ツベルクリン中の赤血球感作抗原に関する研究

第1報 Zone Electrophoresis による感作抗原の検討

永 井 一 成

東京大学伝染病研究所・第三細菌研究部 (部長 武田徳晴教授)

(受付: 9月26日・1959年)

緒 言

Middlebrook-Dubos が結核の赤血球凝集反応¹⁾ 及び溶血反応²⁾ を報告して以来, 多くの研究者により, ツベルクリン及び結核菌から血球感作抗原が分画され, その抗原の本態が追求された。これらの研究では感作抗原の本態は多糖体^{1,3-8)} と考えている研究者が多いが, 中には蛋白分画にも感作能力があるとの報告⁹⁻¹²⁾ もある。一方 Boyden¹³⁾ は蛋白は無処置の血球には吸着せず, タンニン酸で処理した血球を用いれば蛋白抗原も吸着可能で凝集反応を起すとしている。しかし進藤等^{11,14,15)} は或る種の蛋白抗原では無処置の血球に吸着し, 凝集反応の成立することを報告している。

更に高橋等¹⁶⁾ は菌体磷脂質にも感作能があり, 多糖体とは異なつた抗原抗体系が存在するとしている。その他トリプシン処置血球^{17,18)} 及びカオリン¹⁹⁾, 墨等²⁰⁾ の粒子を用いて種々の抗原を吸着させそれらの抗原抗体系の研究も行われている。

この様に種々の抗原による血球凝集反応が報告されているが, 感作抗原を厳密に単離精製した研究は皆無で, いずれも使用している抗原が単一なものでないため, 凝集反応に関与する抗原の本態は明らかでなく, 又蛋白, 多糖体, 磷脂質にそれぞれ独立したいくつかの反応系が存在するかどうか決定されていない。

武田等⁵⁾ は以前にツベルクリンから感作抗原の精製を試み, メタノール50~80%濃度で沈殿する多糖体分画に強い活性のあることを報告したが, このものは未だ単離精製されたものでなかった。

私はツベルクリン中の感作抗原の精製について検討を企て, 先ず武田等⁵⁾ の方法に準じて O. T. を分画し, 更に zone electrophoresis により, ツ中の感作抗原の分布について検討したので報告する。

実験材料及び方法

1. ツベルクリン

青山B株(予研株)を Sauton 培地に8週間培養後 100℃, 1時間加熱殺菌し, 菌体を濾別し, 濾液を Seitz 濾過器を通した後, 減圧又は限外濾過で濃縮し, 更に透析後凍結乾燥し, 粉末としたものを用いた。Lot. は3種類

表 1 抗原の分画法

註: 分画の最初は Lot. を示す

NAGAI Kazunari: Studies on the Sensitizing Antigen in the Hemagglutination Reaction of Old Tuberculin. I. Analytical Studies in the Distribution of the Sensitizing Antigen in Zone Electrophoresis. 3rd. Div., The Inst. for Infect. Diseases., Univ. of Tokyo. —Jap. J. of Bact., 15(5), 489-495, 1960.

である。

2. 抗原の分画

抗原の分画は、粉末 O. T. を使用したため最初のアルコール沈澱を省略した。略記すると第 1 表の如くである。分画はいずれも透析し凍結乾燥した。

この他同研究部の脇田²¹⁾ が Seibert²²⁾ の方法で非加熱ツベルクリンから分画した蛋白 A 及び C を用いた。

3. Zone electrophoresis

Kunkel²³⁾ の方法に準じて行つたが、澱粉を支持体とし緩衝液は硼砂—第一燐酸ソーダ緩衝液²⁴⁾ (pH 8.4, $\mu=0.05$), 使用した泳動槽は主として $3.5 \times 1.0 \times 38.0$ cm である。試料は 50~100mg を少量の緩衝液に溶解し、陰極側から 14~15cm の所に約 2mm の切り込みを入れ、試料を流し込み、装置後 30 分、4°C に放置し、その後泳動を開始した。電流は総べて、 2 mA/cm^2 とし 250~310V 電圧で 22~23 時間泳動させた。泳動終了後 1.0 cm の間隔で澱粉層を切り、1.2~1.5 ml の生理的食塩水で抽出し、その抽出液について呈色反応を行い、試料の泳動図を画くとともに、血球を感作して活性の分布を調べた。

4. 呈色反応

a) 蛋白: Folin 変法²⁵⁾ を用いた。標準曲線には結晶卵白アルブミンを用い、Beckman spectrophotometer により 750m μ で定量した。

b) 糖: 主としてカルバゾン反応²⁷⁾ を用いたが、その他ペントーゼの定量にはシステイン硫酸反応²⁶⁾ を用いた。標準曲線には前者は、グルコースを後者はアラビノースを用いた。

