌	++	++	—	—
60°C 1 h.	++	++	±	±
70°C 1 h.	—	++	++	—
100°C 1 h.	—	++	++	—
100°C 2 h.	—	++	++	—
120°C 2 h.	—	++	+	—
N-HCl 直 後	±	±	++	±
N-HCl 37°C 20 h. 後	±	±	++	±

*春日³⁾の血清

後述する理由から 120°C 1 時間加熱 I 相菌免疫血清を使用した。K-因子血清は、I 相菌免疫血清を III 相菌で

第 2 表 I 相菌免疫血清を用いた場合の K-凝集反応と O-凝集反応

因子血清	K	K(-S)	O	対 照
加熱条件				
生 菌	++	++	—	—
60°C 1 h.	++	++	+	—
100°C 1 h.	++	—	++	—
100°C 2 h.	++	—	++	—

吸収すると、凝集價の減少を来さず、簡単に作成出来る。しかし此の K-因子血清は加熱した I 相菌をも凝集するから、K 抗原の中には、耐熱性のものもある事は明らかである。此の事は春日の報告にもある通りである。

KANEKO, Yoshinori: Study on the K antigen of *Haemophilus pertussis*. Dep. of Public Health Bact., National Institute of Public Health. —Jap. J. of Bact., 8(7)753-758, 1953.

第 3 表 其の 1.

K-免疫原性に及ぼす加熱, I 規定塩酸, 50%エチルアルコールの影響

I 相 菌 処 理 方 法	血清稀釈 凝集原	未 吸 收 血 清										III 相 菌 の 吸 收 血 清									
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	対照	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	対照
0.5 % フォ ルマリン加 生食水菌液	I 相 生 菌	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	I 相加熱菌	++	++	++	++	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II 相 生 菌	++	++	++	++	++	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100°C 2 h. 加 熱	同 上	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	++	++	++	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120°C 2 h. 加 熱	同 上	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	++	++	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I 規定塩酸 37°C 20 h. 処 理 菌 体	同 上	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50%エチル アルコール 処 理 菌 体	同 上	±	±	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±
		-	-	±	++	++	++	++	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75°C 1 h. 加 熱	同 上	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++	++	++	±	±	±
		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

第 3 表 其の 2.

100°C 加熱の K-免疫原性に及ぼす影響

免 疫 原	血清稀釈 凝集原	未 吸 收 血 清											Ⅱ 相 菌 吸 收										
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	対照	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	対照
0.5% フォ ルマリン加 加熱菌体	Ⅰ相 生 菌	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—
	Ⅰ相 加熱菌	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—
	Ⅱ相 生 菌	++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
同 上 上 清	同 上	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
		++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	
		—	++	++	++	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
生食水浮 游加熱菌 体	同 上	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	—
		++	++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	
		++	++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
同 上 上 清	同 上	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
		++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	
		±	++	++	++	++	++	±	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
120℃ 1h. 加熱全菌体	同 上	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		++	++	++	++	++	++	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

此の K-因子血清を、加熱 I 相菌で吸収すると、凝集價は下るが、I 相生菌のみを凝集する血清を得る事が出来る。之を K(-S) で示す。

第 2 表から百日咳菌には凝集反應上易熱性の抗原と、生菌の状態ではその抗原によつて凝集を阻止されている耐熱性の O 抗原とがあることが明らかである。勿論、耐熱性の K 抗原もあるが、此の抗原については後で考察することにする。尙この際 70°C 前後に加熱すると I 相菌液は著しく粘稠性を帯びることは III 相菌に比べて特異な現象である。

