

抗酸性菌の抗原性に関する血清学的研究

第2報 Tween 80 加抗酸性菌抗原菌液による凝集反応

新 島 恭 樹

栃木県衛生研究所 (所長 木村貞夫)

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)
指導 大林啓二

受付 昭和34年11月2日

I 結 言

結核菌の凝集反応の研究は古くから行なわれていたにもかかわらず、技術的に菌液の調製に適当な方法が見出されなかつたことと、臨床的な応用価値が少ないとみられた等の理由によつて久しく発展をみながつた。著者は最近大林ら^{1) 2)}の Tween 80 法によつて調製された菌液が凝集反応抗原として適することを知り、結核の抗原抗体反応研究の一環として凝集反応の研究に着手したのでその成績を報告する。

II 実験方法ならびに実験成績

1. Tween 80 の濃度について

1) 実験方法

a) 抗原菌浮遊液の作製

菌液の調製には大林らの方法^{1) 2)}を本研究の目的に適合するように改めて行なつた。すなわち青山 B 株の小川培地 1 カ月培養菌試験管 1 本に 0.1 % NaN_3 を含む 6 % Tween 80 加生理的食塩水 1 ml を加え、60°C 前後の水浴中で 1 時間ときどき振盪して濃厚菌液を作り、それに 6 % Tween 80 10 ml を加え遠沈管に移し、1,000 ~ 2,000 r.p.m. で 5 分間遠沈上澄菌液を採り、6 % Tween 80 加抗原菌液とした。次に 6 % Tween 80 加菌液より 3 %, 1.5 %, 0.75 % と Tween 80 濃度別菌液を作り、光電比色計により 1 mg/ml 菌液となるようにそれぞれの Tween 80 濃度の生理的食塩水で希釈補正し、Tween 80 加 1 mg/ml 青山 B 抗原菌液を作つた。その方法は以下のようである。すなわち島津製作所製光電比色計の波長 470 ミリミクロンのところを用い、1 % Tween 80 加生理的食塩水を透過率 100 % とする場合、通常の磨砕による 1 mg/ml 菌液の透過率は 40 % であるから 1 % Tween 80 加 BCG 菌液についても 40 % の透過率のものを 1 mg/ml と決めた。

次に抗原菌液および生理的食塩水 (すなわち反応液) に雑菌による汚染防止剤として 0.5 % フォルマリン、

50,000 倍マーズニン、0.1 % NaN_3 を使用してみたところ、0.1 % NaN_3 は凝集反応に及ぼす影響がみられず、適当と思われた。以下の凝集反応のための抗原菌液および反応液には 0.1 % NaN_3 を加えた。

b) 抗血清

抗血清を得るにはウサギを用い、青山 B 株の生菌 5 mg/ml 生理的食塩水菌液 1 ml を 4 匹のウサギに 2 ~ 3 日間隔で 4 回静脈内に接種し、最終接種後 7 ~ 10 日目に全採血して、抗青山 B 血清とした。抗 BCG 血清については、BCG 生菌 10 mg/ml の生理的食塩水菌液 1 ml を 7 匹のウサギに 2 ~ 3 日間隔で 4 回静脈内に接種して、抗青山 B 血清と同様最終接種後 7 ~ 10 日目に全採血した。

抗血清は 56°C 30 分水浴中で不活化して、0.1 % NaN_3 を加え保存した。

c) 凝集反応

ウィダール反応の方法にならい、抗 BCG 血清、抗青山 B 血清を生理的食塩水で各試験管に希釈抗血清として 0.5 ml ずつ残るように、 2^n 乗希釈法により希釈した。その後 Tween 80 加抗原菌液を 0.5 ml ずつ各希釈抗血清試験管に分注し、最後の試験管は抗原対照とした。反応条件は 37°C フラン器に 21 時間放置後判定し、判定方法はウィダール反応の基準に従い (++)、(+), (+), (±), (-) とした。

2) 実験成績

Tween 80 の濃度については表 1 に示すように生菌青山 B 株の小川培地 1 カ月間培養菌に、Tween 80 を 6 %, 3 %, 1.5 %, 0.75 % に加えた 1 mg/ml の抗原菌液では、抗青山 B 血清でも抗 BCG 血清でも Tween 80 の濃度の凝集価に及ぼす影響には著明な差異は認められず、Tween 80 の最終濃度 0.5 % で十分使いうるものと考えられた。

2. Tween 80 加抗原菌液の濃度について

1) 実験方法

a) Tween 80 加磨砕菌液

BCG の小川培地 3 週間培養の湿菌量 100 mg を

表1 Tween 80 加青山 B 菌液の凝集反応

Tween 80 濃度 (%)	抗BCG血清希釈倍数 (No.11)									対照
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
3.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
0.75	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-

Tween 80 濃度 (%)	抗青山B血清希釈倍数 (No. 15)									対照
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
6.0	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
3.0	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-
1.5	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
0.75	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-

