



Title	精製リン脂質による結核血清反応
Author(s)	佐々木, 昭雄; SASAKI, Akio; 山本, 健一 他
Description	
Citation	結核の研究, 34, 56-63
Issue Date	1974-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26835
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_P56-63.pdf



精製リン脂質による結核血清反応

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

樽松三郎 永山能為

国立北海道第二療養所

(昭和48年10月1日受付)

結核患者血清中には結核菌リン脂質に対する抗体が存在する。このリン脂質の主成分はイノシトールとマンノースを含むグリセロリン脂質であり、Ballouら¹⁾およびPangbornら²⁾の研究から図1の様な構造をもつ一群の物質であることが明らかにされている。

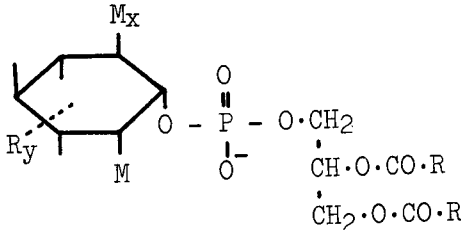


図1 Phosphatidylinositol oligomannosides with extra acyl residues の構造

M: マンノース残基。 $x=0\sim5$

R: 脂肪酸残基。 $y=0\sim2$

略号: PIM_x (R_y)

これら PIM_x の一部が血清学的活性を有することは、かなり確かである。Stössら³⁾は彼等の考案した微量沈降反応により結核菌のリン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⁴⁾はケイ酸カラムおよびペーパークロマトによって数種の結核菌よりリン脂質を分画し、高橋結核反応(カオリン凝集反応⁵⁾)の活性因子は PIM₁, PIM₂, PIM₅ であると報告している。一方 Pangbornら²⁾は補体結合反応抗原の精製を目的とし、結核菌からペリジンで抽出した糖脂質画分を溶解度とケイ酸カラムクロマトのたぐみな組合わせで分画し、Phosphatidylinositol (PI), 2種の PIM₂ (A と M) および2種の PIM₅ (K と G) を単離した。これらはすべてケイ酸薄層クロマト (TLC) 上単一スポットを示し、2モルの A または M と1モルの G の混合物が最適の補体結合抗原であり、PI および2種の微量成分 (共に PIM₂R₀) は血清学的に不活性であると報告している。

我々は高橋結核反応の抗原を精製する目的で仕事を始め、リン脂質画分中の血清学的活性は、この画分に混在するかも知れない 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、クロロホルム:メタノールで抽出後分画したリン脂質の最少血球感作濃度と TLC パターンを比較して血清学的活性は PIM_x 群中であると推定したが、各成分を精製出来ずにいた^{6,7)}。Stössらおよび Subrahmanyam らの成績は高橋抗原としての活性を示しているが、抗原画分の均一性および血清学的活性が定量的に示されていない。そこで我々は実験 I. において Pangborn らの精製画分による高橋抗原の解析を試みた。しかし、分与された画分 (A, M, K, G) はいずれも報告されている様に単一ではなく、はっきりした成績が得られなかった。

化学構造の類似する PIM_xR_y 群の各成分を相互分離することは困難であるが、活性成分を単離精製し、それらを免疫化学的に解析することは抗リン脂質抗体と結核症との関連を確立するために必須のことである。

最近我々は従来の吸着型クロマトではなく、分配型のクロマトを使うことにより、リン脂質成分を TLC 上単一にまで精製することに成功し、これにより PIM_x 群の中には少なくとも2種の抗原決定基が存在することを示すことが出来た。化学的なことは別に報告する予定であり、ここでは精製リン脂質による血清反応について報告する。

実験 I. Pangborn らの精製画分による反応

実験材料と実験方法

抗原: リン脂質画分 A, M, K, G は Dr. Pangborn より分与された。A と M はヒト型結核菌 H₃₇R_v 株より単離された PIM₂R₂ と PIM₂R₁ であり、K と G はヒト型結核菌 No. 48189 株より単離された PIM₅R₂ と PIM₅R₁ である。結核菌体全リン脂質 B-T は BCG より温メタノール法で抽出し、分画したリン脂質画分 VI であり、その製法および血清学的性質は既に報告した⁷⁾。

脂質を 1.6 mg/ml の濃度に水に懸濁し、よく攪拌しながら等量のテトラヒドロフランを加えて溶解した。得られた透明溶液をリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) で 25 倍に希釈し、これを抗原原液 ($32 \mu\text{g/ml}$) とした。脂質は前もって水でよく膨潤させ、均一な懸濁液にしておくことが必要で、この操作が不完全であると力価の安定した抗原液は得られなかった⁸⁾。

