

# Tuberculin 에 관한 研究\*

(2) 抗原感作赤血球凝集反應에 의한 結核死菌免疫 Guinea pig 血清의 赤血球凝集 抗體價 消長

農村振興廳 家畜衛生研究所

金 丁 圭

—Abstract—

## Studies on the Tuberculin

### 2) Serological observation of hemagglutinating antibody in guinea pigs sensitized with heat killed tubercle bacilli

Jung Kyu Kim

*Veterinary Research Laboratory, Anyang, Korea*

In order to assay one lot of the potency of tuberculin for intradermic use, four guinea pigs sensitized with heat killed *M. tuberculosis* were used by the method originally of the Agriculture Research Service Center (A.R.S.) and Bureau of Animal Industry (B.A.I.) in the United States of America in which guinea pigs were used on 21st day after sensitization.

There is doubt whether the guinea pigs are sensitized or not. Therefore, this study has taken the method of Middle Brook-Dubos hemagglutination test, and observed the humoral hemagglutinating antibody in the blood. The results obtained are as follows.

1. The maximum titer of hemagglutinating antibody was demonstrated 30 days after sensitizing the guinea pigs with killed tubercle bacilli. The maximum titer was continued for a period of 45 days and thereafter declined gradually.

2. The swelling and redness of the region of the sensitized guinea pigs was shown to be reached to the maximum size within 24 hours after intradermal inoculation with HCSM tuberculin and gradually reduced 96 hours after inoculation. The swelling and redness could not be detected by macro-observation after 14 days.

## 摘 論

Middle Brook-Dubos(1948)<sup>1) 2)</sup>는 *Hemophilus duckrey* 및 *Tubercle bacillus*의 抗原-抗體反應에서 抗原感作赤血球凝集과 溶血反應 現象을 일으키는데 關與하

\* 本文의 要旨은 1968年 12月 14日 大韓微生物學會 秋季學術大會에서 發表하였음.

는 抗原이 多糖體成分이라는 것을 報告한 바 있고 Boyden(1951)<sup>3) 4)</sup>은 PPD Tuberculin(purified protein derivative)의 tuberculo-protein이 赤血球에 吸着하는데는 凝集難性이 있어 미리 tannic acid 處理를 함으로써 吸着이 容易하게 되어 tuberculo-protein에 대한 特異反應이 成立된다는 것을 報告하였다. 進騰(1952)<sup>5) 7) 8) 10)</sup>는 從來의 old tuberculin(OT) 或은 結核菌體成

分の 抗原이 tuberculin 皮內反應을 일으키는 tuberculo-protein의 主因子인 것으로 밝혀졌다. 이 tuberculin 過敏反應에 關與하는 tuberculo-protein의 特異抗體는 血中の 抗體와 相異한 tuberculo-polysaccharide에 依한 抗原-抗體反應이라는 것과 結核菌體는 構造自體上으로 凝集反應에는 離點이 介在되어 있음으로 진병性이 있는 다른 反應法이 發見되어야 한다는 것을 強調하였다. 根津(1953)<sup>9)</sup>은 結核菌의 各型 및 Thymode 菌의 菌體와 培養濾液으로 處理한 蛋白質과 多糖體分劃은 赤血球의 感作抗原能을 가졌고 이들中的 蛋白質分劃感作原 PF<sub>I</sub>, PF<sub>II</sub>는 凝集反應을 통하여 哺乳動物型的 結核菌, 鳥型, Thymode 菌型에서의 鑑別이 可能하였으나 多糖體分劃感作原 CF<sub>I</sub>, CF<sub>II</sub>에 의한 凝集反應에서는 그들의 菌型間에 共通의인 反應이 일어나므로 型別의 鑑別을 할 수 없었다는 報告를 한바가 있다. 土屋等(1955)<sup>10)</sup>은 多糖體分劃, CF<sub>I</sub>, CF<sub>II</sub>에 의한 赤血球凝集反應을 통해서 家兔, guinea pig의 抗血清中的 CF<sub>I</sub>, CF<sub>II</sub>를 比較檢討한 結果 CF<sub>I</sub>에서는 菌體間 差異가 있었으나 CF<sub>II</sub>에서는 그의 差異가 없으므로 型特異性을 鑑別할 수 없다는 것을 報告하였다. 細田(1958)<sup>11)</sup>은 MiddleBrook-Dubos의 血球凝集反應, 進藤은 MiddleBrook-Dubos의 溶血反應, 進藤, 歌稿等の 不完全 抗體證明法에 의한 結核患者의 血中抗體는 病狀의 輕重에 따라 抗體價의 變動이 있으나 患者에 대한 完全 및 不完全抗體를 證明할 수 있다고 報告하였다. 高橋(1960)<sup>12)</sup>은 結核菌體의 磷脂質에 대한 抗體는 生體內에서 各各 產生된다는 것을 報告하였다.

