



| | |
|------------------|---|
| Title | 卵白アルブミン感作に及ぼす結核菌体脂蛋白画分のAdjuvant作用について |
| Author(s) | 浜田, 栄司; HAMADA, Eiji; 河内, 薫 他 |
| Description | |
| Citation | 結核の研究, 20, 27-32 |
| Issue Date | 1964 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/26747 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 20_P27-32.pdf |



卵白アルブミン感作に及ぼす結核菌体脂蛋白画分の Adjuvant 作用について

浜田 栄司・河内 薫

(北海道大学結核研究所病理部 主任 森川和雄教授)

(昭和38年12月10日受付)

弱い抗原物質を用いて、動物を感作する際に Adjuvant を添加することは、常に行われていることであるが、Adjuvant (以下 Adj と記す) を添加することによって抗体価を高め、皮膚感受性を増加せしめ、さらに従来の方法では、抗体を産生出来なかつたものに対しても、例えば picryl chloride に対して、抗原抗体反応をひきおこすことが出来る¹⁾ ようになって来た。

最も代表的な Adj としては、結核死菌を含んだ、Freund の complete Adj²⁾ である。その Adj 効果は、結核菌を含まない incomplete Adj に遙かにまさる。つまり結核死菌体には、抗体産生原を刺戟する作用があるわけである。

それでは菌体のどこにそのような作用があるのであろうか、菌体という物理的な形態に作用があるのか。それとも菌体に含まれる何か特殊な成分にあるのか、この解答は明確にはえられていない。

Raffel³⁾ は結核菌から抽出した蛋白画分を感作原として用いた場合、ツベルクリン感受性の発現は全菌体感作に劣る。又この蛋白を菌体全画分と一緒に感作すると、高い感作原性を発揮し、しかもそれによって現われて来る皮膚反応性は遅延型のものであることを見ている。又当研究室で奥山⁴⁾ は菌体全画分に卵白アルブミンに対する強い Adj 効果のあることを認めている。

かつて、Dienes⁵⁾ らは馬血清とか卵白アルブミンのような Arthus 型抗原物質でも結核性病巣に注射すれば遅延型の反応性を与えることを認め、さらに結核菌を混ざることによっても、Arthus 型抗原を遅延型抗原に一時的ながら変換出来ることが認められている。この作用も前記 Adj 作用の別の表現と考えざるをえない。

それでは菌体全画分以外にこのような作用を営む画分は存在しないか。当教室では、先年来結核菌体から Folch⁶⁾ の方法で抽出した脂蛋白画分が、結核症の結節性病変の成立に重要な役割を演ずることを認めており、⁷⁾

また、その際、脂蛋白画分で感作した兎には、ツベルクリン蛋白に対し即時型と遅延型の丁度中間型を呈する皮膚反応性が与えられることを報告している。⁸⁾ そこで今回著者らは、この脂蛋白画分を用い結核死菌を対照にしつつ、卵白アルブミン感作の際の Adj 効果の有無を調べんとしたものである。

実験材料及び方法

感作方法

実験動物には、成熟家兎24羽を用い、それをA, B, C, D群の4群に分けた。

A群(7羽)には、卵白アルブミン30mg/ml生食水、Adj 1 ml (アラセル0.1ml, ドラチオール0.9ml)に脂蛋白画分5mgを乳鉢ですりつぶし乳濁液にして、全量2mlを家兎臀筋内に注射した。

B群(7羽)には、卵白アルブミン30mg/mlにcomplete Adj (アセトン死菌5mg, アラセル0.1ml, ドラケオール0.9ml)を加え、2ml臀筋内に注射した。

C群(5羽)には、卵白アルブミン30mg/mlに、前記のincomplete Adj 1mlを加え乳濁液を作り2mlを同部に注射した。

D群(5羽)には、complete Adj つまり、アセトン死菌5mg/mlと、incomplete Adj 1mlを加えて、2mlを同部に注射した。

以上の感作は1回しか行わず、感作後下記の通り皮内反応、沈降反応で抗体価の測定を行った。

皮内反応

A, B, C群に対して、各々7, 9, 14, 21, 28日目に卵白アルブミン1mg/ml生食水を0.1ml,

A, B, C群に対しては、ツベルクリン蛋白(TPt) 100r/ml生食水を0.1ml, 衆兎の背部に皮内注射をし、その経過を注射後、3, 6, 24, 48, 72時間後に、硬結によって増加した皮膚の厚さ、紅斑の広がり測定した。皮内反応の強さの指標として、紅斑平均直径×(1

