



Title	結核死菌の免疫原性に関する研究：特に紫外線照射死菌の呼吸とマウスに対する免疫効果との関係について
Author(s)	高橋, 和男; TAKAHASHI, Kazuo
Description	
Citation	結核の研究, 12, 81-91
Issue Date	1960-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26691
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_P81-91.pdf



結核死菌の免疫原性に関する研究

特に紫外線照射死菌の呼吸とマウスに対する 免疫効果との関係について

高橋和男

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(昭和 34 年 11 月 20 日受付)

結核予防における BCG の効果を今日疑うものは無いが、同時にまた、これが生菌である為にワクチンとして諸種の制約を持つていることも、決して否定する事は出来ない。予防ワクチンの理想から云えば、結核の場合にも死菌免疫が望ましい事は云うまでもなく、BCG のすぐれた効果が統計的に証明されているにもかかわらず、古くから死菌による結核免疫の研究がたゆみなく続けられてきた所以もここにある。文献を尋ねて見ると、この様な研究は、すでに古く Koch の結核菌発見の直後から始まっている。然しその後、今日までに行なわれた枚挙に遑ない程の研究の結果は必ずしも一致した結論に到達せず、死菌免疫の効果を否定するもの^{2)~22), 92)}と、肯定するもの^{1), 23)~69)}とがほぼ相半ばしている。古来、結核免疫は「感染免疫」の名をもつて呼ばれ、生菌を用いなければ明確な免疫は得られないものとされていた。この考えは次第に訂正されるようになり、中には BCG 生菌に勝る免疫効果を死菌免疫に認めた報告^{45) 57) 58) 69)}さえあるが、然もなお一般的に云うならば、死菌免疫の効果は BCG 免疫に及ばないとみるのが常識であろう。^{50), 70)~72)}但し死菌ワクチンの効果については殺菌方法及び接種方法がかなり成績を左右するらしく、この点に関する研究も甚だ多い。即ち殺菌方法については加熱の外に formal^{57) 58), 73)~77)}, phenol^{47) 62)~64), 78)~80)}, 紫外線^{22) 69), 81)~84) 92)}, 尿素^{26) 85) 86)}, 超音波^{87)~89)}, その他^{53) 54) 76) 90) 91)}が試みられており、接種方法に関しては route の選択や adjuvant の利用などが研究されている。これらの成績は甚だ区々で、殺菌方法の優劣は暫く措く事とし、問題を紫外線照射死菌だけに限つてみても、その効果は BCG 生菌に勝るとなすもの⁶⁹⁾もあれば、同等と評価するもの^{82) 84)}もあり、更には全く無効と主張するもの^{22) 92)}もあつて我々はその判断に迷わざるを得ない。かくの如き成績の不一致は何に基因するものであろうか?。これに対

しては、後に考察の項で触れる如き種々雑多な要因を挙げ得るであろう。然しその要因の 1 つとして、同じ死菌の中にも色々な gradation のあることを考える必要があるように思う。著者はこの実験において、紫外線照射や凍結融解によつて殺した結核菌の中には、増殖能を失つてもなお呼吸、其の他の metabolic activity を保つているもののある事を知つた。このような死菌と、すべての生命現象を失つた死菌との間には、免疫効果において差が現われても不思議ではない。本実験はこのような metabolic activity と免疫原性との間に何らかの関係が存在するか否かを調べる目的で行われたものである。

一方、結核菌の呼吸乃至物質代謝に関するこれまでの報告をみるに、生菌についてこれを調べた報告は夥しい数に上るが死菌またはその過程にあるものを対象とした報告は甚だ少ない。よつて著者は加熱、紫外線照射、及び凍結融解の三者による結核菌の致死過程を、定量培養と酸素吸収能の両面から比較追究した後、さらに紫外線照射菌について TCA cycle 関与物質を基質とした場合の酸素吸収能を調べ、併せてマウスに対する免疫効果を challenge 後の生存日数によつて BCG 生菌と比較した。死菌の免疫原性とその metabolic activity との関係については予期以上に clear-cut な成績が得られ、従来の死菌免疫実験に見られた成績の不同に対し、1 つの説明が与えられたと考えるので、以下に実験の詳細について報告したいと思う。

実験材料及び実験方法

i) 使用菌株 人型毒力菌 H₃₇Rv 株、同仲野株、人型無毒力菌 H₃₇Ra 株、BCG 予研株、鳥型菌竹尾株及び M. phlei の 6 株を使用した。いずれも当研究所保存のもので、Sauton 培地に適当な期間培養した後、型の如き手振り法によつて菌浮遊液を作つた。

ii) 紫外線照射 内径 85mm のペトリ皿に40mg/ml (wet weight) の菌液を 5ml づつ分注し、マツダ製 0.3A. 19W の紫外線殺菌灯 (波長 2537 Å) によって 20 cm の距離から菌液を振盪しつつ紫外線を照射した。照射時間は 1 分から 15 分に至る間とし、各分ごとに紫外線の菌に与える影響を調べた。

iii) 加熱 菌浮遊液を 1.5 ml づつ中型試験管に分注し、色々な温度 (5°C の間隔で 40°C~70°C に至る間) にした water bath に色々な時間 (1 分より 30 分に至る間) 浸し、その間随時振盪を行った。

iv) 凍結融解 同じく菌液を 1.5 ml づつ中試験管に分注、これを -180°C の液体空気中に入れて凍結後、37°C の water bath につけて融解せしめた。この操作は 1 回から 20 回まで繰返した。

v) 紫外線照射菌の基質添加時における酸素吸収測定 人型菌 H₃₇Rv 株に 8 分間紫外線を照射した後、これに 1/15 M のリンゴ酸、フマル酸、コハク酸、乳酸及び醋酸 (いずれも NaOH によって pH 7.0 に調整) を基質として加え、型の如く Warburg 検圧計によって酸素吸収量を測定した。なお乳酸を基質とした場合のみは、H₃₇Rv 株の他に鳥型菌竹尾株及び M. phlei についても測定を行った。

vi) 紫外線照射菌によるマウスの免疫試験

(a) 免疫法。総数 84 頭のマウス (市販のスイス系白色マウス、体重 18g 前後) を 6 群に分ち、第 1 群には紫外線 8 分照射 H₃₇Rv 死菌、第 2 群には同じく 15 分照射死菌、第 3 群には紫外線 8 分照射 BCG 死菌、第 4 群には同じく 15 分照射死菌、第 5 群には BCG 生菌をそれぞれ 1 mg づつ (液量 0.5 ml) 腹腔内に接種して動物を免疫し、第 6 群は対照として同量の生理食塩水を接種した。

