

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2篇 沈降反応交叉試験*

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

R. Koch の結核菌発見以来、結核菌の菌型鑑別に就いては免疫学的にも多数の報告があるが、今日なお可能⁹⁻¹⁰⁾、不可能¹²⁻¹⁴⁾の両論に別れ定説がない。一方細菌性沈降反応に於て蛋白性及び含水炭素性抗原が分析され、後者は前者より鋭敏であり、更に前者は種特異性を、後者は型特異性を示すことが明らかにされている。黒屋一派^{9,10)}は各種細菌浮遊液の酸性加熱抽出液を抗原として用いるときは類属反応消失し型特異性が証明されることを報告し、小西¹⁵⁾は人型結核菌免疫血清と各種抗酸性菌の酸性加熱抽出液との沈降反応を試み結核菌の加熱抽出液は上記血清と特異的に反応すると述べてい

る。私は第1篇¹⁶⁾で人型結核菌及び他抗酸性菌の塩酸酸性(pH 3.2)加熱抽出液を抗原とすると人型菌免疫血清の沈降素価は全般的に著しく低下するが、両抗原による沈降素価間に明瞭な差が招来されることを報告したが、今回は更に各型結核菌免疫血清と各種抗酸性菌蒸溜水加熱抽出液との交叉沈降反応及び吸収試験を行い、他方結核菌の中性蒸溜水加熱抽出液と蒸溜水塩酸酸性(pH 3.2)加熱抽出液とでは結核菌免疫血清との沈降反応で最も著しい抗体価の差を示したので両者の反応原性の相異を知るため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。

実験材料並びに実験方法

1) 使用免疫血清：前篇¹⁶⁾に記載せる方法に準じ、人型結核菌(以下人型菌と略称する) H₂ 株、牛型結核菌(以下牛型菌と略称する) R₁₀ 株及び鳥型結核菌(以下鳥型菌と略称する) A₆₇ 株加熱死菌を夫々家兎に注射して各々の免疫血清を作った。

2) 抗原液の調製：前篇¹⁶⁾に記載せる方法に準じ、人型菌 H₂ 株、同青山 B 株、牛型菌、BCG、鳥型菌 A₆₇ 株、同竹尾株及びチモテー菌を中性及び塩酸酸性(pH 3.2)蒸溜水で加熱抽出せる液に0.85%の割

に食塩を加えた。(加熱抽出液を以下 P と略称する)

3) 吸収原：人型菌 H₂ 株並びに牛型菌のソートン培地4週間培養及び鳥型菌 A₆₇ 株のソートン培地2週間培養の菌苔を100°C、30分間加熱濾別し生食水で充分洗滌し濾紙で吸湿して使用した。

4) 吸収方法：前記3種の免疫血清を抗体価の高低に従い1万倍マーズニン加生食水で人型菌免疫血清は10倍、牛型菌免疫血清は5倍に稀釈し、鳥型菌免疫血清はそのまま用い、これに乳鉢で充分磨砕した各菌

* 本論文の一部は昭和29年10月、第8回日本細菌学会北陸地方支部集会において発表した。

体を 100mg/ml の割に加え時々振盪し乍ら 37°C に 5 時間保つた後、氷室に一夜放置し翌日 4,000 r.p.m. 30 分間宛 2~3 回遠心分離し上澄液に更に 1 回同じ操作を繰返し吸収の完全を期した。

実験成績

I) 交叉試験

1) 各菌中性 P による沈降反応：(第 1 表参照) 人型菌免疫血清及び牛型菌免疫血清は各当該菌 P によつて夫々最も高い抗体価を示したが、鳥型菌免疫血清のみ人型菌 H₂ 株とチモテー菌以外の菌に対して殆んど同じ抗体価を示した。なお 3 免疫血清共にチモテー菌 P では極めて低い抗体価しか示さなかつた。

