原　著

抗結核菌モノクローナル抗体アフィニティー精製抗原に対する肺結核症の免疫応答

露口隆一

兵庫医科大学細菌学教室

受付　平成元年12月18日

IMMUNOREACTIVITY OF PULMONARY TUBERCUROSIS PATIENTS TO TUBERCULOUS ANTIGENS PURIFIED BY AFFINITY COLUMUS COUPLED WITH MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Takaichi TSUYUGUCHI *

(Received for publication December 18, 1989)

Immunoaffinity–purified antigens (MAb–Ags) of *Mycobacterium tuberculosis,* which had been obtained in a previous study by use of anti–*M. tuberculosis* monoclonal antibodies and designated MTA 2a (24kD), MTA 6a (19kD) and MTA 8a (19kD), were examined for their antigenicity by determining the responsiveness to these antigens of pulumonary tuberculosis (TB) patients and non–tuberculous controls. Serum anti–MAb–Ags ELISA antibody levels in TB patients were significantly higher than those in non–tuberculosis controls, including patients with atypical mycobacterial infection and Mantoux–test–positive healthy individuals. MAb–Ags stimulated proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL) from TB patients as determined by ^{3}H–thymidine uptake of PBL. MAb–Ags also stimulated PBL from TB patients to increase T4/T8 ratio and Ia–positive T cells. After stimulation with MAb–Ags, increse of IL–2 receptor–positive T cells in PBL from TB patients was not significantly higher than that in PBL from healthy persons. Responses of PBL from non–tuberculosis controls to MAb–Ags varied considerably, and the response was either none or weak, in some cases, or as high as that of PBL from TB patients, in the other cases. In general, MAb–Ags stimulated PBL from TB patients and some of Mantoux test–positive persons to almost the same extent as PPDs did.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis* AOYAMA–B, Monoclonal antibody–affinty –purified antigen, Pulmonaly tuberculosis, ELISA antibody titer, Flowcytometric analysis of PBL

キーワーズ：結核菌青山B株，アフィニティー分離抗原，肺結核症，エライサ抗体価，フローサイトメトリーによる末梢血の分析

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

序論

わが国を始め先進国の結核症には，例えば老人性結核にみられる難治性結核の増加，あるいは免疫不全に伴う合併症としての結核のように病像が多様化する傾向にある。これに伴いツベルクリンによるMantoux反応を補塡すべく，さまざまな免疫診断クライテリアの導入が検討され始めている。ここで問題となるのは，従来のツベルクリン（PPDs）が多数のペプチドを主とする抗原の不規則な集合であり，いまだ主なアクティブサイトが確定されていないことである。

われわれは前報[1]において，結核菌に対するマウスモノクローナル抗体（MAb）9種を作製，その中より人型結核菌群に特異的なもの3種を選び，それぞれに対応する抗原（MAb–Ag）をイムノアフィニティーにより得，小動物実験の上でこれらのMAb–Agは，PPDsにほぼ匹敵する抗原性を持つことを報告した。今回は結核症患者症例について，これら3種のMAb–Agの抗原性をPPDsを対照として，これら抗原に対する患者の血清抗体価，末梢血ンパ球のこれら抗原刺激に対する反応性などの面から検討した。

方法

1．対　象

結核症（TB）患者20例，非定型抗酸菌症患者5例，健常者14例（ツベルクリン反応〔ツ反〕陽性者6例，陰性者8例），年齢は24〜60歳（平均50歳）にわたる。なお，PPDsに対するELISA抗体測定にのみ臍帯血16例，新生児8例の血清も用いた。結核患者は年齢60歳以下，最終排菌より3カ月以内ツ反陽性，また重篤な合併症のない者に限った。

2．抗結核菌MAb；

前報[1]で得たものを用いた。略述すると，BALB/cマウスを結核菌青山B株（*M. tbc* AB）乾燥死菌をFreund incomplate adjuvantに加えたもので免疫，免疫マウスの脾細胞をP3×63–Ag 8–Ul ミエローマ細胞とポリエチレングリコール法で融合しハイブリドーマを作製，ELISA法により抗結核菌抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。抗体産生ハイブリドーマを4回のリクローニング後，プリスタン処理マウスにi. p. 注射，それらのマウスの腹水を50％硫安沈殿分画してMAbとした。このうち，MTA2 (Ig Gl)，6 (Ig,Gl)，8 (Ig G2b) を次のイムノアフィニティーによる抗原の分離に用いた。

3．イムノアフィニティーにより分離した抗原；

前報[1]で得たものを用いた。略述すると*M. tbc* AB培養濾液80％硫安画分（TACF）をDEAEセファロースCL6Bで2回分画してMAbと反応する画分を集め，これを各MAb (MTA 2, 6, 8) をカップリングさせたCNBr–activated Sepharose 4Bカラムにかけ，それぞれのMAbに対応する抗原（MTA 2a, 6a, 8a）を得た。MTA 2a, 6a, 8aはそれぞれ分子量24, 19, 19 kDの均質なbandとなることをPAGE上確認した(以後アフィニティー抗原またはMAb–Agと略称する)。対照抗原として，PPDs (CIP；*M. tbc* AB由来検査用PPD抗原，日本BCG社）および前述のTACFを用いた。

4．ELISA法；

前報[1]と大略同じ方法で行った。上述の各抗原をそれぞれ蛋白質濃度5 $\mu g/ml$で，COBIND 96穴マイクロタイタープレート（Micro Membrans）に吸着させ，1％ウシ血清アルブミン加燐酸緩衝食塩水（PBS）でブロック後，被検一次血清を作用させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒトイムノグロブリン血清(Cappel）を，発色基質として*o*–フェニレンジアミンを用い，反応後の492 nm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。

