

# 結核免疫に関する研究

## 第 19 報

### 結核菌体浸出液の免疫学的研究

#### 第 1 編 浸出条件と抗原性の関係

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

山 本 純 夫

（受付：昭和 34 年 1 月 16 日）

#### 緒 言

Koch による OT の創製とその皮膚反応への応用に端を発し、結核菌々体成分およびその代謝産物を抗原として結核症の血清学的研究が急速な進展を遂げ、これに関する内外研究者の報告もきわめて多い。なかんずく沈降反応は最も古くから研究され、<sup>1)</sup>M. Mayer、<sup>2)</sup>M. Ficker、<sup>3)</sup>草場 および<sup>4)</sup>東風がそれぞれ菌体より抽出した抗原を使用してその成果を発表している。しかして 1948 年 Middlebrook & Dubos<sup>5)</sup> は結核菌々体抽出物をもつて感作された赤血球が結核血清によつて特異的に凝集されることおよび 1950 年 Scott & Smith<sup>6)</sup> が OT を菌体抽出液に代用しうることを報告して以来、この新しい血清学的反応はきわめて広く応用されるに至つた。

しかしながら菌体抽出液を用いる場合、その作製法は一定せず、研究者によりおのおの異なる

方法を用いている。たとえば Middlebrook-Dubos は phenol-aceton 処理菌体を 0.55% NaCl + 0.5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 20% Methanol 含有水溶液中に浮遊し 35°C で 20 時間攪拌後、中島<sup>7)</sup> は熱殺菌体を蒸留水中で 60°C 1 時間加熱し氷室に 48 時間放置後、Thurston et al<sup>8)</sup> は生菌を蒸留水および生理食塩水で 37°C、2 時間加温後、善田<sup>9)</sup> は蒸留水および生理食塩水の pH を 3.2、4.6、7.0 あるいは 11.0 として 100°C、2 時間加熱後遠心する方法を採用している。

そこで私は各種条件下でヒト型結核菌青山 B 株の加熱浸出液を作り、それらの血球感作能、沈降原性および皮膚反応惹起力を指標として、最も強い抗原性を有する浸出液の得られる浸出条件を追求し以後の実験に資せんとした。以下その成績の概要を記述する次第である。

#### 実験材料ならびに実験方法

##### A. 実験材料

- 1) 浸出液作製に用いた結核菌：ヒト型結核菌 青山 B 株で、その Sauton 培地 8 週培養の菌苔をメノウ乳鉢内で充分細砕した後 50 mg/ml の浮遊

液を作り浸出に供した。溶媒および浸出条件は各実験の項に記載する。

- 2) 使用抗血清：ヒト型結核菌青山 B 株の熱殺乾燥細砕菌体を 10 mg/ml に生理食塩水に浮遊し 100°

- C, 1 時間加熱したものを 2 ml あて 1 週 1 回ウサギに静注し, OT 感作血球凝集価が 1 : 2,048 に達したとき全採血して血清を分離し, 0.5% に Phenol を加えて保存したものを使用した.
- 3) 皮膚反應用ウサギ: ヒト型結核菌青山 B 株の熱殺乾燥菌体を 10 mg/ml に流動パラフィンに浮遊し, その 1.0 ml を臀筋内に注射した.
- 4) OT: 教室保存の H<sub>37</sub>Rv-OT を用いた.

## B. 実験方法

- 1) 感作方法, 凝集能および阻止能試験: 西東ら<sup>10)</sup>の方法によつた.
- 2) 沈降反応: 重層法により 5 時間後に最終判定を行つた.
- 3) 皮膚反応: 型のごとく背部皮内に注射し, 48 時間後に判定した.

