



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスにおけるツベルクリン・アレルギーの研究(続報)
Author(s)	沼田, 達夫; NUMATA, Tatsuwo; 藤本, 哲 他
Description	
Citation	結核の研究, 9, 47-52
Issue Date	1958-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26656">https://hdl.handle.net/2115/26656</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	9_P47-52.pdf



## マウスにおけるツベルクリン・アレルギーの研究（続報）

沼田 達夫 藤本 哲

（北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授）

（昭和 33 年 7 月 31 日受付）

結核の実験におけるマウスの有用性は近年急速に認められるようになり、従来用いられて来た海獺にとつて代らんとする傾向さえ見られるが、マウスの最大の欠点はツベルクリン反応（以下ツ反応と略記）の出現しないことである。即ち Römers<sup>1)</sup>以来マウスはツベルクリンに対し naturally anergic の動物であると考えられ、この事は同時にアレルギーと免疫を無関係な現象と考える学者にとつて 1 つの論拠とされていたものであつた。然し近年に至り、マウスも亦方法如何によつては家兎や海獺と同様にツ反応を現わすことが明らかになつて来た。即ち Hart ら<sup>2)</sup>及びこれに続いて Kirchner<sup>3)</sup>によれば、結核マウスに皮膚反応を起すことは出来なかつたがツベルクリンを静脈内に与える事によつて致死的な反応を起すことが出来、更に進んで Gray & Jennings<sup>4)</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出現する事を観察した。Gray & Jennings<sup>4)</sup>の実験は教室の新明ら<sup>5)</sup>によつて追試され、病理組織学的にも他の動物に見られるツ反応と全く同様なことが証明されている。ただこの追試における欠点は実験に用いた動物数が稍少くツ反応の実施を左右の足蹠に交互に行つたことである。即ち用いられたツベルクリンは 25 倍稀釈と云う可なり高濃度のものであるから、ツベルクリンの反復接種による反応の促進とか、あるいは逆に脱感作とかをこの際考慮に入れなければならず、得たる成績に若干の疑義をさしはさむ余地が無かつたとは云われない。本実験はかかる疑義を除くために行われたもので、同一足蹠に対するツベルクリン注射が二度反復されないよう多数のマウスを使用してツ反応を観察した。新明らの実験は前記の疑義がある代りに同一マウスについて経過を追つたものであるが、本報告は同一個所に対する反復接種を避けた為ツ反応の経過は同一動物について調べたものではなく、統計的な観察によつて求めたものである。従つて今回の報告におけるツ反応の時間的推移に関しては個体差が全く問題にならない訳ではなく、この点両実験はそれぞれ一長一短を持つ

ている。然し得たる成績は全く同一で、今回の実験は新明らの成績をそのまま再現したものであつた。尚今回の実験においては結核マウスの血清について電気泳動的研究と沈降反応とを行つたので、その結果をも併せて報告する。

### 実験材料及び実験方法

(i) マウス： 体重 18~23 g の比較的大きい雑系白色マウスの雄のみを使用した。

(ii) 感染菌株： 雑系マウスにも均一な死亡分布を与える<sup>6)</sup>牛型菌 Ravenel 株を使用した。毒力を一定に保つためにマウス体内通過（8 代）と小川培地培養とを交互に繰り返して保存したものを用いた。

(iii) 感染方法： 小川培地に生えた Ravenel 株の集落より生理的食塩水で菌浮遊液を作り、マウス 1 匹当り 0.001 mg（生菌単位  $13.7 \times 10^3$ ）宛尾静脈より感染せしめた。

(iv) ツ反応検査法： 人型結核菌青山 B 株の Sautton 培養濾液より型の如くして調製した旧ツベルクリンを生理的食塩水で 25 倍に稀釈し、マウスの足蹠部皮内に注射した。注射に当つては足蹠部が瀰漫性に腫脹する様にしたが、所要量は大体 0.06 cc であつた。成績の判定には新明らと全く同じく次の 4 つの基準を設けた。

