



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核菌体リン脂質画分の赤血球感作能に関する研究：第1報 感作抗原液の作製法とその安定性
Author(s)	佐々木, 昭雄; SASAKI, Akio; 山本, 健一 他
Citation	結核の研究, 21-22, 25-32
Issue Date	1965-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26754
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_22_P25-32.pdf



結核菌体リン脂質画分の赤血球感作能に関する研究

第1報 感作抗原液の作製法とその安定性

佐々木昭雄・山本健一・高橋義夫

(北海道大学結核研究所予防部)

(昭和40年1月20日受付)

先に著者らの1人、高橋及び協同研究者らにより、Anderson法及びBoquet-Nègre法によってえられた結核菌体リン脂質画分は、結核血清との感作赤血球凝集反応において感作抗原となりうること¹⁾、この反応系は従来結核抗体の検出に用いられてきた多糖体画分を感作抗原とするMiddlebrook-Dubos反応及び蛋白質画分を感作抗原とするBoyden反応とはことなる抗原・抗体系であること²⁾、及びこの反応の抗体価は結核症の病状と平行関係があること³⁾が示された。その後この反応は簡易化され、凝集媒体として赤血球の代わりにカオリン粒子が用いられるようになり⁴⁾、いわゆる高橋結核反応として現在その臨床的価値が検討されつつある。

本研究の目的は、この反応系の免疫化学的解析である。その第一歩は抗原の精製であるが、その前に抗原活性の測定法を決めておかねばならない。問題の反応系は脂質画分の懸濁液を感作抗原とする間接凝集反応であるので、抗原活性は凝集媒体の種類と抗原懸濁液の作製法によって当然変動すると考えられるからである。

凝集媒体としては、カオリンその他の無機物質及び合成高分子化合物などについて種々検討したが抗原活性測定に適したものがなく、綿羊赤血球が最良であることがわかった。高橋結核反応はカオリン凝集反応であるが、その始まりは感作赤血球凝集反応であり、両反応は臨床的に血清学的診断価値は殆んど同じであることが示されている。⁴⁾

高橋結核反応における感作抗原液は、抗原のメタノール溶液を希釈液中に滴下して作られており、その作製条件については既に小野⁵⁾が検討している。しかし精製の目的でリン脂質画分を分画するとメタノール難溶性の画分が生じ、この画分もまた適当な方法で微細懸濁液にすると抗原活性を示すことがわかった。そこで今回はこのメタノール難溶性画分について抗原液の作製法とその安定性を検討した。

実験材料及び実験方法

抗原 結核菌体リン脂質画分の抽出・分画法は、高橋の方法⁴⁾を改良したもので、その詳細は別に報告する予定であるが、概略は次の通りである。

粗リン脂質はBCGソートン4週培養菌体から抽出した。まず菌体を15℃以下でアセトン、メタノール、クロロホルムにより順次可及的に抽出し、その残渣を37℃メタノールで可及的に抽出、抽出物を乾固後熱アセトン可溶部を除いて粗リン脂質を得た。使用したリン脂質画分は、まず粗リン脂質をクロロホルム・エーテル(1:2)で抽出し、抽出物をクロロホルム・メタノール・水(800:200:25, v/v/v)を溶媒としてセルロース・カラムを通し、溶媒により溶出したものである。

この画分は粗リン脂質と違ってメタノールに難溶である。その化学組成は窒素0.3%、リン2.1%、糖質(アンスロン法、グルコースに換算して)11%であった。

抗血清 人型結核菌種野株の加熱死菌注射(Adjuvant浮遊)によって得た家兎免疫血清で、-25℃で保存したもの。使用に際し、1/10容の3% ethylenediamine tetraacetic acid水溶液を加えることにより化学的に非働化し異種血球凝集素を除くため原血清と等容の綿羊血球で室温10分間の吸収操作を2回行なった。

希釈液 リン酸緩衝生理的食塩水(0.85%食塩水9容+0.1Mリン酸緩衝液1容を、pH7.2)用いた。

血球 脱線維した綿羊血液に等容のAlsever液を加えて永庫に保存し、使用に際し綿花で濾過後希釈液で数回洗滌した。

抗原液の作製法

(1) 水浮遊法: リン脂質画分の粉末を水に浮遊、充分混合してゾル状とし、これに2倍塩濃度の希釈液を等容加えた。

(2) ブレンダー法: リン脂質画分の粉末を希釈液に浮遊し、これをマルサン式ホモブレンダー500D型により

15分間激しく攪拌した。

(3) メタノール法：リン脂質画分の粉末をメタノールと混じ、これを上記ホモブレンダーにより懸濁液とした。希釈液 9.5ml をマグネチック・スターラーで攪拌しつつ、その中に上記懸濁液 0.5 ml を滴下した。