注：抗原菌…青山B
血清の希釈倍数は菌液0.5ml宛加えたのちの倍数

採り、これに10% Tween 80 1mlを加え、磨砕法により濃厚菌液を作り、次に生理的食塩水9mlを加えて、1% Tween 80 加10mg/ml菌液を作り、これを原液として Tween 80 の最終濃度が0.5%となるように1ml中1mg, 2mg, 3mg, 4mg, 5mgを含む各段階の菌液を作製した。

b) Tween 80 加加温菌液

BCGの小川培地3週培養を用い、これに既述の方法により10% Tween 80 加生理的食塩水を加え加温、振盪、遠沈等によって菌浮遊液を作り、さらに Tween 80 加生理的食塩水で希釈、終末濃度、Tween 80 は0.5% 菌は1ml中1mg, 2mg, 3mg, 4mg および5mgのものを作つた。

2) 実験成績

1% Tween 80 加磨砕菌液では表2のごとく、対照例においても凝集を認めたのに対し、1% Tween 80 加加温菌液では凝集を認めなかった。この点については次項に詳述する。なお両菌液とくに加温菌液における菌濃度は1~2mg/mlのところを適当で3~5mg/mlの菌液となると凝集の判定が困難となる。

3. Tween 80 加抗原菌液と磨砕菌液との比較

BCGのソートン培地2週間培養菌について1% Tween 80 加加温菌液と磨砕菌液とを作り、これを抗原菌として抗BCG血清について凝集反応を行なつた。その成績は表3に示すよう磨砕菌液では自然凝集が著明に認められるが、1% Tween 80 加抗原菌液では自然凝集を起こさないことが分かる。

次に抗原菌として人型菌のKH₁株, H₃₇Rv株, H₃₇Ra株, 青山B株, 牛型菌のRavenel株, 三輪株, BCG, 鳥型菌のE_{2368c}株, Maren Cecilie株,

表2 Tween 80 加抗原菌液の磨砕菌液と加温菌液の凝集反応における菌濃度

1% Tween 80 加 磨砕菌液 mg/ml	抗BCG血清希釈倍数 (No. 2)					対照
	16	32	64	128	256	
5	+++	+	++	+	±	±
4	+++	++	++	++	+	±
3	+++	+++	++	+	++	±
2	+++	+++	++	++	+	±
1	+++	+++	++	++	++	±

1% Tween 80 加 加温菌液 mg/ml	抗BCG血清希釈倍数 (No. 2)					対照
	16	32	64	128	256	
5	+++	++	-	-	-	-
4	+++	+++	+	-	-	-
3	+++	+++	+	-	-	-
2	+++	+++	+	+	+	-
1	+++	+++	+	+	+	-

注：抗原菌…BCG

表3 Tween 80 加抗原菌液と非 Tween 80 加抗原菌液との比較

抗原菌液	抗BCG血清希釈倍数 (No. 8)									対照
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
1% Tween 80 加加温	+	+++	+++	+	±	-	-	-	-	-
非 Tween 80 加磨砕	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+

注：抗原菌…BCG

9 および非病原性抗酸性菌の Phlei (有色) 株, No. 1 (白色) 株等を用い、それぞれの小川培地3週間培養菌を100°C 1時間殺菌して磨砕菌液を作り、1,000~2,000 r.p.m. で5分間遠沈、上澄を採り、光電比色計で1mg/mlとなるように生理的食塩水で補正希釈して1mg/ml死菌生理的食塩水抗原菌液を作り、健康ウサギ血清について凝集反応を行なつた。成績は表4に示すごとく各菌株間に程度の差は認められるが対照試験管と同様な凝集が認められた。

4. 抗原菌液の培養日数と凝集反応

BCGのソートン培地, 9日, 14日, 25日培養菌について、Tween 80の濃度6%より0.188%までの各段階の1mg/ml菌液を作り、抗BCG血清により凝集反応を検した。成績は表5に示すように14日培養菌の反応がもつとも鋭敏であり、培養日数により凝集価に差のあることが認められる。菌の培養日数が異なるにつれて凝集反応上の Tween 80 の至適濃度には幾分相違があるように見えるが著しい差はない。

5. Tween 80 加抗原菌液による凝集反応の判定時間

表 4 非 Tween 80 加死菌抗原菌液の健康血清における凝集反応

非 Tween 80 加抗磨碎菌液		健康血清希釈倍数									対 照
		4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
人 型	KH ₁	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	H ₃₇ Rv	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	H ₃₇ Ra	+	卅	卅	+	+	+	+	+	+	+
	青山 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
牛 型	Ravenel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	三 輪	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±
	B C G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鳥 型	Essene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maren Cecilie	卅	卅	+	+	+	+	+	+	+	+
非性性 病抗菌 原酸	Phlei (有色株)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	No.19 (白色株)	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±

