血球凝集反應用抗原の分析について

第2報 ツベルクリン中の蛋白及び多糖体 分割による血球凝集反應

土屋 皖司 浅見 望 細井 正春

国立予防衛生研究結核所 (部長 柳沢謙)

(受付: 1月19日 1954年)

I 緒 言

第1報¹⁾に於てツベルクリンの蛋白及び多糖体の分割方法及びそれ等の化学的性状を述べたが、本報では之等各分割を用いて血球凝集反応及び溶血反応を行つたので、その結果について報告する。

II 実験材料及び実験方法

(1) ツベルクリン及びその各分割

前報に詳しく報告したが大要を示すと次の如くである。

i: ツベルクリン 青山-B株ソートン培養 $1/10$ 濃縮液これを OT とする。

ii: 蛋白分割 上のツベルクリンから5%三塩化醋酸で沈澱するものを PF とし、このうち三塩化醋酸の pH 4.0 の沈澱を PFI, その上清を PFII とした。

iii: 多糖体分割 除蛋白した上清から85%メタノールで沈澱するものを CF とし、このうち50%メタノールの沈澱を CFI, その上清を CFII とした。尚 CFI 及び CFII の醋酸加水分解後、メタノール沈澱によるものを CFIIa 及び CFIIa とした。

(2) 免疫血清

青山-B株ソートン3週培養の菌体を集め100°C 1時間殺菌し、流動パラフィンにて10mg/ccの乳剤となし、健康ウサギの股部筋肉内に60mg接種した後8週目に採血、血清分離後0.5%の割に石炭酸を加え、56°C 30分非動化したものを氷室に保存した。使用に際しては綿羊血球に対する正常凝集素を吸収するため、血清1ccに対し洗滌血球0.2ccを加え20分室温に放置し遠心沈澱をなし更に同一操作を一回繰返した。

(3) 健康血清

健康ウサギより血清を分離し、その後は免疫血清の場合と同一方法により正常凝集素を除去した。

(4) 血 球

アルザーバー液中に保存した綿羊血球を使用した。

(5) 補 体

健康モルモット5~7頭分を合せ、2倍補体15ccに対し洗滌血球1ccを加え20分氷室で吸収を行つた後使用した。

(6) 感作血球液

血球0.1ccに対し OT 及びその各分割の一定量(後述)を生理的食塩水(以後食塩水)で稀釈し、その6ccを加え37°Cで2時間時々振盪しながら感作し、次で食塩水で3回洗滌し、最後に食塩水20ccを加え0.5%感作血球液とした。

(7) 血球凝集反応及び溶血反応術式

正常凝集を吸収した血清を各試験管に0.5ccになる如く倍数稀釈し、感作血球液0.5ccを加え、37°C 2時間放置した後、一夜室温に置いて翌朝判定した。判定には凝集の程度を参考にし、凝集の認められる最高稀釈度をもつて血球凝集価とした。

血球凝集反応を判定した後、2単位の補体(後述)を加え、強く振盪し血球を完全に再浮遊せしめてから37°Cに1時間放置し、溶血の程度を観察し、完全溶血を示す最高稀釈度をもつて溶血価とした。

(8) 血球凝集及び溶血阻止試験術式

血清稀釈後 OT 或いはその分割の一定濃度(後述)の溶液を各試験管に0.05cc加え、37°Cに30分置き、しかる後に感作血球液を加え、以後上記の方法に従つて血球凝集及び溶血反応を行つた。

TUTIYA Kanzi, ASAMI Hozomu, HOSOI Masaharu: The Analysis of Antigens for the Hemoagglutination Test. (II) The Hemoagglutination Test Using Protein and Carbohydrate Fraction of Tuberculin. The National Institute of Health. — Jap. J. of Bact. 9(5), 315-318, 1954.

