THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST "ATYPICAL ACID-FAST BACILLI" IN THE SERUM OF LEPROSY PATIENT BY THE OUCHTERLONY METHOD

Kiyo SUSHIDA & Norimasa HIRANO

Department of Bacteriology, Tokyo Women's Medical College

Sera obtained from 86 leprosy patients were tested for the presence of circulating antibody by means of the Ouchterlony method. The antigens employed were filtrate Preparations of Youman's culture media of the H37Rv strain, *M. bovis* (BCG, 263), two strains of atypical acid-fast microorganisms isolated from the sputum of tuberculous patients and saprophytic microbacterial strains (scotocromogenic acid-fast bacilli and milk strain). The results were as follows:

Fifty-four Specimens of serum from 86 leprosy patients reacted with the above antigens on agar-double diffusion test. Thirteen specimens of these 54 cases gave a positive reaction only with the antigen of H37Rv, and five specimens reacted only with the antigen of *M. bovis*. Two of the remaining 36 specimens reacted only with the antigens present in atypical acid-fast bacilli. The last 34 specimens of sera reacted with the common antigens present in H37Rv, bovine strains (BCG, 236), atypical acid-fast bacilli, milk strain and Dharmendra antigen.

Antibodies to the antigens of atypical mycobacteria were detected also in sera of tuberculous patients as indicated in the preceding paper. The positive rate of the Ouchterlony test in sera of tuberculous patients was less than that in leprosy patients. In so far as these tests show, there is significant differences between the positive cases in the Ouchterlony test obtained in lepromatous and tuberculoid leprosy. For example fifty-one of fifty-four cases of a positive Ouchterlony test were observed in lepromatous leprosy and only the remaining three cases in tuberculoid. Sex, age and process of diseases as well as associated tuberculosis do not effect the results of the Ouchterlony test. Sera taken from healthy nurses did not show any precipitation band with the exception of one case. In this case no evidence of tuberculous disease had been noted in the past.

癩患者血清中における抗酸菌，特に所謂 非定型抗酸菌抗原に対する抗体について

須子田キヨ*・平野憲正*

湯川智**・須藤昭子**

近年肺結核患者の喀痰より所謂非定型抗酸菌がしばしば検出され、内外の多くの学者によってこの問題が論ぜられている。わが教室においても本学附属病院入院中の肺結核患者から分離された非定型抗酸菌について、結核菌との比較研究を行った¹⁻⁶⁾。Parlett & Youmans⁷⁾⁸⁾は寒天内沈降反応によって、非定型抗酸菌が結核菌と共

通の抗原をもつことを報告しており、著者らも一部共通抗原のあることを報告した⁹⁾。更にわれわれは非定型抗酸菌の他、人型結核菌、牛型結核菌、その他の抗酸菌を抗原として肺結核患者血清について沈降抗体の検出を、Ouchterlony 法によって実験した⁹⁾。

以上のように非定型抗酸菌と結核菌との関連性につい

*東京女子医科大学細菌学教室 (1961年5月14日受稿)

**神山復生病院

ては、細菌学および血清学的研究の報告があるが、未だ *Mycobacterium leprae* との関係については殆んど研究されていない。いうまでもなく癩菌の培養は今日のところ不可能であるため、細菌学的方面の研究は困難である。それ故著者らは非定型抗酸菌と、*M. leprae* との関係をしらべるために、非定型抗酸菌の培養液を抗原として癩患者血清中におけるこれに対する抗体の検出を Ouchterlony 法（以下 O-test と略す）を用いて実験を行い、更に本実験成績と病型との関係、結核症の有無、その他癩症状との関係についても検討した。

実験方法

被検血清：神山復生病院入院中の癩患者86人より、約2～3 ccずつ採血し、分離した血清を56°C 30分非働性として用いた。対照として看護学院の健康生徒54人の血清を同様に非働性とした後、このものを減圧下で約10分の1だけ濃縮して用いた。