(b) 免疫効果の判定。上記の免疫操作後 5 週目に全動物を challenge して median survival time (ST₅₀) を求め、これによって各ワクチンの効果を判定した。Challenge に用いた菌株は毒力の安定した牛型菌 Ravenel 株で、感染菌量は 1 mg (液量 0.2 ml)、接種場所は静脈内である。ST₅₀ の測定は Litchfield⁹³⁾ の方法に従った。なお免疫試験に用いた紫外線照射死菌は、すべて同時に培養と海狸接種を行い、死菌である事を確かめた。

実験成績

実験 1. 紫外線照射による生存菌数及び酸素吸収能の時間的消長について。

被検菌 6 株に色々な時間紫外線を照射し、時間を追ってその酸素吸収能と生菌数とを調べた結果は図 1、図 2、

図 3 に示す如くである。図 1 は鳥型菌竹尾株と M. phlei についての実験値を plot したものであるが、この両菌株は大体類似した成績を示し、5 分から 7 分の紫外線照

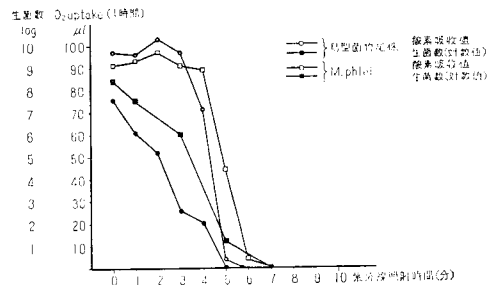


図 1 鳥型菌竹尾株, M. phlei に及ぼす紫外線照射の影響

射によって生菌数も酸素吸収量も共に殆んど零となつた。然し生菌数の減少と酸素消費量の減少とはその経過において多少異なつており、前者が照射時間に比例して漸次減少して行くのに反し、後者は最初減少の度合が緩徐で後半になつて急激に消失する傾向を示した。即ち鳥型菌竹尾株は 4 分間照射によって約 1/4, M. phlei は同じく約 1/5 だけ酸素吸収を阻害されたに過ぎなかつたが、その後において図の如き急激な減少を見せている。図 2 は BCG 予研株と人型菌 H₃₇Ra 株についての成績を示したもので、生菌数から見た両菌株の抵抗は図 1 の 2 株とはほぼ同様であるが、呼吸から見た抵抗はそれらよ

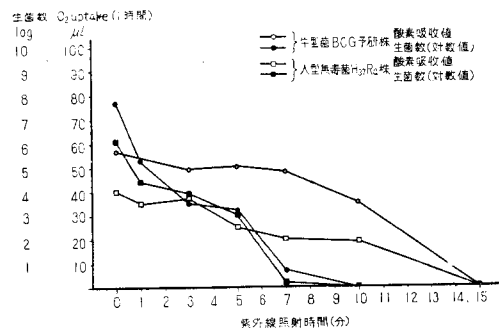


図 2 牛型菌 BCG 予研株と人型無毒菌 H₃₇Ra 株に及ぼす紫外線の影響

りかなり強く、酸素吸収能が完全に零となるには約 15 分の紫外線照射を必要とした。図 3 は人型菌 H₃₇Rv 株と仲野株の成績で、生菌数を見ると前者は 8 分、後者は 10 分照射によつてすべて死菌となつたが、酸素吸収能は図 2 の場合と同じく 15 分まで保たれていた。

このように菌の死滅即ち増殖能の消失と酸素吸収能の消失との間には、時間的な gap が存在する。即ち一定時間以上紫外線の照射を受けると、増殖能も酸素吸収能も共に消失するが、その以前において、図 2、図 3 の如く

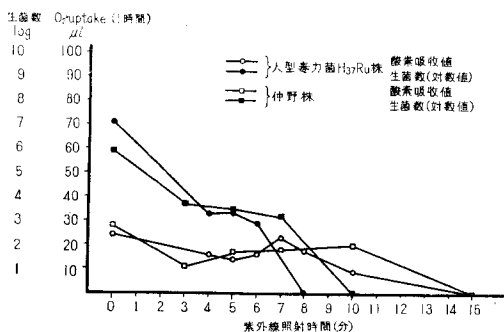


図 3 人型毒力菌 H₃₇Rv 株 仲野株に及ぼす紫外線照射の影響

増殖能は失われてもなお酸素吸収能を保有している時期が認められる。特に著明なのは図 2 の場合で、紫外線 10 分照射によつて完全に死滅した菌でも、50%~60% の酸素消費能が残されていた。一般に人型菌、牛型菌はかかる gap が著明で、鳥型菌及び M. phlei においてはさほどこれが明らかでなかつた。

実験 2. 加熱による生存菌数及び酸素吸収能の時間的消長について。

菌の増殖能及び酸素吸収能に及ぼす加熱の影響を時間的に調べた成績は図 4 から図 9 までに示した。図 4 は

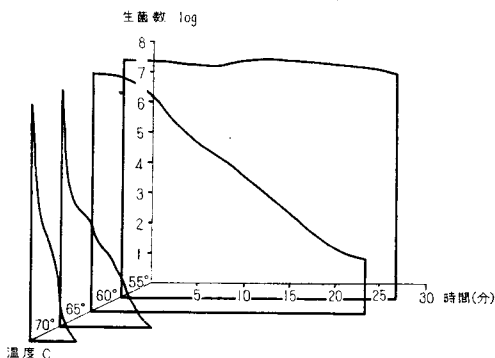


図 4 鳥型菌竹尾株に及ぼす加熱の影響 (生菌数一対数値)

55°C, 60°C, 65°C, 及び 70°C の熱を加えた場合の鳥型菌の増殖能を示したもので、温度が 55°C の場合には 30 分加熱によつても殆んど生菌数は変化しないが、60°C になると漸く効果を示しはじめ、65°C 以上では極めて短時間の加熱で菌は死滅した。これに対し酸素吸収量の変化は、図 5 に示した如く、55°C まではやや刺激が見られ、60°C 以上になつて急激に酸素吸収能の減少が見られた。図 6, 図 7 は M. phlei, 図 8, 図 9 は人型菌 H₃₇Rv 株についてそれぞれ上と同じことを調べた成績であるが、阻害を示す温度及び程度に若干の差があると

