



Title	結核菌磷脂質による赤血球凝集反応の研究：反応の諸条件の検討
Author(s)	小野, 勝男; ONO, Katsuo
Description	
Citation	結核の研究, 10, 1-8
Issue Date	1959-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26663">https://hdl.handle.net/2115/26663</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_P1-8.pdf



# 原 著

## 結核菌磷脂質による赤血球凝集反応の研究

### 反応の諸条件の検討

小 野 勝 男

(北海道大学結核研究所予防部 主任 高橋義夫教授)

(昭和 34 年 1 月 20 日受付)

高橋及び著者は、前回の実験において<sup>1)</sup>、Anderson<sup>2)</sup>及び Boquet-Nègre<sup>3)</sup>の方法によつて得られる結核菌の磷脂質が、ツベルクリン多糖体と同様、赤血球凝集反応の良好な感作原になり得る事、及び磷脂質による赤血球凝集反応の抗原抗体系はツベルクリン多糖体による赤血球凝集反応の夫とは全く別個で独立している事をつきとめた。それで今回著者は磷脂質による赤血球凝集反応の術式を確立する目的で、抗原の調製法、血球感作法其他について種々検討を加え、且つ同種抗原による溶血反応及び補体結合反応との比較を試みた。本報はその実験成績である。

### 実験材料及び実験方法

#### 抗 原

抗原は高橋教授が抽出したもので、其方法は次の通りである。BCG ソートン 8 週培養アセトン致死菌体 25g, H37Rv ソートン 8 週培養加熱致死菌体 12g, 仲野株ソートン 8 週培養加熱致死菌体 3g, 以上の菌体を混合し、450 ml のアセトンで 40°C 2 回 (各 3 時間) 抽出し、その残渣に H37Rv プイオン 31 日培養アセトン致死菌体のエーテル・アルコール抽出残渣 17g を加え、これをメタノール 600 ml で 2 回煮沸しながら抽出し、メタノール抽出液を窒素を通じながら 200 ml に濃縮、2 倍のアセトンを加えて沈澱を生ぜしめて遠心分離、沈澱物を再びメタノールに加温溶解し、不溶物を除去、再びアセトンを加えて沈澱を生ぜしめ、沈澱物を乾燥して得た磷脂質である。以下これを Pd. mix とする。(P: 2.2%)

Pd. mix をメタノールに 2.0 mg/ml の割合に溶解し、これを保存原液として 4°C の冷蔵庫中に保存したが、保存中に白色の沈澱を生ずるので、使用時には約 50°C に加温して沈澱を完全に溶解して用いた。

**抗原液の作製法:** 結核菌体磷脂質は、ツベルクリン又は菌体蛋白及び多糖体と異り、水に溶解せず、従つてメタノール溶液から水に懸濁液をつくつて抗原として用いるわけであるが、懸濁液の作り方によつて液中の磷脂質粒子の大きさに差を生じ、ひいては試験管内抗原性に差を生ずる事が考えられる。そこで著者は次にのべる 2 方法を比較してみた。

(1) 滴下法: 予め所定量の食塩水を結晶皿にとり、これをマグネチック・スターラーで攪拌しながら、これに所定量の Pd. mix メタノール溶液を滴下し、得られた抗原懸濁液を重盪煎上で加温しつつ扇風機で送風してメタノールを蒸発させ、蒸発した水分を蒸溜水で補う。滴下条件を一定にするために Pd. mix メタノール溶液は注射針で滴下した。他の方法を用いた場合はその都度記載する。

(2) 混合法: 希釈液の食塩水と Pd. mix メタノール溶液を 2 本の試験管に別々に入れておき、希釈液を Pd. mix メタノール溶液に手早く加え、これを希釈液の方の試験管にうつすと云う操作を数回くり返し、37°C の孵卵器内に 30 分放置した後使用した。但し抗原濃度が 0.5 mg/ml 以上 (メタノールの量が 20% 以上) では溶血が起るので、滴下法の場合と同様にメタノールを蒸発させて使用した。

