

A群レンサ球菌菌体に対する健康学童血清の凝集抗体価：トリプシン処理菌体、ペプシン処理菌体およびASP試薬の比較

吉原丘二子 新井 秀雄* 永瀬金一郎*

I はじめに

A群レンサ球菌感染症で、ASO, ASK, AHDその他菌体外産生抗原に対する抗体の検査が広くルチンに実施されているが、一方菌体抗原に関しては群特異多糖や型特異蛋白等重要なものがあるにも拘らず、ルチンに抗体検査が行なわれる状態に至っていない。

人血清の群抗体測定法に関しては、今迄種々の方法が報告されている。高圧処理菌凝集反応¹⁾、トリプシン消化菌凝集反応¹⁾、細胞壁凝集反応²⁾、抽出抗原沈降反応³⁾、抽出抗原感作赤血球凝集反応⁴⁾、等である。最近この感作血球によるASP試薬が開発され、群抗体価のルチン検査への途が開けてきたので、健康学童血清についてASPで群抗体価を求め、さらにトリプシンおよびペプシン消化菌凝集価を求めて相互の関係を調べたので報告する。

II 材料・方法

1. 菌 株

A群2型レンサ球菌T2株を用い、Todd-Hewitt培地(BBL)で27℃2日間培養後、洗浄菌体を以下の如くトリプシンあるいはペプシンで消化して得た菌液を菌凝集反作用抗原とした。トリプシン消化はT型別菌液作製法に準じて行った。ペプシン消化は菌体を56℃30分加熱後、ペプシン0.1%加N/100塩酸に浮遊し、37℃2時間の条件で行った。各消化菌体を洗浄後、pH7.4のPBSに浮遊し、コールマン・ジュニアII型分光光度計波長650nmで吸光度を0.6に調整し、窒化ソーダ0.03%を加え冷蔵庫に保存した。

2. ASP試薬

ヘキストジャパン社より供与された試供品を用いた。

3. 学 童 血 清

昭和56年11月に八丈島で採取され、東京都予防医学協会の小野川尊、天野裕次、飯村達代から供与された健康学童血清98検体を56℃30分間非働化して用いた。

4. 群、型別用血清

消化菌の群、型特異凝集性の定性試験は、デンカ生研製のA, B, C, G群血清およびT型血清を用い、常法

に従って行った。

5. 家免疫血清

消化菌の群特異凝集性の定量試験は、A, B, C, G群標準株レンサ球菌で高度免疫して得た家免疫血清を用いて行った。

6. 凝 集 反 応

消化菌液による学童血清の凝集価測定は、U型マイクロタイター板(豊島製作所)を用い、これに0.1%ウシ血清アルブミンと0.03%窒化ソーダ加PBSで10倍希釈より2段階希釈した学童血清の一定量を取り、同量の消化菌液を加えて振盪後室温に一夜置いて判定した。ASP試薬による凝集価測定は、指定のV型でなくU型トイレを用いたほかはASP使用説明書通りに行った。何れの場合も、凝集価は明らかな凝集像を示す最高血清希釈倍数で表わした。

7. 統 計 処 理

凝集価を対数変換して各種統計量を求めた。必要に応じてべき重根変換による統計量も参考にした。平均値の差の検定はWelchの方法によるt検定によった。

III 結 果

トリプシンおよびペプシン消化菌の群および型特異凝集反応性を調べた、何れもA群血清では強い凝集を示したが、B, C, G群血清では凝集しなかった。型血清としては、トリプシン消化菌はT2型血清に強い凝集を示したのに対し、ペプシン消化菌はT2型血清でも全く反応を示さなかった。

八丈島学童血清98検体を用い、それぞれトリプシンおよびペプシン消化菌ならびASP試薬に対する凝集価を測定した成績を表1に示す。Table1トリプシン消化凝集価は40~1280の間に分布し、平均値は188、平均値の95%信頼限界は163~217であった。ペプシン消化菌凝集価は80~1280間に分布し、平均値425(95%信頼限界:381~473)ASP凝集価は2~256間に分布し、平均値33(95%信頼限界:28~40)であって、何れの平均値の間にも危険率1%以下で有意の差が認められ、ASP<トリプシン消化菌<ペプシン消化菌の順に高い凝集価を示した。

* 国立予防衛生研究所

Table 1. Agglutinin-titer distribution of 98 healthy school-children sera measured by the use of ASP reagent, trypsin-digested T2 cells, pepsin-digested T2 cells as the agglutinating antigens.

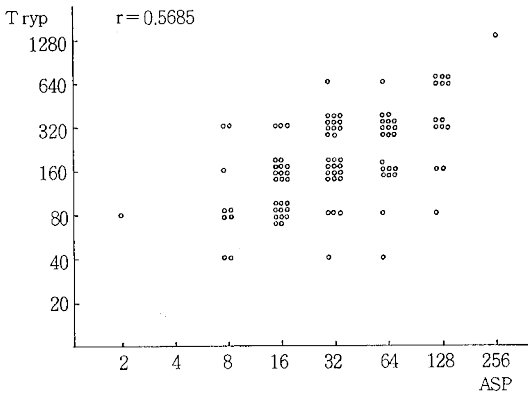
	serum dilution							
	2	4	8	16	32	64	128	256×n*
ASP	1	0	9	25	27	21	14	1
Tryp	0	4	20	33	32	8	1	0
Pep	0	0	1	10	39	44	4	9

* ASP (n = 1), Tryp (n = 10), Pep (n = 10)

