リウマチ性心疾患におけるタンニン酸赤血球凝集反応

による溶連菌型特異抗体の研究

第1編 基礎的検討

東京大学医学部附属病院分院内科教室 (主任 小林太刀夫教授)

西 村 俊 夫

STUDIES ON STREPTOCOCCAL TYPE-SPECIFIC ANTI M ANTIBODIES IN RHEUMATIC HEART DISEASE USING TANNIC ACID HEMAGGLUTINATION. (1) FUNDAMENTAL STUDIES

Toshio NISHIMURA

Department of Internal Medicine, Branch Hospital University of Tokyo

(Prof. Tachio Kobayashi)

概要 リウマチ性心疾患と溶連菌感染が密接な因果関係にあることは、各方面より実証されているが、なお、不明な点が多い。そこで著者は、溶連菌型特異抗体の面より、これを検討しようとした。A群β溶連菌は感染防禦に関与するといわれる蛋白質性のM抗原と呼ばれる型特異的な物質によつて分類されている。したがつて、M抗原に基づく菌型の分類は、人体の溶連菌感染症における免疫、ひいては、疫学においても有意義なものであると考えられる。このため、M抗原を使用して種々の方法が試みられているが、Bactericidal testを除いては特異性に乏しい。また、その方法の実施は臨床家にとつて、必ずしも容易でない。ここにおいて、著者はBoydenの感作タンニン酸赤血球凝集反応の改良法(熊谷)を、初めて溶連菌感染症に応用し、菌液による吸収試験、抗原液による抑制反応、Bactericidal testとの比較、抗原のトリプシン処置等種々の方法で型特異性を証明し、本法が患者血清中の型特異抗体の研究に用いることを示した。

I. 緒 言

リウマチ性心疾患と溶連菌感染が密接な因果関係を有することは、各方面より実証されている。しかし、なお、不明な点が多い。そこで著者は、

溶連菌型特異抗体の面より、これを検討しようとした。連鎖球菌、なかんずく、A群β溶連菌は人体感染と密接な関係を有し、その抗原構造は詳しく調べられている。すなわち、蛋白質性のM抗原と呼ばれる型特異的な物質によつて、Lancefield¹⁾らは、A群菌を1型から51型まで分類している。

このM抗原は感染防禦に関与するものであるとされ、人体の感染症における免疫、ひいては、溶連菌感染症の疫学も、この菌型をもとにして考えることができる。したがつて、人体感染症において、溶連菌型特異抗体を究明することは極めて必

本論文は第23回日本血液学会総会(昭和36年4月9日)、第5回日本リウマチ協会総会(昭和36年5月)、第35回日本伝染病学会総会(昭和36年7月)、第23回日本循環器学会関東甲信越地方会総会(昭和36年12月9日)、第59回日本内科学会(昭和37年4月)、第6回日本リウマチ協会総会(昭和37年5月)、日仏国際ゼミナール(昭和37年11月)、モントリオールにおける第8回国際微生物学会(1962年8月)(追加討論)に一部発表した。

要である。このため、M抗原を使用して、マウス防禦試験²⁾、凝集反応³⁾、沈降反応⁴⁾などが試みられているが、抗原の多様性、非特異的反應の存在、動物実験と患者血清における結果の不一致、各菌型間の交叉反応の多いことなどのため、實際的意義が薄い。現在、最も信頼されているのは、Bactericidal test⁵⁾であるが、この方法は特殊な操作を必要とし、臨床家にとっては、その実施は容易でない。

こゝに著者は、教室の熊谷⁶⁾の行なつたBoydén⁷⁾の感作タンニン酸赤血球凝集反應の改良法の応用を試みた。すなわち、A群β溶連菌を培養し、えた酸処理加熱抽出抗原液をもつて、ヒトO型血球を感作し、感作タンニン酸赤血球凝集反應を試みたところ、ウサギの免疫血清において、高い特異性が認められた。ついで、患者血清に応用し、抗原による抑制反應、菌液による吸収試験、Bactericidal testとの比較、抗原のトリプシン処置等を行ない、その型特異性を証明しえた。さらに、臨床的に多数例について検討し、本法が溶連菌感染症における型特異抗体の検出法として、臨床的に用いるすぐれた方法であることを認めたので、こゝに報告する。第1編において、基礎的検討の結果について述べ、第2編において、臨床的検討、特に、リウマチ性心疾患について検討した結果を報告する。

II. 実験材料および実験方法

(I) 材 料

a) 緩衝食塩水： 生食水と等容量の所要のpH (通常 7.2) のSørensen磷酸塩緩衝液を混じて作製した。

b) 赤血球： ヒトO型赤血球は10%，ウサギの赤血球は3.8%のクエン酸ソーダを用いて、実験当日採血し、直ちに使用した。前日採血のものは氷室に保存しても、つぎの異好性抗体吸収には使用しえたが、感作タンニン酸赤血球には不適であった。

c) タンニン酸： 本邦製 (Shuzui社) を用いた。必ず実験当日、上記の緩衝食塩水を用いて新

鮮な希釈法を作つた (通常pH 7.2, 2×10^4 倍を使用)。

d) 血清希釈液： 正常なウサギの血清を56°C 30分で不活化し、ヒトO型血球で異好性抗体を吸収したのち、窒化ソーダを0.1%の割に加えて、-20°Cに保存し、用に臨みとかし、緩衝食塩水で100倍に希釈して、血清希釈液として用いた。この血清希釈液は、必ず実験当日作製のもののみを使用した。

e) 感作タンニン酸血球凝集反應用抗原

(i) 培地の作製

表1のごとく行なつた。すなわち、まず、Todd-Hewitt培地⁸⁾⁹⁾を作製した。脂肪をよく取除いた馬肉を細挫し、この500gに蒸留水1lを加え、一夜氷室に保存し、翌日徐々に加温して温度を上げ、85°Cになつてから、この温度に30分間保つて後、温度を下げ濾紙で濾過する。この肉水1lにたいして、ネオペプトン (Difco) 20gを加え加温溶解させる。つぎに、1NのNaOH液でpHを6.8～7.0に上げ、これに、

