



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスにおけるツベルクリン・アレルギーの研究：マウスのツベルクリン足蹠反応について
Author(s)	新明, 美仁; SHIMMYO, Y.; 高橋, 和男 他
Description	
Citation	結核の研究, 8, 50-56
Issue Date	1958-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26644">https://hdl.handle.net/2115/26644</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	8_P50-56.pdf



## マウスにおけるツベルクリン・アレルギーの研究

— マウスのツベルクリン足蹠反応について —

新明美仁・高橋和男

(北大結核研究所細菌部 主任 大原 達 教授)

橋本徹二・小林豊司

(北大結核研究所病理部 主任 森川和雄助教授)

(昭和33年1月16日受付)

結核菌に関する種々の研究において実験動物としてマウスの用いられる頻度は近年次第に増加しつつあるが、マウスにツベルクリン皮膚反応が発現し得るか否かについては従来否定的な考えが圧倒的であつた。即ちマウスはツベルクリンに対し生来 *anergic* な動物であるとさえ考えられて居り、例えば Gerstl & Thomas<sup>1)</sup> は、PPD を以てする皮膚反応にマウスが全く *insensitive* である事、結核マウス組織の培養に 1000 皮膚反応単位の PPD を加えても何の影響もない事等からマウスは *naturally anergic* であると述べ、Holden et al<sup>2)</sup> ともこれを支持している。Favour<sup>3)</sup> も亦マウスがツベルクリンに対して生来 *anergic* であることを主張し、副腎を剔除してもこの状態に何等変化を来さなかつたと述べている。然し、一方においてマウスが結核に対しある程度の免疫、即ち抵抗を獲得し得ることは次第に広く認められて来ており、このことが又、結核におけるアレルギーと免疫との問題に関し種々の議論を起したのもあるが、近年に至つてようやく、マウスのツベルクリン・アレルギーに関し、注目を惹く研究の発表が見られるようになって来た。即ち Hart ら<sup>4)</sup> は結核マウスに皮膚のツベルクリン・アレルギーは認められなかつたが、充分大量のツベルクリンを静注によつて与えるならば系統的な反応を表わし得ると述べ、これにつづいて Kirchheimer ら<sup>5)</sup> は、PPD を静注することにより感染マウスに致死的なショックを起すことが出来ると報告した。更に、最近 Gray & Tennings<sup>6)</sup> は結核マウスの足蹠にツ反応を行うことにより、マウスにも典型的な皮膚アレルギーの表われることを証明し、又ツベルクリンの腹腔内注射によつて、結核マウスにショック死を起すことに成功した。われわれもこの Gray らの方法に倣つてマウスのツベルクリン足蹠反応を観察し、又時間的経過を追つてその病理組織学的所見を検したので、以下得たる成績につ

いて報告する。

### 実験材料及び実験方法

1) マウス：市販の雑系白色マウス、体重 18-22 g 前後の雄のみを使用した。

2) 使用菌株：マウスの体内通過と小川培地培養とを交互にくり返して保存していた牛型毒力菌 Ravenel 株を使用。この菌株に対しては雑系マウスでもかなりの感受性のあることが教室の信太<sup>7)</sup> によつて認められている。

3) マウスへの感染法：小川培地に生じた上記菌株の集落より、生理的食塩水にて菌浮游液を調製し、マウスの尾静脈より静注感染せしめた。感染菌量は 1 匹につき 0.01 mg~0.001 mg (湿潤量) である。

4) ツベルクリン：青山 B 株のソートン培養濾液より型の如く調製した旧ツベルクリン (以下 O T と略記) を使用する。

5) ツベルクリン反応の実施及び判定：生理的食塩水にて 25 倍に稀釈した O T をツベルクリン注射器にとり、1/5 針を以てマウスの後肢皮内足蹠全体が瀰漫性に腫脹する程度に注射した。判定は最初 24 乃至 48 時間後に行つたが、どちらの時間でも殆んど差がなかつたので、後には主として 24 時間後に判定した。尚判定の基準として Gray 等は *positive*, *intermediate*, *negative* の 3 種の *grade* を区別しているが、われわれは一応次の如く 4 段階に分けて反応程度を表わした。