5. 赤血球凝集反応

a) 血球: Alsewer 液保存ヒツジ赤血球を良く洗滌して用いた。

b) 抗血清: 青山 B 株死菌 4mg で 1 週間間隔、3 回免疫した家兎血清を用いた。

c) 血球感作: 澱粉ブロックの奇数番号の抽出液を生理的食塩水で 4~25 倍に稀釈したものを原液とし、血球を 1/50 量加え、37°C 2 時間ふらん器中で感作し、3 回洗滌後凝集反応の予備試験を行い、活性のある場合には更に抗原を倍数稀釈し、最小感作稀釈倍数を決定した。

d) 反応術式: 0.5% 感作血球浮游液 0.2 ml にヒツジ赤血球で吸収した抗血清の稀釈系列 0.2 ml を加え、37°C 2 時間反応させ、氷室に一夜保存したのち、判定した。対照は、生理的食塩水+感作血球、抗血清+非感作血球をおいた。

6. 溶血反応

上記凝集反応を行つた各試験管にモルモットより分離せる補体 0.4ml (1 又は 2 exact unit を含む) を加えて 37°C の恒温槽中に時々振盪しつつ 80 分間放置し 50% 溶血で判定した。

7. 赤血球凝集阻止試験

感作抗原を 10 倍稀釈し 0.1 ml 宛分注する。此れに 160 又は 320 倍家兎抗血清を 0.2 ml 宛加えて、37°C のふらん器中に時々振盪しつつ 2 時間放置、次いで青山 B 株 O. T. (Lot A) 200 γ /ml 感作赤血球 1% 浮游液を 0.1 ml 宛加えて 37°C のふらん器中で時々振盪しつつ 2 時間放置、更に一夜 4°C の氷室に置き判定する。

又 Lot X の O. T. 蛋白分画 (X-4) 及び多糖体分画 (X-70) を用い、抗原及び感作血球による交叉吸収試験を試みた。

実験成績

1. 各分画の活性

X-O. T. からの各分画の活性を第 2 表に示した。

表 2 各分画の活性

		収量 (mg)	最小感作濃 度 (γ /ml)	凝集反応陽 性抗血清稀 釈倍数	凝集阻止能 γ /0.4ml
	X-O T	4000	25	80	0.015
蛋白	X-4	46.19	100	160	1.5
白画	X-T	174	800	40 (±)	1.5
多 糖 体 分 画	X-30	1860	>800	40 (一)	50
	X-50	45	12.5	40	<0.015
	X-70	722	3.125	40 (±)	<0.015
	X-80	270	6.25	80	<0.015

X-O. T. の最小感作濃度は 25 γ /ml であり、X-70 は最も強く、3 γ /ml であつた。蛋白分画 X-4 は 100 γ /ml、X-T は約 800 γ /ml であつた。他の多糖体では X-30 は 800 γ /ml でも活性なく、X-50、X-80 はそれぞれ、12.5 γ 、6.25 γ /ml であつた。凝集阻止力も大体感作能と平行している。

2. O. T. 及び分画の泳動所見

a) 呈色反応による泳動図

主として Lot X の泳動図について述べる。Lot-X の O. T., 多糖体分画 X-70、蛋白分画 X-4、及び X-T の泳動図を第 1 図から第 4 図に示した。曲線の高さは X-4 以外は同一 scale であり、extinction を γ /0.1 ml に換算してある。但し多糖体 300 γ 以上、蛋白 100 γ 以上は既略の値である。泳動条件は分画に依り僅かず

図1 青山B株, X-OT, 50 mg
2 mA/cm², 250~290 Volt, 23 hrs.

図2 X-70 (多糖体) 50 mg
2 mA/cm², 310 Volt, 23 hrs.

図3 X-4 (蛋白分画), 20 mg
2 mA/cm², 300 Volt, 21 hrs.

図4 X-T (蛋白分画), 50 mg
2 mA/cm², 300~310 Volt, 22 hrs.

