螢光抗体法による淋菌の検索

第II報 臨床的応用

東京大学医学部泌尿器科教室 齊 藤 功
(主任: 高安久雄教授)

DETECTION OF NEISSERIA GONORRHOEAE BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE.

II: CLINICAL APPRAISAL.

Isao Saito

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo
(Director: Prof. H. Takayasu)

In the previous report (40) a method of preparing fluorescent antibody to gonococcus and the results of tests for its specific activity were described. Fluorescent antibody labelled with two or three fluorescein molecules was shown to be most useful in view of its specificity and staining potency. Among stock strains of genus *Neisseria* and of several gram-positive cocci, only meningococcus strains (Group A,B,C, and D) were found strongly cross reactive with the fluorescent antibody solution, although, because of the natural antibody involved, a strain of staphylococcus (209P) was stained to some extent. Further studies carried out thereafter on strains which were isolated from urethritis and cystitis patients, and revealed that the unfavourable staining of microorganisms indigenous to urethral membrane would not be likely to occur, so far as the present fluorescent antibody solution was concerned.

The present studies were undertaken to make a clinical appraisal of fluorescent antibody technique (FAT) for the detection of gonococci in specimens taken from patients. Specimens from 126 patients were examined by both gram and fluorescent antibody staining. One hundred and twelve males were suspected of gonorrhea and 14 females were mostly the sexual partners of male patients. Cultural examinations were carried out on 86 out of 126 cases. Gram staining demonstrated the presence of gram-negative diplococci in 85 cases (67.5%), as compared to that of specifically by FAT stained diplococci in 79 cases (62.0%).

Cultural examinations of 86 patients detected the presence of gonococci in 46 cases (88.5%) on the first trial. FAT-positive, culture-negative six cases were treated with placebo and subjected to cultural examination again on the next day. With this procedure five more positive cases were detected, making in total 51 positive cases (98.1%). The isolates were identified as gonococci by oxidase reaction as well as by fermentation tests when necessary. Thus, FAT and cultural method gave nearly identical results in both positive and negative cases. This fact led the author to believe that the FAT is as much accurate and sensitive as cultural examination. About one fourth of the patients were examined by both direct and delayed methods of FAT. Both results agreed quite well in all of the cases tested.

Eighty-five gram-negative diplococci found by gram staining probably included nine microorganisms other than gonococci, as revealed by FAT and cultural examination. The causes of discrepancies between the results obtained by gram staining, FAT and cultural examination were discussed in detail. The specificity, sensitivity, simplicity and rapidity of FAT in demonstrating gonococci in specimens indicated the usefulness of this procedure as a diagnostic tool for gonococcus infections.

I 緒 言

淋疾の細菌学的診断法には染色（メチレンブラウ、グラム等）、あるいは培養による淋菌の直接的検出と、皮内反応、補体結合反応、凝集反応、赤血球凝集反応などの免疫学的、血清学的反応による間接的方法とがある。今日これらの中で臨床的に最も利用されているのはグラム染色法と、GC 血液寒天培地によるローソク培養法とである。後者については大多数の検査室では培養後、オキシダーゼ反応、鏡検をする程度で淋菌の有無を診断している現状であり、糖分解能試験による同定は一般的には行われていない。

最近性病特に梅毒と淋疾の増加が世界的に注目されてきている^{1)~14)16)}。また淋菌と形態的に良く似た *Mima*¹⁵⁾、^{17)~23)}による尿道炎が新しい問題として臨床的に重要視せざるをえない段階となっており、さらにペニシリン抵抗株による非定型的症例の増加、症状のない女子淋疾^{9)24)~29)}の追求もゆるがせにできない問題となり、従来の慣例的に行われてきた診断方法の再検討と同時により迅速、且つ正確な淋疾の診断方法の導入が要望される機運となった。

蛍光抗体法による淋菌の検出は1959年Deacon et al³⁰⁾が男子急性淋疾に応用したのが最初である。彼等は1960年³¹⁾にはさらに女子への応用を試みその有用性を認識した。次いで Harris et al³²⁾。(1961), Brown et al³³⁾。(1962), Prince et al⁹⁾。(1964), Danielson⁴²⁾⁴⁵⁾ (1963, 1965)等は臨床的に症状のない女子症例について検索、特に Deacon et al³¹⁾。(1960), Danielson⁴²⁾ (1963)等は分泌液の培養に蛍光抗体を行ういわゆる *delayed* 法の効果について、みるべき好成績をおさめている。また蛍光抗体法による淋菌の検出を容易ならしめるために Fry et al³⁶⁾。(1964)は FITC で標識した抗淋菌蛍光抗体液に赤色蛍光の Lissamin Rhodamin B で標識した正常家兎グロブリンを加えて染色し、抗原（淋菌）と back ground とのコントラストを良くし、Peacock et al³⁷⁾ (1964)は flazo orange を併用して白血球等との間の対比染色を行い、又 Danielson⁴³⁾ (1965)は赤色蛍光の RB 200 で抗ブドー球菌蛍光抗体と、緑色蛍光の FITC 標識淋菌蛍光抗体とを併用してブドー球菌と淋菌との対比染色を行い効果をおさめている。しかし、これらの対比染色は特異性の高い標識抗体を作成しうれば必要でないように思われる。著者はさきにウサギの免疫抗血清よりこのような特異性の高い淋菌免疫標識抗体を作製し、稀釈により充分特異的に淋菌の検出が可能である

ことを実験室保存の各種細菌を用いて確かめ、実際の診断に応用が可能であることを発表⁴⁰⁾ (1964)した。

今回はこの蛍光抗体液を淋菌の診断に応用し、臨床面より従来の諸検査法と比較検討を行つたので、それらの成績について報告する。又前報と多少重複するが、実験室内での基礎的資料の再確認および2, 3の追加実験にもふれておきたい。

II 基礎的研究

1. 蛍光抗体液の作製

男子急性淋患者よりの新鮮分離株（NG 30として伝研に依託、凍結乾燥保存）の GC 培地16時間培養菌を100倍マーズン水浮遊液とし、10%カリシヨウバン液を白濁沈澱が最高になるまで加え、炭酸ナトリウム液で pH 6.5に補正この溶液を2日間室温に静置後3000回転、30分遠心沈澱、その沈渣を生食水で2 mg/ml の菌液とし、これを免疫原とした。

体重2500~3000 gの白色健康ウサギに、この免疫原を初回耳静脈と後趾間皮下に1 ml づつ計2 ml、を、2日後に初回同様計2 ml、3週後にブースターとして耳静脈より1 ml の量を注入、初回注射より1カ月後に全採血し、血清を分離した。

