



Title	結核における赤血球凝集反応の研究：特に抗原加熱の影響について
Author(s)	小野, 勝男; ONO, Katsuo; 高橋, 義夫 他
Description	
Citation	結核の研究, 9, 1-5
Issue Date	1958-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26651
Type	departmental bulletin paper
File Information	9_P1-5.pdf



原 著

結核における赤血球凝集反応の研究

特に抗原加熱の影響について

小野 勝男 高橋 義夫

(北海道大学結核研究所予防部 主任 高橋義夫教授)

(昭和 33 年 7 月 28 日受付)

結核における赤血球凝集反応に於て、血球感作抗原は主として多糖体と考えられ、又血球を予めタンニン酸で処理した場合には蛋白が感作抗原になると考えられている。著者は非加熱ツベルクリン及び加熱ツベルクリンより得た 12 種の多糖体及び蛋白画分を用いて、Middlebrook-Dubos 反応及び Boyden 反応を追及、同時に抗原加熱の影響を検討した。以下その成績を報告する。尚、これらの抗原は著者の一人高橋が分離したものである。

実験材量及び実験方法

抗原の製法

1) 蛋白画分 P: H37Rv ソートン 8 週培養濾液 (9 l) をザイツ濾過, rotary evaporator で 300 cc に濃縮 (45°C 以下), これに核酸を除去する目的で上清に沈澱の出来なくなるまで複合ストレプトマイシンを加え, 遠心して沈澱を除去, 上清に三塩化醋酸を加えて pH 1.0 とし, 一昼夜氷室に放置後遠心分離し, 沈澱を蒸溜水 (pH 6.0) で数回洗滌後再び弱アルカリ水に溶解, 三塩化醋酸で沈澱させる操作を数回くり返して精製したものの。(収量 2050 mg, 窒素量 10.6%)

2) 蛋白画分 PD: 上記 P 700 mg をアルカリ水に溶解し, 遠心して不純物を除去, 三塩化醋酸で沈澱を生ぜしめ, 再びアルカリ水に溶解し, セロファン囊中で流水で 2 日, 蒸溜水で 1 日透析し, 最後に三塩化醋酸で pH 4.0 にして沈澱を生ぜしめ, これを乾燥したものの。(収量 380 mg, 窒素量 9.2%, 上清の Molish 反応陰性)。

3) 蛋白画分 PH: 上記 P をアルカリ溶液とし, 遠心して不純物を除去, 三塩化醋酸で pH 4.0 にして沈澱して沈澱を生ぜしめ, 沈澱物に 1% 塩酸 100 ml を加

えて 40°C 前後の重濃煎上でマグネチックスターラーで攪拌しながら 10 時間加水分解した。この溶液に 10% 三塩化醋酸を少量加えて完全に沈澱を生ぜしめ, 遠心分離, 10% 三塩化醋酸で数回洗滌後, 蒸溜水で上清の Molish 反応が陰性となるまで洗滌, 乾燥したものの。(窒素量 9.7%)

4) 多糖体画分 PsQC: P を分離した残りの濾液を流水で透析 (2 日), 遠心して不純物を除去, これに Sevag の方法により, クロロホルム・アミルアルコール混合液 (4:1) を約 1/5 量加えて, 分離漏斗で強く振盪し, これを 3 回くり返して除蛋白し, これにメタノールを 45% に加えて 24 時間放置して沈澱したものを蒸溜水とメタノールで溶解沈澱をくり返して精製したものの。(窒素量 0.17%)

5) 多糖体画分 PsQV: PsQC をとつた残りの液を rotary evaporator で 40°C で 1/10 に濃縮, これにメタノールを 80% に加えて, 24 時間放置後沈澱物を分離, 蒸溜水とメタノールで精製したものの。(窒素量 0.22%)

6) 多糖体画分 PsQQ: PsQV をとつた残りの液を再び重濃煎上で 1/15 に濃縮, 95% にメタノールを加えて出来た沈澱を同じ様にして精製したものの。(窒素量 1.00%)