(4) クロロホルム法：希釈液をマグネチック・スターラーで激しく攪拌しつつ、これに水飽和クロロホルムまたはクロロホルム・メタノール (3:1) に溶かしたリン脂質画分溶液を滴下し、攪拌を続けつつ加熱または減圧により溶媒を除去した。

(5) テトラヒドロフラン法：水でゾル状にしたリン脂質画分に等容のテトラヒドロフランを加え、できた溶液を 40 倍容の希釈液と直接混合した。

感作赤血球凝集反応 感作赤血球作製にあたっては、抗原液を適当に希釈し、等容の 4% 血球浮遊液を加え、37℃ 2 時間感作 (30 分毎に振盪) 後、希釈液で 3 回洗滌した。反応は、通常の方法により、0.5 ml あての通減血清希釈液に 2% 感作赤血球浮遊液を 0.05 ml を加えて 37℃ 2 時間、ついで室温に 1 夜放置して行ない、翌朝判定した。判定基準は小野の方法⁵⁾に従った。

抗原活性 抗原活性は、2% 綿羊赤血球浮遊液 1 ml を感作するに要する抗原画分の最少量で表わした。

実験成績

1) 水浮遊法

リン脂質画分は、メタノールで抽出し、混在する水溶性成分の大部分を除いてあるが、親水性がかなり強く、水に浮遊すると膨潤してゾル状になる。塩溶液中では膨潤がおそく、ゾル状にするためにはマグネチック・スターラーで長時間攪拌する必要がある。

水浮遊法による濃度 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原液を倍数希釈して血球感作を行なった実験では、凝集反応はすべて陰性であった。抗原液作製時の濃度を 4,092 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にすると反応は陽性となり、第 1 図に示すようにその活性は 512 μg であった。しかしこの反応は全般に凝集が弱く、反応の終末点も不明瞭であった。

このように水浮遊法抗原液の活性が著しく低いのは、抗原物質が液中で完全に溶解していない、ゾル状になって分散しているにすぎないためとも考えられる。そこでこのゾル状液の pH を変えることにより、抗原物質が溶解し活性が上昇するのではないかと考え、次の実験を行なった。即ち水でゾル状にしたリン脂質画分に等容の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) またはホウ酸緩衝液 (pH 9.0) を加え、30 分間攪拌し、希釈液で 10 倍にうすめて濃度 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原液を作った。しかしこれを用いた

第 1 図 水浮遊法抗原液による反応

抗 原*	2048	1024	512	256	128	64	32	16
80	+	+	+	-	-	-	-	-
160	+	+	+	-	-	-	-	-
320	+	+	+	-	-	-	-	-
640	+	+	+	-	-	-	-	-
1280	-	±	±	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-
5120	-	-	-	-	-	-	-	-
対 照	-	-	-	-	-	-	-	-

* 2% 綿羊赤血球浮遊液 1 ml の感作に用いたリン脂質画分の量を μg で表わす。

** 血清 No. 1. 数字は希釈倍数を示す。

反応はすべて陰性であった。

2) ブレンダー法

この方法で作られた抗原液は、直ちに用いれば 4~8 μg の活性を示し、反応の終末点も明瞭であった (第 2 図-I)。しかし室温に数十分放置すると、抗原液の活性は明らかに低下し、反応の終末点も不明瞭になった。放置時間による活性低下の程度は一定でなく、種々の因子が関係しているように思われた。最も著しかったのは粗リン脂質を抗原とした場合で、濃度 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原液の活性は室温 1 時間の放置により 8 μg から 128 μg に低下し、抗体価も 1:1280 から 1:40 に低下した。

新鮮抗原液で感作した血球または感作後洗滌した血球を氷庫に 1 夜保存した際、反応の終末点は幾分不明瞭となったが、活性は低下しなかった (第 2 図-II, -III)。これに比し、抗原液 (512 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をあらかじめ氷庫に 1 夜保存した実験では、活性は 32 μg であった (第 2 図-IV)。