NaCl 2.0g

表1. 抗原の製法

表2. 使用した菌株

菌型	標準菌株	菌型	標準菌株	菌型	標準菌株
1	T 1 型	18	J 17C	35	C 171
2	T 2	19	J 17D	36	C 119
3	SS 265	22	T 22	37	C 242
4	T 4	23	T 23	38	C 141
5	T 5 B	24	C 98	39	C 95
6	S 43	25	B 346 OP	40	C 143
8	C 265	26	J 17F	41	C 101
9	T 9	27	T 27	42	C 113
10	E 14	28	T 28	43	C 126
11	T 11	29	D 23	44	C 512
12	SS 95	30	D 24	46	C 105
13	T 13	31	J 137	47	C 744
14	S 23	32	SS 48		
15	T 15	33	C 107		
17	J 17E	34	C 142		

NaHCO₃ 2.0 g

Na₂HPO₄·2H₂O 0.5 g

ブドウ糖 2.0 g

を次々に加え、直下で加熱する。次に、冷却してpHを再び測定する。通常は8.0～8.2になつてゐる。これを濾紙で濾過し、適当な容器に分注し、100°C、20分～30分ずつ3日間、間欠滅菌する。作製後、できるだけ早く使用した。

(ii) 酸処理加熱抽出抗原液の作製¹⁾¹⁶⁾

あらかじめ1～2 ccのTodd-Hewitt培地に菌(表2に示した42種でLancefieldより伝研および北里研究所に送付されたものから分与されたものである。)を移植し、数時間、37°Cに培養し、菌が発育してきたら、これを全部500 ccの同培地に移し、37°Cに8～24時間培養し、2500 rpm 30分間遠心沈殿して上清を捨てる。沈殿した菌体に2倍容量の1/5 N-HCl液(生食水で作る)を加え、菌体を白金耳でほぐし、一様な浮遊液とし、0.01%チモールブルー液を1滴加え、pHが2.0～2.4であることを確かめる。このスピッツ遠心管を沸騰水中で10分間、2～3分置きによく攪拌しながら加熱し、その後直ちに冷却する。次に、0.01%フェノールレッド液を1滴加え、1/5 N-NaOH液(蒸留水で作る)を毛細管ピペットで滴下し、pHを7.0～7.8程度にする。さらに、必要に応じてN/20のHCl液、または、NaOH液で細いpHの修正を行な

う。これに1000倍マーズニン液4滴を加えてから、遠心沈殿して、透明な上清をとり、感作タンニン酸赤血球凝集反應用の抗原とする。これを-20°Cのアイスボックスに保存し、沈殿が生じた場合は、pHを修正し遠心して使用する。

(f) 吸収試験用菌液の作製

上記の方法で菌を培養し、その菌液を2500 rpm 30分間遠心沈殿して上清を捨て、生食水で10%菌液を作り56°C 30分で滅菌する。

(g) 群決定のための血清

予研草間氏並びに駒込病院小林健三氏より分与された群血清を使用した。

(h) A群型血清

表1に示した菌株にたいするそれぞれのウサギの抗血清で、これは、草間氏並びに、小林氏の好意により分与されたものを使用した。

(i) 患者血清

本学分院内科の入院および外来のリウマチ熱、リウマチ性心疾患、リウマチ様関節炎、その他の患者および駒込病院入院の猩紅熱患者の肘静脈より採血し、血清を分離後、56°C 30分で不活化し、-20°Cのアイスボックスに保存し、用に臨み融解して終価を測定した。

(II) 実験方法

(1) 感作タンニン酸赤血球凝集反応の術式⁶⁾

a) 赤血球のタンニン酸処置

3回洗った沈渣血球1容量に対し、pH 7.2緩衝食塩水2容量、25倍タンニン酸溶液3容量を加え、よく混じ室温に10分間保存し、1回緩衝食塩水を用いて、弱い力で遠心し、その沈渣をタンニン酸(処置)血球として、次の操作を行なつた。

b) タンニン酸血球の抗原感作

タンニン酸血球の沈渣1容量にたいし、緩衝食塩水2容量および後述の適當の濃度の抗原液3容量を加え、よく混じ37°C 30分保存し、約10倍量の上記の血清希釈液を用いて、弱い遠心力で2回洗い、残存抗原を充分除去した後、20倍容量の血清希釈液を加えて、5%感作血球液を作製した。別

に对照として、タンニン酸処置のみの血球の5%血球液を作製した。

c) 血球凝集反応の術式

ビールス血球凝集盤法（平沢製作所製80コおよび144コの凹面を有するプラスチックの平盤）を用いた。今4種の抗原、たとえば、1, 3, 6, 12, 46型を用いた場合には、上記の血球希釈液をもつて、ウサギの免疫抗血清あるいは、患者血清の倍数希釈列（通常1:12より始め、1:6, 144に至る各管0.2mlずつ）を6列作り、縦に、上より、1, 3, 6, 12, 46各型のA群β溶連菌の酸処理加熱抽出抗原液をもつて感作したタンニン酸処置ヒトO型血球液を、最後の列には、对照として、抗原を感作しない5%タンニン酸血球を、それぞれ、ビベットで1滴（0.04ml）ずつ加え、よく混じた後、室温に2時間静置して判読し、さらに、一夜静置（夏期は氷室）して結果を確かめた。管底像を肉眼で観察して血球が底面に一様に散在しているのを陽性、まるく中央に集まっているのを陰性、蛇の目模様を呈しているものを(±)とした。