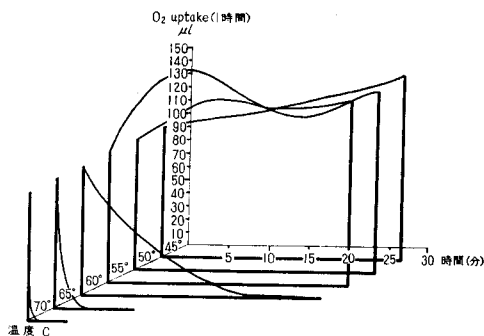


図 5 鳥型菌竹尾株に及ぼす加熱の影響 (酸素吸収値)

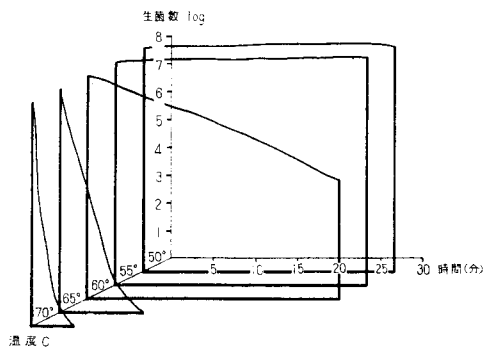


図 6 M. phlei に及ぼす加熱の影響 (生菌数一対数値)

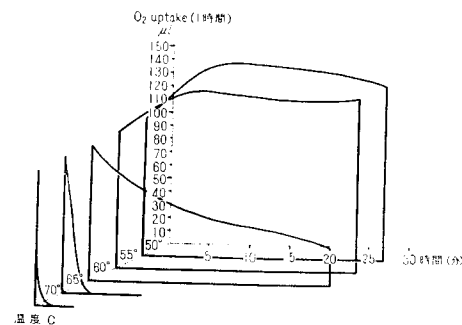


図 7 M. phlei に及ぼす加熱の影響 (酸素吸収値)

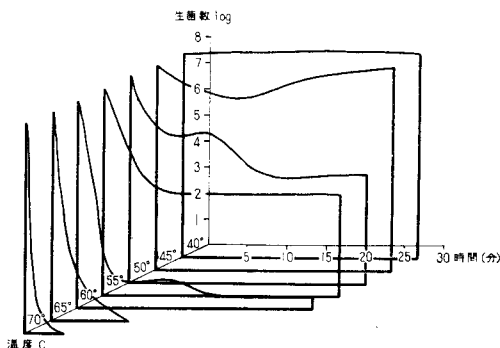


図 8 人型毒力菌 H₃₇Rv 株に及ぼす加熱の影響 (生菌数一対数値)

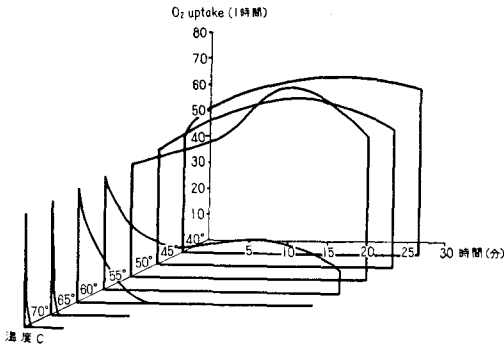


図9 人型毒力菌 H₃₇Rv 株に及ぼす加熱の影響 (酸素吸収値)

は云え、傾向としてはすべての菌株が同様な成績を示している。即ち紫外線照射の場合と異なり、加熱によつて菌を殺す場合には、増殖能の消失と酸素吸収能の消失との間に時間的な gap がみられず、大体においてこの2つの能力は、同一加熱条件により、略々時を同じうして消失する事を知つた。また熱に対しては、紫外線の場合に較べると菌株間の抵抗の差が殆んどみられなかつた。

実験 3. 凍結融解の反復による生菌数及び酸素消費能の消長について。

鳥型菌竹尾株、*M. phlei* 及び H₃₇Rv 株について凍結融解を1回から20回まで繰返し、回を追つて試料中の生菌数及び酸素消費能を測定した。結果は図10に示す如くである。鳥型菌竹尾株及び人型菌 H₃₇Rv 株では、

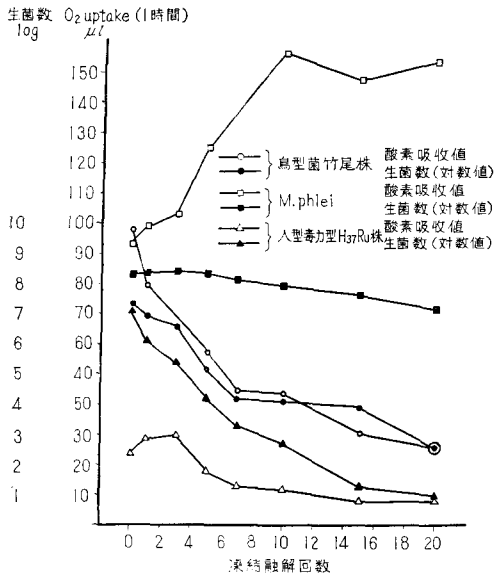


図10 凍結融解の生菌数及び酸素吸収値に及ぼす影響

生菌数、酸素吸収量とも凍結融解の回数に比例して平行的に減少したが、*M. phlei* はこれらと甚だ異なる態度を示し、凍結融解20回に至るまで全く阻害の影響を受けなかつた。即ち生菌数はやや減少したが酸素吸収量はかえつて増量を示し、10回の凍結融解で無処置菌の約1.5倍となり、20回の凍結融解までこの値は殆んど変らなかつた。

かくの如く凍結融解の菌に与える致死効果には、菌株による差異がかなり強く認められる。*M. phlei* の如く極端な抵抗性を示す菌株が見られた事は凍結融解の致死作用が他の因子のそれと相当異なつたものである事を示すものと思われる。

実験 4. 紫外線照射菌の酸素吸収能に及ぼす数種の TCA cycle 関与物質の影響について。

紫外線を8分間照射した人型毒力菌 H₃₇Rv 株の死菌浮游液に、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、醋酸を基質として加え、それぞれの場合について酸素吸収量を測定した。その成績は図11の如くである。即ち紫外線照射を行つた菌と行なわない菌について基質を加えずに酸素吸収を測定した対照と較べ、基質を加える事によつて照射、非照射菌間の酸素吸収比が変化したのは乳酸添加の場合のみで、他の基質を加えた場合には紫外線の影響を受けたと考えられるような結果は見られなかつた。紫外線照射菌に乳酸を加えても酸素吸収量の増加が見られなかつた事は、乳酸々化酵素系または乳酸脱水素酵素系のみが紫外線によつて強い影響を受けたことを示すものと考えられる。