以上の MiddleBrook-Dubos를 爲한 先人들은 結核菌體成分 및 그의 培養濾液을 處理한 蛋白質 및 多糖體成分이 血球感作能의 役割에 關與한다고 하였다.

著者는 MiddleBrook-Dubos의 抗原感作赤血球凝集反應을 利用한 試製 heate concentrated synthetic medium tuberculin(HCSM tuberculin)에 대한 그의 抗原感作赤血球凝集能의 力價, 溫浴槽內的 溫度에 의한 凝集反應의 態度, 抗原感作赤血球(抗原)와 結核死菌免疫 guinea pig 血清(抗血清)의 稀釋用食鹽水의 pH가 凝集反應에 미치는 影響을 再檢討하고, tuberculin 檢定基準에 따른 HCSM tuberculin의 效能測定에 供試되는 結核死菌免疫 guinea pig(感作 guinea pig)은 接種後 21일부터 90일까지 사이에 있는 것을 供試한다. 이 時期에 있는 感作 guinea pig 血清에 대한 試劑 HCSM tuberculin—抗原感作赤血球凝集力價의 消長을 觀察하였든 바 이에 대한 若干의 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

### 1. 使用菌株

美國 農務省 ARS로부터 分讓받은 人型結核菌 Pn. DTA, C株를 供試하였다.

### 2. 感作抗原

前報에서 記述한 바와 같은 製劑法 및 檢定法에 의한 試製 HCSM tuberculin을 緬羊赤血球의 感作原으로 使用하였고 對照로는 美國 農務省 ARS로부터 分讓받은 標準 HCSM tuberculin을 供試하였다.

### 3. 抗原感作赤血球

緬羊血液은 alsever 液에 同量의 血液을 採血해서 冷暗所 4~5°C에 保管하고 赤血球는 隨時로 使用時에 磷酸緩衝食鹽水(P. B. S) 또는 pH 7.2의 食鹽水로 1,500 r. p. m에서 15分씩 2~3回 洗滌한 赤血球를 供試하였다.

抗原感作赤血球는 HCSM tuberculin 1:15, 1:30, 1:60, 1:120 倍의 稀釋液에 10%의 洗滌緬羊赤血球를 10對 1量으로 混合한 後 잘 흔들어서 溫浴槽 37°C에서 2時間동안 加溫하여 感作시켰다. 이 感作赤血球의 浮遊液은 感作赤血球를 1,500 r. p. m에서 15分씩 2~3回를 反復洗滌해서 食鹽水로써 0.5%의 感作赤血球浮遊液으로 만들어서 供試하였다. 한편 이의 동일한 處理法으로 非抗原感作赤血球의 浮遊液을 만들어서 赤血球凝集反應의 判定時에 比較對照하였다.

### 4. 抗血清

結核死菌은 Pn, DTA, C株의 人型結核菌을 Sauton 合成培地에 各各 移植해서 37°C에서 28日 동안 培養하였고, 이 培養菌은 100°C의 Koch oven에서 3時間동안 殺菌하였다. 培養液中的 菌體는 濾過紙로 濾別하였고, 菌體乳劑液은 各各 同量으로 pooling 한 菌體를 500mg씩 Meno 乳鉢內에 넣고, 加溫流動 paraffine oil 10 ml을 加해서 乳劑하였다. 이 乳劑液을 振盪器에 30分동안 練作하여 均等乳劑液을 만들어 37°C로 加溫한 것을 體重 500gm 以上の 白色 ♂ guinea pig에 接種하였다.

接種部位는 兩後肢의 大腿部 筋肉內에 0.3 ml씩 各各 接種하여 感作시켰다.

tuberculin의 效能測定에 使用한 感作 guinea pig은 結核死菌을 接種한 後 21日에서 90日 以內로 供試되었다. 이 期間에 있는 感作 guinea pig의 抗血清을 採取하여 -20°C의 冷藏庫內에 保管하였다.

抗血清의 非特異凝集素는 使用前에 56°C에서 30分동안 非動化시킨 抗血清 2 ml에 非感作赤血球 0.2 ml을 잘 混合하고, 室溫에 30分間 靜置시킨 後 1,500 r. p. m에서 15時間 遠心分離해서 非特異凝集素를 除去하였다.