**免疫血清:** 家兔免疫血清を用いた。免疫方法は、家兔 No. 21 は BCG 生菌を 4 回に分け合計皮下に 17 mg, 腹腔内に 10 mg, 静脈内に 7 mg 注射した。家兔 No. 27 と No. 28 は BCG 生菌を腹腔内に 10 mg づつ 3 回注射して免疫した。得られた血清は採取後ザイツ濾過、56°C 30 分非働化し、アンプルに分注して 4°C の冷蔵庫内に保存したが、赤血球凝集反応に際しては、血清 0.2 ml に、感作血球に使用するのと同じ血球の 10% 浮遊

液 1.0 ml を加え、室温 10 分間放置、これを 2 回繰返して異種血球凝集素を除去して使用した。

**血球:** 脱線維した綿羊血液に等量の修正 Alsever 溶液<sup>4)</sup>を加え 4°C に保存し、使用時には Alsever 保存血液を希釈液で 2 回洗滌して使用に供した。Alsever 保存血液は採血後 3 週間以内に使用した。

**希釈液:** 特に指定した場合以外は、磷酸緩衝生食水 pH 7.2(M/15) を使用した。

#### 血清反応術式

1) **赤血球凝集反応:** 抗原濃度、血球量、感作時間等を色々変えて行つたが、それはその都度記載し、特に記載していない場合には、すべて下記の方法を用いた。即ち、血球感作条件は Pd. mix 1.0 mg/希釈液 2.0 ml/血球 0.05 ml とし、37°C の孵卵器内で 2 時間感作 (30 分毎に振盪)、希釈液で 2 回洗滌後、1.25% 感作血球浮遊液を作つた。又ヴイダール試験管に被検血清を 0.5 ml づつ 20 倍より倍数希釈して、これに前記の感作血球浮遊液 0.1 ml づつを加え、37°C の孵卵器内で 2 時間加温 (30 分毎に振盪)、14~18 時間室温に放置した後、管底に沈澱した血球の状態によつて判定した。尚 (1) 感作血球+希釈液、(2) 非感作血球+被検血清の最高濃度を対照とした。

2) **溶血反応:** 前記の方法で赤血球凝集反応を行い (但し希釈液は生食水を用い、又血清は 0.25 ml づつ倍数希釈した)、判定後、緒方法で測定した補体 3, 4, 5, 6, 8, 10 単位/0.1 ml を加えて恒温槽で 37°C 30 分加温後直ちに判定した。判定基準は

- 0: 完全不溶血
- 1: 一部分溶血
- 2: 大部分溶血
- 3: 完全溶血

として、完全溶血と大部分溶血を陽性とした。

3) **補体結合反応:** 緒方法<sup>5)</sup>を用い、抗原、血清両方を希釈して施行した。

4) **沈降反応:** 重層法により、抗原血清両方を希釈して施行した。血清の希釈には 2%アラビアゴム食塩水を用いた。

### 実験成績

1) **滴下法:** 実験方法の部に記載した方法で次の 5 通りの抗原液を作つて赤血球凝集価を比較した。感作抗原濃度はすべて 0.5 mg/ml である。尚希釈液は生理的食塩水を用いた。

(1) 希釈液をマグネチック・スターラーで攪拌しながら、1/5 注射針で Pd. mix メタノール溶液を滴下し

たもの。滴数 1 ml あたり 300 滴。

(2) 希釈液をマグネチック・スターラーで攪拌しながら、1 cc ピペットで Pd. mix メタノール溶液を滴下したもの。滴数 1 ml あたり 45 滴。

(3) 希釈液を入れたビーカーを手で振盪しながら、1 cc ピペットで Pd. mix メタノール溶液を滴下したものの。

(4) 希釈液の上に Pd. mix メタノール溶液を重層させ、次でマグネチック・スターラーで攪拌したもの。

(5) Pd. mix メタノール溶液を先づビーカーに入れ、マグネチック・スターラーで攪拌しながら、希釈液を 1/5 注射針で滴下したもの。

成績は表 1 に示す様に、(1) (2) (3) の方法では同じ凝集価を示したが、(4) では不安定で、血清によつては陰性となり、陽性の場合でも低希釈の血清の試験管で凝集の起らない事があつた。(5) では凝集は全く起らなかつた。