抗血清: ヒト型結核菌仲野株の加熱死菌を Freund's incomplete adjuvant と共に注射して得られたウサギ抗血清を使用した。1/10 容の 3% disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 水溶液を加えることで非働化し、原血清と等量の綿羊赤血球 (SRBC) で室温 10 分間 $\times 2$ 回吸収した。

血清反応: 感作赤血球凝集反応は前報⁸⁾と同様に行なう。適当に希釈した新鮮な抗原液に等量のよく洗滌した SRBC を加えて 37°C 2 時間感作し、洗滌後 2% 感作血球浮遊液とした。血清希釈液 0.5 ml に感作血球 0.05 ml を加えて反応させた。

感作赤血球凝集反応阻止試験は、感作抗原濃度を一定 ($16 \mu\text{g/ml}$ 2% SRBC) とし、阻止抗原と抗血清の両方について希釈系列をとり、二次元で行なう。反応を確実にする為、抗原 (0.25 ml) と抗血清 (0.25 ml) の混合液を 37°C に 2 時間保った後、氷庫中に一夜放置してから感作血球を加えた。

カオリン凝集反応は高橋法に従って行なう。抗原液は脂質の 0.1 mg/ml メタノール溶液より作製した。

薄層クロマトグラフィー: シリカゲル H (メルク社製) を 0.01 M 炭酸ナトリウム溶液に懸濁し、 $20 \times 20 \text{ cm}$ のガラス板上に塗布、室温で一夜乾燥した後、特に活性化の操作を行わず、そのまま使用した。試料は 5 mg/ml の濃度に Folch の溶媒 (クロロホルム:メタノール:水 = 86:14:1) に溶解し、その $2 \mu\text{l}$ または $10 \mu\text{l}$ をスポットした。展開溶媒はクロロホルム:メタノール:水 = 60:35:8、検出には重クロム酸ナトリウムを飽和した 50% 硫酸を噴霧後、 160°C で一夜加熱した。

実験結果

上記 5 種の脂質画分による感作赤血球凝集反応の成績

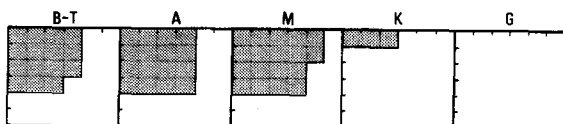


図2 感作赤血球凝集反応の場

横軸: 感作抗原濃度。左より $16, 8, 4, 2, 1, 0.5 \mu\text{g/ml}$ 2% SRBC。縦軸: 血清希釈度。上より 80, 160, 320, 640, 1280 倍, 生食水対照。

を図2に示した。今回の実験条件下、B-Tの最少血球感作濃度は $2 \mu\text{g/ml}$ 2% SRBC、この抗原に対する抗体価は 640 であった。AとMはB-Tとほとんど同じ活性を示したが、Mの方がAより僅かに強い活性を有する様に見えた。K感作血球の場合、最少血球感作濃度は $4 \mu\text{g}$ 抗体価は 80 であった。G感作血球は今回の実験条件 (最大感作濃度 $16 \mu\text{g}$, 最少血清希釈 1/80) では凝集しなかった。

血球感作能を示した B-T, A および M を感作抗原とし、5 種の脂質画分すべてについて凝集反応の阻止能力を調べた成績を図3に示した。B-T感作血球の凝集はB-Tの添加により特異的に阻止された。AまたはMによる阻止は特異的でなく、そのパターンは図に見られるごとく共に不規則なものであった。KとGでは阻止されなかった。一方、AまたはM感作血球の凝集はB-T, A, Mのいずれによっても阻止された。これらの場合にもKとGでは阻止されなかった。

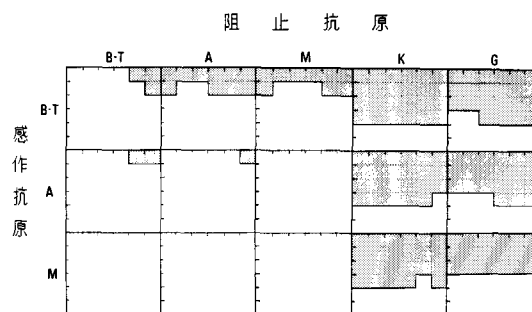


図3 感作赤血球凝集反応阻止試験の場

横軸: 阻止抗原濃度。左より $16, 8, 4, 2, 1, 0.5 \mu\text{g/ml}$ 。縦軸: 血清希釈度。上より 80, 160, 320, 640, 1280, 2560 倍。

