

レプトスピラの沈降反応に関する研究

第2報*

長崎大学風土病研究所臨床部 (指導: 横田名誉教授
主任: 吉田 助 教授)

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 教授)

西 田 公 一
にし だ きみ かず

Experimental Studies on the Precipitin Reaction of Leptospirae. Report II. Kimikazu NISHIDA. Clinical Department I (Director: Ass. Prof. Shizuma YOSHIDA; Leader: Prof. emer. Soichirō YOKOTA), Pathological Department (Director: Prof. Noboru TOKURA), Research Institute of Endemics, Nagasaki University.

本論文の要旨は、第33回日本伝染病学会総会・昭和34年4月6日・東京において発表した。

第2章 沈降反応の吟味

実験Ⅰ. レプトスピラ抽出抗原による沈降反応の特異性について

第1章において、レプトスピラ免疫家兎血清が該当抗原によつて沈降反応のみられることを報告したが、次の如く、各種免疫家兎血清及び患者人血清について、本抗原による沈降反応を実施して陰性であることを確かめ、本沈降反応がレプトスピラに特異的のものであることを推論した。

実験材料並びに実験方法

抗原: 第1章を参照。

被検血清:

1) 正常家兎血清: 10例

2) 志賀赤痢菌免疫家兎血清: 1例

志賀1型菌液を0.5, 1.0, 1.0, 1.5ml 宛4~5日毎に4回、2kg内外の健康家兎の静脈内に注射し、最終注射より2週間目に血清を採り、凝集価1.800倍に上昇したことを確かめて実験に供した。

3) Korthof 培地免疫家兎血清: 1例

10%山羊血清加 Korthof 培地を1.0, 1.5, 2.0, 3.0ml/kgと漸次増量して3日毎に4回耳静脈に注射し、最後の注射より2週間目に血清を採り、10%山羊

血清加 Korthof 培地に対する沈降反応を行い、抗原価800倍、抗体価64倍の陽性を示すことを確かめて実験に供した。

4) 患者人血清: 肝疾患4例、腎疾患8例、肺結核20例、計32例

以上の血清は、56°C/30分加熱によつて非凝性とし、S-M反応は総べて陰性であることを確かめて用いた。

実験成績

以上の血清は総べてレプトスピラ抽出抗原に対する沈降反応を示さなかつた。

実験Ⅱ. 沈降反応の活性因子について

従来、化学的又は物理的方法によつて、病原菌の菌体成分の劃分を抽出して、これと免疫血清との間の沈降反応を疾病の診断に供することは相当に行われつつある。微生物が蛋白質、ポリペプチド、含水炭素、脂質、無機物及び水分から構成されていることは周知の通りであつて、この各成分の含量は菌種により相違しているが、なかんづく、蛋白質、ポリペプチド及び多糖体が沈降反応に参与するものとされている。近時肺炎菌の研究から出発して諸種の菌種から化学的成分を分離抽出し、それ等によつて型特異性或いは種特異性の証明などに沈降反応が行なわれるようになってきたが、レプトスピラの沈降反応についてみるに、土屋(1950)は Millon 反応, sulfosalicyl 酸反応ともに弱陽性, Molisch 反応, Fehling 反応ともに強陽性の

* 長崎大学風土病研究所業績第317号

第 11 表

劃分		V 液					劃分		E-F					劃分		K-F				
抗体	抗原	1	2	4	8	16	抗体	抗原	1	2	4	8	16	抗体	抗原	1	2	4	8	16
2		+	+	+	+	+	2		+	+	+	+	+	2						
4		+	+	+	+	+	4		+	+	+	+		4						
8		+	+	+	+	+	8		+	+	+	+		8						
16		+	+	+	+		16		+	+	+	+		16						
32		+	+	+	+		32		+	+	+	+		32						

レプトスピラ抽出液にて沈降反応を行い、陽性の成績を得ているが、著者もレプトスピラ沈降反応用抗原物質を独自の方法によつて抽出に成功したので、その活性因子が何れの劃分にあるかを検討した。

実験材料並びに実験方法

抗原：第 1 章を参照，

抗血清：第 1 章を参照，

沈降反応術式並びに判定法：第 1 章を参照，

実験成績

V 液，E 劃分及び K 劃分によるレプトスピラ免疫家

兎血清に対する沈降反応の成績は、第 11 表に示す如く、V 液では抗原価 16：抗体価 32。E 劃分では抗原価 16：抗体価 16 を示したが、K 劃分では陰性であつた。

実験Ⅲ. 沈降反応に及ぼす各種条件の影響

1) 抗原の pH が沈降反応に及ぼす影響

前項までの実験においては、抗原及び稀釈液 (0.9%生理食塩水) は中性に補正して実施したのであるが、この重層する抗原の pH の変化が沈降反応に如何なる影響を及ぼすかを検索した。

実験材料並びに実験方法

抗原：第 1 章に記述した抽出液を pH 6.2, 6.4...8.0

第 12 表 抗原の pH と沈降反応の関係

pH		6.2					pH		6.4					pH		6.6					pH		6.8				
抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+		2		+	+	+	+		2		+	+	+	+		2		+	+	+	+	
4		+	+	+			4		+	+	+	+		4		+	+	+	+		4		+	+	+	+	
8		+	+	+			8		+	+	+			8		+	+	+	+		8		+	+	+	+	
16		+	+	+			16		+	+	+			16		+	+	+			17		+	+	+		
32		+					32		+	+	+			32		+	+	+			32		+	+	+		

pH		7.0					pH		7.2					pH		7.4					pH		7.6				
抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+		2		+	+	+	+		2		+	+	+	+		2		+	+	+	+	
4		+	+	+			4		+	+	+	+		4		+	+	+	+		4		+	+	+		
8		+	+	+			8		+	+	+	+		8		+	+	+	+		8		+	+	+		
16		+	+	+			16		+	+	+			16		+	+	+			16		+	+	+		
32		+	+				32		+	+	+			32		+	+	+			32		+	+	+		

pH		7.8					pH		8.0				
抗体	抗原	2	4	8	16	32	抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+		2		+	+	+	+	
4		+	+	+			4		+	+	+		
8		+	+	+			8		+	+	+		
16		+	+	+			16		+	+	+		
32		+	+	+			32		+	+	+		

に修正した生理食塩水で倍数稀釈して、それぞれ pH を異にする抗原稀釈液を作製して実験に供した。

抗血清：第 1 章を参照

沈降反応術式並びに判定法：第 1 章を参照。

実験成績

第 12 表に示す如く、pH 6.6 より pH 7.4 の間では沈降反応の場に差異を認めないがそれより酸性或いはアルカリ性に於いては、稍沈降反応の場の縮小する傾向が認められた。

2) 抗血清稀釈液の相違による影響

実験材料並びに実験方法

抗原：第 1 章を参照。

抗血清：第 1 章を参照。

沈降反応術式並びに判定法：沈降反応は第 1 章に則り実施したのであるが、抗血清の稀釈液として、1.2% アラビヤゴム加生理食塩水溶液を用うる代りに、正常家兎血清を用いて稀釈を行った。