2. K 抗原の免疫原性

第 2 表に示した血清を使用して O-難凝集性である I 相菌株を第 3 表 (其の I) に示すように色々に処理して各 2 頭の家兎を免疫してその免疫原性を検討した。家兎は免疫前何れも血清 5 × 稀釈で I 相生菌凝集陰性であった。尙表には、2 頭略々同様の成績であつたので、1 頭の成績のみを示した。結局第 3 表 (其の 1) から、フォルマリン菌液で免疫した家兎が 5120 倍程度の凝集價を得る位の免疫 (約 60 bil.) では 100°C 及 120°C 2 時間加熱菌では所謂 K-抗体は殆んど產生されず III 相菌に対する凝集素が產生される。

50%エタノール及び N-塩酸、37°C 20 時間処理菌体ではフォルマリン菌液と略々同程度の凝集素を產生する。100°C 加熱菌の免疫原性を更に確める爲に約 600 bil の菌体とその上清を用いて免疫した結果を第 3 表 (其の 2) に示す。即ち 100°C 加熱菌体、及び上清免疫血清ともに I 相生菌に対してかなり著明な凝集素を有する。即ち 100°C 加熱でも易熱性 K 抗原の免疫原性は完全には破壊されない。

又 120°C 加熱菌液ではそれ以上の免疫量でも I 相生菌に対する凝集素は產生されず III 相菌に対する凝集素のみが產生される。

更に 75°C 1 時間加熱菌液では加熱で毒性が減少する爲か大量の免疫に耐えるので約 500 bil で免疫した所 I 相生菌に対して 10 万倍、加熱 I 相菌に対して 1280 倍の凝集價を有する血清が得られた。この附近の温度は先きに述べた様に菌液が粘稠になる所であり、今日まで高い凝集價を得るには生菌免疫がよいと言われているが、生菌免疫では家兎が斃死する場合もしばしばあり、此の点 75°C 加熱菌免疫法は有利であると考え。勿論当然の事ながら I 相菌で免疫しても、III 相菌に対する抗体即ち O 抗体が產生される。

3. I 相菌耐熱性抗原と III 相菌抗原の同定

上述の第 3 表に明らかな様に、I 相菌で免疫すると毎

第 4 表 加熱 I 相菌と III 相菌の交叉吸収試験

血 清	吸収菌	凝集原	血 清 稀 釈										対 照
			10	20	40	80	160	320	640	1280			
I 相	生食水	I 相	++	++	++	++	++	++	++	++	±	—	—
		III 相	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—
III 相	生食水	I 相	++	++	++	++	++	++	++	++	±	±	
		III 相	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
I 相	III 相	I 相	±	±	±	±	±	±	±*	—	—	—	
		III 相	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
III 相	I 相	I 相	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	
		III 相	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

- 註: 1) I 相血清は 100°C 30 分加熱菌免疫血清。
 2) 吸収菌は各れも 100°C 1 時間加熱菌体 1200 bil.
 3) III 相血清は生菌免疫血清。
 4) * は I 相生菌で 320 倍まで凝集を示した。したがつて此の (±) の反應は S-抗原によるものと考えられる。
 5) 凝集原は各れも 100°C 1 時間加熱菌体を再浮游したもの。

常 III 相菌に対する凝集素が產生され更に凝集反應でも I 相菌を加熱すると毎常 O 凝集が現われる事から当然 I 相菌の耐熱性 O 抗原と III 相菌の抗原の固定が問題になる。第 4 表は両抗原の交叉吸収試験を行つた結果で、交叉吸収は成立する。即ち I 相菌の O 抗原と、III 相菌抗原とは同一のものである。以上凝集反應、免疫実験及び交叉吸収試験から百日咳 I 相菌の抗原構造は耐熱性 O 抗原、O-凝集を阻止する易熱性 K 抗原、及び耐熱性 K 抗原から成り立つものであることが証明された。