カオリン凝集反応の成績は次の様であった。B-TとAはカオリン凝集反応の標準抗原であるPdと同じ抗体価 160 を示した。MとKでは一段低い抗体価 80 が得られた。Gによる抗体価は 20 に過ぎなかった。カオリン凝集反応の場合、感作抗原濃度を低くすると非特異凝集が起こりやすくなるので、今回は感作濃度を一定に行なう。従って抗原力価を直接比較することは出来ない。しかし、反応の強さを考慮に入れると、B-T, A, Mの血清学的活性はPdと大体同じであり、Kは少し低く、Gは著しく低いといえる。

リン脂質抗原の TLC パターンを図4に示した。各精製画分とも 2 つ以上の成分を含んでおり、AとMの間には 2~3 個の共有成分が見られた。

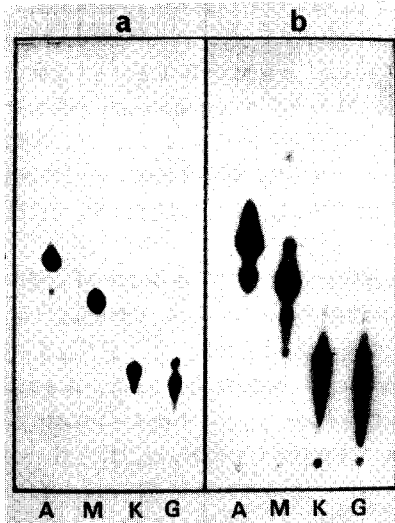


図4 リン脂質の薄層クロマトグラム
試料添加量: a. 10 μ g, b. 50 μ g

小 括

Pangbyrn らの精製リン脂質による感作赤血球凝集反応およびその阻止試験を行なった。PIM₂R₂を主成分とするA, PIM₂R₁を主成分とするMと、結核菌体全リン脂質B-Tとの間には共通する抗原があることが示された。血清学的にAとMとは区別出来ず、B-Tはこれらと共通する抗原の他に別な特異性をもった抗原をも含むことが示された。PIM₅R₂を主成分とするKにはAおよびMとは違った血球感作抗原があると考えられる成績が得られた。PIM₅R₁を主成分とするGには赤血球感作能および凝集阻止能が見られなかった。カオリン反応では弱い活性が見られたが、この画分に混在する微量の抗原成分に由来するか、あるいは非特異反応である可能性がある。

4種の精製リン脂質はすべて TLC 上単一であるとはいえず、活性成分の確認は出来なかった。

実験 II. BCG より単離した 2 種の TLC 上単一なリン脂質による反応

実験材料と実験方法

リン脂質: ソートン 4 週培養 BCG 菌体より Pangborn らの A および M 分画法²⁾に従って単離した A' と M' は TLC 上 A および M と類似のパターンを示し、いずれも単一ではなかった。

両画分を更にクロロホルム:メタノール:水=70:20:3を溶媒としてシリカゲル H のカラムクロマトにより分画し、TLC 上主成分のみの単一スポットを示す PA と

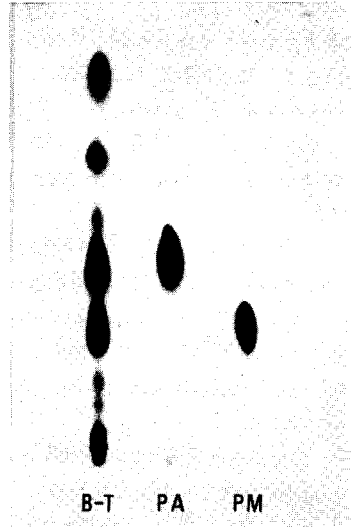


図5 リン脂質の薄層クロマトグラム

試料添加量: 100 μ g。展開溶媒:クロロホルム:メタノール:水=65:25:4。その他の条件は図4と同じ。

PMを得た(図5)。これらの製法および血清学的性質の一部は既に報告した⁹⁾。

BCG 菌体全リン脂質 B-T は実験 I. で使用したものである。

抗血清: BCG 生菌で繰返し感作したウサギ血清(pool したもの) および国立北海道第二療養所に入院中の結核患者 20 名の血清を使用した。

血清反応: 実験 I. と同様にして作製した新鮮な抗原希釈液に等量の洗滌した 2.4% SRBC を加え、37°C の水浴中で 1 時間感作し、洗滌後、1.2% 感作血球液とした。

反応はマイクロタイター法で行なった。ウサギ血清の場合は血清 2 滴または血清 1 滴 (25 μ l) と阻止抗原 1 滴に、患者血清の場合は血清 1 滴に、感作血球 1 滴を加えた。

実験結果

A' および M' はいずれも血球感作抗原あり、最少血球感作濃度および抗体価については B-T とほとんど同じであった。B-T 感作血球の凝集は B-T によって特異的に阻止されたが、A', M', A'+M' のいずれによっても阻止されなかった。A' および M' 感作血球の凝集は B-T, A', M' のいずれによっても阻止された。

