HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究：III 各種沈降法によってえたツベルクリン蛋白の比較
Author(s)	奥山, 春枝; 太田, 明彦; 森川, 和雄
Description	
Citation	結核の研究, 20, 19-25
Issue Date	1964
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26746
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_P19-25.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ツベルクリン蛋白の抗原性に関する研究

Ⅲ　各種沈降法によってえたツベルクリン蛋白の比較

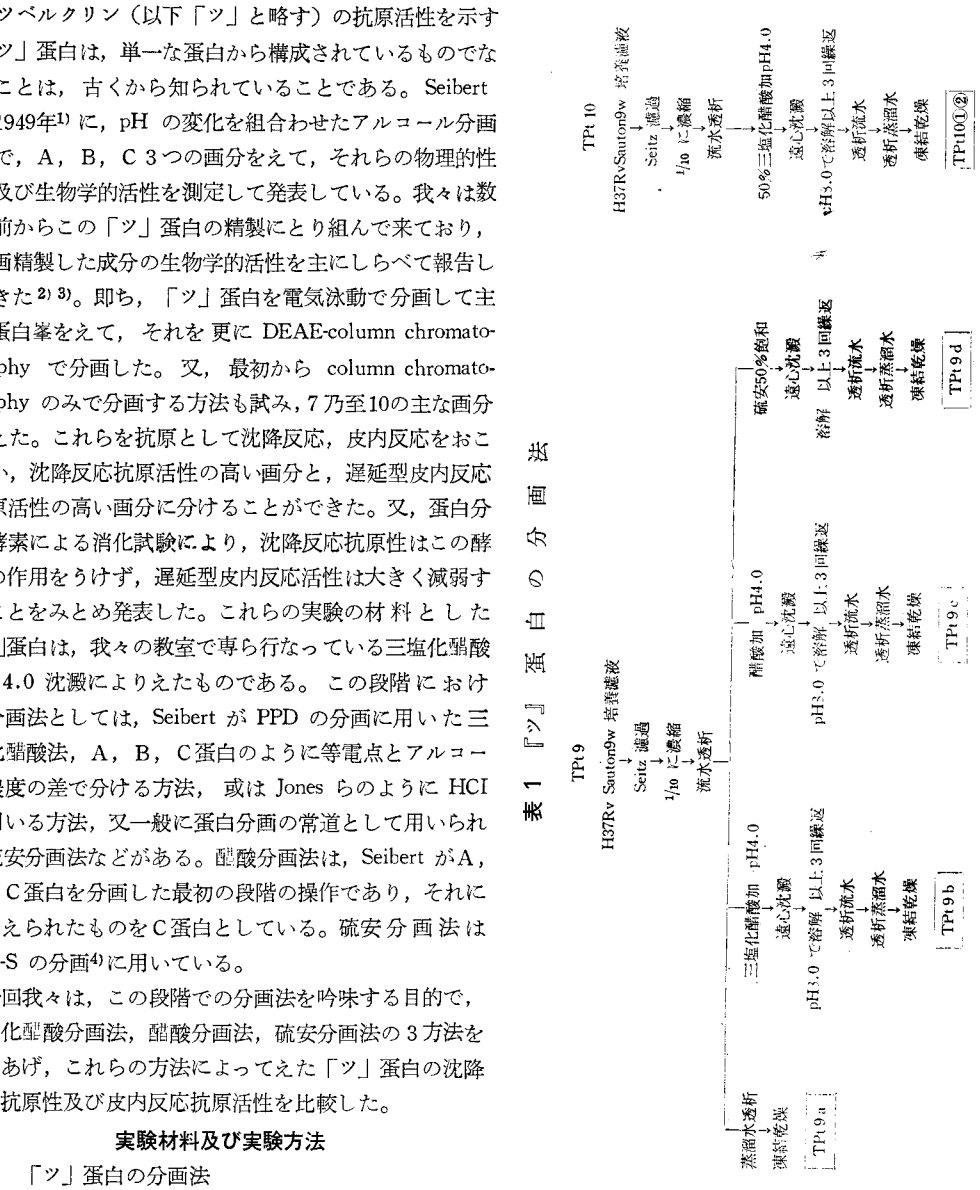
奥山春枝・太田明彦・森川和雄
（北海道大学結核研究所病理部）

（昭和38年12月10日受付）

ツベルクリン（以下「ツ」と略す）の抗原活性を示す「ツ」蛋白は，単一な蛋白から構成されているものでないことは，古くから知られていることである。Seibert は1949年[1]に，pH の変化を組合わせたアルコール分画法で，A，B，C 3つの画分をえて，それらの物理的性状及び生物学的活性を測定して発表している。我々は数年前からこの「ツ」蛋白の精製にとり組んで来ており，分画精製した成分の生物学的活性を主にしらべて報告してきた[2)3)]。即ち，「ツ」蛋白を電気泳動で分画して主な蛋白峯をえて，それを更に DEAE-column chromatography で分画した。又，最初から column chromatography のみで分画する方法も試み，7乃至10の主な画分をえた。これらを抗原として沈降反応，皮内反応をおこない，沈降反応抗原活性の高い画分と，遅延型皮内反応抗原活性の高い画分に分けることができた。又，蛋白分解酵素による消化試験により，沈降反応抗原性はこの酵素の作用をうけず，遅延型皮内反応活性は大きく減弱することをみとめ発表した。これらの実験の材料とした「ツ」蛋白は，我々の教室で専ら行なっている三塩化醋酸 pH 4.0 沈澱によりえたものである。この段階における分画法としては，Seibert が PPD の分画に用いた三塩化醋酸法，A，B，C蛋白のように等電点とアルコール濃度の差で分ける方法，或は Jones らのように HCl を用いる方法，又一般に蛋白分画の常道として用いられる硫安分画法などがある。醋酸分画法は，Seibert がA，B，C蛋白を分画した最初の段階の操作であり，それによりえられたものをC蛋白としている。硫安分画法は PPD-S の分画[4]に用いている。

