レプトスピラの補体結合反應に就て

北岡 正見 井上 裕正 馬場 貞義

國立予防衛生研究所

〔受付: 9 月 6 日, 1951 年〕

まえがき

レプトスピラ(以下「レ」と略)の血清学的反應として、補体結合反應、溶菌現象及びリーケンベルク反應等が知られて居る。しかし今日一般に広く用いられているのは、凝集反應で、他の血清学的諸反應は殆んど用いられていない。凝集反應にも、大庭法、Schüffner 法等のように顯微鏡を用い、その結果を判定する方法と、著者等¹⁾の記載したような肉眼的判定法がある。

「レ」症の診断、「レ」の抗原分析、及びその分類に當り、補体結合反應(以下補結と略)が殆んど用いられていない理由は、簡單で確實でしかも特異的な凝集反應があるからである。

しかし、「レ」補結については、既に 1915 年 Hübner²⁾ は、ワイル氏病で斃死した人又は、モルモットの肉臓の水又はアルコール抽出液を抗原として試みたが成功しなかつた。しかし、その抗原に就いては異論があり、Bessemans³⁾, Wilmaers⁴⁾ 等は使用し得ると主張したのに対し、Costa⁵⁾ 及び Pettit⁶⁾ 等は非特異的であると反対した。

その後「レ」の純培養に成功するに及び、その培養液そのものを抗原とした補結が一部の学者により試みられたが、不成功に終つた。然し、Korthof 培地のような「レ」發育に適した培地が見出されるに及び、「レ」發育の盛んな培養液を遠沈し、純粹且つ濃厚な「レ」浮游液を抗原とし、ここに「レ」の補結も漸く実地に應用されるに至つた。

Bessemans³⁾, Gaetgens⁷⁾, Papageorgiu⁷⁾, Pot⁸⁾, 坂⁹⁾, 由利¹⁰⁾ 及び沼田¹¹⁾ 等はその抗原製造の上で多少の差異はあるが、何れもこの線に沿つて作つた抗原を用い好成績を挙げた。最近 Randall¹²⁾ は「レ」に超音波を掛けた抗原を以つて補結を行つている。

著者等も曾て Korthof 培地に發育した「レ」を遠沈し抗原とし Gaetgens 法を追試したが、遠心器の不備と石炭酸添加の抗原を用いたことから余り良い成績が得ら

れなかつた。その後設備も整つたので再びこの問題を取り上げて見た。即ち「レ」培養液を遠沈し、純粹且つ濃厚な「レ」浮游液を抗原とし、術式として発疹チフス、発疹熱の補結のそれ(アメリカ陸軍軍医学校法)に準じ、「レ」の補結を行つた。又この方法を「レ」症の診断、類症鑑別及び「レ」株の分類にも應用し、同時に凝集反應によるそれ等の成績とも対比し、併せて使用抗原の作り方についても検討を加えて見た。

抗原の作り方

10%家兎血清加コルトフ 培地を大試験管に 40cc 分注し、「レ」を添加し 37°C 4 日間、次いで室溫に 3 日間放置し、「レ」が充分發育したものを 6,000~7,000 r.p.m. 60 分間遠心し、その上清を捨て、その沈澱を後に述べる濃度に防腐剤を加えた pH 7.2 の生理食塩水又は磷酸緩衝液で元培養液量の約 1/10 に濃縮浮游させる。この抗原の作り方は、既に発表した肉眼的凝集反應のそれと同じである。因みに凝集反應では抗原に含まれる「レ」の数が問題になるが、補結では「レ」の数ではなく抗原價が問題である。抗原價測定については後に述べる。

補体結合反應術式

本術式に就いては著者は既に屢々照会した。その詳細は、綜合医学 6 卷, 829~834, 又は衛生検査指針 2 卷, 99~121 (昭和 25 年 5 月厚生省發行) 又は Pub. Health. Rep. 59, 402, 1944 を参照されたい。

