

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 2 編

抗体産生能及びツベルクリン・アレルギー賦与能について* (ウサギを用いての実験)

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33年1月6日)

緒 言

結核菌菌体脂質の抗体産生能に関しては既に多くの先人によつて認められて居る。当教室においても先に秋山¹⁾が Anderson²⁾ による諸分画の内、特に磷脂質に抗体産生能のある事を報告した。又一方武田³⁾は蠟 (Wax D) にも抗原性が存在し、且つこの Wax D を水解して得られる多糖体には明かな血球感作能の存するこ

とを確認している。

私は Wax の抗体産生能及びツベルクリン・アレルギー (以下「ツ・ア」と略記す) 賦与能を Wax 単独の場合と Schleppey を用いた場合に就いても検討を加えると共に菌体のその他のフラクションの抗体産生能及び「ツ・ア」賦与能との比較を行つたので報告する。

実 験 方 法

1) 免疫原及び反応原の製法：

- a) Wax : Wax 抗原の製法は前編⁴⁾に報告した。
- b) 菌体蛋白 (PF), 菌体蛋白 I (PF_I), 菌体多糖体 (CF), 菌体多糖体 I (CF_I) 菌体多糖体 II (CF_{II}), の抽出法びに性状：

PF 並びに CF は夫々蔵⁵⁾, 秋山⁶⁾の方法に準じて抽出し、得られた PF, CF は更に浅見等⁷⁾の方法によつて夫々三塩化錯酸沈殿法及びアルコール沈殿法により PF_I, PF_{II}及び CF_I, CF_{II}に分画した。それ等の各々 10mg をとり PF, PF_I は 0.1N-NaOH 1ml に, CF, CF_I, CF_{II} は蒸溜水 1ml に溶解して定性反応を行つた。

第 1 表はその成績である。

- c) 旧ツベルクリン (OT) : 人型結核菌 H₂ 株を Sauton 培地に 10 週培養し、培養ろ液より型の如く作製した。

- 2) 実験動物：体重 2,000~2,500gm の雄性健康ウサギで 10 倍 OT 0.1ml による皮内反応陰性のもの 10 頭を使用した。

- 3) 免疫方法：10 頭のウサギを 5 群に分ち、各群に夫々 Wax (40mg), PF (30mg), Wax (40mg) + PF (30mg), Wax (40mg) + ブタ血清 (以下 PS と略記す) (1ml) を 2ml の流パラに浮遊したものを 1 週間隔で 2 回腎筋内に注射した。対照群には H₂ 株加熱死菌 40mg を前記同様 2ml の流パラに浮遊し同様の方法で注射した。

* 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。

4) 反応術式

- a) OT 感作血球凝集反応, 東風沈降反応, Wax を抗原とした補体結合反応並びに沈降反応等の術式は前編⁷⁾記載の通りである。
- b) CF, CF_I 及び CF_{II} 感作血球凝集反応: CF, CF_I 及び CF_{II} の各々 2mg を生理的食塩水 1ml に溶解し, pH7.0に修正した後, 型の如く健常ウサギ血球を感作して用いた。
- c) PF_I 感作タンニン酸処理血球凝集反応: PF_I 2mg を 0.1N-NaOH 1ml に溶解し, pH7.0に修正した後, タンニン酸処理血球遠心沈渣 0.05ml (Boyden⁸⁾法に準じた) を加え型の如く感作して用いた。

d) 結核菌に対する喰菌現象: 結核菌浮遊液の製法, 反応術式及び成績の判定法は大山⁹⁾の方法に従った。

e) 吸収試験

- i) OT 或は CF によるそれぞれの感作血球遠心洗浄沈渣 2ml ii) 菌体及び脱脂菌体(乾燥菌体) 2mg をそれぞれ1mlの抗血清に加え, 37°C に2時間放置する。この操作を2回繰り返して吸収の完全を計りそれぞれ OT 感作血球吸収血清, CF 感作血球吸収血清, 菌体吸収血清及び脱脂菌体吸収血清として反応に供した。
- f) ツベルクリン反応: 10倍 OT 0.1ml を皮内に注射し48時間後の発赤及び硬結を観察した。

実験成績

1) OT 感作血球凝集反応(第1図)

PF 注射群ではほとんど抗体産生が認められなかつたが Wax, Wax+PF, Wax+PS 及び死菌注射群ではいずれも5~6週にて抗体価最高となり, Wax群は最高123倍, Wax+PF群では最高64倍, Wax+PS 及び死菌群では最高1,024倍を示した。すなわち, Wax とブタ血清を混合して注射することにより Wax 単独注射時よりも強く OT 感作血球凝集素の産生する事を認めた。