つ異なっているが、O. T. では蛋白の主峰は原点より約 8.0cm 陽極側に移動し、多糖体は陰極側に約 8.0cm 移動し、両者は比較的良く分離している。分画した多糖体及び蛋白の泳動図でも、O. T. の場合と大体同じ位置に主峰が来ているが、蛋白分画ではO. T. 中の蛋白

表 3 治集阻止試験

感作抗原	阻 止 原	稀釈倍数 10000×2 ⁿ <small>(下の数字は nを表はす)</small>												
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
X-4	X-OT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
X-OT		—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	
X-70		—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
X-4	X-4	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	
X-OT		—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
X-70		—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
X-4	X-70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	
X-OT		—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	
X-70		—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	

註：血球感作濃度，夫々 400 γ /ml

より移動速度が早いようである。これは多糖体との interaction がとれたためと考えられる。X-4 は非常に巾の広い pattern を画いているが，繰り返して行つても同様な所見が得られたのでこれは蛋白の性質によるものであろう。多糖体分画についてベントースの曲線をみた所，カルパゾール反応の曲線とは一致せず，陽極側にづれている。これは糖の構成の差によるものであろう。しかしあとで述べる活性の分布と比較すると活性はベント

図 5 A 蛋白, 100 mg
2 mA/cm², 260 Volt, 18 hrs.

図 6 C 蛋白, 100 mg
2 mA/cm², 300 Volt, 18 hrs.

図 7 青山 B.O.T. CCLCOOH 3% 沈澱蛋白
50 mg 2 mA/cm², 260 Volt, 22 hrs.

ースの比較的多い所にある。

非加熱蛋白A及びCは第5及び第6図に示した。A蛋白は Tiselius 電気泳動でも易動度が小さいのであるが、この場合には泳動時間も比較的短かつたため、多糖体と蛋白との分離が悪かつた。また pH 4.0 の沈澱を省略し、トリクロール醋酸 3% で直接沈澱させた蛋白 (第7図) では2つの山を示している。

b) 活性の分布

先ず O. T. についてみると、凝集反応の活性の分布は相当巾広く存在しているが、主として原点より陰極側にある。これを呈色反応曲線と比較すると、多糖体の主峰よりは僅かに陽極にずれており一致していず、呈色反応曲線で明瞭な山の認められない所にある。一方蛋白の主峰には全然活性が認められていない。又活性の山は一つのみであつた。溶血反応は凝集反応と殆んど完全に一致している。凝集阻止抗原の分布を凝集反応と比較すると、陽極側は大体一致するが、陰極側は範囲が広くなっており、多糖体の陰極側の曲線と良く一致している。

X-O. T. の各分画について活性の分布を見ると、先ず多糖体分画 (X-70) では凝集反応と溶血反応は良く一致しており、活性の分布は O. T. と殆んど同じで凝集阻止反応はこの場合にも凝集反応よりやや陰極側に拡がっている。多糖体は他の Lot で二つの山を画いたものもあつたが、活性の分布は同じ傾向であつた。蛋白分画 X-4, X-T では抽出液の4倍で感作したが、活性が弱く、凝集反応は認められなかつた。然し溶血反応 (この場合は4倍稀釈感作における血清稀釈倍数で示した。) で見ると X-4 では O. T. や多糖体の場合よりやや右側に活性の山が来ている。又とくに、活性の山に当る所及びその両側では2倍稀釈液 (X-T では約 700 γ /ml, X-4 では約 120 γ /ml) で感作したが、どの反応も見られなかつた。

他の Lot (A) の CCl_3COOH 3% で分画した蛋白 (TCA 蛋白) (第7図), 非加熱蛋白A及びC (第5, 6図) では凝集反応域が認められているが、いずれも活性の山は一つのみであつた。その分布の場所はA蛋白, TCA 蛋白では, O. T. や多糖体の場所と殆んど同じであつたが、その内C蛋白ではやや陽極側にずれている。然しいずれの場合にも蛋白の主峰には殆んど活性は認められていない。

3. 各分画の交叉試験

X-O. T., X-70及びX-4について凝集阻止を応用し、交叉反応を行つた。結果は第3表の如くであり、阻止能に差はあるが、いずれの抗原でも他の抗原で感作

した血球の凝集反応を阻止していたまた3者の感作血球 0.1 ml でそれぞれ抗体を吸収した後、血球を除き、更に感作血球を加えて凝集反応を観察したがいずれも凝集せず X-70 と X-4 の中には同一の凝集阻止抗原が含まれていることが判つた (第4表)。

表4 吸収試験

感作抗原 \ 吸収抗原	X-OT	X-4	X-70	吸収前
X-OT	—	—	—	++
X-4	—	—	—	++
X-70	±	—	—	++

註：血球感作濃度 400 γ /ml

4. Zone electrophoresis による活性物質の分離。

多糖体分画を用い zone electrophoresis により活性物質を分離させ、回収してその感作能を調べると、泳動前よりも約2倍活性が高くなっているが、全体の回収率は50~60%であり、而も易動度の近似した不活性の分画が入つて来るため、電気泳動のみでは精製は困難と考えられる。

