

# モルモット血清によるタンニン酸処置 赤血球凝集現象に関する研究

## 第 3 報

強毒結核菌一、BCG一及び加熱結核菌一接種モルモット並びに健常  
モルモットについて血清の TE 凝集反応力の比較実験

金沢大学結核研究所薬理部（主任：伊藤亮教授）

宮 本 乙 男

（受付：昭和39年3月5日）

### 緒 言

さきに伊藤等は<sup>1,2)</sup>、モルモットの新鮮血清の一定稀釈液（1:64—1:128）に、低温でタンニン酸処置を行なった同種属赤血球を加えるとたちまち強い凝集反応が起こる、しかもこのタンニン酸処置赤血球凝集反応（Tanned Erythrocyte (TE) 凝集反応）が結核感染モルモット血清に甚だ顕著に現われることを観察した。氏等は更にこの新しい赤血球凝集現象の意義に関して、モルモット血清中にはタンニン酸処置赤血球に対する凝集因子（Agglutinator）とその阻止因子（Inhibitor）の2つが共存していて、健常動物では均衡状態にある両者の力量関係が結核感染動物では失調をきたし、その結果 TE 凝集作

用の増大が起こつたものであろうと論じた。

TE 凝集反応が結核動物血清に顕著に現われるという実証は、結核の病態生理学的見地から極めて重要な意義をもつものと考えられる。そこで著者は、結核感染と血清の TE 凝集作用との影響関係を精査する目的をもつて、本研究において、結核感染モルモット、BCG 接種モルモット及び死菌接種モルモットの3動物群について、正常動物を対照としてそれら動物の血清の TE 凝集作用を、菌接種後4カ月間にわたつて定期的に追究した。ここにその成績を報告する。

### 実 験 方 法

赤血球、血清及び凝集反応などに関する実験方法はすべて前報告<sup>1,4)</sup>に記載された方法に従つた。

#### 1. 赤血球

心臓穿刺で得た健常モルモット（体重500—700 gm）の血液を、1.2倍容量の Alsever 氏液<sup>5)</sup>に混和して遠心（2,500 r. p. m., 5分間）する。分離した赤血球を磷酸緩衝液加生理的食塩水（0.85% 食塩水 1,000 ml に 0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.0—7.2, 100 ml を加えたもので、以下単に食塩水と呼ぶ）で4回洗滌し、最

後に食塩水を加えて原血液量とする。

#### 2. タンニン酸処置赤血球浮游液の調製。

下記操作はすべて低温室内（2° ± 2°C）で行なわれた。

タンニン酸（局方、武田製薬）の 1:10,000 溶液（食塩水に溶解）40 ml に前記洗滌赤血球浮游液 2 ml を混和し、30分間放置する。次いで赤血球を遠心（3,000 r. p. m., 3分間）分離し、食塩水（約 30 ml）で3回洗滌した後、食塩水を加えて全量を 2 ml とし、氷水

中に保存する。タンニン酸処置赤血球は調製後ただちに使用することとした。

### 3. 動物

体重 400-500 gm の多数の健康モルモットを下記のように所要致(実験期間中の死亡による損失を見越して余分に用意した)ずつの群に区分した。

#### 第 I 回実験 :

第 1 群. 結核感染<sub>1</sub>(H37Rv 0.5 mg, 皮下接種)

第 2 群. BCG 接種 (BCG 0.4 mg, 皮内接種)

第 3 群. 対照 (無処置)

#### 第 II 回実験 :

第 1 群. 結核感染 (H37Rv 0.5 mg, 皮下接種)

第 2 群. 加熱死菌接種 (100°C, 1時間加熱した H37Rv 5 mg, 腹腔内注射)

第 3 群. 対照 (無処置)

人型結核菌 H37Rv 及び BCG は Sauton 培地に約 3 週間培養したものをを用いた。

菌接種後およそ 1 月毎に各群からモルモット 3 匹ずつを取り出して心臓穿刺によつて全採血 (約 15-20 ml) を行なつた。結核感染動物では、採血後ただちにと殺、剖検して、肝、脾、肺における病変を肉眼的に