5．ヒト末梢血リンパ球（PBL）の分離；

被検者のヘパリン加末梢血10〜20 mlよりFicol–Hypaque沈降法で単核細胞層を分離，RPMI–1640で3回洗浄後，PBLとして以下の実験に用いた。

6．リンパ球増殖反応，[^{3}H]–thymidine ([^{3}H] TdR）取り込み；

以下の細胞培養は，すべて10％非働化ヒト（血液型AB）プール血清と2 mM glutamineを加えたRPMI–1640を用いた。分離した被検PBL $1\times10^6/ml$に各種抗原0.05〜50 $\mu g/ml$を加えて6日間培養後，0.25 μ Ci [^{3}H] TdRを加え，18時間後のリンパ球内[^{3}H] TdR取り込みを測定した。各々の測定値は，triplicateの平均をとった。

7．フローサイトメトリーによるリンパ球表面抗原の解析；

基本的にはShiratsuchiらの方法によった[2)3)]。分離したPBL $2\times10^6/ml$と各種抗原50 $\mu g/ml$とを，24穴プレート（Falcon）の各ウエルにそれぞれ1 mlずつ入れて6日間培養した。培養後リンパ球に次の標識抗体を作用させた。すなわち，① fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗Leu 3aおよびphycoerythrin (PE) 標識抗Leu 2aマウスMAb，② FITC標識抗Leu 4およびPE標識抗HLA DRマウスMAb，あるいは，③ FITC標識抗IL–2レセプター（IL2R）マウスMAb。各MAb (Becton–Dickinson，藤沢）を各々20 μl加え，30分間冷暗所においた後，PBS（2％ウシ胎児血清，0.1％ NaN_3加）で2回洗浄して測定用サンプルとし，FACS–analyzer (Becton–Dickinson，藤沢）で細胞表面抗原の解析を行った。図1に示

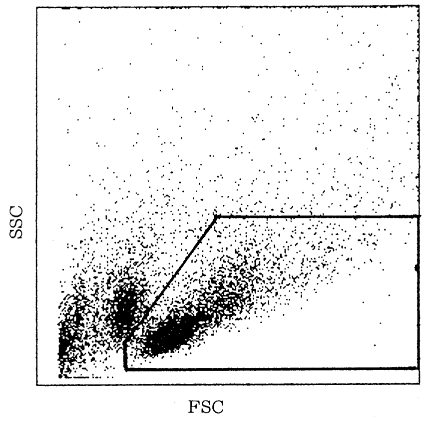

図1　PPDs存在下培養後サイドグラム上の設定領域（培養6日後）

SSC: Side Scatter（細胞内部構造の複雑さ）
FSC: Forward Scatter（細胞の大きさ）
枠内を拡大リンパ球領域に設定した。

すような拡大リンパ球領域にゲートを設定し，FITCおよびPE蛍光陽性細胞の百分率を算出した。

結　　果

1．ELISA法による血清抗体価（図2）；

結核患者，非定型抗酸菌症患者および健常コントロール群のELISA法における抗PPDs，抗TACF，抗アフィニティー抗原（MTA 2a, 6a, 8a）抗体価の分布を図2に示した。各々，血清1,000倍希釈におけるELISA吸光度（O. D. 492 nm）を示す。結核患者群はいずれの抗原に対しても，非結核対照群よりも有意に高い抗体価を示した（$P<0.01$）。非結核対照群ではツ反陰性，陽性にかかわりなくすべてが低い抗体価を示した。そして注目すべきこととして，PPDsに対して最も低値の抗体価を示したのは予想に反し，臍帯血ではなくて1歳未満の新生児血清であった。総じて，各アフィニティー抗原はPPDsとほぼ等しい抗原性を示し結核患者血清とのみ有意に反応し，対照群とはツ反陽性者血清といえども反応していないことは注目される。

次にいくつかの症例について抗原の違いによる種々血清希釈におけるELISA抗体価のkineticsの相違を示す。図3-(a)(b)(c)は結核症患者，図3-(d)はツ反陽性健常人である。結核患者血清では多くの症例において，図3-(a)(b)のように，抗PPDs，抗TACF抗体価の著明な上昇とそれにほぼ平行した抗アフィニティー抗原（MTA 2a, 6a, 8a）抗体価の上昇がみられたが，図3-(c)は抗PPDs，抗TACF抗体価よりも抗アフィニティー抗原抗体価が明らかに低値を示した例である。図3-(d)は，ツ反陽性（健常人）であるにもかかわらず，すべての抗原に対する抗体価は低値を示している。