表 5 培養日数を異にする Tween 80 加 BCG 菌液の凝集反応

BCG ソートン 培 養 日 数	Tween 80 濃 度 (%)	抗 BCG 血清希釈倍数 (No. 11)									対 照
		4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
9 日	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.0	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.75	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.375	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-
	0.188	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-
14 日	6.0	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-
	3.0	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
	1.5	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-	-
	0.75	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-	-	-
	0.375	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-
	0.188	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25 日	6.0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.0	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	1.5	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	0.75	+	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	0.375	+	卅	卅	卅	±	-	-	-	-	-
	0.188	+	卅	卅	±	-	-	-	-	-	-

および反応液

BCG の小川培地 20 日間培養菌に 10% Tween 80 を 1 ml 加え加温振盪して菌液を作り、その後 Tween 80 の濃度が 1% となるように生理的食塩水と磷酸緩衝液を用いて希釈し 1 mg/ml の抗原菌液とした。判定は 37°C 2, 4, 10 時間後および 5°C 24 時間後に行なった。

なお反応液の pH は 0.1% NaN₃ 加生理的食塩水 7.3, 1% Tween 80 加 NaN₃ 食塩水 6.2, 磷酸緩衝

液 7.2 であった。

成績は表 6 に示すごとく、37°C 10 時間で凝集価は最高に達し、これを 5°C 24 時間放置後に判定したところ凝集価の低下が認められた。この場合 0.1% NaN₃ 加生理的食塩水でも、0.1% NaN₃ 加磷酸緩衝液を用いても凝集価に差は認められなかった。

6. Tween 80 添加培養菌の凝集反応

青山 B 株を小川培地に培養するさいに、小川培地中の凝固水を捨て、6%, 3%, 1.5% Tween 80 加減

表6 Tween 80 加 BCG 菌液凝集反応判定時間

判定時間	抗血清	反応液	抗血清希釈倍数								対照	
			4	8	16	32	64	128	256	512		1,024
37°C 2時間	抗青山B (No. 15)	緩衝液	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
		食塩水	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
	抗BCG (No. 11)	緩衝液	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-
		食塩水	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-
37°C 4時間	抗青山B (No. 15)	緩衝液	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
		食塩水	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
	抗BCG (No. 11)	緩衝液	-	±	±	±	+	±	-	-	-	-
		食塩水	-	±	±	±	+	±	-	-	-	-
37°C 10時間	抗青山B (No. 15)	緩衝液	±	±	±	±	±	+	-	-	-	-
		食塩水	±	±	±	±	±	+	-	-	-	-
	抗BCG (No. 11)	緩衝液	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
		食塩水	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
5°C 24時間	抗青山B (No. 15)	緩衝液	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-
		食塩水	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-
	抗BCG (No. 11)	緩衝液	±	±	±	±	±	+	-	-	-	-
		食塩水	±	±	±	±	±	+	-	-	-	-

注：緩衝液……0.1% NaN₃ 加磷酸緩衝液
食塩水……0.1% NaN₃ 加生理的食塩水

表7 Tween 80 加培養菌青山 B 株の Tween 80 加抗原菌液の凝集反応

Tween 80 加培養 Tween %	抗原菌液 Tween 80 %	抗青山 B 血清希釈倍数 (No. 15)									対照
		4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
6.0	6.0	±	±	±	±	±	±	+	-	-	-
	3.0	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-
	1.5	±	±	±	±	±	±	+	-	-	-
	0.75	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
3.0	6.0	±	±	±	±	±	+	±	-	-	-
	3.0	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-
	1.5	±	±	±	±	±	+	+	±	-	-
	0.75	±	±	±	±	±	±	+	±	-	-
1.5	6.0	±	±	±	±	±	±	±	+	-	-
	3.0	±	±	±	±	±	±	+	+	-	-
	1.5	±	±	±	±	±	±	+	±	-	-
	0.75	±	±	±	±	±	±	±	+	-	-

菌蒸留水約 0.1 ml を培地表面に流し各濃度ごとに5本ずつ1ヵ月間培養後6% Tween 80 加生理的食塩水1 ml を加え、前述の方法により加温速沈して菌液を作り、6%、3%、1.5%、0.75% Tween 80 加 1mg/

ml 菌液となるようにしてこれについて凝集反応を行なった。表7には上記の菌液と抗青山 B 血清との凝集反応の成績を示したが菌接種時にあらかじめ加える Tween 80 の濃度による反応の差は認められなかった。

