Weil-Felix 反応起因抗原に関する研究

Studies on the Weil-Felix Reaction inducing Antigen

東京大学医学部衛生学教室 (指導 羽里教授)

小 野 村 雄

Takeshi Onomura

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Tokyo University

(Director : Prof. H. Hazato)

緒 言

Castaneda (1935) は *Proteus* OX₁₉ を用いての Weil-Felix 反応により 発疹チフス 並に 発疹熱の 診断が可能であると云うことは、*Proteus* OX₁₉ が *Rickettsia* *Pro-wazeki* 及び *Rickettsia typhi* に共通する耐熱性且つ耐アルカリ性の X 因子を有するためであると報告した。

羽里、飯田及び西岡等 (1949) は 発疹チフス及び発疹熱に高度に感受性を有するモルモットが Weil-Felix 反応を缺除することから Castaneda の所謂 X 因子がモルモットの臓器中に存在すると云う推定のもとに実験を行い、脾及び淋巴腺で免疫した家兎に *Proteus* OX₁₉ に対する抗体の上昇するのを認めた。

Tamiya et al. (1949) は Castaneda の所謂 X 因子中には人 B 型赤血球、家兎赤血球、モルモット赤血球に共通する B_{III} 型質と、Z 因子との 2 つが含まれ、前者は耐熱性の多糖類の物質で、後者は易熱性且つ易酸性の蛋白質の物質であり、しかも Weil-Felix 反応起因物質は後者の Z 物質であることを明らかにした。

著者は以上の所見から *Proteus* OX₁₉ に対する物理化学的処置が Weil-Felix 反応に如何なる影響を及ぼすかを検討し、更に *Rickettsia* *pro-wazeki*, *Rickettsia typhi* 及び *Proteus* OX₁₉ の共通抗原のモルモット臓器組織中に於ける分布を追究し、注目すべき結果をあげ得たのでここに報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用した *Rickettsia* 株

伝染病研究所第五研究室より分与せられた *Rickettsia* *pro-wazeki* は Breinl 株 (B-10) を、*Rickettsia typhi* は Wilmington 株 (W₃, W₂) を発育鶏胎卵黄嚢内に累代培養したものを使用した。

2. 使用した *Proteus* OX₁₉

同じく伝染病研究所第五研究室から分与された P-1

株を使用した。

3. 供試血清

i) 抗 *Rickettsia* 家兎免疫血清

夫々上記の株の感染卵黄嚢 1% 乳剤を 1.0 ml 宛家兎臍丸内に接種、感染 3 週間後に全採血した。

ii) 抗モルモット脾家兎免疫血清

健康モルモット脾臓の 10% 乳剤 5.0 ml 宛 5 日間隔に家兎腹腔内注射を 5 回繰返し、最終回から 7 日後に全採血した。

iii) 抗 *Proteus* OX₁₉ 家兎免疫血清

Proteus OX₁₉ (P-1) 株 18 時間葡萄糖加寒天培養菌を生理的食塩水に 0.5 mg/ml の割合に浮游したものを 0.5 ml 宛家兎静脈内に 5 日間隔 5 回注射を行い、最終回から 7 日後に全採血した。

上記採血分離した各免疫血清は 56°C 30 分間非働化し石炭酸を 0.5% の割合に加え氷室に保存使用した。各免疫血清の *Proteus* OX₁₉ に対する凝集価は第 1 表に示した。

第 1 表 各免疫家兎血清の *Proteus* OX₁₉ に対する凝集価

抗 R. p. 血清		抗 R. t. 血清		抗モルモット脾血清		抗 Pr. OX ₁₉ 血清	
家兎番号	凝集価	家兎番号	凝集価	家兎番号	凝集価	家兎番号	凝集価
13	640	16	640	5	320	8	2560
14	160	17	640	6	80	11	5120
15	160	18	640	21	160	12	5120
23	320	25	640			19	2560
24	320	26	160			20	5120