B-T, PA, PM による血清反応の成績を図 6 と図 7 に示した。抗 B-T および抗 PA 抗体価は共に 640 であり、これらに比して抗 PM 抗体価は 320~640 と僅かに低かった。一方、各抗原の最少血球感作濃度はそれぞれ 2, 4, 2 μ g/ml 2.4% SRBC であった。B-T 感作血球の凝集は

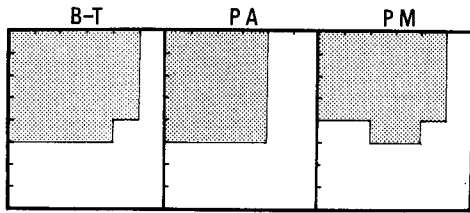


図6 感作赤血球凝集反応の場合

横軸：感作抗原濃度。左より32, 16, 8, 4, 2, 1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 2.4% SRBC。縦軸：血清希釈度。上より40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560倍, 生水対照。

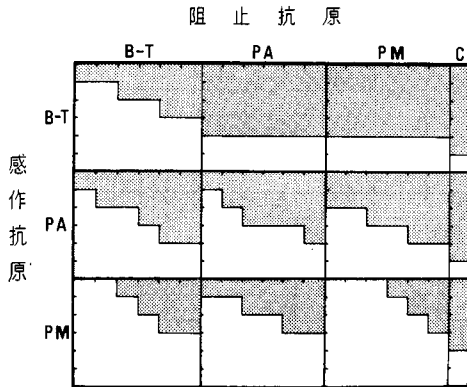


図7 感作赤血球凝集反応阻止試験の場合

横軸：阻止抗原濃度。左より8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 。縦軸：血清希釈度。上より40, 80, 160, 320, 640, 1280倍。

B-Tによって阻止されたが、PAによってもPMによっても阻止されなかった。PA感作血球の凝集はB-T, PA, PMのいずれによっても阻止されたが、PMによる阻止の程度は低かった。PM感作血球の凝集は3抗原のいずれによっても阻止されたが、PAによる阻止の程度は低かった。

結核患者血清20例について調べた3抗原に対する抗体価を表1に示した。抗B-T抗体価はほぼカオリン凝集反応の成績と一致していた。1例においてのみ(IV型)抗PA抗体価が抗B-T抗体価より高かったが、その他の例では抗PAおよび抗PM抗体価は抗B-T抗体価と同じかそれより低かった。13例において抗PAと抗PMの抗体価は大体等しかったが、4例においては抗PA抗体価の方が、3例においては抗PM抗体価の方が明らかに高かった。3つの抗体価の相対的大小関係から患者を5つの型に分けて見たが、このような抗体価による分類と臨床症状との間には現在までのところ相関は得られていない。

表1 結核患者血清の抗リン脂質抗体価

型	症例	抗体価 B-T	抗体価 PA	抗体価 PM	病巣の 拡がり*	排菌の 有無
I (B-T \geq PA \geq PM)	51Ya	128	128	128	F.A.	
	21Mo	64	64	32	M.A.	+
	12Ku	64	32	32	M.A.	+
	12Kw	16	16	8	Min.	±
	12Kg	16	16	4	M.A.	-
II (B-T>PA>PM)	53Sh	128	32	8	M.A.	+
	12Su	32	16	4	M.A.	-
	21Yk	16	8	4	M.A.	+
	12Ks	16	4	-	Min.	-
III (B-T>PA \approx PM)	12Ni	128	8	8	M.A.	+
	21Is	128	4	4	F.A.	+
	21Yo	128	-**	-	M.A.	+
	21Ym	16	-	-	M.A.	+
	12Ya	16	-	-	Min.	±
	52Fu	8	-	-	Min.	
IV (B-T<PA>PM)	51Ho	128	512	128	F.A.	+
V (B-T>PA<PM)	51Su	64	-	32	F.A.	+
	52Ka	64	-	4	F.A.	+
	12Mi	32	-	8	M.A.	-
	51Wa	16	-	16	M.A.	+

* N.T.A. 分類による。F.A.; 高度進展, M.A.; 中等度進展, Min.; 軽度。

** 4倍希釈血清で反応陰性。

小 括

Pangbornらの方法に従い、BCG菌体より単離したAおよびMに相関するリン脂質A'とM'を用いて実験I.の成績を確認した。

次に、これらをTLC上主成分のみの単一スポットを示す様になるまで精製し(PAとPM), ウサギ抗BCG血清と結核患者血清を使って血清反応を行なった。PAとPMとの間にはかなりの交差反応が起こるが、両脂質の血清学的活性には差があること、B-T中にはこれらとは違う抗原も含まれていることが示された。