表 1

| Group | Sensitizing Antigen | No. of Animals | Days after Sensitization. | | | | | | | | | |
|-------|---------------------|----------------|---------------------------|---|----|-----|----|----|----|----|-----|---|
| | | | 7 | 9 | 12 | 14 | 16 | 21 | 22 | 30 | 37 | |
| A | EA+PL | 61 | P | | | | | | | | | |
| | | 62 | | P | | | | | | | | |
| | | 63 | S | | P | | | | | | | |
| | | 64 | S | | | | P | | | | | |
| | | 65 | | S | | S | | | P | | | |
| | | 66 | P | S | | S·P | | | S | P | P | |
| | | 67 | P | | | P | | | S | P | S·P | P |
| B | EA+FC | 68 | P | | | | | | | | | |
| | | 69 | | P | | | | | | | | |
| | | 70 | S | | P | | | | | | | |
| | | 71 | S | | | | P | | | | | |
| | | 72 | | S | | S | | | P | | | |
| | | 73 | P | S | | S·P | | | S | P | P | |
| | | 74 | P | | | P | | | S | P | S·P | P |
| C | EA+IA | 75 | P | | | | | | | | | |
| | | 76 | | P | | | | | | | | |
| | | 77 | S | | P | | | | | | | |
| | | 78 | S·P | | | S·P | | | P | | | |
| | | 79 | P | S | | S·P | | | S | P | S·P | P |
| D | TPt+IA | 80 | P | | | | | | | | | |
| | | 81 | | P | | | | | | | | |
| | | 82 | S | | P | | | | | | | |
| | | 83 | S·P | | | S·P | | | P | | | |
| | | 84 | P | S | | S·P | | | S | P | S·P | P |

EA=egg-albumin, PL=proteolipid fraction of *Myc. tuberculosis*, TPt=tuberculin protein, FC=Freund's complete adjuvant, IA=incomplete adjuvant, P=precipitin test, S=skin test (A, B群の皮内反応は, EA と TPt と同時に皮内注射し, C群はEAのみD群はTPtのみ皮内注射した)

+硬結による皮膚の厚さ×0.5) で表わした。

沈降反応

沈降反応は重層法を用い, 感作後7, 9, 12, 14, 22, 30, 37日目に, 感作兎から心臓穿刺をして得た血清を用い, 抗原は, A, B, C群には卵白アルブミン0.1mg/ml, A, B, D群には TPt 0.1mg/ml を用いて行った。抗体価は反応陽性を示した抗血清の最高稀釈倍数で表わした。

成 績

1. 皮内反応

a) 卵白アルブミンに対する反応

検査した5回の各例の算術平均値を第1図に示した。尚この図は同一例の日を追った反応成績ではなく, 例えば7日はA群については No. 63 と No. 64. の平均値

であり9日のA群の点は No. 65 No. 66. との平均値であって個体差の影響を大いに受ける可能性が含まれている。(表1参照)

