

結核免疫に関する研究

第 16 報

結核菌菌体蠟質の免疫学的性状に関する研究

第 1 編

結核菌菌体蠟質の毒性及び反応原性に就いて*

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

宮 森 正 孝

（受付：昭和32年11月25日）

緒 言

結核菌菌体成分の研究は、結核症の本態——免疫及びアレルギーを含めて——を解析する手段として欠くべからざるものである。

しかして菌体成分の研究を系統的に体系づけたのは Anderson^{1)~5)}であり、彼の抽出した燐脂質を以て実験的に結核結節の形成を証明したのは Sabin^{6) 7)}である。その後多くの研究者により、この方面の研究は目覚しく進展したがそのうちの生物学的研究に関する主なものを挙げれば Bloch^{8)~12)}による cord-factor, 山村¹³⁾, 中村¹⁴⁾らによる実験的結核性空洞の形成, Raffel¹⁵⁾による精製蠟, Choucroun¹⁶⁾による Pmko の研究などである。

当教室に於ても先に蔵¹⁷⁾, 秋山¹⁸⁾, 杉林¹⁹⁾らによつて結核菌, 腸チフス菌, 並びにパラチフス B 菌菌体諸成分の免疫学的意義について一連の研究が施行された。私もこれらの研究の一環として、結核菌の複雑な菌体諸成分中特に特徴のある菌体脂質に注目し, Sauton 培地 12 週培養人型結核菌 H₂ 株の熱殺死菌より脂質分画を Anderson^{1) 2)}の方法で抽出し, そのうちの蠟脂質（以下 Wax と略記す）の免疫学的意義の解明を試みた。本編においては先ずその化学的性状, 毒性並びに反応原性の検討を行つたのでここに報告する。

実 験 成 績

I) 抽出法

Sauton 培地 12 週間培養人型結核菌 H₂ 株の熱殺死菌より第 1 表の如く Anderson^{1) 2)}の方法に従つて脂質分画を抽出し, その内の Wax を実験に供した。

II) 化学的性状

化学的性状は第 2 表に示した。すなわち P 及

び N の含有量はそれぞれ 0.1% 以下及び 0.4%, 融点は 120°~123°C で Anderson²⁾ の人型菌 (H-37) 6 週培養生菌より抽出した Wax の融点 (200~250°C) より低く Noll u. Bloch¹¹⁾ が 12 週間培養加熱死菌より抽出した精製蠟 D (Wax D) の融点 130°~140°C に近似し, 且, 水, 0.1 N-HCl 及び 0.1 N-NaOH に不溶で, 熱

* 本論文の要旨は昭和31年11月4日日本細菌学会北陸地方会で発表した。

アルコール(60°C前後)に対しては大部分が可溶性であつた。

III) 毒性試験(第3表)

実験方法

1mg, 2mg 及び 4mg の Wax を生理的食塩水 0.4ml, 0.7ml 及び 1.4ml でそれぞれ懸濁液とし, 各 2 匹宛のマウス(体重 15~20mg) の腹腔内に注射後, 3~4 日毎に体重を測定し, 12 日目に撲殺して肺, 肝, 腎, 脾を肉眼的に観察した。

実験成績

第 3 表に見る如く Wax 1 mg を注射した No. 1 は体重減少し, 肺, 肝, 脾, 腎に所見なく, Wax 4 mg を注射した No. 5, No. 6 では脾やや肥大し, 肝に粟粒大或は麻の実大の結節及び斑点を認めたが体重は増加している。No. 4 のマウスは経過中肺炎を併発して斃死した。

以上の成績から, Wax は健常マウスに対し著明な毒性を有するとは考えられなかつた。

IV) 反応原性試験(第4, 5表)

Wax の反応原抗原の製法:

原液: 60°C 前後に加温せる 0.1% コレステリン・アルコール 1 ml に対し Wax 2 mg を溶解したものを原液として保存した。

沈降反応原: 上記原液 1 容量に生理的食塩水 15 容量を急速に混合し 30 分後より使用した。

補体結合反応原: ワツセルマン反応抗原の製法に従いウサギ心臓筋肉 1 gm に対し 10 ml の割に 96% アルコールを加え室温にて 7 日間抽出した液を生理的食塩水にて 14 倍に稀釈し, この稀釈されたウサギ心臓アルコール抽出液で上記原液を 8 倍に稀釈したものを補体結合反応原とした。

使用に際しては毎度適正使用量を決定して実

験に供した。

反応術式

- (1) 沈降反応: 型の如く重層法により室温に 2 時間放置後成績を判定した。
- (2) 補体結合反応: 被検血清を非働化し, 上記 Wax 抗原を使用し, 柿下²⁰⁾ が報告したウサギ梅毒血清反応の術式によつた。