4. 凝集反応術式

0.5 ml 宛第 1 試験管 10 倍よりの免疫血清倍数稀釈列をつくり、これに *Proteus* OX₁₉ (P-1) の 18 時間葡萄糖加寒天培養菌を Mac Farland 3 号の濃度に相当するようにつくつた生理的食塩水浮游液を 0.5 ml 宛加えて振

[10]

湯混和し、孵卵器内に2時間置き時々振盪した後、24時間室温に放置してから凝集価を判定した。

5. 沈降反応術式

村田梅毒血清反応用試験管を使用し、各免疫血清に倍数稀釈した抗原を重層し、1時間後及び3時間後に沈降価を判読した。

6. 各抗原の物理化学的処置については各実験成績の項に於て述べる。

実験成績

1. Proteus OX₁₉ の凝集価に及ぼす酸及び熱処置の影響

寒天斜面18時間培養 OX₁₉ 菌を n/10 HCl 水溶液及び生理的食塩水に Mac Farland 3 号の濁濁度を示す程度に浮遊せしめたものを、夫々3等分し、40°C、60°C及び100°C に各30分間加熱したのち、酸加熱のものはこれをアルカリで中和した後、遠心沈澱し、生理的食塩水に再浮遊し、各免疫血清に対する凝集価を測定した。第2

第2表 酸及び加熱処置 Pr. OX₁₉ に対する血清凝集価

	家兎に対する番号	生OX ₁₉ の凝集価	生理的食塩水に浮遊せる OX ₁₉			n/10 HCl 溶液に浮遊せる OX ₁₉		
			40° C	60° C	100° C	40° C	60° C	100° C
抗R. p. 家兎血清	13	640	320	320	160	160	160	160
〃 R. t. 〃	16	640	320	320	320	160	80	80
〃 OX ₁₉ 〃	19	2560	2560	2560	2560	2560	1280	1280
〃 モル牌 〃	21	160	80	80	40	80	40	40

表に示す如く、Proteus OX₁₉ に対する各免疫血清の凝集価は、Proteus OX₁₉ の単なる加熱処置によつてもその温度の上昇するに従い、また酸性加熱の場合にはより強く下降するを認めた。

2. Proteus OX₁₉ ホルマリン処置の凝集価に及ぼす影響

Proteus OX₁₉ を生理的食塩水に浮遊せしめ、これにホルマリンを0.5%、1.0%及び2.0%の割に加え、室温に30分放置した後、これら処置菌液に対する各免疫血清の凝集価を検した。この場合に於ても第3表に示す如く Proteus OX₁₉ 免疫血清は別として各血清の凝集価は菌液に加えるホルマリンの濃度が高いほどより強く低下するをみた。

3. Proteus OX₁₉ 凍結融解上清の沈降価に及ぼす酸アルカリ及び熱処置の影響

なす型培養基18時間培養15斜面の Proteus OX₁₉ を蒸留水 7.0ml に浮遊せしめ、凍結融解を20回繰返し行い、

第3表 ホルマリン処置 Pr. OX₁₉ に対する血清凝集価

OX ₁₉ 菌浮液 抗血清(No.)	生理的食塩水	ホルマリン加生理的食塩水		
		0.5 %	1.0 %	2.0 %
抗 R. p. 血清	13	1: 640	1: 20	1: 20
	14	1: 160	1: 40	1: 20
〃 R. t. 〃	16	1: 640	1: 80	1: 80
	18	1: 640	1: 80	1: 80
〃 モル牌 〃	5	1: 320	1: 40	1: 40
	6	1: 80	1: 20	1: 20
〃 OX ₁₉ 〃	11	1: 5120	1: 5120	1: 5120
	12	1: 5120	1: 5120	1: 2560

NaCl 0.85% になるように10% 食塩水を加え、これを5,000回転30分間遠心して上清を採り、これを7等分し、3管はそのままとし、2管にはn-HClを、残りの2管にはn-NaOHを夫々 $\frac{1}{10}$ の割になるように加え、各群の1管宛、夫々40°C 30分間及び60°C 30分間加熱し、酸及びアルカリを加えたものはこれを中和する。かくして出来たものを原液とし、倍数稀釈により各免疫血清に対する沈降価を測定した。この場合に於ても第4表に

