

トリ型結核菌保存株に関する研究

第2報 産生ツベルクリン蛋白, とくにその型特異性について

神 中 寛・武 谷 健 二

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田教授)

受付 昭和34年7月25日

わが国の諸研究機関に保存されているいわゆるトリ型結核菌の性状に関して、さきに武谷・吉村・山浦¹⁾はこれらの菌の培養性状、フェージ感受性、毒力等を検し、これが本来のトリ型菌の性質を備えたものと、これらとはかなり異なつた性質をもつものとの2群に分かれたることを指摘した。

今回はさらにこの点を明らかにするために、これらの菌から精製ツベルクリン蛋白 π を製し、培養性状と収量との関係、相互間の交叉皮内反応による型特異性を検したので報告する。

実 験

1) 材料および方法

使用菌株:いわゆるトリ型結核菌保存株としてA3717, A71, 獣疫, A62 (B), A62 (C), 竹尾, 獣調, 伝鳥の8株(第1報の成績にもとづいてこれを2群に分ち、前4株をI群、後の4株をII群とよぶこととする)。このほか対照として柏木²⁾によつて多発性結核腫の患者から分離、トリ型菌変異株として報告された松本株、ヒト型菌H37Rvおよび青山B株、非病原性抗酸菌 *Myc. phlei* および *Myc. smegmatis* を使用した。各菌の由来については第1報¹⁾に記載したが、I群が定型的なトリ型結核菌の性状を示すに反し、II群に属する菌は定型的とはいへないものである。

培養:上記の各菌を1,000 cc 三角コルペンに350 cc ずつ分注した変法ソートン培地(アスパラギンの代りに倍量のグルタミン酸ソーダを含む)に浮かべ10週間培養した。

π の精製³⁾:培養期間終了後、菌を培地ごと100°C 30分蒸気釜中で加熱殺菌し、菌体を濾別、菌は別に乾燥秤量した。濾液はpHおよび量を測定後、20%三塩化酢酸溶液を加えて粗蛋白を沈澱せしめた。この沈澱は1/10N NaOHによつて溶解、さらに1/10N HClによる等電点沈澱と1/10N NaOHによる溶解とを5回繰返したのち流水および蒸溜水に対して透析、凍結乾燥した。この最終産物が精製ツベルクリン蛋白 π である。

電気泳動⁴⁾:上記 π について、Antweilerの微量電気泳動装置を用いて電気泳動を行なつた。泳動条件は次

のとおりである。蛋白濃度:約1%, 緩衝液:pH 7.94, M/20の磷酸緩衝液, 温度:23°C, 電流:1.5 mA, 時間:12分。なおMicro-Kjeldahl法によつてN量の測定も行なつた。

交叉皮内反応:体重400g前後のモルモットを選び、上記各菌を用いて型のごとく免疫した。すなわち各菌の10 mg/cc 死菌流ばら浮遊液を作製し、これを1菌株3頭ずつ背部筋肉に0.6 cc 注射、感作を行なつた。感作約1ヵ月後、各株の π をpH 7.0の緩衝生理食塩水に20 γ /cc になるごとく溶解、その0.1 cc すなわち2 γ ずつを背部皮内に注射、生じた発赤および硬結を48時間後に測定、比較した。

2) 結果

培養性状および π の収量:表1にみるごとくトリ型菌のうち、I群の菌株は π の収量少なく、II群の菌はこれに反し前者の10倍以上の収量を示し、濾液のpHは前者で低く、後者で高い傾向を示した。ただし松本株はやや異なつた性状を呈し、非病原性菌の2株はII群に準ずる結果を示した。また菌量は多少 π の収量と関係するごとくであつた。

