



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核菌体りん脂質画分の赤血球感作能に関する研究：第2報 りん脂質画分の性状
Author(s)	佐々木, 昭雄; SASAKI, Akio; 高橋, 義夫 他
Citation	結核の研究, 25-26, 17-24
Issue Date	1967-03-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26772">https://hdl.handle.net/2115/26772</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_26_P17-24.pdf



# 結核菌体りん脂質画分の赤血球感作能に関する研究

## 第2報 りん脂質画分の性状

佐々木 昭 雄・高 橋 義 夫

(北海道大学結核研究所予防部)

(昭和42年1月10日受付)

結核症における感作赤血球凝集反応としては、未処理血球に多糖体画分を感作する M-D(Middlebrook-Dubos) 反応と、タンニン酸処理血球に蛋白質画分を感作する Boyden 反応とが広く知られている。高橋ら<sup>1)2)</sup>は種々の方法で抽出した結核菌体りん脂質画分が未処理血球に対する感作抗原となり、りん脂質感作赤血球は結核血清と凝集反応をおこすことを発見し、同時にこのりん脂質反応と、M-D 反応および Boyden 反応の血清学的特異性を確立した。

M-D 抗原は血清学的特異性を有する Polyarabomannose と、赤血球に附着する役割を有する脂質とからなるリポ多糖体であることが、積田ら<sup>3)</sup>によって明らかにされた。彼らの精製抗原では、2%人O型赤血球1mlを感作する最少抗原量は0.25~0.5 $\mu$ g であると報告されている<sup>4)</sup>。一方高橋抗原は、0.3~2%の窒素と15~20%の糖質を含み、綿羊赤血球に対する最少感作量は50~100 $\mu$ g<sup>5)</sup>であった。高橋抗原と積田らの精製 M-D 抗原とは共に未処理血球を感作するが、量的関係を見ると同量の血球を感作するのに高橋抗原は積田らの精製 M-D 抗原の約200倍を要する。従って、りん脂質反応と M-D 反応の血清学的特異性は一応確立されているが、りん脂質反応の場合は抗原として用いられるりん脂質画分に含まれる多糖体が独自の特異性をもって反応している可能性はあながち否定出来ない。本研究では生化学的にこの点を追求した。

M-D 抗原は水溶性リポ多糖体であるが、高橋抗原はその大部分が水不溶性りん脂質画分で、血球感作の際には水浮遊液として用いている。前報<sup>6)</sup>においてわれわれは高橋抗原の血球感作能が浮遊液の作り方によっていちぢるしく変化することを報告したが、今回上記の目的で抗原画分の抽出・分画法を検討した。

### 実験材料および方法

**材料** 菌は主としてソートン培養 BCG を用いた。初期

の実験では、8週培養菌体を東洋濾紙 No131 で濾過して集め、アセトンで洗い、乾燥した。その後の実験では、4週培養菌体を布(天じくもめん)による濾過で集め、水洗し、凍結乾燥した。

**血清反応** 感作赤血凝集反応は前報<sup>6)</sup>と同様にしておこない、綿羊赤血球を使用した。感作抗原液は、抗原画分を水でゾル状にし、等容のテトラヒドロフランを加えて溶解した後40倍の希釈液と混合して作った。2%赤血球1mlを感作する抗原画分の最少量を最少血球感作量とし、それをもって血球感作能を示した。

感作赤血球凝集反応阻止試験は通常の方法に従ったが、特に阻止抗原と抗血清の両方について希釈系列を作り、阻止が特異的であるかどうかを確かめた。

M-D 反応には2種の抗原を使用した。その1つは積田博士より分与いただいた最少血球感作量0.25~0.5 $\mu$ gの精製 M-D 抗原、もう1つは、表2に示した方法で脱脂した BCG 菌体を Westphal らの方法<sup>7)</sup>により水：フェノール=1：1で処理し、その水層からアセトンで沈澱させた粗リポ多糖体である。この画分の水溶液は、265 m $\mu$  にピークをもつ紫外吸収物質を含むが、最少血球感作量は2 $\mu$ g であった。