表 1 各種抗原液の凝集価

血清 抗原	No. 21	No. 27	No. 28
(1)	640	640	320
(2)	640	640	320
(3)	640	640	320
(4)	640	640	—
(5)	—	—	—

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

Pd. mix メタノール溶液を希釈液に滴下する場合と、逆に希釈液を Pd. mix メタノール溶液に滴下する場合では、抗原液の性状に著明な差異が見られた。前者では Pd. mix メタノール溶液を滴下するにつれて徐々に白濁度を増すが、白濁は軽度で、やや螢光をおび、放置してもこの抗原濃度では沈澱を生じない。これに反して後者では希釈液を数滴滴下すると強い白濁を生じ、以後白濁は増強しないが、前者に比して白濁強く、放置するか、又は 2000 回転 5 分程度の遠心により沈澱を生ずる。

次に滴下時の温度の影響について検討した。希釈液の温度を 2°C、室温 (約 25°C)、40°C とし、これをマグネチック・スターラーで攪拌しながら Pd. mix メタノール溶液を 1/5 注射針で滴下して抗原液を作つたが、何れも凝集価は同じであつて、この程度の温度の変化では凝集価に影響を与えない事がわかつた。

次に、メタノールを加温蒸発させる事の可否について検討した。前と同様にして作つた抗原液を 2 分して、一

方は前述通り沸騰した重蒸煎上でメタノールを蒸発させ、他方を真空ポンプで吸引してメタノールを蒸発させた。成績は表2に示す様に、加温蒸発させた方が高い凝集価を示した。

表2 メタノール除去法の抗原域に及ぼす影響

血清	No. 21	No. 27	No. 28
抗原			
加温蒸発	640	640	320
真空蒸発	320	320	—

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

2) 混合法: この方法でも凝集反応抗原液を作る事が出来た。0.5 mg/ml の濃度ではメタノールの濃度が20%となつて溶血を起すので、加温してメタノールを蒸発させる事が必要であつたが、この場合には滴下法で作つた同濃度の抗原液より凝集価が低かつた。0.4 mg/ml 以下の濃度ではメタノールを蒸発させる必要がなく、むしろその方がメタノールを蒸発させた抗原液より凝集価が高かつた。又希釈液と Pd. mix メタノール溶液の混合は手早く行ふ事が重要であつて、徐々に加えた場合には、至適濃度でも凝集価が低いか、凝集しない事が多かつた。

#### 抗原濃度と血球量

滴下法と混合法によつて 2.0 mg/ml から 0.1 mg/ml までの種々の濃度の抗原液を作り、各濃度の抗原液に血球を 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 量に加えて凝集価を比較した。混合法では、0.5 mg/ml 以上の濃度の抗原液は加温してメタノールを蒸発させたものである。何れの方法でも 2.0 mg/ml の抗原液は放置すると可成りの沈澱を生じ、1.0 mg/ml の抗原液は僅かながら沈澱を生じた。凝集反応の成績は表3, 4に示した。表を見ると、この血清に対する最高凝集価は320倍で、血球量を減じてでもこれ以上凝集価は高くない事がわかる。

表3 抗原濃度と血球量 1) 滴下法 血清 No. 28

抗原濃度 mg/ml	血球量				
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
2.0	320	320	320	320	320
1.0	320	320	320	320	320
0.5	320	320	320	320	320
0.25	320	320	320	320	320
0.1	160	320	320	320	320
0.05	—	—	80	160	160
0.01	—	—	—	—	—