総括及び考按

結核の赤血球凝集反応に関与している感作抗原の化学的本態に関しては多糖体とするものが多いが、蛋白にも感作能があるとする研究者もあり、未だ結論は出ていない。Boyden¹³⁾ は血球への吸着性を考慮して、タンニン酸で処置した血球を使用すれば蛋白抗原による凝集反応の成立することを報告している。

血球凝集反応の成立には先ず抗原が血球に吸着する可否かが問題であり、Neter 等²⁸⁾ は無処置の冷血動物の血球には E. coli の Lipopolysaccharide は吸着しないが、トリプシン処置後の血球では吸着可能で凝集反応の成立することを報告している。

しかし進藤等は卵白アルブミン¹⁴⁾、ジフテリア毒素¹⁵⁾等の蛋白抗原でもその抗血清との間で、血球凝集反応の成立することを認め、更にツ蛋白¹¹⁾でも無処置の血球に吸着し、凝集反応の成立することを報告し、蛋白抗原でも多糖体抗原でも赤血球に対する吸着性によつて、活性が決定されるとしている。

更に高橋・小野¹⁶⁾ は結核菌菌体より分画した磷脂質による血球凝集反応を報告し、種々の有機溶媒で順次抽出した菌体残渣で免疫した血清に対する反応態度と凝集阻止実験から、磷脂質による血球凝集反応の抗原抗体系は

多糖体のそれとは独立的に存在すると報告している。

Meynell²⁹⁾は PPD から蛋白抗原及び多糖体抗原の分離を報告しており、Grabar³⁰⁾は阻止反応によって蛋白質と多糖体の抗原性の相違を認めている。従つて血球凝集反応の抗原抗体系には数種のものが考えられる状態である。

しかしこれらの研究での使用抗原は純粋とはいひ難く、異なつた感作抗原の存在も決定的ではない。私はこの点を明らかにするため、zone electrophoresis を利用しツベルクリン中の感作抗原の分布をほぼ同一条件で O. T., 多糖体分画及び蛋白分画について検討したのであるが、無処置の血球を使用した場合その中に含まれている感作抗原はいずれも一つであり、その分布をみると、主として原点より陰極側に來ており、多糖体分画では O. T. の場合と殆んど一致していた。一方蛋白分画では前二者の場合よりもやや陽極側に分布する傾向があり、多糖体分画における活性物質とは異なる物質が存在することも考えられるが、一方他の O. T. (Lot L 及び A.) でも常に一つであつたこと、及び交叉試験で多糖体と蛋白とが交叉することから考えると、O. T., 多糖体分画及び蛋白分画中の活性物質の泳動上の差は蛋白が移動する際の interaction によるとも考えられ、両者の活性物質は同一と考えられる。

たとえ、蛋白分画中の活性物質が異なつたものと考えても非常に弱い、又は少量であり、血球凝集反応に関与している抗原としては意義の少ないものであろう。

次に活性の分布と多糖体及び蛋白の分布曲線を比較すると、活性物質は酸で分画した蛋白の主峰とは相当離れて存在している。このことは酸性側で沈澱して來る所謂ツ蛋白には活性がない事を示すものであり、蛋白の示す活性は微量の活性物質の混入によるものと考えられる。一方活性物質は多糖体の主峰よりも僅かに陽極側に分布しており、完全には一致していない。50~70% アルコールで沈澱して來る多糖体分画でも活性物質と多糖体の分布は一致していない。この分画は強い活性を有するのであるが、未だ相当量の血球感作能のない多糖体を含有しているものであることが判つた。

凝集阻止抗原の分布は、凝集反応の分布とは陽極側は大体一致するが、陰極側ではやや広がっており、多糖体曲線の陰極側と一致している。

これらの事から多糖体には凝集反応に関与する抗原と決定群を共通に持つているが、血球に吸着されない分画があることが考えられる。

このことは Middlebrook³¹⁾が多糖体を何回も血球で吸

収し凝集反応の活性はなくなつたが、尚阻止能力はあると報告している成績と一致している。又 Iland 等¹²⁾も抗原を血球で吸収し、凝集能はなくなつたが、precipitin titer は残つていることを報告している。