(2) 吸収試験の術式

A群β溶連菌を酸処理加熱抽出抗原液の作製の項で述べたと同様な方法で培養し、3000rpm30分遠心し、沈殿した菌体を生食水で2回洗い、それに生食水を加えて10倍の懸濁液とする。これを

患者血清	抗原3	1:50	1:100	1:200	1:400	1:500	1:600	1:3200	1:6400	1:2800	1:25600	1:51200	C ₁
1:30	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1:60	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
1:120	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
1:240	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1:480	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1:960	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1:1920	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1:3840	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:7680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:15360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C ₃

写真1. 抑制反応の場合

縦に患者血清を1:30倍より始めて倍数希釈し、横に抗原液（type 3）を1:50倍より始めて倍数希釈し、よく混和し、室温に30分保存後、すべてに5% type 3 感作ヒトO型血球液を1滴ずつ加えて、2時間後に判定した。左はその判定の結果である。

C₁ は 抗原液を加えない対照 C₂ は 患者血清を加えない対照 C₃ は 両者を加えない対照

56°C30分で滅菌する。冷却した後、1万分の1の割合にマーゾニンを加え、-20°Cのアイスボックスに保存する。患者血清をpH 7.2 B.S. で3倍に希釈し、それに10倍菌液を同量加えて6倍の懸濁液とする。これを37°Cの恒温槽に1時間入れ、その間、ときどき振つてよく混合する。それを3000rpm30分間遠心し、上清を毛細管ピペットで菌体の混じらないよう静かに吸引する。対照として、3倍血清に、生食水を同量加えたものを37°C1時間恒温槽に入れる。かくのごとく、同一血清を少なくとも二つ以上の型の菌液で吸収したものについて反応を試みた。

(3) 抑制反応の術式（写真1）

横に、感作抗原の倍数希釈列を、縦に、ウサギの抗血清、または、患者血清の倍数希釈列を作り、同量ずつ加えて反応の場を画き、よく混和して室温に30分間放置後、これに感作血球を加えて血球凝集反応を行なわせ、抗原による抑制反応の場を観察した。

(4) 抗原のトリプシン処置法

トリプシンは本邦（持田製薬）製の結晶トリプシン製剤で、アンプルに封入したものを用いた。

5 ccの溶解液にトリプシン 1 A (10,000単位)すなわち、1 ccに2,000単位になるように溶解し、50倍3型抗原と50倍6型抗原1 ccに、その溶解液を1 ccずつ加え、室温(約23°C)に10分間放置する。これを感作抗原として、血球凝集反応を試みた。

(5) 溶連菌の咽頭よりの分離方法

内山ら¹⁰⁾の希釈培養法によつて、純培養を行ない、Gram染色によつて鏡検確認のうえ、一白金耳は保存培地に培養、残りは、50mlのTodd-Hewitt培地に移植し、沈降抗原作製に用いた。

(6) 沈降抗原作製方法

Lancefield¹¹⁾, Swiftらの塩酸抽出法の変法を用いた。感作タンニン酸血球凝集反応に用いる感作抗原の製法とは別に、駒込病院で行なっている方法を用いた¹¹⁾。すなわち、Todd-Hewitt培地に37°C, 18~24時間培養せるものを所定目の盛付遠心沈殿管に採り、3000rpm30分間遠沈し、上清を捨て、えた菌体に20倍量のN/20塩酸食塩液(生食水に、1N塩酸を $1/20$ の割合に加える)を加え、充分に混和し、沸騰水中に入れて、ときどき振盪しながら15分間置き流水にて冷却の後、0.1%フェノールレッド液1滴加え、苛性ソーダ液をもつてpH 7.0に補正する。次いで、3000rpm30分間遠沈し、透明な上清をとり出し、4分の1の割合にマーズオンを加え、氷室に保存して沈降抗原とする。

(7) 溶連菌群血清の作製方法

Lancefieldの方法を御簾納および中沢¹²⁾が改良して、溶連菌をクロームワクチンとして作製したものを使用した。

(8) 溶連菌型血清

Conroy and Updyke¹³⁾の方法に準じて、小林健三氏の作製したものの分与を受けた。一部、草間氏作製のものも含まれる。すなわち、表1に示すごとく、34種の型血清である。

(9) 沈降反応術式

Lancefield¹⁴⁾の毛細管重層法を用いた。

(10) ASL-O測定法

診断用ストレプトリジンO“北研”を用いた。測定法はRanzおよびRandall¹⁵⁾法を用いたが、赤血球浮遊液は伝研法の2%を用いた。

(11) CRP測定法

大部分の症例は本学分院細菌検査室で検査したが、一部分は、著者が本邦製(協和薬品)の抗CRP血清を用い、術式は、その使用書のごとく行なった。

(12) Rose反応の方法

- i) ヒツジ血球は市販のものを用いた。
- ii) 患者血清は56°C30分で不活化した。
- iii) 感作血球は凝集価1:4000倍のものを使用し、血球濃度は1%を用いた。
- iv) 不活化した患者血清を、1:8倍より2倍連続希釈法にしたがつて希釈し、その同じもの2列について凝集反応を行ない、0.1ccずつ血球を加えた。
- v) 37°Cのゆぶねに2時間(その間15分ごとによく振る)、さらに、氷室に1晩放置した。
- vi) 氷室からとり出して、直ちに凝集の有無を肉眼的にしらべ、1+の凝集を示した最高希釈倍数をもつて、その血清の凝集価とした。
- vii) Diff. T.16以上のとき陽性とした。

