

OT感作血球の免疫学的研究

第 1 0 報

血球のタンニン酸前処理の意義*

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任: 柿下正道教授)

不 室 徳 治

(受付: 昭和34年5月2日)

緒 言

1947年 Keogh¹⁾ は *Haemophilus influenzae* (Type B)の抽出液によって赤血球は感作され、この感作血球は型特異抗体によって凝集されると報告し、続いて翌年²⁾ この赤血球感作原は多糖体であろうと述べた。

結核症については、1948年 Middlebrook-Dubos³⁾ の結核菌水抽出液による感作血球の結核動物あるいは結核患者血清による特異的凝集反応の発表に端を発し、Smith-Scott^{4,5)} のOT感作血球凝集反応および Middlebrook⁶⁾ によるOT感作血球溶血反応などの報告が相次ぎ、以来この方面の研究はめざましい展開をみせた。

しかしながら菌水抽出液あるいはOT中の血球感作原に関しては多糖体説^{2-6,8-11)} と蛋白説

¹²⁻¹⁵⁾ とがなお対立している現況であるが、当教室の小林¹⁶⁻¹⁸⁾ および登谷¹⁹⁾ によるとそのいずれか一方のみに限定することができないという成績が得られている。

一方1951年 Boyden⁷⁾ は P.P.D. や馬血清アルブミンを用いた実験で、血球に対するタンニン酸前処理は蛋白抗原の血球への吸着を容易ならしめ、しかも特異的反応の鋭敏度を増大せしめることを指摘した。私はここにおいて Boyden のタンニン酸処理血球とタンニン酸非処理血球に対するOT中の感作原になんらかの相違が認められるかいなかについての検討を、西東ら²⁰⁾ の感作血球免疫法を応用して実施した。

以下はその成績の概要である。

実験材料ならびに実験方法

1) 材 料

1) 抗 原

イ) OT: ヒト型結核菌 H₃₇R_V株を Sauton 培地に8週間培養して得られた培養ろ液より常法に準じて作製した。

ロ) OT分画の調製: 浅見⁹⁾ の方法に準じ前記OTより沈殿時の酸性度により PF_I, PF_{II} (蛋白) に、沈殿時メタノール濃度により CF_I, CF_{II} (多糖体) に分画した。各分画の化学的性状は第1表に示した。

2) 動 物

体重2.5kg内外の健康無処置ウサギで、その血清が後に記載する各種抗原感作血球と反応せず、かつ10倍OTをもってする皮膚反応陰性なることを確かめた後実験に供した。

3) 血 球

ウサギ血液 (同種または自家血液) を Aalsever 液中に採取し、生理的食塩水 (以下生食水と略記) で3回遠沈洗浄して使用に供した。ヒツジ血球を用いた場合も同様である。

* 本論文の要旨は昭和32年10月27日第11回日本細菌学会北陸地方支部集会において発表した。

4) タンニン酸

大日本製薬の製品を使用した。その50mgを蒸留水に溶解して5.0mlとなし(100倍)氷室に保存し、用へのぞみ次に記載するpH 7.2の緩衝液にて希釈した。

緩衝液の調製: 0.15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 76.0mlと0.15M KH_2PO_4 , 23.9mlとを混合し、これに等量の生食水を加えてpH 7.2の緩衝液を得、また上記 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 32.2mlと KH_2PO_4 , 67.7mlとを混じこれに等量の生食水を加えてpH 6.4の緩衝液を得た。これら2種の緩衝液は感作タンニン酸処理血球を用いての凝集反応、溶血反応、阻止試験ならびに吸収試験にのみ使用した。

2) 血球の感作方法

1) OTあるいはその分画感作血球の作製法

10倍OTまたは一般にOTの各分画の2mg/ml生食水溶液20容に前記のごとく洗浄した無処置血球沈査1容を混じ、37°Cの湯槽中に2時間保った後——その間15分ごとに振とう——生食水で3回遠沈洗浄し、その沈査を生食水で所要濃度に希釈して感作血球浮遊液を調製した。

2) 血球のタンニン酸処理

前記タンニン酸100倍溶液から緩衝液(pH 7.2)を用いて4万倍溶液を作製し、その1容量に対し同緩衝液をもって作製せる2.5%ウサギ血球浮遊液の1容量を混合し、37°Cの温浴中に10分間放置、次いで1,500 rpm 3分間あて2回遠沈洗浄してタンニン酸処理血球を得た。

3) OTあるいはその分画感作タンニン酸処理血球の作製

緩衝液(pH 6.4)をもって希釈した抗原溶液20容に前記タンニン酸処理血球沈査1容を加え、37°Cの湯槽中に時折振とうしつつ30分間置いた後、緩衝液(pH 7.2)で3回遠沈洗浄し、その沈査を正常ウサギ血清を0.4%に含有する緩衝液(pH 7.2)を用いて0.5%血球浮遊液とした。(以下タンニン酸処理をタ・処理と略記)