今回我々は，この段階での分画法を吟味する目的で，三塩化醋酸分画法，醋酸分画法，硫安分画法の3方法をとりあげ，これらの方法によってえた「ツ」蛋白の沈降反応抗原性及び皮内反応抗原活性を比較した。

表1　『ツ』蛋白の分画法



実験材料及び実験方法

1.　「ツ」蛋白の分画法

人型結核菌 H37Rv の Sauton 培地9週間培養の培養濾液を，非加熱のまま表1のような操作で TPt 9a（生「ツ」），TPt 9b，TPt 9c，TPt 9d の4画分をえた。濃縮後の流水透析以後の全操作を，0℃～4℃の間の温度で行なった。生「ツ」aは，各分画蛋白の対照として用いた。更に，別の培養 lot から，三塩化醋酸処理操作を行なう際の温度の影響をみるために，低温と室温で操作して，それぞれの蛋白 TPt 10①と TPt 10②をえた。前者は低温操作によるものであり，後者は室温操作でえたものである。

2. 沈降反応

結核死菌感作兎の抗体価の高い血清を使い，抗原稀釈（「ツ」蛋白稀釈）と抗血清稀釈を組合わせて重層法で行なった。尚，抗原価は「ツ」蛋白原液を蛋白量1 mg/mℓ として4倍数稀釈を行なって，陽性を示す最高稀釈数で表わし，抗体価は，抗血清を倍数稀釈して最高陽性稀釈倍数で示した。

3. 皮内反応

皮内反応は家兎背部を用い，次のような感作群について行なった。

i) TPt 感作群：醋酸 pH4.0 で沈澱された「ツ」蛋白 1.5mg を家兎臀部皮下に1日おき10回注射して感作した。

ii) Acetone 死菌感作群：acetone 内に1週間放置して殺した H37Rv 死菌（乾燥量）4 mg/mℓ に Arlacel 1：Drackeol 9 の割合で混じた adjuvant を等量加えたものを，2 mℓづつ家兎臀部皮下に5日おき5回注射して感作した。

iii) 加熱死菌感作群：加熱 H37Rv 死菌の乾燥量4 mg/mℓ に上記と同様の adjuvant を等量加え，その2 mℓを5日おき5回家兎臀部皮下に注射した。

各兎の背部を剪毛し，sample a，b，c及びdを，窒素量各1r を0.1 mℓ生食水にとかして皮内に注射し，又対照の意味で PPD を sample 量で10r 同じく0.1mℓ生食水にとかして皮内注射した。注射後，1，3，6，24，48及び72時間後に発赤の大きさ，硬結の程度としては皮膚の厚さの増加度を測定し，平均直径に皮膚の厚さの増加度をかけ合わせて反応の強さとし，図に示した。