抗原：抗原として用いた菌株は、人型結核菌 H37Rv、牛型結核菌（BCG, 263）、非定型抗酸菌は大成(1)、長谷川(2)、岩井(3)、市原(5)である。これらの4株の非定型抗酸菌は肺結核患者の喀痰から分離されたもので¹⁾、毒力²⁾ および抗原性³⁾ の点から非常によく似た性質をもつ Non-chromogenic の菌である。その他の抗酸菌として同じく肺結核患者より分離された Scotochromogenic の木村株と、生牛乳から分離された Non-chromogenic の W46²²⁻²³⁾ を用いた。これらの菌株はそれぞれ人血清加 Youmans 培地に3カ月培養し、その培養液にマーズオンを1万倍となるように加えて用いた。また Dharmendra 抗原（国立癩研究所より分与されたもの）を強力音波で破壊し、これを60°C で約5分の1に濃縮したものを1部の癩患者血清と同様に、O-test によって実験した。

寒天内抗原抗体反応：Parllet & Youmans⁷⁾ あるいは Wilson¹⁰⁾ らの方法を参考として寒天平板（寒天0.8%，NaCl 0.85%，メチールオレンジ0.002%，窒化ナトリウム0.01%）を作り、中心の凹みに抗原を入れ、これより7 mmはなれた周囲の5つの凹みに、1人ずつの患者血清を入れ、室温に放置して毎日、反応帯の数および性質について観察した。

実験成績

表 I に示すように、人型結核菌 H37Rv 抗原に対しては癩患者86名全部の血清を、牛型菌中 BCG 抗原に対しては56名の血清を、263 抗原に対しては残りの30名の血

清を反応せしめ、また非定型抗酸菌抗原中、長谷川株に対しては過半数の57名の血清を、岩井株に対しては27名の血清を実験に用いた。大成株と市原株に対しては上記検査を行ってもなお余りのあった患者血清10名ずつについて実験を行った。その他非定型抗酸菌抗原のうち W46 に対しては43名の血清を、残り20名の血清は木村株抗原と反応せしめた。このようにすべての患者血清について同一株の抗原を用いなかったのは抗原の量の不足のためで特別の意味はない。

癩患者血清中、人型菌 H37Rv 抗原に対して86名中43名（50%）が陽性であって最も多数を示した。牛型菌中

Table 1. Numbers of leprous patients indicated positive on Ouchterlony test

Culture filtrate antigens	Numbers of patients	Numbers of positive cases (per cent)
<i>M. tuberculosis</i> (H32Rv)	86	43 50.0%
<i>M. bovis</i> { B C G 263	56 30	15 ¹⁶ / ₆₆ 1 18.6%
Atypical acid-fast { 2* ¹ 3* ² bacilli	57 27	15 ³³ / ₈₄ 18 39.3%
Non-path.acid-fast { 8* ³ W46* ⁴ bacilli	20 43	1 ⁸ / ₆₃ 17 12.7%
Dharmendra antigen *	44	2 4.2%

*1...2 (Hasegawa) *2...3 (Iwai) *3...8 (Kimura)

*4...W46 (milk strain)

BCG 抗原に対する陽性数は56名中15名（26.5%）、263 抗原に対しては30名中1名3.4%）であり、全患者数86名中牛型菌抗原に対して陽性であったのは16名（18.6%）であった。非定型抗酸菌中、長谷川株(2)抗原に対しては57名中15名（26.3%）、岩井株(3)抗原に対しては27名中18名（66.6%）であった。これらのうち非定型抗酸菌の1株または2株に陽性を示した患者は84名中33名（39.3%）であって、人型菌に次いで高い陽性率を示した。Scotochromogen の抗酸菌中、木村株抗原に対しては20名中1名、W46抗原では43名中7名で、非病原性抗酸菌の1株またはそれ以上に陽性のものは63名中8名（12.7%）であった。Dharmendra 抗原と陽性反応を示したものは44名中2名（4.2%）であったが、抗原の量の不足のため充分な結果が得られなかった。