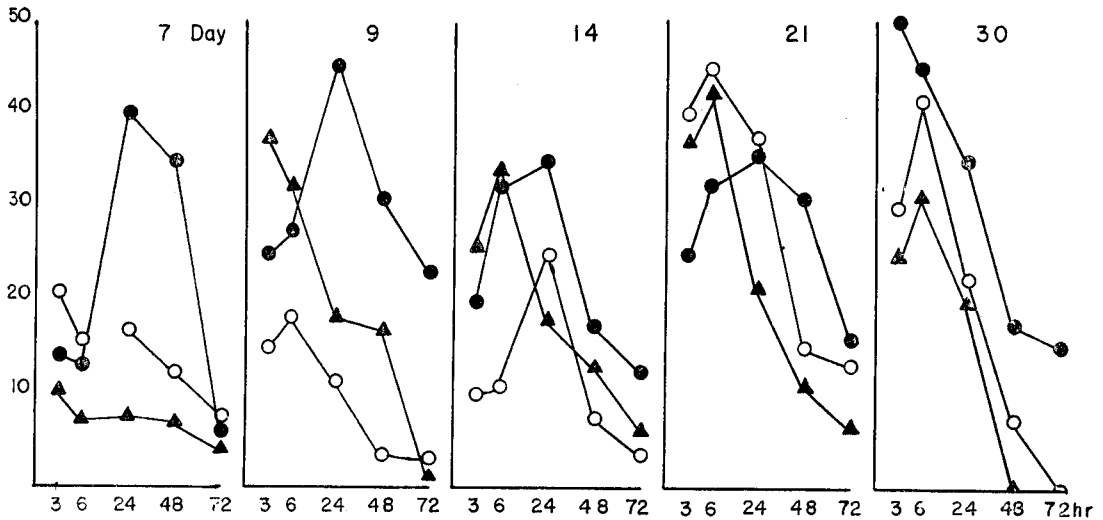
さて第1図を見て先ずわかることは, 日を追うに従って各群共反応性は高まることである。次に各群間の差異を見ると, 一般にB群が最も強い反応性を示し, C群は最も弱い。しかし感作後30日になると, 三群共ほぼ同じような強さになってしまう。次に時間的な反応形式を例えば9日目を例にとってみると, A群とC群は強さには若干の差があるが, 3—6時間をピークとした典型的即時型の反応形式をとり, 72時間には殆んど反応は消滅してしまふ。

これに反しB群だけは変わった反応態度を示し, そのピークは24時間にあり, 48時間で減弱するが, 72時間でも

図 1 SkinTest

(Egg-albumin 0.1 mg/ml)

○—○ A group.
●—● B "
▲—▲ C "



まだ相当強い反応を残している。この反応形式は次記のツベルクリン蛋白に対する死菌感作兔の反応性と全く一致するもので、遅延型の形式である。

しかしこのような遅延型の型式は感作後日を追うに従って、反応のピークはもっと早い時間の方に寄って行き72時間値も次第に減弱し、即時型を呈するA群やC群と

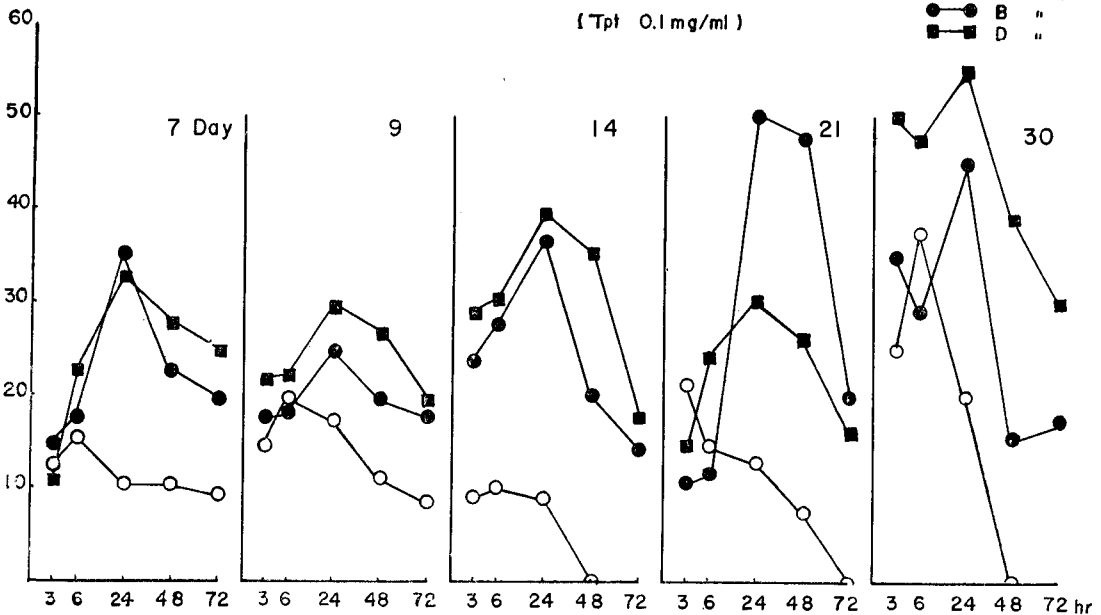
の間に差はなくなってしまふ。つまり遅延型から即時型への変換が起つたと判断される。