**化学分析** 窒素量は Microkjeldahl 法、りん量は Allen 法又は Bartlett 法<sup>8)</sup>、糖質量はグルコースを標準としてアンスロン法により測定した。イノシトール量は次のようにして測定した。試料を6N塩酸で100 $^{\circ}$ C 40時間加水分解した後濾過し、濾液を一度乾固してから水：エーテルで振り脂肪酸を除いた。水層を乾固して混在するエーテルを除き、再び水に溶解、アンバーライト IR410(OH<sup>-</sup>型)と IR 120(H<sup>+</sup>型)のカラムを通し電解質を除いた。水溶出部を集めて乾固し、少量の水に溶解、メタノールを加えた。ここで沈澱してくる画分の重量を測定し、これをイノシトール量とした。イソプロパノール：氷酢酸：水=3：1：1の系でペーパークロマトグラ

フィーをおこないこの画分はほとんどイノシトールであることを確認した。脂肪酸含量は、試料をけん化した後酸性とし、エーテルで抽出される画分の重量から計算した。結核菌のりん脂質画分中に不けん化物は認められなかった。

**クロマトグラフィー** 薄層クロマトグラフィーには Wako Gel B-O を使用した。溶媒系はクロロホルム：メタノール：水=65：25：4で、検出にはヨード蒸気と Dittmer らのりん発色試薬<sup>9)</sup> を使用した。一部硫酸で検出してみたが、ヨード蒸気の場合と完全に同じクロマトグラムが得られた。

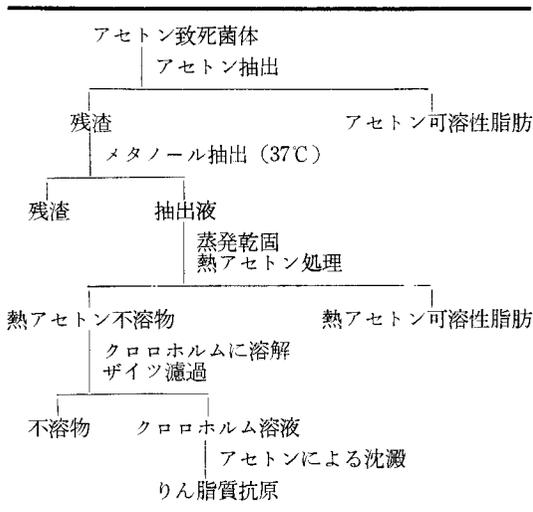
カラムクロマトグラフィーには重曹処理<sup>10)</sup> したけい酸：Hyflo Super Cel=2：1 (w/w) 250g (4.6×37.0cm) を使用した。

## 実 験

### 高橋抗原の性状

高橋らは種々の方法で抽出した結核菌のりん脂質画分が血球感作抗原となることを見出した<sup>1)</sup> が、簡単に収量

表 1 結核菌体りん脂質画分の抽出法



がよいという理由から表 1 に示す抽出法を採用した<sup>11)</sup>。すなわち高橋抗原は Boquet et Nègre のメチル抗原抽出法<sup>12)</sup> に準じ、メタノールで抽出した粗りん脂質から熱アセトン可溶物とクロロホルム不溶物を除いた画分である。

この方法で得られたいくつかの抗原についてその化学組成を調べてみると、窒素含量 0.3~0.8%，りん含量 1~3%，糖質含量 15~24% であった。更に BCG より得られた抗原の 1 つについて測定した結果では、この画分

のイノシトール含量は約 4%，脂肪酸含量は約 31% であった。脂肪酸は中和価 194 で、赤外スペクトルからはパルミチン酸が主成分であると推定された。糖成分としてはマンノースとグルコースがペーパークロマトグラフィーにより検出された。

高橋抗原の最少血球感作量は、小野<sup>5)</sup> によると 50~100 μg であったが、前報<sup>6)</sup> に記したごとく感作抗原液の調製法を改良することによりこの量はいちぢるしく低下し、いくつかの抗原について 4~8 μg であった。しかしこの中には少なくとも 0.6~1 μg の糖が含まれている筈であるから、積田らの精製 M-D 抗原の最少血球感作量から見ると、この含有糖の血清学的作用の可能性は否定出来ない。