(13) RA testの方法

Hyland製RA test用試薬を用いた。glycine-saline buffer希釈液1 ccに患者血清0.05cc加えて20倍に希釈する。これをスライドの上に1滴落とし、Latex-Globuline試薬の1滴を加え、つまようじで約20×25mmに拡げる。この前に、対照として陽性および陰性のコントロール血清に試薬を1滴ずつ加え、反応を確かめておく、反応の判定は1分後、肉眼で観察した。

(14) F II testの方法

熊谷の方法⁶⁾を用いた。

III. 実験成績

(1) 反応の型特異性についての検討

a) 家兎の抗血清についての証明

抗原1, 3, 6, 12型と家兎抗血清抗1, 3,

表3. 抗血清抗原の特異性の検討 (家兎)

Anti-1		1:400	1:800	1:1600	1:3200	対照
OT ₁	++	++	++	++	++	++
OT ₃	+	±	-	-	-	-
OT ₆	+	+	±	-	-	-
OT ₁₂	+	+	+	-	-	-
OT ₄₆	-	-	-	-	-	-
OT	-	-	-	-	-	-

Anti-3		1:400	1:800	1:1600	1:3200	対照
OT ₁	-	-	-	-	-	-
OT ₃	+	+	+	+	+	±
OT ₆	+	+	+	±	-	-
OT ₁₂	+	+	+	±	-	-
OT ₄₆	-	-	-	-	-	-
OT	-	-	-	-	-	-

Anti-6		1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	対照
OT ₁	++	++	++	++	-	-	-	-
OT ₃	++	++	++	++	±	-	-	-
OT ₆	++	++	++	++	++	++	++	±
OT ₁₂	++	++	++	++	++	-	-	-
OT ₄₆	+	+	+	±	-	-	-	-
OT	-	-	-	-	-	-	-	-

OT₁: 1型感作タンニン酸赤血球の凝集, OT₃: OT₆, OT₁₂と1型感作赤血球の凝集を示す
OT: タンニン酸赤血球の凝集

表4. 抗血清抗原の特異性の検討 (家兎)

Anti-12		1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	対照
OT ₁	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
OT ₃	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
OT ₆	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
OT ₁₂	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±
OT ₄₆	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
OT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6, 12型について, 本法を試みたところ, 表3, 4に示すごとく, 抗1型血清は102,400倍の終価を有し, 他の終価と5管以上の差, 抗3血清は51,200倍で5管以上の差, 抗6血清は819,250倍で6管以上の差, 抗12血清は51,200倍で他の終価と4管以上の差を示し, 明らかに型特異性が認められた。

b) Bactericidal testにより 型特異抗体を証明された患者血清についての検討

Bactericidal testで, 6型抗体を有することを確かめられたリウマチ様関節炎の患者血清に, 本法を試みた結果, 表5に示すごとく, 6型抗原にたいして6,144倍の終価を示したのに, 他の抗原では192倍以下であった。

表5. Bactericidal test との比較 (6型検出の血清について)

患者 草○

血清の価	1:24	1:48	1:96	1:192	1:644	対照
OT ₁	+	+	±	-	-	-
OT ₃	+	+	±	-	-	-
OT ₆	+	+	+	+	+	+
OT ₁₂	+	+	+	±	-	-
OT ₄₆	+	+	±	-	-	-
OT	-	-	-	-	-	-

表6. 溶連菌感作タンニン酸赤血球凝集反応菌液による抗体の吸収試験

患者名	血清の価	食塩水	Type 3	Type 6
草○ リウマチ様関節炎	Type 1	0	0	0
	3	0	0	0
	6	1:1536	1:1536	0
	12	1:24	0	0
	46	1:24	0	0
見○ リウマチ性心疾患	タンニン酸のみ	0	0	0
	Type 1	1:40	1:20	1:20
	3	1:2560	0	1:2560
	6	1:640	1:640	0
	12	1:320	1:160	1:320
タンニン酸のみ		0	0	0

0: < 1:12を示す

c) 菌液の吸収試験による証明

表6に示すごとく, 抗体は感作抗原と同型の菌液によつてのみ完全に吸収されている。すなわち, 表において, 上の欄のリウマチ様関節炎の患者血清は, 6型感作の赤血球に対し, 1,536倍という高い終価を有するが, 3型の菌液では全く吸収されず, 食塩水による吸収と同様であり, 6型の菌液では完全に吸収されている。下の欄のリウマチ性心疾患の患者血清は, 3型抗原感作血球に対し, 1:2560倍という高い終価を有するが, この抗体は3型の菌液で完全に吸収され, 6型の菌液では食塩水による吸収と全く同じ値を示している。すなわち, 患者血清について型特異性が証明された。

d) 抑制反応による証明

表7および写真1のごとく, 反応は, 加えた抗原抗体の濃度にほぼ比例して抑制され, 本反応の抗体は赤血球に吸着されている抗原に対するものであることが証明されている。なお, 他の型の抗原では全く抑制が認められず, 抑制反応によつても型特異性が証明された。

表7. 溶連菌感作タンニン酸赤血球凝集反応の感作抗原による抑制反応

Antibody (患者血清)	抗原 6	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	抗原 C ₁
1:100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:1600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:3200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:6400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:12800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:25600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:51200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
抗血清加せず C ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C₂抗血清も抗原を加えず表8. 各種の抗原による抑制反応 (OT₃ について) 患者: 見○静○ (3型に高い終価を有する血清)