癩患者86名のうち上記抗原のいずれかに O-test 陽性を示したものは54名（63.6%）であったが、このなかに

は人型菌, 牛型菌, 非定型抗酸菌のうちの一つに反応したものと, 2株以上に共通の反応を示したものとがあった。人型菌抗原に反応した43名のうち13名は人型菌のみに反応し, またBCG抗原に反応した15名中5名は牛型菌のみに反応した。非定型抗酸菌抗原と反応した33名の血清のうち非定型抗酸菌のみに反応したものは2名であった(表2)。2つ以上の菌に反応したものの中人型菌抗原と, 非定型抗酸菌抗原の両方に反応したものは19名で最も多かったが, 人型菌抗原に反応し, 牛型菌, 非定型抗酸菌あるいは生牛乳株(W46)抗原とも反応したのもあった。Dharmendra 抗原と反応したのも上記抗原と共通の反応を示した。要するに, 患者血清の過半数は2種以上の抗原と共通反応を示した(表3)。

Table 2. Serum of patients reacted with single antigen by Ouchterlony test

	Antigens			
	H37Rv	BCG	Atyp. 2	Atyp. 3
Serum of patients indicated positive Ouchterlony test	6	41	8*	75
	7	42		
	9	45		
	10	66		
	11	86(T)*		
	16			
	17			
	33			
	37			
	47*			
	48			
	59			
	12(T)*			
Total	13	5	2	

(T).....Tuberculoid type

*associated tbc.

Atyp.....atypical acid-fast bacillus

O-test 陽性者の病型は陽性者54名のうちL型が50名, T型が4名であって, 圧倒的にL型が多い。被検患者86名中, L型患者は66名であり, そのうち Ouchterlony 陽性者は50名(83.3%)であって, T型は20名中4名(20.0%)であった。

以上のように癩患者血清が結核菌抗原に対して高率に陽性反応を示したので, これらの患者に結核症の合併があるのではないかと考えたが, レントゲン所見上明らかに結核像を認め, 現在抗結核剤服用中のものは6名であ

って, そのうち4名(No. 8 L型, No. 12 T型, No. 86 T型, No. 47 L型)はO-test 陽性であったが, No. 27 T型, No. 78 L型の2名は陰性であった。しかし排菌検査では塗抹培養とともに結核菌を証明した者はなかった。このようにO-test 陽性者のうち少数のものに肺結核症が証明されたが, O-test 陰性者のうちにも明らかに結核症をもつものがあり, その他結核性疾患と断定し難いものがO-test 陽性群にも陰性群にもあって, O-test の成績と癩患者に合併した結核症との関係は明らかでない。牛型菌抗原としてはBCGと263の2株が用いられたが, このうちBCG抗原に対して陽性を示したものが多かった。近來BCG接種が普及している折柄, BCG抗原に対するO-test 成績とBCG接種の有無との関係をくらべたが, 全患者のうちBCG接種を受けたことのあるものは20名であって, このうちBCG抗原に対して, O-test 陽性成績を示したものは4名で, 残りの15名は反応を示さず, BCGと共通抗原をもつ他の抗酸菌抗原と反応した。またBCG接種を受けたことのないものにおいてもBCG抗原に対して陽性を示したものが11名もあったので, O-test 成績とBCG接種の有無とは無関係のようである。なおBCG接種の回数, あるいは接種してからの時期等の関係もないものようであった。

反応帯の数は大部分のものがI本であって, ウザギの免疫血清を用いた場合⁶⁾の複雑な反応帯とはそのおもむきを異にしていた。またこの1本の反応帯はお互に全く融合しているものが多く(図1の31—32—33, 46—50—49—48), 稀に一部分の融合を示した(図1の47—48の間)。これらは主として人型菌抗原に対する患者血清の反応帯において観察されたもので, 同一抗原抗体反応系と思われる。人型菌以外の抗原に対する反応帯はこれとはやや異り, 殊に非定型抗酸菌に対する反応帯は少なくとも3種類のものがあり, (図2のA, B, Cの反応帯), あるものはその1種のみ, あるものはそのうちの2つの反応帯を示した(図2の61はBとC, 79はAとB, 図1の73, 74はAとB)。

