

原 著

結核菌青山B株に対するモノクローナル抗体の作製と
イムノアフィニティー分離抗原の免疫活性について

露 口 隆 一

兵庫医科大学細菌学教室

受付 平成元年6月12日

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS AOYAMA-B AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITY
OF THE AFFINITY-PURIFIED ANTIGENS

Takaichi TSUYUGUCHI *

(Received for publication June 12, 1989)

Nine hybridomas of BALB/c mouse, producing monoclonal antibodies (MAb : MTA 1-9) directed to *Mycobacterium tuberculosis* AOYAMA-B (*M. tbc* AB), were established. The MAbs reacted to *M. tbc* AB antigens, forming a main band of 32 KD, 24 KD or 19 KD on immunoblotting, except MTA 1 that reacted with 58 KD in addition to 32 KD antigen. Immunoglobulin isotypes of MAbs were IgM, IgG 1 or IgG 2b. On a mode of reactivity of ELISA against various mycobacterial antigens, MAbs were divided into two categories : those reacting to human type mycobacterial antigens alone and those reacting both to the human and non-human type. The MAbs could further be classified into 4 groups by subtle discrimination of ELISA reactivity to the antigens. Three kind of MAb-affinity-purified antigens (MAb-Ag) from *M. tbc* AB were obtained. Immunogenic activities of the three MAb-Ags, together with that of control PPDs were examined. Every MAb-Ag showed positive reaction in ELISA, DTH skin test and [³H] TdR incorporation of lymphnode cells, on *M. tbc* AB sensitized rabbit, guinea pig and rat, respectively, with almost equal level of those of PPDs. However, in some occasions, MAb-Ags positively reacted in animals primed by non-human type mycobacteria. It was discussed that whether a homogeneous antigen like MAb-Ag, bearing limited number of epitopes, could be as immunogenic as PPDs consisting of multi-components.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis* AOYAMA-B, Monoclonal antibody, Affinity-purified antigen, Immunological activity, PPDs

キーワード : 結核菌青山B株, モノクローナル抗体, アフィニティー分離抗原, 免疫活性, PPDs

* From the Department of Bacteriology, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo, 663 Japan.

序 論

結核症は発展途上国においては、依然として死因順位の上位を占める重大な感染症であり、日本を含めた先進国においても、高齢人口の増加・癌・臓器移植・人工透析・AIDS等に伴う日和見感染として、難治性非定型抗酸菌症とともにあらたな課題となりつつある。

結核を含む抗酸菌症においては、ツベルクリン (PPDs) による Mantoux 反応に代表される遅延型アレルギー (DTH) の発現消長がその感染の有無、また病態の指標のひとつとされる。また、ツベルクリン自体も、リンパ球刺激等の生物活性物質として研究されている。一方、旧ツベルクリン中の多糖体抗原の Middlebrook-Dubos 反応、結核菌リン脂質抗原の高橋反応などによる患者血清中の抗結核菌抗体の上昇が、活動性結核症の指標に古くから用いられてきた。

近年、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)¹⁾²⁾ や Radioimmunoassay (RIA) などが導入されるようになってから、抗ツベルクリン血清抗体価の臨床的応用が試みられている³⁾。しかし、抗原としてのツベルクリンには次の問題点がある。① ツベルクリンは構造不定なペプチドのランダムな集合である。② 特に皮内反応上、非結核性抗酸菌との交差が指摘されている。③ 病型、病期と必ずしも対応しない。④ BCG 接種と、結核感染がツ反で判別できない。

1983年WHOの結核・呼吸器感染症委員会は、これらの問題に対するアプローチとして、生物工学的手法の発展に伴い、recombinant DNA・免疫担当細胞のクローニング等の導入を勧告した⁴⁾。今回われわれは、抗結核菌モノクローナル抗体の血清学的特異性に対応する単一成分の抗原を、イムノアフィニティーカラムによって分離することを試みた。本研究の目的は、液性免疫上の特異性を指標として得た均質な結核抗原が、細胞性免疫やさまざまな免疫活性の上でどのように反映されるかを標準ツベルクリンと対比しつつ調べることにあるが、本報告では、結核菌青山B株に対するモノクローナル抗体とその対応抗原の性質についての基礎的知見を総括した。

材料および方法

1) 使用菌株；人型結核菌群として、① *Mycobacterium tuberculosis* AOYAMA-B (NIHJ 1635 *M. tbc* AB と略す)、② 同 H37Ra (RIMD 1337)、③ 同 H37Rv (TMC 102)、④ 同 Erdman (ATCC 35801)、⑤ *M. bovis* BCG 日本標準株 (日本 BCG)、⑥ *M. bovis* Ravenel (NIHJ 1607)、⑦ *M. africanum* (TC3, AF1)、病原性非定型抗酸菌群として、⑧ *M. kansasii* (ATCC 12478, *M. kans* と略す)、⑨ *M. intracellulare* (TMC 1406, *M. int* と略す)、⑩ *M.*

scrofulaceum (ATCC 19981)、⑪ *M. fortuitum* (ATCC 14407) 等を用いた。

①、②、⑤の3株は、高橋宏博士(国立予研)より、⑦は斎藤肇博士(島根医科大学)より、それぞれ御恵贈いただいた。いずれも Sauton 培地で、*M. fortuitum* は1週、他は6~8週間培養したものをを用いた。培養後 NaN_3 を1%、強毒菌はフェノール0.5% W/V を添加、48時間以上室温に置き、強毒菌はさらに60°C 30分処理した。いずれも小川培地で生き残り菌のないことを確認後、凍結保存した。

2) 抗原の調製ならびに対照抗原：すべて菌体の超音波抽出物をもちいたが、*M. tbc* AB については、培養濾液80%硫酸画分(以下 TACF と略称する)をも併せて用いた。対照として PPDs (CIP；*M. tbc* AB 由来試験管内検査用 PPD 抗原、日本 BCG 製)、PPD-B、PPD-Y (それぞれ *M. int* および *M. kans* 由来、田坂博信博士および小林製薬の御好意による)を用いた。

3) 抗血清；家兔免疫血清は、家兔に上記菌体を Freund incomplete adjuvant (FIA) とともに免疫した。また、活動性結核患者血清をヒト抗 *M. tbc* 血清として用いた。いずれも ELISA で力価を測定した。

4) モノクローナル抗体 (MAb) の作製；BALB/c マウス(雌、8週齢)を用い、*M. tbc* AB 200 μg (乾燥死菌)を FIA とともに4週毎に4回繰り返し腹腔内投与し、最終免疫として *M. tbc* AB 50 μg を尾静脈に注入、3日後に脾臓を摘出した。脾細胞と P3-X63-Ag-U1 ミエロマ細胞 (P3U1) を、5:1 の比率に混合し、50% polyethyleneglycol (PEG 1500, Boehringer) で融合させ、HAT 培地で選択、抗体産生細胞群を ELISA 法で検索しつつ限界希釈法でクローニングを行った。得られた抗体産生ハイブリドーマ (10^7 cells 以上)を、プリスタン処理した BALB/c マウス腹腔内に投与し、腹水の50%硫酸画分を以下の実験に供した。

5) MAb の isotype の決定；Mouse Monoclonal Typing Kit (Serotec) による Ouchterlony ゲル内沈降反応によった。

