肺結核患者の血中抗体について

細 田 行 隆

東京大学医学部衛生学教室

[受付: 5月12日・1958年]

Keogh, Fischer¹⁾, Middlebrook²⁾等によつて百日咳菌, 結核菌等の特異抗原による抗原感作赤血球凝集反応及び溶血反応³⁾が紹介されて以来, 多くの追試研究の報告があつた。肺結核患者の血清について行つた報告も多数であるが, それらは主にツベルクリン感作赤血球凝集反応に関するもので^{4) 5) 6)}, 溶血反応を併せ検討したものは^{7) 8) 9) 10) 11)}比較的に少い。陽性率に関する諸家の報告を見ると高いもので80~90%であり, 低いものでは50~60%と云うことになっている。又病状と血中抗体量との関係について検討された報告もあるが, 大体において重症例では陽性率, 抗体価共に高く, 軽症例では低いと報告されている。進藤^{12) 13) 14)}はMiddlebrookとの共同研究によつて次元的解析を行い, 非常に鋭敏な反応方式(進藤・Middlebrook方式)による溶血反応を案出した。その報告によれば米国における結核患者については88.9%に陽性であり, 健康者についても4.4%の陽性率であつたが, 健康者ではその方式による反応陽性のpatternの傾斜がゆるく補体量の多い部位に位置するのに反し, 患者ではpatternの傾斜も急であり少量の補体によつても反応著明であつた。又進藤帰国後吾国の患者について行つた実験¹⁵⁾でも結核患者では抗体価高く, patternも立った形の例が多く米国における患者の成績と大差はないが, 健康者血清の成績は大いに様子が違つていた。即ち吾国は世界でも有数の結核国であり, またツベルクリン皮内反応検査或はBCG注射等がしばしば行われるために相当結核抗体を保有しているので, 溶血反応陽性率高く, patternも結核患者のそれに近い結果になつてい^{16) 17) 18)}。また進藤・歌橋等是不完全抗体証明法であるCoomb's testの原理¹⁹⁾と抗原感作赤血球凝集反応の理論とを組合せて新しい不完全抗体証明法^{20) 21)}を考案し, 結核菌抗原に対する抗体にも不完全抗体の存在することを明らかにした。この論文の目的はMiddlebrook & Dubos法による抗原感作赤血球凝集反応, 進藤・Middlebrook方式による溶血反応に併せて進藤・歌橋法によ

る不完全抗体証明法を行い, 徹底的に血中抗体の追究を行い, 他方それら患者の病状と血中抗体量との関係を検討するにある。

材料及び手技

検索過程の概要は次の通りである。まず患者血清につきMiddlebrook & Dubos法による抗原感作赤血球凝集反応と抗体稀釈, 補体減量の次元的解析を目的として進藤・Middlebrook方式による溶血反応を行い, 然る後に赤血球凝集反応陰性の血清及び陽性のものについては終末凝集価以上の稀釈液について進藤・歌橋法による不完全抗体証明法を行つた。稀釈及び洗滌にはすべて磷酸緩衝生理食塩水を使つた(以下略して生理食塩水と記載する)。

可検血清: 東京共済病院及び船員保険東京中央病院に入院中の肺結核患者 200名及び臨床的細菌学的に治癒したと思われる29名の血清を使用した。血清は56°C30分非働化し, 10%綿羊赤血球浮游液を血清の10倍量加え, よく混合して室温に30分間放置後遠心沈澱し, 上清を分離して10倍稀釈の血清とした。5倍稀釈の場合には20%綿羊赤血球浮游液を血清の5倍量加え同様に処理した。

抗原液: ツベルクリン分割 Fr. II (PS) の1%溶液を生理食塩水で1:10(先に進藤等の発表^{11) 12) 13)}したLederle製 Fr. II (PS) の1:7.5に相当する)に稀釈した抗原液 1.6mlに洗滌沈澱した綿羊赤血球を0.1mlの割合になる様に添加し, よく混合して37°Cの水浴中に2時間放置して抗原を吸着する。次いで生理食塩水で3回よく洗滌し遠心沈澱して上清を棄て0.5%抗原感作赤血球浮游液を作つた。対照として抗原感作処置をし, ない綿羊赤血球を同様に処理し, 0.5%の赤血球浮游液

HOSODA Yukitaka: Studies on the antibodies in the sera of the pulmonary tuberculous Patients. Department of Hygiene, School of Medicine, University of Tokyo. —Jap. J. of Bact., 13(10), 929-933, 1958.