検査して、その程度を適宜分類 (一から III まで) して記録した。

### 4. 血清

前記各群モルモットから心臓穿刺によつて採つた血液を室温で凝固させて血清を分離した。血清は分離後できるだけ早く実験に使用することとした。また血清を保存する必要がある時は、そのまま無菌的に 0-5°C で保存した。

### 5. 赤血球凝集試験

所要数の遠心沈降管 (12 mm × 100 mm) に先ずタンニン酸処置赤血球浮遊液 0.2 ml ずつをとり、次いで被検血清の 2 倍過下稀釈液 (1:2 - 1:1,024) 4 ml ずつを各管に加え、よく混和した後、混合液を室温に静置して 5 分毎に透過光線によつて肉眼的に血球凝集の有無強弱を観察した。凝集反応の程度を、- (陰性)、± (血球凝集は起こつたが管底に沈積するに至らない)、III (血球は著明に凝集して殆んど完全に管底に沈積した)、及び +, ++, +++ (管底に沈積した凝集血球量の多少によつて適宜区分した) として記録した。附表の成績は反応開始 25 分後の最終判定である。

## 実験成績

実験は 2 回に分けて行なわれた。即ち第 I 回実験では、結核感染モルモット群、BCG 接種モルモット群及び対照モルモット群について 5 月 14 日から 9 月 11 日 (1962 年) までの 4 月間にわたつて、毎月 1 回各群の 3 動物から採血して、血清の TE 凝集反応力を比較測定することによつて、結核感染または BCG 接種によつて、血清の TE 凝集反応力にどのような影響が現われるかを追究した。また第 II 回実験 (実験期間: 8 月 29 日 (1963 年) から 1 月 13 日 (1964 年) まで) では、結核感染、死菌接種及び対照の 3 モルモット群について、第 I 回実験と同じようにして血清の TE 凝集反応力を比較検討した。第 1 ないし 6 表は、これら 2 回の実験で得られた成績を示したものであるが、実験の主要成績を表について説明すれば次の如くである。

#### 第 I 回実験 :

第 1, 2 及び 3 表に掲げた血清の TE 凝集試験の成績を比較すれば明らかなように、強毒人型結核菌 H37Rv 0.5 mg を皮下接種した結核感染モルモット群では、血清の TE 凝集反応力は他の 2 群 (BCG 接種群及び対照群) より遙かに顕著であつた; 即ち、菌感染 1 月後の試験においてすでに被検 3 血清は何れも 1:64 及び 1:128 稀釈で、+, ++ または +++ 程度の血球凝集を起こした。そして、1:2 から 1:32 までの低稀釈液では却つて凝集反応は陰性であつて、伊藤等<sup>2)</sup>の記載したように Inhibiting Prozone を伴つた典型的な TE 凝集反応を示したのである。更に菌感染後、4 カ月間にわたつて行なわれたその後の検査でも、各血清はこれとほぼ同等あるいはこれよりも強い凝集作用を示した。即ち、大多数の血清は 1:64-1:256 の稀釈域内で ++ あるいは +++ 程度の強反応を示し、しかも第 5 号及

び第7号血清の如く Inhibiting Prozone に著明な血球凝集の出現をきたしたのもあつた。

感染モルモットの剖検による内臓の肉眼的病変の程度は表に記載した如く、全動物に高度の結核病変の像が見られた。しかし、第6号モルモットの如く内臓病変も比較的軽度で血清の凝集作用も弱いものもあれば、一方また第2号モルモットの如く内臓病変は高度でありながら血清凝集作用は左程顕著でないものもあつて、血清の TE 凝集反応力の強さと内臓病変の肉眼的所見とは必ずしも完全な平行関係を示さなかつた。

感染動物群とは対蹠的に、BCG 接種モルモット群及び対照モルモット群では、血清の TE 凝集力は実験全期間を通じて一般に微弱であつた。例えば、BCG 群の第1、2及び3号血清や対照群の第2、3及び4号血清では、TE 凝集反応は全く陰性であつた。その他の大多数の血清は何れも1:64または1:128稀釈で±ないしⅢ程度の反応を呈したに過ぎなかつた。しかし少数ではあるが、BCG 群第5号血清や対照群第5及び10号血清の如く、かなり強い反応(Ⅲ)を示すものもあつた。