なお Wax による沈降反応及び補体結合反応を下記諸反応と比較検討した。

- (3) OT 感作血球凝集反応: 人型結核菌 H₂ の Sauton 培地 10 週培養濾液より型の如く作製した旧ツベルクリンを健常人 O 型血球に感作し山下²¹⁾, 中島²²⁾ の方法により実施した。
- (4) 東風沈降反応: 東風²³⁾ の報告に従い反応実施後室温に 15 分間静置して成績を判定した。
- (5) ワツセルマン氏反応, 村田氏反応, チトコール反応: 抗原は当教室保存のものを使用し, 型の如く行つた。²⁴⁾

実験成績

肺結核患者血清に対する反応原性試験: 第 4 表の如く東風沈降反応の比較的強い血清の一部と Wax の間で沈降反応弱陽性を示し, 臨床症状並びに OT 感作血球凝集反応とは平行関係は認めなかつた。

ワツセルマン反応陽性血清に対する Wax の反応原性試験: 第 5 表は他に合併症なき梅毒患者 24 名について行つた梅毒血清反応と Wax を抗原とした補体結合反応及び沈降反応の比較成績である。Wax を抗原とした補体結合反応は 14 名中 1 名においてのみ血清稀釈 5 倍にて陽性を示し, Wax を抗原とした沈降反応は梅毒諸反応強陽性例でも陰性を示し, 村田氏反応弱陽性者の一部に本反応弱陽性を認め, 梅毒諸反応とは平行しなかつた。

総括並びに考按

1953 年 Noll u. Bloch¹¹⁾ は 2 乃至 12 週培養の人型菌 H₃₇Rv 加熱死菌よりクロロホルム可溶

性 Wax を抽出し, 次で熱アセトンにて 2 分し, 熱アセトン可溶性部分を Wax C, 不溶性

部分を Wax D と名づけ、Wax C は有毒性、Wax D は無毒性であると報告し、同年 Asslineau, Bloch, and Lederer¹²⁾ も 4 乃至 6 週培養の *H₃₇Rv* 生菌から Wax C 及び Wax D を抽出し、Wax D 必ずしも無毒性でないこと及び 2 週間培養の BCG 生菌からの Wax C 及び Wax D もまた有毒性なることを報告している。しかして私の抽出した Wax について行つた毒性試験の結果 No. 5, No. 6 のマウスで肝脾に変化を認めたが、いずれも体重は増加し、著名な毒性があるとは考えられなかつた。

私の抽出した Wax は 2 乃至 6 週の比較的短い培養日数の菌から得たものでなく 12 週間培養の *H₂* 株加熱死菌より抽出したもので融点が 120~123°C であることから考えて Noll u. Bloch¹¹⁾ の Wax D に近似し、毒性があると

してもきわめて弱いものと推定される。

またその結核患者血清に対する反応原性を観察するに、東風沈降反応強陽性の患者血清の一部に弱い沈降反応原性を示すのみであり、しかも之は東風抗原が菌体のアルコール抽出液で、Wax は菌体から第 1 表の如くアルコール・エーテルにて抽出後、更にクロロホルムで抽出したもので、従つて Wax 中にアルコール・エーテル可溶性成分の少量が残存せる結果ではないかと思われる。

先に秋山¹⁸⁾ は臓器アルコール・エキスと結核菌菌体燐脂質とは免疫学上互に共通するものがあると報告しているが、梅毒患者血清に対する Wax の反応原性の成績を観察するに Wax もまた村田氏反応の抗原とわずかに共通性を有するが反応原性ははるかに弱いように考えられる。

結 論

私は Anderson¹⁾²⁾ の方法に従つて Sauton 培地 12 週間培養人型結核菌 *H₂* 株の熱殺死菌体より精製 Wax すなわち融点 120~123°C, N 含有量 0.4%, P 含有量 0.1% 以下の標品を抽出し毒性並びに結核患者及び梅毒患者血清について反応原性の検討を行い次の如き結論を得た。

1) Wax はマウスに対し著明な毒性は無かつた。

2) 肺結核患者及び梅毒患者血清に対する Wax の補体結合反応原性並びに沈降反応原性はきわめて弱かつた。

文 献

- 1) Anderson, R. J. : J. Biol. Chem., **83**, 505, 1929.
- 2) Anderson, R. J. : Physiol. Rev., **12**, 166, 1932.
- 3) Anderson, R. J. and Newman, M. S. : J. Biol. Chem., **101**, 499, 1933.
- 4) Anderson, R. J. : J. Biol. Chem., **121**, 649, 1937.
- 5) Anderson, R. J. : J. Biol. Chem., **125**, 299, 1938.
- 6) Sabin, F. R. : J. Exp. Med., **56**, 867, 1932.
- 7) Sabin, F. R. : Physiol. Rev., **12**, 141, 1932.
- 8) Bloch, H. : J. Exp. Med., **91**, 197, 1950.
- 9) Bloch, H. : J. Exp. Med., **92**, 507, 1950.
- 10) Bloch, H. : Am. Rev. Tub., **61**, 270, 1950.
- 11) Noll, H. and Bloch, H. : Am. Rev.