6) ELISA 法；2) 項で挙げた各種抗酸菌由来抗原をそれぞれ蛋白質濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、Poly-L-lysine (Sigma) コーティングをした 96 穴イムノプレート (Nunc) に吸着させ、5% スキムミルクでブロック後、被検一次抗体を作用させた。二次抗体としてペルオキシンダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン (Cappel) を、発色基質として *o*-フェニレンジアミンを用い、490 nm の吸光度を MTP-32 コロナマイクロプレートリーダーで測定した。抗原を加えない対照の吸光度を差し引き、免疫前血清力価の平均+標準偏差 $\times 2$ をカットオフ値として、血清の段階希釈による end point を力価とした。

7) Immunoblotting 法；10~20% ポリアクリルア

ミド・SDSゲルで、前項の各種抗原を60 mA 定電流で1時間泳動後、デュラポアメンブラン (Millipore) へ、ホライズプロット装置 (ATTO) で転写し、5%スキムミルクでブロック後、500~1,000倍希釈一次抗体と反応させた。抗血清または抗体の希釈度はELISA力価に応じて等しくなるよう調節した。二次抗体として、2,000倍希釈ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン (Cappel) を用いた。分子量マーカーとして Pharmacia 製マーカーキット (Phosphorylase b: M. W. 94,000・Albumin: 67,000・Ovalbumin: 43,000・Carbonic anhydrase: 30,000・Trypsin inhibitor: 20,100・ α -Lactalbumin: 14,400) を同時に泳動した。

8) Two-dimensional immunoblotting 法; 永井らの変法 (O' Farrell 原法) に従い、抗原 (TACF) を1次元で等電点電気泳動 (2% Bio-lyte pH 3-10, Bio-Rad 製), 2次元として SDS-PAGE (10% アクリルアミド) を行い、前項と同様にデュラポアメンブランに転写、免疫染色を行った。

9) イムノアフィニティークロマトグラフィーによる MAb 対応抗原の分離; CNBr-activated Sepharose 4B ゲル 1 ml 当たり 10 mg の MAb 画分 (4 項参照) をカップリングさせイムノアフィニティゲルとした。TACF を 30 mM Tris (pH 8.7) buffer で平衡した後 DEAE セファロース CL-6B (12 mm×50 mm) に吸着させ、0.05~0.25 M NaCl の linear gradient 計 40 ml で溶出した。dot blotting で MAb と陽性反応を示すフラクションを集め、同クロマトグラフィーを再度

繰り返した後、陽性画分を 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) と透析置換し、上述のイムノアフィニティゲルに吸着させ、4M urea で溶出させた。陽性画分を 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に対して透析、モルカット 10,000 (Millipore) で 1 mg/ml に濃縮した。

10) イムノアフィニティ分離抗原の性状および生物活性: 皮内反応にはモルモット (雌, 8 週齢), リンパ球刺激試験には Lewis 系ラット (雌, 10 週齢, 200 g) を用い、*M. tbc* AB, *M. kans*, *M. int* 各 200 μ g (乾燥死菌) を FIA とともに四足趾に皮下注入後、20 日目に試験に用いた。(1) 皮内反応; 感作モルモットに各抗原 1~2 μ g/50 μ l を背部に皮内注射し、24 時間後に紅斑径を測定した。(2) リンパ球刺激試験; 以下の細胞培養はすべて 10% FCS・2mM Glutamine 加 RPMI 1640 を用いた。ラットより鼠径部、腋窩部リンパ節 (リンパ球) および脾細胞を単離、 2×10^6 /ml 細胞浮遊液とし、これに各抗原 1~2 μ g/20 μ l を加えて反応させ、37°C・2 日間培養した。その後 0.25 μ Ci 3 H-thymidine (3 H TdR) を加えて培養を続け、18 時間後のリンパ球内取り込みを測定した。すべての反応は 3 匹を一群とし、各々の測定は 3 回の平均をとった。

11) 蛋白質の比色定量; Bio-Rad Protein Assay キット (BIO-RAD) を用い、595 nm の吸光度を測定した。

結 果

1. 抗酸菌菌種の全血清およびモノクローナル抗体による血清学的識別

Table 1-A. ELISA Reaction of Serum of Rabbit Immunized with *M. tbc* AB and of Serum from TB Patient against Mycobacterial Antigens

Mycobacterial antigens	Rabbit anti- <i>M. tbc</i> AB serum			Serum from active pulmonary tuberculosis patient		
	lot 1	lot 2	lot 3	case 1	case 2	case 3
<i>M. tbc</i> AB	++	++	++	++	++	++
<i>M. tbc</i> H37Ra	++	++	+	++	+	+
<i>M. tbc</i> H37Rv	+	+	+	++	+	++
<i>M. tbc</i> Erdman	+	++	++	+	+	+
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+	+	+	+
<i>M. kansasii</i>	+	-	+	+	-	-
<i>M. intracellulare</i>	+	+	-	+	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	-	+	-	+
PPDs	++	+	+	+	+	+
PPD-Y	-	-	-	-	-	-
PPD-B	-	-	-	-	-	-

++, +, -: strong, moderate positive and negative, respectively.

Table 1-B. ELISA Reaction of MAbs Directed to *M. tbc* AB against Mycobacterial Antigens

Mycobacterial antigens	Reactivities of MAbs: MAb code (Isotype)									Poly-Ab ²⁾
	MTA1 (M)	MTA2 ¹⁾ (G1)	MTA3 (G1)	MTA4 (G2b)	MTA5 (G2b)	MTA6 ¹⁾ (G1)	MTA7 (G2b)	MTA8 ¹⁾ (G2b)	MTA9 (G1)	
<i>M. tbc</i> AB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tbc</i> H37Ra	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tbc</i> H37Rv	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tbc</i> Erdman	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. bovis</i> Ravenel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. africanum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. kansasii</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. scrofulaceum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PPDs	-	-	ND ³⁾	ND	ND	-	ND	-	ND	+
PPD-Y	-	-	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	-
PPD-B	-	-	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	-

+, +, -: strong, moderate positive and negative, respectively.

1) used as ligand for affinity chromatography hereafter.

2) anti-*M. tbc* AB rabbit serum.

3) not done.

