炭疽沈降素血清の特異性に関する研究

第1報 炭疽沈降素血清に類属反応を示す細菌の種類

高 木 静 雄

浪速大学農学部家畜微生物学教室

〔受付: 6月4日 1954年〕

緒 言

炭疽沈降素血清（以下炭沈血清と略記す）の特異性に関する従来の研究報告¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾によると、実際面に応用の場合炭沈血清は絶対に特異性を示すものと認めてよい。即ち炭疽臓器の浸出液には例外なく沈降反応を示すが、炭疽でない臓器の浸出液にはどんな場合でもまず反応を示すことがない。而して細菌の純粋培養の浸出液を用いた場合は、炭疽菌に近縁の細菌の中には炭沈血清に対して類属反応を示すものがある。しかしながら他の近縁でない細菌には絶対に類属反応を示すものがないと記載されている。現在我々の炭沈血清の特異性に関する知識⁶⁾の大部分は、これ等の研究報告によつて基礎づけられているように思われるが、併し血清蛋白による沈降素血清の特異性に関しては佐藤及び大熊⁷⁾、佐藤⁸⁾等の外多数の研究者によつて詳細な研究がなされているの compared, 炭沈血清の特異性については、いささか等閑視されているよううらみがある。

又著者は元華北産業科学研究所に在職中、たまたま炭疽斃死馬の腐敗臓器を以て Ascoli 反応を実施した際認められた陽性の反応が真性の結果によるものか、或は使用した炭沈血清の非特異性によるものかその判定に迷つた経験⁹⁾があり、更に現在吾国で使用されている炭沈血清の特異性についても実験の結果、従来の報告に照してかなり相違ある点があるように認められたので、これ等の事実からも炭沈血清の特異性については多方面からの再検討が必要であることを痛感して、本研究に着手した次第であるが、今回は先ず基礎研究として、炭沈血清に対して類属反応を示す細菌の種類について追究した結果を報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用炭沈血清 農林省家畜衛生試験場の製品（以下家畜馬血清と略記す）及び当教室で Ivanoff¹⁰⁾、昆野等¹¹⁾の方法を修正して、家兔を使用して炭疽1 苗菌の幼

若培養を0.5% Formalin 生理的食塩水に浮遊させた死菌抗原を以て、その実量、約1, 2, 5白金耳、及び1, 1.5, 2斜面の6回接種によつて免疫して得た5例の炭沈血清（以下家兔血清と略記す）を使用した。

2. 使用菌株及びその由来

好気性有芽胞菌 36株
好気性(無芽胞)菌 7株
嫌気性菌 2株
或種の微 1株

これ等供試菌株は東大農学部獣医学科細菌学教室。阪大微生物病研究所、武田薬品工業株式会社醸酵研究所、農林省家畜衛生試験場より分与を受けたもの及び当教室で分離保存しているものである。

3. 沈降反応の実施 重層法によることとし、20分間観察によつて、細菌浸出液の何倍稀釈迄反応がおきるかを検べて反応の強さを定めた。

実験成績

実験1 好気性有芽胞菌の浸出液に対する炭沈血清の類属反応

使用菌株及びその浸出液の作り方: 本試験に用いた好気性有芽胞菌は既知株6株の外、当教室に於て、土壤或は枯草から分離した30株(B. 1, 2 ~30と呼称す)である。此の分離菌30株の性状は第1表に示すように、group III, IV, Vに入れた4株を除いて他の26株は略類似した性状を有するが、特に group I の16株は極めて類似して、これを Bergey¹²⁾の記載によれば、*B. cereus* Flankland 或は *B. megatherium* De Bary

TAKAGI Sizuo: Studies on the specificity of Anthrax precipitin serum. (1) Kinds of bacteria show the group reaction against Anthrax precipitin serum, Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Naniwa University. — Jap. J. of Bact., 9(10), 885-890, 1954