電気泳動:泳動図と泳動による分析結果を図1および表2に示す。どの標品にあつても、もつとも主要な成分

表1 培養性状と π の収量

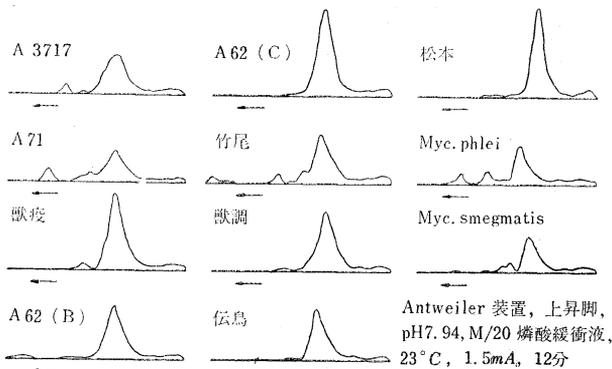
菌 株	集 落	培 地 pH	菌 量 (g/l)	π 収量 (mg/l)
A 3717	S	6.8	7.3	46
A 71	S	6.8	12.0	184
獣 疫	SR	8.4	12.0	144
A 62(B)	R	8.2	8.0	104
A 62(C)	R	7.6	10.4	2,300
竹 尾	R	9.0	7.2	944
獣 調	R	9.6	6.9	1,150
伝 鳥	R	8.2	6.5	2,000
松 本	S	6.8	8.5	234
<i>Myc. phlei</i>	R	8.6	—	1,590
<i>Myc. smegmatis</i>	R	8.4	—	1,404

はC蛋白に相当する易動度 ($-7 \sim -8 \times 10^5 \text{cm}^2/\text{v}\cdot\text{sec}$) をもち、これが主として hc 蛋白であることは明らかである。このほか少量の核酸(または核蛋白)および多糖体成分を含むことは従来の場合³⁾と同様であつた。

表2 各菌株 π の電気泳動分析値

菌 株	電気泳動分析値 %			N% Micro- kjeldahl
	核 酸 核蛋白	蛋 白	多糖体	
A 3717	10.0	79.0	11.0	12.0
A 71	22.4	64.9	12.7	13.4
獸 疫	5.0	85.8	9.2	13.3
A 62(B)	2.8	87.6	9.6	13.5
A 62(C)	<3	88.0	11.0	12.7
竹 尾	8.3	78.2	13.5	14.8
獸 調	5.3	85.5	9.2	13.1
伝 鳥	<3	86.0	11.0	13.0
松 本	2.1	91.3	6.6	
Myc. phlei	24.1	64.5	11.4	14.5
Myc. smegmatis	14.5	75.3	10.2	13.9

図1 各株 π の電気泳動図



交叉皮内反応: 交叉皮内反応の結果を表3, 4に示す。本表にみるごとく, I群すなわち A 3717, A 71, 獸疫および A 62 (B) の4株とII群すなわち A 62 (C), 竹尾, 獸調および伝鳥の4株とは免疫学的に明らかに異なつた性状をもつことが分かつた。なお前者は松本株およびヒト型菌と, 後者は非病原性抗酸菌と近い性状を示し, II群のうち獸調と伝鳥によつて感作した動物は A 62 (C) の π に, A 62 (C) による動物は獸調の π に対する反応がやや弱かつた。

総括ならびに考察

今回の実験は, トリ型結核菌保存株の産生するツベルクリン蛋白 π に関するものであるが, その結果, 定型的なトリ型の性状を示す I 群の菌は π の産生量低く,

それに反し定型的ならざる II 群に属する菌株の産生量は非常に大きいこと, これらの π を使用しての交叉皮内反応によつてこの2群は免疫学的に明らかに異なることが分かつた。

従来トリ型結核菌はヒトあるいはウシ型結核菌と免疫学的に異なつた性質をもつ1群であることが認められている^{5)~7)}。さらに, たとえば Furth⁸⁾ は補体結合反応を, Harpøth⁹⁾ は凝集反応を用いてトリ型菌がさらに亜型に分かたれることをみ, Schaefer¹⁰⁾ はトリ型菌とみなされる94株の菌を補体結合反応により4型に分ち, 1型と2型が典型的なもの, 3型と4型は毒力低く典型的といえないことを報告したが, いずれにしても今回の実験とは観点が異なつていたのでわれわれの観察と一致するかどうかはただちに断定しがたい。

