

# ツベルクリン感作赤血球凝集反応の 免疫学的意義について

東京大学冲中内科

吉 田 清 一

(昭和 28 年 12 月 11 日受付)

## I 緒 言

1948 年 Middlebrook & Dubos が綿羊赤血球を結核菌の多糖類分測にて処置すると、その血球と結核罹患動物又は結核患者血清との間に特異的な血球凝集反応が起ることを報告して以来、今日迄に本反応は多数の追試を受けている<sup>1)~18)</sup>。その追試成績については著者は既に前報<sup>19)</sup>において文献的考察を試みたが、本反応が結核症において、従来種々試みられたいずれの血清反応よりもより特異的反應であるとする報告が一般に多いようである。

しかしながら本反応が結核抗体或いは結核感染による生体防禦反応と如何なる関係にあるかについては未だその報告をみない。

著者は、先に本反応を追試し、本反応が肺結核症において略々特異的反應を示すこと、及び本反応凝集価が生体防禦反応の一面を示すといわれている Slide cell culture 法による全血静菌力の消長と密接な関係を有することを認め、これを前報に報告したが、本凝集反応と結核抗体との関係を更に明らかにする為結核家兎血清につき結核菌で吸収試験を行い、その前後のツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価を測定し若干の知見を得たのでその成績をここに報告する。更に本凝集反応と  $\gamma$ -グロブリン分測との関係を検索する為 2, 3 の実験を行ったのでその結果を併せ報告する。

## II 実験材料及び実験方法

予めツベルクリン反応陰性であることを確かめた体重 2kg 前後の健康な家兎に結核菌を接種し、経過を追ってツベルクリン感作赤血球凝集反応を行い、本反応凝集価の上昇したことを確かめた血清について吸収試験を行った。

次に吸収試験後の血清につき再びツベルクリン感作赤血球凝集反応を行い、吸収試験前後の本反応凝集価の変動を比較検討した。

### 1) 実験材料

上述した家兎 5 匹に、岡・片倉培地培養 4 週目の人型結核菌フランクフルト株 5 m $\mu$  をそれぞれ静脈内接種した。その後 10 日置きに約 2 カ月間経過を追って本反応の消長を観察し、凝集価の上昇した血清をもつて実験に供した。

実験的家兎結核症におけるツベルクリン感作赤血球凝

集反応の推移に就いては著者はこれを既に報告したが、本実験における家兎結核症の本反応の推移は第 1 表に示す如くである。

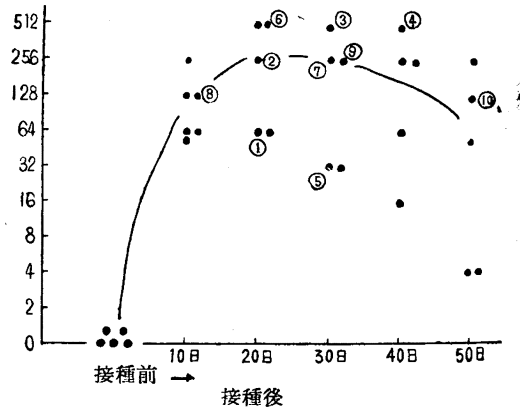
第 1 表

症 例	接種後日数	接種後日数					
		接種前	10日目	20日目	30日目	40日目	50日目
家 兎 1	0	0	1:64	1:64 ①	1:32	1:16	1:4
家 兎 2	0	0	1:64	1:256 ②	1:512 ③	1:512 ④	1:4
家 兎 3	0	0	1:256	1:64	1:32 ⑤	1:64	1:64
家 兎 4	0	0	1:128	1:512 ⑥	1:256 ⑦	1:256	1:256
家 兎 5	0	0	1:128 ⑧	1:512	1:256 ⑨	1:256	1:128 ⑩

