結核における赤血球凝集反応抗原の研究

第 1 報

名古屋大学予防医学教室（指導　岡田　博 助教授）

浅　野　元　康

（昭和 28 年9月 27 日受付）

緒　　言

1948 年 Middlebrook 及び Dubos[1]は結核菌のフェノール処置後の食塩水抽出液を以つて感作された緬羊赤血球は結核患者血清及び BCG 接種家兎血清と特異的に赤血球凝集反応を起すことを報告し更に1950年 Scott及び Smith[2]は原法の変法としてLederle製旧ツベルクリン原液を用いても同様の反応を起し得ることを報告した。その後多数の研究者によつて追試され本反応が結核症に特異的であることはすべて認めているが活動性結核症の診断に対する本反応の臨牀的価値の評価については研究者によつてそれぞれ意見を異にしている。すなわち Rorthbard[3], Gernez-Rieux[4], Sigv. Tsohudi Madsen[5], H. Brodhage[6], 矢追[7][8][9][10], 水上[11], 丸本[12], 吉田[13], 佐藤[14], 熊谷[15], 吉田[16] 等は活動性結核症に高度の陽性度を認め，その臨牀的価値を認めているに対し Scott 及び Smith[17], W. Hentdl 及び G. D. Gilbert[18], John Adcock 及び Rapheal R.[19], Benjamin Schwartz[20], William M., M. Kirby[21] 等は臨牀的価値が少ないか或いは疑わしいと報告している。以上の如く反応成績が一定でないのは矢追[7]がいう如く感作抗原の化学的本態が明らかでなく且つ純粋なる感作抗原が得られぬためと不安定な赤血球を使用するためと思われる。よつて本反応の臨牀的価値を高めるためには純粋なる感作抗原を得ることと赤血球にかわる安定性のある物質を使用することであると思われる。余はまず純粋なる感作抗原を得る目的でツベルクリンの分劃を行い如何なる分劃に感作抗原が存在しその化学的本態は如何なるものであるかを検索したいと思い第1報として F.B. Seibert のツベルクリン分劃法[22]を参考として下記の如き方法により分劃し，その各分劃について赤血球凝集反応との関係を検べた。