2) PF, Wax+PF 及び Wax+PS 群における PF_I 感作タンニン酸処理血球凝集反応(第2表)

本反応は PF, Wax+PF 及び Wax+PS 群において共に殆んど陰性で特に Wax+PS 群においても陰性成績を示した事はまことに興味ある所見である。

3) Wax を抗原とした補体結合反応(第2図)

PF 群では観察期間中陽性を示さず, 他の群では何れも5週にて最強となり, 死菌群では最高160倍陽性, Wax 群, Wax+PF 群, Wax+PS 群ではそれぞれ40倍陽性を示した。

4) Wax を抗原とした沈降反応(第3図)

PF 群ではほとんど陰性に終始し, Wax 群, Wax+PF 群, Wax+PS 群及び死菌群ではいずれも4~6週後最高の抗体価を示したが

Wax+PS 群及び Wax 群の最高抗体価はいずれも8倍で PS 混合による抗体価の上昇は認められなかつた。

5) 東風沈降反応(第4図)

Wax 群, Wax+PF 群及び Wax+PS 群の3群では前記の Wax を抗原とした沈降反応よりも一般に低い抗体価を示し, かつ PS 混合による抗体価の上昇は認められなかつた。

6) 結核菌に対する喰菌現象(第5図)

PF 群では4週まで軽度に低下しその後漸次回復し8週で軽度の上昇を示した。

死菌群では漸次上昇を示し6週にて一時復旧傾向を示したが8週目には再び上昇した。

Wax 群及び Wax+PF 群では6週迄上昇し8週には軽度の下降を認めた。Wax+PS 群のみ8週まで上昇し終始他群に比し高い喰菌能を示した。すなわち, ブタ血清を混合する事により白血球の喰菌力も他の免疫群に比し増強するものと考えられる。

7) Wax 免疫血清の吸収試験(第3表)

吸収前後における OT, CF, CF_I 及び CF_{II} 感作血球凝集反応を比較した。すなわち吸収前, OT 感作血球に対する凝集価は64倍, CF 及び CF_{II} 感作血球に対する凝集価は16倍, CF_I 感作血球に対する凝集価は2倍陽性であ

つたが菌体及び OT 感作血球による吸収血清ではいずれの感作血球を以つてする凝集反応も陰性となり、脱脂菌体による吸収では OT・CF_{II}感作血球凝集価は 2 倍に低下し、CF 感作血球による吸収血清では OT 感作血球凝集反応のみ軽度に残存し（凝集価 4 倍）CF、CF_I 及び CF_{II} 感作血球凝集反応は陰性となつた。

考 按

武田³⁾は菌体から抽出した Wax 中免疫原性を有するものは Wax D であり、此の Wax D を水解すると血球感作原性を有する多糖体が証明されると述べまた抗 Wax D 血清は OT 感作血球、多糖体感作血球と反応するが蛋白感作血球とは反応しないと報告している。前編⁴⁾にて報告した Noll u. Bloch¹⁰⁾の 12 週培養 Wax D に近似せる Wax を免疫原として行つた私の成績もまたほぼこれと一致した。たゞ武田³⁾の成績に比して一般に CF に対する抗体価が低かつたが、これは反応原として用いた CF が私の場合は菌体に、武田の場合はツベルクリンに由来した為かも知れない。

Robert 等¹¹⁾は 1955 年 egg-albumin に結核菌 Wax を混じて免疫すれば egg-albumin 単独免疫時よりも抗 egg-albumin 抗体の増産されることを報告しているが、私は PF 及び

8) ツベルクリン反応 (第 4 表)

死菌群及び Wax+PS 群では同程度の強い硬結発赤を伴つた「ツ」反応が惹起されたが Wax 群では硬結は伴なわなかつたが著明な発赤が認められた。Wax+PF 群の 1 頭が 2 乃至 4 週で陽性、6 週以後は陰性となり、他の 1 頭は終始陰性であつた。此の件に関しては現在尚検討中である。

PF+Wax 注射群について PF_I 感作タンニン酸処理血球凝集反応を行つたが、PF+Wax 群の一頭のみ抗体産生が認められたに過ぎなかつた。Wax の混合が PF に対する抗体産生を促進したと確言出来る所見は得られなかつた。

Wax の「ツ・ア」賦与能に関しては Myrvik 等¹²⁾は Wax は「ツ・ア」を賦与すると言ひ、柳沢¹³⁾は人型菌青山 B 死菌体より Anderson²⁾の方法で抽出せる Wax (蛋白反応陽性)は強い「ツ・ア」賦与能を有するが、H₃₇Rv 生菌体より Anderson 及び Schargaff¹⁴⁾法を併用して抽出した蛋白反応陰性の Wax には「ツ・ア」賦与能なく、蛋白は弱い「ツ・ア」賦与能を示すと報告した。私の場合も PF 注射群は Wax 群より Römer 反応弱く柳沢の成績に一致した。

