リケッチアの肉眼的凝集反應に就いて

北岡正見 井上裕正

國立予防衛生研究所

〔受付: 1月23日, 1951年〕

まえがき

発疹チフス, 発疹熱, ロッキー山熱及び痘瘰癧熱等の病原体が何れもリケッチア(以下Rと略)属に属する事が明かとなつて以来, Rそのものを抗原とする凝集反應が夙に試みられ, 此れ等R症の診断¹⁾²⁾, 類症鑑別³⁾⁴⁾のみならず, 各種Rの抗原構造⁵⁾⁶⁾の研究にも應用されるに至つた。

凝集反應の抗原として, 有毒ダニの卵(ロッキー山熱¹⁾), 有毒シラミの腸乳劑⁸⁾⁷⁾³⁾⁵⁾(発疹チフス, 痘瘰癧熱²⁾) 感染ラットの腹腔洗滌液(発疹チフス⁷⁾), 組織培養¹⁰⁾(発疹チフス), マウス或はラットの罹患肺¹⁰⁾(発疹チフス¹¹⁾), 発疹熱⁹⁾等が用いられ又その術式も当初はギムザ染色標本を作り餘微鏡下で凝集状態を判読する所謂顯微鏡法¹²⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁶⁾が専ら行われた。

1932年に至り Zinsser³⁾が特別の毛細試験管を作り, 抗原と血清を夫々 0.025 cc 宛入れ, 40°C の温浴槽中に2~5時間, 次に氷室に一夜放置し, 然る後肉眼をもつてその凝集を判読する方法を発表して以来, この方法⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾及びその変法¹¹⁾が行われていた。即ちR凝集反應の抗原作並に術式には種々の困難があつたのである。しかるに1938年 Cox⁶⁾によりRの卵黄囊内培養が報告されるに及び, 純粋なRを濃厚に大量に得ることが容易となり, R凝集反應の術式にも急速の進歩が齎された。即ち Plotz¹²⁾は Cox-Craigie 法によつてR抗原を作り一般細菌の如くウイダール用小試験管中に抗原及び血清を夫々 0.25 cc 宛入れ, 42°C, 4時間, 次に氷室(4°C)に16~18時間放置し, 然る後その凝集を肉眼的に判読した。この方法の欠点は多量の抗原を必要とすること, 従つて抗原を節約するため載物硝子上の方法が報告されて来た(Fitz-Patrick²¹⁾, Castaneda⁹⁾, 北岡²⁰⁾)。

著者等は更に微量の抗原を用い, 被檢血清内の定量的R凝集素の測定法を案出した。即ち凹窩載物硝子上で滴数法により血清を稀釈し, 抗原を一滴宛加えて混合し肉眼をもつてその凝集状態を判読した。これによつて発疹チフス疾患群と他の急性傳染病とを區別し得るのみならず, 発疹チフスと発疹熱をも容易に鑑別し得る。

I. 器具機械: 1 cc 約20~25滴になる様に尖端を加

工したガラスピペット 数本

直径 1~2 cm, 深さ 0.5 cm の凹窩が四つある載物硝子 数枚

透過光源。37°C 孵卵器。冷蔵庫。

II. 術式: 発疹チフス, 発疹熱を鑑別する場合の術式に就いて述べれば

(1) 上記の凹窩載物硝子を図の如く, 二列に2枚づゝ横に並べる。

(2) 上記のピペットで生理食塩水(pH 7.0 に修正)を第一列, 1 の凹窩に9滴, 第二列の1の凹窩をのぞき, その他のすべての凹窩に1滴づゝ滴下する。

(3) 被檢血清を第一列, 1 の凹窩に1滴落しよく混合する。血清は 1:10 倍に稀釈されたことになる。

(4) 次に第一列の1の凹窩に1滴残し矢の方向に第一列の2, 第二列の1及び2の凹窩に各々1滴づゝ滴下する。

(5) 第一列の2凹窩より横に7の凹窩までピペットを用ひ滴数法による2倍稀釈を行う。

(6) 第二列も亦2より7まで同じ操作を反復する。かくして第一列, 第二列共血清が滴数法による 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 に稀釈される。なほ第一列, 第二列の第8番目の凹窩は対照とする。

(7) 予め抗原價の測定してある発疹チフス(R.p.), 発疹熱(R.m.)の抗原を第一列にはR.p, 第二列にはR.mを夫々1滴づゝ滴下する。かくして血清は同量の抗原の添加により, すべて2倍に稀釈され, 1:20, 1:40, 1:80……となる。

KITAOKA, Masomi, INOUE, Hiromasa: The National Institute of Health of Japan.

