



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	50%溶血を指標とする補体結合反応の實驗的研究：特に溶血素の定量法と結核に於ける各種反応原の比較について
Author(s)	池端, 隆; IKEHATA, Takashi
Description	
Citation	結核の研究, 4, 7-24
Issue Date	1956-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26591">https://hdl.handle.net/2115/26591</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_P7-24.pdf



## 50%溶血を指標とする補体結合反應の實驗的研究

特に溶血素の定量法と結核に於ける各種反應  
原の比較について

池 端 隆

北海道大学結核研究所 細菌部 (主任: 大原 達教授)

(昭和 31 年 2 月 20 日受付)

補体結合反應は極めて高度の鋭敏さを持つ反應として血清学的診断には欠くべからざるものであり、凝集反應、沈降反應のような直接肉眼で見得る免疫反應が陰性的の場合にも陽性を呈する場合が屢々あつて、その鋭敏度は他の反應に比すべくもないのであるが、一方この反應に参与する因子は、他の反應の場合より遙かに多く、従つて補体結合反應の最終段階における溶血現象は極めて複雑な経過を経て行われる。一般にこの反應における溶血現象が影響を受ける因子としては、被検血清と抗原とによつて形成される抗原抗体複合物の量の多寡という因子を除いても、1) 反應にあずかる赤血球の数 2) 溶血素の力価 3) 補体の力価 4) 全反應液の容量 5) 感作時間 6) 使用稀釈液の塩類濃度 7) 被検血清の抗補体性 8) 抗原の溶血性及び抗補体性、などが考えられる。これらの各因子についてはそれぞれの項において述べることにするが、かように幾多の因子から構成されている補体結合反應を最も特異的に、かつまた、最も感度の高い方法で行うためには、理論的並びに實際的に考究すべき問題が色々と残されている。近年欧米において盛んに研究されつつある 50%溶血單位法は、これらの問題を解決すべく採り上げられた 1 つの方法であるといひ得よう。すなわち補体結合反應を正確に定量的に行わんとする傾向が結実してきたわけである。

結核の補体結合反應については、Bordet & Gengou がその術式を發表した当時から、幾多の学者により色々な抗原を用いて実に数多くの實驗が行われてきたが、その殆んどすべてが完全溶血を end-point としたものであつた。しかしながら完全溶血は理論的に云つて、成績判定の指標としてはきわめて不正確であるため、これに替つて Leschly (1914)<sup>1)</sup> が始めて部分溶血に着目し、続いて Morse<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup> および Brooks<sup>4)</sup> 等が補体結合反應の單位として 50%溶血点を用いることを提唱した。その後 Wadsworth<sup>5)</sup>~<sup>13)</sup> 一派の人々によつてこの新しい方法は最も

系統的に研究され、これらの實驗が今日色々と發表されている 50%溶血單位法の基礎となつている。これを始めて結核血清反應の場合に応用したのも同じくかれら<sup>5), 9), 12)</sup> である。しかし当時の方法は、標準の溶血度を示した試料を作つておいて、部分溶血を肉眼で判定するものであり、今日から見れば方法的にはまだ不正確なものといわなければならない。最近に到つて Spectrophotometer が用いられる様になり、この方法はその正確度が高められ、Mayer,<sup>14)</sup> Kent<sup>15)</sup> 等の實驗によつても明かな如く、理論的にも實際的にも極めて正確な値が得られるようになってきたのである。

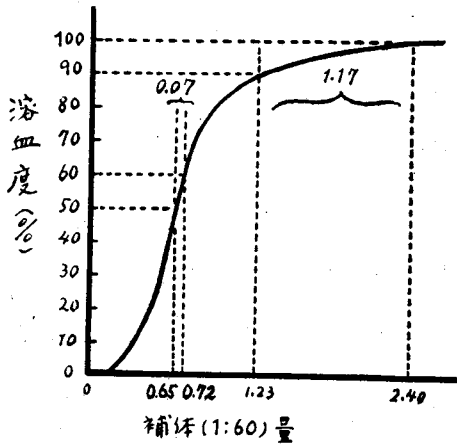
従来の完全溶血單位による方法が 50%溶血單位法に移行してきたのは、定性反應から定量反應に進んだものと解してよい程の進歩であるが、この新しい方法と雖もあくまでも colloidal の反應であるから、その条件を理論的に決定づけることは未だ困難である。しかしながらこの方法は次のような理由から確かに現段階においては最も優秀な方法と云うべきであろう。

今補体量と溶血度の關係を實驗的に調べてこれを curve に描くと、von Krogh<sup>16)</sup> の觀察の如く第 1 図の如き S 字状の曲線が得られる。

この curve において凡そ 30%溶血から 70%溶血位までの範囲では(厳密に云うともつと狭い)、溶血度と補体量との關係が略々直線的になつているのに反し、特に 90%溶血を越す部分からは補体が著しく多く必要になつてくる<sup>17)</sup> <sup>18)</sup>。云い換へると、完全溶血に近い附近においては、極めて大量の補体量の変化も溶血度に対してはそれ程の変化を示さない。従つて indicator として用いられた溶血系は、完全溶血を end-point とする限り、補体量の変化に対して甚だ鈍感なものとなつてしまう。Morse,<sup>3)</sup> Brooks<sup>4)</sup> 等も、補体の溶血作用を測定する場合においては、完全溶血点を end-point として用いる方法は最も正確度の低い

単位を用いたことになるといつており、また完全溶血単位と 50% 溶血単位を用いて補体単位を決定する場合には、両者の間に生ずる誤差の差は少なくとも 10 倍になると述べているが、かかる観点から見ていずれも容易に肯けるところである。50% 溶血に必要な補体量は殆んど“点”で

第1図 補体量と溶血度の関係



あるのに反して、完全溶血を指標とした場合の変動がある程度の“幅”を持つていることは、致死量測定に於ける LD<sub>50</sub> と MLD との関係にも比すべきものがある。補体結合反応のように鋭敏な血清反応は、このように“点”として表わされる補体の単位を用いることによつてはじめてその血清学的な感度を最高に發揮することができる筈である。しかし補体の単位が 10 倍の正確度で決定されたからいつて、最終的反應の結果においても 10 倍の正確度を保つかどうかは分らない。この点について關守<sup>18)</sup>も、感作時間および fixation の過程における補体の崩壊などを指摘している。先にも述べた如く、いずれにしても補体結合反応は一つの膠質反応であり、まだ理論的にすべての条件を決定づけるには到つていない。しかしながら 50% 溶血単位法は次のような理由からも優秀な方法であることが推論される。すなはち第 1 図において、50% 溶血附近で curve が最も強く傾斜している。このことは溶血素によつて感作された血球の補体による実際の溶血量が、50% 附近で最も多いこと、云いかえれば補体に対して特に易溶性又は特に難溶性の感作血球は統計的にその数が少なく、中等度の溶解性のものが大多数であることを示すものである。吉田<sup>19)</sup>の実験もこの事実を裏書きしている。すなわち彼は補体が等比級数的に変化する時、感作血球の溶解量が正規確率分布を示すことを観察した。従つてこのように補体による感作血球の溶解性から考えても、50% 溶血単位は極めて理論的な単位というべきである。すなわち

常識的にも容易に肯ける如く、赤血球中には溶血に対し特に抵抗の強い血球が何パーセントが含まれているが、完全溶血を指標とする限り、それは結局一番抵抗の強い赤血球の溶血を目あてに測定していることになる。これが如何に不合理であるかは多言を要しないであろう。

次にこの補体単位の求め方であるが、von Krogh<sup>16)</sup>は補体量を  $x$  とし、これによつて起される溶血度を  $y$  とした場合、吸着の公式を応用して両者の間に次の関係があることを見出した。

$$x = K \left( \frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}}$$

$$\text{従つて } \log x = \log K + \frac{1}{n} \log \left( \frac{y}{1-y} \right)$$

この式において、溶血度が 50% の場合、即ち  $y=0.5$  ならば

$$\log \frac{y}{1-y} = 0 \quad \therefore x = K$$

となり、 $K$  は 50% 溶血に必要な補体量を示す。 $\frac{1}{n}$  は恒数で縦軸に  $\log x$ 、横軸に  $\log \frac{y}{1-y}$  をとるとき、この式が表わす直線の傾斜を示すものである。

LD<sub>50</sub> の求め方に色々な方法がある如く 50% 溶血単位の求め方にも幾つかの方法が考えられるが、原理的にはすべてこの von Krogh の公式に則つて 50% 溶血単位が求められている。

しかし 50% 溶血を指標として補体単位の測定を行った場合、実際の補体使用量は非常に少量であり、一方高濃度の血清、ことに家兎血清などにおいては、それ単独でも可なり抗補体作用を有するため、斯様に少量の補体が用いられた場合には直接溶血の程度に影響を与え、反応がまぎらわしくなつてくる。この被検血清の抗補体性は、完全溶血を end-point とした従来の補体結合反応においても屢々見られ、その本態についての研究も Friedemann<sup>20)</sup> 始め、Sachs<sup>21)</sup>、上野<sup>22)</sup>、吉田<sup>23)</sup> など、数多くの報告がみられるが、しかしいまだにその Mechanism は不明の域を脱せず、決定的な結論は得られていないようである。50% 溶血単位法による定量的な補体結合反応の実施に際しては、このような点にも特に注意が払われねばならない。しかるに最近補体結合反応の反応系内に起るこのような矛盾を巧みに除外して、しかも血清力価を詳しく求める定量的な 50% 溶血単位法が、Stein & Ngu<sup>25)</sup> (1950) によつて発表された。ただし理論的な正確さを持つた定量的な反応は Osler<sup>24)-27)</sup> 一派の人々によつてもすでに報告されているが、この術式は極めて複雑であり、簡便さの点においては遙かに Stein 等の術式がまさつている。

そこで著者は先づ Stein の方法を主とし、現在まで

に行われてきた色々な 50% 溶血単位法を参考として、実験的にこの術式を追求し、これに若干の変法を加味して家兎に於ける補体結合反応の実施を試みた。この方法に於いて最も重要な補体の定量法に関してはすでに報告したので<sup>40)</sup>、本論文に於いては特に溶血素の定量法について考察を加え、更に進んで結核に於ける種々なる反応原について比較検討を加えてみたいと思う。

なお Stein and Ngu の術式に関しては、すでに著者等<sup>32)</sup> が結核血清を用い我が国最初の追試を行つたほか中村等による術式の紹介<sup>29)</sup> 及び追試<sup>41)</sup> もあるので、ここでは割愛することにする。