実験成績

第 13 表に示す如く、両者の間には殆んど差異を見ることは出来なかつた。

小 括

レプトスピラ抽出物質によつて、正常家兎血清、赤痢菌免疫家兎血清、Korthof 培地免疫家兎血清並びに肝疾患、腎疾患及び肺結核患者人血清に就いて沈降反応を行い、すべて陰性であることを確かめ、略々本抽出物質による沈降反応がレプトスピラに特異的であることを明かにした。また、著者の方法によつて、レプトスピラ抽出物質を蛋白割分と含水炭素割分に分別し、レプトスピラの沈降反応の活性因子は蛋白割分にあることを証明した。次に抗原液が pH 6.6 より pH 7.4 の間では沈降反応の場に影響のないことを知つた。更に抗血清を 1.2% アラビヤゴム加生理食塩水溶液で稀釈しても、正常家兎血清で稀釈しても、両者に殆んど差異のないことを明かにした。

第 13 表

稀釈液	抗原					
	抗体	2	4	8	16	32
家 兎 血 清	2	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	
	16	+	+	+	±	
	32	+	+	+		

第 3 章 レプトスピラ抽出液の免疫原性

前述レプトスピラ抽出液を以つて家兎を免疫し、その抗血清に就いて、特異的抗原抗体反応の成立するかどうかを沈降反応並びに凝集反応 (S-M 反応) によつて観察した。

実験材料並びに実験方法

抗原：Leptospira autumnalis の 10mg/CC の溜水浮游液を 37°C の恒温器と 5°C の氷室に 1 日交互に 1 週間反復放置して、自家融解を図つた後、それに 56°C / 60 分の加温を施し、これを 9000r.p.m./45 分間遠心し、上清を分離してレプトスピラ抽出液を作り、0.5% の割に石炭酸を加えたものである。

免疫方法及び抗血清：2 kg 内外の白色健常家兎を用い、1 回免疫の場合は 3 cc/kg、4 回免疫の場合は 0.5, 1:0, 1.5 及び 2cc/kg の割合に漸次抗原を増量して 3 日毎に耳静脈より注射し、注射後週毎に採血して血清を分離し、非働化したものである。

検査法：沈降反応の沈降原として本抗原を用い、その術式並びに判定法は第 1 章に於ける場合と同様であり、凝集反応は S-M 法に拠る。

実験成績

1. 1 回免疫家兎血清の成績

第 14 表に示す如く、沈降反応の場は、第 3 週において抗原価 8 : 抗体価 8 であり、最大の「反応の場」を示し、その後は漸次縮小する傾向が見られた。

凝集反応は 3 ~ 4 週に凝集価 30,000 倍で最高を示し、その後は低下する傾向が見られた。

2. 4 回免疫家兎血清の成績

第 15 表に示す如く、沈降反応の場は、第 2 週に於いては抗原価 16 : 抗体価 8 であり、1 回免疫より速かに最高の反応を示し、且つ反応の場も大きくて、その後は漸次縮小する傾向が見られた。

凝集反応も 2 ~ 3 週において凝集価 30,000 倍で最高を示し、1 回免疫より早く最高に達するようになり、その後は漸次に低下する傾向が見られた。

稀釈液	抗原					
	抗体	2	4	8	16	32
ア ラ ビ ヤ ゴ ム 液	2	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	
	16	+	+	+		
	32	+	+	+		

第 14 表

週		1					2					3					4				
沈 降 反 応	抗体\抗原	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		1						+	+	+			+	+	+			+	+	+	
	2						+	+	+			+	+	+			+	+	+		
	4						+	+	+			+	+	+			+	+	+		
	8						+	+	+			+	+	+			+	+	+		
	16						+	+	+			+	+	+			+	+	+		
S-M 反応	凝集価	300					3000					30000					30000				

週		5					6					7					8				
沈 降 反 応	抗体\抗原	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		1	+	+	+			+	+	+			+	+				+			
	2	+	+	+			+	+	+			+	+				+				
	4	+	+				+	+				+	+				+				
	8	+	+				+	+				+	+				+				
	16																				
S-M 反応	凝集価	10000					300					100					30				

第 15 表

週		1					2					3					4				
沈 降 反 応	抗体\抗原	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		1	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
	2	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	
	4	+	+	+			+	+	+			+	+	+			+	+	+		
	8	+	+				+	+	+			+	+				+	+			
	16						+	+	+			+	+				+	+			
S-M 反応	凝集価	10000					30000					30000					10000				

週		5					6					7					8				
沈 降 反 応	抗体\抗原	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		1	+	+	+			+	+	+			+	+				+			
	2	+	+				+	+				+	+								
	4	+	+				+	+													
	8																				
	16																				
S-M 反応	凝集価	3000					1000					300					300				

小 括

Leptospira autumnalis の菌体抽出物質によつて免疫された家兎血清について、沈降反応及び凝集反応の発呈を見、本抽出物質が免疫原性を有することを明らかにした。また、免疫後抗体の消長を週を追つて検索するに、1回免疫では3~4週目に、4回免疫では最後の注射より2~3週目に最高値に達し、その後漸次低下する傾向がみられた。

〔附〕レプトスピラ抽出液の蛋白割合の免疫原性

既報の方法によつて得たレプトスピラ抽出液(V液)

を用いて家兎を免疫し、抽出液の抗原性を確かめ、また、抽出液の沈降反応に於ける活性因子は、著者の方法によつて分別すると、蛋白割合にあり、含水炭素割合によつては沈降反応は陰性であることを明らかにしたので、蛋白割合によつて家兎を免疫してその免疫原性の証明を試みた。

実験材料並びに実験方法

抗原：レプトスピラ抽出液(V液)に20%三塩化醋酸を加えてpH2.0に至らしめ、其処に生ずる沈澱を分離する。それを溜水に浮かべて、n/10-NaOHでpH

第 16 表

週		1					2					3					4				
沈降反応	抗体/抗原	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
		1	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
	2	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		
	4	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+			+	+			
	8	+					+	+	+			+	+				+				
	16						+					+					+				
S-M反応	凝集価	1000					10000					3000					1000				

週		5					6					7					8				
沈降反応	抗体/抗原	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
		1	+	+	+			+	+				+					+			
	2	+	+				+	+				+					+				
	4																				
	8																				
	16																				
S-M反応	凝集価	300					100					30					30				

5.8として溶解し、澱別して不溶部を除き、再度三塩化醋酸を添加し、pH2.8で沈降せしめる。かかる沈降・溶解の操作を数回繰返し、最後の沈降物をn/10-NaOHでpH8.0とした原量（分別時）の溜水に溶解したものを蛋白劃分（E-F）とした（第1章を参照）。

免疫方法及び抗血清：健常白色家兎（S-M反応並びに沈降反応陰性）の耳静脈内に蛋白劃分を3.0cc/kg 1回だけ注射を行い、適時採血し非働化（56°C/30分）して実験に供した。

実験成績

第16表に示す如く、沈降反応はすでに第2週目に於いて抗原価16：抗体価8を示して最高の反応の場を現わし、漸次縮小する傾向が見られた。凝集反応もまた、第2週目において10.000倍と最高の凝集価を示し、その後は沈降反応と同様に漸次低下する傾向が見られた。