2) 各菌塩酸酸性 (pH 3.2) P による沈降反応：(第 2 表参照) 3 免疫血清共に人型菌 P によつてのみ中性 P の場合と殆んど同程度の高い抗体価を示し、他の牛型菌 P、鳥型菌 P 及びチモテー菌 P によつては何れも反応陰性か又は極めて低い価を示した。

II) 吸収試験

前記 3 種の免疫血清を夫々人型、牛型及び鳥型各菌で互に交叉吸収し、これらの吸収血清と上記 3 種の結核菌の pH 7.0 P との間に沈降反応を行つた。(第 3 表参照)

1) 人型菌免疫血清に於ける吸収試験：人型菌で吸収すると人型菌 P とは勿論牛型及び鳥型菌 P とも反応陰性となり、牛型菌で吸収すると牛型菌 P とのみ反応陰性となり、鳥型菌で吸収すると牛型及び鳥型菌 P との反応は陰性となつた。

2) 牛型菌免疫血清に於ける吸収試験：牛型菌のみならず人型菌による吸収で、すべての菌の P に対し反応陰性となり、鳥型菌による吸収では牛型及び鳥型菌 P との反応は陰性となつたが、人型菌 P との反応はなお陽性であつた。

3) 鳥型菌免疫血清に於ける吸収試験：人型及び牛型菌で吸収すると何れも人型及び牛型菌 P とのみ反応陰性となつたが、鳥型菌 P とは

5) 沈降反応術式：前篇¹⁰⁾に記載せる方法に準じ、抗体価を測定した。なお沈降反応の場の観察は緒方¹⁷⁾の方法に従い最終判定を 5 時間後とした。

陽性で、鳥型菌で吸収すると、すべての菌の P に対し反応陰性となつた。

以上の如く 3 型結核菌による吸収交叉試験の成績から 3 型結核菌 P の間には互に共通する抗原が存するものと推察されるが、その詳細に關しては更に研究を続けている。

III) 沈降反応の場に就いて

人型菌免疫血清(但し本実験は第 1 篇¹⁰⁾記載の実験に使用せる免疫血清を使用した。)と上記 3 種結核菌の pH 7.0 P 及び pH 3.2 P との沈降反応の場を観察した。

1) 人型菌 P を抗原とせる場合の反応の場：(第 1, 2 図参照) 人型菌 pH 7.0 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 32, 最高血清稀釈倍数 4,096 で階段状を呈し、pH 3.2 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 32, 最高血清稀釈倍数 512 で前者と略々平行に短縮した階段状を呈した。

2) BCG P を抗原とせる場合の反応の場：(第 3, 4 図参照) BCG pH 7.0 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 16, 最高血清稀釈倍数 4,096, BCG pH 3.2 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 16, 最高血清稀釈倍数 16 で血清高稀釈側の著しく短縮した階段状を呈した。

3) 鳥型菌 P を抗原とせる場合の反応の場：(第 5, 6 図参照) 鳥型菌 pH 7.0 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 16, 最高血清稀釈倍数 2,048, 鳥型菌 pH 3.2 P を抗原とせる反応の場は最高抗原稀釈倍数 16, 最高血清稀釈倍数 64 で前者と略々平行に短縮した階段状を呈した。

総括並びに考按

人型、牛型及び鳥型菌免疫血清と各型結核菌及びチモテー菌の中性 P との交叉沈降反応では前記 3 種の免疫血清共に各型結核菌 P に対し高度に反応し、明らかな特異性を認めないのみならず、チモテー菌 P とも極めて弱いが類属反応を示した。又前篇¹⁰⁾に於て人型菌免疫血清は蒸溜水塩酸酸性 (pH 3.2) 加熱抽出条件下の人型菌 P とは同条件下の他型菌 P より高度に反応するのを見たので、今回は更に人型、牛型及び鳥型菌各免疫血清に就いて各菌の蒸溜水塩酸酸性 (pH 3.2) P との交叉試験を行つた。その結果人型菌免疫血清に就いては人型菌 P と他抗酸性菌 P とでは抗体価に明瞭な差を認め第 1 篇¹⁰⁾の成績を再確認し、又牛型及び鳥型菌免疫血清に就いても人型菌 P による場合抗体価が当該菌 P 及び他抗酸性菌 P によるものより明らかに高いという成績を得た。中村⁷⁾は赤痢菌の中性加熱抽出液は良好な沈降原性を有するが、なお類属反応著しく、その原因の少なくとも一部は抗原液中に菌種特異性の蛋白質が溶存するためと考