とした。

補体：健常モルモットから心臓穿刺によつて採血し、血清を分離し之に洗滌した綿羊赤血球を50%の割合に加えて混合し20分間4℃に保つた後、遠心分離し、米国軍医学校法により補体力価測定を行い、後述の様に補体稀釈液を作つて使用した。

手技：

1) Middlebrook & Dubos 法による赤血球凝集反応

1:10~1280 迄倍数稀釈した可検血清0.25ml ずつを盛つた各々の小試験管に0.5%抗原感作赤血球浮游液0.25ml を加え、37℃の水浴中に1時間保つた後4~6℃の氷室に入れ16~18時間後とり出して判定した。対照として抗原感作赤血球浮游液と生理食塩水を加えた抗体対照及び血清の各々の稀釈液と非感作赤血球浮游液を加えた抗原対照を平行して検査した。

2) 進藤・Middlebrook 方式による溶血反応

2 次的に pattern を完全に追究することは多数検査材料については困難なことである。また凡その Pattern については進藤・Middlebrook 等の報告及び吾国の材料については進藤等が既に報告しているが、それを案ずるに一定抗体稀釈でどの程度の少量の補体によつて溶血反応が起るかが病状との比較に意味があるであろうと考えられた。また補体量の最少量を測定することの方が患者と健康者の区別の標準になるのではないかと考えられたのである。それ故補体量4単位における溶血反応の抗体価と可検血清10倍稀釈における溶血反応の最少補体量を測定する2例の試験管列の実験を行つたのである。こゝで問題になるのは prozone であるが、既に進藤等が報告した様に所謂健康者血清では凡そ5~10倍稀釈の辺りに prozone の出ることがある。けれども患者については、今迄の所著明な prozone を証明していないし、大体可検血清10倍稀釈の辺りでは prozone の影響による反応阻止は現われないであろうと云う根拠から10倍稀釈一定で溶血に要する最少補体量を測定比較したのである。

a) 可検血清10倍稀釈における溶血反応の最少補体量測定にあつては、10倍稀釈した可検血清0.25ml ずつを7本の小試験管に分注し、その各々に抗原感作赤血球浮游液0.25ml を加え、更に0.05ml 中に4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625 単位を減量的に含む様に稀釈した補体液0.05ml ずつを階段的に各管に加えた。b) 補体4単位における溶血反応の抗体価測定にあつては可検血清を1:10~1280迄倍数稀釈し、その各々の0.25ml ずつを1列の小試験管に分注し、感作赤血球浮游液0.25ml ず

つを加え、更に0.05ml 中に4単位の補体を含む様に稀釈した補体液0.05ml ずつを各試験管に加えた。充分振盪してから4℃~6℃の氷室中に保ち、1時間後とり出して37℃の水浴中に浸し、30分後とり出して判定した。猶、赤血球凝集判定後にも4単位の補体を含む補体液0.05ml ずつを各試験管に加え、充分振盪後30分間37℃の水浴中に保つて溶血反応の判定を行つた。対照としては上記の対照の外に非感作赤血球浮游液と生理食塩水を加えたものをおき、それぞれの試験管には本試験に使用したと同じ単位量の補体を加えた。

3) 進藤・歌橋法による不完全抗体証明法

赤血球凝集反応判定後、陰性のものについては各管に、また陽性のものについては終末凝集価以上の稀釈液各管に約4mlの生理食塩水を加えよく振盪し、洗滌遠心する。以上の操作を3回繰返し、血球を洗滌して最後に充分上清を除去した後、各試験管に生理食塩水0.25ml 及び抗人γグロブリン家兎血清(56℃30分非働化後綿羊赤血球及び結核乾燥菌体で吸収し、1:20に稀釈したもの)0.25ml を加え、37℃の水浴中に30分浸した後4~6℃の氷室に入れ、16~18時間後とり出して判定した。

以上の3反応の判定は既に成績の判つている陽性血清を対照とした試験の結果に比較して行つた。

4) 判定基準

進藤の著書(血清反応とその実際, 113頁, 医学書院)によつたがその大要は次の通りである。

赤血球凝集反応……その程度により卅, 卅, +, ±, -の符号で判定した。

溶血反応……その程度により4(完全溶血), 3(約75%溶血), 2(約50%溶血), 1(約25%溶血) 0(非溶血)の符号によつて判定した。図1では溶血反応を陽性の終末試験管の溶血の程度即ち凡その溶血%に比例させてその区劃内に記録したのである。

