

結核における酸性加熱沈降反応

第 1 報

国立東京療養所 (所長 砂原 茂一)

小 西 忠 正

(昭和 27 年 2 月 7 日受付)

(本報告の一部は既に医学と生物学 18 (3) : 147, 昭26 ; 18 (5) : 260, 昭26 に発表した)

I 緒 言

従来結核における血清学的諸反応を通覧するに、その大部分は結核菌或いはその成分、結核組織成分等を抗原として、血清・尿・滲出液等の中に対結核抗体を証明したものであつて、この逆すなわち既知抗体を以て未知抗原物質を証明しようとした研究は次に示す如く寥々として少ない。すなわち既に古典的な Wildholz¹⁾ の自家尿皮内反応 (Lewis, M. S.²⁾, 前田⁶⁾・西浜³⁾ 等は否定的、Imhof⁴⁾, Lanz⁵⁾, Leone⁶⁾, v. Frišoh⁷⁾ 等の自家血清皮内反応 (石川・最上⁸⁾) をはじめとし、M. Takahata⁹⁾ は対結核菌抗血清を以て泌尿器結核尿中に結核抗原を証明し (補体結合反応——以下同様)、Lehmann-Fascius u. Loeschoke¹⁰⁾, Steinert¹¹⁾, Horster¹²⁾ 等は交叉反応により結核血清中の過剰抗原を証明、F. Klopstock¹³⁾ は尿中結核抗原を炭末吸着によつて取り出し、結核患者血清との反応によつてこれを証明した。かかる尿中結核抗原の検案についてはその他 Fried, B.M.¹⁴⁾, Debré et Parf¹⁵⁾, Marmorek¹⁶⁾ Parker, M. E.¹⁷⁾, Ponzi, E.¹⁸⁾ Citron u. Klinkert¹⁹⁾, Bauer²⁰⁾, Piazza²¹⁾ 等の報告を見ることができる。尿以外の物質については、Bruck²²⁾ は急性粟粒結核患者血清及び滲出液中に、小川²³⁾, Jousset²⁴⁾, Debré et Parf¹⁵⁾ は滲出液中にそれぞれ結核菌抗原物質を証明し、Graziano, F.²⁵⁾ は結核母体の乳汁中にツベルクリン様物質を、Simone, G. de²⁶⁾ は結核小児の涙液中に結核抗原を証明した。

抑々抗原抗体反応における多糖類成分の特異性については言を新にするまでもなく周知のことであるが、黒屋²⁷⁾ は病原菌或いはその成分を含有する病材料を酸性加熱してその菌の主多糖類成分を抽出、これと免疫血清との間に沈降反応を試み、見るべき成績をあげた。すなわち発疹チフス血清を用いては優秀な早期診断成績をあげ、赤痢・腸チフス患者糞便については菌培養成績に優る陽性率と特異性を示し、更にガス壊疽の診断、菌種の鑑別にも良成績をあげた。小泉²⁸⁾ はガス壊疽菌種の鑑別に本法を追試して良結果を得、鶴浦等²⁹⁾ は本法を用いて肺炎双球菌型の鑑別に成功、肺炎患者喀痰・咽頭粘液・膿液・肋腹膜腔内滲出液・脳脊髄液においても本反応が

型特異性を示すことを報告した。本法はその趣旨興味深いものがあるが、結核におけるこの種の試みは寡聞にして未だ一つも聞かず、大平³⁰⁾ がある論文の中で、腸結核糞便に本法を応用したが対照とともにすべて陰性で、この問題は困難であると言しているにすぎない。

私は結核諸病材料中に結核特異抗原を証明するためには、高価かつ特異的な免疫血清をうるとともに、病材料より特異反応物質を抽出する操作が必要であると考え種種実験を重ねているものであるが、以下若干の成績を報告する。

II 実験方法

本法は免疫血清の調製と被検材料の酸性加熱処理との二つの部分よりなつている。

1) 免疫血清の調製

高価優秀なる結核免疫血清を得るべく、私の今までになし得た実験成績を記す。

(i) 生菌免疫血清——(a)——

牛型結核菌 R₁₄ 株 (岡・片倉培地上に約 1 月培養) 0.1mg/滅菌生理的食塩水 1cc の割に菌浮游液を作り、その 0.5cc を成熟雄性家兔 (約 3kg) 両側睾丸内に注射、約 6 ヶ月経たものの血清を採取した。(これは元来本法のための抗血清をうることを目的としたものではなく、他の実験目的の下に操作されたものであるが、たまたまよい免疫血清をうることができた。)