- (陰 性)：判定時に何等の反応も見られないもの。
- 士 (疑陽性)：腫脹又は発赤腫脹が軽微或いは余り明らかでないもの。
- + (陽 性)：明らかな腫脹又は発赤腫脹を認めるもの。

卅 (強陽性): 発赤腫脹強度のもの。

I. ツベルクリン足蹠反応の肉眼的観察

29 匹のマウスを用いうち 9 匹を正常対照群として残し、残りの 20 匹には前記 Ravenel 株を各々 0.001 mg (生菌単位  $147 \times 10^3$ ) づつ静注によつて感染させ、感染後 4 週目より 12 週目迄、毎週左右の足蹠に交互にツ反応を行つて、その経過を観察した。個々のマウスについての成績は第 1 表に示した通りで、4 週目頃からごく少数のものはツ反応が現われて来たがその数は未だ少く、大部分が陽性になつたのは 7 週前後からであつた。而して 10 週前後になると陽性から再び疑陽性、陰性に

第 1 表 マウスにおけるツベルクリン足蹠反応の経過

群別及前処置	動物番号	感染後の経過(週)									
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	
感 染 群  Ravenel 0.01 mg 静注	1	+	+	+	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	2	±	+	D <sub>42</sub>							
	3	±	±	+	+	+	+	+	+	+	
	4	+	±	+	卅	+	+	+	D <sub>77</sub>		
	5	+	+	±	+	+	±	±	D <sub>77</sub>		
	6	±	±	±	+	+	+	+	+	+	
	7	-	±	±	±	D <sub>54</sub>					
	8	±	+	+	+	+	卅	卅	+	+	
	9	+	±	+	+	+	+	+	+	+	
	10	+	+	+	卅	卅	+	卅	+	+	
	11	±	±	±	+	+	+	+	±	±	
	12	-	±	±	+	+	+	+	±	±	
	13	±	+	±	+	+	+	+	±	±	
	14	±	+	±	+	+	+	+	±	-	
	15	+	±	+	+	+	+	+	+	+	
	16	±	+	+	+	卅	+	+	+	+	
	17	±	+	±	+	+	+	+	+	+	
	18	+	±	+	+	+	+	+	+	+	
	19	±	+	+	卅	+	+	±	+	+	
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
対 照 群 (無処置)	K 1	±	-	-	-	±	-	-	-	-	
	K 2	-	±	-	±	-	±	-	-	-	
	K 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	K 4	-	-	±	±	-	-	-	-	-	
	K 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	K 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	K 7	-	±	-	-	-	-	-	-	-	
	K 8	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
	K 9	-	-	-	-	±	-	-	-	-	

(註) 使用 OT : 1 : 25 生食稀釈

移るものが表われて来た。一方対照群の正常マウスではいづれも陰性で時に疑陽性程度の反応と見られるものも少数あつたが、陽性と判定されるものはいづれの時期においても 1 頭もなかつた。尚表中 D を以て表わしたのは、実験経過中死亡したマウスで、例えば D<sub>54</sub> とあるのは、感染後 54 日目に死亡したことを示すものである。この死亡について、Gray 等は Preallergic death と postallergic death とに分け、positive の反応を示している間にはマウスは死亡しないと述べているが、我々の成績ではそれ程厳密な関係は見られず、死亡した 4 匹の中 2 匹は前回の反応程度が (+) で死んでいる。但し、反応実施の間には 1 週間の間隔がある訳で、而もこの 2 匹は偶然その次の反応実施予定日、即ち前回の反応実施より丁度 1 週目に死んで居るので、若し死亡直前に検査したとすれば或いは反応が ± とか - であつたかも知れず、その点については尚実験例を重ねなければ結論的なことは言われない。然し一般の傾向としては、感染が進行し、マウスが衰弱して来ると反応は再び陰性化して来る様に見受けられた。