1) 全菌体抗原(粗抗原)対全血清の反応(ELISA法およびImmunoblotting法):全血清(ここでは家兔免疫血清3ロット, ヒト3症例のみを示す)のレベルでは,粗抗原(超音波抽出,ただし青山B株は培養上清)との反応を見た場合,人型菌グループと非定型菌グループとを識別することは,ELISA (Table 1-A) およびimmunoblotting (Fig. 1) の両方法とも困難であった。一方,全血清とPPDs,-Y,-B,との反応は,人型菌と非定型菌間の血清学的識別はELISA上ある程度可能である(Table 1-A)。しかし,いずれの場合も血清のロット,または症例による変動幅が大きく,安定した結果が得られ難かった。

以上,粗抗原対全血清の反応には限界があり,特定された抗原あるいは特異的な血清を用いることにより,結核症や結核菌の血清学的識別をより安定かつ精密にすることが望まれる。

2) *M. tbc* ABに対するモノクローナル抗体(MAb)の作製:特異抗体を得るべく,*M. tbc* ABに対する9つのハイブリドーマ細胞を得た。これらはいずれも相互に独立した細胞融合実験により得られた。それぞれのクローンとそのMAbをMTA1~9と名づけた(Table 1-B)。Isotypeは,IgMが1種,IgG1が4種,IgG2bが4種であった。各MAbの各菌種抗原に対する反応を,ELISAとimmunoblottingで調べた。

3) 全菌体抗原対MAbの反応(ELISA法):9種のMAbは,各菌種抗原に対するELISA反応とisotypeの組合せから,4つのグループに分類された(Table 1-B)。すなわち,①MTA1(isotype IgM)のように反応の強弱はあるが,人型・非定型を問わず供試したすべての菌株の抗原と反応するもの,②MTA4(IgG2b),MTA6,9(IgG1)のように供試した人型結核菌群とのみ反応をするもの,③MTA2,3(IgG1)のように,供試した人型結核菌群の中でH37RaとRvの2株に対し反応を欠如するもの,④MTA5,7,8(IgG2b)のように,供試した人型結核菌群に加えて*M. kansasii*とも反応を示すもの,以上の4群である。

4) *M. tbc* AB抗原対MAbの反応(Immunoblotting法):*M. tbc* AB抗原(TACF)に対し,一次抗体として抗血清(ポリクローナル抗体)を用いたimmunoblotting (Fig. 1)では多数のbandが出現するが,MAbを用いると, Fig. 1と対照的にその反応する抗原は限られてくる(Fig. 2)。MTA1と反応する抗原は,分子量約58KDと31~35KDの2カ所に分布した(Lane 1)が,MTA2,3に反応する抗原は約24KDの位置に1本(Lane 2, 3),またMTA4-9に対する抗原は(Lane 4, 9)いずれも,約19KDの1本のbandとして見られた。

5) *M. tbc* AB抗原対MAb(MTA6)の二次元電

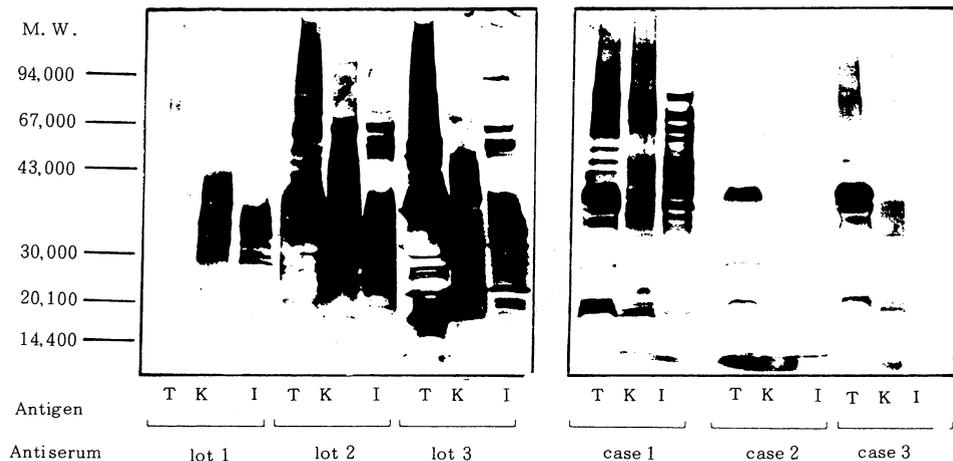


Fig. 1. Immunoblotting analysis of rabbit anti-*M. tuberculosis* AB serum and of TB patient serum against mycobacterial antigens: T; *M. tuberculosis* AB, K; *M. kansasii*, I; *M. intracellulare*. Lanes: lot 1, 2, 3; rabbit anti-*M. tuberculosis* AB serum, case 1, 2, 3; active TB patient serum.

気泳動: MTA 6は, Fig. 2に示したように immunoblotting 上では TACF の 19 KD 部分とのみ反応している。しかし二次元展開の上では MTA 6 と反応する抗原は, M. W. 19 KD-i. e. p. pH 6.5 を主なスポットとし, その周辺に minor なスポット群が散在する。このことは, MTA 6 MAb に対して同じエピトープを持

つ複数のペプチドの存在を意味するのか, あるいは自己融解などのアーティファクトによるものか, 現段階では判定できない。しかし, MAb 対応エピトープに関する限り均質なものと想定して, 以下の実験に供した。

6) 各種全菌体抗原(粗抗原)对各 MAb の反応: 次に, 菌種の鑑別が MAb を用いることにより容易になるか否かをみるため, 各菌種との交差反応を見た。Fig. 4では, 前出の1の3)項の②, ③, ④群に属する MAb より各1種を選び, 「材料と方法」で挙げた 11 種の菌体抗原に対する immunoblotting 上の反応を見た。Fig. 1 と 4 を比較すると, Fig. 4 では, MAb を用いることにより粗抗原に対する反応が 1 本の band として見られ, MAb の方がその対応する抗原部分が限定されてくることが分かる。ただし問題としては, MAb を用いて菌種を識別する場合, immunoblotting と ELISA 法の結果に微妙な差異がある, ということである。まず, Fig. 4 の MTA 2 MAb を用いた反応では, *M. kansasii* を除きすべての菌株との間に反応がみられるが, これを Table 1 の ELISA 法での結果と比べると, *M. tuberculosis* H37Ra, 同 Rv および 4 種の非定型抗酸菌とも反応がみられない点で異なっている。MTA 6 の場合では, ELISA では反応陰性の *M. kansasii* が immunoblotting 上陽性となる食い違いがみられた。MTA 8 の場合は, ELISA と immunoblotting の結果が完全に一致した。

以上の結果から, MAb の各菌種に対する反応性は ELISA と immunoblotting 上では必ずしも一致せず, むしろ後者の方法で交差抗原のレポトリーが広がる傾

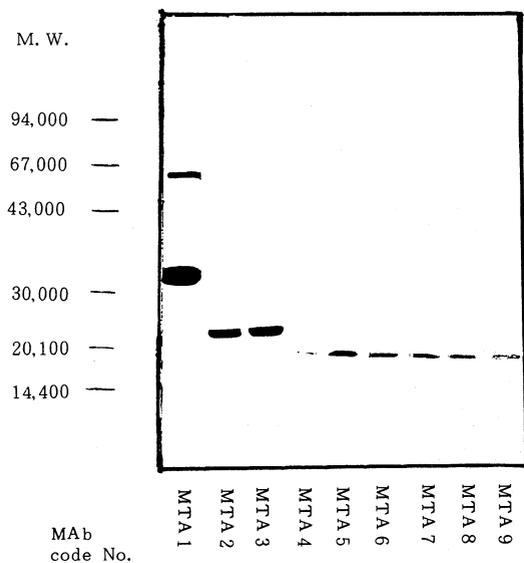


Fig. 2. Immunoblotting analysis of nine MAbs MTA 1-9 against *M. tuberculosis* AB antigen.