第1表 分離好気性有芽胞菌30株の性状検査成績

グループ	分離菌株番号	形態				生物学的									
		大きさ 平均幅×長 μ	グラム	芽胞	運動性	ゼラチン	リトマス牛乳	硝酸塩還元	クエン酸ソーダ	インドール産生	カタラーゼ	アラビノーゼ	キシロノーゼ	グルコノーゼ	ラクトーゼ
I	1, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 27	1.1×4.0	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	+	+	-	+	-	-	+	-
Ia	12, 19	1.0×4.1	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	+	+	-	+	-	-	+	-
Ib	16, 18	1.4×4.6	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	+	+	-	+	-	-	+	-
II	2, 3, 6, 29, 30	1.1×3.0	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	+	+	-	+	-	-	+	-
IIa	5, 13, 26	1.0×3.8	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	+	+	-	+	-	-	+	-
IIb	8, 23, 25	1.1×4.0	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	-	+	-	+	-	-	+	-
III	24, 28	1.0×3.6	+	+	+	-	R _{n2} , P ₇	-	-	-	+	-	-	-	-
IV	4	0.8×3.7	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	-	+	-	+	-	-	-	-
V	7	0.7×3.6	+	+	+	-	- ₁₄	-	-	-	+	-	-	-	-
対照	B.subtilis NRRL-588	0.7×3.0	+	+	+	+	R _{n2} , P ₇	+	+	-	+	+	-	+	-
	B.megatherium de Bary	1.0×4.8	+	+	+	+	R _{n2} , P ₁₀	-	+	-	+	-	-	+	-
	B.pseudoanthracis	1.1×4.3	+	+	+	+	R _{n1} , P ₇	・	+	-	+	+	-	+	-
	B.cereus Frankland	1.0×4.5	+	+	+	+	R _{n2} , P ₇	-	+	-	+	-	-	+	-
	B.mycoides Smith	1.2×5.3	+	+	+	+	R _{n7} , P ₁₂	・	-	-	+	-	-	+	-
	B.anthraxis 強毒株	1.1×4.7	+	+	-	+	R _{n2} , P ₇	++	-	-	+	-	-	+	-

〔註〕 R_n: 還元 P: ペプトン化 •: 検査されなかつたもの 記号右側の数字: 経過日数

*: 大部分は () 外の反応を示し, 一部は () 内の反応を示す。

に近いもののようである。

以上の菌株を用いてその幼若培養を加熱殺菌後, 乾燥して菌粉を作り, それを以て100倍生理的食塩水浸出液を作つて濾過したものを浸出液の原液 (これを100倍稀釈液とす) として使用した。

成績 これ等の浸出液を以て炭沈血清に対する類属反応の発現如何を検べて第2表及び第3表に示すような結果を得た。

既知株の浸出液は, 家衛馬血清に対しては何れも強い類属反応を示し, 炭疽菌の示す主反応と殆ど差違が見ら

第2表 既知好気性有芽胞菌の浸出液に対する炭沈血清の類属反応

炭沈血清	反応原	B. anthracis 家衛試	B. pseudo-anthraxis 東大より	B. megatherium De Bary	B. cereus Frankland	B. mycoides Smith	B. subtilis NRRL-588	B. mesentericus Trevisan
家衛馬血清		204800	204800	204800	204800	204800	204800	204800
家衛馬血清	No.12 (♂ 2 kg 在来種)	3200	0	6400	0	0	0	0
	No.20 (♂ 2.4 kg 在来種)	12800	800	51200	100	200	400	800
	No.21 (♂ 2.7 kg 在来種)	6400	400	12800	0	100	400	400
	No.31 (♂ 2.5 kg 在来種)	51200	800	25600	0	0	0	0
	No.32 (♀ 2.6 kg 在来種)	51200	400	25600	100	200	0	800

表中の数字は反応の力価を示す

0は浸出液の100倍稀釈で反応のおきなかつたもの

性					状	
サ ッ カ ロ ー ゼ	グ リ セ リ ン	澱 粉	* M R	* V P	* 溶 血 性	
			馬 血 球	山 羊 血 球		
+	+	+	+(−)	−(+)	+(±)	+(±)
+	+	+	+(−)	−	+(±)	±(−)
+	+	+	+(−)	−	+(±)	+(−)
+	+	−	−(+)	−	+	+(±)
+	+	−	−(+)	−	−	±(−)
+	+	−	+	−	−	−
−	+	−	−	−	−	−
−	−	−	−	−	−	−
−	−	−	−	−	−	−
+	+	+	−	−	+	−
+	+	+	+	−	+	・
・	・	・	−	+	+	+
+	+	+	+	−	+	・
+	−	+	−	−	・	・
+	+	+	−	−	−	−

れない。家兎血清に対しては家兎の個体による差違はあるが、かなり抗血清の特異性が認められて、*B. megatherium* を除く他く菌株は軽度の反応か、或は全く反応を示さないものも見られて主反応とは容易に区別が出来る。併し *B. megatherium* のみは略々主反応と同程度の強い反応を示し、量的に主反応と区別することは困難に思われる。

