感染防禦に関する研究

10. 結核菌体より分離した不溶性顆粒部と可溶性部の 血清学的性状について

岡 好 万

岡山大学医学部寄生虫学教室 (指導 稲垣 誠一)

松 浦 慶 之・吉 岡 達 治

岡山大学医学部微生物学教室 (指導 村上 栄)

[受付 5月20日・1960年]

緒 言

結核免疫に関してはBCGの如く生菌接種以外に、強毒死菌^{1,2)}、有機溶媒による抽出菌体成分^{3,4)}の実験的検討も行われているが、Dubos⁵⁾は防禦抗原性は宿主体内での増殖能力に比例することを述べ、H37Ra株の如き無毒菌はBCGにも劣るとしている。しかし最近人型H37Rv⁶⁾、H37Ra^{6,7)}のsauton発育菌を磨砕し、これの無細胞液を40000rpmで超遠心分離することにより得た不溶性顆粒分離 (以下R₂)は強力な感染防禦能力をマウスに賦与しうることが知られた。

即ち生菌でなくとも生菌細胞内に存在するある微細構造単位が、その保持する特異的酵素活性、その他の機能を損傷することなく宿主体内に与えられるならば、これと宿主組織細胞とのからみあいにおいて防禦抗原性を発動できる。このことは少なくとも従来の細菌細胞の増殖を必要としないことを暗示している。

又結核免疫の程度の測定としてtuberculin allergyがしばしば利用されるが、これと免疫が平行した経過をとるという完全な証拠はない⁸⁾。

著者等⁶⁾は裏にR₂がマウスに対し強力な防禦抗原性を発揮したことを述べたが、この報告においては実験動物をモルモットに移し、R₂の防禦抗原性とtuberculin allergyとの関係をはじめ、該分離及び生菌体より得た可溶性上清部 (以下S₁)につき血清学的諸性状を主体に検討した。

実験材料および実験方法

供試株：小川氏中性鶏卵培地に継代保存中のH37Rv

株をsauton液体培地に2代継代後sauton培地16~18日発育菌を実験に供した。

超遠心分離法：上記発育菌を滅菌濾紙上に集め0.85% NaCl 加0.02mol phosphate buffer PH 7.0液 (以下buffer) で十分に洗滌後、無菌濾紙にて脱水し湿菌量を秤量した。この湿菌量の約2倍量の石英砂を添加し滅菌乳鉢中で約1時間強力に磨砕 (0°Cの氷室中で) を行う。磨砕後湿菌の3倍容量のbufferを添加し充分攪拌混和後10,000rpmにて冷凍遠心し、その上清を15,000rpmにて遠心し無細胞液を得た。これを更に40,000rpm (144,000 ×g) で1時間超遠心し淡黄色透明な可溶性上清部 (S₁) と赤褐色を呈した不溶性顆粒分離を得た。後者は元の湿菌と等容量のbufferにてsuspensionとなし、これを基準液 (R₂) とした。これは乳白色不透明である。その詳細は第1図に示した。

実験動物：体重450g前後の健康なモルモットを用い、供試前ツベルクリン反応陰性であることを確認した。

接種法：R₂、S₁は調製後直に3~5分間紫外線照射を施し動物接種に用いると同時に、その0.1mlをTween 80 albumin 培地に移し無菌であることを確めた。モルモットに対する接種法は静脈 (Iv)、腹腔 (Ip)、皮下 (Is) の3者を用いた。

攻撃法：上記発育菌を冷却磨砕法により0.85% NaCl

OKA Yoshikazu (Director, Prof.: Inatomi Seiichi), Matsuura Yoshiyuki, Yoshioka Tatsuji (Director, Prof.: Murakami Sakae): Studies on prevention of Infection. 10. Studies on serological capacity of insoluble particulate and soluble fractions isolated from cell-free extract of tubercle bacilli. —Jap. J. of Bact., 16(1), 1-5, 1961.

第 1 図

液で suspension となし, 0.2mg を左側単蹠部皮下に接種した。攻撃は抗原接種後 1 カ月で実施した。

實驗成績

R_2 , S_1 の酵素学的活性について検討の結果 R_2 は動物細胞の mitochondria, microsome の分割と類似した性状を有したことは前に述べた⁶⁾。電子顕微鏡による観察の結果 R_2 は極めて微細な密度の高いほぼ均一な顆粒部であり、大体直径 50~100 m μ 前後である。しかし S_1 は一様に電子密度は低く顆粒構造は認められない。