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

滴下法では、2.0 mg/ml から 0.25 mg/ml までは、各量の血球を最高の凝集価を与える様に感作する事が出来た。0.1 mg/ml では 1/10 量の血球を加えた場合の凝集価が低下し、0.01 mg/ml では全く凝集しなくなつた。これに反して混合法では、0.4 mg/ml から 0.2 mg/ml までの非常に制限された範囲内で 1/20 量以下の血球を充分に感作する事が出来るが、それ以上又はそれ以下の濃度では著明に感作能力が減弱した。他の血清でも同様の成績を得た。

表4 抗原濃度と血球量 2) 混合法 血清 No. 28

抗原濃度 mg/ml	血球量				
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
2.0	—	—	—	—	—
1.0	—	—	—	80	160
0.5	—	—	160	320	320
0.4	80	320	320	320	320
0.3	80	320	320	320	320
0.25	80	320	320	320	320
0.2	80	320	320	320	320
0.1	—	—	160	320	320
0.05	—	—	—	80	160
0.01	—	—	—	—	—

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

#### 希釈液の pH の影響

希釈液の pH の影響を検べるために、pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0 の磷酸緩衝食塩水 (M/15), 及び生食水 (pH 6.0) の5通りの希釈液を用意して、抗原液の作製、血球の洗滌から血清の希釈に至るまでの全操作を各々の希釈液で行つて凝集価を比較した。抗原液は滴下法によつて作つた 0.5 mg/ml のものである。成績は表5に示す様に、pH 5.0 の磷酸緩衝食塩水では溶血が起つて判定不能、pH 6.0 の磷酸緩衝食塩水では凝集価が低いか又は凝集しなかつた。最高の凝集価に達したのは pH 7.0, pH 8.0 の磷酸緩衝食塩水及び生食水であ

表5 希釈液の pH の影響

希釈液	血清 No.			
	pH	21	27	28
磷酸緩衝食塩水	5.0	溶血	溶血	溶血
	6.0	—	320	—
	7.0	640	640	320
	8.0	640	640	320
生食水	6.0	640	640	320

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

る。即ち中性乃至弱アルカリ性の磷酸緩衝食塩水、又は生食水を用いるのが適当である事を示している。

#### 血球感作時間及び反応実施後加温する時間

抗原液は滴下法では 0.5 mg/ml、混合法では 0.25 mg/ml のものを用い、この両方の感作時間について、37°C で 30 分、60 分、120 分の 3 通りを行つたので、一つの抗原液について 9 通りの組合せが出来た。凝集価は滴下法でも混合法でも No. 28 の血清で 320 倍であつて、血球感作時間も反応実施後加温する時間も 37°C 30 分で充分である事を示している。又血球感作時間については、室温（約 25°C）15 分では凝集しなかつたが、室温 30 分乃至 60 分で最高の凝集価に達した。

#### 判定

判定は一晚室温に放置して血球を完全に試験管底に沈澱させ、沈澱の状態によつて判定した。凝集の状態は図 1 に示す様に、多糖体を感作原とした赤血球凝集反応の場合と同じである。多糖体の場合と異なる点は、多糖体では試験管を振盪すると、凝集が起つていれば血球は凝集塊となつて浮上するが、磷酸質では均等な血球浮遊液

となつてしまうので、この方法で判定するのは適当でない。又、再浮遊再沈澱させても凝集価は変らなかつた。又、抗原液が不適當で凝集価が低下する場合、高希釈の側で凝集が起らなくなると共に、低希釈の側でも凝集が起らなくなり、血清希釈 80 倍乃至 160 倍附近でのみ凝集すると云う現象が度々見られた。

#### 抗原液の保存

抗原液は滴下法で 0.5 mg/ml、混合法で 0.25 mg/ml のものを作り、これを 2 分して一方は 4°C の冷蔵庫に保存し、他方を室温（15~30°C）に放置して、日を追つて凝集価の変化を検べた。血清は No. 27 と No. 28 を用いた。成績は表 6 に示す様に、滴下法では 4°C に保存した場合 4 週間にわたつて凝集価は低下しなかつた。室温に放置した場合でも凝集価は少し低下したが 5 週目まで可成り高い凝集価を示した。これに反して混合法では、4°C に保存した場合でも 2 週間で全く凝集しなくなり、室温では 24 時間で全然凝集しなくなつた。これは滴下法で作つた抗原液は粒子が微少で安定性が高く、これに反して混合法で作つた抗原液は粒子が大きく不安定で抗原