**Table 1.** Results of hemagglutinating antibody reaction of sheep red cells sensitized with the experimental tuberculin

Tuberculin dilution for sensitizing sheep R. B. C.	Titers of hemagglutination reaction (antiserum)					
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:15	4	4	4	2	1	0
1:30	4	4	4	2	1	0
1:60	4	4	2	1	0	0
1:120	2	1	0	0	0	0
Control serum	0	0	0	0	0	0
Control antigen	0	0	0	0	0	0
Specific antigen(A. R. S)	4	4	4	2	1	0

그리고 이와 동일한 방법으로 항血清은 2~3회 反復處理하였다.

**5. 抗原感作赤血球凝集反應의 施術式**

抗血清은 2倍數稀釋法에 따라 稀釋된 血清 0.5 ml씩을 注入한 各試驗管에 0.5%의 感作赤血球 浮遊液 0.5 ml씩을 加해서 잘 混合하고, 37°C의 溫浴槽內에서 2時間 靜置한 後에 凝集反應의 程度를 肉眼的으로 判定하고, 室溫에 1夜放置한 後에 反應의 程度를 再判定하였다. 對照에는 感作赤血球에 抗血清代로 食鹽水 또는 PBS, 抗血清에 感作抗原代로 非感作赤血球 그리고 正常血清에 非感作赤血球를 넣어서 동일하게 處理한 反應을 判定比較하였다. 判定의 區分은 凝集反應의 程度에 따라 4(100% 凝集), 2(50% 凝集), 1(25% 以下 凝集), 0(非凝集)으로 判定하였다.

가. Tuberculin 에 의한 赤血球의 感作效能價 測定  
HCSM tuberculin 에 의한 抗原感作赤血球는 既知의

抗血清(256倍)에 대하여 赤血球凝集價가 試製 HCSM tuberculin 의 稀釋液 1:30 倍에서 256 倍, 1:60 倍에서 128 倍, 1:120 倍에서 32 倍의 抗血清을 凝集시키었음을 알 수 있었다. 한편 試製 tuberculin 과 對照 tuberculin (標準)의 感作原에 의한 赤血球의 感作原性 및 凝集原性を 觀察比較한 結果 感作原에 대한 感作赤血球와 抗血清에서 일어나는 凝集反應 現象의 樣相은 兩者가 거의 동일하였다. (表 1 參照) 여기에서 tuberculin 의 最適稀釋濃度는 試製 HCSM tuberculin 稀釋液 1:30~60 倍를 抗原感作赤血球用으로 決定해서 使用하였다.

나. 溫浴槽內의 溫度에 의한 赤血球凝集反應의 態度  
赤血球凝集反應價 256 倍를 갖인 既知의 抗血清은 2 倍數稀釋法에 따라 稀釋해서 各試驗管에 0.5 ml씩 分注하고, 感作赤血球液 0.5 ml 을 各管에 加하여 23~25, 30, 37, 40°C 의 溫浴槽內에서 各溫度別로 2時間 作用시킨 後 赤血球凝集反應의 程度를 觀察하였다.

**Table 2.** Influence of hemagglutinating antibody reaction under various temperature

Temperature in water bath serum	Titers of hemagglutination reaction (antiserum)								Specific antigen (A. R. S)
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
24~26°C N*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P**	0	0	0	0	0	0	0	0	4
30°C N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	4	4	2	1	0	0	0	0	4
37°C N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	4	4	4	4	4	2	1	0	4
40°C N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	1	0	0	0	0	0	0	0	4

\*; Negative guinea pig serum

\*\*; Immunize guinea pig serum

그 결과 既知의 抗血清과 感作赤血球는 30°C, 37°C에서 깨끗한 凝集反應을 동일하게 일으켰으나 이에 反해서 對照는 凝集反應에서 陰性이었다. 한편 이 試驗에서, 26°C에서의 凝集反應價가 1:2 배, 30°C에서 1:32 배이었고, 40°C에서는 肉眼的으로 反應을 判定하는데 正確性を 期하기에 不可能할 程度로 自然溶血現象이 일어난다는 것을 알 수 있었다. (表 2 參照)

여기에서 本反應을 37°C의 溫浴槽內에서 30分, 60分, 2時間, 3時間씩 各各作用시킨 바 30分에서 1:8 배, 60分에서 16배, 2時間에서 1:64 배, 3時間에서 64 배의 凝集價를 보였었다. 이러한 作用時間別의 處理例를 室溫에서 1夜放置한 것에 대한 判定의 結果 全例가 동일한 1:256 배의 凝集價이었음을 觀察할 수 있었다. (表 3 參照) 여기에서 溫浴槽內의 適當溫度는 37°C로 決定하였고, 最適判定時間은 37°C의 溫浴槽內에서 2時間, 室

溫에서 1夜放置해서 感作赤血球凝集反應의 判定을 實施하였다.

