真菌皮内反応抗原 (Coccidioidin および Histoplasmin) の迅速製造法について

青 木 良 雄

東京大学医科学研究所

Stanley Marcus

Department of Microbiology, University of Utah College of Medicine

緒 言

アメリカ大陸に地方病として存在する histoplasmosis⁸ および coccidioidomycosis は真菌症のうちでも最も感染力の強い疾患である。

両疾患とも1940年頃までは全身感染を起した症例のみが知られ、まれではあるが必ず死亡する疾患であると考えられていた。ミシシッピ流域では肺に石灰化巣を有するものでしかもツベルクリン反応陰性者の多いことが知られていたが、Christie¹⁾は1943年この現象に注目し、肺に石灰化巣を有する181人に histoplasmin の皮内反応を行い、ツ反応よりも本反応の方が高い陽性率を示すことを報告した。1945年 Palmer²⁾はこの結果にもとづき全国的に histoplasmin 皮内反応を行い、地域別で住民の皮内反応陽性率が非常にことなること、およびツ反応陰性者の石灰化巣と本反応との間に密接な関係のあることを明らかにした。

これらの研究により本疾患は不顕性感染が多く、濃厚浸淫地では成人の80%までもが皮内反応陽性であり、*Histoplasma* に感染しているか、または過去に感染したことが明らかになった。

カリホルニアには以前から San Joquin or Valley Fever と呼ばれていた原因不明の疾患があつたが coccidioidin 反応により、この疾患は coccidioidomycosis の軽症型にはかならないことが判明し、さらにその地理的分布も明らかになった³⁾。

このように皮内反応はこれら疾患の診断および疫学的研究に必須の手段である。

coccidioidomycosis の皮内反応抗原³⁾として、初期には菌体そのもの、菌のエマルジョン等が、ついで培養濾

液が用いられていたが、これらは培養法も不定で抗原の性状および力価も一定ではなかつた。

Smith ら⁴⁾⁵⁾はこの点について検討し、ツベルクリン製造に用いられていた合成培地を modify し coccidioidin の製造に利用した。

さらに Emmons ら⁶⁾および Howell ら⁷⁾はこの培地が histoplasmin の製造にも用い得ることを明らかにした。現在アメリカでは、この培地が真菌抗原の製造に広く用いられている。抗原の製造基準としては histoplasmin についてのみ Division of Biologics Standards, NIH の minimum requirements⁸⁾があるが、それによると培養期間は6カ月を越えないこととなつている。Coccidioidin およびその他の抗原については特に基準がなく、coccidioidin では一般に6~10週間培養されている。

このように真菌皮内反応抗原の製造には長期間を要し、実用的でなかつた。

我々はこの点につき、比較的短期間に抗原を得る方法および力価検定の方法について検討を行った。

実験材料および方法

1. 菌株

Coccidioides immitis, Silveira 株、および *Histoplasma capsulatum*, G 17M 株。

2. 培地

真菌皮内反応抗原を製造するため、培地を検討していた際、我国でツベルクリン産生に常用されている Sauton 培地にグルコースを加えると *Coccidioides immitis* は非常によく発育することを認めた。そこでまず培地に加えるグルコース量について検討するとともにグリセリンの量についても検討した。

Yoshio AOKI and Stanley MARCUS: Rapid Production of Mycotic Sensitins (Coccidioidin and Histoplasmin). From the Institute of Medical Science, University of Tokyo and Department of Microbiology, University of Utah College of Medicine

Sauton 変法培地：アスパラギン4.0 g, クエン酸 2.0 g, リン酸2カリウム 0.5 g, 硫酸 マグネシウム 0.5 g, クエン酸鉄アンモン0.05 gを 900ml の蒸溜水に溶解し，基礎培地とする．グリセリンは0，2および5%の割合に加え，pH 7.2に修正し，高圧滅菌した．グルコースは別に高圧滅菌したものを所要濃度に加え培地全量を1 lにする．

Histoplasma capsulatum は37°Cではこの培地に発育不能であるが，yeast extract を加えると良く発育する．このため37°Cの培養には yeast extract の透析外液を用いた．

yeast extract 透析外液 (DYE): Yeast extract (Difco) をセロファンチューブに入れ，少量の蒸溜水に対し氷室で1～2日透析する．透析外液を別の容器に保存し，さらに新しい蒸溜水に対し透析をする．この操作を5回反復し，外液を集め，Seitz 濾過して無菌とした．無菌外液の1 ml を乾燥し，重量を秤り，濃度を測定する．その濃度に応じて適量を培地に加えた．

