レプトスピラ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: 2月12日, 1951〕

まえがき

レプトスピラ(以下「レ」と略)の血清學的反應として、今日迄に報告されているものには、凝集反應、溶菌現象、リーケンベルグ氏反應、補体結合反應、沈降反應等があるが、この中凝集反應は、他のものに比して、その操作が簡便で且つ特異的であることから「レ」症の診断、類症鑑別並に各種の「レ」抗原分析¹⁾²⁾に広く用いられている。

然し「レ」は、一般細菌の如く大量に濃厚な菌液を作ることとは容易でないため「レ」凝集反應術式にも種々な変法が案出されて来た。今日行はれている方法は、主として顯微鏡下で「レ」の凝集を判定する方法³⁾⁴⁾(以下顯微鏡法と略)であるが、肉眼的に「レ」の凝集を判定する方法(以下肉眼法と略)に就いても研究が進められ、Pot⁵⁾、Smith⁶⁾、沼田⁷⁾、Brown⁸⁾、小野、陳¹⁰⁾及びMinette¹¹⁾等の報告がある。Pot及びBrownは「レ」の培養を3500~5800回轉30分間遠沈して作った濃厚な「レ」浮游液を、小野、Smith、沼田及び陳等は何れも「レ」の培養そのものを抗原としている。Minetteは抗原に色素を加えて凝集を判定している。

その術式に就いて見れば、Brown⁸⁾及びMinette¹¹⁾は載物硝子を用い室温で凝集價を判読しているが、他の方法はすべて、特別な小試験管を用い、56~37°C、3~24時間放置し、然る後、その凝集を肉眼又は凝集鏡で判読している。

著者の研究室に於ては「レ」凝集反應は最初大庭法⁹⁾によつて行れてきたが、その後簡単に確実なSchüffner法⁴⁾を専ら行りに至つた。しかしこの方法も最後は顯微鏡によつて凝集を判定しなければならない煩雜があつた。

ここに於て、Schüffner法を簡単に肉眼的に判読出来るやう種々工夫し、遂に凹載物硝子上で、微量の抗原を使用し、定量的に「レ」凝集反應を肉眼的に判読出来る方法を案出するに至つたので、その概要を報告する。

I. 器具

(1) 1 mlの食塩水が約20~25滴になるやうに尖端を

調製してあるゴム帽子附ガラスビベット数本

(2) 直径凡そ1.0~2.0 cm、深さ0.5 cmの凹窩が四つある載物硝子 数枚

(3) 下よりの透過光源

II. 術式

(1) 図の如く、凹載物硝子を2枚(必要に應じ1枚又は3枚)を横に並べ、生理食塩水(pH 7.0~7.2)を上記ビベットを用い第1の凹窩に9滴以下第2~8の凹窩に夫々1滴づゝ入れる。

(2) 次に第1の凹窩に被験血清(非働化する必要はない)を1滴落し、よく混合する。かくして第1の凹窩には滴数法による1:10倍の血清が出来たわけである。

(3) その8滴を捨て、1滴を残し、更に残りの1滴を第2の凹窩に落しよく混合する。

(4) 之を更に第3の凹窩に落す。以下同様の操作を第7凹窩まで反復し、その1滴を棄てる。最後の第8凹窩は対照とする。この際泡を立てない様に注意せねばならない。かくして血清は、滴数法により、1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640と稀釈されたことになる。

(5) 次いで抗原を各1滴づゝ入れる。血清は同量の抗原添加によつて2倍に稀釈され、第1凹窩は1:20、第2の凹窩は1:40...となる。

(6) 前後左右によく混合し、然る後蒸発を防ぐために、同じ凹載物硝子を逆に重ね、37°Cの孵卵器に6時間入れ、次いで4~10°Cの氷室に一夜放置する。

(7) 下よりの透過光線(出来れば周囲を暗くする)により、肉眼を以て凝集の程度を判定する。

KITAOKA, Masami, INOUE, Hiromasa: National Institute of Health of Japan

(8) 判定 凝集の程度は図の如く、対照と差異なく一様に濁濁しているもの(一)、対照に比して幾分細かい凝集塊が認められるもの(±)、凝集塊が非常に細かく不明瞭であるが、かなり多く認められるもの(1)、明かに凝集塊が認められるが猶ほ多少濁濁しているもの(2)、(1)より(2)に近いもの(2-)とする。強く凝集しその周囲が全く透明なもの(3)とする。