## I 溶血素の至適濃度測定法について

補体結合反応に於いて被検血清の力価を直接に表示するものは溶血系であり、溶血素はこの溶血系の 1 つの構成因子として各予備試験に先立つてその使用濃度が決められるべきものである。従来完全溶血を指標とする場合の使用溶血素濃度(単位)は、補体量及び血球浮游液濃度を常に一定にして決定されたものであり、術式の操作上からみても比較的容易にこれを求めることができたが、50% 溶血単位法による場合は、用いられる補体は極めて少量であり、かつ反応の鋭敏さを増す意味からこの少量の補体をして溶血作用を Maximum に行わしめることが必要とされる。補体と溶血素の血球溶解に対する相補性については、すでに Dungen<sup>42)</sup>、Morgenroth u. Sachs<sup>34)</sup>、Thiele and Embleton<sup>35)</sup>、Seelich<sup>36)</sup>、Heidelberger<sup>37)</sup> 等によつて詳しく報告され、その Mechanism についても色々追究されている。即ち一定量の血球を完全溶血させる場合には、補体と溶血素の濃度の関係は逆比例するのである。つまり完全溶血のために用いられる補体量を少なくしようとすれば溶血素の濃度を濃くすればよく、また補体量を多くすれば溶血素は少量でよいことになる。著者の実験<sup>17)</sup> したところでは、この関係は 50% 溶血を end-point とした場合も完全溶血を end-point とした場合も大体同様であつた。しかしながらこの場合一方を極端に多量用いると(ことに溶血素の方)、反応が正常に行われず、むしろ逆の結果をきたす場合のあることは従来知られているところである。つまり溶血素の補体代償作用、補体の溶血素代償作用及び高濃度の溶血素(抗体過剰)による阻止帯現象<sup>38)</sup>、<sup>39)</sup> 等が起つてくるからである。しかし理論的に考えてみても当然この 2 つの reagent の間には、溶血作用を起させるに際し最適と思われる量的関係が存在する筈である。これを見出すことは、完全溶血の場合においても勿論であるが、殊に 50% 溶血単位を用いる場合には特に重要な問題となつてくる。Stein and Ngu の術式における溶血素の測

定法<sup>25)</sup> も確かにこれを決定する 1 つの方法ではあるが、この方法では多くの主観が入る恐れがあり、彼等の行つた術式中での最大の欠点とも云い得る。しかし現在までのところ、血球に溶血素分子が付着する状態は依然として不明のままであり、Heidelberger<sup>37)</sup> 等の報告をみても分る如く、この両者は化学反応における分子のように数学的に割切れる関係にあるものとは到底考えられない。しかし著者は出来得る限り鋭敏な、しかも反応過程において反応成績を左右するようなまぎらわしい反応を起さないところの溶血系を得んと色々苦心した結果、経験的に 1 つの新しい方法を知り得たのでこれについて報告したいと思う。

なお理解に便ならしめるため、以下の記述中実験方法ならびに術式に関しては特に項目を設けず、個々の実験成績の項においてその都度述べることにする。

### 1. 実験材料

全実験を通じて大体前報<sup>17)</sup>、<sup>31)</sup>、<sup>32)</sup>、<sup>40)</sup> と同様なものを使用した。

(i) 溶血系：牛血球と抗牛血球家兎溶血素血清を使用した。

(ii) 稀釈液：Stein<sup>25)</sup> の変法による Mayer の Veronal-buffer 食塩水を使用した。

(iii) 血球浮游液及び感作血球の作り方

血球浮游液はその濃度が濃くなると各 reagent の間の作用が不規則になる傾向があり<sup>41)</sup>、またエルマ IV 型の Spectrophotometer の性能からみて Optical Density (以下 O.D. と略記) が 0.2 から 0.4 の間が最も鋭敏であるから本実験においては前報と少しく異なり以下の如き血球浮游液を用いた。これは Kent 等<sup>12)</sup> が用いた例と同じである。即ち大体 2% 前後の血球浮游液を作り、その 0.8 cc に蒸留水を 3.2cc 加えて溶血を起させ、その O.D. が 0.5 になるように修正した一定濃度の血球浮游液を使用した。このものは 1 立方耗に約 30 万個の赤血球を含有する血球浮游液に相当する。感作血球は斯くして作つた血球浮游液に、これと同量の各濃度の溶血素を混合して作つた。混合後 20 乃至 30 分程度の感作では、往々にして溶血度に不規則性があらわれるので、大体 1 時間以上室温に置き、その間、時々振盪した。この術式においては、本試験の最終段階に加えらる感作血球は一夜を経たものであり、従つてこの予備試験の場合も出来るだけ感作時間を長くした感作血球を用いるのが合理的と思われる。

### 2. 実験方法及び実験成績

(i) 各種濃度の溶血素による感作血球が示す  $1/n$  の値の測定について

Krogh<sup>16)</sup> の式における  $1/n$  なる恒数の求め方についてはすでに報告<sup>40)</sup> した如く、作図による方法と最小自乗法に

よる方法とがあるが、本実験に於いてはこれを最小自乗法によつて求めた。なおここで用いた溶血素は、次の章 II において用いたものとは Lot が違うことを付記しておく。

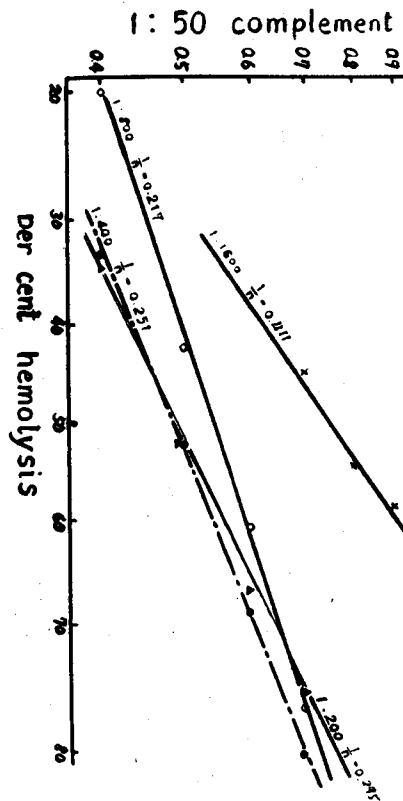
第 1 表 各種度の溶血素による感作血球が示す  $\frac{1}{n}$  の値

Amb. dilut.	1 : 50 Compl.	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1/n	Agg
1 : 200	O.D.	0.065	0.162	0.249	0.320	0.360			0.295	卅
	%H	13.6	34.1	52.4	67.3	75.7				
1 : 400	O.D.	0.075	0.157	0.251	0.330	0.388			0.251	±
	%H	15.7	33.0	52.8	69.4	81.6				
1 : 800	O.D.	0.049	0.096	0.198	0.290	0.366			0.217	—
	%H	10.3	20.2	41.6	61.0	77.0				
1 : 1600	O.D.					0.205	0.240	0.290	0.411	—
	%H					45.0	50.5	61.0		

先づ第 1 表の如く、溶血素を 200 倍より 1600 倍まで稀釈し、夫々に同量の血球浮游液を加えて前述の如く感作する。次で 50 倍の補体を 0.3 cc より 0.9 cc まで順次に試験管に入れた後、これに稀釈液を加えて各試験管の内容が 2.4 cc となるようにし、更に上述の感作血球を夫々 1.6 cc づつ加え全量を 4 cc とする。この際 0.3 cc とか 0.4 cc という量をピペットで入れるわけであるが、時として管壁に残つたりするから、補体を入れた後直ちに稀釈液を加えるようにする。しかしそれでも、時に斯様な操作の結果と思われる不規則な溶血をみる場合がある。著者はかかることを避ける意味で、50 倍の補体 0.3 cc を加える場合には、予め 2.4 cc をとればその中に 50 倍の補体が 0.3 cc 入つていような補体の稀釈液を作つておいてこれを使用した。このようにするとほとんど不規則な溶血をみることはない。以下すべて補体の注入はこのようにして換作した。なほ補体はできるだけ泡沫を生じないように扱はねばならぬ<sup>43)</sup> ことは勿論である。補体に感作血球を加えた後は、恒温槽に入れて型の如く 37°C 30 分感作した。感作後各試験管を同時に 1500 r.p.m. 10 分間遠沈して、それぞれの上清の O.D. を読み、100% 溶血の Standard からそれぞれの溶血度を求めて 1/n を計算した。その結果は第 1 表の如くであつた。この表から分るように、800 倍の溶血素で感作した溶血系の例において 1/n が最も小さい値を示した。

またこれらの関係を前報<sup>22)</sup> の如く縦軸に  $\log x$ 、横軸に  $\log \frac{y}{1-y}$  を目盛つた対数グラフ上に作図すると第 2 図のような直線が得られる。これからも分るように、補体の

第 2 図 各種濃度の溶血素による感作血球の溶血の傾向



ある一定量の変化に対して起る溶血パーセントの変動は、 $1/n$ の最小なるものに於いて最も大きい。いい換えると、 $1/n$ の値が最小な溶血系が最も鋭敏な溶血作用を示すことになる。

(ii) 完全溶血域附近に於ける溶血状態について

前の実験は50%溶血前後に於ける部分溶血の成績であるが、この場合に完全溶血域附近では如何なる溶血が起っているかをみるために、更に補体を増量して次の実験を行つてみた。

第2表 各種感作血球の完全溶血域附近に於ける溶血の傾向

1:50 Compl. Amb. dil.		1.0	1.4	1.8	2.2	Agg.
		1:200	O.D. 0.427 %H 89.8	0.448 94.3	0.450 94.7	
1:400	O.D. 0.442 %H 93.0	0.460 96.8	0.457 96.2	0.460 96.8	±	
1:800	O.D. 0.455 %H 95.8	0.462 97.2	0.473 99.6	0.473 99.6	-	
1:1600	O.D. 0.399 %H 84.0	0.435 91.6	0.460 96.8	0.460 96.8	-	

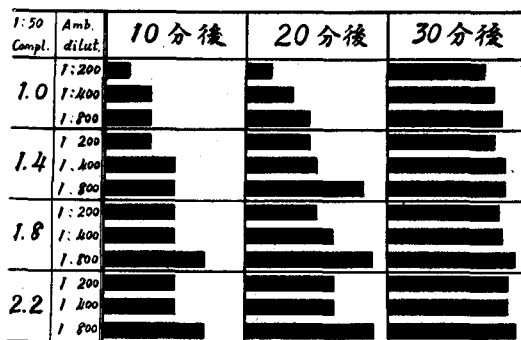
即ち20倍の補体1.0 cc, 1.4 cc, 1.8 cc, 2.2 ccにそれぞれの感作血球を加えて、前回と同様に恒温槽で感作してその溶血の程度を調べた。その成績は第2表に示した通りである。即ち800倍の溶血素を用いた感作血球が、同一量の補体によつて最も良く溶血させられている。この場合、1600倍溶血素を用いた溶血系では同一量の補体に対して溶血の程度が低くなる<sup>33)~37)</sup>のは当然と考えられるが、200倍及び400倍の溶血素による感作血球では逆に800倍のものより溶血し難くなつてきていることは興味ある事実である。この点に関する理論的な追求は考按の項で述べることとする。

