発疹チフスリケツチャの抗原構造に関する研究

4. *Proteus* OX₁₉, *Rickettsia prowazeki* 及び *Rickettsia mooseri*

に共通抗原である X 因子の構造について

飯 田 毅

東京大学傳染病研究所第五研究部 (部長 田宮猛雄教授)

[受付: 8 月 25 日 1952 年]

著者は前報において, Castaneda の所謂 X 因子は, B 型人血球の部分抗原である B_{III} 型質に密接な関係を有する新しい異性抗原を含有することを報告したが, 本実験の主目的は, X 因子と B_{III} 型質との関係につき更に究明することであつた。

然るに血液型が B 型及び AB 型に属する人においても原則的に, また血球に B_{III}, B_{III} 型質を有する家兎 (水谷 (1932), 山崎 (1933), Friedenreich (1933), 古畑 (1947)) においては殆ど毎常, *R. prowazeki*, *R. mooseri* 感染により *Proteus* OX₁₉ に対する凝集素の上昇することは周知の事実である。これだけの事実からしても, X 因子中に B_{III} 部分型質を含有するとしても, Weil-Felix 反應基因物質の主要抗原は B_{III} 部分型質以外のものであることを容易に想定し得る。

A 型質に対する抗体産生適の家兎の選択に関し, 日比野 (1934) は免疫動物の血清型を, 越野 (1938) は唾液型を強調している点に鑑み, 著者は使用家兎血球中における B_{III} 部分型質の存在を確認した上で, *Proteus* OX₁₉, *R. mooseri* で家兎を免疫し, X 因子に対する抗体産生と唾液中の B_{III} 部分型質の排出, 非排出との関係。家兎血球及び海狸血球酸性加熱抽出液による B_{III}-β_{III} 血球凝集反應及び Weil-Felix 反應に対する抑制試験との関係。さらにまた *Proteus* OX₁₉ アセトン乾燥菌体より抽出した X 因子の理化学的影響に対する抵抗性の研究等より, X 因子中に含有される B_{III} 部分型質と Weil-Felix 反應に関與する部分とを区別し得る所見が得られたので, その成績を発表し同学諸賢の批判を乞う次第である。

実験材料及び実験方法

1. 供試血清

a. 抗 *Proteus* OX₁₉ 家兎血清。*Proteus* OX₁₉ の 37°C 20 時間寒天斜面培養を滅菌生理的食塩水の 1cc 中 1mg

の割合に浮遊せしめ, 60°C, 30 分間加熱したものの, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 及び 5.0cc をそれぞれ耳静脈内に 5 日間間隔で 5 回注射し, 最終注射から 10 日後に全採血し, 分離した血清を 56°C, 30 分間加熱により非働化したものに 0.5% に石炭酸を加え氷室に保存した。

b. 抗人 B 血球家鶏血清。前報において使用したものと同一血清で, B_{III}-β_{III} 血球凝集反應にはすべて本血清を A 型人血球で吸収した上, 海狸血球を凝集原として使用した。本血清は海狸血球に対し 320 倍まで陽性をしめた。

c. 発疹熱恢復期患者血清。Weil-Felix 反應 10,240 倍以上陽性のもの 1 種類を使用した。本患者の血液型は O に属している。

2. B_{III}-β_{III} 血球凝集反應抑制試験術式。抑制抗原を段階的に 2 倍稀釈し, その 0.2cc づつを試験管に分注し, これに予備試験で測定した凝集價の 6 単位を含むように稀釈した抗人 B 血球家鶏血清を 0.2cc づつ加え, 室温に 1 時間放置したのち各試験管に 1% 海狸血球浮遊液 0.2cc づつを加え, 37°C, 2 時間放置した場合の凝集反應阻止の有無を觀察した。

3. Weil-Felix 反應抑制試験術式。抑制抗原を段階的に 2 倍稀釈した各 0.2cc に, 予備試験で測定した凝集價の 6 単位を含むように稀釈した発疹熱患者血清 0.2cc を加え, 37°C, 2 時間更に氷室に 1 夜放置したのち, *Proteus* OX₁₉ の 20 時間培養を生理的食塩水 1cc に 2mg の割合に浮遊させてつくつた菌液 0.2cc を各試験管に加

IIDA, Tsuyoshi: Studies on the antigenic structure of *Rickettsia prowazeki*. IV. Further studies on the antigenic composition of so-called Castaneda's X factor. The Institute for Infectious Diseases, Tokyo University. — Jap. J. of Bact., 8(4): 365-368, 1953.