2．アフィニティー抗原刺激によるPBL増殖反応；

表1に示すように，ツ反陽性者および結核患者のPBL

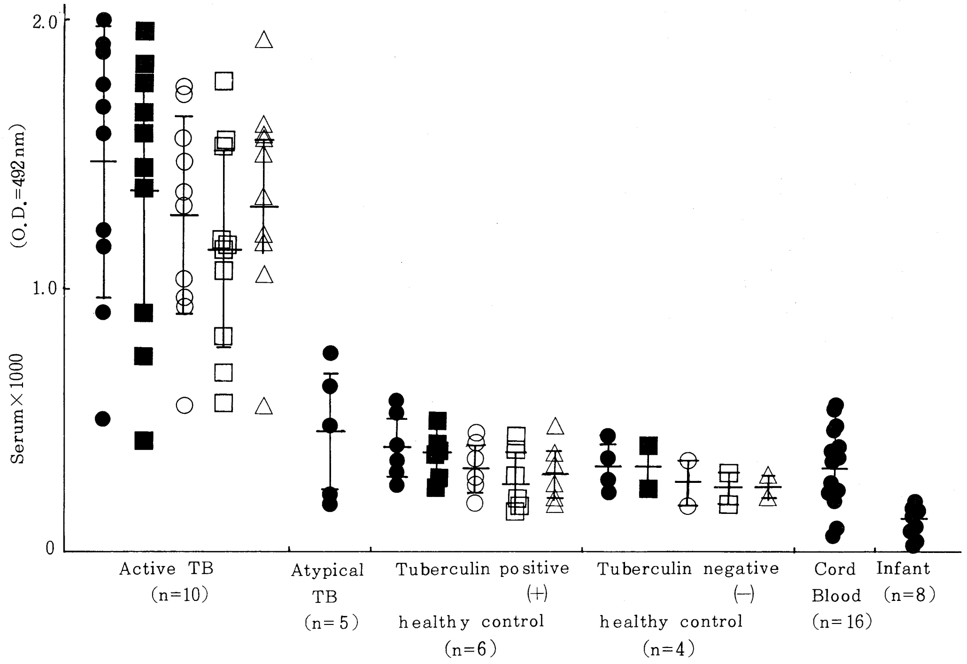

図2　ヒト血清の結核菌由来各種被検抗原に対するELISA抗体価
○：MTA 2a，□：MTA 6a，△：MTA 8a，
●：PPDs，　■：TACF

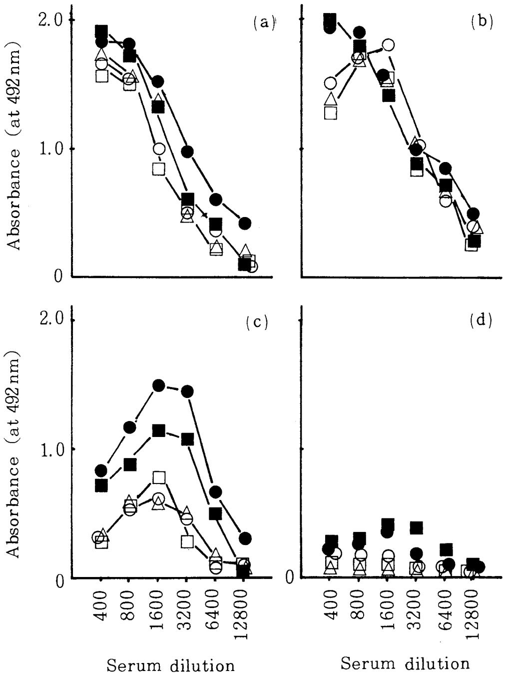

図3　ヒト血清の結核菌由来各種被検抗原に対する抗体価（血清希釈による kinetics）
(a)(b)(c)：結核患者，(d)：ツベルクリン反応陽性常人
○：MTA 2a，□：MTA 6a，△：MTA 8a，
●：PPDs，■：TACF

はいずれの抗原刺激に対しても［^{3}H］TdR の取り込みの上で顕著な増殖反応を示した。また，抗原間に抗原刺激の面で有意の差を認めなかった。平均値の上ではアフィニティー抗原は単独でも，あるいは3種混合した場合でも惹起した PBL の増殖反応（cpm 値）は PPDs に対する反応（cpm 値）の 1/2〜2/3 程度であったが，両者間に統計上の有意差は認められなかった。

ここで問題となるのはツ反陰性者 PBL の増殖反応であり，［^{3}H］TdR 取り込みが結核患者に匹敵するほど高い「high responder」とその 1/10 以下の「low responder」の2群が認められた。両群は PBL 採取時において健常であったが，各々年齢，性，既往において完全に等しいわけではないので，表1では両群の結果を分けて記載した。これによると high responder の［^{3}H］TdR 取り込みはツ反陰性にもかかわらず，ツ反陽性健常人，結核患者とほとんど等しい。

代表的な症例について，抗原希釈に対応する PBL の［^{3}H］TdR 取り込みの kinetics を図示する。図4はツ反陽性健常人例，図5および図6(a)(b)は結核患者，図6(c)(d)は非定型抗酸菌（*M. int*）症患者の PBL についての結果である。図の上で一般にアフィニティー抗原は PPDs または TACF とほぼ平行する［^{3}H］TdR 取り込みの kinetics を示しているが，図4(a)の MTA 2a，図6(a)の MTA 群のように，PPDs と［^{3}H］TdR 取り込みの kinetics で完全には平行しない例がある。図6(b)はツ反陽性結核患者であるが，すべての結核菌抗原刺激に対し PBL の［^{3}H］TdR の取り込みの極めて低い例である。また *M. int* 症患者 PBL では，図6(c)(d)のようにすべての結核菌抗原刺激に対し低値を示した。

3．T リンパ球表面マーカーの変動から見たアフィニティー抗原の PBL 刺激能；

PBL の抗原刺激による helper/suppressor 細胞比（T4/T8）の変動および T リンパ球活性化の指標である Ia 抗原と IL-2R の変動をみた（表2〜4）。T4/T8（表2）は，結核患者では健常人に比しすべての抗原刺激後，著増がみられる。ただし患者の場合無刺激ですでに T4/T8 の軽度上昇が有意（$P<0.05$）にみられた。健常人 PBL ではツ反陽性者，陰性者にかかわらず MTA

表1　PBL の各種結核菌抗原刺激による「^{3}H」TdR の取り込み

Stimulants*	[^{3}H] TdR incorporation (cpm)			
	Helthy persons			TB patients (n=10)
	Mantoux test (skin DTH)			
	Negative		Positive (n=6)	
	high (n=6) responder	low (n=2) responder		
None	1318 ± 376	338 ± 231	547 ± 63	1101 ± 768
PPDs	42432 ± 19030	4387 ± 1697	63140 ± 4355	42967 ± 17468
TACF	38611 ± 7144	7459 ± 3538	41636 ± 5811	40898 ± 8064
MTA 2a	34716 ± 10606	1296 ± 328	27337 ± 8971	30378 ± 13962
MTA 6a	26249 ± 6174	1750 ± 873	20803 ± 13217	28201 ± 14273
MTA 8a	32578 ± 10410	2698 ± 2033	24306 ± 14600	32394 ± 15165
MTA 2a+6a+8a	24176 ± 13105	2183 ± 1560	29158 ± 10264	34504 ± 13828

*5μg/1×10^5 cells/200 l/well

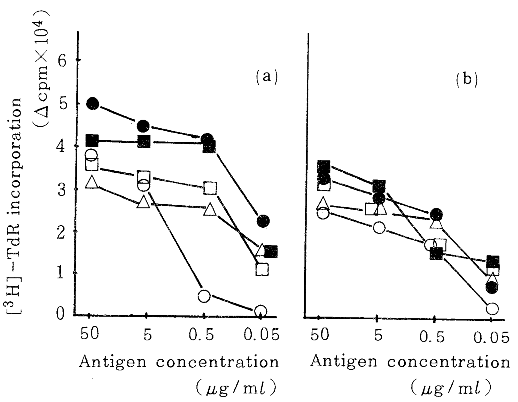

図4　種々濃度の各種抗原刺激による末梢血リンパ球の$[^3H]$ TdRの取り込み
(a)(b)：ツベルクリン反応陽性健常人
○：MTA2a，□：MTA6a，△：MTA8a，
●：PPDs，■：TACF

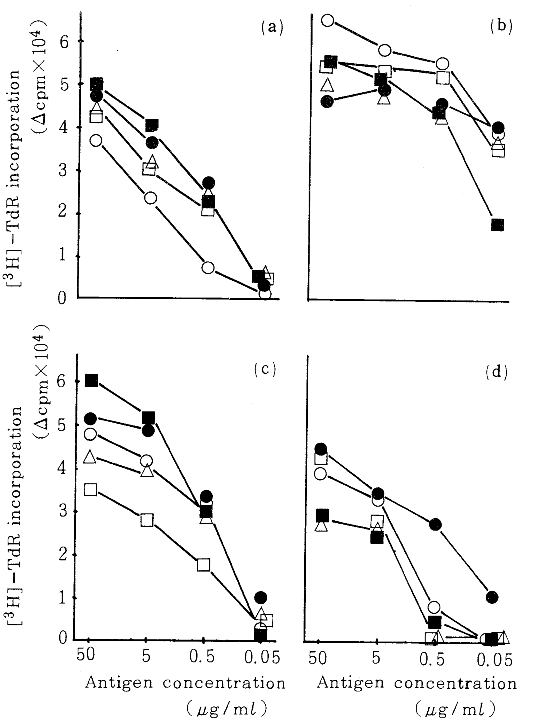

図5　種々濃度の各種抗原刺激による末梢血リンパ球の$[^3H]$ TdRの取り込み
(a)(b)(c)(d)：結核患者
○：MTA2a，□：MTA6a，△：MTA8a，
●：PPDs，■：TACF

抗原刺激ではT4/T8に変動は生じなかった。PPDsを刺激抗原とした場合，ツ反陽性健常人PBLはツ反陰性健常人PBLより有意（$P<0.01$）に高いT4/T8を示したが，アフィニティー抗原ではこの識別ができなかった。

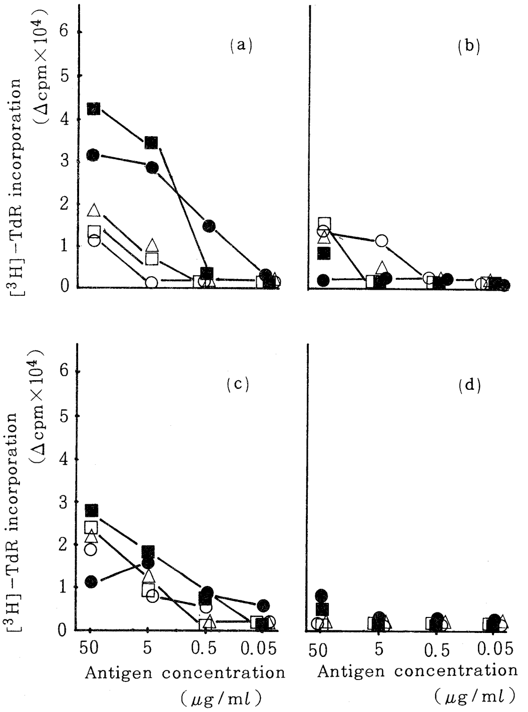

図6　種々濃度の各種抗原刺激による末梢血リンパ球の$[^3H]$ TdRの取り込み
(a)(b)：結核患者，(c)(d)：非定型抗酸菌患者
○：MTA2a，□：MTA6a，△：MTA8a，
●：PPDs，■：TACF

Ia抗原陽性細胞（表3）は，結核患者およびツ反陽性健常人PBLの両者ともに，各抗原刺激後ツ反陰性健常人PBLに比して増加がみられた。また，IL-2Rの変動（表4）は，PPDs, TACF刺激ではIa抗原と同様の増加がみられたが，MTA抗原を刺激に用いた場合ツ反陰性健常人とツ反陽性健常人および結核患者PBLの間に有意の差は認められなかった。

以上の結果のもととなった抗原無添加と添加後のFACS-analyserによるサイトグラムを，PPDsを抗原として用いた場合を例に示す。図7は培養6日後の抗Leu 3aと抗Leu 2a MAbによるtwo color analysisを示し，図8は抗Leu 4と抗HLA-DR MAbによるtwo color analysis，図9に抗IL-2R MAbによる分析を示した。PPDs刺激により図7ではLeu 3a陽性細胞（helper）の増加によるhelper/suppressor (Leu 2a) 比（T4/T8）の上昇が，図8ではLeu 4, HLA　DR陽性細胞（Ia^+・Tリンパ球）の増加が，図9ではIL-2R陽性細胞の増加が表出されている。