(8) 載物硝子を前後左右に動かし、内容をよく混合した後、蒸発を防ぐために同じ凹窩載物硝子を逆に重ね、37°C の孵卵器に6時間、次いで 4~10°C の氷室に一夜放置し、然る後下方よりの透過光線をもつてその凝集を肉眼的に判読する。

(9) メチレン青或はゲンチアナ紫を添加した抗原を用いれば透過光線で検査しなくとも載物硝子を白紙の上に置くのみで肉眼的に容易に凝集状態が判読出来る。

(10) 判定、対照と同じく一様に混濁しているもの(0)対照に比してやや細かい凝集塊が認められるもの(±)、細かい凝集塊がかなり認められるもの(1)、細かい凝集が確かに認められるが、その周囲が混濁しているもの(2)、強く凝集しその周囲が全く透明なもの(3)、(1)より(2)に近いものを(2-)とする。(2-)以上を陽性の限界とする。

このような簡単な術式も次ぎに述べる実験的基礎の上に築き上げられたものである。

(i) 作用温度並に時間の R 凝集反応に及ぼす影響

肉眼的 R 凝集反応の作用温度としては 40°C³⁾¹¹⁾¹³⁾, 42°C¹²⁾¹⁵⁾, 37°C⁴⁾⁵⁾⁸⁾¹⁴⁾ 及び室温等⁹⁾¹⁶⁾²⁰⁾ が用いられ、亦その作用用時間として、2~5 時³⁾⁴⁾⁵⁾ 又は 24 時間⁸⁾ が使用されている。

著者等も作用温度並に時間と凹窩載物硝子上の R 凝集反応との関係を見る爲、室温 (12°C), 32°C, 37°C 及び 42°C の夫々の温度に於て、種々なる時間作用させ R 凝集状態を 2 時間, 3 時間, 4 時間, 6 時間及び氷室一夜放置後と逐時観察した (表略)。

即ち 42°C では反応が最も早く出現し、6 時間で R 凝集が完了し、37°C では 6 時間でなほ不完全、氷室に一夜放置する事によつて始めて完了し、32°C、室温では反応は遅く、32°C では反応完了に 24 時間を要し、室温では 24 時間経過しても R 凝集反応は殆んど認められなかつた。42°C の孵卵器を用意する事は一般の研究室では望めないから 37°C 6 時間、次いで 4~10°C の氷室に一夜放置して R の凝集状態を判読する事にした。

(ii) 本反応の信頼度

本術式は使用抗原量を節約する目的で先ず滴数法により血清を稀釈し、次いで抗原を滴下してある。従つて小試験管内定量法に比して凝集價の誤差が大きいのではなからうかと疑はれるのであるが、同一血清について検査日

を異にして測定しても、その結果に殆んど差異がないのである (表略)。

(iii) 本反応の特異性

R 凝集反応の特異性殊に Weil-Felix (W.F. と略) 反応、補体結合反応との関係に就いては種々なる報告がある。R 凝集反応は W.F. 反応より早く (Hammarström¹⁴⁾, Fitz-Patrick¹⁰⁾, Hudson¹¹⁾ 遅れて (Nelson¹³⁾, Plotz¹²⁾, Addison¹⁵⁾), 或は同時に平行して (Castaneda⁵⁾⁹⁾, Packalin¹⁶⁾, Giroud¹⁷⁾) 出現すると言はれ定説がない。蓋し W.F. 反応の本態からすれば、こんな結論になるのも已むを得ない事であろう。R 凝集反応は補体結合反応より

第 1 表 発疹熱患者血清の検査 (金〇)

病日	ワイル・フェリックス反応	凝集反応		補体結合反応		
		Rp 抗原	Rm 抗原	可溶性 Rm	Rp 抗原	Rm 抗原
2	20			0	0	0
3	20	0	0	0	0	0
6	2560	0	40	0	0	0
8	5120	0	40	10	0	10
13	10240	20	80	40	20	80
18	5120	0	40	10	0	40
23	2560	0	20	0	0	40
28	1280	0	20	0	0	10
33	1280	0	20	0	0	10

早く (Plotz¹²⁾¹³⁾, Addison¹⁵⁾, Nelson¹³⁾) 出現し、しかもその特異性に於て前者が勝るといふもの (Nelson¹³⁾), 亦両者略同じであると言ふもの (Castaneda⁹⁾, Packalin¹⁶⁾, Plotz¹⁸⁾) も居る。