4. 易熱性 K 抗原の凝集素吸収能について。

易熱性 K 抗原の凝集素吸収能を加熱其他の方法で検討した結果は第 5 表に示す通りで、120°C 加熱では菌体、上清共に吸収能は完全に破壊されるが 100°C 加熱では減弱はするが残存し、50%エタノール、N-塩酸処理菌体では吸収能は殆んど破壊されずに残る。此の際 100°C 加熱の上清が強い吸収能を示すことは注目すべき点であつて、第 3 表 (其の 2) の結果と合せ考えると、K 抗原は主として表在性にあつて加熱によつて殆んど上清に移行するが、第 3 表の免疫実験にも明らかな如く菌体内にも存在すると思ふべきであらう。

5. K 抗原の生体反應における意義。

I 相菌 (東浜 22 代) と III 相菌 (小セ川 66 代) の 48 時間培養生菌の腹腔内注射によるマウス致死量, Gundel

第 5 表

易熱性 K- 抗体吸収能に及ぼす加熱の影響

	吸 收 原	吸 收 菌 量	凝 集 原	血 清 稀 釈							対 照
				800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	
	生 食 水		I 生 菌 I 加 熱 III 生 菌	++	++	++	++	++	—	—	— — —
菌	生 菌	430 bil./2	I 相 生 菌	—	—	—	—	—	—	—	
		" /4	"	—	—	—	—	—	—		
		" /8	"	+	—	—	—	—	—		
		" /16	"	++	++	—	—	—	—		
	100℃ 1 時間	430 bil./2	"	—	—	—	—	—	—	—	
		" /4	"	++	++	—	—	—	—		
		" /8	"	++	++	++	—	—	—		
		" /16	"	++	++	++	++	—	—		
	120℃ 1 時間	430 bil./2	"	++	++	++	++	++	—	—	
		" /4	"	++	++	++	++	++	—	—	
		" /6	"	++	++	++	++	++	—	—	
		" /16	"	++	++	++	++	++	—	—	
上 清	生 菌	430 bil./2	"	++	++	++	++	—	—	—	
	100℃ 加 熱	"	"	—	—	—	—	—	—	—	
	120℃ 加 熱	"	"	++	++	++	++	++	—	—	

第 6 表 I 相菌と III 相菌の生体反応

(1) 喰菌の比較

菌 白 液 血 濃 球 度 数*		I 相 菌		III 相 菌	
		全喰菌数	白血球 1 個に ついて	全喰菌数	白血球 1 個に ついて
20 bil./cc	100	77	0.77	286	2.86
10 bil./cc	"	51	0.51	218	2.18
5 bil./cc	"	8	0.08	300	3.00
平 均			0.45		2.67

*白血球は健康幼モルモットの中性多核白血球。
濃度は 1 視野約 50 個

反応及び喰菌を検討した所、第 6 表の如く I 相菌は 10bil で確実にマウスを斃し、5 bil で著明な壊死を示す。又健康モルモットの中性多核白血球による喰菌は I 相菌は III 相菌に比べて明らかに喰菌され難く、其の比は約 1:5 であった。

III 相菌では 160 bil. でもマウスを斃さず、20 bil. でも壊死を起さない。

又凍結融解 20 回 10000 r.p.m 30 分上清は第 7 表の如く I 相菌の場合は N 量 0.3 r で 72 時間後明らかに壊死

(2) 腹腔内注射法によるマウス致死量の比較

菌 相	菌 数	観 察 日 数			死/全
		1	2	3	
I 相 菌	10 bil.	●●○	●		3/3
	" /4	○○○	●○○	○○	1/3
	" /8	○○○	○○○	○○○	0/3
III 相 菌	160 bil.	○○○	○○○	○○○	0/3
	" /4	○○○	○○○	○○○	0/3
	" /8	○○○	○○○	○○○	0/3

(3) Gundel 反 應

菌 相	菌 数	72 時間後の反応
I 相 菌 (東浜 22 代)	20 bil.	⊕ (12×12 mm)
	10 bil.	⊕ (12×12 mm)
	5 bil.	⊕ (12×12 mm)
III 相 菌 (小セ川 66 代)	20 bil.	+ (5×5 mm)
	10 bil.	—
	5 bil.	—