以上を要約すると、C群は卵白アルブミン(EAと略記する)と incomplete Adj を混合感作したものでこれは初期からずっと典型的な即時型の反応性を呈する。次にA群はこの incomplete Adj の代りに脂蛋白画分を用

図 2 Skin Test

(Tpt 0.1 mg/ml)

○—○ A group.
●—● B "
■—■ D "



いE Aと一緒に感作したもので、この反応型式はほぼC群と同様即時型を呈する。しかし14日迄は脂蛋白の Adj 効果は低い。最後にB群はE Aを死菌を含む Complete Adj と一緒に感作したもので、死菌に早期から強い効果を認めえた。又少くとも、9日目迄はE Aに対して遅延型の反応形式を示した。以降次第に即時型の傾向を強め30日にはE A本来の即時型を呈する感作状態に達した。

b) ツベルクリン蛋白に対する反応

第1図同様、ツベルクリン蛋白 (TPt) に対する反応結果を第2図に示した。

この図でもわかる通り、感作後日を追うに従って反応性は増強する。ただしA群のみは明らかな陽性反応は30日目になって始めて認められ、しかもその際の反応形式は6時間をピークとし48時間で既に消退してしまっている即時型のものである一方B群は14日迄はほぼ同じような強さの反応が認められる。21日ではB群が強く、30日ではD群が強い。しかし反応形式は全期間を通じ24時間にピークを有し、48時間で若干減弱するが72時間においても相当強い反応を残しており、遅延型の反応性である。

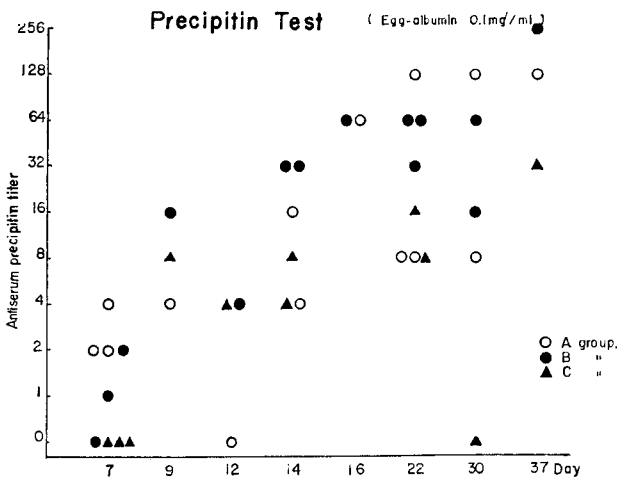
以上を要約すると、B群とD群は共に等量の結核死菌で感作されたものであり、ただB群にはE Aが一緒に注射されている。つまりE Aの混合感作は余り著明な変化を与えなかった。一方A群は脂蛋白画分とE Aを混合感作したもので脂蛋白の TPt に対する感作原性は低く、しかも即時型の感作状態を与えることがわかった。