3. 培養法

予備実験では 300ml の Erlenmeyer flask に培地100 ml を入れ，大量培養では直径30cm の low form flask に培地1 l を入れたものを用い，菌を接種し振盪培養を行った．

培養温度は主として 37°C を用いたが室温でも培養した．

振盪数は1分間約60往復，振幅は6 cmである．一定期間培養後，培養中の flask から液を無菌的にとり，Seitz 濾過し適当に稀釈し，皮内反応活性を調べた．培養終了後ホルマリンを 0.2%の割合に加えて殺菌し，Seitz 濾過により無菌とした．

4. 皮内反応活性の測定

培養濾液の皮内反応活性は，それぞれの菌の感染モットで測定した．*C. immitis* では分節胞子 100コ，*H. capsulatum* では yeast phase の菌 $10^5 \sim 10^6$ 個を動物の腹腔内に接種し，2～3週後に対応する標準液（1：100稀釈）の皮内注射で24時間後10mm前後の発赤を示す動物を使用した．

予備実験では3～4匹の動物の側腹部皮内に適当に稀釈した被検液 0.1ml を注射し，反対側の対応する部位には標準液の 0.1ml を注射した（左右差）．24時間後に発赤を計測し，標準液の示す平均値で被検液のそれを割り ratio (R) として表わした．

実験成績

1. *Coccidioidin* の産生

1. グリセリンおよびグルコース量と抗原産生との関係

グリセリン濃度は0，2および5%を用い，それらにグルコース量1，2および5%濃度のものを組合わせた培地を作った (Table 1)．これらに一定量の菌を接種して，37°Cで振盪培養した．15日後に菌の発育を肉眼的に観察したのち，濾液を分離し（さらに Seitz 濾過後）1：100に稀釈し皮内反応活性を調べた．

Table 1. Production of Coccidioidin in Modified Sauton Media

Carbohyd. Source in Medium		Growth	Skin Test Activity * mm
Glycerin %	Glucose %		
0	0	—	0
0	1	+	8.0
0	2	++	9.0
0	5	+++	10.0
2	1	+	8.2
2	2	++	9.2
2	5	+++	11.0
5	1	++	10.7
5	2	+++	9.0
5	5	+++	10.3
Asparagine M.		+	6.5
Coccidioidin 64D ₃ 1:100			7.2

* 15 days old culture filtrate. All samples were diluted 1:100.

グルコースは菌の発育に影響大で，1%よりも2%の方がよく，5%ではさらに良かった．グリセリンはグルコースほど発育に影響せず，グリセリンがなくてもグルコースがあれば発育する．しかしグルコース量一定で，グリセリンの菌発育におよぼす影響をみるとグリセリンを含有する方が良好であつた．

濾液の皮内反応力価は菌の発育とほぼ比例している．この実験において，アスパラギン培地による抗原産生をも比較したが，Sauton 変法培地の方がはるかに菌の発育が良好であり，培養濾液の力価も強かつた．

2. グリセリン2%および5%含有培地における抗原力価の比較

さきの実験でグルコースを5%含有し，グリセリンは2%および5%をそれぞれ含有する培地では，肉眼的にみて，グリセリン5%含有培地の方が僅かではあるが良好な発育を示した．しかし皮内反応の結果では逆に5%

含有培地の濾液が発赤平均値 10.3mm, 2% のものでは 11.0mm であつた。これを確かめるため大量の培地を用い、グルコースは 5% とし、グリセリン 2% および 5% 含有培地の抗原力価を比較した。

3 週後に濾液をとり 1 : 100 に稀釈し, 3 匹のモルモットを用い左右差で活性をみた。

その結果, 2% グリセリン培地からの濾液よりも 5% グリセリン培地からの濾液の方が僅かではあるが ($R = 11.0/10.1$) 力価の強い *coccidioidin* が得られた。この結果から以後の実験ではグリセリン 5% を用いた。

3. 培養期間と *coccidioidin* 産生

菌を接種した培地 1 l 入りの 6 本の瓶から, 培養後 2 週および 3 週間目に, 培養液 10ml ずつを無菌的にとり Seitz 濾過し, 1 : 100, 1 : 150 および 1 : 200 に稀し, 標準液 1 : 100 と力価を比較した (Table 2)。2 週間培養では被検液の 1 : 100 稀釈が標準液に対し, ratio 0.93 であつたが, 3 週間培養では被検液 1 : 100 は $R = 1.11$, 1 : 150 は $R = 1.02$ であつた。

