

感作血球の免疫学的研究

第 19 報

赤痢菌加熱浸出液感作血球の免疫学的意義

第 1 編 赤痢菌加熱浸出液の抗原性の検討*

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

柳 穎也

（受付：昭和38年2月10日）

緒 言

1948年 Middlebrook & Dubos¹⁾, 1950年 Smith & Scott²⁾および Middlebrook³⁾により感作血球凝集反応ならびに溶血反応が体系づけられて以来、結核症における血清学的研究のめざましい進展は衆知のとおりである。

1955年当教室の西東ら⁴⁾が旧ツベルクリン(OT)感作血球をウサギに静注することにより容易にかつ高価の抗OT抗体が得られることを報告しており、小林⁵⁾、登谷⁶⁾、不室⁷⁾、恒元⁸⁾らにより一連の研究が行われ、松井⁹⁾はチ

フス菌について菌体物質の化学的構成々分と免疫学的性状の関連性を追研している。私はこれら感作血球免疫に関する研究の一環として菌型分類の困難な赤痢菌について実験を行い、抗原抗体系の解明を試み、更には感作血球を使用する血清学的反応の臨床診断的価値を検討する目的で、まず赤痢菌の粗製加熱浸出液の血球感作原性とその感作血球の免疫原性とを追究し、いささか知見を得たのでここに報告する次第である。

実験材料ならびに実験方法

1) 使用菌株

Sh. flexneri 2a, Sh. flexneri 1b, および Sh. sonnei の3菌株を使用した。以下それぞれ 2a, 1b および son と略記する。

2) 菌加熱浸出液の作製

普通寒天培地 37°C 24時間培養の前記各菌株を 50 mg/ml の割合に生理的食塩水（以下「生食水」）に浮遊し、100°C 1時間加熱後一夜冰室に放置した後、4,000 r.p.m. 30分間遠心沈殿（以下遠沈）し、その上清を Seitz 細菌濾過器で濾過し 0.5% の割合にカルボ

ルを加えて冰室内に保存した。この浸出液（以下「E」）を原液とし、生食水で所要濃度に希釈して使用した。

3) 動 物

体重 2.5kg 内外の白色健康ウサギを使用した。使用に先立ちこれらウサギの血清が 2a, 1b, および son 菌を凝集せず、又それぞれの E 感作血球を凝集しないことを確かめた。

4) 血 球

自己または同種の正常ウサギ血球を用いた。採血方法は西東らの記載⁴⁾に従った。

* 本論文の要旨は昭和35年5月8日第5回日本結核病学会北陸地方学会において発表した。

5) 感作血球の作製方法

採取したウサギ血球を生食水で3回遠沈洗浄し、得られた血球1容を5倍希釈E20容に混じ37°Cの温浴中に約10分ごとに振とうしつつ2時間置いた後、生食水で3回遠沈洗浄し、血球沈殿に生食水を加えて所要濃度の血球浮遊液を作り、実験に供した。

6) 免疫原および免疫方法

i) 菌免 疫

普通寒天培地37°C24時間培養の2a, 1bおよびsonを1mg/mlの割合に生食水に浮遊し、56°C30分間加熱したのちその1mlあてを1週おきに3回ウサギの耳静脈より注射した。

ii) E感作血球免疫

各E感作血球の10%生食水浮遊液5mlあてを5日おきに4~5回ウサギ耳静脈より注射した。

7) 採 血

前記免疫ウサギより、各注射前および最終注射後1週ごとに採血して血清を分離し、反応に供した。又抗体価の最高となった時期に全採血し、血清を分離して、-20°Cに保存した。

8) 反応術式

a) 菌凝集反応

普通寒天培地24時間培養の前記3菌株をそれぞれ

1mg/mlの割合に生食水に浮遊し、56°C30分間加熱したものと反応抗原とした。反応術式ならびに判定は小西の記載¹⁰⁾に従った。

b) 感作血球凝集反応、溶血反応、血球凝集反応阻止試験ならびに溶血反応阻止試験はすべて西東の記載⁴⁾に従った。

c) 沈降反応

重層法によった。抗原はEの倍々希釈列各10容と0.1%コレステリンアルコール溶液各1容とを急速に混和して作製した。抗体価は、抗原希釈および血清希釈による場の形で表わした。

d) 菌体ならびにE感作血球による吸収

i) 菌体による吸収

普通寒天24時間培養の各菌体を集め、56°C30分間加熱後、生食水で3回遠沈洗浄した後、菌体沈殿を4倍希釈の抗血清に加えて37°C1時間温浴中に置いた後、4,000 r. p. m. 30分間遠沈して菌体と抗血清とを分離した。菌体は算出量の数倍量を数回に分けて用い、吸収操作を繰り返した。

ii) E感作血球による吸収には算出量の数倍量のE感作血球を用いて、前記と同様に吸収操作を繰り返した。

実験成績

I) Eの化学的性状

3菌株より得た各E(原液)についてその化学的性状を検討したところ、糖および蛋白定性反応はいずれも陽性を呈した。(第1表)

II) Eの血球感作能

各種濃度の2a-E, 1b-Eおよびson-Eで感作された血球とそれぞれ抗2a菌血清、抗1b菌血清および抗son菌血清との間でまず凝集反応を行った。各Eとも原液では溶血を起すため、2倍より順次希釈して感作原とした。第2表から明らかなるべく、2a-Eおよび1b-Eでは270倍希釈まで、son-Eでは7,200倍希釈までに血球感作能が認められた。しかしいずれのEの感作能も2~5倍希釈で最高を示し、以下希釈するに従い低下した。