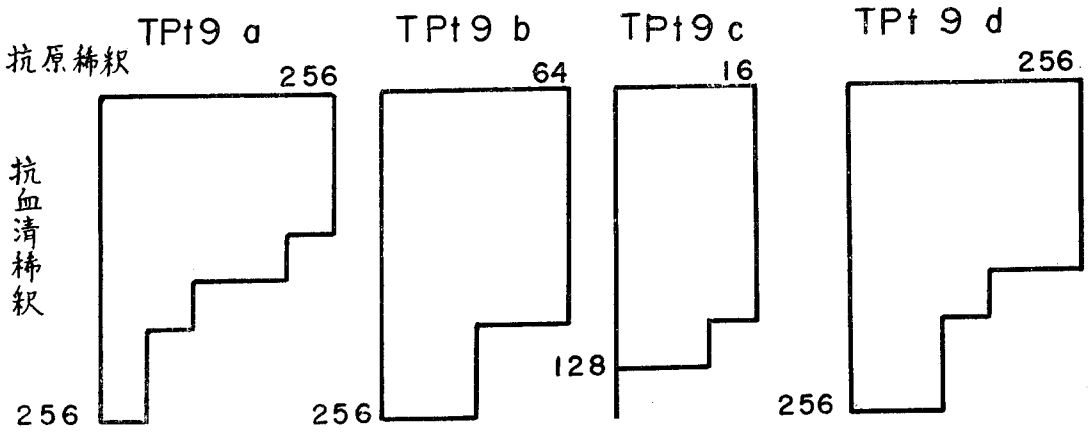
実 験 方 法

1. 「ツ」蛋白の性状

各方法でえた蛋白の収量及び窒素，糖含量を表2に示した。先ず収量についてみると，TPt 9 は何れも原液 80mℓからえた乾燥量である。aは蛋白の他に多糖体その他，セロハンバッグを通過しない成分が全部含まれているので，その収量も他の3蛋白よりはるかに多くえられた。b, c, d の収量を比較すると，cとdはほぼ同じ量

表2 Sample の 性 状

		収量 ツ原液 80mℓより	N Duma法%	糖 Anthron法 glucoseとして %
TPt9	a 生 ツ	1,336.0	2.73	49.4
	b 三塩化醋酸 pH4	223.0	12.86	1.87
	c 醋 酸 pH4	142.3	12.30	1.45
	d 硫 安 50%	147.6	12.17	1.22
		490mℓより		
TPt10	① 低 温	1,386.4	10.78	1.82
	② 室 温	1,457.8	10.46	2.07



抗血清：T744死菌感作　　抗原原液：1 mg/mℓ

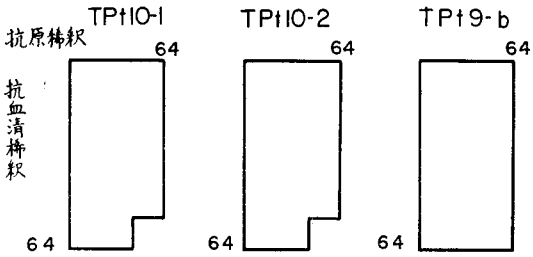
図1 沈 降 反 応 その1

で，bがかなり沢山えられた。又 TPt 10の①と②を比較すると，室温即ち②の方が僅かに多量であった。窒素含量は，aが一番少ないが，b, c, d 間の比較ではほぼ同じ値を示した。TPt 10 は TPt 9 よりもやや低い価であるが，①と②では同じであった。糖含量は，aが49.4%で多く，他の3画分は何れも2%以下を示した。TPt 10 の①は②より低いが，TPt 9 のbとほぼ同じ価を示した。

2. 沈降反応抗原性

死菌感作兎 T744 の抗血清で TPt 9 の各画分の抗原性をしらべた。図1は，その場の形を表わしたものである。対照としたa画分をみると，抗体価256，抗原価256で，場の形ではかなりの階段状を示した。これと全く同じ価を示したのはd画分であった。b画分は，抗体価は同じく256であるが，抗原価は64であり，c画分は抗体価は1管低い128であり，抗原価は更に低く16を示した。

