HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核菌燐脂質による赤血球凝集反応(第1報)
Author(s)	高橋, 義夫; 小野, 勝男
Description	
Citation	結核の研究, 7, 1-4
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26623
Type	departmental bulletin paper
File Information	7_P1-4.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　　著

結核菌燐脂質による赤血球凝集反応　（第1報）

高橋義夫　小野勝男
（北海道大学結核研究所予防部）

結核における赤血球凝集反応の赤血球感作抗元は現在主として多糖体であるとされているが，我々は結核菌体成分研究の途上，従来菌体燐脂質が補体結合抗元としての能力を持つている事実から，本物質の赤血球感作能を検べてみたところ，果して本物質も亦優秀な赤血球感作抗元たり得る事を知つた。又興味ある事に，菌体燐脂質を感作元とする赤血球凝集反応の抗元抗体系はツベルクリン多糖体を感作元とする凝集反応の夫とは全く別に独立している事，及び生体内において菌体燐脂質に対する抗体は少くともツベルクリン多糖体に対する夫とは独立して産生される事を知つた，以下はその実験報告である。

実験材量及び方法

抗　　元

1）ツベルクリン蛋白　人型菌仲野株ソートン8週培養濾液を濾紙で濾過し，濾液を重曹煎上（67°C）で1/10に濃縮後遠心して沈澱物を除去，セロファン襲中にて流水で3日間透析，再び遠心して沈澱物を除去，重曹煎上で元の量に再濃縮，ザイツ濾過，濾液に多量の三塩化醋酸を加え，生じた沈澱を遠心して集めて沈澱を少量の NaOH を入れたアルカリ性蒸溜水（pH 7.2）に溶かし，再び三塩化醋酸を加えて沈澱させ，乾燥乾燥後再びアルカリ性蒸溜水に溶解し，遠心により不純物を除去し，三塩化醋酸で沈澱させ，沈渣を三塩化醋酸で pH 2.0 にして蒸溜水で3回洗滌後乾燥した。褐色粉末。

2）ツベリクリン多糖体　上記の除蛋白後の溶液を流水で一昼夜透析，45°C～50°C で元の量に再濃縮，濃縮液を濾紙で濾過し，メタノール中に点滴して沈澱を生ぜしめ，一昼夜室温に放置後沈澱を遠心分離し，再び蒸溜水にとかし，濾紙で濾過した後，ザイツ濾過。得られた溶液に先づ50％の割にメタノールを加えて沈澱してくるものを除去（これは Seibert[1] の多糖体 II に相当し，赤血球感作能が無い），上清を再び約 1/20 に濃縮，遠心して不純物を除去し，95％の割にメタノールを加え沈澱を得，沈澱を遠心分離し，これをメタノールと蒸溜水で溶解沈澱を数回くり返して可及的精製したもの。

3）仲野燐脂質（B.N.）　Boquet et Nègre[2] の方法に従い，仲野株ソートン8週培養の加熱致死乾燥菌体から先づアセトン可溶物を除去，残渣を乾燥後，メタノールで数回抽出（45～50°C 磁気攪拌器を使用），抽出液を集めて，これを一昼夜氷室（5°C）に放置して生じた沈澱物をガラスフイルターで分離し，濾液を重曹煎上でアルコールを蒸発させて乾燥，再びメタノールに溶かし不純物を除去，これを数回くり返して乾燥したもの。

4）BCG 燐脂質（B. N.）　アセトン致死乾燥菌体より上記 Boquet et Nègre の方法に準じて得たものである。但しこの場合は得られたメタノール抽出物を熱アセトンで数回処理して，アセトン可溶物を殆んど完全に除去した。

5）仲野燐脂質（A.）　仲野株ソートン8週培養加熱致死乾燥菌体を，Anderson[3] の方法に従つて，アルコールエーテル等量液で1回 4～8 時間づつ数回抽出をくり返し，抽出液をザイツ濾過，重曹煎上で，蒸発乾固，これを熱アセトンで処理してアセトン可溶物を除去したもの。

6）ツベルクリン抗元　青山Bソートン8週培養の旧ツベルクリンを，セロファン襲中で流水で 48 時間，蒸溜水で 24 時間透析したもの。抽出に使用した溶媒はすべて本研究所化学教室にて再蒸溜して精製したものを用いた。抗元液の調製，蛋白，多糖体は生食水に溶解し，燐脂質は先づメタノールに溶解し，これを生食水に滴下して懸濁液を作り，加温してメタノールを蒸発させ，蒸発した水分は蒸溜水で補つた。又，抗元液はすべて1万倍の割にマーゾニンを加えて 4°C の氷室に保存した。