次に溶血反応を行い、その成績を第3表に掲げた。これによると2a-Eは90倍希釈まで、1b-Eは30倍希釈まで、son-Eは800倍希釈ま

で感作能を示すことが明らかである。更にここでも2~5倍希釈Eに最高の感作能が認められた。よって以下の実験には5倍希釈Eを血球感作原として用いた。以上は抗菌血清を用いて得られた成績であるが、次項実験により得られた3抗E感作血球血清によってもこれとほぼ同様の成績が得られたことを付記する。(第4,5表)

III) E感作血球の免疫原性

各E感作血球の10%浮遊液5mlあてを5日おきに4~5回ウサギ耳静脈に注射し、各注射前および最終注射後1週ごとに採血して得た血清について反応を行い、抗体産生の推移を死菌免疫ウサギのそれと比較検討した。第1図から明らかなるべく、死菌免疫群、感作血球免疫群とも初回注射5~7日後には菌凝集素およびE感作血球凝集素の産生がみられ、最終注射1週後両抗体価はともに最高となり、後次第に低下した。菌免疫群では菌凝集価とE感作血球凝集

価とはほぼ平行して上昇し、E感作血球凝集価は菌凝集価よりわずかに高く、免疫開始後3週目ではE感作血球凝集価の1:8,192～1:16,384に対し菌凝集価は1:4,096～1:8,192であった。感作血球免疫群では菌免疫群におけると同様高価のE感作血球凝集素の産生がみられたが、菌凝集素の産生は低く、両抗体価の最高となつた最終注射1週後では、E感作血球凝集価の1:4,096～1:8,192に対し菌凝集価は1:256～1:1,024と低く、感作血球免疫による菌凝集素の産生が菌免疫の場合より劣ることが認められた。

IV) 交 差 反 応

全採血して得た各抗血清について菌凝集反応、E感作血球凝集反応、同溶血反応ならびに沈降反応を交差的に行い、各抗原および各反応の特異性を比較検討した。

a) 菌 凝 集 反 応

6抗血清について菌凝集反応を行うと、第6表のごとく各菌株間にはかなりの程度類属性が認められ、特に2a-1b間の類属性は2aあるいは1bとsonとにおけるよりも高かつた。

b) 感作血球凝集反応

各E感作血球と6抗血清との間で凝集反応を行うと、第7表のごとく前述の菌凝集反応とはほぼ同様のPatternが認められた。しかしE感作血球凝集反応では菌凝集反応に比し、各菌株の菌型特異性がより明瞭であることを認めた。しかしながら抗E感作血球血清では3菌株間の類属性は抗菌血清におけるより高く、菌凝集反応との間にも顕著な差は認められなかつた。

c) 感作血球溶血反応

溶血反応においても血球凝集反応におけると同様、各E感作血球がいずれも当該菌抗血清と特異的に反応することが認められた。特に抗菌血清では、2aあるいは1bとsonとの類属性は全く認められなかつた。しかしながら抗E感作血球血清では前述の感作血球凝集反応で観察されたと同様、かなり高い類属反応を呈した。

(第8表)

d) 沈 降 反 応

6抗血清と各Eとの交差沈降反応では第9表のごとく各抗血清とも当該菌Eと特異的に反応することが認められた。抗菌血清では2a, 1b間にかなりの類属性が認められたが、抗E感作血球血清では認められず、2aあるいは1bとsonとの類属性はいずれの抗血清でも認められなかつた。

一方、各抗菌血清および抗E感作血球血清と当該菌Eとの沈降反応におけるそれぞれの場の形を比較すると、抗菌血清では少なくとも3反応系を示す場の形が認められ、抗E感作血球血清では前者に比し場の形が小さく、かつ反応系も少ないことが認められた。

V) 阻 止 試 験

6抗血清について各Eの阻止能を比較検討した。第10, 11表から明らかに各Eはいずれも各抗血清の当該菌E感作血球凝集反応ならびに溶血反応を特異的に阻止することが認められた。

VI) 吸 収 試 験

前述の交差反応から、2a, 1bおよびsonの3菌株のうち、2aと1bとの間にはかなり高い類属性が認められ、2aあるいは1bとsonとの間にもある程度の類属性が認められた。更にE感作血球凝集反応ならびに溶血反応では、各菌株の菌型特異性が菌凝集反応におけるより明瞭にみられることが認められた。そこでこれら抗原の特異性および類属性を更に追究し、抗菌血清と抗E感作血球血清の質的異同を比較検討するため、各抗血清を各菌体ならびに各E感作血球で交差吸収した。

1) 抗2a血清についての吸収試験

第12表にみられるごとく、抗2a菌血清を当該菌(2a菌)で吸収すると、当該および非当該の各抗原に対応する諸抗体(菌凝集素、感作血球凝集素、溶血素および沈降素)はすべて吸収された。同血清を1b菌体で吸収すると、抗1b抗体および抗son抗体はすべて吸収され、抗2a抗体はほとんど吸収されなかつた。又、son菌体で吸収すると抗son抗体のみが完全に吸収され、抗2a抗体および抗1b抗体はい

