



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒツジ赤血球をもつて連続吸収せる旧ツベルクリンの抗原性について
Author(s)	今井, 忠; IMAI, T.; 板倉, 益夫 他
Description	
Citation	結核の研究, 6, 69-74
Issue Date	1957-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26619
Type	departmental bulletin paper
File Information	6_P69-74.pdf



ヒツジ赤血球をもつて連続吸収せる旧ツベルクリン の抗原性について

今 井 忠
坂 倉 益 夫
高 橋 和 男
沼 田 達 夫

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(昭和32年2月15日受付)

緒 言

結核に於ける血清反応としては、古くより行われてきた凝集反応、沈降反応、補体結合反応のほか近年広く用いられるようになった Middlebrook and Dubos¹⁾ の赤血球凝集反応など色々な方法が行われているが、いずれも手技上の困難さその他の理由から実際の診断の目的には利用されずに終つてゐる。然しながら結核血清反応の領域にこの赤血球凝集反応が登場してきた事は、結核菌体中の色々な抗原性物質を化学的に解明して行く上に寄与する所極めて大であつた。即ち Middlebrook の方法に於ては polysaccharide が血球に吸着され Boyden²⁾ 及び Meynell³⁾ の行つた如く血球を予めタンニン酸で処理しておいた場合には protein が血球表面に吸着されるので、この2つの血球凝集反応は屢々 protein, polysaccharide の分離とそれぞれの抗体の発見に利用されている。更にまた極く最近になつて Hinson ら⁴⁾ 及び進藤ら⁵⁾ は間接 Coombs test を応用して人間の結核血清中に不完全抗体を見出している。このように次々と別種の新しい血清反応が取り上げられる状態を見ても、結核に於ける抗原抗体系が如何に複雑なものであり、そして又最近如何に結核の血清反応が分析的に追求されるようになってきたかが分る。

我々の教室においても予ねてより旧ツベルクリンの抗原性について血清学的な研究を行つてゐるが、1955年 Rheins and Thurston⁶⁾ によつて行われた実験に極めて深い関心を覚えるに至つた。即ち彼等は旧ツベルクリンを綿羊赤血球により連続的に12回吸収し、各回の感作赤血球をそれぞれ抗原として赤血球凝集反応及び溶血反応を行つた所、吸収を重ねる毎に漸次抗体価は低下するが、第7

回吸収日の感作血球を抗原とした場合、突然抗体価の上昇をきたし、時には最初より高い値を呈する事があるのを見た。それ以後は再び抗体価が減少して行くが、もし彼等の実験が正しいものならば、ツベルクリン中の血球凝集反応に関与する抗原は少くとも2種類はあるものと考えなければならなくなる。

ツベルクリン中の有効成分を赤血球によつて吸収し、その抗原性の變化を追求する事は我々に興味を抱かせたので、Rheins らの実験を追試すると共に吸収後の旧ツベルクリンを抗原として、50%溶血単位法による補体結合反応を行い、補体結合反応に与る抗原が赤血球凝集反応、溶血反応の場合と同様にヒツジ赤血球に吸着されるか否か、換言すれば赤血球凝集反応、溶血反応に与る抗原を連続吸収によつて取り去つてしまつた残りのツベルクリンが尚補体結合反応の抗原となりうるかどうかを調べてみた。本実験において Rheins らの成績を確認する事はできなかつたがツベルクリンの抗原性については興味ある知見を得たので、その成績をここに報告したいと思ふ。

実 験 材 料

I) 免疫血清：人型菌仲野株の死菌を20 mg 宛5日間隔で5回家兎の皮下に接種し、最終注射後12日目に採血した血清を使用した。この血清は結核菌(人型菌H₂株)の中性加熱菌体抽出液を抗原とする沈降反応において32倍まで陽性であつた。

II) 旧ツベルクリン：3種のツベルクリンを使用した。即ち人型菌青山B株、人型菌仲野株及びBCG予研株をそれぞれグルタミン酸ソーダ使用ソートン培地に8週間培養した後、加熱殺菌、型の如く濃縮調製したものである。

Ⅲ) 稀釈液・Stein⁷⁾の変法による Mayer の Veronal-buffer 食塩水を使用した。即ち予め下記処方に従つて調製保存した Stock-buffer を用に臨んで蒸留水で5倍に稀釈し、その 1000 cc に 0.2g のグラーチンを溶解させたものを稀釈液として用いた。

Stock-buffer	
Na Cl	42.5 g
Barbital	2.875 g
Na-barbital	1.875 g
Ca Cl ₂ (anhydrous)	0.083 g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.616 mg
Aq. dest	1000 c.c.