実験 III. ヒト型結核菌 H₃₇R_v 株より単離した6種の TLC 上単一なリン脂質による反応

実験材料と実験方法

リン脂質：ソートン6~10週培養H₃₇R_v菌体(poolしたもの)をアセトンで充分抽出した後、60°Cのメタノールで抽出し、抽出物を乾固し、アセトン可溶物と水

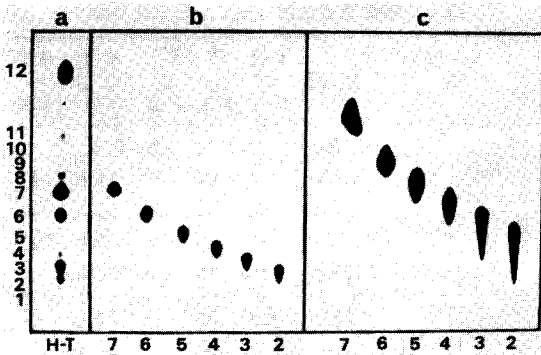


図8 リン脂質の薄層クロマトグラム

試料添加量: b 10 μ g. a, c 50 μ g. 条件は図4と同じ。各数字の前に“H-”をつける。

溶性夾雑物を除き、全リン脂質H-Tを得た。この画分はTLC上少なくとも12成分を含んでいた。溶解度とシリカゲルHによる分配型カラムクロマトの組合わせで分画し、この中の6成分、H-2~H-7を図8に示したごとくTLC上単一になるまで精製した。化学分析によるとH-2~H-7はそれぞれPIM₆R₁、PIM₆R₂、PIM₄R₁、PIM₃R₁、PIM₂R₁およびPIM₂R₂である。各成分の精製法と化学的性質の詳細については別に報告する予定である。

抗血清: 実験II.と同じウサギ抗BCG血清、H₃₇R_v加熱死菌5mgをFreund's incomplete adjuvantと共に筋注射し、1週後同量の抗原でboosterした2羽のウサギから6週後別々に採血して得た2種の抗血清、および国立北海道第二療養所に入院中の結核患者32名の血清を使用した。

血清反応: 実験II.と同様にしてマイクロタイター法で行なった。

実験結果

菌体全リン脂質H-Tと6種の精製リン脂質H-2~H-7を感作抗原とし、3種のウサギ抗血清を用いて行なった感作赤血球凝集反応の成績を図9に示した。6種の精製リン脂質すべてが血球感作能を有しており、それらの最少血球感作濃度は1~4 μ g/ml 2.4% SRBCで、血清と感作抗原の組合わせにより多少の変動はあったが大差は見られなかった。これに反し、各精製リン脂質に対する抗体価の相対的關係は血清によって著しく違っていた。抗BCG血清を使用した場合の抗体価はH-T、H-6、H-7に対して320、H-4とH-5に対して80、H-2とH-3に対して20と3つの群に分けられ、抗H-Tと抗PIM₂の抗体価は等しく、これらに比して抗PIM₆抗体価は明らかに低かった。抗H₃₇R_v-I血清を使用した場合の抗

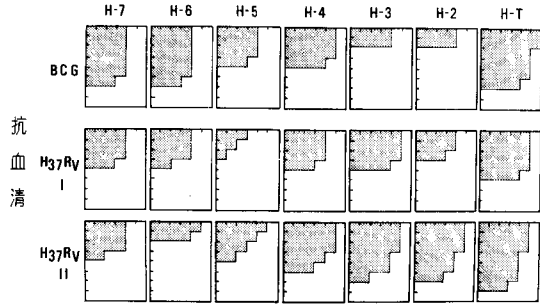


図9 感作赤血球凝集反応の場合

横軸: 感作抗原濃度。左より32, 16, 8, 4, 2, 1 μ g/ml 2.4% SRBC。縦軸: 血清希釈度。上より抗BCG血清は10, 20, 40, 80, 160, 320, 640倍、生食水対照。2種の抗H₃₇R_v血清は40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560倍、生食水対照。

体価はH-Tに対して最も高く640、H-3、H-4、H-6、H-7に対して320、H-4とH-5に対して160であり、各精製リン脂質に対する抗体価に大差はなかった。一方、抗H₃₇R_v-II血清を使用した場合の抗体価はH-Tに対して2560、H-2とH-3に対して1280、H-4に対して640、H-5とH-7に対して320、H-6に対して80であり、抗H-T抗体価が最も高く、次いで抗PIM₆抗体価であり、