ずれもほとんど吸収されなかつた。2a-E感作血球で吸収した場合は、抗2a抗体のうち、感作血球凝集素、同溶血素および沈降素はいずれも吸収されたが、菌凝集素のみはある程度残ることが認められた。抗1b抗体では1b菌凝集素および1b-E感作血球凝集素が残り、抗son抗体はすべて吸収された。1b-E感作血球で吸収すると、抗1b抗体では1b菌凝集素のみがある程度残り、抗son抗体は完全に吸収されたが抗2a抗体はほとんど吸収されなかつた。son-E感作血球で吸収した場合は抗son抗体のみが完全に吸収され、抗2a抗体および抗1b抗体はいずれもほとんど吸収されなかつた。

抗2a-E感作血球血清を上述と同様各菌ならびに各E感作血球で吸収した成績は抗2a菌血清における吸収試験の結果におおむね一致した。(第13表)しかしながらこの血清を当該菌(2a菌)のE感作血球で吸収した場合には、当該ならびに非当該抗原に対応する各抗体はすべて吸収され、この点抗菌血清と相違した。

2) 抗1b血清についての吸収試験

抗1b菌血清および抗1b-E感作血球血清においても抗2a血清におけると同様の成績が得られた。(第14、15表)すなわち、抗1b血清を当該菌(1b菌)で吸収した場合、および抗1b-E感作血球血清を当該菌E感作血球で吸収した場合は当該ならびに非当該の各抗体はすべて吸収され、非当該菌あるいは非当該菌E感作血球で吸収した場合は抗1b抗体はほぼ完全に残つた。

抗1b菌血清を1b-E感作血球で吸収すると、抗1b抗体では1b菌凝集素のみが残り、更に2a菌凝集素および2a-E感作血球凝集素も完全には吸収されなかつた。なおson菌で吸収した場合には抗2a抗体が残ることが認められた。

3) 抗son血清についての吸収試験

抗son菌血清および抗son-E感作血球血清について行った吸収試験でも、抗2a血清および抗1b血清におけると同様の関係が認められた。(第16、17表)すなわち、sonの抗菌血清を当該菌で吸収すると当該および非当該抗原との反応はすべて陰性となるが、当該菌E感作血球で吸収した場合は当該菌凝集反応が残ることが認められた。又、抗son-E感作血球血清を当該菌あるいは当該菌E感作血球のいずれで吸収した場合も、当該および非当該抗原との各反応はすべて陰性となつた。

一方、抗son血清を2aあるいは1b⁻の、菌体あるいはE感作血球のいずれで吸収した場合も、抗2a抗体ならびに抗1b抗体はともに吸収された。このことはsonに由来する抗2a抗体および抗1b抗体がほとんど同一とみなされるものであるか、あるいはきわめて近縁な関係にあるものであろうことを示唆している。

以上の吸収試験の成績から、抗菌血清においては、E感作血球免疫により產生される抗体のほか、更に質的に相違する抗体が存在することが明らかといえよう。

総括ならびに考察

1947年 Keogh, North および Warburton¹¹⁾は *Hemophilis influenzae* の水溶性抽出物質が容易にヒツジ血球を感作し、かつこの感作血球が対応抗体の存在において特異的に凝集されることを報告した。翌年 Middlebrook & Dubos は結核菌抽出液感作血球が結核免疫ウサギ血清および結核患者血清と特異的に凝集することを発表し、1950年 Smith & Scott は旧ツベルクリン(OT)を血球感作原に用い得ることを報告するに及んで、結核症の血清学的診

断法としてこれら感作血球凝集反応が大きく展開され、今日 Middlebrook-Dubos 反応と呼称されている。この反応術式はヴィールス¹²⁾¹³⁾、Tularemia¹⁴⁾、百日咳菌¹¹⁾、コレラ菌¹⁵⁾、淋菌¹⁶⁾あるいは腸チフス菌症¹⁷⁾の検索の面等にまで広範に応用されている。これら血球感作原の抽出には今日多くの方法が用いられておるが、当教室の中島¹⁸⁾および山本¹⁹⁾は結核菌体を蒸留水で煮沸し、大西¹⁷⁾、松井⁹⁾らはチフス菌について同様煮沸して血球感作原

を抽出している。本実験において私もまた赤痢菌体を100°C 1時間加熱して得た浸出液(E)が容易にウサギ血球を感作することを認めた。

感作血球の免疫原性に関しては、先述のごとく西東ら⁴⁾はOT感作血球をウサギに静注し高価の抗OT抗体を得ており、松井⁵⁾はチフス菌加熱浸出液感作血球に免疫原性を認めている。さかのぼって Neter²¹⁾は *E. coli* 加熱 suspension の感作血球をウサギに静注し、感作血球凝集価1:160～1:320の抗血清を得たと報じている。私は2a, 1bおよびson 3菌株のE感作血球をウサギに静注し、高価の抗 *Shigella* 血清を得ることが出来た。

抗 *Shigella* 菌血清について菌凝集反応を対照として感作血球凝集反応を行うと、感作血球凝集価は菌凝集価より高く、感作血球凝集反応が菌凝集反応より鋭敏なように考えられる。一方、E感作血球免疫を行うと、高価のE感作血球凝集素の産生がみられるにかかわらず、菌凝集素の産生は菌免疫の場合に比しはるかに低かった。このことは菌と菌抽出液感作血球との間に明らかな免疫学的性状の差異があることを示している。

