

3 痘瘡痂皮の抗原性に関する研究

痂皮の補体結合反応による痘瘡の診断について

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)

北海道立衛生研究所技師 寒河江和子

痘瘡の診断は臨床的にた易いようであるが実際的に屢々細菌学的診断の抜けをかりなければ適確に決定され難い場合に遭遇することは免かれ難い。

痘瘡と水痘との鑑別を必要とする場合は既に優れた痘瘡の細菌学的診断法が知られている今日に於ても、なお依然として経験される。

北海道に於ても茲2・3年引続いて水痘の小流行があつて、それが痘瘡ではないかと疑われ、痘瘡の研究室的診断法が陰性なることによつて速に水痘に外ならないことが決定され、騒がれずに済んだ類例を見ている。

このことは一面から考えると、痘瘡の実験的診断法がまだ改善の余地があることを示している。たとえそれが優れたものであるとしても、不便な点があるとか、或は慣れた人でなければその成績が信頼し得ないとか、とにかく他の細菌学的反応のように保健所の技術者が手がけることの難しいような缺点をもつてゐることが推測される。

然しながら果して俄に理想的な痘瘡の診断法が見出されるであろうか。恐らくそれは至難であろう。

茲に於て先ずそれを誘導する意味に於て即ちその前段階として色々と違つた診断法を考案乃至実施して、これを学界に提示するのがよいと思われる。

又違つた方法はそれぞれ自ら使途を異にするから、そのあるものは他の方法の企て及ばない応用の途を見出し得て、意外な利点を有するかも知れない。

著者は友人伊藤学士の厚意により保存された痘瘡患者の痂皮を入手することが出来たので Craigie & Wishart (1936) が報告し、厚生省衛生検査指針に於て推奨されている痘瘡診断法として患者の痂皮を抗原とする補体結合反応を行つた成績について報告する。

なお、痂皮抗原を以てせる沈降反応の成績及びこの抗原性の安定度などについて述べる。

痘瘡の細菌学的診断法として患者血清が入手し易い場合には、著者が先きに山田教授等との協同研究で発表した牛痘毒鶏血球凝集抑制反応が優れた成績を示す。¹⁾ 又無疹性痘瘡のように早く経過する痘瘡であれば抗体による反応ではなく、血液中の痘毒の微量証明法としての中村教授の家兎睪丸接種法がよい。

痘瘡内容が得られるならば Paul の家兎角膜接種法を試むべきである。又勿論痘瘡基本小体の染色を行つて見るのも1法である。

若し患者の痘瘡痂皮による補体結合反応の優秀なることが知られるすれば、痘瘡の発生に際して、心掛けて痂皮の採取を行うことはた易い。この反応は水痘との鑑別をなすことも可能である。

Sugai (1909)²⁾ は痘瘡内容と痘瘡患者血清を用いて補体結合反応の出来ることを見出した。その後牛痘又は痘瘡ウイルスが患者及び種痘者血清の抗体と結合し補体をとることが多くの研究者によつて報告されている。著者の本研究と直接関係ある文献としては Kolmer (1916)³⁾ が彼の牛痘及び痘瘡の補体結合反応に関する研究のうちで、痘瘡患者の痂皮又は膿疱内容を用いて牛痘家兎免疫血清との補体結合反応の可能であることを認めているのが嚆矢であろう。この問題はその後学界の注目から逸脱していたが、1936年になつて Craigie と Wishart⁴⁾ によつて改めて脚光をあびて来た。即ち彼等は痘瘡例に於ける補体結合反応の価値を極めて高く評価し、それが鋭敏な反応であり、普通の研究室で容易に行うことが出来、又 0.008g の痂皮又は6ヶの膿疱内容があれば抗原として充分役立つことを長所としてあげている。

実験材料及び方法

抗原：痘瘡痂皮は昭和21年に札幌市に於て流行した時、患者から採取し使用時まで、室温で乾燥器内に保存しておられたものである。この10倍及び50倍食塩水乳剤を作り、3回凍結融解後 3000 rpm. 15分間遠心沈澱した上清を抗原Aとした。この沈澱に更に20倍量の生理食塩水を加え、凍結融解を繰返し遠心沈澱した上清を抗原Bとして、抗原の抵抗性を調べるために利用した。

抗血清：家兎痘毒免疫血清を用いる。即ち牛痘毒家兎睪丸苗の種々な発痘量を有するように稀釋したものをお正常家兎の皮内に接種した後、同じ睪丸苗を1週間の間隔で3回、2cc. ずつ耳静脈内に注射して hyperimmunize し、一部採血によつて得た血清である。この抗血清は補体結合反応の時は65°20分、沈降反応の時は56°30分間加熱非動化した。

補體結合反応：米国陸軍軍医学校法によつた。はじめ抗原稀釋と抗血清稀釋を組合せて抗原と抗血清の値を測定し、種々の処置を行つた材料の抗原価測定には、2単位の抗血清を用い抗原を2倍階段稀釋して行つた。

沈降反応：重層法を用い、抗血清に数本の抗原階段稀釋液を重ね 37°C 孵卵器内において、1時間後と2時間後に判定した。

赤血球凝集反応：吾々が嘗つて発表した方法⁵⁾によつた。

実験結果

1. 痂皮の抗原性

先ず抗原稀釋列と抗血清稀釋列を組合せて補体結合反応を行いその抗原価と抗体価を測定した。その結果は表1及び2に示した通りである。即ち抗原Aの場合抗原価は25600倍で、抗原Bでは256倍であつた。

