

細菌多糖類の抗原性に関する研究

第 2 編

Proteus X19 菌多糖類の沈降反応と Weil-Felix
反応の關係に就いて

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 大田原一祥教授)

専攻生 横 山 衛

〔昭和 32 年 11 月 1 日受稿〕

目 次

第 1 章 緒 論	第 2 節 発疹チフス及び発疹熱の既往 歴を有する者並びに発疹熱患 者の血清に対する沈降反応及 び細菌凝集反応
第 2 章 実験材料	第 3 節 沈降反応 (Uhlenhuth 氏法) 抗原価に対する Weil-Felix 反応凝集価の比較
第 3 章 実験方法	第 5 章 考 按
第 1 節 家兎の免疫	第 6 章 結 論
第 2 節 沈降反応及びその判定	
第 3 節 細菌凝集反応 (Weil-Felix 反 応) 及びその判定	
第 4 章 実験成績	
第 1 節 抗 Proteus X19 菌家兎血清に 対する沈降反応及び凝集反応	

第 1 章 緒 論

細菌多糖類が Hapten として、それ自身で免疫した場合には抗体を作り得ないに拘らず、細菌で免疫した抗体とは試験管内に於て抗原として作用する事は、肺炎双球菌についての Heidelberger¹⁾, Avery²⁾ の実験以来幾多の研究者によつて認められた事実である。

又、発疹チフス及び発疹熱患者の血清と Proteus X19 菌とが凝集反応を呈することによつて診断的価値を有する事は、Weil-Felix³⁾ の発見以来臨床的に多く利用されている事柄である。

Castaneda⁴⁾⁵⁾⁶⁾ 等は Proteus X19 菌より含水炭素系物質を抽出し、これと発疹チフス患者血清との間に沈降反応の成立することを認めた。又、Bendich⁷⁾ 等は三塩化醋酸法により抽出した多糖類を用いて発疹チフス患者血

清と、同様に沈降反応を行つている。

一方、黒屋⁸⁾ 等は中性及び酸性加熱法で抽出した多糖類が、発疹チフス患者血清と沈降反応を生じ、且つその価が Weil-Felix 反応の凝集価と平行する事を認め、岡本⁹⁾ 等も同様の方法で両者の価が平行することを認めている。

著者は、三塩化醋酸法を用いて Proteus X19 菌多糖類を抽出し、これと Proteus X19 菌で免疫した家兎抗血清、発疹熱患者及び発疹チフス並びに発疹熱の既往歴を有する者の血清との間に沈降反応を行い且つ Weil-Felix 反応と対比して、興味ある関係を証明したので、ここに報告する。

第 2 章 実験材料

(1) 使用菌:

使用菌は岡山大学医学部微生物学教室保存

の *Proteus* X19 菌の分与を受けて之を使用した。

(2) 動物：

免疫のための動物は体重約 3,000 gm の家兎を用いた。

(3) 患者血清：

現在発疹チフス及び発疹熱患者の発生が殆んど見られないために、主として昭和19年より昭和25年に至る間に既往歴を有する者及び昭和30年に散発した発疹熱患者より得た血清を実験に供した。

(4) *Proteus* X19 菌多糖類：

前記 *Proteus* X19 菌より三塩化醋酸抽出法により第1編に於て述べた如く抽出精製して使用した。精製粉末は Biuret 反応陰性、Molisch 反応強陽性である。

第3章 実験方法

第1節 家兎の免疫

前記 *Proteus* X19菌を試験管普通寒天斜面培養基に 37°C, 20時間培養し、その1斜面を 10 cc の生理的食塩水に浮遊せしめ、それを 60°C, 2時間重湯煎中で加温殺菌し、これを前記家兎に1週間2回の間隔で第1回 1 cc, 第2回 2 cc, 第3回 3 cc, 以後 3 cc 宛耳静脈内に注射し、第16回注射後3日目に全採血してその血清を分離した(第16回注射後家兎の衰弱甚きためやむなく3日目に全採血を行った)。血清には 1:100 の Merthiolate をその 1/100 容量加えて保存した。