本術式による R 凝集反応は特異的である。之によつて他の急性傳染病から発疹チフス疾患群を区別する事が出来るのみならず、発疹チフス、発疹熱を相互に鑑別し得るのである。また本反応は W.F. 反応より少し遅れて或は殆んど同時に出現し、補体結合反応より早く出現することは、一発疹熱患者血清の逐日的検査 (表 1) によつて明らかである。

III 抗原: (i) 抗原の作り方, R 凝集反応に於て特異的な抗原價の高い抗原を作ることが重要である。

著者等の抗原は Cox-Cragie 法によつて作られたワクチンを 6000~7000 r.p.m 30~60 分間或は 4000 r.p.m 2~3 時間遠心し、此の沈渣を磷酸緩衝食塩水 (pH 7.0) で 2~3 回洗滌し、原量の約 1/40~1/50 に濃縮したものである。R は保存中屢々自然凝集を起すから、これ防ぐため、抗原に正常人或は健康モルモット血清、又はゲラチ

ンを0.5%の割に加えて置く。

(ii) 抗原價測定 R体を濃縮したからとて直ちに抗原として使用出来ない。Rの抗原性は一般細菌のそれと趣きを異にし、R体が濃縮されたに拘らず、その抗原性が失くなり、R凝集反應が全く出現しなかつたり、或は発疹チフス、発疹熱の鑑別が出来ないことがある。従つて出来上つた抗原に就ては必ず既知血清を以て抗原價を測定する必要がある。

Plotz¹²⁾は抗原 0.25 cc 中に10~20單位(補体結合反應單位に対し)が含まれる様にし、又 Castaneda⁹⁾は家兎免疫血清を用い、予備的凝集反應を行い1~3分以内

第2表 抗原の抗原價測定

抗原	血清濃度	抗原濃度							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
A	Rp	1:1	3	3	2	2	2	1	0
		1:2	3	3	2	2	2	±	0
		1:4	0	0	0	0	0	0	0
	Rm	1:1	3	2	2	1	0	0	0
		1:2	2	2	1	0	0	0	0
		1:4	0	0	0	0	0	0	0

使用血清, 抗 Rp 血清 (No. J.-1038)

C-F-T E 320 M 1:0

抗原	血清濃度	抗原濃度							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
B	Rm	1:1	3	3	3	2	1	0	0
		1:2	3	2	2	2	0	0	0
		1:4	1	0	0	0	0	0	0
	Rp	1:1	2	2	±	0	0	0	0
		1:2	2	2	0	0	0	0	0
		1:4	0	0	0	0	0	0	0

使用血清, 抗 Rm 血清 (No. W-O)

C-F-T E 0 M 1:160

37°C 6 時間一夜放置

に凝集を呈するものを抗原として使用した。

上述の如く約 $\frac{1}{40} \sim \frac{1}{50}$ に濃縮した抗原を 1:1, 1:2, 1:4 と稀釈し、既知患者血清又は既知免疫血清を用い、R補体結合反應に於て指摘した(北岡²²⁾)と同様に、反應の場を作り、定量凝集反應を行い、使用さるべき抗原の稀釈濃度を決定する(表2)。

A並にBに於て血清單位はそれぞれ1:320及び1:160である。その1~2單位(1:160並に1:80)に対しR凝

集陽性で而も R.p と R.m が區別出来る抗原稀釈倍数即ち何れも 1:2 稀釈抗原が本反應に用ゆべき1單位抗原である。4 單位の血清を以て、2 單位の抗原を測定する補体結合反應の抗体價測定の如き複雑さはない。

しかし抗原内のR数が余りに少なかつたり濃厚に過ぎると肉眼的にR凝集状態を判読する事は困難である。1 單位の抗原は必ずしも同一R数を含んで居るのではないが、要は R.p と R.m が明らかに區別する事が出来而も肉眼的に判読出来る抗原1單位を用いれば足りる。抗原は 4~10°C の冷蔵庫内では6ヵ月以上保存に耐える。

第3表 定量前

抗原	濃度				
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Rp	2	0	0	0	0
Rm	2	2	2	0	0

抗原	濃度				
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Rp	3	2	2	2	2
Rm			2	1	0

使用血清 ○戸 25/III 37°C 6 時間一夜放置

若し使用抗原の抗原價を測定せず、單にR濃度のみによつて本反應を行うと時には、発疹チフス、発疹熱が逆の結果に現われることがある(表3)。即ち使用した R.m 抗原は正しいが、R.p 抗原價が低かつたためこの様な誤診が起つたのである。