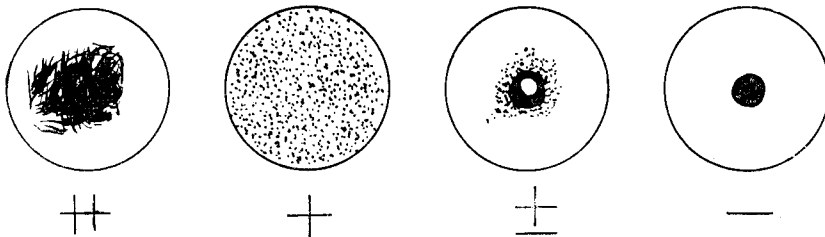


図 1 判定基準

表 6 抗原液の保存 血清 No. 28

抗 原	保存日数												
	保存温度	0	1	2	3	5	7	10	14	21	28	35	42
滴 下 法 0.5 mg/ml	4°C	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	160	—
	室 温	320	320	320	160	160	160	160	160	160	160	160	—
混 合 法 0.25 mg/ml	4°C	320	320	320	320	320	320	160	—	—			
	室 温	320	—	—	—	—							

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

血 清 No. 27

抗 原	保存日数												
	保存温度	0	1	2	3	5	7	10	14	21	28	35	42
滴 下 法 0.5 mg/ml	4°C	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	320	—
	室 温	640	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	—
混 合 法 0.25 mg/ml	4°C	640	320	320	320	320	320	160	—	—			
	室 温	640	—	—	—	—							

表中の数字は赤血球凝集価を示す。

粒子自体が自然に凝集する傾向にあるためと思われる。

### レシチンの影響

梅毒血清反応に於て、カルデオライピンにレシチンを加える事によつて、沈降価、補体結合価が上昇する事は既に知られているので<sup>6,7)</sup>、同じリポイド抗原である結核菌磷脂質に対するレシチンの影響について検討した。レシチンは市販一級レシチン（卵製）を使用した。抗原液の作り方は Pd. mix メタノール溶液（2.0 mg/ml）にレシチン・メタノール溶液（2.0 mg/ml）を種々の割合に加え、滴下法では Pd. mix の濃度が 0.5 mg/ml、混合法では 0.1 mg/ml になる様にした。滴下法で 0.5 mg/ml は最高の凝集価を得る濃度であり、混合法で 0.1 mg/ml はレシチンによつて感作能力が増加すれば、直ちに凝集価の上昇となつて現れる濃度である。レシチンは 0.5 mg/ml 以上の濃度では溶血を起したので、0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.0125 mg/ml とする様にした。又、レシチン・メタノール溶液に、Pd. mix メタノール溶液と同量のメタノールを加えたもの、及び Pd. mix メタノール溶液にレシチン・メタノール溶液と同量のメタノールを加えたものを対照とした。成績はレシチン単独では凝集反応は陰性であり、又 Pd. mix に加えても凝集価の上昇は見られなかつた。

### 溶血反応

方法は実験方法のところに記載したが、血清を 0.25 ml づつ倍数希釈したのは、血球の濃度が濃い方が判定が容易であるからである。成績は表 7 に示した様に、補体量を増加させるに従つて溶血価も上昇してくるが、10 単位では対照にも溶血が起つた。溶血価は加える補体量に従つて凝集価の 1/2 倍から 2 倍乃至 4 倍であつた。即ち結核菌に由来する多糖体を感作原として溶血反応が見られると同様、結核菌磷脂質を感作原とした場合でも補体の存在下において溶血反応が起る事がわかつた。