蛍光標識抗体の作製は、免疫血清より γ -globulin を硫酸処理により分離、これに Baltimore Biological Laboratories 社製、結晶蛍光色素 fluorescein isothiocyanate（以後 FITC と略す）を川村ら⁴⁵⁾の法で標識した。

すなわち免疫血清40 ml に等量の生食水を加え、それと等量の飽和硫酸を室温で magnetic stirrer で攪拌しながら加え、10分間静置後9000回転10分間冷凍遠沈し、その沈澱を生食水で最初の硫酸を加える前の原量に再浮遊する。ついで半量の飽和硫酸を加え、以下同様の処理をさらに2回計3回行い最後の沈渣を4 ml の生食水に再浮遊させ、セロハンチューブに入れ、生食水で24時間透析し、硫酸の残存しないことを確認した。この蛋白液を2%に調製し $1/10$ 量に当る 0.5M Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.2) に蛋白の $1/100$ 量の FITC をあらかじめ溶したものを加え (pH 9.2~9.0), 4℃で4時間攪拌して標識した。次に 0.005M Na-phosphate buffer に 0.1M NaCl 水を加えた溶液で調製した Sephadex G-25カラムに標識液を通して遊離の色素を除去し、さらにこれも同様の buffer で調製した DEAE cellulose カラムを通し蛋白対色素の結合比 ($\times 10^{-3}$) が2~5の分画をブールし、蛍光抗体液とした（表1）。この結合比は日立の photo electric spectrometer（分光光度計）を使用

表1 蛍光抗体液作製法

して測定したところ2.47と計算された。また淋菌に対する Staining titer は1:64であつた。

2. 研究室保存のナイセリア属及び他菌に対する染色性。

作製淋菌蛍光抗体液で研究室保存の他のナイセリア、及び少数の皮膚粘膜在菌である他菌の染色性をしらべたところ表2の如き交叉反応が認められた。ナイセリアについては髄膜炎菌の各型が交叉反応を示したがその他のものとの交叉はほとんど認められなかつた。なお髄膜炎

菌との交叉反応は、標識抗体を生食水で適当に稀釈して使用すると淋菌に対する特異光に変化を認めない範囲で、ほぼこれを除去することができた。その他の菌についてはブドウ球菌 209P株についてのみ若干の染色性が認められ、この場合も蛍光抗体液の稀釈により、これに対する染色性を除去することができた。これらの成績、および交叉性の原因については第1報に精細に報告された通りである。

3. 患者から分離培養された淋菌以外の菌に対する染色性。

表3 淋菌蛍光抗体液による下部尿路感染症の新鮮分離菌の染色

	Bacterial Strains	No. of B. Strains	FAT (direct method)	
			Positive	Negative
Urethritis	Staph. aureus	10	0	10
	Staph. epid.	2	0	2
Cystitis	Staph. aureus	2	0	2
	Staph. epid.	3	0	3
	Micrococcus	1	0	1
	E. Coli	12	0	12
	Klebsiella	4	0	4
	Citrobacter	2	0	2
	Proteus	3	0	3
	Pseudomonas	2	0	2
	B. anitratum	2	0	2
		43	0	43

表2 各種蛍光抗体液によるナイセリア及び球菌間の交叉反応

Bacterial Strains	FITC-Conjugated Globulin of Anti-Gonococcus Sera			FITC-Conjugated Globulin of Anti-Meningococcus Sera	
	Unabsorb.	Absorbed with N. Mening.	Staph. Aureus	Unabsorb.	Absorb. with N. gono.
N. gono.	+++~+++	++~+++	+++~+++	++	—
N. mening. A	++~+++	—~+	++	+++	++
B	++~+++	—	++	+++	++
C	++~+++	—~+	++	+++	++
D	++~+++	—~+	++	+++	++
N. sicca	—	—	—	—	—
N. haemo.	—~±	—	—~±	±	—
N. cat.	—	—	—	—	—
N. flav.	—	—	—	—	—
N. perfl.	—	—	—	—	—
N. subfl.	—	—	—	—	—
Staph. aureus	+	+	—	±	±
Streptococcus	—~±	—	—	—	—
Diplococcus	—	—	—	—	—

表 4 培養淋菌による各種検査法の敏感性の比較

	Gram. Stain	Culture	FAT
1 mg/ml.	+	+	+
0.5 /	+	+	+
0.25/	+	+	+
0.125 /	+	+	+
0.06/	+	+	+
0.03/	+	+	+
0.015 /	+	+	+
0.0075/	+	+	+
0.0038/	+	+	+
0.0019/	—	+	+
0.0010/	—	+	—
0.0005/	—	—	—

作製蛍光抗体液の特異性をみるため、淋菌以外による尿道炎及び下部尿路感染症より直接分離培養したブドウ球菌、レンサ球菌、大腸菌、変形菌、緑膿菌等32例、43株につきさらに直接法で染色を行つたところ、いずれの株においても特異光はみられなかつた(表3)。

4. 他の検査法との淋菌検出における敏感性の比較.

蛍光抗体法による淋菌検出の敏感性をみるために NG 30株の GC 血液寒天培養から定量白金耳を用いて 1 mg/ml の淋菌ブイオン浮遊液を作り、これを倍数稀釈し、その各々から一白金耳ずつをとつてグラム染色、培養、蛍光抗体染色を行つてその成績を比較した。

その結果、培養と蛍光抗体染色は敏感性においてはほぼ一致をみているが、グラム染色は多少劣る結果をえた(表4)。

III 臨床的応用

淋疾の診断における蛍光抗体の臨床的意義については、従来の検査法であるグラム染色と培養との比較において、その敏感性及特異性が検討された。

1. 対象

実験の対象は都内の5つの病院(東大分院、虎の門病院、東京共済病院、都交通局病院、都立台東病院)の泌尿器科、性病科と船員保険芝浦診療所の症例で、1962年10月より1965年12月までに受診し臨床的に淋疾を疑われた126例(男子112例、女子14例)である。

2. 検査方法

1) 検体の採取

男子は龟头消毒後、尿道より、女子は外陰部洗滌後尿道、頸管の2カ所より検体を滅菌綿棒で採取、全例にグラム染色、培養(オキシダーゼ反応まで)、蛍光抗体染

色(直接法、一部 delayed 法)を行つた。

2) 細菌学的検査

i) グラム染色(Hucker の変法)