第2節 沈降反応及び其の判定

(1) 沈降反応：

前述の方法によつて得た家兎抗血清を抗体とし、同じく前述の多糖類を抗原として抗原抗体稀釈法¹⁰⁾により沈降反応を行った。即ち 1%アラビヤゴム生理的食塩水溶液を用いて抗体を、生理的食塩水を用いて抗原を各々稀釈し、これら抗原及び抗体を沈降反应用毛細試験管内にて重層した。

患者血清は Uhlenhuth 氏法¹¹⁾により前述の多糖類を抗原として沈降反応を行い抗原価を検定した。抗原対照には生理的食塩水を、

抗体対照には正常家兎血清を、患者血清に対する対照には健康人血清を使用した。

(2) 反応の判定

抗原抗体を重層後接触面に白輪の生じたものを陽性とし、重層後15分で陽性のものを卅, 30分卅, 1時間卅, 2時間+を以て表し、然らざるものを-と記した。

第3節 細菌凝集反応(Weil-Felix 反応)及びその判定

前記 *Proteus* X19 菌を試験管普通寒天斜面培養基に 37°C, 20時間培養し、この菌の3白金耳を 10.0 cc の生理的食塩水に浮遊せしめた後、60°C の重湯煎中で2時間加温殺菌する。次に生理的食塩水を以て所定の稀釈度に稀釈した被検血清の各 1.0 cc に対し、この菌浮遊液を毛細ピペットを用いて各4滴宛加え、よく振盪した後、2時間、37°C に保存して凝集の有無を検し、更に24時間氷室に留置した後成績を判定した。

判定には肉眼及び Agglutinoscope を用い、凝集の強さによつて卅, 卅, +を以て表し、反応陰性のものを-とした¹²⁾。

第4章 実験成績

第1節 抗 *Proteus* X19 菌家兎血清に対する沈降反応及び凝集反応

Proteus X19 菌多糖類と抗 *Proteus* X19 菌家兎血清との抗原抗体稀釈法による沈降反応に於ては、第1表に示す如く、抗原価 1:

第1表 沈降反応

Proteus X19 菌多糖類 ← 抗 *Proteus* X19 菌家兎血清系

抗原稀釈	抗体稀釈				
	1:1	1:5	1:10	1:25	1:50
1: 1,000	卅	卅	卅	-	-
1: 2,500	卅	卅	卅	-	-
1: 5,000	卅	卅	卅	卅	-
1: 10,000	卅	卅	卅	卅	-
1: 25,000	卅	卅	卅	卅	-
1: 50,000	卅	卅	卅	-	-
1: 100,000	-	-	-	-	-

50,000, 抗体価1:25, 結合帯抗原価1:10,000であつた。

又, Proteus X19 菌と本抗血清との細菌凝集反応は, 第2表に示す如く, 24時間値に於て1:2,500の凝集価を示した。

第2表 細菌凝集反応
Proteus X19菌 ← → 抗 Proteus X19菌
家兎血清系

検体	時間	稀釈倍数						
		1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	1:10,000
抗血清	2時間	+	+	±	-	-	-	-
	24時間	++	++	+	+	+	-	-
正常家兎血清	2時間	-	-	-	-	-	-	-
	24時間	±	±	-	-	-	-	-
生理的食塩水	2時間	-	-	-	-	-	-	-
	24時間	-	-	-	-	-	-	-

第2節 発疹チフスの既往歴の既往歴を有する者並びに発疹熱患者の血清に対する沈降反応及び細菌凝集反応

第3表に示す如く, 発疹チフスの既往歴を有する者2例(第1例は年令30才の女子, 昭和20年12月満洲ハルピン市新香坊日本人收容所に於て罹患。第2例は年令41才の男子, 昭和19年2月朝鮮咸鏡南道安辺郡安辺邑に於て罹患)の血清に対する沈降反応及び細菌凝集反応(Weil-Felix反応)は, 次の如くである。即ち, 第1例(罹患後10年を経過)に於ては Uhlenhuth 氏価1:2,500, 凝集価1:500を示した。又, 第2例(罹患後11年を経過)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:500, 凝集価1:250を示した。対照例(健康者)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:100, 凝集価1:50であつた(凝集価はいづれも24時間価, 以下同様)。又, 第4表に示す如く, 発疹熱の既往歴を有する者(5例)の血清に対する沈降反応及び細菌凝集反応では, 第1例(罹患後6年を経過せる者)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:250, 凝集価1:100を示し, 第2例(罹患後5年を経過せる者)に於ては,