次に分離菌 30 株の浸出液に対しても、略既知株に於けると同様の結果が認められて、家衛馬血清は、これ等何れの菌株に対しても強い反応を示し、量的に主反応と殆ど差違のないものが多数をしめていた。

家兎血清に於ては、全く反応を示さないものが 30 株中 15~23 株、弱い反応を示したものが 6~8 株あり、そして group 1 に入る 16 株中の B. 1, 16, 17, 18, 19, 20, 21 の 7 株だけは常に既知株 *B. megatherium* と同様に主反応と略々同程度の強い反応を示した。尙この group 中の他の 9 株は一般性状に於ては、これ等 7 株と殆ど差違はないが、炭沈血清に対する類属性に於ては著しい差違を示している。

実験 2 Micro. aureus 209 p, E. coli 行俊,
S. enteritidis 1891, Br. abortus 草柳
Ps. aeruginosa T.1, Pr. vulgaris 5

第 3 表 分離好気性有芽胞菌 30 株の浸出液に対する炭沈血清の類属反応

炭沈血清 反原稀釈	家衛馬血清	家 兎 血 清				
		No. 12	No. 20	No. 21	No. 31	No. 32
1: 100			B. 5, 12, 15, 27 28, 29, 30	B. 5, 6, 10, 13 26, 29, 30	B. 5, 6, 13, 27 28, 29, 30	B. 5, 13, 15, 27, 29, 30
1: 200			B.13			
1: 400						
1: 800						
1: 1600						
1: 3200		B.18, 19		B. 1, 16, 17, 19		
1: 6400		B. 1, 16, 17, 20, 21,	B.19			
1: 12800	B. 7			B.18, 20, 21,	B.18, 19	B.19
1: 25600	B.22					B.17, 18
1: 51200	B. 4, 5, 13, 14 15, 26		B. 1, 16, 17, 18 20, 21		B. 1, 16, 17, 20 21	B. 1, 16, 20, 21
1:102400	B. 2, 3, 6, 9 10, 11, 12, 16 17, 18, 23, 24					
1:204800	B. 1, 8, 19, 20 21, 25, 27, 28 29, 30					

表の見方 B. 7 は家衛馬血清に対しては 1×12800 迄又 B. 22 は 1×25600 迄反応陽性である以下同様
分離菌で表に現れていないものは浸出液の 1×100 で反応のおきなかつたもの

等の浸出液に対する炭沈血清の類属反応

標題の様な 6 種類の菌株を任意にえらび、これ等の菌株から実験 1 に於けると全く同様の方法で浸出液を作りそれに対する炭沈血清の類属反応を検べた結果、第 4 表に示すように、家衛馬血清はこれ等何れの菌株に対して主反応と略々同程度の強い反応を示し、Ascoli,¹⁾ Schutz & Pfeiler²⁾ 等の報告に記載されているものと著しく相違した結果を示した。

家兎血清に於ては、Micro. aureus を除く他の 5 株に対しては全く反応を示さなかつたが Micro. aureus 209 に対しては使用した 5 例の血清中 3 例はその濃厚な浸出液に於て、軽度ではあるが反応を示したことは注目に値する。

第 4 表 好気性（無芽胞）菌 6 株の浸出液
に対する炭沈血清の類属反応

炭沈血清	Micro. aureus 209P	E. coli 行俊	S. enteritidis 1891	Ps. aeruginosa T.1	Pr. vulgaris 5	Br. abortus 草柳
家衛馬血清	51200	51200	51200	51200	102400	102400
家兎血清						
No. 12	0	0	0	0	0	0
No. 20	400	0	0	0	0	0
No. 21	200	0	0	0	0	0
No. 31	0	0	0	0	0	0
No. 32	200	0	0	0	0	0

実験 3 Cl. septicum 広島, Cl. tetani T.3 の

浸出液に対する炭沈血清の類属反応

浸出液の作り方 標題の 2 種類の嫌気性菌を、それぞれ肝片加 Bouillon に 3 週間培養後、加熱殺菌して、濾過したものを浸出液の原液とした。更に Cl. septicum については、本菌の接種による斃死海狗の肝臓及び腹筋からの浸出液を併せ用いた。又対照の炭疽菌浸出液は、炭疽 1 苗菌を Bouillon に 1 週間培養後、加熱殺菌して濾過したものである。