### 補体結合反応及び沈降反応

両反応共、抗原液は滴下法で作つた 0.5 mg/ml のものを抗原希釈 1 倍とした。補体結合反応の成績は表 8 に示す様に、陽性反応の起つたのは抗原希釈 4 倍乃至 8 倍から 512 倍の間で、補体結合反応に於ける抗体価は赤血球凝集反応に於ける抗体価の 1/4 乃至 1/8 であつた。沈降反応の成績は表 9 に示す様に、抗原希釈 32 倍まで反応が起り、沈降反応に於ける抗体価は赤血球凝集反応に於ける抗体価の 1/20 であつた。

えた溶血反応について検討を加えたが、これらの方法は本実験の成績が示す様に、同抗原を使用した補体結合反応や沈降反応に較べてはるかに微量の抗体を検出する事が出来る。

この反応の全操作を通じて最も重要な点は抗原液の作製法である。磷脂質の様なりポイド抗原は多糖体や蛋白と異つて水溶液にならないので、血清反応抗原には懸濁液として用いるが、それには次の様な方法が考えられる。

1) 抗原アルコール溶液に希釈液を手早く加えて混和する。

2) 抗原アルコール溶液に希釈液を滴下する。

3) 希釈液を振盪混和しながら、これに抗原アルコール溶液を滴下する。

1) は Nègre<sup>8)</sup> がメチル抗原について用い、又梅毒血清反応の際は殆んどこの方法を用いている。本実験に於てもこの方法（混合法）を用いて抗原液を作る事が出来たが、この方法の欠点は、至適濃度の範囲が狭い事と、希釈液を加える速度等の相違により抗原粒子の性状に変化を来し、感作能力が変動する事であつた。

2) はワッセルマン反応北研法<sup>9)</sup>に用いられているが、この方法では粗大な抗原粒子を作り、血球を感作する事が出来なかつた。

3) は滴下法として本実験に用いたが、本実験の様に、滴下条件、攪拌条件を一定にする事によつて常に一定の感作能力を持つた抗原液を作り得る事、感作能力が強い事、広い範囲の抗原濃度で同じ感作能力を示す事、保存実験の成績が示す様に混合法に較べて安定度の高い事等から、最も良い方法であると思われる。

又、滴下法と混合法に於て至適抗原濃度の広さが異なること云う事は、この場合抗原液内の抗原粒子の大きさが重要な因子であると考えられる。血球を感作し得る抗原粒子の大きさについては特に検べなかつたが、比較的小さいものであると思われる。それ故、滴下法では高濃度まで同じ様に血球を感作するが、混合法では高濃度で著明に感作能力が低下すると云う事実は、滴下法では始めに滴下された抗原は小さい粒子を作り、濃度が上昇するに従つて粒子は大きくなり、遂に沈澱を生ずる様になつても、上清には血球を感作するに充分な小さい粒子の抗原が存在するが、これに反して混合法では高濃度では一様に大きな抗原粒子を作るので血球を感作する事が出来ないと考えるのが妥当であろう。

## 考 案

結核菌磷脂質感作赤血球凝集反応及びこれに補体を加

## 結 論

結核菌磷脂質感作赤血球凝集反応及び同溶血反応につ

表 7 凝集反応と溶血反応

血清 No. 21

方法	血清希釈 1: 補体 単位/0.1 ml	血清希釈									HL 判定	
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照 1		対照 2
HA		卅	卅	卅	+	+	-	-	-	-	-	320
HL	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	160
	4	3	3	3	3	1	0	0	0	0	0	160
	5	3	3	3	3	2	0	0	0	0	0	320
	6	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0	320
	8	3	3	3	3	3	3	1				640
	10	3	3	3	3	3	3	3	1	0	1	

血清 No. 27

方法	血清希釈 1: 補体 単位/0.1 ml	血清希釈									HL 判定	
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照 1		対照 2
HA		卅	卅	卅	+	+	±	-	-	-	-	320
HL	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	160
	4	3	3	3	3	2	0	0	0	0	0	320
	5	3	3	3	3	3	2	0	0	0	0	640
	6	3	3	3	3	3	3	2	0	0	0	1280
	8	3	3	3	3	3	3	2	0	0	0	1280
	10	3	3	3	3	3	3	2	1	0	1	