小 括

蛋白劃分（E-F）免疫家兎血清は、抽出液（V液）免疫家兎血清と殆んど同程度の凝集反応及び沈降反応を現わし、抽出物質の抗原性としての有効因子は、著者の得た劃分に関する限り、蛋白劃分にあると考えて差支えないものと考えられる。

第4章 抗レプトスピラ血清抗体の推移

Ehrlich の側鎖説によると、沈降素は構造並びに作用の機転に於いて凝集素と同一の系統に属し、結合簇（haptophore Gruppe）と結合した沈降原を沈降簇

（präcipitierende Gruppe）なる作用簇（zymphose Gruppe）によつて沈降させるものであるが、従つて、沈降素の消長は凝集素のそれと並行するであろうことが考えられたので、レプトスピラ接種人血清及びレプトスピラ免疫家兎血清に就いて下記の観察を行つた。

実験1. レプトスピラ接種人血清

実験材料並びに実験方法

抗原：沈降反応抗原は第1章参照。凝集反応は、S-M反応に従い、コルトフ培地培養の生菌を抗原として使用した。

感染方法及びに抗血清：Leptospira autumnalis 感染モルモット心血をコルトフ培地に培養した菌液 3.0ccを脳梅毒の発熱療法のために患者の了解の下で臀部に1回だけ注射を行つて感染せしめた。接種後、適時採血、非働化した血清を一連の検査に供した。血清の稀釈には1.2%アラビヤゴム加生理食塩水溶液を用いた。

実験成績

第17表に示す如く、沈降反応は2週目より陽性となり、3-4週目に於いて抗原価2：抗体価8で最大の反応の場を示したが、その後は抗体価のみ低下して縮小する傾向がみられた。

凝集反応は漸次上昇し、3-5週に於いて凝集価30.000倍で最高の凝集価を示し、その後は少々低下する傾向がみられた。

実験II. レプトスピラ免疫家兎血清

第 17 表

週		1					2					3					4				
沈 降 反 応	抗 体	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
		1						+	+				+	+				+	+		
	2						+					+					+				
	4																				
	8																				
	16																				
S-M 反応	凝集価	1000					10000					30000					30000				

週		5					6					7					8				
沈 降 反 応	抗 体	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
		1	+	+				+	+				+	+				+	+		
	2	+					+					+					+				
	4	+					+					+					+				
	8																				
	16																				
S-M 反応	凝集価	30000					10000					10000					3000				

実験材料並びに実験方法

実験成績

抗原：前項を参照。

免疫方法並びに抗血清：2.0kg内外の白色健常家兎（沈降反応及びS-M反応陰性）の耳静脈内に第1章で述べた方法に依つて作成したLeptospira autumnalis Vaccin (1.0mg/cc)を2.0cc/kg1回だけ注射して免疫した。免疫後、適時採血、非働化した血清を1.2%アラビヤゴム加生理食塩水溶液を以つて稀釈して実験に供した。

反応術式並びに判定法：前項を参照。

1) 第1例

第18表に示す如く、沈降反応に於いては1週目より既に陽性となり、漸次反応は増強して4-5週に於いて抗原価16：抗体価8で最大の沈降反応の場を示し、その後は縮小する傾向が見られたが、この時、抗原価の変化は比較的少なく、抗体価の増減が鋭敏であつたことは人血清の場合と同様であつた。

凝集反応に於いては、3-4週に於いて凝集価30,000倍で最高値を示し、その後は低下する傾向がみられた。

2) 第2例

第 18 表

週		1					2					3					4				
沈 降 反 応	抗 体	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		2	+	+	+			+	+	+			+	+	+			+	+	+	+
	4	+					+					+					+				
	8																				
	16																				
	32																				
S-M 反応	凝集価	1000					10000					30000					30000				

週		5					6					7					8				
沈 降 反 応	抗 体	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		2	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+			+	+	+	
	4	+	+	+			+	+	+			+	+				+	+			
	8	+	+	+			+	+				+	+				+	+			
	16																				
	32																				
S-M 反応	凝集価	10000					3000					3000					1000				

第 19 表

週		1					2					3					4				
沈 降 反 応	抗 体	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		2	+	+	+			+	+	+			+	+	+			+	+	+	
	4	+					+					+					+				
	8						+					+					+				
	16											+					+				
	32											+					+				
S-M 反 応	凝集価	100					300					1000					1000				

週		5					6					7					8				
沈 降 反 応	抗 体	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32
		2	+	+	+			+	+	+			+	+	+			+	+		
	4	+	+	+			+	+				+	+				+				
	8	+																			
	16																				
	32																				
S-M 反 応	凝集価	1000					1000					100					100				

第19表に示す如く、沈降反応は1週目より既に陽性となり、3—5週に於いて抗原価8：抗体価8で最大の反応の場を示し、その後は漸次縮小する傾向がみられるが、この際、抗体価の変化が抗原価のそれに先んじたことは前例と同様であつた。

凝集反応は漸次増強したが、あまり高度の上昇は見られず、3—6週に於いて凝集価1,000倍で最高値を示し、その後は低下することがうかがわれた。

小 括

実験的患者血清（1例）及びレプトスピラ免疫家兎血清（2例）に於いて、沈降反応は凝集値の上昇につれて反応の場を漸次に増大し、沈降反応並びに凝集反応の発現の最著明な時期は略々一致して3—5週の間であり、凝集価の低下につれて、沈降反応の場も縮小する傾向が見られ、この際、抗原価の変化より抗体価の増減が先行することが特質と思われた。これによつて、抗レプトスピラ血清に於いては、沈降反応と凝集反応との消長に平行関係の存することが知られた。

第 5 章 抗レプトスピラ免疫家兎血清の
吸収試験前後の沈降反応について

Leptospira autumnalis, hebdomadis, australis A 及び *icterohaemorrhagiae* の4株の抗原を以つて家兎を免疫し（第1章参照）、それらの免疫血清と各株との交叉沈降反応並びに交叉凝集反応を行い、それらの4株間には或程度著明な類属反応が認められたので、Schüffner-Bohlander(1939)の法に準じて交叉吸収試験を行い、それら4株の血清学的特異性を沈降

反応の面から観察した。

実験材料並びに実験方法

菌株：当教室保存の *Leptospira autumnalis, hebdomadis, australis* A 及び *icterohaemorrhagiae* の4株で、此等の株は山羊血清を10%の割合に添加した Korthof 培地に累代培養されたものである。

抗血清：上記4株のレプトスピラの1.0 mg/cc の Vaccin（第1章参照）を家兎の耳静脈内に3日毎に反覆4回注射して単価免疫血清を作り、凝集価30,000倍に達して沈降素の産生も最高に達したと推定される時期に全採血し、血清を分離して、型の如く非酸化、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存した。

抗原：沈降反応用抗原は、第1章記述の方法に則り10mg/ccのレプトスピラ浮游液から作製した。

沈降反応術式並びに判定法：第1章を参照。

吸収試験：レプトスピラの吸収試験は、それを一般細菌の如く多量に蒐集して吸収原とすることが容易でないで、比較的困難であると言わねばならない。著者の実験に於いては、Schüffner-Bohlander(1939)の方法を参考にして、0.5% フォルマリン添加のレプトスピラ培養液（1視野50以上）3 ℓ を10,000 r.p.m./30分遠心して集菌し、1回生理食塩水で洗滌した沈降レプトスピラを4.0ccの免疫血清に浮游して37°C/24時間放置した後、更に5°Cに1夜保存したものを10,000 r.p.m./60分間遠心して、その上清を分離する。この操作を数回繰返したものを吸収血清として用い、凝集反応並びに沈降反応を行った。