(iii) 溶血反応の時間的推移について

溶血反応は時間を追つてどのような反応を示すかと言うことはLourau<sup>4)</sup>、大川<sup>5)</sup>等によつても報告されているが、著者も前項と同じ実験を時間の経過を追つて調べてみた。ただしこれは現象そのものについて調べただけである。

即ち各 reagent を加えて恒温槽に入れた後、10分、20分及び30分に於ける溶血状態を完全不溶血から完全溶血までに分類してこれを肉眼的に判定し、その程度を模式

第3図 溶血反応の時間的推移



図化したのが第3図である。やはり800倍溶血素で感作した感作血球の場合は始めから最もよく溶血を起し、すでに20分にしてほとんど完全溶血を呈している。しかも同じ時間に於いて、これより濃厚な溶血素ではまだ溶血が完了しないことは興味深い。

(iv) 溶血反応に用いられた溶血素と補体の量的関係について

次に著者は、これらの溶血反応に於いて50%溶血を起すに必要な補体量と溶血素の原液量の和を調べてみた。即ち溶血反応に用いられた1本の試験管内の血清成分の和を求めてみたところ、次のような興味ある結果を得たのである。

第3表 溶血反応に用いられた溶血素と補体の量的関係

溶血素 稀積	溶血素 原液量	50%溶血 に必要な 補体原液 量	溶血素 + 補体	1/n	顕微鏡的 血球凝集 所見
1:200	0.004	0.0098	0.0138	0.295	+
1:400	0.002	0.0096	0.0116	0.251	±
1:800	0.001	0.0104	0.0114	0.217	-
1:1600	0.0005	0.0152	0.0157	0.411	-

即ち第3表の如く、 $1/n$ が最小なる値を示した800倍溶血素による感作血球の場合にこの和(補体量+溶血素量)が最小となつた。ここには1例のみを掲げたが、この実験は十分に再現性がある。以下この方法を仮に“最小和法、”と呼ぶことにすれば、この時の溶血素が求むる至適濃度である。

(v) 著者の“最小和法、”による諸家の成績の検討

前項で述べたこの最小和法は、すべて牛血球を用いた場合の例であり、あるいは他の羊の血球を使用した場合には成立するかどうか危ぶまれる。そこで著者は羊の血球を用いて行つた諸家の溶血反応の成績表から溶血素及び補体の原液量を算出して最小和法を適用してみた。

第 4 表 著者の "最小和法" による諸家成績の検討

I Kent による成績									
Amboceptor (ml×10 <sup>-3</sup> )	0.05	0.075	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80
Complement (ml×10 <sup>-3</sup> )	29.41	7.98	5.85	4.62	4.18	3.81	3.65	3.51	3.44
1/n	0.366	0.354	0.254	0.221	0.199	0.175	0.166	0.180	0.189
Amb.+Compl.	29.46	8.05	5.95	4.77	4.38	4.11	4.05	4.11	4.24
II Stein and Ngu による成績									
Amboceptor (ml×10 <sup>-2</sup> )	0.01	0.015	0.02	0.03	0.04	0.06	0.06	0.08	
Complement (ml×10 <sup>-2</sup> )	0.242	0.214	0.192	0.181	0.179	0.173	0.173	0.171	
1/n	0.262	0.207	0.191	0.183	0.192	0.197	0.197	0.205	
Amb.+Compl.	0.252	0.229	0.212	0.211	0.219	0.233	0.233	0.251	

その結果は第 4 表に示す如く、Kent<sup>40)</sup> の実験結果も、Stein and Ngu<sup>23)</sup> の成績も、共に 50% 溶血を起すに必要な補体の量と、その時、血球の感作に使用された溶血素の量の和が最小なる場合の感作血球に於いてやはり 1/n が最小である。なほ、表に掲げた以外の諸家の成績に於いても総て同じ関係がみられた。この結果からみて、最小和法は羊の血球を用いた場合にも成立するものと考えられる。

(vi) 補体の多寡による各種感作血球の溶血の傾向

前に掲げた第 1 表、第 2 表、第 3 表の最後の欄に各感作血球 (5 時間以上室温に放置したもの) の顕微鏡的凝集所見を記載したが、これは溶血素濃度がある程度以上濃くなると、反つて感作血球が溶解し難くなる現象が、血球の凝集に原因するのではないかと考えたからである。溶血反応の阻止帯現象に関しては、Gay<sup>47)</sup>、Sorman<sup>38)</sup>、Pandit<sup>39)</sup> 等を始めとして古くからその報告があり、現在まで色々とその Mechanism について議論されている。著者もその原因の一端を探らんとして次に第 1 表と第 2 表の一部を抜き書きしてみた。

第 5 表 各種感作血球の補体の多寡による溶血の傾向

1:50 Compl.		0.4	1.8	顕微鏡的 血球凝集 所見
Amb. dilut.				
1:200	O.D. %H	0.162 34.1	0.450 94.7	卅
1:400	O.D. %H	0.157 33.0	0.457 96.2	±
1:800	O.D. %H	0.096 20.2	0.473 99.6	—
1:1600	O.D. %H	0 0	0.460 95.8	—

即ち 800 倍溶血素による感作血球の方が、それよりも濃い濃度の溶血素を用いた感作血球よりも溶血の程度が強いという事実は、どのような補体量を用いてもみられるかどうか、つまり如何なる程度の部分溶血域に於いても起り得るかどうかを調べてみたのである。その結果は第 5 表に示す如く、極く少量の補体を用いた 30% 程度の溶血域附近では、このような現象、即ち溶血素濃度が 800 倍より濃いと溶血が起り難くなるという傾向はみられなかつた。即ちこの表からは、極く低い溶血域では溶血素濃度が濃くなれば溶血の程度は次第に高くなるが、高度の部分溶血域ではある程度以上溶血素濃度が濃くなるとこの関係が逆になるという傾向が窺われた。しかし、このことが溶血素濃度を次第に増した場合、各種感作血球から得られる 1/n の値は順次小さくなっていくにもかかわらず、ある程度以上高濃度の溶血素を用いた感作血球では逆に 1/n の値が再び大きくなるという第 2 図の成績の主な原因になっているのではないかと考えられる。

### 3. 小括ならびに考按

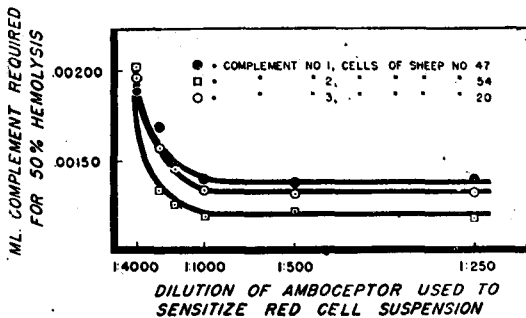
完全溶血を指標とする従来の補体結合反応に於いては、反応の全過程を通じ比較的少量の補体を用いたが、ここに報告した 50% 溶血を end-point とする方法は、比較的小量の補体を用い、しかもより鋭敏な反応を行わんとするものであるから、前述の如く溶血素の濃度についても十分に吟味をする必要が生じてくる。

Spectrophotometer が使用されるに到つてからは、50% 溶血単位による補体結合反応が急速に発展し、補体の定量等は主観の入らない極めて正確な方法<sup>45), 46)</sup> で行われるようになってきた。しかしこの補体結合反応を行うに当つて最初に行われねばならない溶血素の最適濃度の測定については、現在までのところ主観の全く入らないよい方法はないようである。

先にも述べた如く、血球と溶血素の結合状態については Heidelberg<sup>37)</sup> 等の詳細なる実験があり、わが国に於いては吉田<sup>45)</sup> 等の報告がある。即ち Heidelberg は羊の赤血球が完全溶血を起すためには、1個の赤血球に溶血素分子が約1500個結合して、血球の表面積の約0.4乃至14%が覆われれば足りると述べ、吉田は溶血素分子と血球は単なる n:1 の割合に結合するものではないように思われると云つてゐる。このことからみると、結局最適比(溶血のための)に両者が結合する点を見出すのは可なり困難なことと想像される。

1939年に Wadsworth<sup>12)</sup> は種々の濃度の溶血素で感作した感作血球をそれぞれ50%だけ溶血せしめるに必要な補体量を求め、縦軸に補体量、横軸に溶血素濃度をとつて、これらの点を plot し、一本の curve を画いた。そしてこの curve から溶血素の至適濃度を求める新しい方法を発表している。その詳細は原著にゆずるが、ここにその図を引用しておく。

第4図 Wadsworth の方法による至適溶血素濃度の求め方。(Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. 2nd ed. Williams & Wilkins Company. 1939. 226頁より引用)



図に於いて直線から曲線部分に移行する点の溶血素濃度が使用すべき溶血素の至適濃度であるというのである。このような関係はすでに Morgenroth u. Sachs<sup>34)</sup> によつても報告されている。即ち多量の溶血素を用いる場合は極めて少量の補体でも血球を完全に溶かすことが出来、しかも溶血素量を更に数倍より数百倍の間に変化させても、この時血球を完全に溶血せしめるに必要な補体量は僅か2乃至3倍しか変らないと述べている。ただしこれは完全溶血を指標とした場合のことで、これと同様な成績は北岡等<sup>49)</sup> によつてもまた報告されている。50%溶血単位によつてこのような関係を指摘した学者には Wadsworth の他に Kent<sup>50)</sup>, Stein and Ngu<sup>25)</sup> 等がある。ことに Stein and Ngu の方法に於いては溶血素稀釈を500倍、655倍、

1000倍…というように、実際の濃度(0.002, 0.0015, 0.001…)が等間隔になるように目盛られており、得られた curve から彎曲の著しい点を見出し易いように作図している点に於いて確かに良い方法であると思う。しかし実際には Wadsworth 等の云うように溶血素濃度がある一定に達しても、更に濃度を少しづつ増せば、これらの感作血球の50%溶血に必要な補体はやはり少しづつ減少するのである。Kent<sup>49)</sup> は Spectrophotometer を用いた実験でこの事実を指摘し、また蘭守<sup>15)</sup> も斯様な事実のあることを認めている。従つて実際的には、図に於いてかかる変曲点を求めることは可なり困難でもあり同時にまた主観の混入する余地も十分にあると云わなければならない。更にこの方法には次のような欠点もある。即ちこのグラフを作成するのに縦軸と横軸の目盛の取り方に相関関係のないことである。従つて目盛の取り方によつてこの curve の型が少なからず変化する。例えば縦軸の間隔を広くとり、横軸の間隔を狭くとると curve は急傾斜してくるし、縦軸を狭く、横軸を広くとるとゆるやかな curve となる。しかしてこの様なことによつて変化する curve から彎曲点を決定する場合には、当然実施する人によつて異つた値が得られるであろうことは想像に難くない。ことに溶血素濃度を細かく刻んで実験すればする程、斯様な困難に逢着する。著者もこの方法によつて溶血素の至適濃度を決定するに際しては何時也非常な困難を感じずにはいらなかつた。