## 実験成績

### A) 浸出液 (P と略記) の浸出条件による抗原性の吟味

1) 浸出の温度および時間の影響: ヒト型結核菌青山 B 株の熱殺乾燥菌体の蒸留水浮遊液を 37°C, 60°C あるいは 100°C で 1 時間加熱した後各組を 2 分し, 氷室内にそれぞれ 3 日および 7 日保存後遠心し, 上清をザイツでろ過して P を作つた. 得られた P は肉眼的にごくわずかに乳白色を呈し, 顕微鏡的に菌の混在を認めない. 各 P の性状は表 1 に示すごとくで, いづれも糖および蛋白を含有し, その量はそれぞれ Folin-Wu 法および Azotometry により定量すると, ともに加熱温度が高く浸出時間の長い程多くなるのが認められた. このような性状の上記 6 種の P について血球感作能, 感作血球凝集反応阻止能, 沈降抗原価および皮膚反応惹起力を比較観察した. なお血球感作および皮膚反応には P は原液のまま, 対照の OT は 10 倍に稀釈して用いた. その成績は表 2 に示すごとく, 各反応における抗原性をみると 37°C P\* ≪ 60°C P < 100°C P であり, また同一加熱温度のものでは氷室保存 7 日後作製した P の方が 3 日後作製の P よりすぐれていた. すなわち高温に加熱し氷室に長時間保存すれば抗原物質の浸出率を高めることは明らかであり, 100°C, 1 時間加熱後氷室 7 日保存浸出の P (とくに P<sub>m</sub> と記載する) は 10 倍稀釈 OT に比して遜色のない抗原性を有することは注目し得るものである.

こゝで 2 気圧 120°C, 30 分加熱後 7 日間氷室保存浸出により得た P を P<sub>m</sub> とその感作能を比

較したが, ほとんど差がなく前者がやゝ強いかと思われる程度であつた. (表略)

2) 浸出時の pH の影響: 次に蒸留水の pH を 5.0, 7.0 および 9.0 とし, それぞれ P<sub>m</sub> を作製しその pH を 7.0 に補正して実験に供した. その結果は表 3 のごとく pH 5.0-9.0 の間で浸出された蒸留水 P の抗原性はほとんど同程度であつた.

3) 浸出に用いる菌の生死の影響: 生菌および加熱死菌よりそれぞれ P<sub>m</sub> のほか, 37°C, 48 時間浸漬し, 次いで氷室に 7 日間保存した後 P を作製しそれらの抗原性を検討した. 表 4 に示すごとく, 生菌および死菌の 37°C, 48 時間 P の抗原性はともにきわめて低く, 一方 P<sub>m</sub> の抗原性は高く, 特に死菌 P<sub>m</sub> では生菌 P<sub>m</sub> より抗原性が高かつた.

4) 菌体脱脂処理の影響: 結核菌が多量の類脂体を含有するため, 菌体成分の分離に際して類脂体の除去が種々検討されており, 蔵<sup>11)</sup>は菌体蛋白の抽出におよぼす脱脂処理の影響に言及し, 脱脂菌を用いる方が効率的であることを認めている. そこで脱脂菌体の浸出液の抗原性を検討するため, 青山 B 株熱殺乾燥菌体にアルコール・エーテル等容液を加え室温にて 48 時間作用せしめ, 別後乾燥した菌体より P<sub>m</sub> を作つて非脱脂菌体よりの P<sub>m</sub> と比較した. 表 5 に示すごとく脱脂菌 P<sub>m</sub> は非常に高い抗原性を示

\*37°C P: 37°C に 1 時間加熱氷室に保存してから作製した P の意味, 60°C P, 100°C P もこれに準ずる.

した。すなわち P についても抗原物質は菌体の脱脂処理によつて分離されやすくなることは明らかである。

5) 菌体の浸出回数の影響：同一の菌体を繰り返し返して浸出し、最初の Pm とその後の Pm の間の抗原性を検討したのが表 6 である。すなわち 2, 3 回と浸出回数を重ねるごとに Pm の抗原性は急速に減弱したが、4 回および 5 回目の Pm では差がなく、なおわずかながら抗原性の存在が認められた。

6) 浸出に用いる溶媒の影響：蒸留水、生理食塩水および 0.01 M クエン酸ソーダ液を溶媒としてそれぞれ Pm を作った。0.01 M クエン酸ソーダは西田<sup>12)</sup>の報告にもとづきこゝに用いたものである。これら Pm の血球感作能、阻止能、沈降反応原性および皮膚反応惹起力について比較検討した結果は表 7 に示す通りであつて、蒸留水 P および生理食塩水 P は血球感作能、阻止能および沈降抗原性においてほぼ等しい力価を有し、クエン酸ソーダ液 P はやゝ劣るが、これに反して皮膚反応惹起能ではクエン酸ソーダ液 P は他の二者よりも強いという興味ある知見を得た。すなわち菌体中の皮膚反応抗原の抽出には 0.01 M クエン酸ソーダ液を、血球感作原および沈降抗原の抽出には蒸留水あるいは生理食塩水を用いることが適当であつて、この事実は血球感作能因子と皮膚反応惹起因子とが異つたものであることを示しているものと思われる。