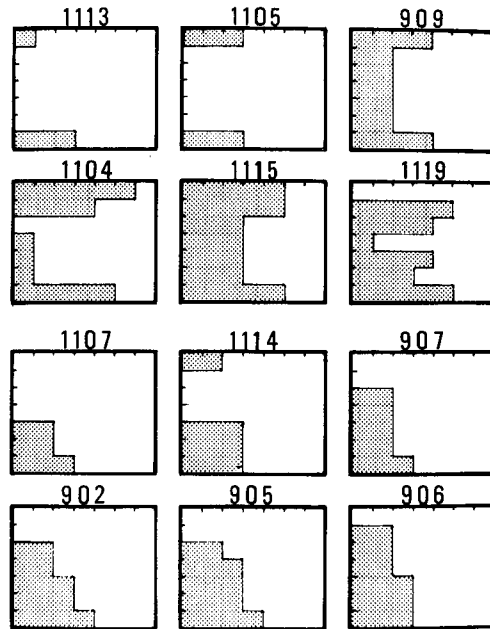


図10 6種のリン脂質に対する患者血清の抗体価パターン

横軸: 血清希釈度。左より8, 16, 32, 64, 128, 256, 512倍。縦軸: 感作抗原。上よりH-7、H-6、H-5、H-4、H-3、H-2、H-T。数字は血清番号。

これらに比して抗 PIM₂ 抗体価は明らかに低かった。また、2種の PIM₂, H-6 と H-7 に対する抗体価の間に明らかな差が見られた。

患者血清については、感作抗原濃度を一定 (32 μg/ml 2.4% SRBC) とし、各精製リン脂質に対する抗体価のみを測定した。任意に選んだ 32 例の結核患者血清中、6 例はすべての抗原に対して反応陰性 (抗体価 8 以下)、7 例は一部の抗原に対して疑陽性反応 (抗体価 8~16 で凝集がはっきりしないもの) を示した。明らかに陽性反応を示した 19 例中 7 例ではウサギ抗 H₃₇Rv-I 血清と同様に各精製リン脂質に対する抗体価の間に大差はなかった。残り 12 例の抗体価パターンを図 10 に示した。6 例ではウサギ抗 BCG 血清と同様に各抗体価の間には抗 H-T ≒ 抗 PIM₂ > 抗 PIM₆ の関係があった。この中 4 例では抗 H-6 < 抗 H-7, 1 例では抗 H-6 = 抗 H-7, 1 例では抗 H-6 > 抗 H-7 と、2 種の抗 PIM₂ 抗体価の間に差が見られた。また、この群の 1 例において抗 H-4 抗体価は抗 H-5 抗体価より明らかに低かった。残り 6 例はウサギ抗 H₃₇Rv-II 血清と同様に抗 H-T ≒ 抗 PIM₆ > 抗 PIM₂ の抗体価を示した。この群の 1 例で抗 H-6 抗体が、また別の 1 例で抗 H-7 抗体が検出された。4 例において抗 H-4 と抗 H-5 抗体が検出されたが、両抗体価の間に差は見られなかった。両群を通して全例で抗 H-2 と抗 H-3 の両抗体価の間に差は見られなかった。

ウサギ抗 BCG および抗 H₃₇Rv-II 血清を用いて行なった感作赤血凝集反応阻止試験の成績は複雑であり、血清、感作抗原、阻止抗原の組合せによって種々の結果が得られた。代表的な 3 例を図 11 に示した。凝集がほとんど或いは全く見られなくなる場合を [#] (図 11 a), 阻止抗原量に大体比例する阻止が見られる場合を [#] (図 11 b), 阻止抗原量に比例しないが部分的に凝集の阻止が見られる場合を [+] (図 11 c), 全く阻止が見られない場合を [-] とし、7 種の抗原についての交差阻止反

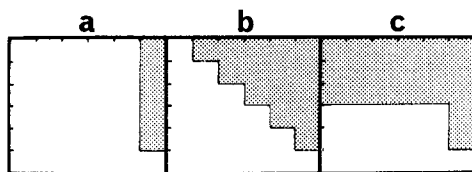


図 11 代表的な阻止反応の場合

横軸：阻止抗原濃度。左より 32, 16, 8, 4, 2, 0 μg/ml。
縦軸：血清希釈度。a 抗 BCG 血清。20, 40, 80, 160, 320, 640 倍。b 抗 H₃₇Rv-II 血清；c 抗 BCG 血清。共に 5, 10, 20, 40, 80, 160 倍。
感作抗原：阻止抗原の組合せは a と b, H-6:H-6。c, H-4 または H-5:H-7。