7) 蛋白画分 hP, hPD, hPH, 多糖体画分 hPsQC, hPsQV, hPsQQ: 前述の H37Rv ソートン 8 週培養を高圧滅菌釜で 120° 30 分加熱し, 濾液を非加熱のものと同様の方法で分画したものの。(窒素量 hP 10.3%, hPD 11.3%, hPH 10.3%, hPsQC trace, hPsQV 0.65%, hPsQQ 2.47%)

使用した抗原は以上の如くであるが, 蛋白画分は窒素量からみて可成りの多糖体が混在していると考えられ

る。これは糖蛋白の型のものであろう。

免疫血清

家兎免疫血清を使用した。本実験に使用した免疫血清の内、No. 6とNo. 12は前回の実験²⁾に使用したもので、No. 6は菌体RCで、No. 12はBCG生菌で免疫したものである。No. 21は家兎にBCG生菌を4回に分け合計皮下に17mg、腹腔内に10mg、静脈内に7mg注射して免疫したものである。これらの免疫血清は、採取後ザイツ濾過、56°C 30分非働化して4°Cの氷室に保存したが、赤血球凝集反応に際しては、血清0.2mlに感作血球に使用したのと同じ血球の10%浮遊液1.0mlを加え、室温10分2回吸収し、異種血球凝集素を除去して使用した。

血 球

脱線維した綿羊血球に等量の修正Alsever溶液²⁾を加えて4°Cの氷室に保存し、使用時にこのAlsever保存血液を遠心し、血球を希釈液で3回洗滌して使用した。Alsever保存血液は採血後3週間以上は使用しなかつた。

希 釈 液

特に指定した時以外は、すべてM/15 燐酸緩衝食水(pH 7.2)を使用した。

血清反応術式

1) Middlebrook-Dubos法(以下M・D法と略す)。血球感作方法は、特に指定した場合以外は、抗原0.5mg/希釈液1.0ml/packed cell 0.025mlとし、37°Cの孵卵器で2時間感作(30分毎に振盪)、希釈液で3回洗滌後、2.5%感作血球浮遊液を作つた。又ヴィダール試験管に被検血清を0.5mlづつ倍数希釈して、これに前記の感作血球浮遊液0.05mlづつを加え、37°Cの孵卵器で2時間加温(30分毎に振盪)、14~18時間室温に放置した後、管底に沈澱した血球の状態によつて判定した。判定基準は図1に示した。尚①感作血球+希釈液、②非感作血球+被検血清の最高濃度を対照とした。



図1 判定基準

2) Boyden法(以下B法と略す): 大体Boyden³⁾の方法に準じて施行した。即ち2.5%血球浮遊液10mlに、同量の2000倍タンニン酸溶液を加えて室温に10分間放置後遠心し、希釈液で1回洗滌した。これに抗原1.5mg/希釈液50mlの抗原液を加えて室温10分感作後遠心し、0.4%に正常家兎血清を加えた希釈液(0.4

% NRS)で1回洗滌した後、10mlの0.4% NRSを加えて2.5%感作血球浮遊液とした。又被検血清をヴィダール試験管に0.5mlづつ1% NRSで倍数希釈し、これに前記の感作血球浮遊液0.05mlづつを加えて振盪、室温に14~18時間放置した後、M・D法と同様の基準で判定した。尚①感作血球+希釈液、②タンニン酸処理非感作血球+被検血清の最高濃度を対照とした。

3) 赤血球凝集反応阻止試験: 抗原液をヴィダール試験管に希釈液(B法では0.4% NRS)で0.5mlづつ倍数希釈し(第1管は抗原0.25mg/希釈液0.5mlとした)、これに8倍免疫血清0.05mlづつを加えて37°Cの孵卵器で30分吸収し、次で2.5%感作血球浮遊液0.05mlづつを加え、以後2)3)に記した方法と同様に施行した。阻止価は反応が陽性になる直前の試験管の抗原量の逆数で現した(例えば1/32mgならば32と記載した)。尚①感作血球+免疫血清+希釈液、②非感作血球+免疫血清+希釈液を対照とした。

4) 沈降反応: 重層法を用い、抗原希釈のみを行つて抗原価を測定した。

実 験 成 績

各抗原を感作原としてM・D法及びB法で赤血球凝集反応を行つた。又一部の抗原については感作濃度を変えて赤血球凝集反応(M・D法)を行い、又沈降反応を行つた(表1, 2)。M・D法では、多糖体画分の内、PsQC、hPsQCは共に感作力がなく、PsQV、PsQQに感作力があつたが、その加熱画分であるhPsQV、hPsQQには