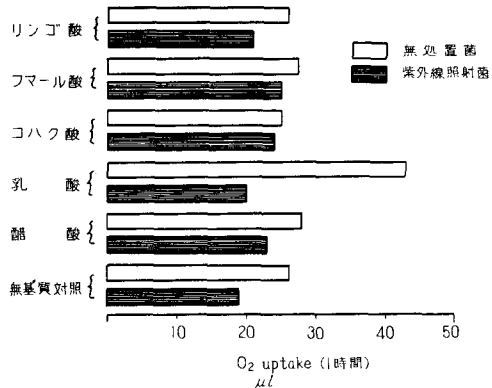


図11 TCA cycle に関与する物質の紫外線照射菌酸素吸収に及ぼす影響 (人型毒力菌 H₃₇Rv 株)

実験 5. 紫外線照射菌及び凍結融解菌の酸素吸収に及ぼす乳酸の影響について。

紫外線照射は乳酸々化に強い影響を与えることを知つたので、次にその時間的推移を調べると共に、凍結融解

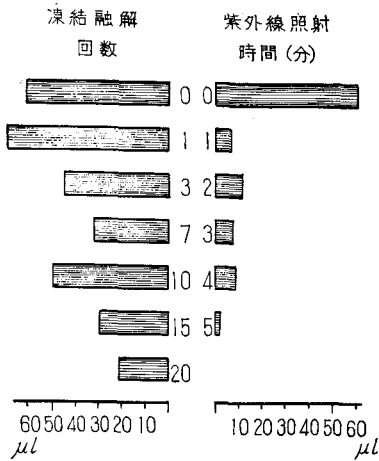


図 12 紫外線照射及び凍結融解による乳酸々化度の変化 (鳥型菌竹尾株)

註: 横軸は乳酸添加時の酸素吸収量と内呼吸量の差を示す。

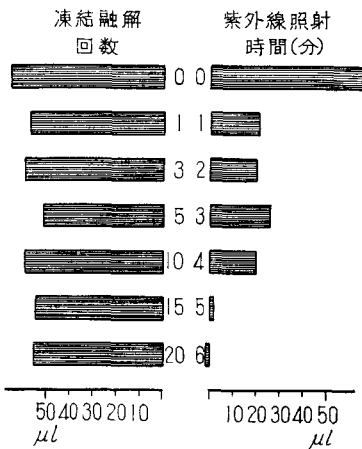


図 13 紫外線照射及び凍結融解による乳酸々化度の変化 (M. phlei)

もまた乳酸々化に影響を与えるかどうかを調べてみた。図 12 は鳥型菌竹尾株についての成績である。竹尾株の場合、乳酸を基質として加えた場合と加えなかつた場合の酸素消費量は、その差が 62 μl あつたが、1 分間の紫外線照射によつてすでにこの値は著明な減少を示し、基質を加えなかつた場合と殆んど同程度の差しか見られなかつた。即ち乳酸の酸化は紫外線照射によつて極めて短時間内に低下する。これに反し菌に凍結融解を繰返した場合には、その回数が進んでも乳酸の酸化は相当高いまま保たれていた。図 13 は M. phlei, 図 14 は人型菌 H₃₇Rv 株についての成績でいづれもこれと同様の結果がみられている。

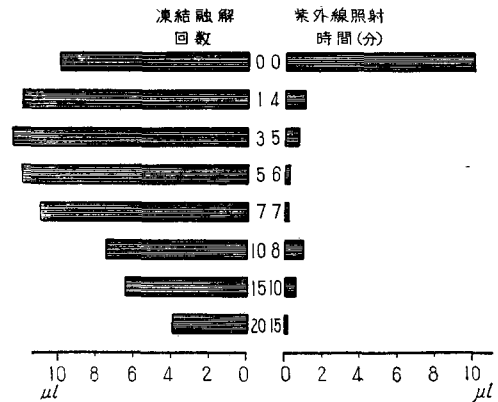


図 14 紫外線照射及び凍結融解による乳酸々化度の変化 (H₃₇Rv 株)

実験 6. 紫外線照射死菌のマウスに対する免疫効果について。

紫外線照射によつて増殖能は失われたが、なお酸素吸収能は残されている状態の死菌と、後者まで完全に失われた死菌とのマウスに対する免疫効果を BCG 生菌のそれと比較した。結果は表 1 の如くである。即ち免疫後 5 週目に牛型毒力菌 Ravenel 株 1 mg をもつて動物を

表 1 紫外線照射死菌のマウスに及ぼす免疫効果

群	免疫菌株及び量	紫外線照射	酸素吸収値	生菌数	感染菌株及び量	ST ₅₀
第 1 群	H ₃₇ Rv 1.0 mg	8 分	19 μl	0	Ravenel 1.0mg	44
第 2 群	H ₃₇ Rv 1.0 mg	15 分	0 μl	0	Ravenel 1.0mg	30
第 3 群	BCG 1.0 mg	8 分	34 μl	0	Ravenel 1.0mg	30
第 4 群	BCG 1.0 mg	15 分	0 μl	0	Ravenel 1.0mg	30
第 5 群	BCG 1.0 mg	0 分	56 μl	6.9 × 10 ⁷	Ravenel 1.0mg	43
第 6 群	無 処 置 対 照				Ravenel 1.0mg	30

challenge してみると、免疫しない対照（第 6 群）の median survival time (ST₅₀) が 30 日であつたのに対し、BCG 生菌で免疫したマウスの ST₅₀ は 43 日、8 分間紫外線照射の H₃₇Rv 死菌で免疫したマウスの ST₅₀ は 44 日で、この 2 群のみに生存日数の延長が認められ、他の 3 群はどれも対照と差のある成績を示さなかつた。この実験において、菌の酸素吸収能と免疫効果との間には興味ある関係が見出される。即ち同じ H₃₇Rv 株の死菌であつても、紫外線 8 分照射菌の如く未だ酸素吸収能を保有するものには免疫効果が認め得られ、紫外線 15 分照射菌の如く、すでにこの能力を失つたものにはかかる効果を期待し得ない。且また死菌ワクチンの効果は菌株による差違がきわめて大きく、たとえ酸素吸収能は残されていても、BCG の如き弱毒株の死菌には免疫賦与力が全く認められなかつた。なお median survival time の測定は前述の如く Litchfield⁹³⁾ の方法に従つたもので、図 15、図 16 の如き正規確率紙上に各群マウスの累積死亡率を plot して ST₅₀ を求めた。図から明らかなように、第 1 群（紫外線 8 分照射 H₃₇Rv 株

