

# 結核症の結核菌及びチモシー菌抗原に対する 沈降反応に関する臨床的及び実験的研究

## 第3報 結核菌及びチモシー菌沈降反応抗原の 化学的成分に関する実験

東京大学伝染病研究所第八研究部（主任 美甘 義夫教授）

江 藤 武 夫  
（昭和 26 年 9 月 12 日受付）

### 緒 言

結核の血清学免疫学的診断法として幾多の抗原が考案  
案出され実験されているが、それ等は総べて臨床的または  
動物実験的に行われた結果成績についてのみ論ぜられ、  
その抗原の如何なる因子が主たる作用機軸を営んでいる  
かということについて、一つの抗原を追求した研究を余  
りみない。殊に結核沈降反応では結核菌体の各種抽出液  
を抗原として用いているが、臨床的に結核患者血清につ  
いてのみその抗原の特異性を論じているに過ぎず、さら  
に動物実験並びにその抗原の化学的成分について追求し  
たものは殆んどない。もつとも結核菌体及び非病原性抗  
酸性菌体の各種分劃の化学的成分についての研究は1)  
Hammerslag 及び Weyl などを始めとし、Anderson  
その他多数の学者が優れた発表をなしておる。これらの  
業績からみれば細菌菌体の化学的成分研究では結核菌に  
ついて最も多くの知見が得られているといひ得る。しか  
しその成績は甚だ一致を欠いている。これは培養の条件  
又は菌株などの因子が重要な役割をするものの如く、た  
とえ同一人によつて反復せられても同一成績を得ると限  
らず、この種実験の困難さを思わせるに充分である。一  
方結核菌体化学的成分の生物学的性状も幾多論ぜられ  
実験されているところである。

著者はこれ迄（第1, 2報）Schlossberger の法により  
結核菌及び非病原性抗酸性菌チモシーのアンチホルミン  
浸出液を抗原として、臨床的に結核患者血清その他多数  
の人血清について沈降反応を試み、両抗原の差違並びに  
結核血清に対する共通性、特異性を論じ、また動物実験  
的に両抗原の交叉免疫学的性状を論じてきたが、両抗原  
の優劣差違は浸出抗原の菌体化学的成分の含量差違によ  
り生ずるものと考え、如何なる因子によるものなるかを  
可能な範囲内において追求してみた。結核菌々体成分と  
して水分の他、乾燥物質としては脂質・蛋白質・含水炭  
素・灰分が挙げられているが、浸出溶媒として本抗原は  
アンチホルミンを用いたので、アルカリ溶液に溶解浸出  
されるものは主として蛋白質なるものと考え、結核菌及  
びチモシー菌のアンチホルミン浸出抗原について各種蛋  
白呈色反応を試み、さらに両抗原の総窒素量を測定し両

抗原中の蛋白含量の差違により、結核菌抗原とチモシー  
菌抗原の異同を比較研究してみた。

### 実験方法並びに成績

結核菌及びチモシー菌のアンチホルミン浸出抗原につ  
いてつぎの如き実験を行い定性並びに定量試験を試み  
た。

#### [A] 定性試験

##### 1) 蛋白現色反応

###### a) Biuret 反応

結核菌抗原、チモシー菌抗原各 3cc に苛性曹達液  
(2N) 2cc を加えた後、稀硫酸銅液(1%)を1滴宛滴下  
しつつ振盪、対照としてアンチホルミン液 3cc に同操作  
を行いしものを置くと、両抗原ともに対照青色に比し  
紫青色を呈し蛋白陽性反応を示す。

###### b) Millon 反応

結核菌、チモシー菌両抗原各 3cc に Millon の試薬  
を等量加えると白色沈澱を発生、暫く放置するかまたは  
60~70°C に加熱すると、一部煉瓦赤色を呈し弱き蛋白  
陽性反応を呈す。

試薬添加後加熱せられた際に溶液は酸性なるを要  
し、原液アルカリ性なるため濃硫酸1滴を加えるを  
要す。

本反応は Tyrosin に因るものとされる。

###### c) Molisch 試験

結核菌、チモシー菌両抗原約 3cc に  $\alpha$ -Naphthol-  
Alkohol 溶液(1%) 2~3 滴を加え混和した後、試験管  
に沿うて静かに純濃硫酸約 3cc を加え重疊すると、両液  
接触層に淡い紫赤色の色環を生じ弱陽性を呈す。