## 第Ⅱ回実験：

上記第Ⅰ回実験によつて強毒結核菌感染モルモットの血清が、BCG 接種及び正常モルモット血清より遙かに強い TE 凝集反応を示すことが実証された。そこで次ぎに、強毒結核菌の生菌感染とその死菌感作とでは、モルモット血清の TE 凝集反応力の消長に違いがあるかどうかをしらべるため、第Ⅱ回実験として、結核感染(H37Rv 0.5mg, 皮下接種)モルモット群、死菌接種(100°C, 1時間加熱 H37Rv 5mg, 腹腔内注射)モルモット群及び正常モルモット群(対照)の3群について、前回同様にして、血清の TE 凝集反応を菌接種後4カ月にわたつてしらべた。実験成績は第4、5及び6表に示された如くである。これらの表を通覧して先ず注目されることは、第4表の結核感染モルモット群における血清の TE 凝集反応が極めて顕著

——前回第1表動物群よりも更に強い——であることである。各表の主要成績は次の如くである。

### 第4表 結核感染モルモット。——

(1) 菌感染1月後に行なつた TE 凝集反応力検査では、被検3血清は何れも低稀釈域(1:2ないし1:32)における陰性帯につづいて、1:64ないし1:256稀釈において+ないしⅢ程度の強い凝集を示した。しかもこの時期では、動物の内臓における病変の程度はまだ左程著しいものではなかつた。

(2) 菌感染2月以後に検査したすべてのモルモットでは、血清の TE 凝集反応は更に顕著なものがあり、特に通常1:64ないし1:256の稀釈範囲に限局して現われる陽性域が拡大される傾向が認められた。例えば、第7号血清では1:2から1:256までの全稀釈域にわたつて+ないしⅢの、血清稀釈度に平行した凝集反応が起こつた。また第5号及び第10号血清では低稀釈域の陰性帯の一部(1:2から1:4または1:8)に強陽性反応が現われた。なお感染2月以後では、すべてのモルモットに剖検で高度の結核病変が認められた。

### 第5表 死菌接種モルモット。——

死菌感作のモルモット群では、すべての血清が多少とも TE 凝集を呈した。しかしその反応力は前表血清に比して遙かに弱く、また凝集も1:32ないし1:256の稀釈範囲内に限局したものであつて、前表血清のように凝集反応域の拡大を示したものはなかつた。また反応の強さは血清によつて区々であつて、

(1) 第3、6及び11号血清のようにはなはだ微弱(±)のものもあれば、

(2) 第7及び10号血清のように結核感染動物に匹敵する程の強い反応(Ⅲ)を示すものもあり、

(3) その他のものは中等度(+またはⅡ)の反応を呈した。

### 第6表 正常モルモット。——

対照の正常モルモット群では、血清の TE 凝

集反応力は一般にはなはだ弱く、大多数の動物は1:64ないし1:256の稀釈範囲内において弱陽性（±または+）凝集反応を起こしたに過ぎなかつた。しかし正常モルモットでも、第2号及び第3号血清のようにならかなり強い（++または

+++）凝集を呈したのもあつた。

なお第5表と第6表の成績を比較すると、全体的に死菌感作群血清の方が正常群血清より凝集反応力においてやや優るものがあるように思われる。

## 考 察

伊藤等はTE凝集現象に関する研究において、  
 (1) TE凝集が結核感染モルモット血清ではなはだ著明に起こり、正常血清では一般に弱い、

(2) TE凝集反応が通常血清の一定稀釈範囲に局限して現われる、

(3) 血清をタンニン酸処置赤血球で前処置することによつて、そのTE凝集作用が著しく増大する、

ことを観察し、これらの事象を説明するため、血清中に互いに相反する作用をもつた2つの因子（凝集因子と阻止因子）が共存し、TE凝集反応の顕現や増減が、両者の相対的力量関係によつて支配されるものであると論じた。次いで山崎<sup>4)</sup>は、ヒトあるいはウシの血清Glycoprotein 標品がTE凝集反応に対し強力な阻止作用を発揮することを明らかにして、伊藤等が想定したモルモット血清中の阻止因子の実在性に関して重要知見をもたらした。