2. 沈降反応

a. E Aに対する抗体価

成績は第3図に示したが、先ず感作後日数がたつにつ

図 3

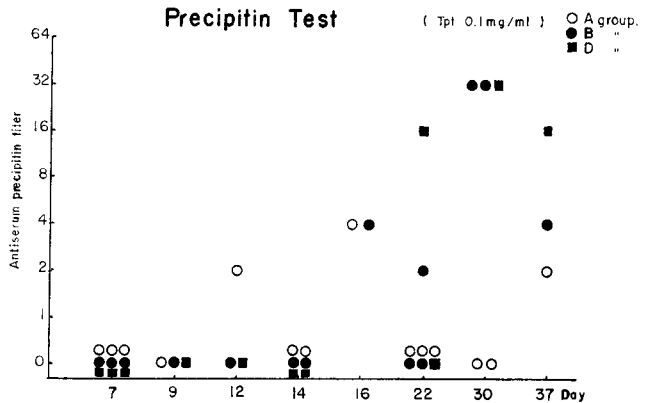


れ抗体価は上昇している。次はA群とB群とは共に感作後7日目から沈降素を検出できた。一般的にB群が最も高い抗体価を示しているが、A群例にB群以上の値を示したものもあり、ほぼ両者は同じ程度の感作状態を示したと判断される。これに反しC群は一般に感作状態は低い。

b. TPt に対する抗体価

第4図の如く、9日目迄は抗体を証明できず、4倍以上の抗体価は16日以後のB群、D群に認められた。この

図 4



場合も日を追って抗体価は幾分上昇する。しかしE Aの最高256倍に比し最高32倍に止まる。またB群とD群はほぼ同じ感作状態を示し、A群ではごく弱い反応しか起らず、たかだか2倍陽性の程度にすぎない。

総括及び考按

以上の成績をまとめながら、結核菌体脂蛋白画分の Adj 作用を考えてみたい。

先ず complete Adj として用いられる結核死菌の作用を見ると、感作抗原であるE Aに対して、皮内反応性も又沈降素も早期からしかも強く現われる。たしかに結核死菌の持つ Adj 作用は強烈であり死菌だけをぬいたC群とは比較にならない位強い皮内反応性及び抗体価をえた。そこで死菌の持つこのような作用に脂蛋白画分が関係してはいないかを調べてみると、この場合は皮内反応と沈降反応では、若干態度が異なり、反応では脂蛋白画分には殆んど Adj 作用が認められない。これに反し沈降反応ではA群、B群の間に殆んど差異をみない。すなわち死菌に匹敵する Adj 効果を持つと判断せられる。このように脂蛋白画分は沈降抗体産生系には促進的に働きかけ、皮内反応抗体系には作用は弱い。

これと同様の成績は当研究室の奥山らの結核菌体 wax を使用した報告⁴⁾に見られる。この場合も wax の使用は、E A に対する沈降素の産生に強く働くけれど、皮内反応性には余り著明な影響が認められていない。彼女らの成績では更に感作抗原を E A から TPt に代えても同様な結果がえられている。

一方既に Salvin ら⁹⁾は結核菌体磷脂質画分を蛋白に混じて感作しても、その蛋白抗原に対する強い皮膚反応性をうることは出来なかったし、又 Raffel¹⁰⁾は結核菌体蛋白に菌体磷脂質を加えてツベルクリンに対する反応性を見たが、磷脂質には Adj 効果は認めていない。

ところで奥山ら⁴⁾は菌体 wax の Adj 作用が沈降価のみに働いている現象を、抗原抗体の量的関係から説明し抗体量が抗原量より余りにも多い時は皮内反応はむしろ弱く現われる。

つまり wax の役割は抗体価をより高くするように作用しただけであるにすぎないと考えている。今回の成績を見ると菌体 wax には沈降価を上げるばかりでなく皮内反応性も高める作用が認められたことから、菌体脂蛋白の作用は少なくとも沈降抗体産生にのみ強く働いたと考へざるをえない。どうやら皮内反応抗体と沈降反応抗体は産生される場所が異なるものであり、少なくとも両者は同一のものではないように考へたいのである。

なお皮内反応性で TPt に対する成績は、死菌感作では早期に反応陽性となるが、脂蛋白感作では陽転時期がおくれ、しかも反応型式は即時型の性格のものであった。この結果は既に河内ら⁷⁾が確かめている。なお死菌感作による TPt に対する反応、すなわちツベルクリン反応をみると、反応形式は24時間をピークとしたもので、動物が兎である以上余り典型的遅延型とは云えない。これは死菌の製法が問題になるもので奥山ら¹⁰⁾も既に認めている通り、典型的な遅延型反応性は加熱死菌で感作した場合のみえられ、アセトン死菌では即時型の中間形式をとることがわかっている。典型的遅延型反応は兎では48時間にピークを有するものと考えている。

