



Title	結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応の研究
Author(s)	深江, 肇; FUKAE, Hajime
Description	
Citation	結核の研究, 13, 27-39
Issue Date	1960-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26700
Type	departmental bulletin paper
File Information	13_P27-39.pdf



結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応の研究

深 江 肇

(国立療養所旭川病院 院長 小野英夫博士)
(北海道大学結核研究所予防部 主任 高橋義夫教授)

(昭和35年6月1日受付)

1948年 Middlebrook & Dubos がツベルクリンを感作吸着させた緬羊血球を抗原とした赤血球凝集反応を報告したが、この本態は Middlebrook, Scoot, Pound, 等により多糖体であることが確認された^{15)~18)}。その後、Boyden は血球をタンニン酸で処理することにより、蛋白質も感作元となり得ることを報告した。爾來、此の両血清反応に関して幾多の研究がなされ、その特異性には異論は少ないが、結核症の病勢との関係については未だ一致した見解はみられない。1956年、高橋、小野^{7)~9)}によつて結核菌磷脂質も赤血球凝集反応の鋭敏な抗原となり、しかもこの反応に関与する抗原抗体系は菌体乃至はツベルクリン蛋白、多糖体をもつてする同種反応とは全く別個で独立していることが明らかにされた。その後、高橋及び著者¹⁹⁾は本磷脂質赤血球凝集反応を肺結核患者血清について研究し、本反応の成績は結核患者の病勢に平行するという興味ある結果を得た。又望月、永山²⁰⁾その他も結核菌体多糖体、蛋白及び磷脂質を感作抗原とする赤血球凝集反応を多数の肺結核患者及びツベルクリン反応陽性な健康者に施行し、多糖体及び蛋白反応は、患者、健康者の別なく、又病勢に関係なく一様に出現するに反し、ひとり磷脂質反応のみ結核患者の約80%、活動性結核患者の90%以上に出現し、しかも健康者には殆んど出現しないという成績を得た。かくして磷脂質による赤血球凝集反応は活動性結核の確実な血清学的診断法として注目されるに至つた。しかしながら、本反応の手技は血清学的手技としては簡便であるとはいひながら緬羊血球を必要とするので、いずれの場所においても容易に行ない得ないし、又緬羊血球の採取、特殊溶液をもつてする保存(アルスベール)、処理、被検血清中の血球に対する正常抗体の吸収等の前処理を必要とするばかりでなく、反応に長時間を要するという不便がある。

さて、色々な抗原を血球以外の血清学的に不活性な色々な物質、例えば細菌、コロデウム、カオリン等に吸着させこれらの同種免疫血清と混和すると凝集反応を起すことは多くの研究者により認められている。例えば、F.

S. Jones の Agglutination by Precipitin¹²⁾¹³⁾, Hulschoff の Suspension-Prezipitation と呼ばれているものがそれである。この現象は主として、沈降素と凝集素の一元性の問題の論議のための手段とされてきたが、その後、Zinsser¹⁴⁾により抗原粒子を大きくすることにより、反応の感度がたかめられることが報告されて以来、この種の反応が血清学的研究の対象になつた。

本邦においても緒方⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾は梅毒血清反応にカオリン凝集反応を応用してすでに実用化しており、水上⁹⁾⁶⁾、安田、飯塚¹²⁾、山本⁴⁾等がカオリン粒子又はコロデウムによる感作凝集反応は微量抗体の証明に優れていると報告している。

そこで著者は、高橋教授指導の下に本反応を簡易化する目的で、赤血球の代りにカオリン粒子懸濁液を使用し、て反応条件を追求し、赤血球凝集反応との比較を試みた。

実験材料

1. 抗 元

北大結核研究所予防部において抽出された次の3種の結核菌磷脂質を使用した。

- ① Pd. ha: 人型菌 H 37 Rv 及び青山株を等量混ぜたものより抽出したもの (P=2.6%)
- ② Pd. b: BCG より抽出したもの (P=2.3%)
- ③ Pd. n: 人型菌仲野株より抽出したもの (P=2.5%)

2. 抽出方法 (高橋教授による)

ソートン培養のアセトン致死乾燥菌体を、アセトンで40°Cで温抽出し、乾燥後、メタノールで抽出(ソックスレー3日)、メタノール抽出液を蒸発乾固した後、これを熱アセトンで抽出してアセトン可溶物質を完全に除去する。残渣をクロロホルムに溶解し、クロロホルム不溶物を高速遠心(12,000 r.p.m.)及びザイツで除去し、可溶物を蒸発乾固して抗原とする。抗原は予め2.0 mg/mlにメタノール溶液とする。ちなみに、アセトン可溶物及びクロロホルム不溶物には試験管内抗原性は全くみられない。