え、37°C、孵卵器内に2時間、更に氷室に1夜放置したのち結果を凝集鏡で判読した。

4. *Proteus* OX₁₉ より X 因子の抽出法。*Proteus* OX₁₉ のアセトン乾燥菌体 1g につき n/100 NaOH を 20cc 加え、振盪器で5時間振盪抽出し、更に1夜氷室に放置したのち遠心沈澱により菌体を除去して得た上清に、n HCl を沈澱を生じなくなるまで加える。その遠心上清を水道水に対し48時間透析する。内液に2倍量の96%アルコールを加え、生じた沈澱を乾燥器内で乾燥する。この500倍水溶液に1/50量にn NaOHを加え100°C、10分間加熱する。のちn HClでpH=3.0に修正し、生じた沈澱を除去し、2倍量のアセトンで分割沈澱し、この操作をpH=3.0で沈澱を生じなくなるまで繰返し、最後に得た沈澱を乾燥し本実験に使用した。

実験成績

1. 家兎唾液による B_{III}-β_{III} 血球凝集反応並に Weil-Felix 反応抑制試験。

健康家兎15匹から0.1%ピロカルピン0.5cc注射によつて唾液を採取し、100°C、10分間加熱したのち遠心沈澱した上清を用い、B_{III}-β_{III} 血球凝集反応並に Weil-Felix 反応抑制試験を行つた。これ等家兎唾液中には B_{III} 部分型質を排出するものと全く排出しないものとが認められた。排出型の中、終末稀釈96倍または192倍まで血球凝集反応を阻止する唾液であつても、Weil-Felix 反応を抑制し得ないことが認められた。更に、これ等排出型の家兎の唾液を抗原として、抗 *Proteus* OX₁₉ 家兎血清並に発疹熱患者血清に対し補体結合反応を行つたが、いずれも陰性であつた。なおこの場合に用いた各免疫血清の使用濃度は、R. mooseri ワクチンに対する補

体結合反応における抗体価の4単位を含むように稀釈されたものである。

2. 家兎免疫試験

人β血清の海狼血球に対する凝集素はいずれの家兎血球によつても吸収されることから、実験に使用した家兎の何れの血球にも B_{III} 部分型質が存在することが考えられる。これ等の家兎を *Proteus* OX₁₉ で免疫し、R. mooseri ワクチンに対する補体結合性抗体及び海狼血球に対する凝集素産生の有無、次に R. mooseri ワクチンまたは海狼血球で免疫し、*Proteus* OX₁₉ に対する凝集素の産生の有無を検し、B_{III} 部分型質の排出型、非排出型により X 因子に対する抗体の産に差異を認め得るかどうかを観察した。

表1に示す如く次の結果が得られた。

a. *Proteus* OX₁₉ 免疫家兎群。いつれの家兎においても、*Proteus* OX₁₉ に対する抗体価の上昇を来すと同時に R. mooseri ワクチンに対する補体結合性抗体の著明な産生が認められ、この抗体産生と家兎の唾液型との間に平行関係は認められなかつた。

b. R. mooseri ワクチン免疫家兎群。Cox-Craigie 法で感染卵黄囊乳剤より作つた R. mooseri ワクチンを、1, 2, 3, 4, 及び5ccの順に5日間隔で5回静脈内に注射免疫して得た血清につき検したが、何れの家兎においても唾液型に関係なく、*Proteus* OX₁₉ 凝集素の上昇が認められ、また、*Proteus* OX₁₉ 免疫群の場合と同様、B型人血球、海狼血球に対する凝集素の産生は認められなかつた。

c. 海狼血球免疫家兎群。心臓穿刺で採血した枸橼酸血液を滅菌生理的食塩水で5回洗滌したものを、第1回

表 1 家 兎 免 疫 試 験

家兎番号	B _{III} 血球凝集 反応抑制能力 (唾液稀釈倍数)	免 疫 原	反 應 原			
			<i>Proteus</i> OX ₁₉	B型人血球	海 狼 血 球	R. mooseri ワ ク チ ン
1	3	<i>Proteus</i> OX ₁₉	10240	—	—	640
2	96	"	10240	—	—	320
10	—	"	10240	—	—	640
11	48	"	10240	—	—	320
12	3	海 狼 血 球	—	—	1280	
15	—	R. mooseri	1280	—	—	
16	96	"	640	—	—	
17	192	"	320	—	—	
19	—	"	320	—	—	
20	96	海 狼 血 球	—	—	2560	

