

肺結核患者血中の結核菌蛋白に対する沈降抗体と補体結合抗体

長尾 四郎・友田 恒典

北野病院研究室
大阪医科大学臨床病理学教室

山内 良澄・馬島 治平・高井 晶子

北野病院

受付 昭和42年9月27日

TITRATION OF PRECIPITINS AND COMPLEMENT FIXING
ACTIVITIES TO TUBERCULOPROTEINS IN PATIENTS
WITH PULMONARY TUBERCULOSIS*Shiro NAGAO, Tsunesuke TOMODA, Yoshizumi YAMAUCHI
Jihei MAJIMA and Akiko TAKAI

(Received for publication September 27, 1967)

The authors titrated precipitins and complement fixing activities to tuberculo-proteins in sera from patients with pulmonary tuberculosis. Cells of human tubercle bacilli (Frankfurt strain) were mechanically disintegrated by the equipment designed by one of the authors. A crude protein fraction extracted from them with minimum denaturation was used as the antigen. Precipitin titration was carried out by the agglutination reaction of antigen-coated collodion particles elaborated by the authors.

Complement fixation performed against the native tuberculo-proteins was of high disease-specificity. No healthy positive reactor to tuberculin had 1/20 or higher titers, while vast majority of 335 tuberculous patients revealed higher titers than 1/20 reaching 1/640 in serious cases. The serological reaction, therefore, was useful in making differential diagnosis of abnormal chest shadows, in speculating prognosis and confirming recovery of pulmonary tuberculosis.

Precipitins to tuberculo-proteins were comparatively scant (1/5~1/20) in hopeless patients suffering from severe disease and in recovered patients as well as in healthy positive reactors. Precipitins were plentiful (1/40~1/160) only in improving patients whose chest shadows were diminishing steady.

It was of interest to notice that excessive production of the precipitins to the mostly noxious bacillary element (tuberculo-proteins) accompanied a favourable clinical condition, whereas low blood concentration of the antibodies occurred in patients running hopeless course. The authors postulated basing on their studies that the precipitins (antiproteins) would be reduced in the circulation of severe patients not only by the paralysis of production but also by increased union with corresponding antigen from active lesion.

* From Kitano Hospital, Kitaku, Osaka, Japan.

緒 言

結核症については、結核菌体の脂糖質に対するものと考えられる Middlebrook-Dubos 反応¹⁾と磷脂質を抗原とする高橋反応²⁾など数種の報告があるが、菌体の蛋白の呈する臨床血清反応はほとんど検索が進められていない。本研究では結核菌体を機械的に破碎し、それから可及的緩和な方法で抽出した蛋白を抗原として、肺結核患者血清内の蛋白に対する沈降抗体と補体結合抗体を測定した成績の概要を報告する。

材料および方法

1) 抗原：人型結核菌(F株)を破碎し、それを原料として抗原を製した。2枚のセルロイド板(レントゲンの古フィルムの被膜をアルカリで除去したもの)に少量の水を加えた乾燥菌塊を挟み、金属板上に固定して、ハンマーで強打を加える装置で菌体の破壊を行なつた³⁾。2gの菌を処理し borate buffer (pH 8.2) 100 ml に投入し一夜冷蔵庫内で抽出した。これに酢酸を加えて pH 4.2 とし 3,000 回転で遠心して菌残渣と蛋白を沈殿した。沈渣を素早く pH 4.2 の acetate buffer で3回洗滌し、borate buffer (pH 8.2) の 100 ml に投入し蛋白を溶解させ 15,000 回転 15 分間遠心して淡黄色を帯びたほぼ透明な上清液を得た。これに phenol を 0.5% に添加したものを数週間冷蔵庫に保存すると培養基上で結核菌の発育がみられなくなるのが常なので、それを確かめて抗原として使用した。われわれの初期の実験ではシャンペランで濾過したものを用いたが⁴⁾、上記のように保存で無菌化されることを知つたので、濾過を省略したのである。マイクロキールダル法によるN測定値をもとにして、既知蛋白濃度液 (0.5 g/dl) に補正して保存した。

