120°C 処置抗原の保存性について

富 沢 万 之 助

国立予防衛生研究所細菌部 (部長 福見秀雄博士)

〔受付: 6月15日 1954年〕

菌の生理食塩水浮游液を 56°~60°C 或は 100°C 1 時間加熱して作った上清に他種細菌を浮游させて 120°C で処置すると, この他種細菌は上清由来の細菌と同様に凝集原として用いられることは既に発表した。然らば, この 120°C 処置で作った抗原は何日或は 何カ月位 凝集原として使用出来るものであるかについて, 日を追って実験を行つたのでその成績を報告する。

実験方法

腸チフス菌 Vi, 6 S 及び Ballerup 菌などの 17~18 時間培養菌を食塩水 1 cc 中 200 億の割合に浮游させて, 56°~60°C で 1 時間加熱して直ぐ遠心沈澱して上清を作った。この上清に大腸菌 (Coli Communior) 或は赤痢駒込 B₁ 菌の食塩水浮游液 (1 cc 中 200 億の割合に浮游させた) を等量加えて良く混和し, 高圧釜で 120°C で 3~4 時間加熱してからそのまま 37°C, 室温及び 2~5°C の冷蔵庫内に保存して置き, 凝集反応を行う度毎に遠心沈澱して上清を捨て沈澱菌を食塩水に再浮游させて凝集反応を行つた。又対照の意味で遠心沈澱しないで保存菌液のまゝでも凝集反応を行つた。120°C 加熱処置の時間は Vi 上清と O 上清とは少しく異なるようである。又上清に加える菌数は少ない方がよいようである。これらについては別に報告する。

処置法及び種類は次の通りである。

I	6 S 上清 Ballerup 上清	+ 大腸菌 → 120°C 4 時間
II	Vi I 食塩水菌浮游液	→ 120°C, 3 時間
	1	+ 0.5% の比に石炭酸
	2	+ 0.1% の比にマーズニン
	Vi I 血清 + KBI	→ 120°C, 3 時間
III	3	+ 0.5% の比に石炭酸
	4	+ 0.1% の比にマーズニン
	58 Vi I 食塩水菌浮游液	
	1	1% の比にフォルマリン
III	2	0.5% の比に石炭酸
	3	56°C 1 時間加熱
	4	120°C 3 時間加熱

I の処置抗原を以て純 Vi 血清及び Ballerup 血清と 6 S 血清とについて行つた Vi 凝集反応

上清処置抗原を作ってから 15 日と 52 日後行つた成績は略々同様な結果を示す。175 日保存のものについてみると 2°~5°C に保存したものも室温に放置したものも前と略々同様な成績を示す, 但し上清処置抗原を遠心沈澱しないで保存のまゝの菌液を以て行くと凝集価も凝集度も共に著しく減弱する, 殊に Ballerup 上清処置抗原に於て然りである。これは遊離の Vi 抗原が凝集反応を抑制するためと思われる。このことについては既に報告してある。以上の成績を 1 表に示す。

今までは純 Vi 血清を用いたが保存 322 日のものから Ballerup 血清を用いた。2 表に示すように, 6 S 上清処置抗原は血清稀釈 100 倍までは弱く凝集し 800~1600 倍の所で強く凝集するのが認められる。このことについても 28 年の関東支部総会で報告した。

Ballerup 上清処置抗原についてはこのようなことが認められない, これは Ballerup 血清対 Ballerup 上清処置抗原であるため O 凝集原が関与しているためと思われる。保存 426 日のものも略々 322 日のものと同様な成績を示す。その後 511 日及び 637 日保存のものについても行つたが, いづれも同じような成績を示す。保存 819 日のものは 6 S 上清処置抗原だけで行つたが前同様よく凝集するのが認められる。

次に 6 S 血清についてみると 3 表に示すように, Ballerup 血清に於てみられるような凝集を抑制する現象は認められない, Ballerup 上清処置抗原は保存温度によつて異なつた成績を示す, 即ち保存 426 日, 511 日及び 637 日とも皆同じ成績で, 2°~5°C に保存のものは 800 倍まで凝集するが, 室温に放置したものは 200 倍ま

TOMISAWA Mannosuke: On Preservation of Vi-antigen which treated at 120°C. National Institute of Health of Japan—Jap. J. of Bact., 9(12), 1033-1039, 1954.