その大要は、56°C 30 分間加熱し、非働化した被驗血清の 1:2 又は 1:10 から始まり、倍加法により稀釈した各稀釈血清 0.25cc に、予め 0.25cc 中に 2 單位を含む様に稀釈してある抗原 0.25cc を加え、更に 0.5cc 中に 2 充單位を含む補体 0.5cc を加え、よく混合し、4~10°C の氷室に一夜保存する。この一夜氷室に保存する代りに 0.5cc 中に 2 正單位を含む補体 0.5cc を加え、よく混合

KITAOKA, Masami, INOUE, Hiromasa & BABA, Sadayoshi: On the complement-fixation test for leptospira. National Institute of Health of Japan. Jap. J. of Bact., 7 (3): 179-184, 1952.

してから、37°C の温浴槽内で 30 分間加温する。ついで溶血系 (3% 綿羊赤血球浮游液と、0.25cc 中に 3 単位の溶血素が含まれる様に稀釈した溶血素とを同量加えて感作したもの) 0.5cc を加え、よく混和し、37°C の温浴槽内で 30 分間加温し、直ちにその成績を判読する。判定は 3 以上の溶血阻止を以て陽性の限界とする。

肉眼的「レ」凝集反應

本術式に就いても既に発表した¹⁾。即ち凹窩載物ガラスの上で、滴数法により被検血清を稀釈し、これに抗原を 1 滴宛加え、よく混和し、次いで 37°C 孵卵器内で 6 時間加温し、更に氷室 (4~10°C) に一夜放置し、然る後、下からの透過光線で、肉眼的にその凝集状態を判定する方法である。(H) 以上の凝集状態を陽性の限界とする。さて、抗原として ワイル「レ」の培養液を遠沈し、0.2% ホルマリン添加生理食塩水に浮游したものを抗原とし、上述の補結術式に準じ、「レ」の補結を行つた。被検血清としては凝集價 1:40.906 のワイル「レ」家兎免疫血清を用いた。この際、抗原も抗体も共に本補結術式における單位價は未知である。そこで第 1 表に示すように縦軸に

第 1 表 遠沈抗原の抗原價測定

血清 稀釈 抗原 稀釈	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	抗原 對照
1:2	4	4	4	4	4	4	4	3	0	0
1:4	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
1:8	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
1:16	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
1:32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血清對照	0	0								

抗原 ワイル「レ」

血清 ワイル「レ」家兎免疫血清
(凝集價 1:40.906)

補体二次定量

補體量	0.5	0.3	0.25	0.2cc
NaCl の場合	0	0	±	1
抗原の場合	0	0	2	4

抗原の各階段稀釈を、横軸に抗体のそれを取り、反應の場を作つた。その結果、抗原稀釈 1:2, 1:4 及び 1:8 に対し、血清稀釈はそれぞれ 1:512, 1:256, 及び 1:256 迄陽性となり、2 単位の抗原とはこの場合、原「レ」浮游液を 4 倍に稀釈したものに相当し、4 単位の血清とは、本血清の 64 倍稀釈液に相当することになる。この 2 單

位の抗原を以て補体二次定量をしても抗補体作用のため本試験に支障を來たす程度のもではなかつた。

そこで、このようにして作つた抗原の特異性を検討するために、各種「レ」株免疫血清を用い、補結を行つて見た。抗原 2 單位、即ち 1:4 のワイル「レ」浮游液を以て、秋疫 A「レ」Lept. hebdomadis A (凝集價 1:40, 960), 秋疫 B「レ」, Lept. hebdomadis (1:5, 120), 秋疫 C「レ」Lept. australis A (1:5, 120) 及び沖繩「レ」Lept. pyrogenes (1:5, 120) の家兎免疫血清に対し補結を行つた。その成績を要約すると、ワイル「レ」抗原は自己の免疫血清に対し 1:256 陽性であるのに対し、秋疫 A, B, C, 及び沖繩「レ」免疫血清に対し、それぞれ 1:32, 1:8, 及び 1:64 の程度の類屬反應を示した。この成績は後にも触れるが、著者等の発表した肉眼的「レ」凝集反應のそれに比して殆んど遜色のないものである。つまり著者等の補結は特異的であることを物語るものである。