高橋抗原は、アセトン、石油エーテルに不溶、メタノールに難溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルム、四塩化炭素中では分離不能の不溶物を生じ、含水クロロホルムに可溶であった。含水クロロホルム中の溶解度は抗原の lot によってかなりの変動が見られ、表 1 に示したクロロホルム不溶物を除く操作が困難なことがあった。この現象は特にメタノール抽出回数が多い画分で見られた。上記溶解性は高橋抗原が多量のイノシトールりん脂質を含んでいるためとも考えられるが、水溶性成分の混在による可能性が大きい。表 1 に示した抽出法には水溶性物質を除く操作が含まれていない。そこで高橋抗原からエーテル：水またはクロロホルム：水による分配で水溶性成分を分離しようと試みたが、ゲル化が激しくて 2 相に分離することが出来なかった。

Folch はイノシトールりん脂質画分のクロロホルム溶液が分離不能の不溶物を含むときには、この溶液に 2 倍容のエーテルを加えると不溶物が容易に分離されると報告している<sup>13)</sup>。Lea らは脂質画分中に混在する水溶性物質を除く方法の 1 つとして、クロロホルム：エタノール：水=800：200：25 を溶媒とし、セルロース上で分配させる方法を案出した<sup>14)</sup>。著者らはこれらの方法を高橋抗原の画分に応用すべく次の予備実験をおこなった。

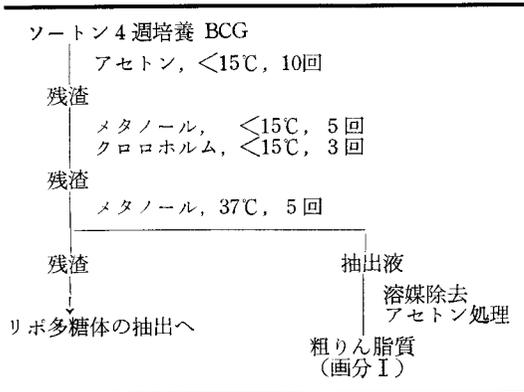
高橋抗原をクロロホルム：エーテル=1：2 で処理し抽出部と残渣に分けた後、両画分をそれぞれ濾紙上にスポットし、クロロホルム：エタノール：水で下降法により展開した。Hanes-Isherwood のりん発色法<sup>15)</sup> により検出されたスポットの数はいずれも 2 つで、両画分間に定性的な差はなかった。1 つのスポットは原点にあり、水溶性物質であった。他のスポットは溶媒先端の近くにあり、脂質部分である。両画分ともかなりの量の水溶性物質を含んでいたが、脂質部分の含量はクロロホルム：エーテル抽出部の方が残渣より大きいことが、りん

発色の程度から推定された。

**低温溶媒による菌体脂質の分別抽出**

一般に生物学的活性を有する物質を抽出するにはなるべく温和な条件でおこない、不純物の含量は少ない方がよいことはいうまでもない。Macheboeuf らは低温連続抽出装置<sup>16)</sup>を用いて結核菌の脂質を分別抽出している。この場合菌体をまずアセトンで抽出するが、このときの温度が15℃以下であるとりん脂質と wax は全く抽出されないという。そこで氷冷アセトンで乾燥した BCG 菌体を彼らの考案した連続抽出装置を用い15℃以下(水道水の温度)でアセトン、メタノール、クロロホルムにより順次抽出し、最後に残渣を Soxhlet の装置に移し、メタノールにより抽出した。溶媒の除去は以後すべて窒素気流下減圧でおこなった。乾燥菌体に対する抽出物の重量比は、アセトン8.34%、メタノール4.14%、クロロホルム20.0%および Soxhlet メタノール8.52%であった。クロロホルム抽出画分は、窒素含量0.03%、りん含量0.1%、糖質含量0.4%で、ほとんどが熱アセトン可溶、冷アセトン不溶の wax であった。メタノール抽出画分は冷抽出温抽出の別なく同程度の血球感作能を示した。従って低温抽出法は抗原物質を得るための分別抽出法として必ずしも最適とはいえない。のみならず温メタノール抽出画分は収量がよく、アセトン可溶物の含量が少なく、以後の分画操作がおこないやすい。従って本実験においては温抽出画分を出発材料とすることにした。多量

表 2 低温分別抽出法



の菌体を一度に処理するため、連続抽出装置を用いず表 2 に示すように低温溶媒による抽出を繰り返した。

ソートン 4 週培養 BCG 菌体を15℃以下のアセトンで 3 日づつ10回処理し、残渣 560 g を得た。この残渣を 2 日づつのメタノールで 5 回、クロロホルムで 3 回、15℃以下で処理した後、37℃のメタノールで 5 回抽出した。