各抗菌血清について菌凝集反応、E感作血球凝集反応ならびに溶血反応を行い、各菌株の特異性および類属性を比較すると、後2者の反応では菌凝集反応におけるより菌型特異性が明瞭に認められ、特にE感作血球溶血反応では2aあるいは1bとsonとの類属性は全く認められなかつた。すなわち、E感作血球を用いる反応、特にその溶血反応によって *Shigella* 各菌株特に2a, 1b(B群赤痢菌)とson(D群赤痢菌)とを血清学的に鑑別し得ることを示唆している。一方、抗E感作血球血清では抗菌血清に比較すると各菌株間、特に2aあるいは1bとsonとの類属性が高く、3反応の間にもみるべき差はなかつた。これは菌体の抗原性物質が加熱抽出される際に、その抗原性状になんらかの変化を受けたためか、あるいはEの中に各菌に共通の因子が遊離しているために、E感作血球を注射した場合、高い類属性反応を呈する抗体が産

生されるのではないかと考えられる。一方、沈降反応では、抗菌血清において2a, 1b間の類属反応がみられたのみで、抗E感作血球血清はそれぞれ当該菌のEとのみ陽性反応を呈した。以上のようにE感作血球凝集反応、同溶血反応、および沈降反応では抗血清の免疫方法のいかんによつては菌凝集反応に比して特異性に優れた点がみられることは明らかである。

各 *Shigella* 菌株間の抗原性の相違ならびに抗菌血清と抗E感作血球血清との質的異同を検討するため、3抗菌血清および3抗E感作血球血清をそれぞれの菌ならびにE感作血球で交差吸収した。各抗菌血清を当該菌で吸収すると、当該および非当該のすべての抗体が吸収された。これに反し当該菌E感作血球で吸収すると、対応する諸抗体のうち菌凝集素のみが一部残るほか、非当該抗体については3菌株間に次のような差が認められた。すなわち、抗2a菌(1b菌)血清を2a-E(1b-E)感作血球で吸収すると抗1b菌(2a菌)凝集素および1b-E(2a-E)感作血球凝集素が残り、抗son菌血清を2aあるいは1bの菌体あるいはE感作血球のいずれで吸収した場合も、抗2a抗体および抗1b抗体はいずれも完全に吸収された。このことは、sonに由来する抗2a抗体および抗1b抗体が同一のものであるか、あるいはきわめて近縁な関係にあることを示唆している。一方、各抗E感作血球血清を当該菌あるいは当該菌E感作血球のいずれで吸収した場合も各反応はすべて陰性となつた。このことは、菌免疫により産生される抗体が单一のものではなく、感作血球免疫により産生される抗体となんらかの質的相違をもつてゐることを示している。

さて血球感作因子の本態に関しては、従来種々の検討が加えられその報告も少なくないが、未だ一定の見解をみると至っていない。根津²²⁾らはチフス菌々体物質の血球感作能を検討し、血球感作原は菌体のO物質と同一のものであろうといい、登谷⁶⁾はOT中の血球感作因子はその蛋白にも多糖体にも認められると報告している。本実験において赤痢菌加熱浸出液が

容易にウサギ血球を感作することが認められたが、その化学的性状は第1表のごとく、糖反応、蛋白反応いずれも陽性を呈し、その抽出方法からして耐熱性の抗原を含んでいるものと考えられる。又、このEの阻止能、Eを用いる沈降反応

結

Sh. flexn. 2a (2a), Sh. flexn. 1b (1b) および Sh. sonnei (son) の菌加熱浸出液 (E) の血球感作原性、およびE感作血球の免疫原性を検討し次の成績を得た。

1) Eは容易にウサギ血球を感作し、この感作血球をウサギに静注することにより高価の抗 *Shigella* 血清が得られた。

2) 抗E感作血球血清は抗菌血清に比し、菌凝集価および沈降素価が低かった。

3) 抗菌血清を用いてE感作血球凝集反応、溶血反応および菌凝集反応を行うと、前2者において菌型特異性が著明にみられた。特にE感作血球溶血反応では2aおよび1bとsonとの

の成績、更にはE感作血球の反応原性からみて、各Eがかなりの菌型特異性を持つことは明らかである。しかしながらEの血球感作因子の本態の究明にはなお多くの問題を残しており、今後Eを分画しての検討にまたねばならない。

論

類属性が全く認められなかつた。

4) 各抗菌血清ならびに抗E感作血球血清を菌およびE感作血球で交差吸収した結果、抗菌血清および抗E感作血球血清を当該菌で吸収した場合、および抗E感作血球血清を当該菌E感作血球で吸収した場合は、すべての反応が陰性となり、抗菌血清を当該菌E感作血球で吸収した場合は当該菌凝集反応の残存が認められた。

5) E感作血球を用いる血清学的反応、特にE感作血球溶血反応が2aおよび1b (B群赤痢菌) とson (D群赤痢菌) を鑑別する上有用であると考えられる。

文

- 1) Middlebrook, G. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 2) Smith, D. T. & Scott, N. B.: J. Lab. & Clin. Med., 35, 303, 1950.
- 3) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 24, 1480, 1950.
- 4) Saito, T. et al.: Jap. J. Tuberc., 3, 75, 1955.
- 5) 小林 博: 金大結研年報, 14(中), 177, 1956.
- 6) 登谷栄作: 金大結研年報, 16, 31, 1958.
- 7) 不室徳治: 金大結研年報, 17, 227, 1959.
- 8) 恒元 博: 金大結研年報, 18, 231, 1960.
- 9) 松井敏夫: 金大結研年報, 17, 247, 1959.
- 10) 小西健一: 金大結研年報, 10(下), 355, 1952.
- 11) Keogh, E. V. et al.: Nature, 160, 63, 1947.
- 12) Landsteiner, K.: The specificity of Sero-logical Reactions, Cambridge, Harvard University Press, 144, 1945.
- 13) Burnet, F. M. & Anderson, S. G.: Brit. J. Exp. Path., 27, 236, 1946.
- 14) Alexander, M. M., George, G. W.: J. Exp. Med., 91, 561, 1951.
- 15) 江口 穂: 長崎医学雑誌, 28(12), 1392, 1953.
- 16) 広田武郎: 東京医学誌: 62(1-2), 13, 1954.
- 17) 大西敏夫: 日本伝染病学会雑誌, 28, 685, 1955.
- 18) 中島 滌: 金大結研年報, 13 (上), 99, 1955.
- 19) 山本純夫: 金大結研年報, 17 (上), 37, 1959.
- 20) 善田輝美: 金大結研年報, 15 (下), 211, 1957.
- 21) Neter, E.: J. Exp. Med., 96, 1, 1952.
- 22) 根津尚光: 医学通信, 6, 251, 1951.