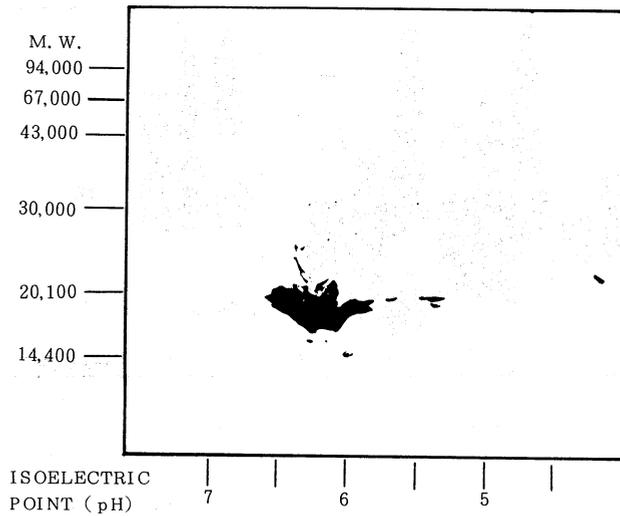


Fig. 3. Two-dimensional immunoblotting of MAb (MTA 6) against *M. tbc* AB antigen: Isoelectric focusing in the first dimension (horizontal), followed by SDS-PAGE in the second (vertical).

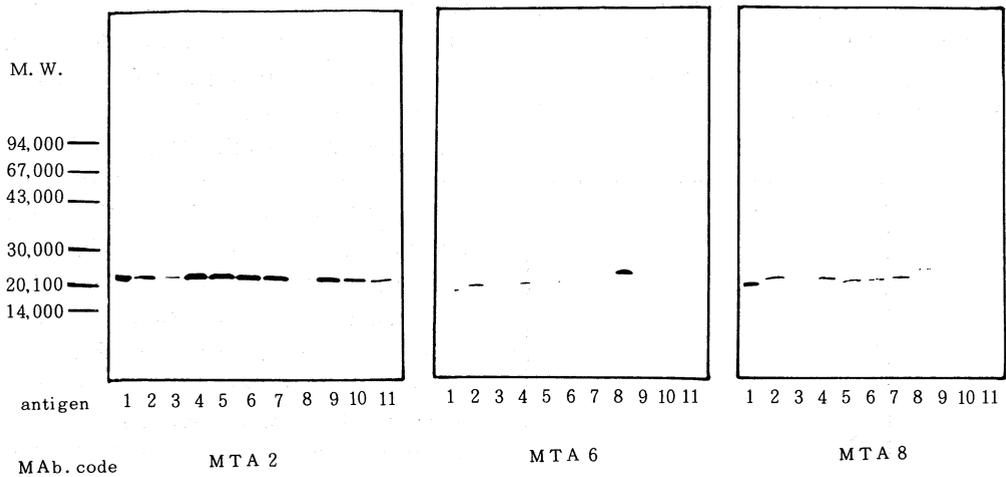


Fig. 4. Immunoblotting analysis of MABs (MTA 2, 6 and 8) against mycobacterial antigens. Lanes: 1; *M. tbc* AB, 2; *M. tbc* H37Ra, 3; *M. tbc* H37Rv, 4; *M. tbc* Erdman, 5; *M. BCG*-Y, 6; *M. bovis* Ravenel, 7; *M. africanum*, 8; *M. kansasii*, 9; *M. intracellulare*, 10; *M. scrofulaceum*, 11; *M. fortuitum*.

向があることが分かった。これは、SDS-PAGE 操作による抗原の変性、隠蔽抗原の露出によることがまず考えられよう。したがって、菌種を判定するためには MAb のみならず、その assay 法も考慮しなければ

ならないことが分かった。

2. アフィニティークロマトグラフィーによる MAb 対応抗原 (MAb-Ag) の分離
MTA 2 (G1), MTA 6 (G1), MTA 8 (G2b) の 3 個

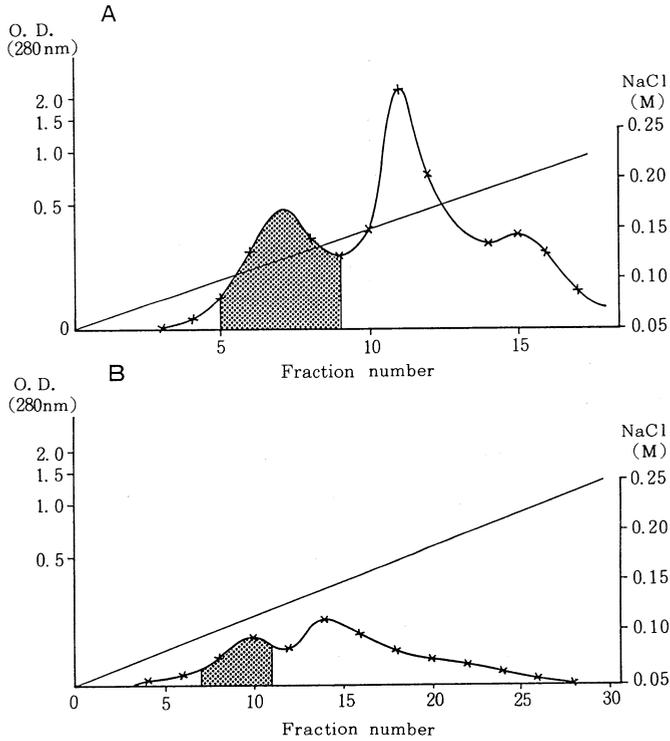


Fig. 5. DEAE-Sepharose 6B column chromatogram of *M. tbc* AB culture filtrate.

The antigen of 5mg as protein was applied on the column (12×50 mm), eluted by total 50 ml of 30 mM Tris-HCl pH 8.7 buffer with linear gradient of NaCl (0.05–0.25 M) and collected 1.5 ml/tube.

As shown in figure A, fractions No. 5 to 9 reacting MAb of MTA 2 (marked with dots) were combined and subjected to second chromatography under the same condition shown in figure B. The dotted fractions No. 7 to 11 were pooled.

の MAb に対する抗原を分離した。これらの MAb は immunoblotting 上、それぞれ 24 KD, 19 KD, 19 KD の抗原と反応した。Fig. 5, 6 では、MAT 2 MAb 対応抗原を例にとって分画の過程を示した。Fig. 5-A, B に示すように、*M. tbc* AB を、DEAE-Sepharose CL6B による分画を 2 回繰り返すことにより、あらかじめ部分精製した。この抗原を MAb (MTA 2) をカップリングさせた Sepharose 4B アフィニティークラムにかけると、Fig. 6 の矢印 (1) に吸着されない部分が流出する。カラムを同上緩衝液で十分に洗浄 (矢印 (2)) した後、4M urea によって矢印 (3) が溶出する。dot blotting 法で 4M urea 溶出画分 (3) に MTA 2 と反応する抗原が検出され、immunoblotting 法では (3) は、

蛋白染色、免疫染色法とも一致する 1 本の band となり (Fig. 6 枠内に示す)、ここで MTA 2 に対応する抗原が一応分離されたものと考えられる。MAb (MTA 2) に対応して分離された抗原を MTA 2a と呼ぶことにする。さらに、同上のアフィニティークロマトグラフィーにより、*M. tbc* AB から MTA 6 に対応する MTA 6a, MTA 8 に対応する MTA 8a の抗原を分離した。これらのアフィニティー分離抗原 MTA 2a, 6a および 8a は、抗 *M. tbc* AB 家兔血清に対する immunoblotting (Fig. 7) で、それぞれ分子量約 24 KD, 19 KD および 19 KD の band を形成し *M. tbc* AB (TACF) 対 MAb immunoblotting (Fig. 2) の結果と一致した。