実　験　方　法

1）旧ツベルクリンの作製

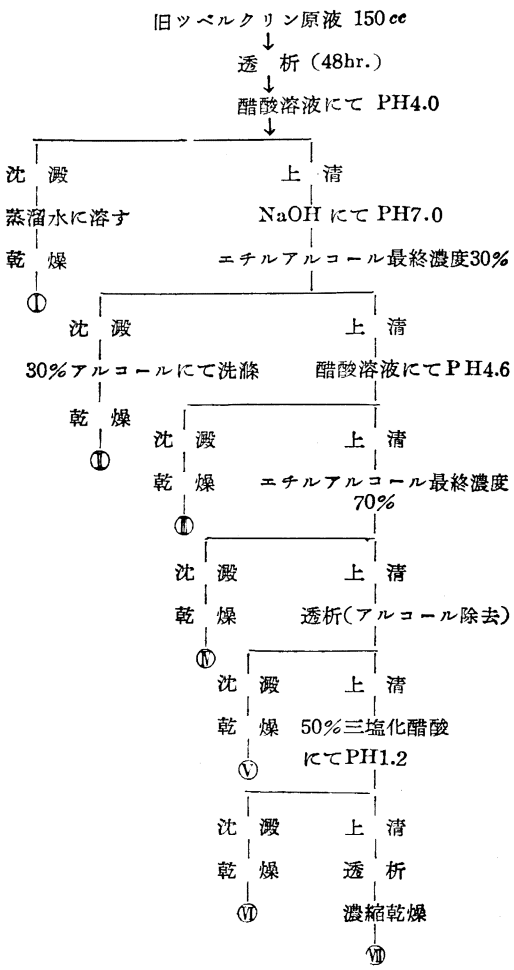
厚生省基準[23]によつて自家作製した。培地はソートン無蛋白培地を使用した。

2）ツベルクリン分劃法

ツベルクリン原液をトリオールを加えてセロファン袋で流水中 48 時間透析し水浴上にて原量に迄濃縮した。

a）分劃Ⅰ：その内液を醋酸溶液にて PH4.0 にし生ずる沈澱を蒸溜水（PH7.0）にとかし遠心してその上清を真空乾燥しこれをⅠとした。

第1表　ツ分劃の方法



b）分劃Ⅱ：a）における上清に NaOH溶液を加えて pH7.0としエチルアルコール最終濃度 30 %になる迄加えて生ずる沈澱を真空乾燥しこれをⅡとした。

c）分劃Ⅲ：b）における上清を醋酸溶液にてPH4.6とし生ずる沈澱を真空乾燥しこれをⅢとした。

d）分劃Ⅳ：c）における上清にエチルアルコールを最終濃度 70 %になる迄加えて生ずる沈澱を真空乾燥しこれをⅣとした。

e）分劃Ⅴ：c）における上清を流水中にて透析しエチルアルコールを除去し生ずる沈澱を真空乾燥しこれをⅤとした。

f） 分劃 Ⅵ：e）における上清を水浴上にて $^1/_{10}$ に濃縮しこれに 50 %三塩化醋酸溶液を PH1.2 迄加え生ずる沈澱を蒸溜水（PH7.0）にとかし遠心してその上清を透析してその内液を真空乾燥しこれを Ⅵ とした。

g） 分劃Ⅶ：e）における上清をトリオールを加えて流水中にて 48 時間透析し三塩化醋酸を除去しその内液を濃縮乾燥したものを Ⅶ とした。

3） 赤血球凝集反応

赤血球凝集反応の術式は Middlebrook 及び Dubos[1] の原法に準拠し赤血球は熊谷[15]と同様O型人赤血球を使用した。被検血清はレ線所見にて明らかに結核性と考えられる病巣を認め喀痰培養の結果菌陽性であり且つ現在治療中の患者 10例と健康と思われる者 10例について行つた。感作抗原は各分劃を化学天秤にて正確に 5*mg* それぞれ秤量し 5*ml* の生理的食塩水にとかし使用した。被検血清は非働化して 4 倍稀釈からの稀釈例をつくりこれに感作血球浮游液を血清稀釈液と同量加え 2 時間孵卵器中に保存し 2 時間後及び一夜放置後判定した。8 倍稀釈以上で凝集したものを陽性とした。対照として無感作血球浮游液を加えた試験管及び生理的食塩水と感作血球浮游液とを加えた試験管 2 本を用意した。

4） 紫外線吸収曲線

紫外線吸収曲線はベツクマン装置を使用して各分劃の 0.5*mg/ml* 溶液の吸光度を 2,200μ から 3,300μ の間について測定し作製した。

5） 電気泳動法

電気泳動法は日立の HTB型チセリウス装置を使用し概ね電気泳動研究会の規定[24]にもとづいて行つた。泳動条件は PH7.8 イオン強度 0.1 の燐酸緩衝液を用い100 Volt 10 mA 45 分間で行つた。試料の濃度は 1.5 %溶液のものを用いた。

6） ツベルクリン力価試験

ツベルクリン力価試験は概ね厚生省基準[23]にもとづいて行つた。各分劃 5*mg* を秤量し 10*cc*生理的食塩水にとかしその 1 *ml* を更に 10 *ml* の生理的食塩水にとかし 50δ/*ml* の溶液を作製しその 0.1*ml* をモルモットの背部の一側に皮内注射した。Ⅳ分劃を対照として一側に他の分劃をそれぞれ他側対応部に注射し 24 時間後及び 48 時間後その硬結の大きさを測定した。モルモットは厚生省基準にもとづいて予め処置し 5 匹を一群としその平均値をとつた。