O-test の成績と臨床所見との関係を明らかにするために, 症状の軽重, 病期の長短, 性別, ツベルクリン反応および光田反応等の所見とを併せて考察を行ったが, 復生病院という特殊の環境における入院患者を病勢別に分けると殆んど quiescent 型に属するためか, 得るところがなかった。

対照として検査した健康者54名の血清を濃縮して上記と同様の実験を行ったが, 非定型抗酸菌市原株抗原と陽性反応を示したものが1名あっただけで, 他は人型結核菌, 牛型結核菌, 市原株以外の非定型抗酸菌および非病

Table 3. Sera of patients reacted with two or more antigens

Group	No. of patient	Antigens							Total
		H37Rv	BCG	2 6 3	Atyp. 2	Atyp. 3	W46	Dharmendra	
I	31	+			+			—	19
	32	+			+				
	40	+			+				
	49	+			+				
	50	+			+				
	51	+			+				
	52	+			+				
	53	+			+				
	61	+				+		—	
	62	+	—			+	—	—	
	63	+				+			
	69	+				+		—	
	70	+				+		—	
	71	+				+			
	72	+				+			
	73	+				+			
	77	+				+			
	79	+				+			
	80	+				+			
II	58	+	+		—		—		1
III	65	+	+			+	—		2
	76	+	+			+	—		
IV	54	+	+		+		+		4
	55	+	+		+		+		
	56	+	+		+		+		
	57	+	+		+		+		
V	20	+	—	+		+	—	+	1
VI	46	+	—		—		+		1
VII	39	+	—		+		+		1
VIII	36	+	—		+		—	+	1
IX	64	—	+			+	—		3
	67		+			+			
	74		+			+			

Group I ; Consists of 19 sera of leprous patients, which are reacted with two kinds of antigens of *M. tuberc. var hominis* and atypical acid-fast bacil.;

Group II : *M. tuberc.* and *M. bovis*;

Group III : *M. tuberc.* *M. bovis* and atypical acid-fast bacil.;

Group IV : *M. tuberc.*, *M. bovis*, atypical acid-fast bacil. and milk strain (w46);

Group V : *M. tuberc.*, *M. bovis*, atypical acid-fast bacil. and Dharmendra antigen;

Group VI : *M. tuberc.* and milk strain (w46);

Group VII : *M. tuberc.*, atypical acid-fast bacil. and milk strain (w46);

Group VIII: *M. tuberc.*, atypical acid-fast bacilli, and Dharmendra antigen;
Group IX: *M. bovis* and acid-fast bacilli.

Table 4. Results of the agar diffusion precipitation technique tested sera of leper (tuberculoid and lepromatous leprosy) with mycobacterial antigens

Antigens	Numbers of positive patients	
	Lepromatous type (L)	Tuberculoid type (T)
<i>M. tuberculosis</i>	41	2
<i>M. bovis</i>	15	1
Atypical acid-fast bacilli	32	1
Dharmendra	2	0