第 1 表

赤痢菌加熱浸出液(E)の化学的性状

反応の種類	E の種類			
	2a	1b	son	
蛋白反応	Sulfosalicylic acid reaction	+	+	+
	Millon's reaction	+	+	+
	Biuret reaction	+	+	+
	Ninhydrin reaction	+	+	+
	Heller's reaction	+	+	+
	Xanthoprotein reaction	+	+	+
糖反応	Molish's reaction	+	+	+
	Tollev's reaction	+	+	+
	Phloroglucinol reaction	+	+	+
	Seliwanoff's reaction	+	+	+
	HCl-orcin reaction	+	+	+

注) 2a, 1b および son は、それぞれ Sh. flexn. 2a, Sh. flexn. 1b および Sh. sonnei の略。以下同じ。

第 2 表 感作原の濃度と感作血球凝集価との関係

注) 対照: 感作血球 + 生食水, 無感作血球 + 生食水

第3表 感作原の濃度と感作血球溶血価との関係

注) 対照: 感作血球 + 生食水 + 極体, 無感作血球 + 生食水 + 極体

第4表 感作原の濃度と感作血球凝集価との関係

感作原 抗血清	2a-E								1b-E								son-E										
	抗2a-E 感作血球血清				抗1b-E 感作血球血清				抗son-E 感作血球血清				抗2a-E 感作血球血清				抗1b-E 感作血球血清				抗son-E 感作血球血清						
感作原の濃度 血清希釈	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球			
1:4	3	3	3	3'	2	2'	0	0	3	3	3	3	2'	1	0	0	3	3	3	3	3	3	3'	2	0	0	
1:8	3	3	3	3'	2	2'	0	0	3	3	3	3	2'	1	0	0	3	3	3	3	3	3	3'	2	0	0	
1:16	3	3	3	3'	2	2'	0	0	3	3	3	3	3	2'	1	0	0	3	3	3	3	3	3	3'	2	0	0
1:32	3	3	3	3'	2	2'	0	0	3	3	3	3'	2'	1	0	0	3	3	3'	3'	3'	3'	3'	2	0	0	
1:64	3	3	3'	2	2	2'	0	0	3	3	3'	3'	1	1'	0	0	3	3	3'	3'	3'	3'	2	2'	0	0	
1:128	3'	2	2	2	2	2	1	0	3'	3'	3'	2'	1	0	0	3	3'	2	2'	2'	2'	2'	2'	0	0	0	
1:256	2	2	2	2'	2'	1	0	3'	2	2	1	0	0	0	0	3'	2	1	2'	2'	2'	2'	1	1	0	0	
1:512	2	2'	2'	2'	1	0	0	2	2'	1	1	0	0	0	0	3'	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
1:1,024	1	1	1	1	1	0	0	2'	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1:2,048	1	1	1'	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1:4,096	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