抗原の型	1:4	1:8	1:16
Type 1	+	+	+
3	-	-	-
6	+	+	+
12	+	+	+
46	+	+	+
B.S.	+	+	+

次に、同型および異型の抗原による抑制により、患者血清の凝集反応が型特異性を有するか否かをみるテストを行なった。横に、各抗原の原液を倍数希釈し、各管に同量の患者血清を加えた。表8に示すごとく、3型の高い抗体価を有する患者血清の3型感作血球による凝集反応は、3型抗原によつてのみ完全に抑制され、他の型の抗原液によつては全く抑制されていない。これによつても、型特異性が証明された。

e) B, C, G群溶連菌抗原による凝集反応

表9のごとく、A群以外に、B, C, G群溶連菌よ

表9. A, B, C, G群溶連菌抗原感作タンニン酸赤血球凝集反応

患者血清	見○	鶴○	山○	石○	山○	浅○	高○	木○	松○	門○	長○
35	17	35	9	12	18	20	40	21	24	18	
OT _A (Type 12)	1:384	1:190	1:768	1:1526	1:48	1:768	1:768	1:48	1:24	1:768	
OT _B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OT _C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OT _G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ASL-0	333	333	833	833	833	333	50	100	125	125	333

0: < 1:12 を示す

表10. 感作抗原のトリプシン処置試験

患者血清	見○	鶴○	山○	石○	山○	浅○	高○	木○	松○	門○	長○
35才	20才	17才									
OT ₃	1:2560	1:80	1:2560								
OT ₆	1:640	1:640	1:20								
OT ₃ Trypsin	0	0	0								
OT ₆ Trypsin	0	0	0								
OT	0	0	0								

0: < 1:12 を示す

りも酸抽出抗原を作製し、リウマチ性心疾患の患者血清について検討したが、3群とも、凝集反応を全く認めなかつた。本反応の感作抗原M proteinが、B, C, G群の溶連菌に含まれていないことから、当然のことと思われる。

f) トリプシン処置試験

表10に示すごとく、3型および6型感作抗原のトリプシン処置試験を行なった結果、両者とも終価が0であつた。これは型特異抗原がトリプシンにより破壊されるという従来の知見とよく一致するものであり、本反応が型特異抗原M proteinによるものであることを証明するものと思われる。

g) 咽頭培養検出菌と血清型特異抗体の一致

抗生剤を全く投与しなかつた猩紅熱患者の咽頭培養菌型と血清中の型特異抗体を調べた結果、表11のごとく、咽頭培養検出菌も、血清中の型特異抗体も6型で、その一致することを認め、本法の型特異性を、さらに確かめることができた。ま

表11. 猩紅患者の咽頭培養菌型と血清中の抗体価 患者: 関○房○, 11才, 女。

検査日	23/III	30/III	5/IV	21/V	18/VI
咽頭培養検出菌	A群β溶連菌 Type 6	Type 6	Type 6	Type 6	β溶連菌多数
ASL-0 (u)	250	500	500	333	333
型特異抗体	0	0	0	Type 6 1:12	Type 6 1:192
病日	3日	10日	15日	59日	87日
治療	抗生剤使用せず				

0: < 1:12 を示す

表12. 再現性の検討

一致	16
1管の差	14
2管以上の差	0
合計	30

た、経過を追って検討するに、型特異抗体はA S L-O値よりも遅れて上昇することが認められ、Bactericidal testによるLancefieldら¹⁶⁾の知見とよく一致する成績であった。

(2) 再現性の検討

1, 3, 6, 12, 30の5型を用い、6個の血清について30回再現性を検討し、表12のごとく、一致したものが16回、1管の差は14回、2管以上の差はなかった。したがって、本法の再現性は充分信頼できる成績であった。

(3) 交叉反応の検討

猩紅熱患者では、入院時と退院後を比較し、後

表13. 交叉反応の検討 (22名について)
(他の型の抗原で吸収後、終価の著しく低下した回数)

吸収前の終価	終価の著しく低下した回数	終価の余り低下した回数
1:12	1	0
1:20	2	0
1:24	12	2
1:40	0	2
1:48	5	1
1:80	4	5
1:96	4	4
1:160	4	0
1:192	7	2
1:320	0	5
1:384	0	4
1:640	0	2
1:768	0	3
1:800	0	1
1:1536	0	2
1:1600	0	4
1:2560	0	2
1:3072	0	0
1:5120	0	1
1:6144	0	0
1:6400	0	0
合計	39	40

者において、型特異抗体の終価が上昇していた。これらには既往反応、あるいは、交叉反応もあると考えられたので、22名の患者血清について、1, 3, 6, 10, 12, 18, 30, 37, 40, 46の各型のそれぞれに充分な菌量を用いて吸収試験を行なった。表13のごとく、他の型の抗原で吸収後、著しい終価の低下したもの39件は、すべて192倍以下であり、320倍以上の24件は、いずれも著しい終価の低下は認められなかった。したがって、384倍以上を、有意の終価と見なし、192倍以上の値を問題とするときは、かならず吸収試験を行なった後、その型特異抗体か否かを考慮した。すなわち、吸収されるものは交叉反応の可能性があるとみなした。

(4) 多価抗原液(polyvalent antigen)による感作の検討

Lancefieldらの51型中42型の個々について、本凝集反応を試みることは多くの時間を要する。よって、多価抗原液(polyvalent antigen)による感作を試みた。主な型1, 3, 6, 12, 46型の組合せと、稀な型13, 14, 15, 17, 19型の組合せによる、それぞれ50倍に希釈せる多価抗原液を作り、凝集反応を試み終価を単独抗原のそれと比較した。表14に示すごとく、前者は、3型の終価が3,072倍で最も高く、多価抗原による終価は、やはり、3,072倍で一致した。後者は、どの型も終価は0で多価抗原による終価も0で一致を示した。