陰 性 (-)： 発赤、腫脹が全く無いもの。

偽陽性 (±)： 発赤・腫脹が軽微、又は明らかでないもの。

陽 性 (+)： 明らかな発赤、腫脹を認めるもの。

強陽性 (++)： 発赤、腫脹が高度のもの。

尚判定はすべて 24 時間後に行つた。

(v) マウスの群別及びツ反応の経過観察： マウスは感染群及び正常対照群共に 6 群に分ち、前者は 1 群 10 匹宛、後者は 5 匹宛のマウスを使用した。ツ反応検査に当つては感染群、正常対照群共に第 1 週は第 1 群の右足蹠に、2 週目は同じく第 1 群の左足蹠に皮膚反応を行い、以下同様に 3 週目は第 2 群の右足蹠、4 週目は同じく左

足蹠と云う風に1匹のマウスの同一足蹠には1回しかツ反応を行わぬようにして12週間ツ反応を継続し、反応の進展を統計的に観察した。

(vi) マウス血清の電気泳動法：被検査血清が少量ですむので濾紙電気泳動装置（小林式）を使用して電気泳動を行った。使用濾紙は東洋濾紙 No. 51, 緩衝液には pH 8.5, イオン強度 0.045 の voernal-醋酸ソーダ緩衝液を用い、濾紙幅 1 cm 当り 0.5 mA の電流を約 3.5 時間通した。通電完了後濾紙を brom phenol blue で染色、加熱熔融した paraffin 中を通して半透明にした後これを光度計にかけ density を読んだ。血清各分層の百分率を求めるには吸光度の読みをそのまま加える事によつて計算した。

(vii) 沈降反応：教室の大原・中川の方法<sup>7)</sup>に従い人型結核菌 H<sub>2</sub> 株から沈降原を作り、型の如き重層法によつて抗体価を測定した。

(viii) マウスの血清採取法及び採血時期：マウスの採血には眼球よりの採取、頸部又は尾部の切断による採取等の方法があるが、手技に馴れば心臓穿刺による方法が最も多量の血液を採取し得るので、本実験においてはこの方法によつた。採血には熟練を要するが、この方法により電気泳動、沈降反応共に血清を混ぜ合わせることなく個々のマウスについて測定することが出来た。電気泳動的研究には菌感染後8週目に第1群から第4群までのマウス全部についてツ反応を検し（第3群までは以前にツ反応を行つているが改めて検査す）、反応陽性乃至強陽性のものについてそれより1週間後に採血、血清を分離して実験に供した。1/5 針をつけた注射器により心臓穿刺では1匹 0.4 cc から多いものでは 1.0 cc まで採血可能であるが、マウスは何回も穿刺すると死亡し易いので 1~2 回穿刺に失敗した場合はエーテル麻酔を施して解剖台上に固定し、出血を避けながら左胸部の皮膚を剥離、直接心臓に針を刺して採血した。但しこの場合の取量は余り多くを望めない。マウス 1 匹宛について電気泳動と沈降反応を同時に検する事は血液の量的関係から不可能なので、後者については感染 11 週目に、沈降反応を行い得る血清量が得られた 9 例のみについて行つた。尚マウスの血液は極めて溶血し易いので、採血後の操作は特に慎重に行い、血清分離も遠心分離を避けて氷室に静置後、血清の自然分離をまつて使用に供した。

## 実験成績

### 1. ツベルクリン足蹠反応の時間的推移

感染マウス 60 匹、正常対照マウス 30 匹について左右足蹠交互にツ反応を行い、12 週間に亘つて反応の

進展を観察した。第1表から第6表までは各群ごとにその成績を示したものである。その経過を見るに第1, 第2週には陽性成績を示したものはなく、第3週には1例のみツ反応が現われ、第4週に至つて半数が陽性に転化、以後次第に陽性率を増加し、9週まで最高率を保つた後漸次減少の傾向を見せている。この経過を1つの表