一方高橋および橋本¹¹⁾ はトリ型菌とされている8株の菌について, 培養性状, 薬剤感受性, 毒力等のほか, ツベルクリン特異性をも検し, その結果これらの菌を A, B, C 3群に分ち, A を典型的なトリ型菌, 他を非典型的なものとし, A には Kirchberg 等4株, B に A 62, C としては竹尾等3株をあげ, ツベルクリン特異性については, A 群のツベルクリンは A 群免疫動物にのみ反応するが C 群のツベルクリンにすべての菌による免疫動物によく反応するといつている。

異なつた菌株の産生するツベルクリンを用いて交叉皮内反応をやるためには, 各標品中に含まれるツベルクリン活性物質の量がほぼ等量でなければ意味をなさない。培養濃液中の活性物質すなわちツベルクリン蛋白の量は表1にみるごとく菌株間で非常な差異があるから, 従来旧ツベルクリンあるいは精製しない培養濃液による反応は免疫学的特異性よりも, むしろ濃液中のツベルクリン蛋白の量によつて影響されることが多い, また精製されたものが, おのおの力価を異にする物質でも困るわけであるが, われわれの π は皮内反応活性物質である hc 蛋白を主成分とし, このものの含量も大体等しいので, 交叉皮内反応の抗原としてもつとも適したものであり, 反応の結果もまた信頼をおけるものとしてよい。

その意味から高橋らの報告をみると, A 群の菌はわれわれのいう I 群に, C 群の菌は II 群に相当すると思われるが, ツベルクリン蛋白の産生量は後者が前者の10倍以上にも及ぶものであるから, 蛋白量に無頓着に精製しない濃液で皮内反応を行なえば A 群のツベルクリンが特異性を示すにかかわらず, C 群のツベルクリンでは特異性に関係なくすべての動物に陽性の反応を起こすことは当然である。

表3 各型 π の各型菌感作モルモットに対する力価 (その1)

π	A 3717	A 71	獣疫	A62(B)	A62(C)	竹尾	獣調	伝鳥	青山B
A 3717	12.0(+)	11.5(+)	12.0(+)	11.0(+)	6.0(±)	4.0(-)	9.0(-)	3.5(-)	5.0(-)
A 71	16.3(+)	13.5(+)	12.5(+)	12.5(+)	5.3(±)	4.5(-)	6.0(±)	4.0(-)	5.8(-)
獣疫	11.8(+)	12.3(+)	11.3(+)	10.3(+)	5.5(-)	5.8(-)	7.0(-)	5.3(-)	3.0(-)
A 62(B)	9.5(+)	9.9(+)	9.5(+)	10.2(+)	2.3(-)	4.4(-)	4.4(-)	3.9(-)	6.9(±)
A 62(C)	3.7(-)	3.5(-)	5.0(-)	3.5(-)	9.0(+)	8.9(+)	6.9(±)	6.9(+)	2.7(-)
竹尾	4.9(-)	3.3(-)	2.0(-)	6.0(-)	10.0(+)	10.0(+)	9.0(+)	8.5(+)	3.0(-)
獣調	2.7(-)	3.9(-)	3.0(-)	3.3(-)	2.9(-)	9.7(+)	10.2(+)	8.5(+)	3.5(-)
伝鳥	4.0(-)	3.5(-)	3.0(-)	3.0(-)	3.0(-)	9.2(±)	10.5(+)	9.0(+)	3.3(-)
松本	7.2(±)	7.8(±)	6.7(±)	7.7(+)	3.3(-)	4.7(-)	3.3(-)	6.2(±)	5.4(-)
Myc. phlei	3.5(-)	5.0(-)	3.0(-)	3.5(-)	4.0(-)	7.5(±)	10.5(+)	8.5(±)	3.5(-)
H37Rv	10.2(+)	9.2(+)	9.4(+)	9.2(+)	7.2(±)	8.0(±)	6.8(-)	6.0(±)	18.5(++)