第20表 秋疫A免疫家兎血清の吸収前後の成績

抗原		A					B					C					W								
抗血清	抗原	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
A	無	2 4 8 16 32	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+				+	+				
A	A	2 4 8 16 32																							
A	B	2 4 8 16 32	+	+	+	+																			
A	C	2 4 8 16 32	+	+	+	+																			
A	W	2 4 8 16 32	+	+	+	+																			

抗血清	抗原	抗原価				抗体価			
		A	B	C	W	A	B	C	W
		16	2	4	2	32	8	16	8
A	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	8	0	0	0	16	0	0	0
	C	8	0	0	0	16	0	0	0
	W	8	0	0	0	16	0	0	0

抗血清	抗原	S-M 反応			
		A	B	C	W
		30000	100	100	300
A	A	0	0	0	0
	B	10000	0	0	0
	C	3000	0	0	0
	W	10000	0	0	0

実 験 成 績

Leptospira autumnalis 免疫家兎血清の吸収試験前後の沈降反応及び凝集反応の成績は、第20表に示す如く、吸収前、主抗原 (*autumnalis*) に対して30.000倍、*icterohaemorrhagiae* に対して300倍、*hebdomadis* 及び *australis A* に対しては100倍の凝集価を示した。主抗原で吸収すれば、凝集価はすべて消失するが、副抗原たる *hebdomadis*, *australis A* 及び *icterohaemorrhagiae* で吸収すれば、*autumnalis* に対してのみ凝集素の残存が認められ、それぞれ、10.000倍、3.000及び10.000倍の凝集価を示した。

吸収前の沈降反応の成績は、主抗原 (*autumnalis*) に対して抗原価16：抗体価32、*australis A* に対して抗原価4：抗体価16、*hebdomadis* 及び *icterohaemorrhagiae* に対して抗原価2：抗体価8であり、主抗原たる *Leptospira autumnalis* に対する沈降素が最も高いことが知られた。また、類属反応は、*australis A* に於いて一段と著しく、*hebdomadis* 及び *icterohaemorrhagiae* は同じ価を示した。

主抗原 (*autumnalis*) で吸収した場合は、主抗原及び副抗原に対する沈降素は完全に吸収されて、凝集反応と同様に沈降反応もすべて陰性となつた。副抗原たる *hebdomadis*, *australis A* 及び *icterohaemorrhagiae* で吸収した場合は、主抗原 (*autumnalis*) の沈降反応だけ残存し (抗原価8：抗体価16となつて反応の場は稍々縮少する傾向がみられたが)、類属反応は各々陰性となつた。

Leptospira hebdomadis 免疫家兎血清の吸収試験前後に於ける成績は、第21表に示す如く、凝集反応についてみると、主抗原 (*hebdomadis*) に対して30.000倍、*autumnalis* 及び *australis A* に対し100倍、*icterohaemorrhagiae* に対し30倍の凝集価を示し、主抗原を以つて吸収すれば、凝集価はすべて陰性となり、副抗原たる *autumnalis*, *australis A* 及び *icterohaemorrhagiae* の各株で吸収を行うと、それぞれ類属反応は陰性となり、主抗原 (*hebdomadis*) に対してのみ30.000倍、10.000及び3.000倍の凝集価を残した。

吸収前に於ける沈降反応の成績は、主抗原 (*hebdomadis*) に対して、抗原価16：抗体価16という最高の価を示し、副抗原たる *autumnalis* 並びに *australis A* に対しては抗原価2：抗体価4の類属反応を示したが、*icterohaemorrhagiae* だけは陰性であつた。

主抗原 (*hebdomadis*) で吸収した場合は、主・副沈降素は凝集素と同様に完全に吸収されてすべて陰性となり、副抗原たる *autumnalis*, *australis A* 及び

icterohaemorrhagiae で吸収した場合は、副沈降素のみ吸収されて類属反応は各々陰性となり、主抗原に対してのみ抗原価8：抗体価16、8及び8を残した。

Leptospira australis A 免疫家兎血清の吸収試験前後における成績は、第22表に示す如く、凝集価についてみると、主抗原に対し30.000倍、*autumnalis*, *hebdomadis* 及び *icterohaemorrhagiae* に対して、それぞれ300倍、100倍及び30倍の凝集価を示し、主抗原 (*australis A*) を以つて吸収すればすべて陰性となり、副抗原たる *autumnalis*, *hebdomadis* 及び *icterohaemorrhagiae* で吸収を行うと、類属反応のみすべて陰性となり、主抗原に対しての3例とも10,000倍の凝集価を残した。

沈降反応についてみると、吸収前に於いても、主抗原 (*australis A*) に対してのみ抗原価8：抗体価16の陽性反応が見られただけであつて、*autumnalis*, *hebdomadis*, 及び *icterohaemorrhagiae* に対する類属反応を起さなかつたことは、凝集反応と異なる点であつた。主抗原 (*australis A*) で吸収した場合は、凝集素に於けると同様に沈降素も完全に吸収されたことが知れたが、*autumnalis*, *hebdomadis* 及び *icterohaemorrhagiae* で吸収した場合は、主抗原の反応の場が幾分か縮小する傾向が見られたに過ぎない。

Leptospira icterohaemorrhagiae 免疫血清の吸収試験前後に於ける成績は、第23表に示す如く、主抗原に対して30.000倍、*autumnalis* に300倍、*hebdomadis* 及び *australis A* に対して100倍の凝集価を示した。主抗原を以つて吸収すれば、凝集反応はすべて陰性となり、副抗原 (*autumnalis*, *hebdomadis* 及び *australis A*) で吸収すれば、主抗原 (*icterohaemorrhagiae*) に於いてだけそれぞれ30.000倍、30.000倍及び10.000倍の凝集価の残るのが見られた。

沈降反応についてみると、吸収前には *Leptospira australis A* 免疫血清に於ける場合と同様に、主抗原 (*icterohaemorrhagiae*) に対してのみ抗原価8：抗体価16の陽性反応を示し、副抗原に対する類属沈降反応は陰性であつた。主抗原を以つて吸収した場合は、凝集素に於けると同様に沈降素も完全に吸収されたことは言うまでもないが、副抗原 *autumnalis*, *hebdomadis* 及び *australis A* で吸収を行つても、それぞれ抗原価2、4及び2、抗体価はすべて8の沈降素の残存が見られた。

小 括

Leptospira autumnalis, *hebdomadis*, *australis A*

第21表 秋疫B免疫家兎血清の吸収前後の成績

抗原		A						B						C						W					
抗血清	抗原	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
B	無	2 4 8 16 32	++	++				+	+	+	+	+							+	+					
B	A	2 4 8 16 32						+	+	+	+														
B	B	2 4 8 16 32																							
B	C	2 4 8 16 32						+	+	+	±														
B	W	2 4 8 16 32						+	+	+	±														
抗血清	沈降素	抗原価				抗体価																			
	抗原	A	B	C	W	A	B	C	W																
	吸収前	2	16	2	0	4	16	4	0																
	吸収原																								
B	A	0	8	0	0	0	16	0	0																
	B	0	0	0	0	0	0	0	0																
	C	0	8	0	0	0	8	0	0																
	W	0	8	0	0	0	8	0	0																
抗血清	凝集素	S-M 反応																							
	抗原	A	B	C	W																				
	吸収前	100	30000	100	30																				
	吸収原																								
B	A	0	30000	0	0																				
	B	0	0	0	0																				
	C	0	10000	0	0																				
	W	0	30000	0	0																				