第 1 図



第 1 図の写真はかかる足蹠反応を起したマウスの典型的な例を示したもので (マウス No. 8, 感染 9 週後, ツ反応 卅, 24 時間目), モノクロームの為発赤を明かにし得ないのは遺憾であるが対側に較べ反応実施部位の著明な腫脹は十分認め得ると思う。第 2 表は第 1 表の成績を数字にまとめて表わしたもので、感染後の経過 (週) を追つて程度別の反応数を示したものである。表中陽性率としたのは (+) 以上の反応を示したもののパーセントで、7 週目には 94.7%, 8 週目には 100% の値を示し、9 週以後になると又これが減少して来ている。対照群では (+) 以上の反応を示したものはいづれの時期にも 1 匹もないから、陽性率は勿論どれも 0 である。

第 2 表 感染後の経過とツベルクリン足蹠反応の程度別反応数

群別及 前処置	使用 数	死亡 数	反応 程度	感 染 後 の 経 過 (週)								
				4	5	6	7	8	9	10	11	12
感 染 群 (Ravenel 0.01 mg 静 注)	20	4	—	2/20	0/20	0/19	0/19	0/18	0/18	0/18	0/16	1/16
			±	10/20	9/20	8/19	1/19	0/18	1/18	2/18	3/16	2/16
			+	8/20	11/20	11/19	14/19	15/18	15/18	14/18	12/16	12/16
			++	0/20	0/20	0/19	4/19	3/18	2/18	2/18	1/16	1/16
			陽性率 (%)	40.0	55.0	55.6	94.7	100	94.4	88.9	81.3	81.3
対 照 群 (無処置)	9	0	—	8/9	7/9	7/9	7/9	7/9	8/9	9/9	9/9	9/9
			±	1/9	2/9	2/9	2/9	2/9	1/9	0/9	0/9	0/9
			+	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
			++	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
			陽性率 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

## II. ツベルクリン足蹠反応の病理 組織学的観察

以上の如く、マウスでも足蹠にツ反応を行うと陽性の反応成績が得られることが判明したが、ツベルクリンは相当濃度の濃いものを用いて居るのであり、単なる肉眼的観察のみでこれが真のツベルクリンによる delayed type の allergy 反応であると確言することは危険と思われるので、我々は更に時間的経過を追つて、この反応の病理組織学的検索をも行つて見た。

即ち第3表に示す如く、31匹のマウスを用い、その中19匹に Ravenel 株を 0.01 mg づつ(生菌単位  $163 \times 10^3$ ) 夫々静注感染せしめ、12匹を正常対照群として残した。感染6週後に感染群のマウスには右足蹠に食塩水で25倍に稀釈した OT、左足蹠には食塩水のみを、

又対照マウスには右足蹠に OT をそれぞれ注射して、その後3時間目、6時間目、10時間目、24時間目、48時間目及び72時間目の6回に分けて、感染群のマウスは各時間後毎に3匹づつ(24時間後のみは4匹)、対照マウスは2匹づつ殺して、それぞれの足蹠反応実施部位の皮膚を取り、型の如く固定染色してその組織学的所見を検した。第4、第5表はその成績をまとめたものであり第2図は代表的なものについて顕微鏡写真を示したものである。

1) 感染マウス足蹠に対するツベルクリンの作用：注射3時間目には、皮下の浮腫を主とし、若干の多形核球及びごく少数の単核球からなる細胞浸潤が小血管周囲に認められた。この浮腫、細胞浸潤は6時間目には若干その強さを増し、かなり著明な所謂白血球の細胞反応が、血管周囲及び浮腫性結合織の中に起つていた。充血も増