2) 補体結合抗体の測定：上記粗製蛋白液は抗補体作用はほとんどなく、3,000 倍くらいの希釈液でも抗原活性があり、補体結合反応の抗原としては優秀なものである⁵⁾。これを抗原として緒方氏梅毒補体結合反応の術式に従い、血清希釈法で被検血清の補体結合抗体の titer を求めた。補体には新鮮モルモット血清を用いた。

3) 沈降抗体の測定：上記蛋白液は抗原活性が強いので沈降反応 (flocculation) でも抗体の titer は測定されるが⁶⁾、Boyden 法⁷⁾によると一層鋭敏に行なわれる。しかし Boyden 法は煩雑なので、われわれは阪東⁸⁾が工夫したコロジオン粒子反応に若干変更を施した術式で、結核菌蛋白に対する沈降抗体の titer を測定することにした。

コロジオン粒子の製法：脱イオン水で洗滌しよく乾燥したニトロセルローズ (片山) の 1.0 g をアセトン 10 ml とアルコール 5.5 ml の混液にとかし、強く攪拌しながらそれに脱イオン水 20 ml を注加し粒子を生ぜしめ

る。綿花で濾過し、濾液に等量の生食を加えて2時間静置する。再び綿花で濾過し、生食で3回洗滌して有機溶媒を除いてコロジオン粒子を集めた。この粒子を 10% 容量比の懸濁液とし、等量の 0.25% のビスマルク褐生食溶液を添加して2日間室温に置き、ついで生食で3回洗滌し 5% の容量比の懸濁液とした⁹⁾。

コロジオン粒子反応：上記菌蛋白液の 10 倍生食希釈液の 1 容に等量の色素処理粒子液 (5%) を混じ 37°C で 2 時間感作し、生食で 3 回洗滌後 4 倍量の生食に懸濁し、phenol を 0.5% に添加し冷蔵庫に保存しておき、用に臨み抗原として使用した。

非動した血清を 1/5 から出発し生食で倍数希釈し、その各 0.5 ml に上記感作粒子液を 1 滴 (0.05 ml) ずつ滴下し、2 時間 37°C で incubate し、その後翌日まで室温に放置し成績を判定した。判定法は Boyden 法と同じく pattern method で下された。すなわち管底に均質な沈降物がみられるものは陰性、皺を生じいわゆる carpet 状の沈降物が現われているものを陽性とした。ただしコロジオン粒子は赤血球より比重は小さい関係上管底の最深部に集積しにくいので、試験管を側下方から眺めて、沈降物の辺縁が鋸歯状な線を描いており carpet 状なることが明らかなものも弱陽性とした。

実験成績

1. 補体結合反応の成績

292 名の肺結核患者、335 名の一般病棟入院患者および 85 名のツ反既陽性の健康者について本反応を行なつたところ、図 1 に示した成績を得た。1/20 以上を陽性とする活動性結核患者はすべて陽性で、健康者はすべて陰性であつた。また本抗体の titer は病勢と並行し、重症患者では 1/320~1/640 に達していた。一般病棟患者のうち、20 名が 1/20 以上であつたので、それらを調査したところ、肺外結核を有するものと肝疾患患者であることが知られた。川上¹⁰⁾は肝疾患では、まれに 1/20 くらいの低い titer の偽反応がみられると報告しているが、本研究でもそれが確かめられた (図 1 の C.F. titer は逆数値)。

2. コロジオン粒子反応の成績

蛋白に対する沈降抗体を肺結核患者、一般病棟入院患者および健康成人合計 286 名について、コロジオン法で測定した結果は表 1 に示すように、補体結合抗体と傾向が異なるものであつた。titer の平均値をみると結核患者は健康者や非結核患者より高いがその差は補体結合抗体よりはるかに少ない。また重篤患者と発病初期の者では明らかに低く、胸部陰影が急速に吸収されつつある者で最も titer が高いということが示された (図 2 参照)。

