細菌多糖体処置赤血球の特異的溶血反應 に関する研究(第四報) 結核菌に就いて

根 津 尙 光

東京大学医学部細菌学教室 (主任 秋葉教授)

中村 滝 公衆衛生研究所 (所長 北野博士)

[受付: 10月12日, 1951年]

Middlebrook & Dubos²⁾ は結核菌体から Phenol 抽出法によつて得た多糖体を以て処置した羊の赤血球は人又は動物の結核血清によつて特異的に凝集せられ、活動性結核と関係があることを報告し、Rothbard, Dooneief & Hite³⁾ はこの反應を旧ツベルクリン原液を用いて行つた。Fisher & Keogh⁴⁾ は Middlebrook & Dubos の方法で牛の結核血清について実験した結果赤血球凝集反應は「ツ」反應並に解剖所見と相違していることがあつた。然し血清と抗原処置赤血球を混和して、それに補体を加えると血球凝集反應の結果に関係なく、結核牛又はワクチンを接種した牛の血清では溶血が起るが、無処置の健康牛の血清では溶血しないと報告した。私は第一報りに述べた様に *H. pertussis* の Phenol 抽出多糖体を以て血球凝集反應を研究中、この現象と同様なることを経験していたので、此の溶血反應に就いて検討して來た。その結果に就いて先に第一報り、第二報り及び第三報りで報告した。此等の知見を應用して、結核の特異的溶血反應を行い、一部の成績を得たので茲に報告する。

抗原抽出法及び抗原液

2. 岡・片倉培地又はグリセリン・ブイオン培地に發育した人型結核菌 H 37 株或は青山 B 株の菌苔を採り、これをエーテル・アルコール等量混合液に浸して 37°C の孵卵器中に 2~3 日間おき脱脂した菌に中性蒸溜水を加え、121°C、60 分間加熱抽出した遠心上清に飽和食塩水を計算量を加えて食塩濃度を 0.85~0.9% とする。エーテル、アルコール等量混合液による脱脂を省いて同様の操作を行つて作つた抗原液は著しく白濁し且つ本反應の処置用抗原液として役立たないことが分つた。

2. グリセリン・ブイオン培地に結核菌 H 37 株又は青山 B 株を十分發育せしめ、100°C、60 分間加熱殺菌後、菌体を濾過により除き、その培養濾液を採取して pH を 7.0 に修正し食塩濃度を 0.85~0.9% とすれば、その儘抗原液として使用し得ることが分つた。

3. Sauton 培地で作つた旧ツベルクリン原液 (北研製) の 5~10 倍稀釈液の pH を 7.0 に修正して食塩濃度を 0.85~0.9% とすれば、本反應の抗原液として十分役立つものであつた。

4. グリセリン・ブイオン培地に人型結核菌 H 37 株を十分に發育せしめ、100°C 60 分間加熱殺菌後、結核菌苔と培養濾液とに分離し、結核菌体はエーテル・アルコール等量混合液に浸して 37°C の孵卵器中において 2 日間脱脂し、中性蒸溜水を加え 121°C で 60 分間加熱抽出する。この上清を濃縮し、10% 三塩化醋酸を以て pH 3.0 とし、一夜氷室に置く。此の時の上清部分を採取してセロファン囊に入れ、氷室にて 5 日間透析し、略々 pH 7.0 に復した後、アルコール 3 倍量と醋酸ソーダを加えて沈澱を生ぜしめ、この沈澱を pH 4.0 の醋酸水に溶解せしめて不溶物を遠心除去後、上清にアルコール 3 倍量と醋酸ソーダを加え沈澱を生ぜしめこれを減圧乾燥する。このものは水によく溶解し 10 mg per cc の溶液で Biuret 反應陰性、Molish 反應陽性で結核菌体の多糖体性分割 (Fr. 1) である。

グリセリン・ブイオン培養濾液は、 $1/10$ に加熱濃縮して、10% 三塩化醋酸で pH 3.0 とし一夜氷室におき、その上清をとり、セロファン囊に入れて 5 日間透析して透析内液が中性に復した後、再び濃縮して 3 倍量のアルコールと醋酸ソーダを加え一夜氷室におき、その沈澱をとり、pH 4.0 の醋酸水に溶解して不溶物を除き、更に 3 倍量のアルコールと醋酸ソーダを加えて沈澱せしめ減圧乾燥する。このものは培養基の色がついたためか茶褐色

NEZU, Naomitsu: Studies on the specific hemolysis of the red corpuscles treated with some bacterial polysaccharides. IV. On *Mycobacterium tuberculosis*. Department of Bact., Faculty of Med., University of Tokyo; Public Health Laboratory, Nakamura-Taki Pharm. Co. Ltd., Tokyo; Jap. J. of Bact., 7(5): 477-480 1952.