表 2 抗 BCG 血清による交差阻止試験

	阻止抗原							
	H-7	H-6	H-5	H-4	H-3	H-2	H-T	
感作抗原	H-7	#	#	#	#	-	-	#
	H-6	#	#	#	#	-	-	#
	H-5	+	+	#	#	-	-	#
	H-4	+	+	#	#	-	-	#
	H-3	-	+	#	#	#	#	#
	H-2	-	+	#	#	#	#	#
	H-T	-	+	#	#	-	-	#

表 3 抗 H₃₇Rv-II 血清による交差阻止試験

	阻止抗原							
	H-7	H-6	H-5	H-4	H-3	H-2	H-T	
感作抗原	H-7	#	#	+	+	+	+	+
	H-6	+	#	+	+	+	+	+
	H-5	-	-	#	#	-	+	#
	H-4	-	-	+	#	#	#	#
	H-3	-	-	-	+	#	#	#
	H-2	-	-	-	+	#	#	#
	H-T	-	-	-	#	#	#	#

応の成績を表にまとめた。抗 BCG 血清による成績 (表 2) では、H-2 と H-3, H-4 と H-5, H-6 と H-7 それぞれの間には完全な交差反応が見られた。H-2 と H-3, H-4 と H-5 は感作抗原としても阻止抗原としても全く区別出来なかった。一方、H-6 と H-7 は感作抗原としては同じであったが、これら以外の抗原で感作された血球の凝集を阻止する能力において僅かながら差が見られた。H-T 感作血球の凝集は H-T, H-4, H-5 のいずれによっても特異的に、H-6 によっては部分的に阻止されたが、H-2, H-3, H-7 のいずれによっても阻止されなかった。これに反し、抗 H₃₇Rv-II 血清による成績 (表 3) では、H-2 と H-3 の間には完全な交差反応が見られたが、H-4 と H-5, H-6 と H-7 それぞれの間の交差反応は完全でなかった。H-2 と H-3 は感作抗原としても阻止抗原としても大体同じであったが、H-4 と H-5 の間にはかなりの差が見られた。H-T 感作血球の凝集は H-T, H-2, H-3, H-4 のいずれによっても阻止されたが、H-5, H-6, H-7 のいずれによっても阻止されなかった。

小 括

H₃₇R_v 菌体より単離した6種の TLC 上単一なリン脂質すべてが血球感作抗原であった。各精製リン脂質に対する抗体価の相対的關係および凝集反応の交差阻止パターンは血清によって違っていた。2種のリン脂質は血清学的に区別出来なかったが、その他のリン脂質間には一部の血清で血清学的差が見られた。

総括および考按

抗原抗体反応は非常に感度の高い、すぐれた特異性を持つ反応であり、他の方法では困難な微量物質の検出にも用いられている。一方、化学構造の類似した抗原の間では屢々交差反応が起る。従って、天然物から単離・精製された類似の化学構造を持つ一群の物質に血清学的活性が見られた場合、その活性がこれらの物質に共通して存在する微量成分に由来する可能性があり、また、複数の抗原決定基が存在する可能性もある。高橋結核反応の抗原は Phosphatidylinositol oligomannosides (PIMx) であるといわれている⁴⁾ が、上記可能性についての検討がなされていなかった。

Pangborn らの精製リン脂質を用いた実験 I. の成績では、PIM₂ を主成分とする A と M に強い血清学的活性が見られ、PIM₅ を主成分とする K と G にはほとんど活性がなかった。また、4種の精製リン脂質はいずれも TLC 上主成分の他に数個の微量成分も含んでいた。一方、Ribi ら¹⁰⁾ は K と G にそれぞれ主成分の他に5個および2個以上の微量成分を検出し、血清学的活性は両主成分にはなく、遠心クロマト上これらより移動度の大きい微量成分にあると報告している。これらのことは PIMx 群中の抗原決定基が PIM₂ や PIM₅ 上にあるのではなく、共存する微量成分上にある可能性を示している。しかし、TLC 上主成分のみの単一スポットを示す6種の精製リン脂質を用いた実験 III. の成績は、PIMx 群中に複数の抗原決定基が存在することを明らかにした。

結核血清は精製リン脂質に対する抗体価から3つの群に分けられる。抗 PIM₆ 抗体価が抗 PIM₂ 抗体価に比して高い群 (I 群)、大体等しい群 (II 群)、低い群 (III 群) である。我々の実験 I. や Ribi らの実験において K と G に血清学的活性を見出し得なかったのは、III 群に属する血清を使用した為と説明される。抗体価のみならず交差阻止の成績からも PIM₆ と PIM₂ は違う抗原決定基を有していることは明らかである。

2種の PIM₆, H-2 と H-3, は今回の実験では血清学的に区別出来なかった。一方、2種の PIM₂, H-6 と H-7 の間には一部の血清で差が見られた。PIMx は親水性の