原性抗酸菌に対して全く反応を示さなかった。

考 案

Burrell, Rheins¹¹⁾ らは O-test を用いて肺結核患者血清中の沈降抗体の検出を行い, Parlett, Youmans¹²⁾¹³⁾ は tube methode により同様の実験を行っている。しかし非定型抗酸菌を抗原として肺結核患者および癩患者血清中の抗原抗体反応を行った報告はないようである。著者らはさきに非定型抗酸菌ばかりでなく, 人型結核菌, 牛型結核菌及び非病原抗酸菌を抗原として肺結核患者血清について O-test を行い, その結果を報告した⁹⁾。結核菌と癩菌とは共通抗原を有する事実¹⁴⁾¹⁹⁾ にもとづいて結核菌の培養液を抗原として癩患者血清中における寒天内沈降抗体の検出を実験すると同時に, 癩菌と所謂非定型抗酸菌との関係を明らかにするために本菌抗原を用いて癩患者血清について O-test を行った。その結果は上述の如く癩患者血清は人型結核菌抗原に対して最も高率に反応し, 次いで非定型抗酸菌抗原に対して反応を示すものが多く, その陽性率は肺結核患者血清の人型結核菌抗原および非定型抗酸菌抗原に対する反応よりも遙かに高率であった。阿部¹⁹⁾熊谷²⁰⁾らは人型結核菌を抗原として血球凝集反応を行い, 肺結核患者血清より癩患者血清中の抗体の検出率の高いことを報告している。本実験の結果では諸家の成績と一致した成績を得たばかりでなく, 非定型抗酸菌抗原に対して癩患者血清が肺結核患者血清のそれよりも高率に陽性反応を示したことは興味あることと思われる。本実験に用いた所謂非定型抗酸菌は肺結核患者の主として喀痰から分離されたものであるが, 癩患者から本菌の分離される可能性も多いことと思う。結核菌に対する抗体が肺結核患者より癩患者血清中により高率に証明される理由は明らかでないが, 全身状態

とか病期の長さなどがその一役を果しているのではないと思われる。しかしこの点については肺結核患者においても癩患者においても明らかな結果をうることは出来なかった。

病型別にみると, O-test 陽性者が L 型に多いということは諸家の血清学的研究においても L 型の方が T 型よりも抗体価の高いという報告と一致した^{15)~21)}。Parlett &

Fig 2. Tracing prepared from Ouchterlony plate, showing lines of precipitation between atypical acid-fast organism antigen and sera of leprosy patients

Center well contained 2 (Hasegawa) antigen;
Center well, 3 (Iwai) antigen; well 51~65, 76~80 contained serum of leprosy patient.

Fig 1. Appearance of precipitate in plates with antigen and serum of leprous patient.

Center well contained antigen, well 31~35, 46~50, 71~75 contained serum of leprous patient.

Youmans ら¹²⁾は少数の Hansens disease³⁾ について寒天内抗原抗体反応を行った結果、人型菌抗原に対して全く陰性であったと報告しているが、被検患者の病型については全く記載していない。

癩患者血清と Dharmendra 抗原との反応は抗原の量の不足のため充分の成績を得ることが出来なかったが、

更に実験を続けたいと思う。

結 論

所謂非定型抗酸菌の分類学的立場より本菌についての論議が盛んに行われている。著者らは本菌と、*M. leprae* との関係の一端を究明するために肺結核患者喀痰から分

離された所謂非定型抗酸菌のほか、人型結核菌、牛型結核菌および非病原性抗酸菌の培養液を抗原として癩患者血清中のこれに対する沈降抗体の検出を O-test によって実験し、次のような結果を得た。

癩患者86名の血清中、O-test 陽性者は54名で、このうち半数近くのものは人型結核菌抗原(13名)、牛型結核菌抗原(5名)、あるいは非定型抗酸菌抗原(2名)にそれぞれ単独に反応を示したが、残りの半数は2株以上の抗原と共通の反応を示した。単独反応および共通反応を示したものでいずれも最も陽性数の多かったのは人型結核菌抗原に対する反応であって、次いで非定型抗酸菌抗原に対して高率に陽性反応を示し、これらの陽性率は肺結核患者のそれらよりも高く、また病型別にみるといずれの抗原に対してもL型の患者の方がT型の癩患者よりも陽性者数が多かった。