다. 抗原感作赤血球凝集反應에 미치는 稀釋液의 pH Sørensen의 燐酸緩衝液에 食鹽水를 1/4 量으로 混合한 pH 7.0의 燐緩衝食鹽水(P. B. S)를 만들었다. 이 P. B. S의 pH 6.5는 HCl로, pH 7.5, pH 8.0은 NaOH로 各各 再修正한 各 pH 別의 PBS 14 ml에 感作原稀釋液 1.0 ml와 赤血球 0.1 ml을 加하였다. 이것을 溫浴槽 37°C에서 2時間 동안 15 分 間隔으로 잘 흔들어서 吸着시켰었다.

各 pH 別로 1,500 rpm에서 15分으로 2~3回 反復洗滌한 0.5%의 感作赤血球浮遊液을 만들었다.

赤血球凝集反應은 各 pH 別로 된 PBS로 2倍稀釋法에 의하여 稀釋한 既知의 抗血清 0.5 ml씩 分注한 各 試驗管에 感作赤血球 浮遊液을 0.5 ml씩 注入해서 混

Table 3. Influence of hemagglutination reaction in various reading hours

Reading hours of reaction	Serum	Titers of hemagglutination reaction (antiserum)							Specific antigen (A. R. S)
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
30 min.	P*	4	2	1	0	0	0	0	4
	N**	0	0	0	0	0	0	0	0
60 min.	P	4	4	2	1	0	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
2 hr.	P	4	4	4	4	2	1	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
3 hr.	P	4	4	4	4	2	1	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	0	0

\*\*; Negative guinea pig serum

\*; Immunized guinea pig serum

Table 4. Influence of hemagglutination reaction under various pH of PBS

pH of diluents	Serum	Titer of hemagglutination reaction (antiserum)							Control specific antigen (A. R. S)
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
6.5	P*	4	4	2	1	0	0	0	4
	N**	0	0	0	0	0	0	0	0
7.0	P	4	4	4	4	2	1	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
7.5	P	4	4	2	1	0	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
8.0	P	4	2	1	0	0	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0

\*; Immunized guinea pig serum

\*\*; Negative guinea pig serum

합하였고, 37°C에서 2時間, 室溫에서 1夜放置한 後에 判定하였다.

赤血球凝集價는 pH 6.5에서 1:64, pH 7.0에서 1:256, pH 7.5에서 1:64, pH 8.0에서 1:32 倍의 凝集力價를 觀察하였다. 이들의 各 pH 中에서 pH 7.0에서 1:256의 높은 凝集價를 나타내었다. 여기에서 最適反應 pH는 pH 7.0이었고, 赤血球凝集反應의 出現은 弱酸性에서나 弱 alkali 側에서도 凝集反應이 일어난다는 것을 알 수 있었다. (表 4 參照) 여기에서 抗原感作赤血球凝集反應의 適當 pH는 稀釋液 pH 7.0으로 調整해서 本反應을 實施하였다.

라. Tuberculin의 皮內接種에 의한 發赤反應의 觀察  
乾燥結核死後 500 mg 을 乳鉢內에서 充分히 磨碎하고 流動 Paraffin oil 10 ml 을 넣어서 잘 乳劑液으로 만들었다. 이 死菌乳劑液 0.3 ml 씩을 體重 300 gm, ♂, 白色 guinea pig 의 兩後肢 大腿部 筋肉內에 接種해서 感作시켰다. 이 感作 guinea pig 에 試劑 HCSM tuberculin 對 標準 HCSM tuberculin 을 50, 100, 200, 400 倍로 稀釋하여 0.1 ml 씩 皮內接種하였다.