進藤・歌橋法による不完全抗体証明法の判定は既報²⁰⁾によつた。

5) 病状分類

肺結核の病状分類は N. T. A. (National Tuberculosis Association) の肺病巣の拡りによる分類によつて, Minimal 軽度, Moderately advanced 中等度, Far advanced 高度の3群に分けた。

成 績

1) 抗原感作赤血球凝集反応の成績：

表1に示した様に200例中129例64.5%が陽性であつた。病状別に陽性率を見ると中等度が76.5%で最高を示

表 1 抗原感作赤血球凝集反応の成績

病状分類	例 数	陰 性	陽 性	陽 性 率
高 度	50	15	35	70%
中 等 度	68	16	52	76.5%
軽 度	82	40	42	51.2%
総 計	200	71	129	64.5%
治 癒 者	29	24	5	17.2%

し、高度が70%でこれに次ぎ、軽度では51.2%であった。これとは別に治癒者29例について行つた検査の結果は17.2%と云う低率であった。凝集価の平均は高度24倍、中等度22倍、軽度19倍であり、治癒者では12倍であった。

2) 進藤・Middlebrook 方式による溶血反応の成績:

表2に示した様に200例中168例84%が陽性を示した。病状別に陽性率を見ると中等度が88.2%で最も高く、高度は88%で殆ど同率であり、軽度は78%であった。治癒者では34.4%であった。図1は補体量4単位における溶血反応の抗体価を縦軸にとり、10倍稀釈にお

表 2 溶血反応の成績

病状分類	例 数	陰 性	陽 性	陽 性 率
高 度	50	6	44	88%
中 等 度	68	8	60	88.2%
軽 度	82	18	64	78%
総 計	200	32	168	84%
治 癒 者	29	19	10	34.4%

図 1

る補体減量による溶血価を横軸として記録したものである。枠外の点(32例)は溶血反応陰性のものである。例外もかなり多く見られるが、大体において重症例ほど抗体価高く、少量の補体量で溶血する結果であり、軽症例では抗体価低く、補体量も大量ではじめて溶血する傾向にある。抗体価及び最少補体量の平均はそれぞれ高度では192倍、0.85単位、中等度では176倍、0.92単位、軽度では97倍、1.62単位であり、治癒者では85倍、1.85単位であった。

3) 進藤・歌橋法による不完全抗体証明法の成績:

赤血球凝集反応陰性の71例に対し進藤・歌橋法による

表 3 進藤・歌橋法による不完全抗体証明法の成績

病状分類	例 数	陰 性	陽 性	陽 性 率
高 度	15	8	7	46.7%
中 等 度	16	9	7	43.8%
軽 度	40	28	12	30%
総 計	71	45	26	36.6%

表 4 赤血球凝集反応陽性の例について凝集価以上の稀釈液で行つた進藤・歌橋法の成績

	赤血球凝集反応+ 溶血反応+ 52		赤血球凝集反応+ 溶血反応- 10	
進藤・歌橋法による不完全抗体証明法	+	-	+	-
	8	44	0	10

不完全抗体証明法を行つた結果、表3に示した様に26例36.6%が陽性であった。病状別では高度が46.9%、中等度が43.8%、軽度が30%の陽性率であった。次に赤血球凝集反応陽性の例についてその各々の凝集価以上の稀釈液について進藤・歌橋法を行つた結果、表4に示した様に赤血球凝集反応陽性、溶血反応陰性の10例ではすべて陰性であり、赤血球凝集反応溶血反応共に陽性の119例中(材料の関係で一部についてしか検査が出来なかった)52例について行つた結果では8例で15.4%に陽性であった。以上3法の関係は表5に示した通りである。

表 5 3法の関係

赤血球凝集反応	+		-	
	129		71	
溶 血 反 応	+	-	+	-
	119	10	49	22
進藤・歌橋法による不完全抗体証明法	/		+	-
			22	18