第22表 秋疫C免疫家兎血清の吸収前後の成績

抗 原		A						B						C						W					
抗血清	抗原	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
C	無	2	4	8	16	32							+	+	+	+									
C	A	2	4	8	16	32							+	+	+	+									
C	B	2	4	8	16	32							+	+	+	+									
C	C	2	4	8	16	32																			
C	W	2	4	8	16	32							+	+	+	+									

抗血清	抗原	沈降素				凝集素			
		抗原価				抗体価			
		A	B	C	W	A	B	C	W
	吸収前	0	0	8	0	0	0	16	0
	吸収原								
C	A	0	0	4	0	0	0	8	0
	B	0	0	4	0	0	0	16	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
	W	0	0	4	0	0	0	16	0

抗血清	抗原	S-M 反応			
		A	B	C	W
		吸収前	300	100	30000
吸収原					
C	A	0	0	10000	0
	B	0	0	10000	0
	C	0	0	0	0
	W	0	0	10000	0

第23表 黄血「レ」免疫家兎血清の吸収前後の成績

抗 原		A					B					C					W								
抗血清	吸収前 抗体 抗原	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
W	無	2	4	8	16	32																			
W	A	2	4	8	16	32																			
W	B	2	4	8	16	32																			
W	C	2	4	8	16	32																			
W	W	2	4	8	16	32																			
抗血清	沈降素	抗 原 価					抗 体 価																		
	抗原	A	B	C	W	A	B	C	W																
	吸収前	0	0	0	8	0	0	0	16																
	吸収原																								
	W	A	0	0	0	2	0	0	0	8															
	B	0	0	0	4	0	0	0	8																
	C	0	0	0	2	0	0	0	8																
	W	0	0	0	0	0	0	0	0																
抗血清	凝集素	S - M 反 応																							
	抗原	A	B	C	W																				
	吸収前	300	100	100	30000																				
	吸収原																								
	W	A	0	0	0	30000																			
	B	0	0	0	30000																				
	C	0	0	0	10000																				
	W	0	0	0	0																				

及び icterohaemorrhagiae を免疫原として、4回接種後に於ける各単価免疫血清を主抗原並びに副抗原を以つて吸収し、吸収前後の抗血清について凝集反応並びに沈降反応を観察した。各免疫血清は、交叉凝集反応に於いて多少の類属反応が認められるが、主抗原に対する凝集価が格段に高く、主抗原による吸収によつて、主・副反応共に総べて陰性となるが、副抗原による吸収によつては、類属反応のみ陰性となつて、主反応は依然として陽性に止まるので、種特異性の凝集原の存在が推知された。

各免疫血清における交叉沈降反応は、*Leptospira autumnalis* 及び *hebdomadis* 免疫血清においては凝集反応と同様に相互間に多少の類属反応が見られるが、主抗原反応が格段に強いのであつて、主抗原によつて吸収を行うと、主・副反応ともに凝集反応に於ける場合と同様に総べて陰性となり、副抗原で吸収を行つても類属反応のみ陰性となつて、主反応は陽性に止まり、種特異性の沈降素の存在が推知された。

Leptospira australis A 及び *icterohaemorrhagiae* 免疫血清に於いては、凝集反応に於いて類属反応が認められるに拘らず沈降反応に於いては主抗原に対する沈降反応のみ陽性であり、副抗原による類属反応は認められなかつた。

総括及び考察

レプトスピラの特異的免疫血清反応としての沈降反応に関する研究は、重要な研究課題であるに拘らず、Hindle et al (1934), 土屋 (1950) 等の若干の報告が散見せられるに過ぎず、幾多今後の観察に待つべき面が遺されている。

著者は、本研究に於いて、まづレプトスピラ沈降原の抽出について検討を行い、最優秀と認められた抗原を用いて、初めて凝集反応と沈降反応との間の関連性を観察追求し、かつ、レプトスピラの沈降反応による種特異性を証明することができた。

実験から得られた成績は、各章に小括したが、此処に更めて総括し、若干の解釈を加えれば次の如くである。

(1) レプトスピラの10mg/cc水浸液から抽出液(V液)を得、また、これより三塩化醋酸及び酸性樹脂(Anberleite IR-120) 濾過法により、大体に於いて蛋白劃分(E-F)と含水炭素劃分(K-F)とに分けた。このV液及びE-Fを以つて家兎を免疫して得られた血清に就いて、凝集反応及び沈降反応の成立を見、それによつてレプトスピラの特異的抗原物質の抽出されたことを確認した。なお、レプトスピラ免疫

家兎血清に対して、本抽出液による沈降反応が認められ、各種対照血清に於いては陰性であつたので、本抽出液を沈降原とする沈降反応はレプトスピラ属に特異的であることが確認された。竹中(1957)によると、沈降反応はpH6.4よりpH7.8の間では影響されず、土屋(1950)もpH6.4よりpH7.4の間では抗原価の変動が見られなかつたと述べているが、著者の場合も、pH6.6よりpH7.4の間では沈降反応の場に影響は見られなかつた。

(2) レプトスピラ抽出液より分別し得た蛋白劃分(E-F)及び含水炭素劃分(K-F)の両者は、定性反応上、Molisch 反応が同等に陽性なので、所謂蛋白多糖体複合体(protein polysaccharide)と考えられるが、量的関係から見て、E-Fは蛋白を主体としK-Fは含水炭素を主体とすると思つてよいであろう。E-F免疫家兎血清に於いて、V液免疫家兎血清及びレプトスピラ免疫家兎血清に優るとも劣らぬ凝集価及び沈降価が見られたことは、今村等(1956)が超音波曝射によつてレプトスピラを破壊し得られた抽出液をトリクロール醋酸で沈澱せしめ、上清と沈澱に分ち、その兩分劃で家兎を免疫(静脈注射)すると、AP分劃(沈澱)では免疫開始後6日で既に6.400倍陽性(S-M法)を示したのに反して、AF分劃(上清)注射家兎血清では僅かに100倍陽性に過ぎなかつたと述べている知見に一致するのであつて、レプトスピラ抽出液の抗原性は蛋白系に存すると思考される。