え、これを除去するため酸性加熱を行い良結果を得たと報告している。今回の抗酸性菌に於ける私の実験成績では牛型及び鳥型菌、非病原性抗酸性菌の蒸溜水塩酸酸性 (pH 3.2) 抽出液中には人型菌のそれに比し或る種沈降原が欠如することを示している。換言すると此種沈降原は酸性加熱により破壊され易いが、その程度が人型菌とその他の菌との間で異なるために沈降素価に明らかな差を招来するのであらうと推察することが出来た。なお蒸溜水中性 P で行つた 3 免疫血清の交叉吸収試験では人型、牛型及び鳥型菌 P 相互間に或る程度の相異を認めたが、厳密な特異性が認められなかつた事実はこれを裏付けるものであらう。

沈降反応の場を観察するに pH 3.2 P を抗原とせる反応の場は pH 7.0 P を抗原とせる反応の場に比べ BCG P、鳥型菌 P 及び人型菌 P の順に血清高稀釈側の方がより多く縮小せる形を示し、酸性加熱によつて各 P 中の異なつた抗原性を顕性化することが出来た。

結

私は人型、牛型及び鳥型結核菌免疫血清と各種抗酸性菌蒸溜水加熱抽出液との交叉沈降反応及び吸収試験を行つて次の如き結果を得た。

1) 前記 3 種の免疫血清と各菌中性加熱抽出液との間に明らかな型特異的の反応を認めることは出来なかつた。

2) 前記 3 種の免疫血清は各菌塩酸酸性 (pH 3.2) 加熱抽出液との沈降反応に於て、人型結核菌抽出液に対してのみ高い抗体価を示し、他の抗酸性菌塩酸酸性加熱抽出液とは殆んど陽性反応を呈しなかつた。

3) 人型、牛型及び鳥型菌に対する免疫血清

論

を各当該菌によつて吸収すると各当該菌 P との沈降反応は陰性となつたが、交叉吸収でも反応は程度の差はあれ、すべて低下し厳密な特異性は認められなかつた。

4) 人型結核菌免疫血清と各型結核菌加熱抽出液との沈降反応の場は何れも数段の階段状を呈し、塩酸酸性 (pH 3.2) 加熱抽出液を抗原とせる反応の場は pH 7.0 加熱抽出液を抗原とせる反応の場に比べ何れも可成り縮小したが、BCG、鳥型結核菌及び人型結核菌加熱抽出液の順に免疫血清稀釈側の縮小が著明であつた。

(文献後載)

第1表 各種抗酸性菌中性蒸溜水
P と各型結核菌免疫血清との沈
降反応交叉試験成績

抗原作製用菌株	免疫血清		
	抗人型 血清	抗牛型 血清	抗鳥型 血清
人型菌 H ₂ 株	512	64	8
人型菌 青山 B 株	512	64	16
牛型菌 R ₁₀ 株	256	128	32
B C G	256	128	16
鳥型菌 A ₆₇ 株	128	64	32
鳥型菌 竹尾 株	64	64	16
チモテー菌	16	8	2