表 3 低温分別抽出法による抽出物の重量

回数	溶媒 <15℃ MeOH	<15℃ CHCl <sub>3</sub>	37℃ MeOH
1	11.5	65.4	20.5
2	7.1	13.9	9.5
3	3.7	4.0	6.7
4	2.4	-	7.0
5	2.9	-	3.3
計	27.6	83.3	47.0

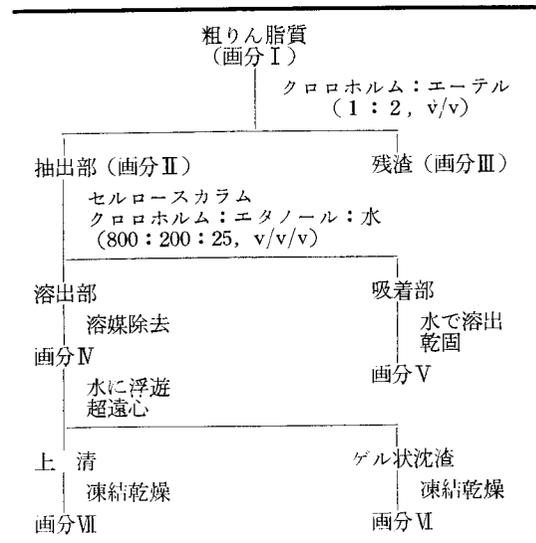
表中の数値は、560 g のアセトン抽出残渣より表 2 の方法で抽出された画分の重量(g)を示す。

抽出物の重量を毎回秤量した結果を表 3 に示した。アセトン処理菌体に対する抽出物の重量比は、冷メタノール 4.9%、冷クロロホルム14.9%、温メタノール8.4%であった。これらの値を連続抽出装置を用いたときの成績と比較すると、クロロホルム抽出物の量が少ないことが目立つ。しかし表の成績からは抽出不完全と考えられないので、これは用いた菌の lot が異なる為と考えられよう。冷および温メタノール抽出物をそれぞれ冷、温、沸騰アセトンで順次処理し、可及的にアセトン可溶物を除いた画分を粗りん脂質とした。収量はそれぞれ17.7g と 39.8g で、アセトン処理菌体に対する比率は3.2%と7.1%となる。これら画分の最少血球感作量は 8 μg および 4 μg であった。

温メタノール抽出物から得られた粗りん脂質を出発材料(画分 I)とし、以下の分画をおこなった。

**水溶性成分の分離**

表 4 水溶性成分の分離



高橋抗原での予備実験に基づき、表4に示すような水溶性成分の分画を行った。画分I 30gをクロロホルム：エーテル＝1：2に30 mg/mlの割合で浮遊し、マグネチックスターラーで1時間攪拌後10,000 r.p.m 30分遠心し、抽出液と残渣に分けた。残渣は秤量して更に2回同様に処理した。3回の抽出物(13.2g, 7.9g, 0.5g)を合わせて画分IIとし、最後の残渣(6.5g)を画分IIIとした。次に画分II 15gを100mlのクロロホルム：エタノール：水＝800：200：25に溶解し、同じ溶媒で作ったWhatmann セルロース粉末のカラム(150g; 4×42cm)にかけた。900mlの溶媒で溶出した後吸着部を水で溶出、溶出液をそれぞれ減圧乾固、画分IV、画分Vを得た。画分IVは更に20mg/mlの水浮遊液とし氷庫中一夜攪拌した後、40,000r.p.m 3時間の遠心により上清と沈渣に分けた。沈渣は同様にして2回超遠心により水洗した後凍結乾燥し、画分VIとした。上清は2回の洗液と合わせ、凍結乾燥し、画分VIIとした。

表5 表4で得られた各画分の性状

画分	窒素含量 %	りん含量 %	糖含量 %	収量 %	最少血球感作量 μg
I	0.5	1.9	35	(100)	4
II	0.4	2.0	27	72	2
III	0.8	1.3	58	22	8
IV	0.3	2.1	11	46	2
V	0.6	1.2	63	20	16
VI		2.2	9	43	1
VII		0.9	58	2	32