であつた。水によく溶解し 10 mg per cc の溶液で Biuret 反應陰性、Molisch 反應陽性の培養濾液中の多糖体性分劃 (Fr. 2) である。

Fr. 1 及び Fr. 2 の 1 mg per cc の生理食塩水溶液は本反應処置抗原液となり得た。No. 24 の Fr. 2 の分劃は還元糖は 45.87 % であつたが 1 表に示す通りその有効濃度は 0.5 mg per cc 以上であればよい。但し十分の濃度が與えられた方が反應の時間が短かくて明瞭な結果がえられる關係上 1 mg per cc が適當である。

表 1 Fr. 2 (No. 24) の有効濃度

Fr. 2 (No. 24) per cc 濃度	10mg	1mg	0.5mg	0.1mg	0.01 mg
結核患者血清による 溶血反應の結果	3	3	3	3/	0

(3) は完全溶血 (0) は溶血せざることを示す

溶血反應術式

結核に於ける溶血反應の術式はすべて第一報に記載した通り行つた。牛の洗滌赤血球を用い、補体は数頭のモルモット血清を混合してその 5 倍稀釈を用い、可檢血清は 56°C で 30 分間非働性にして牛血球吸收後稀釈せず用いた。其の他は既述の通りであるから省略する。

特異的溶血反應の成績

本実験に供した結核患者血清及び其の他の血清の大多數は、稻田登戸病院及び東京都立大塚病院の入院患者並に外来患者から得たものである。其の他中滝公研、中滝駒込工場及び大沢研究所に勤務する人達からも蒐集した。

此等の血清 182 例について本溶血反應を行つた成績を總括すると表 2 に示す通りである。

表 2 結核の特異的溶血反應成績

血清の種類	検査 例数	陽性 例数	陰性 例数	陽性率 (%)
結核血清	111	102	9	91.8%
所謂健康者ツ (+)	45	5	45	11.1
ツ (-) 者	5	0	5	0
最近 BCG ツ (+)	4	4	0	100
4~7 年前 BCG ツ (+)	3	0	3	0
最近 ツ陽轉者	2	2	0	100
他の疾患者	12	6	6	50

1. 結核患者血清の場合の成績

肺結核、腸結核及び腎臓結核等の患者の重軽症併せて 111 例の血清に就いて行つた結果は、本溶血反應陽性

102 例、陰性 9 例でその陽性率は 91.8 % であつた。陰性例には結核として入院しているがその所見の明かでないもの又は現在是非常に輕快しているもの及び肺結核腸結核合併の重症者等が含まれていた。

2. 「ツ」反應陰性者血清の場合の成績。

「ツ」反應陰性で健康な者の血清 5 例についての成績は陽性例 0、陰性 5 例で陽性率 0 % であつた。

3. 「ツ」反應陽性で所謂健康者と見られる者の血清についての成績。

検査例数 45 例中陽性 5 例、陰性 40 例で陽性率 11.1 % であつた。陽性例のうち 1 例は 3 カ月後発病した者が見られた。

4. BCG 接種、「ツ」反應陽轉後 6 カ月以内の者の血清についての成績。

検査例数 4 例中 4 例とも陽性であつた。

5. BCG 接種後 4~7 年經過し「ツ」反應陽性者の血清の場合の成績。

検査例数 3 例中 3 例とも陰性であつた。

6. 他の診断名で治療中の患者血清の場合の成績。

検査例数 12 例中陽性 6 例、陰性 6 例で陽性率 50 % であつたが、その詳細な内訳は、表 3 にかゝげた。尙お此等患者は診断により一應結核を否定されてはいるが嚴密に結核の有無はたしかではないと考えられる。

7. 自然に「ツ」反應陽轉者の血清の場合の成績。

検査例数 2 例中 2 例とも陽性であつた。此の場合 2 例とも陽轉後 3~4 カ月經過した者で微熱を訴えていた。

表 3 他診断名患者の溶血反應結果

病 名	検査例数	陽性例数	陰性例数
脚 氣	2	1	1
高 血 壓	4	2	2
膿 胸	1	0	1
Bronchektasie	1	0	1
乳 癌	1	1	0
蟲様突起炎 (手術後)	1	1	0
梅 毒	1	0	1
診 斷 不 明	1	1	0
計	12	6	6

型特異性の検討

人型結核菌としては H 37 株及び青山 B 株を、鳥型及び牛型結核菌としては傳研株を、他の抗酸性菌としては恥垢菌 (傳研) を用い、之等の夫々をエーテルアルコール等量混合液で脱脂し、中性蒸溜水を加えて 121°C で 60

表 4 各型結核菌及び恥垢菌抽出抗原を用いての実験

血 清	處置抗原	人型	人型	牛型	鳥型	恥垢菌
		青山 B株	H37株	(傳研)	(傳研)	(傳研)
結核血清 No. 1		+	+	+	—	—
結核血清 No. 44		+	+	+	—	—
結核血清 No. 58		+	+	+	—	—
健康血清 No. 2		—	—	—	—	—

分間加熱した遠心上清を抗原液として牛血球を処置し、本反應を既知結核患者血清を用いて行つた結果を表4に示した。即ち鳥型菌及び恥垢菌からの抗原処置血球では陰性に終つた。

