Treponema Pallidum Immobilization Test の研究

第1報 主として生存試験について

遠 山 雄 三 山 口 晴 一

国立予防衛生研究所一般検定部 (部長 安東清)

(受付: 5月19日 1954年)

本来の梅毒血清反応 (所謂 Reagin 反応) は牛心アルコールエキスを抗原とする所謂異性抗原による反応であり biological false positive reaction は常にこの血清反応を論ずる場合に問題になって来た。Nelson & Mayer¹⁾ は梅毒病原体 *Treponema pallidum* そのものを用いる反応, 即ち *Treponema Pallidum Immobilization Test* (T.P.I. Test) を発表して以来, 多くの人 (Magnuson,²⁾ Chacko,³⁾ Levaditi et Vaisman 等⁴⁾) により実施されている。特に Nelson⁵⁾ は, 実験梅毒に於ける免疫との関係及び biological false positive reaction につきよく論じている。我国に於ても佐藤⁶⁾ 等, 松井等⁷⁾ により報告され, 後者に於ては特にその基礎になる実験が詳細に報告されている。吾々もこの Test の実施に当り最初に遭遇する困難である *Treponema pallidum* (以下 T.p. と略す) の試験管内生存試験を行い特に補体 (活性) の影響について観察したのでその大要を報告する。

実験材料並びに方法

1. 使用 T.p. 株

使用した株は金沢大学谷教授より分与された第36号株で家兎辜丸に接種継代したもので代数は不明である。

2. 培 地

R. Boak⁹⁾ による50%家兎血清培地及び Nelson¹⁰⁾ の培地を使用した。50%家兎血清培地は, 健康家兎血清を同量の pH 7.0 の滅菌磷酸緩衝食塩水で希釈し 60°C 30分間非働化したもので, 約10~12 cc を滅菌ワクチン瓶に入れゴム栓を施した。培地中のアルブミンは Armour 製 Bovine Albumine Fraction V を使用した。Glutathion は Nutritional Biochemical Corp. 製。但し牛血清の ultrafiltrate は入手困難の為割愛した。

3. 補 体

前日に3頭以上のモルモットより採血し, 氷室に保存, 血清分離, プールしたもので, 不活性化は56°C 30分加

熱した。

4. 使用血清

ワッセルマン反応検査用血清及び実験に用いた梅毒家兎血清 (辜丸炎を起し T.p. を証明したもので, 使用前 56°C 30分 (一度非働化したものは56°C 10分) 加温した。

5. T.p. 浮遊液の作製

家兎辜丸に T.p. を接種後, 約2週間後, 血清反応と触診により辜丸炎を診断し, 頸動脈より全採血し (Boak により耳静脈より食塩水を約200 cc 注入しながら心臓より採血する方法も行つたことがある)。死後腹腔より無菌的に両側辜丸を摘出し, 滅菌シャーレにとり, 滅菌食塩水で洗い鉢で10~20コに slice し, ワクチン瓶中の培地に入れ, ゴム栓をし, 真空ポンプで排気し, 窒素炭酸ガス混合ガス (N₂ 95%, CO₂ 5%の割) を充填し室温に約1時間回転, 振盪し T.p. を組織内より浸出せしめて後500回転, 10分間遠心し, 上清をとり T.p. 浮遊液とした。この浮遊液は1部をとり暗視野鏡検 (油浸) し motility (動%) を算定し, 70%以上のものを使用した。

6. T.P.I. Test の実施

被検血清 0.05 cc, 補体 0.05 cc T.p. 浮遊液 0.3 cc を小試験管に入れ, 活性補体と不活性補体の分で2本が1組となるようにした。(補体の最終濃度は 1:8 となるわけである)。小試験管の綿栓は出来るだけ緩かにし嫌気瓶に入れ10 mm Hg 位まで減圧し, N₂+CO₂ 混合ガスを充填し, 32°C に保ち16時間~20時間後, 暗視野鏡検 (油浸) した。本実験の前半に於ては10視野中

TOYAMA Yuzo & YAMAGUCHI Seiichi: Studies on *Treponema Pallidum Immobilization Test*. (I) In vitro survival test of *Treponema pallidum*. National Institute of Health of Japan. — Jap. J. of Bact., 9(10), 805-809, 1954.