表1 各抗原の赤血球凝集価と沈降価
血清 No. 12

抗 原	赤血球凝集価		沈 降 価 (抗原価)
	M・D 法	B 法	
P	640	1280	64,000
PD	640	1280	
PH	640	640	
PsQC	0	0	10,000
PsQV	640	0	320,000
PsQQ	640	0	320,000
hP	640	0	8,000
hPD	640	0	
hPH	640	0	
hPsQC	0	0	10,000
hPsQV	0	0	320,000
hPsQQ	0	0	40,000

表 2 抗原濃度を変えて感作した場合の
赤血球凝集価 (M・D 法)

血清 No. 12

抗原	抗原濃度 Per ml						
	5 mg	1 mg	0.5 mg	0.25 mg	0.1 mg	0.01 mg	
P		640	640	640	640	0	
PsQC	0	0	0	0	0	0	
PsQV	640	640	640	640	640	160	
PsQQ	640	640	640	640	320	0	
hP		640	640	640	640	0	
hPsQC	0	0	0	0	0	0	
hPsQV	320	0	0	0	0	0	
hPsQQ	0	0	0	0	0	0	

感作力が無かつた。但し hPsQV は全く感作力が失われたのではなく、高濃度を用いた時には陽性反応が現れた。これに反して蛋白画分では非加熱、加熱画分共に感作力を持つていた。B 法では非加熱蛋白画分のみが感作力を持ち、加熱蛋白画分、多糖体画分には感作力がなかつた。沈降反応では、PsQC、hPsQC は低希釈でのみ反応が起つた。PsQV、PsQQ は共に高希釈まで反応したが、赤血球凝集反応では陰性であつた hPsQV、hPsQQ も亦相当高希釈まで反応したのが注目される。蛋白画分は多糖体画分に較べて、低希釈で反応が起つた。

次に M・D 法では PsQV、PsQQ、P、hP を感作原とし、B 法では P を感作原として、各抗原を阻止抗原として阻止試験を行つた (表 3)。M・D 法では、多糖体画分を感作原とした場合は、蛋白画分よりも多糖体画分によつて強く阻止されたが、蛋白画分を感作原とした場合でも、同様に蛋白画分よりも多糖体画分によつて強く阻止された。又、B 法で蛋白画分を感作原とした場合は、

表 3 赤血球凝集反応阻止試験成績

血清 No. 12 8 倍血清

阻止抗原	感作抗原					
	P	hP	PsQV	PsQQ	P	
	M・D 法					B 法
P	64	64	32	32	128	
PsQC	0	0	0	0	0	
PsQV	256	256	128	128	0	
PsQQ	128	256	32	64	0	
hP	16	8	4	0	64	
hPsQC	0	0	0	0	0	
hPsQV	256	256	64	64	0	
hPsQQ	128	128	32	32	0	

0 は 4 以下を示す。

蛋白画分によつてのみ強く阻止され、多糖体画分によつては全く阻止されなかつた。

加熱多糖体画分 (hPsQV、hPsQQ) は先に述べた様に、血球感作力を失つてゐるが、阻止価、沈降価は非加熱画分 (PsQV、PsQQ) と大差ない事がわかつたので、非加熱画分を加熱する事によつて、加熱画分と同様の性質を持つた抗原を作り得るのではないかと考え、次の様な実験を行つた。即ち PsQV を 1 mg/ml に生食水に溶解し、N/10 塩酸、N/10 苛性ソーダを用いて、pH 4.0、pH 7.0、pH 10.0 の 13 通りの抗原液を作り、Koch 釜で 100°C、15 分、30 分、60 分、120 分、240 分加熱し、直ちに N/10 塩酸と N/10 苛性ソーダで pH 7.0 にもどして、これを感作原として赤血球凝集反応を行つた (表 4)。又加熱前と 240 分加熱後の抗原について赤血球凝集反応阻止試験と沈降反応を行つた (表 4)。阻

