デフテリア及び破傷風菌の 補体結合反應起因物質に関する研究 特にC分割の相互關係に就いて

副 島 道・男・芳 賀 邦 夫

東京大学傳染病研究所第五研究部 (部長 田宮猛雄教授, 指導 進藤宙二助教授)

[受付: 5月31日, 1951年]

進藤・目黒・副島(1951)はデフテリア菌について、副島(1949)は破傷風菌について補体結合反應起因物質に関する研究を報告したが、いづれも培養濾液(原毒素)のHClの等電点で沈澱する分割に特異抗原物質の含まれていることを認め、同時に蛋白質部分を除いた上清からアルコールで沈澱するC分割に健康馬血清とも反應する非特異抗原と思われるものが含まれていることを記載した。その後の実験によつてこのC分割は血清学的に興味のあることが判つたのでこゝに報告する。

実験材料および手技

抗原: デフテリア原毒素, 破傷風原毒素, デフテリア毒素産生培地, 破傷風毒素産生培地および健康馬肝の水浸出液から前報に記載した方法で蛋白質部分除去後アルコール沈澱分割を行い、それぞれDtC, TtC, DmC, TmCおよびHLCとした。使用した範囲の濃度では抗補体作用は全く認めなかつたので、抗原対照は表から省略した。

抗体: 馬血清はデフテリア抗毒素馬血清, 破傷風抗毒素馬血清および健康馬血清を使った。これらは傳染病研究所で製造したもの或いは予防衛生研究所から分與を受けたものである。実験に使用した馬血清はすべて原液で抗補体作用を示さなかつたが、実験の都度56°, 30分加熱非働化して使つた。人, 家兎, 牛, 海狸および豚の血清についても抗補体作用を検査し、抗補体作用のない濃度から使用した。

補体結合反應手技: アメリカ陸軍々医学校の方法により、2次元法で実験した(前報参照)。

実 験

1) 各C分割を抗原とし各種馬血清について行つた補体結合反應成績:

いづれも補体結合反應の場を求めたのであるが、個々の成績を記載する繁雜を避け、一眼で判る様に終末抗原價(反應成績±以上)の点を継なく線で反應の場を表示した(第1図)。

第 1 圖

第1図に見られる様にDtCおよびTtCを抗原としてデフテリア・破傷風抗毒素馬血清および健康馬血清について行つた実験では3種の血清ともに反應陽性の場が見ら

SOEZIMA, Michio and HAGA, Kunio: Studies on the antigenic substances of *Corynebacterium diphtheriae* and *Clostridium tetani*, reacting in the complement fixation test. In special reference to relationship among C-fraction from various sources. Institute for Infectious Diseases, Tokyo University. Jap. J. Bact., 7(2): 71-74, 1952.

れるが、各抗毒素馬血清よりも健康馬血清の方が（破傷風抗毒素馬血清 No. 9 を除いて）広い反応の場を示している。このことから健康馬血清にもジフテリアおよび破傷風毒素の DtC および TtC に対する所謂正常抗体のあることが考えさせられる。又抗毒素馬血清の方が健康馬血清に比較して反応の場の狭かつたことは、使用した健康馬血清は採血後 1 カ月以内の新しいもので、石炭酸を加えていないのに対して抗毒素馬血清は何れも石炭酸を加え比較的永く保存されていたものであつたので、抗体が多少変性していたのによるのではないかと考えられる。

ジフテリアおよび破傷風毒素産生培地から作つた C 分割 DmC および TmC を抗原として 3 種類の馬血清について行つた実験では DmC は凡ての馬血清に対し全く陰性であつたが、TmC は各種馬血清に陽性に反応した。そして抗毒素馬血清についての反応の場の狭かつたのは前述の DtC、TtC の両種血清に対する関係と同様であると思われる。

いづれにしてもこの反応には馬血清の保有している正常抗体に対して毒素とは別個の成分が作用しているのではないかと考えられる。DmC、TmC を分割した培地の成分の相違は馬肝の有無であつて、この点が以上の反応結果の相違の原因ではないかと考えられるので、次の実験を行つた。