実 験 成 績

1） 各分劃と赤血球凝集反応との関係

各分劃成分を感作抗原として患者血清 10 例健康者血清 10 例について反応を行つた結果表 2 に示す如く患者血清の場合 Ⅳ 分劃及び Ⅶ 分劃を感作抗原とした場合のみ陽性を示し他の分劃で感作した場合はすべて陰性であつた。ツベルクリン 15 倍稀釈で感作した場合と Ⅳ 分劃で感作した場合とその凝集価を比較して見ると凝集価が等しい場合が 10 例中 5 例，他の 5 例はすべて Ⅳ 分劃の方が高い凝集価を示した。

またⅦ分劃とツベルクリンの場合とを比較して見ると凝集価が等しい場合が 10 例中 6 例他の 4 例は Ⅶ 分劃の方が低い凝集価を示した。Ⅳ分劃とⅦ分劃の場合を比較して見ると凝集価が等しい場合が 10 例中 2 例で他の 8 例はすべて Ⅳ 分劃の方が高い凝集価を示した。健康者血清では Ⅶ 分劃の場合すべて陰性であつたが Ⅳ 分劃及び旧ツベルクリンの場合 1 例陽性を示し凝集価は 8 倍であつた。

第 2 表　各分劃と血球凝集反応との関係

血清＼抗源	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	O.T
1	0	0	0	64	0	0	64	64
2	0	0	0	64	0	0	32	64
3	0	0	0	64	0	0	32	32
4	0	0	0	16	0	0	8	8
5	0	0	0	32	0	0	16	32
6	0	0	0	32	0	0	8	32
7	0	0	0	32	0	0	32	32
8	0	0	0	32	0	0	16	16
9	0	0	0	16	0	0	8	8
10	0	0	0	8	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	8	0	0	0	8
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0

数字は凝集価（倍数）8 倍以上を陽性とした。抗原は1*mg/Pcc* を用いた

以上の成績から本反応の感作抗原の大部分が Ⅳ 分劃及び Ⅶ 分劃すなわち PH4.6 エタノール最終濃度 70 %以上で沈澱する分劃に存在すると思われる。

2） 各分劃の化学的性状

表 3 に示す如く Ⅰ，Ⅲ，Ⅴ，Ⅵ 分劃はともにXanthoprotein R. Ninhydrin R. Biuret R. いずれも強陽性で且つ Diphenylamin R. が陽性を示し核酸を含む蛋白質を大部分含むものと思われるが Molisch R. が弱陽性又は陰性のため僅少の多糖体を含むか又は含まないものと思われる。Ⅱ，Ⅳ，Ⅶ 分劃は Molisch R. が強陽性でいずれも相当大量の多糖体を含むものと思われる。Ⅳ 分劃は Xanthoprotein R. Ninhydrin R. Biuret R. がいずれも強陽性を示し且つ Diphenylamin R. も陽性を示し相当量の蛋白質及び核酸を含むものと思われる。Ⅶ 分劃は Xanthoprotein R. Ninhydrin R. Biuret R.が陽性を示すが反応が弱く且つ Diphenylamin R. が陰性を示すので核酸を含まぬ少量の蛋白質を含むものと思われる。

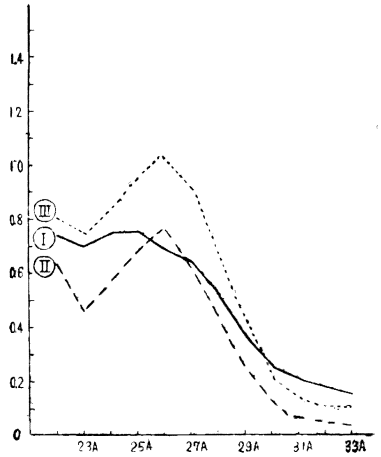
第3表　各分割成分の化学的性状

反応 / 分割	Xantho-protein R.	Ninhy-drin R.	Sulfo-salyl Säure R.	Dipheny-lamin R.	Molishe R.
Ⅰ	⧺	⧺	⧺	+	−
Ⅱ	+	+	+	⧺	⧺
Ⅲ	⧺	⧺	⧺	⧺	−
Ⅳ	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
Ⅴ	⧺	⧺	⧺	⧺	−
Ⅵ	⧺	⧺	⧺	⧺	−
Ⅶ	+	⧺	±	−	⧺