塗抹標本は火焰固定後染色し、グラム陰性双球菌の存在を検した。

ii) 培養、培養同定法

GC 基礎培地に馬血液10%を加えた血液寒天平板(GC 培地)に検体を塗抹後、ローソク培養18~24時間後にグラム染色で陰性双球菌、オキシダーゼ反応陽性の集落の有無を検索し、なお症状、グラム染色の所見を参考として淋菌の確実な同定を必要と考えられた86例についてはさらに一旦純培養した後、糖分解試験を行いグルコースを分解し他の糖を分解しないこと、またこの菌が普通寒天培地に発育しない淋菌であることを確認した。ここまでの検査をしたものを培養同定法を行つたものとして、その成績を記載した(表6~9)。鏡検上グラム染色で陰性双球菌を明らかに認めながら、時として第1回(初診時)の培養法で淋菌の検出をみない例がある。このような時には患者に偽薬を与え翌日2回目の培養を行つた。

iii) 蛍光抗体法 Fluorescein Antibody test (FAT)

松波の薄手良質スライド(No. 1)に塗抹した検体をアセトンで1~2分固定後、抗淋菌蛍光抗体で37℃、30分染色しリン酸緩衝液(PBS: pH 7.2)で15分間洗滌(この間PBS液を3回とりかえる)し、エルパノール包埋しカバーガラスをかけ蛍光顕微鏡で検鏡した。又一部の症例に delayed FAT を行つたが、これは GC 培養16~18時間培養後の集落を綿棒で集め、この塗抹したものを空気乾燥後アセトン固定し上記の直接法にて染色検鏡した。

Fig. 1は未吸収 NG 30蛍光抗体を生食で8倍に、Fig. 2は16倍、Fig. 4は64倍に稀釈したもので染色したものである。高単位に稀釈を行うと、白血球の非特異光、赤血球の自発蛍光等が漸次減少、64倍稀釈でほとんど淋菌の特異蛍光を残すのみである。また Fig. 3は肝アセトン粉末で同蛍光抗体を吸収した16倍稀釈による染色であるが、未吸収の16倍稀釈と比べ白血球、赤血球等の蛍光は減少しているが64倍未吸収に比べるとまだかなり特異蛍光以外の蛍光が残る、そこで著者は吸収せず、蛍光抗体液の稀釈液で以後の臨床材料を検討した。

なお Staining titer は 1 : 32 として使用した。

3. 成績

患者は126例で、グラム染色により表5の如く4つの

表5 尿道炎患者分類

Group	Organisms	
1	Gram. neg. diplococci	65 (1)
2	Gram. neg. diplococci with	
	neg. rods	5 (2)
	pos. rods	1 (1)
	pos. cocci	11 (1)
	neg. rods, pos. cocci	2 (1)
	others	1
		20 (5)
3	Gram. neg. rods	4 (1)
	Gram. pos. rods	2 (2)
	Gram. pos. cocci	18 (2)
	Gram. pos. cocci, neg. rods	13 (3)
		37 (8)
4	not detected	4
		126 (14)

* 括弧内は女子症例

表6 蛍光抗体法とグラム染色との比較

Group	Gram-Staining	Cases	F A T	
			Positive	Negative
1	Positive	65	60	5
2		20 > 85	15 > 75	5 > 10
3	Negative	37	4	33
4		4 > 41	0 > 4	4 > 37

matched, : 88.9% Unmatched : 11.1%

グループに分類した。第1グループはグラム陰性双球菌が多数で他の菌の混在はなく65例（うち女子1例）、第2グループは陰性双球菌の他、他の細菌の混在も認めうる20例（うち 5例）、第3グループは陰性双球菌は検出しない、他の種の菌の混在も認める37例（うち女子8例）、第4グループは原因菌とおぼしき細菌の存在を検出できなかった4例である。

1) FAT とグラム染色との比較

FAT とグラム染色は 126例全例に施行した（表6）。グラム染色で陰性双球菌を検出した第1、第2グループ計85例中、FAT で淋菌の特異蛍光を陽性であるものは、それぞれ60例、15例の計75例であり、FAT 陰性はそれぞれ5例づつであった。グラム陰性双球菌の検出されなかったグループ3、4の41例中、FAT 4例が陽性、残りの37例はFAT でも陰性であった。すなわちグラム染色とFAT が共に陽性であったもの75例、共に陰性

37例の計 112例（88.9%）が両検査法で一致した。FAT のみ陽性のもの4例、グラム染色のみ陰性双球菌陽性のもの10例、計14例（11.1%）で不一致がみられた。不一致の症例を培養同定法の成績及び再度の培養の上同定を行つた（更検）成績で検討してみると、グラム染色法で淋菌と考えられたがFAT で陰性であった10例の中9例は培養同定法でも淋菌が証明されなかつた。一方グラム染色法で淋疾と考えられないもののうちFAT が陽性である4例中、3例は培養同定法でも淋菌が証明されている（表9参照）。この中の一部症例については後に述べる（症例参照）。

2) FAT と培養同定との比較

培養同定法は表7に示すように、第1グループに属する65例中37例に、第2グループ20例中15例、第3グループ37例中30例に、第4グループは4例全例の計86例につき施行した。第1グループではFAT 培養同定法で共に陽性32例、共に陰性3例で計35例が一致した。不一致の

表7 蛍光抗体法と培養同定法との比較（1）

Group	Cases	Culture			
		Positive		Negative	
		FAT (+)	FAT (-)	FAT (+)	FAT (-)
1	37	32	0	2 [2]*	3
2	15	11	0	2 (2)*	2
3	30	2	1	2 (1)*	25
4	4	0	0	0	4

* Positive Cultures were obtained on the second trial.
[] : Male cases. () : female cases.

2例は培養で淋菌を検出できなかったが、FAT では陽性であった。第2グループは15例中共に陽性11例、共に陰性2例の計13例が一致した。不一致には培養陰性でFAT 陽性の2例である。この2例はいずれも女子の症例であり、グラム染色で他菌に混じ陰性双球菌を検出しているが、培養で淋菌を確認出来ず、FAT は直接法、delayed 法共に淋菌の特異蛍光を確認している。第3グループでは30例中培養同定法、FAT 共に陽性2例、共に陰性25例で計27例が一致、不一致例には培養陽性でFAT 陰性の1例、培養陰性でFAT 陽性の2例があり、培養で検出できなかったものの中、1例は女子例であった（女子症例No. 7）。第4グループは4例共培養、FAT

陰性であつた。

以上を総計すると、培養同定を施行した86例中初回の検査で FAT と培養同定法 が共に 陽性であつたもの45例、共に陰性34例の計79例 (91.8%) が一致した。不一致の計 7 例中 6 例は培養で淋菌を検出しえなかつたが FAT 陽性であつた。この中の 3 例は女子例で、第 2 グループに属す 2 例では他の陽性球菌と陰性桿菌の混在をみ、第 3 グループの 1 例はグラム染色で陽性球菌と陰性桿菌を多数混在していた症例である。