### 総括ならびに結論

H1 型結核菌青山 B 株を用いて、最もすぐれた抗原性を有する浸出液を得るための浸出条件を追求した。

A) まず菌の蒸留水浮遊液を 3 分し、それぞれ 37°C、60°C および 100°C に 60 分加熱した後各組を更に 2 分し一方は氷室に 3 日、他方は 7 日間保存してから上清（浸出液）を分離して検討したところ、37°C、60°C および 100°C、60 分加熱ではその順に、氷室保存日数 3 日と 7 日

B) 浸出液中の感作血球凝集反応活性因子に関する吟味

中島<sup>13)</sup>はさきに OT で血球を感作し、血球凝集反応および血球感作後の OT で皮膚反応を行い OT 中に皮膚反応原と血球感作原の両因子の存在を認めたが、私の実験でもクエン酸ソーダ液を溶媒とすると蒸留水または生理食塩水を溶媒とする場合に比し、皮膚反応原性が強く血球感作原性の弱い Pm が得られ、Pm 中の皮膚反応原と血球感作原は別個の因子であろうと推定した。そこで更に蒸留水 Pm を用いウサギ赤血球を 37°C の湯槽中で 2 時間感作し、遠心後の上清に更に新しい血球を加えて 2 時間感作し、更にその上清で血球を感作するという操作を繰り返し、各回の感作血球の凝集反応およびそれらの上清による皮膚反応を検した。その成績は表 8 に示す通りである。すなわち血球感作の回数を重ねるごとに Pm の血球感作能は低下し、数回の感作の繰り返しにより消失するが、これに反して Pm の沈降反応および皮膚反応惹起因子の力価には血球凝集反応活性因子の減少にもかかわらず変動が見られなかつた。すなわち P についても OT におけると同じく、血球に吸着せられて反応を起す因子は皮内反応を惹起せしめる因子とは異なるものと考えられる。ちなみに還元糖および N<sub>2</sub> 量は吸収によりともに減少するが、化学的定量によつては抗原性を鑑別することは出来ない。

では後者がすぐれた浸出効率を示した。そこで菌蒸留水浮遊液を 100°C、60 分加熱後氷室に 7 日保存して浸出液を作製する場合について更に詳細な検討を加えた。その結果

- 1) pH 5.0—9.0 の間では浸出効果に差はなかつた。
- 2) 生菌に比し熱殺菌体よりの浸出効率は大きく、死菌では非脱脂菌体に比して脱脂菌体よりの浸出効率が大きくある。

3) 同一の菌体から連続して浸出液を作製すると、浸出回数が増加とともに浸出液の血球感作能は低下する。

4) 浸出液中の皮膚反応惹起因子および沈降反応抗原はほとんど血球には吸着されない。

B) 蒸留水、生理食塩水および0.01 M クエン酸ソーダ菌浮遊液を100°C、60分加熱後氷室に7日保存後作製したそれぞれの浸出液につ

いてみるに、蒸留水および生理食塩水浸出液は血球感作能ならびに沈降反応原性に富み、クエン酸ソーダ浸出液は皮膚反応原性にすぐれている。

C) 血球感作を繰り返すと浸出液の血球感作能は漸次低下しついに消失するが、皮膚反応原性には変化が認められなかつた。

## 文

- 1) Mayer, M. : Biochem. Zschr., **22**, 225, 1921. 2) Ficker, M. : Handbuch d. path. Micro., **2**, 1, 1929. 3) 草場幹人 : レプラ, **9**, 779, 1938. 4) 東風睦之 : 医学と生物学, **9**, 204, 1946. 5) Middlebrook, G. & Dubos, J. : J. Exp. Med., **88**, 521, 1948. 6) Scott, N. & Smith, D. : Am. Rev. Tbc., **62**, 121, 1950. 7) 中島 滋 : 金大結研年報,

## 献

- 13** (上), 99, 1955. 8) Thurston, J. et al. : Am. Rev. Tbc., **73**, 571, 1955. 9) 善田輝美 : 金大結研年報, **15** (下), 193, 1957. 10) Saito, T. et al. : Jap. J. Tbc., **3**, 75, 1955. 11) 藏 尚之 : 金大結研年報, **8** (上), 113, 1949. 12) 西田昭治 : 金大結研年報, **16** (中), 203, 1958. 13) 中島 滋 : 金大結研年報, **10** (下), 312, 1952.