各種抗原の抗原價の比較

「レ」補結の鍵は抗原の特異性にある。従つて如何にすれば特異性の高い抗原が得られるかが問題となる。先づ抗原に添加する防腐剤の種類により、更に抗原を凍結融解したり、加熱したりした場合に抗原性が如何に影響を蒙るかを検討した。

今日迄に報告されている抗原には、「レ」培養液を遠沈し、その上清を捨て、沈澱した「レ」のみを集め、生きた「レ」をそのまま浮游したもの、生きた「レ」を使用することは感染の危険があるので石炭酸、ホルマリン等の防腐剤を加えたもの、抗原性を増強する意味からリボイドを加えたもの、或は「レ」培養液を遠沈することなく培養液から除蛋白したものがある。Gaechtens⁶⁾ は石炭酸を加えることにより特異性が增強されると述べたが、著者等は石炭酸を添加することは抗補体作用を起しやすくする欠点のあることを指摘した。沼田¹¹⁾ はホルマリン添加は抗補体作用が強く實際に用ひられないと述べた。

そこで、「レ」の培養液を遠沈し、沈渣を集め 0.85% 生理食塩水に「レ」を浮游し、これを 8 等分し、そのうちの 3 にはそれぞれホルマリン 0.2%, 石炭酸 0.2%, マーゾニン 0.01% になるように加え、他の 3 はそれぞれ 60°C, 100°C, 及び 121°C に 30 分間加熱し、残り 2 つのうち 1 つは凍結融解を 5 回行い、他の 1 つは何等操作を加えず、そのまま抗原とした。別に遠沈しない「レ」培養液をそのまま抗原とし、計 9 種類の抗原についてそれぞれの抗原性を比較した。勿論、各抗原は比濁計によつて測定しても、略々同様であつた。ホルマリンや石炭酸を 0.2% の割合に加えたのは凝集反應の實驗に於て最適

第2表 各種抗原の抗原價の比較(作成直後)

各種 抗原	抗原 稀釋	抗原價				抗補體作用 の出現する 抗原の濃度
		1:2	1:4	1:8	1:16	
0.2%ホルマリン添加		4	4	4	0	1:2 (±)
0.2%石炭酸 "		4	4	4	0	1:2 (±)
0.01%マーゾニン "		4	4	4	0	抗補體なし
60°C 30分間加熱		4	4	4	0	1:2 (±)
100°C "		4	3	0	0	1:2 (1)
120°C "		4	4-	0	0	1:2 (1)
遠沈生レ		4	4	4	0	抗補體なし
凍結融解5回		4	4	4	0	"
培養液		4	2-	0	0	1:4 (±)

抗原 秋疫Cレ

血清 秋疫C免疫血清 (1:128)

であつたからである。

以上9種類の抗原は、秋疫C「レ」の培養液から作られた。それ等の抗原價を同「レ」の家兔免疫血清4單位を以て測定した(第2表)。その成績を要約すると、培養液そのまゝを抗原として用いた場合が最も低く、抗原として實際使用出来ない程度であつた。又 100°C と 121°C に加熱したそれぞれの抗原は、何れも抗原價の減弱が認められたが、60°C 30分間加熱しても著しい抗原價の低下は認められない。しかし 0.25% ホルマリン、0.2% 石炭酸、生「レ」、凍結融解及びマーゾニン等の各抗原は何れも優劣がなく、略々等しい抗原價を示した。但し、この成績は、製造直後の抗原を用いた場合のもので、之等の抗原を一定期間保存した場合のものではない。

未知血清の検査、各種「レ」株の分類及び

凝集反應との比較

「レ」補結は、「レ」症の診断や類症鑑別に使用し得ることは、諸家の一致した成績であるが、その補体結合價に比して、一般に低いと言われ、又その特異性は凝集反應のそれに比して劣ると云うもの(沼田⁽¹⁾)もいる。補結を「レ」分類に使用した報告は未だない。