これらの抗元の化学的性状は表1に示した。定性反応は 1 mg/ml の溶液について行い，窒素はミクロキエルダール

表1　抗元の化学的性状

抗元	Molisch 反応	Orcin-HCl 反応	Biuret 反応	Millon 反応	Xanthoprotein 反応	窒素量	燐
仲野加熱「ツ」蛋白	±	−	+	+	+	11.1%	0.6%
仲野非加熱「ツ」多糖体	++	+	−	−	−	0.45%	0.5%
仲野加熱死菌燐脂質（B/N/）	++	±	−	−	−	0.33%	2.6%
BCG生菌熱脂質（B.N.）	++	±	−	−	−	1.9%	2.7%
仲野加熱死菌燐脂質（A）	++	±	−	−	−	0.25%	2.0%

法，燐の定量は Allen[4] 法により，Beckman 型分光光度計を使つて，波長 600 mμ，スリット 0.01 で測定した。

抗血清

2～3 kg の健康家兎 18 匹を用い，家兎 1 より 9 までは結核菌の色々な抽出菌体残渣で免疫した。用いた抽出菌体残渣及び免疫方法は次の通りである。

1）菌体 BA　ソートン 5 週培養の青山 B 菌苔を出来るだけ水分を除き，充分量のアセトンに 24 時間入れ，アセトンを除去乾燥したもの。即ちアセトン致死菌体である。窒素量 4.56 %。

2）菌体 RC　アセトン致死乾燥菌体を先づメタノールで抽出，次いでクロロホルムで抽出して遊離の脂質を完全に除去した残渣である。抽出は 50°C 前後 1 回 5～7 時間あて，各 3～4 回行つた。窒素量 6.25%

3）菌体 RHC　菌体 RC を 1 %塩酸アルコールで処理して結合脂質を完全に除去した菌体残渣である。抽出条件は前回と同様。窒素量 8.25 %

以上の 3 つの菌体残渣を生食水に浮遊し，各菌体浮遊液の窒素量を一定にして，家兎 1，2，3，には BA を一週間隔で耳静脈より 8 回注射，計 12 mg。4，5，6，には RC を同様に 8.76 mg。7，8，9，には RHA を同様に 6.72mg 注射した。

家兎 10，11，12，には BCG 菌，14，15，には人型菌青山 B 生菌，16，17，には青山 B 加熱死菌を各 10 mg づつ 1 週間隔で 3 回腹腔内注射して免疫した。家兎 19，20，は無処置の対照血清とした。

かくして得た各種免疫及び対照血清は，採血後ザイツ濾過，56°C 30 分非動化して 4°C の氷室に保存したが，赤血球凝集反応に際しては，抗血清 0.2 ml に，感作血球に使用したのと同じ血球の 10 %生食浮遊液 1.0 ml を加え，室温 10 分 2 回吸収し，異種赤血球凝集素を除去して使用した。

血球

脱線維した緬羊血液に等量の修正 Alsever 溶液[5] を加え 4°C に保存し，用に臨んで Alsever 保存血液を遠心し，血球を生食水で 3 回洗滌して使用に供した。Alsever 保存血液は採血後 3 週間以上は使用しなかつた。

血清反応術式

1）赤血球凝集反応　血球感作方法は予備実験に於て抗元濃度は 0.5 mg/ml，抗元液：血球の比は 40：1 が適当と認められたので，本実験を通じてこの比率で行つた。即ち抗原液 4.0 ml に洗滌血球 0.1 ml を加え 37°C の孵卵器で 2 時間感作し，生食水で 3 回洗滌後 40 ml の生食水に浮遊して 2.5 %感作血球液とした。又ヴイダール試験管を用い，生食水で被検血清を倍数希釈して 0.5 ml の系列を作り，これに前記の 2.5 %感作血球浮遊液 0.5 ml づつを各試験管に加えた。対照として，①2.5 %正常血球浮遊液＋被検清の最高濃度，②2.5 %感作血球浮遊液＋健康家兎血清の倍数希釈を用意した。

2）赤血球凝集反応阻止試験　ヴイダール試験管に抗元液を生食水で所要濃度より倍数希釈した 0.5 ml の系列を作り，これに一定濃度（例えば赤血球凝集単位）の抗血清 0.5 ml を加えて 37°C の孵卵器で 30 分吸収した後，赤血球凝集反応と同様に施行した。対照として，①感作血球＋抗血清＋生食水，②正常血球＋抗血清＋生食水を用意した。