モルモット接種にあたり、2匹づつ一群となし R_2 の 0.5ml をそれぞれ Iv, Is, Ip に接種せるものと Is, Ip にそれぞれ 0.5ml を 5 日間隔で 2 回接種せる計 5 群に別ち、 S_1 は 1 ml を Ip に 1 回接種した群のみとし、更に対照群を加え実験総群は 7 群である。

1. tuberculin 反応の検討

R₂ 又は S₁ の接種後 3 週間目（2 回接種の場合は初回より 3 週目）に tuberculin 原液（OT）の 10 倍稀釈液を 0.1ml 下腹部皮下に接種し 24, 48 時間後の 2 回反応を測定した結果全く陰性の成績を得た。即ち R₂, S₁ 分画には tuberculin allergy 発現因子が全く或は完全な形で存在しないものと考えられる。

更にこれ等のモルモットについて攻撃後4週目の結果を同一の方法で検討したところ第1表に示した成績が得られた。

即ち攻撃処理により一様に tuberculin 反応が出現するが、その反応の程度は免疫処理の行われなかった対照群において少々強度の出現を観た。

2. 赤血球凝集反応

赤血球凝集反応多糖体抗原は根津⁸⁾の方法に従いH37

第1表 実験モルモットの tuberculin 反応

接種抗原	接種量	接種ルート	モルモット No	ツベルクリン反応			
				免疫3週後の結果		攻撃4週後の結果	
				24時間	48時間	24時間	48時間
R ₂	0.5 ^m	Iv	1 2	— —	— —	++ —	++ —
	0.5	Is	3 4	— ±	— —	++ —	++ —
	0.5 +	Is	5 6	— —	— —	++ ++	++ —
	0.5	Ip	7 8	— ±	— —	++ ++	++ —
	0.5 +	Ip	9 10	— —	— —	++ ++	++ —
S ₁	1.0	Ip	11 12	— —	— —	++ ++	++ ++
対 照			13 14	— —	— —	++ ++	++ ++

十……直径 1 cm 前後. 卅……2~3cm,
卅……3 cm 以上

第2図 菌体蛋白及び多糖体の抽出法

Rv の sauton 4 週発育菌より抽出した。その大要は第 2 図に示した。

この多糖体抗原を生理食塩水 1 ml: 1 mg の割合に溶解

し羊洗滌血球に感作せしめたものを使用した。

R₂, S₁ の接種により tuberculin 反応の陽転化は得られなかったが赤血球凝集反応が如何なる結果を示すかは興味ある問題である。そこで tuberculin 反応と同様に同一モルモットにつき免疫処理後 3 週目と、攻撃後 4 並びに 8 週目に検討した。その結果は第 2 表に示した。

第 2 表 実験モルモットの赤血球凝集反応

接種抗原	接種量	接種ルート	モルモット No	凝集抗体価		
				免疫処理 3 週目	攻撃 4 週目	攻撃 8 週目
R ₂	0.5ml	Iv	1 2	8 4	8 8	32 32
	0.5	Is	3 4	4(±) 4(±)	8 8	16 32
	0.5 +	Is	5 6	8 8	4 8	32 32
	0.5	Ip	7 8	8 8	8 8	16 32
	0.5 +	Ip	9 10	32 16	16 64	256 128
S ₁	1.0	Ip	11 12	8 4	16 4	16 32
対 照			13 14	— —	4 8	16 32

凝集抗体価欄中の数字は凝集陽性の最高稀釈血清倍数

免疫処理により産生される抗体価の上昇は抗原の接種ルートよりも接種量が強く影響を与えるようである。ただ R₂ 0.5ml 1 回 Is 接種は抗体価の上昇が最も低い結果を示した。最も上昇率の高いのは R₂ 0.5ml 2 回 Ip 接種した群であり 32 倍の抗体価を示した。S₁ 1ml 1 回 Ip 接種群の抗体価は R₂ 0.5ml 1 回 Ip 接種群とほぼ同一であるが僅かに低いように思われる。しかしこれは動物個体差も充分考えられるので有意の差とは思われない。

次に感染後 4 週目の検討においては免疫処理の各群とも感染により一般的にはやや抗体価の上昇は認められるが、攻撃前の価と差して有意の上昇があったとは思われない。ただ R₂ 0.5ml 2 回 Ip 接種群中 1 匹は著明な上昇が観られた。

更に感染後 8 週目の検討においては感染の効果が抗体の上にも現われ著明な上昇が一般に認められた。即ち免疫処理後 3 週目では一般に抗体価は 8 倍程度、感染後 4