0.2%ホルマリン、0.2%石炭酸、0.01%マーゾニン、凍結融解及び生「レ」浮游液はそれぞれ抗原として使用し得ることは既に述べた。凝集反應によつてワイル氏病と診断された4例、秋疫Aと診断された1例の患者血清、発疹チフス2例、発疹熱2例及び正常人1例、計10例についてホルマリン添加抗原を用い、補結を行い、同時に凝集反應も行い、その成績を互いに比較して見た(第3表)。更にワイル、秋疫A、B、C、及び沖縄の各「レ」に対して作つたそれぞれの免疫家兔血清を用い、凝集反應と補結を同時に行い、その成績を互いに比較した(第4表)。

その成績を要約すると「レ」補結は、凝集反應に比して一般に低い價を示し、その特異性も凝集反應のそれよりもやや劣るようであるが、「レ」症の診断、類症鑑別を始め、「レ」株の分類にも使用し得ることが明らかとなつた。

抗原の保存

既に肉眼的「レ」凝集反應の報告で指摘したように、「レ」遠沈浮游液を凝集反應の抗原とした場合に、他の細菌のそれと異なり、その有効期間は極めて短い。さて補結抗原の有効期間はどうかであろうか。

第3表 未知血清に対する凝集反應、補体結合反應の比較

反 應 血清 No.	抗 原	補 體 結 合 反 應				凝 集 反 應				備 考
		ワイル レ	秋疫A レ	秋疫B レ	秋疫C レ	ワイル レ	秋疫A レ	秋疫B レ	秋疫C レ	
1		40	10	0	0	160	10	0	0	ワ イ ル
2		80	20	0	0	640	20	0	0	ワ イ ル
3		80	10	0	0	1,280	10	0	0	ワ イ ル
4		40	0	0	0	1,280	10	0	0	ワ イ ル
5		160	640	10	10	160	2,560	0	0	秋 疫 A
6		0	0	0	0	0	0	0	0	正 常 人
7		0	0	0	0	0	0	0	0	發疹チフス
8		0	0	0	0	0	0	0	0	"
9		0	0	0	0	0	0	0	0	發 疹 熱
10		0	0	0	0	0	0	0	0	"

第4表 補体結合反應及び肉眼的凝集反應
による「レ」の分類

抗原	免疫血清 反 應		ウイルス	沖繩	秋疫A	秋疫B	秋疫C
	凝 集	補 結					
ウイルス	凝 集	補 結	40,960 256	640 64	320 32	0 8	0 8
沖繩	凝 集	補 結	1,280 16	5,120 512	0 0	0 0	40 ±
秋疫A	凝 集	補 結	320 0	0 ±	40,960 10,240	0 0	80 16
秋疫B	凝 集	補 結	0 0	0 0	0 0	5,120 256	0 0
秋疫C	凝 集	補 結	0 0	0 0	0 0	0 0	5,120 1,024

上述の9種類の抗原の中、培養液を除いた他の8種類の抗原に就て、作成直後、4日、8日、17日、及び1ヵ月後に逐的にそれぞれの抗原性を追求した。これ等の

抗原はすべて4～10°Cの氷室に保存し、抗原價の測定には同一既知血清の4単位を用いた(第5表)。

その成績を要約すれば、0.01% マーゾニン 添加及び0.2% ホルマリン添加抗原は保存1ヵ月後には、多少の抗補体作用の出現が認められたが最も優れ、他の抗原は何れも8日以内に抗補体作用が出現し使用出来なくなった。

次で、0.01% マーゾニン 添加及び0.2% ホルマリン 添加抗原を作り、それぞれ室温及び氷室に保存し、その抗原性が幾日間保たれるかを逐的に検査した。同時に凝集反應を行い、その抗原性の保持日数と対比した(第6表)。

その成績を要約すれば、補結の抗原として、何れも1ヵ月以上抗原性が保たれること、特に抗原保存温度が室温たると氷室たるとを問わずマーゾニン抗原では余り影響を蒙らないが、ホルマリン抗原では1ヵ月後には抗補体作用が現われた。之に反し、凝集反應の抗原としては既に述べたように0.2% ホルマリン抗原は1週間では何等変化を蒙らないが、マーゾニン抗原ではホルマリン抗