表 6 可検血清 10 倍稀釈以上で抗体を証明し得なかつた 18 例について 5 倍稀釈で行つた成績

血清番号	病状	排菌	血沈 1 時間値	赤血球凝集反応	溶血反応	進藤・歌橋法
No. 21	高	ガフキー 4	42	+0	0	
55	軽	—	12	-1	1	+
70	軽	—	7	++0	0	
85	中	ガフキー 4	9	+0	0	
91	中	—	45	+0	0	
95	高	—	33	+0	0	
97	軽	—	1	-0	0	—
132	軽	—	12	-0	0	—
135	軽	—	26	+0	0	
208	高	+	8	+2	2	
222	中	—	92	-0	0	—
226	軽	—	17	-0	0	—
231	軽	—	7	±0	0	
247	軽	ガフキー 7	5	+0	0	
325	軽	—	3	+0	0	
330	軽	—	4	-1	0	—
335	軽	—	5	+0	0	
348	高	—	50	+2	0	

4) 可検血清 10 倍稀釈以上で抗体を証明し得なかつた 18 例についての追究：

とにかく以上の 3 反応によつて完全或は不完全抗体のいずれかの形で証明されたものは可検血清 200 例中 182 例で 91% であつた。そこで残りの抗体を証明出来なかつた 18 例について更に可検血清の 5 倍稀釈液によつて 3 反応を検査した所、表 6 に示した様に 14 例に抗体を証明することが出来、残りの 4 例はなほも全く陰性と云う結果であつた。表中赤血球凝集反応の欄の数字は赤血球凝集反応判定後補体を加えた溶血反応の成績である。結局 200 例中 196 例即ち 98% に結核抗体が証明されたことになる。全く陰性であつた 4 例については色々の批判のある所であつて、今後の研究に俟つべき所である。

考 察

以上の実験によつて肺結核患者血清の大部分に結核抗体を証明することが出来た。証明出来なかつた 4 例について更に検討して見ると、その中 3 例は軽度で本実験後 6 カ月目の調査では既に治癒退院しているのであるから、本実験を行つた頃には既に治癒に向つていたために特異抗体が試験管内反応では証明出来ない程度に消費減退し、同時に抗体産生機序も停止している状態ではない

かと考えられる。勿論健康者でも全く陰性と云う例は吾国においては少いのであるから結核症と診断された場合の全く陰性には特別の意味があるかも知れない。また他の 1 例は中等度で血沈値も極めて大（1 時間値 92 ミリ）であつたが、病状の一方的進展のために抗体が消費しつくされたか又は抗体産生の力がなくなつたために試験管内で証明出来ない程度となつていたのではなからうかと考えられる。同様の事柄が赤血球凝集反応、溶血反応において中等度が高度よりも高い陽性率を示し、又高度であり乍ら低い抗体価を示した例について考えられるのである。

抗体を証明する方法として以上の 3 法を比較すると、可検血清 200 例中 10 倍稀釈では赤血球凝集反応陽性が 129 例 64.5% で陽性率が比較的低い、赤血球凝集反応陰性 71 例について更に進藤・歌橋法を行なうと 26 例が陽性となり、この両反応の陽性例を合すると 155 例が陽性で 77.5% の陽性率となる。ところが溶血反応では 84% であるから補体を使用する手数はあつてもやはり溶血反応は最も鋭敏な反応と考えられる。しかし溶血反応が陽性でも赤血球凝集反応が陰性であつたり、赤血球凝集反応が陽性で溶血反応が陰性の場合があり、又両方とも陰性で進藤・歌橋法だけが陽性に出ることもあるから、徹底的に血中抗体の追究を行うためには赤血球凝集反応、溶血反応及び進藤・歌橋法による不完全抗体証明法の 3 者

図 2 赤血球凝集反応・溶血反応共に陽性のものについて凝集価以上の稀釈液について行つた進藤・歌橋法陽性の 8 例についての 3 反応の終末価比較

を併せ行う必要がある。

次に赤血球凝集反応陽性の可検血清について凝集価以上の稀釈で行った進藤・歌橋法の成績を見ると、溶血反応陽性のものでは全例陰性であつたのに反し溶血反応陽性のものでは15.4%に不完全抗体を証明している。しかもこれら8例は図2に示した様に溶血価の高いものが大部分であつた。溶血価の低いものでは完全抗体による凝集価の pattern の範囲内に不完全抗体の pattern がかくれて失うと考えられるから、赤血球凝集反応・溶血反応共に陽性の血清中には完全・不完全抗体が含まれ、赤血球凝集反応陽性、溶血反応陰性の血清中には主として完全抗体が含まれていると想像出来るのである。