第 3 表 組織学的検査に用いたマウスのツ反実施後の時間別屠殺数

群別及 前処置	感染後 の期間	ツ 反 実 施 後 の 時 間					
		3	6	10	24	48	72
感 染 群 (Ravenel 0.01 mg 静 注)	6 週	3 (No. 1-No. 3)	3 (No. 4-No. 6)	3 (No. 7-No. 9)	4 (No.10-No.13)	3 (No.14-No.16)	3 (No.17-No.19)
対 照 群 (無処置)	—	2 (K 1-K 2)	2 (K 3-K 4)	2 (K 5-K 6)	2 (K 7-K 8)	2 (K 9-K 10)	2 (K 11-K 12)

### 反応実施法

感染マウス { 右足蹠：25×稀釈 OT 注  
左足蹠：生理的食塩水注  
対照マウス—右足蹠：25×稀釈 OT 注

第4表 感染マウス足蹠におけるツベルクリン反応

動物番号	反応時間	ツベルクリン注射 (右)					生理的食塩水注射 (左)						
		反応程度	多形核球	単核球	充血	変性腫	反応程度	多形核球	単核球	充血	変性腫		
1	3	+	+	±	±	-	+	±	-	-	-	-	±
2	3												
3	3	++	++	±	±	-	++	-	-	-	-	-	-
4	6	++	++	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-
5	6	++	+	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-
6	6	++	++	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-
7	10	++	++	+	±	+	++	±	±	±	±	-	-
8	10							±	-	±	-	-	-
9	10	++	++	++	±	±	++	±	±	±	-	-	-
10	24	+++	++	++	±	+	++						
11	24	+++	+	++	+	++	++						
12	24	+++	+	++	+	++	++	-	-	-	-	-	-
13	24							-	-	-	-	-	-
14	48	+++	+	+++	±	+	++	-	-	-	-	-	-
15	48	++	±	++	±	±	+	-	-	-	-	-	-
16	48							-	-	-	-	-	-
17	72	++	±	++	±	±	+	-	-	-	-	-	-
18	72	++	±	++	-	+	+	±	±	±	-	-	-
19	72	+	±	+	-	±	+	-	-	-	-	-	-

第5表 正常マウス足蹠に対するツベルクリンの作用

動物番号	注射後時間	反応程度	多形核球	単核球	充血	変性	浮腫
K 1	3	±	-	-	-	-	+
K 2	3	±	±	干	+	-	+
K 3	6	±	±	干	±	-	+
K 5	10	干	干	-	-	-	-
K 6	10	干	干	-	-	±	-
K 7	24	-	-	-	-	-	-
K 8	24	±	-	±	-	-	-
K 9	48	-	-	-	-	-	-
K10	48	±	-	±	-	-	-
K11	72	-	-	-	-	-	-
K12	72	±	-	±	-	-	-

強されていた。10時間になると、浮腫特に強く、結合繊維の膨化が著明であり、又細胞反応自体も強化するが、単核球の増量が目立つて来る。しかしまだ単核球反応とは云えない。24時間になると、始めて単核球が細胞反応に優位を占めるに至る。反応自体は更に増強され、又白血球の崩壊、結合繊維のフィブリン様変性が著明となつて来る。この状態は48時間迄継続し、殊に No. 14 では単核球が広く皮下結合繊維一帯に浸潤し、著明な単核球型反応と認めることが出来た。72時間になると反応全体は著しく減弱し、若干の単核球性細胞の浸潤に止つて居る。しかしまだ浮腫は認めることが出来た。

2) 感染マウス足蹠に対する生理的食塩水の作用：  
3時間目ごく弱い浮腫を呈した例があるが、全体を通じて殆んど変化を認めず、只10時間目、多形核球、単核球のごく弱い滲出を血管周囲に認めたにすぎない。

3) 正常マウス足蹠に対するツベルクリンの作用：  
3時間目から6時間目にかけて、浮腫と、軽い多形核球の滲出を認めるにすぎず、しかも10時間になると著しく減弱し、24時間以降は殆んど変化を認め得ない。