週目で 8～16 倍程度であったものが 8 週目においては 32～64 倍に上昇した。

3. 沈降反応

沈降反応用抗原も前記第 2 図において示した多糖体及び蛋白部であり、この両抽出分画をそれぞれ生理食塩水にて 1 ml : 1 mg の割合に溶解し抗原として使用し、重層法により測定した。

感染後 8 週目の血液につき検討した結果は第 3 表に示した。

第 3 表 攻撃 8 週目モルモット沈降反応

接種抗原	接種量	接種ルート	モルモット No	多糖体抗原	蛋白抗原
R ₂	0.5ml	Iv	1 2	± ±	— ±
	0.5	Is	3 4	± +	— —
	0.5 +	Is	5 6	— +	— +
	0.5	Ip	7 8	— +	— ±
	0.5 +	Ip	9 10	— ++	— ++
S ₁	1.0	Ip	11 12	± —	— —
対 照			13 14	++ +	++ —

表に示す如く蛋白抗原の感度は著しく悪く沈降反応抗原としては多糖体分画が遙かに優れている。しかし両抗原とも血清反応としての特異性は著しく低く、又血球凝集反応の成績と必ずしも一致しない結果を得た。

4. 肉眼的臓器所見及び定量培養

感染後 8 週目に実験全モルモットは頸動脈及び静脈を切断、放血し臓器の肉眼的病理所見と定量培養に使用された。この目的に供使された臓器は肺、肝、脾の 3 者である。

免疫処理群においては S₁ 接種群中 1 匹 (No. 11) の肺に全葉に亘り軽い鬱血が認められたのみで他は全く肉眼的変化は観られなかった。しかし対照群である No. 13, 14 においては三臓器ともに変化が認められた。即ち 2 匹ともに肺に局所的鬱血巣が 2～3 カ所散在し、No. 13 の肝の全面に数十個の粟粒大結節が散在し、更に No. 14 の肝においては無数の粟粒大結節が散在している。No. 13 の脾の表面には十数個の粟粒大結節が、又 No.

14の脾は全面に亘り米粒大結節が形成されていた。

以上の肉眼的所見から明かに免疫処理群と対照群との間には有意の差があることが判明した。

次に同一群モルモットの同一臓器を1gずつ取り乳剤となし、これに10倍量の1% NaOH液を加えよく混和したものを基準液とし、これの 10^{-5} 稀釈液を小川氏鶏卵中性培地に0.1mlずつ定量培養し、40日後に結果を判定した。その成績は第4表に示した。

第4表 攻撃8週目のモルモット臓器の定量培養

接種抗原	接種量	接種ルート	モルモット No	肺	肝	脾
R ₂	0.5ml	Iv	1 2	3	5	0
	0.5	Is	3 4	2	6	7
	0.5 +	Is	5 6	3	0	5
	0.5	Ip	7 8	8	3	6
	0.5 +	Ip	9 10	0	2	1
S ₁	1.0	Ip	11 12	+	47	60
対 照			13 14	80	+	+

同一群同一臓器を混合し、10倍量1% NaOHで乳剤となし、これを基準液とし、0.85% NaCl液で 10^{-5} に稀釈し、その0.1mlを培養した。数字は発育集落数。

+……100~300, ++……集落数計算不能

表の如く R₂ 処理免疫群において各臓器とも極めて生菌数が少い。しかも生菌数においては使用した免疫量、免疫ルートの範囲においては差が認められない。しかし S₁ 処理群においては R₂ 処理群より各臓器において生菌数が遙かに多くなっている。ただし対照群に比較すると一段と数の少いことがうかがえる。

総括および考察

最近の細菌細胞の微細構造とそれ等の生理的意義の究明は蛋白合成を主体とする細胞化学に著しい貢献をしている。著者等⁹⁾が超遠心分画法により分離した不溶性顆粒分画(R₂)は lactate, succinate のみを特異的に酸化することは前に述べたが、電子顕微鏡による観察で直径が約 50~100 mμ の密度の高い顆粒であることが判つ

た。恐らくこの顆粒は山村等^{9,10)}が 38,000 rpm で鳥型菌から得た顆粒、又谷¹¹⁾、楠瀬¹²⁾が鳥型菌から分離している大顆粒、小顆粒に該当するものと考ええる。この R₂ が動物細胞の mitochondria, microsome とよく比較されるが酸素学的に電子電達粒子が完全に具備されている限り当然考慮されるべき点と思う。