(ii) BCG 菌免疫血清——No. 2, 3, 4——

グリセリン寒天上に約 1 月培養の BCG 菌を用い、健常雄性家兔 (2~3kg) No.1, 2 にはその 9.0mg を、No.3, 4 には 20mg をそれぞれ滅菌生理的食塩水に浮べて静脈内に注射した。No.2 は 25 日後に (No.1 は死亡)、No.3 及び 4 は 62 日後に採血、型の如く非働化し、石炭酸を 0.5% の割に加えて貯蔵した。

(iii) 人型加熱死菌免疫血清——No.5, 6——

Sauton 培地上に約 1 月増殖せる人型結核菌 H₂ 株菌苔を多量生理的食塩水中にとり、100°C 1 時間加熱、遠心沈澱して上清液はそのまま保存、沈澱菌塊を乾燥、粉末となし、乳鉢内で、前に保存した上清液を加えつつ磨

菌, 20mg/cc の割の菌液を作り, 100°C, 30 分加熱滅菌した。本菌液を健康雄性家兎 (2~3kg) No.5 及び 6 に 20, 20, 30, 30~40mg の菌量だけ静脈内に注射, 7~10 日後に採血した。

2) 被検抗原材料の酸性加熱処理法

被検材料の酸性加熱処理については種々工夫されなければならない。私の行つた方法は後報において各被検材料について述べることにする。がその大要は被検材料を生理的食塩水(或いは蒸溜水)で抽出, 酸性 (PH. 3.0~3.2) にして加熱, 1~2 時間, 滲出した上清液を正しく中和してこれを抗原液とした。

3) 沈降反応術式

内径約 3mm, 高さ約 5cm の沈降反应用細小試験管に免疫血清を入れ, その上に抗原液を静に重層した。一普通の重層法沈降反応(緒方)一重層後室温において直後, 30分, 1~2 時間後の各時に境界面に現われる白輪を観察し, 陽性反応においては反応出現の速さにより, 卅, 卅, + と記述し, 2 時間でもなお反応の現われぬものを陰性とした。本反応では現われる白輪は鮮明かつ狭細, 光沢あるものが多く, 判定に困難を感ずることが少なかつた。随つて疑わしい反応すなわち ± はすべて陰性とした。

III 基礎実験

1) 各免疫血清の抗原価, 抗体価

Ⅱにおいて得た免疫血清 2 種 5 コの力価を測定すべく私は次の如き抗原液を作製した。すなわち Glycerin-boillon 上に約 1 月培養せる人型結核菌 H₂ 株菌苔 15mg / 中性滅菌蒸溜水 3cc の割の菌平等浮游液を作り, 100°C 2 時間加熱抽出, そのまま振盪 2 時間 (1 分 60~80 回) 更に孵卵器内に 24 時間以上放置, 用時遠心沈澱して上清を得た。本抗原液は中性, やや濁濁していた。

本結核菌抽出抗原液 (E) の 10×2ⁿ 生理的食塩水稀釈液と前記結核免疫血清 5 種—No.2, 3, 4, 5, 6—の 2ⁿ 各 1.5% アラビアゴム液稀釈液との間に型の如く重層法沈降反応を行い, 抗原価及び抗体価を測定した。その結果は次の如くなつた。

第 1 表 各種抗酸性菌エキスの反応成績 (No.5 血清)

菌		抗原価/抗体価	菌		抗原価/抗体価
病原性抗酸性菌	清 H ₁	10×2 ⁿ	性抗酸性菌	Smegma	10×2 ⁿ
	H ₂	n=11/5		Grass	n=5/1
	R ₁₄	11/5		Lepra	3/0
	(BCG)	10/5		芝 B527	(0)/(0)
	鳥 F	10/4		芝 B645	4/1
非病原	モルモット I	8/2	芝 B645	3/0	
	モルモット II	6/1	芝 B1160	4/1	
	モルモット III	4/0	Courmont	3/0	
	Sail	8/3	Wara	1/(1)	
		4/0	生理食塩水	(0)/(0)	