表 4 PsQV を pH 4.0、pH 7.0、pH 10.0 で 100°C に加熱した場合の赤血球凝集価、同阻止価、及び沈降価

(1) 赤血球凝集価

血清	pH	加熱前					
		15'	30'	60'	120'	240'	
No. 21	4	1280	1280	1280	640	320	320
	7	1280	1280	1280	1280	640	640
	10	1280	640	640	320	320	0
No. 6	4	320	320	320	320	160	160
	7	320	320	320	320	320	160
	10	320	320	320	160	160	0

(2) 赤血球凝集反応阻止価感作抗原 PsQV

血清	pH	240'	
		加熱前	加熱後
No. 21	4		256
	7	256	256
	10		256
No. 6	4		512
	7	512	512
	10		512

(3) 沈降価
血清 No. 21

血清	pH	240'	
		加熱前	加熱後
No. 21	4		800,000
	7	800,000	800,000
	10		800,000
No. 6	4		400,000
	7	400,000	400,000
	10		400,000

止試験の感作抗原には PsQV を用いた。成績は表 4 に示す様に、pH 4.0、pH 7.0 では、240 分加熱後に於ても軽度の赤血球凝集価の低下を示したに過ぎないが、pH 10.0 では、240 分加熱後に凝集価は 0 となり、アルカリ性で加熱する場合には、酸性又は中性で加熱する場合よりも容易に感作力が失われる事がわかつた。この場合でも阻止価、沈降価は加熱前に較べて全然低下しなかつた。

総括及び考案

赤血球凝集反応の本態については、Middlebrook⁴⁾⁵⁾⁶⁾は多糖体と推定し、Scott と Smith⁷⁾、Gernez-Rieux⁸⁾、Pound⁹⁾、も同様の報告をしている。又 Boyden³⁾は赤血球を予めタンニン酸で処理する事によつて蛋白が吸着されると報告している。本実験に於ても表3に示す様に、M・D法では、多糖体画分を感作原とした場合でも、蛋白画分を感作原とした場合でも、多糖体によつてより強く阻止され、B法では、蛋白画分を感作原とした場合には、蛋白画分によつて阻止されるが、多糖体画分によつて阻止されないと云う事実から、M・D法では多糖体が感作原となり、B法では蛋白が感作原となると考えられる。

次に、ツベルクリン多糖体をメタノールで分画した場合、どの分画に血球感作力があるかと云う問題については、既に幾つかの報告がある。即ち、Pound⁹⁾は75～87%メタノール沈澱物、浅見等¹⁰⁾は50%メタノール上清からの83%メタノール沈澱物、武田等¹¹⁾は50～80%メタノール沈澱部分と云う様に略一致した成績を得ている。本実験の成績も、以上の報告と略一致して、45%沈澱部分には感作力がなく、45～80%、80～95%に感作力がある事を認めた。且後二者は阻止試験の成績から、血清学的に同一のものと考えられた。以上の成績から45～95%沈澱部分に感作力、阻止力があり、沈降反応に於ても家兔免疫血清と強く反応し、45%沈澱部分には、感作力、阻止力共になく、沈降反応では家兔免疫血清とは僅に反応するに過ぎないと結論する事が出来る。武田等¹¹⁾は又、この感作力を有する画分が、Seibertの多糖体Iに一致する事を示している。

次に加熱の影響については、本実験に於て、酸性、中性で加熱した場合でも感作力に多少の低下が認められるが、特にアルカリ性で加熱した場合には著明な低下を来すと云う成績を得た。この事実はIland と Peacock¹²⁾、佐々木¹³⁾、も指摘しており、又、根津¹⁴⁾は培地のpHがアルカリ性に傾き、37°Cで永い間加温されていると感作力を失うと述べている。

而して、感作力を失つた多糖体画分でも、尚阻止力を持ち、且つ沈降反応に於ける抗原価が低下しないと云う事実は次の様に説明されると思う。即ち、赤血球凝集反応の機転は未だ明確に解明されていないが、(1)抗原が血球表面に吸着される。(2)血球表面に吸着された抗原が、血清中の抗体と結合する、と云う2つの段階を経て行われると考えられているが、阻止力を持ち、沈降反応で反応すると云う事は、抗体と結合する能力は保持し