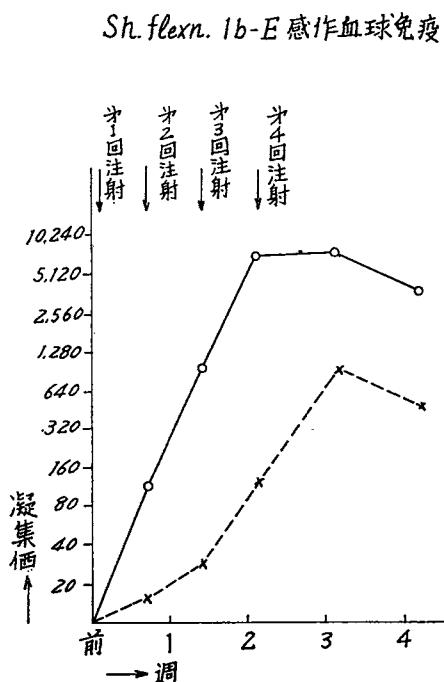
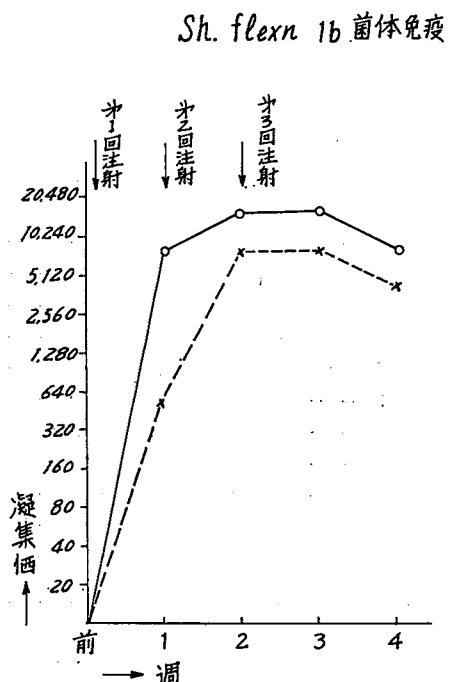
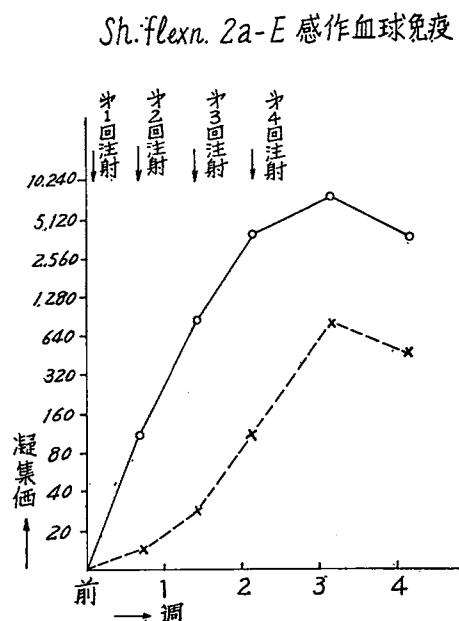
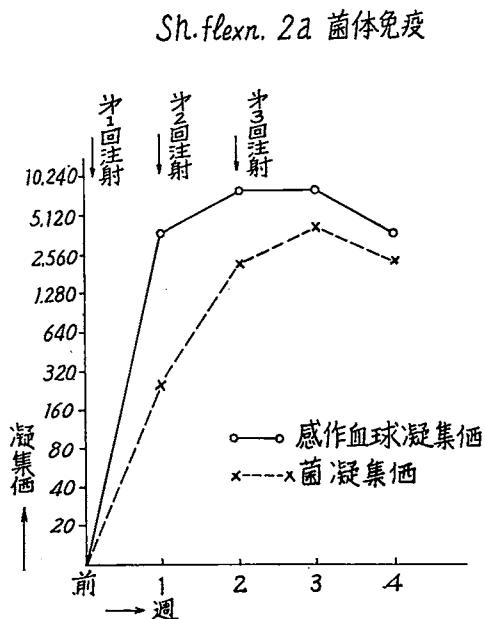
注) 対照: 感作血球+生食水, 無感作血球+生食水

第5表 感作原の濃度と感作血球溶血価との関係

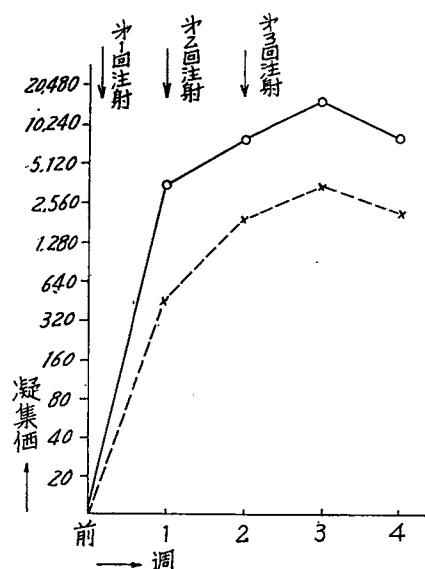
感作原 抗血清	2a-E								1b-E								son-E								
	抗2a-E 感作血球血清				抗1b-E 感作血球血清				抗son-E 感作血球血清				抗2a-E 感作血球血清				抗1b-E 感作血球血清				抗son-E 感作血球血清				
感作原の濃度 血清希釈	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球	2	5	10	30	90	270	800	無感作血球	
1:4	++	++	+	+	+	±	-	-	++	++	±	-	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:8	++	++	++	+	+	+	±	-	++	++	+	±	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:16	++	++	++	++	+	+	-	-	++	++	++	+	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:32	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	++	+	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:64	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	++	+	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:128	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	+	±	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:256	++	++	++	++	+	+	±	-	++	++	+	±	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-		
1:512	++	++	++	+	+	±	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+	±	-	-	-	
1:1,024	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:2,048	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:4,096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注) 対照: 感作血球+生食水+補体, 無感作血球+生食水+補体