1) アフィニティー分離抗原 (MAb-Ag) と抗 *M.*

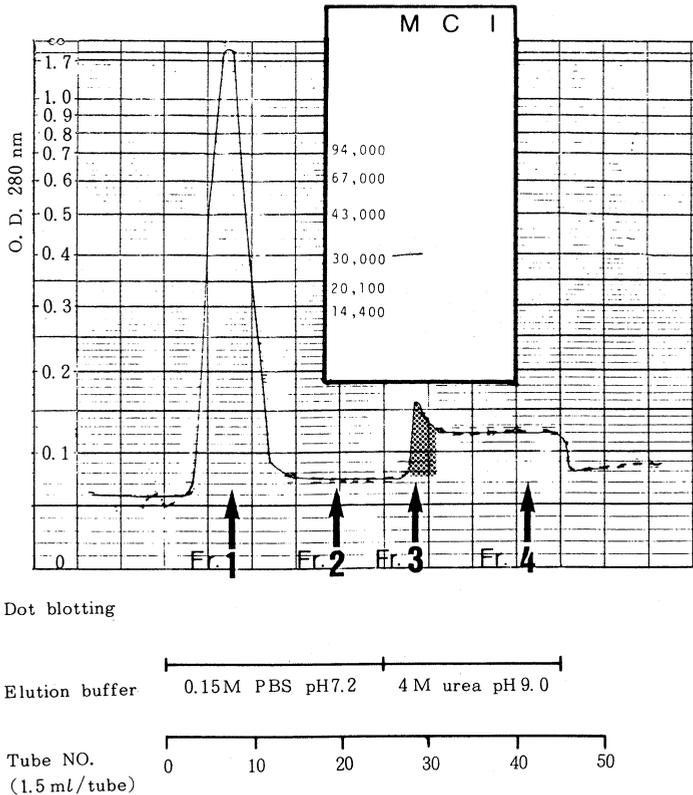


Fig. 6. Immunoaffinity chromatogram of the pooled fractions from 2nd DEAE-Sephrose 6B chromatography (Fig. 5). The ligand of the affinity chromatography was MAb MTA 2. The pooled and concentrated antigen, 10 mg as protein in 1 ml of 0.15M sodium phosphate buffer pH 7.2 with 0.85% NaCl (PBS) were applied to the affinity column of a bed volume of 10 ml. The column was washed with above PBS and eluted with 4.0M urea. Fr. 1; tube No. 12, Fr. 2; tube No. 24, Fr. 3; tube No. 33-36 were pooled (marked with dot), Fr. 4; tube No. 46. The immunoblotting of Fr. 3 is shown in the square on the figure: M; Markers, C; Coomassie Brilliant Blue staining, I; immunostaining with MAb MTA 2.

kans, 抗 *M. int* 家兔血清 (ポリクローナル抗体) との反応 (Fig. 7): *M. tbc* AB, *M. kans*, *M. int* を免疫して得た家兔抗血清 3 ロットずつと, 上記の 3 種の MAb アフィニティークロマトグラフィー分離抗原との反応を ELISA と immunoblotting 上で調べた。両者の結果は平行したので後者の結果のみを示す。アフィニティークロマトグラフィー分離抗原は家兔抗血清に対し 1 本の band しか示さない。しかもホモログな組合せである抗 *M. tbc* AB 血清と

3 種の分離抗原とは強く反応するが, 抗 *M. kans* 血清との反応は弱く, また抗 *M. int* 血清とはまったく反応を示さなかった。

2) アフィニティークロマトグラフィー分離抗原 (MAb-Ag) と各 MAb との反応 (Table 2): MAb-Ag は ELISA では免疫アフィニティークロマトグラフィーのリガンドにそれぞれ対応する MAb とのみ反応した。しかし immunoblotting では, MTA 2a 抗原は対応リガンドの MTA 2 のほか, MTA 3 MAb

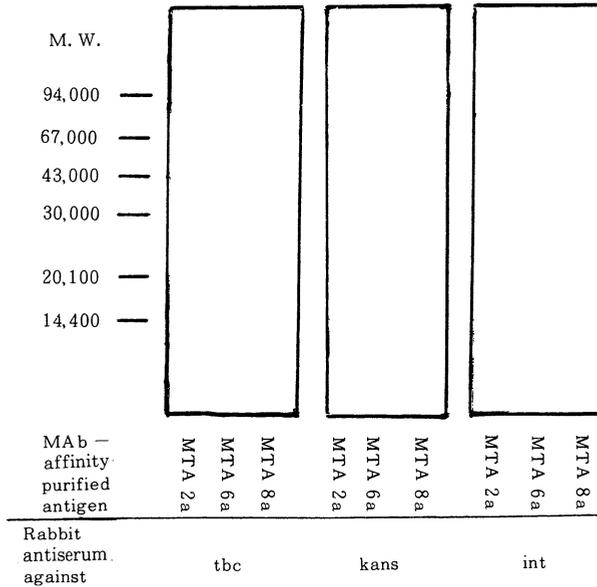


Fig. 7. Immunoblotting analysis of immunoaffinity-purified antigens (MTA 2a, 6a and 8a) with rabbit antisera against *M. tbc* AB (tbc), *M. kansasii* (kans) and *M. intracellulare* (int).

Table 2. Cross Reactivity on Immunoblotting of MAb Affinity-purified Antigens (MAb-Ag; MTA 2a, MTA 6a, MTA 8a) with the Monoclonal Antibodies (MAb; MTA 1-9)

Affinity-antigens	Monoclonal antibodies								
	MTA 1	MTA 2	MTA 3	MTA 4	MTA 5	MTA 6	MTA 7	MTA 8	MTA 9
MTA 2a	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MTA 6a	-	-	-	+	+	+	-	+	+
MTA 8a	-	-	-	+	+	-	+	+	-

+, +, - : strong, moderate positive and negative, respectively.

とも反応した。MTA 6a と MTA 8a は、それぞれの対応 MAb である MTA 6, 8 のほか、MTA 4~9 のいずれの MAb とも、強弱の違いはあるが反応する。すなわち、ここで用いた 3 種の MAb に対応する分離抗原は、イムノアフィニティーのリガンドとして用いた対応 MAb 以外の MAb とも反応することが、Immunoblotting 法の上で分かった。

3. アフィニティー分離抗原 (MAb-Ag) の細胞性免疫活性: 感作動物に対する皮内反応 (DTH), およびリンパ球の [³H] TdR の取り込み (リンパ球増殖試験)

1) モルモットを用いた DTH 型皮内反応: *M. tbc*

AB, *M. kansasii* および *M. intracellulare* でそれぞれ感作したモルモットに、各抗原を惹起抗原として相互に皮内注射する交差試験を行った (Table 3)。