結 論

ウサギを用ひ前編⁴⁾にて報告した Wax の抗体産生能及び「ツ・ア」賦与能の検討を行つた。重要な知見を摘記すると次の如くである。

1) Wax 単独注射によつて OT 感作血球及び CF 感作血球凝集反応、東風沈降反応、Wax を反応原とする沈降反応及び補体結合反応等に対する抗体産生が認められたが、PF_I 感作タンニン酸処理血球に対する抗体産生は認められなかつた。

2) Wax に Schleppey としてブタ血清を

混合して注射した場合は OT 感作血球凝集反応のみに対する抗体産生の著しい昂進が認められた。

3) Wax 注射により白血球の喰菌能は昂進したがブタ血清を Schleppey として混合して注射すると昂進は一層著明となつた。

4) PF 単独注射では OT 感作血球、東風沈降反応、Wax を抗原とした補体結合反応及び沈降反応に対する抗体の産生は認められなかつた。

5) Wax は著明な「ツ・ア」賦与能を有す

るが、PF のそれは弱かつた。

文 献

1) 秋山舜一：金大結研年報, 10(下), 147, 1952.
 2) Anderson, R. J. : J. Biol. Chem., 83, 505, 1929. 3) Takeda, Y. et al. : J. J. Tub., 2(4), 361, 1954; 16 (上), 11, 1958. 2 (2), 216, 1954. 4) 宮森正孝：金大結研年報, 5) 藏尚之：金大結研年報, 8(上), 113, 1949. 6) 秋山舜一：金大結研年報, 10 (上), 1, 1952. 7) 浅見 望, 他：日本細菌学雑誌, 9(4), 271, 1954. 8) Boyden, S. V. : J. Exp.Med., 93, 107, 1951. 9) 大山 馨：金

大結研年報, 8 (上), 121, 1949. 10) Noll, H. and Bloch, H. : Am. Rev. Tub., 67, 828, 1953. 11) Robert, G., Albert, H. and Jeanne, M. : J. Exp. Med., 102, 83, 1955. 12) Myrvik, Q. and Weisser, R. S. : J. Immunol, 68, 413, 1952. 13) 柳沢 謙：アレルギー-, 4(2), 73, 1955. 14) Schargaff, E. and Saidel, H. F. : J. Biol. Chem., 177, 417, 1949.

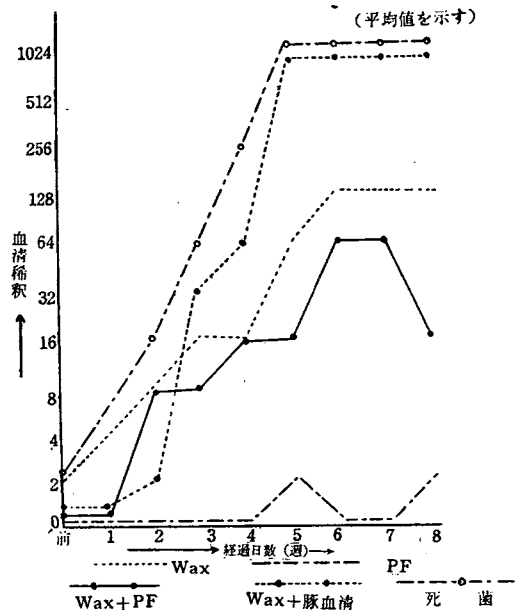
第 1 表

PF, PF_I, CF, CF_I, CF_{II}の定性反応

定性反応	PF	PF _I	CF	CF _I	CF _{II}
スルフォサリチル酸試験法	+++	+++	-	-	-
ビクリン酸試験法	+++	+++	.	.	.
ミロン氏反応	-	-	.	.	.
モーリツ反応	-	-	+++	+++	+++
トロンメル反応	.	.	+	+	+
フロログルシン反応	.	.	+	+	+++

第 1 図

各種免疫群における OT 感作血球凝集反応



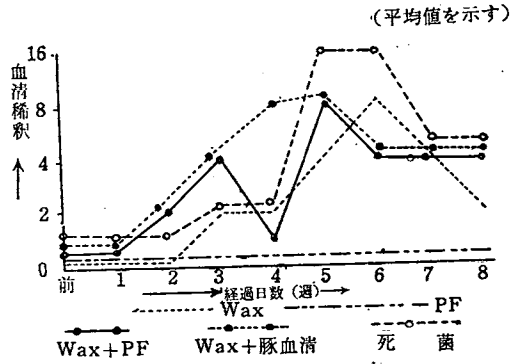
第 2 表

PF, Wax+PF 及び Wax+ プタ血清
免疫群における PF₁ 感作タンニン酸処
理血球凝集反応

免疫動物	No.	週	1	2	3	4	5	6
		前	週	週	週	週	週	週
P F	No. 3	0	0	0	0	0	0	0
	No. 4	0	0	0	0	0	0	0
Wax + PF	No. 5	0	0	0	0	0	0	0
	No. 6	0	0	0	0	1:2	1:2	1:2
Wax + プタ血清	No. 7	0	0	0	0	0	0	0
	No. 8	0	0	0	0	0	0	0

