

結核免疫に関する研究

第 11 報

抗酸性菌水抽出成分の沈降反応抗原性に就いて

第 1 篇 抽出方法の検討*

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

善 田 輝 美

（受付：昭和32年5月7日）

緒 言

1897年 Kraus が細菌の培養濾液を抗原として初めて細菌性沈降反応を行つて以来、その沈降原性の増強を計るため各種の実験が試みられた。就中1917年鳥瀉¹⁾は細菌のブイオン培養液及び菌体浮遊液を煮沸しその濾液に顕著な抗原性を認め、その理由として、氏の所謂 Impedin の破壊をあげ、井上(善)²⁾は煮沸により熱凝固性蛋白質が除外され膠質の物理的変化を来し、その結果反応に対する抑制機能の低下が招来されるためであろうと説明した。扱て抗酸性菌菌体水抽出成分の抗原性に関しては1931年井上(達)³⁾は結核菌菌体蒸溜水抽出液が沈降原として優秀なことを報告し、草場⁴⁾は菌を蒸溜水及び生理的食塩水に浮遊し、100°C、30分間加熱

後更に2時間以上 37°C に保ち時々振盪抽出した液を用い抗酸性菌の分類に応用している。又 Zinsser & Parker⁵⁾ は結核菌等の生理的食塩水浮遊液を pH 5.4 として煮沸した濾液は所謂 Reizidie Antigen を有し、当該菌免疫血清と特異的に沈降反応を呈すると述べている。

黒屋⁶⁾、中村⁷⁾ は細菌の中性生理的食塩水抽出液はなお種属特異性の蛋白質を溶存するため類属反応著しく、塩酸酸性加熱抽出を行つてこれを除外すると型特異性を増大すると述べている。

私も亦抗酸性菌に就いて特異沈降原を得る目的で種々の条件下に、その水溶成分の抽出を行い比較検討し知見を得たのでここに報告する。

実験材料並びに実験方法

I) 家兎免疫方法：人型結核菌 H₂ 株をソートン培地に3週間培養し、(1) 一部菌苔を採取し濾紙にて充分吸湿せる後略々 5mg/ml の割に生理的食塩水(以下生食水と略称する)に浮遊し 100°C、30分間煮沸し、その遠心上澄液を採り、(2) 他は 100°C、30分間加熱殺菌後濾別乾燥し、これを前記遠心上澄液にて磨砕し乍ら 5mg/ml の浮遊液を作製し、更に 100°C、30分間加熱滅菌後保存し、1週間間隔でその 2ml を 2

回、3ml を 3 回(全菌量 65 mg) 家兎耳静脈内に注射し、最後の注射より 1 週間目に全採血し、血清を、分離し、56°C、30分間加熱後 1 万倍の割にマーズニンを加え氷室に貯蔵し、使用に際し更に 56°C、10分間⁸⁾加熱した。

II) 沈降反応用抗原

1) 抗原作製用菌種：人型結核菌(H₂株、青山B株)、牛型結核菌(R₁₀株)、BCG、鳥型結核菌(A₆₇

* 本論文の要旨は昭和29年10月、第8回日本細菌学会北陸地方支部集會に於て発表した

株), 非病原性抗酸性菌 (チモテー菌, スメグマ菌) の7種とした。

2) 抗原液の調製: 上記各菌株をソートン培地に一定期間 (前記4者は4週間, 後記3者は2週間) 培養後菌苔を採取し, 濾紙にて充分吸湿後生食水又は蒸溜水にて10mg/mlの菌浮游液を作り, これをN/10クエン酸又は塩酸をもつてpH 3.2, 4.6及び7.0として100°C, 2時間加熱後3,000r.p.m. 30分間宛2~3回遠心しその上澄液を中和した後もとの容量に修正した。(加熱抽出液を以下Pと略称する。)修正後の性状は

1) 酸性Pは全く透明で中性Pは微濁濁を呈した。又生食水Pは蒸溜水Pよりも混濁度は低かつた。

2) 化学的定性反応: 人型結核菌H₂株のpH 7.0及び塩酸性(pH 3.2)Pに就いて例示すれば第1表の如くである。

3) ペーパークロマトグラフィーによる成績: (第1図参照)鳥型結核菌A₆₇株のpH 7.0及び塩酸性蒸溜水Pに就いて例示すれば, pH 7.0及びpH 4.6 Pでは2個のn-ブタノールニンヒドリン呈色スポット