3. 沈降抗体と補体結合抗体の測定：慢性患者 184 名についてコロジオン粒子法と補体結合反応を行ない、両抗体の titer を比較した。この場合臨床像と抗体の titer

Fig. 1. Percentage of Healthy Positive Reactors, Non-tuberculous Patients and Tuberculous Patients Having Various Complement Fixation Titers

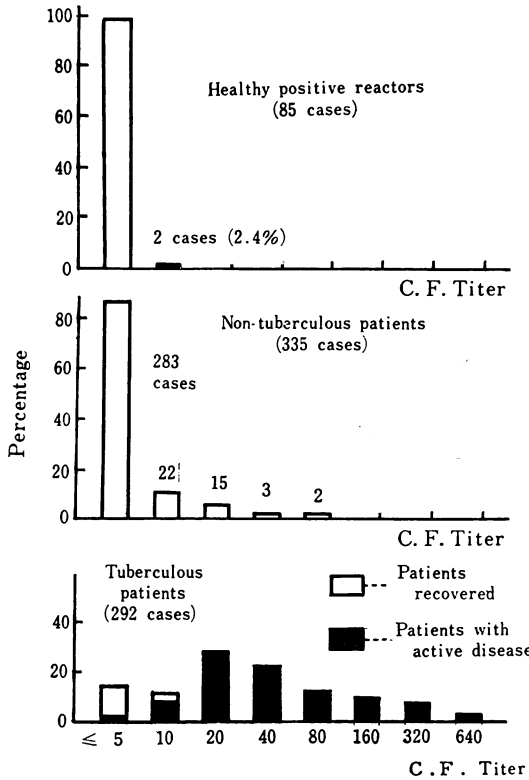
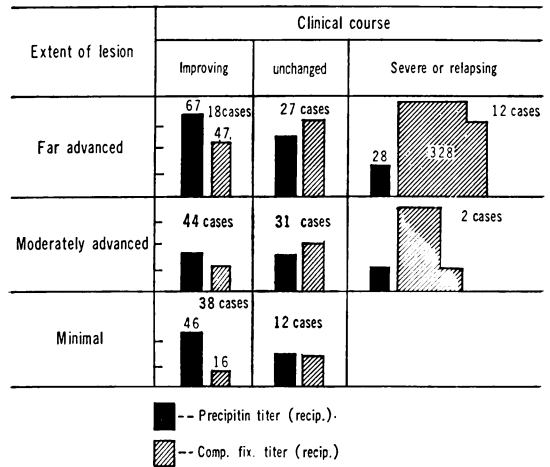


Table 1. Precipitin Titer in Tuberculous and Non-tuberculous Persons

Disease		Case	Average titer
Pulmonary tuberculosis	Onset	23	1/30
	Active disease	176	1/34
	Inactive disease	21	1/13
Non-tuberculous disease	Nephropathy	6	1/8
	Pneumonia	4	1/3
	Hepatopathy	8	1/5
	Diabetes mellitus	6	1/10
	Rheumatic disease	5	1/8
	Carcinoma	3	1/7
	Gastropathy	5	1/8
	Heart disease	4	1/10
Healthy positive reactor		25	1/10

との関連性を検するため、患者を次のように区分してみた。まず病巣の進展度で型のごとく、(1) far advanced, (2) moderate advanced および (3) minimal に分け、各群の症例を病状の経過を参照して、(i) improving, (ii) unchanged および (iii) relapsing or serious の3群に再区分してみた。このように分類すると病巣の拡

Fig. 2. Various Patterns of Precipitin and Complement Fixation Titers Observed in Groups of Patients Classified according to Extent of Lesion and Course of Disease



りと経過の双方が類似した症例が再区分群に揃えられることになる。検査の3カ月前と反応検査時のX線を比較し、学研の基準に従い陰影の吸収が10%以上のものを(i)とし、悪化をみたものおよび病状がきわめて重いものを(iii)に入れ、その他を(ii)に区分した。判定しにくい若干例と発病6カ月以内の患者は除外した。