上述の実験成績において、結核感染動物群が全期間を通じて常に正常動物群より遙かに顕著なTE凝集反応を呈したこと、しかもその際血清活性の増大が単に既定稀釈域内における個々の反応の増強だけに止どまらずに、更に血清の凝集反応陽性稀釈域の拡大となつて現われたことは、伊藤等の主張に対し有力な証左を与えたものである。

またこの実験成績では、BCGや強毒菌の死菌を接種したモルモット血清のTE凝集力が正常血清と大差なく（第5表と第6表の成績を比較すると、死菌接種モルモット群血清が全体的に正常モルモット群血清よりTE凝集力がや

や強いような傾向もないではないが）、結核感染動物血清より遙かに弱かつたことは、血清のTE凝集反応増強現象の結核感染症における病態生理学的意義の重要性を示唆したものであると共に、他方また血清のTE凝集活性が個体のツベルクリン・アレルギーによつて殆んど影響されないことを明示したものである。

しかしここで、上記の実験成績において、正常モルモット群の血清中にも少数ながら相当強いTE凝集反応を呈するものがあつたことを指摘しておかねばならない。この事實は、その原因は不問としても、血清のTE凝集反応の増強が結核感染症に特異な現象ではないことを示すものとして注目される。

動物の結核感染の経過にともなう血清のTE凝集反応の時間的關係については、第1表ならびに第4表の成績に見られるように、血清のTE凝集反応力は、感染1月後においてすでに明らかに増強を示し、感染2月後の検査では更に強大となり、それ以後は殆んど消長することなく同程度の強度を保持した。この結果から、少なくともここに適用された感染条件では、TE凝集反応力の増強をもたらした血清成分の変動が、感染後極めて早期に起こつたと考えられるのである。

ヒト及び動物の結核感染症において血清成分にいろいろな変化が起こることは一般によく知られているのであるが<sup>6,7,8)</sup>、本研究の結核感染モルモットに実証されたTE凝集反応を指標とする血清の異常性が、血清成分の如何なる変化によるものかの問題は今後に残された大きな課題である。

## 結 論

結核菌（人型 H37Rv）感染モルモット群、BCG 接種モルモット群及び加熱死菌（H37Rv）接種モルモット群について、正常モルモット群を対照として、血清の TE 凝集作用を菌接種後 4 カ月間にわたって検査して次の結果を得た。

1. 対照の正常モルモット群では、大多数の血清の TE 凝集作用は陰性または微弱であった。しかし一部少数の血清はかなり強い TE 凝集作用を示した。

2. 結核感染モルモット群では、血清の TE 凝集力は他の何れの動物群よりも著しく強大であった。しかも結核血清の TE 凝集反応力の増大は、菌感染 1 月後の検査ですでに認めることができた。

3. BCG 接種モルモット群ならびに加熱死菌接種モルモット群では、血清の TE 凝集作用は正常血清と大差がなかった。

Table 1

Experiment I. Group 1. Tuberculous guinea pigs.

Infection : H37Rv 0.5 mg, subcutaneously, May 14, 1962.

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination*										Tuberculous lesions in visceral organs**		
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Spleen (gm)	Liver	Lung
1	June 12	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	++ (1.03)	##	##
2		-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	## (2.0)	##	###
3		-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	### (2.12)	±	###
4	July 17	-	-	-	-	##	##	-	-	-	-	### (3.18)	###	##
5		##	-	-	-	-	±	##	-	-	-	## (0.9)	+	±
6		-	-	-	-	-	±	+	-	-	-	## (0.85)	-	+
7	Aug. 12	##	-	-	-	±	##	##	-	-	-	### (4.62)	###	±
8		-	-	-	-	-	##	##	##	-	-	## (2.2)	###	##
9		-	-	-	-	-	##	##	+	-	-	### (3.0)	###	###
10	Sep. 11	-	-	-	-	-	##	##	-	-	-	± (0.98)	##	±
11		-	-	-	-	-	##	##	±	-	-	## (1.32)	##	##
12		-	-	-	-	-	##	##	##	±	-	### (3.13)	###	###

\* The hemagglutination was graded by noting the gross amounts of settled cells on the bottom of the tube.