第4表 酸、アルカリ及び熱処置 Pr. OX₁₉ 凍結融解上清の沈降価

抗原 (OX ₁₉ 菌凍結融解上清)	加熱	免疫血清			
		R. p.	R. t.	モル牌	OX ₁₉
	40°C	1: 8	1: 8	1: 8	1: 512
	60°C	1: 8	1: 4	1: 8	1: 256
n/10 HCl を加える	40°C	1: 2	1: 2	1: 2	1: 128
	60°C	1: 2	1: 2	1: 1	1: 128
n/10 NaOH を加える	40°C	1: 1	1: 1	1: 1	1: 128
	60°C	1: 1	1: 1	1: 1	1: 128
OX ₁₉ に対する凝集価		1: 640	1: 640	1: 160	1: 2560

示す如く Proteus OX₁₉ 凍結融解上清の沈降価は加熱の温度の上昇するに従い、また酸及びアルカリ処置により、より高度の沈降価の低下を示した。

4. Rickettsia prowazeki 可溶性抗原の沈降価に及ぼす熱、酸及びホルマリン処置の影響

Rickettsia prowazeki 感染卵黄囊を磷酸緩衝液で10% 乳剤とし、これを分液漏斗内で2倍量のエーテルを加え

振盪後、氷室内に1夜放置し、下層透明液を分離し、これを更に遠心して上清と沈渣とに分離した。この下層透明液とその上清及び沈渣を夫々倍数稀釈して各免疫血清と沈降反応を行つた。その成績は第5表に示す如くであ

第5表 加熱、酸及びホルマリン処置 R.p. 可溶性抗原の沈降価

抗原処置	免疫血清				正常家兎血清
	R. p.	R. t.	OX ₁₉	モル脾	
100°C 加熱上清	1:4	1:2	1:1	1:0	1:0
酸性加熱(黒屋法)上清	1:4	1:2	1:1	1:0	1:0
上 無処置	1:16	1:8	1:2	1:1	1:0
60°C 15分加熱	1:4	1:4	1:1	1:1	1:0
100°C 5分加熱	1:4	1:2	1:0	1:0	1:0
清 ホルマリン(1.0%)	1:4	1:2	1:1	1:0	1:0
沈 凍結融解上清	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0

つた。即ち上清の *Rickettsia typhi*, *Proteus OX₁₉* 及びモル脾免疫血清に対する沈降原価は 100°C 5分加熱により最も著しく減弱し、1%ホルマリン加による影響はその次に位し、60°C 15分加熱によつても軽度ながら減弱するのを認めた。

5. 酸、アルカリ及び熱処置のモルモット脾凍結融解上清の沈降価に及ぼす影響

モルモットの脾臓から蒸留水で10%の乳剤を作り、凍結融解を10回繰返した後、10%食塩水を加えて NaCl 0.85%になるようにし、5,000回転30分間遠心して上清を採り、これを3等分し、夫々生理的食塩水、n-HCl 及び n-NaOH を 1/10 量宛加え、更にこれを夫々 40°C 及

第6表 酸、アルカリ及び熱処置モルモット脾凍結融解上清の沈降価

抗原(モル脾凍結融解上清)	免疫血清(家兎番号)				
	加熱	R. p. (13)	R. t. (18)	OX ₁₉ (11)	モル脾 (5)
		1:8	1:8	1:8	1:32
	40°C	1:4	1:4	1:2	1:16
	60°C	1:2	1:2	1:1	1:8
n/10 HCl を加える	40°C	1:1	1:1	1:2	1:8
	60°C	1:1	1:1	1:1	1:4
n/10 NaOH を加える	40°C	1:1	1:1	1:2	1:8
	60°C	1:1	1:1	1:1	1:4
OX ₁₉ に対する凝集価		1:160	1:160	1:2560	1:160

び 60°C に30分間加熱したものの各血清に対する沈降価を測定した。この場合に於ても第6表に示す如く脾凍結融解上清の沈降価は加熱により、また酸並にアルカリ処置加熱によりより高度の沈降価の減退する傾向を示した。