成績 以上 2 種類の嫌気性菌の浸出液に対する炭沈血清の類属反応を検べた結果、第 5 表に示すように、これ等何れの浸出液に対しても家衛馬血清及び家兎血清は共に類属反応を示さなかつた。此の結果は Ascoli, Schutz & Pfeiler 等の報告と一致している。

実験 4 My. tuberculosis H 37 及び或種微の

浸出液に対する炭沈血清の類属反応

使用菌株及びその浸出液の作り方：使用菌株は人型菌 My. tuberculosis H 37 及び当教室に於て分離したもので、Bouillon の表面に自然に發育した或種の微 — その

第 5 表 Cl. septicum 及び Cl. tetani の浸出液
に対する炭沈血清の類属反応

炭沈血清	反応原 Cl. septicum 広島		Cl. tetani T.3	対 照 B. anthracis
	培養浸出液	海狗材料浸出液		
家衛馬血清	0	原液±	0	2000
家兎血清				
No. 12	0	0	0	100
No. 20	0	0	0	200
No. 21	0	0	0	200
No. 31	0	0	0	200
No. 32	0	0	0	500

發育は 23°C 前後が最適で、寒天培地に灰白色、綿状の發育をなし、茶褐色ないし淡黒色の胞子を形成する——である。

My. tuberculosis に於ては、Petragnani 培地に培養した 1 斜面を、微に於ては寒天培地に約 1 週間培養した 1 斜面を、それぞれよく磨碎して、5 ml の生理的食塩水に浮遊させ、加熱殺菌後、室温に 3~7 日放置して濾過したものを浸出液の原液とした。尙対照の炭疽菌浸出液も同様寒天培養の 1 斜面を 5 ml の生理的食塩水に浮遊させたものから作つた。

成績 これらの浸出液に対する炭沈血清の類属反応は第 6 表に示すように、家兎血清は My. tuberculosis H 37 及び微の何れの浸出液に対しても反応を示さなかつた。

家衛馬血清は My. tuberculosis にはその濃厚な浸出液に於て軽度の反応を示すに過ぎなかつたが、微の浸出液に対しては極めて強い反応を示し、主反応と殆ど量的に差違のない強さであつた。

微の浸出液に対する炭沈血清の類属反応に就ては、從來全く記載がないようであつて、この結果は極めて興味があると思う。

第 6 表 My. tuberculosis 及び或種微の浸出液
に対する炭沈血清の類属反応

炭沈血清	反応原 My. tuberculosis H-37		或 種 微	対 照 B. anthracis
	培養浸出液	海狗材料浸出液		
家衛馬血清	2		1000	1000
家兎血清				
No. 12	0		0	20
No. 20	0		0	100
No. 21	0		0	20
No. 31	0		0	100
No. 32	0		0	100

総括並びに考察

炭沈血清の特異性に関する研究として、先ず炭沈血清に対して類属反応を示す細菌の種類に就いて検討を行い次の成績を得た。

1. 家衛馬血清即ち現在吾国で用いられている炭沈血清に対しては、使用した 36 株の好気性有芽胞菌の浸出液は何れも主反応と略々同程度の強い反応を示し、この類属反応の強さによる各菌株の間の差違は極めて小数のものを除き殆ど認められなかつた。

更に *Micro. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. vulgaris*, *Br. abortus* 等の浸出液及び或種微の浸出液も極めて強い類属反応を示した。

併し *My. tuberculosis* はその濃厚な浸出液に於てのみ軽度の反応を示し、*Cl. septicum* 及び *Cl. tetani* 等の浸出液は何等反応を示さなかつた。

以上の成績中特に注目せられる点は、その何れにも主反応と殆ど同程度の強い類属反応を示すこと、更に好気性有芽胞菌以外の他の細菌及び或種の微等の浸出液に対しても強い反応を示す場合があると云う事実であつて、この結果は Ascoli, Schutz & Pfeiler 等の報告並びに現在一般に認められているところとは著しく相違しているようであつて、従つて本炭沈血清はかなり非特異性の強いものであるように思われる。

Schutz & Pfeiler はかゝる異常に非特異性の強い炭沈血清は、極めて稀であるが、免疫に用いる動物の個体の影響によつてあらわれることがあると記載し、かかる性質の血清は炭沈血清として望ましくないのだと述べている。

この家衛馬血清の示す非特異性を以て、炭沈血清の示す非特異性の 1 例と見なしてよいか、更にこの炭沈血清の強い非特異性は免疫に用いた動物の種類によるものか或は Schutz & Pfeiler の述べているように、免疫動物の個体差による極めて稀な例に合致したものか、或は又免疫方法に起因するものであるかどうかは今後の研究にまつことにする。

