

抗レプトスピラ免疫家兎血清の吸収試験 前後の蛋白像の変動について*

長崎大学風土病研究所臨床部第一研究室 (主任 吉田静麿助教授)

田 崎 弘, 西 田 公 一, 一 瀬 忠 邦
た さき ひろし にし だ きみ かず いち しせ ただ くに

An Experimental Study on the Electrophoretic Pattern of Antileptospiral Rabbit Serum with Reference to Agglutinin Absorption. Hiroshi TAsAKI, Kimikazu NISHIDA and Tadakuni ICHINOSE. Clinical Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University (Director: Ass. Prof. S. YOSHIDA).

緒 言

Leptospira (以下 *Lept.* と略記) 感染後に於ける血清蛋白像の変動については、吉田¹⁾, 山崎²⁾, 久保³⁾, 柿本⁴⁾, 橋本⁵⁾, 菊池⁶⁾ 等の報告にみられる如く、諸種伝染性疾患の際の血清蛋白像と同様に *Albumin* (以下 *Al* と略記) の減量と *Globulin* (以下 *G1* と略記) の増量が認められる。

先に田崎⁷⁾は抗 *Lept.* 免疫家兎血清を同一抗原をもつて吸収し、吸収前後の血清蛋白像の変動を観察して、吸収後 *Al* の増量、 β -*G1* 及び γ -*G1* の減量、従つて *A/G* の増加を認めたのであるが、各 *Lept.* 間には互に類属凝集反応を呈するものがあることが知られているので、免疫抗原と異なる他の *Lept.* 株にて免疫血清の抗体を吸収せしむることによつて、その血清蛋白像に何らかの変動を来すものではないかと考えて次の実験を行つた。

即ち家兎を *Lept. icterohaemorrhagiae* (以下 *icter.* と略記), *Lept. autumnalis* (以下 *autum.* と略記), *Lept. hebdomadis* (以下 *hebd.* と略記) 及び *Lept. australis A* (以下 *aust. A* と略記) の4種の *Lept.* をもつて感染免疫し、その免疫家兎血清を以上4種の *Lept.* にて夫々吸収して抗体成分を出来るだけ除去し、その前後の血清について凝集価並びに蛋白像の変動を観察し、主凝集抗体及び副凝集抗体について、いささかの知見を得たので茲に報告する。

実験材料並びに実験方法

1) 実験材料

Korthof 培地に发育せる *Lept.* を9000rpm 45分間遠心し、その沈渣を滅菌生理的食塩水にて3回洗滌後、沈渣を秤量して0.2%ホルマリン加pH7.0の滅菌生理的食塩水にて1mg/ccの割合で浮遊させ、氷室に保存して適宜使用した。

2) 実験方法

a) 実験動物: 健康な2kg前後の白色雌性の家兎を用いた。尙家兎は購入後一週間以上飼育観察して、健康状態を確かめた上で使用した。

b) 免疫方法: 上記菌液を家兎の耳静脈より第1回0.5cc/kg, 第2回1.0cc/kg, 第3回1.5cc/kg, 第4回2.0cc/kgと3日間隔にて4回注射して免疫した。

c) 被検血清: 実験家兎は飼料を一定にして飼育し、血清は最終注射後2週目に全採血を行つて使用した。

d) 凝集溶菌反応: Schueffner-Mochtar 凝集溶菌反応⁸⁾に準じて行つた。

e) 血清蛋白量⁹⁾: 日立蛋白計を用いて測定した。

f) 電気泳動¹⁰⁾¹¹⁾: 装置は日立製作所 HT-D 型 Tiselius 装置を用い、透折にはpH7.8 μ =0.1の磷酸緩衝液を用いた。泳動方法は電気泳動協会規定¹²⁾に従つた。

g) 吸収試験: Schueffner-Bohlander の法¹³⁾に準じて行つた。

実験成績

Lept. icter., *autum.*, *hebd.* 及び *aust. A* の4種の *Lept.* にて免疫した家兎血清の交叉凝集反応は第

第1表 各種 *Leptospira* の交叉凝集反応

抗原レ株 免疫血清	<i>Lept. icter.</i>	<i>Lept. autum.</i>	<i>Lept. hebd.</i>	<i>Lept. aust. A</i>
<i>Lept. icter.</i>	30.000	300	100	100
<i>Lept. autum.</i>	100	30.000	300	100
<i>Lept. hebd.</i>	30	100	30.000	100
<i>Lept. aust. A</i>	30	300	100	30.000