実験方法

1. 感作及び吸収

稀釈液に2, 3回洗滌した pack の状態のヒツジ赤血球 0.1 c.c. を、4倍に稀釈した前記3種類の旧ツベルクリン 4 c.c. に加え時々振盪してよく混合しながら 37°C の温浴中で2時間感作する。感作後 2000 回転5分間遠沈して血球を分離し、沈澱赤血球は5~8%にグリセリンを加えた稀釈液で3回洗滌後再びその 20 c.c. に浮遊させる(稀釈液にグリセリンを加えたのは、Rheins らの実験を追試するため非透析ツベルクリンを使用したので感作血球の洗滌及び再浮遊に際して当然起る可き溶血を防ぐ為である。経験上溶血阻止有効最少量は仲野ツベルクリンでは5%, 青山Bツベルクリンでは8%, BCG ツベルクリンでは7.5%である事を知つた)。一方残された上清の旧ツベルクリンには更に新しい血球 0.1 c.c. を混合し上と同様の操作を行う。かかる方法を14回繰り返えし、各回の感作赤血球浮遊液を抗原として赤血球凝集反応及び溶血反応を行い、又第2回, 5回, 8回, 11回, 14回吸収後の各ツベルクリンを抗原として補体結合反応を行つた。

2. 術式

i) 赤血球凝集反応及び溶血反応

Rheins らの追試であるが Middlebrook and Dubos¹⁰⁾の方法と大約同様に行つた。

血清は 1/10 量の赤血球を加えて 37°C 30 分の正常抗体吸収を2度行つた後、5倍から 81,920 倍迄の稀釈を用意する。補体も 1/5 量の赤血球を混合して 0°C 20 分の寒冷飽和を2回行つてから9倍に稀釈して使用した。

凝集反応: 小試験管に各稀釈血清2滴と感作血球液2滴とを滴下混合し、37°C温浴中において30分反応させた後軽く遠沈して凝集の程度を観察した。

溶血反応: 血清2滴, 感作血球2滴及び補体1滴を混合し、37°C温浴中30分放置後直ちに溶血の有無を検する。

ii) 補体結合反応 正確な場の形を作る可く50%溶血単位法による補体結合反応を行つた。術式の詳細は極めて複雑なため省略するが、曩に教室の大原等⁹⁾池端¹⁰⁾が発表した通りである。

実験成績

1) 赤血球凝集反応及び溶血反応による Rheins 実験の追試験成績

青山B, 仲野, BCG 3株のツベルクリンをヒツジ赤血球で連続12回吸収し、各回の感作赤血球について行つた血球凝集反応及び溶血反応の結果は第1表から第6表までに示した通りである。第1表は青Bツベルクリンを用い

第1表 青山Bツベルクリンによる赤血球凝集反応

血清稀釈↓	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	3	3'	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0
10-	3	3	3	2	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	0
20-	3	3	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
40-	3	3	2	2	1	1	1'	0	0	0	0	0	0	0
80-	3	2	2	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0
160-	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320-	2'	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1280-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 3, 3', 2, 2' の記号は凝集の程度を示す。
3は強陽性 0は陰性である。

第2表 青山Bツベルクリンによる溶血反応

血清稀釈↓	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2'	1	0	0
10-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2'	1	0	0
20-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2'	2'	1'	0
40-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2'	0	0
80-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2'	1	0	0
160-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0
320-	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2'	1'	0	0	0
640-	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1	0	0	0	0
1280-	3	3	3	3	2	2'	2'	1	0	0	0	0	0	0
2560-	3'	2	2'	2'	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0
5120-	2'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10240-	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 3, 3', 2, 2', 1, 1', 0 の記号は溶血の程度を示す
3は完全溶血, 0は完全不溶血である。

第3表 仲野ツベルクリンによる赤血球凝集反応

血清稀釈	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	3	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10-	3	3	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-	3	3	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-	3	3	3	3	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80-	3	3	3	3	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160-	3	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320-	3	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640-	3'	3'	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1280-	2	2'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2560-	1'	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5120-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 第1表の註に同じ