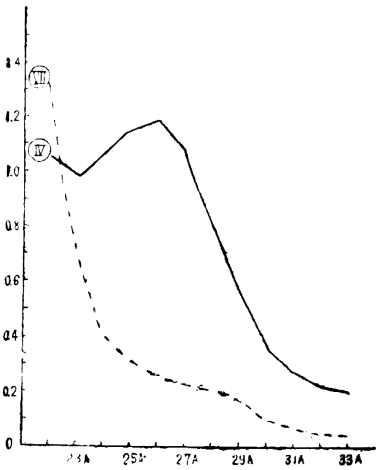
3）各分割の紫外線吸収曲線

図1及び2に示す如くⅠ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ分割は共に2600Åの部分に吸収帯が認められ核酸の存在を示しているがⅦ分割ではその部分に吸収帯が認められず核酸を含まないことを示している。Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ分割の2500Å～2800Åの部分の吸収帯は明らかに認められ蛋白質の存在が明らかであるがⅦ分割においても2500Å～2800Åに吸収帯が認められ少量であるけれども蛋白質を含むことを示している。

第1図　分割の紫外線吸収曲線



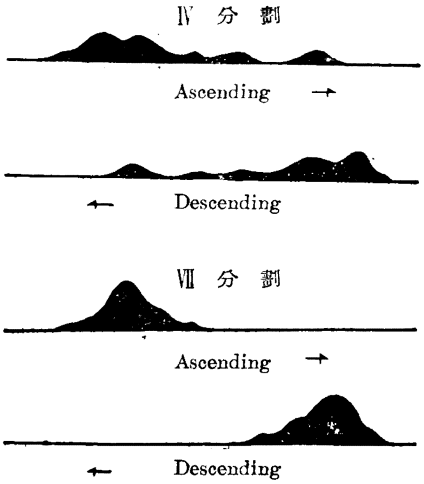
第2図　分割の紫外線吸収曲線



4）Ⅳ分割及びⅦ分割の電気泳動法による分析

図3に示した如くⅣ分割の泳動図は5つの峯からなつている。すなわち易動度測定により多糖体と考えられる1つの峯と蛋白質と思われる3つの峯と核蛋白と思われる1つの峯からなつている。Ⅶ分割の泳動図は多糖体と思われる1つの峯と蛋白と思われる2つの峯からなつている。その百分比を測つて見ると Ⅳ 分割は多糖体 41.3 %蛋白質 37.3 %核蛋白質 21.3%であり，Ⅶ 分割は多糖体68.3%蛋白質32.7%である。多糖体と蛋白質の比は Ⅳ 分割は 0.59 で多糖体は蛋白質の半量しかないのに対しⅦ分割では 2.1 で多糖体は蛋白質の約2倍からなることが判る。

第 3 図



5）各分割と「ッ」力価

Ⅳ分割を対照として一側に，他の分割を他側対応部に皮内注射しⅣ分割を1とし比を求めた。その果結表4に示す如くⅠ分割とⅣ分割とでは 24 時間後 Ⅰ/Ⅳ=12.6, 48 時間後 Ⅰ/Ⅳ=1.19 でⅠ分割の方が力価が強い。Ⅱ分

第4表　各分割とッ力価

時間 \ 分割	Ⅰ 分 割	Ⅳ 分 割	Ⅰ/Ⅳ
24 時 間	11.7	9.3	1.26
48 時 間	13.0	11.0	1.19
時間 \ 分割	**Ⅱ 分 割**	**Ⅳ 分 割**	**Ⅱ/Ⅳ**
24 時 間	16.0	18.4	0.87
28 時 間	15.1	20.3	0.74
時間 \ 分割	**Ⅲ 分 割**	**Ⅳ 分 割**	**Ⅲ/Ⅳ**
24 時 間	12.6	9.5	1.32
48 時 間	17.0	12.7	1.33
時間 \ 分割	**Ⅶ 分 割**	**Ⅳ 分 割**	**Ⅶ/Ⅳ**
24 時 間	10.2	12.5	0.81
48 時 間	8.2	13.2	0.62