また抗 BCG 血清についての反応も同様な成績を示した。

7. Tween 80 添加培養菌と非 Tween 80 添加培養菌の生菌と死菌抗原菌液の比較

BCG, 青山B株, 人型分離菌株 65, および 68 について小川培地への培養時前項の方法により 10% Tween 80 加滅菌蒸留水約 0.1 ml を培地面に流し込み接種したものと Tween 80 を用いないで接種したものを, 4 週間培養して各菌株に 10% Tween 80 加生理的食塩水 1 ml を加えて加温して菌液を作り, その後 0.1% NaN₃ 加生理的食塩水 9 ml を加え遠沈上澄を採り, 1% Tween 80 加 1 mg/ml 生菌菌液と 0.1% NaN₃ 加生理的食塩水 9 ml を加えたのち 100°C 1 時間殺菌, その後遠沈上澄を採り, 1% Tween 80 加死菌菌液を作り, 抗青山 B 血清, 抗 BCG 血清について凝集反応を行なった。抗 BCG 血清についての成績は表 8 のごとく, Tween 80 添加培養菌でも非添加培養菌でも青山 B 株と BCG については生菌と死菌とがほぼ同様な凝集価を示した。これに反し分離菌 65, 68 の非 Tween 80 加培養菌液では, 生菌の凝集価が死菌のそれよりも高い。

8. 免疫経過週数と凝集価の推移

表 8 Tween 80 加および非 Tween 80 加培養菌の生菌, 死菌抗原菌液の凝集反応

Tween 加培養		抗 BCG 血清希釈倍数(No.2)									対照
抗原菌液		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
死菌	BCG	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
生菌	BCG	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-

非 Tween 加		抗 BCG 血清希釈倍数(No.2)									対照
培養抗原菌液		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
死菌	BCG	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
生菌	BCG	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-

表 9 Tween 80 加および非 Tween 80 加培養菌の生菌, 死菌抗原菌液の凝集反応

Tween 加培養		抗青山 B 血清希釈倍数(No.15)									対照
抗原菌液		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
死菌	BCG	+	+	卅	卅	-	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
生菌	BCG	+	+	卅	-	-	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-
	分離菌68	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

非 Tween 加		抗青山 B 血清希釈倍数(No.15)									対照
培養抗原菌液		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
死菌	BCG	+	+	卅	-	-	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-
	分離菌68	卅	+	+	-	-	-	-	-	-	-
生菌	BCG	卅	+	+	卅	-	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌65	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
	分離菌68	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-

BCG の小川培地 2 週培養生菌で 10 mg/ml 生理的食塩水を作り, その 1 ml を 2~3 日間隔で 5 回ウツキ静脈内に接種し, 最終接種より 2 週, 8 週, 12 週後の血清について, 1% Tween 80 加生理的食塩水 1 mg/ml BCG 抗原菌液と 1 mg/ml 青山 B 抗原菌液を用いて凝集反応を行なった。表 10 に示すごとく,

表 10 免疫経過週数と凝集価

免疫経過週数	抗 BCG 血清希釈倍数 (No. 1)									対照
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
2 週	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
8 週	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
12 週	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 抗原菌…BCG 1% Tween 加菌液

免疫経過週数	抗青山 B 血清希釈倍数 (No. 1)									対照
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	
2 週	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
8 週	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
12 週	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 抗原菌…青山 B 1% Tween 加菌液

BCG 抗原菌液では 2 週で凝集価 128 倍, 8 週で 32 倍と下降を示し, 12 週では凝集反応を示さない。また 青山 B 抗原菌液でも 12 週後になお程度の凝集が認められたほかはこれとほぼ同様の結果が得られた。

9. Tween 80 の抗原性について

1) 実験方法

これについては凝集反応および沈降反応重層法で行なった。

a) 抗血清

免疫抗原液として, 生理的食塩水による 10 mg/ml BCG 菌液, 1% Tween 80 加生理的食塩水による 10 mg/ml BCG 菌液および 1% Tween 80 加生理的食塩水を用い, ウサギ 6 匹について, 1 匹には生理的食塩水 BCG 菌液を, 2 匹には 1% Tween 80 加 BCG 菌液を, 3 匹には 1% Tween 80 加生理的食塩水を 2~3 日間隔で 5 回静脈内に 1 ml ずつ注射して, 免疫最終日より 10 日目に全採血し, 翌日血清を分離して, 56°C 30 分間不活化して 0.1% NaN₃ を加え保存した。

表 11 Tween 80 の免疫に及ぼす影響 (凝集反応)
抗原 1% Tween 80 加 BCG 死菌菌液

ウサギ No.	抗血清						
	希 釈 倍 数						
	4	8	16	32	64	128	256
2	+	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	-

注: No. 2……生理的食塩水 BCG 菌液で免疫
No. 4, 5……1% Tween 80 加菌液で免疫

b) 凝集反応

上記各抗原による免疫前の血清と免疫後の抗血清を 2ⁿ 乗希釈法により各試験管に 0.5 ml となるように希釈して, 1% Tween 80 加生理的食塩水 1 mg/ml BCG 死菌抗原菌液を 0.5 ml 宛分注 37°C 24 時間後判定した。

c) 沈降反応重層法

凝集反応の場合と同じ血清について, 2ⁿ 乗希釈法により 1% アラビヤゴム生理的食塩水で希釈した。抗原液としては BCG ツベルクリン 50 倍液と 0.75% Tween 80 加生理的食塩水を重層して, 室温に放置し, 3, 5 時間ごとに判定した。