粗抗原を惹起に用いた場合、感作-惹起抗原のホモログな組合せとヘテロな組合せの間に有意の差はみられない。次に今回の分離抗原についてみると、MTA 2a 抗原は、*M. tbc* AB 感作モルモットに対し PPDs に匹敵する強い皮内反応を惹起するが、*M. kansasii* および *M. intracellulare* 感作モルモットの皮内反応は弱かった。この傾向は PPDs による皮内反応にほぼ平行する。MTA 8a は 2a に準じる傾向を示し、特に *M. intracellulare* 感作動物に対する皮内反応は顕著に低かった。MTA 6a では、*M. tbc* の感

Table 3. DTH Skin Reaction of Mycobacterial Antigens and MA b Affinity-purified Antigens in Guinea Pig Primed with *M. tbc* AB, *M. kansasii*, *M. intracellulare*

Stimulants	Diameter (mm) of erythema ¹⁾			
	immunized with			Background
	<i>M. tbc</i>	<i>M. kans</i>	<i>M. int</i>	
<i>M. tbc</i> (2 μg)	11.7 ± 0.8	14.3 ± 1.8	13.7 ± 1.2	1.5 ± 2.1
<i>M. kans</i> (2 μg)	11.0 ± 0.9	14.5 ± 0.0	10.5 ± 0.7	4.8 ± 0.3
<i>M. int</i> (2 μg)	11.3 ± 1.2	13.3 ± 1.1	19.0 ± 0.0	2.8 ± 0.4
PPDs (1 μg)	11.2 ± 1.9	6.8 ± 1.1	6.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0
PPD-Y (1 μg)	8.8 ± 0.8	17.8 ± 0.4	5.8 ± 1.8	2.0 ± 0.0
PPD-B (1 μg)	6.5 ± 3.3	5.0 ± 0.7	13.8 ± 1.8	1.0 ± 1.4
MTA 2a (1 μg)	12.8 ± 0.6	6.5 ± 1.4	5.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0
MTA 6a (1 μg)	8.5 ± 2.5	7.8 ± 0.4	5.3 ± 1.1	0.0 ± 0.0
MTA 8a (1 μg)	9.5 ± 2.8	5.3 ± 0.4	2.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0
Saline	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

1) Diameter of erythema was measured 24hr after challenging the stimulant.

作に対して 2a や 8a よりやや弱い皮内反応を示した。すなわち、3種の分離抗原のうち特に MTA 2a と 8a がモルモットにおいて PPDs に近い DTH 型皮内反応を示すことが分かった。Fig. 8-A に、*M. tbc* AB 感作モルモットに対する、MTA 2a の DTH 型皮内反応、および Fig. 8-B にその角膜反応を示す。

2) リンパ節由来リンパ球に対する抗原刺激反応、³H] TdR の取り込み (Table 4): 感作ラットのリンパ節 (鼠径部・腋窩部) より集めたリンパ球を用いた。3種のアフィニティー分離抗原 (MTA 2a, 6a, 8a) それぞれの刺激に対する、*M. tbc* AB 感作ラット由来リンパ球の ³H] TdR 取り込みは、*M. kans*, *M. int* 感作ラット由来リンパ球よりも高く、モルモットの DTH 型皮内反応よりも抗原特異性が明瞭であった。対照として同時に行った粗抗原や PPDs, PPD-Y, PPD-B 刺激では、³H] TdR の取り込みの上で特異性は明らかでなく、MTA 2a, 6a, 8a に及ばなかった。

3) 脾細胞とリンパ節細胞の抗原刺激に対する ³H] TdR の取り込みの相違: *M. tbc* AB 感作ラットにおいて、各アフィニティー分離抗原 (MTA 2a, 6a, 8a) 刺激に対する脾細胞の ³H] TdR の取り込みは、リンパ節リンパ球の取り込みより顕著に低い傾向がみられた (Table 5)。用いた脾臓およびリンパ節の T・B 細胞の比率 (T/B: 脾臓; 0.5/1, リンパ節; 2.5/1) を考慮に入れると、この分離抗原の抗原刺激が B 細胞より T 細胞に向けられているものと思われる。同様の傾向は、*M. tbc* AB 粗抗原および PPDs においてもみとめられ

た。

考 察

本研究の目的は、*M. tbc* に特異的なモノクローナル抗体 (MAb) を得ること、この MAb に対応する *M. tbc* 菌体抗原 (MAb-Ag) を分画・分離すること、ついで MAb-Ag の免疫活性を調べ、ツベルクリンと比較することにあつた。本邦のツベルクリンは *M. tbc* 青山 B 株に由来するので、本研究では青山 B 株 (*M. tbc* AB) とそれに由来する市販の CIP ツベルクリン (PPDs) を基準とし、対照として非人型菌のうち病原性のある *M. kans*, *M. int* を用いた。

一般に「抗原」は、被感作者について感染原の免疫学的、血清学的判定に用い、「抗血清」は分離された感染原の同定に用いる。結核菌の場合、全菌体抗原や家兔免疫血清、人患者血清は、上述の目的に使用するためには特異性が十分ではなく、MAb および MAb-Ag を用いることにより改善されることが期待された。9種の MAb のうち MTA 4, 6, 9 は、供試 *M. tbc* を含む人型菌と反応し、非人型菌と反応しなかった。したがって MTA 4, 6, 9 は実用の面で、人型菌と非人型菌の血清学的判別や患者材料、病理標本中の結核菌の特異的免疫染色に有用であろう。人型菌内の種を識別する MAb の報告は今までのところ僅かしかない。ここで得られた MTA 2 と 3 は *M. tbc* H37Ra, Rv と反応せず、他の人型菌と反応する点でユニークであり、種間のみならず株間識別の可能性も示唆すると思われる。次に、人型

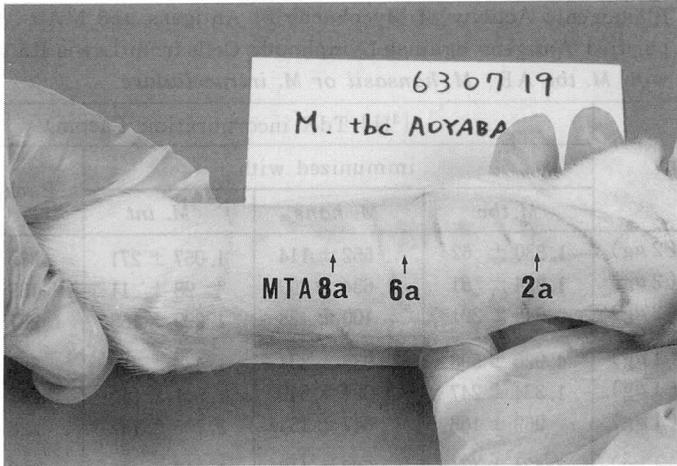


Fig. 8-A. Skin reaction of immunoaffinity-purified antigens in guinea pig primed with *M. tbc* AB. Guinea pigs were given intradermal injection of 1; MTA 2a, 2; MTA 6a, 3; MTA 8a ($1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ of each antigen).