数字は吸収試験実施の症例を示す

すなわちいずれの家兎も菌接種前本反応凝集価は 0 であるが、菌接種後凝集価の上昇を認め接種して 20~30 日後に最高に達した。その後本反応は 50 日後の実験終了時迄陽性を持続したが幾分下降する傾向を認めた。これを図示すると第 1 図の如くである。

第 1 図



数字は吸収試験実施の症例を示す

次に各例についてその凝集価の推移を検討し、更に吸収試験に使用した血清を明示した。

家兎 No. 1: 本反応凝集価は接種前は 0, 接種後 10 日目は 1:64, 20日目は 1:64, 30日目は 1:32, 40日目は 1:16, 50日目は 1:4 の値を示した。このうち接種 20 日目の血清について吸収試験を行った(症例 1)。

家兎 No. 2: 接種前凝集価は 0, 接種後 10日目は 1:64, 20日目は 1:256, 30日目は 1:512, 40日目は 1:512,

50日目は 1:4 の値を示した。このうち接種後 20日目、30日目、40日目の血清をそれぞれ実験に使用した(症例 2, 3, 4)。

家兎 No. 3: 接種前凝集価は 0, 接種後 10日目は 1:256, 20日目は 1:64, 30日目は 1:32, 40日目は 1:64, 50日目は 1:64 の値を示した。このうち接種後 30日目の血清を実験に使用した(症例 5)。

家兎 No. 4: 接種前凝集価は 0, 接種後 10日目は 1:128, 20日目は 1:512, 30日目は 1:256, 40日目は 1:256, 50日目は 1:256 の値を示した。このうち接種 20日目、30日目の血清をそれぞれ実験に使用した(症例 6, 7)。

家兎 No. 5: 接種前凝集価は 0, 接種後 10日目は 1:128, 20日目には 1:512, 30日目には 1:256, 40日目には 1:256, 50日目には 1:128 の値を示した。このうち接種 10日目, 接種 30日目, 接種 50日目の血清をそれぞれ実験に使用した(症例 8, 9, 10)。

## 2) 実験方法

上記血清を 56°C 30分間の条件で非働化した後、異種凝集素を除く為次の如き操作を加えた。すなわち可検血清の  $\frac{1}{10}$  量の非感作洗滌赤血球を加え少なくとも 20 分間は室温に放置後毎分 3000 回転で 5 分間遠心し、次に他の非感作洗滌赤血球を先程と同量加え、室温に 20 分間放置後同じように遠心沈澱する。時にはなお異種凝集素の除き得ないことがあり、その場合には更にもう一度非感作洗滌赤血球を加え放置後遠心沈澱する。次にかくの如く異種凝集素を除いた血清を 2 分し、一方に吸収試験を行い他方はそのまま放置する。操作終了後両血清にツベルクリン感作赤血球凝集反応を行い両者の凝集価を比較検討した。

吸収試験の方法: 岡・片倉培地にて培養 3 週目の人型結核菌フラックフルト株 50 mg を使用し、被検血清 1 cc による菌浮游液を作り、37°C に 5 時間保温する。その後 12 時間氷室に放置し次にそれを毎分 3000 回転にて 15 分間、10000 回転にて 5 分間遠心沈澱し、上澄について本凝集反応を行った。なお対照実験として同血清で同時に葡萄状球菌にて吸収試験を行い、その前後の血清につき本凝集反応凝集価を比較検討した。すなわち寒天培地により分離培養した後、その 50 mg を取り生理的食塩水にて 3 回洗滌する。次にそれを被検血清 2 cc の中に入れよく混和し、37°C に 5 時間保温する。その後 12 時間氷室に放置し、後毎分 3000 回転にて 15 分間、10000 回転にて 5 分間遠心沈澱し、上澄について本凝集反応を行った。

ツベルクリン感作赤血球凝集反応の術式: 著者は熊谷氏<sup>10)</sup>に倣い O 型人血球を用い、抗原には東京大学伝染病研究所製旧ツベルクリンを使用した。