以下の実験に用いた血球の種類を表示すると次のごとくである。

3) ウサギの免疫方法

前報²⁰⁾に準じて行ったが、詳細は実験成績の項で記述する。

血球感作原	タ・処理の有無	略号
OT	-	OT血球
	+	OTタ血球
PF _I	-	PF _I 血球
	+	PF _I タ血球
PF _{II}	-	PF _{II} 血球
	+	PF _{II} タ血球
CF _I	-	CF _I 血球
CF _{II}	-	CF _{II} 血球

4) 被検血清

56°C, 30分間加温し、0.5%の割に石炭酸を加えて保存し、使用時更に10分間56°Cに加温して反応に供した。

5) 被検血清の吸収

被検抗血清を抗原感作血球で吸収するには抗血清の抗体価に応じて必要とする吸収用感作血球の量を算出し、その計算量を抗血清に混合、37°Cの湯槽中に2時間保った後遠沈する操作を2回繰り返して吸収の完全を期した。

6) 反応術式

1) 血球凝集反応

タ・処理しない感作血球を使用せる本反応については、前報²⁰⁾と同様の手技を用いた。タ・処理感作血球を使用せる場合には、被検血清希釈液として1%に正常ウサギ血清を含有する緩衝液(pH 7.2)を用いた点の特徴である。この際対照として、
(1) 被検血清の倍々希釈液+無感作タ・処理血球、
(2) 1%正常ウサギ血清+感作タ・処理血球、
(3) 最低希釈被検血清+正常ウサギ血球、
を用意した。判定は37°Cの湯槽中に2時間保った後に行った。

2) 溶血反応

タ・処理の有無にかかわらず前報²⁰⁾に準じたが血球浮遊液は1%のものを用いた。

3) 補体結合反応

前報²⁰⁾の術式に準じた。反応原もすべて前記OTを用いた。

4) 井上菌凝集反応

井上²¹⁾の報告に準拠した。被検血清は生食水で倍々希釈し、これに同量の菌液を加えて0.5mlとし37°Cの湯槽中に2時間置いた後室温に放置、24時間後に成績を判定した。

5) 沈降反応

小林¹⁸⁾の方法に準じたが臓器エキ스는使用しなかった。抗原はOTおよびPF_{II}を用いた。

6) 血球凝集反応阻止試験

同じく前報²⁰⁾に準じた。しかし感作タ・処理血球を使用せる場合は、37°Cの温浴中に2時間置い

た後判定した。

7) 皮膚反応

10倍OT 0.1mlの皮内反応を常法に準じて行った。

実 験 成 績

1) OT血球免疫およびOTタ血球免疫における成績

a) 血球凝集反応および溶血反応

第2表はOT血球およびOTタ血球の10%生食水浮遊液5mlを3日おきに繰り返し静注して得られたウサギ血清についての成績である。すなわちOT血球免疫血清は西東ら²⁰⁾および小林¹⁶⁾の報告のごとくOT血球凝集ならびに溶血反応を呈し、OTタ血球ともほぼ同程度に反応した。OTタ血球免疫血清は明らかにOTタ血球凝集および溶血反応を呈し、OT血球を用いてもOTタ血球に対するとはほぼ同じ抗体価を示すことが確認された。しかしながら第3表に示すごとく経時的に観察するとOTタ血球免疫によってもOT血球凝集反応の方が早期から現われOTタ血球凝集反応は4—8日遅れることが認められた。

次にこの両抗血清についてOT血球およびOTタ血球による交差吸収試験を行った成績を第4表に一括した。この表から明らかのようにOT血球免疫血清はOTタ血球で吸収後も軽度ながらOT血球凝集反応を呈したがOTタ血球免疫血清はOTタ血球はもちろんOT血球によって完全に吸収された。

更にPF_I、PF_{II}、CF_IおよびCF_{II}でそれぞれタ・処理血球および非タ・処理血球を感作し、このおのおのの血球と両抗血清とによる凝集反応を行った成績を第5表に示した。これによってみると蛋白分画感作タ・処理血球に対する凝集能がOT血球免疫血清とOTタ血球免疫血清の間には格段

の差があつて後者が強かつた。また両血清とも多糖体分画感作タ・処理血球凝集反応を呈しなかつた。

b) 血球凝集反応阻止試験

OT血球免疫およびOTタ血球免疫によって得られたそれぞれの抗血清とOT、OTタ、PF_{II}およびPF_{II}タ血球との間の凝集反応に対するPF_I、PF_{II}、CF_I、CF_{II}およびOTの阻止能試験を行った成績を第6表に一括表示した。すなわち蛋白分画の阻止能は多糖体分画のそれに比して一般に強く、タ・処理感作血球を反応原とするこの傾向が一層明らかとなつた。しかしながらOTの阻止能は反応原に用いる血球のタ・処理の有無によって変化が認められなかつた。

c) 補体結合反応

第7表および第11表のごとく、OT血球およびOTタ血球免疫血清はOTを抗原としていづれも1:40の補体結合性抗体価を示して両血清間に差を認めず、かつ、この価は分画感作血球免疫血清においてはみられない高い価であつた。

d) 沈降反応

OTとOT血球免疫血清では抗原価1:5,120、抗体価1:4と抗原価1:80、抗体価1:4の場の形、OTとOTタ血球免疫血清では抗原価1:5,120、抗体価1:1と抗原価1:640、抗体価1:2の場の形を示した。(第8表)この両血清についてPF_{II}を抗原として沈降反応を行うといづれも抗原価1:64,000、抗体価1:1で両者の間に差はなかつた。