6. 凝集反応に於ける加熱処置 *Proteus OX₁₉* による吸収試験

葡萄糖加寒天培地より得た *Proteus OX₁₉* 約600エーゼを35ml に浮遊し、これを 8.5ml 宛4本のスピッツグラスに入れ、3本を夫々 100°C、60°C 及び 40°C に30分間加熱、時々振盪する。この4本を各々 2.0ml 宛4分し、更にこれを各々2等分して2列とする。それを遠心分離し、上清を除き、第1列に5倍稀釈の各免疫血清を 3.0ml 宛入れ、十分混合し、37°C 孵卵器内に1時間放置後遠心分離した上清、即ち第1回吸収各抗血清 1.5ml について OX₁₉ 生菌で凝集反応を行つた。

残りの第1回吸収血清 1.5ml を各々第2列加熱処置菌によつて同様に第2回の吸収を行い、OX₁₉ 生菌に対する凝集価を検した。

第7表 加熱処置 Pr. OX₁₉ による吸収試験

		免疫血清				正常家兎血清
		R. p.	R. t.	モル脾	OX ₁₉	
吸 収 前		1:160	1:640	1:160	1:163840	1:0
第 I 回	100°C 加熱菌・吸収	1:160	1:640	1:160	1:20480	1:0
	60°C //	1:160	1:640	1:80	1:10240	1:0
	40°C //	1:40	1:80	1:40	1:10240	1:0
	非加熱菌・吸収	1:40	1:80	1:40	1:5120	1:0
第 II 回	100°C 加熱菌・吸収	1:20	1:20	1:80	1:2560	
	60°C //	1:20	1:20	1:40	1:1280	
	40°C //	1:0	1:0	1:20	1:640	
	非加熱菌・吸収	1:0	1:0	1:0	1:320	

第7表に示す如く各血清の *Proteus OX₁₉* に対する凝集価の減退は吸収菌液の生のものを使用した場合に最も強く、加熱温度の高まるに従つて次第に弱まる成績を得た。

7. モルモット臓器乳剤凍結融解上清の沈降価に及ぼす熱処置の影響

正常モルモットの淋巴腺、肝臓、脾臓及び肺臓の10%乳剤を作り、凍結融解を20回行い、5,000回転20分間遠心沈澱した後上清をとり、これらを 40°C、60°C 及び 100°C 30分間加熱し、これを原液として倍数稀釈により各免疫血清と沈降反応を行つた。この場合の成績も第8

第 8 表 加熱処置正常モルモット臓器乳剤凍結融解上清の沈降価

抗 原	加 熱	免 疫 血 清 (家兎番号)			
		R. p. (15)	R. t. (18)	OX ₁₉ (19)	モル脾 (21)
淋 巴 腺		1 : 8	1 : 2	1 : 1	1 : 32
	40°C	1 : 4	1 : 2	1 : 1	1 : 16
	60°C	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 8
	100°C				
肺 臓		1 : 8	1 : 4	1 : 4	1 : 64
	40°C	1 : 4	1 : 2	1 : 2	1 : 64
	60°C	1 : 2	1 : 2	1 : 1	1 : 16
	100°C	1 : 1	1 : 0	1 : 0	1 : 4
脾 臓		1 : 8	1 : 4	1 : 8	1 : 32
	40°C	1 : 4	1 : 4	1 : 2	1 : 16
	60°C	1 : 2	1 : 2	1 : 1	1 : 8
	100°C	1 : 1	1 : 1	1 : 0	1 : 2
肝 臓		1 : 2	1 : 1	1 : 2	1 : 8
	40°C	1 : 1	1 : 0	1 : 0	1 : 4
	60°C	1 : 0	1 : 0	1 : 0	1 : 4
	100°C	1 : 0	1 : 0	1 : 0	

表に示す如く加熱温度が高まるに従つて各血清に対する各臓器の沈降価は低下する傾向を示した。この成績で注目すべきは各臓器が何れも各血清に対して陽性反応を示したことである。