表14. 多価抗原液(polyvalent antigen)による感作の終価

稀な型の組合せによる Polyvalent antigen I (1型+3型+6型+12型+46型)		希な型の組合せによる Polyvalent antigen II (13型+14型+15型+17型+19型)				
患者血清	見○静○	患者血清	豊	泉○	西○	吉○
OT ₁	<1:48	OT ₁₃	0	0	0	0
OT ₃	1:3072	OT ₁₄	0	0	0	0
OT ₆	1:96	OT ₁₅	0	0	0	0
OT ₁₂	1:384	OT ₁₇	0	0	0	0
OT ₄₆	<1:48	OT ₁₉	0	0	0	0
Polyvalent I	1:3072	Polyvalent II	0	0	0	0
OT	0	OT	0	0	0	0

すなわち、多価抗原液による感作血球の終価は、その組合せ中の型の最高終価を示すと考えられた。そこで、わが国で検出されるA群β溶連菌のうち、約40%を占める¹¹⁾といわれる1, 3, 6, 10, 12型の主な型はもちろん、比較的頻回に出現する18, 30, 37, 40, 44, 46, 5, 23, 29, 39, 41, 42型については一つ一つ感作し、他の稀な型は5型ずつ組合せて多価抗原液を作り、感作を行ない、もし高い終価を有した組合せがあつた場合には、その型のおおのについて感作を行ない、終価を決定した。

(5) 抗原濃度の検討

a) 粗抗原の蛋白量測定

Lancefieldらの51型中42型のA群β溶連菌の酸加熱抽出抗原の蛋白量を、ビュレット法により測定した。粗抗原を同一のピペットで0.2ccとり、ビュレット試薬5ccを加え、25°C30分放置する。その後、ADS比色計の540mμフィルターで比色し、係数0.0132をかける。蛋白量のg/dlが

表15. 感作抗原の適当濃度と蛋白量との比較

菌株	蛋白量 mg/dl	感作血球の終価	菌株	蛋白量 mg/dl	感作血球の終価
1	252	1:50	29	744	1:200
2	890	1:50	30	820	1:100
3	173	1:50	31	650	1:50
4	500	1:50	32	345	1:50
5	850	1:100	33	1325	1:50
6	340	1:50	34	901	1:50
8	411	1:50	35	570	1:50
9	265	1:50	36	516	1:50
10	1486	1:50	37	637	1:50
11	239	1:50	38	465	1:50
12	292	1:50	39	570	1:100
13	1260	1:50	40	491	1:400
14	266	1:50	41	597	1:400
15	106	1:50	42	385	1:50
17	371	1:50	43	796	1:50
18	820	1:400	44	980	1:50
19	1030	1:50	46	199	1:50
22	783	1:50	47	437	1:50
23	704	1:50			
24	450	1:50			
25	863	1:50			
26	624	1:50			
27	770	1:50			
28	1020	1:50			

できる。その結果は表15のごとく、蛋白量と抗原の感作力とは、必ずしも平行しなかつた。

b) 粗抗原の感作濃度の適当量の検討

粗抗原を倍数希釈し、各濃度でタンニン酸血球を感作し、その終価を比較検討する。抗血清として家兎の抗血清を用いた(草間氏作製)。表16, 17のごとく、1, 3, 6, 12型では、粗抗原の感作

表16. 粗抗原の感作濃度の適当量の検討

Type-1		終価	1:200	400	800	1600	3200	6400	12800	対照
1:25 OTI	1	±	±	±	±	-	-	-	-	-
1:50	2	+	+	+	+	±	±	-	-	-
1:100	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1:200	4	+	+	±	-	-	-	-	-	-
1:400	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:800	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1600	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:3200	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OT	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Type-3		終価	1:200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	対照
1:25 OTIII	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1:50	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1:100	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1:200	4	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
1:400	5	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
1:800	6	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1600	7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:3200	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OT	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表17. 粗抗原の感作濃度の適当量の検討

Type-6		終価	1:200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800	対照
1:25 OTVI	1	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:50	2	±	±	±	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
1:100	3	±	±	±	±	±	+	+	+	±	±	±	±	±
1:200	4	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:400	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:800	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:1600	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:3200	8	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
OT	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Type-12		終価	1:200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	対照
1:25 OTXII	1	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
1:50	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1:100	3	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
1:200	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1:400	5	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
1:800	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1:1600	7	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:3200	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OT	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表18. 感作血球濃度による終価変動の検討
OT₃/Anti 3 を用いる

感作血球濃度	終価	1:400	800	1600	3200	6400	102400	819200	対照
5% 3 滴		+	+	+	+	+	+	+	+
2 "		+	+	+	+	+	+	+	+
1 "		+	+	+	+	+	+	+	+
2.5% 2 "		+	+	+	+	+	+	+	+
1 "		+	+	+	+	+	+	+	+
1.25% 2 "		+	+	+	+	+	+	+	+
1 "		+	+	+	+	+	+	+	+
OT		-	-	-	-	-	-	-	-

濃度は 1 : 50 倍が適当であつた。その他の型については、家兎の抗血清不足のため患者血清について行ない、粗抗原の感作濃度を一応 1 : 50 倍にして反応を試み、対照の管底像が完全に中央に集まるまで感作濃度を調節した。したがって、型によつては、1 : 400 倍まで粗抗原を希釈せねばならなかつた。また、1 : 25 倍以下の型はなく、1 : 50 倍から 1 : 400 倍の濃度が適当であつた。したがって、本反応を行なうにあつては、終価の高い患者血清を常に保存し対照にとり、抗原濃度、あるいは、血球の感作力を調節する必要を認めた。しかし、マーズニンを入れて -20°C に凍結して保存した場合、粗抗原液の感作能力は約 1 年間、ほとんど変化を認めなかつた。