(9) 補体力価の測定法

免疫血清を10倍より倍数希釈し、ツベルクリン感作血球液0.5cc及び2倍希釈補体0.05ccを加えて、溶血反応を行ない。その完全溶血を示す最高希釈倍数を1単位とする。この血清の2単位にOT感作血球液0.5ccを加え次いで補体を2倍より等差級数的に12倍迄6段階に希釈し、その各0.05ccを各試験管に加え、完全溶血を示す最高希釈倍数をもつてその補体の1単位とした。

III 実験成績

1. 予備試験

(1) OT及び各分割の使用量 OT及び各分割の種々な濃度により感作された血球を使用して予備試験を行つた結果、血球0.1ccに対しOTは30倍液を6cc又分割は1mgを6ccに溶解して使用する事にした。

(2) OT及び各分割の血球凝集及び溶血阻止濃度は予備試験の結果OTは10倍液、各分割は4mg/ccを用いた場合、最も良い結果を得た。

(3) 補体の使用量は同一免疫血清の希釈系列について種々の濃度の補体を用いて溶血反応を行うと一つの反応の場が形成されたので、本試験では2単位の補体を使用した。

2 本試験

(1) 蛋白分割による血球凝集及び溶血反応

これらの成績は第1表に示すようにOTの感作血球に何れの免疫血清も高い凝集価を示したが、蛋白分割は第2回を除き第1回に1例の血清が10倍陽性を示した他は全て陰性で、陽性を示した第2回実験の蛋白ではPFIよりPFIIの方が高い凝集価を示している。溶血反応に

第1表 蛋白分割による血球凝集価と溶血価

反 應	実 験 回 数	分 割 の 種 類	免 疫 ウ サ ギ 血 清				健 康 ウ サ ギ 清
			1	2	3	4	
血 球 凝 集 反 應	1	ツベルクリン	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	0
		PF	0	1:10	0	0	0
		PFI	1:20	1:80	1:320	1:640	0
	2	PFII	1:320	1:320	1:1280	1:1280	0
		PF	0	0	0	0	0
	3	PF	0	0	0	0	0
溶 血 反 應	1	ツベルクリン	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	0
		PF	0	0	0	0	0
		PFI	1:40	1:160	1:640	1:1280	0
	2	PFII	1:640	1:640	1:2560	1:2560	0
		PF	0	0	0	0	0
	3	PF	0	0	0	0	0

於ても上記の結果を再確認する様な成績であつた。即ち10倍陽性を示した1例の血清は陰性となり、血球凝集反応陰性のものは全く溶血せず、又陽性であつたものより高い溶血価を示した。

(2) 多糖体分割による血球凝集及び溶血反応

多糖体分割による血球凝集反応の成績は第2表に示すように、CFIは何れの場合も全く凝集せず、CFI及びCFIIの混合しているCF及びCFIIでは何れもほぼOTと同様な凝集価を示した。溶血反応に於てもCFIは陰性、CF及びCFIIは血球凝集価より高い溶血価を示した。

尚、健康血清に対しては何れの感作血球も凝集は起らなかった。

第2表 多糖体分割による血球凝集価と溶血価

反 應	実 験 回 数	分 割 の 種 類	免 疫 ウ サ ギ 血 清				健 康 ウ サ ギ 清
			1	2	3	4	
血 球 凝 集 反 應	1	ツベルクリン	1:640	/	1:1280	1:1280	0
		CFI	0	/	0	0	0
		CFII	1:640	/	1:1280	1:1280	0
	2	CFI	0	0	0	0	0
		CFII	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	0
	3	CF	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	0
溶 血 反 應	1	ツベルクリン	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	0
		CF	1:1280	/	1:2560	1:2560	0
		CFI	0	/	0	0	0
	2	CFII	1:1280	/	1:2560	1:2560	0
		CFI	0	0	0	0	0
	3	CF	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	0

(3) 加水分解後の多糖体分割による血球凝集及び溶血反応

OT, CF, CFI, CFII, CFI-a及びCFII-aを使用した結果は第3表に示すように、前4者は今までの実験と同様な結果を示したが、CFI-a及びCFII-aは再反応とも全く陰性であつた。

(4) 各分割による血球凝集及び溶血阻止試験

血球の感作元としてOT, CF及びCFIIを使用し、OT及び各分割の反応阻止試験を行つた結果は第4表に示すようにOT, CF, CFII及びCFII-aは各感作血球に対して反応阻止現象を現わしたが、他の分割では血球凝集価及び溶血価に変化は見られなかつた。

第 3 表 加水分解後の多糖体分割
による血球凝集及び溶血価

反 應	分割の種類	免疫ウサギ血清			健 康 ウサギ 血 清
		1	3	4	
血 球 凝 集 反 應	ツベルクリン	1 : 1280	1 : 2560	1 : 2560	0
	CF	1 : 640	1 : 1280	1 : 1280	0
	CFI	0	0	0	0
	CFII	1 : 640	1 : 1280	1 : 1280	0
	CFI-a	0	0	0	0
	CFII-a	0	0	0	0
溶 血 反 應	ツベルクリン	1 : 2560	1 : 5120	1 : 5120	0
	CF	1 : 1280	1 : 2560	1 : 2560	0
	CFI	0	0	0	0
	CFII	1 : 1280	1 : 2560	1 : 2560	0
	CFI-a	0	0	0	5
	CFII-a	0	0	0	0