の T.p. を算え、後半に於ては 50 コ算えて動いているものの百分率(動%)を算出した。

本実験の一部は松井, 富川²⁾に従つて 2 本位の Thum-
berg 管を使用したか後述の理由で嫌気瓶に変更した。

生存対照としては T.p. 浮遊液のみ、補体対照として
は補体(活性)+浮遊液及び補体(不活性)+浮遊液とし
て両者の結果を比較した。

生存対照で 70%以下の生存率(動%)の場合は、この
試験の結果は無意味とすることは Nelson に従つた。

不動%の計算は次の式によつた。

$$\text{不動\%} = \frac{\text{不活性補体不動\%} - \text{活性補体不動\%}}{\text{不活性補体不動\%}}$$

判定

不動%が

51% 以上 陽性

21~50% 疑わし

20% 以下 陰性 とした。

実験成績

第 1 表に見るように T.p. を家兎睾丸内に接種後の日
数は 13~31 日である。吾々の実験に於ては T.p. 接種
後睾丸炎を起すまでの日数は大体 2~3 週間である。

第 1 表

	家兎番号	日 数	血清反応	Trep/視野	培 地
1	# 7	14		43.3	R.S.
2	# 9	20		7.8	R.S.
3	#13	20	4 +	1.5	R.S.
4	#26	31	4 +	5.7	R.S.
5	#28	26	4 +	5.1	R.S.
6	#31	22	4 +	2.3	R.S.
7	#36	24	4 +	16	N.
8	#44	21	4 +	15.3	R.S.
9	#45	13	2 +	20.3	R.S.
10	#49	21	4 +	7.2	R.S.

R.S. 50% 家兎血清培地

N. Nelson 培地

血清反応 スライド法(カルデオライビン)

梅毒血清反応(Reagin 反応)は睾丸摘出の直前全採血
して得た家兎血清につきスライド法(カルデオライビン)
を行つた結果で大部分は強陽性を呈した。

1 視野当りの T.p. 数は 1.5~43.3 で 10 視野の平均
である。

使用培地は 50%家兎血清培地であるが、家兎# 36 の
睾丸の場合は Nelson 培地を用いた。この培地用の Bo-
vine Albumin Fraction V は入手困難の為充分使用出

来なかつた。

家兎# 7 (第 2 表)

第 2 表

# 7	補 体	活 性	不活性	差
		動 %	動 %	
1	1:1	81	97	16
2		96	94	- 2
3		89	80	- 9
4		95	88	- 7
5	生 存 対 照	96	培地 50%家兎血清 接種後日数 14日 Trep/視野 43.4 Thumberg tube 動% 100% 温度 32.5°C	
6		93		
7		93		
8		63		
9		83		
10		99		
11		96		
12		88		

最初は試験管内生存率に注意していたが、多くの失敗
の後で大体 80~90%代の生存率を得た。活性補体を入
れた方の動%も不活性の側に比して大した減少はない。
この T.p.は接種後 14 日目のものである。

家兎# 26 (第 3 表)

第 3 表

#26	補 体	活 性	不活性	差
		動 %	動 %	
1	1:1	0	98	98
2		0	88	88
3		0	90	90
4		0	94	94
5	生存対照	96		
6		96		
7		96		

培地 50%家兎血清

接種後日数 31 日

Trep/視野 5.7

動% 96%

嫌気瓶

温度 32°C

活性補体側の生存の極度に悪かつたもので、T.p.数も
非常に減少し、10 視野中殆んど 0 であつた。接種後日
数 31 日の T.p. を使用したものである。

家兎# 28 (表省略)

補体を倍数稀釈して生存に対する影響をみた。濃度の高い処、即ち1:1, 1:2では活性補体側の生存率は減少している。

家兎#9, #36 (第4表, 5表)