(3) 微生物の体成分の劃分による沈降反応は、Avery and Heidelberger (1923) の肺炎菌の研究から出発して、爾來、諸種の細菌に就いて幾多の観察が追加されている。発疹チフスに於ける黒屋及び川上(1942)、腸チフス及びパラチフスに於ける柳沢(1951)、コレラ菌及びチフス菌に於ける小林(1954)、炭疽菌に於ける米村等(1948)、野兎病に於ける佐藤(1954)、結核菌及びツベルクリン多糖類の化学的血清学的研究に於ける村田(1939)、中武(1943)、戸田(1942)等の報告を見ると、多糖系抗原を用いた実験が多いが、しかし多糖系のみが抗原性を有するのではないわけであつて、山本等(1951)によると、百日咳菌に於いて多糖体には沈降原性は認められず、糖蛋白及び核蛋白に抗原性を認められており、江上(1950)も志賀赤痢菌の超音波によつて得られた抽出液の蛋白質部分は毒性が少く沈降原性が強いと述べている。レプトスピラに於いては土屋(1950)によると、Millon 反応陰性、xanthoprotein 反応、biuret 反応、sulfosalicylic 酸反応共に弱陽性であるのに比して、Molisch 反応、Fehling 反応共に強陽性の抽出液で沈降反応が陽性で

あつたので、肺炎菌多糖類にアナロギーを求めて考えると、この抗原の活性物質は含水炭素に関連するものであらうと述べている。著者の抗原に於いては、レプトスピラ免疫家兎血清に対して、E—Fのみに依つて陽性を呈し、Molisch 反応及び Bial 反応のみ陽性であるK—Fによつては沈降反応は陰性に終つた。このように相反した成績の生じたのは、劃分精製の化学的操作の差異に問題があるのであつて、この点、再検討の余地が遺されていると思われる。

V液1回免疫家兎の成績と4回免疫家兎の成績を比較してみると、4回免疫の場合が1回免疫に比して凝集価及び沈降価は早期に高くなり、且つ長期に亘つて持続する傾向が見られ、井上(1953)がレプトスピラの免疫では注射回数増加と共に凝集価は上昇すと述べ、添田(1943)がレプトスピラの感染防禦免疫では注射回数の多い方が顕著な結果が得られると述べていることに一致した。

(4) 金田(1943)は、100°C/2時間加熱レプトスピラワクチンに抗原性の消失することを見て、レプトスピラはチフス菌のような耐熱性抗原を有せずと述べ、井上(1953)も加熱滅菌したワクチンの抗原性の低下を認めている。著者の抽出液は、56°C/120分及び100°C/60分の加熱によつて幾分沈降原の力価の低下が認められたが、しかし完全に消失したわけではない。これは免疫原性と反応原性との差異であらう。

なお、抽出液をセロハンに包み、48時間流水に於いて透析しても沈降原の力価に格別の影響は見られなかつた。

(5) レプトスピラの毒素について、松崎・今井(1917)はワイル・スピロヘータは主として体内毒素を産生すると述べ、樋口(1931)はワイル・スピロヘータ融解ワクチン液及び羅患犬血清をモルモットに接種して発熱、眼球結膜の充血、出血、黄疸等の発現を認め、ワイル病の症状が毒素によつて惹起される事を報告している。

著者の抽出液は、マウス腹腔内に1.0cc注射しても、これを短時に殺し得る毒性を認め得なかつたが、レプトスピラは試験管内累代培養により毒性の低下又は消失する事は周知の事実であるから、著者の成績からは毒素の有無に結論は得られないと考えられる。

(6) ワクチン注射による諸種の抗体の消長は、添田(1943)によると、家兎では4—7週で最高になり以後下降し、野口(1918)は約8週間持続すると述べSmith(1937)は抗体の産生されるのは2週間後であると述べている。塩沢(1918)によると、レプトスピ

ラ症患者血清に就いて、免疫体は6—11病日までは不定に証明され、11病日以後には毎常必ず証明されるに至り、20—50病日で最高に達し、一定期間持続して後次第に減少するという。その他、佐藤(1933)、本田(1936)、塩沢(1934)、塩沢等(1943)等の報告があるが、いずれにしても、免疫体は一週末より次第に出現し、3—7週で最高に達し、一定期間持続して後次第に低下することが認められている。その他、レプトスピラ・ワクチンの感染予防効果に関する福田(1917)の実験報告を初めとし、人体接種の場合の抗体産生に関しては、井戸等(1915, 1916)、伊藤等(1917)、和邇(1920)、樋口(1931)等の報告があり、最近では北岡等(1953)によつて実験がなされている。著者の実験に於いても、実験的患者血清及びレプトスピラ免疫家兎血清の凝集反応及び沈降反応にて略々同様の成績を得、凝集素と沈降素とが消長の経過に於いて密接な関係を有することが観察された。

(7) 我が国に於いては、塩沢(1934, 1938, 1943)北岡(1940)、山本(1940, 1943, 1944)等によれば7種(*Leptospira autumnalis*, *hebdomadis*, *australis* A, *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *bataviae*, *pyrogenes*)のレプトスピラの存在することが知られている。これらレプトスピラの種類は、主としてSchüffner(1938)及びWalch-Sorgdrage(1939)の報告に続いて、山本(1944)、北岡(1947, 1951)北岡等(1948)坂巻(1949)によつて凝集反応及び吸収試験によつて行なわれ、補体結合反応の成績も顧慮されている。沈降反応だけによつてレプトスピラの種類が可能であるか否か、それは幾多の実験と観察を累ねなくては俄かには断じられないが、著者の得た成績を次に述べる。

Leptospira autumnalis, *hebdomadis*, *australis* A, *icterohaemorrhagiae* の単価家兎免疫血清を用いて交叉凝集反応及び交叉沈降反応を行うと、*Leptospira australis* A 及び*icterohaemorrhagiae* 免疫血清は他の2株に比して沈降価が低かつたのであるが、凝集反応に於いて類属反応が認められるにかゝらず、沈降反応では類属反応を生じなかつた。*Leptospira autumnalis* 及び *hebdomadis* 免疫血清においては、凝集反応及び沈降反応に類属反応が認められたが、吸収試験によつて株特異性が見られた。著者の研究に於いては、沈降反応による抗原分析にまで立ちつたわけではないが、本反応を利用して、レプトスピラ症の診断乃至レプトスピラの種類の新分野も開拓されるのではないかと思われる。