第2表 抗 *Lept. icterohaemorrhagiae* 免疫家兎血清吸収試験後の交叉凝集反応

抗原レ株 吸収抗原	<i>Lept. icter.</i>	<i>Lept. autum.</i>	<i>Lept. hebd.</i>	<i>Lept. aust. A</i>
<i>Lept. icter.</i>	300	100	10	10
<i>Lept. autum.</i>	30.000	30	10	10
<i>Lept. hebd.</i>	30.000	100	30	30
<i>Lept. aust. A</i>	30.000	100	10	10

1表に示す如く、免疫血清は同一の *Lept.* 株に対して30000倍以上の凝集価を示したが、他の *Lept.* 株に対しても、それぞれ程度の差は認められるが30倍乃至300倍陽性の類属凝集反応を示した。

抗 *Lept. icter.* 免疫家兎血清の吸収試験後の凝集価は、第2表に示す如く、*Lept. icter.* にて吸収した場合には主凝集価は30000倍以上の価より300倍と著明に低下し、又副凝集価も *Lept. autum.* に対するものは300倍より100倍、*Lept. hebd.* 及び *aust. A* に対するものは共に100倍より10倍に低下した。他の *Lept.* 株即ち *Lept. autum.*, *hebd.* 及び *aust. A* にて吸収した場合には主凝集素として *Lept. icter.* に対する凝集価はすべてに於いて依然として30000倍

以上にして少しも低下せず、副凝集素として *Lept. autum.* に対する凝集価は300倍より30~100倍、*Lept. hebd.* 及び *aust. A* に対する凝集価は夫々100倍より30倍へとその低下が認められた。

総蛋白量及び蛋白分層値は第3表に示す如く、抗 *Lept. icter.* 免疫家兎血清の吸収前の総蛋白量は6.4 g/dl であつたものが同一抗原である *Lept. icter.* にて吸収した場合には6.0g/dl に減量し、他の *Lept.* 株による吸収にては *Lept. autum.* によるものは軽度の減量を示したが、*Lept. hebd.* 及び *aust. A* によるものでは変動を示さなかつた。又蛋白分層値は同一抗原である *Lept. icter.* にて吸収した場合には Al の増量、 $\beta\text{-Gl}$ 及び $\gamma\text{-Gl}$ の減量が認められ、

第3表 抗 *Lept. icterohaemorrhagiae* 免疫家兎血清吸収試験後の血清蛋白像

血清蛋白 吸収抗原	Al %	$\alpha\text{-Gl}$ %	$\beta\text{-Gl}$ %	$\gamma\text{-Gl}$ %	TP g/dl	Al g/dl	$\alpha\text{-Gl}$ g/dl	$\beta\text{-Gl}$ g/dl	$\gamma\text{-Gl}$ g/dl	A/G
Vor	49.6	10.3	18.4	21.6	6.4	3.17	0.66	1.18	1.38	0.98
<i>Lept. icter.</i>	53.0	11.1	15.8	20.1	6.0	3.18	0.67	0.95	1.21	1.13
<i>Lept. autum.</i>	49.8	10.1	18.1	22.1	6.2	3.09	0.63	1.12	1.36	0.99
<i>Lept. hebd.</i>	49.8	10.1	18.5	21.8	6.4	3.18	0.65	1.18	1.39	0.99
<i>Lept. aust. A</i>	49.5	10.3	18.1	21.8	6.4	3.18	0.66	1.17	1.39	0.98

第4表 抗 *Lept. autumnalis* 免疫家兎血清吸収試験後の交叉凝集反応

抗原レ株 吸収抗原	<i>Lept. icter.</i>	<i>Lept. autum.</i>	<i>Lept. hebd.</i>	<i>Lept. aust. A</i>
<i>Lept. icter.</i>	0	30.000	30	30
<i>Lept. autum.</i>	10	1.000	100	30
<i>Lept. hebd.</i>	30	10.000	30	30
<i>Lept. aust. A</i>	30	30.000	100	10

