A群レンサ球菌菌体に対する健康学童血清の凝集抗体価：

トリプシン処理菌体，ペプシン処理菌体および

ASP 試薬の比較

猩紅熱研究会（会長 飯村 達）

香川県衛生研究所

吉原 丘 二 子

国立予防衛生研究所

新井 秀 雄 永瀬 金一郎

（昭和58年6月14日受付）

（昭和58年7月12日受理）

Key words : Group A streptococcus agglutinating antibody

要 旨

A群レンサ球菌 T 2 株のトリプシン消化菌およびペプシン消化菌を用い、健康学童血清98検体の凝集価を測定し、ASP 試薬による凝集価と比較した。平均凝集価は ASP では33、トリプシン消化菌では188、ペプシン消化菌では425とそれぞれ有意の差を示したが、それぞれの凝集価の間には相関がみられた。

はじめに

A群レンサ球菌感染症で、ASO, ASK, AHD その他菌体外産生抗原に対する抗体の検査が広くルチンに実施されているが、一方菌体抗原に関しては群特異多糖や型特異蛋白等重要なものがあるにも拘らず、ルチンに抗体検査が行われる状態に至っていない。

ヒト血清の群抗体測定法に関しては、今迄種々の方法が報告されている。高圧処理菌凝集反応¹⁾、トリプシン消化菌凝集反応¹⁾、細胞壁凝集反応²⁾、抽出抗原沈降反応³⁾、抽出抗原感作赤血球凝集反応⁴⁾等である。最近この感作血球による ASP 試薬が開発され、群抗体価のルチン検査への途が開けてきたので、健康学童血清について ASP で群抗体価を求め、さらにトリプシンおよびペプシン消化菌凝集価を求めて相互の関係を調べたので報告する。

材料・方法

菌株：A群2型レンサ球菌 T 2 株を用い、Todd-Hewitt 培地（BBL）で27℃ 2日間培養後、

洗浄菌体を以下の如くトリプシンあるいはペプシンで消化して得た菌液を菌凝集反応用抗原とした。トリプシン消化はT型別菌液作製法に準じて行った⁵⁾。ペプシン消化は菌体を56℃30分加熱後、ペプシン0.1%加 N/100塩酸に浮遊し、37℃ 2時間の条件で行った。各消化菌体を洗浄後、pH 7.4のPBSに浮遊し、コールマン・ジュニアII型分光光度計波長650nmで吸光度を0.6に調整し、窒化ソーダ0.03%を加え冷蔵庫に保存した。

ASP 試薬：ヘキストジャパン社より供与された試供品を用いた。

学童血清：昭和56年11月に八丈島で採取され、東京都予防医学協会の小里川尊、天野裕次、飯村達氏から供与された健康学童血清98検体を56℃30分間非働化して用いた。

群・型別用血清：消化菌の群・型特異凝集性の定性試験は、デンカ生研製のA, B, C, G群血清およびT型別血清を用い、常法に従って行った。

家兔免疫血清：消化菌の群特異凝集性の定量試験は、A, B, C, G群標準株レンサ球菌で高度

免疫して得た家兎血清を用いて行った。

凝集反応：消化菌液による学童血清の凝集価測定は、U型マイクロタイマー板（豊島製作所）を用い、これに0.1%ウシ血清アルブミンと0.03%窒化ソーダ加PBSで10倍希釈より2倍段階希釈した学童血清の一定量を取り、同量の消化菌液を加えて振盪後室温に一夜置いて判定した。ASP試薬による凝集価測定は、指定のV型でなくU型トレイを用いたほかはASP使用説明書通りに行った。何れの場合も、凝集価は明らかな凝集像を示す最高血清希釈倍数で表わした。

統計処理：凝集価を対数変換して各種統計量を求めた。必要に応じベキ乗根変換による統計量も参考にした。平均値の差の検定はWelchの方法によるt検定によった。

結 果

トリプシンおよびペプシン消化菌の群および型特異凝集反応性を調べた。何れもA群血清では強い凝集を示したが、B、C、G群血清では凝集しなかった。型血清に対しては、トリプシン消化菌はT2型血清に強い凝集を示したのに対し、ペプシン消化菌はT2型血清でも全く反応を示さなかった。

八丈島学童血清98検体を用い、それぞれトリプシンおよびペプシン消化菌ならびにASP試薬に対する凝集価を測定した成績をTable 1に示す。トリプシン消化菌凝集価は40～1280の間に分布し、平均値は188、平均値の95%信頼限界は163～271だった。ペプシン消化菌凝集価は80～1280間に分布し、平均値425(95%信頼限界：381～473)、ASP凝集価は2～256間に分布し、平均値33(95%信頼限界：28～40)であって、何れの平均値の間にも危険率1%以下で有意の差が認められ、 $ASP < \text{トリプシン消化菌} < \text{ペプシン消化菌}$ の順に高い凝集価を示した。Fig. 1 a～cにTable 1の成績における抗原間の成績の対応関係を図示した。Fig. 1 aはASP：トリプシン処理菌の関係を示したもので、相関係数0.5685と計算された。Fig. 1 bはASP：ペプシン処理菌で、相関係数0.5447、Fig. 1 cはトリプシン処理菌：ペプシン処理菌で、相関係数0.5772だった。即ち何れ