このような意味から本実験に於いては、先づ補体と溶血素の相対関係を追求し、von Krogh<sup>16)</sup> の式に於ける  $1/n$  という係数と、感作血球の溶血状態を調べてみたのであるが  $1/n$  の値が小さくなればなる程、その溶血系の補体に依る溶血の仕方が鋭敏であるという結論を得た。つまりこの場合の溶血素濃度が至適濃度であるが、Wadsworth も溶血素の至適濃度に於いて Krogh の式に於ける  $1/n$  の値は最小となることを指摘している。しかしてこの  $1/n$  の値は一般に溶血素濃度が増すに従つて小さくなつてゆくが、溶血素濃度がある限界以上になると再び大きくなつて来る。この事実は所謂阻止帯現象に関係があるのではないかと思われる。Neisser 等<sup>51)</sup> によつて所謂 Neisser-Wechsberg 現象が発表されて以来、溶血反応に於いてもかかる現象があることが分り、幾多の学者によつてその原因が追求され、また色々な説が報告されて来ている。今その主なものを挙げてみると、Gay<sup>47)</sup> の沈降物による補体の固定説、Sormani<sup>35)</sup> の特殊脆弱性説、Pandit<sup>39)</sup> の補体解離説、Hyde<sup>52)</sup> の補体成分の変動説、吉田<sup>53)</sup>、三井・黒沢<sup>54)</sup> 城<sup>55)</sup>、須磨<sup>56)</sup>、大川<sup>45)</sup> 等の溶血素、補体及び血球の量的関係によつて起るという説等があり、また最近では羽里等<sup>57)</sup> によつてこの現象は抗体グロブリンとアルブミン複合体で

ある agglutinoid の作用によつて起るものであるという実験が報告されている（ただしこの実験は血球を用いた場合ではなく、チフス菌について行われたものである）。また一方 Lourau<sup>41)</sup>、由利<sup>42)</sup>等は、かかる現象は血球の凝集のために起るものであると説明している。またたとえこの現象が直接に血球の凝集のために起るものではないにしても、溶血素と血球凝集素との間には密接な関係があつて、常に両者の平行関係が成立すると大川<sup>43)</sup>は報告している。また常泉<sup>44)</sup>は綿羊血球系を用いて3次元的抗原抗体反応を詳細に追求し、血球凝集反応と溶血反応の間には何か密接な関係があることを指摘している。最近に於いては一般にこの両者の間に平行関係があるという説が多く、Replöh及び Bötticher<sup>45)</sup>等は、両者は同一物質であつてそれがこの2つの作用をするのであると説明している。

斯様に溶血反応の阻止常現象に関しては、現在までの所定説はないようであるが、第5表の実験結果から、かかる現象は恐らく血球の凝集のためか、もしくは凝集に密接な関係のある因子によつて起るものであり、各種濃度の溶血素による感作血球から得られる  $1/n$  の値の変動も、これに原因を求め得るのではないかと考えられる。即ち第5表の如く、30%程度の溶血に基準をおいてみると、同一補体量に依る溶血度は濃い溶血素を用いた感作血球の方が強く、逆に90%程度の溶血をみると高次稀釈即ちうすい溶血素による感作血球の方が溶血度が強くなつてゐる。

これは高濃度の溶血素で感作された場合は、感作血球浮游液中に於いて一部分の血球だけが補体の溶血作用を充分に受け得るような状態に在るに過ぎず、他の大部分の血球は凝集を起して補体が充分作用し得ない状態になつており、これを溶血させるにはより多くの補体が必要とされ、従つてこの場合は  $1/n$  が大きくなつてくるものと想像される。（第2図参照）。これと反対に最も鋭敏な溶血反応を呈する感作血球の場合は、各個の血球が溶血のために必要にして充分な溶血素と結合して凝集を起さない程度に浮游し、しかも補体の溶血作用を最も受け易い量的なバランスに置かれてゐるのであろう。従つてこの場合  $1/n$  の値は最も小となる。溶血反応と同時に調べた血球凝集状態の顕微鏡的所見からも、大体この考えを裏書きするような結果が得られた。

次に50%溶血に必要な補体と溶血素の原液量の和に就いてであるが、第3表にみる如くこの和が最少の値を示した溶血系は確かに  $1/n$  の値が最少であり、従つて最も鋭敏な溶血反応を呈した。この50%溶血を起すに必要な補体の量と、その時用いた溶血系中の溶血素の原液量との和を求める方法を著者は仮に“最小和法”と名づけたが、これによつて溶血素の至適濃度を求める方法は充分に再現性

があつてしかも全く主観の入らない方法である。Kroghの式における  $1/n$  という係数の示す実際の値は、上述の如く極めて小さな数字で表わされ、これから溶血素の至適濃度を求めんとすれば相当精密な実験<sup>15), 40)</sup>をしなければならぬ。しかし Stein and Ngu の術式<sup>25), 32)</sup>によれば、50%溶血に必要な補体の量は、縦軸に  $\log x$ 、横軸に  $\log \frac{y}{1-y}$  を目盛つたグラフを作つておくことと容易に求めることが出来、しかも実験操作上の誤差を生ずる機会も  $1/n$  を計算によつて求める場合より格段に少なく、またたとえ生じたとしてもそれは前後の関係から容易に判別し得るものである。ただここで述べた実験は、血球浮游液の濃度を常に一定にして行つたものであり、もしも血球浮游液の濃度が変われば、あるいはこの方法に不合理が生ずるかもしれない。しかし普通に用いられ得る力価の溶血素と、2乃至3%前後の濃度の血球浮游液とによつて反応が行われる場合は、第4表の諸家の実験成績からみても、この“最小和法”は充分に成立するものと考えられる。

しかしこの方法は実験中に経験的に知り得たもので、特別な理論的根拠というものはないが、根本的に云えば、Kent<sup>50)</sup>等の“それ以上溶血素の濃度を増すと補体の溶血作用がむしろ逆に低下してくる点の濃度を溶血素の至適濃度とする”方法と一致するものを持つてゐる。また理論的な興味の見地からみると、一定の50%溶血を起させるために加えられた補体と溶血素の量の和が最小ということ、要するに一本の試験管に加えられた血清成分が最も少ないということであり、このように幾種もの試料が加えられた複雑な膠質反応の場合には、加えられた reagent が過剰となつて反応がスムーズに行われなくなるということも考えられる。兎に角、同じ血球の同じ量を50%だけ溶血させるための補体と溶血素の加え方には色々あるわけであるが、その和が最小の場合反応が最も鋭敏に行われるということは興味あることであろう。

この“最小和法”に関しては、いまだ論究されるべき余地も充分にあると思われるが、これは現在行われている方法とは違つて、全く主観を入れずに測定し得る点、現行の50%溶血単位法の1つの欠点を埋めるのに充分な方法であると考えられる。

## II 結核の補体結合反応における各種抗原の比較

結核の補体結合反応は、Bordet & Gengou によつてその術式が発表されて以来現在に至るまで極めて多数の報告がなされており、それに用いられた抗原についてもまた各種のものが報告されている。今その使用された抗原を総括的に述べてみると、均等な結核菌浮游液を始めとし、

菌の自然融解液、菌体の加熱抽出液、生食水抽出液、エチルアルコール抽出液、メチルアルコール抽出液、エーテルあるいはベンゾール抽出液、苛性ソーダ抽出液、タリセリン抽出液、またこのような方法を色々と組合せて得た抽出液、脱脂菌体の上記のような操作による各種抽出液、培養濾液、特殊培地の培養濾液、旧ツベルクリン、あるいはこれらの抗原に他の脂質等（例えば卵レチチン等）を混合した液、更には結核菌と直接関係のない物質、最近はまだ精製された菌体蛋白、脂質等、実に多種多様である。なお又これらの抗原を使用した場合の反応成績が、病状あるいはツベルクリンアレルギーと平行するとか、特異性が強いとか云う問題についてもその報告は実に区々であり、実際臨床的に本反応を応用し得るまでには至っていないようである。

斯様に他の疾患の場合に比してその特徴を追求するのが困難なのは、要するに結核菌そのものが他の菌と異つた性状を持ち、それが体内に進入して起す変化もまた複雑となつているためと思はれる。斯くて結核の補体結合反応は一時放置されたような状態となり、極く一部の学者によつてのみこれが行われてきている現状である。

しかしながら近年 50% 溶血単位法が採用され、更に Spectrophotometer が用いられるようになってからは、補体結合反応は一段とその鋭敏さを増すに至りこの反応の結核研究における重要性は少くとも基礎医学の分野に関する限り何人も否定し得ないところと思われる。殊に 50% 溶血単位法は従来の不連続な力価に代り、連続的に血清力価を表示し得る点においてこれまで不可能であつた微細な力価の比較も可能ならしめたものである。著者はこの術式を、従来判然としなかつた色々な基礎的な問題の研究に応用せんとし、先づ実験的に結核家兎血清を用いて Stein & Ngu の術式による補体結合反応の実施を試みたのである。

50% 溶血単位法による結核の補体結合反応は Wadsworth 等<sup>51</sup>によつてすでに行われているが、当時は Spectrophotometer を用いなかつたため、すべての点に正確を期することは未だ困難であつたと想像される。その後は文献的にみても、この方法による結核の補体結合反応は見当らないようである。

本報においては、一般の血清反応において見られる Dean & Webb の最適比の関係または prozone 等の問題に関する混乱をできるだけ避ける意味で、抗原及び抗体濃度の色々な組合せの下にすべて反応の場を調べつつこれを行つた。

また抗原としては、従来用いられてきた抗原の中で比較的優秀と思われる Boquet & Nègre<sup>68</sup> のメタノール抽出抗原及び旧ツベルクリン等を主として使用した。勿論現

在の結核の基礎的研究がそうであるように、今後は精製した抗原を用いてこれを行つてゆくつもりである。なお抗原を作るに際して準備した菌株は、青山 B 株、仲野株及び B.C.G. であるが、これら各菌株の同じ量から同様な操作によつて得た抗原は、同一の免疫血清に対してほとんど同じような反応成績を示したので、菌体から得た抗原についての実験は青山 B 株のみについて報告する。

