

# 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 3 篇 水抽出成分中の多糖体並びに蛋白を以てする 沈降反応の場に就いて

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

私は先<sup>16),23)</sup>に各種抗酸性菌に就いて種々の条件下にその水抽出成分の抽出を行い、沈降反応によりその反応原性並びに特異性に就いて観察した結果を報告した。今回は菌の中性蒸溜水加

熱抽出液より分離精製した多糖体及び蛋白をそのまま、或いは酸又はアルカリ加水分解産物を抗原として行つた沈降反応の場を観察し些か知見を得たのでここに報告する。

#### 実 験 方 法

##### 1) 菌体成分分離法（第1図参照）

菌体水溶成分の分離過程において酸性並びにアルカリ性の下で加熱することにより、免疫学的活性に変化を来たすことが考えられるので、加熱抽出操作中はすべて中性の下で行つた。即ちアルコール・エーテル等量液及びクロロフォルムで脱脂した人型結核菌 H<sub>2</sub> 株の中性蒸溜水加熱抽出液よりそれぞれ多糖体及び蛋白を分離精製した。

##### 2) 多糖体及び蛋白の化学的性状（第1表参照）

多糖体：0.1%溶液で試みた諸蛋白反応はすべて陰性で、糖反応は Trommer 反応以外は陽性であつた。又 Hagedorn-Jensen Jod-methrie による葡萄糖換算還元量は加水分解前は0%、加水分解後は68%であつた。因みに加水分解は 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を以て30分間行つた。

蛋白：0.1%溶液で試みた糖反応はすべて陰性で

蛋白反応はすべて陽性であつた。

##### 3) 抗原液

10mg/ml の割に作製せる多糖体 (α) 及び蛋白 (β) の蒸溜水溶液の一部は0.85%の割に食塩を加えそのまま抗原 (α 及び β 抗原) とし、他部は塩酸で pH 3.2 とし 100°C、2 時間加熱後中和して 0.85% の割に食塩を加え抗原 (α' 及び β' 抗原) とし、又苛性曹達で pH 11.0 で同様操作を加え抗原 (α'' 及び β'' 抗原) とした。

##### 4) 免疫血清

第1篇<sup>19)</sup>の方法に従い 5mg/ml の割に作製した人型結核菌 H<sub>2</sub> 株死菌ワクチンを型の如く家兎の耳静脈内に 65mg を 5 回に分ち注射して得た免疫血清を用いた。

##### 5) 沈降反応術式

緒方<sup>17)</sup>の方法に従い 5 時間後判定した。

## 実験成績

I) 多糖体を抗原とする沈降反応の場合

1)  $\alpha$  抗原による反応の場合 (第2図参照)

反応の場合は抗原価16,000, 抗体価16 (A反応系), 抗原価4,000, 抗体価256 (B反応系), 及び抗原価1,000, 抗体価1,024 (C反応系) の三つの矩形からなり緒方に従えば少なくとも3反応系の混合せるもので, 従つて該多糖体は少なくとも三つの活性因子を含有することが推測された。

2)  $\alpha'$  抗原による反応の場合 (第3図参照)

反応の場合は抗原価4,000, 抗体価2, 抗原価2,000, 抗体価8, 及び抗原価1,000, 抗体価64の三つの矩形からなり $\alpha$ 抗原による反応の場合を全体に縮小せる形を示した。

3)  $\alpha''$  抗原による反応の場合 (第4図参照)

反応の場合は抗原価16,000, 抗体価16, 抗原価4,000, 抗体価32の二つの矩形からなり,  $\alpha$  抗原による反応の場合と比較して見るに, 抗原価

1,000, 抗体価1,024のC反応系は消失, 抗原価4,000, 抗体価256のB反応系の代りに抗原価4,000, 抗体価32なる反応系の出現を見た。一方A反応系はかかるアルカリ性加水分解では変化を受けなかつた。

II) 蛋白を抗原とする沈降反応の場合

1)  $\beta$  抗原による反応の場合 (第5図参照)