第 4 表 各分割による血球凝集及び溶血阻止試験

反 應	分割の種類	免疫ウサギ血清		健 康 ウサギ 血 清
		5	6	
血 球 凝 集 阻 止 試 験	ツベルクリン	0	0	0
	PFI	1 : 1280	1 : 640	0
	PFII	1 : 1280	1 : 640	0
	CF	0	0	0
	CFI	1 : 1280	1 : 640	0
	CFII	0	0	0
	CFI-a	1 : 1286	1 : 640	0
	CFII-a	0	0	0
	対 照	1 : 1280	1 : 640	0
溶 血 阻 止 試 験	ツベルクリン	0	0	0
	PFI	1 : 2560	1 : 1280	0
	PFII	1 : 2560	1 : 1280	0
	CF	0	0	0
	CFI	1 : 2560	1 : 1280	0
	CFII	0	0	0
	CFI-a	1 : 2560	1 : 1280	0
	CFII-a	0	0	0
	対 照	1 : 2560	1 : 1280	0

註 1. 本表はツベルクリン感作血球を使用した場合
2. CF 及び CFII を感作元とした場合も同様な傾向を示す

IV 総括及び考察

私共はこの様な実験を行うには、出来るかぎり種々な条件を一定にする必要を感じて、2, 3 の予備実験を行った。本反応の術式に関する基本的な問題に関しては、先に土屋、遠藤¹³⁾等により報告されたが、その際行なわれなかつた少数の点に関しても本実験に於て決定し得たものと思う。その結果、本反応は常に種々なる条件を一定にする様に心掛けて行えば、ほぼ一定の価を得る事が出来るものと思われる。

矢追¹⁴⁾等は同一感作液で数回血球を感作すると次第に凝集価が低下する事を認め、私達も先きに OT の 30 倍液 6 cc 中に含まれる血球量が一定量以上多くなると、凝集価の低下を来し、それ以下では価に変化を来さない事を認めた。今回私共はツベルクリン及びその多糖体の種々な濃度のもので血球を感作した結果、或る濃度以上では何れも同一な価を示した。この事からたとえ感作元がツベルクリン、その多糖体或いは菌体成分であつても、一定量の血球に対して或る一定量以上のものを使用すれば血球凝集価に差異は無いものと思われる。この事は一方 1 血球が吸着する感作元量は決つており、それ以上はいくら感作元が存在しても吸着されないものと思われる。

血球凝集価はこの様にして一定になつたが、Middlebrook,³⁾ S. Fisher¹⁵⁾¹⁶⁾により報告された溶血反応を行うに、常に一定の値を得ようとすれば常に一定力価の補体を使用しなければならない。Middlebrook は 2 倍補体 1 滴を加えるが如き極めて不確実な方法を用いており Fisher は補体濃度を種々に稀釈して実験を行つてゐるが、まだ力価を決定するまでに至つていない。その後 Pound⁷⁾により始めて補体力価を測定する方法が報告された。私共もそれに従い補体力価を測定し、常にほぼ一定力価の補体を使用する事が出来た。私共の使用した補体では 4 単位以上の濃いものを得る事が出来なかつたが補体力価の高い場合にはそれ程問題はないが、補体力価の低い場合には溶血価の低下を来し、時により血清の低稀部部に於て溶血阻止帯が認められた。

血球凝集反応及び溶血反応の感作元に関する研究はあまり多くない。Middlebrook¹⁾ は 1948 年の報告のうちで、又、その後の報告に於て、菌体抽出液の多糖体にその活性があるのだらうと記載しているが、何らの証明があつての事ではない。この感作元の分析は Pound によりなされ、Pentose を多く含む多糖体にその活性が認められている。ツベルクリンの分割の感作元性に関しては Gernez-Rienxet & Taeqnet³⁾により N 量 14.4%