### 1. 実験材料及び実験方法

(i) 反応に使用した器具、溶血系、補体及び稀釈液はすべて前項と同様である。

(ii) 使用菌株は上記の理由から青山 B 株だけで、ソートン培地に約 4 週間培養したものである。

(iii) 旧ツベルクリンは青山 B 株及び B.C.G. から常法によつて作つたものであるが、防腐剤等は一切加えずに無菌的に氷室に保存しておいたものである。

(iv) 免疫血清は、青山 B 死菌を 5 mg ずつ 10 日間連続皮下接種した家兎血清及び B.C.G. をそれぞれ 0.01 mg, 1 mg, 100 mg を先づ皮下接種し、約 1 カ月を経てから再び同量の B.C.G. を皮下接種した 3 群の家兎血清を、何れも 10 倍、及び 100 倍の 2 種の濃度の旧ツベルクリンで Mantoux 反応陽性であることを確かめた後使用した。実験に使用した群は各項目毎に記することにするが、2 種の抗原を比較する場合は常に同一免疫血清を用いたことを附記しておく。なお被験血清の非働化は型の如く 56°C 30 分間行つた。

### (v) 術式の概略

詳細な点に関しては前報<sup>3), 4)</sup>までに報告したので、ここでは概略を述べることにし、主として Stein & Ngu の報告と変つている点について記する。即ち全実験を通じて常に「反応の場の形」を作り、抗原の抗補体作用と被験血清の抗補体作用を同時に調べ得るように工夫した。今第 6 表を例にとると、まず横の列に各稀釈被験血清 (S.D.) を 0.8 cc ずつ順次に加え（ただし最後の 1 K の列には稀釈液のみ 0.8 cc 加える）、次に縦の各行に各稀釈抗原 (A.D.) を同じく 0.8 cc ずつ加える（やはり最後の 1 K の行には稀釈液のみ 0.8 cc を加える）。次いで 1 K の列及び行には 1 K (1 単位即ち 50% 溶血単位) の補体 0.8 cc を注加し、残りの試験管には 2 K (2 単位) の補体 0.8 cc を加え、各試験管内の容量がそれぞれ 2.4 cc となるようにする。これをよく振盪した後、4°C ~ 6°C の氷室に一夜 (15 時間位) 放置し、翌日これを取りだして少くとも室温に 15 分間位おいてから感作血球を 1.6 cc 宛各試験管に追加して全量を 4 cc とし、37°C 30 分間感作後、その遠沈上清の Optical Density を読む。この時用いる blank には必ず感作血球の上清を用いなければならないことは前報でも述

べたが、感作血球が自然溶血を起した場合にはその実験は捨てねばならない。また1Kの補体を加えた各試験管は、それぞれの濃度における抗原及び被検血清の抗補体作用をみるためのものであり、表の右最下欄に相当する試験管は、溶血系を加えて感作した後では理論上50%溶血を起す筈であるから、これが反応後に溶血していなくつたり、または非常に溶血の度が強い場合には、使用した補体単位が不正確なものであつたことを意味し、このような場合の反応成績もとることはできない。なお各種抗原の特異性に関しては毎回無処置の家兔血清を用いてこれを調べたが、後述する如く今回の実験の範囲では、陽性を示した例は1例もなかつた。また抗原の製法に関しては実験成績の項においてその都度、説明することにする。

2. 実験成績

(i) アセトン脱脂菌体のメタノール抽出抗原による反応

Boquet & Nègre<sup>(65)</sup>の原法に従い、菌体を加熱滅菌後蒸留水で洗滌乾燥し、これに100倍量のアセトンを加えて24時間脱脂する。この脱脂菌体に再び100倍量のメタノールを加えて約2週間37°Cで抽出し菌体を濾別したものを抗原とした。この抽出液は低温にすると雲架状のものが析出してくるが、使用に際してはこれをあたためて雲架状のものをよく溶解してから直ちに希釈して実験に供した。なおメタノール単独の抗補体性及び血球溶解性は100倍になると完全に消失することは別な実験によつて確かめた。第6表は青山B死菌接種による家兔免疫血清を使用した場合の例である。

第6表 アセトン脱脂菌体のメタノール抽出抗原による反感

A.D. S.D.	200	400	800	1600	3200	1 K
100	0	0	0	0.10	0.18	0.04
200	0	0	0	0.09	0.24	0.07
400	0	0	0.04	0.14	0.32	0.10
800	0.04	0.11	0.12	0.24	0.36	0.13
1600	0.18	0.19	0.24	0.26	0.39	0.16
3200	0.37	0.37	0.38			0.18
1 K	0.13	0.16	0.16	0.17	0.17	0.17

溶血の程度からも大体反応の場の形は想像することはできるが、これを図にして示したのが第5図(A)である。これは各濃度の抗原によつて50%溶血を示した血清希釈を正確に算出し(算出法は文献<sup>(32)</sup>参照のこと)、これ等の点を結んで画いたものである。なお抗原及び被検血清の抗補体作用の強い部分は表及び図から除外した。

さて第6表及び第5図(A)から分るようにアセトン脱脂菌体のメタノール抽出液は400倍からほとんどその抗補体作用がみられずしかもかなりの優れた抗原性を有し、(この実験の範囲では抗原価1600倍)被検血清の最高力価もこの表では1600倍である。

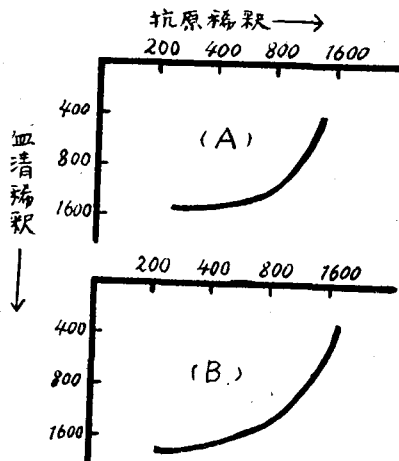
(ii) アセトン脱脂菌体のエタノール抽出抗原による反応

Boquet & Nègre<sup>(65)</sup>はアセトン脱脂菌体から得られる抗原性物質はエチルアルコール可溶性の脂質よりもむしろメチルアルコールの方により易溶性の脂質に属すると云うことを指摘しているの、果してエタノール抽出液とメタノール抽出液との間には差があるかどうか、或いはまた同じようなものだとすればメタノール抽出液の方により多くの抗原性物質が抽出されるものかどうかという点を追求する意味で、メタノール抽出の場合と全く同じ条件でエタノールをもつて抽出してみた。その結果が第7表であり、これを図にして示したのが第5図(B)である。

第7表 アセトン脱脂菌体のエタノール抽出抗原による反感

A.D. S.D.	200	400	800	1600	3200	1 K
100	0	0	0	0.02	0.15	0.05
200	0	0	0	0.05	0.21	0.08
400	0	0.02	0.02	0.11	0.22	0.12
800	0.04	0.03	0.04	0.13	0.31	0.15
1600	0.17	0.13	0.18	0.28	0.34	0.20
3200	0.37	0.36	0.38			0.20
1 K	0.12	0.16	0.18	0.18	0.18	0.20

第5図 アセトン脱脂菌体のメタノール抽出液(A)とエタノール抽出液(B)の比較

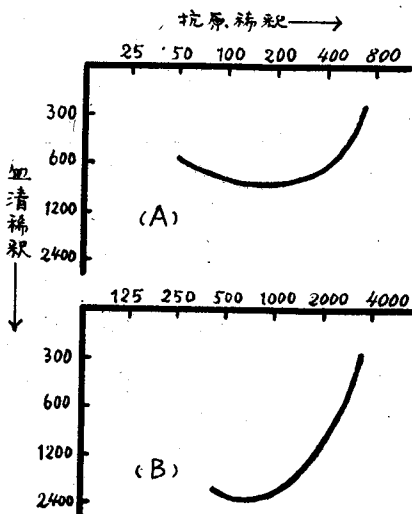


表及び図から明かなように、このエタノール抽出抗原は、抗補体作用の程度も免疫血清との反応結果も全くメタノール抽出抗原に似ており、早急に結論することは勿論出来ないが、大体同じ性質の物質が抗原として働いているのではないと思われる。このエタノール抽出液も低温になるとやはり雲絮状のものが析出してくるが、その量はメタノールの場合に比して多いようである。なおこの場合の被検血清は、前回と全く同じ青山B死菌接種家兎免疫血清である。

(iii) アセトン脱脂菌体の生理的食塩水抽出液  
とメタノール抽出液との比較

次にメタノール抽出抗原は従来から強い反応原性のある物質とされているが、単なる生理的食塩水抽出液とどの位差があるかをみるために、アセトン脱脂菌体の同一量のを2通り用意し、一方には100倍量のメタノールを加えて前と同じ操作で抽出し、一方には徐々に生理的食塩水を加えながら乳鉢でよく磨砕し最後に100倍量としてこれをSeitz濾過器で濾別し、この両者を前と同じく死菌免疫家兎血清を用いて比較してみた。表を省き図だけを掲げた。

第6図 アセトン脱脂菌体の生理的食塩水抽出液(A)とメタノール抽出液(B)の比較



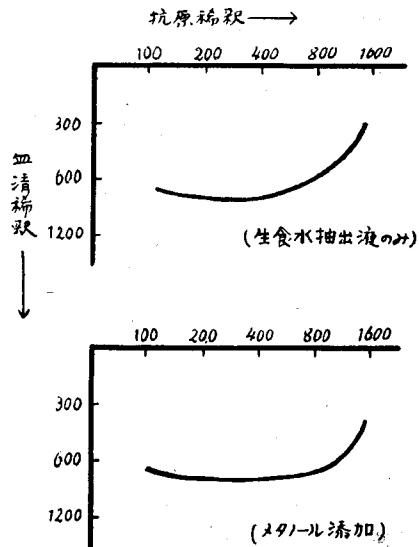
第6図から明らかな様に生食水抽出液は抗原価抗体価共に約800倍であるに対しメタノール抽出液は抗原価4000、抗体価2400を示し、後者の方が反応原として遙かに優秀であつた。しかし生食水抽出液の方は使用した菌量は同一でも、乳鉢で磨砕するのであるから抽出のされ方による相違も考慮に入れる必要はあろう。従つてこの両者は直接に

は比較出来ないが、抗原価に相当の差があることは別としてもメタノール抽出液の方が同一血清に対して遙かに高度の血清稀釈まで反応が陽性にあらわれた点においてよりすぐれた反応原と考えるのが妥当と思われる。

(iv) 生理的食塩水抽出液にメタノールを添加  
した場合の反応

E. Wheeler-Hill<sup>(9)</sup>の実験によると、補体結合反応の場合に抗原に phenol 等を加えるとその抗原としての能力が増すと云われているが、(iii)の実験において見られた差は果してこのような現象と同一の範疇に入るものかどうかを見るために更に次の如き実験を行つた。被検血清は前と同じである。