このようにして分けた各画分の性状を表5に示した。画分VIすなわち水溶性物質を除いた脂質画分は、最も強い血球感作能を有し、その糖含量は出発材料の35%から9%まで減少した。また僅かではあるが窒素含量の低下とりん含量の上昇も見られた。低いながら血球感作能を有する水溶性画分Vをゲル濾過で分画し、水溶性抗原を得ようとする試みは不成功に終わった。すなわちこの画分の水溶液をクロロホルムで洗い、混在する脂質を可及的

表6 感作赤血球凝集反応阻止試験

感作抗原	阻止抗原 血清希釈度	画分VI (μg)						粗リポ多糖体 (μg)						M-D抗原 (μg)							
		*	16	8	4	2	1	0	16	8	4	2	1	0	16	8	4	2	1	0	
		画分VI (16 μg)	40	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	80		±	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++
	160		-	-	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++
	320		-	-	-	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++
	640		-	-	-	-	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++
	1280		-	-	-	-	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++
粗リポ多糖体 (16 μg)	40		+	+	++	++	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	+	++	++	++	
	80		+	+	+	++	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	+	++	++	
	160		+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	±	+	+	
	320		±	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	640		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1280		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M-D抗原 (8 μg)	40		+	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	
	80		+	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	-	+	++	++	++	
	160		++	+	+	+	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	±	++	++	
	320		++	++	++	+	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	++	
	640		±	±	±	±	±	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	±	
	1280		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\* テトラヒドロフラン濃度が高いため溶血し、判定不能

に除いた画分1gを10mlの水に溶解し、水を溶媒としてセファデックスG 50 M (145ml) を通過させた。溶出液5mlづつについてその260m $\mu$ における吸光度を測定したが、初めに溶出してくる小さなピークにのみ血球感作能が認められた。この画分を凍結乾燥して約25mgの物質を得たが、この物質は再び水には溶けなかった。

#### 画分VIの性状

M-D 抗原は中性溶液で長期保存すると沈澱を生じ血球感作能が低下するが、溶液をpH9にすると沈澱は再溶解し血球感作能も回復するという<sup>17)</sup>。そこでM-D抗原の混在を調べるため、画分VIをborateで処理してみた。pH9の0.1M borate bufferに画分VIを20mg/mlの割合で溶解し、充分攪拌後40,000 r.p.m. 4時間遠心した。沈澱を更に2回同様に処理し、各上清について紫外域の吸光曲線とアンスロン法による糖の測定を行なったが、いずれも検出できなかった。

画分VIの血球感作能は最も強く、その最少血球感作量は1 $\mu$ gで、これを感作抗原とする赤血球凝集反応とM-D反応との関係は表6に示すごとくであった。前者の反応は画分VIにより特異的に阻止されたが、積田らの精製M-D抗原および粗リポ多糖体による阻止は見られなかった。これと逆にM-D反応と粗リポ多糖体感作赤血球凝集反応は、共に積田らの精製M-D抗原および粗

リポ多糖体によって特異的に阻止されたが、画分VIによる阻止は見られなかった。

画分VIは55%の脂肪酸を含有し、その糖組成はアンスロン法によるヘキソース定量値、Somogyi法による還元糖定量値、Discheの硫酸システイン法によるヘキソース定量値の3つの測定値および分光特性から計算すると、マンノース11~12%、グルコース3%で、ペントースは検出されなかった。この画分は高橋抗原と類似の溶解性を示し、クロロホルム中では分離不能の不溶物を生じたが、クロロホルム：メタノール=3:1には溶解し、そのけい酸薄層クロマトグラムは図1、a、bに示すごとくであった。これはAkamatsuら<sup>18)</sup>が結核菌からクロロホルム：メタノールで抽出して得た全りん脂質のクロマトグラムとほとんど同じである。

#### クロロホルム：メタノールによる抗原物質の抽出と、けい酸カラムクロマトグラフィーによる分画

最少血球感作量1 $\mu$ gのりん脂質画分VIは結核菌のりん脂質成分をすべて含むと考えられるが、クロロホルム中で不溶物を生じ通常のけい酸カラムクロマトグラフィーを適用出来ない。そこでクロロホルム：メタノールでりん脂質を抽出し、けい酸カラムクロマトグラフィーで分画しようとしてみた。