TPt 10 の抗原性を同じく死菌感作兎 T756 の抗血清でみると，図2のように，抗体価，抗原価共に両者全く



抗血清：T756死菌感作　　抗原原液1 mg/mℓ

図2 沈降反応 その2

同じで，更にTPt 9 dとの比較でも同価を示した。ただし場の形においては TPt 10 と TPt 9 の間に僅かの差がみられた。

3. 皮内反応抗原性

i) 「ツ」蛋白（TPt）感作兎における反応

この群の反応は一般に弱い反応であつたが，その時間的経過は測定した5例共同じであつたので，図3に全例の平均値で経過を示した。PPD が一番弱い反応であり，24時間で殆んど消褪したが，他の4画分はこれよりやや強く，同程度の強さを示した。その時間的経過は，何れも1乃至3時間が最も強く，24時間ではかなり減退し，48時間では殆んど陰性に近い定型的な速時型の反応を示した。

ii) Acetone 死菌感作兎における反応

前例と同様に平均値で図示した。家兎は10羽用いた。図4にみるように，反応の強さはaが僅かに強かつた。時間的経過は，PPD だけは24時間が最強で，他の4画分は3乃至6時間 peak を示した。前例の TPt 感作群と比較すると，24時間後の低下が少なく，48時間，72時間

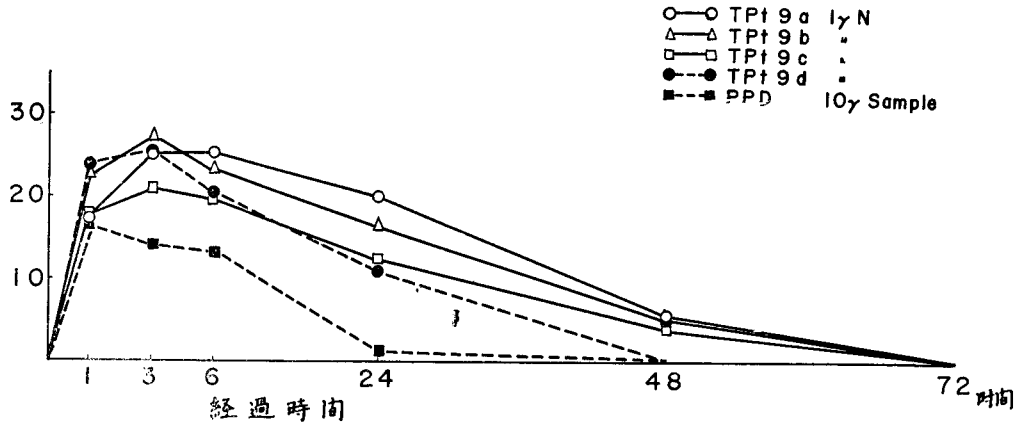


図3 Tpt 感作兎における皮内反応

にまだはつきりと反応の持続を示していた。

iii) 加熱死菌感作兎における反応

本群も10例の平均値で示した。反応の強さはaが僅かに強かつたが，他の4画分は殆んど同程度の強さの反応であつた。時間的経過は，acetone 死菌感作群よりはるかに遅延しており，24乃至48時間 peak で，72時間でもなおかなり強い硬結を伴なつた発赤を表わしていた。