培養陰性で FAT 陽性 6 例中、5 例は培養再検 (未治療中) を行つて淋菌を検出しえている。従つて、初診時両検査法で異つた結果をえた 7 例中、再検査で 5 例が一致したとすると、培養同定法と FAT 両方法を施行した86例中84例 (97.5%) が一致したことになる (表 8)。

表 8 螢光抗体法と培養同定法との比較 (2)

F A T	Culture	
	Positive	Negative
Positive	45 (50)	6 (1)
Negative	1	34

matched : 91.8%, Unmatched : 8.2%
() : On the second trial the positive cultures were obtained in 5 cases.
(Matched: : 97.5%)

表 9 グラム染色と培養同定法との比較

Group	Cases	Culture	
		Positive	Negative
1 2	37 15 > 52	32 11 > 43	5 4 > 9
3 4	30 4 > 34	3 0 > 3	27 4 > 31

Matched : 86.0% Unmatched : 14.0%

なお、FATの直接法と一部について行われた delayed 法の成績は、いずれも共に陽性であるか、あるいは陰性であつて、とくに delayed 法が検出率が高いという成績はえられなかつた。

3) グラム染色と培養同定法との比較

グラム染色で陰性双球菌の検出された第 1, 第 2 グループの計85例中52例に培養同定を行つた成績では淋菌の検出可能であつたもの43例 (82.7%)であり、9例(17.3%)では培養で淋菌を確認出来なかつた。又グラム染色

で陰性双球菌の検出されなかつた41例中、34例について培養同定を行い、3例 (8.8%) に淋菌を検出した。すなわち86例中、グラム染色と培養同定法で74例(86.0%)が一致し、12例 (14%) が不一致であつた (表 9)。

4) 男子症例の不一致例

No. 1 : 24才 独身 (第 2 グループ)

感染機会 2 日目より尿道不快感、膿性分泌物の排出を認め、排尿痛あり、初診時外尿道口の発赤と同時に膿性分泌物中等度あり、グラム染色で陰性双球菌中等度、陽性球菌多数認め、培養で Staphylococcus epidermidis の多数と同時にナイセリア少数を検出したが、FAT は直接法、delayed 法共に陰性であつた。非淋菌性尿道炎と診断治療した。

No. 2 : 42才 既婚 (第 2 グループ)

感染機会 3 日目より尿道より膿排出あり、初診時グラム染色で陰性双球菌中等度、陰性桿菌少数認めたが培養で細菌陰性で、FAT は直接法、delayed 法共に陰性であつた。非淋菌性尿道炎と診断し、治療後グラム染色、培養、FAT いずれも陰性であつた。

No. 3 : 36才 既婚 (第 1 グループ)

感染機会後 2 日目より尿道不快感あり、3 日目より排尿痛、尿道よりの膿性分泌物を認めた。グラム染色で陰性双球菌少数あり、培養でグラム陰性双球菌少数検出するもオキンダーゼ陰性、FAT は直接法、delayed 法共に陰性であつた。非淋菌性尿道炎と診断、治療後グラム染色、培養、FAT いずれも陰性であつた。

No. 4 : 27才 独身 (第 1 グループ)

初診 3 週間前より 1 週間の間に 2 回感染の機会あり、排尿痛、尿道よりの膿性分泌物を認め受診、グラム染色で陰性双球菌中等度あり、培養で Staphylococcus を分離したが淋菌は陰性、FAT は共に陰性であつた。治療 3 日後グラム染色で陽性球菌少数、培養で Staphylococcus epidermidis を同定、FAT も陰性であつた。非菌性尿道炎と診断した。

No. 5 : 25才 独身 (第 3 グループ)

感染機会後翌日より尿道不快感、3 日目より不快感増悪、排尿痛、尿道よりの膿性分泌物を認めた。外尿道口は発赤、膿性分泌物高度に認めグラム染色で陽性球菌中等度、培養で Staphylococcus aureus 少数検出したが淋菌陰性であつた。FAT は直接法、delayed 法共に淋菌の特異光を確認した。未治療のまま翌日再検、グラム染色で陰性双球菌中等度、陽性球菌中等度認め培養同定法で淋菌を検出した。淋菌性尿道炎と診断、治療 3 日後よ

写真1 未吸収NG30FA 8倍稀釈露出時間 150秒, 倍率 400. 淋菌の特異螢光の他白血球の非特異光著明

写真2 未吸収NG30FA 16倍稀釈. 露出時間 150秒, 倍率 400. 淋菌特異螢光の他, 赤血球の自発螢光あり.

写真3 肝アセトン粉末吸収NG30FA 16倍稀釈. 白血球, 赤血球の各非特異螢光減少している. (撮影条件同じ)

写真4 未吸収64倍稀釈. 白血球, 赤血球の非特異螢光全くなし, 淋菌の特異螢光のみ.

りグラム染色，培養，FAT いずれも陰性となつた．

No. 6： 29才 独身（第2グループ）

感染機会なし，数日前より排尿困難，残尿感あり，初診時尿道口より漿液性分泌物軽度あり，グラム染色で陰性双球菌少数，陽性球菌中等，陽性桿菌僅少認めた．培養でオキシダーゼ陽性の陰性双球菌あり，しかしこの集落は普通寒天上にも培養可能であつたが，FAT はいずれも陰性であつた．治療後の検査ではグラム染色，培養いずれも陰性双球菌陰性となつた．

表10 女子症例の検査成績

Group	female cases	Positive cases of N. gonorrhoeae		
		Culture	F A T	
			direct	delayed
1	1	1	1	1
2	5	2	4	4
3	8	0	1	1

表11 女子症例の検査成績

Group	Cases	gram-stain.	Culture	usually clinical diag.	F A T		Final diag.
					direct	delayed	
1	1	+	+	gono.	+	+	gono.
2	2	+	+	gono.	+	+	gono.
	3	+	+	gono.	+	+	gono.
	4	+	—	non gono.	+	+	gono.
	5	+	—	//	+	+	gono.
	6	+	—	//	—	—	non gono.
3	7	—	—	non gono.	+	+	gono.
	8	—	—	//	—	—	non gono.
	9	—	—	//	—	—	//
	10	—	—	//	—	—	//
	11	—	—	//	—	—	//
	12	—	—	//	—	—	//
	13	—	—	//	—	—	//
	14	—	—	//	—	—	//

5) 女子症例の検討

126例の臨床例中，女子14例で，この中排膿及び膀胱炎症状のあるものは僅か3例で，他は全く認むべき自覚症状はなかつた．これらの患者は Sexual partner が性交後，尿道炎の症状を呈したため受診，或いは受診をすすめられ来院したものである．又女子患者の特長は男子の場合と異り表10に示すより，グラム染で陰性双球菌のみがみられたグループ1に属すものは僅か1例にすぎず，他の5例が他菌との混合するグループ2に，8例がグループ3に属し淋菌以外の球菌，桿菌のみを検出した．

第1グループの1例はグラム染色，培養同定法，FAT いずれも陽性で問題なく（表11），第2グループの5例中培養同定法で2例が陽性，3例が陰性であつた．この陰性3例中 FAT 直接法で淋菌陽性は2例，又この2例は delayed 法でも陽性であつた．第3グループに属す8例

は培養同定で1例も淋菌を検出していないが，FAT 直接法，delayed 法でいずれも陽性の1例をえている．

女子症例 No. 4： 22才 既婚

夫が淋疾罹患治療中のため受診，自覚症状全くなく外尿道口，外陰部に所見なし，尿道及び頸管分泌物塗抹標本のグラム染色で共に陰性双球菌少数，陽性桿菌多数，球菌少数を認めた．培養で Staphylococcus epidermidis 中等度検出するも，淋菌を検出出来なかつた．FAT は直接法，delayed 法で共に淋菌の特異光を認め淋菌性尿道炎と診断，一旦偽薬投与で翌日培養再検で淋菌を検出した．治療後いずれの検査も陰性双球菌陰性であつた．

女子症例 No. 5： 28才 既婚

自覚症状全く認めないが夫が淋疾罹患，治療中のため精査を目的で受診．外尿道口及び外陰部に所見なく，尿道，頸管分泌物塗抹標本でグラム陰性双球菌少数，陽性

球菌多数，陽性桿菌多数認め，培養で *Staphylococcus epidermidis* を分離したが，淋菌の検出は出来なかつた．FAT の直接法，delayed 法でいずれも淋菌の特異蛍光を認めたため，偽薬投与で翌日培養をくり返すことにより淋菌を分離しえた．淋菌性尿道炎の診断のもとに治療，3日後にいずれの検査法でも淋菌陰性となつた．

女子症例 No. 6 24才 未婚

膀胱刺激症状のため受診，感染機会3日目より膀胱炎症状出現，外尿道口軽度発赤するも他に特記することなし，グラム染色で陽性桿菌多数，陰性双球菌少数認めた．培養では溶血性黄色ブドウ球菌少数，グラム陽性桿菌多数を認めたが淋菌陰性，FAT でも直接法，delayed 法いずれも陰性であり，非淋菌性尿道炎と診断治療した．なお治療後の FAT も陰性であるが，グラム染色では僅かの陰性双球菌が残存している．

女子症例 No. 7 : 33才 未婚

11年前淋疾罹患，その後2～3回尿道膀胱炎の自覚症状があつた．ここ数年来自覚症状全くなく経過していたが，2年前より患者と性交の機会ある男性（2人，数回）がいずれも機会数日後より急性尿道炎の症状を呈し，この中の1人は近医より淋疾と診断され治療した．患者は受診前は時々買薬で不規則な治療をしていた．初診時グラム染色で陽性球菌多数認めたが陰性双球菌を認めず，又培養でも淋菌を検出せず， α 型溶血性レンサ球菌多数及び，グラム陰性桿菌中等度認めた．しかし，FAT は直接法，delayed 法いずれも明らかな淋菌特異光を少数認めることが出来た．

この症例はグラム染色，培養同定法で淋菌を検出しえることが出来ず，FAT のみで検出可能であつた例である．

IV 考 按

Coons の開発による蛍光抗体法は^{(43)~(48)}，それと特異的に結合する抗原の所在を，顕微鏡下で的確に検出しうするため，極めて有力な免疫化学的，組織化学の方法として，生体自身の各種抗原（酵素，ホルモン，組織抗原等），あるいは微生物（ウイルス，リケツチア，真菌，細菌等）の検出に利用されつつある．

従来最も正確な淋菌診断は患者より分泌物採取後，グラム染色，GC 血液寒天培養，オキシダーゼ反応，純培養，糖分解能検査等を経て淋菌を同定する方法とされている．しかしこの方法は日数と手間を要するため，普通の検査室ではほとんど糖分解能の検査をせず，培養集落についてグラム染色，オキシダーゼ反応を行つて淋菌

を同定している現状である．淋菌培養法は技術的にややむづかしいのが欠点である，とくに女子症例においては，材料中に多数の他菌が混在するのが多く，初診時，グラム染色で陰性双球菌がみられても，培養すると他菌のため陰性双球菌の発育が阻止されたり，over growth されて分離することがむづかしく，細菌学的に淋菌を同定することが不可能の場合が多くみられた．

これに対し，FAT の応用は，蛍光抗体液を作製しておけば，材料の塗抹標本をこれにより染色させるだけの手技によつて，検鏡まで凡そ60分の短時間で，淋菌を能率よく検出同定しうることを可能ならしめることが出来る．

このような見地から，著者は淋菌の蛍光抗体による検出を企図し，基礎的な研究をへて，今回これを臨床例に応用し，勝れた結果をえることができた．以下蛍光抗体法に関する最も重要な問題として，蛍光抗体液作製上の技術面及び，これを臨床に応用した場合の淋菌の検出率，過誤等の点につき，従来の文献の成績と対比しながら考察してみたい．

1. 蛍光抗体液作製上の問題点

このことに関してはこれまで Deacon et al⁽³⁹⁾ (1959), Danielson⁽⁴¹⁾ (1963), 著者 (1964)⁽⁴⁰⁾ が比較的詳しく述べている．まず Deacon et al. は加熱滅菌した菌液を，0.3%ホルマリン処置し抗原としてウサギを免疫し，免疫グロブリンに FITC を，Goldmann et al⁽⁵¹⁾. (1957) の変法で標識している．すなわちcarbonate bicarbonate buffer を用い pH 9.0, 4℃の条件で蛋白 μ g当り 0.5mg の FITC をグロブリン液に反応させ，冷所で6時間振とうその後，未反応の色素を除くため，燐酸緩衝液透析し，これを蛍光抗体液としている．Danielson は新鮮分離株にホルマリン及び 100℃の加熱処置を加え，この抗原で免疫抗血清を作り蛍光抗体液作製しているが，その条件は色素量が蛋白 μ g当り 0.05mg で，標識時間も 4℃，24時間である．又未反応色素の除去も Sephadex G-25 を通すだけである．川村らは，抗体グロブリン1分子に結合する色素分子の数が，少くない程抗原に特異的に結合して，色素分子が多いと，荷電の関係で各種の細胞成分に非特異的に結合しやすくなることを証明した．そこで著者は川村ら⁽⁴⁵⁾の方法に準じて，蛍光抗体作成の条件として，色素量を蛋白量の 100分の1におさえ，4℃4時間反応させ，Sephadex G-25のカラムで遊離色素を除いた後，DEAE cellulose カラムでえられた蛋白1分子に色素1分子ないし5分子の結合した分画のみをプール（平均2.47）して蛍光抗体液とした．これは Deacon et al.,