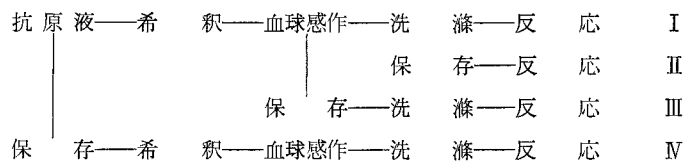
次に抗原液を -25℃ で 1 夜凍結保存し、室温で徐々に融解した場合にも活性の低下が認められ、反応の終末点は著しく不明瞭になった (第 3 図-I)。氷庫 1 夜保存した抗原液を 100℃ 1 時間加熱または高圧滅菌処理 (120℃, 1 気圧, 20 分間) すると、活性は 64~218 μg となり、反応の終末点は著しく不明瞭となった (第 3 図-II, -III)。

しかしこのように活性が低下した抗原液を再びブレンダー処理すると、活性はかなりの程度回復した。即ち、氷庫 1 夜放置により 32 μg に低下した抗原液の活性は、再ブレンダー処理により 8~16 μg となった。また、高圧滅菌処理後室温 44 時間放置により 128~256 μg に低下

第2図 プレンダー法抗原液による反応

I									II								
血清*	抗原								抗原								
	256	128	64	32	16	8	4	2	256	128	64	32	16	8	4	2	
80	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	
160	++	+	+	++	+	++	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	
320	+	+	+	+	+	++	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
640	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	
1280	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

III									IV													
抗原液									抗原液													
80	160	320	640	1280	2560	80	160	320	640	1280	2560	80	160	320	640	1280	2560					
++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-
++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-
+	+	+	++	+	+	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-
+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



(保存はすべて氷庫1夜)

* 血清 No. 2

した抗原液の活性は、再ブレンダー処理により16 μ gにまで回復した(第4図)。

3) メタノール法

ブレンダー法の結果から抗原液の活性は加熱により低下することが認められたので、抗原液中のメタノールは加温による蒸発で除かず、希釈によって反応液中のメタノール濃度を低くした。

メタノール中のリン脂質画分は完全に溶解せず懸濁していたにもかかわらず、この方法で作られた抗原液は8~16 μ gの活性を示した。しかし反応の終末点は不明瞭であった(第5図)。

4) クロロホルム法

この方法でも抗原液を作ることができたが、懸濁粒子があまり不均一で、一定の活性を示さなかった。この際

希釈液中に Tween 80 のような表面活性剤をあらかじめ加えておくと均一な微細懸濁液がえられたが、表面活性剤の作用のため反応は陰性に終わった。

5) テトラヒドロフラン法

種々の方法でとったリン脂質画分は、あらかじめ水で充分膨潤させた後等容のテトラヒドロフランを加えると殆んど瞬時に溶解する。この時できた溶液は数日間放置すると沈澱を生ずるが、製造後数時間は安定であった。なお今回用いたリン脂質画分は水を10%含むテトラヒドロフランに完全溶解するので、この方法と前記の方法とを比較してみたが抗原液の活性には差がなかった。

テトラヒドロフラン法による濃度64 μ g/mlの抗原液を倍数希釈した反応をみると、2 μ gの活性がえられた。

第3図 ブレンダー法抗原液の安定性

血清*	抗原	256	128	64	32	16	8	4	2
I. 1夜凍結保存									
80	+	+	+	+	+	+	-	-	-
160	+	+	+	+	+	+	-	-	-
320	+	+	+	+	-	-	-	-	-
640	+	+	+	±	-	-	-	-	-
1280	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2560	+	+	+	-	-	-	-	-	-
II. 氷庫1夜後 100℃ 1時間									
80	+	+	+	-	-	-	-	-	-
160	+	+	+	-	-	-	-	-	-
320	+	+	+	-	-	-	-	-	-
640	+	+	±	-	-	-	-	-	-
1280	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2560	+	+	-	-	-	-	-	-	-
III. 氷庫1夜後 高圧滅菌									
80	+	+	+	±	-	-	-	-	-
160	+	+	±	-	-	-	-	-	-
320	+	+	±	-	-	-	-	-	-
640	+	+	±	-	-	-	-	-	-
1280	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2560	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* 血清 No. 3

この活性は作製時の抗原液の濃度を 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした場合にも、各濃度の抗原液を1本ずつ作った場合にも変わらなかった。反応の終末点はすべて明瞭であった(第6図)。

テトラヒドロフラン法による抗原液は、ブレンダー法によるものと較べてかなり安定であり、その活性は室温数時間の放置でも変わらなかった。しかし 37℃ 18時間の保存または高圧滅菌処理により 8 μg まで低下した。これに比し、水でゾル状にしたりリン脂質画分をあらかじめ高圧滅菌処理してから抗原液を作ると、その活性は 4 μg であった(第7図)。