皮內接種法은 感作 guinea pig 의 腹部 正中線을 中心으로 하여 廣範圍하게 被毛를 削毛하고, 硫化 Barium 液으로 脫毛해서 洗滌한 다음 正中線을 境界로 한쪽에 試製 tuberculin 을 各稀釋液의 濃度別로 接種하고 反對

쪽에 標準 tuberculin 을 各稀釋液의 濃度別로 接種하였다. 發赤反應 部位의 크기는 接種後 24時間부터 時間經過에 따라 sliding carrypass 로써 反應部位의 最長直徑과 最短直徑을 計測하고 直徑의 平均值를 算出하여 總合計한 數值로 標準 tuberculin 의 効能을 100%로 보고, OT 와 HCSM tuberculin 의 効能率을 求하였다. 그리고 發赤反應의 消長比較는 接種後의 時間經過에 따라서 調査하였다.

## 成 績

### 1. Tuberculin의 効能測定으로 使用되는 感作 Guinea pig 血清에 대한 赤血球凝集 反應價의 消長

試製 tuberculin 의 効能을 測定하여 그의 使用稀釋濃度를 決定하는데 供試되는 感作 guinea pig 血清에 대한 赤血球凝集 反應價의 消長을 觀察하였던 바 guinea pig 의 兩後肢 大腿部 筋肉皮下에 結核死菌을 接種한 14日, 21日, 30日, 45日, 60日, 90日, 120日後에 感作 guinea pig 5頭를 採血해서 pooling 한 抗血清의 赤血球凝集價는 14日에 1:8倍, 30日과 45日에 1:128倍, 120日에 1:32 倍이었던음을 알 수 있었다. 그리고 赤血球凝集價는 接種後 30日에 1:128倍에 達하여 45日까지 持續되었고 60日에는 1:60倍, 120日에는 1:32倍로 漸次的으로

Table 5. Fluctuation of hemagglutination antibody titer in guinea pigs sensitized with heat killed tubercule bacilli

Days after immunizing to G. P.	Serum	Titers of hemagglutination reaction (antiserum dilution)							Specific antigen control (A. R. S)
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
14	P*	4	2	1	0	0	0	0	4
	N**	0	0	0	0	0	0	0	0
21	P	4	4	2	1	0	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
30	P	4	4	4	4	4	2	1	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
45	P	4	4	4	4	4	2	1	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
60	P	4	4	4	4	2	1	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
90	P	4	4	4	2	1	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0
120	P	4	4	4	2	1	0	0	4
	N	0	0	0	0	0	0	0	0

\*: Immunized guinea pig serum

\*\* : Negative guinea pig serum

消失됨을觀察할 수 있었다. (表 5 參照)

## 2. Tuberculin의 操作 guinea pig 接種에 의한 發赤反應의 消長比較

guinea pig에 結核死菌을 接種한 健康한 感作 guinea pig는 30日後에 赤血球凝集反應을 凝集價가 1:128 倍에 達하고 45日까지 持續되었다. 이 感作 guinea pig에 OT對 標準 HCSM tuberculin, 試製 HCSM tuberculin 對 標準 HCSM tuberculin 50, 100, 200, 400 倍의 稀釋液 0.1 ml씩 皮內接種하며 發赤反應의 크기를 時間經過에 따라 測定하였다. 그리고 標準 tuberculin의 效能을 100%로 보고, 試劑 tuberculin의 效能率을 算出한 後 對照 HCSM tuberculin, OT, HCSM tuberculin에 대한 反應消失의 時間的 推移를 觀察하였던바 試劑 HCSM tuberculin과 標準(對照) HCSM tuberculin은 接種後 24, 48, 72, 96 時間까지 皮膚에서의 發赤反應을 計測할 수 있었다. 그러나 72, 96 時間에는 反應部位의 限界가 消失됨으로 皮膚의 發赤反應의 크기를 測定하는데 確實한 計測이 不可能하였다.

OT에 의한 皮膚發赤反應은 接種後에 24, 48, 72 時間까지 反應部位의 크기를 計測할 수 있으나 96 時間에는 反應部位의 크기가 減少되었고 그의 消失에 따라 正確한 計測을 할 수 없음을 알았다.