(6) 感作血球濃度の検討

3 型による感作血球と家兎の 3 型抗血清を用いた。表18に示すごとく、5 % 1 滴が最も終価が高く、それ以下の濃度では終価が低く、それ以上の濃度では終価が高かつた。したがって、本反応には常に 5 % 1 滴の濃度で行なつた。

(7) 10 型と 12 型に対する検討

Watson & Lancefield (1944)¹⁷⁾ は A 群溶連菌の 10 型と 12 型は同一抗原を有するため、M 抗原によつては、型分類されないが、T 抗原が異なるため、これによつて二つの型、すなわち 10 型と 12 型に型分類されると述べている。この関係が本赤血球凝集反応によればどうであるかを調べた。表19に示すごとく、1 : 384 倍以上の終価を示した回数45回中、完全に一致したものは15回で、1 管の差を有するものは18回、2 管の差を有するものは 6 回で計39回、3 管以上の差を示したものは 6 回

表19. 10 型と 12 型についての検討 (384 倍以上の終価について)

同一血清における終価の差	回数
一致	15
1 管の差	18
2 "	6
3 "	1
4 "	2
5 "	0
6 "	3
7 管以上の差	0
合計	45

表20. 10 型と 12 型について検討 (384 倍以上の終価について) 12 型と 1, 3, 6, 10 型の終価の比較

同一血清における終価の差	回数			
	1 型	3 型	6 型	10 型
一致	3	7	5	15
1 管の差	6	12	4	10
2 "	10	3	6	3
3 "	1	3	13	2
4 "	4	2	3	2
5 "	0	1	2	0
6 "	6	4	10	2
7 管以上の差	0	0	0	0
合計	30	32	43	34

あつた。しかし、同一血清において、1 : 384 倍以上の 12 型と 1, 3, 6, 10 型について終価の差を調べたところ、表20に示すごとく、12 型の終価と一致した回数30回中、1 型は 3 回、3 型は 7 回、6 型 5 回であつたが、10 型は 15 回で、他の型より明らかに一致の回数が多かつた。これは 10 型と 12 型が同じ M 抗原を有するとの Lancefield¹⁷⁾ らの知見と照合して興味深い。

(8) リウマチ因子との関連性の有無にかんする検討

リウマチ熱 19 例、リウマチ性心疾患 11 例、リウマチ様関節炎 28 例、腎炎 24 例につき、型抗体と RA test との関連を検討した結果、表21, 22 に示すごとく、型の数とも、最高終価とも関連を認めな

表21. 型抗体の数と RA test

表22. 型抗体の最高終価と RA test

かつた。

型抗体とRose反応との関係であるが、リウマチ熱9例、リウマチ性心疾患18例、リウマチ様関節炎24例、腎炎21例を検討した結果、表23、24に示すごとく、型の数とも、最高終価とも関連を認め

表23. 型抗体の数とRose反応

表24. 型抗体の最高終価とRose反応

なかつた。

型抗体とF II testの関係であるが、リウマチ熱10例、リウマチ性心疾患17例、リウマチ様関節炎13例、腎炎19例につき検討した結果、表25、26に示すごとく、型の数とも、最高終価とも関連を示

表25. 型抗体の数とF II test

表26. 型抗体の最高終価とF II test

さなかつた。次に、リウマチ様関節炎の患者血清について、型抗体の最高終価とF II testの最高終価との関連を見たが表27のごとく、両者の間に全く関係がなかつた。さらに、ヒト血清γ-グロブ

表27. 型抗体の最高終価とF II testの最高終価
(リウマチ様関節炎) 表28. 型抗体とF II testの交叉抑制試験 (I)
(高い終価の血清)

山○美○ ♀ 20才 リウマチ様関節炎

血球	抑制抗原	1:12	1:384	Control
OT6	A	+	+	-
	B	+	+	-
	C	+	+	-
OT8	A	+	+	-
	B	+	+	-
	C	+	+	-

A : B.S. + 1% R-O
B : 0.25 mg/cc γ-globulin
C : Typ 6 M protein 抗原液の1:50液
* Latex (+) Rose (-) ASL-O 166 T.U.

表29. 型抗体とF II testの交叉抑制試験 (II)
(低い終価の血清)

水○富○ ♀ 22才 慢性腎炎

血球	抑制抗原	1:12	1:96	Control
OT3	A	+	+	-
	B	+	+	-
	C	+	+	-
OT8	A	+	+	-
	B	+	+	-
	C	+	+	-

A : B.S. + 1% R-O
B : 0.25 mg/cc γ-globulin
C : Type 3 M-protein 抗原液の1:50液
* Latex (+) Rose (-) ASL-O 625 T.U.

リンと溶連菌抽出抗原液による交叉抑制試験を行なつた。表28はリウマチ様関節炎の患者で6型に高い終価の型抗体について行なつたのであるが、γグロブリンと6型抗原液によつて、それぞれ特異的に抑制されている。表29は3型に低い終価を

有する腎炎患者について行なつたのであるが、 γ グロブリンと3型抗原液によつて、それぞれ特異的に抑制されている。以上の結果より、本凝集反応がリウマチ因子とは無関係に反応を示しているものと思われる。