表1. 痂皮の補結抗原性（抗原A）

抗血清稀釋倍数	3200	6400	12800	25600	51200
痂皮稀釋倍数					
32	4	4	4	4	0
64	4	4	4	0	0
128	3	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0

表2. 痂皮の補結抗原性（抗原B）

抗原稀釋倍数	40	80	160	320	640	1250	2560	5120
抗血清稀釋倍数								
16	4	4	4	4	4	4	4	0
32	4	4	3	2	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0

60倍であつた。

更に抗原Aに就て沈降反応と鶏赤血球凝集反応を行つた。免疫血清に抗原の食塩水稀釋液を重ねて沈降反応をした結果は3200倍まで陽性であつた。（表3）

表3. 痢皮の沈降原性

抗原稀釈倍数	200	400	800	1600	3200	61000
	+	+	+	+	+	-

2. 補體結合性抗原の抵抗性

痘瘡痂皮は著しく高い補結抗原性を示したので抗原Bを用い抗原の抵抗性を検査した。

痂皮乳剤を80°C30分間又は100°C15分間加熱すると白色の沈殿を生じ上清は水様透明になる。それでこれらは 3000rpm. 15分間遠心沈殿した上清を使つた。これに反し痂皮乳剤を予め N/10 の苛性ソーダで pH8 にして加熱する時は100°C15分間加熱しても沈殿を生じない。これらの処置をした材料は反応の結果、無処置で加熱したもののが 10×2^{11} から 10×2^{10} に低下していたのに対しアルカリ処置後加熱した材料は100°C15分間加熱してもその抗原価は対照と等しく 10×2^{11} であつた。即ち痂皮の補結抗原は加熱処置に対し比較的の安定であつて、耐熱性抗原の存在することを考えさせる。

次に材料に水銀石英燈で紫外線を種々の時間照射した。2ccの痂皮乳剤を直径約4cmのシャーレ

表4. 補結抗原の抵抗性

稀釈 10×2^n	n=6	7	8	9	10	11	12
80° 30'	4	4	4	4	4	2	0
100° 15'	4	4	4	4	4	2	0
アルカリ -80° 30'	4	4	4	4	4	4	0
100° 15'	4	4	4	4	4	4	0
uv 5'	4	4	4	4	4	4	0
10'	4	4	4	4	4	0	0
20'	4	4	4	4	0	0	0
30'	4	4	4	0	0	0	0
エーテル	4	4	4	4	4	0	0
クロロフォルム	4	0	0	0	0	0	0
PH-4	4	4	4	4	0	0	0
PH-8	4	4	4	4	4	1	0
無処理	4	4	4	4	4	4	0

た。N/10 の塩酸と苛性ソーダで材料の PH を大体4.0と8.0にし、室温に30分間おいた後それぞれの PH を7.2に修正して抗原価を測定した。塩酸処置により抗原価は 10×2^{11} から 10×2^9 に低下し、アルカリ処置によつて 10×2^{10} に低下していた。即ち抗原因子は酸処置によつて比較的多く破壊されるが、アルカリ処置では極く僅かの影響より受けない。

又有機溶媒による影響を検索しようとして、痂皮乳剤をエーテル及びクロロフォルムで処置した。細い遠心沈殿管に材料を2cc. 入れ等量のエーテル及びクロロフォルムを加え、直ちに錫箔で包んだコルク栓をして激しく振盪した後3000rpm. 15分間遠心沈殿して溶媒と生じた沈殿を除いた。その結果エーテル処置による抗原価の低下は僅かで 10×2^{11} から 10×2^{10} に下つたのみであつたが、クロロフォルム処置した材料は 10×2^6 に著明な低下を示した。

斯様に補体結合反応、沈降反応共に著しく高い抗原性のあることを示したにも拘らず、赤血球凝集反応では20倍希釈でも凝集像を認めるることは出来なかつた。

入れ、その周囲に水と氷を入れて冷却しながら 10cm の距離で 5 分、 10 分、 20 分、 30 分間照射した。抗原価は 5 分照射では何等影響を受けず対照と同じ 10×2^{11} であるが、 10 分間照射すると 10×2^{10} に、 20 分間照射で 10×2^9 に、 30 分照射で 10×2^8 に低下する。即ちその補結抗原価は階段的に低下するが、 30 分間照射しても抗原性は残つている。

補体結合性因子の酸及びアルカリに対する抵抗性を調べようとして次のような実験を行つ

た。室温に30分間おいた後それ

結 論

1. 痘瘡痂皮は牛痘毒家兎免疫血清との補体結合反応及び沈降反応には高い銳敏度を有する。然し鶏赤血球を凝集しない。
2. 補体結合性抗原は抵抗性強く比較的安定である。
3. 痘皮乳剤の補体結合反応は著しく銳敏な反応であり、その抗原は強い抵抗性を有するが、この材料は水疱を形成する第4病日頃から痂皮を作る第14病日頃までの比較的長い期間に亘つて得ることが可能である。従つて吾々の研究室のように抗血清が常に用意されていれば12~24時間以内に抗原の有無を知ることが出来る。

斯様な利点を有するから痂皮の補体結合反応が痘瘡の診断の上になす役割は大きく評価されてよい。

なお、この抗原を用い、種痘善感者血清との反応なども行う積りである。

文 献

- 1) 山田、その他：日本細菌学雑誌，6，182，1951.
- 2) Sugai, T : Zbl. Bact., Abt. I orig. 49, 650
- 3) Kohmer : J, Immunol., 1, 59, 1916
- 4) Craigie & Wishart : Canad. publ. Health. J., 24, 72, 1936
- 5) 山田、寒河江：北海道立衛生研究所報(I), p. 53, 昭26.4.