反応の場合は抗原価16,000, 抗体価512なる見掛け上唯一の矩形を呈し, 本蛋白が強い免疫学的活性を有することが明らかとなつた。

2)  $\beta'$  抗原による反応の場合 (第6図参照)

反応の場合は抗原価16,000, 抗体価1,024なる矩形を呈し,  $\beta$  抗原によるものに比べ一般に反応の程度が強く, 且つ抗体価が僅かに高かつた。

3)  $\beta''$  抗原による反応の場合 (第7図参照)

反応の場合は抗原価8,000, 抗体価512なる矩形を呈し,  $\beta$  抗原によるものに比べ抗原価が僅かに低かつた。

## 総括並びに考按

結核菌の多糖体には従来より免疫学的活性物質と不活性物質を含むことが知られ<sup>5)189-20)</sup>, 又蛋白に関しては Coghil<sup>11)</sup> は脱脂菌体より蒸留水で抽出せる蛋白はアルブミンであると報告し, 田原, 高崎<sup>22)</sup> は脱脂結核菌菌体蛋白は沈降原性を有し, 煮沸により増強すると唱えた。

本実験での多糖体と抗菌血清との沈降反応の場の形から見るに, この多糖体は免疫学的に少なくとも三つの単位抗原を含み, これらの単位抗原は何れも酸性加水分解により沈降原性に變

化を生じ, その相異の程度は前篇<sup>23)</sup>に記載せる菌の中性蒸留水抽出液と塩酸性蒸留水抽出液による沈降反応抗体価の相異と略々同程度であつた。又アルカリ性加水分解により低抗原価高抗体価を示す単位抗原の沈降原性の變化が推測された。

蛋白も亦高い沈降原性を有し, 既述のような酸及びアルカリ性加水分解によつてはその反応原性に殆んど變化が認められなかつた。

## 結 論

私は人型結核菌 H<sub>2</sub> 株の中性蒸留水加熱抽出液より分離精製された多糖体及び蛋白と該菌株加熱死菌免疫血清との間に沈降反応の場を観察し, 次の如き結果を得た。

1) 脱脂菌体を中性蒸留水で加熱抽出し高度

の沈降原性を有する多糖体並びに蛋白を得た。

2) 該多糖体は少なくとも血清学的に三つの単位抗原を有し, 塩酸性又はアルカリ性加水分解によつてその反応原性に變化を受けた。

3) 該菌体蛋白の反応原性は塩酸性又はアル

ルカリ性加水分解によつて見掛け上変化を受けなかつた。

### 全篇の総括

私は第1篇に於て各種抗酸性菌加熱抽出液の化学的、血清学的性状を考察し、上記抽出液が結核菌免疫血清に対し沈降原性を有すると共に、これら抽出液の反応原性はその抽出条件の相異により動揺する事実、並びにこれら抽出液中に相当量の還元物質と少量の含窒素物質を含有することを見出した。第2篇でこれら抽出液の特異性の有無を検すると共に、これら抽出液と結核菌免疫血清との沈降反応の場を観察し、塩酸酸性(pH 3.2)加熱抽出液を抗原とせる反応の場は、中性加熱抽出液を抗原とせる反応の場と同様階段状を呈するが、その場の大きさは血清稀釈倍数側が著しく縮小せる形を示した。この反応の場の著しい変化を来す原因を追究するため第3篇に於て人型結核菌よりなるべく酸