一方蛋白の主峰部分には凝集阻止能を含む何れの活性も認められないので活性物質とは無関係と考えられる。しかし多糖体分画でも活性を示す部分には、多糖体と蛋白の両者が常に含まれており、活性物質の化学的本態は未だ不明であつた。又ペロナル緩衝液、硼酸-硼砂緩衝液を用いて泳動させても、感作抗原の分布は一つのみであつたことから見ると、多糖体及び蛋白がそれぞれ独立した反応系を持つてゐるとは考えられない結果であつた。しかしこれは無処置の血球を使用した場合の成績であるので、処置血球や他の粒子を使用した場合には異なることも考えられ、更に検討する必要がある。

次に zone electrophoresis で活性物質の精製を試みたが、1回の泳動のみでは約2倍に活性が上昇したに過ぎず、此の条件では不活性の多糖体と易動度が近いので、活性物質のみを分離することが困難であつた。また分画全部の回収率も50~60%であつた。

結 論

ツベルクリンを zone electrophoresis で泳動させ無処置のヒツジ血球を使用して、感作抗原の分布を検討し、次の結果を得た。

1. ツベルクリン中の血球凝集反応及び溶血反応に関与している感作抗原は電気泳動的に見ると、一種類のみと考えられる。
2. 活性物質は主としてアルコール50~70%で沈澱する多糖体分画に含まれており、通常の酸性側に等電点を有する蛋白には活性は認められない。従つて蛋白分画の示す活性は感作抗原が混在しているためと考えられる。
3. 多糖体中には凝集反応の活性はないが、凝集阻止力のみを有する分画が存在する。

稿を終るに当り御懇篤なる御指導並びに御校閲をいただいた武田教授に衷心より感謝し終始御助言、御援助をいただいた渡辺貞博士、青木良雄博士はじめ研究室の諸学兄に謝意を表します。

文 献

- 1) Middlebrook, G. and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 2) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.

- 3) Fisher, S. & Keogh, E.V. : Nature, 165, 248, 1950.
- 4) Takeda et al. : Japan, J. Exp. Med., 22, 405, 1952.
- 5) Takeda et al. : Japan, J. Tuberc., 2, 307, 1954.
- 6) Sorkin, E. et al. : Helvetica Chim. Acta, 39, 1684, 1956.
- 7) 水野伝一 : 胸部疾患, 1, 1, 1957.
- 8) Boyden, S.V. and Sorkin, E. : Ciba Foundation Symposium on Experimental Tuberculosis, p. 144, 1955.
- 9) Gericke, D. : Zbl. Baktr., 158, 191, 1952.
- 10) Gaby, W. L. et al. : Am. Rev. Tuberc., 65, 272, 1952.
- 11) Sindo, T. et al. : Japan, J. Exp. Med., 22, 97, 1952.
- 12) Iland, C. N. and Peacock, D. B. : Ciba Foundation Symposium on Experimental Tuberculosis, p. 163, 1955.
- 13) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 14) Siudo, T. and Wakakura, K. : Japan, J. Exp. Med., 22, 285, 1952.
- 15) 高橋光辰 : アレルギー, 5, 208, 1956.
- 16) 高橋義夫, 小野務男 : 結核の研究, 7, 1, 1957.
- 17) Hein, H. & Sroka, W. : Beitr. Klin. Tuberkulose. 319, 108, 1953.
- 18) 西東利男等 : 金沢大学結研年報, 16(上) 6.
- 19) 山本善三郎 : 米子医学雑誌, 5, 234, 1954.
- 20) 長尾四郎等 : 日本細菌学雑誌, 14, 576, 1959.
- 21) 脇田南洋 : 日本細菌学雑誌, 15巻2号掲載予定.
- 22) Seibert, F. B. : Am. Rev. Tuberc., 59, 86, 1949.
- 23) Kunkel, H. G. : Methods of Biochemical Analysis, 1, 141, 1954.
- 24) Gedin, H. I. & Porath, J. : Biochem. Biophys. Acta., 26, 159, 1957.
- 25) Lowry, O.H. et al. : J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
- 26) Dische, Z. : J. Biol. Chem., 181, 379, 1949.
- 27) Seibert, F.B. : J. Biol. Chem., 133, 593, 1940.
- 28) Neter, E. et al. : Proc. Soc., Exp. Biol. Med. 96, 803, 1957.
- 29) Meynell, G.G. : J. Path. Bact. 67, 137, 1954.
- 30) Grabar, P. et al. : C.R. Acad. Sci., 234, 899, 1952. (進藤宙二 : 日本細菌学雑誌, 13, 560, 1958. より引用)
- 31) Middlebrook, G. : Bull. New York Med., 28, 474, 1952.