IV. 考 案

溶連菌型特異抗体を証明する方法として、初めに、Denny¹⁸⁾¹⁹⁾がBoydenの感作タンニン酸赤血球凝集反応を試みたのであるが、動物血清については成功したが、患者血清については非特異的の反応のため不成功に終つた。これはDennyが緩衝液を使用せず、したがつて、タンニン酸処置血球凝集反応のpHによる終価の変動についての考慮がなされなかつたことにも一因があると思われる。また、血球濃度も2%の薄いものを用いているが、この濃度では、溶連菌酸抽出抗原を感作した場合、管底像が開き易い状態となり、本来なら、目のつぶれるはずの対照すら開いて輪状となり、陽性と陰性の区別がつきにくくなる。また、溶連菌の抗原は、他の抗原に比して血球凝集にたいする過敏性が強く、酸で処理されているため、なおさらのことである。しかし、このことは菌の型にも関係し、非常に不安定な菌株のあることを経験した。酸抽出抗原¹⁸⁾はM proteinの他に、未知の蛋白を含む粗抗原であるため、血清中には、型特異抗体以外に溶連菌体の蛋白質性抗原にたいする抗体が存在する可能性があると思われる。すなわち、前者を主抗原とすれば、後者は副抗原で、かつ、共通抗原の役割を果たすとも考えられる。本凝集反応の低い終価すなわち、1 : 192倍以下で認められた交叉反応かと思われるものは、この共通抗原によるものかも知れない。あるいは、残存した菌液による血球凝集反応の抑制かも知れないが、少なくとも1 : 384倍以上の高い終価を有した場合、菌液による吸収試験によつても、著しい終価の低下はなく、型特異抗体によるものと考えられた。抗原をさらに精製するなら、この交叉反応をより少なくすることができるかとも思われるが、今後の問題であり、現在の段階では、粗抗原

液を用いても、1 : 384倍以上の高い終価を問題とするなら、充分用いうる。また、各菌型の抗原量については菌株、培養条件等によつても相違があり、感染を受けても、抗体価の上昇し難い菌型もあるようである。最近、Quinn²⁰⁾も鶏赤血球をタンニン酸で処置し溶連菌抗原を感作し、患者血清について型特異抗体を観察しようと述べている。しかし、この方法はヒト血清中の鶏血球にたいする異好性抗体を鶏血球で吸収する必要がある、ヒトO型血球を用いる本法は、この必要がなくより簡単である。臨床的検討の結果については第2編において報告する。

V. 結 論

Boydenの感作タンニン酸赤血球凝集反応の改良法を初めて溶連菌感染症に応用し、菌液による吸収試験、抗原液による抑制反応、Bactericidal testとの比較、咽頭培養菌型との比較、抗原のトリブシン処置等種々な方法で、その型特異性を証明した。また、反応の再現性、多価抗原による感作、抗原濃度、交叉反応、リウマチ因子との関連性の有無等においても検討し、若干の考案を試みた。

文 献

- 1) Lancefield, R.C.: The antigenic complex of streptococcus hemolyticus, J. exp. Med., 47 : 91, 469, 481, 843. — 2) Diefendorf, H.W.: A method for detecting in human serum protective bodies against hemolytic streptococci. Proc. Soc. exp. Biol., 48 : 56, 1941. — 3) Rantz, L.A., Kirby, W.M. and Jacobs, A.H.: Griffith type agglutinin and antistreptolysin titers in normal men and in acute infections, J. clin. Invest., 32 : 411, 1943. — 4) Swift, H.F. and Hodge, B.E.: Type-specific anti M precipitations in rheumatic and non-rheumatic patients with hemolytic streptococcal infections, Proc. Soc. exper. Biol., 34 : 849, 1936. — 5) Todd, E.W.: A method of measuring the increase or decrease of the population of hemolytic streptococci, Brit. J. exp. Path. 8 : 1, 1927. — 6) 熊谷直秀 : 感作タンニン酸血球凝集ならびに抑制反応の研究, 日新医学, 47 (6) : 396, 1960. — 7) Boyden, S.V.: The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera, J. exp. Med., 93 : 107, 1951. — 8)

Todd, E.W. and Hewitt, L.F.: *Dubos' Bacterial and Mycotic Infection of Man*. 1st Ed. p. 286, 1948. —9) 草間秀夫: 溶血れんさ球菌の血清学的分類の手技について, *Modern Media*, 4 (5) : 166, 1958. —10) 飯弓之助: 猩紅熱を中心とした溶連菌について (その3) 各地より分与された溶連菌の菌型, 第30回日伝学会総会一般演説要旨, 30 : 204, 1956. —11) 中沢秀夫: 溶連菌の疫学的研究, *日伝会誌*, 34 (1) : 63, 1960. —12) 飯弓之助, 小林健三: 猩紅熱と溶連菌の群及び型, 31 (5) : 346, 1957. —13) Conroy, E. and Updyk, E.L.: The use of fraction of mechanically disrupted cells for production of group A streptococcus typing antiserum, *Science*, 119 : 69, 1954. —14) Lancefield, R.C.: A micro precipitation-technic for classifying hemolytic streptococci and improved method for producing antisera, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 38 : 473, 1938. —15) Rantz, L.A. et al.: A modification of the technic

for determination of the antistreptolysin titer, *Proc. Soc. exp. Biol.*, 59 : 22, 1945. —16) Lancefield, R.C.: Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci, *J. exp. Med.*, 110 : 271, 1959. —17) Watson, R.F. and Lancefield, R.C.: Studies on the antigen composition of group A hemolytic streptococci. III Types with serologically identical M but distinct T antigens: Type 10 and 12, *J. exp. Med.*, 79 : 89, 1944. —18) Denny, F.W. and Thomas, L.: The demonstration of type specific streptococcal antibody by a hemagglutination technique employing tannic acid, *J. clin. Invest.*, 32 : 1085, 1953. —19) Denny, F.W., Perry, W.D. and Wannamaker L.W.: *J. clin. Invest.*, 36 : 1092, 1957. —20) Quinn, R.W.: Type specific anti M antibodies against streptococcal pyogenes human serum, 第8回国際微生物学会, モントリオール, 1962年8月.