第3表 発疹チフスの既往歴を有する血清の沈降反応及び凝集反応

1) 沖○妙○♀30才昭和20年12月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗体稀釈	抗原稀釈						
	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	
1:1	+++	+++	++	+	-	-	

細菌凝集反応

抗体稀釈	反応時間						
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	
2時間	+	±	±	-	-	-	
24時間	+++	+	+	+	-	-	

2) 光○誠○♂41才昭和19年2月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗体稀釈	抗原稀釈						
	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	
1:1	+++	+++	++	-	-	-	

細菌凝集反応

抗体稀釈	反応時間						
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	
2時間	+	-	-	-	-	-	
24時間	+++	++	+	±	-	-	

対照

井○ア○♀27才

沈降反応 (Uhlenhuth)

抗体稀釈	抗原稀釈						
	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	
1:1	+++	-	-	-	-	-	

細菌凝集反応

抗体稀釈	反応時間						
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	
2時間	±	-	-	-	-	-	
24時間	+	-	-	-	-	-	

Uhlenhuth 氏価1:250, 凝集価1:100を示し, 第3例(罹患後5年を経過せる者)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:500, 凝集価1:

第4表 発疹熱の既往歴を有する血清の沈降反応及び凝集反応

1) 今○峰○♀30才昭和24年11月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	卍	卍	-	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	卍	卍	-	-	-
2 時間	-	-	-	-	-	-
2 4 時間	卍	+	-	-	-	-

2) 波○野○太○♂47才昭和25年12月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	卍	卍	±	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	卍	卍	±	-	-
2 時間	±	-	-	-	-	-
2 4 時間	+	+	±	-	-	-

3) 北○鶴○♀29才昭和25年12月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	卍	卍	卍	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	卍	卍	卍	-	-
2 時間	-	-	-	-	-	-
2 4 時間	+	+	+	-	-	-

4) 柴○一○♂35才昭和24年2月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	卍	卍	-	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	卍	卍	-	-	-
2 時間	±	-	-	-	-	-
2 4 時間	卍	+	±	-	-	-

5) 湯○元○♂54才昭和25年2月罹患
沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	卍	卍	-	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	卍	卍	-	-	-
2 時間	-	-	-	-	-	-
2 4 時間	+	+	±	-	-	-

対 照

土○保○♀31才

沈降反応 (Uhlenhuth)

抗原稀釈	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	-	-	-	-	-

細菌凝集反応

抗体稀釈	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	1:1	-	-	-	-	-
2 時間	-	-	-	-	-	-
2 4 時間	-	-	-	-	-	-

250, 第4例(罹患後6年を経過せる者)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:250, 凝集価1:100, 第5例(罹患後5年を経過せる者)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:250, 凝集価1:100を示した. 対照例では, 沈降反応は抗原稀釈1:100, 凝集反応は抗体稀釈1:50に於ていづれも陰性であった.

又, 第5表に示す如く, 発疹熱患者(3例)の血清に対する沈降反応及び細菌凝集反応では, 第1例(発病後7日)に於ては, Uhlenhuth 氏価1:1,000, 凝集価1:500,

第5表 発疹熱患者血清の沈降反応及び凝集反応

1) 横○伊○松○ 49才昭和30年10月罹患 発病後7日

沈降反応 (Uhlenhuth)

		抗原稀釈				
		1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
抗体稀釈	1:1	卍	卍	卍	卍	-

細菌凝集反応

		抗体稀釈				
		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000
反応時間	2時間	+	+	-	-	-
	24時間	卍	+	+	+	±