○は壊死を示す。

第 7 表 I 相菌及び III 相菌の凍結融解上清の皮内反應と靜脈内注射法による毒性試験

(1) 皮 内 反 應

菌 相	菌 数	N mg	72 時間後の反應
I 相	4 bil.	0.0003	⊕
	2 bil.	" /2	⊕
	1 bil.	" /4	⊕
III 相	40 bil.	0.004	⊕
	20 bil.	" /2	+
	10 bil.	" /4	—

凍結融解 20 回, 10000 r.p.m. 30 分上清。

を示し、靜脈内注射では 0.4 r で確実にマウスを斃す。之に反し III 相菌の場合は其の 10 倍量で壊死を示さずマウスを斃さない。尙此の致死毒は 100°C 10 分の加熱によつて破壊される。

以上、血清学的に區別される I 相菌と III 相菌は生体反應においても著しい相違のある事が明らかになった。

考 察

百日咳ワクチンの免疫効果に関する研究は細菌学的研究によるよりもむしろ人体における野外研究によつて押し進められて来たといつても良い。即ち Madsen⁴⁾, Sauer⁵⁾, Kendrick⁶⁾, Bell⁷⁾, 及英國⁸⁾の最近の野外研究は百日咳ワクチンの予防効果について疑う余地のない研究結果を得ている。唯其の際細菌学的に如何なる性狀を有する百日咳菌株を用うべきかについては殆んど抛り所が無く、本質的には、唯新鮮分離菌を用い、防腐剤としてマーゾニンをを用いた方がいいという事が上記野外研究によつて經驗的に分つていたに過ぎない。百日咳菌の変異については、Leslie & Gardner⁹⁾の研究以来、主として凝集反應によつて、抗原分析が行われて来たが、序言に述べた如く S-R 変異と、所謂 K- 抗原の喪失変異を區別せずに行われて来た凝集反應による抗原分析では、明確な結論を得ずして今日に至つたのは蓋し当然であらう。

本研究によつて所謂 I 相菌は O-凝集を阻止する Kauffmann¹⁰⁾の所謂 K 抗原と、耐熱性の O 抗原を有することが明らかになった。此の I 相菌は、培地條件が悪いか或は継代によつて容易に移行型 (チフス菌の VW 型に相当する) に変異し、22°C に培養すると、2 代目で既に K 凝集を示さず O 凝集のみを示すようになる。此の K 抗原の中にも易熱性のものと、耐熱性のものとある事は既に春日の報告した通りであつて、春日は夫々 L, S 抗原と命名している。此の S 抗原については、余の研究はまだ不十分であるから暫らくおいて、L 抗原について考

(2) 靜脈内注射法による毒性試験

菌 相	菌 数	N mg	観 察 日 数			死/全
			1	2	3	
I 相 菌	20 bil.	0.0015	●			3/3
	10 bil.		●			3/3
	5 bil.		●	●		3/3
I 相 菌 100°C 10 分 加 熱	40 bil.	0.003	○	○	○	0/3
	20 bil.		○	○	○	0/3
	10 bil.		○	○	○	0/3
III 相 菌	50 bil.	0.005	○	○	○	0/3
	25 bil.		●	○	○	1/3
	12 bil.		○	○	○	0/3

察すれば、Kauffmann の K 抗原の Schema によれば今回の実験結果に明らかな如く、むしろ B 抗原に近いものである。しかし免疫原性においてかなりの相違点がある。少くとも、Kauffmann の所謂 L 抗原とは劃然と區別されるべきものであると考える。