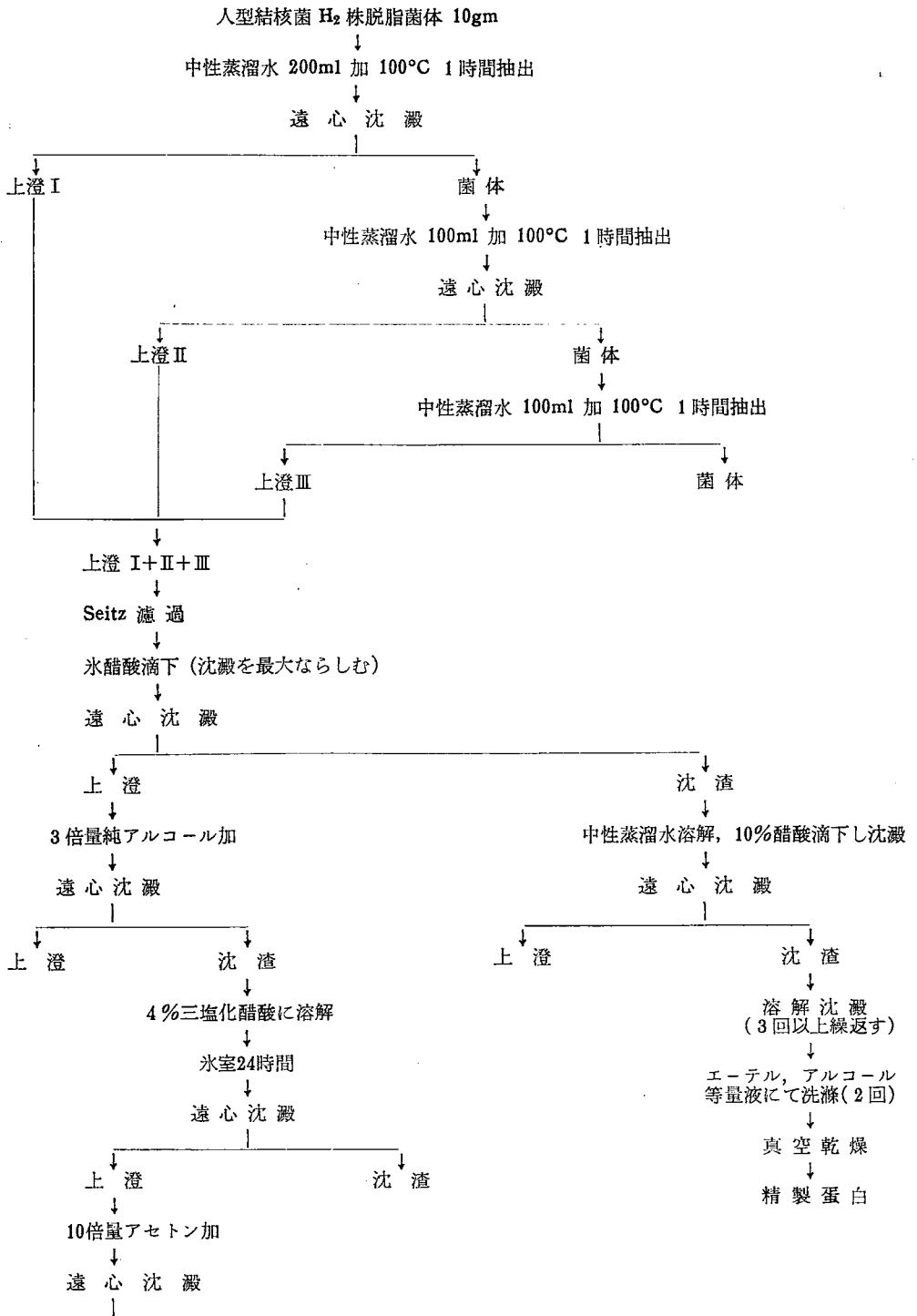
性加熱アルカリ性加熱を避けた抽出法により血清学的に活性なる多糖体並びに蛋白体を得、これらと人型菌免疫血清との沈降反応の場を観察し、1) 該多糖体は血清学的に少なくとも三つの単位抗原を有し、この3単位抗原共に塩酸酸性加熱により変化を受けその反応の場は抗原稀釈倍数及び血清稀釈倍数の両側共に縮小し、又アルカリ性加熱により3単位抗原中2単位の抗原性が消失するか、又は減弱を来すこと、2) 蛋白体は血清学的に見掛け上1単位抗原だけ認められ、この抗原性は酸及びアルカリ性加熱により殆んど変化を受けないことを実証した。