() 内の数字は抗原価・抗体価の実値

(抗体価)

(抗原価)

No.6.....	1:2 ⁹	1:10×2 ¹³
5.....	1:2 ⁹	1:10×2 ¹³
4.....	1:2 ⁶	1:10×2 ⁹
3.....	1:2 ⁶	1:10×2 ⁹
2.....	1:2 ⁴	1:10×2 ⁵

(a) 血清は本測定よりも遙か以前に得られ, 以前に実験に供されたものである故に, 本抗原液を以ての測定は行うことができなかった。

本成績よりすると, No.5 及び 6 血清が最も優秀な成績を示し, No.4, 3, 2 血清はこれより大分劣る。これについては今後種々の検討吟味を加えなければならないが, 最も安全かつ容易な加熱死菌免疫法によつて, 適切な条件の下ではかかる有用な免疫血清を得ることができると分つた。

2) 免疫血清の各種細菌抽出液に対する反応

1) で最も力価の高かつた No.5 血清を用い, それが各種細菌酸性加熱抽出液といかなる反応を呈するかを実験した。

用いた細菌はいずれも純培養のもので, 各菌を 1 標準白金耳宛滅菌生理的食塩水 2cc 中にとり, できるだけ均等化した後, 6% HCl で PH. 3.0~3.2 とし, 100°C 1~2 時間加熱, 遠心沈澱後, 上清を 4% NaOH で正しく中和, 更に 100°C, 10 分加熱して遠心沈澱, 清澄な上清液を得た。この上清を原液とし, 生理的食塩水で稀釈し, その各々と No.5 血清各稀釈液との間に沈降反応を行つた。

病原性抗酸性菌(清 H₁, H₂, R₁₄, 鳥 F) 4 種 4 株, 非病原性抗酸性菌(モルモット I, II, III, Sail, Smegma, Grass, Lepra, 芝 B527, 芝 B645, 芝 B1160, Courmont, Wara, BCG) 13 種 13 株 合計 17 株についての反応成績を表示すると第 1 表の如くになつた。

病原性抗酸性菌のうち牛型菌は人型菌とその反応態度を殆んど等しくし, 本反応によつては両型を鑑別することが難しいようである。しかし鳥型菌はこれら 2 型菌とかなりよく区別され得る。

上記本実験に用いた非病原性抗酸性菌は人或いは牛型菌に比し遙に低い抗原及び抗体価を示し, 両者の間には著しい差異が認められた。

その他の細菌(連鎖球菌 3 株, 葡萄球菌 2 株, 大腸菌 4 株, デフテリ菌 1 株, 肺炎双球菌 2 株, 腸チフス菌 1 株) 計 6 種 13 株について, 前記諸菌と同様にその酸性加熱抽出液 (1:10×2⁴~1:10×2⁸) と No.6 血清と

第2表 各種菌抗原による吸収試験後の反応成績

菌抽出抗原 吸収後 No.5 血清	原													
	H ₂	R ₁₄	モルモット I	モルモット III	Sail	Grass	Smegma	モルモット II	芝 B527	芝 B645	芝 B1160	Courmont	Wara	生理食塩水
H ₂ 吸収血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R ₁₄ "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
モルモット I	+10	+9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
モルモット III	+10	+8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sail	+10	+9	-	+4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grass	+11	+19	+0	+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吸収前免疫血清	+11	+10	+6	+8	+4	+3	+5	+4	+4	+3	+4	+3	+1	-
健常家兎血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表中の数字は 10×2^n の n 指数

の間に沈降反応を行つたが、その結果はすべて陰性であつた。

3) 免疫血清の吸収反応

No.5 血清につき、結核菌及び諸種抗酸性菌抗原液を以て吸収試験を行い、該免疫血清が酸性加熱沈降反応において反応する抗原物質は何か、を確かめようとした。すなわち結核菌人型 H₂ 菌、牛型 R₁₄ 菌；モルモット I 及び III, Sail 及び Grass 各抗酸性菌の酸性加熱抽出液〔2〕参照〕をそれぞれ別個に徐々に No.5 血清にこれとほぼ等量宛加え、よく混和後 37°C に 4 時間反応せしめ、1 夜氷室に放置した後遠心沈澱して上清血清を得た。これら吸収後血清につき、上記各菌抽出液及び Smegma, モルモット I 及び III, 芝 B527, 芝 B645, 芝 B1160, Courmont 及び Wara 各抗酸菌抽出液計 13 種を以て沈降反応を行つた。その結果は上表 2 の如くになつた。