第 1 表 I の処置抗原を以て純 Vi 血清について行つた Vi 凝集反応

		保存温度	上清処置抗原	純 vi 血清 稀 釈								対照
				50	100	200	400	800	1600	3200	6400	
保存15日	遠沈	2°~5°C	6 S	++	++	++	++	++	+	±	—	—
			Ball.	+++	++	+	+	+	—			—
保存52日	遠沈	2°~5°C	6 S	++	++	++	++	++	+	—		—
			Ball.	+++	+++	++	++	+	—			—
保 存 175 日	遠沈	2°~5°C	6 S	++	++	++	++	++	+	—		—
			Ball.	++	++	++	+	(+)	—			—
	室 温		6 S	++	++	++	++	++	+	—		—
			Ball.	++	++	++	+	(+)	—			—
	非遠沈	2°~5°C	6 S	+	+	+	+	±	—			—
			Ball.	+	+	—						—
	室 温		6 S	+	+	+	+	±	—			—
			Ball.	+	±	—						—

第 2 表 I の処置抗原を以て Ballerup 血清について行つた Vi 凝集反応

		保存温度	上清処置抗原	Ballerup 血清 稀 釈								対照
				50	100	200	400	800	1600	3205	6400	
保 存 322 日	遠沈	2°~5°C	6 S	+	+	++	++	+++	+++	+	—	—
			Ball.	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	—	—
	室 温		6 S	+	+	++	++	++	++	+	—	—
			Ball.	++	++	++	+	(+)	—			—
保 存 511 日	遠沈	2°~5°C	6 S	+	++	++	++	++	++	+	—	—
			Ball.	+++	+++	+++	(+++)	(+++)	+	+	—	—
	室 温		6 S	+	+	++	++	++	+	±	—	—
			Ball.	++	++	++	++	+	(+)	—		—
保 存 637 日	遠沈	2°~5°C	6 S	+	+	++	++	++	++	+	—	—
			Ball.	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)	—	—
	室 温		6 S	++	++	++	(+++)	(+++)	++	+	—	—
			Ball.	+++	+++	++	+	+	+	—		—
保 存 819 日	遠沈	2°~5°C	6 S	++	++	++	++	++	++	+	+	—
	非遠沈		6 S	+	+	+	+	+	+	+	—	—

第 3 表 I の処置抗原を以て 6 S 血清について行つた Vi 凝集反応

		保存温度	上清処置抗原	6 S 血清 稀 釈								
				50	100	200	400	800	1600	3200	6400	対照
保 存 426 日	遠沈	2°~5°C 室 温	Ball.	++ +	++ +	++ ±	++ -	++ +	-			- -
保 存 511 日	遠沈	2°~5°C	6 S Ball.	++ +++	++ +++	++ ++	++ +	++ (+)	++ -	-		- -
		室 温	6 S Ball.	++ (+)	++ (+)	++ ±	++ -	++ +	++ +	(+)	-	-
保 存 637 日	遠沈	2°~5°C 室 温	Ball.	+++ +	+++ (+)	+++ (+)	++ -	++ +	-			- -

で弱度に反応するに過ぎない。6 S 上清処置抗原は保存温度によつて差違は認められない。

II の処置抗原を以て純 Vi 血清及び Ballerup 血清について行つた Vi 凝集反応

37°C と 2°~5°C とに保存したものについて純 Vi 血清を以て凝集反応を行つてみた、保存 17 日及び 32 日ともに同様な成績を示す。保存 95 日のものは前 2 者に比して反応度は幾分弱まるようだが尙お良く凝集する、但しマーズニンを加え 37°C に保存したものは凝集度が非常に弱まつた、そして血清稀釈度の低い所では凝集がみられないが稀釈度の高い 400~1600 倍の所で弱度ながら凝集するのが認められる、2°~5°C に保存したものゝ内