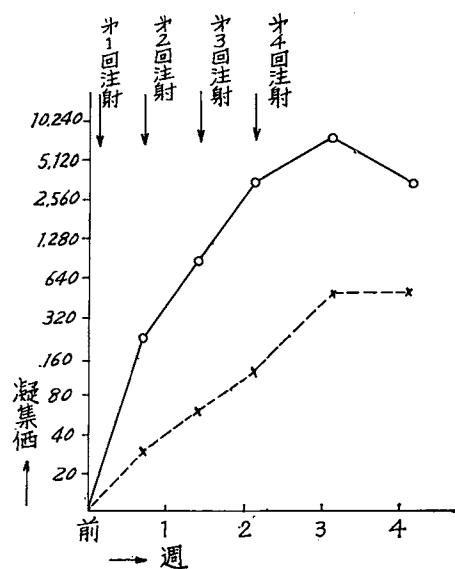
図 1. 菌免疫群および感作血球免疫群における血中抗体価の推移



Sh. sonnei 菌体免疫



Sh. sonnei-E 感作血球免疫



第 6 表 菌凝集反応

抗血清 の種類 血清希釈 反応に 用いた 抗原	抗菌血清						抗 E 感作血球血清											
	2a			1b			son			2a			1b			son		
	2a	1b	son	2a	1b	son	2a	1b	son	2a	1b	son	2a	1b	son	2a	1b	son
1 : 2	3	3	1	3	3	1	2'	2'	3	3	3	2'	3	3	2'	2	2	3
1 : 4	3	3	1	3	3	1	2'	2'	3	3	3	1	3	3	1	2	2'	3
1 : 8	3	3	1	3	3	1	1	1	3	3	3	1	3	3	1	1	1	3
1 : 16	3	3	0	3	3	1	1	1	3	3	3	1	3	3	1	1	1	3
1 : 32	3	3	0	3	3	0	1	1	3	3	2	1	3'	3	1	1	1	3'
1 : 64	3	3	0	3'	3	0	0	1	3	3	1	0	1	3	0	0	0	2'
1 : 128	3	2	0	2'	3	0	0	0	3'	2'	1	0	1	2'	0	0	0	1
1 : 256	2'	1	0	1	3	0	0	0	3'	1	0	0	1	1	0	0	0	1
1 : 512	2'	1	0	1	3'	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0
1 : 1,024	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 : 2,048	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 : 4,096	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 : 8,192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
対 照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注) 対照: 菌液+生食水

第7表 感作血球凝集反応

血清希釈	抗菌血清						抗E感作血球血清													
	2a			1b			son			2a			1b			son				
	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球				
1 : 2	3	3	2'	0	3	3	2'	0	2'	2	3	0	3	3	3'	0	3	3	3	0
1 : 4	3	3	1	0	3	3	2'	0	2'	1	3	0	3	3	3	0	3	3	3	0
1 : 8	3	3	1	0	3	3	1	0	1	1	3	0	3	3	3	0	3	3	3	0
1 : 16	3	3	0	0	3	3	0	0	1	1	3	0	3	3	3'	0	3	3	2'	0
1 : 32	3	3	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	3	3	3'	0	3	3	2'	0
1 : 64	3	2	0		2	3	0		0	0	3		3	2	1		3'	3	1	
1 : 128	3	1	0		2	3	0		0	0	3		3'	2	1		1	3	0	
1 : 256	3'	1	0		1	3	0		0	0	3		3'	1	0		1	2	0	
1 : 512	2	0	0		1	3	0		0	0	3'		2'	1	0		0	1	0	
1 : 1,024	2'	0	0		0	3	0		0	0	3'		2'	0	0		0	1	0	
1 : 2,048	1	0	0		0	2	0		0	0	3'		1	0	0		0	1	0	
1 : 4,096	1	0	0		0	2	0		0	0	2'		1	0	0		0	0	0	
1 : 8,192	1'	0	0		0	1	0		0	0	1		0	0	0		0	0	0	
1 : 16,384	0	0	0		0	1	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	
1 : 32,768	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	
対 照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注) 対照: 感作血球+生食水, 無感作血球+生食水

第8表 溶血反応

血清希釈	抗菌血清						抗E感作血球血清						2a			son				
	2a			1b			son			2a			1b			son				
	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球	2a	1b	son	無血 感作球				
1 : 2	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 4	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 8	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 16	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 32	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 64	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	++	+	-	++	+	-	-
1 : 128	++	+	-	-	++	++	-	-	-	-	++	-	++	+	-	-	++	-	+	-
1 : 256	++	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	++	-	-
1 : 512	++	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	+	-	-
1 : 1,024	++	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
1 : 2,048	+	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
1 : 4,096	+	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
1 : 8,192	±	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 16,384	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 32,768	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 65,536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対 照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注) 対照: 感作血球+生食水+補体, 無感作血球+生食水+補体

第9表 沈降反応

抗 血 清	抗原の種類 抗原希釈 血清希釈	2a-E						対照	1b-E						対照	son-E						対照									
		1	2	4	8	16	32		1	2	4	8	16	32		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024					
抗2a-E感作血球清	1: 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	1: 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1: 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1: 8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1: 16	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1: 32	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1: 64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
抗1b-E感作血球清	1: 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 4	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 8	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
抗1b-E感作血球清	1: 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 4	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 8	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1: 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
抗son-E感作血球清	1: 1	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 2	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 8	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注) 対照: 抗血清+生食水

第10表 感作血球凝集反応阻止試験

抗 血 清		反 応 に	阻止原の 希釈	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192	16,384	32,768	65,536	対 照
		用いた抗原	阻止原 (E)の種類	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	
2a		2a - E 感作血球	2 a	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2'	2'	2	2	2	2	2	2
			1 b	1	1	1	1	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1b		1b - E 感作血球	2 a	0	0	0	0	0	0	0	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			1 b	0	0	0	0	0	0	0	1	2'	2'	2'	2	2	2	2	2	2
son		son - E 感作血球	2 a	1	1	2'	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			1 b	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
			son	1	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

注 1) 対照: 阻止原なし 2) () 内の数字は阻止試験に用いた血清の濃度を示す

第11表 溶血反応阻止試験 第

抗 血 清		反 応 に	阻止原の 希釈	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192	16,384	32,768	65,536	対 照
		用いた抗原	阻止原 (E)の種類	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	
2a		2a - E 感作血球	2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
			1 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
1b		1b - E 感作血球	2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
			1 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
son		son - E 感作血球	2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
			1 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
			son	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

注 1) 対照: 阻止原なし 2) () 内の数字は阻止試験に用いた血清の濃度を示す

第 12 表 吸 収 試 験 (1)