2) 確○千○ 46才昭和30年10月罹患 発病後6日

沈降反応 (Uhlenhuth)

		抗原稀釈				
		1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
抗体稀釈	1:1	卍	卍	-	-	-

細菌凝集反応

		抗体稀釈				
		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000
反応時間	2時間	-	-	-	-	-
	24時間	+	+	±	-	-

3) 柴○四○ 18才昭和30年10月罹患 発病後6日

沈降反応 (Uhlenhuth)

		抗原稀釈				
		1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
抗体稀釈	1:1	卍	卍	-	-	-

細菌凝集反応

		抗体稀釈				
		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000
反応時間	2時間	-	-	-	-	-
	24時間	+	+	±	±	-

対照

沖○春○♀ 43才

沈降反応 (Uhlenhuth)

		抗原稀釈					
		1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
抗体稀釈	1:1	±	-	-	-	-	-

細菌凝集反応

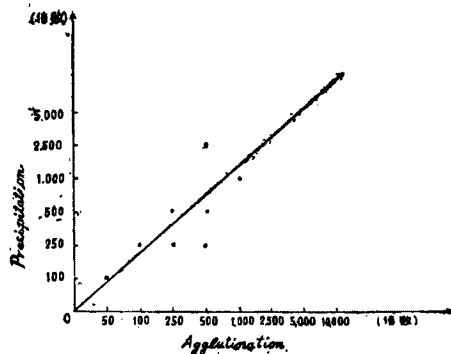
		抗体稀釈					
		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500
反応時間	2時間	-	-	-	-	-	-
	24時間	+	-	-	-	-	-

第2例(発病後6日)に於ては, Uhlenhuth氏価 1:250, 凝集価 1:100, 第3例(発病後6日)に於ては, Uhlenhuth氏価 1:250, 凝集価 1:100 を示した. 対照例に於ては, Uhlenhuth氏価 1:100 (疑陽性), 凝集価 1:50 を示した.

第3節 沈降反応 (Uhlenhuth 氏法)
抗原価に対する Weil-Felix
反応凝集価の比較

上述の沈降反応及び凝集反応の成績を得た結果, 第6図に示す如く, 横軸に凝集価を求め, 縦軸に Uhlenhuth 氏価を求めて, 両者を比較するに, 両者は平行関係にある事を認め得た.

第6図 沈降反応 (Uhlenhuth) に対する凝集反応比較関係図



第5章 考 按

黒屋⁸⁾等 は中性及び酸性加熱法で抽出した

本菌多糖類と発病後20~85日の間の発疹チフス患者血清との間に沈降反応を行い、1:1,000乃至1:4,000,000の抗原価を認め、又、同一患者の発病後の時期による反応の程度を比較して、発病後40日乃至50日に於て最も高い抗原価を示し、70日以上経過すれば1:5,000乃至1:1,000に低下すると述べている。

著者の場合は、このような血清が得られなかつたが、発疹チフス及び発疹熱の既往歴によつて入手した血清を主とし、又、発病後1週間前後の血清を併せて検したのであつて、当然その抗原価は低いが、罹患者5~10年に於て1:250乃至1:2,500の抗原価を認め、又、発病後6~7日に於て1:250乃至1:1,000の抗原価を認め得た事は興味ある事実と思われる。然して、本多糖類は抽出に當つて加熱除蛋白操作がないために、その抗原性が比較的損われない状態にあると思われ、かつ前編に於て述べた如く、抽出収量及び純度共秀れているので、多糖類抗原として充分使用に耐え得るものと思う。

第6章 結 論

三塩化醋酸法により抽出した *Proteus* X19 菌多糖類を用いて、抗 *Proteus* X19 菌家兎血清、並びに発疹熱患者、発疹チフス及び発

疹熱の既往歴を有する者の血清との間に、沈降反応を行い、かつ同時に行つた Weil-Felix 反応と比較して、次の如き成績を得た。

(1) 抗 *Proteus* X19 菌家兎血清との抗原抗体稀釈法による沈降反応では、抗原価 1:50,000, 抗体価 1:25, 結合帯抗原価 1:10,000 であり、細菌凝集反応による凝集価は 1:2,500 であつた。