対 照

対照 1: 生理的食塩水+感作カオリン浮遊液

対照 2: 健康家兎血清+未感作カオリン浮遊液

1. 結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応に 関与する諸因子の最適条件の検索

1) 至適抗元濃度, 2) 抗元液とカオリン浮遊液の混合比
3) pH の影響, 4) 感作時間と温度との関係, 5) 感作カオリン浮遊液洗滌の影響, 6) 被検血清と感作カオリン浮遊液の混合比, 7) 被検血清, 感作カオリン浮遊液混和後判定迄の温度と時間の経過の影響, 8) 遠心沈澱法, 静置法による判定の比較, 9) 遠心沈澱の廻転数の影響, 10) アルコール濃度の影響, 11) レシチン添加の影響, 12) 抗元保存期間, 以上について検討を加えた。

1) 至適抗元濃度

0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.01, 0.0075 及び, 0.005 mg/ml の 7 段階の抗元濃度について至適濃度を調べた。表 1 に示すように 3 抗元共 0.01 mg/ml が最も凝集価が高く最

適な濃度であつた。

2) 感作抗元液とカオリン浮遊液の混合比について

0.5 及び, 1.0 mg/ml の 2 つのカオリン浮遊液を使用し, 至適濃度 0.01 mg/ml の抗元液との比率を色々かえて作った感作カオリン浮遊液と予め倍数稀釈した被検血清とを混和して反応の影響を調べ最適な両者の比率を検索した。この結果は表 2 に示した。

(1) Pd. ha の場合

0.5 mg/ml カオリン使用の場合は, 抗元対カオリン比が 1:1, 及び 2:1 の時, 又 1.0 mg/ml カオリン使用の場合は同じく 1:1, 及び 2:1 の時にいずれも, 2,560 倍と凝集価は同一であるが, 凝塊の強さの点で 1.0 mg/ml のカオリン液で, 比率が 2:1 の時が感度が強く凝塊も大きく, 従つて判定が容易であつた。

(2) Pd. b の場合

1.0 mg/ml カオリン液で抗元対カオリンの比率が 1:1 2:1 の時が凝集価が 5,120 倍と同一であるが凝塊は比率 2:1 の時が最も強く現われた。

表 1. 至 適 抗 元 濃 度

抗元	濃 度 (mg)	血 清 稀 釈 1: n (n=)											
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂	
Pd. ha	0.1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.075	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	0.025	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	0.01	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	0.0075	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	0.005	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
Pd. b	0.1	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	0.075	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.05	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	0.025	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
	0.01	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
	0.9975	++	++	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	0.005	++	++	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-
Pd. n	0.1	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	0.075	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.025	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	0.01	++	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-
	0.0075	++	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
	0.005	++	++	++	++	+	±	±	±	-	-	-	-

表 2. 感作用抗元液とカオリン浮遊液の混合比

(1) Pd. ha

カオリン (mg/ml)	抗元 : カオリン	血 清 稀 釈 1 : n (n=)										K ₁	K ₂
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120			
0.5	1 : 1	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	
	2 : 1	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	
	3 : 1	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	
	4 : 1	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	
	5 : 1	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	
	6 : 1	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	
	7 : 1	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	
	8 : 1	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	
1.0	1 : 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	2 : 1	##	##	++	++	++	+	+	+	±	-	-	
	3 : 1	##	##	++	++	+	+	+	±	±	-	-	
	4 : 1	##	##	++	++	+	+	+	±	-	-	-	
	5 : 1	##	##	++	++	+	+	+	±	-	-	-	
	6 : 1	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	
	7 : 1	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	
	8 : 1	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	

(2) Pd. b

カオリン (mg/ml)	抗元 : カオリン	血 清 稀 釈 1 : n (n=)										K ₁	K ₂
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120			
0.5	1 : 1	+	+	++	++	+	+	+	+	-	-	-	
	2 : 1	++	++	+	+	+	+	+	±	-	-	-	
	3 : 1	++	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	
	4 : 1	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	
	5 : 1	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
	6 : 1	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	
	7 : 1	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	
	8 : 1	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	
1.0	1 : 1	+	++	##	++	++	++	+	+	-	-	-	
	2 : 1	##	##	##	++	++	++	++	++	+	-	-	
	3 : 1	##	##	++	++	++	++	+	+	+	-	-	
	4 : 1	##	##	++	++	+	+	+	+	-	-	-	
	5 : 1	##	##	++	++	+	+	+	-	-	-	-	
	6 : 1	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	
	7 : 1	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	
	8 : 1	++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	

(3) Pd. n

カオリン (mg/ml)	抗原：カオリン	血清稀釈 1:n (n=)									K ₁	K ₂
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120		
0.5	1 : 1	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	2 : 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3 : 1	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	4 : 1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	5 : 1	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	6 : 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 : 1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	8 : 1	+	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-
1.0	1 : 1	±	±	+	++	++	++	++	+	-	-	-
	2 : 1	++	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-
	3 : 1	+	+	++	+	+	±	-	±	-	-	-
	4 : 1	++	++	+	+	±	±	±	-	-	-	-
	5 : 1	+	+	+	±	±	±	-	-	-	-	-
	6 : 1	+	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-
	7 : 1	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 : 1	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-