第7図 生理的食塩水抽出液にメタノールを添加した場合の反応



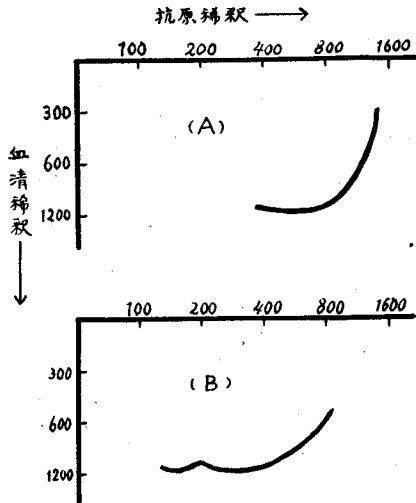
即ちメタノール抽出液の優れた抗原性がメタノール可溶成分に在るのか、あるいは然らずして単にメタノールが加わつたことによる増強作用に過ぎないのかを検討するため生理的食塩水抽出液と、これにメタノールを前と同じような割合に添加したものを比較してみた。その結果は第7図の如く、メタノールの添加だけでは反応成績には何も影響がみられなかつた。従つてこの場合は Wheeler-Hillの実験の場合とは本質的に異つたものと想像される。

(v) アセトン脱脂菌体のメタノール抽出液と  
未処置菌体のメタノール抽出液の比較

アセトンによる脱脂という操作はメタノール抽出抗原を作る上にどの程度の役割を演じているかを見るために、一方、未処置菌体からもメタノール抽出液を作つてこれを比較してみた。用いた免疫血清は前と同じ死菌免疫家兎血

清である。

第8図 アセトン脱脂菌体のメタノール抽出液 (A) と未処置菌体のメタノール抽出液 (B) の比較



結果は第8図の如く反応の場の形において多少異つたものが得られた。これは未処置の菌体から得た抽出液には何か不純なものが入っているような感を抱かせる。事実後述するように、旧ツベルクリンを用いた場合には2つの反応の場が得られたが、この場合の抗原中にはツベルクリン因子の一部も同時に含まれていたのではないかということが推測される。しかし勿論これだけの実験では決定的なことは何もいい得ないであろう。

(vi) 旧ツベルクリンを抗原とした場合の反応

ツベルクリンは古くから補体結合反応のすぐれた抗原として使用されてきてきているが、50%溶血単位を用いたならば如何なる成績が得られるかと考え次のように実験を行つてみた。

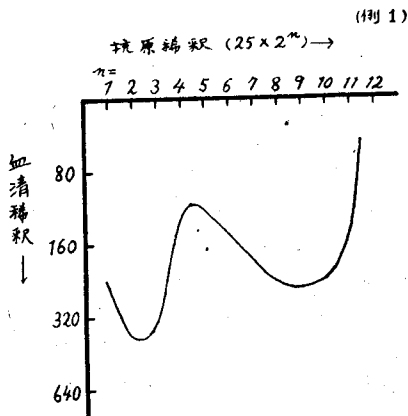
(第1例)：用いた免疫血清は前と同じ死菌免疫家兔血清であるが、前とは異つた家兔の血清であり、用いたツベルクリンは青山B株の培養濾液から作ったものである。その反応結果は第8表及び第9図に示した如く、非常に高度に稀釈されたツベルクリンにも反応が陽性にあらわれ、しかも2つの反応の場がみられた。

第8表 ツベルクリンを抗原とした場合の反応 (例1)

A.D.	n=1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1k
80	0	0	0	0.01	0.02	0	0	0	0	0.07	0.08	0.25	0.17
160	0.03	0.01	0.01	0.30	0.32	0.25	0.15	0.03	0.06	0.08	0.23	0.34	0.21
320	0.34	0.18	0.21	0.40	0.38	0.38	0.42	0.39	0.29	0.34	0.40	0.40	0.23
640	0.47	0.43	0.39	0.43	0.42	0.41	0.42	0.42	0.42	0.43	0.42	0.43	0.27
1 K	0.31	0.30	0.27	0.29	0.28	0.28	0.30	0.28	0.29	0.28	0.29	0.29	0.29

A.D. = 25 × 2<sup>n</sup>

第9図 ツベルクリンを抗原とした場合の反応



この成績は進藤等<sup>70)</sup>が精製ツベルクリンを用いた結核感染家兔血清による反応(8例)中、2例において見ら

れた反応の場と極めて良く類似している。

(第2例)：ツベルクリンを抗原とした場合に、2つの異つた反応の場が見られるのは、ある特定の家兔の場合のみかどうかを知るため、次にB.C.G. 100 mgを2回接種した別な家兔血清を用いて同様に実験を行つてみた。

その結果はやはり前回と同じく2つの異つた反応の場が得られた(第9表及び第10図)。また第8表においては抗原の抗補体作用を見る1Kの列を除外したが、この場合のツベルクリンは50倍では血球の溶解性がなく、また第8表の如く抗補体作用もなかつたからである。

なお著者はその後B.C.G.の培養濾液から作ったツベルクリンについても同様に実験してみたが、何れも上と同じ結果が得られた。すなわち陽性血清は現在までに6例行つたが、今までのところ6例共2つの異つた反応の場を示している。なおかかる「場の形」は完全溶血法によつては見出し得ないものである。

第 9 表 ツベルクリンを抗原とした場合の反応 (例 2)

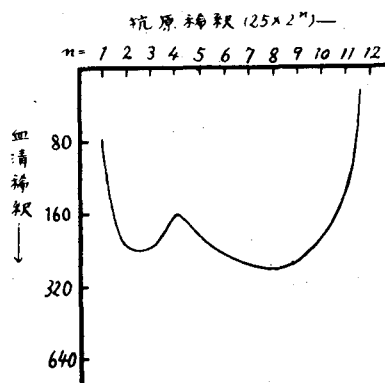
A.D. \ S.D.	n=1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1 K
80	0.15	0.02	0.01	0.01	0.01	0	0	0.01	0.01	0.01	0.06	0.20	0.08
160	0.21	0.04	0.06	0.10	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.11	0.27	0.10
320	0.42	0.30	0.26	0.36	0.38	0.32	0.31	0.13	0.17	0.30	0.36	0.39	0.15

A.D.=25×2<sup>n</sup>

(vii) メタノール処理ツベルクリンの上清分劃を抗原とした場合の反応

脂菌体のメタノール抽出液、すなわちメタノール可溶成分に補体結合反応の抗原性物質が存在することは前の実験でも明らかであるが、ツベルクリン中の抗原性物質の中にもあるいはメタノール可溶成分と不溶成分の2因子があるのではないか、若し存するとすればツベルクリンによつて示された2つの反応の場の形がメタノールで処理操作することに依り変化するのではないかと考えられるので本実験を行つた。すなわちツベルクリンに5倍量のメタノールを加えて良く振盪し、遠沈して上清分劃と沈澱分劃に分け、上清部分はアルコールを除き、両者とも稀釈液をもつて元のツベルクリン量に修正し、これを原液として適当に稀釈後反応を調べた。上清分劃による成績は第10表及び第11図にこれを示した。すなわち上清分劃はその高濃

第10図 ツベルクリンを抗原とした場合の反応



度の部分に於いて僅かに反応が陽性にあらわれただけで、高次稀釈の部分ではすべて反応は陰性であつた。

第10表 メタノール処理ツベルクリンの上清分劃を抗原とした場合の反応

A.D. \ S.D.	n=1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1 K
80	0.02	0.06	0.20	0.33	0.35	0.35	0.40	0.41	0.43	0.42	0.43	0.43	0.17
160	0.03	0.27	0.37	0.37	0.40	0.39	0.42	0.42	0.39	0.43	0.42	0.43	0.20
320	0.14	0.34	0.39	0.40	0.41								0.24
640	0.33	0.40	0.42	0.41	0.41								0.29
1 K	0.27	0.27	0.28	0.29	0.28	0.28	0.29	0.30	0.29	0.29	0.29	0.30	0.29

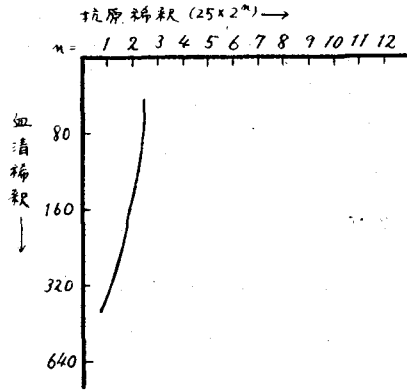
A.D.=25×2<sup>n</sup>

第11表 メタノール処理ツベルクリンの沈澱分劃を抗原とした場合の反応

A.D. \ S.D.	n=1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1 K
80	0.01	0.02	0.08	0.08	0.18	0.12	0.01	0.01	0.01	0.11	0.18	0.29	0.20
160	0.11	0.23	0.21	0.38	0.38	0.38	0.22	0.23	0.22	0.30	0.34	0.38	0.24
320	0.41	0.38	0.39	0.44	0.43	0.42	0.42	0.42	0.34	0.38	0.42	0.45	0.26
640	0.43	0.45	0.44	0.45	0.44	0.43	0.42	0.43	0.44	0.45	0.45	0.45	0.28
1 K	0.30	0.31	0.29	0.29	0.29	0.28	0.29	0.29	0.30	0.29	0.30	0.29	0.29

A.D.=25×2<sup>n</sup>

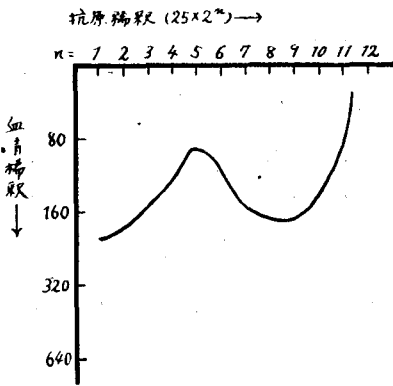
第11図 ツベルクリンのメタノール処理上清分劃を抗原とした場合の反応



(viii) メタノール処理ツベルクリンの沈澱分劃を抗原とした場合の反応

メタノール沈澱分劃を抗原とした場合は、第11表及び第12図の如く、ツベルクリンをそのまま用いた場合とほぼ同様に2つの異つた反応の場を呈した。なお実験(vii)及び(viii)に於いて用いた免疫血清は、死菌接種の同一家兎血清である。

第12図 メタノール処理ツベルクリンの沈澱分劃を抗原とした場合の反応



(xi) メタノール抽出抗原と、それに KOH を加え加熱した抗原との比較

メタノール抽出抗原が Boquet & Nègre の云う如くいわゆる脂質が主となつている抗原とすれば、あるいは鹼化等によつてその抗原性が消失するのではないかも考えられたので、先に青山Bアセトン脱脂菌体から作つたメタノール抽出抗原と、これに1%の KOH を同量加えて80°C 30分間加熱したものの2種について、死菌免疫による同一家兎血清を用い比較を行つた。なお加えた KOH は第12表のように稀釈した場合、それ単独では溶血反応に何

等影響がないことをあらかじめ確かめておいた。結果は第12表に示す如く、KOH 処理の抗原は完全にその抗原性を消失していることが分つた。但し KOH 処理という操作が鹼化と云うことを意味するかどうかは、化学的に調べていないので速断は出来ない。