まず 3.8% 枸橼酸ソーダ液で凝固を防いだ O 型人血球を磷酸緩衝液加生理的食塩水で 2 回洗滌し、その血球 0.5cc を旧ツベルクリン原液の 15 倍稀釈液 5cc に加え 2 時間 37°C の恒温槽中で感作する。この間血球の沈澱を防ぐ為 15 分毎に軽く振盪する。次にこの感作赤血球を緩衝液加生理的食塩水で 3 回洗滌する。この際遠心沈澱は 1000 回転 6 分間で回転数が多いと浴液をおこす恐れがある。その 0.1cc を 40cc の緩衝液加生理的食塩水に浮游させて 0.25% の感作赤血球浮游液を作る。なお対照に同様 0.25% の非感作赤血球浮游液を用意する。

4 倍稀釈の可検血清を出発稀釈液とし用意した 10 本のワッセルマン試験管を使い、ヴァーダル反応を行うと同様に倍数稀釈する。稀釈抗体液は 0.3cc でその各々の試験管に 0.25% 感作赤血球浮游液を 0.1cc 宛加え、良く振盪して 2 時間 37°C 恒温槽に保つ。その間 20~30 分毎に良く振盪する。恒温槽より取り出して夏季なら氷室にその他の季節なら室温に放置し翌朝判定し、陽性の最高稀釈倍数をもつて凝集価とした。

対照として可検血清 0.1cc に 0.25% 非感作赤血球浮游液 0.1cc を加えたもの、緩衝液加生理的食塩水に感作赤血球浮游液を加えたもの及び常にある程度高値を示す結核感染家兎血清に感作赤血球浮游液を加えたものを置いた。

## III 実験成績

吸収試験によるツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価の変動を示すと、第 2 表の如くである。

表にみる如く結核菌により吸収試験を行った場合には、各例とも著明な凝集価の減少を認めた。すなわち第 1 例は吸収試験前 1:64 が吸収試験後 0, 第 2 例は吸収前 1:256 が吸収後 0, 第 3 例は吸収前 1:512 が吸収後 1:4, 第 5 例は吸収前 1:32 が吸収後 0, 第 6 例は吸収前 1:512 が吸収後 1:8, 第 7 例は吸収前 1:256 が吸収後 1:8, 第 8 例は吸収前 1:128 が吸収後 1:8, 第 9 例は吸収前 1:256 が吸収後 0, 第 10 例は吸収前 1:128 が吸収後 1:16 とそれぞれ変動を示し、以上 10 例を平均すると吸収試験前 1:256 の値を示したものが、吸収試験後 1:4 と明らか

第 2 表

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
吸収前凝集価	1:64	1:256	1:512	1:512	1:32	1:512	1:256	1:128	1:256	1:128	1:256
結核菌による 吸収後凝集価	0	0	1:8	1:4	0	1:8	1:8	1:8	0	1:16	1:4
葡萄状球菌に よる吸収後凝 集価	1:64	1:128	1:512	1:256	1:32	1:512	1:128	1:128	1:256	1:64	1:128

な凝集価の減少を認めた。

これに反し同血清につき対照試験として行つた葡萄状球菌による吸収試験では、吸収試験による本反応凝集価の変動は殆んど認められなかつた。すなわち第1例は吸収試験前 1:64 が吸収後 1:64, 第2例は吸収前 1:256 が吸収後 1:128, 第3例は吸収前 1:512 が吸収後 1:512, 第4例は吸収前 1:512 が吸収後 1:256, 第5例は吸収前 1:32 が吸収後 1:32, 第6例は吸収前 1:512 が吸収後 1:512, 第7例は吸収前 1:256 が吸収後 1:128, 第8例は吸収前 1:128 が吸収後 1:128, 第9例は吸収前 1:256 が吸収後 1:256, 第10例は吸収前 1:128 が吸収後 1:64 の値で殆んど吸収試験による影響は認められない。10例を平均すると、吸収試験前は 1:256 の値を示したものが、吸収試験後は 1:128 の値で、明らかに結核菌による吸収試験の場合と異つている。