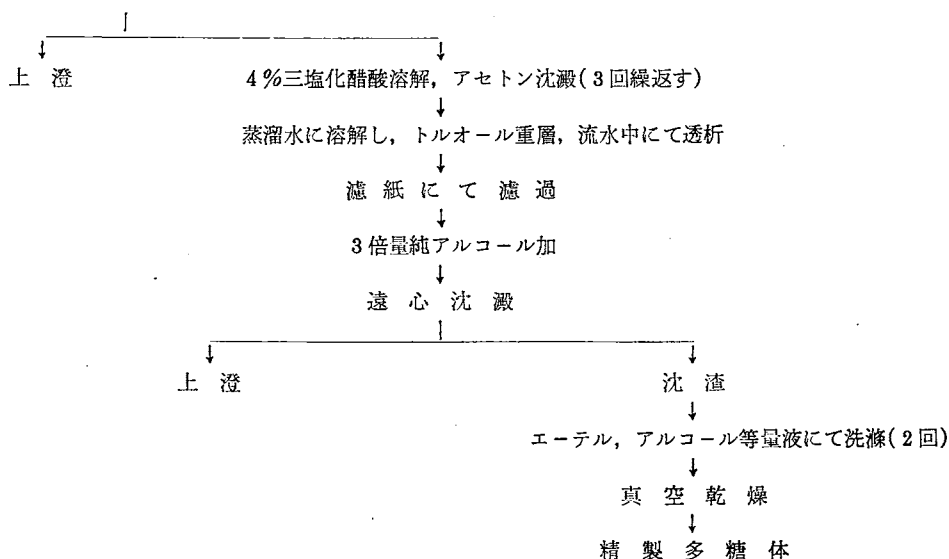
(本研究にあたり西東助教授の御援助に対し謝意を表します)

### 文 献

- 1) Torigata, R. : Die Impedin, 1917. 2) 井上善十郎 : 実験医学雑誌, 11, 1, 1937. 3) 井上達 : 岡山医学会雑誌, 43, 1952, 1931. 4) 草場幹人 : レプラ, 9, 779, 1938. 5) Zinsser, H. & Parker, J. T. : J. Exp. Med., 37, 275, 1923. 6) 黒尾政彦 : 日本伝染病学会雑誌, 18, 1, 1943. 7) 中村修介 : 東北医学雑誌, 28, 1041, 1941. 8) 緒方富雄 : 梅毒の新しい血清学的検査法, 1951. 9) 川村六郎 : 慶応医学, 3, 381, 1933. 10) Furth, J. : J. Imm., 12, 273, 1926. 11) HarpPTH, H. : Zschr. f. Tbk., 79, 140, 1938. 12) Schlossberger, H. & Pfannenstiel, W. : Zschr. Hyg. u. Inf., 95, 77, 1922. 13) 久保久候, 他 : 日本医学, 3400, 5, 1946. 14) 青木義男, 他 : 長崎医学会雑誌, 11, 952, 1933. 15) 小西忠一 : 結核, 27, 405, 1952. 16) 善田輝美 : 金大結研年報, 15 (下), 193, 1957. 17) 緒方富雄 : 血清学の領域から, 1946. 18) Mueller, J. H. : J. Exp. Med., 43, 1, 1926. 19) Heiderberger, M. & Menzel, A. E. O. : J. Biol. Chem., 118, 79, 1937. 20) Mc Alpine, K. L. & Masucci, P. : Am. Rev. Tbc., 24, 729, 1931. 21) Coghill, R. D. : J. Biol. Chem., 70, 439, 1926. 22) 田原留吉・高崎文雄 : 日本微生物学会雑誌, 20, 3941, 1926. 23) 善田輝美 : 金大結研年報, 15 (下), 198, 1957.