第12表 青山Bメタノール抽出抗原(A)とそれに KOH を加え加熱した抗原(B)との比較

		(A)		
A.D.	S.D.	500	1000	1 K
100		0.02	0.08	0.11
200		0.05	0.09	0.16
400		0.13	0.14	0.18
800		0.17	0.21	0.18

		(B)		
A.D.	S.D.	500	1000	1 K
100		0.30	0.29	0.11
200		0.40	0.38	0.15
400		0.41	0.42	0.17
800		0.44	0.44	0.18

(x) ツベルクリンを KOH で加熱処理した場合の反応

次にツベルクリン自体を前と同様な KOH による加熱処理を行つたならば反応成績に差があらわれるかどうかを知らせてみた所、前回とは逆に殆んどその抗原能力に変化を来たさなかつた。(図表は省略する)

この(ix)及び(x)の実験結果からみると、アセトン脱脂菌体のメタノール抽出抗原とツベルクリンとは、大体において異つた性質を持つた抗原と考えられる。

(xi) 各種抗原の特異性について

以上用いて来た各種の抗原が、他の疾患における抗体と如何なる反応を示すかと云うことに関しては、今回は実験を行わなかつたが、各抗原については常に正常家兎の血清を用いて同時に実験を行つた。その結果は常に陰性で、疑陽性と思われるものも1例もなかつた。

### 3. 考按並びに小括

結核の補体結合反応の抗原に関しては、古くから数多く報告されて来ていることは前述したところであるが、この中で学問的にも興味が多く、また実際的にも現段階ではすぐれた抗原とされているものは、旧ツベルクリン及び Boquet & Nègre<sup>(68)</sup> によるメタノール抽出液であろう。Boquet 等の報告によると、アセトン不溶性で、メチルアルコールに可溶性菌体脂質は、試験管内で抗原として結核

血清と反応し、またこのものは生体にも与えても抗体を産生すると報告している。しかも彼等によればこのメタノール抽出液を予め動物に与えるか、若しくは感染後に定期的に投与して行くと、結核の感染に対して防禦力を示すと云う。かかる意味からすると、メタノール抽出抗原によつて抗体を見出すと云うことは何か意味があることのように思われる。従つてこのような事実の一部を追求する目的も兼ねて、著者は先づ3種の Strain すなわち青山B株、仲野株及び B.C.G. を準備して夫々のメタノール抽出抗原を作つたのであるが、実験の最初にも述べた如く、同一条件下で得たこの三者の間には、同一免疫血清に対する反応上に差を見出し得なかつた。この菌株間の関係については、Cooke<sup>71)</sup> 等のように血清反応上菌株を分類することが可能であるとする学者もあるが、Bordet & Gengou<sup>72)</sup>、Harris and Lanford<sup>73)</sup> のように、一般には血清学的な結核菌の分類は困難であるとされている。最近柿下等<sup>74)</sup> も免疫血清に対する交叉血球凝集反応及び吸収試験により、人型、牛型及び B.C.G. は共通の抗原性を有することを認めている。本実験においても、実験の性質上正確に各菌株についての交叉反応を行つたわけではないが、少なくとも今回の実験に関する限り菌株間に抗原的な差違を認め得なかつたので、一応青山B株1株に限つて実験を進めたわけである。

菌体から脂質を分離して、それについての試験管内及び生体内における抗原性を検討した実験は、Boquet 等以前にも Thiele and Embleton<sup>75)</sup> の報告に接し得るが、この抗原抽出方法は化学的にも不正確で結果はあまり信頼出来ないことを Wadsworth 等<sup>76)</sup> は指摘している。Boquet & Nègre の報告 (1923 年) に次いで 1925 年には Wadsworth 等<sup>76)</sup> が菌体脂質の試験管内抗原性について詳細にその研究を報告している。これによると菌を脂肪溶剤に入れた場合 Lipoid 様物質が抽出されるが、これは中性脂肪と脂肪酸のエステルから成り (蛋白もいくらか含まれるという)、この中アセトン不溶性でアルコール可溶性の分割に高度の試験管内抗原性を有する物質が含まれ、かつこれは耐熱性のものであると云う。またメチルアルコール可溶性脂質とエチルアルコール可溶性脂質については、本実験の結果と同様に、両者とも高度の抗原性を示したと云うことも同時に報告している。Boquet 等はこの抗原性を有する脂質の本態は多分 phosphatide であろうと述べているが、その後 Pilmer<sup>77)</sup>、Doan<sup>78)</sup> も追試の結果この考えを肯定している。すなわち Pilmer によるとメタノール抽出液を更に窒素量を少なくなるように精製しても抗原性は反つて増加し、Anderson 等の精製した磷脂質分割は完全抗原としての性質を有すると云う。つまり正常家兔に補体結合性

抗体を産生し、試験管内でも抗原となり得ると云うのである。然しこれに対して Mayer and Terroine<sup>79)</sup> は Boquet 等の抗原はなお不純で蛋白質を含んでいる可能性があり、従つて実際抗原となり得るものは、磷脂質と蛋白質の結合物であると述べている。われわれも目下共同実験の一部として精製磷脂質分割の試験管内抗原性を追求中であるが、精製が進むにつれて一般に抗原能力が消失してゆくような傾向がみられるようである。

また生理的食塩水抽出液、蒸留水抽出液等にも抗原性が認められることは、過去にも多数の報告があり、また本実験の (iii), (iv) 及び前報<sup>32)</sup> からも明かであるが、メタノール抽出液に比して一般に弱いようである。

なおアセトン可溶性の脂質については、その実験結果を省略したが、先人の結果と同様、全く抗原性は認められなかつた。

次にツベルクリンについてであるが、Wadsworth はその報告<sup>76)</sup> の中で一定の抗結核血清に対する抗原の能力をその稀釈度であらわして、ツベルクリンは 1:1000~1:2000、脂肪溶剤抽出液は 1:500、蒸留水抽出液は 1:50~200、グリセリン抽出液は 1:30~50 という様に記載している。本実験結果から見ても確かにツベルクリンは抗補体作用も少なく、すぐれた抗原であることは明らかであるが、更に注目すべき点は常に2つの反応の場を示したことである。これは恐らく2つの抗原抗体系による反応であろうと想像される。Seibert<sup>80)</sup> は旧ツベルクリンには2種の多糖体分割と、3種の蛋白分割が存在すると報告しているが、Haurowitz and Schwerin<sup>81)</sup> の理論的な抗原抗体系の実験事実と考え合わせて見ると学問的に興味のあることと思う。進藤等<sup>70)</sup> も実験的家兔の結核症に於いて、精製ツベルクリンを抗原として用い、8例中2例にこのような現象が起つたことを報告しているが、本実験に於いては前述の如く、6例中6例共2つの異つた反応の場を示した。これは著者が用いたツベルクリンにも原因するかも知れないが、前記の如く青山Bの培養濾液及び B.C.G. の培養濾液から作つたツベルクリンは両者とも同じような態度を示しており、むしろ50%溶血法の鋭敏性に原因を求むべきものではなからうか。

また一方、同一抗原で動物を免疫しても、動物の種属が異なると免疫反応上に異つた点があられることもある<sup>82)</sup> ので、家兔以外の動物においてもかかる現象が起るかどうかが検討してゆくつもりである。

以上記載して来た如く、旧ツベルクリンもまた菌体のメタノール抽出液も優れた試験管内反応原性を有しているが、然らば旧ツベルクリン中の抗原性物質と、メタノール抽出液中のそれとは同様な性質のものであるか、あるいは

異なるものであると云う疑問が起つて来る。この点について血清反応の上から検討しようと考え、先づ旧ツベルクリンが示した2つの反応の場の中、何れか一方があるいはメタノール可溶性の分割と関係があるのではないかと想定してツベルクリンにメタノールを加えて良く振盪し、メタノール可溶成分と不溶成分に分けて実験を行つてみたのである(実験 vii 及び viii)。結果は不溶成分の方はツベルクリンそのものを抗原とした場合と同様な成績を示し、可溶成分の方は高濃度の部分に於いて僅かに陽性反応を呈したに過ぎなかつた。

また一方実験(x)の如く、メタノール抽出液の KOH 加熱処理による抗原性の変化を調べた所、メタノール抽出液はこのような操作によりその抗原性を完全に消失することが分つた。然しながらツベルクリンの場合にはこのような操作をしても殆んどその抗原性に变化を来たさなかつたのである。かかる点から見るとやはり両者は異つた性状の物質が反応原として働いているものと考えられる。

なお KOH による加熱処理は一応鹼化と云うことが考えられるわけであるが、Wadsworth 等<sup>76)</sup>も菌体から NaOH で抗原を抽出する場合は、その濃度が 1/50 N ならば抗原性物質が抽出されるが、1/10 N あるいは 1/20 N のものを用いて抽出した場合には殆んど抗原性は認められず、これは恐らく鹼化のためであろうと述べており、著者の行つたこの操作もそれと軌を一にするものではなからうかと考えられる。

この他、一般の血清反応に於けると同様に、使用する抗原を出来るだけ純化しなければ云々出来ない問題が多々あり、今回報告した抗原もすべて従来報告されて来たものをそのまま用いたものであるから、当然純化した抗原による反応が要求されて来る。メタノール抽出液については前述の如く共同実験の一部として実験中であり、またツベルクリンについてもこれを精製分析して反応を行い、2つの抗原抗体系によると思われる反応の解析を続けてゆきたいと考えている。

なお、免疫及びアレルギーの問題に関しても Choucron<sup>83), 84)</sup>, Raffel<sup>85), 86)</sup>, 武田<sup>81)~83)</sup>等、これを菌体成分の側から解かんとする研究が最近の趨勢となりつつあるがこれに対して大きな役割を演ずるものは補体結合反応である。勿論各菌体成分についての血清反応は必ずしも補体結合反応ばかりでなく、その目的によつて、採用する血清反応の種類が異なるべきであるが、鋭敏さに於いてはやはり補体結合反応を第1に挙げねばならないであろう。この反応を従来より更に正確度を増して行つたのが 50% 溶血単位による方法である。著者は以上の如く、現在報告されているこの方法の中で最も使用し易いと思われる Stein

and Ngu の方法を採り上げ、その術式の一部を改良して結核の場合に応用し、2, 3の抗原についてここに報告した。抗原に関しては未だ研究の途上であるが、使用した抗原の中、Boquet & Nègre のメタノール抽出抗原の成分は確かに1種の脂質と考えられるものであり、現在色々と問題になつている Choucron<sup>83)</sup> の PMKo, Bloch<sup>81), 85)</sup> 等の云う Cord factor, あるいはまた Anderson<sup>80)</sup> 等によつて分離された各種の蠟及び脂質等との関連性も考えられ、また一方ツベルクリンアレルギーに関して、武田<sup>82)</sup>は、ツベルクリン蛋白を主成分とした武田・須賀<sup>87)</sup>の抗原による補体結合反応の結果は、ツベルクリン反応の結果と似た関係にあると述べており、従来に倍した正確度を持つこの術式を用いてこれらの点を追求してゆくならば、あるいはまた何か新しい知見を期待しても良いかも知れないと考えている。