他方結核菌をはじめその他の病原微生物の免疫手段として細菌の超遠心分画物が使用された報告^{6,13,14,15)}は極めて少ない。特に結核においては感染免疫が主体と考えられたため BCG 以外のものは余り考慮されなかつたように思われる。しかし最近 adjuvant 添加死菌免疫¹⁶⁻²¹⁾が実験され注目すべき結果が得られている。著者等は生菌又は従来の死菌とは異り、生菌より得た上記酵素活性分画による免疫を検討してきたが結核菌をはじめ多くの内毒素性細菌において R₂ が極めて強力な防禦抗原性を有することを認めた。本報告の主点は防禦抗原物質と考える R₂ が血清学的特に tuberculin allergy との関係において如何なる態度をとるかにおいた。

結核菌を磨碎し超遠心分画法によつて得た 15,000 rpm の上清を更に 40,000 rpm で超遠心分画し R₂ と S₁ に分離した結果、何れも単独では tuberculin allergy を誘起する能力に欠けていた。特に R₂ は如何なる方法でモルモットを免疫しても tuberculin 反応が陽転しなかつたにかかわらず強力な防禦抗原性を發揮している。その事実は以前のマウスの実験⁹⁾でも、又この報告における感染モルモットの臓器の肉眼的所見、定量培養においてもうかがうことができる。以上のことから結核免疫と tuberculin allergy は区別して考えることができるのではなからうか。

次に R₂, S₁ を接種したモルモットは3週間後には赤血球凝集抗体価の上昇(8~16倍)が観られる。R₂.

0.5ml 一回 Is 接種群が最も抗体価の出現が低く、又最も高い抗体価を示したのは R₂. 0.5ml 2回 Ip 接種群であつた。攻撃後4週目までは免疫による凝集抗体価と余り差は観られなかつたが、攻撃後8週目においては顕著な上昇(16~32倍)が観察された。

次に攻撃8週目のモルモット血清につき沈降反応を検討したが、反応用抗原としては蛋白よりも多糖体抗原が優れた成績を示したが、この反応は血球凝集反応に比し特異性は遙かに劣り又血球凝集反応と必ずしも並行した結果は得られなかつた。

結 論

結核菌細胞を磨碎し、これを超遠心分画することによ

り直径 50~100 μ の不溶性顆粒分画と可溶性分画を得た。これをモルモットに接種することにより下記の結果を得た。

1. 不溶性顆粒分画は強い防禦抗原性を有するが tuberculin allergy を誘起する能力はない。

2. 可溶性分画も tuberculin 反応陽転能力に欠けているが又防禦抗原性も低い。

3. 両分画とも赤血球凝集抗体を宿主血清中に産生せしめる能力を有する。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜った微生物学教室村上教授並びに寄生虫学教室稲臣教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Opie, E. L., Freund, J.: J. Exp. Med., 66, 761, 1937.
- 2) Wills, C. W., Flahiff, E. W., & Smith, H. H.: Am. J. Hyg., 40, 116, 1944.
- 3) Nègre, L.: Les lipoides dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose., paris. Masson et Cie, 1950.
- 4) Choucroun, N.: C. R. Acad. Sc., 210, 511, 749, 1940.

- 5) Dubos, R. J., Pierce, C. H., & Schaefer, W. B.: J. Exp. Med., 97, 207, 1953.
- 6) Murakami, S., Oka, Y., Matsuura, Y., & Yoshioka, T.: Acta. Med. Okayama., 13, 1, 1959.
- 7) Youmans, G. P., Millman, I., & Youmans, A. S.: J. Bact., 70, 557, 1955.
- 8) 根津: 日本細菌学雑誌, 8, 777, 813, 1953.
- 9) Yamamura, Y., Kusunose, M., et al.: Med. J. Osaka Univ., 6, 489, 1955.
- 10) 山村・楠瀬・他: 酵素化学シンポジウム, 10, 114, 1954.
- 11) 谷・永井: 生化学, 30, 902, 1956.
- 12) 楠瀬(正)・楠瀬(恵): 生化学, 30, 902, 1956.
- 13) Murakami, S., Yoshioka, T., Oka, Y., & Matsuura, Y.: Acta. Med. Okayama., 13, 15, 1959.
- 14) 村上・松浦・岡・吉岡: 日本細菌学雑誌, 15, 184, 1960.
- 15) Youmans, G. P., Millman, I., & Youmans, A. S.: J. Bact., 70, 557, 1955.
- 16) 山口: 日本細菌学雑誌, 11, 63, 1956.
- 17) 山口: 日本細菌学雑誌, 11, 111, 1956.
- 18) 山口: 日本細菌学雑誌, 11, 379, 1956.
- 19) 山口: 日本細菌学雑誌, 12, 89, 1957.
- 20) 梶原: 日本細菌学雑誌, 11, 1041, 1956.
- 21) 梶原: 日本細菌学雑誌, 12, 1, 1957.