次に死菌添加による反応型式の変換にふれた。まえおきに述べた通り Dienes ら⁵⁾、Raffel⁹⁾ 更に Salvin⁹⁾らは死菌あるいは結核菌体 wax 画分を用いると、E A、馬血清、ジフテリアトキソイド、ツベルクリン蛋白による感作が遅延型の性格をとることが認められている。今回の成績では死菌を添加感作した B 群にのみ E A に対し感作後9日迄は遅延型に近い反応性を示している。このようにして発生する遅延型反応性は Salvin⁹⁾の報告にある通り、ジフテリアトキソイドでは感作後11日、E A で

は8日迄しか認められない一過性のものである。

且て奥山ら¹⁰⁾は菌体 wax に Raffel の報告とは異なりこの様な特殊な作用は認められないと報告しているがその第一回の皮内反応検査は最初の感作から15日もたっている。もっと早期に検査をしていればあるいはこのような結果がえられたかもしれない。

死菌にはこのような即時型を遅延型に近づけさせる特殊な作用が認められたが、脂蛋白画分にはそのような作用は認められなかった。

死菌あるいは wax のこのような作用が果していかなる機転によっているかは知るべくもない。尚抗 E A 沈降価は今回の成績では7日目迄2倍以下であり、9日目に16倍例が認められたにすぎない。沈降抗体の産生とこの種の遅延型反応性との相関を物語る興味ある成績といえよう。つまり循環抗体が充分量存在しないということが皮内反応を遅延型に近づけさせることも考へうる。Raffel は一過性の遅延型反応性は Jones-Mote 型反応性として、本来の遅延型反応性とは区別しているが、いずれにせよその本態は今後の研究にまたざるをえない。

結 論

結核菌体脂蛋白の生物学的活性を調べ一部としてその Adj 作用を兎の卵白アルブミン感作について実施し、結核死菌の同作用と比較しつつ皮内反応、及び沈降反応について調べたような結果をえた。

1. 卵白アルブミンに対する皮内反応性は抗原に脂蛋白画分の添加によって強められない。しかし沈降素の産生は死菌と同程度に高められた。
2. 結核死菌を添加感作すると、皮内反応性、血清抗体価共に著しく増強せられた。尚その際感作後9日迄は卵白アルブミンに対しても遅延型の皮内反応を起し、以降は即時型の反応性へと移り代った。
3. 脂蛋白の感作ではツベルクリン蛋白に対する皮内反応性、血清抗体価の出現は遅く皮内反応性は21日目から、沈降体は37日迄有意な量を示さなかった。
4. 以上から complete Adj として使用される結核死菌の Adj 作用のうち沈降素の産生には脂蛋白画分が参与すると考へられる。

引用文献

1. Chase, M. W. : Int. Arch. Allergy, **5**, 163 (1954)
2. Freund, J. : J. Immunol. **60**, 383 (1948)
3. Raffel, S. : J. Infect. Dis., **82**, 267 (1948)
4. 奥山春枝, 森川和雄 : 結核の研究 **13** 80 (1960)
5. Dienes, L. : J. Immunol., **15**, 153 (1928)

- Dienes, L. & Schoenheit, E. W., : Am. Rev. Tuberc., **20**, 92 (1929)
6. Folch, J. & Lees, M., : J. B. C., **191**, 807 (1951)
 7. 河内薫, 富崎方子 : 結核の研究 **19**, (1964) 掲載予定
 8. 森川和雄他 : 日病会誌, **51**, 458 (1962)
 9. Salvin, F. R., & Joyner, A. L., : J. Exp. Med., **68**, 659 (1939)
 10. 奥山春枝他 : アレルギー, **13** (1964) 掲載予定
 11. Raffel, S. & Newell, S.M., : J. Exp. Med., **108**, 823 (1958)
 12. Jones, T. D., & Mote, J. R., : New Engl. J. Med., **210**, 120 (1934)