註 (1) 著者が Weil-Felix 反應の抗原にメチレン青を加えた如く、メチレン青、或はゲンチアナ紫で僅かに着色した抗原を用いれば、載物硝子を透過光線に翳すことなく、白紙上に置くことによつて凝集程度を判読することが出来る。

(2) 類症鑑別を行う場合は凹載物硝子を数列に列べ、第1列にワイル、第2列に秋疫A第3列に秋疫Bの「レ」抗原を滴下する。

III. 抗原

(1) 遠心: 「レ」凝集反應を行うには、先ず「レ」を濃厚に含む抗原を準備しなければならない。それには「レ」の遠沈が行はれる。然し「レ」は一般細菌と異なり、遠心

清に残っている事が解つた。著者の抗原はすべて7000回30分~60分遠沈し、その上清を捨て、沈渣を生理食塩水(pH 7.0~7.2)に浮游したものである。

(2) 抗原の濃度: 「レ」は屢々自家凝集を起すものである (Schüffner¹³⁾, 小野⁹⁾, 著者)。肉眼法の抗原は顯微鏡法のそれに比し、遙かに濃厚な「レ」浮游液を必要とすることは申すまでもない。「レ」の凝集反應に於ける「レ」の好適濃度を見出すために、7000回轉30~60分間遠沈し、0.2% フォルマリン添加生理食塩水を以て、一視野約400匹、200匹、100匹及び50匹の「レ」が含まれるような抗原を作り、患者血清並に正常人血清を用いて凝集反應を行つた(第1表)。約400匹の抗原は明らかに自家凝集を起し、100匹或はその以下の「レ」数抗原では凝集が認め難く、陳¹⁰⁾の報告の如く、結局一視野約200匹を含む抗原が最適であつた。従つて一視野約200匹の「レ」を含む抗原が専ら用意された。因みに「レ」抗原はその「レ」数さえ一定にすればその抗原價に大きなずれが認められなかつた。

(3) 各種抗原の優劣: 顯微鏡法たと肉眼法たとを問はず、生菌又はホルマリン添加抗原が広く使用されている。Smith⁹⁾, 沼田⁷⁾及び Walch-Sorgdrager¹⁴⁾等にホルマリン添加抗原は、生菌のそより劣ると述べ、又 Schüffner¹³⁾, 沼田⁷⁾等はホルマリン添加抗原は長期保

第1表 「レ」凝集反應と抗原濃度との關係

血清種類		一視野、數				約400匹				約200匹				約100匹				約50匹			
		血清稀釋				40	80	160	320	40	80	160	320	40	80	160	320	40	80	160	320
正 常 ・ 血 清 (古 ○)	恢 復 患 者 血 清	1:	1:	1:	1:	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1:	1:	1:	1:	3	3	3	2	2	2	2	0	1	±	±	0	0	0	0	0

抗原 0.2% ホルマリン添加 ワイル「レ」使用 37°C 6時間 氷室1夜放置

し難い。Brown⁹⁾は「レ」培養液にサポニンを $1/1000$ の割合に加え、滲透圧を下げ、5800回轉30分間遠沈する事によつて「レ」の濃厚浮游液を作成している。

「レ」遠沈の程度を見るため、先ず「レ」培養液を種々の速度で遠心し、その上清に「レ」がどの程度残るかを實驗した。即ち「レ」をコルトフ培地(10%家兎血清加)に培養し一視野(ライツ対眼1, 対物 $1/12$)約30匹に發育したものを種々なる速度で遠心し、その上清をコルトフ氏培地で10進法稀釈を行い、各稀釈液を更に夫々10%家兎血清加コルトフ氏培地に10%の割に加えて培養し「レ」が、各遠心上清のどの程度の稀釈で發育するかを見た。(表、略)。「レ」は7000回轉30分間遠心しても猶その上

存出来るが、自家凝集を起すことを認め、沼田⁷⁾, 小野⁹⁾は生菌の使用を推奨している。然し生菌でも菌株により或は陳腐となると自家凝集を起し、抗原として不適当なものがあり、また生菌操作中に感染の危険があり、出来れば死菌抗原が望まれる。