次にこの培養法で製造した 4 lots の抗原力価を調べたが, いずれも培養 2 週間で濾液の力価は標準液とほぼ同

等になり, 3 週間培養すれば常に標準液より強い力価のものが得られた (Table 3)。

II. *Histoplasmin* の製造

Histoplasmin の場合も *coccidioidin* と同様, 一般にアスパラギン培地が用いられ, 室温静置培養で製造されているが, この条件では長期間培養する必要がある。Table 5 に示した成績では 2 lots (UH 10, UH 12) が 13 週培養で標準液より高い力価を示したが, 他のもの即ち UH 11 では 4 週で ratio 0.64, UH 13 は 23 週でも $R = 0.76$ であり, UH 14 は 20 週で 0.79 であつて標準の力価に達していなかつた。この点を改良するため, Sauton 変法培地を用い検討を加えた。

1. *Histoplasmin* の力価におよぼす DYE の影響

H. capsulatum は室温では Sauton 変法培地に発育するが, 37°C では発育しない。しかしこの培地に yeast extract の透析外液を加えると, *H. capsulatum* は 37°C (yeast phase) でも非常に良く発育する。まず DYE の量と抗原産生との関係を検討した。Table 4 のような培地を作り, yeast phase の菌を接種し, 37°C で 3 週間振盪培養後, 濾液を (Seitz 濾過で分離) 1 : 100 に稀釈して力価を比較した。

グリセリン 5%, グルコース 5% 含有培地 (B) の場合, DYE 濃度 0.12, 0.3 および 0.6% の 3 段階における比較では, 発赤の平均値をみると, それぞれ 3.1, 6.3 および 8.1mm であつて, DYE の多い方が力価が強かつた。グリセリン 2% 含有培地 (A) でも同様の傾向が認められた。

DYE を同量含有する A および B 培地を比較すると, DYE 0.6% では差がなかつたが, 濃度を 0.3, 0.12% に下げると, B 培地即ちグリセリンおよびグルコースを多く含む培地の方が強い力価のものが得られた。

Table 2 Skin Test Activity of 2 Weeks and 3 Weeks-old Culture Filtrates of *Coccidioides immitis*

Dilution	Culture Filtrate			
	2 Weeks-old		3 Weeks-old	
	Mean Diameter mm	Ratio	Mean Diameter mm	Ratio
1 : 100 St.	7.2 7.7	0.93	10.0 9.0	1.11
1 : 150 St.	6.5 8.0	0.81	8.7 8.5	1.02
1 : 200 St.	6.6 7.7	0.85	7.7 8.2	0.93

St. 1 : 100

Table 3 Skin Test Activity of *Coccidioidins*

Lot	Medium	Volume (l)	Cultural Conditions			Potency (Ratio)
			Temp.	Static or Shaking	Period (Wks)	
UC 3	Asparagine	6	RT	Static	12	4.5
UC 4	Modified Sauton		37°C	Shaking	2 3	0.93 1.11
UC 5	〃	1	37°C	Shaking	3	1.10
UC 6	〃	12	37°C	Shaking	3	1.07
UC 7	〃	6	37°C	Shaking	3	1.20

RT: Room Temperature

Table 4 Production of Histoplasmin in Modified Sauton Media Containing Different Amounts of Nutrients

	Components in Media			Growth OD (650m μ)	Skin Test * mm
	Glycerin %	Glucose %	D Y E %		
A	2	2	0.12	0.30	2.6
			0.30	0.93	3.1
			0.60	1.35	8.0
B	5	5	0.12	0.22	3.1
			0.30	1.07	6.3
			0.60	1.12	8.1
	Histoplasmin (NIH) 1 : 100				10.1

*3 weeks-old-culture. All samples were diluted 1 : 100

2. 培地および培養方法の相違と抗原産生

上記の実験で、D Y Eは *H. capsulatum* の yeast phase の培養および抗原産生に有効であることが判り、また3週でかなりの力価の histoplasmin が得られたので培養方法の相違と histoplasmin 産生とを比較した。これらの結果は Table 5 に集計した。Sauton 変法培地 (D Y Eなし) を用い、室温で静置培養した場合 UH21-1 は菌の発育が遅く、30週でも標準液の力価に達しなかつた。

