牛型結核菌ツベルクリンより Zone electrophoresis

でえられた2蛋白分画について

第3報 抗全菌体免疫血清による両分画の比較

根 本 久

農林省家畜衛生試験場 (部長 杉村克治, 指導 田嶋嘉雄教授)

[受付: 11 月 30 日・1960 年]

緒 言

著者は牛型結核菌牛10株の非加熱ツベルクリンから、澱粉を担体とした Zone electrophoresis を用い、電気泳動上ほぼ均一な2蛋白分画をえ、その2蛋白分画の物理化学的性状を第1報¹⁾で述べ、第2報²⁾でそのツベルクリン力価及び発熱性についてのべた。

本報では2蛋白分画について、補体結合反応、血球凝集反応、沈降反応及び寒天内沈降反応を用いて、全菌体に対する免疫血清について2蛋白分画の抗元関係をしらべたので、現在までにえられた成績を報告する。

実験方法と材料

1. 使用抗元: 既報¹⁾の分画Ⅱ, Ⅲを用いた。なお1部の実験に Zone electrophoresis で分離した多糖体分画を用いた。これはフェノール硫酸法で92%の含糖量を示した。

2. 免疫血清: 牛型結核菌牛10株のフェノール処置死菌(乾燥菌)の流動パラフィン乳剤(50mg/ml)を家兎に1週間隔で3回以上皮下に1ml あて注射し、約2カ月経過したのち予備採血を行い、満足すべき力価のものをえらび本実験に使用した。

3. 各種血清反応:

a) 補体結合反応: アメリカ軍医学校法を用い、温感作、冷感作で Box titration を行つた。

b) 血球凝集反応: 綿羊血球を用いて、下記の2法を行つた。

Middlebrook-Dubos 反応³⁾: 各所定濃度の抗元液に等量の2%綿羊血球液を混じ、37°Cの温槽で1時間感作後3回洗滌して1%の濃度としたものを0.1ml あて、予め正常凝集素を吸収した抗全菌体免疫血清の20倍稀釈液

0.3 ml に加え、37°Cの温槽に2時間おき、一晚氷室に放置後翌朝判定した。

Boyden 反応: Boyden⁴⁾の原法に従つた。血球のタンニン酸処理には2万倍稀釈タンニン酸を用いた。各所定濃度の抗元液1ml にタンニン酸処理血球の2.5%浮游液、を0.5ml 加え、室温に15分放置後洗滌し、2.5%感作血球浮游液としたものをそれぞれ0.05 ml ずつ、上記吸収血清の20倍稀釈液0.5ml に混じ、以下 Middlebrook-Dubos 反応と同様に行つた。血清稀釈液および感作血球浮游液として健康家兎血清の100倍と、250倍稀釈液を用いた。本反応ではとくに感作血球液の非特異的凝集に注意した。

c) 沈降反応: 重層法を用い、抗元稀釈法で実施し、重層後30分以内に生ずる反応で判定した。このさい抗元稀釈に用いた生理的食塩水を対照として血清に重層し、非特異的反応の生じないことをたしかめた。

d) 寒天内沈降反応: Ouchterlony 法を Pepy ら⁵⁾の報告を参照して用いた。

生理的食塩水に寒天を1%, 窒化ソーダを0.02%, メチルオレンジを0.003%に加え、加温溶解して濾過後、シャーレに流し固めた。各 basin 間の距離は約8mm 内外とし、径7mm の basin をつくつた。反応は室温と氷室で同時に行い1週間観察した。

4. 加熱試験: 分画Ⅱ, Ⅲの2mg/ml の濃度のものをそれぞれ60°C, 80°C, 100°C10分間ずつ加熱した後、寒天内沈降反応を行つて沈降帯の有無をしらべた。

NEMOTO Hisashi: Studies on two native proteins purified by zone electrophoresis from bovine tuberculin. 3. Comparative studies of their antigenicity for anti-bacillary immune sera. The National Institute of Animal Health.—Jap. J. of Bact., 16 (9), 773-776, 1961.

5. トリプシン消化試験：分画Ⅱ、Ⅲの2 mg/mlの濃度のもの1 ml に対しトリプシン液(0.2 mg/ml) 0.5mlを加え、37℃で6時間消化した。このトリプシン処置の分画溶液を寒天内沈降反応に用いた。このさいトリプシンのみを対照におき血清と非特異的反応のおこらないことをたしかめた。

実験成績

1. 補体結合反応

抗全菌体免疫血清について分画Ⅱ、Ⅲを抗原として用い、温、冷感作法で Box titration を行つて、反応の場をしらべ、抗原性を比較した(図1)。

図1 補体結合反応

この結果、温、冷感作法とも、分画Ⅱの反応の場は明らかに分画Ⅲの反応の場よりも広く、分画Ⅱの抗原性がすぐれた。両抗原ともその反応の場はほぼ同一の傾向がみられ、冷感作では温感作よりも高い抗原価、抗体価がえられた。