3）沈降反応　重層法。抗元濃度は，多糖体は 0.1 mg/ml，他は 1 mg/ml とした。又，①生食水＋最高濃度血清抗元＋健康家兎血清を対照とした。

実験成績

赤血球凝集反応の成績は表 2 に示した通りいづれの燐脂質劃分で感作した血球も，多糖体及び蛋白劃分で感作した血球と同様，極めて鋭敏に各種抗血清と反応した。但

表 2　赤血球凝集反応成績　（抗体価）

番号 血清	免疫元	仲野蛋白	仲野多糖体	仲野燐脂質(B.N)	BCG燐脂質(B.N)	仲野燐脂質(A)	青山BOT
1	BA	80	640	1280	2560	1280	—
2	〃	1280	640	640	640	640	160
3	〃	320	640	>5120	>5120	2560	—
4	RC	640	640	—	—	—	320
5	〃	1280	1280	—	20	—	320
6	〃	1280	1280	—	—	—	640
7	RHA	20	80	80	80	—	—
8	〃	20	40	—	20	—	—
9	〃	20	80	40	40	—	—
10	BCG	1280	1280	1280	1280	640	640
11	〃	1280	1280	640	1280	640	640
12	〃	1280	1280	640	1280	160	320
14	青山B(生)	320	320	320	320	320	320
15	〃	1280	640	320	320	160	160
16	青山B(死)	320	640	1280	1280	640	160
17	〃	320	640	320	640	320	640
19	無処置	10	40	—	—	—	—
20	〃	—	20	—	—	—	—

表 3　沈降反応成績　（抗体価）

血清番号	免疫元	仲野蛋白	仲野多糖体	仲野燐脂質(B.N)	BCG燐脂質(B.N)	仲野燐脂質(A)
1	BA	16	—	16	8	16
2	〃	8	—	16	16	16
3	〃	64	—	64	16	64
4	RC	8	2	—	—	—
5	〃	16	4	—	—	—
6	〃	8	8	—	—	—
7	RHA	—	—	—	—	—
8	〃	—	—	—	—	—
9	〃	—	—	—	—	—
10	BCG	64	16	64	64	64
11	〃	16	8	16	32	32
12	〃	64	16	32	32	8
14	青山B(生)	32	4	—	—	—
15	〃	16	4	16	16	16
16	青山B(死)	32	8	64	64	32
17	〃	64	4	32	64	32
19	無処置	—	—	—	—	—
20	〃	—	—	—	—	—

し，多糖体及び蛋白感作血球が，完全に遊離の脂質（燐脂質を含む）を除去した菌体 RC で免疫した血清と高度に反応したにも拘らず，燐脂質感作血球は本血清とは全く反応しなかつた。以上の成績は菌体燐脂質がツベルクリン蛋白及び多糖体と同様血球感作能力を持ち，且つ，生体内において燐脂質抗体は多糖体及び蛋白抗体とは別個に独立して産生される事を意味する。又本表に見られる如く，いづれの抗元で感作した血球も，結合脂質まで完全に除去した菌体残渣 RHA の免疫血清とは殆んど反応を示さなかつた。

沈降反応の成績は表3に示した通り，一般的傾向は赤血球凝集反応の成績と略一致したが，ただ多糖体は赤血球凝集反応に於て抗 BA 血清と強く反応したにも拘らず，沈降反応では陰性であつた事が注目される。

結核菌の燐脂質は一般動植物の燐脂質と違つて多糖類を多く含んでいるのがその特徴の1つであり，一方赤血球凝集反応における主たる血球感作物質は多糖体考えられて

表 4　赤血球凝集反応阻止試験　1

血清　No. 10　160 倍

阻止抗元 / 感作抗元	仲野多糖体	仲野蛋白	青山BOT	仲野燐脂質(B.N)	BCG燐脂質(B.N)	仲野燐脂質(A)
仲野多糖体	16	8	—	—	—	—
仲野蛋白	256	128	32	—	—	—
青山BOT	1024	128	128	—	—	—
仲野燐脂質(B.N)	—	32	—	1024	512	512
BCG燐脂質(B.N)	—	16	—	1024	512	128
仲野燐脂質(A)	—	256	—	1024	2048	2048

註）阻止に要した抗元量は 1/数字 mg. 但し OT は数字 ×10 倍

表 5　赤血球凝集反応阻止試験　2

血清　No. 14　40 倍

阻止抗元 / 感作抗元	仲野多糖体	仲野蛋白	青山BOT	仲野燐脂質(B.N)	BCG燐脂質(B.N)	仲野燐脂質(A)
仲野多糖体	32	8	—	—	—	—
仲野蛋白	256	32	16	—	—	—
青山BOT	1024	128	128	—	—	—
仲野燐脂質(B.N)	—	32	—	1024	512	128
BCG燐脂質(B.N)	—	64	—	2048	1024	512
仲野燐脂質(A)	—	256	—	2048	2048	2048