しかしこの培地条件で振盪培養すると (UH15) 発育良好となり、11週で R=1.11 のものが得られた。

一方、室温の静置培養でも D Y E を 0.5% の割に加えると (UH16) 7週で標準以上の力価のものが得られた。またこの培地を用い室温で振盪培養すると4週で標準以上の力価に達した。すなわち、D Y E を加えることにより、菌は発育良好となり短期間に高力価の抗原が得られる。37°C で yeast phase の菌を培養した場合、濾液の力価が標準に達するには約9週を要し、室温で mycelial phase の菌を培養するより長期間を要した。

考 察

さきにも述べたように histoplasmin の製造基準に関しては Division of Biologics Standards, NIH の minimum requirements⁸⁾ があるが coccidioidin については基準がなく、Smith ら⁴⁾⁵⁾ によつて製造されたものが標準に用いられている。この抗原はアスパラギン培地に菌を1~2カ月培養し (温度については記載がない)、数株の菌からの lot を混合したものである。

Histoplasmin の minimum requirements では培地に対する規制はなく、菌を室温 (22°C~30°C) で培養し、期間は6カ月を越えないこと、3カ月以内が適当とされ

Table 5 Skin Test Activity of Histoplasmins

Lot	Medium		Volume (l)	Cultural Conditions			Potency (Ratio)
				Temp.	Static or Shaking	Period (weeks)	
UH10	Asparagine		12	R T	Static	13	1.45
UH11	"		12	R T	Static	14	0.64
UH12	"		12	R T	Static	13	1.05
UH13	"		11	R T	Static	13 23	0.67 0.76
UH14	"		11	R T	Static	20	0.79
UH21-1	Modified Sauton		2	R T	Static	30	0.90
UH15	"		4	R T	Shaking	4 6 11	0.76 0.71 1.11
UH16	"	0.5% D Y E	1	R T	Static	7 10	1.04 1.17
UH17	"	0.5% D Y E	2	37°C	Shaking	4	0.80
UH18	"	0.5% D Y E	2	37°C	Shaking	4 9	0.76 1.05
UH19	"	0.5% D Y E	1	37°C	Shaking	4	1.04
UH20	"	0.5% D Y E	1	R T	Shaking	4	1.09
UH21-2	"	0.25% D Y E	1	R T	Shaking	4	1.11
UH22	"	0.1% D Y E	6	R T	Shaking	7.5	1.00

RT: Room temperature.

ている。

アスパラギン培地を用いた我々の実験では、5 lots のうち2 lots は13週で標準に達したが、他の3 lots は20～23週でも標準液の力価に達しなかつた。このような長期間の培養は実用的な製造法とは考えられず、出来るかぎり短期間に製造出来る方法を検討した。

その結果 Sauton 変法培地を用い振盪培養を行うと、coccidioidin では3週以内に標準液より力価の強い抗原を得ることが出来た。

HistoplasminでもSauton 変法培地(DYEなし)で振盪培養することにより、11週で高力価のものが得られた。

真菌は一般に発育が遅く、菌の培養には振盪培養が常用されているが、*C. immitis* や *H. capsulatum* は感染力が強く、mycelial phase の振盪培養は危険性もあり常用されていない。しかし、振幅と振盪数を加減し、孢子を飛散させないように注意すれば特に危険はない。

Ajello ら⁹⁾は *C. immitis* を振盪培養し、CF 抗原を短期間に得る方法を報告しているが、この抗原は皮内反応活性をもたなかつたと述べている。Pappagianis ら¹⁰⁾も振盪培養で *C. immitis* を培養し、3日培養の young mycelium の autolysate から CF 抗原を得ている。このものは皮内反応活性をもっている。しかし皮内反応抗原の製造に振盪培養を用い標準化した報告は見当らない。

上記の実験で振盪培養により、coccidioidin では1～2カ月の培養期間を3週以内に短縮するのに成功した。

Histoplasmin の場合は3～6カ月を11週に短縮出来たが、更にこの培地にDYEを加えると、菌は非常に良く発育し、室温での振盪培養により、4週間で確実に標準液より力価の強いものが得られた。

また yeast phase の場合はややおくれるが、4～9週で等力価のものが得られた。

Yeast phase の菌は室温では mycelial phase に変り、37℃での培養が必要であるが、単純な合成培地には発育せず、血液または栄養の高い成分を要求する。