2) 健康馬肝の分割 HLC を抗原とし各種馬血清について行つた成績：

ジフテリア毒素産生培地は Martin 変法培地（豚胃消化液を使わずペプトンを使用した）であり、破傷風毒素産生培地は肝片加肝ブイヨンであつた。また上記の様な DmC、TmC の間の相違は馬肝に起因すると思われる。それで馬肝の水浸出液を同様処置で分割し、C 分割に相当する HLC を作つて実験した。著者が使つた破傷風毒素産生培地の肝片は新鮮な馬肝片でなく、煮沸浸出した肝を乾燥し賽の目形に細かく切り乾燥保存したものであつた。しかし最初の実験として新鮮健康馬肝 1 kg を 1000cc の蒸留水と共に 100°C、2 時間加熱し、その上清について分割し HLC を作り、健康馬血清について補体結合反応を行つた。その結果は抗原性非常に弱く反応の場が狭がつた。即ち HLC の 500 倍稀釈で僅かに反応陽性の程度であつた。そこで前記加熱浸出した馬肝を一旦乾燥し、その乾燥馬肝 50g を 500cc の蒸留水と共に再び 100°C 2 時間加熱浸出し、その上清から HLC を作つて補体結合反応を検査した。その結果は第 2 図に示した様に著明陽性の反応の場が得られ、その程度は TtC のそれと同程度であることが判つた。このことから TtC によつて起つ

第 2 図

た反応の場はその培地中に含まれていた馬肝に起因することが覗えた。この実験は 5 例の健康馬の肝について行つたが、3 例の HLC が著明な反応の場を示し、他の 2 例では抗原性が弱く、100 倍稀釈で弱い反応を示したに過ぎなかつた。個々の馬によつて量的又は質的に含有量に相違がある様である。

3) HLC を抗原とし他種動物血清について行つた成績：

以上の結果は健康馬血清が同種の臓器である肝から抽出した物質に対して正常抗体を持つていと云う興味ある現象であるが、更にこの HLC の非特異的な抗原性が他種動物血清即ち人、牛、家兎、海狸、豚の血清に対しても現われるかどうかを検査した。

人血清については血液およびワッセルマン反応（Browning 法）の成績とも比較して見た。

その結果は第 1 表に示した様に人および家兎の血清とは著明に、牛および海狸の血清とは弱く反応し、豚血清とは全く反応しなかつた。また人の血清では血清型およびワッセルマン反応の成績と何等関係のないことが判つた。

4) 加熱（65°C、30 分）によるこの抗体の態度：

所謂正常抗体として知られている家兎血清中の正常緬羊血球溶血素、正常ワッセルマン抗体および Kidd & Friedewald が記載している家兎臓器に対する正常抗体は血清を 65°C、30 分加熱することによつて殆んど破壊されて失うことが知られている。それで馬血清と家兎血清中に含まれている HLC に対する正常抗体も同じ様に

第1表 HLC を抗原として
他種動物血清について行つた実験

		血清稀釋 2n						W.R	血液型
		n=0	1	2	3	4	5		
人血清	No. 1	±	0	0	0	0	0	++	B
	No. 2	4	3	2	1	±	0	++	A
	No. 3	4	4	1	±	0	0	++	B
	No. 4	2	1	±	0	0	0	++	O
	No. 5	0	0	0	0	0	0	++	O
	No. 6	4	4	4	4	4	1	+	AB
	No. 7	4	4	4	1	0	0	—	A
	No. 8	4	4	3	0	0	0	—	O
	No. 9	3	4	4	2	0	0	—	A

		血清稀釋 2n					
		n=0	1	2	3	4	5
牛血清	No. 1	±	1	1	±	0	0
	No. 2	±	0	0	0	0	0
	No. 3	±	±	±	0	0	0
豚血清	No. 1	0	0	0	0	0	0
	No. 2	0	0	0	0	0	0
	No. 3	0	0	0	0	0	0

		血清稀釋 2n					
		n=0	1	2	3	4	5
家兎血清	No. 1	4	4	±	0	0	0
	No. 2	4	4	4	±	0	0
海狸血清	No. 1	±	0	0	0	0	0
	No. 2	±	0	0	0	0	0

※

- ①抗原は 500× 溶液を使用す。
 ②抗原及び各血清の対照は凡てに置いて抗補體作用の無い事を確かめた。
 ③欄内の数字は溶血度を表わす。
 即ち 4……100% 溶血阻止
 3……75% "
 2……50% "
 1……25% "
 ±……痕跡程度溶血阻止
 0……完全溶血

65°C, 30 分加熱で破壊されるかどうかを検索した。その結果は第2表に示した様に反応は僅かに減弱するが全く消失することはなかつた。この点が従来の正常抗体と一寸様子が違う。

第2表 HLC を抗原として 56°C 及び 65°C
30 分間加熱した家兎及び馬血清について行つた実験

			血清稀釋 2n×5					
			n=0	1	2	3	4	5
馬血清	56°C	No. 4	4	4	2	0	0	0
		No. 5	4	4	3	±	0	0
	65°C	No. 4	4	3	0	0	0	0
		No. 5	4	4	1	0	0	0
家兎血清	56°C	No. 1	4	4	±	0	0	0
		No. 2	4	4	4	±	0	0
	65°C	No. 1	4	±	0	0	0	0
		No. 2	4	4	3	0	0	0