第5表 抗 *Lept. autumnalis* 免疫家兎血清吸収試験後の血清蛋白像

血清蛋白 吸収抗原	Al %	α -G1 %	β -G1 %	α -G1 %	TP g/dl	Al g/dl	α -G1 g/dl	β -G1 g/dl	γ -G1 g/dl	A/G
Vor	50.9	10.8	15.2	23.0	6.6	3.36	0.71	1.00	1.52	1.02
<i>Lept. icter.</i>	51.3	10.5	15.4	22.8	6.4	3.28	0.67	0.99	1.46	1.05
<i>Lept. autum.</i>	55.6	11.6	11.5	21.1	6.0	3.34	0.70	0.69	1.27	1.25
<i>Lept. hebd.</i>	51.2	10.7	15.3	22.6	6.4	3.28	0.69	0.98	1.45	1.05
<i>Lept. aust. A</i>	51.1	10.7	15.3	22.9	6.4	3.27	0.68	0.98	1.47	1.04

第6表 抗 *Lept. hebdomadis* 免疫家兎血清吸収試験後の交叉凝集反応

抗原レ株 吸収抗原	<i>Lept. icter.</i>	<i>Lept. autum.</i>	<i>Lept. hebd.</i>	<i>Lept. aust. A</i>
<i>Lept. icter.</i>	10	30	30.000	30
<i>Lept. autum.</i>	0	10	30.000	30
<i>Lept. hebd.</i>	0	30	3.000	10
<i>Lept. aust. A</i>	10	30	30.000	30

従つてA/Gの増加が認められたが、他の *Lept.* 株にて吸収した場合も *Lept. autum.* 及び *hebd.* によるものでは同様の変動がみられたが、その程度は同一抗原による場合に比して極めて軽度であり、*Lept. aust. A* によるものでは余り変動がみられなかつた。

抗 *Lept. autum.* 免疫家兎血清を吸収した場合凝集価は第4表に示す如く、*Lept. autum.* にて吸収後主凝集価は30000倍以上より1000倍に低下し、副凝集価も100~300倍より10~100倍に低下を示したが、他の *Lept.* 株即ち *Lept. icter.*, *hebd.* 及び *aust. A* にて吸収した場合主凝集価は *Lept. hebd.* によるものにて30000倍以上より10000倍に軽度の低下を示したのみで他に変動は認められなかつた。副凝集素として *Lept. icter.* に対する凝集価は100倍より全く消失するか乃至30倍、*Lept. hebd.* に対する凝集価は300倍より30~100倍、*Lept. aust. A* に対する凝集価は100倍より10~30倍に低下した。

総蛋白量及び蛋白分層値は第5表に示す如く、抗 *Lept. autum.* 免疫家兎血清の吸収前の総蛋白量は6.6g/dlにして、吸収後全例に於いて軽度の減量が認

められ、同一抗原である *Lept. autum.* にて吸収した場合には6.0g/dlとなり、他の *Lept.* 株による吸収の場合の総蛋白量の減量に比して大であつた。又蛋白分層値は同一抗原である *Lept. autum.* にて吸収した場合 Al の増量、 β -G1 及び γ -G1 の軽度の減量が認められ、他の *Lept.* 株にて吸収した場合も同様の変動がみられたが、その程度は同一抗原の場合に比して極めて軽度であつた。従つて A/G はすべてに於いて増加したが、同一 *Lept.* 株にて吸収した場合は他の *Lept.* 株による場合に比して大であつた。

抗 *Lept. hebd.* 免疫家兎血清を吸収した場合には第6表に示す如く、*Lept. hebd.* をもつて吸収した際、主凝集価は30000倍以上より3000倍に低下し、又副凝集価も30~100倍より全く消失するか或は10~30倍に低下を示したが、他の *Lept.* 株即ち *Lept. icter.*, *autum.* 及び *aust. A* にて吸収した場合には主凝集価はすべてに於いて依然として30000倍以上にして低下せず、副凝集素として *Lept. icter.* に対する凝集価は30倍より全く消失するか乃至10倍、*Lept. autum.* 及び *aust. A* に対する凝集価は共に100倍より10~30