第4表 仲野ツベルクリンによる溶血反応

血清稀釈	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	0	0	0	0
10-	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	0	0
20-	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	1'	0	0
40-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0
80-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0
160-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	0	0	0
320-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0
640-	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1'	0	0	0
1280-	3	3	3	3	3	3	3'	3'	1'	1'	0	0	0	0
2560-	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0	0	0	0	0
5120-	3	3	3	3	3'	2'	1	0	0	0	0	0	0	0
10240-	3	3	3	3'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20480-	2	2'	2'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40960-	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81920-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 第2表の註に同じ

た場合の赤血球凝集反応の成績で、表の如く第1回目の感作血球を抗原とした場合、血清は640倍稀釈まで反応陽性であったが、2回目の血球では320倍、4回目160倍と吸収を重ねる毎に抗体価は漸次低下して行き、吸収8回目以後の感作血球では全く反応が現われなくなった。この実験を溶血反応によつて調べた成績も全くこれと同じで、第2表に示す如く最初10240倍まで陽性であった反応が、血球による吸収を繰り返して行くうちに次第に抗体価の低下をきたし、第14回目の感作血球を抗原とした場合には全く

第5表 BCGツベルクリンによる赤血球凝集反応

血清稀釈	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	2	2	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10-	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-	3	2	2'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-	3'	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80-	2	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 第1表の註に同じ

第6表 BCGツベルクリンによる溶血反応

血清稀釈	吸収回数→													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2'	0
10-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
20-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1'
40-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	3'	1
80-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	2	0
160-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3'	2	1	0	0
320-	3	3	3	3	3	3'	2	2'	2'	1	0	0	0	0
640-	3	3	3'	2	2'	1	1	1	1'	0	0	0	0	0
1280-	3	2	1	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2560-	2'	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5120-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10240-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 第2表の註に同じ

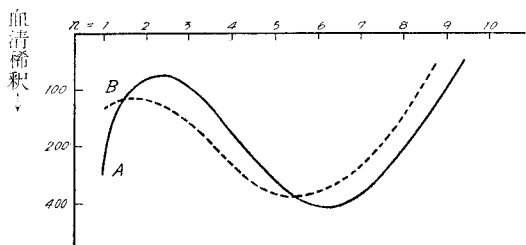
陰性に終つている。即ち血球凝集反応、溶血反応のいずれにおいても吸収の途中で抗体価が再上昇すると言う現象は全く見られなかつた。仲野ツベルクリン(第3表及び第4表)、及びBCGツベルクリン(第5表及び第6表)について行つた実験もこれを裏書きするもので、吸収を重ねる毎に抗体価は漸次低下しつつ遂には全く消失してしまい、その間決して抗体価の再上昇を見る事はなかつた。

2) ヒツジ血球吸着部分を除いたツベルクリンの抗原性について

ヒツジ赤血球を以て連続吸収し、血球凝集並びに溶血反応に与る有効因子を除去し去つた残りのツベルクリンについて補体結合反応による抗原性を調べた成績は第1図及び第2図の如くである。個々のデータは煩雑なため、図においては反応の場の形を曲線を以て示した。即ち図において、曲線によつて囲まれた上の部分が反応陽性を示す「場」である。

第1図 青山Bツベルクリンを抗原とした
補体結合反応

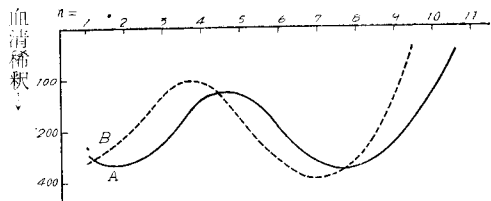
抗原稀釈 (25×2n) →



A: ツベルクリン原液
B: 14回吸収後のツベルクリン

第2図 BCGツベルクリンを抗原とした
補体結合反応

抗原稀釈 (25×2n) →



A: ツベルクリン原液
B: 14回吸収後のツベルクリン

第1図は青山Bツベルクリンを抗原とした場合で、Aの実線はツベルクリン原液、Bの点線は14回吸収後のツベルクリンを夫々抗原とした際の陽性下限を示すものである。

る。A・Bを比較するに抗体価、場の形共この2つの反応は全く同一で、唯一つの異なるのは抗原価においてBの方がAの約1/2になつてゐることだけである。然しこの程度の低下ならば14回の感作吸収操作によつて当然受ける濃度の稀釈によるものと考えても大きな間違いはなからう。この他われわれは第5回、8回、11回吸収後の各ツベルクリンについて同じ反応を行つたが、それ等は丁度A、Bの中間に位するもので、図が煩らわしくなるので省略したが抗体価及び場の形は極めてよくA、Bに類似してゐた。