(3) Pd. n の場合

0.5 mg/ml カオリン液で両者の比率 1:1 の時と、1.0 mg/ml カオリン液で同じく 2:1 の場合が 2,560 倍と凝集価は同じであつたが、やはり凝塊の状態は後者において強く、判定が容易であつた。

以上の実験結果から、抗原液とカオリン浮遊液との混合比は 3 抗原共に、標準カオリン液をそのまま使用して (1:mg/ml) 抗原対カオリン比が 2:1 の時に最も感度が高く最適な量的関係であることがわかつた。これ以上両者の比が大きくなるにつれて反応は減弱して行つた。

3) pH による影響

反応に用いる稀釈液の pH は反応経過中、特に抗原粒子がカオリン粒子に吸着する過程に影響するのではないかと考え、この関関を検討した。すなわち、pH 5.2 より 7.8 迄の 8 段階の磷酸緩衝生理的食塩水を調製し反応を実施した。

表 3 に示すように 3 抗原共 pH 6.8 が最も凝集価が高く凝塊も大きかつた。これより酸性に傾く程これに比例して凝集価は低くなつた。これに反して、pH 7.2 以上のアルカリ性になると酸性側のように凝集価はさほど低くはならなかつたが、凝塊は細くなつた。この結果より反応に用いる緩衝生理的食塩水の至適 pH は 6.8 であることがわかつた。

4) 感作の際の時間と温度の関係

温度と時間の経過により抗原液、カオリン浮遊液の混合液が抗原としてどのように影響されるかをみた。温度は 20°C 及び、37°C とし、感作時間を 5, 30, 60 及び 120 分として、反応に対する影響をみた。

結果は表 4 に示すように、いずれの条件でも凝集価には差異は殆んど認められなかつたが、凝塊の大きさの点から、20°C、15 分及び、30 分、37°C、15 分では凝塊は細かく感作が不充分のように思われた。感作は本反応系の重大な因子であるが、37°C 30 分が適当であると考えられる。

5) 感作カオリン浮遊液に対する洗滌の影響

抗原を吸着した感作カオリン液を遠心沈澱して上清を捨て、pH 6.8 の緩衝生理的食塩水で洗滌し、これが反応にいかなる影響を与えるかを検討した。すなわち、1) 感作カオリン浮遊液をそのまま使用した場合 (未洗滌)、2) 感作カオリン浮遊液を 2,000 r.p.m. 5 分遠心沈澱し、この上清を捨て沈澱した感作カオリン粒子を緩衝生理的食塩水で原量に復した場合 (洗滌 1 回)、3) この洗滌操作を 2 回行なつた場合 (洗滌 2 回) の 3 つの場合を比較した。

結果は表 5 に示すように 3 抗原共に未洗滌の場合が反応が最も強く、洗滌回数と共に反応は弱くなつた。これは山本⁴⁾も云つているように磷脂質のカオリン粒子への吸着が弱いため遠沈、洗滌という物理的操作により、カオリンに吸着した抗原が離脱して行くためと思われる。

表3. pH の影響

抗元	pH	血清稀釈 1:n (n=)										
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	5.2	##	##	##	++	++	+	-	-	-	-	-
	5.6	##	##	##	##	++	+	±	-	-	-	-
	6.0	##	##	##	##	++	++	+	-	-	-	-
	6.4	##	##	##	##	++	++	+	±	-	-	-
	6.8	##	##	##	##	++	++	+	+	±	-	-
	7.2	##	##	##	##	++	++	++	+	±	-	-
	7.6	##	##	##	++	++	++	++	+	±	-	-
	7.8	++	++	++	+	+	+	+	+	±	-	-
Pd. b	5.2	##	##	##	##	++	+	-	-	-	-	-
	5.6	##	##	##	##	++	+	±	-	-	-	-
	6.0	##	##	##	##	++	+	+	-	-	-	-
	6.4	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	-
	6.8	##	##	##	++	++	++	+	+	-	-	-
	7.2	##	##	##	++	+	+	+	±	-	-	-
	7.6	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
	7.8	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
Pd. n	5.2	##	##	##	++	+	±	±	-	-	-	-
	5.6	##	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	6.0	##	##	++	++	+	+	±	-	-	-	-
	6.4	##	##	##	+	+	+	±	-	-	-	-
	6.8	##	##	##	++	+	+	+	+	-	-	-
	7.2	##	##	##	++	++	+	+	±	-	-	-
	7.6	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
	7.8	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-

表4. 感作時の温度及び時間の影響

抗元	温度	時間 (分)	血清稀釈 1:n (n=)										
			20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	20°C	15	++	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
		30	##	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
		60	##	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	##	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	37°C	15	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
		30	##	##	++	++	++	++	+	+	-	-	-
		60	##	##	++	++	++	+	+	+	-	-	-
		120	##	##	++	++	++	+	+	+	-	-	-

抗原	温度	時間 (分)	血清稀釈 1:n (n=)										K ₁	K ₂
			20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120			
Pd. b	20°C	15	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
		30	++	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
		60	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
	37°C	15	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		30	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		60	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	++	++	++	+	+	±	+	-	-	-
Pd. n	20°C	15	++	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-	-
		30	+++	+++	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
		60	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
	37°C	15	+++	+++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		30	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		60	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-

表5. 感作カオリン浮遊液に対する洗滌の影響

抗原	洗滌廻数	血清稀釈 1:n (n=)										K ₁	K ₂
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120			
Pd. ha	未洗滌	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
	洗滌1回	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	洗滌2回	±	±	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-
Pd. b	未洗滌	+++	+++	+++	++	++	+	+	±	-	-	-	-
	洗滌1回	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	洗滌2回	-	±	-	+	±	+	-	+	±	-	-	-
Pd. n	未洗滌	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
	洗滌1回	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	洗滌2回	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-

6) 血清量と感作カオリン浮遊液の混合率

被検血清を 0.5 ml ずつ倍数稀釈した試験管に感作カオリン浮遊液を 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び, 0.5 ml を夫々混和後, 全量が 1.0 ml になるように緩衝生理的食塩水を加えて検討した。

表6で明らかのように, 0.2 ml を混和した時が反応が強く最適と考えられた。併し, 操作の簡便さを重視して血清に感作カオリン浮遊液のみを夫々混和してみたが同様な結果を得た。従つて血清 0.5 ml に感作カオリン浮

遊液 0.2 ml を混和するのが最適と考えられる。

7) 血清と感作カオリン浮遊液混和後の温度, 時間の影響

温度 20, 及び 37°C の下で, 反応時間 15, 30, 60 及び 120 分として, 温度と時間の経過により反応がどのように影響されるかを調べた。その成績は表7に示されておるのように, いずれの抗原に対しても凝集価, 凝塊の大きさの点から見て, 37°C で 30 分反応させるのが最もよいことがわかつた。

表6. 血清量と感作カオリン浮遊液の混合率

抗原	血清量 (ml)	感作抗原 浮遊液 (ml)	緩衝生理 的食塩水 (ml)	血清稀釈 1:n (n=)										
				20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	0.5	0.05	0.45	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		0.1	0.4	##	##	++	++	+	+	±	-	-	-	-
		0.2	0.3	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	-
		0.3	0.2	##	##	##	++	++	++	+	+	-	-	-
		0.4	0.1	##	##	##	++	++	-	-	-	-	-	-
		0.5	0	##	##	##	++	-	-	-	-	-	-	-
Pd. b	0.5	0.05	0.45	++	++	++	+	±	-	-	-	-	-	
		0.1	0.4	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-	
		0.2	0.3	##	##	##	##	++	+	+	+	-	-	
		0.3	0.2	##	##	##	##	++	+	+	+	-	-	
		0.4	0.1	##	##	##	++	++	-	-	-	-	-	
		0.5	0	##	##	##	+	-	-	-	-	-	-	
Pd. n	0.5	0.05	0.45	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	
		0.1	0.4	##	##	++	+	+	+	+	-	-	-	
		0.2	0.3	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	
		0.3	0.2	##	##	##	##	++	+	+	±	-	-	
		0.4	0.1	##	##	##	##	+	-	-	-	-	-	
		0.5	0	##	##	##	++	-	-	-	-	-	-	

表7. 血清と感作カオリン浮遊液混和後の温度、時間の影響

抗原	温度	時間 (分)	血清稀釈 1:n (n=)										
			20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	20°C	15	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		30	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
		60	##	##	++	++	+	+	+	±	-	-	-
		120	##	##	##	++	+	+	+	±	-	-	-
	37°C	15	##	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
		30	##	##	##	++	+	+	+	+	-	-	-
		60	##	##	##	++	+	+	+	±	-	-	-
		120	##	##	##	++	++	+	+	+	-	-	-
Pd. b	20°C	15	++	+	+	+	+	±	±	±	-	-	-
		30	++	++	++	++	+	+	±	±	-	-	-
		60	++	##	##	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	++	##	##	++	+	+	+	+	-	-	-
	37°C	15	##	##	++	##	++	+	+	+	-	-	-
		30	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	-
		60	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	-
		120	##	##	##	##	++	++	+	+	-	-	-

抗原	温度	時間 (分)	血清稀釈 1:n (n=)										
			20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. n	20°C	15	++	++	+	+	+	+	±	±	-	-	-
		30	+++	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
		60	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
	37°C	15	+++	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
		30	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
		60	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
		120	+++	+++	+++	++	++	++	+	±	-	-	-

8) 遠心沈澱法, 静置法による判定の比較

被検血清に感作カオリン浮遊液を混和, 37°C, 30分間反応させた直後では, 各試験管はみな同様に濁濁している, 果して凝集反応がおきているかどうか判定はできない。従つて通常は遠心沈澱したあとで判定するのであるが, 感作赤血球凝集反応の場合は, 反応終了後そのまま試験管列を室温に一夜放置し, 翌朝試験管底の凝集の様子をみて判定することになっている。

そこで感作カオリン凝集反応の場合, 遠心沈澱法と静置法といずれに反応が鋭敏に判定されるかを比較検討し

た。

1) 遠心沈澱法: 2,000 r.p.m. 5分間遠心沈澱後判定。

2) 静置法: 24時間氷室に放置後判定。結果は表8に示すように, 遠心沈澱法では3抗原共2,580倍と高い凝集価を示したのに反し, 静置法では3抗原共80倍と凝集価は遙かに劣つた。従つて判定は遠心沈澱法によるのが適当であるし, 又この方法では短時間内に判定出来る利点もある。

表8. 判定の際の遠心沈澱法と静置法の比較

	抗原	血清稀釈 1:n (n=)										
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
遠心法	Pd. ha	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
	Pd. b	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
	Pd. n	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
静置法	Pd. ha	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	Pd. b	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	Pd. n	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-

9) 判定の際の遠心沈澱の廻転数の影響

前の実験で判定には遠心沈澱法がよいことがわかつたが, この操作は故意に外部から力をかけて凝集させるために, 遠心力の大きさによつて反応結果の判定に差が生じないかどうかという懸念がある。そこで遠心沈澱時の廻転数により反応にいかなる影響があるかを検討した。遠心沈澱器はどこでも使用されている普通の小型のものである。遠心沈澱時間はいずれも5分間とした。

表9に示すように1,000 r.p.m. では, 凝集価はやや低く, 凝塊も細かくやや不十分であつたが, 2,000 r.p.m. 以上では凝集価に変わりなく且つ, 凝塊も大きく判定が容易

であつた。併し廻転数をあまり多くすると沈澱したカオリン粒子が強く試験管底に固着するため, 再浮遊し判定するのにやや困難を覚えた。従つて2,000 r.p.m. 5分で充分であると考えられた。

10) アルコール濃度の影響

前述の如く結核菌磷脂質は水に不溶のため, 先ずメタノール溶液となし, これを出発点として抗原液の緩衝生理的食塩水懸濁液を作るのであるから, 作るべき抗原液の濃度によつてその中に含まれるメタノール濃度が当然變つてくる。又至適濃度0.01 mg/mlの抗原液を作るにしても, はじめのメタノール溶液に含まれる磷脂質の含

表9. 遠沈の廻転数の影響

抗原	廻転数	血清稀釈 1:n (n=)										
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	1,000	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
	2,000	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	3,000	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
	4,000	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
Pd. b	1,000	+++	+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-
	2,000	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
	3,000	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
	4,000	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
Pd. n	1,000	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
	2,000	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
	3,000	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-
	4,000	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	-	-	-

表10. アルコール濃度の影響

抗原	抗原濃度 (mg)	血清稀釈 1:n (n=)										
		20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	K ₁	K ₂
Pd. ha	2.0	+++	+++	++	++	++	+	+	±	-	-	-
	1.0	+++	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
	0.5	+++	+++	+	+	±	±	+	+	-	-	-
	0.1	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pd. b	2.0	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	1.0	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	0.5	+++	+++	++	+	±	±	+	-	-	-	-
	0.1	+++	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-
Pd. n	2.0	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
	1.0	+++	+++	+++	++	+	+	+	±	-	-	-
	0.5	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	0.1	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-

有量により当然懸濁液中のアルコール含有量が異なってくる。本実験において使用した磷脂質メタノール溶液は 2.0 mg/ml であったが、反応のための至適濃度は 0.01 mg/ml 緩衝生理的食塩水であるので、2.0 mg/ml メタノール溶液から一挙に 0.01 mg/ml の抗原液を作ることは、数百という被検血清を一度に調べる時は別であるが、少数例を調べる場合は濃度に誤差を生ずるので、2段階、3段階に稀釈して行なわねばならない。このわずらわしさを除くためには 2.0 mg/ml 以下、例えば、0.5, 0.2, 0.1 mg/ml のメタノール溶液があれば楽である。しかしな

がら、低濃度のメタノール溶液で作ると必然的に出来上った所定の抗原液のメタノール濃度が高くなる。そこで抗原の節約のためと、稀釈回数をへらすために、どの程度までメタノール溶液中の磷脂質含有量を下げられるかを調べてみた。すなわち、各磷脂質 2.0, 1.0, 0.5 及び 0.1 mg/ml メタノール溶液の 4 つの磷脂質の異なるものより、0.01 mg/ml の懸濁液を作り、反応に及ぼす影響をみた。