5%浮遊液 3 cc, 第2回に 5%浮遊液 5 cc, 第3回に 10%浮遊液 5 cc, 第4回に 10%浮遊液 5 cc, 第5回に 20%浮遊液 5 ccづつ, 3日間隔で耳靜脈内に注射し, 最終注射日から 10 日目に採血して得た血清につき検したが, 家鶏免疫の場合と異り海狸血球に対する凝集素のみが産生され, B型人血球, *Proteus* OX₁₉ に対する凝集素の産生は認められなかつた。

3. 海狸血球及び家兎血球酸性加熱浸出液の B_{III}-β_{III} 血球凝集反應並に Weil-Felix 反應に対する抑制試験。

海狸及び家兎の枸橼酸血液を生理的食塩水で 5 回洗滌し, 血球 1 容に対し n/10 HCl 加食塩水 4 容を加え, 100°C, 2 時間加熱し遠心沈澱した上清を n NaOH で中和し, 生ずる沈澱を除去した後その上清を用いた。

海狸血球浸出液は終末稀釈 384 倍, 家兎血球浸出液は 768 倍まで, それぞれ抗人 B 血球家鶏血清に対する海狸血球の凝集反應を抑制したが, Weil-Felix 反應に対する抑制を全くしめさなかつた。

4. *Proteus* OX₁₉ より抽出した X 因子における易酸性物質と耐酸性物質との存在について。

前述の如く *Proteus* OX₁₉ より抽出した X 物質の 100°C, 1 時間加熱溶液, また同物質溶液に n HCl を 1/10 量加え 100°C, 30 分加熱したのち n NaOH で中和した溶液のそれぞれを用いて, 抗 *Proteus* OX₁₉ 家兎血清並に発疹熱患者血清に対する沈降原價の測定及び B_{III}-β_{III} 血球凝集反應に対する抑制能を調べた。

表 2 X 因子の血清学的性状

抗 原	沈 降 反 應		B _{III} 血球凝集 反應抑制能力
	抗 OX ₁₉ 家兎血清	発 疹 熱 患者血清	
未 処 置	1 : 256,000	1 : 512,000	1 : 120,000
100°C, 1 時間	1 : 256,000	1 : 512,000	1 : 120,000
n/10 HCl 加 100°C, 1 時間	—	—	1 : 120,000

表 2 に示す如く, 100°C, 1 時間加熱の場合は, 抗 *Proteus* OX₁₉ 家兎血清に対し 256,000 倍, 発疹熱患者血清に対し 512,000 倍まで沈降反應陽性を示めし, B_{III}-β_{III} 血球凝集反應を 120,000 倍稀釈まで抑制し, 未処置溶液との間に殆ど差異が認められなかつた。然るに酸性加熱処理を行う時は, その血球凝集反應抑制能に変化を示めさなかつたが, その沈降原價は 1,000 倍稀釈で陰性を示めた。

なお本物質を酸性加熱処理する時は, 多量の沈澱を生じ, この沈澱を n NaOH で中和しながら原量の食塩水

に溶解した後, その沈降原價を測定したが全く陰性であつた。

また本物質の 1,000 倍溶液は, Molish 反應⁺, Biuret 反應⁺を示めた。

以上の実験成績から, 前述の如くして抽出した X 因子には, 患者血清に対し高度の沈降原性を有する物質と B_{III} 部分型質に関連する物質とが含有され, 前者は易酸性であるが, 後者は耐酸性であると考えられる。

5. X 因子による発疹熱患者血清の吸収試験。

40 倍稀釈患者血清に抽出物の 1,000 倍溶液の等量を加え, 37°C, 2 時間更に氷室に 1 夜放置したのち高速遠心沈澱して得た上清を用いて, Weil-Felix 反應を行い, *Proteus* OX₁₉ に対する凝集素吸収能を検し, 中性加熱並に酸性加熱により如何なる影響を蒙るかにつき実験した。