O-test 陽性患者の反応帯の数は1本のものが大部分であって、互に融合し同じ抗原抗体反応系を示すものが多かった。

O-test の結果と臨床所見との間には 著明な関係はみとめられなかった。

稿を終るに臨み Dharmendra 抗原を御分与いただいた国立癩研究所阿部正英博士に感謝致します。

本論文要旨は昭和35年4月、第33回日本癩学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 長田富香：患者より分離された非定型抗酸菌について、日本細菌学雑誌，15，74，(1960)
- 2) 山田三郎：非定型抗酸菌の電子顕微鏡的研究，東京女子医科大学雑誌，29，63，(1959)
- 3) 張登川：人及び生牛乳から分離された非定型抗酸菌の研究，東京女子医科大学雑誌，30，100，(1960)
- 4) 長川静：非定型抗酸菌の Streptomycin 耐性試験について，1.生物学的性状 東京女子医科大学雑誌，30，622，(1960)
- 5) 長川静：同上，2.その病原性 同上，30，1110，(1960)
- 6) HIRANO N. and SUSHIDA K.: Serological relationship between mycobacteria as determined by agar diffusion precipitation test; Japan J. Microbiology, 4, 303, (1960)
- 7) Parlett R. & Youmans P. G.: Antigenic relationships between Mycobacteria as determined by agar diffusion precipitin techniques; Am. Rev. Tuberc., 73, 637, (1956)
- 8) Parlett R. & Youmans P. G.: Antigenic relationships between ninety-eight strains of mycobacteria using gel-diffusion precipitation techniques; Am. Rev. Tuberc., 77, 451, (1958)
- 9) 須子田キヨ，平野憲正，三神美和，小山千代，竹内富美子：肺結核患者血清中の所謂非定型抗酸菌に対する抗体について，結核，35，700，(1960)
- 10) Wilson W. M. & Pringle H. B.: Experimental studies of the agar plate precipitin test of Ouchterlony; J. Immunol., 73, 233, (1954)
- 11) Burrell G. R., Rheins M. and Birkeland M. J.: Tuberculous antibodies demonstrated by agar diffusion, Am. Rev. Tuberc., 74, 239, (1956)
- 12) Parlett C. R. Youmans P. G. Rehr C & Lester W.: The detection of antibodies in the serum of tuberculous patients by agar double-diffusion precipitation technique, Am. Rev. Tuberc., 77, 462, (1958)
- 13) Parlett C. R. & Youmans P. G.: An evaluation of the specificity and sensitivity of a gel double-diffusion test for tuberculosis, Am. Rev. Resp. Dis., 80, 153, (1959)
- 14) Levine M., Chung-Hoon K. E., Ichiriu E., Araki J. & Beatty M.: Serological response in various types and stages of Hansen's disease (Leprosy) to tuberculin-sensitized sheep red blood cells Intern. J. Leprosy, 20, 201, (1952)
- 15) Ross H. S.: The results of a modified Middlebrook-Dubos hemagglutination test in leprosy, 22, 174, (1954)
- 16) 福田実：癩患者に於ける所謂血球凝集反応について，レプラ，21，179，(1952)
- 17) 川口陽一郎：癩性結節性紅斑における感作赤血球凝集反応，レプラ，22，63，(1953)
- 18) 川口陽一郎：癩患者血清における感作赤血球凝集反応，レプラ，22，59，(1953)
- 19) 阿部正英：結核，癩，梅毒の血清学的関連性，日本の医学の1959年，——第15回日本医学会総会学術集會記録，第三卷，500，1959，
- 20) 熊谷直秀：結核と癩の血球凝集反応，並びに溶血反応，臨床病理，2，151，(1954)
- 21) 緒方富雄，原一郎，阿部正英，徳永栄一，松橋直：癩血清の新しい血清学的反応(第1)主として凝集法，

日新医学, 39, 468, (1952)

22) 佐々木論: 牛乳から分離した抗酸菌に関する研究, 第1報, 分離菌の生物学的性状について, 日本細菌

学雑誌, 13, 1091, (1958)

23) 佐々木論: 同上, 第2報, モルモットに対する態度, 日本細菌学雑誌, 14, 138, (1958)