本反応は本来糖質の一般反応に属するものとされ、  
蛋白質中に存する Amino 糖に因るものであつて蛋  
白の存在と共に僅かながら糖質の存在を知る。

##### 2) 蛋白沈澱反応

###### a) 煮沸試験

結核菌、チモシー菌抗原を醋酸で中和後、加熱煮沸す  
るも認むべき混濁沈澱を生ぜず。すなわち対熱凝固性蛋  
白は認められない。

###### b) Sulfosalicyl 酸試験

両抗原に醋酸を加え、中和して Sulfosalicyl 酸溶液 (20%) を加えるも白濁せず陰性を示す。

3) 糖質還元反応

a) Fehling 試験

Fehling の試薬 3cc 宛 2 本の試験管に採り、予め煮沸してその変化しないことを確めた後、一方には結核菌抗原を、他方にはチモシー菌抗原を数滴加え加熱を継続するも Cu<sub>2</sub>O の赤色沈澱を発生せず、還元性糖の存在を認めず陰性を示す。

b) Benedict 反応

Benedict の試薬 5cc 宛 2 本の試験管に採り、一方には結核菌抗原、他方にはチモシー菌抗原各十数滴を滴下し 1~2 分間強く煮沸した後、放置し自然に冷却せしめるも何等沈澱を生ぜず反応陰性を示す。

c) Nylander 反応

両抗原液 3cc 宛に Nylander 試薬各  $\frac{1}{5}$  量宛加え 2~5 分間煮沸した後、放置するも反応陰性にして還元糖の存在を認めない。

以上結核菌抗原及びチモシー菌抗原の定性試験の結果は次表に示す(第 1 表)。

第 1 表 菌体浸出抗原の化学的成分定性試験

試 験 名		抗 原	結核菌抗原	チモシー菌抗原
紫色	Biuret 反応		(+)	(+)
白濁	Millon 反応		(+)	(+)
現色	Molisch 反応		(+)	(+)
同反	煮 沸 試 験		(-)	(-)
沈澱	スルホサルチル酸		(-)	(-)
糖元	Fehling 試験		(-)	(-)
質反	Benedict 反応		(-)	(-)
還元	Nylander 反応		(-)	(-)

[B] 定量試験

結核菌及びチモシー菌のアンチホルミン浸出抗原は以上の如く蛋白反応を呈し、菌体のアルカリ可溶性蛋白が主成分をなすものと思われ、両抗原中の総窒素量を Parnas の法を用いて測定実験してみた。

1) 結核菌抗原、チモシー菌抗原各 1cc を Kjeldahl の小酸化コルベン 3 本宛採り、酸化剤(純濃硫酸 2cc 並びに銅加里一小尖刀量)を加え、酸化装置して小火焰にて加熱完全に酸化後、放冷約 4cc の水を注意して添加後、法の如く蒸溜、 $\frac{N}{25}$  塩酸液 5cc 及び田代 Indicator (2~3 滴) を入れた受器内に蒸溜を受け、 $\frac{N}{50}$  NaOH 液にて滴定した。Blind としては抗原 1cc の代りに菌体浸出溶剤として用いたアンチホルミン 1cc を測定して、各抗原中の総窒素量を算出した結果次の如き値を得た。

{ 結核菌抗原.....58.954 mg/dl  
チモシー菌抗原.....33.309 mg/dl

本抗原は菌体 50mg に対しアンチホルミン 1cc の割合すなわち 5 gr/dl の濃度にて浸出したもの故、浸出菌体量に対する抗原総窒素量を gram per cent に換算すると次の如き値となる。

{ 結核菌抗原.....1.179%  
チモシー菌抗原.....0.666%

2) つぎに結核菌及びチモシー菌両菌体の総窒素量並びに浸出残渣菌体の総窒素量を測定し、その差によりアンチホルミン浸出操作における菌体蛋白窒素喪失量を求め、浸出抗原中に含まれる菌体蛋白窒素量とを比較検討してみた。

さらにまた浸出抗原透析液の総窒素量を測定、前記浸出抗原の総窒素量と比較して、抗原透析操作による窒素含量の変動を検討してみた結果、次表の如き値を得た(第 2 表)。

第 2 表 結核菌及びチモシー菌々々成分窒素定量値(gram per cent)

被検菌株	全菌体	浸出残渣菌体	浸出による菌体 N 減少	浸出抗原	透析抗原
結核菌	14.922%	12.089%	2.833%	1.179%	0.325%
チモシー菌	14.186%	12.921%	1.265%	0.666%	0.203%

総括並びに考按

(A) 1) 結核菌及びチモシー菌のアンチホルミン浸出抗原の定性反応を試みた結果、Biuret 及び Millon の反応陽性を示し、これ等抗原中には菌体成分のアルカリ可溶性 Protein が大部を占め、沈降反応の一重要因子をなしているものと思われる。これ等 Protein は煮沸試験により熱凝固性はなく Sulfosalicyl 酸によつても白濁沈澱はみられず albumin, globulin の類ではないと考えられる。アルカリ可溶性 Protein については Klebs<sup>2)</sup> その他の人々は一種の Nuclein と考え、Weyl<sup>3)</sup> はそれを Albumin と同一物と信じていたが、一般には認められていない。Ruppel<sup>4)</sup> はさらに研究を行い Nucleoprotein だと考えた。彼は又核酸と結合した Protein 物質は Protamin なることをも証明した。Ruppel は弱アルカリにより結核菌から浸出される物質の全量は約 15% なることを発見した。彼は分析に際しこれ等溶液中には凝固性の Protein は含んでいず、総べての Protein について現色反応はただ単に弱い、Biuret 反応を呈するのみだつた。