2) 実験成績

凝集反応の成績は表 11 のごとく, BCG 菌液のみを接種した抗血清では 32 倍の凝集価を示したのに対し 1% Tween 80 BCG を接種した抗血清では, 2 例とも 128 倍と, 前者に比較して高い凝集価を示した。なお免疫前の血清はどちらの抗原とも反応していない。

次に沈降反応重層法の成績は表 12 のごとく生理的食

ウサギ No.	抗血清						
	希 釈 倍 数						
	4	8	16	32	64	128	256
49	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-

注: 1% Tween 80 で免疫

表 12 Tween 80 の免疫に及ぼす影響 (沈降反応重層法)

抗原 BCG ツベルクリン 50 倍液

抗原 0.75% Tween 80 液

ウサギ No.	抗血清						
	希 釈 倍 数						
	0	2	4	8	16	32	64
2	3	3	3	3'	2	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1'	0	0	0	0	0

ウサギ No.	抗血清						
	希 釈 倍 数						
	0	2	4	8	16	32	64
2	0	0	0	0	0	0	0
4	1	2	2	2	2	1'	0
5	2	2	2	2	2	1'	0

塩水 BCG 接種抗血清は BCG ツベルクリンに対し 32 倍の沈降価を示したのに対し 1% Tween 80 加 BCG 菌液接種抗血清はほとんど反応を示さない。また生理的食塩水 BCG 接種抗血清は, 0.75% Tween 80 抗原には全く反応を示さないのに反し, 1% Tween 80 加 BCG 接種抗血清は 32 倍の沈降価を示した。

なお免疫前の No. 2 血清では BCG ツベルクリン 50 倍液に対し 4 倍, No. 4 の血清では 0.75% Tween 80 に対し 8 倍の沈降価を示した。またウサギ 3 匹に 1% Tween 80 を注射した血清については注射前の血清

でも注射後の血清でも BCG ツベルクリン 50 倍液, 0.75% Tween 80 加抗原液の両者に対し全く沈降反応を示さなかった。

10. 健康ウサギ血清の凝集反応

健康血清 10 例について 1% Tween 80 加生理的食塩水で 1 mg/ml の菌浮遊液とした人型菌 (KH₁, H₃₇Rv, H₃₇Ra, 青山 B), 牛型菌 (Ravenel, 三輪, BCG), 鳥型菌 (E₃₈₆₈₆, Maren Cecilie), 非病原性抗酸性菌 (Phlei, No. 19), いわゆる非定型抗酸菌 (甲府, 新倉) 等の抗原菌を用いて凝集反応をみると, 血清

により差があるが、5~10 倍血清で (+) ~ (±) の凝集価であつた。したがつて以下の実験では血清は 10 倍希釈以上のものを用いた。

11. Tween 80 加抗酸性菌の交叉凝集反応

1) 実験方法

a) 抗原菌液の作製

前実験と同様抗酸性菌 13 株を用い、小川培地の 3~4 週間培養に 10% Tween 80 加生理的食塩水 1 ml を加え、既述の方法により濃厚菌液を作り、その後 0.1% NaN₃ 加生理的食塩水 9 ml を加えて、Tween 80 の濃度を 1% とし、次に 100°C 1 時間殺菌菌液を遠

沈管に移して、1,000~2,000 r.p.m. で 5 分間遠沈上澄を採り、光電比色計を用い菌液の濃度が 1 mg/ml になるように 1% Tween 80 加生理的食塩水で補正希釈して抗原菌液とした。

b) 免疫血清

前述の抗酸性菌 13 株について、ウサギを 3 匹宛用い、H₃₇Ra 株、青山 B 株は生理的食塩水生菌 5 mg/ml 菌液を、BCG、Phlei 株、No. 19 株*は生理的食塩水 10 mg/ml 菌液 1 ml を 2~3 日間隔で 3~5 回静脈内に接種した。KH₁ 株、H₃₇Rv 株、Ravenel 株、三輪株、E₃₈₆₈₆*, Maren Cecilie 株*, 甲府株**,