8. モルモット臓器乳剤凍結融解上清の沈降反応

上に同じく正常モルモット臓器即ち淋巴腺, 肺臓, 脾臓及び肝臓の10%乳剤の凍結融解を20回行う。5,000回転20分間遠心沈澱せしめた上清をとり, 各免疫血清及び正常家兎血清に対して沈降反応を行つた。

成績は第9表に示す如くであつて, 正常家兎血清に対

第 9 表 モルモット臓器乳剤凍結融解上清の沈降価

抗血清	R. p.	R. t.	OX ₁₉	モル脾	正常血清
淋巴腺	1 : 64	1 : 32	1 : 64	1 : 32	1 : 32
肺 臓	1 : 32	1 : 32	1 : 16	1 : 128	1 : 16
脾 臓	1 : 8	1 : 16	1 : 4	1 : 32	1 : 2
肝 臓	1 : 4	1 : 8	1 : 8	1 : 32	1 : 1

しても高低の差はあるが各臓器が陽性成績を示したのである。

9. モルモット各臓器乳剤のアルカリ処置後酸添加により得た沈澱物の沈降反応

Tamiya et al. (1949) が *Proteus* OX₁₉ から Z 物質を分離したと同方法に従い, モルモットの淋巴腺, 脾, 肺及び肝臓から蒸留水で夫々10%乳剤を作り, 凍結融解を20回繰返した後遠心して上清を得, これを n/10 NaOH で pH 9.2 とし, 55°C に15時間加熱し, 冷却後 pH 4.8 になるように n/10 HCl を加え, 生じた沈澱物を遠心沈澱しその沈澱を稀アルカリ液に溶解した後中和し, 蒸留水を加えて原量としたものの各血清に対する沈降価を測定した。

第10表 モルモット臓器乳剤のアルカリ処置後酸添加により得た沈澱物の沈降価

	家兎 番号	アルカリ並に酸処 置による沈澱物				OX ₁₉ 菌 に対する 凝集価
		淋巴 腺	脾臓	肺臓	肝臓	
抗 R. p. 家兎血清	24	1 : 11	21 : 0	1 : 0	1 : 320	
// R. t. //	17	1 : 21	21 : 0	1 : 0	1 : 320	
// OX ₁₉ //	20	1 : 21	81 : 0	1 : 0	1 : 5120	
// モル脾 //	5+21	1 : 21	81 : 0	1 : 0	1 : 160	
正常家兎血清	25	1 : 41	21 : 0	1 : 0	1 : 0	

成績は第10表に示す如く上記の処置により肝臓及び肺臓の抗原性はなくなるが淋巴腺及び脾臓は各血清に対し陽性を示した。ところがこれらの抗原は正常血清に対しても陽性を示したことは無視出来ないが沈降価からみて脾に *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia typhi* 及び *Proteus* OX₁₉ の共通抗原が局在するのではないかと考えられる。

総 括 及 び 考 按

田宮, 羽里 及び その共同研究者等の研究により, *Proteus* OX₁₉ の *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia typhi* に共通する抗原中には, 血液型 B_{III} 特異物質と Weil-Felix 反応起因物質 Z 因子の2つが含まれ, 前者は耐熱性の多糖類的物質であり, 後者は易熱性且つ易酸性の蛋白質的物質であることが明らかにされた。

著者は *Proteus* OX₁₉ を加熱, 酸及びホルマリン処置することにより, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia typhi* 及びモルモット脾の各免疫家兎血清の *Proteus* OX₁₉ に対する凝集力の変動及び *Proteus* OX₁₉ の凍結融解上清, *Rickettsia* 可溶性抗原及びモルモット脾の凍結融解上清の酸, アルカリ, ホルマリン及び熱処置により上記各免疫血清に対する沈降価の変動を検査し次の如き成績を得た。

1. *Proteus* OX₁₉ に対する *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia typhi* 及びモルモット脾の各免疫家兎血清の