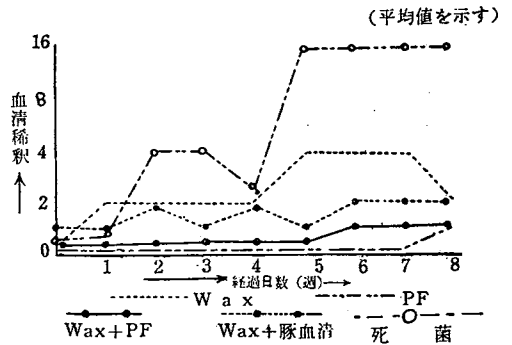
第 3 図

各種免疫群において Wax を抗原とする沈降反応



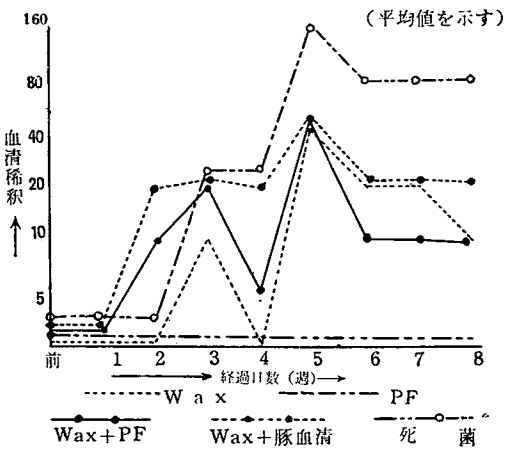
第 4 図

各種免疫群における東風沈降反応



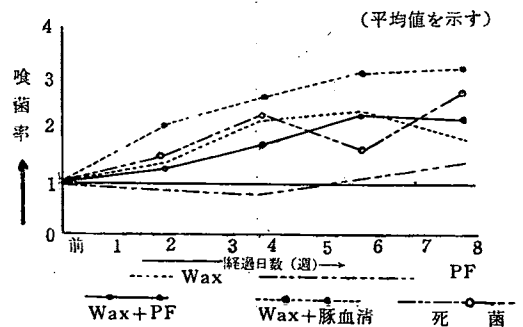
第 2 図

各種免疫群において Wax を抗原とする補体結合反応



第 5 図

各種免疫群の結核菌に対する喰菌現象



第3表 Wax免疫血清の吸収後におけるOT, CF, CF_I 及びCF_{II} 感作血球凝集反応

血清稀釈 感作原		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
		吸 収 前	OT CF CF _I CF _{II}	+++ +++ + +++	+++ ++ ± +++	+++ + - +	++ + - +	+ - - -
菌 体 吸 収	OT CF CF _I CF _{II}	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
脱 脂 菌 体 吸 収	OT CF CF _I CF _{II}	+ - ± +	± - - ±	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
OT 血 球 感 作	OT CF CF _I CF _{II}	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
CF 血 球 感 作	OT CF CF _I CF _{II}	++ - - -	+ - - -	± - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -

第4表 各種免疫群におけるツベルクリン反応

(10×OT48時間判定)

週 日		免疫前	2週	4週	6週	8週
Wax 免疫群動物No.	No. 3	0×0	17×18	26×22	21×21	14×13
	No. 4	0×0	10×10	15×14	18×17	19×19
PF 免疫群動物No.	No. 5	0×0	12×15	10×11	9×9	4×5
	No. 6	0×0	10×12	0×0	4×4	4×6
Wax + PF 免疫群動物No.	No. 7	0×0	15×18	14×12	0×0	0×0
	No. 8	0×0	0×0	0×0	0×0	4×5
Wax + 豚血清 免疫群動物No.	No. 9	0×0	13×15 (i)	10×12 (i)	13×14 (i)	14×15 (i)
	No. 10	0×0	15×15 (i)	10×13 (i)	12×14 (i)	24×25 (i)
死 菌 免疫群動物No.	No. 11	0×0	22×20 (i)	22×26 (i)	22×20 (i)	19×20 (i)
	No. 12	0×0	18×17 (i)	25×20 (i)	19×18 (i)	19×21 (i)

(註) i は硬結を示す。