この再区分群の症例の沈降抗体と補体結合抗体の平均値をとつてみると図2に示すものとなつた(図2のtiterはすべて逆数値)。前者のtiter, すなわち血中濃度は病巣の進展度が大きいほど高い傾向を示すが、そのうちでも改善しつつある患者でことに高いというやや複雑な関係にあることが知られた。後者はこれに反し、病巣の拡がり大きいほどまた経過が不良の者ほどそのtiterは高いという簡単なものであつた。

観察法をかえて、逆に両抗体の出現の具合によつて肺結核患者、非結核患者および健康成人計152名(この観察では急性期の患者も含む)を数群に分類し、その各群の症例の臨床像を調べてみたところ、表2に示したように両抗体のpatternが似かよっている患者では、臨床像も共通したところが多いことが確かめられた。

考 案

本研究ではわれわれが工夫した新しい手技で結核菌体の蛋白の呈する血清反応を患者血清で行ない、2, 3の新知見を得た。新しい手技の第1は抗原の製法である。硬い被膜のためか、結核菌体から蛋白の抽出は緩和な方法では困難で、尿素で抽出したものが抗原として用いられていた¹¹⁾。われわれは菌体を機械的に破砕すると、水抽出法でも多量に蛋白が分離されることを知つた⁴⁾。この蛋白と尿素抽出蛋白とを比較したところ、前者には強い

抗原活性があるのに、後者では辛うじて認められる程度であつた⁴⁾。またこの蛋白は加熱や有機溶媒で変性され抗原活性を失うことが証されてお¹²⁾、結核菌蛋白抗原のすぐれたものが得られなかつたので、その血清学が進められていなかつたのであり、本実験で用いたようないわゆる native な蛋白を使用すると鋭敏な血清反応が行ないことが明らかにされた。結核菌体は数週間にわたる磨砕 (Koch) や長時間の超音波でも破壊されると報じられているが、これらは変性を伴うため有用な蛋白抗原は得られなかつたものである¹³⁾。

われわれは Seibert¹³⁾ の術式に準じて非加熱培養濾液から蛋白を分離してみたところ、破砕菌からのものと化学組成⁴⁾、電気泳動上の性状¹⁴⁾も抗原活性⁴⁾からもほぼ同一なことを発見した。それゆゑ蛋白抗原の材料としては非加熱培養濾液を用いてもよいわけであるが、収量ははるかに多いので菌体から直接分離することにした。なおこれまで血清反応の抗原としてもしばしば利用された濾液蛋白 (PPD) は加熱殺菌した培地から製されるものなので¹⁵⁾、抗原としての価値は低いものであろう。

本研究での新しい手技として、次にコロジオン粒子反応があげられる。しかしこれは優秀なものとしてではなく、便利なものとして採用されたのである。蛋白抗原に対する沈降抗体の測定法としては Boyden 法がすぐれている。コロジオン粒子法と Boyden 法とを比較してみたところ、卵白で免疫した家兎や実験家兎結核症の血清については Boyden 法の titer は高いが結核患者血清では両反応で得られる titer は大差がなかつた¹⁶⁾。そのうえコロジオン粒子法では予製してある感作粒子液を非動血清に滴加するだけの操作で済むが、Boyden 法では綿羊の採血、その血球のタンニン酸処理をはじめとし一連の長時間を要する操作が伴い、また感作血球は調製後 18 時間以内に使用せねばならない。したがって日常検査法としての応用が望みがたい術式を避けて、本研究ではコロジオン粒子法を用いたのである。

なおコロジオン法を主として研究した理由は、粒子の製法を多少変更すると (たとえば色素処理を省略すると) 燐脂体の反応に適した粒子も得られるからでもあつた¹⁷⁾。

本研究の成績で注目すべきことは、重篤な者や悪化している患者では沈降抗体がはなはだしく低水準なことであらう。このことは沈降反応でもすでに認められている

Table 2. Groups of Patients Classified According to Pattern of Precipitins and Complement Fixing Activities