- = negative. ± = clumping with little or no settling. ### = almost complete settling. +, ## and ## = intermediate settling.

\*\* The intensity of macroscopical lesions was arbitrarily graded from ± to ###.

文 献

- 1) Ito, R., & Akiyama, M. : Japan. J. Tuberc., 10, 102, 1962.      2) Ito, R., & Akiyama, M. : Amer. Rev. Resp. Dis., 88, 553, 1963.      3) Ito, R., & Akiyama, M. : Nature, 200, 791, 1963.      4) 山崎隆吉 : 金大結核年報, 21 (下), 259, 1963.
- 5) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93, 107, 1951.      6) Stary, z. et al. : Klin. Wschr., 31, 399, 1953.      7) Sher, B. C. et al. : Amer. Rev. Tuberc., 77, 120, 1958.      8) Borornkitti, S. : Amer. Rev. Resp. Dis., 85, 58, 1962.

Table 2

Experiment I. Group 2. BCG-vaccinated guinea pigs.  
Vaccination : BCG 0.4 mg, intracutaneously, May 14, 1962.

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	June 12	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	July 17	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
5		-	-	-	-	-	++	###	-	-	-
6		-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
7	Aug. 12	-	-	-	-	-	±	++	±	-	-
8		-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	++	±	-	-
10	Sep. 11	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
11		-	-	-	-	-	±	++	-	-	-
12		-	-	-	-	-	-	+	±	-	-

Table 3

Experiment I. Group 3. Normal guinea pigs (Control)

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	June 12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	July 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		-	-	-	-	-	+	###	-	-	-
6		-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
7	Aug. 12	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
8		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	Sep. 11	-	-	-	-	-	++	###	±	-	-
11		-	-	-	-	-	±	+	±	-	-

Table 4

Experiment II. Group 1. Tuberculous guinea pigs.

Infection : H37Rv 0.5 mg, subcutaneously, August 29, 1963.

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination										Tuberculous lesions in visceral organs		
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Spleen (gm)	Liver	Lung
1	Oct. 1	-	-	-	-	±	##	++	+	-	-	± (1.28)	-	+
2		-	-	-	-	-	##	##	++	-	-	± (0.82)	±	-
3		-	-	-	-	-	++	##	+	-	-	++ (0.95)	-	-
4	Nov. 11	-	-	-	+	++	##	##	++	-	-	### (2.6)	###	##
5		##	##	##	-	-	##	##	++	-	-	++ (1.25)	##	++
6		-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	++ (0.8)	##	++
7	Dec. 9	##	##	##	##	##	##	##	+	-	-	## (1.2)	###	++
8		-	-	-	-	±	##	##	+	-	-	## (2.3)	##	+
9		-	-	-	-	-	##	##	+	-	-	++ (1.2)	+	±
10	Jan. 13 1964	##	±	-	-	##	##	##	##	±	-	## (1.45)	###	++
11		-	-	-	-	##	##	##	++	-	-	### (4.58)	##	++

Table 5

Experiment II. Group 2. Guinea pigs inoculated with dead tubercle bacilli.

Inoculation : Heat-killed H37Rv 5 mg, intraperitoneally, August 29, 1963.

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	Oct. 1	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-
2		-	-	-	-	-	±	++	±	-	-
3		-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
4	Nov. 11	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-
5		-	-	-	-	-	++	++	±	-	-
6		-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
7	Dec. 9	-	-	-	-	+	##	++	±	-	-
8		-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
9		-	-	-	-	-	+	++	-	-	-
10	Jan. 13 1964	-	-	-	-	+	##	##	-	-	-
11		-	-	-	-	-	-	±	-	-	-

Table 6  
Experiment II. Group 3. Normal guinea pigs (Control).

Guinea pig No.	Bleeding	Titration of serum for TE-agglutination									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	Oct. 1	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
2		-	-	-	-	-	++	+++	+	-	-
3		-	-	-	-	-	++	++	+	-	-
4	Nov. 11	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
5		-	-	-	-	-	±	+	-	-	-
6		-	-	-	-	-	±	+	-	-	-
7	Dec. 9	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
8		-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
9		-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
10	Jan. 13 1964	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-