2. 次に当教室に於て、家兎を用いて、炭疽 1 苗菌の Formalin による死菌を抗原として免疫して作った 5 例の炭沈血清に於ては、兎の個体による差違は認められるが、何れも家衛馬血清に比べかなり特異性が高いように認められ、略々 Ascoli, Schutz & Pfeiler 等の報告に近い特異性を示した。

即ち好気性有芽胞菌に対しても *B. megatherium* 及びその類似菌を除き、その他のものは全く反応を示さないか、或は主反応とは量的に区別し得る軽度の反応を示

したに過ぎない、又好気性有芽胞菌以外の他の供使菌及び微には殆ど反応を示すものがなかつた。ただ *Micro. aureus* に対しては使用した 5 例の炭沈血清中 3 例が軽度の反応を示した。

この家兎血清を以て行つた実験の成績中 2, 3 注目に価することは、好気性有芽胞菌の中には炭疽菌と略同程度か或はそれ以上の強い類属反応を示すものがあるという点で、このような事実は既に Pfeiler & Drescher⁹⁾ が *B. pseudoanthracis* の或株で認めているが、私の実験に於ては *B. megatherium* DeBary 及びその類似菌で認められた。何れにしても現在成書⁷⁾に記載されている様な主反応と類属反応とは、量的に区別し得るという簡単な記載は、好気性有芽胞菌全般には通用しないように考えられる。

又好気性有芽胞菌の中には、その一般性状に於ては殆ど差違がないが、炭沈血清に対する類属反応性に於ては著しく差違のあるものがあるということは興味があると思う。

更に又炭沈血清は *Micro. aureus* に対しても反応を示す場合があるという点も従来の報告には全く見られない注目すべき点であると思う。

結 論

1. 現在吾国で使用されている炭沈血清は相当非特異性が強く、単に好気性有芽胞菌のみでなく、その他かなり広範囲の細菌及び或種の微の浸出液に対しても、主反応と略々同程度の強い類属反応を示し、従来の報告に記載されているところと著しく相違していた。

2. 当教室に於て、家兎を使用して作った炭沈血清に於ては、かなり強い特異性が認められ、従来の報告に記載されているものに略々近い結果を示した。即ち好気性有芽胞菌の或種のものだけに反応を示し、その他の供試菌及び微には殆ど反応を示さなかつた。

併し家兎の個体によつては、*Micro. aureus* の浸出液に対して反応を示すものがあつたことは注目に価する。

3. 現在吾国で使用されている炭沈血清と、当教室で作った家兎血清との著しい特異性の差違については今後の究明にまつ。

終りに臨み、本研究にあたり菌株の分與及び引用文献で御支援を賜つた東大農学部越智博士、大越博士、農林省家畜衛生試験場石井富士雄、南本実俊、屋部寧清の諸氏並に阪大微生物病研究所、武田薬品工業株式会社醸酵研究所の方々に深謝の意を表す。

尚終始絶大な御助力に與つた当教室の尾藤行雄、広直武司の諸兄並に研究学生の諸兄に深甚の謝意を表す。

文 献

- 1) Ascoli, A. : Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 58, 63 1911.
- 2) Schutz, W. & Pfeiler, W. : Arch. Wissensch. u. Tierheilk. 38, Heft 3, 207, Heft 4, 311, 1912.
- 3) Gasperi, F. : Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 61, 184, 1912.
- 4) Pfeiler, W. & Drescher, L. : Z. Infektkr. Parasikr. u. Hyg. Hausti., 13, 341, 1913.
- 5) Rosenberg, R. & Romanow, D. : Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 110, Heft 1/3, 102, 1929.
- 6) G. S. Wilson & A. A. Miles : Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 3d ed., Edward Arnold Co., London, 1946.
- 7) 佐藤良藏, 大熊直俊 : 北海道医学雑誌, 7年, 11号, 1611, 昭4 (1929).
- 8) 佐藤武雄 : 社会医学雑誌, 51号, 126, 昭5 (1930)
- 9) 高木静雄, 渡名喜守雄 : 第6回華北農学会講演, 昭19 (1944).
- 10) Ivanoff, K. : Z. Hyg. Infektkr. 113, 400, 1932.
- 11) 昆野恒太郎, 谷川年午郎 : 日本獣医学会雑誌, 12卷, 4号, 290, 昭8 (1933).
- 12) Robert S. Breed, E. G. D. Murray, A. Parker Hitchens : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore.