

# 実験的結核動物の血清中における 沈降抗体について

— Ouchterlony 法による研究

東京女子医科大学細菌学教室

須子田 キ ヨ・平 野 憲 正  
スシダ キヨ ヒラ ノ マサ

落 合 章 雄・長 川 静・全 美 善  
オチ アイ ユキ オ ナガ カハ シヅ ゼン ビ ゼン

(受付 昭和 35 年 5 月 2 日)

Burrell G.R. & Rheins ら<sup>1)</sup> は結核患者血清中の沈降抗体検出を Ouchterlony 法 (以下 O-test と略す) によつて検出し得ることを発表し、著者らもまた結核菌、その他の抗酸菌の培養液を抗原として、肺結核患者血清中における沈降抗体の検出を行った。肺結核患者は外来、入院の双方であつて、症状、発病よりの時期は、軽重長短様々であつた。著者らは O-test の成績とこれらの症状及び感染後の時期との関係を検討するに先立つて、2, 3 の実験動物について実験した。すなわち動物に結核菌を接種してから、日を遂つて血清を採取し、O-test を行い、感染後の時期と陽性率、及び病変の程度と陽性率との関係を考察し、併せて一部の動物にはツベルクリン皮膚反応、血球凝集反応及び溶血反応をも行つて、血中抗体産生の有無をたしかめた。

## 実験方法

実験動物：白色 d d 系マウス約 20g のもの 100 匹、モルモット 350~400g で Römer 陰性のもの 38 匹、及びウサギ約 2000g 10 匹を実験に用いた。

使用菌株及び接種方法：人型菌 H37Rv の 2 週間培養菌をエムルジオンとして、マウスには 0.1mg を尾静脈に、モルモットには 0.01mg を皮下に接種した。ウサギには 10 匹中 5 匹に上記人型菌を 1mg、残り 5 匹には長田が肺結核患者から分離した非定型抗酸菌<sup>2) 3) 4)</sup> のうち 2 株 (大成、磯川) の 2 週間培養菌 3mg ずつを左側睪丸実質内に接種した。

採血方法：マウスでは感染後、3, 4, 5, 6, 7, 9 週

目に 10~20 匹宛より採血した。モルモットにおいても同様 3 週目より毎週採血し、9 週以後は、12 週目と 15 週目に採血した。感染後 12 週及び 15 週のモルモットにはツベルクリン皮内反応を行った。マウスは各匹とも全採血し、全例解剖したが、モルモットは各匹とも 3 乃至 4 週の間隔において 2 回採血した。個々の血清はいずれも 56°C 30' 非働性にして用いた。ウサギは 1 匹宛ずつから感染後 6 週まで毎週 2~3 cc ずつ採血した。

病変所見：マウスは毎回採血後解剖し、肉眼的所見を観察し、比較的所見の少ないものと多いものを 1 匹ずつ選り病理組織学的所見を併せて観察した。モルモットは毎回採血したものの中より at random に数匹ずつ、第 12 週目は 11 匹、第 15 週目は残り 6 匹全部を屠殺し、肉眼的並びに病理組織学的所見を観察した。ウサギにおいては睪丸の発赤腫脹を観察したが、1 頭の睪丸は常に腹腔内にとどまり触診不可能であつた。しかし剖検によつて著しく腫脹し、大部分が壊死に陥つてゐることを認めた。睪丸の所見については別に報告した<sup>5)</sup>。

血清学的変化：主として Ouchterlony 法を用いて寒天内抗原抗体反応を行った。抗原としては前述のように H37Rv、及び非定型抗酸菌 (大成、磯川) を Youmans 培地に培養し、その培養液を用いた。抗原及び O-test 用寒天の作り方及び実験方法は前報<sup>6)</sup> で報告したので省略する。モルモット及びウサギの一部の血清について、ツベルクリンの多糖体分劃を抗原として Middle-brook Dubos の赤血球凝集反応及び溶血反応を行った。

Kiyo SUSHIDA, Norimasa HIRANO, Yukio OCHIAI, Shizu NAGAKAWA & Mi Seon CEON  
(Department of Bacteriology, Tokyo Women's Medical College) : The detection of antibodies in the serum of tuberculous animals. — Studies by Ouchterlony double diffusion method.

## 実験成績

マウスにおける成績：菌接種後3週目に採血した19匹中、1匹（No.6マウス）の血清だけが抗原H37Rvと反応し、1本のbandを生じたが、隣接するNo.10マウスの血清との間にもbandを生じた。第4週目20匹、第

表1 実験的結核動物血清のO-test成績  
(抗原：人型菌H37Rv)

接種菌	動物	菌接種後の日数(週)							
		3W	4	5	6	7	9	12	15
人型菌 H37Rv	マウス	1/19	0/20	0/10	0/10	1/10	2/10		
	モルモット	0/10	0/10	0/10	0/3	0/8	0/10	ツベルクリン反応全例(+) 0/11 0/6	

分母……被検動物数  
分子……O-test陽性数

5週目10匹のマウスの血清は全く反応を示さなかった。第6週目においては10匹中9匹（No.51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60）の血清が著明なbandを示した。第7週目には10匹中1匹（No.63）と、第9週目の10匹中1匹（No.73）の血清は著明に、他の1匹（No.71）の血清は弱い反応を示した。（写真1）

これらマウスの剖検所見は肉眼的には病変の程度にやや軽重の差があつたが、肺臓には点状結節様の灰白点が多数認められ、相当大きいものもあつた。かかる変化は感染後第4週目より観察されたが、第6週目以後ではO-test陽性のものにもまた大部分のO-test陰性のものにもいずれも大きい結節が認められた。陰性例の中、数匹（No.61, 62, 66, 75）には髄血様斑紋のみで結節様の変化は認められなかつた。病理組織学的には肺臓に剝離性肺炎、気管動脈周囲における細胞浸潤が認められ、殆ど全例に程度の差こそあれ同様の病変が観察された。

1例を除いて乾酪変性は認められなかつた。

モルモットにおける成績：表1に示すように感染後第15週目まで全例の血清がO-test陰性であつた。しかしツベルクリン反応は感染後12週のもの11匹、15週のもの6匹の大部分に強陽性に現れた。

剖検の結果、4週及び5週目のものの肺臓、肝臓、脾臓に非常に小さい結節様灰白点が認められ、病理組織学的には肝臓、脾臓及び淋巴腺に大小の結節、肺臓には結節と剝離性肺炎が観察され、結節の大きいものには乾酪変性が認められた。かかる肉眼的、組織学的変化は程度の差があつても15週目まで観察され、12週以後のものではproductiveの変化も混在して認められた。

ウサギにおける成績：表2に示すように菌接種後1, 2, 4, 6週目の採血血清について実験した。O-testの抗原として人型菌H37Rvを用いた場合は菌を接種してから1週目で、1匹（No.4）の血清が陽性を示し、2

表2 実験的結核ウサギ血清のO-test成績

抗原	接種菌	ウサギ No.	菌接種後の日数(週)				
			1W	2	4	6	
人型菌 H37Rv	人型菌 H37Rv	1	-	-	-	-	
		2	-	-	+	+	
		3	-	-	-	-	
		4	+	-	+	+	
		5	-	+	+	+	
	非定型抗酸菌	磯川	6	-	-	+	+
			7	+	-	-	-
		大成	8	-	-	-	-
			9	-	-	+	+
			10	-	-	-	-
磯川	非定型	6	+	+	+	+	
		7	+	+	+	+	
	大成	8	+	+	+	+	
		9	+	+	+	+	
		10	+	+	+	+	
	抗酸菌	磯川	6	+	+	+	+
			7	+	+	+	+
		大成	8	+	+	+	+
9	+		+	+	+		
10	+		+	+	+		

週目ではNo.5ウサギ血清が陽性を示した。このように感染後早い時期では陽性を示すものが少なく、また不安定であつたが、4週目になると、5匹中3匹（No.2, 4, 5）の血清が陽性を示し、6週目にも陽性反応を示した。非定型抗酸菌（磯川、大成）を接種したウサギでも同様であつて、感染後、4週目以後に反応陽性のものが多く、その数はやや少ない。（写真II）しかし非定型抗酸菌を接種したウサギの血清とそれの抗原との反応は早く出現し、感染後1週目のウサギ血清が全部著明な反応帯を示し、4週目に到るも同様であつた。反応帯の数については未だ検討不十分であるが、人型菌を抗原とした場合は大体1本であつたが、非定型抗酸菌を抗原とした場合は2～5本出現し、大成株と磯川株を交互に抗原として用いた場合も全く同様の反応を示した。（写真III）これらのウサギの病変については別に詳細に報告したが、人型結核菌接種のものでは肉眼的に著明な結核様変化を認め、非定型抗酸菌を接種したものでも軽度ではあつたが全身の結核性変化を認めた。

血球凝集反応及び溶血反応：O-test陰性のモルモット血清について沈降抗体以外の抗体を証明しようと思つて血球凝集反応と溶血反応を行つた。

抗原としてはツベルクリン原液を透析後、原量まで濃

縮し、これを20倍稀釈として用いた。モルモット血清は感染後3週目から15週目までの間の29匹と、対照として上記 O-test 陽性のウサギの血清を用い、それぞれ4倍稀釈より試験管10本まで倍数稀釈を行い、上記抗原を0.25cc ずつ加え、さらに洗滌した感作血球 (0.5%) 0.25cc を加え 37°C 1 時間作用せしめた。

その結果は表3に示すように、感染後4週目に2匹

表3 実験的結核モルモット血清における血球凝集反応及び溶血反応

感染後 日数(週)	モルモ ット No.	血清の稀釈									
		2×2n									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 W	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 "	11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 "	29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2
6 "	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 "	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 "	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	49	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
12	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 "	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	71	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ ~ - ..... 血球凝集反応  
4 ~ 0 ..... 溶血反応

(No.11, 19), 9週目に1匹 (No.49), 12週目に2匹 (No.55, 57) の血清が4~8倍稀釈で凝集反応陽性を示し、これに補体を加えた。溶血反応では4週目の2匹が約200~300倍まで溶血を示した。15週目の1匹 (No.71) は以上のものよりやや強く、32倍まで凝集した。対照として用いたウサギの血清では人型菌を接種したものでは3週目の4匹ともいづれも8~32倍までの凝集反応

表4 実験的結核ウサギ血清における血球凝集反応及び溶血反応

感染後 日数	ウサギ No.	血清の稀釈									
		2×2n									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 W (人型菌)	1	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
9 日 (非定型 抗酸菌)	6	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
	10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

を示し、溶血反応では10本全部完全溶血を示した。非定型抗酸菌を接種したものでも試験管1~2本の差はあつたが、両反応とも同様の成績であつた。ウサギの血清でも人型結核菌と、非定型抗酸菌のいずれの感染の場合では血球凝集反応及び溶血反応によつて差を見出すことは出来なかつた。

モルモットの場合に血球凝集反応及び溶血反応陽性のものと陰性のものとの間における病理学的所見に差はみとめられなかつた。

考 案

著者らの実験によると、結核菌感染後の沈降抗体出現の時期は O-test によると、マウスでは大凡6週目以後に、ウサギでは4~6週目が最も多く、人型菌を抗原とした場合には、人型菌感染の場合も、非定型抗酸菌感染の場合もほぼ同様であつた。モルモットでは感染後15週に到るも沈降抗体を証明することが出来なかつた。

実験的結核動物における病状の経過と沈降抗体との関係を研究した報告は未だないようである。モルモットは結核菌によく感染するので沈降抗体のような抗体は容易に証明されるであろうと想像していたが、予期に反して O-test では全然証明されなかつた。ウサギは人型結核

菌には感染しないといわれているが、かつて有馬<sup>7)</sup>が研究し、またわれわれの研究によつても結核菌をウサギ睾丸内に接種すると、睾丸に結核性病変を起すばかりでなく、しばしば肺臓、肝臓、脾臓もおかし、ウサギの人型結核菌への感受性は相当強いようである。沈降抗体は人型結核菌を睾丸内に接種後1週頃から現われ、6週になると接種したウサギの大部分に証明された。従つてウサギはこの方面の研究には非常に適した動物であると思う。非定型抗酸菌をウサギの睾丸内に接種した場合においても、睾丸のみならず、内臓諸臓器をおかし、沈降抗体も著明に証明された。

結核菌を接種したモルモットの血清による血球凝集反応は接種後4週、9週、及び12週目のものに少数ながら陽性に現われ、溶血反応は感染後4週のもの及び15週目のものに極めて少数例に証明された。また上記のウサギ血清による血球凝集反応及び溶血反応の成績から人型結核菌H37Rvと非定型抗酸菌とを区別することはできなかった。

先に著者らは肺結核患者血清についてO-testを用いて沈降抗体の検出を計るとともに臨床所見との関係などについて検討した<sup>8)</sup>が様々の症状をもつた患者の場合には発病の時期などとの関係は不明瞭であつた。

#### 結 論

マウス、モルモット及びウサギ(睾丸内接種)に人型結核菌H37Rvを、他のウサギに非定型抗酸菌を接種して、逐目的に採血してその血清についてO-testを行い、他方各被検動物の肉眼的及び病理組織学的変化を検して両者の関係について観察した。その結果

- ① マウスでは感染後大凡6週目に最もO-test陽性数が多く現はれたが、結核性変化の程度の差との関係は認められなかつた。
- ② モルモットでは感染後15週までO-testは全例陰性で、これらの動物は、ツ反応は強陽性にあらはれるが、血球凝集反応及び溶血反応はごく少数のものに陽性反応

を示したが、titerは低かつた。

③ ウサギでは人型結核菌接種群では感染後4週目位よりO-test陽性のものが増し、非定型抗酸菌接種群でもほぼ同様であつたが、同株抗原に対してはすでに1週目より陽性反応を示した。血球凝集反応及び溶血反応では全例に陽性反応を示し、そのtiterはモルモットのそれより高く、更に非定型抗酸菌接種群では高い価を示した。