表 13 各抗酸性菌の交叉凝集反応

抗原菌株		人 型 菌				牛 型 菌			鳥 型 菌		非 病 原 性 菌		い ち ゃ む の 非 定 型 菌	
		KH ₁	H ₃₇ Rv	H ₃₇ Ra	青山 B	Ravenel	三輪	BCG	E ₃₈₆₈₆	Maren Cecilie	Phlei (有色株)	No. 19 (白色株)	甲府	新倉
人 型 菌	KH ₁	160	40	160	80	0	80	80	0	80	80	160	0	40
	H ₃₇ Rv	640	2,560	40	20	160	1,280	80	160	1,280	80	160	640	320
	H ₃₇ Ra	160	1,280	2,560	2,560	40	320	80	80	160	320	640	320	80
	青山 B	160	1,280	2,560	2,560	0	280	640	40	320	640	640	160	80
牛 型 菌	Ravenel	80	40	20	40	80	320	40	0	160	320	320	160	0
	三輪	0	0	0	20	20	320	80	0	40	160	160	40	0
	BCG	0	20	0	0	40	160	160	0	80	80	40	40	0
鳥 型 菌	E ₃₈₆₈₆	80	20	20	0	0	320	80	80	320	0	20	40	40
	Maren Cecilie	0	20	0	0	0	160	160	0	320	0	20	40	0
非 抗 原 性 菌	Phlei (有色株)	320	40	20	0	160	640	0	80	640	1,280	80	160	160
	No. 19 (白色株)	80	40	80	40	40	320	0	40	160	20	640	160	40
い ち ゃ む の 非 定 型 菌	甲 府	80	0	0	0	0	160	0	0	160	0	0	160	80
	新 倉	40	40	0	0	0	160	0	0	320	40	0	320	320

新倉株** については、生理的食塩水死菌 10 mg/ml 菌液 1 ml を 2~3 日間隔で 5~7 回静脈内に接種した。最終接種後 7~10 日目に全採血し、翌日血清を分離して 56°C 30 分間不活化し、0.1% NaN₃ を加え保存した。凝集反応の判定は 37°C 24 時間後に行なつた。

2) 実験成績

成績は表 13 に示すようであるがこれを概括すれば以下ようになる。まず KH₁ 株を除く人型結核菌は同種血清に対して高い凝集価を示すが、同時に他の異種血清とも類属反応を示すことが多い。人型菌中でも H₃₇Ra 株と青山 B 株との間には高度の交叉反応が認められた。

次に青山 B 株と BCG の関係については、青山 B 株は抗 BCG 血清に対して BCG よりも高い凝集価を示すが、同種血清にはさらに高い凝集価を示した。一

方 BCG は抗青山 B 血清には反応せず、同種血清には比較的低い凝集価を示している。

牛型菌は一般に抗人型菌血清とは全く反応しないか、あるいは弱い反応しか示さないが同種血清とは比較的よく反応し、同型血清ともある程度反応する。抗鳥型菌血清、抗非病原性菌血清中には牛型菌と比較的よく反応するものがみられた。

なお抗 Ravenel 血清はどの菌に対しても弱い反応を示すのみであつた。

鳥型菌は同種血清とよく反応するほか、抗牛型菌血清とも反応する。ただし抗 E₃₈₆₈₆ 血清の凝集価はこの成績では低い。

※, * 結核研究所 工藤祐是博士保存株

** 国立予防衛生研究所結核部より分与されたもの

非病原性抗酸性菌、とくに Phlei 株は同種血清とよく反応するほか、異種血清とも比較的よく反応する。

いわゆる非定型抗酸菌 2 株は同種血清とよく反応するほか、抗 Maren Cecilie 血清、抗三輪血清とある程度の反応を呈した。

III 考 察

前述のように、結核の血清反応に関する研究中でも、凝集反応の研究は近年ほとんど行なわれていない状態であるが、その理由としては、第一には術式上の難点があるが、これを均等な浮遊液とすることが困難なこと、また一たん磨砕等の方法によつて均等浮遊液としても、容易に自然凝集を起すこと等の点が問題となる。この問題を解決するためには、結核菌の蠟様物質をある程度除去するための化学的処理を行なう方法^{3)~6)}や均等培養を抗原とする方法^{7)~11)}が採られた。前者ではとくに Fornet^{3) 4)}のエーテル蒸気を作用させた脱脂結核菌浮遊液による方法が問題とされたが、これについては、Bignami¹²⁾はこの方法による反応の特異性を否定し、その他 Hoffmann¹³⁾らや Ossoinig¹⁴⁾も、その応用価値を疑っている。また後者には、長谷川⁸⁾の Convallamarin 添加培養、鴻上⁹⁾のアルカリ卵黄水添加培養等多くの報告がある。その他真志田^{15)~17)}は結核菌の X 線照射によつて得られた非抗酸性菌による凝集反応について報告している。

以上のような比較的多数の報告がありながら、その後のこの方面の研究が発展を示していないのは1つには、これらの方法が技術的にまだ十分満足すべき段階にいたっていないことと、さらには、これらの研究目的が主として結核症の臨床的な応用面に限られていたためと考えられる。多くの他の結核血清反応の場合と同じく、凝集反応においても、これが結核症の臨床的診断面への応用価値が少ないとみられたことは凝集反応そのものの研究をも停滞させる結果となつた。

しかし一方近年問題となつている BCG 陽性者と自然感染陽性者の鑑別の問題や、ミコバクテリアの分類や同定の問題は、血清学分野の研究の進展にまつところが多く、これに方法の簡単な凝集反応が導入されるならば寄与するところが少なくないものと考えられる。