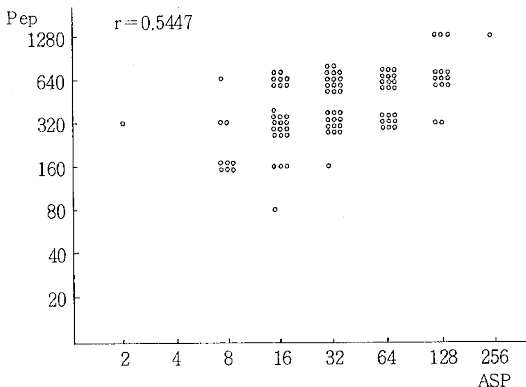
図1 a ~ c に表1の成績における抗原間の成績の対応関係を図示した。図1 a は ASP : トリプシン処理菌の関係を示したもので、相関係数0.5685と計算された。図1b は ASP : ペプシン処理菌で、相関係数0.5447、図1c は トリプシン処理菌 : ペプシン処理菌で、相関係数0.5772だった。即ち何れの間にも危険率1%以下で有意の相関が認められた。

Fig 1. Correlation among agglutinating antigens

a) ASP vs. Tryp-cell



b) ASP vs. Pep-cell



c) Tryp-cell vs. Pep-cell

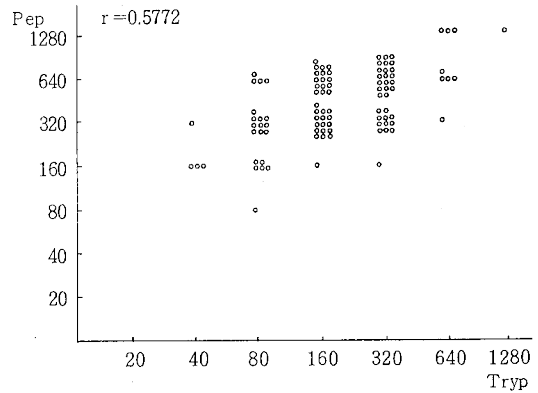


Fig1a~c 平均凝集価の最も高かったペプシン消化菌について群特異反応性の程度を知る目的でASP 試薬を対照において、A, B, C, G, 群の家兔免疫血清に対する凝集価を測定した成績を表2に示す。Table2 ASP 試薬はほぼ良好な

Table 2. Estimation of the serogroup-specificities of pepsin-digested T2 cells and ASP reagent.

Antigen ×10	serum dilution										
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
Pep A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
B	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
G	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
NRS*	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti serum ×2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
ASP A	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-	
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NRS*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*) normal rabbit serum

群特異性を示し、A群血清のみ高い凝集価を示した。ペプシン消化菌は、A群血清で更に高い凝集価を示したが、一方C群でもこれに近い高い凝集価が示された。B群、G群血清では正常血清と差がなかった。ASP およびペプシン消化菌とA群血清との間の凝集反応25 µg/ml のN-アセチルグルコサミンの存在で低度の抑制しか受けなかったが、ペプシン消化菌とC群血清の間の凝集反応はほぼ定量的に抑制された。なおN-アセチルガラクトサミンは殆んど影響を与えなかった。

IV 考 察

Rosendal (1956) らは、A群レンサ球菌凝集反応の障害となるM抗原を破壊するのに127℃2時間処理が有効であると報告したが、今回使用したT2株、121℃30分処理したところ、部分的菌体破壊が起り、良好な凝集反応性を示さなかった。

Karakawa (1965) らによれば、トリプシン、ペプシン処理で蛋白抗原を除去した菌体は、調整後数日間は凝集反応用抗原として利用できるが、その後自然凝集のため使用できず、人の群抗体測定には細胞壁による凝集反応を行っている。今回我々の使用したペプシン処理T2菌液は冷所で2ヶ月保在後も自然凝集はみられず、凝集反応に支障なく利用可能であった。菌の自然凝集性は菌株によっても異なるし、培養温度等によっても左右されるものである。

トリプシンおよびペプシン消化菌は何れもA群特異凝集反応性を有していたが、何れもASPに比し著しく高い凝集価を示したことから、群抗体以外の凝集抗体とも反応したと考えるのが妥当であろう。ペプシン処理菌とC群血清との間にみられた高い凝集価は、先ず第一に、A、C群抗原に共通なラムノース配列が関与している可能性が考えられるが、N-アセチルグルコサミンで強く抑制されることを考えると、むしろ大半はペプチドグリカンの如き抗原の関与するものと考えべきであろう。トリプシン処理とペプシン処理間にも凝集価の差のみら

れたことは、ここでも関与する抗原に質的差のある可能性を示している。関与抗原の追求は今後の問題であるが、トリプシン消化菌、ペプシン消化菌、ASP試薬を組合せて凝集価を測定することにより、複数の抗体価の動きを大まかにつかめる可能性も考えられ、今後興味ある課題と考える。

文 献

1. Rosendal, K and Grandal, H: Serological investigations of group A streptococci 3. The groupspecific agglutination in human sera, Acta pathol Microbiol, Scand, 38 164~169 1956
2. Karakawa, W, W, Osterland, C, and Krause R, M.: Detection of streptococcal group-specific antibodies in human sera, J, Exp, Med, 122 195~105, 1965
3. Wilson, A.T, and Wiley, G. G.: The cellular antigens of group A streptococci, Immunoelectrophoretic studies of the C. M. T PGP, E₄-F, and E antigens of serotype 17 streptococci, J, Exp, Med 118, 527, 1963
4. Schmidt, W. C, and Moore, D. J.: The determination of antibody to Group A streptococcal Polysaccharide in human sera by hemagglutination, J, Exp, Med, 121 793-806, 1965
5. 宮本泰: レンサ球菌感染症, 微生物検査必携, 細菌, 真菌検, 日本公衆衛生協, 1978, P 34~54