Fig. 1 Correlation among agglutinating antigens

a) ASP vs. Tryp-cell

Fig. 1 b) ASP vs. Pep-cell

Fig. 1 c) Tryp-cell vs. Pep-cell

の間にも危険率1%以下で有意の相関が認められた。

平均凝集価の最も高かったペプシン消化菌について群特異反応性の程度を知る目的で、ASP試薬

Table 1 Agglutinin-titer distribution of 98 healthy school-children sera measured by the use of ASP reagent, trypsin-digested T2 cells, and pepsin-digested T2 cells as the agglutinating antigens.

	serum dilution							
	2	4	8	16	32	64	128	256×n*
ASP	1	0	9	25	27	21	14	1
Tryp	0	4	20	33	32	8	1	0
Pep	0	0	1	10	39	44	4	0

* ASP (n=1), Tryp (n=10), Pep (n=10)

Table 2 Estimation of the serogroup-specificities of pepsin-digested T2 cells and ASP reagent.

Anti-gen	Anti-sera	serum dilution											
		×10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
Pep	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—
	B	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	G	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—	—	—
	NRS*)	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
		×2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ASP	A	+	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	C	+	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	NRS*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*) normal rabbit serum

を対照において、A, B, C, G群の家兎免疫血清に対する凝集価を測定した成績を Table 2 に示す。ASP 試薬はほぼ良好な群特異性を示し、A 群血清のみ高い凝集価を示した。ペプシン消化菌は、A 群血清で更に高い凝集価を示したが、一方 C 群血清でもこれに近い高い凝集価が示された。B 群, G 群血清では正常血清と差がなかった。ASP およびペプシン消化菌と A 群血清との凝集反応は 25mg/ml の N-アセチルグルコサミンの存在で低度の抑制しか受けなかったが、ペプシン消化菌と C 群血清の間の凝集反応はほぼ定量的に抑制された。なお N-アセチルガラクトサミンは殆んど影響を与えなかった。

考 察

Rosendal ら (1956) は A 群レンサ球菌凝集反応の障害となる M 抗原を破壊するのに 127℃ 2 時間処理が有効であると報告したが、今回使用した T 2 株は、121℃ 30 分処理したところ、部分的な菌体破壊が起り、良好な凝集反応性を示さなかった。

Karakawa ら (1965) によれば、トリプシン、ペプシン処理で蛋白抗原を除去した菌体は、調製後数日間は凝集反应用抗原として利用できるが、その後自然凝集のため使用できず、ヒトの群抗体測定には細胞壁による凝集反応を行っている。今回我々の使用したペプシン処理 T 2 菌液は冷所で 2 カ月保存後も自然凝集はみられず、凝集反応に支障なく利用可能であった。菌の自然凝集性は菌株によっても異なるし、培養温度等によっても左右されるものである。

トリプシンおよびペプシン消化菌は何れも A 群特異凝集反応性を有していたが、何れも ASP に比し著しく高い凝集価を示したことから、群抗体以外の凝集抗体とも反応したと考えるのが妥当であろう。ペプシン処理菌と C 群血清との間にみられた高い凝集価は、先ず第一に、A, C 群抗原に共通なラムノース配列が関与している可能性が考えられるが、N-アセチルグルコサミンで強く抑制されることを考えると、むしろ大半はペプチドグ

リカンの如き抗原の関与するものと考えるべきであろう。トリプシン処理とペプシン処理間にも凝集価の差のみられたことは、ここでも関与する抗原に質的差のある可能性を示している。関与抗原の追求は今後の問題であるが、トリプシン消化菌、ペプシン消化菌、ASP 試薬を組合せて凝集価を測定することにより、複数の抗体価の動きを大まかに掴める可能性も考えられ、今後の興味ある課題と考える。

文 献

- 1) Rosendal, K. & Grandal, H.: Serological investigations of group A streptococci. 3. The group-specific agglutination in human sera. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, 38: 164—169, 1956.
- 2) Karakawa, W.W., Osterland, C. & Krause, R. M.: Detection of streptococcal group-specific antibodies in human sera. *J. Exp. Med.*, 122: 195—205, 1965.
- 3) Wilson, A.T. & Wiley, G.G.: The cellular antigens of group A streptococci. Immunoelectrophoretic studies of the C,M,T, PGP, E₄, F, and E antigens of serotype 17 streptococci. *J. Exp. Med.*, 118: 527—556, 1963.
- 4) Schmidt, W.C. & Moore, D.J.: The determination of antibody to group A streptococcal polysaccharide in human sera by hemagglutination. *J. Exp. Med.*, 121: 793—806, 1965.
- 5) 宮本 泰: レンサ球菌感染症. 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 日本公衆衛生協会, 1978, p. 34—54.

Determination of Agglutinin titer to Group A Streptococcal Cells in Sera of Healthy School Children: Comparison of Trypsin- and Pepsin-Digested Bacterial Cells with ASP Reagent

Kuniko YOSHIHARA

Kagawa Prefectural Public Health Institute

Hideo ARAI & Kinichiro NAGASE

National Institute of Health, Tokyo

Agglutinin titers of ninety-eight sera from healthy school children were determined by using trypsin-digested cells and pepsin-digested cells of group A streptococcus strain T2, and the titers were compared with those obtained by ASP reagent. Trypsin-digested cells, pepsin-digested cells and ASP reagent revealed significantly different mean-titers of agglutination, i.e. 33, 188, and 425, respectively. On the other hand, there was good correlation between the results by any pair of the three agglutinating antigens.