iv) TPt 10 の皮内反応抗原性

TPt 10 ①と②の皮内反応抗原性を，前例に用いたと同じ3種の感作家兎群でしらべた。図6に示したように3群共室温操作でえた②の方が僅かに強い反応を示した

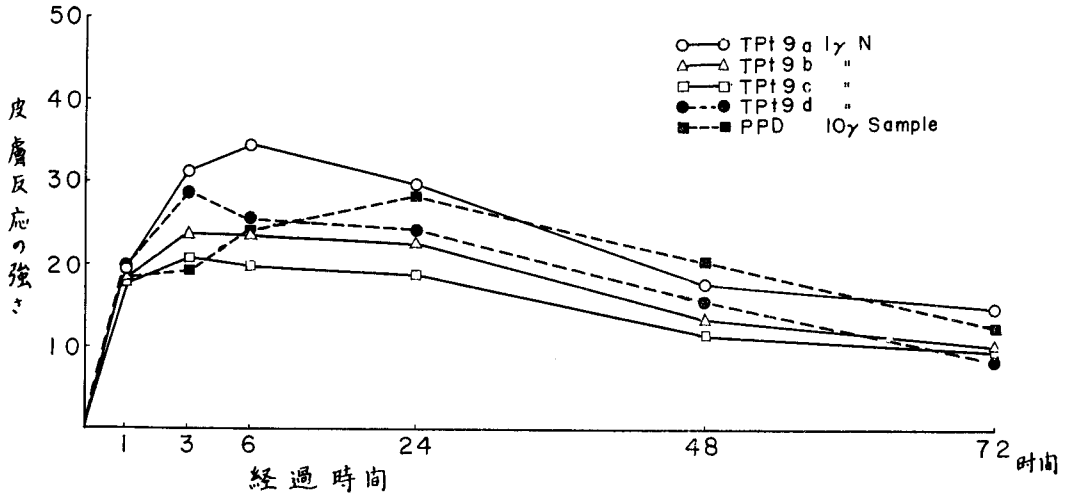


図 4 Acetone 死菌感作兎における皮内反応

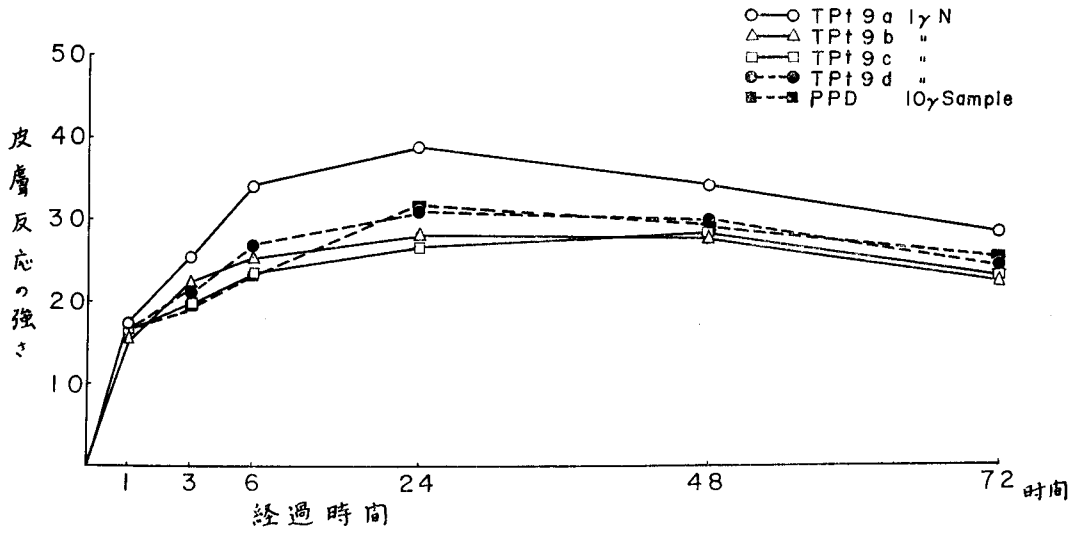


図 5 加熱死菌感作兎における皮内反応

が，大きい差ではない。反応経過をみると，①と②では全く同じ推移をした。ただ3感作群間の反応を比較すると，TPt 感作群と acetone 死菌感作群では6時間が最強で漸次減退し，加熱死菌感作群のみは24，48時間と急激に増強し，72時間で僅かに減退した。即ち6時間までの反応の強さは3群共同じであるが，その後の経過に大きな開きがみられた。

v) TPt 8 による皮内反応

今迄みられた感作群間の時間的経過の差が，更に TPt 8でもう1度たしかめた。TPt 8 は，三塩化醋酸 pH4.0 室温処理でえた「ツ」蛋白である。皮内反応は sampl 量を 10γ 皮内注射してしらべた。この3乃至6時間の反応が，前記抗原による反応よりかなり強いが，時間的経過をみると，TPt 感作群は6時間最強で，その後急激な減弱をし，加熱死菌感作群は48時間が最強の反応で，acetone 死菌感作群は丁度その中間型を示した。

総括及び考案

ツベルクリン活性物質の分離精製ということは，結核の研究分野における長年の課題である。古く1926年より Seibert 一門は，最近に至るまでツベルクリンの分画を試み，その活性物質の化学的，物理的及び生物学的性状を詳細に研究している。一方我国においても，戸田[5][6][7]