接種群）と第 5 群（BCG 生菌接種群）のみが他の群と有意な差を示している。

綜括ならびに考案

紫外線照射及び加熱は最も簡単な殺菌方法として、また凍結融解法は同じく簡単な酵素抽出法として、細菌学の分野では屢々利用される方法である。然しこのような処置を受けた菌について呼吸乃至物質代謝を調べた報告は非常に少ない。本実験は、上記の操作による結核死菌及び死滅過程にある結核菌の酸素吸収能を調べ、死菌の免疫原性と、その菌の保有する酸素吸収能との間には一定の関係があることを見出したものである。以下今回の実験成績を綜括しつつ、若干の考察を加えてみたいと思う。

紫外線の殺菌機序については未だはつきりした定説を得ていないが^{94)~102)}、比較的短時間の照射によつて菌の増殖能は失われるにも拘わらず、なお酸素吸収能を保有するものが見られた事は注目し得る。この事は一見紫外線の致死作用と酸素吸収能との間に関係の無い事を示すようにも思えるが、然しこれに TCA cycle 関与物質を加えて見ると、正常な菌と異なつて乳酸化機能が極端に低下している事を認め得る。この場合、乳酸以外の基質を加えてみても殆んど変化はみられない。この成績からみると、紫外線は TCA cycle を構成する環の一部である乳酸化酵素または脱水素酵素に何らかの変化をあたえ、その結果としてこの環を中途において切つてしまうものと考えられる。この際紫外線照射の時間が短かければ、その変化が可逆的であるために菌の死滅は比較的少ない。然し照射時間が長びくと遂には不可逆的な変化を与え、そのために菌は以後の増殖力を得る事が不可能となつてくる。それにも拘わらず酵素系のあるものは未だ破壊されずに残つているので、死菌の状態となつた菌でもその後一定時間は酸素吸収能を保持しているのであろうが、若し照射が更に続くならば、遂には終末呼吸系全体が破壊されるか、或いは代謝系の一部が断たれ、そのためにおこる特定の中間代謝産物の飢餓状態により、酸素吸収値もまた零とならざるを得なくなるものと考えられる。この場合乳酸化に関してはすべての strain に共通して低下が認められた事から推して、乳酸化系または脱水素酵素系は特に紫外線照射に対して破壊されやすいものと考えて差支えなからう。紫外線照射に対する抵抗力と菌の毒力との間に、はつきりした関係を見出し得なかつたが、非病原性の *M. phlei* と鳥型菌竹尾株の 2 株は、他の 4 株に較べて幾分紫外線に対する抵抗力が弱いように思われた。若し紫外線に対し、真に非病原

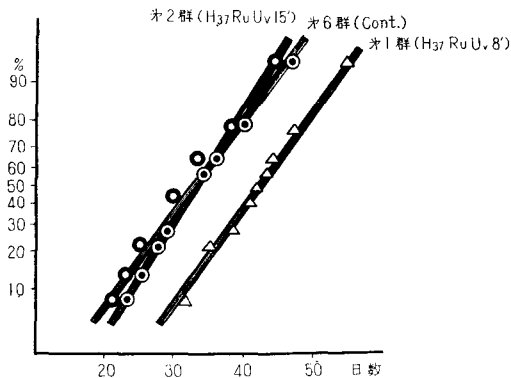


図 15 紫外線照射人型毒力菌 H₃₇Rv 株のマウスに及ぼす免疫効果

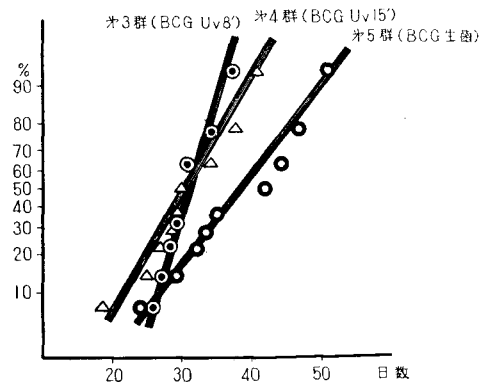


図 16 紫外線照射及無照射牛型 BCG 予研株のマウスに及ぼす免疫効果

性の strain が強毒株よりも抵抗が弱いものであるならば、前者の紫外線照射ワクチンが多く of 学者によつて無効と報ぜられている原因もある程度説明し得られると思われるが、この点については更に詳細な実験結果に俟ちたいと思う。

加熱の菌に与える致死作用は大体において原形質の変性として理解し得られる。菌に熱を加えた場合、一定温度以下の加熱は菌の酸素吸収に対し刺戟的に働くが、加温が一定温度以上になると（本実験によれば 60°C~65°C 以上）菌の増殖力は奪われ、殆んどこれと同時に酸素吸収能もまた阻害される。即ち加熱殺菌の場合は紫外線照射の場合と違つて、生菌数と酸素吸収能とが、ほぼ平行する成績を示し、その為か菌株間の差は殆んどみられず、また特異な耐熱性を示すものもみられなかつた。その点からみて加熱の致死効果は、紫外線照射や凍結融解のそれに比し遙かに強烈なものと云うべきであろう。前述の如く紫外線照射の場合は、これを時間的にみると、先づ菌の呼吸系の一部のみに破壊が起り、細胞内呼吸のような生活現象の一部は、増殖力を失つた後までも一定時間続く。これに反し原形質の変化が急激に起る加熱殺菌の場合には、菌の死滅と同時に酸素吸収の如き生活現象も全くみられなくなり、しかもその変化は極めて早期から不可逆的な過程に入るものと考えられる。

一方、凍結融解に対しては極端な耐寒性を示す菌株がみられた。非病原性の *M. phlei* がこれで、鳥型菌竹尾株及び人型毒力菌 *H₃₇Rv* 株が凍結融解の回数に比例して生菌数を減少したのに対し、*M. phlei* は 20 回の凍結融解によつても殆んど生菌数に影響を受けなかつた。このように菌株間の差が比較的大きく現われた原因は明らかでないが、凍結融解によつて影響を受けると考えられる原形質、細胞膜の性状が菌株によつて異なるのではないかと想像される。然し本実験では被検株の種類が少ないため断定的な結論はくだし得ない。

結核菌の終末呼吸系に TCA cycle が関与する事は既に認められており^{108)~109)}、その他に DCA cycle の関与する事も一部の菌について報告されている¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾。著者はさきに TCA cycle 関与物質を基質とする酸素吸収値の変化について報告したが¹⁰⁸⁾、本実験では、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、醋酸等について、紫外線照射菌による酸化を測定した。その結果、乳酸を除く他の基質の酸化に関しては、紫外線照射菌と非照射菌との間に有意な差をみとめ得ず、従つてこれらの基質に働く酵素系が紫外線によつて特別な変化を受けたとは考えられないと思う。

かくの如く、菌に与える加熱、紫外線照射、凍結融解

等の影響は作用条件によつて色々であるし、また菌株によつても受ける変化は違つてくる。ことに紫外線照射によつて菌の受ける傷害は極めて区々で、Heilmets ら¹⁰¹⁾も述べている如く、紫外線の波長、照射量、菌の age、濃度、遺伝学的な特性、代謝の状態等、非常に多くの factor によつて成績を左右される。著者は結核の死菌免疫に関する古今の文献を渉猟しつつあるうちに、特に紫外線照射菌について 1 つの大きな疑問を持つに至つた。即ち、単なる培養や動物試験によつて区別し得ない死菌のうちにも、物質代謝を調べて見ると、本実験の示す如く酵素活性の残されているものと然らざるものとの 2 通りを区別し得るが、かかる酵素活性と免疫原性との間には何らかの関係があるのではないかと云う疑問である。本研究はこの点を追究する事により、従来の死菌免疫実験にみられた成績の不一致に対し、1 つの説明を加えんとしたものであるが、もとよりこれによつてすべてが解明されるものではない。免疫実験の成績を左右する因子は極めて多種多様で、次に挙げる如き色々な因子を無視出来ないからである。

第 1 に菌株の問題を挙げ得る。同じ結核菌でも strain によつて抗原構造を異にする以上¹⁰⁹⁾、その免疫原性にも差がある事は当然考えられる。また同じ抗原構造の菌であつても、培養日数、培地の種類、分離条件並びに培養条件（永年業室保存株であるか、新しく分離したものであるか、または動物を時に通過せしめたか然らざるか、等の条件）などの差により、その量的関係に相違を生ずる事もあるのであろう。本実験においても、人型強毒株である *H₃₇Rv* 株と牛型弱毒株である BCG とは同じ実験条件にも拘らず（同じ時間紫外線を照射し等しく酸素吸収能を保有するもの）、免疫原性において全く相違する態度を示した。即ち前者が BCG 生菌に匹敵する効果を示したのに対し、後者には何らの免疫効果も認められなかつた。この成績は Olson⁸²⁾、Sarber⁸⁴⁾ らの観察とよく一致しており、Olson らはこれを、紫外線によつて破壊される免疫原性物質が量的に相違するのであろうと説明している。第 2 に殺菌条件の問題を挙げ得るが、この点については既に明らかにしてきたので省略したい。また加熱、紫外線、凍結融解以外の殺菌方法に関しては諸家の成績もまちまちであるし、この実験においてはその優劣を比較し得ないので触れない事にする。

第 3 に免疫菌量と攻撃菌量、ならびに両者の相互関係を問題にしなければならない。免疫に用いられる死菌ワクチンの量が余りに少な過ぎればその効果を期待し得ないのは当然であるが、過大量もまた、かえつて免疫効果を減殺する。Widström¹¹⁰⁾ は鳥型菌及び BCG から作

つた死菌ワクチンをもつて動物（ウサギ、モルモット）を免疫したが、中等量のワクチンは著明な生存日数の延長を示したのに反し、大量のワクチンは全く無効であった。

Westenrijk¹¹¹⁾ もワクチンの量を重要視し、Uhrenhuth^{89)~10)} の陰性成績はワクチン接種量の過大にあると述べている。結核の免疫実験において攻撃菌量の撰択が重要な事は云うまでもないが、特に免疫菌量と攻撃菌量との量的関係は実験の成績を大きく支配する。常識的に考えても容易に首肯し得るように、免疫菌量即ちワクチン接種量に比し攻撃菌量が過大であれば、当然免疫効果を示すべきワクチンにもこれが認められず、逆にワクチン量に比し攻撃菌量が過少の場合にも、同じくワクチン効果に対する正しい判断は下し得ない。特に、結核の如く慢性に経過する疾患にあつて留意すべき事は、ある量の攻撃菌は感染経過中において宿主に対し攻撃的にも働かし免疫的にも働く事である。従つて、challenge にあつては動物を確実に斃し、しかも均一な死亡分布を得るような最少量を択ぶ事が大切である。本実験に用いられた攻撃菌量は、教室の信太¹¹²⁾が行つたマウス死亡の均一性に関する実験に基いて決定されたもので、図 15、図 16 にみられる累積死亡率の直線性は本実験の攻撃菌量が適当であつた事を明確に物語っている（図の横軸を対数目盛にした対数正規確率紙を用いればこの事は更に明らかになる）。

第4に Vaccination-challenge intervals の問題がある。ワクチン接種から攻撃実験を行うまでの間隔が異なれば、現われる結果もまた同じではない。然しこの間隔を如何に択ぶべきかについては、実験条件が異なる限り個々の実験者が決めなければならない問題である。ここでは両者の至適間隔として、Moussu & Goupil¹¹³⁾ は 2 カ月またはそれ以上、Streng & Ryti¹¹⁴⁾ は 90 日乃至 110 日と述べている事を記載しておく。この問題に関連して第5に挙げるアレルギーの関与も結核の場合特に考慮の必要があらう。Van Deirse¹¹⁵⁾ は鳥型菌をパラフィンと混ぜてウサギの筋肉内に注射した後、5週目に鳥型菌生菌を静注した実験においては生存日数の延長を観察したが、生菌の静注を6カ月後に行つた同じ実験においては Yersin type の症状を起して急激に動物の斃死するのを見た。彼の見解に従えば、この時期になつて著明なアレルギーが発生したためである。然しアレルギーも免疫も共に抗原と抗体の量的関係によつて規定されるものであるから¹¹⁶⁾、この問題は畢竟するに先に述べた免疫菌量と攻撃菌量の問題に帰せられるべきものと考え得る。