水洗、凍結乾燥したBCG 500gを7 $\ell$ のクロロホルム：メタノール=2:1により2日づつ室温で2回、37 $^{\circ}$ Cで1回抽出し、抽出液をそれぞれゼイツ濾過した後濃縮乾燥した。抽出物を合わせ、1 $\ell$ のクロロホルム：メタノール=2:1に溶解し、これを10 $\ell$ の0.1M NaCl中に

図1 りん脂質画分の薄層クロマトグラム



- a, りん脂質画分VI ヨード蒸気  
b, " リン発色試薬  
c, クロロホルム・メタノール法 ヨード蒸気  
d, " リン発色試薬

表7 けい酸カラムによりえられた画分の性状

画分*	収量(mg)	薄層クロマトグラム上のスポット番号**	最少血球感作量( $\mu$ g)
粗りん脂質	(4,450)	1,2,3,4,5,6,7,8,9	4
I	860	1	
II	1,015	1,2	>64
III-1	119	2,3	>64
III-2	336	2,3,4, 6	4
III-3	253	3,4, 6	16
III-4	541	2,3,4,5,6,7,8	4
III-5	67	6,7	4
IV-1	340	5,6,7,8,9	4
IV-2	529	5,6,7,8,9	4~8
IV-3	238	5,6,7,8,9	8
V	120	(原点)	>64
計	4,418		

\* 図2参照

\*\* 図1参照

加えて水溶性物質およびリポ蛋白質を可及的に除いた。ここで得られたクロロホルム層を濃縮乾固した後、冷温、熱アセトンで数回づつ抽出し、得られた抽出残渣 24.45g をりん脂質画分とした。

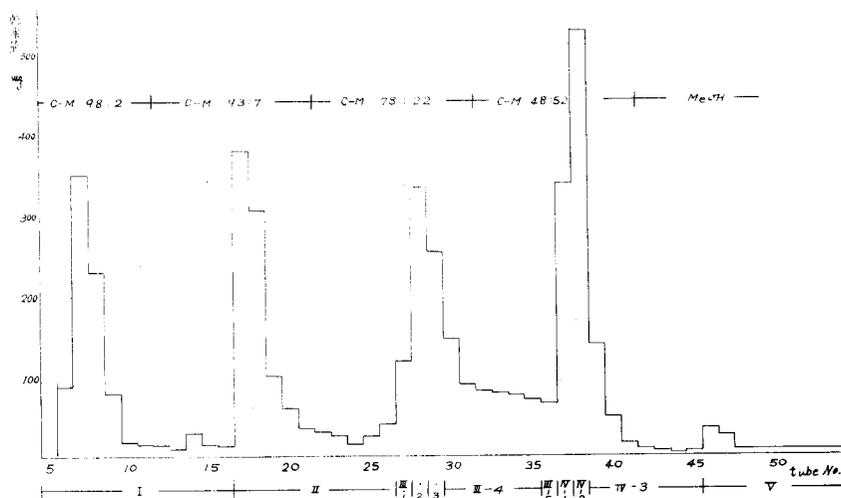
この画分の最少血球感作量は、前記りん脂質画分Ⅵの量より明らかに多く、4  $\mu$ g であった。

この画分は Na 塩であるので、その薄層クロマトグラフィーには 0.05M 重曹で作ったけい酸薄層を用いた。得られたクロマトグラムは図 1, c, d に示すごとくりん脂質画分Ⅵとほとんど同じであるが、溶媒先端にりんを含まないスポットがはっきり認められた。

この画分をクロロホルム：メタノール=93：2 に溶解し、重曹処理けい酸カラムクロマトグラフィーで分画し、図 2 に示す溶出パターンを得た。溶出物を図に示し

たごとく集め、けい酸薄層クロマトグラフィーによる分析と最少血球感作量の測定を行った成績を表 7 に示した。薄層クロマトグラム上の各スポットはまだ同定していないが、Akamatsu ら<sup>19)</sup>によると結核菌体りん脂質の主成分は、cardiolipin (スポット番号 2), phosphatidyl ethanolamine (スポット番号 3) および phosphatidyl-inositol oligomannosides (スポット番号 7, 8, 9) である。表 7 からはスポット番号 6 の物質が抗原のように見えるが、血球感作能を有するすべての画分はいくつかの成分を含んでいた。これらの成分を分離すべく現在実験中である。イノシトールりん脂質画分にはいくつもの成分があることが知られている<sup>19)20)21)</sup>ので、未同定のスポット番号 5, 6 の物質もこの画分に属すると推定される。

図 2 BCG 菌体りん脂質画分のクロマトグラフィー



Silicic Acid-Hyflo Super Cel (2 : 1) Na 型 250g.