註）前同

いるので，燐脂質による血球感作も中に含まれる多糖体による可能性が考えられる。これを鑑別するために阻止試験を行つた。表4，5はその成績である。血清は6種の抗元に対して大体等しい赤血球凝集価を持つている No. 10 と No. 14 を使用したが，成績は両方とも同様の傾向を示した。即ち燐脂質感作血球の凝集反応は燐脂質自身によつて強く阻止され，「ツ」多糖体によつては全く阻止されなかつた。但し蛋白分劃によつてある程度阻止された。又逆に燐脂質は「ツ」多糖体，蛋白，ツベルクリンで感作した赤血球凝集反応を全然阻止しなかつた。又多糖体はそれ自身によつて最も強く阻止されたが，蛋白，ツベルクリンで感作した赤血球凝集反応は，それ等自身よりも多糖体によつて最も強く阻止された。

総括及び考案

赤血球凝集反応の本態については Middlebrook[6)7)8)] は多糖体と推定し，Scott と Smith[9)]，Gerne-Rieux[10)]，Pound[11)] も同様の報告をしている。又 Boyden[12)] は赤血球を予めタンニン酸で処理することになつて蛋白が吸着されるとしているが，これに反応して根津[13)]，若倉[14)]進藤[15)] は多糖体ばかりでなく，前処置なしに蛋白によつても感作する事が出来ると主張している。

Boquet et Nègre の燐脂質（メチル抗元），Anderson の燐脂質は補体結合反応や沈降反応の抗元として既に使用されており，この活性因子は燐脂質と考えられているが (Pinner[16)]，Doan[17)]，Chargoff と Shaefer[18)])，我々はこれらの燐脂質を赤血球凝集反応の抗元として使用し，燐脂質も亦赤血球凝集反応の血球感作元となる事を知り得た。而して燐脂質が赤血球凝集反応＋沈降反応に於て，脱脂菌体残渣で免疫した抗血清と反応しなかつた事，及び阻止試験に於て「ツ」多糖体と交叉反応を示さなかつた事からみて，燐脂質による赤血球凝集反応の抗元体系は少くとも「ツ」多糖体による赤血球凝集反応の夫とは全く別個の独立したものであるといい得る。

次に，本報告の趣旨とは直接関係はないが，本実験に使用した蛋白劃分は化学的性状からみて，かなりの多糖体を含んでおり，且つ蛋白感作血球の凝集反応が，蛋白劃分自身によるよりも多糖体によつてより強く阻止された事実から見ると，蛋白劃分による赤血球凝集反応が，果して蛋白自体の感作によるものか，中に含有されている多糖体によるものかは目下のところ明確でない。又完全脱脂菌体残渣 RHA の抗血清はいずれの抗元とも殆んど反応しなかつた事から考えると，生体内において結核菌に対する各種抗体の産生には菌の結合脂質が重要な役割を演じている事を示唆するものと思われる。

結　　論

1) 結核菌体燐脂質は赤血球凝集反応において鋭敏な血球感作抗元になり得る。

2) 燐脂質による赤血球凝集反応の抗元体系は少くともツベルクリン多糖体による赤血球凝集反応の夫とは全く別個で独立している。

3) 結核菌体燐脂質は，抽出菌体の加熱非加熱を問はず，又抽出方法の如何によらず（Poguet et Nègre 法，Anderson 法）すべて殆んど同様に血球の感作元になり得る。

文　　献

1) Seibert, F. B.,: Am. Rev. Tuberc., 49, 86, 1949.
2) Boquet, A., and Nègre, L.,: Ann. Inst. Pasteur., 37, 787, 1923.
3) Anderson. R, J.,: Fortschr. Chem. Org. Natursloffe., 3, 145, 1939.
4) Allen, R. J. L.,: Biochem. J., 34, 858, 1940.
5) Bukonz, S. C., Rein, C. R., and Kent, J. F.,: J. Lab. and Clin. Med., 31, 394, 1946.
6) Middlebrook, G., Dubos, R.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
7) Middlebrook, G.,: Am. Rev. Tuberc., 62, 233, 1950.
8) Middlebrook, G.,: J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
9) Scott, N. P., and Smith, D. J.,: J. Lab. Clin. Med., 35, 303, 1950.
10) Gernez-Rieux, C. H., and Toquet, A.,: Ann. Inst. pasteur., 3, 1, 1950.
11) Pound, A. W.,: J. Path. Bact., 64, 136, 1952.
12) Boyden, S. V.,: J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
13) 根津尚光：日細．8，777，昭和28年．
14) 若倉和美：アレルギー．2—1，110，昭和29年．
15) 進藤宙二他：YOKOHAMA. Med. Bull., 3, 298, 1952.
16) Pinner, M.,: Am. Rev. Tuberc., 17, 86, 1928.
17) Doan. C. A.,: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 26, 672, 1929.
18) Chargaff, E., and Schaefer, W.: Ann. Inst. Pasteur. Iiv. 708, 1935.