2) 結核菌及びチモシー菌アンチホルミン浸出抗原中に糖質成分を含んでいるか否かを検したが、ただ Molisch 試験が弱い反応を呈し、一部 Protein に結合している糖、すなわち Amino 糖の存在を認めたと、還元性糖の存在は本抗原から直接には証明し得なかつた。

3) その他本抗原中には微量ながら燐質の存在及び Lipin 物質の残存が推定される。

(B) 1) 結核菌及びチモシー菌アンチホルミン浸出抗原の総窒素量を測定した結果、結核菌抗原は 58.954 mg/dl, チモシー菌抗原は 33.309 mg/dl なる値を得、結核血清に対する沈降反応において結核菌抗原とチモシー菌抗原との反応差異は、これ等総窒素量より推定して両菌体浸出抗原中に含有される菌体 Protein 量の差異が一重要因子をなしているものと考えられる。

2) 結核及びチモシー菌体の総窒素量を測定した結果、結核菌は 14.922%, チモシー菌は 14.186% となり、両菌体で家兎を免疫した場合沈降反応に差異の生ずるもの、これ等菌体蛋白量の差異によるものと考えられる。

3) 菌体アンチホルミン浸出後の残渣菌体について窒素分を測定せしに、結核残渣菌体では 12.089%, チモシー残渣菌体は 12.921% となり、浸出により結核菌は 2.833%, チモシー菌は 1.265% の菌体窒素分が浸出喪失しているのを見る。従つて浸出残渣菌体で家兎を免疫した場合、全菌体を接種した場合より沈降反応が低下するのが見受けられるのは、これ等菌体蛋白の喪失により菌体の免疫元性(沈降元性)が減弱されるものと思う。

4) 菌体のアンチホルミン浸出により結核菌では 2.833%, チモシー菌では 1.265% の窒素分喪失をみる。しかるにこれ等浸出抗原中に含まれる窒素分はその約半量で、結核菌抗原は 1.179%, チモシー菌抗原は 0.666% となり、これは恐らく浸出過程における濾過及び濾液遠心沈澱操作中に菌体蛋白を逸出するものと考えられる。

5) 結核菌及びチモシー菌浸出抗原を透析したものについて同じく窒素分を測定せしに、結核菌透析抗原は 0.325%, チモシー菌透析抗原は 0.203% となり透析前抗原の約  $\frac{1}{3}$  に減少しているのがみられ、透析により約 3 倍に稀釈されている。

従つて前報実験において透析抗原に対する結核患者血清の沈降反応が減弱するのは、これ等透析抗原中の菌体 Protein 含量の減少によるものと考えられる。またこれ等透析抗原を以つて家兎免疫を試みた場合、全菌体免疫

及び残渣菌体免疫の場合より沈降反応弱く、沈降素産生の減弱するのもこれ等菌体蛋白含量の減少に起因するものと思われる。

## 結 論

結核菌及びチモシー菌アンチホルミン浸出抗原中に含有される菌体成分の化学的性状を検した結果、両抗原ともに化学的に共通の成分を有す。すなわち定性試験の結果本抗原中には菌体のアルカリ可溶性蛋白が重要部を占めるものと思われる。

結核菌及びチモシー菌のアンチホルミン浸出抗原及び同透析抗原、並びに両菌体及び浸出残渣菌体それぞれの総窒素量を測定した結果、両菌間に蛋白成分の量的差違を認めた。従つて既報の臨床的並びに動物の実験における沈降反応の強弱は之等免疫元及び反応元間の蛋白成分の量的差違が一因子として関与するものと考えられる。

以上結核菌及びチモシー菌は化学的に共通成分を有し、両菌体浸出抗原による沈降反応も共通反応を呈す。しかし両抗原を以つてする臨床実験並びに動物実験においていずれの場合も差違を生ずるのは、両抗原並びに両菌体の蛋白量の相違が一重要因子を占めることを認めた。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた美甘教授に深く感謝する次第である。

## 参 考 文 献

- 1) H. Gideon Wells and Esmond R. Long : The Chemistry of Tuberculosis ; Second Edition , P.48~87, 1932.
- 2) Klebs : Zent. f. Bakt. , 20, 488, 1896.
- 3) Weyl : Deut. med. Woeh. , 17, 256, 1891.
- 4) Ruppel : Zeit. Physiol. Chem. , 26, 218, 1898.
- 5) 渡辺義政 : 結核の細菌及免疫学 (改訂第四版) 273. 昭 18.