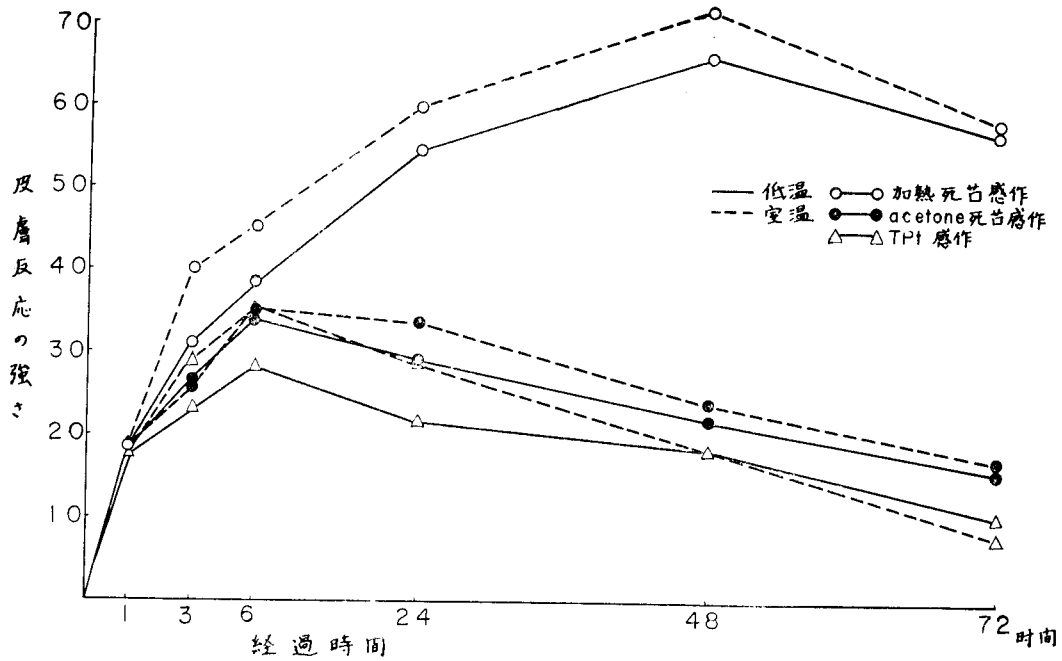


図 6 Tpt 10 による皮内反応

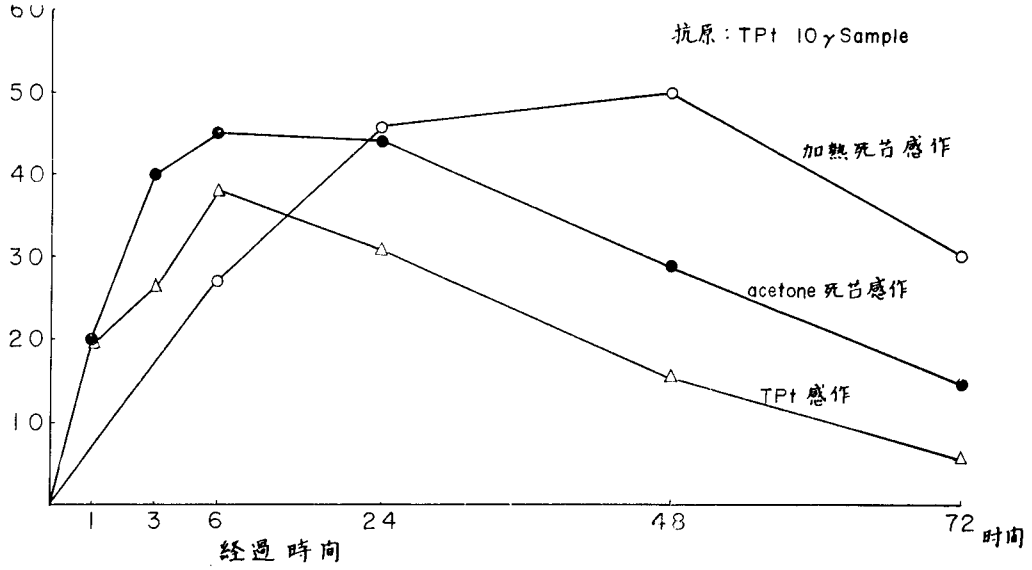


図 7 各種感作法による皮内反応経過の比較

らによるπの精製，武田[8]らの方法など報告されている。最近米田ら[9)10)11)12)]は，H37Rv の Sauton 培養を行ない，その3週間培地より硫安分画でえたツベルクリン蛋白を，更に電気泳動，DEAE-cellulose 又は Hydroxylapatite の column chromatography で分画精製して，化学的に純粋な蛋白を分離し，その物理的性状，或は寒天ゲル内沈降反応による抗原分析など行なつているが，その皮内反応抗原性は，化学的に純粋になるに従い活性が低下してしまい，その抗原物質の分離は出来なかつたようである。

さて，我々の教室では，米田らとは別の見地にたち，皮内反応抗原性即ちツベルクリン反応の最も特長とする遅延型皮内反応抗原を分離精製しようとこの数年実験してきた。その成績は今まで2篇の論文にまとめて発表したが，何れも，非加熱ツベルクリンより三塩化醋酸で沈澱してえた「ツ」蛋白を材料として，電気泳動及び column chromatography で精製したものである。これらの方法によって，結核血清との沈降反応で抗体価を高く表わす画分と，沈降反応抗原としては力価は低いが，皮内反応抗原として，特に遅延型反応を惹起するという点で優秀な画分とを分けることができた。その後，醋酸により pH4.0 でおとした TPt 7，或は硫安50%飽和でおとした TPt 8 を作って，同様操作を行なったところ，皮内反応抗原として望むべきものがえられず，又凍結乾燥後保存しているうちに活性が低下する傾向がみられた。蛋白分画法としては硫安分画法が最も広く用いられていて，蛋白の変性も少ないといわれているが，前記の点を考慮し，更に三塩化醋酸法の操作は簡便であるし，大量処理もらくに行なわれ，容易に透析で除きうるという利点があるので，この操作が「ツ」蛋白に対しどんな影響を与えるかということを，特に皮内反応抗原性に注目して実験を試みたのである。