で、1 の処置菌は 37°C に放置したものと同様な成績を示すが、2~4 の処置菌は 37°C に放置のものよりは強く凝集する。保存 278 日のものは保存菌液そのままのものと遠心沈澱して菌体を食塩水に再浮遊させたものとの凝集反応を行つた、マーズニンを加えたものを遠心沈澱して行くと血清稀釈 50~100 倍の所で凝集がみられないが 200~3200 倍の所では認められる。これは抗原抗体混合の結果沈降を起したものと思われる。今までの純 Vi 血清では血清の濃い所で凝集抑制現象はみられなかつたが、マーズニンを加えたもの (0.01%に加える所を誤まつて 0.1%に加えた) が凝集抑制現象を現わした。その成績を 4 表に示す。保存 420 日に始めて Ballerup 血清

第 4 表 II の処置抗原を以て純 Vi 血清について行つた Vi 凝集反応

		保存温度	処置抗原	純 Vi 血清 稀 釈								
				50	100	200	400	800	1600	3200	6400	対照
保 存 17 日	遠沈	37°C	Vi I	1	++	++	++	++	++	(+)	-	-
				2	+	+	+	+	+	+	±	-
				3	++	++	++	++	++	++	±	-
				4	+	+	+	+	+	+	(+)	-
		2°~5°C	Vi I	1	++	++	++	++	++	++	-	-
				2	++	++	++	++	++	++	-	-
				3	++	++	++	++	++	++	-	-
				4	+	+	+	+	+	+	±	-
保 存 32 日	遠沈	37°C	Vi I	1	++	++	++	++	++	(+)	-	-
				2	++	++	++	++	++	+	-	-
				3	++	++	++	++	++	(+)	±	-
				4	++	++	++	++	++	(+)	±	-

		2°~5°C	Vi I	1	++	++	++	++	++	++	±	—	—	
				2	++	++	++	++	++	++	(+)	—	—	
				3	++	++	++	++	++	++	(+)	—	—	
				4	++	++	++	++	++	++	(+)	—	—	
保存95日	遠沈	37°C	Vi I	1	++	++	++	+	+	+	+	±	—	
				2	—	—	—	(+)	(+)	(+)	±	—	—	
				3	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	
				4	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	
		2°~5°C	Vi I	1	++	++	++	+	+	+	+	+	—	—
				2	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	—	—
				3	++	++	++	+	+	+	+	+	±	—
				4	++	++	++	+	+	+	+	+	±	—
保 存 278 日	遠沈	2°~5°C	Vi I	1	++	++	++	+	+	+	+	+	—	—
				2	—	—	±	+	+	+	+	+	—	—
	非遠沈	2°~5°C	Vi I	1	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	—
				2	(+)	(+)	+	+	+	+	+	(+)	—	—
Ballerup 血清														
保 存 420 日	遠沈	2°~5°C	Vi I	1	+	++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	
				2	(+)	(+)	+	+	+	(+)	—	—	—	

を用いて凝集反応を行つたのであるが、純 Vi 血清を用いたときよりは強度に反応する。そして血清稀釈 50~100 倍の所で弱く 400~800 倍の所で最強度に反応するのが認められる、マーズニンを加えたものはこれと異なつて強度に反応するにすぎない、而も純 Vi 血清に於て血清稀釈の低い所でみられた凝集抑制がみられない、但し 50~100 倍の所でその傾向が認められる。

III の処置抗原を以て純 Vi 血清及び Ballerup 血清

について行つた Vi 凝集反応

この実験は対照として行つたもので、フオルマリンと石炭酸とが Vi 抗原をもつている菌浮游液にどんな影響を与えるものであるか、又 56°C 1 時間加熱と 120°C 3 時間加熱して保存した場合、どのような結果を示すものであるかを腸チフス菌 58 及び Vi I の両菌株を用いて Vi 凝集反応によつて実験してみた。その成績を 5 表及び 6 表に示す。

第 5 表 III の処置抗原を以て純 Vi 血清について行つた Vi 凝集反応

		菌 株	処置抗原	純 vi 血 清 稀 釈								
				50	100	200	400	800	1600	3200	6400	対照
保存 8 日	遠沈	58	1	+++	+++	+++	++	+	±	—	—	—
			2	+++	+++	+++	++	++	+	(+)	—	—
			3	++	++	+	+	+	+	±	—	—
			4	++	++	++	+	+	+	—	—	—
		Vi I	1	+++	+++	+++	+	—				—
			2	+++	+++	+++	+	+	(+)	—		—
			3	++	++	++	++	++	++	+	—	—
			4	++	++	++	++	++	++	+	—	—
			1	+++	+++	+++	++	++	(++)	—		—
			2	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—