(2) 発疹チフス及び発疹熱の既往歴を有する者には抗体が残存し、その血清との沈降反応では、抗原価は 1:250 乃至 1:2,500 であり、Weil-Felix 反応による凝集価は 1:100 乃至 1:500 であつた。

又、発疹熱患者血清との沈降反応の抗原価は、1:250 乃至 1:1,000 であり、その細菌凝集価は、1:250 乃至 1:1,000 であつた。

(3) 沈降反応抗原価と Weil-Felix 反応凝集価は平行関係を有する。

(4) 本多糖類は長期保存が可能な特徴を有する。

稿を終るに當り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師大田原教授に深謝するとともに、種々御助言を戴いた緒方助教授に謝意を捧げる。

(本論文の要旨は昭和30年11月第65回岡山医学会総会、及び昭和31年4月第26回日本衛生学会総会に於て発表した)

主 要 文 献

- 1) Heidelberg, Goebel, Avery: *J. Exp. Med.*, 42, 701, 1925.
- 2) Heidelberg, Goebel, Avery: *J. Exp. Med.*, 42, 727, 1925.
- 3) Weil-Felix: *Wien. Klin. Wochenschr.*, Nr. 2, S. 29, 33, 927, 1916.
- 4) Zinsser, Castaneda: *J. Exp. Med.*, 56, 455, 1932.
- 5) Castaneda, Zia: *J. Exp. Med.*, 58, 55, 1933.
- 6) Castaneda: *J. Exp. Med.*, 60, 119, 1934.
- 7) Bendich, Chargaff: *J. Biol. Chem.*, 168, 283, 1946.
- 8) 黒屋, 川上: *血清学免疫学雑誌*, 3 (3) 377, 昭和17年.
- 9) 岡本, 吉沢: *日本細菌学雑誌*, 1 (2) 241, 昭和19年.
- 10) Ogata: *Z. f. Immunität Forschung, Org.* Bd. 39, 270, 1924.
- 11) Uhlenhuth: *Prkt. Anleitung Zur Ausführung biologischer Eiweissdifferenzierung*, (Jena) 1909.
- 12) 緒方: *血清学実験法(その手ほどきから)*, 南山堂書店, 昭和19年.

Studies on the Antigenicity of Bacterial Polysaccharides

Part 2:

On the Relationship Between Precipitation by *B. Proteus* X19
Polysaccharide and Weil-Felix Reaction

By

Mamoru Yokoyama

Department of Public Health Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. K. Ohtahara)

With the use of polysaccharide of *B. Proteus* X19 extracted by trichloracetate method, the author has performed precipitation between this polysaccharide and anti-serum of the rabbit immunized with *Proteus* X19 on one hand, and this polysaccharide against serum of *Febris exanthematicus* patient and serum of those having anamnesis of typhus exanthematicus and *Febris exanthematicus* on the other hand; and comparing these results with those with Weil-Felix reaction performed concomitantly, the following results have been finally obtained.

1) In the precipitation with anti-*Proteus* X19 rabbit serum by antigen-antibody-dilution method, various values have been found to be: antigen titer, 1:50,000; antibody titer, 1:25; and antigen titer of binding zone, 1:10,000; while the agglutination titer has been 1:2,500.

2) Antibody has remained in those patients having anamnesis of typhus exanthematicus or *Febris exanthematicus*. In the precipitation with their serum antigen titer has been found to be 1:250-1:2,500; while the agglutination by Weil-Felix reaction has been 1:100-1:500.

Furthermore, in the precipitation with serum of *Febris exanthematicus* patient antigen titer has been found to be 1:250-1:1,000; while the agglutination titer is 1:250-1:1,000.

3) The antigen titer of precipitation runs parallel to the agglutination titer of Weil-Felix reaction.

4) This polysaccharide seems to possess a special feature which makes it possible to be kept for a long period of time.