第2図はBCGツベルクリンを抗原とした場合の反応で、Aは原液、Bは14回吸収後のツベルクリンである。この図からも第1図と全く同じことが言われる。

考 按

我々の実験成績によれば、ヒツジ赤血球によつてくり返し旧ツベルクリンを吸着してゆくと、遂にツベルクリン中に血球感作 factor が消失し、しかもそれ以後は決してこの factor の再現しない事が確かめられた。これは Rheins and Thurston の実験と全く相反する所である。

Rheins and Thurston の実験成績は第7表に引用した如く、BCG, Ravenell, Phlei 及び H 37 Rv 株の何れの場合にも6回吸収迄は凝集価、溶血価が共に低下するが、7回目の感作血球を抗原とした場合、急に力価が上昇し以後12回吸収迄波状型に減弱している。この現象の説明として彼等が述べてゐるのは、旧ツベルクリン中の血球凝集反応抗原は唯一種のものではなく(例えば血球感作 factor が多糖体であるとしても、旧ツベルクリン中には数種の異なる多糖体がある)、而もそれら異なる抗原が

第7表 Rheins and Thurston の実験成績

(Am. Rev. Tuberc. 72, 210, 1955 より引用)

吸収回数↓	B C G		Ravenell				Phlei				H 37 Rv					
	凝	反	溶	反	凝	反	溶	反	凝	反	溶	反	凝	反	溶	反
1	64		512		128		2,048		256		16,384		8		256	
2	32		256		128		1,024		256		4,096		4		32	
3	8		128		64		512		512		2,048		4		16	
4	8		32		128		512		256		512		2		4	
5	8		16		32		128		128		256		—		—	
6	—		8		8		64		32		64		—		—	
7	512		1,024		128		256		512		1,024		2		—	
8	512		512		128		512		256		1,024		2		—	
9	256		1,024		64		512		256		1,024		—		—	
10	64		256		4		128		128		256		—		—	
11	64		128		8		128		32		128		—		—	
12	32		256		8		256		32		256		—		—	

同じ割合で赤血球に吸着されるとは限らないので、或る種の抗原が吸収され尽したあとにはじめて他の抗原が吸着されるためではないかと言う推測である。

抑々 Middlebrook and Dubos の赤血球凝集反応は、その抗原として参与する物質が polysaccharide である事を Keogh¹¹⁾が報告して以来、一般にこの反応はツベルクリン多糖体に特異的な反応とされて居り、Boyden もそれを強調している。本邦に於ても武田(徳)¹²⁾ 武田(眞)¹³⁾等は多糖類抗原説をとつている。然し若倉¹⁴⁾は旧ツベルクリンの蛋白分割が赤血球凝集反応及び溶血反応に於て多糖体分割よりも鋭敏な反応を示したと言つて居り、Iland¹⁵⁾、Pound¹⁶⁾は彼等の高度に純化したと言つるツベルクリン多糖体を用いて、結核患者血清と赤血球凝集反応を行つた場合、全例が陰性であつた事から、ツベルクリン多糖体はこの反応の特異抗原ではないと結論している。かかる見解の不一致は、つまり所ツベルクリンの分割が不完全であり又各研究者によつて分割成分が区々である為と思われる。かくの如くツベルクリン中に含まれる赤血球感作因子の本態についてはいまだ定説の無い現状であるのに鑑み、Rheins and Thurston の抗原吸着に関する想定に興味を持ち追試したのであるが、我々の実験結果からは彼等の主張するような成績は得られなかつた。即ち血球感作 factor が唯一種であるか数種あるかは不明であるにしても少く共或る種の抗原の吸収除去後に別の抗原が吸着して抗体価の再上昇を起す事は無いと断言し得る。而して Rheins らの実験においてどのツベルクリンを用いても、すべて第7回吸収目の感作血球を抗原とした場合に力価の急上昇をみせている事は我々に可なり奇異の感を抱かせ、或いはテクニクに何かの誤りがあつたのではないかと疑わしめるものがある。一方補体結合反応に於て、旧ツベルクリンを抗原とした場合、2つの反応の場を示す事は池端¹⁷⁾が既に報告しているが、今回の実験においても青山B、BCGの2つのツベルクリンについて同じく2つの反応の場が示されている。而して我々の実験においては抗原としてツベルクリン原液を用いても、ヒツジ赤血球で14回連続吸収後のツベルクリン(この中には赤血球凝集反応、溶血反応に因する抗原が残つていない)を用いても、抗体価、場の形共全く同一のものが得られた。この点から見て、補体結合反応に因する抗原が全くヒツジ赤血球に吸着されない事は明らかである。