凝集価は、*Proteus* OX₁₉ を 40°C、60°C 及び 100°C に加熱処置する場合には、加熱温度の上昇に従つて漸減する。

2. *Proteus* OX₁₉ 菌液を n/10 の割に HCl を加え、上記の場合と同様に加熱処置を加えるときは、上記各共通抗原免疫血清の凝集価は酸を加えない場合よりもより強く減退する。

3. *Proteus* OX₁₉ 菌液にホルマリンを 0.5%、1.0% 及び 2.0% の割に加え、室温に30分間放置するときは、これに対する各共通抗原免疫血清の凝集価はホルマリン量の増加するに従つて加熱の場合よりも著しく漸減する。

4. *Proteus* OX₁₉ 凍結融解上清の各共通抗原免疫血清に対する沈降価は 60°C 加熱によつて半減するが、本上清に n/10 HCl 及び n/10 NaOH を加え加熱するときは、40°C 加熱によつてもその沈降価はより強く減退する。

5. *Rickettsia prowazeki* 可溶性抗原の各共通抗原免疫血清に対する沈降価は、単なる処置、黒屋法による酸性加熱及び 1.0% ホルマリン加により半減乃至 1/4 に減弱する。

6. モルモット脾凍結融解上清の酸、アルカリ及び熱処置により各共通抗原免疫血清に対する沈降価は減弱する。

7. *Proteus* OX₁₉ に対する各共通抗原免疫血清の凝集価は、血清を非加熱菌で吸収した場合よりも 40°C、60°C 及び 100°C 加熱菌で吸収するときは、加熱温度の上昇するに従つて凝集価の減退がより少くなる。

以上の成績から Weil-Felix 反応に關与する *Proteus* OX₁₉、*Rickettsia prowazeki* 及び *Rickettsia typhi* の共通抗原の大部分は熱、酸及びアルカリに対して不安定であり、且つホルマリン処置によつてもその抗原価の減退を來すことを認める。従つて Weil-Felix 反応の実施に於ては、生の無処置抗原を使用することが合理的である。

なお吸収試験の結果、本共通抗原は易熱性の部分と耐熱性の部分の2つから成ることが推定される。

次に Z 因子のモルモット臓器内に於ける分布を知る目的をもつて各臓器の凍結融解上清の各共通抗原免疫血清に対する沈降価を検査したがその結果は正常家兎血清に対しても同程度の沈降価を示した。そこで各臓器の凍結融解上清を、Z 因子を比較的純粹に分離する Tamiya et al. の方法によつて処置したものの沈降反応により、その沈降価の高さからみて Z 因子は脾に局在するが如き結果を得た。

結 論

著者は *Proteus* OX₁₉、*Rickettsia prowazeki* 及び *Rickettsia typhi* の共通抗原 Z 因子に対する物理化学的影響を調べ、その成績を記載した。その結果より Weil-Felix 反応に使用する抗原は加熱またはホルマリン処置を施すことなく抗原価の高い OX₁₉ 生菌浮遊液を使用すべきであることを認めた。

Weil-Felix 反応を欠除するモルモットの臓器に於ける Z 因子の分布は脾に局在するが如き結果を得た。

撰筆に当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師羽里教授に謹んで満腔の謝意を表す。

本論文の要旨は第23回日本衛生学会に於て誌上発表した⁸⁾。

文 献

- 1) Tamiya, Hazato et al. : Japan. J. Exp. Med., 20 (1949), 135-143
- 2) Tamiya, Hazato et al. : Japan. J. Exp. Med., 20 (1949), 1-23
- 3) White, P. B. : Brit. J. Exp. Path., 14 (1933) 145-148
- 4) Castaneda, M. R. : J. Exp. Med., 60 (1934) 119-125, 62 (1935) 289-296
- 5) Castaneda, M. R. & Zia, S. H. : J. Exp. Med., 58 (1933) 55-62
- 6) 飯田 : 日本細菌学雑誌, 8 (1953) (1), (3) 及び (4)
- 7) 羽里, 飯田, 西岡 : 日本細菌学雑誌, 8 (1953) (2)
- 8) 小野村 : 日本衛生学雑誌, 8-1 (1953) 62

(受付: 1954年6月1日)