本 試驗成績에서 OT와 HCSM tuberculin에 의한 感作 guinea pig의 皮內反應은 接種後 48 時間부터 反應部位의 減少 및 消失이 되기 始作하여 7~8日에는 거의 反應部位의 發赤反應이 消失되었다. 한편 OT는 HCSM tuberculin보다 빨리 反應部位 크기의 減少 및 消失이 된다는 것을 比較觀察할 수 있었다. (Fig. 1 參照)

## 考 按

著者는 前報(1967)<sup>13)</sup>에서와 같이 tuberculin 製劑에 Sauton 合成培地를 使用해서 HCSM tuberculin을 製劑하고 MiddleBrook-Dubos의 抗原感作赤血球凝集反應法을 利用해서 洗滌綿羊赤血球에 대한 試製 HCSM Tuberculin 對 對照 HCSM tuberculin의 感作原性, 溫度 및 pH가 抗原感作赤血球凝集反應에 미치는 變動等을 比較檢討한 바 試製 HCSM tuberculin의 抗原感作赤血球原價는 1:60~120倍이었고, 對照 HCSM tuberculin의 抗原感作赤血球原價는 1:60~120倍이었다. 이 兩者의 赤血球凝集反應 現象은 肉眼的으로 거의 동일한 赤血球의 凝集樣相이 일어남을 觀察하였다.

이러한 綿羊赤血球에 대한 試劑 HCSM tuberculin의 感作原性은 根津(1953)<sup>2)</sup>, 進藤(1957)<sup>4)</sup>, 永井(1960)<sup>14)</sup> 등의 研究報告와 같이, tuberculin 中の 赤血球感作物質은 蛋白質, 多糖體 및 磷脂質 등의 作用에

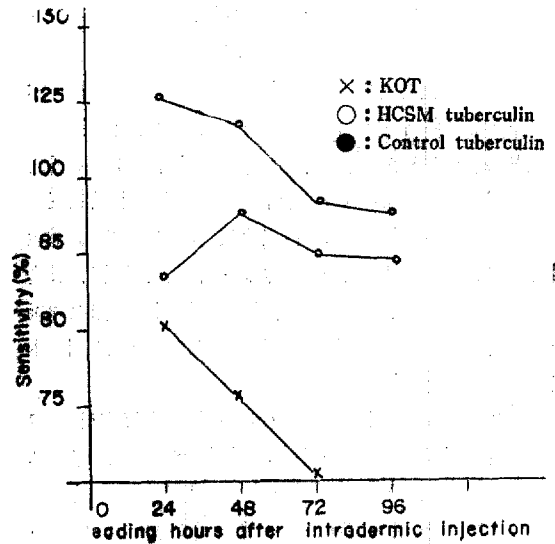


Fig. 1. Fluctuation of tuberculin reaction in guinea pigs sensitized with heat killed tubercule bacilli

因한 既知 抗血清과 特異反應을 일으킨다는 報告成績과 거의 동일하였다. 여기에서 抗原感作赤血球凝集反應의 tuberculin 最適稀釋濃度는 試製 HCSM tuberculin 1:30~60倍의 稀釋液을 抗原感作赤血球用으로 決定하였다.

試製 HCSM tuberculin을 利用한 抗原感作赤血球에 既知의 抗血清을 加한 試驗結果로 볼 때, 表 2에서와 같이 溫浴槽內에서 本反應의 最適溫度는 37°C였으며 30°C 以下의 溫度에서는 그의 赤血球凝集反應이 遲延되는 傾向을 보였다. 이로 볼 때 適當한 反應의 結果判定은 室溫에서 1夜放置함으로서 肉眼的 判定의 正確性을 期할 수 있었다. 한편 이와 같은 試驗의 結果로 適溫 37°C에서 30分, 60分, 2時間, 3時間을 各各 作用시켜 處理한 後의 成績은 表 3에서와 같이 30分에서 1:8倍, 60分에서 16倍, 2時間에서 64倍, 3時間에서 64倍의 赤血球凝集價를 보였으나 室溫 23~25°C에서 1夜靜置한 後의 判定結果는 各例가 동일하게 1:256 倍의 赤血球凝集價를 가지게 되었음을 알 수 있었다. 이러한 試驗成績에 따라 溫浴槽內의 最適溫度는 37°C로 決定하고 最適判定時間은 37°C의 溫浴槽內에서 2時間, 室溫에서 1夜放置해서 赤血球凝集反應의 結果判定을 實施하였다.

한편 抗原/1抗體反應에서 稀釋液의 pH가 本反應에 미치는 影響을 觀察한 바 表 4에서와 같이 弱酸性側 或은 alkali 側의 稀釋液에서도 特異反應이 일어난다는 것을 알 수 있었으나 本反應의 稀釋液은 pH 7.0이 適當하였음을 알 수 있었다. 여기에서 赤血球凝集反應의 最適 pH는 7.0으로 調整하여 本反應을 實施하였다. 本反應에서의 適當溫度 및 pH는 根津(1953)가 培養菌

液의 多糖體分割(CF I), 蛋白質分割(PF I)이 不活性化되는 原因의 究明, 進藤(1957)<sup>14)</sup>에 의한 可檢血清 및 血漿의 凍結保存時의 非動化에 因한 抗體價의 變動, 永井外(1960)<sup>14), 15)</sup> 등의 感作抗原이 gel의 pH에 의한 活性物質의 移行에 關한 試驗成績에서 適當溫度 및 pH와 本反應은 alkali 側에서 그의 活性이 弱化한다는 報告를 한바 있다.