第7表 抗 *Lept. hebdomadis* 免疫家兎血清吸収試験後の血清蛋白像

血清蛋白 吸収抗原	Al %	α -G1 %	β -G1 %	γ -G1 %	TP g/dl	Al g/dl	α -G1 g/dl	β -G1 g/dl	γ -G1 g/dl	A/G
Vor	52.2	10.6	15.6	21.6	6.8	3.55	0.72	1.06	1.47	1.09
<i>Lept. icter.</i>	54.0	10.5	14.7	20.8	6.6	3.56	0.69	0.97	1.37	1.16
<i>Lept. autum.</i>	53.3	10.6	14.8	21.2	6.6	3.52	0.70	0.98	1.40	1.14
<i>Lept. hebd.</i>	55.6	11.2	12.8	20.3	6.4	3.56	0.72	0.82	1.30	1.25
<i>Lept. aust. A</i>	53.2	10.7	15.1	20.9	6.4	3.40	0.68	0.97	1.34	1.14

第8表 抗 *Lept. australis* A 免疫家兎血清吸収試験後の交叉凝集反応

吸収抗原	抗原レ株			
	<i>Lept. icter.</i>	<i>Lept. autum.</i>	<i>Lept. hebd.</i>	<i>Lept. aust. A</i>
<i>Lept. icter.</i>	0	100	30	10.000
<i>Lept. autum.</i>	10	100	30	30.000
<i>Lept. hebd.</i>	10	100	30	10.000
<i>Lept. aust. A</i>	0	30	10	300

第9表 抗 *Lept. australis* A 免疫家兎血清吸収試験後の血清蛋白像

吸収抗原	血清蛋白									
	Al %	α -G1 %	β -G1 %	γ -G1 %	TP g/dl	Al g/dl	α -G1 g/dl	β -G1 g/dl	γ -G1 g/dl	A/G
Vor	49.1	10.8	15.2	24.2	6.8	3.34	0.73	1.03	1.70	0.96
<i>Lept. icter.</i>	49.8	10.9	14.9	24.3	6.8	3.38	0.74	1.01	1.65	0.99
<i>Lept. autum.</i>	49.2	10.8	15.0	24.9	6.8	3.35	0.74	1.02	1.69	0.97
<i>Lept. hebd.</i>	49.7	10.8	14.8	24.7	6.6	3.28	0.71	0.98	1.63	0.99
<i>Lept. aust. A</i>	50.9	11.2	14.4	23.6	6.6	3.36	0.75	0.95	1.54	1.04

倍に低下した。

総蛋白量及び蛋白分層値は第7表に示す如く、抗 *Lept. hebd.* 免疫家兎血清の吸収前の総蛋白量は6.8g/dlにして吸収後全例に於いて軽度の減量が認められた。即ち同一抗原である *Lept. hebd.* による吸収の場合と *Lept. aust. A* による場合とは共に6.4g/dlとなり、*Lept. aust. A* 及び *icter.* による場合は共に6.6g/dlに減量した。蛋白分層値は同一抗原である *Lept. hebd.* にて吸収した場合にはAlの増量、 β -G1及び γ -G1の減量が認められ、従つて、A/Gの増加があり、他の *Lept.* 株にて吸収した場合も同様の変動が認められたが、その程度は同一抗原の場合に比して極めて軽度であつた。

抗 *Lept. aust. A* 免疫家兎血清を吸収した場合には、第8表に示す如く、*Lept. aust. A* をもつて吸収した際、主凝集価は30000倍以上より300倍に低下し、又副凝集価も30~300倍より全く消失するか或は10~30倍に低下したが、他の *Lept.* 株にて吸収した場合には主凝集価は *Lept. icter.* 及び *hebd.* による吸収にて夫々30000倍以上より10000倍に軽度の低下を示し、*Lept. autum.* による吸収にては低下が認められなかつた。又副凝集素として *Lept. icter.* に対する凝集価は30倍より全く消失するか或は10倍、*Lept. autum.* に対する凝集価は300倍より30~100倍、*Lept. hebd.* に対する凝集価は100倍より10~30倍に低下した。

総蛋白量及び蛋白分層値は第9表に示す如く、抗 *Lept. aust. A* 免疫家兎血清の吸収前の総蛋白量は6.8g/dlにして、吸収後同一抗原である *Lept. aust. A*