カラム : 4.6×37.0cm ガラス・フィルター, テフロンコック

試料 : 4.45g/ml CHCl<sub>3</sub>-MeOH (93 : 2)

## 考 按

結核菌のりん脂質画分は、結核症における補体結合反応の抗原となることが早くから知られている<sup>12)</sup>。高橋<sup>1)</sup>はこの画分が感作赤血球凝集反応の抗原ともなり得ることを見出した。この反応は、結核症の診断・予後の判定に広く用うべく赤血球の代わりにカオリン粒子を凝集媒体とするよう改良され、臨床面でのデータを集積中である。著者らはこの反応の抗原を精製中であるが、前

報<sup>1)</sup>に記したごとく抗原画分の感作能を量的に表示するため、赤血球凝集反応を用いている。

高橋抗原は窒素と糖質を含有するので、その中の抗原物質は混在するりん脂質以外の成分である可能性が残っていた。そこでまず血球感作能の高い画分を得ようと試み、低温溶媒で分別抽出した菌体残渣より温メタノールで抽出された粗りん脂質から水溶性物質を除き、2%緬羊赤血球 1ml を感作する最少量が 1  $\mu$ g の抗原 (画分Ⅵ) を得た。この最少血球感作量は、初期の高橋抗原につい

て報告された値 (50 ~ 100  $\mu\text{g}$  <sup>9)</sup>) よりいちぢるしく低く、積田ら<sup>9)</sup>の精製 M-D 抗原の値 (0.25~0.5  $\mu\text{g}$ ) に近い。M-D 抗原は、Polyarabomannose と脂質からなる活性部分を有し、pH 9 で最もよく溶解することが知られている<sup>9)16)</sup>。今回得られた抗原画分は、アラビノースが検出されないこと、pH 9 で溶解しないこと、および感作赤血球凝集反応阻止試験の成績から M-D 抗原とはことなることが確認された。粗りん脂質中に存在する抗原物質は必ずしも1つとはいえないが、粗りん脂質から分離された水溶性画分 (画分V) の有する弱い血球感作能は、水溶性抗原によるのではなく、その画分中に混在する水不溶性物質によることも示された。抗原画分は、けい酸薄層クロマトグラフィーによると結核菌のりん脂質成分をすべて含んでいたが、クロロホルム中で分離不能の不溶物を生じた。一方クロロホルム：メタノールで抽出して得られたクロロホルム可溶の結核菌体全りん脂質画分の最少血球感作量は 4  $\mu\text{g}$  であった。両りん脂質画分とも脂質画分からアセトン不溶物を除いて得られた。ところで一般に脂質が低融点の wax を多量に含む場合、熱アセトン中で全脂質が液化してアセトン層と脂質層に分離し、脂質層中のアセトン可溶物の除去は不完全となる。前記抗原画分 (画分VI) の出発材料は wax 含量が少なく、熱アセトン中で液化しないので、沸騰溶媒連続抽出装置によりアセトン可溶物をほとんど完全に除くことが出来た。一方クロロホルム：メタノールではほとんどすべての脂質が抽出されるため、この抽出物からアセトン処理して得たりん脂質画分には、薄層クロマトグラムが示すようにアセトン可溶性脂質が混入していた。このことは両りん脂質画分のクロロホルム溶解性および血球感作能の差の一因となっていると考えられる。

クロロホルム：メタノール法で得られたりん脂質画分のけい酸カラムクロマトグラフィーによる分画成績から抗原物質はイノシトールりん脂質画分にあると推定された。最近 Pangborn ら<sup>22)</sup>は、補体結合反応抗原の精製を目的とし、結核菌からピリジンで抽出した糖脂質画分を溶解度とけい酸カラムクロマトグラフィーのたぐみな組合せで分画し、phosphatidyl inositol, 2種の phosphatidyl inositol dimannosides (AとM) および2種の phosphatidyl inositol pentamannosides (GとK) を単離した。これらはすべてけい酸薄層クロマトグラフィーにより単一のスポットを示していた。AとMは補体と非特異的に反応するが、これらの1つをGと2:1の割合で混合すると抗補体作用は消失し、結核血清の存在下で特異的に補体を結合すると報告されている。Stöss ら<sup>23)</sup>