(表略)

e) 井上菌凝集反応

この反応においては正常ウサギ血清も、

1:32~64 の凝集価を示すが、OT 血球および OT タ血球による免疫によっていずれも 2^3 ~ 5 倍の凝集価の上昇を認めた。(第9表および第12表)

f) 皮膚反応

全例とも実験期間中には陽転しなかった。

2) PF_I 血球免疫, PF_I タ血球免疫および PF_I 単独免疫における成績

a) 血球凝集反応および溶血反応

非タ・処理血球およびタ・処理血球を PF_I (2mg/ml 生食水溶液) で感作した 10% 血球浮遊液 5ml あて、ならびに PF_I (20mg/ml の生食水溶液) 1ml をそれぞれウサギに 3 日おきに 4 回静注し、最終注射 5 日後に得られた抗血清について抗体価を測定した。抗体価はすべて OT タ, OT, PF_I タ および PF_I 血球を用いて観察した。

第10表からわかるように抗体価は PF_I タ血球免疫血清と PF_I 血球免疫血清ではほとんど差がなく、PF_I 単独静注血清ではこれらに比し低かった。上記 4 種感作血球のうち OT タ血球が最も強い反応原性を有し、PF_I タ血球および OT 血球がこの順にこれに次ぎ、PF_I 血球はほとんど陽性反応を呈しなかった。ことに溶血反応では OT 血球でもほとんど陰性にとどまり、まれに弱い反応を呈するにすぎなかった。

以上のことから PF_I の免疫原性についてみて OT に関する小林の報告¹⁶⁾ のように、単独静注よりも感作血球として静注する方が強く抗体を産生することは明らかである。また PF_I 血球と PF_I タ血球とを比較するとその抗体産生能には著差がなかったが、その PF_I に対する 3 抗血清との反応原性には明瞭な差が認められ後者においてきわめて大であった。なお OT 血球と OT タ血球の抗 PF_I 血清に対する反応原性の間にも同様な差が認められたが PF_I 血球

と PF_I タ血球の反応原性の間の差ほどは大でなかった。

b) 補体結合反応

上記 3 抗血清と OT を抗原とした補体結合反応の成績は第11表に示した。(1例あて表示) これでは血球凝集および溶血反応におけるとやや異なって PF_I タ血球免疫血清が最も強い反応を呈した。

c) 沈降反応

OT を抗原とする沈降反応は 3 抗血清とも抗原価 1:1,280~1:5,120, 抗体価 1:1 にとどまる見掛け上単一なもので、OT 血球免疫および OT タ血球免疫血清と OT による反応の場より小さかった。(略略)

d) 井上菌凝集反応

第12表のごとく 3 抗血清とも 2^{1-3} 倍の凝集価の上昇を認めたにとどまった。

e) 皮膚反応

全例とも陰性に終始した。

3) PF_{II} タ血球免疫, PF_{II} 血球免疫および PF_{II} 単独免疫における成績

a) 血球凝集反応および溶血反応

前章 2) における PF_I の代りに PF_{II} を免疫原として同様にし得られた 3 種抗血清について OT タ血球, OT 血球, PF_{II} タ血球および PF_{II} 血球を用いて行った血球凝集反応および溶血反応の成績を第13表に一括表示した。すなわち PF_{II} タ血球免疫血清は上記 4 種感作血球との反応ですべて高い抗体価を示し、かつ各抗原感作血球のタ・処理の有無による差が小さく、OT 血球免疫血清および OT タ血球免疫血清と優劣を論じ得なかった。PF_{II} 血球免疫血清は各抗原感作タ・処理血球に対しては PF_{II} タ血球免疫血清と同程度の抗体価を示したが、各抗原感作非タ・処理血球に対する抗体価は低かった。また PF_{II} 単独免疫血清でもこれと同様な現象が認められるとともに抗体価は前二者に比し一般に低かった。

すなわち PF_{II} 免疫においても単独静注よりも血球に感作して静注する方が抗体産生能強く、更に PF_{II} 血球と PF_{II} タ血球の PF_{II} タ血球免疫血清に対する反応原性には明らかな差は認められなかったが、PF_{II} 血球免疫血清あるいは PF_{II} 単独免疫血清に対する反応原性には著しい差があって PF_{II} タ血球 > PF_{II} 血球であった。なお OT 血球と OT タ血球は PF_{II} 血球および PF_{II} 単独免疫血清に対し著しい反応原性の差を示した。