第1表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物番号	1 群	
		1W.	2W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
対 照 群 (無 処 置)	1	-	-
	2	-	-
	3	±	±
	4	-	-
	5	-	-

第2表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物番号	2 群	
		3W.	4W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	11	-	±
	12	±	+
	13	+	+
	14	±	+
	15	±	±
	16	-	-
	17	-	±
	18	±	+
	19	-	±
	20	-	+
対 照 群 (無 処 置)	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-

第3表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物 番号	3 群	
		5W.	6W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	21	±	+
	22	+	+
	23	+	+
	24	+	+
	25	±	±
	26	±	±
	27	±	+
	28	-	±
	29	+	+
	30	+	+
対 照 群 (無 処 置)	11	±	±
	12	-	-
	13	-	-
	14	-	-
	15	-	-

第4表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物 番号	4 群	
		7W.	8W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	31	±	±
	32	+	±
	33	+	+
	34	±	±
	35	+	+
	36	±	+
	37	+	+
	38	+	+
	39	+	±
	40	+	+
対 照 群 (無 処 置)	16	-	-
	17	-	-
	18	±	-
	19	-	-
	20	±	-

第5表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物 番号	5 群	
		9W.	10W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	41	±	±
	42	+	+
	43	+	+
	44	+	±
	45	+	+
	46	+	+
	47	+	+
	48	±	+
	49	+	+
	50	±	±
対 照 群 (無 処 置)	21	±	±
	22	-	-
	23	-	±
	24	-	-
	25	-	-

第6表 ツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	動物 番号	6 群	
		11W.	12W.
感 染 群 (Ravenel 0.001 mg 静注)	51	+	+
	52	+	+
	53	-	-
	54	+	+
	55	+	+
	56	±	±
	57	+	±
	58	+	+
	59	+	+
	60	±	±
対 照 群 (無 処 理)	26	±	±
	27	-	-
	28	±	±
	29	-	-
	30	-	-

に經め各週ごとにツ反応陽性率を示して見ると第7表の如くなる。表に示した如くツ反応陽性率は第4週、第5週に50%、6週目に70%となり、7週から9週まで最高の90%を示したが10週目には80%、12週目に

は70%と以後次第に陽性率の低下して行く傾向が認められた。これに対し正常マウスにおいては時に疑陽性を示したのも若干あつたが、全経過を通じ明らかに陽性と判定されたものは1例もなかつた。

第7表 感染後の経過とツベルクリン足蹠反応の進展

群別及前処置	使用数	反応程度	感 染 後 の 経 過											
			1 群		2		3		4		5		6	
			1W	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
感 染 群 (Ravenel 0.001mg 静注)	60	-	10/10	10/10	5/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10
		±	0/10	0/10	4/10	4/10	4/10	3/10	1/10	1/10	1/10	2/10	1/10	2/10
		+	0/10	0/10	1/10	5/10	5/10	7/10	7/10	6/10	7/10	7/10	7/10	6/10
		++	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	3/10	2/10	1/10	1/10	1/10
		十以上の 比陽性率	0.0	0.0	10.0	50.0	50.0	70.0	90.0	90.0	90.0	80.0	80.0	70.0
対 照 群 (無処置)	30	-	4/5	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5
		±	1/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5	2/5	0/5	1/5	2/5	2/5	2/5
		+	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		++	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		陽性率	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