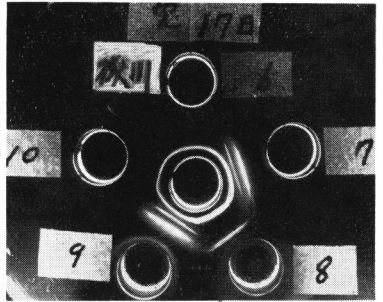
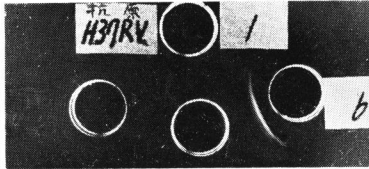
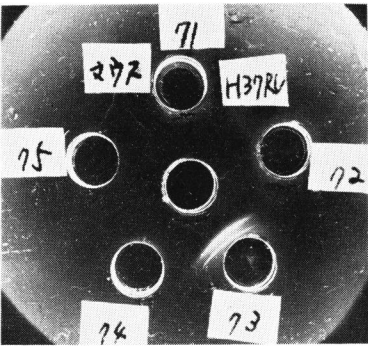
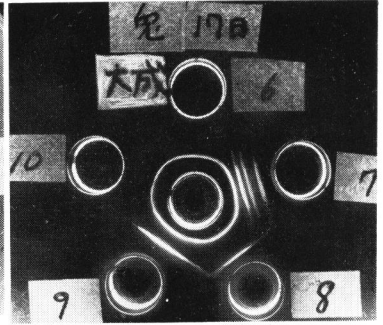
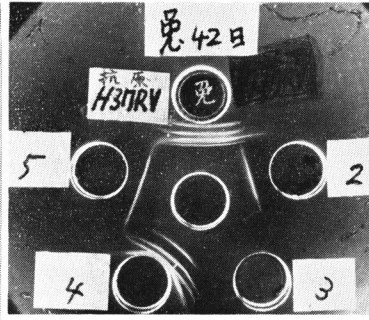
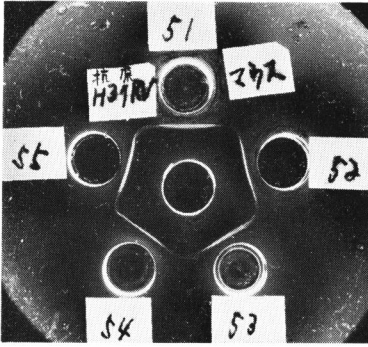
④ 結核菌を感染させた動物の血清についてO-testを行つた場合には、動物の種類によつて抗体産生の時期、あるいわ程度が異なる。

⑤ ウサギの睾丸内に人型結核菌H37Rv及び非定型抗酸菌を接種すると、睾丸に病変が起るばかりでなく、内臓諸臓器もおかされ、沈降抗体も比較的早い時期から証明される。したがつてかかる研究にはウサギは非常に適した動物であると思う。

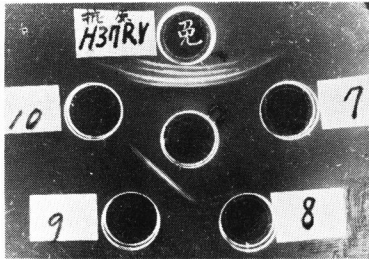
病理組織学的検査は本学病理学教室今井三喜教授の厚意によるところ多大である。ここに謝意を表する。

#### 文 献

- 1) Burrell, G.R., Rheins, M. & Birkeland, M.J.: Am. Rev. Tuberc., 74, 239, 1956
- 2) 長田富香: 日本細菌学雑誌 15 74 (昭 35)
- 3) 張 登川: 東京女医大誌 30 100 (昭 35)
- 4) 須子田キヨ, 平野憲正: 第14回日本細菌学会関東支部総会発表 (昭 35)
- 5) 全 美善: 東京女医大誌, 8, 掲載予定 (昭 35)
- 6) Sulitzenu, D.: J. exp. Path., 39 367 (1958)
- 7) 有馬頼吉: 内田三千太郎による, 細菌学雑誌, No.259 演9 (大正6)
- 8) 平野憲正, 須子田キヨ, 落合章雄, 長川静, 三神美和, 小山千代, 竹内富美子: 第35回日本結核病学会総会発表 (昭 35)
- 9) 平野憲正, 須子田キヨ: 医学と生物学 55, 169, (昭 35)



中心は抗原：H37RV  
 マウス血清：51~55… 感染後6週目  
 71~75… " 9"



中心は抗原， {上…大成  
 下…磯川

ウサギ血清：  
 6.7…非定型抗酸菌接種（磯川）  
 8.9.10… " （大成）

中心は抗原，H37RV  
 ウサギ血清：  
 1~5…人型菌接種  
 6.7…非定型抗酸菌接種（磯川）  
 8.9.10… " （大成）  
 免…人型菌H37RVで免疫したウサギ血清