すなわち本免疫血清は結核菌酸性加熱抽出液によつて吸収した後は、もはや結核菌抗原とは勿論他の種々抗酸性菌抗原とは全然反応しなくなつた。

一方モルモット I 及び III, Sail, Grass 各菌抽出液で吸収すると、吸収前はこれら各抗原と弱度ながら反応したものが既に反応しなくなつた。がなお結核菌抗原とは非常に高い力価を以て反応し、吸収前後における対結核菌抗原力価の変動は極く軽微なものであつた。これより本反応によつて証明せられるものは結核菌に由来する抗原物質であるという論拠の一を得ることができた。

IV 考察及び結論

以上酸性加熱沈降反応を以て結核諸病材料中の特異的結核菌抗原物質を検索しようとして、まず免疫血清の調製、その力価の評価、特異性の検討等について述べた。

これら諸成績につきいささか考察を試みるならば、まず免疫血清の調製について一従来免疫病理学的に或いは免疫血清学的に結核症の免疫力（感染防禦力、結核菌発育阻止力等）の附与には生菌免疫が最も優れたものとされ、死菌免疫はこれより遙に劣るものとされている。私の本実験でも結核生菌免疫血清（結核家兎血清）は一その力価は測りえなかつたが—後報する如くに優秀な酸性加熱沈降反応成績を示した。随つて本反応においても有毒生菌免疫血清は

最も有用なものの一つであるようである。しかしながら一方私は結核死菌全成分を以てかなり強力に免疫することによつて、十分に有用な抗血清をうることに成功した。これは本反応施行にとつて有利なことの一方で、危険性の大きなる、かつ機構の複雑な生菌免疫によらなくてもよいことは本反応を一般的になしうる基礎となるであろう。しかし今後更に死菌免疫の極限を究め、その極限免疫血清による本反応の限界を確定しなければならない。

本実験では BCG 生菌免疫では十分な力価を示す抗血清をうるができなかつた。更に菌そのものの検討・菌量・免疫方法、特に採血時期について吟味するつもりである。

次に本免疫血清を比較的容易にかつ恒常的に得ることができかどうか問題となる。

(a) 血清は確に偶然的な所産であるが、死菌免疫によつて十分有用な抗血清を比較的容易に得ることができこの疑問に答え得た。

次に抗原材料の酸性加熱抽出法についてみるに、抗原物質の抽出に生理的食塩水を用いても、蒸留水を用いてもその間に著しい差を認めていない。しかし草場²⁾は塩類濃度が大きになると反応はやや抑制せられる傾向があるといつているから、その恐れのある時には蒸留水を用いた。加熱する際の PH 値は 3.0~3.2 が至適の如く、これよりも中性側に傾くことが大になると類属反応が混入してくる危険性が認められる。

各免疫血清の諸種細菌抽出液に対する反応成績及びこれら各抽出液による吸収試験成績についてみるに、本免疫血清は結核菌以外のいくつかの抗酸性菌の濃厚抽出液とも反応を呈した。しかしながらこの反応度は極めて低

いから、實際上諸病材料についての本反応において、これら抗酸性菌による類属反応の出現はないか或いは極めて稀なものといえよう。次報以下の臨床実験成績はこのことを例証している。

ここに本免疫血清をこれと比較的よく反応する非病原性抗酸性菌を以て吸収した後の所謂特異的因子血清を以て、本反応を行つたならば、この疑問はより徹底的に取除かれるであろう。後に又報告するつもりである。

畢竟これら基礎実験より諸種病材料において本反応の証明するものは結核菌成分一恐らく主にその多糖類成分一であつて、その他のものではないということが裏書きされる。更にこのことは続報する臨床実験成績においても指摘されるであろう。