また PF_{II} 血球免疫血清と PF_{II} タ血球免疫血清を PF_{II} タ血球および PF_{II} 血球をもってそれぞれ交差吸収し、その間になんらかの質的相異がないかを検討した結果を第14表に一括した。その結果この抗血清間には質的差異が認められなかった。なおここで PF_{II} タ血球に比し PF_{II} 血球は抗体の吸収能力が低いという結果が得られたが、このことが反応原性において PF_{II} 血球が PF_{II} タ血球に劣る原因とも考えられる。

b) 血球凝集反応阻止試験

PF_{II} タ血球免疫および PF_{II} 血球免疫血清と OT, OT タ, PF_I および PF_{II} タ血球との間の凝集反応に対する PF_I, PF_{II}, CF_I, CF_{II}, および OT の阻止能試験を

行った。その成績は第15表のごとくであった。蛋白分画の阻止能は多糖体分画のそれに比し一般に強く、タ処理感作血球を反応原とした場合この傾向は一層明らかであった。しかし OT の阻止能は反応原に用いる血球のタ・処理の有無によってかわらなかった。これらの成績は OT タ血球免疫血清および OT 血球免疫血清における成績（前章1）と全く同じであった。

c) 補体結合反応

上記3抗血清についての補体結合反応の成績は第11表に示した。すなわち PF_I による免疫の場合と同様に PF_{II} タ血球免疫血清が最も強い反応を呈した。

d) 沈降反応

OT と PF_{II} タ血球免疫血清の沈降反応は抗原価 1:5, 120, 抗体価 1:2 の見掛け上単一な場の形を示した（第8表）が、他の2抗血清の抗体価は 1:1 にとどまり PF_{II} を抗原とするとすべてにおいて抗体価 1:1 であった。（表略）

e) 井上菌凝集反応

第12表に示したごとく、3抗血清とも 2¹⁻³ 倍の抗体価の上昇を認め PF_I 免疫とほとんど同じであった。

f) 皮膚反応

全例とも陰性に終始した。

総括ならびに考案

当教室の登谷¹⁹⁾ は先に OT 中の血球感作能因子について検討した結果 OT 中の蛋白および多糖体分画ともにその性能を有することを確認したが、その際 OT 蛋白分画をもって血球を感作するにも血球に対してタンニン酸前処理（タ・処理）を行っておらない。しかして Boyden は既に血球のタ・処理が蛋白の吸着を容易ならしめると報告しているので私はここで OT およびその蛋白分画感作血球の免疫原性を追求するに当り、血球のタ・処理の有無によって血球に吸着される因子に差があるかいないかの検討を試み

た。

まず OT タ血球と OT 血球をそれぞれウサギに静注しその抗体産生能を比較したが両者の間に明らかな差異が認められず、かつこの各種抗血清に対する OT タ血球および OT 血球の反応原性もほぼ同程度であった。（第2, 3, 6, 7, 8表）しかしながら OT タ血球免疫による抗体産生の経時的推移の観察に際しては、OT タ血球凝集反応は OT 血球凝集反応より遅れて出現し反応原性は後者の方が大であることが推定された。

またこの2種の抗血清とOT血球およびOTタ血球との交差吸収試験の結果、OT血球免疫血清をOTタ血球で吸収した後もなおOT血球を凝集する成績およびOTとOT血球免疫血清との沈降反応の場がOTとOTタ血球免疫血清とのそれより複雑であることなどは、タ・処理血球は非タ・処理血球に比しなんらかの因子の吸着が劣るのではないかと考えられるところである。(第4表)このような事実は1)多糖体分画がタ・処理血球に感作されず、2)蛋白分画がタ・処理血球にも非タ処理血球にも感作されるという知見が得られた(第5表)ことと対比せしめてまことに重要なことといわなければならない。2)の点はすでに進藤ら¹²⁾がほとんど純粋と考えられる結晶卵白アルブミンがなんらの前処理なしにヒツジ血球に吸着されて凝集および溶血反応を起こすと報告しているところと一致し、Keogh²⁾の方法とBoyden⁷⁾の方法を併用することによって蛋白と多糖体を区別するというMeynell²²⁾の記載に反した。しかしながら血球のタンニン酸前処理により多糖体分画は吸着されがたくなるという成績は興味があって、今日まで非タ・処理血球には主として多糖体が吸着されるとする説の一面を示している。

次にPF_IあるいはPF_{II}感作非タ・処理血球、PF_IあるいはPF_{II}感作タ・処理血球、およびPF_IあるいはPF_{II}の単独溶液をそれぞれ静注して、その免疫原性を比較した。(第10, 11, 12, 13表)この成績から1)蛋白分画の免疫原性および反応原性は血球をタ・処理することにより一層高められること、2)一般にPF_{II}の免疫原性および反応原性はPF_Iのそれより強いこと、および3)単独静注よりも感作血球として静注の方が抗体産生能が強いことが明らかになった。