以上のPBLに対する各種抗原刺激による細胞表面マーカーの変動を「ツ反陽性健常人および結核患者」と「ツ反陰性健常人」間の各々の絶対値における有意差検定の結果としてまとめて，表5に示す。この表より以下の点

表2　PBL に対する各種結核菌抗原刺激による T4/T8 の変動

Stimulants*	T4/T8 ratio		
	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Negative (n=6)	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Positive (n=6)	TB patients (n=10)
None	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2	3.3 ± 1.4
PPDs	1.5 ± 0.5	3.8 ± 0.7	9.8 ± 6.9
TACF	1.5 ± 0.5	2.2 ± 0.2	8.8 ± 7.7
MTA 2a	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.1	7.3 ± 5.8
MTA 6a	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.2	5.7 ± 3.4
MTA 8a	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.1	6.3 ± 3.2
MTA 2a+6a+8a	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.1	6.5 ± 2.1

* 50μg/2×10^6 cells/2 ml/well

表3　PBL に対する各種結核菌抗原刺激による Ia 抗原の変動

Stimulants*	Ia^+ (%)		
	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Negative (n=6)	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Positive (n=6)	TB patients (n=10)
None	16.1 ± 6.9	22.2 ± 2.1	19.9 ± 4.1
PPDs	30.0 ± 2.8	61.2 ± 5.5	58.6 ± 19.8
TACF	27.6 ± 2.9	53.5 ± 5.7	51.4 ± 20.1
MTA 2a	24.1 ± 1.4	39.8 ± 8.8	40.8 ± 14.9
MTA 6a	25.7 ± 2.2	38.5 ± 4.3	39.0 ± 11.5
MTA 8a	25.6 ± 3.1	39.9 ± 6.0	43.1 ± 12.6
MTA 2a+6a+8a	25.4 ± 2.9	46.9 ± 7.2	48.6 ± 12.8

* 50μg/2×10^6 cells/2 ml/well

表4　PBL に対する各種結核菌抗原刺激による IL-2 レセプターの変動

Stimulants*	IL-2 $receptor^+$ (%)		
	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Negative (n=6)	Healthy persons: Mantoux test (skin DTH) Positive (n=6)	TB patients (n=10)
None	3.0 ± 0.5	7.0 ± 1.1	5.7 ± 0.5
PPDs	28.2 ± 4.5	69.8 ± 6.0	55.0 ± 21.5
TACF	23.9 ± 3.9	65.0 ± 3.8	46.1 ± 22.0
MTA 2a	21.4 ± 6.7	39.5 ± 14.5	36.6 ± 13.8
MTA 6a	19.2 ± 9.1	37.6 ± 11.5	33.7 ± 9.1
MTA 8a	22.7 ± 10.6	39.9 ± 10.9	40.2 ± 11.1
MTA 2a+6a+8a	22.9 ± 10.5	42.8 ± 10.1	44.1 ± 13.5

* 50μg/2×10^6 cells/2 ml/well

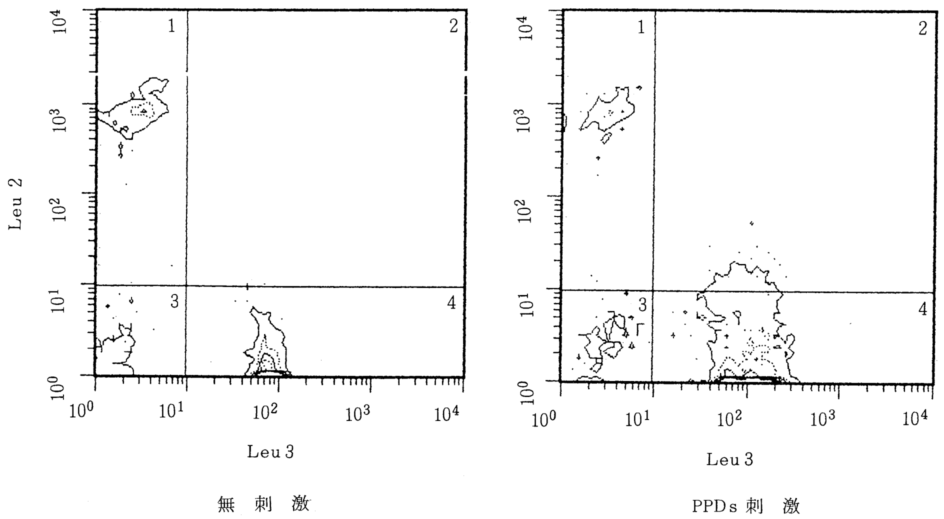

図7 PPDs 存在下培養前後における Leu 3a (helper), Leu 2a (suppressor)陽性細胞の変化

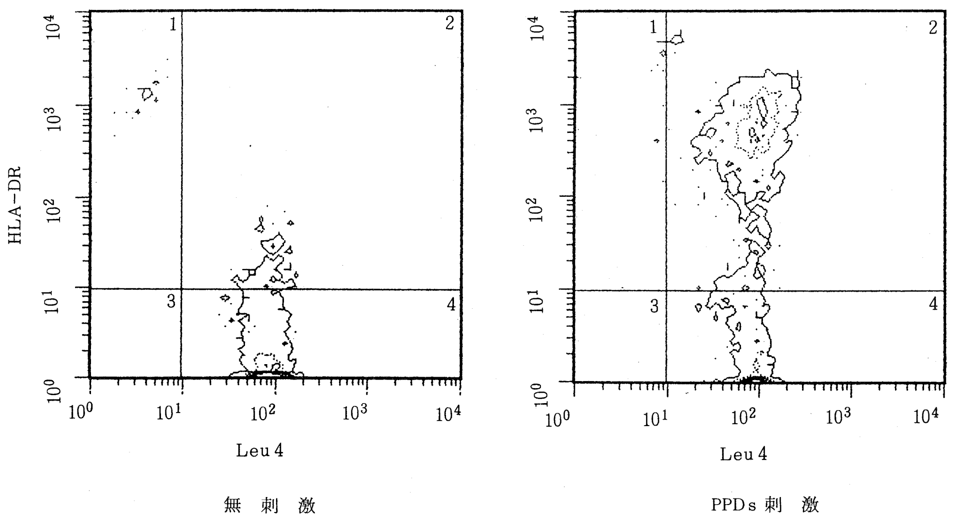

図8 PPDs 存在下培養前後における DR 陽性T細胞の変化

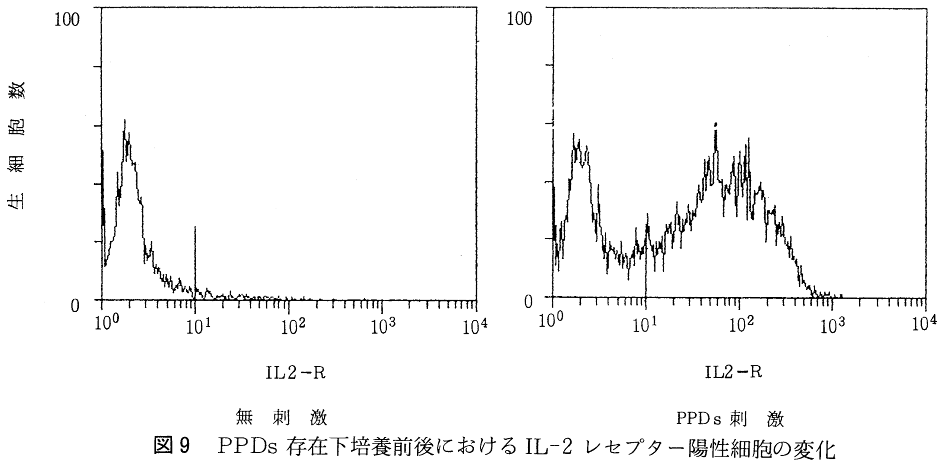

図9 PPDs 存在下培養前後における IL-2 レセプター陽性細胞の変化

表5　抗原刺激による PBL 表面マーカーの変動
「ツ反陽性健常人及び結核患者」と「ツ反陰性健常人」間の有意差検定（P）

Stimulants	T4/T8 ratio		IL-2R+		Ia+	
	ツ反陰性健常人に対し					
	(+) 健常人	TB 患者	(+) 健常人	TB 患者	(+) 健常人	TB 患者
PPDs	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.05
TACF	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.05
MTA 2a	−	P<0.01	−	−	P<0.05	P<0.05
MTA 6a	−	P<0.01	−	−	P<0.05	P<0.05
MTA 8a	−	P<0.01	−	−	P<0.05	P<0.05
MTA 2a+6a+8a	−	P<0.01	−	−	P<0.05	P<0.05

表6　ツ反陰性 PBL の結核菌抗原に対する *in vitro* 免疫応答（low responder 例）

Stimulants	ELISA antibody		[³H] TdR incorporation[1] (cpm)		Marker expression[2]					
					T4/T8 ratio		IL-2R+(%)		Ia+(%)	
	Case 1[3]	Case2[4]	1	2	1	2	1	2	1	2
None	−	−	588 ± 88	127 ± 29	2.8	3.0	2.9	3.7	16.6	20.0
PPDs	0.14	0.08	2690 ± 1381	6083 ± 4	2.6	4.7	6.3	33.0	19.6	45.6
TACF	0.12	0.07	10997 ± 2993	3921 ± 2167	4.1	3.0	11.3	20.7	24.8	26.9
MTA 2a	0.10	0.05	1623 ± 919	968 ± 349	2.4	3.4	5.5	9.6	18.6	25.8
MTA 6a	0.08	0.02	877 ± 167	2622 ± 1132	2.4	3.1	7.3	7.6	17.0	21.6
MTA 8a	0.04	0.06	665 ± 399	4730 ± 732	2.3	3.2	7.0	12.2	19.8	21.4
MTA 2a+6a+8a	−	−	3742 ± 273	3742 ± 113	2.3	3.4	5.0	11.1	15.4	22.1

1) 5μg/1×10⁵ cells/200μl/well
2) 50μg/2×10⁶ cells/2ml/well
3) female (61 old)
4) female (58 old)

表7　ツ反陰性 PBL の結核菌抗原に対する *in vitro* 免疫応答（high responder 例）

Stimulants	ELISA antibody		[³H] TdR incorporation[1] (cpm)		Marker expression[2]					
					T4/T8 ratio		IL-2R+(%)		Ia+(%)	
	Case 1[3]	Case 2[4]	1	2	1	2	1	2	1	2
None	−	−	1694 ± 423	942 ± 425	0.9	1.4	3.4	2.5	22.9	9.2
PPDs	0.18	0.08	43402 ± 5773	41461 ± 5679	1.0	2.0	23.7	32.7	27.2	32.7
TACF	0.15	0.10	31517 ± 3974	45804 ± 2680	1.0	1.9	20.0	27.7	30.5	24.8
MTA 2a	0.12	0.06	24110 ± 942	45322 ± 2288	1.0	1.6	14.7	28.1	25.5	22.7
MTA 6a	0.08	0.07	20075 ± 5348	32422 ± 4138	0.9	2.0	10.1	28.3	23.5	27.8
MTA 8a	0.10	0.08	22168 ± 2051	42988 ± 1515	0.9	1.9	12.1	33.3	22.5	28.6
MTA 2a+6a+8a	−	−	11071 ± 2553	37281 ± 2038	0.9	2.0	12.4	33.4	22.6	28.3

1) 5μg/1×10⁵ cells/200μl/well
2) 50μg/2×10⁶ cells/2ml/well
3) female (32 old)
4) female (25 old)

が要約される。ツ反陰性者に対し，

① 結核患者のPBLは，用いたすべての抗原刺激に対し，有意のT4/T8, Iaの上昇または増加がある。ことにT4/T8の上昇は顕著である。これに反しIL−2RはMTA抗原刺激によっては変動がない。② MTA抗原によるPBL刺激後の表面マーカーの変動のうちT4/T8を指標に用いた場合，ツ反陰性健常人に対してツ反陽性健常人PBLでは有意差がなく，結核患者では有意の差がみられる（$P<0.01$）。③ 一般に多価のPPDsやTACFは，アフィニティー抗原よりPBL刺激能が高い。

4．ツ反陰性者PBLの結核菌抗原刺激によるT細胞表面マーカーの変動；

ツ反陰性者には，結核菌抗原刺激によるPBLの[^{3}H] TdR取り込みの上でlow responderとhigh responderが存在することを前述した（表1）。これらlow responder 2例およびhigh responder 6例中の2例を典型として，そのPBLの結核菌抗原刺激によるT細胞表面マーカーの変動を[^{3}H] TdRの取り込みと血清中抗結核菌ELISA抗体価とともに，それぞれ表6および表7に示す。

表から分かるように，ツ反陰性者は結核菌抗原刺激に対するPBLの[^{3}H] TdRの取り込みの上では，大きな差異のある2群に分かれたが，抗原刺激によるT細胞表面マーカーの表出においては必ずしもそれらの群に対応せず，無関係か，T4/T8のようにむしろ逆相関していると思われる場合もあった。このことは対照群としてツ反陰性群を選択するにあたり問題となると考えられる。

考　　察

本研究の目的は，抗*M. tbc* ABモノクローナル抗体に対応する抗原（MAb−Ag）が，結核患者の免疫反応にどのように関与するか，その程度をツベルクリンとの比較の上で調べることにあった。前報[1]において，*M. tbc* ABに対するMAbのうちヒト型結核菌群に特異的なMAbに対応するアフィニティー抗原は，小動物では血清学的にもDTH皮内反応やPBL刺激能の上でもPPDsにほぼ匹敵することを報告した。アフィニティー抗原の皮膚DTH反応を人に適応できないので，ヒトから採取した材料についてアフィニティー抗原との反応を調べた。

血清学的に結核症を調べる試みは，古くは多糖体抗原，リン脂質抗原を用いて行われていた[4)5)]。1976年Nassauら[6)]はELISA法を導入し結核菌H37Rv株抽出抗原に対する抗体価を測定した。1980年Grangeら[7)]，1983年Radinら[8)]は，抗PPDs抗体価が結核症において有意に増加することを報告している。わが国でも，越野ら[9)]・草野[10)]・山本ら[11)]により同様の報告がなされている。それによると一般に活動性結核では，有意の抗PPDs抗体の上昇があり十分な診断的意義があるという。

しかし，われわれが問題としたのはPPDsが多数のヘテロなペプチド抗原の集合であり，患者血清中の抗PPDs抗体価は多数の抗原に対応する多種の抗体の総和であるということである。同じ意味でDTH反応もPPDsに含まれる抗原に対する反応の総和である。

結核症が典型的な症状と経過を示している間は，PPDsで十分であった。しかし今日のように結核症が難治性と化し，免疫不全合併症となり，同時に非定型抗酸菌症の増加がみられるようになると，免疫学的診断もこれに対応しなければならない。単に多様な抗体の総和だけでなく，特定の抗原に対する反応の差異が病期や病像の判別に利用されうることも考えられる。

例えば，仮定として，ある病型はある抗原にのみ対応する反応として捕らえられるかもしれない。また，免疫不全の結核では総和としての反応は弱くとも，特定の抗原の特定の反応だけは残存する可能性がないだろうか？われわれのアフィニティー抗原はPAGE上均質であり，分子量の上からエピトープ数も5〜10前後と推定されるにもかかわらず，アフィニティー抗原に対するELISA抗体価はほとんどのヒト血清において，多価抗原であるPPDsに対する抗体価とほぼ等しかった。またPPDsと同様に結核患者血清にのみ反応した。したがってアフィニティー抗原を使用したELISA抗体価は補助診断的価値があろう。しかし症例によっては，PPDsとアフィニティー抗原に対するELISA抗体価に若干の解離がみられたが，このことは今後さらに多数の症例についての検討，またさらに多種のアフィニティー抗原が得られれば，病型と特定抗原に対する抗体価の間の有機的関係を明らかにすることが可能なことを示唆するものかもしれない。

今回は非定型抗酸菌症について十分な症例が得られなかった上，非定型抗酸菌症例が結核との混合感染の疑いがあり，ELISA抗体価測定以上の解析は行わなかった。なお，臍帯血の抗PPDs抗体価が新生児のそれよりも高いことは興味深く，母親からの移行抗体によるものと考えられる。

結核菌が体内に入ると，Ia抗原陽性のマクロファージに貪食され，抗原処理を受けたのちその抗原情報は同じIaハプロタイプのTリンパ球に伝えられ，感作リンパ球が形成される。この感作リンパ球が再度結核菌抗原と接触することにより，リンフォカインの産生放出を介して細胞（マクロファージ）内寄生結核菌の殺菌を促進すると考えられている。

この種の抗菌免疫に関与するTリンパ球と，結核症の診断に用いられてきた遅延型過敏症反応に関与する

Tリンパ球の異同については，まだ確定的ではないものの，ここでは両者の反応はほぼ平行して発現すると考えた。Tリンパ球については感作個体のPBLはPPDs刺激によりhelper細胞の誘導が促進される[12]。