Group	Titer of :		Case	General tendency of clinical status
	Precipitins	Complement fixing activities		
A	$\geq 1/40$	$\geq 1/40$	37	Struggling against advanced disease Symptoms ; manifest Prognosis ; hopeless unless more effective therapy
B		$\leq 1/20$	27	Improving Symptoms ; mild Prognosis ; hopeful
C	$\leq 1/20$	1/640~1/80	9	Being defeated by severe disease Symptoms ; serious Prognosis ; hopeless
		1/80~1/40	5	Onset of disease
D	$\leq 1/20$	1/20~1/10	54	Much improved
		1/10~0	20	Recovered Non-tuberculous patients Healthy positive reactors

ことで⁸⁾、コロジオン反応や Boyden 法にかぎつたことではない。しかしこれまで明らかに指摘されたことがない現象なので奇異な成績と解されやすい。他の細菌性疾患では菌の毒性物に対する沈降抗体が重篤病状にさいして低下することは、肺炎双球菌の菌膜多糖体以外にも少なからず知られているところであり、結核症でも菌の多糖体を抗原とする沈降反応は経過がよい患者で陽性率が高いという報告もある⁸⁾。近時牛の *M. mycoides* 菌による肋膜肺炎の末期では凝集抗体 (菌の表面抗原に対する沈降抗体) は完全に血中から消失し、補体結合抗体のみが極度に上昇することが報ぜられている¹⁹⁾。動物の疾患に関するものであるが、本研究の成績とよく合致するものである。

重篤結核症で蛋白沈降抗体が低くなる本態はわれわれの実験でかなり明白にされた⁹⁾。すなわち家兎に卵白を大量に静注すると、卵白に対する沈降抗体も補体結合抗体も上昇するが、静注を頻回に行なうと前者は急激に減退し始めるが、後者は上昇し続け図 2 に示した重篤患者での両抗体の相互関係と同じものになる。ところが静注を停止すると前者は上昇し後者は降下し、改善期の患者での両抗体の pattern と似たものになる (図 2 参照)。重篤患者で沈降抗体が低水準になることの本態は、過度な免疫を施した動物と同じで、大量の病巣抗原との結合による抗体の消費の増加と²⁰⁾、抗体産生能の疲弊²¹⁾の結果という免疫血清学上の基本的な現象として理解された。

ただ蛋白の血清学の成績を他の結核血清反応の報告と

比べてみると割り切れないところがある。等しく菌体成分に対する沈降抗体の測定法である M. D 反応でも、高橋反応でも重篤患者で低下するとされていないからである。M. D 抗体はおそらく毒性を欠きかつ菌の微量成分(脂糖体)²²⁾に対するものなので、重篤な病状でも、それに対する抗体の産生は疲弊しにくいものと解される²¹⁾。しかし、この抗体でも病巣再燃患者で titer が 0 を示す例もあり²⁹⁾、抗体産生の疲弊が伴うこともあるものと考えられる。他方磷脂質を抗原とする補体結合抗体の titer は重症患者ほど高いことは蛋白の反応と似ているが²⁴⁾、沈降抗体も同じ傾向のものとしてされていることは本研究での蛋白の反応と相違していることになる。破碎結核菌から分離した磷脂質を抗原としてわれわれが沈降抗体を検してみたところ、沈降反応⁶⁾でもコロジオン粒子法²⁵⁾でも、きわめて重篤な患者では低い titer が得られているので、磷脂質に対する沈降抗体も蛋白に対するものと本質的に異なつたものではなさそうに考えられる。