さてBoyden⁷⁾、中江²³⁾らは抗原感作血球の作製に際してタ・処理血球を用いることにより反応原性の高まることを認めているが、私の場合も同様な成績が得られた。しかしタ・処理によ

って免疫原性には著変が認められなかった。西東ら²⁴⁾は先に血球をTrypsinで処理した後OTで感作することによって反応原性は強まるが、免疫原性は低下することを報告している。またOT血球免疫およびOTタ血球免疫血清においては、タ・処理の有無によって感作血球の反応原性に差を認めず、またPF_{II}タ血球免疫血清においてはその差はわずかであるにもかかわらずPF_Iタ血球、PF_I血球、PF_I単独、PF_{II}血球、PF_{II}単独免疫血清においてはタ・処理によって感作血球は特に溶血反応に対し感受度を増した。またOT単独の抗体産生能がOT感作血球の抗体産生能にはるかに及ばず、かつ前者では溶血反応がほとんど現われないことは小林¹⁷⁾の報告したところであり蛋白分画単独静注を行った私の成績でも同様であった。しかし小林の成績と私の成績を総合すると免疫原性においてOT血球≡OTタ血球≡PF_{II}タ血球>PF_{II}血球>PF_Iタ血球≡PF_I血球≧OT単独≧PF_{II}単独≧PF_I単独という関係が見出される。

次いでPF_{II}血球とPF_{II}タ血球の質的差異の有無を検討するためPF_{II}血球免疫血清とPF_{II}タ血球免疫血清についてPF_{II}タ血球、PF_{II}血球、OTタ血球ならびにOT血球をもってする交差吸収試験を行ったが両血清の間に質的差異の存在を疑わしめるような成績は得られなかった。しかしなおここで血球はタ・処理によってOTでは感作因子の減少、PF_{II}では被感作性の増強を招来していることを一層確実視させるに至った。

最後に本実験における各種免疫ウサギはいずれも皮膚反応が終始陰性であったことは小林¹⁶⁾の報告と同様であるが、これはアレルギーと免疫の関連性の解明に一つの示唆を与えをものではなかろうかと考えるものである。

結 論

ヒト型結核菌 H₃₇R_v 株の培養ろ液より作製せる OT およびその蛋白分画について、各単独、各感作血球および各感作タンニン酸処理血球によるウサギの免疫を行って血球に対するタンニン酸処理の免疫学的意義の解明を試みるとともに、血球のタンニン酸前処理が血球の OT、その蛋白あるいは多糖体分画による被感作性にあぼす影響についての検討をも行って次の成績を得た。

- 1) OT 中の血球感作能因子は血球に対するタンニン酸前処理の有無によりいくらか異なるところがある。
- 2) 血球はタンニン酸処理により蛋白分画による被感作性を増すが、多糖体分画による被感作性の低下を招来する。
- 3) PF_I および PF_{II} あるいはこれらで感作さ

れた非タンニン酸処理血球およびタンニン酸処理血球の静注によって抗血清が得られた。

しかして 1) PF_{II} は一般に PF_I より血球感作原性および免疫原性ともに強く、2) 免疫原性において PF_I および PF_{II} とも単独静注はそれぞれの感作血球静注に及ばず、3) 蛋白分画感作タンニン酸処理血球は蛋白分画感作非タンニン酸処理血球より反応原性のみならず免疫原性も高いことが認められた。しかし、4) これら血清間には質的差異を認めなかった。

- 4) 以上の免疫ウサギは高い抗体産生にもかかわらず、全例とも OT による皮膚反応は陰性に終始した。

(稿を終るにのぞみ、西東、小西両博士の御指導に深謝の意を表します。)

文 献

- 1) Keogh, E. V., North, E. A. and Warburton, M. F. : Nature, 160, 63, 1947.
- 2) Keogh, E. V., North, E. A. and Warburton, M. F. : Nature, 161, 687, 1948.
- 3) Middlebrook, G. & Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 4) Scott, N. B. & Smith, D. T. : J. Lab. & Clin. Med., 35, 303, 1950.
- 5) Smith, D. T. & Scott, N. B. : Am. Rev. Tuberc., 62, 121, 1950.
- 6) Middlebrook, G. : J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
- 7) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 8) Hilson, G. R. & Elek, S. D. : J. Clin. Pathol., 4, 158, 1952.
- 9) 浅見望, 他 : 日細誌, 9, 271, 1954.
- 10) 武田徳晴, 他 : 総合医学, 10, 16, 1953.
- 11) 浅野元康 : 日細誌, 9, 985, 1954.
- 12) Sindo, T. & Wakakura, K. : Jap. J. Exp. Med., 22, 285, 1952.
- 13) Sindo, T. & Wakakura, K. : Yokohama Medical Bulletin, 3, 298, 1952.
- 14) 進藤 宙二 : 血清反応の新しい見方と考え方, 1952.
- 15) 若倉和美 : アレルギー, 2, 110, 1953.
- 16) 小林博 : 金大結研年報, 14, 177, 1956.
- 17) 小林博 : 金大結研年報, 14, 187, 1956.
- 18) 小林博 : 金大結研年報, 15, 79, 1957.
- 19) 登谷栄作 : 金大結研年報, 16, 31, 195, 1958.
- 20) Saito, T. et al. : Jap. J. Tuberc., 3, 75, 1955.
- 21) 井上門司 : 日本微生物学会雑誌, 20, 2769.
- 22) Meynell, G. G. : J. Patho. Bact., 67, 137, 1954.
- 23) 中江亮一, 他 : 日結, 14, 626, 1955.
- 24) 西東利男, 他 : 金大結研年報, 16, 63, 1958.