以上の理由から，ヒト皮膚DTHに替えて*in vitro*のヒトPBLに対する刺激反応を調べた。[^{3}H] TdR取り込みで示される増殖反応の他，フローサイトメトリーにより活性化Tリンパ球をIL−2R$^+$，HLA−DR$^+$等を指標として測定，粗抗原であるPPDs, TACFに対する反応とわれわれの得た比較的単一なアフィニティー抗原に対する反応との差をみた。われわれの用いたツ反陰性健常人は，ELISA抗体こそ低いものの[^{3}H] TdR取り込みは8名中6名においてツ反陽性または結核患者と差がなく，従来の報告と異なっていた。この説明として，ここで用いたツ反陰性群は完全な無感作群でなく，BCGまたは結核感作後の陰転のためと考えられる。

そこでツ反陰性者PBLの結核菌抗原に対する[^{3}H] TdR取り込みの上で，lowおよびhigh responder groupに分け，表6, 7に例示したが，この表から何らかの傾向を見いだすことは困難であった。しかしながら総体的に，アフィニティー抗原はヒトに対する抗原性の上でPPDsに近い活性をもつことがうかがわれた。当初期待した結核感作状態の細かい識別についてはアフィニティー抗原は従来のPPDsを凌駕するにはいたらず，一部のリンパ球マーカー発現においてPPDsと差がみられた。これは，アフィニティー抗原のエピトープが少ないことが原因かもしれない。

PPDsが10〜100 kDにわたる多様なペプチド抗原の集合体であり，その抗原エピトープの数も多数，多種におよぶことを考慮すれば，PAGE上24または19kDの1本のバンドを形成する均質なアフィニティー抗原が，限られたエピトープでPPDsに近い活性をすべて発現するよう要求することは困難であろう。しかし，将来最小のペプチドでツベルクリンに代替し得る可能性をさぐることは，結核免疫の解明の上で重要であることにかわりない。

なお，以上「ペプチド」という表現を用いたが，ツベルクリンおよびわれわれのアフィニティー抗原には糖成分が含まれており（表8），過沃素酸酸化で抗原活性が減弱することが予備的に認められているので，今後免疫活性への糖成分の関与，ことに糖蛋白の観点からの検討が必要である。これに関して当教室において大腸菌で結核菌遺伝子から発現させたrecombinant peptideは動物実験系においてT, B両細胞と反応し，また患者血清とも反応したが，これで刺激したヒト患者PBLの[^{3}H] TdR取り込み増加は微弱であった（未発表）。この理由としては，recombinant peptideは蛋白のみから成り，一方アフィニティー抗原はpeptideに加えて天然の糖鎖を保有するので，この糖鎖の存在が関与していることが考えられる。

表8 各試料の構成成分

	試料100 μg中の各含量(μg)		
	Protein	Sugar (hexose)	Amino−Sugar (Hexosamine)
PPDs	79.40	3.99	0.02
MTA 2a	104.69	13.25	0.07
MTA 6a	86.37	61.04	0.13
MTA 8a	107.72	29.47	0.02

苔口 進博士による

今回実験に用いた症例は限られており，陳旧例こそ含まないものの症例によってはPPDsに対する反応性の減弱がしばしば認められ，また，結核患者においてsuppressor T細胞[2]やIgG Fc受容体を持つTリンパ球の増加[12]が報告されているので，そのような症例を含めての検討も残されている。さらに多様なアフィニティー抗原を分離し，多様な症例について多様な免疫学的クライテリアについて調べるのが，今後の課題である。

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。兵庫医科大学細菌学・医動物免疫学・遺伝学・第4内科学教室・鳥羽宏和博士，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），堀三津夫名誉教授（結核予防会大阪支部）。

文 献

1) 露口隆一：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，結核，64：761〜775，1989.
2) Shiratsuchi, H., Tsuyuguchi, I. : Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after *in vitro* stimulation with purified protein derivative of tuberculin, Clin exp Immunol, 57 : 271−278, 1984.
3) Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. et al. : Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody, Proc Natl Acad Sci USA, 76 : 4061−4065, 1979.
4) Cole, L. R., Matloff, J. J., Farrell, V. R. : A method for coupling protein antigens to erythrocytes : II. Use of the method in the

diagnosis of tuberculosis, J exp Med, 102 : 647–653, 1955.
5) Favez, G., Jequier, S., Vulliemoz, P. : Demonstration and discrimination of distinct circulating antibodies during active tuberculosis in man, Am Rev Resp Dis, 94 : 905–913, 1966.
6) Nassau, E., Parson, E. R., Johnson, G. D. et al. : The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA), Tubercle, 57 : 67–70, 1976.
7) Grange, J. M., Gibson, J., Nassau, E. et al. : Enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) : A study of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease, Tubercle, 61 : 145–152, 1980.
8) Radin, R. C., Zeiss, C. R., Phair, J. P. : Antibodies to purified protein derivative in different immunoglobulin classes in the diagnosis of tuberculosis in man, Int Arches Allergy appl Immunol, 70 : 25–29, 1983.
9) 越野　健，西岡真二，藤村政樹他：ELISAによる肺結核症患者血清中の抗PPDs–IgG抗体の検出，結核，59：621〜624，1984.
10) 草野展周：ELISA法を用いた活動性肺結核患者の血清中のPPDとα抗原に対するIgG抗体測定の診断的有用性の検討，結核，62：211〜227，1987.
11) 山本節子，田端一彦，戸井田一郎：結核症および非定型抗酸菌症患者の特異的抗体価の測定，結核，62：549〜557，1987.
12) Shiratsuchi, H., Tsuyuguchi, I. : Tuberculin purified protein derivative–reactive T cells in cord blood lymphocytes, Infect Immunol, 33 : 651–657, 1981.
13) Tsuyuguchi, I., Siratsuchi, H., Teraoka, O. et al. : Increase in T cells bearing IgG Fc receptors in peripheral blood of patients with tuberculosis by *in vitro* stimuration with purified protein derivative, Ame Rev Resp Dis, 121 : 951–957, 1980.