第1図 人型結核菌菌体多糖体並びに蛋白の抽出法



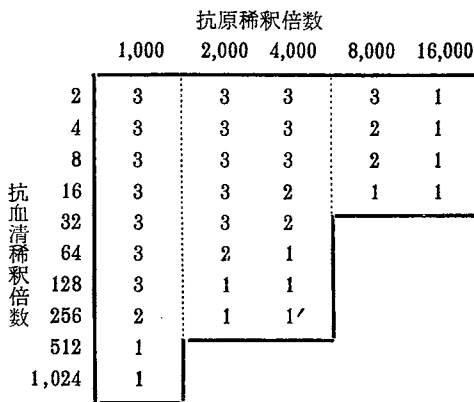


第1表 人型結核菌水抽出液多糖体並びに蛋白の化学的性状

反 応	多糖体	蛋白
Heller's reaction	—	+
Sulfosalicylic acid reaction	—	+
Trichloroacetic acid reaction	—	+
Xanthoprotein reaction	—	+
Millon's reaction	—	+
Ninhydrin reaction	—	+
Tetrabromphthalein ethylester reaction	—	+
Molisch's reaction	+	+
Trommer's reaction	—	—
Seliwanoff's reaction	+	—
Phloroglucinol reaction	+	—
N	0.5%	13.3%
Reducing suger	加水分解前 加水分解後	0% 68%

註：定性反応は多糖体，蛋白共に 0.1% 溶液を使用。

第2図 a 抗原と免疫血清との間の沈降反応の場



第3図  $\alpha'$  抗原と免疫血清との間の沈降反応の場

		抗原稀釈倍数		
		1,000	2,000	4,000
抗血清稀釈倍数	2	2	2	1
	4	2	1	
	8	2	1	
	16	1		
	32	1		
	64	1		

註： $\alpha'$  抗原……脱脂菌体中性抽出液多糖体を塩酸 (pH 3.2) 加水分解したもの。

第4図  $\alpha''$  抗原と免疫血清との間の沈降反応の場

		抗原稀釈倍数				
		1,000	2,000	4,000	8,000	16,000
抗血清稀釈倍数	2	3	3	2	2	1
	4	3	3	2	1	1
	8	3	3	3	1	1
	16	3	3	2	1	1
	32	1	1	1		

註： $\alpha''$  抗原……脱脂菌体中性抽出液多糖体を苛性曹達 (pH 11.0) 加水分解したもの。

第5図  $\beta$  抗原と免疫血清との間の沈降反応の場

		抗原稀釈倍数				
		1,000	2,000	4,000	8,000	16,000
抗血清稀釈倍数	2	3	3	3	3	2
	4	3	3	3	3	2
	8	3	3	3	3	2
	16	3	3	3	3	2
	32	3	3	3	3	2
	64	3	3	3	3	1
	128	3	3	3	2	1
	256	3	3	2	1	1
	512	1	1	1	1	1

第6図  $\beta'$  抗原と免疫血清との間の沈降反応の場

		抗原稀釈倍数				
		1,000	2,000	4,000	8,000	16,000
抗血清稀釈倍数	2	3	3	3	3	2
	4	3	3	3	3	3
	8	3	3	3	3	2
	16	3	3	3	3	1
	32	3	3	3	3	1
	64	3	3	3	3	1
	128	3	3	3	3	1
	256	3	3	3	3	1
	512	3	3	3	1	1
	1,024	1	1	1	1	1

註： $\beta'$  抗原……脱脂菌体中性抽出液蛋白を塩酸 (pH 3.2) 加水分解したもの。

第7図  $\beta''$  抗原と免疫血清との間の沈降反応の場

		抗原稀釈倍数			
		1,000	2,000	4,000	8,000
抗血清稀釈倍数	2	3	3	3	1
	4	3	3	3	1
	8	3	3	3	2
	16	3	3	3	2
	32	3	3	2	1
	64	3	3	2	1
	128	3	3	1	1
	512	2	1	1	1

註： $\beta''$  抗原……脱脂菌体中性抽出液蛋白を苛性曹達 (pH 11.0) 加水分解したもの。