以上の所見を綜括すると、感染マウス足蹠に対し、ツベルクリンは特異的な反応を呈したことが判定される。その反応の形式も、時間的には24~48時間を頂点とした所謂 *delayed* の反応であり、又細胞反応の面から云つても所謂 *monocytic* の反応と云いようであり、結局他の動物に見る皮膚のツベルクリン反応と形式的には殆んど変つていないと判断せられる。只、初期の多核球性反応が典型的なツベルクリン反応と比較すると若干強すぎるようであり、又反応極期に到達する過程を見ると、反応は幾分早目にしかも強く起つて居るようであり、この点反応の性格に若干疑問がないでもないが、これには注射したツベルクリンの濃度の問題が関係しているであろうし、又注射場所が足蹠であると云うこと、つまり注射後たえず歩行と云う刺激が反応部位に加え続けられたこと等も原因として推察される。

## 考 察

われわれはこの実験において、従来ツベルクリンに対し *naturally anergic* と考えられていたマウスにも、適当な方法によればツ反応の発現を十分期待し得ることを知つた。マウスにおいてツベルクリン皮膚反応が出ないことを最初に記載したのは恐らく Roemers<sup>9)</sup> と思われるが、その後の実験は前記 Gray<sup>10)</sup> らのものを除き、殆んどがツベルクリンに対するマウス皮膚の不感受性を報じたものばかりであつた。われわれも過去においてマウスの背中又は腹側等に何回かつ反応を行つて見たが陽

性と思われる成績を得たことはなかつた。然るにこの度 Gray らの報告に興味をひかれ、彼らと同様に足蹠の皮内にツベルクリン反応を実施して見たところここに報告した如き陽性の成績が得られた。何故マウスは足蹠においてのみツベルクリン皮膚反応が発現し、他の場所においてこれが現われないのか、その理由を審かにする事は出来なかつたが、本報に得られた皮膚反応が *tuberculin type* のアレルギー反応である事は発現の時期、反応の様相、病理組織学的所見等から見て大体異論のない所と思われる。

結核アレルギーと免疫との関係を論じた従来論文において、マウスが結核に対し免疫を獲得するにも拘らずアレルギーを示さない事を以てアレルギー免疫二元論の一論拠とする学者は多かつたが、この点において Gray らの研究並びにわれわれの追試は 1 つの修正を与えたことになるであろう。

尚、病理組織学的にツ反応を検した際、これに即時性アレルギーの参与が常にあるものと考えられるが、高濃度のツベルクリンによつては一層この蛋白アレルギーがより強く表現されることが想像される。ごく最近城戸<sup>9)</sup>がわれわれに似た実験を行つているが、その報告によると、結核感染マウスにツベルクリンを静脈注射するとショックを起し、その性格は過敏性ショックと考えざるを得ないと述べている。この事は上述のわれわれの想像を裏書きする 1 つの成績である。何れにせよ、マウスが感受性は高くないにもせよ特異的にツベルクリンに対しアレルギー反応を示すことは疑いない事実であり、マウスを *naturally anergic* の動物と考える従来成績には訂正を要する余地が十分あると考える。

然しこの実験において、ツ反応の実施は左右の足蹠に交互に毎週(即ち 1 側の足には 1 週間おきに)行つており、又ツベルクリンも相当高濃度のものを使用しているのであるから、同一部位におけるツ反応反復実施による反応の促進<sup>10)-12)</sup>とか、あるいは逆にツベルクリンによる脱感作とかも考えられるし、又死亡したものは除外して計算しているの、以上の如き経過の観察に基き第 2 表の如く反応程度別に数を分けることや陽性率を出すことに問題がない訳ではないと考えるが、一応の目標とし

てここに陽性率を算出したものである。なお、かかる疑義を除外するため、ツ反応の反復を避けた多数のマウスによる統計的な観察を教室の沼田<sup>13)</sup>が実施中であるが、その成績は本報のそれと大差ないものであることを附記しておく。