Table 1
Chemical properties of several fractions prepared from OT

Reaction	Protein		Polysaccharide	
	P F I	P F II	C F I	C F II
Tetrabromphenolphthalein ethylester potassium salt reaction	+	+	-	-
Biuret reaction	+	+	-	-
Xanthoproteic reaction	+	+	-	-
Millon's reaction	+	+	-	-
Ninhydrin reaction	+	+	-	-
Sulfosalicylic acid reaction	+	+	-	-
Molisch's reaction	-	-	+	+
Orcin reaction	-	-	±	+
Seliwanoff's reaction	-	-	+	+
Fehling's reaction	-	-	-	-
N (%)	11.8	18.5	0.032	0.026

Chemical qualitative test was carried out on the 1% solution of each fraction.

Table 2

Hemagglutination and hemolysis tests of OT-sensitized red cells or OT-sensitized tanned red cells by the serum of rabbit receiving repeated injection of OT-sensitized red cells or OT-sensitized tanned red cells

Sera of rabbits immunized with (rabbit No.)	Tanning of OT-sensitized red cells used in the test	Hemagglutination test								Hemolysis test									
		Dilution of serum																	
		8	16	32	64	128	256	512	1,024	1:2,048	8	16	32	64	128	256	512	1,024	1:2,048
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OT-sensitized red cells (2)	-	3	3	3	3	2	2	1	0	0	###	###	###	###	###	##	+	-	
	+	3	2	2	2	1	1	1	1	0	0	###	###	###	###	##	+	-	
OT-sensitized tanned red cells (3)	-	3	2	2	2	2	1	1	1	0	###	###	###	###	##	+	±	-	
	+	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0	###	###	###	###	##	+	±	-

The degree of hemagglutination was graded from 3, representing a formation of marked clot, to 0, representing no agglutination. The degree of hemolysis was graded from ###, representing almost complete hemolysis, to -, representing no hemolysis.

Table 5
Comparison of agglutinability between OT-sensitized red cells with or without pretreatment of tanning

Sera of rabbits immunized with (rabbit No.)	Antigen adsorbed onto erythrocytes	Treatment of red cells with tannic acid	Dilution of serum										
			8	16	32	64	128	256	512	1,024	$C_1 C_2 C_3 C_4$		
(1)	P F I	-	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P F II	-	2	2	2	1	1'	0	0	0	0	0	0
		+	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0
C F I	-	2	2'	2'	1'	0	0	0	0	0	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C F II	-	2'	2'	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(4)	P F I	-	2	2	2'	1	1'	0	0	0	0	0	
		+	2	2'	2'	1	0	0	0	0	0	0	
	P F II	-	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	
		+	2	2	2	2	2'	2'	1	1'	0	0	
C F I	-	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
C F II	-	2'	1	1	1	1'	0	0	0	0	0		
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

C_1 : Sensitized red cells in the saline (without serum)

C_2 : Unsensitized tanned cells in the test serum diluted with 1 percent normal rabbit serum

C_3 : Sensitized tanned cells in 1 percent normal rabbit serum

C_4 : Normal red cells in the lowest dilution of test serum

Table 6
Inhibition of the hemagglutination by PF_I, PF_{II}, CF_I, CF_{II} and OT. Serum used was prepared by either OT-sensitized red cells (A) or OT-sensitized tanned red cells (B)

Sera (rabbit No.)	Hemo- sensitin	Treatment of red cells with tannic acid	Inhi- biting antigen	Dilution of inhibiting antigen												C		
				The top column : OT														
				The lower column : OT-fraction														
10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480	40,960	81,920	163,840				
1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:				
500	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000	32,000	64,000	128,000	256,000	512,000	1,024,000	2,048,000	4,096,000	8,192,000				
A (2)	OT	-	PF _I	0	0	0	0	1	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	
			PF _{II}	0	0	0	0	0	0	1	1	2'	2'	2	2	2	2	2
			CF _I	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	2	2	2	2
		CF _{II}	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2
		OT	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2
		+	PF _I	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1'	1	1	1	1	2
	PF _{II}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1'	2	
	CF _I	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
	CF _{II}	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
	OT	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1'	1	1	1	1	1	2	
	PF _{II}	-	PF _I	0	0	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
			PF _{II}	0	0	0	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
CF _I			2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
CF _{II}		2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
OT		0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2	
+		PF _I	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	
PF _{II}	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1		
CF _I	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CF _{II}	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
OT	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2		
B (3)	OT	-	PF _I	0	0	0	0	0	1	1	2'	2'	2	2	2	2	2	
			PF _{II}	0	0	0	0	0	0	1'	1	2'	2'	2	2	2	2	2
			CF _I	0	0	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2
		CF _{II}	0	0	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
		OT	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	2
		+	PF _I	0	0	0	0	0	1'	1'	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2
	PF _{II}	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2	
	CF _I	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
	CF _{II}	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	
	OT	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	2	
	PF _{II}	-	PF _I	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	2'	2
			PF _{II}	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	2'
CF _I			0	1'	1'	1'	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	2
CF _{II}		0	0	1'	1'	1'	1	1	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2	2	
OT		0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2	
+		PF _I	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	
PF _{II}	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1		
CF _I	0	0	1'	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CF _{II}	0	0	1'	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
OT	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1		