その結果, 本物質は *Proteus* OX₁₉ 凝集素を高度に吸収し, しかも中性加熱によつては何等の変化も蒙らないが, n/10 HCl 酸性の條件の下に 100°C, 30 分加熱することによつて, その作用の殆どすべてが破壊されることを示めた。

考 察

著者は血球に B_{III} 部分型質を有する人及び家兎において, 発疹チフス並に発疹熱感染により, *Proteus* OX₁₉ 凝集素の上昇を来することからして, Castaneda の所謂 X 因子中に証明され得る B_{III} 異性抗原は, Weil-Felix 反應の主要基因物質ではなく他のものであるという想定の下に上述の実験を行い, B_{III} 部分型質と Weil-Felix 反應基因物質 (仮に x とす) との両者を血清学的に区別することを得た。

本実験において挙げ得た実験成績を要約し考察を加えれば次の如くである。*Proteus* OX₁₉, *R. mooseri* で家兎を免疫する時は, 両者に共通する抗体の産生がみられるが, B_{III} 抗体の産生は起らない。海狸血球で家兎を免疫する時は *Proteus* OX₁₉ に対する抗体は産生されない。然るに前報において, 海狸血球で家鶏を免疫することにより, *Proteus* OX₁₉, *R. prowazeki*, *R. mooseri*, 家兎血球及び B 型人血球に対する共通抗体の産生を認めたのであるが, この事実は唯單に家鶏に B_{III} 部分型質を有しないことに基因するものであり, 反之, 家兎免疫において Weil-Felix 反應抗体は産生されるが, B_{III} 抗体の産生されないのは血球に B_{III} 部分型質を有するためである。これ等の事実からしても, Castaneda の X 因子は, B_{III}+x からなるということが容易に考えられるところである。

更に、家兎唾液中の Brr 部分型質及び海眞血球並に家兎血球の酸性加熱浸出液は、Brr 血球凝集反應を阻止するが、患者血清の Weil-Felix 反應を阻止し得ないことを立証した。

また、Proteus OX₁₉ 菌体のアルカリ抽出物質は、抗 Proteus OX₁₉ 家兎血清、発疹熱患者血清に対し高度の沈降原性を表わすと共に血球凝集反應をも阻止することが認められ、更に本物質溶液を酸性加熱処理する時は、沈降原性の消失を来すが、血球凝集反應阻止能には何等の変化をも来さなかつた。なおまた、発疹熱患者血清の Proteus OX₁₉ 凝集素吸収試験において、酸性加熱処理により同様抗原性の消失を来すが、中性加熱によつては何等の変化も蒙らないことが認められた。

以上の事實は、X 因子中に含まれる Brr 部分型質と Weil-Felix 反應基因物質とが、血清学的また化学的性状においても異なるものであり、X 因子=Brr+x の想定に実験的論拠を與えたものということが出来る。

結 論

Castaneda の所謂 X 因子には、少くとも熱及び酸に対

し抵抗性を有する血液型に関連する Brr 部分型質と Weil-Felix 反應の基因物質である酸性加熱により容易に不活化する物質の2つからなることが立証された。

終りに臨み御指導を賜つた田宮、羽里両教授に深謝します。

本実験成績の要旨は、昭和 23 年 11 月、日本細菌学会関東支部会で発表された。

文 献

- 1) Castaneda, R.: J. exp. Med., 60, 1934, 119-125; ibid, 62, 1935, 289-296.
- 2) Friedenreich, V. and With, S.: Zeitschr. für Immunitätsf., 78, 1933, 152-172.
- 3) 古畑種基: 血液型学. 昭 22 (1947).
- 4) 日比野勝: 東京医事新誌. 2901, 昭 9 (1934), 2427-2432.
- 5) 越野達郎: 十全会誌. 43, 昭 13 (1938), 3385-3403.
- 6) 水谷榮夫: 十全会誌. 37, 昭 15 (1940), 2951-2967.
- 7) 山崎武治: 千葉医学会誌. 11, 昭 8 (1932), 59-97.