この実験に用いた方法は「ツ」蛋白の分画として一般に用いられているところの，三塩化醋酸処理，硫安処理，醋酸処理の方法で行なって比較した。

先ず収量をみると，窒素含量，糖含量は大体同じであるにもかかわらず，三塩化醋酸処理でかなり大量えられた。しかし低温より室温操作の方が僅かであるが多いようである。沈降反応抗原性をみると，抗原価は硫安分画が一番高いが，抗体価の測定においては三塩化醋酸画分も同じ価である。すなわち，抗原価には4倍の違いがあるが，免疫血清の抗体価を測定する場合には，三塩化醋酸画分も十分使用することが出来る。尚醋酸画分を抗原とした際の抗体価は他の画分よりも低い価である。同一抗血清を用いた沈降反応であるにもかかわらず，この様な差が出るということは，醋酸画分の抗原価も低いことから，この最高の抗体価を示す抗体に対応する抗原濃度が，反応の場に用いた抗原原液においてもまだ反応を表わす有効濃度に達していないのではないかと考えられる。

次に皮内反応抗原活性についてみると，生「ツ」を入れた4抗原の比較では，同一兎においてはほぼ同じ強さの反応を惹起している。ただ死菌感作兎においては一般に生「ツ」が強い反応を示しているが，反応原量を窒素量一定にして用いたために，この生「ツ」には我々の用いた処置により沈降する蛋白以外の抗原物質がかなり混入していること，また処置をしない生のままということが抗原物質に変化を与えていないということなどがこの差をもたらしたものと考える。著者ら[3]が以前に報告したように，遅延型皮内反応は trypsin で抗原を処理することにより著明に減退させることができることから，蛋白がその反応原物質であることは明らかであるが，その意味より夾雑物の多い生「ツ」は反応原として不適当であることはいうまでもないと思う。従って他の3方法によりえた蛋白画分の比較が問題となるが，今回の我々の成績からみると，3者全く同じとみなしてよいようである。特に変性度が強いという懸念のある三塩化醋酸処理画分が，硫安或は醋酸処理画分と比較して全く差がないことが明らかである。更に同じ三塩化醋酸処理でも低温処理より室温処理の方が僅かではあるが常に強い反応であることは興味がある。