にて吸収した場合には6.6g/dlに減量し、他の *Lept.* 株にて吸収した場合 *Lept. icter.* 及び *autum.* によるものは不変であつたが、*Lept. hebd.* によるものは同一抗原による場合と同様に6.6g/dlに減量した。蛋白分層値は同一抗原である *Lept. aust. A* にて吸収した場合Alの増量、 β -G1及び γ -G1の減量が認められ、従つてA/Gの増加があり、他の *Lept.* 株にて吸収した場合も之と同様の変動が認められたが、その程度は同一抗原の場合に比して軽度であつた。

α -G1は全般を通じて吸収前後一定の変動を認められなかつた。

総括並びに考按

Lept. は一個の単一なる抗原から成り立っているものではなく、幾多の部分抗原の集簇から構成されていることは既に先人⁽¹⁴⁾の認むところである。従つて *Lept.* に対する凝集抗体も単一なものではなく、いくらかの凝集抗体の集簇から成り、抗原 *Lept.* と同一の *Lept.* に反応する主凝集抗体と異種の *Lept.* に反応する副凝集抗体より成ると考えられる。即ち *Lept.* の抗血清について凝集反応を実施する場合類属凝集反応が現われて菌型の決定に困難を感じる場合がある。かかる場合菌型の同定には吸収試験の行われることが多い。北岡、坂巻等は凝集反応と吸収試験とを併用することによつて凡ゆる *Lept.* の抗原分析を行い *Lept.* の分類に資せんとしている。而して *Lept.* 免疫血清の吸収試験の際、抗原と同一の *Lept.* 株による吸収にてはそのすべての凝集抗体は勿論完全に吸収され得るが、異種の *Lept.* 株による吸収にては主凝集抗体は尚存統

し、副凝集抗体は抗原性の類似しているものでは完全に吸収され得るし、抗原性の異なるものでは軽度の吸収がみられると考えられる¹⁴⁾。

本実験に於いては *Lept. icter., autum., hebd.* 及び *aust. A* の4種の *Lept.* にて個々に免疫された4種の単価家兎免疫血清をそれぞれの *Lept.* を以つて吸収し、吸収前後の凝集価と血清蛋白像の変動を観察したのであるが、凝集価は免疫抗原と同一の *Lept.* 株にて吸収した場合主凝集抗体の著明の減量と副凝集抗体の消失乃至減量が認められ、免疫抗原と異なる *Lept.* 株にて吸収した場合主凝集抗体は一部に軽度の減量がみられるのみで、殆んどその変動は認められず、副凝集抗体は同一の *Lept.* 株にて吸収した場合と同様に消失乃至減量が認められた。血清蛋白像にては免疫抗原と同一なる *Lept.* 株にて吸収した場合総蛋白量の軽度の減量、AI の増量、 β -GI 及び γ -GI の減量、従つて A/G の増加が認められ、 α -GI は殆んど不変にして之は田崎⁷⁾ の成績と一致する。免疫抗原と異なる *Lept.* 株にて吸収した場合総蛋白量の軽度の減量を示したものはその3分の2にして他は不変であり、AI の増量、 β -GI 及び γ -GI の減量、従つて A/G の軽度の増加が認められ、 α -GI には一定の変化は認められなかつたが、その増減の程度は同一抗原にて吸収した場合に比して極めて軽度であつた。之よりみるに副凝集抗体も主凝集抗体と同様に β -GI 及び γ -GI 中に含まれるものと推察される。

尙本実験に於いては血清蛋白像の測定のために抗血清を稀釈することなく、吸収試験を実施したので吸収試験後に於いても凝集抗体を全く吸収せしむることが出来なかつた。それで血清蛋白像の変動も凝集抗体が

完全に吸収された場合に比して少いのではないかと考えられるのであるが、主凝集抗体の吸収の際には軽度ながら血清蛋白像の変動が認められ、副凝集抗体の吸収の際には之より極めて軽度の血清蛋白像の変動が認められた。

以上の成績より凝集抗体は主、副共に β -GI 及び γ -GI 中に含まれ、凝集抗体中主凝集抗体が大部分を占め、類属反応にあづかる副凝集抗体は極めて少量に存在するものと考えられる。