以上の 모든 本反應에서의 豫備試驗과 先人들의 試驗成績을 通하여 試劑 HCSM tuberculin의 赤血球에 대한 抗原感作原性과 對照 HCSM tuberculin의 赤血球에 대한 抗原感作原性이 거의 동일하였다는 것을 알 수 있었다.

HCSM tuberculin의 使用濃度를 決定하는데는 感作 Guinea pig의 皮膚發赤反應에 따라 tuberculin reactivity를 測定한다. 이 感作 guinea pig의 供試期間은 結核死菌淨遊液을 接種한 3週後부터 90日까지의 것을 供試한다. 著者는 이 供試期間中에 있는 感作 guinea pig 血清에 대한 抗原感作赤血球凝集反應價를 調査하였다. 表 5에서와 같이 抗血清은 結核死菌을 guinea pig에 接種한 30日後에 最高의 赤血球凝集價에 達하게 되었다. 그리고 凝集反應價는 2週 동안 維持하였다가 漸次的으로 減少하였고 120日까지 血中에서 赤血球凝集反應價를 證明할 수 있었다. 또한 guinea pig에 結核死菌을 接種한 21日에 1:16倍, 90日에는 1:32倍의 赤血球凝集價를 證明할 수 있는 感作 guinea pig는 HCSM tuberculin의 效能測定用으로 供試할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

進藤(1958)<sup>16)</sup>는 結核死菌免疫 guinea pig의 抗體에 대한 赤血球凝集價가 接種後 1週부터 出現하여 7週後에는 最高에 達하게 되어 次次 그의 反應價는 減少되어 消失된다는 것을 報告한 바 있으나 著者는 感作 Guinea pig에 대한 血清中의 抗體價가 接種後 4週에서 最高에 達하게 되고 120日까지 抗體가 證明된다는 것을 밝히었다.

著者는 感作 guinea pig의 血清에 대한 humoral 抗體와 그의 組織反應의 程度 및 消長에 關한 時間的 推移를 觀察하였든 바 既知의 抗血清中의 赤血球凝集反應價가 最高에 達하였을 때에 試劑 HCSM tuberculin과 對照 HCSM tuberculin을 皮內接種한 24時間, 48時間, 96時間에 反應價를 各各 測定하여 比較觀察하였든 바 Fig. 1에서와 같이 試劑 HCSM tuberculin과 對照例의 皮膚反應値는 接種後 24時間, 48時間에서 가장 크게 出現하였고 72時間後에는 急進的으로 그의 皮膚反應이 減少하는 傾向을 取하였으며 次次 消失됨을 觀察할 수 있었다.

한편 OT의 皮膚反應値는 72時間後부터 거의 發赤反應을 計測할 수 없을 程度로 size의 外廓부터 消失되어 限界不明으로 됨을 볼 수 있었다. 이러한 試劑例의 HCSM 및 對照例의 HCSM tuberculin과 OT에 의한 皮膚의 發赤反應의 消失狀態를 時間的 推移로 볼 때 그들의 質의 面에 OT中에는 非 tuberculo-protein 物質의 含有量에서 나타나는 發赤反應 消失의 結果라 하겠다.

## 結 論

Tuberculin의 效能分析用으로 供試되는 感作 Guinea pig 血清에 대한 HCSM tuberculin의 抗原感作赤血球凝集反應을 實施한 바에 대한 成績은 다음과 같다.

1) 既知의 感作 guinea pig 血清에 대한 試劑 OT 및 HCSM tuberculin과 對照 HCSM tuberculin의 抗原感作赤血球原性을 동일한 條件下에서 比較檢討한 바 그들의 抗原感作原性은 兩者가 거의 같았다.

2) 感作 guinea pig 血清의 赤血球凝集價는 接種後 30日에 1:128倍의 最高力價에 達하여 45日까지 維持하였고, 그 後는 漸次的으로 下降하여 消失하게 된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 120日까지 抗血清의 凝集價를 證明할 수 있었다.