保存42日	遠沈	58	3	++	++	++	+	+	+	-		-
			4	++	++	++	+	+	+	-		-
		Vi I	1	+++	+++	+++	++	(+)	-			-
			2	+++	+++	+++	++	++	+	-		-
	非遠沈	58	3	++	++	++	++	+	+	+	-	-
			4	++	++	++	+	+	+	-		-
		Vi I	1	+++	+++	+++	+	-				-
			2	+++	+++	+++	+	(+)	-			-
保存168日	遠沈	58	3	+	+	+	-					-
			4	+	+	+	-					-
		Vi I	1	+++	+++	+++	+	-				-
			2	+++	+++	+++	+	(+)	-			-
	非遠沈	58	3	+	+	+	+	(+)	-			-
			4	+	+	+	+	(+)	-			-
		Vi I	1	+++	+++	+++	++	++	+	-	±	-
			2	(+)	(+)	(+)	(+)	±	±	±	±	-
保存315日	遠沈	58	3	+	+	+	(+)	(+)	+	-		-
			4	+	+	+	+	+	+	-		-
		Vi I	1	+++	+++	+++	++	++	+	-	±	-
			2	+	+	+	(+)	(+)	±	±	±	-
	非遠沈	58	3	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
			4	+	+	+	+	+	(+)	-		-
		Vi I	1	+++	+++	+++	++	++	+	-	±	-
			2	+	+	+	(+)	(+)	±	±	±	-

保存温度 2~5°C

第 6 表 III の処置抗原を以て Ballerup 血清について行つた ViI 凝集反応

		菌 株	処置抗原	Ballerup 血 清 稀 釈								
				50	100	200	400	800	1600	3200	6400	対照
保存315日	遠沈	58	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)	-
			2	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		Vi I	3	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
			4	+	+	++	++	++	++	(+)	-	-
	非遠沈	58	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	(+)	-	-
			2	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		Vi I	3	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
			4	+	+	++	++	++	++	(+)	-	-
保存419日	遠沈	58	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)	-
			2	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		Vi I	3	++	++	+	+	+	(+)	(+)	-	-
			4	+	++	++	++	++	++	(+)	-	-
	非遠沈	58	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
			2	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		Vi I	3	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
			4	(+)	+	++	++	++	++	-	-	-

保 存 504 日	遠 沈	58	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	(+)	—
			2	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			3	+	+	+	(+)	(+)	(+)	—		—
			4	+	卅	卅	卅	卅	卅	—		—
		Vi I	1			卅	卅	卅	卅	卅	(+)	—
			2			+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			3			+	+	+	(+)	(+)	—	—
			4			+	卅	卅	卅	(+)	—	—
保 存 661 日	遠 沈	58	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	—
		Vi I	1	(卅)	(卅)	卅	卅	卅	卅	+	(+)	—
保 存 828 日	遠 沈	58	1	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	+	+	—
		Vi I	1	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	+	+	—

保存8日と42日との成績を比較してみると略々同様である、たゞフォルマリン処置の所で8日保存のものが1管低い価を示すだけである、遠心沈澱しないで保存のまゝの菌液で行つたものは、遠心沈澱して行つたものに比して凝集価が一般に低い価を示す、又凝集度も弱い、殊に3及び4の処置のものが甚しい。168日保存のものも略々8日のものと同じ成績を示すが、0.5%の比に石炭酸を加えたものは自然凝集を示すようになった。又Vi凝集も殆んど認められないか或は弱度に反応するにすぎない。こゝでも保存のまゝの菌液で凝集反応を行つたが菌の42日保存のものよりも減弱を示す。保存315日のものから Ballerup 血清で凝集反応を行つた、純 Vi 血清を用いたときよりはフォルマリン処置のものがより強度に且つより高度まで凝集する、石炭酸で処置したものは菌液そのものが自然凝集を起すので判定が困難である。56°C 1時間加熱したものは反応度が弱まつて来た。120°C 処置のものは血清稀釈 50~100 倍の所で凝集が抑制され、200~1600 倍の所で強く凝集するのが目につく。保存 419 日及び 504 日のものも前の 315 日のものと略々同じ成績を示す。フォルマリン処置のものはその後保存 828 日まで Vi 凝集性を保持していることを認めた。