## 2. 結核マウス血清の電気泳動成績

Ravenel 株感染後 8 週目に行つたツ反応が陽性成績を示した 31 匹のマウスについて、その血清を濾紙によつて電気泳動し、各血清分層の percentage を求めた。無処置対照 10 匹の成績と共にこれを纏めたものが第 8 表である。表の如く動物の個体差は可なり大きく、個々の値は相当の変動を認めるが、大体の傾向としては第 9 表に見る如き albumin の比較的減少と  $\beta$ -globulin の増量とを感染群マウスにおいて認める事が出来た。即ち第 9 表の数値は第 8 表記載の各測定値から算術平均を求めたものであるが、 $\alpha$ -globulin 及び  $\gamma$ -globulin に殆んど差が見られないのに反し、 $\beta$ -globulin においては対照群の 19.4% に対し感染群は 24.9% と増加を来たし、従つてこの分だけ感染群には albumin の減少を来たしている。

## 3. 結核マウス血清の沈降反応

沈降反応を行うには濾紙電気泳動を行う場合より多量の血清を要するので両者を同時に行う事が出来ず、沈降反応は時期をずらし感染 11 週後に実施したが、それでも反応を行い得るだけの血清量が採取されたのは第 10 表に掲げた例に過ぎなかつた。かくの如く少数例ではあるが、第 10 表から明らかな事はマウスの血清も陽性の沈降反応を示すことである。但しその力価は余り高くない。今回の例において最高の価を示したのは 8 倍稀釈までで他はすべて 4 倍以下であつたが、陽性を示した反応自身は疑う余地のないはつきりしたものであつた。

## 考 察

結核マウスのツベルクリン・アレルギーに就いては従来これを否定する成績が多かつたが、Gray & Jennings<sup>4)</sup>の成績及びこれを追試した著者らの成績は、マウスにも亦他の動物と同じくツ反応の出現することを明らかに示したものである。同時に又今回の実験は、先に教室の新明ら<sup>5)</sup>が行つた実験における弱点、即ち彼らの観察したツ反応がツベルクリンの反復注射によつて招来されたものではないかと云う疑義を取り除いたものである。著者らの行つた実験によればツ反応は結核感染後 4 週目位から現われはじめ、大体 6 週から 7 週にかけて殆んどすべてマウスが反応陽性となり、9 週前後まで最高率を保つた後次第に陽性率が低下して行つた。この成績は観察方法を異にするにも拘らず新明らの成績と全く一致するものであつた。本実験において 12 週目における陽性率は尚 70% を示し、爾後暫くは相当高率の反応を保つように思われたが、この時期になると結核死するマウスも現われて来るため、12 週をもつて実験を打切つた。従つてその後ツ反応がどの様な経過を取るかについては明らかにし得ないが、Gray & Jennings<sup>4)</sup>によればツベルクリン足蹠反応は 30 週あるいはそれ以上にも亘つて持続すると云う。かくの如く従来ツベルクリンに対し感受性がないと考えられていたマウスも、適当な方法によつてツ反応を検するならば決して他の動物と異なるものではない事が明らかになつた。緒言の項にも述べた如く、マウ