表 10 に示すように、2.0 mg/ml 及び 1.0 mg/ml メタノール溶液を用いた時は凝集価は同一であるが、含有量

が 0.5 mg 以下のものより懸濁液を作る時は反応は減弱してくる。従つて、出発点としてのメタノール溶液中の磷脂質含有量は 1.0 mg/ml 以下に下げられないことがわかつた。メタノールが過剰に存在すると反応が減弱するものと思われる。

11) レシチン添加による影響

現在梅毒血清反応に使用されているカルディオライピンは、それ自体では試験管内抗原性がなく、これに 10 倍のレシチンを加えたものを抗原としてカオリン凝集反応に使用している。本研究に用いた結核菌磷脂質は未だ単一物質として精製されたものでなく、又これ迄の実験成績から明らかなように、それ自体で試験管内抗原性をもっているが、カルディオライピンの場合と同様にリポイド系の抗原抗体反応である。そこでレシチンがこの反応にどのような影響を与えるかを 10 倍量のレシチンを使用してしらべてみた。

すなわち、3 種の磷脂質のメタノール溶液 1.0 mg/ml

及びレシチン 10 mg/ml メタノール溶液を用い、メタノール 1 ml 中に磷脂質 0.5 mg/ml レシチン 5.0 mg/ml を含む様に調製し (レシチンは磷脂質の 10 倍量となる) 更に稀釈液で至適濃度の 0.01 mg/ml の抗原液を作つて影響をみたが、反応はレシチン添加により、かえつて強く抑制された。これは現在の結核菌磷脂質中には未だレシチンが含有されていて、外部からその添加の必要がないことを示すものと思われる。

12) 抗原液の保存

2.0 mg/ml メタノール溶液より、至適濃度 0.01 mg/ml の感作用抗原液を作り、これを 4°C の冷蔵庫に保存し日を追つて凝集価の変化を調べた。表 11 に示すように 10 日目迄は 2,560 倍と変動はなかつたが 12 日後には 640 倍と低下した。このことは一度稀釈液に懸濁した結核菌磷脂質は、たとえ氷室でもかなり早く変質することを示すもので、感作用抗原はその都度作つたものを使用すべきであろう。

表 11. 抗 元 液 保 存 期 間

保 存 温 度	抗 元	保 存 日 数								
		0	1	2	3	5	7	10	12	15
4°C	Pd. ha	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	640	640
	Pd. b	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	640	640
	Pd. n	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	640	640

表中の数字は凝集価を示す。

本反応の術式確立

反応に関与する諸条件を検討した結果次のように行なうのが適当であると考えた。

pH 6.8 磷酸緩衝生理的食塩水で、結核菌磷脂質含有量 1.0 mg/ml 以上のメタノール溶液より 0.01 mg/ml に懸濁した感作用抗原液 1.0 ml に 1.0 mg/ml カオリン浮遊液 0.5 ml を混和振盪 37°C、30 分間感作する。感作カオリン浮遊液は未洗滌のまま、予め小試験管に 0.5 ml ずつ倍數稀釈した被検血清に 0.2 ml ずつ混和振盪し、37°C 30 分間加温後、2,000 r.p.m. 5 分間遠心沈澱する。この沈澱した粒子を軽く振盪再浮遊させ対照と比較して凝塊の状態によつて判定する。

II. 結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応と感作赤血球凝集反応の比較

前の実験によつて、結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応は、反応の最適条件を選べば、ウサギの免疫血清との

間に感作赤血球凝集反応と同程度の凝集価を示すことがわかつた。そこで本感作カオリン凝集反応が臨床面で感作赤血球凝集反応にかわり得るかどうかを、国立療養所旭川病院入院中の結核患者 100 名について調べてみた。

血清は朝食前採取し、56°C、30 分非動化して使用した。抗原は今迄研究に使つてきた Pd. ha, Pd. b, Pd. n の 3 種である。

カオリン凝集反応は前の実験で確立された最適条件下で行ない、赤血球凝集反応は通常の方法で次のようにして実施した。

稀釈液には M/15 磷酸緩衝生理的食塩水 pH 7.0 を使用し、血球としては脱纖維した綿羊血球に等量の Alsver 溶液を加え、4°C に保存 3 週間以内に用いた。使用に際しては血球を稀釈液で 3 回洗滌した。感作は抗原 0.5 mg 稀釈液 1.0 ml に Packed cell 0.025 ml を混和、37°C、2 時間感作 (30 分毎に振盪) 後、稀釈液で 3 回洗滌し、2.5% 血球浮遊液とした。被検血清は非動化後血球に対する正常抗体を除去する目的で、血清 0.5 ml に 12.5% 血球浮

遊液を2.0 ml 混和し、室温で20分間2回吸収を行ない上清を取り使用した。この時の血清は8倍希釈となる。ウィダール試験管に被検血清を0.5 ml ずつ倍数希釈して、これに前記感作血球浮遊液を0.05 ml ずつ加え37°C 2時間加温後、氷室に24時間放置した後に管底に沈澱した血球の状態により判定した。判定規準は図1に示した。なお対照として①稀釈液+感作血球浮遊液、②被検血清+非感作血球浮遊液をとつた。両反応は実験当日採血した血清について平行して行なつた。