5) DtC, TtC および TmC を抗原とし人, 牛, 家兎, 海狸および豚の血清について行つた成績:

DtC, TtC および TmC を抗原として人, 牛, 家兎, 海狸および豚の血清について補體結合反應を行つたのに人, 家兎の血清とは強く, 他の牛, 豚, 海狸の血清とは僅かに反應陽性であるか或は陰性の結果を得, 3 分割について抗原性の程度の相違は認められなかつた。

考 察

前記の実験成績からデフテリアおよび破傷風毒素の C 分割 DtC, TtC および破傷風毒素産生地の C 分割 TmC は補體結合反應によつてデフテリア・破傷風抗毒素馬血清および健康馬血清に対し共通な抗原性のあることが判つた。このことはデフテリア・破傷風抗毒素と健康馬血清との間に共通な正常抗体のあること, また DtC, TtC および TmC の間に共通抗原因子のあることを示している。

Schürmann & Sonntag (1912) が破傷風菌の補體結合反應の報告で非特異反應だろうと考えた原因の 1 つがこんなところにあつたのであろう。更に興味あることは毒素の分割とは別に健康馬肝臓中にある成分と反應する抗体が健康馬血清中にあることを知つたことである。或種の動物の血清が同種の臓器中の成分に対する自家抗体を持つていることは奇妙な現象に思われるが, 既に Kidd & Friedewald は健康家兎臓器即ち腎・肝・肺・脾・脳・心の生理食塩水抽出液の高速遠沈した沈渣に対して健康家兎血清が正常抗体を持つていることを記載しているのので, 著者等の成績も不可解なことではない。この現象を理解するのに次のことがらが考えられる。その 1 は馬肝 C 分割 HCL が馬の生体の肝の中にあつた時とは異つた形で, 即ち変性した形で分割されたのではないかと云う

ことである。その2は HLC の反應物質がそのまま生体内に存在するとすれば Kidd & Friedewald が想像した様に細胞原形質の中に保護された形で存在しているためにアナヒラキシーが起らないのではないかと云うことである。更にその3としては著者が行つた補体結合反應は寒冷法であるので生体内の温度よりもはるかに低い温度で反應したのであつて、当然生体内とは條件が異なると云う事等である。又生体内で同種抗原抗体が共存すること Opie (1924) は免疫操作の初期に、中村等 (1939) も antianaphylaxis について認めている。

HLC に対する正常抗体は従来は正常抗体として記載にないものである。特に抗原が含水炭素性の分劃であること、この正常抗体は加熱 (65°C, 30分) によつて消失しない点は性質の上からも新しい正常抗体である。

結 論

デフテリア・破傷風原毒素の C 分劃 DtC, TtC, 破傷風毒素産生培地の C 分劃 TmC および健康馬肝の C 分劃 HLC に対しデフテリア・破傷風抗毒素馬血清および健康馬血清は共通に反應する正常抗体を保有している。それ故に両毒素の C 分劃の抗原性は非特異的なものである。

健康馬血清には健康馬肝の C 分劃と著明に反應する正常抗体が含まれている。またこの健康馬肝の C 分劃に対する正常抗体は人、牛、家兎、

この正常抗体は従来記載にある正常抗体とは違つた性質を持つている。

稿を終るに臨み田宮猛雄教授、羽里彦左衛門教授の御校閲、進藤宙二助教授の御指導に対し謝意を表し、材料等の便宜を與えて下さつた予防衛生研究所血清検定部の各位に深謝する。

(本研究の要旨は昭和24年5月金沢に於ける第22回細菌学会で発表した)。

主要文献

- 1) Kidd J.G. (1938) Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 38, 292-295.
- 2) Kidd J.G. & Friedewald W.F. (1942) J. Exp. Med., 76, 543-578.
- 3) Kolmer J. A. & Trist M. E. (1916) J. Infect. Dis., 18, 20-87.
- 4) 中村敬三等 (1939) 実験医学雑誌, 23, 1091.
- 5) Opie E.L. (1924) J. Immunol., 9, 259-268.
- 6) Sindo T., Meguro T. & Soejima M. (1949) Jap. J. Exp. Mee., 20, 301-312.
- 7) 進藤宙二, 目黒庸雄, 副島道男 (1951) 日新医学, 38, 148-153.
- 8) 副島道男 (1949) 昭和医学会雑誌, 9, 30-39.
- 9) Schürmann W. & Sonntag E. (1911) Z. Immunitätsf., 9, 490-511.
- 10) Schürmann W. & Sonntag E. (1912) Z. Immunitätsf., 12, 1-15.