2. 血球凝集反応(表1)

Middlebrook-Dubos 反応：分画Ⅱ、Ⅲは1 mg/mlの高濃度の感作でも血球感作能がみられず、凝集が起きなかった。対照の多糖体は7.8 γ/mlの低濃度の感作でも凝集が起り顕著な差異がみられた。

Boyden 反応：本反応では分画Ⅱは125 γ/mlの感作量で血球を感作し、明瞭な凝集がみられた。分画Ⅲは225 γ/mlの感作量で凝集が起つたが、その凝集の程度は明らかに分画Ⅱでの凝集より劣つた。この成績から分画Ⅱは分画Ⅲより Boyden 反応における血球感作能がすぐれた。

3. 沈降反応(表1)

重層法で分画Ⅱは抗原濃度31.25 γ/mlまで反応が起り、高濃度では明らかに強い反応がえられた。これに対し分画Ⅲでは抗原濃度15.625 γ/mlまで反応が起つたが、高濃度では弱かつた。このように抗原の高濃度にお

表1 分画Ⅱ、Ⅲの血球感作能および沈降反応

方 法	抗 元	抗 元 量 (γ)							
		1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125
Middlebrook-Dubos 法*	多 糖 体	+	+	+	+	+	+	+	+
	分 画 Ⅱ	-	-	-	-	-	-	-	-
	分 画 Ⅲ	-	-	-	-	-	-	-	-
Boyden 法**	分 画 Ⅱ	+	+	+	+	-	-	-	-
	分 画 Ⅲ	+	+	+	±	-	-	-	-
沈 降 反 応	分 画 Ⅱ	+	+	+	+	+	+	+	-
	分 画 Ⅲ	+	+	+	+	+	+	+	±

註 * 抗原0.5 ml + 2% 綿羊血球液0.5 ml → 37℃ 1時間感作

** 抗原1 ml + 2.5% 綿羊血球液0.5 ml → 室温15分感作
血清は全て免疫家兎血清を使用

ける反応の程度は分画ⅡとⅢとの様相が異なつた。

4. 寒天内沈降反応

抗全菌体免疫血清に対する多糖体、分画Ⅱ、Ⅲの抗原関係を知るため、2 mg/mlの濃度で Ouchterlony 法を用いてしらべた(図2)。

図2 寒天内沈降反応

分画Ⅱ、Ⅲ、多糖体の濃度2 mg/ml

多糖体と分画Ⅱ、Ⅲに共通する沈降帯がみられ、これをAとする。又多糖体と分画Ⅱに共通する沈降帯がみられ、これをBとする。この他、分画Ⅱ、Ⅲにそれぞれ特異的な沈降帯が一本ずつみられ、これをそれぞれb, aとした。なお多糖体に特異的な沈降帯が免疫血清に接して幅広くみられた。トリプシン消化を行うとこの多糖体に特異的な沈降帯をのぞき、他の沈降帯はほぼ消失し、

分画Ⅱに不明瞭な粗糖の沈降帯が若干みられるにすぎず、抗元物質は蛋白質であつた。

この成績から分画Ⅱ, Ⅲは共通抗元のほかにそれぞれに特異な抗元物質をもつことが明らかである。

次いで分画Ⅱ, Ⅲは第1報¹⁾にのべた如く熱凝固性で差異がみられたので、各分画の2 mg/mlの濃度のものを、60°C, 80°Cおよび100°Cで10分間ずつ加熱し、免疫血清と反応せしめて沈降帯の出現をしらべた(表2)。

表2 各沈降帯の耐熱性

沈降帯	60°C	80°C	100°C
A	+	—	—
B	+	+	+
a	+	—	—
b	+	+	±

60°Cの加熱では各沈降帯は消失しなかつたが、80°Cの加熱ではA, aの沈降帯が消失し、B, bの沈降帯は残つた。100°CではBの沈降帯は明瞭にみられたが、bのそれは不明瞭となつた。分画Ⅲの抗元物質は易熱性であり、分画Ⅱのそれは易熱性のものと耐熱性のものとが認められた。