抗血清	吸収前後	吸 収 に 用いた抗原	抗体価 反応に 用いた抗原	菌凝集価		感作血球 凝集価	感作血球 溶血価	沈降素価
				2 a	1 b son			
清 血 菌 2a 抗	前	•	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•	•
	菌 体	2 a	2 a	1: 256	1: 1,024	1: 1,024	1: 1,024	1: 8
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•	•
	后	E 感作 血球	2 a	1: 1,024	1: 2,048	1: 1,024	1: 16	1: 4
			1 b	1: 256	1: 256	1: 128	1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•	•
	2 a	E 感作 血球	2 a	1: 16	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	1: 16	1: 32	< 1: 4	•	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•	•

注) 表中 (0) 血清希釈は 1:1 で反応陰性のもの。

(•) は反応を行わなかったものを示す。以下同じ。

第 13 表 吸 収 試 験 (2)

抗血清	吸収前後	吸 収 に 用いた抗原	抗体価 反応に 用いた抗原	菌凝集価		感作血球 凝集価	感作血球 溶血価	沈降素価
				2 a	1 b son			
抗 2a-E 感作血球 清	前	•	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
	菌 体	2 a	2 a	1: 128	1: 512	1: 256	1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
	后	E 感作 血球	2 a	1: 256	1: 1,024	1: 512	1: 4	< 1: 4
			1 b	1: 128	1: 256	1: 32	•	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
	2 a	E 感作 血球	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
	1 b	E 感作 血球	2 a	1: 128	1: 512	1: 256	1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
	son	E 感作 血球	2 a	1: 256	1: 1,024	1: 512	1: 4	< 1: 4
			1 b	1: 64	1: 128	1: 32	•	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•

第14表 吸収試験(3)

抗血清	吸収前後	吸収に用いた抗原	抗体価 反応に用いた抗原	菌凝集価	感作血球凝集価	感作血球溶血価	沈降素価
抗 1b 清 血 菌 抗	前	•	2 a	1: 512	1: 512	1: 256	1: 8
			1 b	1: 4,096	1:16,384	1:16,384	1: 32
			son	1: 16	1: 8	0	0
	清 血 菌 体	菌	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	1: 1,024	1: 4,096	•	1: 16
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•
		体	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	1: 256	1: 256	1: 256	1: 4
	E 感 作 血 球	E	2 a	1: 2,048	1: 4,096	1: 2,048	1: 32
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	1: 32	1: 64	< 1: 4	< 1: 4
		2 a	1 b	1: 128	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
		son	< 1: 4	< 1: 4	•	•	•
		2 a	1 b	1: 512	1: 256	1: 64	1: 4
		son	< 1: 4	1: 1,024	1: 8,192	1: 4,096	1: 16
		2 a	1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•

第15表 吸収試験(4)

抗血清	吸収前後	吸収に用いた抗原	抗体価 反応に用いた抗原	菌凝集価	感作血球凝集価	感作血球溶血価	沈降素価
抗 1b-E 感 作 血 球 清	前	•	2 a	1: 256	1: 256	1: 128	0
			1 b	1: 512	1: 2,048	1: 2,048	1: 8
			son	1: 32	1: 64	1: 32	0
	菌 体	菌	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	1: 128	1: 512	1: 256	< 1: 4
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
		体	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			son	1: 128	1: 128	1: 32	•
	E 感 作 血 球	E	2 a	1: 256	1: 1,024	1: 512	1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	1: 256	< 1: 4	< 1: 4	•
		2 a	1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
		son	< 1: 4	1: 128	1: 1,024	1: 512	1: 4
		2 a	1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
		son	< 1: 4	1: 256	< 1: 4	< 1: 4	•
		2 a	1 b	1: 128	1: 128	1: 64	•
		son	1: 256	1: 1,024	1: 512	< 1: 4	•
		2 a	1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
		son	< 1: 4	1: 128	1: 1,024	1: 512	1: 4

第 16 表 吸 収 試 験 (5)

抗血清	吸収前後	吸 収 に 用いた抗原	抗体価 反応に 用いた抗原	菌凝集価	感作血球 凝集価	感作血球 溶血価	沈降素価
清 血 菌 抗 son	前	•	2 a	1: 32	1: 16	0	0
			1 b	1: 64	1: 16	0	0
			son	1: 4,096	1: 8,192	1: 8,192	1: 32
	菌 体	2 a	2 a	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	1: 2,048	1: 4,096	1: 2,048	1: 32
		1 b	2 a	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	1: 1,024	1: 4,096	1: 2,048	1: 32
	E 感 作 血 球	son	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	•	•
		2 a	2 a	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	•	•
			son	1: 32	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4

第 17 表 吸 収 試 験 (6)

抗血清	吸収前後	吸 収 に 用いた抗原	抗体価 反応に 用いた抗原	菌凝集価	感作血球 凝集価	感作血球 溶血価	沈降素価
清 血 菌 抗 son-E 感 作 血 球	前	•	2 a	1: 32	1: 128	1: 64	0
			1 b	1: 32	1: 128	1: 64	0
			son	1: 256	1: 2,048	1: 1,024	1: 4
	菌 体	2 a	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	1: 128	1: 512	1: 512	1: 4
		1 b	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	1: 128	1: 1,024	1: 512	1: 4
	E 感 作 血 球	son	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
		2 a	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	1: 128	1: 512	1: 256	1: 4
		1 b	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	1: 128	1: 512	1: 256	1: 4
		son	2 a	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			1 b	< 1: 4	< 1: 4	< 1: 4	•
			son	< 1: 4	< 1: 4	< 4: 4	< 1: 4