註：表中の数字は沈降反応抗体価を示す。
以下同じ。

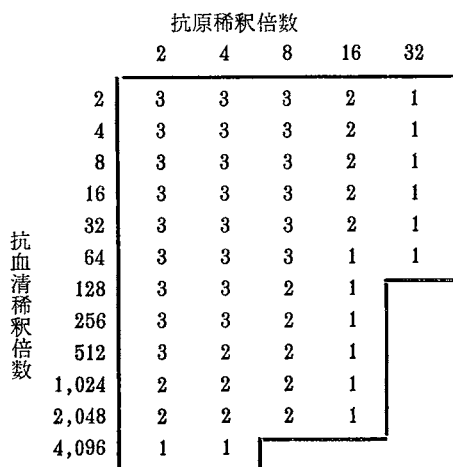
第2表 各種抗酸性菌塩酸性蒸溜水
(pH 3.2) P と各型結核菌免疫血清
との沈降反応交叉試験成績

抗原作製用菌株	免疫血清		
	抗人型 血清	抗牛型 血清	抗鳥型 血清
人型菌 H ₂ 株	256	64	8
人型菌 青山 B 株	256	64	8
牛型菌 R ₁₀ 株	4	2	—
B C G	2	—	—
鳥型菌 A ₆₇ 株	8	—	—
鳥型菌 竹尾 株	8	—	2
チモテー菌	—	2	—

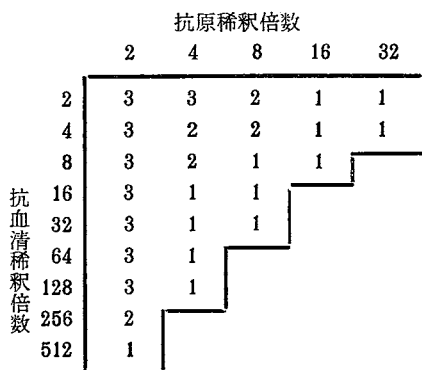
第3表 各型結核菌中性 P を抗原とせ
る沈降反応による交叉吸収試験成績

血処 清置	抗原作製 用菌株	沈降反応抗体価		
		抗人型 血清	抗牛型 血清	抗鳥型 血清
非 吸 収	人型菌	513	64	8
	牛型菌	256	128	32
	鳥型菌	128	64	32
人吸 型 菌収	人型菌	—	—	—
	牛型菌	—	—	—
	鳥型菌	—	—	8
牛吸 型 菌収	人型菌	80	—	—
	牛型菌	—	—	—
	鳥型菌	40	—	8
鳥吸 型 菌収	人型菌	10	20	—
	牛型菌	—	—	—
	鳥型菌	—	—	—

第1図 人型結核菌 H₂ 株中性蒸溜水
P と人型結核菌免疫血清との沈降反
応の場



第2図 人型結核菌塩酸性蒸溜水
(pH 3.2) P と人型結核菌免疫血
清との沈降反応の場



第3図 BCG 中性蒸溜水 P と人型結核菌免疫血清との沈降反応の場

		抗原稀釈倍数			
		2	4	8	16
抗血清稀釈倍数	2	3	3	1	1
	4	3	3	1	1
	8	3	2	1	1
	16	3	1	1	1
	32	3	1	1	
	64	3	1	1	
	128	3	1	1	
	256	3	1		
	512	2	1		
	1,024	1	1		
	2,048	1			
	4,096	1			

第5図 鳥型結核菌 A₆₇ 株中性蒸溜水 P と人型結核菌免疫血清との沈降反応の場

		抗原稀釈倍数			
		2	4	8	16
抗血清稀釈倍数	2	3	3	3	1
	4	3	3	2	1
	8	3	3	2	1
	16	3	3	2	1
	32	3	2	2	1
	64	3	2	1	1
	128	3	2	1	
	256	3	1	1	
	512	2	1	1	
	1,024	1	1		
2,048	1	1			

第4図 BCG 塩酸酸性蒸溜水 (pH 3.2) P と人型結核菌免疫血清との沈降反応の場

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

第6図 鳥型結核菌 A₆₇ 株塩酸酸性蒸溜水 (pH 3.2) P と人型結核菌免疫血清との沈降反応の場

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