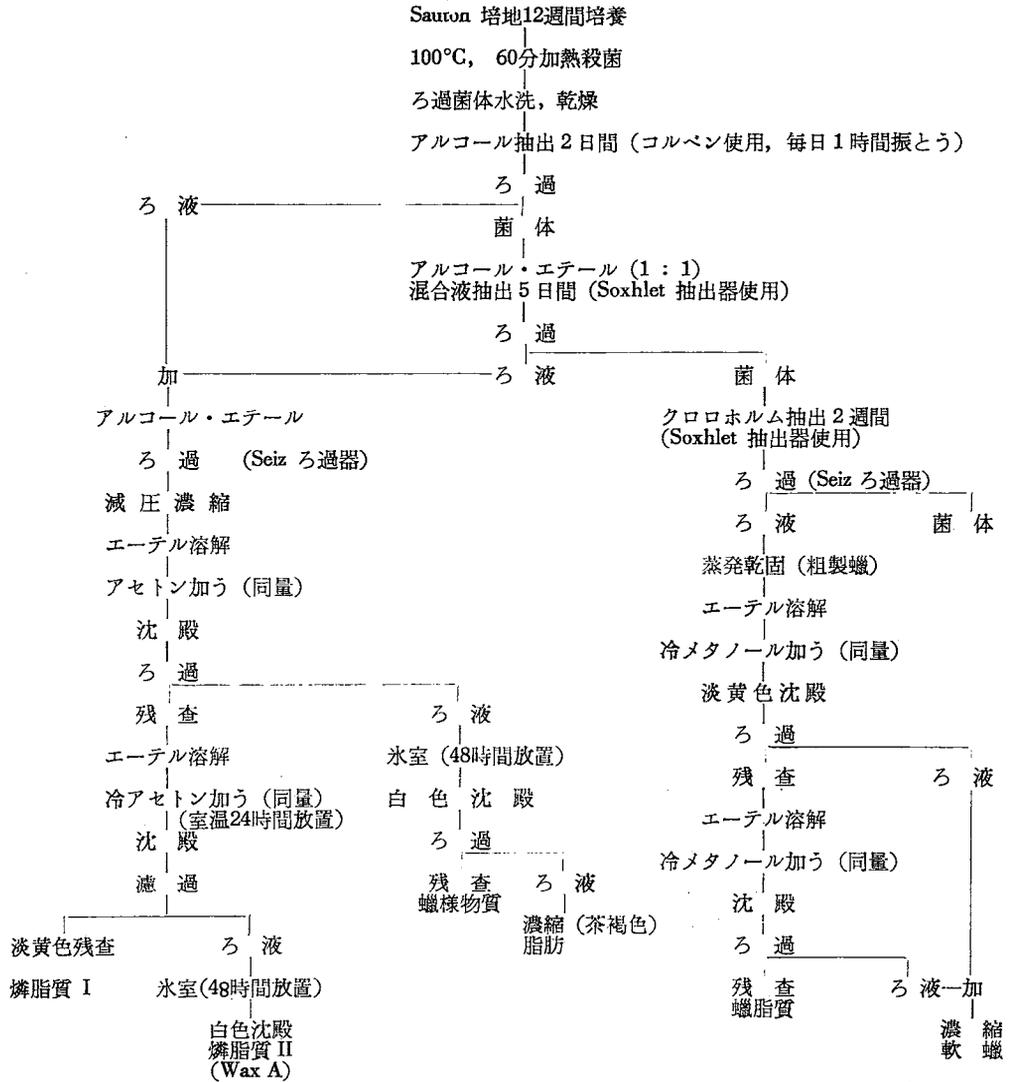
- Tub., **67**, 828, 1953.
- 12) Asselineau, J., Bloch, H. and Lederer, E. : Am. Rev. Tub., **67**, 853, 1953.
- 13) 山村雄一, 他 : 結核, **29** (4), 43, 1954 **29** (9), 361, 1954.
- 14) 中村 滋, 他 : 結核, **29**(6), 205, 1954.
- 15) Raffel, S. : Am. Rev. Tub., **54**, 564, 1946.
- 16) Choucroun, N. : Am. Rev. Tub., **56**, 203, 1947.
- 17) 藤 尚之 : 金大結研年報, **9**(上), 86, 1950.
- 18) 秋山舜一 : 金大結研年報, **10**(下), 147, 1952.
- 19) 杉林篤之 : 金大結研年報, **11**(下), 211, 1953.
- 20) 柿下正道 : 十全会雑誌, **35**, 690, 1930.
- 21) 山下文雄 : 金大結研年報, **12**(上), 153, 1954.
- 22) 中島滋 :

金大結研年報, 13(上), 99, 1955
之: 医学と生物学, 9, 204, 1946.