Danielson のそれにくらべ、Fluorescein, Protein ratio は著しく低いものと考えられる。しかしこの様に注意して作成した蛍抗体液でも、実際には淋菌以外の微生物、あるいは細胞に対して、所謂非特異染色をおこすことがあり、この非特異染色の除去が重要な課題となる。一般的に蛍抗体染色問題となりうるものには、自発蛍光を発する物質の存在、共通抗原を有する他の微生物の存在、免疫動物が有していた所謂自然抗体が蛍抗体にふくまれていて、これによって染色される目的菌以外の微生物の存在、あるいはとくに非特異的に蛍抗体を吸着しやすい細胞、ないし細胞成分の存在などがある。著者の抗淋菌蛍抗体に関しては、基礎面、および臨床面において実際に経験された現象として、非特異な共通抗原の存在による髄膜炎菌の染色、自然抗体の存在によるブドー球菌 209 P 株の染色、非特異吸着による白血球などの染色などであつた。淋菌と髄膜炎菌との間にある強い交叉反応は、両者が共通の抗原成分を有するためであることはよく知られた事実である⁴⁰⁾。淋菌と、*Neisseria catarrhalis* との間で、交叉反応がみられるとの報告があるが³³⁾⁴¹⁾、著者の実験では他のナイセリアを含め、みるべき交叉反応はなかつた。またウサギ血清には、ブドー球菌に対する自然抗体がふくまれることがみとめられている。しかし著者の場合は、しらべられた範囲内において 209 P 株に対する交叉のみであつたが、この頃に該当するものであろう。白血球、赤血球の非特異的吸着は、諸家のひとしくみとめるところである。

非特異染色の難点を克服するため多くの試みがなされた。Deacon et al³⁰⁾ は共通抗原、自然抗体によつておきる非特異蛍光を除くためそれぞれ髄膜炎菌、ブドー球菌で吸収することを試みた。Lind et al³⁸⁾ (1962) は直接法でみられやすい非特異蛍光をさけるために、材料を輸送用培地で 4～5 時間放置した後、塗抹標本をつくり直接法であらためて検査することをすすめており、Fry et al³⁶⁾ は同様の目的のため FITC で標識した抗淋菌蛍抗体と、Lissamin Rhodamin B より標識した正常ウサギグロブリン蛍抗体液の 2 種を用い、対比染色することにより直接法、delayed 法でより特異性の高い染色効果をあげている。又 Peacock et al³⁷⁾ も同様に女子の例について、Flazo orange で白血球を対比染色して染色効果をたかめている。Danielson は Deacon et al. と同様始め髄膜炎菌、白色ブドー球菌等で吸収し、それぞれの交叉反応を除去していたが、1965 年⁴²⁾には非特異蛍光除去のため Lissamin Rhodamine B (RB 200)

で標識した anti-staphylococcus rabbit globulin を用いる方法を発表、検出効果をたかめている。

著者の作製した抗淋菌蛍抗体液は前述の如く髄膜炎菌各グループ、およびブドー球菌と交叉反応を示めた。そこでまずこれらの菌で蛍抗体液を吸収することを試みたところ、髄膜炎菌吸収の場合、髄膜炎菌の交叉反応が全く消失する程度に吸収すると淋菌の特異光も若干減弱することが認められた。この結果は Deacon et al³⁰⁾、Danielson⁴¹⁾ とやや異なる結果であつたが、蛍抗体液を淋菌の特異光の失われぬ範囲で最大稀釈液を作り、これで染色すると淋菌の特異光は明瞭に残りながら、髄膜炎菌、209 P 株、その他のナイセリアに対する交叉蛍光を全く消すことが可能であつた。そして同様に白血球、赤血球への蛍抗体の吸着も稀釈により、ほぼ防ぐことができた。この様に著者は、蛍抗体液の稀釈のみの単純な操作で、他の研究者の delayed 法、対比染色に比し適しえる効果をあげているが、このことを可能ならしめた原因は、著者の用いた蛍抗体の力価が高く、特異抗体量が自然抗体量をはるかに凌駕していたこと、また特異結合性の高い換言すれば、fluorescein-protein ratio の低い蛍抗体を選択的に使用したことにあると考えられる。

2. 蛍抗体法による淋疾診断上の意義

細菌学的診断法の意義に関しては、検出率、正確性、迅速性、簡便性などの諸点が考慮されなければならない。検出率、および正確性の点からみると、従来は培養同定法がもつとも敏感であり、確実であるとされていた。ちかごろ淋疾をグラム染色のみに頼つて診断することも多く行われているが、この方法は培養にくらべ感受性が一般に低く、また検出された陰性双球菌がすべて淋菌であるか否かという点で問題がある。Mima を始め他のナイセリア属、グラム陽性度の弱い他種球菌などの鏡検上まぎらわしい菌があるので、グラム染色のみで診断すると、淋疾と誤診する結果となる。Juhlin et al¹³⁾ によると淋疾は男子の 0～29.5%、女子では 0～35% に培養に対してグラム染色の false positive があると報告している。また Scihus et al¹⁷⁾ は淋疾と疑われた患者の 1/3 が Mima 感染であつたと報告している。

FAT による淋疾の診断を文献的にみると、蛍抗体法の検出率、および確実性についての報告はまだそれほど多くないが、Moore et al³⁴⁾ は Deacon の抗体液を用い 477 例の男子患者を検査、441 例 (92.4%) は FAT と培養法で一致し、27 例が FAT 陽性、培養陰性であり、

9例はFAT陰性、培養陽性であった。なおこの9例の中4例は糖分解試験で淋菌と確定されたが、5例はオキシダーゼ検査のみで糖分解試験は行われていない。Mooreはdelayed法による検出率は、直接法よりまさっているが、判定時間がかかることが欠点であるとしている。Lind et al³⁸⁾は材料をtransport mediaで4～5時間保存した後、その塗抹標本を直接法で検査しているが培養法、直接法、delayed法で夫々17.9%、13.2%、19.1%の検出率をえている。Fry et al³⁹⁾は100例の男子、47例の女子の淋疾及び疑わしい患者に応用、男子ではFAT98%、培養で76%、女子ではFAT、直接法で65.0%、delayed法57.5%、培養53%、染色法で51%の成績をあげ、女子についてはとくに検体採取部位を尿道、膣頸管、直腸の4カ所より採りその部位別検査を行っている。Peacock et al³⁷⁾はこれまでの直接法はその判定に1時間前後を、delayed法では凡そ16～24時間必要のため、直接法でより検出率をあげる意味よりFlazorangeによる対比染色を行って、156例の女子例より培養法88例、FAT直接法72例、FAT直接法プラスFlazorange法85例と培養に比較する検出率をあげている。Danielson⁴²⁾は従来のグラム染色法と培養法、FAT法を比較しているが、男子の場合、直接法とdelayed法を、女子の場合delayed法のみを用い75例の男子114回検査、グラム染色で59.6%、培養法71.2%、FAT直接法63.5%、同delayed法76.9%、女子では150例、239回検査、淋疾のうたがいのあるものや、感染源グループではグラム染色法18.5%、培養法55.6%、delayed法68.5%という成績をあげている。男女を通じdelayed法は培養法よりさらにその検出率がすぐれているが、直接法は培養法より多少検出率が低くなっている。なおこのことは治療中のグループについても同様の傾向がみとめられている。以上の報告は直接法は培養法と比べ多少検出率はおとるが、delayed法は培養法よりさらにすぐれた検出率をえている。