#### IV 総括並びに考按

著者は実験的結核家兎血清 10 例につき結核菌にて吸収試験を行い、その前後の血清につきツベルクリン感作赤血球凝集反応を行い両者の本反応凝集価を比較検討した。実験に供した本反応凝集価は 1:32 より 1:512 に至るものであるが、吸収試験後著明に凝集価の減少することを認めた。これに反し対照実験として行つた葡萄状球菌による吸収試験では、その前後において本反応凝集価の変動は殆んど認められなかつた。

すなわち以上の実験結果より著者は結核家兎血清において上昇せるツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価が結核菌により略々特異的に吸収せられることを認めた。

この実験結果から直ちに減少せる本凝集素が結核の抗体そのものであるとすることはできないが、結核家兎血清において証明せられた本凝集素が結核菌と密接な関係を有することは明らかである。

なお本実験において、結核菌による吸収試験後全く本凝集素の認められぬものは 10 例中 4 例、凝集素のなお認められたものは 6 例、すなわち 1:4 が 2 例、1:8 が 3 例、1:16 が 1 例である。

吸収試験後もなお証明せられたこれら凝集素は、吸収試験に使用した抗原が単一な可溶性抗原でないこと、又証明された凝集素がわずかであること等より、それが結核菌と無関係であるとするよりも寧ろ吸収の不十分によると考える方が妥当であろう。

次に著者は本反応と  $\gamma$ -グロブリン分劃との関係につき二、三の実験を行つたのでその結果をここに示そう。

一般感染症における抗体と  $\gamma$ -グロブリン分劃との関係については、既に多数の業績があり、抗体は一種の  $\gamma$ -グロブリンであることが知られている。結核症においても、その血漿(清)に  $\gamma$ -グロブリン分劃増加のみられることは多数の報告があり<sup>20)~32)</sup>、又当教室原沢<sup>33)</sup>は結核患者血清に就いて増加せる  $\gamma$ -グロブリン分劃の一部が

特異的に結核菌により吸収せられることより、結核症において増加せる  $\gamma$ -グロブリン分劃の一部が結核抗体と密接な関係を有するとした。

著者は本実験に使用した結核家兎血清 4 例につき上述した方法と全く同様に結核菌にて吸収試験を行い、その前後の血清蛋白質の各分劃の値を Tiselius の電気泳動法により測定し両者を比較検討した。電気泳動法の泳動条件については泳動研究会規定によつた<sup>32)</sup>。なお対照実験としては本実験と同様に葡萄状球菌による吸収試験を行つた。

その成績は第3表に示す如くで、結核菌による吸収試験の場合は  $\gamma$ -グロブリン分劃の一部が減少するが、葡萄状球菌による吸収試験では実験の前後において  $\gamma$ -グロブリン分劃の変動は認められず、さきに原沢が結核患者血清について認めたと同じ所見を得た。すなわち結核家兎血清の増加せる  $\gamma$ -グロブリン分劃の一部が、同様な吸収試験により略々特異的に結核菌により吸収せられることを認めた。この結果と上述した吸収試験によるツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集素の変動と併せ考える時、結核症において増加し吸収試験により減少せる  $\gamma$ -グロブリン分劃の一部と本凝集素が密接な関係を有する事が想像せられる。

第3表 吸収試験による  $\gamma$ -グロブリンの変動

#### I 結核菌による吸収試験

No.	時期	T.p. (g%)	Al (%)	$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)	$\gamma$ (%)	$\gamma$ の変動 (%)
1	I	6.0	33.9	14.1	23.9	28.1	- 7.3
	II		50.0	11.1	18.1	20.8	
2	I	7.0	43.2	13.6	16.8	26.4	- 4.6
	II		51.4	16.8	10.0	21.8	
3	I	6.2	37.6	18.8	20.8	22.8	- 2.7
	II		49.2	10.6	20.1	20.1	
4	I	6.4	39.7	16.3	22.6	21.6	- 3.3
	II		45.1	9.8	26.8	18.3	
変動の平均 (%)			+7.8	-3.8	-2.3		- 4.5