第5表 抗原の保存 (4～10°C)

抗原	保存期間	作成直後	4日目	8日目	17日目	1ヵ月目	抗補体作用の出現する抗原稀釋
0.2%ホルマリン添加		1:32*	1:32	1:32	1:32	1:32	1ヵ月で1:8
0.2%石炭酸		1:32	1:32	>1:32			
0.01%マーゾニン		1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1ヵ月で1:2
60°C 30分間加熱		1:32	1:32	>1:32			
100°C		1:16	1:16	>1:16			
121°C		1:16	1:16	>1:16			
遠沈生レ		1:32	1:32	1:32	>1:32		
凍結融解5回		1:32	1:82	>1:32			

抗原 ウィル, レ

* 抗原稀釋濃度(抗原價)

血清 ウィル 1:64

▲ 抗補体作用の出現を示す。

第6表 ホルマリン及びマーゾニン抗原の保存温度との関係

保存温度	保 存 期 間	作 成 直 後		7 日 目	1 カ 月 目			
	反 應 抗原の種類	凝 集	補 結	凝 集	凝 集	補 結	抗補體作用 の出現する 抗原稀釋	
		凝 集 價	抗 原 價	凝 集 價	凝 集 價	抗 原 價		
4~10℃	0.2%ホルマリソ	1:10,240	1:32	1:10,240	不 可	1:32	1:8	
	0.01%マ-ゾニン	1: 5,120	1:32	1:320	不 可	1:32	1:2	
室 温 (18~24 C)	0.2%ホルマリソ	1:10,240	1:32	不 可	不 可	*>1:32	1:16	
	0.01%マ-ゾニン	1: 5,120	1:32	不 可	不 可	1:32	1:4	

* 抗補作用出現を示す

原に比して抗原性の著しい減弱が認められた。猶、「レ」は0.01% マーゾニン添加により24時間以内に死滅することが確められた。即ち補結にはマーゾニン添加抗原が少くとも1ヵ月間は使用出来る。凝集反應では、その抗原の有効期間は補結のそれに比して短いとは云え、抗原に添加する防腐剤の種類により差が生じ、マーゾニン抗原よりホルマリン抗原が優れていることが明かとなった。

考 え 方

肉眼的「レ」凝集反應の抗原と同じようにして作った抗原即ち遠沈浮游液を抗原とし、その補結術式は発疹チフス、発疹熱診断に使用されているアメリカ陸軍軍医学校法に準じ「レ」の補結を行い、本方法の特異性に就て検討すると共に、抗原の二三の点について検討を加えた。その成績を通覧すると、「レ」の補結は凝集反應に比し、特異性に於て何等遜色はなく（少し劣るようであるが）、「レ」症の診断、類症鑑別及び「レ」株分類等にも充分使用出来ることを明かにした。更に使用抗原に就て、之を加熱したり、マーゾニン、石炭酸、ホルマリン等の防腐剤を加えた場合の抗原性を検討すれば、加温により抗原性が著しく破壊されること、石炭酸は抗原性を高めるとも云われているがその保存中速かに抗補体作用が現われること、ホルマリンに就ては、沼田は抗補体作用を強調し使用出来ないと述べているが、著者等の成績では石炭酸に比して遙に優れ、マーゾニン抗原に比較すること、マーゾニンは凝集反應の抗原に添加することは不適當であるが、補結の抗原の添加防腐剤としては優秀なものであること等がわかった。何故に防腐剤の異なるに従い、そうなるかに就ては未だ不明である。

さて「レ」の診断、類症鑑別或は「レ」の抗原分析として従来専ら簡單で特異性の高い凝集反應が用いられ、補結は殆んど用いられなかつた。「レ」培養基の改善に伴い、上述の如く容易に特異性のある、1ヵ月間も保存の出来る抗原が出来る今日に於て、たとえその術式或は設備、器具に於て凝集反應より複雑で、熟練を要するとは言え、補結と云う新たな角度から「レ」症の分類或は類症鑑別が行われるべきである。因みに「レ」症に於ける補結抗体の消長に就ては目下検査中である。