尚旧ツベルクリンを抗原とする補体結合反応に於て常時見られる2つの反応の場は、夫々主としてツベルクリン蛋白分割及び主として多糖体分割を抗原とする反応の場と一致する事を最近我々は見出している。¹⁸⁾従つてツベルクリン多糖体のすべてが赤血球に吸着するものとすれば 14

回吸収後のツベルクリンを抗原とする補体結合反応の場の形は1相性になるか、あるいは少くとも多糖体分割によると思われる反応の場は変化するものと考えられるのであるが結果は旧ツベルクリン原液を抗原とした場合と全く同一であつた。この事は Iland 等の実験において高度に純化されたツベルクリン多糖体が赤血球凝集反応の抗原となり得なかつた事と考え併せると極めて興味深く思われる。而して Iland ら又は進藤らの唱く所と Keogh らの唱く所とは互に矛盾するものであるから、我々は赤血球凝集反応抗原が polysaccharide 性のものであるか protein 性のものであるかを軽々に断定する事は慎しみたい。然し何れが正しいにしても、今回の我々の実験から見れば、血球凝集反応に与る polysaccharide 抗原あるいは protein 抗原と補体結合反応に与るそれとは別個のものである事だけは明らかである。

結 論

3種の旧ツベルクリンをヒツジ赤血球によつて 14回連続吸収し、各回の感作血球をそれぞれ抗原として赤血球凝集反応及び溶血反応を行つた。また赤血球感作因子を種々の段階に吸収除去し去つた残りのツベルクリンを抗原として 50%単位法による補体結合反応を行い、次の如き結果を得た。

1) 吸収の回数を重ねるに従つて、赤血球凝集反応及び溶血反応の抗体価は漸次低下しつづつ遂には消失し、その後は決して抗体価の再上昇を見なかつた。即ち Rheins & Thurston の如き実験結果は認められなかつた。

2) ツベルクリン原液と 14回連続吸収後のツベルクリンを抗原として行つた補体結合反応において、抗体価、場の形とも全く差が認められなかつた。即ちツベルクリンの補体結合反応抗原は全く血球に吸着されない。

稿を終るに臨み、終始御指導と御校閲を賜つた恩師大原教授に深謝し、御助言を頂いた学兄池端博士に感謝する)

文 献

- 1) Middlebrook, G., and Dubos, R: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 2) Boyden, S. V.: J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 3) Meynell, G. G: J. Path Bact., 67, 137, 1954.
- 4) Hinson, K. F. W., et al: Brit. J. Tbc. 46, 50, 1952.
- 5) 進藤宙二, 第6回アレルギー学会 昭 31.
- 6) Rheins, M. S., and Thurston, J. R.: Am. Rev. Tbc. 72. 210, 1955.
- 7) Stein, G. J., and Ngu, D. V.: J. Immun. 65, 17, 1950.

- 8) Middlebrook, G.: J. Clin. Investigation 29, 1480, 1950.
- 9) 大原達他: 日本細菌学雑誌 10, 41, 昭 30.
- 10) 池端隆: 日本細菌学雑誌 10, 121, 昭 30.
- 11) Keogh, E. V. et al : Nature, Lond, 161, 687, 1948.
- 12) 武田徳晴他: 総合医学, 28, 617, 昭 28.
- 13) 武田直良: 抗酸研誌, 11, 177, 昭 30.
- 14) 若倉和美: アレルギー 2, 110, 昭 28.
- 15) Iland, C. N., and Peacock, D. B.: A Ciba Foundation Symposium, Experimental Tuberculosis p. 163, 1955, London
- 16) Pound, A. W.: J. Path. Bact., 64, 131, 1952.
- 17) 池端隆: 結核の研究, 4, 7, 昭 30.
- 18) 今井忠・池端隆: 第7回日本結核病学会北海道地方学会, 昭 31.