(稿を終るに当たり、御懇篤な御指導並びに御校閲

を賜わつた恩師横田名誉教授及び登倉教授並びに吉田助教授に深甚なる謝意を表し、また、御援助を戴いた

各位に深謝します)。

参 考 文 献

- 1) **Avery, O. T., and Heidelberger, M. :**
Immunological relationship of cell constituents of pneumococcus. (Immunbiologische Beziehungen der Zellbestandteile des Pneumokokkus.) J. Exp. Med. Vol. **38** : 81—85 (1923).
- 2) 江上不二夫 : 細菌毒素の化学的研究. 医学通信, **200** : 5—6 (1950).
- 3) **Heidelberger, M., and Avery, O. T. :** The soluble specific substance of pneumococcus. (Die lösliche spezifische Substanz des Pneumokokkus.) J. Exp. Med **38** : 73—79 (1923).
- 4) 樋口 修輔 : 黄疽出血性スピロヘータ毒についての研究. 福岡医科大学雑誌, **24** (1) : 15—30 (1931).
- 5) **Hindle, E., and White, P. B., :** Soluble specific substances in spirochaetes. Proc. Roy. Soc. London, S. B, **114** : 523—529 (1934).
- 6) 本田 親三 : 所謂波佐見熱疫患者血清中に於ける免疫体の消長. 日本伝染病学会雑誌, **10** (9) : 1133—1135 (1936).
- 7) 井戸泰, 法貴六郎, 伊藤聡, 和邇秀恒 : 黄疽出血性スピロヘータ病予防法, 特に接種予防法の実験的基礎について. 医事新聞, **940** : 1657—1666 (1915).
- 8) 井戸泰, 法貴六郎, 伊藤聡, 和邇秀恒 : ワクチン注射による黄疽出血性スピロヘータ病の予防法実施報告 (第一報告). 東京医事新誌, **1964** : 633—640 (1916).
- 9) 今村晋, 栗林久之輔, 龜田三男 : レプトスピラの免疫に関する研究. 第1報. *Leptospira icterohaemorrhagiae* 菌体抽出液の免疫元性について. 東京医事新誌, **73** (2) : 76 (1956).
- 10) **Inada, R., Ido, T., Kaneko, R., Ito, H., Wani, H. und Okuda, K. :** Mitteilung über die Aetiologie, Infektion, Immunität, Prophylaxe und Serumbehandlung der Weilschen Krankheit (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica* Inada). Kitasato Arch. Exp. Med. I : 53—151 (1917).
- 11) 井上 裕正 : レプトスピラワクチンに関する研究 第1報. 力価測定について. 日本細菌学雑誌, **8** (5) : 631—634 (1953).
- 12) 井上 裕正 : レプトスピラワクチンに関する研究. 第3報. 力価試験及びレ殺菌法の力価に与へる影響. 日本細菌学雑誌, **8** (7) : 717—720 (1953).
- 13) 伊藤徹太, 松崎春一郎, 天谷堅作, 今井功 : ワイル氏病予防法について. 千葉医学専門学校雑誌, **90** : 163—175 (1917).
- 14) 伊与田友正 : *Candida albicans* 電溶液の抗原性に関する研究. 長崎医学会雑誌, **29** (10) : 773—790 (1954).
- 15) 金田 晨経 : 「レプトスピラ」ノ抗原性ニ関スル知見補遺. 長崎医学会雑誌, **21** (6) : 511—521 (1943).
- 16) 北岡正見 : *Leptospira canicola* の我邦に存在する事(会). 実験医学雑誌, **24** (6) : 861 (1940).
- 17) 北岡 正見 : レプトスピラ属の分類—レプトスピラ属の抗原分析. 日本医学, **3417** : 179—188 (1947).
- 18) 北岡正見, 坂巻良男 : 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).
- 19) 北岡正見, 井上裕正 : レプトスピラの肉眼的凝集反応について. 細菌学雑誌, **6** (4) : 301—304 (1951).
- 20) 北岡 正見 : CLASSIFICATION OF LEPTOSPIRA. Analysis of Leptospiral Antigen. Japanese Medical Journal, **4** (3) : 181—214 (1951).
- 21) 北岡正見, 井上裕正, 馬場貞義 : レプトスピラの補体結合反応について. 日本細菌学雑誌, **7** (3) : 179—184 (1952).
- 22) 北岡正見, 井上裕正 : レプトスピラワクチンの改良について. 日本細菌学雑誌, **8** (1) : 43—47 (1953).
- 23) 北岡正見, 井上裕正, 伊藤泰一, 斉藤孝一 : 新親格ワイル病ワクチンの人体皮下及び皮内接種後の凝集素の出現消長と副作用について. 日本細菌学雑誌, **8** (1) : 49—51 (1953).
- 24) 小林 謙雄 : コレラ菌及びチフス菌菌体抽出多糖体の免疫学的研究. 日本医科大学雑誌, **21** (7) : 517 (1954).
- 25) 古波倉正栄 : 黄疽出血性「スピロヘータ」族の発

- 育と気圧との関係に就て. 熊本医学会雑誌, 4 (1) : 27—41 (1928) .
- 26) **Kraus, Rudolf** : Ueber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus und Pestbouillonculturen, erzeugt durch homologes Serum. Wien. Klin. Wochschr., 10 (32) : 736—738 (1897) .
- 27) 黒屋政彦, 川上平太郎 : 多糖類沈降反応に依る発疹チフス診断法. 血清学免疫学雑誌, 3 (3) : 377—387 (1942) .
- 28) 松崎一郎, 今井功 : ワイル氏病原スピロヘータ毒素は体内毒素なりや体外毒素なるや, (附) 免疫血清の種類及び黄疸発生を論ず. 東京医事新誌, 20 20—2021 : 847—853 (1917) .
- 29) 村尾鍊志, 森本勉 : 電気溶菌免疫原. 第一篇 : 電流による溶菌現象. 長崎医学会雑誌, 13 (10) : 1398—1401 (1935) .
- 30) 村尾鍊志, 森本勉 : 電気溶菌免疫原. 第二篇 : 「チフス」電気免疫原に関する実験. 長崎医学会雑誌, 13 (12) : 1849—1861 (1935) .
- 31) 村田 正夫 : 「ツベルクリン」に関する研究 (第3報). 第三篇 : 「ツベルクリン」及び各劃分の免疫学的研究. 結核, 17 (2) : 209—254 (1939) .
- 32) 中武 二良 : 細核菌ノ多糖類ニ関スル研究. 第一篇 : 結核菌多糖類ヲ以テセル結核患者血清ニ対スル沈降反応並ニ皮内反応ニ就テ. 熊本医学会雑誌, 19 (6) : 1062—1079 (1943) .
- 33) 中山 たま : 電気溶菌法により処置せる結核菌の抗原性. 兵庫医誌, 10 (1) : 44—49 (1944) .
- 34) 西田 公一 : レプトスピラの沈降反応に関する研究. 第1報. 長崎大学風土病紀要, 1 (2) : 157—165 (1959) .
- 35) **Noguchi, H.** : A comparative study of experimental prophylactic inoculation against Lept, icterohaemorrhagiae. J. Exp. Med. 28 : 561—570 (1918) .
- 36) 沼田 岳二 : ワイル病における補体結合反応. 日本細菌学雑誌, 495 : 301—313 (1937) .
- 37) 沼田 岳二 : 黄疸出血性「スピロヘータ」凝集反応の簡易なる肉眼的検査法. 細菌学雑誌, 511 : 605—613 (1938) .
- 38) 大庭 士郎 : 黄疸出血性「スピロヘータ」凝集素ニ就テ. 殊ニソノ証明法並実験的家兎ワイル氏病ト凝集素ノ出現. 衛生伝染病学会雑誌, 16 (2—3) : 172—203 (1921) .
- 39) 斉藤 孝一 : レプトスピラ症の血清診断法について. 新潟県衛生試験所集談会抄録. 27年度下 (自10月—至3月) : 2—4 (1952) .
- 40) 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) .
- 41) 坂 正義 : 黄疸出血性スピロヘータ免疫血清に就ての2, 3免疫体証明法の比較. 愛知医学雑誌, 29 (3) : 263—279 (1922) .
- 42) 佐藤 悳 : 野兎病の沈降反応. 衛生検査. 3 (1) : 25—26 (1954) .
- 43) 佐藤 道雄 : 所謂アツケ (大分県野津原地方に流行せる一熱性疾患) に就て. 日本伝染病学会雑誌, 8 (2) : 1—30 (1933) .
- 44) **Schüffner, W., & Mochtar, A.** : Versuch zur Aufteilung von Leptospirenstämmen mit einleitenden Bemerkungen über den Verlauf von Agglutination und Lysis. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 101 : 405—453 (1927) .
- 45) **Schüffner, W. und Bohlander, H.** : Zur Technik des Absättigungsversuchs mit Leptospiren. Zbl. Bakt., I. Orig. 144 : 434—439 (1939) .
- 46) **Schüffner, W.**, Zur Systematisierung der Leptospiren. (1938) (坂巻の引用による) .
- 47) 塩沢総一, 北岡正見, 井上克己 : 黄疸出血性スピロヘータ病の経過中に於ける患者血清内免疫体の消長に就て. 東京医学雑誌, 46 (11) : 110—130 (1918) .
- 48) 塩沢 総一 : レプトスピラ及びそれによる疾患に就て. 日本伝染病学会雑誌, 9 (3) : 1—24 (1934) .
- 49) 塩沢総一, 久保郁哉 : 静岡県下天龍川畔に流行する一秋季レプトスピラ病 (用水病・天龍疫) の病原体 (第一報告) (一新レプトスピラ種の発見). 東京医事新誌, 3097 : 2199—2203 (1938) .
- 50) 塩沢総一, 久保郁哉 : 大東亜共栄圏内に於けるレプトスピラ病. 診断と治療, 30 (9) : 727—740 (1943) .
- 51) 塩沢総一, 久保郁哉 : 黄疸出血性 Leptospira 病 (所謂Weil病) 並に類似疾患の黄疸. 臨床医学, 31 (11) : 1330—1343 (1943) .
- 52) **Smith, J.** : Vaccination of guinea-pigs and human being against leptospiral infections. J. Hyg., 37 : 261—270 (1937) .