第 1 表 浸出条件の異なる浸出液の化学的性状の比較

浸出の条件		浸出温度 (各 1 時間)	37°C	60°C	100°C	37°C	60°C	100°C
		氷室内浸出時間	3 日			7 日		
蛋白質 反応	Biuret' reaction	—	±	±	±	±	±	±
	Xanthoprotein reaction	±	±	±	±	+	+	
	Sulfosalicylic acid reaction	±	±	+	±	±	+	
	Millon reaction	—	±	±	—	±	±	
	Picric acid reaction	—	—	±	—	—	±	
	Ninhydrin reaction	—	—	—	—	—	—	
	N <sub>2</sub> 量 mg/dl	8	14	22	9	20	23	
糖 反応	Molisch' reaction	±	+	+	+	++	++	
	Seliwanoff' reaction	±	±	±	±	±	±	
	Phlologlucinol reaction	+	+	+	+	+	+	
	Trommer' reaction	—	±	±	±	±	±	
	還元糖量 mg/dl	33	36	75	34	44	81	

第 2 表 浸出温度および浸出時間の異なる浸出液の抗原性の比較

浸出条件		反 応		血 球 凝 集 反 応									血 球 凝 集 反 応 阻 止 試 験										沈降反応 抗原価	皮 膚 反 応 (mm)		
				血 清 稀 積									抗 原 稀 積*											免 疫 ウ サ ギ		無処置 ウサギ
				16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		No. 10	No. 14	
加熱浸出の条件	氷室内 浸出時間	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:2	8×9	7×7	2×2			
37°C, 1時間	3 日	1	1	1'	0	0	0	0	0	2'	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1:4	14×15	16×17	3×3			
60°C, 1時間		3'	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	0	1'	2'	2	2'	2	2	1:4	18×20	15×15	3×3				
100°C, 1時間		3'	2	2	1	1	1'	0	0	0	0	0	1'	2	2	2	2	2	1:8	19×20	15×15	3×3				
37°C, 1時間	7 日	3'	2'	1	1'	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2	2	2	2	1:4	18×20	17×15	3×3				
60°C, 1時間		3'	3'	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	1	2	2	2	2	1:8	20×20	19×20	5×5					
100°C, 1時間		3	3	3'	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	1'	2'	2	2'	2	1:16	19×22	15×16	6×6				
OT (対照)		3	3	3	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2'	2	1:16	19×22	15×16	6×6		

\* OT は 1 : 10 稀釈液より稀釈した。

第 3 表 浸出時 pH の異なる浸出液の抗原性の比較

溶媒の pH		反 応		血 球 凝 集 反 応									血 球 凝 集 反 応 阻 止 試 験										沈降反応 抗原価	皮 膚 反 応 (mm)		
				血 清 稀 積									抗 原 稀 積*											免 疫 ウ サ ギ		無処置 ウサギ
				8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4	8	16	32	64	125	256	512	No. 10	No. 14				
5.0	2	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	1	2'	2	3'	3'	1:4	19×19	15×18	0					
7.0	3	3	2	2'	2'	1	1	1'	0	0	0	0	1'	1	2'	2'	3'	1:8	18×19	17×18	0					
9.0	3	3'	2'	2'	2'	1	1	1'	0	0	0	1'	1	2'	2	2	3'	1:8	20×20	16×17	0					
OT (対照)		3	3	3	3'	2	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	1'	1	2'	1:16	20×20	16×17	2×2				

\* OT は 1 : 40 稀釈液より稀釈した。

第4表 生菌および死菌よりの浸出液の抗原性の比較

浸出液			血球凝集反応									沈降反応 抗原価	皮膚反応 (mm)			
浸出に用いた菌の死	加熱浸出の条件	氷室内浸出の条件	抗血清の稀釈										免疫ウサギ		無処置ウサギ	
			4	8	16	32	64	128	256	512	1,024		2,048	No. 11		No. 15
生菌	37°C, 48時間	7日	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	1:4	7×7	8×9	0
死菌	37°C, 48時間		1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	1:4	6×6	8×8	0
生菌	100°C, 1時間		3	3	3'	2	1	1'	0	0	0	0	1:8	13×16	17×18	2×3
死菌	100°C, 1時間		3	3	3'	2	2	2'	1	1'	0	0	1:8	16×17	18×20	3×3
OT (対照)			3	3	3	3	3'	2	2'	1	1'	0	1:16	16×15	20×21	3×3