著者は、126例の淋疾をうたがわれた患者全例の材料にグラム染色およびFAT染色を行い、またその86例において培養同定法を行つた。

グラム染色では、85例において陰性双球菌の存在を認めたが、これらの症例についてはFAT直接法陽性75例、陰性10例であった。この10例の培養成績をみると、分離菌は淋菌以外のナイセリア2例（男子症例No. 1, No. 3）、ブドー球菌4例、陰性桿菌1例、細菌陰性2例あり、残りの1例ではオキシダーゼ陽性、糖分解でグルコース

のみを弱く分解し淋菌と考えられる菌が分離培養された。次にグラム染色で陰性双球菌を検出しなかつた41例中、4例のFAT陽性例があつた。この4例についての培養をみると、初回の検査でこの中の2例淋菌を証明し、他の1例は2度目の培養で淋菌を検出しえている（男子症例No. 5）。すなわちグラム染色で陰性双球菌を認めなかつたもののうち、FATで4例、培養法で3例（更検を含め）、淋菌を分離しえた。従つてFATと培養成績を参考とするとグラム染色の所見でグラム陰性双球菌をすべて淋菌とすると、false positiveが85例中9例（10.6%）ふくまれ、その原因は淋菌以外のナイセリア、グラム陰性化した細胞内外のブドー球菌、グラム陰性小短桿菌を淋菌と見誤ることが多いと考えられる。またグラム染色で陰性双球菌をみとめなかつた41例中、FATで4例、培養で3例陽性が認められたことによつても知られるように、false negativeの場合もあることになる。

培養同定法は前述の如く従来最も淋菌の検出率が高く、また正確な同定法であることが知られている。今回の実験でグラム染色、FAT、培養同定法を同時に行つた86例について、FATと培養同定法の成績を比較すると、FATは86例中51例陽性、培養同定法では初回検査では46例陽性となり、陽性率は明かにFATがすぐれている。ではその正確性に関して検討する目的で、両検査の不一致症例7例を更検培養同定法で検討してみると、その中の5例が更検による培養で陽性となり、FATの成績と一致した。従つて最後まで不一致の症例は結局2例となり、これはFAT陽性、培養同定法陰性（グラム染色陰性）の1例（女子症例No. 7）と、FAT陰性、培養同定法陽性（グラム染色陽性）の1例（症例No. 6）である。以上の成績は、FATが淋菌の検出において培養同定法よりすぐれていることを充分裏付けるものである。なお本実験においては、一部の患者について蛍光抗体法の直接法と、delayed法が並行して行われたが、その間に成績のちがいを見出された例はなかつたこと、またとくに14例の女子で、培養では3例のみの検出率であつたのに、FATで6例いづれも直接法で検出しえた。以上の如く諸家の報告と同様に、著者の実験でもFATは培養同定法に比適する、あるいはそれ以上淋菌の検出率と同定法の正確性をもつものであることが証明されたが、蛍光抗体法は迅速性、簡便性においても培養同定法にくらべすぐれていることはいうまでもない。

超高圧水銀灯光源と蛍光抗体を備える必要があるが、材料の塗抹標本を蛍光抗体液で染色するだけの、僅かな

手間を必要とするだけで、1時間半以内に判定が可能である。

以上の如く淋疾の蛍光抗体法による診断はあらゆる点において利点を有するので、良質の抗淋菌抗体が市販され本法の普及が望まれる。

V 結 語

淋菌を敏速に、且つ確実に診断することを目的として著者はさきに、特異抗体量が自然抗体量をはるかに凌駕した、特異結合性の高い、すなわち蛋白・色素結合比の低い蛍光抗体を作製することができたが、これをさらに稀釈のみの単純な操作を行うことによつて delayed 法や、対比染色法に比適しうる効果をあげることができた。今回はこれを臨床診断に応用して、従来の診断法の成績と比較検討した。

1. 作製蛍光抗体液は淋菌について特異的に染色し、髄膜炎菌を除く他の保存菌についてはほとんど交叉反応を示さなかつた。抗体液は単にこれを稀釈することにより髄膜炎菌、その他の細菌と交叉を除くことができた。

2. 非淋菌性尿路感染症の32例よりえられた43株の各種新鮮分離菌は、淋菌蛍光抗体液で染色して、すべて陰性であつた。

3. 126例の淋疾を疑われた患者については、グラム染色で陰性双球菌をみとめたもの85例、この中蛍光抗体法で淋菌を同定したもの75例でこれらはすべて培養法でも淋菌を確認することが出来た。蛍光抗体法陰性の10例中、9例はいずれも培養法によつても淋菌は証明されず、淋疾でないケースであつた。グラム染色で陰性双球菌をみとめなかつた41例では、蛍光抗体法で4例陽性例を検出、この中の3例は培養でも淋菌を証明した。

4. グラム染色、蛍光抗体法、培養同定法の3者が平行して行われた86例においては、初回検査で蛍光抗体法で陽性51例、培養同定法で46例に淋菌を検出、同定した。なお培養同定法は更検を行うことによつてさらに5例が陽性となつた。終局的には蛍光抗体法陽性で、培養同定法陰性1例、蛍光抗体法陰性で培養同定法陽性1例の計2例の不一致がみられただけである。

5. 蛍光抗体法と培養同定法(更検を含めて)の成績は上述の如く陽性、陰性においてよく一致し、蛍光抗体法による淋菌の同定の確実性が実証された。さらに初回検査による検出率よりみて蛍光抗体法は培養同定法より優れた診断法といえることができる。