第4図 再ブレンダーによる活性の回復

血清*	抗原	256	128	64	32	16	8	4	2
I. 氷庫1夜保存, 再ブレンダー									
80	+	+	+	+	+	+	-	-	-
160	+	+	+	+	+	+	-	-	-
320	+	+	+	+	+	+	-	-	-
640	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1280	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2560	+	+	-	-	-	-	-	-	-
II. 高圧滅菌処理, 室温 44時間									
80	+	+	-	-	-	-	-	-	-
160	+	+	-	-	-	-	-	-	-
320	+	-	-	-	-	-	-	-	-
640	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	±	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III. IIを再ブレンダー									
80	+	+	+	+	+	+	-	-	-
160	+	+	+	+	+	+	-	-	-
320	+	+	+	+	+	+	-	-	-
640	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1280	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2560	+	+	+	+	-	-	-	-	-

* I 血清 No. 4., II, III 血清 No. 3

第5図 メタノール法抗原液による反応

血清*	抗原	128	64	32	16	8	4	2	1
80	+	+	+	+	+	+	-	-	-
160	+	+	+	+	+	+	-	-	-
320	+	+	+	+	±	-	-	-	-
640	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* 血清 No. 2

第6図 テトラヒドロフラン法抗原液による反応

64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原液より								16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より				
抗 原 血 清*	32	16	8	4	2	1	0.5	8	4	2	1	0.5
20	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
80	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
160	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
320	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
640	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
1280	+	+	+	+	±	-	-	+	+	+	±	-
2560	±	±	±	±	-	-	-	±	±	±	-	-
5120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対 照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より				抗原液を1本ずつ作ったとき									対
抗 原 血 清	2	1	0.5	64	32	16	8	4	2	1	0.5	対	
20	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
40	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
80	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
160	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
320	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
640	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
1280	±	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-	
2560	-	-	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-	
5120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
対 照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* 血清 No. o

テトラヒドロフラン法抗原液による感作赤血球凝集反応の阻止反応は第8図のようになり、血清希釈度と凝集の阻止との関係は定量的であった。

総括及び考按

著者らの実験目的は高橋結核反応の感作抗原となる結核菌体リン脂質画分を精製するにあるが、これに先立ってまず感作抗原の活性の測定法を検討する必要がある。

そこでまず用いる反応系について検討してみた。

カオリン凝集反応（高橋結核反応）は、操作が簡単であること及び凝集媒体が無機質であるためそれに結合した抗原、抗体量が化学分析により測定しうることが利点であるが、一方抗結核血清の抗体含量が低いこと、感作カオリンはかなりの量の血清蛋白質を非特異的に吸着すること、及びカオリン凝集反応用の緩衝液は蛋白質の微

第7図 テトラヒドロフラン法抗原液の安定性

抗原血清	64	32	16	8	4	2	1	0.5
I. 37C 18時間								
80	++	++	++	+	-	-	-	-
160	++	++	++	+	-	-	-	-
320	++	++	++	+	-	-	-	-
640	++	++	++	++	-	-	-	-
1280	+	+	+	±	-	-	-	-
2560	±	±	-	-	-	-	-	-
II. 高圧滅菌処理								
80	++	++	++	+	-	-	-	-
160	++	++	++	+	-	-	-	-
320	++	++	++	-	-	-	-	-
640	++	++	++	±	-	-	-	-
1280	+	+	+	±	-	-	-	-
2560	+	±	±	-	-	-	-	-
III. 水中で高圧滅菌後抗原液とする								
80	++	++	++	++	+	-	-	-
160	++	++	++	++	+	-	-	-
320	++	++	++	++	++	-	-	-
640	++	++	++	++	++	-	-	-
1280	+	+	+	+	±	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-
対照	-	-	-	-	-	-	-	-

量定量を阻害することなどから、抗体の定量的測定は困難なことがわかった。また、カオリン凝集反応においては適当量のリン脂質画分で感作することによりカオリン粒子を安定化しているの、感作に用いるリン脂質画分の量を減じていくとカオリン粒子が不安定となり、自然凝集が起りやすくなる難点がある。従って一定量のカオリン浮遊液を感作するに要する抗原画分の最少量で抗原活性を示すことは困難であった。なおまた、イオン交換樹脂やフォルマリン処理血球など種々の凝集媒体についても抗原活性の定量的表示法を検討したが適当な反応系はなく、結局通常感作赤血球凝集反応を用い、2%血