23) 東風睦
24) 松田

知夫, 他: 金大結研年報, 10(上), 146, 1951

第 1 表 結核菌体脂質抽出法



第 2 表 使用せる Wax の性状

融 点	N %	P %
120°~123°C	0.4	0.1>

各種溶媒に対する性状

水	0.1N-HCl	0.1N-NaOH	エーテル	クロロホルム
不 溶	不 溶	不 溶	可 溶	易 溶

メタノール	アセトン	熱アセトン	アルコール	熱アルコール
不 溶	不 溶	一部分可溶	不 溶	大部分可溶

註：Nはアツオトメトリーにて、P は光電比色計にて測定す。

第 3 表 マウスに対する Wax の毒性試験

動物 No.	生理的 食塩水	体重経過 Wax	11/XII	14/XII	15/XII	18/XII	22/XII	体重増減	剖 検 所 見
1	0.4ml	1mg	18.0	15.4		15.9	15.4	-2.6	肺肝脾腎所見なし
2			15.1	15.0		16.4	16.4	+1.3	同 上
3	0.7ml	2mg	15.4	15.1		15.5	15.2	-0.2	同 上
4			15.6	13.4	斃 死				右肺炎、腸炎、 肝粟粒大黄色斑点2ヶ、 脾腎所見なし、
5	1.4ml	4mg	15.6	16.5		18.5	17.2	+1.6	肝黄色粟粒大結節1ヶ、 脾稍々肥大、 肺腎所見なし、
6			17.0	16.4	18.7	18.1	18.1	+1.1	肝黄色麻の実大斑点2ヶ 脾稍々肥大、 肺腎所見なし、

第 4 表 肺結核患者における症状と血清反応との比較

氏名	性	年令	病* 期	咯 痰	ガ フ キ ー 号	血(平 均 値 沈)	感 作 血 球	凝 集 反 応	東 風 沈 降 反 応	補 体 結 合 反 応*	沈 降 反 応*
小八田	○	35	III	IV		50	1:64	+++	-	-	+
野	○	15	I	-		5	1:64	++	-	-	-
浅	○	25	I	-		2	1:2	++	-	-	-
樋	○	34	III	V		15	1:16	+	-	-	-
中	○	51	III	-		19	1:64	+++	-	-	-
武	○	53	II	-		110	1:8	+++	-	-	+
本	○	25	I	-		2	1:16	-	-	-	-
森	○	26	II	-		18	1:128	+++	-	-	++
田	○	37	III	II		40	1:4	++	-	-	±
下	○	45	II	-		61	1:16	+	1:20	-	-
中	○	25	I	-		4	1:32	-	-	-	-
林	○	35	II	IV		25	1:8	++	-	-	-
井	○	37	I	-		23	1:8	+	-	-	-
中	○	65	II	-		52	1:4	+	-	-	-
今	○	54	III	II		64	1:8	++	-	-	+
廣	○	30	II	-		4	1:64	+	-	-	-
	○	21	II	-		6	1:8	+	-	-	-
	○	26	I	-		7	1:16	-	-	-	-

* 抗原にWaxを使用す.

** 病期は Turban-Gerhardt の分類による.

第 5 表 梅毒血清反応と Wax を抗原とせる反応

補体結合反応 (14名)

氏名	ワ氏反応	Wax抗原
上川	○ 冊	-
岡	○ 冊	-
小	○ 冊	-
中	○ 冊	-
前	○ 冊	-
井	○ 冊	-
中	○ 冊	-
和	○ 冊	-
奥	○ 冊	-
横	○ 冊	-
福	○ 冊	-
岩	○ 冊	1:5

沈降反応 (10名)

氏名	ワ氏反 応	村 反 応	田 反 応	チ ト コ ー ル 反 応	Wax 抗 原
山	○ 冊	+	+	++	+
白	○ 冊	+	+	++	+
阿	○ 冊	冊	冊	冊	-
小	○ 冊	冊	+	++	-
武	○ 冊	冊	冊	++	±
坂	○ 冊	冊	+	++	±
中	○ 冊	冊	+	++	-
渡	○ 冊	冊	冊	+	-
川	○ 冊	冊	冊	++	-
南	○ 冊	冊	冊	++	±