マンノースと疎水性の脂肪酸を種々の比率で含んでおり、溶液状態では会合コロイドを形成している。H-2 と H-6 は3分子、H-3 と H-7 は4分子の脂肪酸を含んでいるが、脂質の分散状態に影響を与えるのは親水基と疎水基の比である。同じ脂肪酸1分子の差が PIM₆ 群よりも親水基の少ない PIM₂ 群で著しい影響を与える。また脂質の分散状態におよぼす血清側の因子も考える必要がある。従って、H-6 と H-7 との間に見られた血清反応上の差が抗原決定基の違いを示すものか、脂質の物理化学的状态の違いによるものかは明らかでなく、今後の検討を必要とする。H-4 と H-5 相互間、およびこれらと PIM₆ 群、PIM₂ 群との間についても同様である。

H₃₇R_v 菌体全リン脂質は TLC 上少なくとも12成分を含んでいる。その中3成分 (多分 H-10, H-11, H-12) は phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin であることが知られている。適当な方法を用いると、これらの脂質に対する抗体を得ることが出来る¹¹⁻¹³⁾ が、通常の結核血清反応における抗原とはならない様である¹⁴⁾。TLC 上最も移動度の小さい H-1 成分は、分画操作中、水および Folch の溶媒に不溶となり、精製出来なかった。H-2 と H-3 は TLC 上 G と K に相当するが、PIM₅ ではなく PIM₆ であった。これについては別に報告する予定である。未同定の2成分 (多分 H-8 と H-9) は血清学的活性を持っている可能性がある。従って高橋抗原中の活性因子は6成分以上であり、抗原決定基は2種以上と結論される。

精製リン脂質抗原に対する抗体価と結核症との関連については未だ明らかでない。ウサギにおいて BCG 感作血清が常に III 群に属するわけではなく、II 群のこともあり、H₃₇R_v 感作血清は通常 II 群である。しかし、患者血清にも明らかに3つの群が見られている。菌株、菌量、感染経路、感染後の経過、生体の感受性などが複雑に関与して各リン脂質に対する抗体を産生しているであろう。これらが解明されれば、リン脂質による結核血清反応の臨床的価値が増大すると期待される。

結 語

1) Pangborn らの精製した4種のリン脂質はいずれも TLC 上単一でなく、抗原解析の材料としては不適当であった。

2) 当研究室で単離した6種の TLC 上単一なリン脂質はすべて血球感作抗原であった。これらは PIM₆R₁, PIM₆R₂, PIM₄R₁, PIM₃R₁, PIM₂R₁, PIM₂R₂ である。

3) 結核血清の6抗原に対する抗体価のパターンは一定していなかった。

4) PIM₆R₁ と PIM₆R₂ は血清学的に区別出来なかったが、これらおよび他の 4 脂質相互間には血清学的差が見られた。しかし、PIM₆ 群と PIM₂ 群の間の差が最も著しかった。

5) 以上の成績から、PIM₆ と PIM₂ には異なる抗原決定基が存在すると結論し、5 種の抗原相互間の血清学的差について考察した。

終わりにのぞみ、精製リン脂質を分与下さった Pangborn 博士に深謝すると共に、この実験に御協力を頂いた高橋昭一郎技官、他関係諸兄姉に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Lee, Y. C. and Ballou, C. E.: *Biochemistry*, **4**, 1395 (1965).
- 2) Pangborn, M. C. and McKinney, J. A.: *J. Lipid Res.*, **7**, 627 (1966).
- 3) Stöss, B. and Herrman, R.: *Nature*, **208**, 1224 (1965).
- 4) Subrahmanyam, D. and Singhvi, D. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 102 (1966).
- 5) Takahashi, Y.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **85**, 708 (1962).
- 6) Takahashi, Y., Fujita, S. and Sasaki, A.: *J. Exp. Med.*, **113**, 1141 (1961).
- 7) Takahashi, Y. and Sasaki, A.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **154**, 115 (1968).
- 8) 佐々木昭雄・山本健一・高橋義夫: *結核の研究*, **21-22**, 25 (1965).
- 9) Sasaki, A. and Takahashi, Y.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **166**, 476 (1972).
- 10) Ribí, E., Filz, C., Ribí, K., Goode, G., Brown, W., Niwa, M. and Smith, R.: *J. Bact.*, **102**, 250 (1970).
- 11) Akamatsu, Y. and Nojima, S.: *J. Biochem.*, **57**, 430 (1965).
- 12) Motomiya, M., Mayama, A., Fujimoto, M., Sato, H. and Oka, S.: *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 159 (1969).
- 13) Kataoka, T. and Nojima, S.: *J. Immunol.*, **105**, (1970).
- 14) 高橋義夫: 未刊.