6mg 流パラ死菌にて感作, π 2.0 γ /0.1cc 皮内注射, 48時間後各3匹の平均発赤径(mm), ()内は硬結の程度を示す

表4 各型 π の各型菌感作モルモットに対する力価 (その2)

π	松本	Myc. phlei	Myc. smegmatis	同型菌*
A 3717	9.5(+)	9.0(+)	11.5(+)	17.5(++)
A 71	6.5(±)	8.0(+)	7.0(+)	18.0(++)
獣疫	7.5(±)	9.5(+)	9.0(+)	19.0(-)
A 62(B)	3.0(-)	5.0(-)	5.0(+)	13.0(++)
A 62(C)	2.5(-)	11.0(+)	13.0(++)	10.5(+)
竹尾	3.0(-)	8.0(±)	8.5(±)	11.5(++)
獣調	3.0(-)	10.5(+)	7.5(±)	16.5(++)
伝鳥	3.0(-)	12.0(+)	9.0(±)	15.0(+)
松本	14.0(++)	7.5(±)	9.0(±)	
Myc. phlei	4.0(-)	13.0(+)	7.0(±)	
H37Rv	7.5(-)	8.0(±)	10.5(+)	17.0(++)

*感作に使用した菌より製した π , 6mg 流パラ死菌にて感作, π 2.0 γ /0.1cc, 48時間後各3匹の平均発赤径(mm), ()内は硬結の程度を示す

前に報告したごとく I 群に属する菌は発育比較的小さく、ニワトリに対する病原性が強く典型的なトリ型菌の性状を呈するのみならず、フェージ感受性も低いが、II 群の菌は発育早く R 型コロニーをもち、病原性弱くかつフェージ感受性が高く、むしろ非病原性抗酸菌に似ている。同様なことが今回の実験にもみられ、II 群の菌と非病原性の Myc. phlei, Myc. smegmatis とは免疫学的に近縁の群を形成することが分かった。

また松本株は変異トリ型菌とされてはいるが、免疫学的には両者の中間的な性状をもち、あるいはこの株がいわゆる非定型抗酸菌として分類されるのではないかという暗示を示す。

結 論

われわれはトリ型結核菌として、わが国の諸研究室に保存されている菌のうち A3717, A71, 獣疫, A62(B) (以上 I 群), A62(C), 竹尾, 獣調, 伝鳥 (以上 II 群) の 8 株, このほか対照として数株の菌をえらんでツベルクリン蛋白 π を精製し、その産生状態および交叉皮内反応による免疫学的特異性の検討を行なった。その結果いわゆるトリ型結核菌は免疫学的に上記の I 群および II 群に分かれ、しかもこの群別は他の性質による分類とも一致することが分かった。このうち I 群は典型的なトリ型菌の性質を有するに反し、II 群はトリ型としての性質が稀薄でむしろ非病原性抗酸菌に近いものであった。

戸田教授の御指導と御校閲を深謝します。なお本論文の要旨は昭和 33 年 9 月 日本結核病学会九州地方会総会ならびに昭和 34 年 4 月 日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 武谷・吉村・山浦：九大結研紀要, 6: 81, 昭34.
- 2) 柏木：臨床と研究, 25: 578, 昭23.
- 3) Toda, T., Takeya, K., Tomoyasu, S. & Zinnaka, Y.: Jap. J. Microb., 1959.
- 4) 神中：日本細菌学雑誌, 13: 757, 803, 昭33.
- 5) Green, H.H.: Vet. J., 102: 267, 1946.
- 6) 友安：九大結研紀要, 1: 41, 昭29.
- 7) 戸田・武谷・友安：医学と生物学, 35: 212, 昭30.
- 8) Furth, J.: J. Immunol., 12: 273, 1926.
- 9) Harpøth, H.: Z. Tuberk., 79: 140, 1938.
- 10) Schaefer, W.: Ann. Inst. Past., 58: 388, 1937.
- 11) 高橋・橋本：第31回日本細菌学会総会演説, 昭33.