む す び

1. 「レ」培養液を遠心し、その沈渣を集めて作った抗原は「レ」補結に充分使用し得る。その際原培養液量の凡そ $\frac{1}{10}$ に濃縮し、その抗原価を4單位の抗体で測定し、その2單位の抗原を以て補結を行う。

2. アメリカ陸軍軍医学校法による発疹チフス、発疹

熱、患者診断用補結術式は「レ」補結にも應用出来る。

3. 「レ」補結は、「レ」の凝集反應に比して遜色なく、「レ」症の診断、類症鑑別及び「レ」株の分類に應用出来る。

4. 同一被檢血清に対し、補結と凝集反應とを行えば補結價は凝集價に比して一般に低く、時には $\frac{1}{10}$ 以下の低價を示す。

5. 「レ」補結の抗原作成直後では0.2% 石炭酸添加抗原、0.2% ホルマリン添加抗原、0.01% マーゾニン添加抗原、生「レ」浮游抗原、凍結融解抗原の何れも同じ抗原價を示すが、保存期間中、石炭酸添加抗原、生「レ」浮游抗原、凍結融解抗原、加熱抗原は速に抗補体作用が出現する。

6. 「レ」補結保存抗原としてホルマリン或はマーゾニン添加抗原が優れ、少くとも1ヵ月以上使用出来る。

7. ホルマリン抗原、或はマーゾニン抗原を1ヵ月間室温或は氷室に保存すれば、マーゾニン抗原は室温に於ても使用出来るが、ホルマリン抗原では1ヵ月後には抗補体作用が現はれる。

文 献

- 1) 北岡正見, 井上裕正: 肉眼的「レ」凝集反應に就て. 細菌學雜誌. 6, (4), 1951
- 2) Hübner & Reiter: Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit, Dtsh. Med. Wschr., 41, 1275-1277, 1915.
- 3) Bessemans, P. A., et Nélis, P.: Sur la fixation du complément dans la spirochètose ictéro-hémorragique C. R. Soc. Biol., 98, 1234-1236, 1928.
- 4) Wilmaers, L., et. Renaux, E.: Quarante-sept cas de spirochètose ictéro-hémorragique. Bull. de L'Institut. Pasteur, 25, 446-447, 1917.
- 5) Costa, P. S., et Troisier, J.: Sur la spirochètose ictéro-hémorragique, (avec discussion par Pettit), C. R. Soc. Biol. 79, 1038-1042, 1916.
- 6) Gaetgens, W.: Die Serodiagnose der Weilschen Krankheit mittels Komplementbindung und Flockungsreaktion. Zeit. Imm. Forschg. 94, 428-451, 1938.
- 7) Papageorgiu, S.: Über die Komplementbindungsreaktion bei Leptospirosen, Zeit. Imm. Forschg., 94, 489-504, 1938.
- 8) Pot, A. W., and Dornickx, G. J.: The complement fixation test in the diagnosis of Weil's diseases. J. Path. Bact., 43, 397-372, 1936.
- 9) 坂正義: 黄直出血性スピロヘータ免疫血清に就ての2, 3 免疫体証明法の比較. 愛知医学雑誌. 29, 263-279, 大11.

- 10) 由利悦夫：水スピロヘータ (Genus leptospira) の免疫学的分類. 日本微生物病理学雑誌. 22, 1379-1388, 昭 3.
- 11) 沼田岳二：ウイル氏病に於ける補体結合反應. 細菌学雑誌. No. 495, 301-313, 昭 12.
- 12) Randall, R., Wetmore, P. W. and Warner, A. R., Jr.: Sonic-vibrated leptospirae as antigens in complement fixation test for diagnosis of leptospirosis, J. Lab. & Clin. Med., 34, 1411-1415, 1948.