先ず生菌、0.2%ホルマリン添加、0.5%石炭酸添加並に60°C30分間加熱等の4種の抗原を作成し、その抗原價を同一血清(0.2%ホルマリン添加抗原に対して1:10240)を以て比較検討してみた(表、略)。生菌、フォルマリン添加並に石炭酸添加抗原の間には、殆んど優劣が認められないが、加熱抗原はやゝ劣り、その凝集價は1:5120であつた。またその反應出現時間を見るため

に, 60 分, 2 時間, 4 時間及び 6 時間目に判定するに, 生菌抗原が 60 分で最も早く, フォルマリン添加及び石炭酸添加抗原がこれにつぎ, 加熱抗原はやゝ遅れ 4 時間で出現した。

(4) 添加ホルマリン濃度と抗原價: 先ず種々の濃度のホルマリン添加が同一「レ」数の抗原性に如何に影響するかをみたが, 0.5%~0.05%の範囲では「レ」の抗原價に何等の差異も認められなかつた(表, 略)。よつて以後の実験はすべて 0.2%ホルマリン添加抗原を用いた。尙マーズン添加抗原についても目下検討が加えられている。

(5) pH の「レ」抗原に対する影響: 抗原作成に用ゐ

第 2 表 温度並に作用時間の「レ」凝集反應に及ぼす影響

判定時間	室 温 20—22°C+				37°C				45°C±1°C			
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:40	1:80	1:160	1:320	1:40	1:80	1:160	1:320
10 分	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0
60 分	±	0	0	0	2	2	0	0	2	2	1	0
4 時 間	2	2	0	0	3	3	3	0	3	3	3	0
6 時 間	2	2	1	0	3	3	3	0	3	3	3	0
氷 室 1 夜 放 置	3	2	2	0	3	3	3	0	3	3	3	0

抗 原 0.2% ホルマリン加ウイルス「レ」
血 清 患者血清
室温のものは氷室に入せず

る生理食塩水、或いは磷酸緩衝液の pH の変化が「レ」の抗原性に如何に影響するかに就ては, 今日迄何等の報告がない。こゝに pH 7.4, 6.0 並に 8.0 に修正した 0.2%ホルマリン添加食塩水でそれぞれ「レ」を浮游し, 4°~10°C の氷室に 7 日間保存し, 次いで, それぞれを高速遠心し, pH 7.0 の 0.2%ホルマリン添加生理食塩水で 3 回洗滌し, もとの濃度にもどし抗原價を測定した(表略)。その成績を要約すれば, 抗原がアルカリ, 又は酸性にわたむくと中性の場合に比して抗原價が落ちる。

(6) 各種抗原の保存性: 上述の各種抗原を 4°~10°C の氷室に保存し, 作成直後, 7 日, 10 日及び 1 カ月の 4 回に亘り, 同一血清を用い, その抗原價を測定した(表略)。

コルトフ氏培地に培養したそのものにホルマリン添加して作つた抗原は 1 カ月を経ても使用出来るのに反し, 遠心して作つた抗原はその種類を問はず, 仮之血清を添加したとしても, その保存期間は 7 日以内である。10 日を過ぎるとその凝集状態は著しく変化し, 粗な網状を呈し, その成績判読が出来なくなる。

IV. 温度並に作用時間の「レ」凝集に及ぼす影響

肉眼法の加温温度として 56°C⁸⁾, 52°C⁵⁾, 37°C⁹⁾¹⁰⁾ 及び室温等が, また作用時間として 2 時間, 3 時間及び 24 時間等が行われている。著者の方法に於て, 加温温度を検討するため 37°C, 室温(20~22°C)及び 45°C±1°C に種々なる時間放置し, 同一血清のそれぞれの凝集價を比較した(第 2 表)。氷室に一夜放置後では, 何れの温度も大差ない凝集價を示すが, 室温の凝集状態がやゝ劣る。但しその反應出現時間は 45°C±10°C では早い, 37°C と大差なく, 室温では遅れる。つまり普通の研究室に備えてある 37°C の孵卵器に 6 時間加熱でその目的が達せられる。