第6に実験動物の strain 及びワクチンの接種ルートの

問題がある。結核の実験動物には、モルモットの如くアレルギーを起しやすい動物もあればマウスの如くこれを起しにくい動物もある。結核研究においていづれが優つているかは学者によつて異論もあり、また目的によつても異なるが、マウスを用いる場合 strain によつて結核に対する感受性を著しく異にする事は注意しなければならない。同時にこの事は感染試験を行う場合の菌株の撰択とも関係する。動物を challenge するに当つては、その動物に対し出来る限り強毒な菌株を少量用いる事が重要な要件である。弱毒菌の大量と強毒菌の少量とは綜合菌力において同じであつても動物に対する作用はかなり異なつており、しかも前者の成績には余り信をおき得ない。この点において本実験に用いた Ravenel 株はよく目的に適つたものと云うべきであらう。何となればこの菌株は雑系の白色マウスに対して極めて強毒であり、信太¹¹²⁾が明らかにしている如く、雑系マウスにおいてもこの strain を用いる限り十分均一にして且再現性に富む成績が得られるからである。ワクチンの接種ルートに関しては、Westenrijk¹¹⁷⁾ がその重要性を唱えており、皮下接種は静脈内接種に優ると述べている。

最後に免疫実験の判定方法もまた実験成績に或る程度の影響を与えるものと見做し得る。ワクチン効果の判定基準としては生存日数の観察の他に、病理組織学的な所見や生体内生菌数の定量などが単独に、または他と併用されて検索されている。このうち生存日数の観察は、主観の入り込む余地がなく、簡易でしかも正確な方法として多くの学者の好んで^{62)~64), 78), 118)~121)} 用いる方法であるが、特にマウスを用いる場合には、その利点を十分に生かした方法と云うべきであらう。定量培養法による体内の生菌数の測定は操作が煩雑である上に実験誤差も避けられず、また後期になる程生菌数に個体差が現われて data が不均一になつてくる。病理組織学的検査は主観混入の余地があるばかりでなく、場合によつては生存日数の観察と逆の成績が得られる事もある。何となれば Opie & Freund⁴⁸⁾ も指摘している如く、免疫効果の認められる動物には却つて広汎な病巣の観察される事が多いからである。このような病巣は免疫の後期になると消滅するものではあるが、判断を誤り易い点において Opie 等の非難する如く三者のうちでは最も不満足な判定基準と云つて差支えなからう。

さて著者はこの実験において、紫外線照射死菌の示す免疫効果と酵素活性の有無とを関係づける事が出来た。しからば酵素活性を持たない結核死菌は、如何なる場合にも免疫原性を示さないであらうか？ これまで数え挙げて来たように成績を支配する因子が単純なものでない

以上、この問に対する答もまた保留されなければならぬであろう。本実験において免疫効果を示さなかつた死菌ワクチンも、更に大量を用いれば或いはこれを認め得るかもしれないし、その他の実験条件を変える事によつて多少異なつた結果が得られる可能性も無い訳ではない。加熱ワクチン及びその他の処理による死菌ワクチンについても問題はなお残されている。加熱と云う操作がかなり強烈なものであり、増殖能を失うと同時に内呼吸の如き生命現象も失われるものであるならば、加熱死菌の示す免疫効果をこの実験から説明する事は困難である。それにも拘らず、菌の酸素吸収能が免疫の成否に対して大きな関係を有すると云う今回の実験事実は、決してその意義を減ずるものではあるまい。この事実は依然として、従来の死菌免疫実験にみられた不一致を説明するのに役立つからである。

結 論

1) 紫外線を結核菌に照射した場合、増殖能の消失と酸素吸収能の消失との間には時間的な gap が存在する。即ち一定時間以上紫外線の照射を受けると、増殖能も酸素吸収能も共に消失するが、それ以前において、増殖能は失われてもなお酸素吸収能を保有している時期が認められる。この事は人型菌、牛型菌において著明で、鳥型菌及び *M. phlei* においてはさほど明らかでなかつた。なお加熱の場合には、全菌株を通じてかかる事実は認められない。

2) 菌に対し凍結融解を反復した場合、人型菌及び鳥型菌はその回数に比例して生菌数及び酸素吸収量を減少したが、*M. phlei* はこれらと異なる態度を示し、凍結融解による阻害的影響を全く受けなかつた。かくの如き抵抗性の強い菌株が存在することは、凍結融解の致死作用が加熱及び紫外線のそれと可なり異なつた機転に基づくことを示すものと思う。

3) 紫外線照射菌に TCA cycle 関与物質を基質として与えた場合、乳酸々化の極端なる低下の認められる事が特徴である。

4) 酸素吸収能を保有する状態の紫外線照射 *H₃₇Rv* 死菌でマウスを免疫した場合には、BCG 生菌と同程度の免疫効果を期待し得る。同じ死菌でも酸素吸収能を既に失つたものは全く免疫賦与力を持たない。但しかかる死菌ワクチンの効果は菌株による差違が極めて大きく、たとえ酸素吸収能は残されていても、BCG 死菌には免疫効果を期待し得ない。この成績は従来の死菌免疫実験にみられた成績の不一致に対し、1つの説明を加えたものとする。