ているが、血球に吸着する能力を失つたと理解するのが妥当であろう。それ故化学的には同じ位の量の多糖体Iを持つている画分であつても、血球に吸着し得る多糖体の量と吸着しない多糖体の量の比は、培養条件、分画法、保存法等の相違によつて異つてくるのが当然と考えられる。或る画分に於て、血球に吸着し得る多糖体の量を化学的に測定した実験は余りないが、Middlebrook¹⁵⁾は彼がツベルクリンから得た多糖体画分では、約40%が吸着されたと報告し、中島¹⁶⁾は結核菌の水性浸出液で約30%の多糖体が吸着されたと報告している。Iland と Peacock¹²⁾は、粗多糖体抗原を連続的に血球で吸収し、赤血球凝集反応が殆んど起らなくなつた後でも、なお沈降価は吸収前と変らなかつた事実から、多糖体が感作原ではないと述べているが、この様な実験成績から感作物質が多糖体でない結論するのは、上記の様な理由から妥当ではないと考えられる。

又、表1に示す様に、加熱多糖体画分(hPsQV, hPsQQ)は感作力を失つているのに対して、加熱蛋白画分(hP, hPD, hPH)に含まれている多糖体は感作力を持つていると云う理由は、これが蛋白によつて保護されていると想像されるが、目下のところ明確ではない。Meynell¹⁷⁾はPPD、菌体の尿素抽出物、水性抽出物について、感作力と阻止力を検討したが、PPDは阻止力に比し、感作力が特に強い事を述べているのが注目される。

結 論

非加熱「ツ」及び加熱「ツ」より、それぞれ3種の蛋白画分と3種の多糖体画分を得て、赤血球凝集反応、同阻止試験、沈降反応を行つて、次の如き成績を得た。

1) 赤血球凝集反応に於て、M・D法では多糖体が血球感作原となり、B法では蛋白が血球感作原となると考えられる。

2) 多糖体画分では、45%メタノール沈澱部分には血球感作力、阻止力共になく、沈降反応で家兔免疫血清と僅に反応するに過ぎないが、45～80%、80～95%メタノール沈澱部分に血球感作力、阻止力があり、沈降反応に於て家兔免疫血清と強く反応する。且後二者は血清学的に同一のものであると考えられる。

3) 蛋白画分は、本実験の様な条件で透析、加水分解しても、赤血球凝集価の著明な変化を来さない。

4) 多糖体画分(M・D法)、蛋白画分(B法)は、加熱(特にアルカリ溶液中で)によつて赤血球凝集価の消失乃至著明な低下を来すが、阻止価、沈降価は著明な変化を来さない。これは抗原が抗体と結合する能力を失

つたのではなく、血球に吸着する能力を失つたものと考えられる。

文 献

- 1) 高橋義夫・小野勝男：結核の研究，7, 1, 1957.
- 2) Bukonz, S. C., Rein, C. R., and Kent, J. F.: J. Lab. and Clin. Med., 31, 394, 1946.
- 3) Boyden, S.V.: J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 4) Middlebrook, G., and Dubos, R.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 5) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 65, 233, 1950.
- 6) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
- 7) Scott, N.B., and Smith, D.J.: J. Lab. Clin. Med., 35, 303, 1950.
- 8) Gernez-Rieux, C.H., and Tacquet, A.: Ann. Inst. Pasteur., 3, 1, 1950.
- 9) Pound, A.W.: J. Path. Bact., 64, 136, 1952.
- 10) 浅見望他：日細，9, 271, 1954.：日細，9, 315, 1954.
- 11) Takeda, Y., Aoki, Y., and Watanabe, T.: Jap. J. Tuberc., 2, 3, 307, 1954.
- 12) Iland, C.N., and Peacock, D.B.: Ciba Foundation Symposium., 163, 1955.
- 13) 佐々木馨：北海道医学雑誌，30, 1, 15. 昭和30年.
- 14) 根津尙光：日細，8(7), 777, 1953.
- 15) Middlebrook, G.: Bull. N. Y. Acad. Med., 28, 474, 1952.
- 16) 中島滋：金沢医大結研年報，10年下巻，312, 昭和26年.
- 17) Meynell, G.G.: J. Path. Bact., 67, 137, 1954.