の分割ではなく、3.23%の分割にある事が認められている。又 Hilson & Elek⁶⁾ はツベルクリンより、簡単な方法により CCF (Crude Carbohydrate Fraction) を分析し、これに活性を認め、更に、PPD を感作元として使用し、その反応は PPD 中に含まれる多糖体により起るものであろうと記載している。私共は3回ツベルクリンの分析を行ない各分割の化学的性状等については前報に記載した。そのうち多糖体分割を用いて血球凝集反応及び溶血反応を行った結果、還元量の多い CFI には活性が無く、わずかに黄色調を呈し、CFI より還元量が少く、Pentose を含む CFII が強い活性を示した。Pound は97%のエタノールで沈澱する菌体抽出液の分割は血球凝集反応に対する抗元性はあるが、溶血反応に対する活性は認められない事を報告している。私共はツベルクリンを使用した事と、その様なアルコールの高濃度の分割を得る事が出来なかつたので、両反応に於ける抗元性の分離を行う事が出来なかつた。次でこの CFI と CFII を1%醋酸で加水分解を行うと、溶部と不溶部に分かれ、この溶部から再分割した多糖体では、抗元活性が認められなかつた。この不溶部は核蛋白又はポリペプチドと思われるが、収量が少なく、この物質で血球凝集反応及び溶血反応を行なう事は出来なかつたが、おそらくこの物質も単独では本反応に対する抗元性はなく多糖体と結合した型で始めて活性が現われるものと思われる。この様な事は根津⁹⁾も腸チフス菌体の酸性加熱抽出多糖体は赤血球処置抗元としての性能に欠けている事を報告している。更に血球凝集及び溶血阻止試験を行つて見ると、OT 及び CF は勿論のこと、CFII-a にも明らかに反応阻止力が認められた。従つて本反応の決定基は多糖体にあり、CF の加水分解により得られた不溶物は多糖体に結合し、その分子を大きくし更に血球に附着する能力を付与するのではなからうか。又、蛋白分割には抗元性は無いものと思われる。但し、第2回実験の PFI 及び PFII で弱い反応が起つた。この第2回実験は他の場合に比し収量も多く、又糖反応が認められる点から多糖体をかなり含有しているものと考えられる。故に Hilson & Elek 等が多糖体の微量を含む PPD による実験の場合と同様に、この蛋白分割中に含まれた多糖体によるためであると思われる。

V 結 言

青山-B株死菌流動パラフィン乳剤免疫ウサギ血清を使用し、青山-B株ソートン・ツベルクリン及びその各分割の血球凝集反応及び溶血反応に対する抗元性を検討した。

(1) 蛋白分割には血球凝集及び溶血反応に対する抗元性は認められなかつた。

(2) 多糖体分割にては、CFI には本反応に対する抗元性は認められないが、CFII にはツベルクリンと同程度の抗元活性が認められた。

(3) 各分割で血球凝集及び溶血阻止試験を行うと、CF, CFII 及び CFII-a に阻止力を認めた。

終りに臨み御指導、御鞭撻を賜つた柳沢部長に深謝する。尚この研究費の一部は文部省総合研究結核研究班の好意によるもので茲に謝意を表する。

文 献

- 1) Middlebrook, G. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 2) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 62, 233 1950.
- 3) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
- 4) Scoot, N. B. & Smith, D. J.: J. Lab. Clin. Med., 35, 303, 1950.
- 5) Gernez-Rieux, C. H. & A. Taquet,: Ann. de Inst. Pasteur de Lille, 3, 1, 1950.
- 6) Hilson G. R. F. & Elek, S. D.: J. Clin. Patho., 4, 158, 1951.
- 7) Pound, A.W.: J. Patho. Bact. 114, 131, 1952
- 8) 根津尚光: 日本細菌学雑誌, 7, 477, 1952.
- 9) Seibert, F. B. & Watson, D. W.: J. Biol. Chem., 140, 55, 1941.
- 10) Seibert, F. B., Stacey, M. & Kent, P.: Biochem. Biophys. Acta. 3, 632, 1949.
- 11) Karjala, S. A. & Hedelberger, M.: J. Biol. Chem. 137, 189, 1941.
- 12) 浅見望, 土屋皖司, 細井正春: 日本細菌学雑誌 9 (4), 271, 1954.
- 13) 土屋皖司, 遠藤元清, 浅見望, 田嶋嘉雄: 日獣誌 14, 335, 昭27 (1952).
- 14) 矢追透武, 武井盈, 前田博司: 総合医学, 8, 109 昭26 (1951).
- 15) Fisher, S. & Keogh, E. V.: Nature, 165, 248 1950.
- 16) Fisher, S.: Aust. J. Exp. Bio. Med. Sci., 28 612, 1950.