Histoplasma の yeast phase 用の合成培地は Salvin¹¹⁾により報告されたように、ビオチンとシステインとを添加することが必須であるとされているが、発育はさほど良好でなく、抗原の製造には実用的でない。

Markowitz¹²⁾は Salvin の培地でビオチンの代りに yeast extract を用い、*H. capsulatum* の yeast phase の菌を37℃で20日間振盪培養し、濾液から免疫学的活性多糖体を精製しているが、培養期間と濾液の皮内反応力価については触れていない。

このように yeast extract を培地に加えると菌の発育は非常に良好となり抗原の短期間の産生に有用であるが、その中には約10%の非透析性物質を含んでおり濾液からの抗原精製に際し、菌由来以外の培地成分 (yeast extract) が混入する恐れがある。この点を除くために外液を用いた。すなわちDYEはすべて透析性の物質である所から、抗原の精製に際し、培地成分を考慮する必要がなく非常に有用な方法と考えられる。

さらにこの培地は yeast phase の菌体を集めるのにも役立つ。

本実験で得られた結果は *C. immitis* および *H. capsulatum* それぞれ1株ずつについてのものであり、数株の菌についての比較検討も必要であるが、大差のない結果が得られると考えている。この点に関し、Smith³⁾は数株の *C. immitis* を用いて製造した coccidioidin で lot 間に認むべき差異のなかつたことを述べている。

力価の検定法としては標準液1:100稀釈を中心にした対数稀釈液1:50, 1:100および1:200稀釈液を作り、被検液は予備実験で求められた標準液とほぼ等力価の稀釈倍数を中心として同様に1/2および2倍濃度のものを作る。

6匹の感作モルモットを用い、この6検体を Latin square 法により、一匹の動物の左右側腹部3カ所ずつの皮内に注射した。24時間後に反応の大きさを計測し電子計算機を用い統計学的処理により力価を決定する方法を考案した。これによりUH10では力価1.32, UC4では4.0の結果が得られている。

目下人体についても検討を行っており、これらについては別に報告する予定である。

結 論

Coccidioidin および histoplasmin を迅速に製造する方法を検討した。

1. Coccidioidin の場合、37℃で振盪培養することにより、2週間で標準液とほぼ等力価のものが得られ、3週間では常により高力価のものを得ることが出来た。

2. Histoplasmin では yeast extract の透析外液を培地に加えることにより菌は37℃で発育可能となり、約9週で高力価のものが得られた。この培地を用い室温で振盪培養すると、4週で標準以上の力価を有する濾液が得られ、3～6カ月の培養期間を1カ月に短縮出来た。

本論文の要旨は The 8th Annual Meeting of the VA-Armed Forces Coccidioidomycosis Study Group, Dec., 5, 1963, Los Angeles, California および The

64th Annual Meeting of American Society for Microbiology, May 3-7, 1964, Washington, D.C. において発表した。

文 献

- 1) Christie, A. and Peterson, J.C.: Am. J. Publ. Hlth., **35** : 1131, 1945.
- 2) Palmer, C.E.: Publ. Hlth. Rep., **61** : 475, 1946.
- 3) Fiese, M.J.: Coccidioidomycosis, p. 93, C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1958.
- 4) Smith, C.E.: Med. Clin. N. Am., **27** : 790, 1943.
- 5) Smith, C.E., Whiting, E.G., Baker, E.E., Rosenberger, H.G., Beard, R.R. and Saito, M.T.: Am. Rev. Tuberc., **57** : 330, 1948.
- 6) Emmons, C.W., Olson, B.J. and Eldridge, W.W.: Publ. Hlth. Rep., **60** : 1383, 1945.
- 7) Shaw, L.W., Howell, A., Jr. and Weiss, E.S.: Publ. Hlth. Rep., **65** : 583, 1950.
- 8) Minimum Requirements, Histoplasmin, Division of Biologics Standards, NIH, 1955.
- 9) Ajello, L., Walls, K., Moore, J.C. and Falcone, R.: J. Bact., **77** : 753, 1959.
- 10) Pappagianis, D., Smith, C.E., Kobayashi, G.S. and Saito, M.T.: J. Infect. Dis., **108** : 35, 1961.
- 11) Salvin, S.B.: J. Infect. Dis., **84** : 275, 1949.
- 12) Markowitz, H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **115** : 697, 1964.

(昭和42年11月4日受付)