ここで特に注目されるのは，感作に用いた抗原の違いの影響である。この実験で皮内反応を行った兎は「ツ」蛋白感作，acetone 死菌感作及び加熱死菌感作の3群である。「ツ」蛋白感作は，adjuvant を用いないで食塩水溶液として皮下注射を繰返し行なって感作したものである。Seibert[13]，Raffel[14]，今井[15]及び山口[16]は，「ツ」蛋白のみの感作では沈降素を産生し，アナフィラキシーショックをおこす Arthus 型に感作され，精製 wax を同時に注射すると初めて遅延型反応を惹起すると報告している。我々の TPt 感作兎も全くその通りで，定型的な速時型の反応を呈する。一方加熱死菌感作は生菌感作と同様に，24乃至48時間が最も強い，むしろ48時間の方が硬結の著明な定型的な遅延型反応である。ところが，結核死菌を作る方法として acetone 内に長時間おいた場合，即ちアセトン可溶性脂肪が完全ではないがかなり除かれたと思われるアセトン死菌で感作すると，その皮内反応は「ツ」蛋白感作兎と加熱死菌感作兎の示す反応の丁度中間型を示している。その反応の時間的経過をみると，6乃至24時間に peak がみられる。Raffel[14][17][18]の一連の研究や，山口[16]，染谷[19]，らの報告によると，結核菌の wax D 又は精製蠟を抗原物質に添加することにより，遅延型に感作できるといわれているが，acetone 可溶性脂肪にはこのような作用は報告されていない。抗原物質に adjuvant の添加の影響もいわれているが，我々の実験では，acetone 死菌感作の場合も，加熱死菌感作の際と同じ adjuvant を加えて行なっているので，かかる明瞭な差が出ることはやはり acetone 処理の影響を

考慮しなければならないであろう。この解釈に都合のよい証拠は今のところ見当らず，今後の研究を必要とするであろう。

結　　論

1. H37Rv 結核菌9週間培養 Sauton 培地の非加熱濾液から，三塩化醋酸，醋酸及び硫安沈澱法でツベルクリン蛋白を分画し，各蛋白間の性状を比較して次の成績をえた。

2. 収量は三塩化醋酸法が最も多い。又，室温操作の方が低温操作より僅かに多量にえられる。

3. 沈降反応抗原性は，抗原価では硫安処理蛋白が一番高く，抗体価は硫安処理画分と三塩化醋酸処理画分が同じで，醋酸処理画分が低い。

4. 窒素量一定にしてはかった皮内反応抗原性は，3画分とも同程度，同型式の反応を示した。

5. 動物を感作する際に，抗原としてツベルクリン蛋白を用いた時は何れの画分に対しても速時型反応を示し，加熱死菌では遅延型を，acetone 死菌ではその中間型の反応を示した。

文　　献

1) Seibert, F. B.: Amer. Rev. Tuberc., **59**, 86 (1949)
2) 奥山，太田，森川：結核の研究**15**，45（昭36）
3) 奥山，太田，森川：結核の研究，**17**；**18**，7（昭38）
4) Seibert, F. B. & Glenn, J. T.: Amer. Rev. Tuberc., **44**, 9 (1941)
5) 貝原：福岡医学誌，**36**，597（1943）
6) 武谷：医学と生物学，**20**，200（1951）
7) 武谷，三淵：医学と生物学，**20**，254（1951）
8) 武田，河西，青木：日本細菌学雑誌，**6**，369(1951)
9) Yoneda, M. & Fukui, Y.: Biken's J., **4**, 25(1961)
10) Yoneda,M. & Fukui, Y.: Biken's J., **4**, 121(1961)
11) Fukui, Y.& Yoneda, M.: Biken's J., **4**, 187(1961)
12) 米田：結核，**38**，25（1963）
13) Seibert, F. B. & Munday, B.: Amer. Rev. Tuberc., **25**, 724 (1932)
14) Raffel, S.: J. Infect Dis., **82**, 267 (1948)
15) 金井：日本細菌学雑誌，**10**，1003（1955）
16) 山口：日本細菌学雑誌，**12**，373（1957）
17) Raffel, S., Arnaud, L. E., Dukes, C. D. & Huany, J. B.: J. Exp. Med., **90**, 53 (1949)
18) Raffel, S.: Experientia, **6**, 410 (1950)
19) 染谷：日本の医学の1959年Ⅲ，445（1959）