Degree of inhibition is shown by the figures 2, 2', 1, 1', 0.

C : Serum + Sensitized red cells

Table 7
Complement fixation reaction of the mixture of OT and the serum of rabbit receiving repeated injection of OT-sensitized tanned red cells

Rabbit No.	Dilution of OT 1 : ↓	Dilution of serum 1 : →													
		10	20	40	80										
3	20	-	-	-	-	+	-	##	±	##	##	++	±		
	40	-	-	-	-	±	-	##	±	##	##	++	±		
	80	-	-	-	-	±	-	##	±	##	##	++	±		
	160	-	-	-	-	±	-	##	-	##	##	++	±		
	320	-	-	-	-	-	-	##	-	##	##	++	-		
	640	-	-	-	-	-	-	##	-	##	##	++	-		
	1,280	-	-	-	-	-	-	±	-	##	##	++	-		
	2,560	-	-	-	-	-	-	-	-	##	##	++	-		
	5,120	-	-	-	-	-	-	-	-	##	##	++	-		
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	##	±	-	-	-	
4	20	-	-	-	-	±	-	##	+	±	##	##	++	±	
	40	-	-	-	-	-	-	##	±	-	##	##	++	±	
	80	-	-	-	-	-	-	##	±	-	##	##	++	-	
	160	-	-	-	-	-	-	##	-	-	##	##	++	-	
	320	-	-	-	-	-	-	##	-	-	##	##	++	-	
	640	-	-	-	-	-	-	##	-	-	##	##	++	-	
	1,280	-	-	-	-	-	-	±	-	-	##	##	++	-	
	2,560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	##	++	-	
	5,120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	##	++	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	±	-	-	-

Remark :	## no hemolysis	++ slight hemolysis
	+ marked hemolysis	± strong hemolysis
	- complete hemolysis	C : without OT

Table 8
Precipitation reaction between immune sera and OT

Sera of rabbits immunized with	Rabbit No.	Dilution of serum	Dilution of OT										
			20 1 : 1	40 1 : 1	80 1 : 1	160 1 : 1	320 1 : 1	640 1 : 1	1,280 1 : 1	2,560 1 : 1	5,120 1 : 1	10,240 1 : 1	
OT-sensitized red cells	2	1 : 1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
		1 : 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		1 : 4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 : 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OT-sensitized tanned red cells	3	1 : 1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
		1 : 2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0
		1 : 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PF _I -sensitized tanned red cells	12	1 : 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		1 : 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
		1 : 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tested after the 4th injection

The degree of precipitation reaction classified as 2, 1 by the intensity of the reaction and a doubtful case was recorded as 1', negative as 0.

Table 9
Inoue's tubercle bacilli agglutination by the serum of rabbit receiving repeated injection of OT-sensitized tanned red cells

Rabbit No.	Dilution of serum Tested	16	32	64	128	256	512	1,024	C
		1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	
3	before injection	3	0	0	0	0	0	0	0
	3 days after the 1st injection	3	3	3	0	0	0	0	0
	3 days after the 2nd injection	3	3	3	1	1'	0	0	0
	3 days after the 3rd injection	3	3	3	3	2	1'	0	0
	3 days after the 4th injection	3	3	3	3	2	1	0	0
4	before injection	2	0	0	0	0	0	0	0
	3 days after the 1st injection	3	3	2	0	0	0	0	0
	3 days after the 2nd injection	1	1	1'	0	0	0	0	0
	3 days after the 3rd injection	3	3	3	2	1'	0	0	0
	3 days after the 4th injection	3	3	3	2	1	0	0	0

The degree of agglutination classified as 3, 2 and 1 by the intensity of the reaction and doubtful case was recorded as 1', negative as 0.