牛血球による血球凝集反應との比較

本実験に於て補体を加えるに先だつて、牛血球の凝集を観察したが、殆んど凝集像が見られなかつた。

この観察後補体を加えることにより、陽性血清に於ては明瞭に溶血が見られた。鶏及びO型人血球による血球凝集反應と比較すると溶血反應の方が可なり鋭敏であつた。

総括及び考按

Middlebrook & Dubos²⁾は結核菌より抽出した90% Phenolに溶解せずして水に溶解する多糖体を以て羊の赤血球を処置し、患者血清と間の特異的血球凝集反應を行い、活動性結核との関連性に就て報告しているが、Fisher & Keogh⁴⁾はこの方法を牛の結核血清診断に用いたが、解剖所見と異なる場合があり、血球凝集反應の系に補体を追加することによる溶血現象はこの誤を無くする様にのべている。私は第一報から第三報までの実験成績に基き、岡、片倉培地並にグリセリン・ブイヨン培地培養結核菌体から中性蒸溜水加熱法によつて多糖体性分劃を得、又培養濾液からも多糖体性分劃を得、これが赤血球処置抗原となる事を明かにした。又従て菌の中性蒸溜水加熱上清、グリセリン・ブイヨン培養濾液そのまゝも條件を整えると抗原となり、旧ツベルクリン原液も亦処置抗原となつた。結核患者血清に就いては陽性率91.8%「ツ」反應陽性で通常勤務に差支の無い所謂健康者血清に就いては陽性率11.1%であつた。結核に関する限り相当自覚症状も欠除しているのであるから單なる非特異的のものとも考えられない。殊にこの中から他日發病者を出したことは注目させられる。「ツ」反應との関係は非感染にして「ツ」陰性の場合には本反應陰性である。又「ツ」反應陽性の健康者の場合に於ては関連性が少いように観察された。

BCG接種との関係はBCG接種後6ヵ月以内の血清に就いて行つたところは本反應は陽性であるが、BCG接種後4~7年を経過し、現在「ツ」反應陽性者血清に就いては陰性であつた。BCG接種後の陽性血清と結核患者陽性血清の區別等は、今後例数を増加して溶血價を比較して行つて見る予定である。最近「ツ」反應陽轉して微熱等ある者即ち初感染者に於ても本反應陽性であつた。2~3年前に結核性肋膜炎に罹患し加療によつて現在は所見のない者の血清に於ては陰性であつた。現在他疾病名で治療中の患者血清に於てはその50%(12例中)が陽性であつたが、此等の患者中に於て結核の併有が絶無であるとは云えないと考えられる。以上の成績を以て本反應の價値は速断出来ないが、一部の意義は本実験によつて認められた。今後各例について分析的に研究して行く必要がある。

結核菌の免疫化学に就いては、おびたゞしい報告があるが、就中Schlossmann, Ionesco-Mihaiesti¹⁾等は、人型、牛型及び鳥型の各型結核菌は、それぞれ特異の多糖体を持つてゐることを報告しているが、以上各型菌抽出抗原を以て本反應を行い、同様の特異性の一端をうかがうことが出来た。これを利用して鳥型結核菌又は非病原性抗酸性菌との鑑別の方法ともなり得ると考える。

牛血球を用いての本反應と血球凝集反應との比較は後者が反應微弱のためなし得なかつたが、血球凝集反應に適した赤血球を以て今後検討する予定である。鶏及びO型人血球による血球凝集反應に比して溶血反應は鋭敏であつた。

結 論

結核菌体及び培養濾液から抽出した多糖体性分劃で処置した牛赤血球は結核血清と補体を加えると溶血を起し、本反應は一應特異的であつた。又本反應によつて結核菌と非病原性抗酸性菌(恥垢菌)を血清学的に區別する事が出来た。赤血球凝集反應の結果と比較すると溶血反應の方が一般に鋭敏であつた。

(本稿を終るに臨み秋葉教授の御懇切なる御指導・御校閲を深謝する。又御指導と御鞭撻を賜つた北野所長に感謝する。血清を提供された稻田登戸病院宮永博士、大塚病院鷹取氏菌株を御分與下された教室の近岡氏、傳研の金子氏に謝意を表す。大寺、宮田の両君の勞を多とする。本研究の概略は26. 6. 22. 日本細菌学会関東支部総会に発表した。)

文 献

- 1) 根津尚光: 細菌多糖体処置赤血球の特異的溶血反應に関する研究(第一報)一(第三報). 日本細菌

学雑誌 7巻3号及び4号

- 2) Middlebrook, G. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 3) Rothbard, S., Doonaeief, A. S. & Hite, K. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74,72, 1950.
- 4) Fisher, S. & Keogh, E. V.: Nature, 165, 248, 1950.
- 5) Haworth, N. & Stacey, M.: Annual Review of Biochem., 17, 1948.
- 6) Heidelberger & Menzel: J. Biol. Chem., 118, 79, 1937.
- 7) Boivin, A.: 基礎と臨床(訳), 1, 65-73, 97-102, 129-138, 1947.

(本研究は文部省科学研究費の補助に負うものである。秋葉記)