同様に補体濃度の高い方に減少が著しい。

第4表

#9	補 体	活 性	不活性	差
		動 %	動 %	
1	1:1	7	91	84
2		8	92	84
3	1:2	25	0	23
4		64	92	
5	1:3	33	67	34
6		72	100	28
7	1:4	0	0	55
8		32	87	
9	1:8	82	96	14
10		89	94	5
11	1:16	90	88	- 2
12		89	94	5
13	生	97	培地 50%家兎血清	
14		88	接種後日数 20日	
15	存	91	Trep/視野 7.8	
16		96	動% 80%	
17	対	96	Thumbertube	
18		90	温度 32.5°C	

家兎#13 (第6表)

Reagin 反応陽性、陰性両血清に補体を1:4, 1:8 1:16と稀釈して加え T.P.I. Test を行つた。この表中の + は単に Reagin 反応陽性なることを示し、陽性の程度を示しているものではない。

試験管4, 8, 12, 16は補体対照で、活性補体側の動%の減少は10, 2, 24, -12%である。補体1:4 (最終濃度1:32)までは陽性を示し以上の稀釈では陰性となつている。

家兎#44 (表省略)

補体は一定にして血清を倍数稀釈して T.P.I. Test を行つた。1:1の濃度で陽性を示したが、以下は疑わし(d)となり、更に低濃度では陰性となつた。1:8, 1:16では疑わし(d)を呈し血清稀釈と陽性度とは平行しなかつた。

第5表

#36	補 体	活 性	不活性	差
		動 %	動 %	
1	1:1	48	—	—
2		64	—	—
3		20	92	72
4		52	96	44
5	1:2	76	96	20
6		78	94	16
7		62	88	26
8		42	90	48
9	1:4	92	94	2
10		82	84	2
11		84	94	10
12		84	84	0
13	1:8	94	98	4
14		96	94	-- 2
15		94	96	2
16		98	96	— 2
17		94	Nelson 培地 接種後日数 Trep/視野 嫌気瓶, 温度 動%	24日 16 32°C 96%

第6表

#13	血 清	補 体	活性	不活性	結 果		
			動%	動%	差	不動%	判定
1	+	1:1	0	100	100	100	+
2			14	92	78	85	+
3			18	92	74	80.5	+
4			50	100	50		
5	+	1:4	40	100	60	60	+
6			50	90	40	44.5	d
7			93	100	7	7	—
8			93	94	1		
9	+	1:8	100	99	-1	<0	—
10			100	100	0	0	—
11			89	91	2		
12	生 存 対 照		100	培 地	50%家兎血清		
13			91	接種後日数	20日		
14			92	Trep/視野	1.5		
15			92	動%	100%		
16			87	Thumbertube			
17			93	温 度	32.5°C		

考 察

1. 実験の始めは、試験管内に於て T.p. を 16 時間前後まで生存（動いていることを目標として）せしめることが非常に困難であつた。生存していてもその動%は低く、到底 T.P.I. Test に使用出来ない状態であつた。実験の進むにつれて生存率もよく 70% 以上の生存率も割合にたやすくなつた。技術の熟練がつんだことは勿論だが、はつきりした理由はわからない。只、嫌気状態を充分にすること、Gas 交換を充分にすることが大切であるように思われる。その理由は Thumberg 管を使用した場合に、時により 1 本乃至 2 本、全く生存率が悪く、0 のことがあつたからである。

2. 培地について検討してみると、吾々は主として、50% 家兎血清を用い、Nelson 培地その他は充分比較検討していないのでなんと云えないが、Nelson の培地を使用しても失敗はかなりあつた。

3. 温度についての基礎的検討はしていない。Nelson¹⁾ によれば 35°C を好適としている。吾々の場合は 32°C を用いたが、これは別の目的の為にフラン器の温度を調節した為で別に意味はない。

4. 血清、補体、T.p. 浮遊液は各々 0.05cc, 0.05cc, 0.3cc ずつ混合した。補体の量は $1/3$ に稀釈されることとなる。Nelson¹⁾ は補体の最終量を $1/10 \sim 1/20$ がよいとし、Test には $1/20$ を用いている。