総 括

腸チフス菌 6 S 及び Ballerup 菌上清に大腸菌を浮游させて 120°C で処置したものは、保存温度が 2~5°C でも室温でも保存 637 日~819 日まで良く Ballerup 血清に凝集する、6 S 血清に対しても同様に保存 511 日~637 日まで良く凝集する、但し Ballerup 菌上清処置抗原は室温に保存された場合に凝集価も凝集度も非常に低下する。

腸チフス Vi 菌の食塩水浮游液をそのまゝ 120°C で

3時間加熱したものに、0.5%の比に石炭酸、0.1%の比にマーズニンを加えて 37°C と 2~5°C とに保存して実験した。石炭酸を加えたものは保存温度に関係なく 95 日まで良く純 Vi 血清に凝集する、マーズニンを加えたものは 32 日までは変りないが、37°C で 95 日保存のものは純 Vi 血清稀釈 50~200 位の所で反応がみられず、400~1600 倍の所で弱く凝集するのが認められる、2~5°C に保存されたものは血清稀釈 50~200 倍の所でも弱く反応し、400~3200 倍の所で少しく強く凝集する。マーズニンを加えたものは前と同様血清稀釈の低い所では反応がみられない。2~5°C で保存 420 日のものは Ballerup 血清で行つたのであるが、純 Vi 血清を用いたときよりは強く凝集する、そして血清稀釈 50~100 の所で凝集抑制が認められる。

次に Vi I 上清に駒込 B₁ 菌を浮游させて、120°C で処置したものに、前と同様に石炭酸とマーズニンを加えて保存してみたがマーズニンを加えた方の反応度は弱い。

58 及び Vi I の両菌株の食塩水浮游液に 1%の比にフォルマリンと 0.5%の比に石炭酸を加えて保存し、他方これと同一菌液を 56°C 1時間加熱したものと 120°C 3時間加熱したものとを同時に作つて 2~5°C に保存して比較してみた。始めは純 Vi 血清を用いた、保存 42 日までは略々同様に良く凝集する、但し 56°C 及び 120°C 処置菌は反応度が弱いようである。保存 168 日になると石炭酸を加えたものは自然凝集を起すようになり Vi 凝集も非常に弱くなつた、これに反してフォルマリンを加えたものは依然として強く凝集する、56°C 及び 120°C で処置し保存のものも弱度に反応する、保存 315 日のものから Ballerup 血清を用いた、フォルマリンを加えたものは依然として強く凝集する又凝集価も始めのものに

比し8倍位上昇した。120°C 処置菌は血清稀釈50~100倍の所で凝集が抑制され、400~1600倍の所で強く凝集する、56°C で加熱したものは弱く反応し凝集抑制はみられない。419日~504日保存のものも同様な成績を示す。フォルマリンを加えたものはその後828日まで行ってみたが依然として強く凝集するのが認められる。

結 論

1. 120°C 上清処置抗原は保存期間最長819日までしか実験出来なかつたが尙お良く Vi 凝集性を保持している。

2. 保存には0.5%に石炭酸と0.1%にマーズニンを加えたものを比較してみたが石炭酸の方が良い結果を示す。これには勿論マーズニンの量が多過ぎることを考慮

に入れなければならない。

3. 腸チフスV型菌の食塩水浮游液に石炭酸を0.5%に、フォルマリンを1%の比に加え、他方この菌液を56°C 1時間と120°C 3時間加熱後保存して置き Vi 凝集性を比較してみると、フォルマリン、120°C、56°C の順に Vi 凝集性を保持している、石炭酸を加え2~5°C に保存したものは168日以上になると殆んど Vi 凝集性を認めざるようになる。

文 献

- 1) Shimizu, M.: Jap. J. Med. Scie. Biol., 5, 407~419, 1952.
- 2) Shimizu, M.: Jap. J. Med. Scie. Biol. 5, 387~396, 1952.
- 3) 清水万之助: 第8回日本細菌学会関東支部総会, 昭28 (1953).