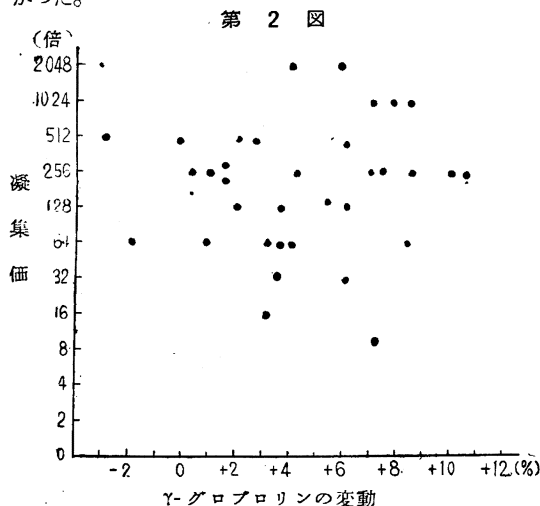
#### II 葡萄状球菌による吸収試験

No.	時期	T.p. (g%)	Al (%)	$\alpha$ (%)	$\beta$ (%)	$\gamma$ (%)	$\gamma$ の変動 (%)
1	I	6.6	46.9	13.5	19.2	20.4	- 0.4
	II		49.7	15.1	15.2	20.0	
2	I	6.0	45.6	13.8	15.6	25.0	- 0.5
	II		45.6	12.9	17.0	24.5	
3	I	7.0	45.5	13.6	17.0	23.9	- 0.3
	II		44.5	14.3	16.6	23.6	
4	I	7.0	39.4	11.6	27.6	21.4	0
	II		40.1	14.5	24.9	21.4	
変動の平均 (%)			+0.3	+1.0	-2.1		- 0.4

I: 吸収前 II: 吸収後

Witmer<sup>34)</sup>は濾紙電気泳動法により分離した結核患者血清の各分割についてそれぞれ本凝集反応を行ったところ、 $\gamma$ -グロブリン分割において凝集反応の程度が最も強くみられたことにより、本凝集素が $\gamma$ -グロブリン分割に最も多く存在するとしているが、この知見も著者の考えを裏書きしている。

更に著者等は本実験と同じ菌量を接種した結核家兎10例について本凝集反応と同時に10日置きに約2カ月間経過を追って電気泳動法によりその血清蛋白像を検索し、その $\gamma$ -グロブリン分割の値の接種前に対する変動と、本凝集反応凝集価の値とを比較検討した。その成績は第2図にみる如くで両者の間には何等の関係も認められなかつた。



以上二つの実験より著者は本凝集素は結核症において増加せる $\gamma$ -グロブリンの一部とは密接な関係を有するが、両者の値の間には何等の関係も存しないことを認めた。

Klee<sup>35)</sup>等は、結核症において増加する $\gamma$ -グロブリン分割には特異的な抗体の他に非特異的ないわゆる随伴性グロブリンのあること、しかも後者の方が多いことを主張しているが、著者等の実験結果からも結核症において増加せる $\gamma$ -グロブリン分割には抗体とは何の関係もないそのような非特異的な $\gamma$ -グロブリンの存在することが想像される。

## V 結 語

1) 実験的結核家兎血清10例につき、結核菌にて吸収試験を行い、その前後の血清につきツベルクリン感作赤血球凝集反応を行い両者の本反応凝集価を比較検討した。実験に供した本反応凝集価は1:32より1:512に至るものであるが、吸収試験後著明に凝集価の減少することを認めた。

2) 対照実験として同血清につき葡萄状球菌にて同様吸収試験を行ったが、その前後において本反応凝集価の変動は殆んど認められなかつた。

3) 以上より本凝集反応凝集素が結核菌と密接な関係を有することを結論した。

4) 次に $\gamma$ -グロブリン分割と本凝集反応凝集価との関係を明らかにする為2, 3の実験を行い、本凝集素が結核症において増加せる $\gamma$ -グロブリンの一部とは密接な関係を有するが $\gamma$ -グロブリン全体との間には何等の関係も存しないことを認めた。これは結核症において増加せる $\gamma$ -グロブリン分割の中には特異的な抗体の他に非特異的な $\gamma$ -グロブリンの存在する為と思われる。

拙筆するに当り御指導、御校閲を賜つた沖中教授、北本教授に心からの感謝を捧げると共に、種々御教示下さつた長沢博士、本間博士始め研究室先輩諸兄に深謝する。

なお当論文要旨は昭和28年4月、日本結核病学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) G. Middlebrook & D.T. Dubos: J. Exp. Med., 88; 521, 1948.
- 2) S. Rothbard et al: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 74; 72, 1950.
- 3) D.T. Smith & N.B. Scott: Am. Rev. Tbc., 62; 121, 1950.
- 4) C.H. Gerner-Rieux et al: Bull. Acad. Nat. Méd., 133; 556, 1949.
- 5) R. Sohler: Ann. Inst. Pasteur., 78; 283, 1950.
- 6) L. Popp: Klin. Wschr., 30; 773, 1952.
- 7) M. Mollov & Th. J. Kott: Am. Rev. Tbc., 65; 194, 1952.
- 8) J. Adeock et al: J. Laborat. & Clin. Med., 38; 736, 1951.
- 9) 矢道: 綜合臨床, 1: 705, 昭 27.
- 10) 熊谷: 日新医学, 38: 481, 昭 26.
- 11) D.T. Smith & N.B. Scott: J. Lab. & Clin. Med., 35; 303, 1950.
- 12) R. Sohler et al: Ann. Inst. Pasteur., 79; 347, 1950.
- 13) W. Kirby: Am. Rev. Tbc., 63; 667, 1951.
- 14) 小路: アレルギー, 1: 126, 昭 28.
- 15) S. Weidman: Klin. Wschr. 30; 651, 1952.
- 16) 土屋: 結核, 28: 80, 昭 28.
- 17) 吉田(文): 東京医事新誌, 23: 68, 昭 26.
- 18) R. Haley et al: Am. Rev. Tbc., 66; 58, 1952.
- 19) 吉田(清)・原沢: 結核, 29: 55, 昭 29.
- 20) F.B. Seibert & J.W. Nelson: Am. Rev. Tbc., 47; 66, 1943.
- 21) F. Wuhrmann & C.H. Wunderly "Die Bluteiweisskörper des Menschen" 1951.
- 22) L. Heilmeyer: Verhand. Dtsch. Ges. f. inn. Med., 55; 465, 1949.
- 23) K. Janke & W. Scholtan: Beit. Klin. Tbk., 105; 249, 1951.
- 24) H. Körver et al: Tbk-arzt., 5; 581, 1951.
- 25) B.W. Volk et al: Am. Rev. Tbc., 67; 299, 1953.
- 26) 金上: 抗酸菌病研究雑誌, 6: 507, 昭 25.
- 27) 福島他: 日本臨床結核, 6: 507, 昭 25.
- 28) 吉沢他: 生物物理化学, 1: 47, 昭 26.
- 29) 向井他: 生物物理化学, 1: 30, 昭 26.
- 30) 中岡: 結核, 25: 487, 昭 25.
- 31) 橋元: 東京医事新誌, 66: 579, 昭 26.
- 32) 土屋・原沢: 生物物理化学, 1: 161, 昭 28.
- 33) 原沢: 結核, 28: 431, 昭 28.
- 34) Witmer, R.: Schweiz. Med. Wschr., 16; 449, 1952.
- 35) Ph. Klee et al: Dtsch. Med. Wschr., 77; 525, 1951.