及び1個のアンモニヤ硝酸銀呈色スポットを認め, pH 3.2 Pでは更に1個のn-ブタノールニンヒドリン呈色スポットを認めた。

4) 還元物質質量: (第2表参照)人型結核菌, 牛型結核菌, 鳥型結核菌及びチモテー菌の蒸溜水 pH 7.0 P及び塩酸性(pH 3.2)P, 並びにこれらPに少量の発煙塩酸を加え100°C, 3時間加熱, 生じた沈澱物を除去後中和した上澄液の還元物質質量をHagedorn-JensenのJod Methrieで測定し, これら各Pが相当量の還元物質を含有することを認めた。

5) 窒素量: (第3表参照)アツオトメトリーにより, 人型結核菌の生食水並びに蒸溜水 pH 7.0 P及び塩酸性P中に1~3 mg/ml程度のN量が証明された。

Ⅲ) 沈降反応術式: 村田氏黴毒血清反応用沈降管を用い2倍稀釈抗血清系列に2倍より倍数稀釈した抗原液(蒸溜水抽出液には0.85%の割に予じめ食塩を加えた)を順次重層し抗原価を, 1.5%アラビヤゴム加生食水で同様2倍より倍数稀釈した抗血清系列に抗原原液を重層し抗体価を測定した。

実 験 成 績

人型結核菌H₂株の免疫血清と各種抗酸性菌Pとの沈降反応を行つた成績は次の如くである。

I. 抗体価: (第4表参照) (1) 生食水 pH 7.0 Pを抗原として上記免疫血清との沈降反応を行うと, 非病原性抗酸性菌Pによる場合に比し各型結核菌Pによる抗体価は高かつたが, 人型結核菌Pによる場合特に高いということはない。生食水クエン酸酸性P及び塩酸性(pH 4.6)Pを用いた場合の抗体価は生食水 pH 7.0 Pによる場合と略々同一であつた。生食水塩酸性(pH 3.2)Pを抗原とせる抗体価は, 全般的に可成り低く, その中では人型結核菌Pを用いた場合最も高かつたが, なお牛型結核菌, 鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌Pによるものと著差はなく, 非病原性抗酸性菌の他の何れの抽出条件下のPによる場合より僅かに高くあらわれた。

(2) 蒸溜水 pH 7.0 Pを抗原とすると抗体価は各型結核菌Pでは高くその間に差が認められず非病原性抗酸性菌Pでは低かつた。又夫々対応する菌株の生食水Pによる場合に比べると何れも概して高かつた。蒸溜水塩酸性(pH 4.6)Pを抗原とすると抗体価は, 人型結核菌Pによるものが牛型及び鳥型各結核菌Pの場合よりも若干高く, 蒸溜水塩酸性(pH 3.2)Pでは抗体価は全般的に低くなるが, 人型菌Pによるものはその他の菌のPによるものより高く, 両者間に明瞭な差を認めた。

II. 抗原価: (第5表参照) 抗原価は抗体価と稍々趣を異にし, 同一条件下に抽出せる各抗酸性菌Pの抗原価には著明な差異が認められなかつた。只一般に生食水塩酸性(pH 3.2)Pの抗原価最も高く, 生食水塩酸性(pH 4.6)Pの抗原価最も低かつた。この事は抽出液中のNの定量実験の成績と一致した。

総括並びに結論

私は人型結核菌 H_2 株加熱死菌を家兎に注射して得た免疫血清と、結核菌（人型菌 H_2 株及び青山B株、牛型菌 R_{10} 株、BCG、及び鳥型菌 A_{67} 株）並びに非病原性抗酸性菌（スメグマ菌及びチモテー菌）を蒸溜水及び生理的食塩水に浮遊し種々の pH の下で加熱抽出した後遠心して得た上澄液と沈降反応を行い次の如き結果を得た。

1) 抗原価は結核菌並びに非病原性抗酸性菌加熱抽出液の間に差はなかつたが、抗体価は結核菌加熱抽出液を抗原とした場合著明に高かつ

た。

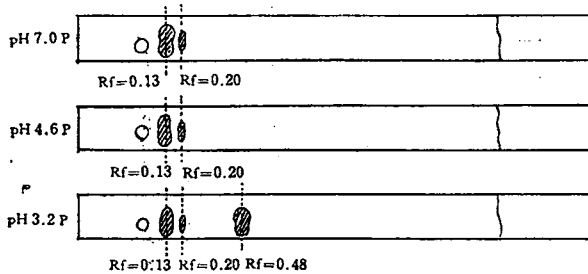
2) 抗体価は各菌の pH 7.0 蒸溜水抽出液をもつて測定せる場合最も高かつたが、各結核菌間の差を認めず、塩酸性 (pH 3.2) 蒸溜水抽出液によつて測定せる場合価は全般的に低かつたが、人型結核菌と他結核菌との間に明らかに差を認めた。