5γ 用量を使用し5匹平均値を以て示す

劃と Ⅳ 分劃とでは 24 時間後 Ⅱ/Ⅳ=0.87, 48 時間後 Ⅱ/Ⅳ=0.74 でⅡ分劃の方が力価が弱い。Ⅲ 分劃とⅣ分劃とでは 24時間後 Ⅲ/Ⅳ=1.32, 48 時間後 Ⅲ/Ⅳ=1.33 で Ⅲ 分劃の方が力価が強い。Ⅶ分劃と Ⅳ 分劃とでは 24 時間後 Ⅶ/Ⅳ=0.81, 48 時間後 Ⅶ/Ⅳ=0.62 でⅦ 分劃の方が遙かに力価が弱い。

総括並びに考按

旧ツベルクリンをエタノール分劃法によつて7つの分劃に分ち，各分劃を感作抗原として赤血球凝集反応を行つた処 Ⅳ 分劃及び Ⅶ 分劃で感作した場合のみ陽性を示し感作能を有することが判つた。すなわち PH 4.6エタノール最終濃度 70 %以上で感作抗原が沈澱するように思われる。Ⅳ 分劃及び Ⅶ 分劃の化学的性状を定性反応，ベックマンによる紫外線吸収曲線及び電気泳動法による分析によつて検べた結果いずれも多糖体及び蛋白質の混在物であつてⅣ分劃は核蛋白質をも含んでいる。「ツ」力価試験によつても Ⅳ 分劃及び Ⅶ 分劃共に「ツ」活性が認められ蛋白質の存在が明らかである。以上の成績から感作抗原の化学的本態を推論することはできないが更に実験を進めてこれを究明したい。

本反応の感作抗原の化学的本態に関して多糖体説を主張するものと蛋白質説を主張するものがあり未だ明らかでない。すなわち Middlebrook 及び Dubos[1], Haas[25], Bull N.Y[26], Fisher 及び Keogh[27], 根津[28], 武田[29], 岡田[30] 等は本態は多糖体であると報告しているに対し Gericke[31], C.W. Dewett 及び J.M. Birckeland[32], H. Brodhage[6], William L. Gaby Joyce[33], 進藤[34], 秋葉[35], 等は蛋白質がその本態であるか若しくは大きな役割をもつものと報告している。

「ツ」力価試験においてF.B. Seibert は Polysaccharide Ⅰ 及びⅡ (F.B. Seibert は非加熱性ツベルクリンをエタノール分劃法により Polysaccharide をⅠ及びⅡに分ちた) には「ツ」活性は認められないと報告しているが余の分劃 Ⅱ 及び Ⅶ には相当強い「ツ」活性があり非加熱性の場合と分劃成分が多少異るためではないかと思う。又 F.B. Seibert は Protein A が一番力価が強くB,Cの順序で力価が弱いと報告しているが余の分劃では分劃Ⅲすなわち Protein B に相当する分劃が一番力価が強くⅣ 分劃すなわち Protein A に相当する分劃が一番力価が弱かつた。この成績は武谷[36] の報告と全く一致し又 Protein A には相当量の多糖体を含むと報告しているがこの点に関しても余の成績と一致している。

F.B. Seibert[37] は Polysaccharide Ⅱは沈降元となり得るが Polysaccharide Ⅰ は分子量が Polysaccharide Ⅱに比較して極めて小さく沈降元となり得ないと報告している。余の成績では Ⅶ 分劃に感作抗原を含んでいることからもし感作抗原が多糖体であるとしたらPolysaccharide Ⅰに感作抗原が存在するのではないかと思う。

結　論

結核症における赤血球凝集反応の感作抗原の化学的本態を検索するために旧ツベルクリンを F.B. Seibert のエタノール分劃法を参考にして7つの分劃に分ち，各分劃を感作抗原として反応を行い，如何なる分劃に感作能があるかを検べた。その結果次のことが結論できる。