V. Schüffner 法との比較

同一血清について, 顯微鏡法と肉眼法の両法を行い, その凝集價を比較すれば, Smith⁹⁾, 沼田⁷⁾等は, 肉眼法が顯微鏡法に比し約 1:2~4 倍高く現われると述べている。Starbuck¹²⁾は顯微鏡法としては Fletcher の術式を, 肉眼法としては Brown の変法を用い, 同一血清に就いて詳細なる比較を行い, 肉眼法は顯微鏡法に比して凝集價の低い所では, 1:2~10 倍, 高い所では 1:2~5 倍低い價を示すと述べている。

いま 9 例の患者血清について, 著者の方法と Schüffner 法による成績を比較すれば(第 3 表), 凝集價の高い所では, 著者の方法は Schüffner 法に比して 1:2~4 倍低い價を示している。

VI. 「レ」症患者の各種「レ」抗原に対する凝集價

著者の肉眼的「レ」凝集反應は實際に患者の診断並に類症鑑別に使用し得るやを見るため, 患者血清 5 例について反復試みられた(第 4 表)。同一血清に就いて, 殆んど誤差なく, 毎回略々同一凝集價が得られ, 本方法は簡單

第3表 肉眼的「レ」凝集反應と
Schüffner 法との比較

血清 番號	肉 眼 的 (200 匹)	Schüffner 氏 法 (30~50 匹/1 時間)	倍 數
1	1: 5120	1: 20580	1: 4
2	1: 2560	1: 10240	1: 4
3	1: 20580	1: 41160	1: 2
4	1: 10204	1: 40960	1: 4
5	1: 640	1: 2560	1: 4
6	1: 5120	1: 20580	1: 4
7	1: 2560	1: 5120	1: 2
8	1: 640	1: 1280	1: 2
9	1: 160	1: 640	1: 4

第4表 「レ」症患者血清の各種
「レ」抗原に対する凝集價

氏名	採血病日	抗原				沖	判定
		W	A	B	C		
須 ○	25 日	5120	160	0	0	320	W
江 ○	不 明	2560	160	0	40	80	W
長 ○	30 日	5120	160	0	0	320	W
高 ○	28 日	2560	80	0	40	640	W
中 ○	15 日	640	0	0	0	0	W

正確で特異的である事が立証された。

むすび

微量の抗原を使用し、凹載物硝子上で行う肉眼的「レ」凝集反應の一術式を提案した。本方法の術式に就て種々実験的に検討が加えられその手技は簡單で且つ反應は特

異的であり、その成績は正確で、ワイル氏病の診断及びワイル氏病秋疫病等の鑑別にも使用出来る。抗原は「レ」培養が悪くとも、遠心によつて「レ」を集め、一視野凡そ200匹の「レ」が含まれれば足りる。但し7000回轉30分間遠沈に要する高速遠沈器のない所では抗原を作ることには困難である。この抗原は1週間しか保存出来ないが検討の余地がある。凝集の判読に、下より透過光線が必要とするが若しメチレン青或いはゲンチアナ紫を以て着色した抗原を用いねば白紙上に於ても略判読出来る。

文 献

- 1) 北岡正見, 坂巻良男: 実験医 28, 284-286, 1944.
- 2) 山本修太郎: 日本獣医 10, 157-188, 1948.
- 3) 大庭士郎: 衛生学傳染病学 17, 59-66, 1921.
- 4) Schüffner, W. und Mochter: Zbl. Bact., 101, 405-413, 1921.
- 5) Pot, A. W.: Lancet, 1, 1290-1293, 1936.
- 6) Smith, J. and Tulloch, W. J.: Lancet, 2, 846-854, 1937.
- 7) 沼田岳二: 細菌学雜 511, 605-613, 1938.
- 8) Brown, H. C.: Brit. Med. J., 2, 1183-1184, 1936.
- 9) 小野蘇牧: 日新医学, 29, 724-736, 1940.
- 10) 陳麗水: 第14回聯合微生物 263, 1940.
- 11) Minette, H. P.: Science, 101, 256, 1945.
- 12) Starbuch, E. B. and Ward, T. G.: J. Infect. Disea., 70, 88-91, 1942.
- 13) Schüffner, W. und Bohlander, H.: Zbl. Bact., 144, 433-439, 1936.
- 14) Walch-Sorgdrager, B., Schüffner, W. und Bohlander, H.: Zeit. Imm., 92, 35-52, 1936.