C : without serum

Table 12
Results of Inoue's tubercle bacilli agglutination by various rabbit immune sera

Sera of rabbits immunized with	Rabbit No.	Before (-) and after (+) immunization	Dilution of serum								C
			8	16	32	64	128	256	512	1:1,024	
			1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	
OT-sensitized red cells	1	-	2	2	2'	0	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2	2	1	1'	0
	2	-	3	2	2	2'	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	3	3	3	2	0	0
PF _I -sensitized tanned red cells	5	-	2	2	2'	1	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2'	1	0	0	0
	6	-	2	2	2	2	2'	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2'	1'	0	0	0
PF _I -sensitized red cells	7	-	2	2	2'	0	0	0	0	0	0
		+	2	2	2	2	0	0	0	0	0
	8	-	2	2	2	2'	0	0	0	0	0
		+	3	2	2	2	2	1'	0	0	0
PF _I -solution	9	-	2	2	2'	0	0	0	0	0	0
		+	3	3'	2	2'	1	0	0	0	0
	10	-	2	2	2	2'	1'	0	0	0	0
		+	3	3	3'	2	2'	0	0	0	0
PF _{II} -sensitized tanned red cells	11	-	2	3	3	1	0	0	0	0	0
		+	2	3	3	3	2	2'	1	0	0
	12	-	2	2	2	1	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	3	2	2	1'	0	0
PF _I -sensitized red cells	13	-	2	2	2	2'	1	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2	1	0	0	0
	14	-	2	2	2	2	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2	1	1	0	0
PF _{II} -solution	15	-	2	2	2	1	0	0	0	0	0
		+	3	3	3	2'	1	0	0	0	0
	16	-	3'	3'	3'	2'	1'	0	0	0	0
		+	3	3	3	2	2	1'	0	0	0

Table 13
Hemagglutination and hemolysis test of OT-sensitized red cells with or without having tannic treatment by the serum of immunized rabbits

Sera of rabbits immunized with	Rabbit No.	Hemo-sensitin	Treat-ment with tannic acid	Hemagglutination test		Hemolysis test	
				Dilution of serum	C	Dilution of serum	C
PR _{II} -sensitized tanned red cells	11	OT	+	3/2	1/0	###	##
		PR _{II}	+	3/2	2/1	###	##
	12	OT	+	3/3	2/1	###	##
		PR _{II}	+	3/3	2/2	###	##
	13	OT	+	3/2	2/1	###	##
		PR _{II}	+	3/3	2/2	###	##
PR _{II} -sensitized red cells	13	OT	+	3/2	2/1	###	##
		PR _{II}	+	3/3	2/2	###	##
	14	OT	+	3/2	2/1	###	##
		PR _{II}	+	3/3	2/2	###	##
	15	OT	+	3/3	2/2	###	##
		PR _{II}	+	2/2	2/1	###	##
PR _{II} -solution	15	OT	+	3/3	2/2	###	##
		PR _{II}	+	2/2	2/1	###	##
	16	OT	+	3/3	2/2	###	##
		PR _{II}	+	2/2	2/1	###	##

Table 15
 Inhibition of the hemagglutination by PF_I, PF_{II}, CF_I, CF_{II} and OT.
 Sera used were obtained from the rabbits immunized with PF_{II}-sensitized red cells
 (A) or PF_{II}-sensitized tanned red cells (B)

Sera (rabbit No.)	Hemo- sensitin	Treatment of red cells with tannic acid	Inhibit- ing antigen	Dilution of inhibiting antigen													C	
				The top column : OT														
				The lower column : OT-fraction														
10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480	40,960	81,920	163,840				
A (14)	OT	-	PF _I	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	
			PF _{II}	0	0	0	1'	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'
			CF _I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'
			CF _{II}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'
			OT	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'
			OT	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	2'
	PF _{II}	+	PF _I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	1	1	2
			PF _{II}	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	2	2	2	2	2
			CF _I	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			CF _{II}	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			OT	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2'	2'
			OT	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2'	2'
B (15)	OT	-	PF _I	1'	1'	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
			PF _{II}	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
			CF _I	1'	1'	1'	1'	1	1	2'	2'	2	2	2	2	2	2	
			CF _{II}	1'	1'	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2'	2'	2'	2'	
			OT	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	1	2'	2'	2'	2'	
			OT	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	1	2'	2'	2'	2'	
	PF _{II}	+	PF _I	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	
			PF _{II}	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	2'	
			CF _I	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	
			CF _{II}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2'	
			OT	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	1	1	1	1	2'	
			OT	0	0	0	0	0	0	1'	1	1	1	1	1	1	2'	
B (15)	PF _{II}	-	PF _I	1	1	1	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
			PF _{II}	0	0	0	0	1'	1	1	2	2	2	2	2	2		
			CF _I	2'	2'	2'	2'	2'	2	2	2	2	2	2	2	2		
			CF _{II}	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
			OT	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2'	2	2		
			OT	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2'	2	2		
	PF _{II}	+	PF _I	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1		
			PF _{II}	0	0	0	0	1'	1'	1'	1	1	1	1	1	1		
			CF _I	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
			CF _{II}	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
			OT	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1		
			OT	0	0	0	0	1'	1'	1	1	1	1	1	1	1		

Degree of inhibition is shown by the figures 2, 2', 1, 1', 0.

C : Serum + Sensitized red cells