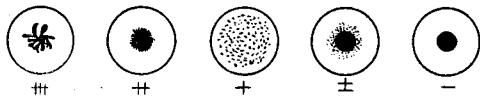


図1. 判定規準

実験結果

両反応の凝集価を比較したのが図2, 3, 4及び表12である。両者の間には大きな差異は認められず明らかな相関関係を示した。すなわち、両反応が全く一致したもの、Pd. ha に対して64例、Pd. b に対して63例、Pd. n に対して61例であつた。凝集価が赤血球凝集反応よりカオリン凝集反応において高い例は、Pd. ha に対して24例、Pd. b に対して26例、Pd. n に対して24例で、反対にカオリン凝集反応の値が低かつた例はPd. ha に対して12例、Pd. b に対して11例、Pd. n に対して15例であつた。すなわち、カオリン凝集反応の凝集価が赤血球凝集反応のそれより高い例が低い例数の約2倍にあたり、しかも

赤血球凝集反応とカオリン凝集反応の比較

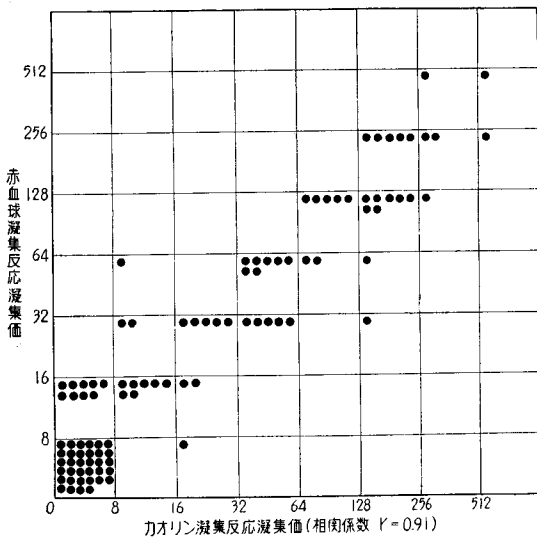


図2. Pd. ha

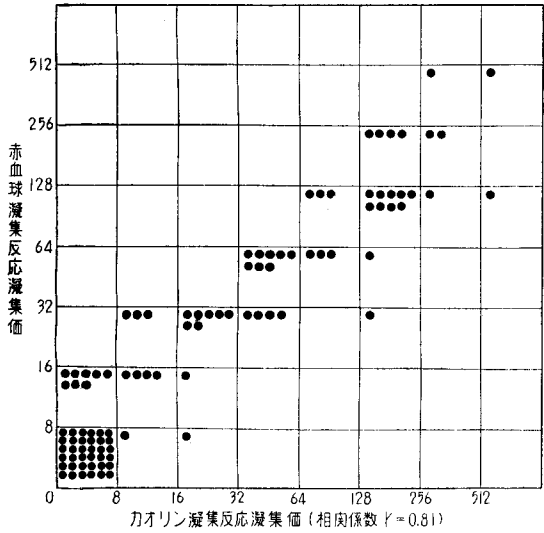


図3. Pd. b

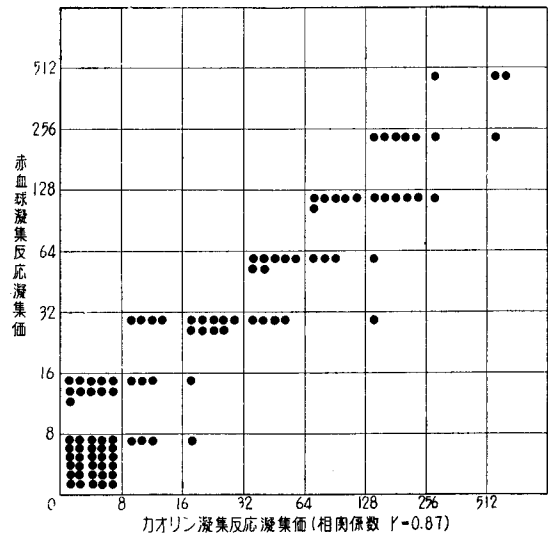


図4. Pd. n

表12. カオリン凝集反応と赤血球凝集反応凝集価の比較

抗元	差						
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
Pd. ha	0	1	11	64	19	4	1
Pd. b	0	0	11	63	21	3	2
Pd. n	0	0	15	61	19	4	1

カオリン凝集反応>赤血球凝集反応: +
 カオリン凝集反応<赤血球凝集反応: -
 カオリン凝集反応=赤血球凝集反応: 0
 差は試験管の数を示す。

血清稀釈の高い所に多い傾向があることは注目に値すると考えられる。感作赤血球凝集反応凝集価と感作カオリン凝集反応凝集価との相関係数は、Pd. ha の場合は 0.91, Pd. b の場合は 0.81, Pd. n の場合は 0.87 であった。