著者は本研究においてまず Tween 80 法による菌液を抗原として凝集反応を行なうさいにおける反応条件を検討した。磨砕法による菌液を用いた場合には非特異性の自然凝集が多く認められるので、この方法は不適当と考えられた。また磨砕のさいに Tween 80 加食塩水を加えた菌液による凝集を Meynell¹⁸⁾が報告しているが、著者の実験では磨砕法による菌に Tween 80 を加えた場合にも反応が不明瞭になるので、適当ではないと

みられる。

なお培地中であらかじめ Tween 80 を入れておいてもとくに反応実施上の利点はみられないので Tween 80 は菌液調製時のみ使用することで十分と考えられる。

著者の方法による場合 Tween 80 濃度や菌濃度にはそれぞれ最適の点が見出された。すなわち反応系における Tween 80 濃度は 1%，菌濃度は 1~2 mg/ml が適当とみられた。判定時間は、10 時間以後が適当とみられ、実際には 37°C に 21 時間放置後に判定している。なお使用菌株の小川培地上の培養時間によつても凝集価には著しい差があり、著者の実験の範囲では BCG については 14 日培養の凝集価が 9 日、および 25 日培養の凝集価よりも高かつた。

凝集原としては生菌のほうが死菌よりも幾分凝集価が高い傾向がみられたが著しい差異はない。また本反応に関する血中抗体のウサギにおける推移については、免疫後 2 週がもつとも高く 12 週では著しい低下がみられたが、1 例の実験であるので一般的な断定はできない。

次に Tween 80 の免疫に及ぼす影響については興味ある事実がみられた。すなわちまず 1% Tween 80 液のみウサギに注射した場合には、その血清中には Tween 80 加菌液を凝集する抗体は認められない。BCG 生理的食塩水浮遊液で免疫したウサギ血清と Tween 80 加 BCG 浮遊液で免疫したウサギ血清では、後者のほうが Tween 80 加 BCG 浮遊液に対する凝集価がはるかに高い。この点をさらに追求する目的で BCG ツベルクリンおよび Tween 80 加食塩水を抗原とする沈降反応をみると、この両者は Tween 80 加食塩水で免疫したウサギ血清には反応しないが、BCG 食塩水浮遊液による免疫血清に対しては BCG ツベルクリンが、Tween 80 加 BCG 浮遊液による免疫血清に対しては Tween 80 加食塩水がそれぞれ沈降反応を示した。後者の現象については Middlebrook および Dubos¹⁹⁾も報告しているように、通常はウサギに対する抗原性をもたぬ Tween 80 が結核菌との結合によつて抗原性を現わしたものと考えられ、結核菌の Adjuvant としての作用の 1 例とみられる。おそらくは Tween 80 加菌体による免疫血清の凝集反応のさいにみられた高い凝集価も同様な理由に基づくものである。したがつて Tween 80 菌液を反応原として用いる場合には動物免疫用の菌液調製には Tween 80 を用いることはできない。なお表 12 の成績では Tween 80 加 BCG 菌液で免疫した場合のウサギ血清では、BCG ツベルクリンを反応原とすると沈降反応はかえつて抑制されるようにみられるが、この理由は不明である。

以上の成績は使用動物の数も少ないのでこれらの点については将来の研究を必要とするものと考えられる。なお皮膚反応における Tween 80 の免疫原性については最近

Magnusson ら²⁰⁾ は Tween 80 加精製 ツベルクリンによつてモルモットを感作しえなかつたと報告している。

本法による各種ミコバクテリアの菌液は健康ウサギ血清に対しては 10 倍までの凝集価を示すので反応実施には血清は 10 倍希釈以上を使用した。

次に供試 13 株のミコバクテリアについての交叉凝集反応の成績については若干の注目すべき点がみられる。まず各菌株の同種ならびに異種血清に対する反応をみると少数の例外 (Ravenel 株, E₃₈₆₈₆ 株) を除いては、すべて同種血清に対して最高の凝集価を示している。このことと免疫前の健康血清にはすべて、10 倍以下の抗体価しか示していない点よりみて、これが特異性の抗原抗体反応によるものであることは推定しうるものと思う。

次に菌株によつて被凝集性にはかなりの差異があることが注目される。また被凝集性の強い菌は類属反応の範囲も広く、反応も強い。たとえば人型菌 3 株や Phlei 株等は異種血清によつてもよく凝集する。青山 B 株は、この意味での被凝集性の強い菌に属するが、青山 B と BCG との関係を見ると、この菌は抗青山 B 血清における凝集価が抗 BCG 血清における凝集価よりも明らかに高く、これに反し BCG は抗 BCG 血清における凝集価が抗青山 B 血清における凝集価よりも明らかに高い。この意味では両菌株の間に凝集反応における特異性がみられるといえるが、一方抗 BCG 血清についてみると、これは青山 B に対する凝集価が BCG に対する凝集価よりも高い。しかし同様の傾向が沈降反応や補体結合反応でも認められていることは興味ある点と思われる。