5. 補体の影響、特に活性補体の生存率に及ぼす影響を本実験に於ては、主として観察したのであるが、吾々の最も悩んだ問題で、Nelson のいう “in vivo sensitization” という現象と考えられる。即ち T.p. を家兎に接種することにより生じた抗体の為に補体（活性）を入ただけで T.p. の運動を停止或は数の減少を来したものと考えられる。T.p. 接種後日数の長きものに（必ずしもではないが）この現象があるようである。Nelson は接種後 1～2 週間後、睪丸炎を起してから 48 時間以内に (Boak) に T.p. 浮遊液を作るようにいつているのもこの為である。然し余り早く睪丸摘出しても T.p. の数が少く実施不能となつた経験もある上、睪丸炎の最初の症状としての腫脹は極めて初期には看過され易い。且睪丸炎を起したら直ちに、いつも出来るわけではないので Nelson は摘出後、凍結して保存することを勧めている。吾々も 1 回ではあるが、凍結後直ちに融解してみたが、T.p. は動かなくなり失敗した。

X線照射の前処置をすると、抗体産生を阻止すると Nelson¹¹⁾ の報告がある。吾々も目下 X線照射を試みて実験中である。

Portnoy¹²⁾ 等はこの in vivo sensitization を認めなかつたと報告している。

6. 判定について最後に一寸触れたい。一定の血清につき一定の結果を出す為にはその技術が確立されねばならない。又補体対照に於ける活性、不活性補体を入れた 2 管中の動%の差が如何程の時に判定不能とするのか、即ちその差の許容範囲を知らない。このとり方によつても判定は可成り影響されてくると思う。勿論 Nelson の判定の規準は非常に大まかで 51% 以上の差があれば陽性とし、20% 以下の時は陰性、その間、即ち 21～50% は疑わしとし、甚だ幅が広い。

そこで Portnoy¹²⁾ 等のいう Reproducibility が大切になると思われる。

松井等⁹⁾ のいう培地による感度の差も大変興味あることで false negative の生ずるおそれもある。

7. 補体の溶血価の問題も未だ充分に検討していない。次の実験に譲る。

総 括

1) 50% 家兎血清培地及び Nelson 培地を用いて大体 70% 以上の T.p. の生存率を得ることが出来た。

2) 本実験の前半に於ては 2 本立 Thumberg 管を使用した、時により排気不充分的為か、ガス充填の不完全な為か全く（活性、不活性補体両方とも）死滅してしまつたことがあつたので後半は嫌気瓶を用い各試験管が平等な嫌気状態になるようにした。

3) 温度は 32°C を用いたのみである。

4) 補体、特に活性補体の影響は接種後日数の多いものに不動 T.p. が多い様であつた。Nelson のいう in vivo sensitization と思われる。且補体濃度の高い方に著しくあつた。

5. T.P.I. Test の結果は未だ不確実であつた。今後の研究にまつつもりである。

拙筆に当り御指導を賜つた安東部長に謝意を表すると共に種々御援助を賜つた東京都衛生研究所細菌部、松井清治博士、富川栄一氏に厚く感謝の意を表する。

文 献

1. Nelson, Jr. R. A. and Mayer, M. M.: J. Exp. Med. 89. 369～393 (1949)
2. Magnuson, H. J., Thompson, Jr. F. A. and McLeod, C. P.: J. Immunol. 67. 41～49 (1951)
3. Chacko, C. W.: Brit. J. Exp. Path., 34 (5), 556～563 (1953)
4. Levaditi, C. Vaisman, A. and Hamelin, A.: Presse médicale 61 (20) 401～402 (1953)
5. Nelson, Jr., R. A.: Brit. J. Ven. Dis.

XXVIII, 160(1952)

6. 佐藤, 市川, 山口: 性病 37(2) 84~88(1952)
7. 松井, 富川: 日本細菌学雑誌 8(6)651~656 (1953)
8. 松井, 富川: 日本細菌学雑誌 9(3) 219~221 (1954)
9. Boak, R.: 私信
10. Nelson, Jr., R. A.: Am. J. Hyg. 48, 120~132 (1948)
11. Nelson, Jr., R. A.: Presse Médicale, 60 (81) 1719 (1952)
12. Portnoy, J. Olansky, S. and Edmundson, W. F.: Am. J. Syph. Gono. and Ven. Dis. 37 (5) 413~423 (1953)