第8図 テトラヒドロフラン法抗原液による感作赤血球凝集の阻止反応

阻止抗原血清	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0
20	+	+	+	+	+	++	++	++	++
40	±	+	+	+	+	++	++	++	++
80	-	±	+	+	+	+	+	+	++
160	-	-	-	+	+	+	+	+	++
320	-	-	-	-	+	+	+	+	+
640	-	-	-	-	-	±	+	+	+
1280	-	-	-	-	-	-	-	±	+
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	±
5120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-

感作抗原量 64 μg/ml 2%血球浮遊液
血清 No. 5

球浮遊液を1mlを感作するに必要な抗原画分の最少量で抗原活性を示す方法が最良であることがわかった。

次に抗原物質の溶解性について検討してみると、先に小野⁵⁾はリン脂質画分のメタノール溶液から抗原懸濁液を作る方法について検討し、懸濁粒子が小さいと広い範囲の抗原濃度で同じ感作能力を示し、保存しうる期間も長いことを報告している。一方 Tsumita 等⁶⁾は青山B菌体より Middlebrook-Dubos 反応の感作抗原を抽出精製し、それはペプチドを含む糖脂質であると報告している。なお積田⁷⁾は、この抗原は中性溶液で保存すると沈澱を生じ活性が低下するが、溶液のpHを9にすると沈澱が再溶解し活性が回復するといっている。われわれの抽出したリン脂質画分は、微量の窒素とかなりの糖質を含み、親水性が強く水を加えると膨潤するが、生じたゾル状液の抗原活性は著しく低く、ゾル状液を酸性またはアルカリ性にしてもその活性には見るべき変化がなかった。このことは、抗原としてのリン脂質画分と Middlebrook-Dubos 反応の抗原とはことなるという高橋、小野らの見解^{1) 2)}を支持するものであり、抗原液は微細粒子の懸濁液としなければならないという小野の見解とも一致する。

本実験においてはメタノール難溶性画分の抗原活性測定を目的としたので、抗原画分を微細粒子の懸濁液とす

るため次の方法を試みた。

(1) 機械的に懸濁粒子を微細化する。

(2) 適当な溶媒を用いて抗原溶液を作り、これを希釈液と混和する。

機械的手段としては、乳鉢などによる磨砕法、音波または超音波による振盪法なども考えられるが、今回はそれらの方法より効率の良いブレンダー法を用いてみた。この方法の長所は抗原画分の溶解性を考えなくてもよいことであり、作られた抗原液は作製直後に用いる限り活性が高く、再現性もよかった。しかし欠点は抗原液を放置すると活性が急速に低下することである。この場合、抗原液を再ブレンダー処理すると活性はかなり回復する。従って急速な活性低下の主な原因は抗原物質の分解でなく、懸濁粒子の凝集による有効抗原濃度の減少と思われる。ブレンダー法抗原液はテトラヒドロフラン法抗原液に比し少し活性が低いのは、段階希釈などの実験操作中に抗原粒子の凝集が起こっているためと考えられる。

次に今回用いたリン脂質画分はメタノール難液であるので、(1)のブレンダー法と(2)の溶液法を組合せたようなメタノール法を用いてみた。即ちリン脂質画分をブレンダーによりメタノール中に懸濁し、これを希釈液中に滴下して作った抗原液は、ブレンダー法と同程度の活性を示した。これはリン脂質画分中に存在する抗原物質がメタノール可溶であるためか、あるいはブレンダーによってメタノール中の抗原粒子が微細化されたためかは不明である。

(2)の溶液法の場合、今回用いたリン脂質画分は、水飽和クロロホルムまたはクロロホルム・メタノール混液(3:1)に可溶であったが、これらの溶媒は希釈液と混和すると乳化し、放置すると2相に分離する。そこでこの混液を激しく攪拌し、乳化した状態のまま加温または減圧により溶媒を除去してみたが、このようにして作られた抗原液は不安定で、一定の活性を示さなかった。

次に希釈液と自由な比率で混合しうる溶媒として水-テトラヒドロフラン系を用いてみたが、得られた抗原液は最も活性が高く、数時間の放置に安定で、加熱による活性の低下も僅かであった。

そこでこの方法とメタノールを用いている小野の方法⁵⁾とを比較してみよう。第1に、抗原画分をメタノールの代わりに水-テトラヒドロフラン系を用いて溶解したことである。メタノールに比し、水-テトラヒドロフラン系は、種々の方法で抽出・分画したリン脂質画分をすべて溶解し、かつその溶解度も大きいことから、溶媒と