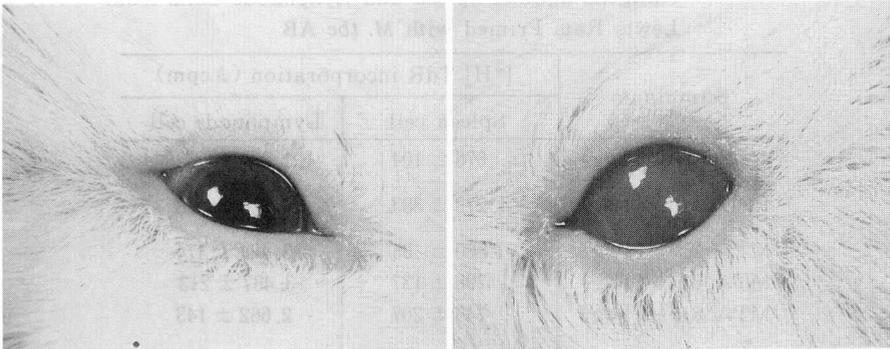


Fig. 8-B. Cornea reaction of immunoaffinity-purified antigens in guinea pig primed with *M. tbc* AB. Guinea pigs were injected intracorneal stroma with A; saline ($10\mu\text{l}$) and B; MTA 2a ($0.2\mu\text{g}/10\mu\text{l}$).

菌と反応する MAb をリガンドとするイムノアフィニティークロマトグラフィーにより MAb 対応抗原 (MAb-Ag) を得たが、さらに次の 2 つの問題を吟味する必要があった。すなわち、

1. *M. tbc* 感作ヒト・動物の血清やリンパ球に対し MAb-Ag は特異的に反応するか、いいかえれば、非人型菌感作例のそれらに MAb-Ag は反応しないか。

2. ツベルクリンは、10-100 KD にわたる多種のペプチド抗原の集合であり、当然免疫反応にあずかるエпитープも雑多である。これに対し MAb-Ag のような

20 KD 程度の均質な蛋白質が、免疫反応の上でツベルクリンに対抗し得るか。

以上の 2 点である。実験結果の一部を抜粋して Table 6 にまとめる。この Table の上で、人型の *M. tbc* に対し、*M. kans* と *M. int* が非人型菌を代表する。Table から、MAb-Ag は血清レベルにおいても細胞性免疫レベルの DTH 皮内反応やリンパ球増殖反応においても、人型菌と非人型菌とをほぼ識別しているといえる。次の段階として、ヒトの結核または非結核菌感染者の血清と末梢血リンパ球に対する MAb-Ag の反応を検索中で

Table 4. Blastogenic Activity of Mycobacterial Antigens and MAb Affinity-purified Antigens against Lymphnode Cells from Lewis Rats Primed with *M. tbc* AB, *M. kansasii* or *M. intracellulare*

Stimulant	[³ H] TdR incorporation (Δcpm)			
	immunized with			Background
	<i>M. tbc</i>	<i>M. kans</i>	<i>M. int</i>	
<i>M. tbc</i> (2 μg)	1,830 ± 62	552 ± 114	1,057 ± 271	389 ± 268
<i>M. kans</i> (2 μg)	1,824 ± 51	1,634 ± 290	98 ± 11	165 ± 20
<i>M. int</i> (2 μg)	545 ± 201	100 ± 38	1,299 ± 158	221 ± 51
PPDs (1 μg)	4,926 ± 598	938 ± 234	1,428 ± 359	402 ± 129
PPD-Y (1 μg)	1,334 ± 247	997 ± 349	1,541 ± 140	242 ± 46
PPD-B (1 μg)	969 ± 168	647 ± 154	2,705 ± 162	228 ± 19
MTA 2a (1 μg)	3,424 ± 474	502 ± 112	1,016 ± 16	290 ± 25
MTA 6a (1 μg)	3,487 ± 213	596 ± 19	1,215 ± 68	696 ± 340
MTA 8a (1 μg)	2,662 ± 143	439 ± 112	1,331 ± 145	298 ± 67
Saline	434 ± 102	141 ± 10	159 ± 13.4	196 ± 59

Table 5. The Blastogenic Activity of MAb Affinity-purified Antigens against Spleen and Lymphnode Cells from Lewis Rats Primed with *M. tbc* AB

Stimulants	[³ H] TdR incorporation (Δcpm)	
	Spleen cell	Lymphnode cell
<i>M. tbc</i> AB (2 μg)	576 ± 104	1,830 ± 62
PPDs (1 μg)	1,272 ± 383	4,926 ± 598
MTA 2a (1 μg)	880 ± 35	3,424 ± 474
MTA 6a (1 μg)	796 ± 137	3,487 ± 213
MTA 8a (1 μg)	745 ± 207	2,662 ± 143
Saline	521 ± 176	434 ± 102

Table 6. Summary of Immunogenicity of MAb Affinity-purified Antigens

Antigens testing for immunogenicity	ELISA/Immunoblot ¹⁾			DTH ²⁾ (skin reaction)			Blastogenic activity of lymphnode cell ³⁾		
	Rabbit antiserum against			guinea pig immunized with			Rat immunized with		
	<i>M. tbc</i>	<i>M. kans</i>	<i>M. int</i>	<i>M. tbc</i>	<i>M. kans</i>	<i>M. int</i>	<i>M. tbc</i>	<i>M. kans</i>	<i>M. int</i>
MTA 2a	+/+	+ / +	- / -	+	+	+	+	-	-
MTA 6a	+/+	- / +	- / -	+	+	+	+	-	-
MTA 8a	+/+	- / +	- / -	+	+	-	+	-	-
PPDs	+ /ND	+ /ND	- /ND	+	+	+	+	-	-

1) + strong positive, + moderate positive, - negative

2) + ≥ 8.0 mm, + 3.0 - 8.0 mm, - ≤ 3.0 mm

3) [³H] TdR incorporation: + ≥ 2,500 Δcpm, - ≤ 1,500 Δcpm

あり、別に報告する。

一般に、液性抗体の抗原認識の特異性と細胞性のそれとは、必ずしも同質ではない。そのため、細胞性免疫にあずかる抗原エピトープの検索にT-cell クローン側からのアプローチが試みられている⁵⁾。今回は、B-cell クローン側の特異性を指標にして得た均質な蛋白質が細胞性免疫の特異性とおよそ合致したが、これが常態であるとはいえない。MAb-Agのような均質な抗原といえども、Table 2に示すように、複数のMAbと反応すること、すなわち複数のエピトープを持つ可能性がある。しかし、この点を考慮に入れても、MAb-Agがはるかに多数の抗原集合体であるPPDsに、免疫反応惹起の上で匹敵したことは興味深く、PPDsに特有の反応を特異性の高い1個または少数の抗原で代替し得る可能性を示すものと思われる。今回得たMAbは、ツベルクリンとは直接反応しなかったが、その理由の1つとして、PPDsが加熱処理を経ているのに対し、われわれの使用した抗原は非加熱である、ということが考えられる。しかし、さらに多くのMAbについて検索すれば、その中にPPDsと反応するものが得られるかもしれない。一方で、MAT 5, 7, 8は、抗PPDs家兎抗血清と反応するリコンビナントペプチドと反応しているの⁶⁾、PPDと起源を同じくする抗原群に属するとも考えられる。なお、PPDsを免疫原とする抗PPDs抗体の誘導は家兎では認められたが、BALB/cマウスでは十分な抗体上昇に至らなかった。