Middlebrook & Dubos のツベルクリン感作赤血球凝集反応発表以来、これを臨床診断に応用しようという努力が諸家によつてされて来たのであるが、本実験の結果からも判る様に、軽症又は治癒者であり乍ら高い抗体価を示すものや、重症の患者であり乍ら抗体価の低い場合もあつて、個々の例については相当に診断の参考とはなるが決定的なものとは考えられない。それ故寧ろ以上の事項に留意して時日の経過を追つて検査して行けば病状診断の一助になると考えられる。

結 論

1) 肺結核患者の血清についてツベルクリン分割 Fr. II (P S) を抗原として Middlebrook & Dubos の抗原感作赤血球凝集反応、進藤・Middlebrook 方式による溶血反応及び進藤・歌橋法による不完全抗体証明法を行い、98%に結核抗体が完全或は不完全抗体のいずれかの形で証明された。

2) 赤血球凝集反応では64.5%、溶血反応では84%の陽性率であつた。赤血球凝集反応陰性の例について行つた進藤・歌橋法の陽性率は86.6%であつた。

3) 病状別に陽性率を見ると赤血球凝集反応では高度70%、中等度76.5%、軽度51.2%であり、溶血反応では高度88%、中等度88.2%、軽度78%であつた。進藤・歌橋法では高度46.7%、中等度43.8%、軽度80%であつた。

4) 溶血価の高いものでは凝集価以上の稀釈液において不完全抗体が証明された。

5) 病状が悪くなるにつれて抗体価が高まり、少量の補体量で反応する傾向であるが、個々の例についてはこれらの反応は診断の参考とはなるが決定的なものとは考

えられなかつた。

6) また血中抗体を追究するためには赤血球凝集反応・溶血反応及び進藤・歌橋法による不完全抗体証明法の3者を合せ行う必要のあることが判つた。

稿を終るに臨み、東京大学医学部衛生学教室羽里彦左衛門教授、伝染病研究所進藤宙二博士の御指導並びに御校閲に対し、又同僚諸兄の御援助に対して深甚の謝意を表すると共に、材料の分与を受けた東京共済病院並びに船員保険東京中央病院の各位に謝意を表します。

(本論文の大意は第10回日本細菌学会関東支部例会昭和32年6月松本において発表した)。

文 献

- 1) Fischer, S., Keogh, E. V.: Nature, 165, 248, 1950.
- 2) Middlebrook, G., Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 3) Middlebrook, G.: Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
- 4) Rothbard, S. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 35, 303, 1950.
- 5) 矢追秀武等: 総合医学, 8, 109, 165; 412, 1951.
- 6) 熊谷直秀: 日新医学, 38, 481; 1951.
- 7) 根津尙光: 日本細菌学雑誌, 7, 5, 477, 1952.
- 8) 根津尙光: 日本細菌学雑誌, 8, 7, 777; 8, 8, 813, 1953.
- 9) 北本治等: 東京医事新誌, 71, 3, 9; 71, 12, 689, 1954.
- 10) 斎藤典穂: 東京医事新誌, 72, 10, 15, 1955.
- 11) 進藤宙二, 歌橋昭和, 檜山斌男, 芳賀邦夫: 日本細菌学雑誌, 12, 4, 303, 1957.
- 12) Sindo, T., Middlebrook, G., Oestreicher, R.: Japan. J. Tuberc., 2, 4, 345-360, 1954.
- 13) Sindo, T., Oestreicher, R., Middlebrook, G.: Japan. J. Tuberc., 3, 1-2, 54-60, 1955.
- 14) 進藤宙二: 血清学の新しい見方と考え方, 医学書院, 二版, 1956.
- 15) 進藤宙二, 歌橋昭和, 檜山斌男, 芳賀邦夫, 細田行隆: 最新医学(印刷中).
- 16) 岡田毅, 丸山寛, 歌橋昭和: アレルギー, 6, 6, 469, 1958.
- 17) 歌橋昭和等: 第5回日本アレルギー学会総会記録(札幌), 1956.
- 18) 進藤宙二: アレルギー, 5, 6, 361, 1957.
- 19) Coombs, R. R. A. et al.: Brit. J. Exp. Path., 26, 255, 1945.
- 20) 進藤宙二, 歌橋昭和, 檜山斌男, 芳賀邦夫, 糸井教雄, 市川洋一: 日本細菌学雑誌, 12, 5, 389, 1957.
- 21) 歌橋昭和: 日本細菌学雑誌, 12, 6, 463, 1957.