第8表 濾紙電気泳動によるマウス血清蛋白分層測定値

動物 番号	T.P. g/dl	ツ反応	Percentage of Total Protein				備 考
			Albumin	$\alpha$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.	
1	5.8	-	35.5	20.3	17.4	27.2	正常マウス
2	5.6	-	44.3	11.4	15.0	29.0	〃
3	5.4	-	36.4	13.4	24.2	25.9	〃
4	5.4	-	37.2	17.7	21.3	23.7	〃
5	5.6	-	45.0	20.0	15.4	19.5	〃
6	4.6	-	36.5	21.4	19.3	22.8	〃
7	5.0	-	40.6	12.7	18.5	28.2	〃
8	5.0	-	35.1	18.1	25.6	21.1	〃
9	5.4	-	51.7	12.6	14.9	20.8	〃
10	5.2	-	37.4	18.6	22.9	21.1	〃
1	5.6	+	32.7	18.7	22.8	25.8	結核マウス
2	5.8	+	47.2	9.0	25.1	18.7	〃
4	6.6	+	36.5	14.5	25.7	23.3	〃
5	5.4	+	39.9	13.6	19.6	26.9	〃
6	6.2	+	33.1	9.4	22.4	34.7	〃
7	6.6	+	39.1	16.1	29.0	16.1	〃
8	7.0	+	34.1	15.6	20.1	30.2	〃
9	5.6	+	43.8	14.4	20.6	21.2	〃
12	6.0	+	35.4	15.0	26.9	22.7	〃
13	5.8	+	40.8	13.4	17.3	28.4	〃
14	5.8	+	43.5	13.0	23.5	20.0	〃
15	5.4	+	42.3	12.8	17.0	27.9	〃
17	6.2	+	43.0	8.6	27.8	20.6	〃
18	5.8	+	33.9	12.9	24.5	28.7	〃
19	5.4	+	34.9	16.4	24.1	24.6	〃
20	6.2	+	28.5	18.8	31.7	21.0	〃
21	5.6	+	40.6	20.0	21.1	18.2	〃
22	5.8	+	36.1	19.0	21.8	23.1	〃
23	6.0	+	37.7	12.9	24.1	25.3	〃
24	6.2	+	38.6	14.1	22.6	24.6	〃
27	5.8	+	28.5	19.2	27.7	24.6	〃
29	5.6	+	29.9	17.1	19.3	33.7	〃
32	6.0	+	25.4	10.5	29.3	34.8	〃
33	6.0	+	37.2	13.3	24.1	25.1	〃
34	6.0	+	37.2	15.2	22.7	24.9	〃
35	5.6	+	28.9	17.7	30.1	23.3	〃
36	6.2	+	34.5	10.2	28.5	26.8	〃
37	6.2	+	31.1	14.9	29.3	24.7	〃
38	5.2	+	24.1	17.5	29.5	28.9	〃
39	5.0	+	29.1	16.7	26.8	27.4	〃
40	5.8	+	33.7	12.4	23.0	30.9	〃

第9表 濾紙電気泳動によるマウス、結核マウス血清蛋白分層測定値の比較

血清	血清蛋白各分層			
	Albumin	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin
対 照 群	40.0%	16.6%	19.4%	24.0%
感 染 群	35.5	14.2	24.9	25.4

スが結核に対し免疫を獲得するにも拘らず従来の方法ではツ反応が発現しなかつた事から、アレルギーと免疫を無関係な現象と考え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つの修正を与えた事になるであろう。マウスに現われるツ反応が確かに delayed type のアレルギー反応であるか否かにつ

第 10 表 結核マウス血清の沈降反応

抗体価					
動物番号	2 倍	4	8	16	ツ反応
41	+	+	±	-	+
42	++	+	+	±	++
44	+	±	-	-	+
45	+	±	-	-	+
46	+	±	-	-	+
48	-	-	-	-	+
67	+	±	-	-	+
68	±	-	-	-	+
69	++	+	±	-	+

いは新明らが病理組織学的に調べているので今回は特に調べなかつたが、彼らの成績によれば海狸、家兎等に見られるツ反応と組織学的に全く同一のものである事が証明されている。

著者らはその代りにツ反応を実施したマウスの血清について電気泳動的な研究と沈降反応とを行つた。結核血清についてその電気泳動像を調べた研究は甚だ多いが、マウスの血清に関するものは殆んど見当らないけだしマウスの血清は検査に必要な量を十分に得ることが難しい為であろう。著者らはツ反応陽性の結核マウスにつき個々の血清からそれぞれ血清蛋白百分の *percentage* を求め、正常マウスのそれと対比して見た。その結果は第 8 表に見る如く正常群感染群共マウス間にかなりの個体差はあつたが、平均して見ると第 9 表の如き成績が得られた。