抗原価は各菌の塩酸性生理的食塩水の pH 3.2 で抽出した液が最も高く、同 pH 4.6 で抽出した液が最も低かつた。

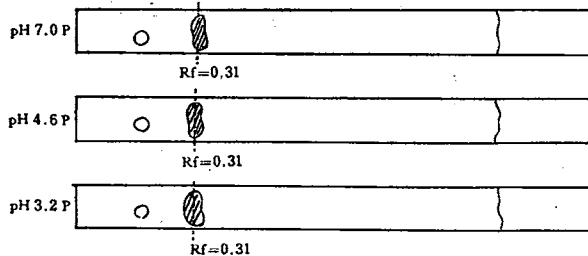
(文献後載)

第1図 鳥型結核菌 A_{67} 株蒸溜水 P のペーパークロマトグラフィーによる成績

a) n-ブタノールニンヒドリン呈色スポット



b) アンモニア硝酸銀呈色スポット



第1表 人型結核菌 H₂ 株蒸溜水 P の化学的性状

反 応	抽出時の pH	
	7.0	3.2
Heller's reaction	—	—
Sulfosalicylic acid reaction	—	—
Xanthoprotein reaction	—	—
Ninhydrin reaction	+	+
Trichloroacetic acid reaction	±	±
Pot. tetrabromophthalein ethylester reaction	—	—
Molisch's reaction	+	+
Phloroglucinol reaction	+	+
Seliwannoff's reaction	+	+
Trommer's reaction	—	±

註: 抽出時の pH 修正は塩酸を用いた。

第2表 抗酸性菌蒸溜水 P 中の還元物質質量

菌 種	抽出時の pH	還元物質質量 mg/dl		% (A/B × 100)
		(A) 加水分解前	(B) 加水分解後	
人型菌 H ₂ 株	7.0	4.3	45.6	9.5
	3.2	7.7	44.0	17.6
牛型菌 R ₁₀ 株	7.0	3.7	31.6	11.7
	3.2	7.7	30.2	25.7
鳥型菌 A ₆₇ 株	7.0	4.6	23.6	19.5
	3.2	10.0	23.2	43.1
チモテ-菌	7.0	6.1	24.8	24.6
	3.2	10.5	25.2	41.7

第3表 人型結核菌 H₂ 株 P の窒素量

抽 出 液	抽出時の pH	N 量 (mg/dl)
蒸 溜 水	7.0	2.0
	4.6	1.25
	3.2	2.38
生理的食塩水	7.0	1.8
	4.6	1.13
	3.2	2.75

第4表 人型結核菌 H₂ 株加熱死菌免疫血清に対する各種抗酸性菌 P の沈降反応抗体価測定成績

抗 酸 原 性 抗 菌	生 理 的 食 塩 水					蒸 溜 水			
	pH 7.0	クエン酸酸性		塩 酸 酸 性		pH 7.0	塩 酸 々 性		アルカリ性 pH11.0
		pH 4.6	pH 3.2	pH 4.6	pH 3.2		pH 4.6	pH 3.2	
人 型 H ₂	1,024	1,024	512	2,048	128	4,096	4,096	512	1,024
人型青山 B	512	512	256	2,048	128	4,096	4,096	512	4,096
牛 型 R ₁₀	128	128	64	64	32	2,048	256	8	•
B C G	4,096	•	•	2,048	32	4,096	1,024	16	2,048
鳥 型 A ₆₇	2,048	2,048	1,024	2,048	64	2,048	1,024	64	1,024
チモテ-	16	8	16	16	32	256	64	4	64
スメグマ	16	4	8	16	32	256	32	2	•

註: 数字は免疫血清の稀釈倍数(抗体価)を示す。抗原は原液使用

第5表 人型結核菌 H₂ 株加熱死菌免疫血清をもつて測定せる
各種抗酸性菌 P の抗原価測定成績

抗 酸 原 性 抗 菌	生 理 的 食 塩 水					蒸 溜 水		
	pH 7.0	クエン酸酸性		塩 酸 酸 性		pH 7.0	塩 酸 酸 性	
		pH 4.6	pH 3.2	pH 4.6	pH 3.2		pH 4.6	pH 3.2
人 型 H ₂	8	8	16	4	32	32	16	32
牛 型 R ₁₀	4	4	4	2	32	8	8	8
B C G	4	・	・	2	32	16	16	16
鳥 型 A ₆₇	8	8	8	4	16	16	4	16
チ モ テ ー	4	4	4	2	32	8	4	8

註： 数字は抗原の稀釈倍数(抗原価)を示す。免疫血清は2倍稀釈液使用