は彼らの考案した微量沈降反応により結核菌のりん脂質に抗原性を見出し、活性因子はイノシトールと2~5分子のマンノースを含むと報告している。Subrahmanyam ら<sup>24)</sup>はけい酸を浸み込ませた濾紙によるクロマトグラフィーで結核菌のりん脂質を分画し、高橋カオリン凝集反応の抗原は phosphatidyl inositol mannosides であると報告している。これらのことから高橋抗原がイノシトールりん脂質画分中にあることはもはや否定出来ない。しかし、この画分は Pangborn ら<sup>22)</sup>によると未同定の物質を含めて少なくとも7つの成分を含有し、補体結合反応の抗原はこの中の2つの適当な比率による組合せであるという。また Subrahmanyam らはカリオン凝集反応を用いているため、抗原画分の感作能が量的に示されていない。赤血球感作抗原については Pangborn らの精製画分のレベルで更に解析する必要がある。

## 結 論

1. 高橋抗原の性状を調べ、それに基づいて抗原画分の抽出・分画法を改良した。
2. 菌体を低温溶媒により分別抽出した後温メタノールで得られたりん脂質画分から水溶性成分を除き、最少血球感作量 1  $\mu\text{g}$  の抗原画分をえた。血球感作能はこの画分中に混在する M-D 抗原または他の水溶性物質によるものではないことを確認した。
3. クロロホルム：メタノールで抽出したりん脂質画分をけい酸カラムクロマトグラフィーで分画し、血球感作能はイノシトールりん脂質画分にあると推定した。

## 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) 積田亨, 大橋昌子: 第11回結核化学研究グループ総会講演. 1963.
- 4) Tsumita, T., Matsumoto, R., and Mizuno, D.: Jap J M Sc & Biol 13, 131, 1960. Matsumoto, R.: Jap J M Sc & Biol 13, 139, 1960.
- 5) 小野勝男: 結核の研究, 10, 1, 1958
- 6) 佐々木昭雄, 山本健一, 高橋義夫: 結核の研究 21~22, 25, 1965.
- 7) Kabat, E. A., and Mayer, M. M.: Experimental Immunochemistry, 2nd ed., Chales C. Thomas Pub. USA p. 833, 1961.
- 8) Bartlett, G. R.: J Biol Chem, 234, 466, 1959.
- 9) Dittmer, J. C., and Lester, R. L.: J Lipid Research 5, 126, 1964.

- 10) Rathbone, L., and Maroney, P. M. : Nature, 200, 887, 1963
- 11) 高橋義夫 : 日本細菌学雑誌, 15, 935, 1960.
- 12) Boquet, A., et Nègre, L. : Ann Inst Pasteur, 37, 787, 1923.
- 13) Folch, J : J Biol Chem, 177, 497, 1949.
- 14) Lea, C. H., and Rhodes, D. N. : Biochem J, 54, 467, 1953.
- 15) Hanes, C. S., and Isherwood, F. A. : Nature, 164, 1107, 1949.
- 16) Macheboeuf, M. A. et Fethké, N : Bull soc chim biol, 16, 229, 1934.
- 17) 積田亨 : 私信
- 18) Akamatsu, Y., and Nojima, S. : J. Biochem, 57, 430, 1965.
- 19) Vilkas, E., and Lederer, E. : Bull Soc chim biol, 42, 1013, 1960.
- 20) Nojima, S., Kondo, E., and Mizuno, : D. J Biochem, 45, 475, 1958.  
Nojima, S. : J Biochem, 46, 607, 1959.
- 21) Ballou, C. E., Vilkas, E., and Lederer, E. : J Biol Chem, 238, 69, 1963.  
Ballou C. E., and Lee, Y. C. : Biochemistry, 3, 682, 1964.  
Lee, Y. C., and Ballou, C. E. : J Biol Chem, 239, 1316, 1964.
- 22) Pangborn, M. C., and Mckinney, J. A. : J Lipid Research 7, 627, 1966.
- 23) Stöss., and Herrmann, R. : Nature, 208, 1224, 1956.
- 24) Subrahmanyam, D., and Singhvi, D. R. : Proc Soc Exptl Biol & Med, 120, 102, 1966.