繼つて結核動物について先人の行つた電気泳動の研究を眺めて見るに、その成績は可なり区々で必ずしも一致した結果は得られていない。例えば金上<sup>9)</sup>によれば人型結核菌感染家兎においては  $\gamma$ -globulin と同時に  $\beta$ -globulin が増加すると云い、岡田<sup>9)</sup>は海狸において  $\alpha$ -globulin と同時に  $\beta$ -globulin の増量を認めている。又森川<sup>10)</sup>及び目黒・森川<sup>11)</sup>は micro-Kjeldahl 法によつて計つた総蛋白量から単位血清における各分層の絶対量を求めた結果、BCG 感作家兎においては次第に総蛋白量を増加して行くが、その中特に  $\gamma$ -globulin が顕著な増量を示し  $\alpha$ -及び  $\beta$ -globulin の増量は著明でなかつたと報じている。かくの如く得られた成績は色々であり一概に結論を与えることは困難であるが、著者らが用いた 31 匹と云う比較的多数を平均した成績によれば上述の如く albumin の減少と  $\beta$ -globulin の増加が認め得られた。この場合厳密に云うならば、正常群、感染群の比較は同一マウスについて感染前及び感染後の比較を行うべきであるが、マウスについてかかる検討は不可能に近

いので本実験の如き統計的な観察をもつてこれに代えざるを得なかつたのは止むを得ない。

一方マウスの沈降反応については極めて報告が少く、少くとも個々のマウス血清について抗体価を測定した報告はこれまで皆無と思われる。ここに集めた例は僅か 9 例の少数ではあるが、マウス血清にも明らかに結核に対する沈降反応が見られることを実証した点において意義があると思う。得られた抗体価はさほど高いものではなかつたが、感染菌量が 0.001 mg と云う少量であるから、もう少し大量を感染せめた場合についても力価を測定して見なければ、他の動物に比しマウスが抗体の現われ難い動物であるか否かは分らない。又今回の例だけでは沈降反応による抗体価とツ反応との関係についても言及する事は不可能である。今後はこの点を追求すると共に、従来マウスに関しては血清学的な報告が少い点に鑑み、更に多数の例を集めて沈降反応並びに補体結合反応を行い、他の動物と比較して見たいと考えている。

## 結 論

1) 25 倍稀釈旧 ツベルクリンをもつて結核マウスの足蹠部皮内にツ反応を行うと、従来 naturally anergic と考えられていたマウスにも皮膚アレルギーを惹起せしめることが出来る。

2) ツ反応発現の時期に関しては、感染後 4 週目頃より約半数に陽性転化が認められるが、大多数が陽転するのは大体 7 週間後で、この状態は 9 週目頃まで続き、10 週目頃より漸次陽性率は低下する傾向が見られた。

3) 結核マウスの血清を濾紙により電気泳動して見ると、正常マウスに比し albumin の比較的減少と  $\beta$ -globulin の増加が認められた。

4) 結核マウスの血清は結核菌の中性加熱菌体抽出液に対して陽性の沈降反応を示す。

## 引用 文 献

- 1) Römers, S.: Beitr. z. Exp. Therap. 6, 1, 1903.
- 2) Hart, P. D'A., Long, D. A. & Rees. R. J. W.: Brit. Med. J., 680, 1952.
- 3) Kirchheimer, W.F. & Malkiel, S.: Am. Rev. Tuberc. 68, 629, 1953.
- 4) Gray, D.F. & Jennings, P. A.: Am. Rev. Tuberc., 72 (2), 171, 1955.
- 5) 新明美仁・高橋和男・橋本徹二・小林豊司: 結核の研究, 第 8 集, 50, 1958.
- 6) 信太隆夫・平野五郎・石山司浪: 結核の研究, 第 7 集, 32, 1957.
- 7) 大原達・中川駿一郎: 東京医事新誌 68 (12), 5, 昭 26.
- 8) 金山晴夫: 抗酸菌病研究雑誌 4, 163, 1953.
- 9) 岡田 博: 生物物理化学, 1, 143, 1953.
- 10) 森川和雄: 結核の研究第 3 集, 1, 1953.
- 11) Megro, H. & Morikawa, K.: Jap. J. Tuberc. 2 (2), 229, 1954.