然しながらこの様に定量された抗原價も一定不変ではなく種々の因子によつて変化する。例えば

(i) pH の R 抗原價に及ぼす影響

R体浮游液の pH がその抗原價に如何に変化を與えるかに就いて実験した。即ち既知抗原價の R を 7000 r.p.m 30 分間遠心、その上清を捨て、pH 9.0, 8.0, 7.0, 6.0 及び 5.0 の各々の磷酸緩衝液を以て夫々原量にもどし、氷室 (4°C) に保存した。24 時間 3 日及び 7 日後に再び 7000 r.p.m 30 分高速遠心し、R を落し、pH 7.0 の磷酸緩衝液を以て 3 回洗滌後原量にもどし、その抗原價を測定した(表略)。

即ち R は 9.0~6.0 の間に於ては比較的安定であるが、pH 5.0 では自然凝集の傾向が認められ 24 時間で発疹チフス、発疹熱の類屬凝集が現われ、3 日目ではそれ等の區別が出来なくなることがある。

(ii) 保存温度の R 抗原性に與える影響

R 抗原は 4~10°C の冷蔵庫に保存すべきであるが、

夏期室温に放置したり、或は過つて凍結した場合、その抗原價が如何に変化するかをみた。先ず 28°C 及 35°C に夫々 6 日間保存し同一血清を以て抗原價を測定した(表略)。

R はいずれの場合も比較的安定であつたが 35°C では R.m の方は不安定で自然凝集の傾向が認められた。凍結融解を 10 回繰返した場合は R.p, R.m 何れもその抗原價が低下し、最早使用出来なくなる。之を要するに抗原は高温に置いたり、冷凍したりしてはならない。必ず 2°~10° の冷所に保存すべきである。

むすび

窩載物硝子上で血清を滴数法によつて稀釈し、肉眼で判読する定量的凝集反應の術式並にその基礎的實驗に就いて述べた。本應は抗原價測定済みの抗原を用いることによつて R 症と他の急性傳染病とを區別し得るのみならず、発疹チフスと発疹熱を容易に鑑別することが出来る。

本術式による R 凝集反應は特異的で實驗誤差も少なく、ワイル・フェリックス反應より少く遅れて或は略同時に、また補体結合反應より早く出現し、凡そ 13~15 病日で最高に達する。R 抗原に正常血清或はゲラチンを添加する事により、R の自然凝集は防ぎうる。

(本研究は文部省科学研究費によつた)

文 献

- 1) Ricketts, H. T.: J. A. M. A., 52, 379~380, 1909.
- 2) Ledingham, J. C. G.: Lancet, 1, 1264~1266, 1920.
- 3) Zinsser, H. and Castaneda, M. R.: J. Exp. Med., 56, 455~466, 1932.
- 4) 河野道男: 東京医事新誌. 2923, 825~828, 1935.

- 5) Castaneda, M. R. and Zia, S. H.: J. Exp. Med., 58, 55~62, 1933.
- 6) Cox, H. E.: Pub. Health Rep., 53, 2241~2247, 1938.
- 7) Zinsser, H. and Castaneda, M. R.: J. Exp. Med., 57, 391~398, 1933.
- 8) Liu, P. Y., Zia, S. H. and Wang, K. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 38, 682~684, 1936.
- 9) Castaneda, M. R.: J. Immunol., 50, 179~184, 1945.
- 10) Fitz-Patrick, F. K.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 42, 217~218, 1939.
- 11) Hudson, N. P.: J. Inf. Dise., 67, 227~231, 1940.
- 12) Plotz, H. et al.: A. J. Hyg., 47, 150~165, 1948.
- 13) Nelson, C. T.: J. Lab. Clin. Med., 32, 360~365, 1947.
- 14) Hammerström, E.: Bull. Offic. Internat. d'Hygiene Publique, 38, 270~273, 1946.
- 15) Addison, B. et al.: A. J. Hyg., 47, 166~176, 1948.
- 16) Packalin, T.: Acta path et Microbio. Scand., 22, 573~592, 1945.
- 17) Giroud, P. et Jadin, J.: C. R. Soc. Biol., 141, 235~237, 1947.
- 18) Plotz, H., Bennett, B., Wertman, Kand Snyder, M.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 57, 336, 1944.
- 19) Castaneda, M. R.: A. J. Path., 15, 467~473, 1939.
- 20) 北岡正見: 綜合医学. 4, 64~66, 1947.
- 21) Fitz-Patrick, F. K.: J. Lab. & Clin. Med., 30, 577~586, 1945.
- 22) 北岡正見: 日本医学. 3423, 181~184, 1948.