第5表 非脱脂菌体および脱脂菌体よりの浸出液の抗原性の比較

反応 浸出に用いた菌体	血球凝集反応									血球凝集反応阻止試験							沈降反応 抗原価	皮膚反応 (mm)			
	血清稀釈									抗原稀釈*								免疫ウサギ		無処置ウサギ	
	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	2	4	8	16	32	64	128		256	No. 15		No. 23
非脱脂菌体	2	2	2	2	2'	1'	0	0	0	0	1'	1	2'	2	2	2	2	1:4	16×20	16×17	2×2
脱脂菌体	3	3	3	3'	2	2	1	1'	0	0	0	0	0	0	1'	2	2	1:16	23×23	24×26	3×4
OT (対照)	3	3	3	3'	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	1	1	2'	2	1:16	15×17	16×17	3×3

\* OT は 1:20 稀釈液より稀釈した。

第6表 同一菌体よりの浸出回数異なる浸出液の抗原性の比較

反応 浸出回数	血球凝集反応										血球凝集反応阻止試験						沈降反応 抗原価	皮膚反応 (mm)				
	血清稀釈										抗原稀釈*							免疫ウサギ		無処置ウサギ		
	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	2	4	8	16	32	64		128	256		No. 10	No. 14
1回目	3	3	3	3	3'	2	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	1'	1	2	1:16	20×20	15×15	3×3
2 " "	3	3'	2	2'	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	1'	1	2'	2'	2	1:16	13×14	11×11	2×3
3 " "	2	2	1	1	1	1'	0	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2	2'	1:8	10×12	7×7	0
4 " "	2'	1	1	1	1'	0	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2	2'	2	1:4	12×12	7×7	0
5 " "	2'	1	1	1	1'	0	0	0	0	0	1'	1	1	2'	2'	2	2'	2	1:4	12×12	7×7	2×2
OT (対照)	3	3	3	3	3'	2	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	1'	1	2'	1:16	20×21	15×16	2×4

\* OT は 1:20 稀釈液より稀釈した.

第7表 溶媒を異にする浸出液の抗原性の比較

反応 浸出に用いた溶媒	血球凝集反応										血球凝集反応阻止試験						沈降反応 抗原価	皮膚反応 (mm)		
	血清稀釈										抗原稀釈*							免疫ウサギ		無処置ウサギ
	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	4	8	16	32	64	128	256		No. 10	No. 14	
蒸留水	3	3	3'	2	1	1	1'	0	0	0	1'	2'	2'	2	2	2	1:8	20×21	16×20	2×3
生理食塩水	3	3	3	2	1	1	1'	0	0	0	1'	1	2'	2'	2	2	1:8	18×20	18×18	3×3
クエン酸ソーダ液	3	3'	2	2'	1	1'	0	0	0	0	1'	2	2	2	3'	2	1:4	21×24	23×25	3×3
OT (対照)	3	3	3'	2	2	2'	2'	1	1'	0	0	0	1'	1	2	2	1:16	20×21	19×21	3×4

\* OT は 1:20 稀釈液より稀釈した.



第8表 ウサギ血球による吸着の浸出液の抗原性に及ぼす影響

ウサギ血球 による吸着回数	血球凝集反応							沈降反応						皮膚反応 (mm)			化学的定量	
	血清稀釈							抗原稀釈						免疫ウサギ		無処置ウサギ	還元糖量 mg/dl	N <sub>2</sub> mg/dl
	16	32	64	128	256	512	1,024	4	8	16	32	64	128	No. 15	No. 23			
	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:1,024	1:	1:	1:	1:	1:	1:					
0	3	3	3	3,	3'	1	0	##	##	##	+	±	-	18×19	20×22	2×3	64	218
1	3	3	3'	2'	1'	0	0	##	##	##	+	±	-	20×20	17×19	3×3	44	189
2	2	2'	1'	0	0	0	0	##	##	##	+	±	-	18×20	18×18	0	36	164
3	1	1'	0	0	0	0	0	##	##	##	+	±	-	20×20	18×19	3×4	34	162
4	1'	0	0	0	0	0	0	##	##	##	+	±	-	20×20	17×18	3×3	34	150