6. 女子の14例の経験で白血球の非特異蛍光除去及び

淋菌検鏡の容易性の点より delayed 法の優位性が認められたが、検出率の点からは直接法と delayed 法との間に差を認めなかつた。

7. 蛍光抗体直接法による淋菌の検出は、検出率、正確性、敏速性、簡易性など勘案すると、すぐれた臨床的検査法であると考案される。

稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた恩師高安久雄教授並びに西浦常雄助教授に深甚の謝意を表すると共に種々御教示戴いた東京大学伝染病研究所常松之典教授、川村明義助教授並びに東大分院黒川一男助教授(現徳島大学教授)に深く感謝致します。又本研究に於ける臨床例に対して御協力戴いた虎の門病院、東京都交通局病院、東京共済病院、台東病院、船員保険芝浦診療所各泌尿器科各位並びに東大分院医局の各位に謝意を表します。

本論文の要旨は日本泌尿器科学会第51回総会(昭和38年)、第275回日本泌尿器科学会東京地方会(昭和38年)、第52回日本泌尿器科学会総会(昭和39年)、日本化学療法学会第12回総会(昭和39年)、日本化学療法学会第9回西日本支部総会(昭和41年)、第15回共済医学会総会(昭和41年)において発表した。

文 献

- 1) Shapiro, L.H.: Am. J. Obst. Gynec., 84, 1806, 1962.
- 2) Rosenblum, B.F.: Public Health Rep., 78, 611, 1963.
- 3) Catterall, R.D.: Lancet, July 20, 103, 1963.
- 4) Ashamalla, G., Walters, N.R. and Crahan, M.: J.A.M.A., 195, 137, 1966.
- 5) Sokoloff, B. and Goldstein, H.: J.A.M.A., 184, 197, 1963.
- 6) Hansen, C.F.: Public Health Rep., 78, 314, 1963.
- 7) Simpson, W.G. and Brown, W.J.: J.A.M.A., 182, 63, 1962.
- 8) Tiedmann, J.H., Hackney, J.F. and Price, E.V.: J.A.M.A., 191, 101, 1965.
- 9) Price, L.N., Randall, E.L., Lentz, J.W. and Schapiro, L.H.: Am. J. Obst. Gynec., 90, 202, 1964.
- 10) Hess, E.V., Hunter, D.K. and Ziff, M.: J.A.M.A., 191, 91, 1965.
- 11) Gästrin, B. and Kallings, L.O.: Acta Derm-Venerol., 44, 286, 1964.
- 12) Willcox, R.R.: Acta Derm-Venerol., 45, 302, 1965.
- 13) Juhlin, I. and Krook, G.: Acta Derm-Venerol., 45, 142, 1965.
- 14) 大越正秋: 治療, 44, 1986, 1962.

- 15) 大越正秋：治療，44，2166，1962.
- 16) 水野重光：Medical Postgraduates, 3, 11, 1965.
- 17) Svihus, R. H., Lucero, E. M., Mikolajczyk, R. L. and Carter, E. E.: J.A.M.A., 177, 121, 1961.
- 18) Ino, J., Neugebauer, D. L. and Lucas, R. N.: Am. J. Clinic. Path., 32, 364, 1959.
- 19) Cary, S. G., Lindberg, R. B. and Faber, J. E. Jr.: J. Bact. 75, 43, 1958.
- 20) Brodie, J. and Henderson, A.: J. Clin. Path., 16, 49, 1963.
- 21) Japlin, D., Rebell, G. and Zaiss, N.: J.A. M.A., 186, 952, 1963.
- 22) Lothe, F. and Griffin, E.: J. Clin. Path., 18, 301, 1965.
- 23) Elston, H. R. and Hoffman, K. C.: Am. J. Med. Science., 76, 113, 1966.
- 24) Lodin, A., Nyström, B. and Rosengren, S.: Acta Derm-Venerol., 44, 127, 1964.
- 25) Björnberg, A.: Acta Derm-Venerol. 45, 309, 1965.
- 26) Krook, G. and Juhlin, I.: Acta Derm-Venerol., 45, 242, 1965.
- 27) Juhlin, I.: Acta Derm-Venerol., 45, 231, 1965.
- 28) Juhlin, I.: Acta Derm-Venerol., 45, 223, 1965.
- 29) Gjessing, H. C. and Ödegaard, K.: Acta Derm-Venerol., 44, 132, 1964.
- 30) Deacon, W. E., Peacock, W. L., Jr. Freeman, Elizabeth, M. and Harris, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 101, 322, 1959.
- 31) Deacon, W. E., Peacock, W. L., Jr. Freeman, Elizabeth, M., Harris, A. and Bunch, W. L.: Public Health Rep., 75, 125, 1960.
- 32) Harris, A., Deacon, W. E., Tiedermann, H. and Peacock, W. E. Jr.: Public Health Rep., 76, 93, 1961.
- 33) Brown, L., Copeloff, M. B. and Peacock, W. L., Jr.: Am. J. Obst. Gynec., 84, 753, 1962.
- 34) Moore, M. B., Vamder Stop, E. M., Wende, R. D. and Knox, J. M.: Public Health Rep., 78, 90, 1963.
- 35) Kellog, D. S. and Deacon, W. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 963, 1964.
- 36) Fry, C. S. and Wilkinson, A. E.: Brit. J. Vener. Dis., 40, 125, 1964.
- 37) Peacock, W. L., Jr. and Jhazer, J. D.: Public Health, Rep., 79, 119, 1964.
- 38) Lind, I.: Proc. Northrn Dermat. Society, P. 53, May 31-June 2, 1962.
- 39) Schapiro, L. H. and Lentz, J. W.: Obst. Gynec., 21, 435, 1963.
- 40) 斎藤功：日泌尿会誌，55，463，1964.
- 41) Danielson, D.: Acta Derm-Venerol., 43, 451, 1963.
- 42) Danielson, D.: Acta Derm-Venerol., 43, 511, 1963.
- 43) Daneilson, D.: Acta Derm-Venerol., 43, 61, 1965.
- 44) Danielson, D.: Acta Derm-Venerol., 45, 74, 1965.
- 45) 川村明義，川島豊作，塩入康平：最新医学，17，2739，1962.
- 46) Coons, A. H., Creech, H. J. and Jones, R. N.: Proc. Soc. Exp. Biol., 47, 200, 1941.
- 47) Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. and Berliner, E. J.: Immunol., 45, 159, 1942.
- 48) Coons, A. H. and Kaplan, M. H.: J. Exp. Med., 91, 1, 1950.
- 49) Kaplan, M. H., Coons, A. H. and Deacon, H. W.: J. Exp. Med., 91, 15, 1950.
- 50) Coons, A. H., Creech, H. J., Johnes, R. N. and Berliner, E.: J. Immunol., 45, 159, 1942.
- 51) Goldmann, M. and Caever, R. K.: Science, 126, 839, 1957.

(昭和42年6月9日受付)