3) 試製 HCSM Tuberculin에 의한 感作 Guinea pig의 皮膚反應은 皮內接種 24時間에 最高의 發赤反應 size에 達하게 되었고 96時間부터 그의 發赤反應 Size는 減少하기 始作하여 14日에는 肉眼的으로 局所에서의 發赤反應을 觀察할 수 없었다.

## 參 考 文 獻

1. MiddleBrook, G., Dubos R.J.: *Specific Serum Agglutination of Erythrocytes Sensitized with Extract of Tubercle Bacilli. J. Exp. Med., 88: 521-524, 1948.*
2. 根津尙光: *MiddleBrook-Dubos 反應ニヨル結核菌ノ赤血球感作物質ニ關スル研究(I). 日. 細., 8(7), 771-781, 1953.*
3. 根津尙光: *MiddleBrook-Dubos 反應: ヨル結核菌, 赤血球感作物質ニ關スル研究(II). 日. 細., 8(8): 813-817, 1953.*
4. Boyden, S.N.: *The Absorption of Proteins on Erythrocytes treated with Tannic Acid Subsequent Hemagglutination by Antiprotein Sera. J. Exp. Med., 93: 107-109, 1951.*
5. Boyden, S.N., Anderson, M.E.: *Agglutination of Normal Erythrocytes in Mixture of Antibody*

- and Antigen and Hemolysis in the Presence of Complement. Bri. J. Exp. path., 36: 162-166, 1955.*
6. 進藤寅二, 歌橋昭和 外: 結核ノ不完全抗體ノ研究ト, 不完全抗體證明法ニ對シテ. 日. 細., 12(5): 389-395, 1957.
  7. 進藤寅二, 歌橋昭和; *Tuberculin* 分割 抗原感作 赤集反應及 溶血反應, 基礎的研究 補遺. 日. 細., 12(4): 303-513, 1957.
  8. 進藤寅二; 癩患者 血清, *Tuberculin* 感作 赤血球凝集反應, 溶血反應ニ關スル研究. *Lepra* 誌, 8(1); 別冊, 1958.
  9. 進藤寅二: 結核菌系ノ 抗原抗體反應. 日. 細., 13(7): 560-578, 1958
  10. 土屋完司, 淺見望: 血球凝集反應ニヨル各種 酸性培養液ノ血球感作原性ニツイテ(Ⅰ) 多糖體分割ニ對スル實驗. 日. 細., 10(1): 29-32, 1955.
  11. 細田行隆: 肺結核患者ノ血中抗體ニ對シテ. 日. 細., 13(10): 395-955, 1960.
  12. 高橋義夫: 結核抗原, 免疫血清學的意義. 日. 細., 15(10): 935-955, 1960
  13. 金丁圭: *Tuberculin* 에 관한 研究 (1) 動物의 皮內用 *Tuberculin* 生産에 대하여. 大韓微生物學會誌, 4(1): 21-28, 1968.
  - 14) Yoshio Aoki, Kazunari Nagai, Tadashi Watanabe: *Studies on the Sensitizing Antigen in the Hemagglutination Reaction of Old Tuberculin.*  
(1) *Studies on the Purification of the Sensitizing Antigen by Chloroform Gel procedure. Jap. J. of Tuberculosis, 9(1-2): 25-33, 1961.*
  - 15) Yoshio Aoki, Kazunari Nagai, Tadashi Watanabe: *Studies on the Sensitizing Antigen in the Hemagglutination Reaction of Old Tuberculin.*  
(2) *Sensitizing Activity and Phyco-Chemical properties of the Sensitizing Antigen prepared by the Chloroform Gel Methd. Jap. J. of Tuberculosis, 9(1-2): 34-42, 1961.*
  - 16) Hong Kyu Park: *The use of Fixed, Sensitized, Lyophilized Erythrocyte for the Middlebrook-Dubos Tuberculin test. Proc. Soc. Exp. Bio. and Med., 109: 159-159, 1962.*
  - 17) 梁學道 外: 牛血清에 대한 結核抗原(PPD) 感作赤血球凝集反應, 溶血反應. 綜合醫學, 別冊, 11(4): 385-390, 1966.
  - 18) Terukazu, Tiuzi Sindo: *Further studies on the Tuberculosis Incomplete Antibody in Maternal and Cord Sera at Delivery. Jap. J. Tuberculosis, 6(2), 73-94, 1948.*
  - 19) Yukitaka Hosoda, Tiuzi Sindo: *Further Investigation on Humoral Antibodies in Tuberculous Patients. Jap. J. of Tuberculosis, 6(3): 112, 1958.*