考 察

Seibert^{6,7)}は非加熱ツベルクリンより分離したA, BおよびC蛋白を抗元として、抗A蛋白血清と抗C蛋白血清について血清学的検討を行い、補体結合反応ではC蛋白が他のものに比し、どの抗血清でも抗原性がすぐれること、沈降反応では3蛋白ともどの血清でも反応するが特異性が多少みられることと、Arthus反応の惹起能はA蛋白がC蛋白より強いと報告した。Boyden⁸⁾は血球凝集反応上ツベルクリンには抗原的に異なる4つの蛋白抗原があると云い、Burtinら⁹⁾もGraber¹⁰⁾のImmune electrophoresisで同様に4蛋白抗原のあることを明らかにした。福井ら¹¹⁾も硫酸分画法にZone electrophoresisを併し寒天内沈降反応で抗原的に特異なる蛋白分画を証明した。又McCarterら¹²⁾も沈降反応上ツベルクリン分画の抗原性の複雑さを指摘しておる。而して、これら各研究者によつても、抗元関係の詳細な検討は不足しており、その複雑性をのべているにすぎない。そこで著者は従来行われている血清反応のうち、補体結合反応、血球凝集反応および沈降反応を用い、第1報¹⁾の蛋白分画Ⅱ, Ⅲの抗原性をしらべたところ、これらの反応では分画Ⅱが分画Ⅲよりも各反応において強い抗原性を示した。しか

し抗元分析にしばしば用いられるOuchterlonyの寒天内沈降反応を用いると、抗全菌体免疫血清に対する沈降帯は分画Ⅱでは3つ、分画Ⅲでは2つ、これの対照として用いた多糖体では2つ認められた。

これら沈降帯の結合状態からみると、分画Ⅱの2とつと、分画Ⅲの1つは多糖体抗原の沈降帯とよく一致し、これら分画Ⅱ, Ⅲに特異的なものはそれぞれ1つずつあつた。

これら抗元はトリプシン処理により消失し、加熱試験でも分画Ⅱと多糖体に共通な沈降帯をのぞき易熱性であつた。

これらの成績から各分画には、それ自身に特異的なものと、多糖体と共通なものの存在が認められる。なおこの多糖体は比較的純粋であるけれども、他の蛋白も含まれているかも知れない。

更に、第1報¹⁾の化学分析において分画Ⅱは分画Ⅲに比しN量がすくなく、糖量の多いことを考えると、この沈降帯の数などからみて、分画Ⅱは分画Ⅲに比し、他の因子が多く含まれているものと思われる。このことはツベルクリン蛋白の分画において、電気泳動法が他の沈澱法にまさるとは云い、隣接成分の混を免れえないために起るものであろう。

なお分画Ⅱ, Ⅲは加熱ツベルクリンよりGreen¹³⁾の方法で製造した牛型PPDと寒天内沈降反応では沈降帯が交叉し、抗原的に異なつた。この成績は耐熱試験で両分画の抗元は1つを除き易熱性である成績と符合している。

いずれにせよ、今回著者の分離した分画ⅡとⅢとは血清反応上著しい差異のあることがたしかめられた。これらの抗原的因子の分析については次報でべる。

総 括

第1報でのべた分画Ⅱ, Ⅲの抗原関係を抗全菌体免疫血清について、補体結合反応、血球凝集反応、沈降反応および寒天内沈降反応でしらべ以下の成績がえられた。

1. 補体結合反応での抗原性では温、冷感作法とも分画Ⅱが明らかに分画Ⅲよりすぐれ、反応の場も広い。
2. Middlebrook-Dubos反応では分画Ⅱ, Ⅲとも血球感作能がなかつた。Boyden反応では分画Ⅱの感作能が明らかに分画Ⅲよりすぐれた。
3. 沈降反応では分画Ⅱ, Ⅲはその沈降状態に差異がみられた。
4. 寒天内沈降反応では分画Ⅱ, Ⅲは互に共通する抗元のほかに、それぞれに特異な抗元をもつ。

5. 分画Ⅱの抗元は分画Ⅲの抗元よりもより耐性熱である。これら抗元はトリプシン処理により抗全菌体免疫血清に対し、沈降帯が消失した。

終りに御指導と御校閲くださった田嶋教授、予研浅見博士に深謝します。本実験に終始御協力くださった当場ツベルクリン研究室の各位に深謝します。

文 献

- 1) 根本：日本細菌学雑誌，投稿中。
- 2) 根本：日本細菌学雑誌，投稿中。
- 3) Middlebrook, G., et al. : J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 4) Boyden, S. U., : J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 5) Pepy, J., et al. : Tubercle, 40(3), 163, 1959.
- 6) Seibert, F. B., et al. : J. inf. Dis., 89, 252, 1951.
- 7) Seibert, F. B., et al. : Amer. Rev. Tuberc., 66, 314, 1952.
- 8) Boyden, S. V., et al. : Bull. Wld. Hlth. Org., 12, 285, 1955.
- 9) Burtin, P., et al. : Ann. Inst. Pasteur, 97, 148, 1956.
- 10) Grabar, P., et al. : Bioch. Bioph. Acta, 10, 193, 1953.
- 11) 福井, 他 : 33 回日本細菌学会
- 12) McCarter, J. R., et al., J. Exp. Med., 87, 245, 1948.
- 13) Green, H. H., : Brit. Vet. J., 102(9), 267, 1946.