血清 No. 28

方法	血清希釈 1: 補体 単位/0.1 ml	血清希釈									HL 判定	
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照 1		対照 2
HA		卅	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-	160
HL	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	160
	4	3	3	3	2	1	0	0	0	0	0	160
	5	3	3	3	3	2	1	0	0	0	0	320
	6	3	3	3	3	2	2	0	0	0	0	640
	8	3	3	3	3	3	2	0	0	0	0	640
	10	3	3	3	3	3	2	1	1	0	1	

(註) HA: 赤血球凝集反応

HL: 溶血反応

対照 1: 非感作血球+20 倍血清

対照 2: 感作血球+生食水



表 9 沈降反応成績

血清 No. 21								
抗原希釈	1	2	4	8	16	32	64	128
血清希釈								
1	+	+	+	+	+	+	±	-
2	+	+	+	+	+	+	±	-
4	+	+	+	+	+	+	±	-
8	+	+	+	+	+	+	±	-
16	+	+	+	+	+	+	±	-
32	+	+	+	+	+	±	±	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-

血清 No. 27								
抗原希釈	1	2	4	8	16	32	64	128
血清希釈								
1	+	+	+	+	+	+	±	-
2	+	+	+	+	+	+	±	-
4	+	+	+	+	+	+	±	-
8	+	+	+	+	+	+	±	-
16	+	+	+	+	+	±	±	-
32	±	±	+	+	±	±	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-

血清 No. 28								
抗原希釈	1	2	4	8	16	32	64	128
血清希釈								
1	+	+	+	+	+	+	±	-
2	+	+	+	+	+	+	±	-
4	+	+	+	+	+	+	±	-
8	+	+	+	+	+	+	±	-
16	+	+	+	+	+	+	±	-
32	+	+	+	+	+	±	-	-
64	-	-	±	±	-	-	-	-

いて検討を加え次の如き成績を得た。

1) 抗原液作製法は、磷脂質メタノール溶液を希釈液に滴下し、メタノールを加温蒸発させる方法（滴下法）

が、広い範囲の抗原濃度に於て同一の凝集価を示したが、磷脂質メタノール溶液に希釈液を加えて混和する方法（混合法）は 0.4 mg/ml から 0.2 mg/ml の間の凝集価が高かった。

2) 希釈液は pH 7.0 乃至 pH 8.0 の磷酸緩衝食塩水、又は生食水を用いた場合に高い凝集価を示した。

3) 血球感作時間及び感作血球を血清に加えてから加温する時間は、何れも 37°C 30 分で充分であつた。

4) 抗原液の保存は 4°C に保存するのが良く、滴下法では 4 週間にわたつて同じ凝集価を示したが、混合法では比較的短時日で陰性となつた。

5) 判定後、補体を加える事によつて溶血反応を行う事が出来た。溶血価は補体を増量するに従つて高くなるが、凝集価の 1/2 乃至 4 倍であつた。

6) 磷脂質メタノール溶液にレシチンを種々の割合に加えたが、凝集価は上昇しなかつた。

7) 磷脂質を抗原として補体結合反応及び沈降反応を行つたが、抗体価は赤血球凝集反応よりはるかに低かつた。

稿を終るに当り、御指導並に御校閲をいただいた高橋教授に深謝する。

## 文 献

- 1) 高橋義夫・小野勝男：結核の研究，7，1，1957.
- 2) Anderson, R.J.: Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe., 3, 145, 1939.
- 3) Boquet, A., and Nègre, L.: Ann. Inst. Pasteur., 37, 787, 1923.
- 4) Bukonz, S. C., Rein, C. R., and Kent, J. F.: J. Lab. and Clin. Med., 31, 394, 1946.
- 5) 厚生省編：衛生検査指針，I，(I)，1950.
- 6) Brown, R.: J. Immunol., 52, 17, 1946.
- 7) Maltaner, E., and Maltaner, F.: J. Immunol., 51, 195, 1945.
- 8) 厚生省編：衛生検査指針，II，(II)，1950.