してメタノールよりすぐれている。ただその唯一の欠点は保存により過酸化物を生じ血球傷害性が強くなることであり、従って抗原溶液は長期保存できない。

その第2は、小野法が希釈液を攪拌しつつその中に抗原溶液を滴下するのに反し、テトラヒドロフラン法では希釈液と抗原溶液を直接混和しうることである。即ちテトラヒドロフラン法では、滴下しても混和しても抗原活性に変わりはない。このことは抗原溶液が既に水を含んでおり、抗原物質は親水性であることによると考えられる。即ち、この方法では溶液中の抗原物質は水和した状態にあるため、希釈液によってそのまま希釈されるが、小野法では希釈液と接した所で始めて水和が起こるため、滴下条件、攪拌条件によって水和された懸濁粒子の大きさに差が生じてくるものと思われる。

第3は抗原液中の溶媒の問題である。テトラヒドロフラン法では希釈によりその濃度を低くしているのみで、特に溶媒の除去を行なわない。この抗原液の活性は2 μ gである。一方小野法では抗原液中のメタノールは加温して除去されており、その結果えられた抗原液の活性は50~100 μ gを示すにすぎない。ところで今回の実験で明らかなように、抗原液の活性は加熱により低下する。テトラヒドロフラン法抗原液は比較的安定であり100 $^{\circ}$ C 1時間の加熱によりその活性は僅か(8 μ g)しか低下しないが、ブレンダー法抗原液の活性は同じ加熱処理により、4~8 μ gから64~128 μ gに低下している。このことから、小野の用いた抗原液の加温処理前の活性は、4 μ g 附近にあったのではないかと考えられる。事実われわれは、小野と同様高橋の方法でリン脂質画分をとり、そのテトラヒドロフラン法による抗原液の活性が4~8 μ gであることを確かめた。以上の点を考えると、抗原液作製時に加温処理による溶媒の除去を行なわない方がよいと考えられる。

さて今回の実験の目的は、メタノール難溶性画分から安定した再現性のある抗原液を作ることであり、種々の方法を検討したがその中でテトラヒドロフラン法が最も適していた。この方法によれば、抗原液の活性は安定で著しく高いのみならず、反応の終末点は明瞭であり、また抗体価は感作抗原量を変えても一定となることがわかった。これらのことはリン脂質画分中の抗原が1種類であるという考えを支持するものであり、従って抗原物質の分画・精製の指標としては単に活性即ち最少感作濃度をめざせばよいことになる。そこで現在この方法を用いてリン脂質画分中の抗原物質の精製を試みている。

結 論

結核菌体リン脂質画分の感作抗原としての活性を測定するのに用いる凝集媒体及び感作抗原液の作製法について検討し、次の結果をえた。

1. カオリン凝集反応（高橋結核反応）は抗体価の測定に便利であるが、抗原活性の測定には不適であり、むしろ感作赤血球凝集反応の方がすぐれていた。

2 血球凝集反作用としての感作抗原液は、抗原画分を水で膨潤させた後等容のテトラヒドロフランを加えて溶解し、この溶液を希釈液と混和して作ったものが最も安定であった。

3. テトラヒドロフラン法による抗原液を用いると2%血球浮遊液1mlを感作するに要するリン脂質画分の最少量は2 μ gであり、感作抗原量を変えても抗体価は一定で、反応の終末点は明瞭であった。

4. リン脂質画分中の抗原は単一であり、Middlebrook-Dubos 反応の抗原とはことなることを支持する実験成績がえられた。

終りにテトラヒドロフランの使用を御教示下さいました東大薬学部野島庄七博士に深謝致します。

文 献

- 1) 高橋義夫, 小野勝男: 結核の研究, 7, 1, 1957.
Takahashi, Y., and Ono, K: Amer Rev Resp Dis, 83, 381, 1961.
- 2) Takahashi, Y., Fujita, S., and Sasaki, A.: J Exp Med, 113, 1141, 1961.
- 3) 高橋義夫, 深江 肇: 結核の研究, 8, 19, 1957.
- 4) 高橋義夫: 結核, 36, 409, 1961.
Takahashi, Y.: Amer Rev Resp Dis, 85, 708, 1962.
- 5) 小野勝男: 結核の研究, 10, 1, 1958.
- 6) Tsumita, T., Matsumoto, R., and Mizuno, D.: Jap J M Sc & Biol, 13, 131, 1960.
- 7) 積田 亨: 私信