なお KH₁ 株の成績は他の人型菌とかなり異なるが、これについてはさらに検討を要する。その他牛型菌と鳥型菌の間にも比較的よく類属反応が認められた。

IV 結 論

1) 主として人型結核菌青山 B 株および BCG を用いて、磨砕等の方法によらず、Tween 80 を菌塊に加え高温中で振盪する方法を用いて、均等浮遊液を作り、これを抗原として抗結核血清との間に凝集反応を起こすことを認めた。

2) 以上の方法による反応系における Tween 80 の濃度は 1%，菌濃度は 1~2 mg/ml が最適とみられ、また反応成立には 37°C, 10 時間以上の放置が必要とみられた。

3) 凝集原としては生菌と加熱死菌の間にはほとんど差がなく、また使用菌の小川培地上の培養期間によつて被凝集性にはかなりの差が認められた。

4) Tween 80 は単独ではウサギに対する抗原性をも

たぬが結核菌を加えることにより抗原性を発揮するようにみえる。すなわち Tween 80 加 BCG 浮遊液で免疫した血清は BCG 食塩水浮遊液で免疫した血清よりも Tween 80 加 BCG 浮遊液に対する凝集価が著しく高く、また前者は Tween 80 加食塩水とよく沈降反応を起こすが、後者は起こさないという事実が認められた。

5) 13 株のミコバクテリアについて交叉凝集反応を行ない以下の事実を認めた。

a) 少数の例外を除けば各株は同種血清に対し最高の凝集価を示す。

b) 菌株によつて被凝集性にはかなりの差異があり、同種血清に対してきわめて高い凝集価を示す菌は概して類属反応の範囲も広い。H₃₇Rv, H₃₇Ra, 青山 B および Phlei 株等は異種血清によつてもよく凝集する。

c) 青山 B 株と BCG の関係については、両者間にある程度の凝集反応上の特異性が認められるが、青山 B 株の被凝集性が強いために、抗 BCG 血清に対しても青山 B 株が BCG よりも高い凝集価を示した。

d) 牛型菌と鳥型菌の間にも比較的著明な類属反応が認められた。

稿を終るにのぞみ、御懇篤なる御指導、御校閲を賜わつた熊本大学教授河盛勇造博士、結核研究所副部長大林容二博士、日本 BCG 研究所長沢田哲治博士に深く感謝するとともに御援助、御協力を頂いた川崎二郎学兄、張仲鑣博士、御指導、御助言を頂いた国立予防衛生研究所結核部浅見望博士、栃木県衛生研究所長木村貞夫博士に感謝いたします。

なお菌株の御便宜を賜わつた結核研究所工藤祐是博士に感謝いたします。

本論文の要旨は昭和 34 年 10 月 14 日第 14 回日本細菌学会関東支部総会において報告した。

参 考 文 献

- 1) Obayashi, Y., Noguchi, T. & Takano, K. : Bull. Wld Hlth Org., 13 : 327, 1955.
- 2) Takano, K., Obayashi, Y. & Noguchi, T. : Bull. Wld Hlth Org., 17 : 295, 1957.
- 3) Fornet, W. : Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 87 : 36, 1922.
- 4) Fornet, W. : Dtsch. med. Wschr., 70 : 600, 1923.
- 5) 井上 : 結核, 4 : 449, 大15.
- 6) 飯島 : 結核, 11 : 349, 昭11.
- 7) Arloing, S. u. Courmont, P. : Zeitschr. f. Tbk., 1 : 116, 1900.
- 8) 長谷川・東風 : 東京医事新誌, 2994 : 2215, 昭11.

- 9) 鴻上：結核, 14:1240, 昭11.
- 10) 今泉・山本・小田切：結核, 14:836, 昭11.
- 11) 柴田：結核, 5:473, 昭2.
- 12) Bignami, G.: Zeitschr. f. Tbk., 41:194, 1925.
- 13) Hoffmann, u. Süssdorf: Dtsch. med. Wschr., 49:1550, 1923.
- 14) Ossoinig, K.: Beitr. z Klin. Tbk., 58:236, 1924.
- 15) 真志田：共済医報, 1(4):40, 昭27.
- 16) 真志田：共済医報, 1(5):32, 昭27.
- 17) 真志田：日本医学放射線学会雑誌, 14:41, 昭29.
- 18) Meynell, G.G.: J. Path. Bact., 67:137, 1954.
- 19) Middlebrook, G. & Dubos, R.: Immunol, 56:301, 1947.
- 20) Magnusson, M., Guld, J., Magnus, K. & Waaler, H.: Bull. Wld Hlth Org., 19:799, 1958.

— 訂 正 —

本論文第1報 (35 卷 4 号掲載) 271 頁右段上 16 および 272 頁表 1 注の Makro-Kjeldahl 法は Mikro-Kjeldahl 法と訂正いたします。