最後に蛋白の反応の臨床意義についてふれる。本研究の結果のように補体結合反応は疾患特異性が高いので、診断的価値がある。実際肺結核と肺癌などの鑑別¹⁰⁾、肋膜炎の予後の判定²⁶⁾に役立つことが報告されている。しかし沈降抗体の測定値にはこのような意味はない。病巣の拡りが大きいのに、本抗体の血中濃度が低いのは不良の徴で、病巣が広くても抗体の titer が高い症例では経過がよいということが本研究で示された。本抗体はすでに論じたように²¹⁾、菌の侵襲に対し発揮されている resistance の強さを示すものと臨床的に考えてよい。Seibert²⁷⁾は結核のごとき複雑な疾患では1つだけ血清反応を検しても意味が乏しいと述べているが、本研究の成績の示唆するところも、蛋白を抗原として沈降抗体と補体結合抗体を同一患者で測定することが host-parasite relationship を理解する新しい有益な資料となるということである。

結 論

破碎した人型結核菌からいわゆる native な蛋白を分離し、それを抗原として肺結核患者血中の沈降抗体と補体結合抗体を測定した。前者はわれわれが工夫したコロジオン粒子反応で行なつた。

沈降抗体は重篤な患者では titer が低く、胸部 X 線陰

影が急速に吸収されつつある者で高かつた。これに反し補体結合抗体は病状が重い患者ほど titer が高かつた。

重篤な患者で沈降抗体が低水準となる本態について論及した。

文 献

- 1) Middlebrook, G. and Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 88 : 521, 1948.
- 2) 高橋義夫 : Am. Rev. Resp. Dis., 85 : 708, 1962.
- 3) 長尾四郎 : Annals Tuberc., 1 : 12, 昭 24.
- 4) 戸田嘉子 : Annals Tuberc., 7 : 1, 昭 30.
- 5) 大屋拳吾他 北野紀要, 11 : 41, 昭 41.
- 6) 馬島治平・有吉浄治 : 北野紀要, 6 : 286, 昭 35.
- 7) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93 : 107, 1951.
- 8) 阪東慶一 : 北野紀要, 7 : 93, 昭 37.
- 9) 長尾四郎・高井晶子・友田恒典 : 北野紀要, 11 : 124, 昭 41.
- 10) 川上良澄・西河直・高井晶子 : 北野紀要, 10 : 158, 昭 40.
- 11) Iland, C. N. et al. : 5th Intern. Congress for Microbiol., p. 20, 1950.
- 12) 長尾四郎・津本洋一・高井晶子 : 北野紀要, 11 : 93, 昭 41.
- 13) Seibert, F. B. : Am. Rev. Tuberc., 49 : 86, 1949.
- 14) 金行広雄・戸田嘉子・山根澄夫 : Annals Tuberc., 7 : 50, 昭 30.
- 15) Seibert, F. B. and Glenn, J. F. : Am. Rev. Tuberc., 44 : 9, 1941.
- 16) 高井晶子 : 北野紀要, 12 : 38, 昭 42.
- 17) 長尾四郎・友田恒典 : 臨床病理, 12 : 613, 昭 39.
- 18) Choucroun, N. Am. Rev. Tuberc., 59 : 710, 1949.
- 19) Turner, W. : Australian Vet. J., August : 401, 1962.
- 20) 友田恒典・長尾四郎 : 胸部疾患, 7 : 1043, 昭 39.
- 21) 長尾四郎・友田恒典・馬島治平 : アレルギー, 15 : 255, 昭 41.
- 22) 積田亨他 : Jap. J. Med. Sci. and Biol., 13 : 131, 昭 34.
- 23) 鈴木秀郎 : 日本臨床, 18 : 2711, 昭 35.
- 24) Wadworth, A. B., Maltaner, E. and Stevens, B. S. : Am. Rev. Tuberc., 22 : 559, 1930.
- 25) 長尾四郎・馬島治平 : 北野紀要, 8 : 110, 昭 37.
- 26) 川上良澄他 : 北野紀要, 10 : 356, 昭 40.
- 27) Seibert, F. B. et al. : Am. Rev. Tuberc., 73 : 547, 1956.