考 按

結核菌磷脂質が感作赤血球凝集反応の感作元になり得ることは、既に高橋によつて確立された事実であるが、本実験においてはこの磷脂質感作赤血球凝集反応の術式を簡略化する目的で、吸着物質としてカオリン粒子を選び、反応に関与する諸条件の検索を行なつて最適な術式を確立した。しかし磷脂質による感作カオリン凝集反応は感作赤血球凝集反応と同程度の鋭敏度をもつ事が実験的に証明された。感作カオリン凝集反応の利点をあげてみると、先ずカオリン感作に要する抗元量が極めて少量ですむことである。すなわち、感作赤血球凝集反応の場合の赤血球感作に要する抗元の至適濃度は 0.5 mg/ml であるがカオリン感作に要するそれは 0.01 mg/ml で血球感作の場合の実に 1/50 である。抗元の節約の点からみてこの事は第一に特記されるべきであろう。

次に従来赤血球凝集反応の場合、吸着物質としての綿羊血液の採取、血球の脱線維操作、使用時の血球の洗滌、又被検血清中の異種凝集素の吸収等、繁雑な前処置が必要であるが、感作カオリン凝集反応の場合はこれらの操作が全く不必要であり、術式は極めて簡単、かつ判定迄の時間が極めて短かくてすむことである。勿論感作カオリン凝集反応にはカオリン粒子懸濁液が必要であるが、このものの製造はさ程難しいことではなく、且つ一度製造したものは半年以上使用に耐えるという利点がある。

抗元、被検血清の稀釈液としては、実験 3 で明らかに pH 6.8 磷酸緩衝生理的食塩水を使用するのが最もよい。而して、ここに特に強調しておきたいことは、実験中に得た経験であるが反応のための稀釈液、試薬はすべて脱イオン水で調製することである。此の実験の行なわれた国立療養所旭川病院は特に水が悪いかも知れないが、病院の薬局で製造した蒸溜水を用いると出るべき反応が出なかつたり、不規則になつたりして非常に悩まされたことがあつた。この理由を北大結核研究所で調べたところ、蒸溜水中にも微量の特に銅イオン、鉄イオン、硅酸イオンが存在し、これらのイオンが反応の出現を阻害していることがわかつた。水質は所によつて変わる。脱イオン水を用いれば問題はないと思われる。

このようにカオリン凝集反応は重金属イオンにかなり影響されるので、テストに用いるすべてのガラス器具は時折、クローム硫酸で洗滌するなど、出来るだけ化学的清浄に保持しておくことが必要である。

ともあれ、結核菌磷脂質を抗元とする結核血清との血清反応に、赤血球の代りにカオリン粒子が使用出来るようになった事は、結核血清学上大きな進歩といえよう。

結 論

1) カオリン粒子は結核菌磷脂質感作赤血球凝集反応の赤血球の代りになる事が出来る。

2) 赤血球の代りにカオリン粒子を用いることによつて反応術式は極めて簡易化され、判定も短時間に確実に出来る。

3) 臨床的に結核菌磷脂質感作カオリン凝集反応と感作赤血球凝集反応の成績は明らかに相関関係を示す。

終りに本実験を命ぜられ、又御指導と御校閲をいただいた高橋教授に満腔の謝意を表すと共に、研究に際し御指導、御援助をいただいた有馬助教授、山本講師に深く謝意を表す。

また御助言御援助をいただいた国立療養所旭川病院小野院長及び、医局の諸兄に深謝する。

文 献

- 1) 飯塚：北海道医誌 24, 458, 1949.
- 2) 飯塚：北海道医誌 25, 7, 1950.
- 3) 水上・塚田：北海道医誌 26, 12, 390, 26 年.
- 4) 山本：米子医誌 5, 235, 1954.
- 5) 阿部：東京医誌 61, 249, 昭 28.
- 6) 水上・塚田：北海道医誌 26, 249, 昭 28.
- 7) 高橋・小野：結核の研究 9 集, 1958.
- 8) 高橋・小野：結核の研究 7 集, 1957.
- 9) 小野：結核の研究 10 集, 1958.
- 10) 緒方：日本細菌学誌 4 (4), 200 昭 24 (1949).
- 11) 緒方：日本細菌学誌 5 (4), 189, 昭 25 (1950).
- 12) Jones, F. S.: J. Exp. Med 46: 303, 1927.
- 13) Jones, F. S.: J. Exp. Med., 48: 183, 1928.
- 14) Zinsser, H.: J. Imm. 18: 483, 1930.
- 15) Middlebrook, G. & Dubos, R.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 16) Middlebrook, G.: J. clin. Invest., 29, 14880, 1950.
- 17) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 62, 233, 1950.
- 18) Pound, A. W.: J. Path. Bact., 64, 136, 1952.
- 19) 高橋・深江：結核の研究 8 集, 1957.
- 20) 望月・永山：未発表.