結 語

レプトスピラ病の病原体の中で *Lept. icter., autum., hebd.* 及び *aust. A* の4種の *Lept.* をもつて家兎を免疫し得られた抗血清を夫々の *Lept.* 株にて吸収して、その凝集価、総蛋白量及び血清蛋白分層値の変動を観察して次の如き成績を得た。

1) 免疫抗原と同一の *Lept.* 株にて吸収した場合には主凝集価の著明なる低下と副凝集価の低下乃至消失が認められ、総蛋白量の軽度の減量、AI の増量、 β -GI 及び γ -GI の減量、従つて A/G の増加が認められた。

2) 免疫抗原と異なる *Lept.* 株にて吸収した場合には副凝集価の低下乃至消失が認められたが、主凝集価には殆んど変動が認められなかつた。又総蛋白量の軽度の減量がみられるものが多く、AI の増量、 β -GI 及び γ -GI の減量、従つて A/G の増加が認められたが、その程度は免疫抗原と同一の *Lept.* 株にて吸収した場合に比して極めて軽度であつた。

(欄筆するに当り御指導並びに御校閲を賜つた吉田静磨助教授に深謝する)

参 考 文 献

- [1] 吉田長之外1名: *Tiselius* 電気泳動法に依る実験的研究. 日本細菌学雑誌, 5 (4) : 188 (1950).
- [2] 山崎晴一郎外1名: 各種肝疾患に於ける血清蛋白泳動像. 日本消化機病学会雑誌, 49 (10) : 58 (1952).
- [3] 久保郁哉外3名: レプトスピラ病に関する研究. 日本伝染病学会雑誌, 25 (1~3) : 33~34 (1951).
- [4] 柿本 杉夫: 諸種伝染性疾患に於ける血清蛋白像に関する研究. 医学研究, 24 (10) : 2069~2090 (1954).
- [5] 橋本 喬: ワイル血清に関する研究. 日本細菌学雑誌, 10 (10) : 893~895 (1955).
- [6] 菊地 公明: 黄血出血性レプトスピラ抗血清の

精製に関する研究. 日本細菌学雑誌, 11 (8) : 709~717 (1956).

[7] 田崎 弘: 抗レプトスピラ免疫家兎血清の蛋白像に関する研究. 長崎医学会雑誌, 33 (10増刊) : 208~234 (1958).

[8] Schüffner, W. & A. Mochtar: *Vesuche zur Aufteilung von Leptospirenstämmen mit einleitenden Bemerkungen über den Verlauf von Agglutination und Lysis.* Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 101 : 405~453 (1927).

[9] 吉川 春寿: 簡易屈折計による血清蛋白濃度測定. 東京医事新誌, 66 (9) : 431~433 (1949).

[10] 平井秀枝外1名: 電気泳動法. 共立出版株式会社, 東京 (1955).

[11] 杉本 良一: 蛋白質研究の為の電気泳動技術. 納谷書房, 東京 (1955) .

[12] 電気泳動研究会: Tiselius 電気泳動法実施規定 (1950) .

[13] Schüffner, W. und Bohlender, H.: Zur Technik der Absättigungsversuchs. Zbl. Bakt, I, Orig 144: 437~439 (1939) .

[14] 北岡正見外1名: 各種レプトスピラの抗原分析に関する研究. 日本伝染病学会雑誌, 21 (4~6) : 50~52 (1948) .

[15] 坂巻 良雄: Leptospira の抗原分析 (Leptospira の分類) に関する研究. 東京医事新誌, 66 (9) : 421~429 (1949) .

Summary

This work was carried out with a view to inquire into some changes in the electrophoretic pattern of antileptospiral serum, before and after agglutinin absorption by leptospirae, from rabbits inoculated with organisms of *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *autumnalis*, *hebdomadis* and *australis* A.

The results was summarized as follows:

1) In each antiserum whose agglutinins were almost completely absorbed by its corresponding leptospira, it was found that a more or less marked decrease in the total protein content, beta and gamma globulin fractions took place, accompanying a partial increase in the alpha globulin fraction.

2) After agglutinin absorption by a heterogenous leptospira of an antiserum, there was little change in the specific agglutination titre, while the group agglutination pronouncedly dropped in the titre, or was practically lost. And besides, change in the total protein content and protein fractions, compared with that in case of absorption by homogeneous leptospira, was found to be much slighter. (Authors)