- 53) 添田 百枝: *Leptospira ictero-haemorrhagiae* の免疫に関する研究. 第1報: 超音波処理ワクチンについて. 日本伝染病学会雑誌, 17(7): 413—423 (1943).
- 54) 竹中善三郎: 沈降反応に関する研究. 第二編: 沈降反応に及ぼす種々反応条件の影響. 小児科紀要, 3(1): 33—47 (1957).
- 55) 陳 麗水: 黄疽出血性「レプトスピラ」ノ病原性免疫原性増強ニ関スル実験的研究. 第三篇: 各種免疫原ノ能働性ニ関スル研究. 長崎医学会雑誌, 19(2): 387—397 (1940).
- 56) 戸田 忠雄: 「ツベルクリン」及び結核「アレルギー」ノ検討. 結核20(3): 111—152 (1942).
- 57) 土屋 博文: 黄疽出血性レプトスピラの研究. 慶応医学, 27(5): 209—218 (1950).
- 58) **Walch-Sorgdrager, B.**: Leptospiroses. Bulletin of the Health Organisation, 8: 143—386 (1939).
- 59) 和邇秀恒, 尾形辰雄, 田川輝太郎, 広岡巴: ワクチン注射による黄疽出血性スピロヘータ病の予防法実施成績(第二回報告). 日本内科学雑誌, 9(10): 631—648 (1920).
- 50) 山本郁夫, 善養寺浩, 加藤智: 百日咳の研究. 第三報: 菌体成分の抽出並に免疫学的性状. 日本細菌学雑誌, 6(1): 47—51 (1951).
- 61) 山本脩太郎: 犬の *Leptospira* 病に関する研究. 第一報: 日本に於ける犬疫の原因学的証明と犬 *Leptospira* の血清学的性状. 日本獣医学雑誌, 2(1): 39—70 (1940).
- 62) 山本脩太郎: 犬の *Leptospira* 病に関する研究. 第二報: 犬 *Leptospira* の型別問題. 日本獣医学雑誌, 5(1): 1—44 (1943).
- 63) 山本脩太郎, 橋口渡: 沖繩県下に於ける *Vervort* (1923)の所謂 *Leptospira pyrogenes* の発見. 日本医学, 3370: 379—382 (1944).
- 64) 柳沢 卓司: 腸チフス及びパラチフスに於ける濃性加熱沈降反応に関する研究(第1回報告). 日本伝染病学会雑誌, 24(11—12): 269 (1951).
- 65) **Yen, A. C. H., and Kurotchkin, T. J.,**: Preparation of specific bacterial carbohydrate substances by electrolysis. *J. Inf. Dis.*, 56: 238—249 (1935).
- 66) 米村寿男, 鳥羽秋彦, 志賀鑑時, 塩入得良: 炭疽菌の化学的免疫学的研究. (1)(会). 日本獣医学会雑誌, 10(3—4): 113 (1948).
- 67) 吉田卯太郎: レプロミン反応 (*Leprominreaction*) に関する研究. 長崎医学会雑誌, 27(4): 301—320 (1952).

Summary

As reported in the previous paper, one of relatively most available precipitinogenic extracts was obtained from leptospiral cells which were heated at 56°C for 60 minutes, after they had been kept in a suspension in sterile distilled water at 37°C and 5°C on alternate days throughout one week. Further observations were made with this extract.

1) The precipitation test with this leptospiral extract, being called V-extract for short, was all negative in 10 samples of the normal rabbit serum, in 1 sample of anti-dysenteric rabbit serum, in 32 samples of human serum including 4 cases of liver diseases, 8 cases of kidney diseases and 20 cases of pulmonary tuberculosis. The test, on the other hand, was definitely positive with sera from rabbits immunized with leptospiral vaccines, showing a precipitinogen titre of 1:16 and a precipitin titre of 1:32 on the average. Simultaneously the agglutination test with the same sera was positive by a titre of 1:30,000 on the average.

2) Protein and polysaccharide fractions were isolated from the V-extract by using trichloroacetic acid and Amberlite IR-120. The precipitinogenicity of the polysaccharide fraction was not demonstrated. On the other hand, the test with the protein fraction was positive by a mean precipitinogen titre of 1:16, being converted into original concentra-

tion of the leptospiral suspension which the fractions were liberated from, and by a mean precipitin titre of 1:16.

3) It was found that changes in the hydrogen ion concentration of the V-extract, ranging from pH 6.6 to pH 7.4, gave no influence on the precipitin reaction.

4) When rabbits were immunized with the V-extract or its protein fraction, being intravenously injected with 3.0 cc/kg of it, their sera attained to a titre in precipitinogen of 1:8 to 1:16 and in precipitin of 1:8 in the test. At the same time the agglutination test was positive by a titre of 1:3,000.

5) In observation of a case of cerebral syphilis, inoculated with *Leptospira autumnalis* for the thermotherapy, and 2 antileptospirally immunized rabbits, it was found that the precipitation reaction was parallel to the agglutination reaction in rise and fall, attaining to the highest titre between the third and fifth week after inoculation.

6) As the cross reactions in the precipitin test as well as in the agglutination test between *Leptospira autumnalis*, *hebdomadis*, *australis A* and *icterohaemorrhagiae* were observed, that the titre to the homologous organism usually proved much higher than those obtained with heterologous organisms. To complete the serological specificity of these leptospiral species, although the components of the antigenic mosaic were not determined, it was suggested by agglutinin absorption method that there were specific precipitinogenic antigens for each species to be demonstrated.

(Author)