## 結 論

25 倍稀釈の旧ツベルクリンを以て結核マウスの足蹠皮内にツ反応を行えば、従来ツベルクリン感受性がないと考えられていたマウスにも皮膚アレルギーを発現せしめる事が出来る。この反応はツベルクリン注射 24~48 時間後頃に最強となる *delayed type* の反応で、病理組織学的所見においても他の動物に見られるツ反応の所見と一致するものであつた。肉眼的には足蹠全体に瀰漫性の腫脹と発赤とが見られる。ツベルクリン・アレルギー発現の時期に関しては、早いものでは結核菌感染後 4 週頃より陽性となるものもあつたが、大部分の動物が陽転する時期は大体 7 週目前後であつた。なお 10 週目前後より、この反応には再び弱化する傾向が認められた。

## 引 用 文 献

- 1) Gerstl, B. and Thomas, R. M.: *Yale, J. Biol. & Med.*, 13, 679, 1940-1941.
- 2) Holden, M., Seegal, B. C. and Adams, L. B.: *J. Exp. Med.*, 98, 551, 1951.
- 3) Favour, C. B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 65, 269, 1954.
- 4) Hart, P. D'A., Long D. A. and Rees, R. J. W.: *Brit. M. J.*, 680, 1952.
- 5) Kirchheimer, W. F. and Malkiel, S.: *Am Rev. Tuberc.*, 68, 629, 1953.
- 6) Gray, D. F. and Jennings, P. A.: *Am. Rev. Tuberc.*, 72(2), 171, 1955.
- 7) 信太隆夫他: 結核の研究, 第 7 集, 昭 32.
- 8) Roemers, S.: *Beitr. z Exper. Therap.* 6, 1, 1903.
- 9) 城戸義正: 九大結研紀要 3, 134, 昭 32.
- 10) 塩田憲三他: 呼吸器診療, 112, 124, 昭 31.
- 11) 松島正視他: 第 6 回日本アレルギー学会総会抄録, 1957.
- 12) WHO, Tuberc. Research. Office., *Bull. World Health. org.* 12-1.2, 197, 1955.
- 13) 沼田達夫: 近く発表予定。

## 写 真 説 明

全て結核感染マウス足跡に旧ツベルクリン 25 倍液 0.1 ml 注射。時間は旧「ツ」注射後、剖検迄の時間を示す。formol 固定, paraffin 切片, hematoxylin-eosin 染色。

Fig. 1. No. 3 3 時間後。皮下組織の浮腫, 小血管に充血, 殊に白血球の増量, 一部好中球の血管外滲出も認められる。

Fig. 2. No. 4 6 時間後。滲出現象, 殊に好中球の滲出が著名となつている。

Fig. 3. No. 11 24 時間後, 滲出細胞は皮下筋層にまで及び炎症範囲は著しく拡大されている。滲出細胞は単核性細胞が優位を占めている。

Fig. 4. No. 14 48 時間後。皮下の浮腫はやや減退してゐるが, 細胞滲出現象は依然強い。単核細胞が殆んどである。

(尙食塩水注射部位, 及び正常マウスに旧「ツ」注射部位の病変程度はごく軽いのでここに掲載しなかつた。)



Fig. 2



Fig. 4

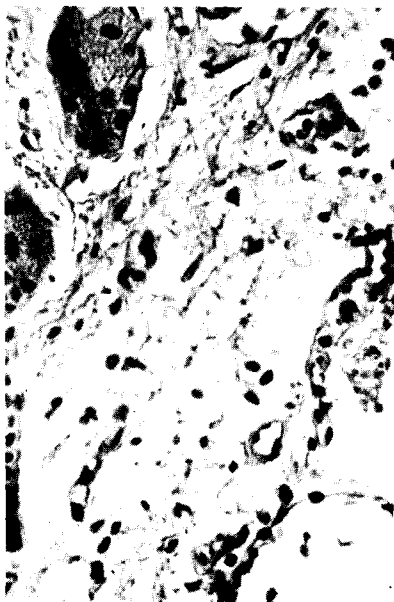


Fig. 1



Fig. 3