本実験より次のことが結論される。

1) 結核における酸性加熱沈降反応を行うべく、抗結核菌免疫血清の調製を試み、有毒結核生菌及び加熱死菌免疫によつて、有用なる免疫血清を得ることができた。

2) 本免疫血清は、人及び牛型結核菌蒸留水抽出液及び生理的食塩水酸性加熱抽出液と高度の反応を呈した。

結核菌以外の諸種抗酸性菌抽出液とも反応を呈したが、それは極めて低度のもので、結核菌抗原液とは明らかに区別された。

非抗酸性諸種細菌抽出液とは陽性反応を呈しなかつた。

3) これらのことは各種細菌抗原液による吸収試験によつて一層確められた。

4) かくの如く本反応は結核諸材料中の結核菌抗原成分を証明する一法として有用であると考察せられる。

本反応の臨床実験成績については第2報以下において述べる。

終りに臨み種々御教示御校閲下さつた当所長砂原茂一博士に衷心より敬意を捧げる。

文 献

- 1) Wildholz : Korresp. bl. Schweiz. Ärzte, 22 : 793, 1919.
- 2) Lewis, M.S. : Amer J. med. Soc. clxv : 890, 1923.
- 3) 前田・西浜 : 結核, 4 : 731, 大15.
- 4) Imhof : Schweiz med. Wschr., 50 : 1033, 1920.
- 5) Lanz : Schweiz. med. Wschr., 50 : 321, 1920.
- 6) Leone : zit, bei Witebsky E, u. R. Klingenstein "Ergeb. d. ges. Tbk-forschg. v : 123, 1933"
- 7) v. Frisch : Beitr. klin. Tbk., 58. 1924.
- 8) 石川・最上 : 結核 15(7) : 863, 昭12.
- 9) M. Takahata : Tohoku J. exper. med., 7 : 293, 1926 ; 8 : 201, 1926.
- 10) Lehmann-Fascius H. u. Loescheke, II. : Münch. med. Wschr., 69 : 871, 1924 ; 73 : 1578, 1926. Zbl.f. Imm-forschg, 51 : 196, 1927.
- 11) Steinert, R. : Beitr. klin. Tbk., 68 : 545, 1928.
- 12) Horster, H. : Klin. Wschr. : 2389, 1931.
- 13) Klopstock, F. : Klin. Wschr. : 249, 1933.
- 14) Fried, B.M. : Amer. Rev. Tbc., 9 : 112, 1924.
- 15) Debré, R. et J. Parf : Rev. méd. : 1^{er} 98, 1914.
- 16) Marmorek : "熊谷"結核の血清学的診断(吐鳳堂)より引用.
- 17) Parker, M. E. : Amer. Rev. Tbc., 23 : 733, 1931.
- 18) Ponzi, E. : Ateneo.parm., 2 (3) : 267.
- 19) Citron u. Klinkert : Berl, Klin. Wschr., 47 : 1614, 1910.
- 20) Bauer : Münch. med. Wschr., 56 : 71, 1909.
- 21) Piazza : 同(16).
- 22) Bruck : Dtsch, med. Wschr., 32 : 945, 1906.
- 23) 小川 : J. Immun., 7 : 423, 1922.
- 24) Jousset : Cpt. rend. 67 : 758, 1909.
- 25) Graziano, F. : zit. bei (6).
- 26) Simone, G, de : zit. bei (6).
- 27) 黒屋 : 日本伝染病学・誌, 18(1) : 1, 昭18.
- 28) 小泉 : 実験医学・誌, 27(2) : 127, 昭18. ; 日本伝染病学・誌, 17(9) : 660, 昭18.
- 29) 鶴浦・平賀 : 東北医学・誌 32 (1) : 1, 昭18.
- 30) 大平 : 日本臨床結核, 9 (1) : 43, 昭25.
- 31) 草場 : レブラ, 9 : 779, 昭13.

以上 (26. 12. 23)

医学博士 三輪 徳 定 著

主な肛門疾患とその臨牀

諸種の疾患と直腸肛門部疾患とは相関関係にある。本書は痔核・肛門周囲炎・痔瘻・脱肛・肛門裂創・肛門搔痒症等について多数の鮮明な挿図を加え詳述している。

A 5 判 上 製

価 280 円 千 実 費

発 行 所

株式 東西 医学 社

東京都中央区銀座西七ノ一
振替口座東京 2 8 1 8 番