1) Ⅳ分劃及び Ⅶ 分劃すなわち PH4.6 エタノール最終濃度 70 %以上で沈澱する分劃に感作抗原の大部分が存在する。

2) 化学的諸反応及びベックマン装置による分析によつてⅣ分劃及びⅦ分劃はいずれも多糖体及び蛋白質を含み Ⅳ 分劃は核蛋白質をも含む。

3) 電気泳動法による分析の結果 Ⅳ 分劃は5つの峯に Ⅶ 分劃は3つの峯に分れる。

4) 「ツ」力価は Ⅳ 分劃の方が遙かに Ⅶ 分劃より強い。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜わりし岡田助教授に深謝す。

文　献

1) G. Middlebrook and R.J. Dubos : J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
2) Scott, N.B. and Smith, D.T. : J. Lab. & Clin. Med., 35, 303. 1950.
3) Rorthbard, S., Dooneief, A. and Hite, K.E. : Proc. Soc. Exp. biol. and Med., 74, 72. 1950.
4) Gernez-Rieux : Bull. Internat. Union against Tbc., 22, 2, 206, 1952.
5) Sigr. Tschudi Madsen et al : Acta Tub. Scand. 27,—3,4,5, 249, 1952.
6) H. Brodhage : Beitr. Klin. Tbk., 107, 6, 494. 1952.
7) 矢追秀武：奈良医学雑誌：2, 3, 1, 1951.
8) 矢追秀武：綜合医学：8, 109, 165, 565, 1951.
9) 矢追秀武：綜合医学：8, 412, 1951.
10) 矢追秀武：綜合医学：9, 39, 1952.
11) 水上美喜雄：北海道医学雑誌：26,12, 390,1951.
12) 丸本　晋：医学, 13, 2, 89, 1952.
13) 吉田　久：小児科臨牀, 5, 5, 1, 1952.
14) 佐藤一男：医療, 6, 6, 35, 1952.
15) 熊谷直秀：日新医学, 38, 8, 481, 1951.
16) 吉田文香他：東京医事新誌, 68, 8, 23, 1951.
17) Smith,D.T. and Scott,N.B. : Am. Rev. Tuberc., 62, 121, 1950.
18) W. Hentdl and G.D. Gilbert : J. of Labor. and Chim. Med., 39, 3, 426, 1952.
19) John. Adcock, Rapheal R., Halvey and Winthrop N. Daney., Ann Arbor Mich. : J. Labor. and Clini : Med., 38, 5, 736,1951.

20) Benjamin Schwartz, et al : Am. Rev. Tuberc., 66, 5, 594. 1952.
21) William M.M. Kirby, James M. Burnell, and Betty O'Learg : Am. Rev. Tuberc., 64, 1, 75, 1951.
22) Seibert, F.B. : Am. Rev. Tuberc., 59. 1,87. 1949.
23) 大林容二：BCG 接種の理論と実際
24) 電気泳動研究会編：電気泳動研究会規定 (1950)
25) Haas : ZbL. Bakter. : 158, 3, 45, 175, 1952.
26) Bull. N.Y. Acad. Med. : 28, 7, 474, 1952.
27) Fisher, S. and Keogh, E.V. : Natur, 165, 248, 1950.
28) 根津尚光：日本細菌学雑誌，7, 5, 477, 1952.
29) 武田徳晴：第 28 回日本結核病学会総会，1953.
30) 岡田藤助：第 27 回日本結核病学会総会，1952.
31) ZbL. Bakter. : 158—3, 4,5, 191,1952 Diskussion zum. Thema Immunbiologie der Tuberkel Bakterien.
32) C.W. Dewett and J.M. Birkeland : Am. Rev. Tuberc., 64, 3, 322, 1951.
33) William L. Gaby Joyce Black, and Amedo Bondi Jr. : Am. Rev. Tuberc. 65, 3, 272, 1952.
34) 進藤宙二：血清反応の新しい見方と考へ方 (1952)
35) 秋葉朝一郎・根津尚光：第 26 回日本細菌学会総会，1953.
36) 武各健二：第 26 回日本細菌学会総会，1953.
37) F.B. Seibert : J. Immunol. 65, 3, 297, 1950.