現在までに、結核・らい菌を含め、抗酸菌の血清学的識別を目的としたMAb産生株の蒐集が欧米を中心に精力的に行われ、主なものはWHOに登録保存されている⁷⁾。しかし、人型、非人型結核菌を問わず、多種の抗酸菌種の血清学的鑑別には今なお十分とはいえず、さらに株間の差異を示すに足るMAbにいたっては、ほとんど得られていない。他のグループで得られたMAbは大別して、Ivanyら⁸⁾⁹⁾のTB 77, TB 73, Leeuwenら¹⁰⁾のF 29-29, F 23-4, -30, Bennedsenら¹¹⁾¹²⁾のHYT 4などのように、人型・非定型を通して多くの抗酸菌種と交差反応を示すものと、TB 68, 71, 78, F 23-49, F 24-2, HYT 28, Chaparasら¹³⁾のHGT 4などのように、人型結核菌群とは反応するがその他の非定型抗酸菌とは反応を示さないもの、の2群に大別される。私たちのMTA 1は前者に属し、MTA 2・3・4・6・9は後者に属する。いずれにせよさらに多くの抗酸菌MAbの蒐集が望まれている。

次に、これらのMAbに対応する抗原をイムノアフィニティーによって精製する試みについては、Kadival¹⁴⁾・Worsaae¹⁵⁾・Young¹⁶⁾らの報告がある。このようなMAb対応抗原について、感作動物を用いた皮内反応およびリンパ球活性化反応が検討されているが、従来の

PPDsに代替するまでに至っていない。なお、MTA 2・3, MTA 6・9, MTA 5・7の組合せは、独立した系で得られたにもかかわらずそれぞれisotype、菌種特異性、分子量の上で近似するが、異同の判定はcompetition実験をまたねばならない。Woodら¹⁷⁾は彼らの得たいくつかの独立したMAbのエピトープが同一であったことを報告している。このほか、異なるグループで得たMAbが、等しいという報告もある⁷⁾。また、リコンビナントペプチドの場合も、理論上の確率は極めて低いにもかかわらず、しばしば同一のペプチドが異なるグループによって得られている。このことは、特定の結核菌抗原がimmunodominantであると仮定することによって説明されている¹⁸⁾。したがって、私たちの場合も独立に同じMAbが得られていても不思議ではない。

結核菌体蛋白抗原や活性ペプチドについては、Okada¹⁹⁾やKuwabara²⁰⁾(Tuberculin-active peptide or protein)・Nagai²¹⁾(TPH 71)・Daniel²²⁾(Antigen 5)・Fukui²³⁾、Tasaka²⁴⁾(α , β Antigen)らにより、蛋白化学的手法で、さまざまな抗原の分画精製が行われてきた。これに対し、上述のMAbやクローン化T-cell エピトープを指標にした抗原分離⁵⁾や、遺伝子工学的手法²⁵⁾が近年試みられるようになってきている。これらの方法は、特異エピトープを直接めざす点で有望と思われるが、結核菌の菌体構成は非常に複雑であるため、さらに多くの試みがなされなければならないであろう。

謝 辞

本稿について、次の諸先生方の御指導と御援助を賜ったことをここに記し、謝意を表します。兵庫医大細菌学教室・医動物免疫学教室・第4内科学教室・露口泉夫博士(府立羽曳野病院)・喜多舒彦博士(国療近畿中央病院)・桜井 宏博士(結核予防会大阪病院)・永井定助教授(大阪市大医学部)・堀三津夫名誉教授(結核予防会大阪支部)

文 献

- 1) Zeiss, C. R., Kalish, S. B., Erlich, K. S. et al. : IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Am Rev Resp dis*, 130 : 845-848, 1984.
- 2) 山本節子, 田端一彦, 戸井田一郎他 : 結核症及び非定型抗酸菌症患者の特異的抗体価の測定, *結核*, 61 : 549~557, 1986.
- 3) Zeiss, C. R., Radin, R. C., Williams, J. E. et al. : Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients

- with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 15 : 93-96, 1982.
- 4) Plan of action for research in the immunology of tuberculosis : Memorandum from a WHO Meeting, *Bull WHO* 61 (5) : 779-785, 1983.
 - 5) Oftung, F., Young, R. A., Godal, T. et al. : Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli*, *J Immunol*, 138 : 927-931, 1987.
 - 6) 露口隆一, 田中公子, 田村俊秀 : 未発表
 - 7) Engers, H. D., Houba, V., Bennedsen, J. et al. : Results of a World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium-specific* monoclonal antibodies, *Infect Immun*, 51 : 718-720, 1986.
 - 8) Coates, A. R. M., Hewitt, J., Allen, B. W. et al. : Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies, *Lancet*, 25 : 167-169, 1981.
 - 9) Hewitt, J., Coates, A. R. M., Mitchison, D. A. et al. : The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis, *J Immunol Method*, 55 : 205-211, 1982.
 - 10) Kolk, A. H., Ho, M., Klatser, P. R. et al. : Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (BCG) and *M. leprae*, *Clin Exp Immunol*, 58 : 511-521, 1984.
 - 11) Schou, C. Yuan, Z. L., Andersen, A. B. et al. : Production and partial characterization of monoclonal hybridoma antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect. C*, 93 : 265-272, 1985.
 - 12) Andersen, A. B., Yuan, Z. L., Haslov, K. et al. : Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 23 : 446-451, 1986.
 - 13) Kadival, G. V., Chaparas, S. D. : Production, characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*, 25 : 76-80, 1987.
 - 14) Kadival, G. V., Chaparas, S. D., Hussong, D. : Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Immunol*, 139 : 2447-2451, 1987.
 - 15) Worsaae, A., Ljungqvist, L., Heron, I. et al. : Allergenic and blastogenic reactivity of three antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in sensitized guinea pigs, *Infect Immun*, 55 : 2922-2927, 1987.
 - 16) Young, D., Kent, L., Rees, A. et al. : Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun*, 54 : 177-183, 1986.
 - 17) Wood, P. R., Ripper, J., Radford, A. J. et al. : Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*, *J Gen Microbiol*, 134 : 2599-2604, 1988.
 - 18) Young, D. B., Ivanyi, J., Cox, J. H. et al. : The 65 kDa antigen of mycobacteria common bacterial protein ?, *Immunol Today*, 8 : 215-219, 1987.
 - 19) Okada, Y., Morisawa, S., Shojima, K. et al. : Improved method for the isolation and properties of tuberculin active peptides, *J Biochem*, 54 : 484-490, 1963.
 - 20) Kuwabara, S. : Purification and properties of tuberculin-active protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biol Chem*, 250 : 2556-2562, 1975.
 - 21) Nagai, S., Nagasuga, T., Matsumoto, J. : Tuberculin peptide from culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Res Dis*, 121 : 551-557, 1980.
 - 22) Daniel, T. M., Anderson, P. A. : The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5, *Am Rev Res Dis*, 117 : 533-539, 1978.
 - 23) Fukui, Y., Hirai, T., Uchida, T. et al. : Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. α and β antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H37Rv) of *Mycobacterium tuber-*

- culosis*, Biken's J, 8 : 189-199, 1965.
- 24) Tasaka, H., Kiyotani, K., Matsumoto, Y. : Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, Hiroshima J Med Sci, 32 : 1-8, 1983.
- 25) Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M. et al. : Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA, Proc Natl Acad Sci USA, 82 : 2583, 1985.