### III 結 語

I. 前報に引続いて 50% 溶血単位法による補体結合反応の術式につき検討し、従来主観的に測定されていた溶血素の至適濃度を客観的に算出する1つの方法を知り得た。

すなわち著者は仮にこれを"最小和法、"と名付けたが、各種濃度の溶血素による感作血球の 50% 溶血に必要な補体量を夫々求め、その時用いられた溶血素及び補体の原液量の和が最小となつた所の溶血素濃度が、50% 溶血単位法の術式に於いて使用さるべき溶血素の至適濃度であることを証明した。

II. アセトン脱脂結核菌体のメタノール抽出液及び旧ツベルクリン等を抗原として、50% 溶血単位法により結核免疫家兎血清について補体結合反応を行い、次のような結果を得た。

(i) メタノール抽出液及びエタノール抽出液は、同一免疫血清に対しほぼ同程度の反応を起した。

(ii) Boquet & Nègre による結核菌体のメタノール抽出液は補体結合反応の抗原として食塩水抽出液より遙かに優れている。但しこれは単なるメタノールの添加による増強作用ではなく明らかにメタノール可溶性成分に帰せらるべきものであると考える。

(iii) 旧ツベルクリンを抗原とした場合には、2つの反応の場がみられた。

(iv) 旧ツベルクリンのメタノール不溶性分割は、ツベルクリンそのものを抗原とした場合と殆んど同じような反応を呈した。

(v) メタノール抽出液は、これと同量の 1% KOH を加えて加熱処理することによりその抗原性を失う。

(vi) 然るに旧ツベルクリンは同様な KOH 処理を行つても、その抗原性には殆んど影響が見られなかつた。

(終りに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を戴いた大原教授に深謝致します)

#### 引用文献

- 1) Leschly, W. : Aarhus, Trykt I Stiftsboktrykkeriet. 1914.
- 2) Morse, S. : Psychiatric Bull. Utica 1, 47, 1916.
- 3) Morse, S. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 19, 17, 1921.
- 4) Brooks S.C. : J. Med. Research 41, 399, 1919~20.
- 5) Wadsworth, A., Maltaner, E. & Maltaner, F. : J. Immunol. 21, 313, 1931.
- 6) Wadsworth, A., Maltaner, E. & Maltaner, F. : J. Immunol. 26, 25, 1934.
- 7) Wadsworth, A., Maltaner, E. & Maltaner F. : J. Immunol. 28, 183, 1935.
- 8) Wadsworth, A., Maltaner, E. & Maltaner, F. : J. Immunol. 29, 135, 1935.
- 9) Wadsworth, A., Maltaner, F. & Maltaner E. : J. Immunol. 35, 93, 1938.
- 10) Wadsworth, A., Maltaner, F. & Maltaner E. : J. Immunol. 35, 105, 1938.
- 11) Wadsworth, A., Maltaner, F. & Maltaner, E. : J. Immunol. 35, 217, 1938.
- 12) Wadsworth, A.B. : Standard Methods of the Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health. Baltimore. The Williams & Wilkins Company P. 213 ~ 262 1939.
- 13) Thompson, R. and Maltaner, F. : J. Immunol. 38, 147, 1940.
- 14) Mayer, A.M., Eaton, B.B. and Heidelberger, M. : J. Immunol. 53, 31, 1946.
- 15) Kent, J.F. Bukantz, S.C., and Rein, C.R. : J. Immunol. 53, 37, 1946.
- 16) vonkrogh., : J. Infect. Dis. 19, 452, 1916.
- 20) 池端隆, 荻田友雄, 谷野政次 : 日本細菌学雑誌, 9, (6), 470, 1954.
- 18) 藺守竜雄 : 日本細菌学雑誌, 10, (8), 677, 1955.
- 19) 吉田赴夫 : 医学と生物学, 27, (6), 232, 昭和28年.
- 20) Friedmann, U. : Zeitschr. f. Hgg. 67, 278, 1910.
- 21) Sachs, H. : Berl. Klin. Wschr. 58, 1075, 1921.
- 22) 上野正吉, 張樹槐 : 血清学免疫学雑誌, 2, 585, 昭和16年.
- 23) 吉田赴夫 : 医学と生物学, 26, (2), 81, 昭和28年.
- 24) Mayer, M.M. Osler, A.G. Bier, O.G. and Heidelberger, M. : J. Immunol. 59, 195, 1948.
- 25) Osler, A.G. Mayer, M.M. and Heidelberger, M. : J. Immunol. 60, 205, 1948.
- 26) Osler, A.G. and Heidelberger, M. : J. Immunol. 60, 317, 1948.
- 27) Osler, A.G. and Heidelberger, M. : J. Immunol. 60, 327, 1948.
- 22) Stein, G.J. and Ngu, D. V. : J. Immunol. 65, 17, 1950.
- 29) 中村敬三, 石坂公成 : 日本医事新報, No. 1616, 1767頁, 昭和30年4月.
- 30) 中村敬三他4名 : 性病, 40, (4), 121, 昭和30年.
- 31) 大原達, 池端隆他 : 結核 29, (増刊号), 169, 1954. (抄録).
- 32) 大原達, 池端隆他 : 日本細菌学雑誌, 10, (1), 41, 1955.
- 33) Dungern : Münch. Med. Wschr. Nr. 15, 387, 1902.
- 34) Morgenroth, J u. Sachs, H : Berl. Klin. Wschr. Nr. 35, 817, 1902.
- 35) Thiele F.H. and Embleton, D. : J. Path and Bact. 19, 372, 1914 ~ 15.
- 36) Seelich, F. : Zellen Biochem. Z. 278, 9, 1936.
- 37) Heidelberger, M. : J. Exp. Med. 73, 681, 695, 1941.
- 38) Sormani, B.P. : Zschr. f. Immunitätsf. 24, 336, 1916.
- 39) Pandit, C.G. : J. Hyg. 21, 406, 1923.
- 40) 池端隆 : 日本細菌学雑誌, 10, 121, 1955,
- 41) Maslakowetz, P.P. u. Liebermann, J.J. : Zschr. f. Immunitätsf. Bd. 2, 554, 1909.
- 42) Kent, J.F., Bukantz, S.C., and Rein, C.R. : J. Immunol. 53, 40, 1946.
- 43) Haurowitz, F. : Chemistry and Biology of Proteins, New York, 129 pages, 1950.
- 44) Lourau, M. : Compt. Rend. Soc. Biol. 127, 133, 1938.
- 45) 大川富雄 : 岡山医学会雑誌, 第53巻, 2018, 昭和16年.
- 46) Kent, J. F. : Science. 105, 316, 1947.
- 47) Gay, F.P. : Ann. L'Inst. Past. 19, 593, 1905.
- 48) 吉田赴夫 : 医学と生物学, 30, 76, 昭和29年.
- 49) 北岡正見, 高野宏一 : 日本細菌学雑誌, 8, 53, 1953.
- 50) Kent, J.F. : J. Lab. and Clin. Med. 31, 1270, 1946.
- 51) Neisser, M. u. Wechshberg, F. : Münch. Med. Wschr. 48, 697, 1901.
- 52) Hyde, R. R. : Am. J. Hyg. 8, 730, 1928.
- 53) 吉田義雄 : 北海道医学雑誌, 第7年, 6号, 810頁, 昭和4年,
- 54) 三井孝夫, 黒沢俊祐 : 北海道医学雑誌. 9, 532 及び 973, 昭和6年.
- 55) 城義彰 : 岡山医学会雑誌, 第44年, 2970, 3112, 昭

和7年.

- 56) 須磨治海：岡山医学会雑誌，第48年，7号，1542頁，昭和11年。
- 57) 羽里彦左衛門，風間新助，飯田毅：日本細菌学雑誌 **8**，661，1953。
- 58) 由利悦夫：日本微生物学会雑誌，**22**，1415，昭和3年。
- 59) 常泉与惣治：アレルギー，**3**，46，1954。
- 60) Reploh, H. and Botticher, H.: *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, **89**, 107, 1936.
- 61) 武田徳晴，太田達男，齋湧泉：医学と生物学，**4**，88，昭和18年。
- 62) 武田徳晴：日本細菌学雑誌，**7**，160，1952。
- 63) 武田徳晴他5名：日本細菌学雑誌，**10**，621，1655。
- 64) Bloch, H.: *J. Exp. Med.* **91**, 197, 1950.
- 65) Noll, H. and Bloch, H.: *Am. Rev. Tbc.* **67**, 328, 1953.
- 66) Anderson, R.J.: *J. Biol. Chem.* **97**, 639, 1932.
- 67) Takeda, Y and Sugai, T.: *Jap. J. Exp. Med.* **14**, 371, 375, 1936.
- 68) Boquet, A. et Negre, L.: *Ann. l'inst. Past.* **37**, 787, 1923.
- 69) Wheeler-Hill, E.: *Zschr. Immunitätsf.* **92**, 270, 1938.
- 70) 進藤宙二，若倉和美，小峰績：アレルギー，**1**，36，1952。
- 71) Cooke: *J. infect. Dis.* **25**, 452, 1919.
- 72) Bordet and Gengou: *C.R. L'Acad. Sciences*, **137**, 351, 1903.
- 73) Harris W.H. and Lanford, J.A.: *J. Infect. Dis.* **13**, 301, 1913,
- 74) 柿下正道他8名：日本細菌学雑誌，**10**，624，1955。
- 75) Thiele, F.H. and Embleton, D.: *J. Path. and Bact.* **19**, 349, 1914~15.
- 76) Wadsworth, A., Maltaner, F. and Maltaner, E.: *J. Immunol.* **10**, 241, 1925.
- 77) Pilmer, M.: *Am. Rev. Tbc.* **17**, 86, 1928,
- 78) Doan: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **26**, 627, 1929.
- 79) Mayer R.L.: *J. Bact.* **48**, 337, 1944.
- 80) Seibert, F.B.: *Am. Rev. Tbc.* **59**, 86, 1949.
- 81) Haurowitz, F. and Schwerin, P.: *J. Immunol.* **47**, 111, 1943.
- 82) Horsfall, F.L.Jr.: *J. Bact.* **35**, 207, 1938.
- 83) Choucron, N.: *C.R. Acad. Sci.* **224**, 104, 1946.
- 84) Choucron, N.: *Am. Rev. Tbc.* **56**, 203, 1947.
- 85) Raffel M.D. and Forney, J.E.: *J. Exp. Med.* **88**, 485, 1948.
- 86) Raffel, M.D. Arnaud, L.E. Dukes C.D. and Huang J.S.: *J. Exp. Med.* **90**, 53, 1949.