K 抗原の莢膜染色による形態学的研究は、Shibley¹¹⁾春日¹²⁾其他によつて行われて居り、明らかに莢膜様構造を示すと考えられる。然し之は肺炎菌における莢膜と同意義に解すべきでなく、上記実験結果から考察するとむしろ安本¹³⁾の所謂 Vi 染色に比すべきものではないかと考えられる。その所在については勿論表在性に多くの K 抗原がある事は事実であるが本実験 (第 3 表) でも明らかな様に 100°C 2 時間加熱し生食水で洗滌した菌体で免疫しても抗体が產生されるので、K 抗原は菌体内部にも存在すると考えられる。

百日咳菌の示す毒性と此の抗原の関聯性についても、本実験で明らかになったと考える。しかし Ørskow & Kauffmann¹³⁾ も言っているように、Vi 抗原も所謂毒性を有するので、今日まで百日咳菌について言われている毒素という用語も更に慎重な検討を要すると考える。

又上述したK抗原の感染防禦における意義についてはK抗原を有する他の細菌の今日までの諸結果、並びに百日咳菌I相菌の感染防禦能に関する今日までの実験結果からも、略々結論を下し得ると考える。然しながら其後の研究によれば、分離後30代でも血清学的には完全なO-難凝集性の菌株があり、之が果して新鮮分離の難凝集性の菌株と同等の感染防禦能を有するかどうかは今後の重要な問題であらう。

尙ワクチンに加える防腐剤について、此のK抗原を指標として、抗体吸収能を見たところ、氷室6ヶ月後の成績では0.01%マーズンが最もすぐれ0.5%石炭酸、0.5%フォルマリン、生食水其儘では何れもかなり劣る事が分つた。此の点は、英國の野外研究の結果、及 Pittmann¹⁴⁾ の実験結果と一致する。

結 論

新鮮分離百日咳菌の抗原構造は耐熱性O抗原と、生菌の状態ではそのO凝集を阻止する所謂K抗原から成り立つ。

此のK抗原について凝集反應、凝集素吸収試験、及び免疫実験から研究し、併せて生体に対するK抗原の意義を検討した。その結果、今日まで所謂I相菌の具備すべき条件と言われていた諸性狀は此のK抗原に由来する事が明らかになり、然もその抗原は試験管内でも把握出来る事が明らかになった。

尙O-難凝集性という点から見ると百日咳菌株の中には比較的安定な菌株もあつて、余の実験の範囲では30代でも血清学的にはI相菌と断定されるものがあつた。之等の菌株が果たして、チフス菌におけるワクチン用菌株のように、ワクチン製造に適するかどうかは今後の重要な問題であらう。

耐熱性K抗原については更に研究中である。

稿を終るに臨み、染谷部長の御指導、御校閲に対して衷心より謝意を捧げると共に、菌株の分與をいただいた北研春日博士、並びに済生会小山博士に深甚なる謝意を表する次第である。尙本研究は文部省科学研究費(染谷四郎)の補助に負う所大きく謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 野崎英勝: 細菌学雑誌, 494, 273, 昭 12.
- 2) 山川匡男: 十全会雑誌, 45, 1, 昭 15.
- 3) 春日忠善: 文部省科学研究総会研究百日咳研究班昭和27年度研究業績.
- 4) Madsen, T.: J.A.M.A., 101, 187, 1933.
- 5) Sauer, L.: J.A.M.A., 100, 239, 1933.
- 6) Kendrick, P.L.: Am. J. Hyg., 29, 133, 1939.
- 7) Bell, J.A.: Pub. H. Rep., 56, 1535, 1941.
- 8) British Medical Research Council: Brit. M. J., 30, 1463, 1951.
- 9) Leslie and Gardner, A. D.: J. Hyg., 31, 423, 1931.
- 10) Kauffmann, F.: J. Immunol., 57, 71, 1947.
- 11) Shibley, G. S.: J. exp. Med., 60, 403, 1934.
- 12) Ando, K.: J. J. Exp. Med., 21, 161, 1951.
- 13) Ørskow, J. and Kauffmann, F.: J. Hyg., 36, 514, 1936.
- 14) Pittman, M.: J. Immunol., 69, 201, 1952.