稿を終るにあたり、恩師大原教授の御指導、御校閲に深謝する。

引用文献

- 1) Darenberg, M.: Bull. Acad. méd. Paris, 22, 391, 1889.
- 2) Trudeau, E.: Tr. Am. Assoc. Phys., 9, 168.
- 3) Neufeld, F.: Dtsch. med. Wschr., 29, 653, 1903.
- 4) Calmette, A.: Tubercle bacillus infection and tuberculosis in man and animals, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1923, pp. 624 et seq.
- 5) Hamburger, F.: Beitr. Klin. Tbk., 12, 259, 1909.
- 6) Römer, P.H., & Josef, K.: Beitr. Klin. Tbk., 17, 287, 1910.
- 7) Smith, Th.: J.A.M.A., 68, 764, 1917.
- 8) Uhlenhuth, P. & Joetten: Dtsch. med. Wschr., 46, 877, 1920.
- 9) Uhlenhuth, P.: Dtsch. med. Wschr., 49, 1197, 1923.
- 10) Uhlenhuth, P.: Beitr. Klin. Tbk., 67, 241, 1927.
- 11) Webb, G.B.: Am. Rev. Tuberc., 8, 93, 1923.
- 12) Dold, H.: Klin. Wschr., 4, 1763, 1925.
- 13) Fischl, F.: Zschr. Tuberk., 42, 218, 1925.
- 14) Moro, E.: Münch. med. Wschr., 72, 172, 1925.
- 15) Seligmann, E. & von Gutfeld, F.: Dtsch. med. Wschr., 51, 1064, 1925.
- 16) Kirchner, O. & Newton, H.F.: Beitr. Klin. Tbk., 72, 97, 1929.
- 17) Corper, H.J., Damerow, A.P. & Cohn, M.L.: Am. Rev. Tuberc., 33, 721, 1936.
- 18) Damerow, A.P.: Am. Rev. Tuberc., 41, 512, 1940.
- 19) Liebow, A.A., Burn, C.G. & Soper, W.B.: Am. Rev. Tuberc., 41, 592, 1940.
- 20) Raffle, S.: Am. Rev. Tuberc., 54, 564, 1946.
- 21) Birkhang, K. & Darricarrere, R.: Am. Rev. Tuberc., 68, 96, 1953.
- 22) Seagle, J.B., Karlson, A.G. & Feldman, W.H.: Am. Rev. Tuberc., 67, 341, 1953.
- 23) Koch, R.: Dtsch. med. Wschr., 23, 209, 1897.
- 24) Di Dound, A.: Zbl. Bakt., 42, 642, 1906.
- 25) Calmette, A., Guérin, C., & Breton, M.: Ann. Inst. Past., 21, 401, 1907.
- 26) Levy, E., Blumenthal, F. & Marxer, A.: Zbl. Bakt., 47, 289, 1908.
- 27) Hawthorn, E.: C.r. Soc. Biol. 66, 364, 1909.
- 28) Noguchi, H.: Zbl. Bakt., 52, 85, 1909.
- 29) Broll, R.: Berl. tierärztl. Wschr., 26, 916, 1910.
- 30) Löffler, F.: Dtsch. med. Wschr., 39, 1025, 1913.
- 31) Rappin, M.: C.r. Acad. Sci., 156, 246, 1913.
- 32) Rappin, M.: Ibid, 164, 421, 1917.

- 33) Lange, L. : Zbl. Bakt., 85, 26, 1920.
- 34) Raw, N. : Brit. Med. J., 1, 741, 1925.
- 35) Langer, H. : Klin. Wschr., 3, 1944, 1924.
- 36) Langer, H. : Dtsch. med. Wschr., 52, 396, 1926.
- 37) Langer, H. : Beitr. Klin. Tbk., 67, 297, 1929.
- 38) Langer, H. : Dtsch. med. Wschr., 55, 768, 1929.
- 39) Bessau, G. : Klin. Wschr., 4, 337, 1925.
- 40) Bessau, G. : Beitr. Klin. Tbk., 67, 268, 1927.
- 41) Horowitz-Wlassowa, L. : Zschr. Immun. forsch., 42, 1, 1925.
- 42) Tobler, W. : Schweiz. med. Wschr., 55, 932, 1925.
- 43) Zinsser, H., Ward, H.K. & Jennings, F.B. : J. immunol., 10, 719, 1925.
- 44) Petroff, S. A., Branch, A. & Jennings, F. B., Jr. : J. immunol., 16, 233, 1926.
- 45) Petroff, S.A. & Steenken, W., Jr. : J. immunol., 19, 79, 1930.
- 46) Zadek, L. & Meyer, E. : Dtsch. med. Wschr., 53, 442, 1927.
- 47) Ferguson, R. L. & Cannon, P. R. : Am. Rev. Tuberc., 33, 328, 1936.
- 48) Opie, E.L. & Freund, J. : J. Exper. Med., 66, 761, 1937.
- 49) Freund, J. & Opie, E.L. : J. Exper. Med., 68, 273, 1938.
- 50) Opie, E. L., Flahiff, E. W. & Smith, H. H. : Am. J. Hyg. 29, 155, 1939.
- 51) Wells, C. W., Flahiff, E. W. & Smith, H. H. : Ibid, 40, 116, 1944.
- 52) Saenz, A. : C. r. Soc. biol., 124, 1161, 1937; 125, 495, 1937.
- 53) Potter, T. S. : J. Inf. Dis., 71, 232, 1942.
- 54) Potter, T.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 54, 143, 1943.
- 55) Swedberg, B. : Acta med. Scandinav., 139, 1951 (Supplement 254, p. 1).
- 56) Buonomini, G. & Santopadre, G. : Scient. med. ital., 3, 121, 1954.
- 57) Salvioli, G., Esposti, A.D. & Dina, A.M. : Presse méd., 60, 1508, 1952.
- 58) Salvioli, G., Esposti, A.D. & Dina, A.M. : Acta tuberc. Scandinav., 28, 147, 1953.
- 59) Yaoi, H., Takei, M. & Saito, K. : Yokohama M. Bull., 3, 1, 1952.
- 60) Abe, I. : Kekkaku, 28, 409, 1953.
- 61) Jespersen, A. & Magnusson, M. : Acta path. et microbiol. Scandinav., 39, 431, 1956.
- 62) Dubos, R. J., Schaefer, W. B. & Pierce, C. H. : J. Exper. Med., 97, 221, 1953.
- 63) Weiss, D.W. & Dubos, R.J. : Tr. Nat. Tuberc. A., p. 198, 1954.
- 64) Weiss, D.W. & Dubos, R.J. : J. Exper. Med., 101, 313, 1955; *ibid*, 103, 73, 1956.
- 65) Dubos, R.J., Weiss, D.W. & Schaedler, R.W. : Am. Rev. Tuberc., 75, 781, 1956.
- 66) Weiss, D. W. & Wells, A. Q. : Tubercle, 37, 137, 1956.
- 67) Weiss, D. W. : Am. Rev. Tuberc., 77, 719, 1958.
- 68) Yamada, S. : Jap. J. Tuberc., 2, 128, 1954.
- 69) Milzer, A., Levinson, S. O. & Lewis, M. B. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 75, 733, 1950.
- 70) Calmette, A. : L'infection bacillaire et la tuberculose, Masson et Cie, Paris, 1936, pp. 838-981.
- 71) Corper, H.J. : J. Lab. Clin. Med., 31, 346, 1946.
- 72) Irvine, K. N. : BCG vaccination in theory and practice, Blackwell, Oxford, 1949, pp. 49-77.
- 73) Thomas, R.M. : J. Exper. Med., 58, 227, 1933.
- 74) Branch, A. & Enders, J.F. : Am. Rev. Tuberc., 32, 595, 1935.
- 75) La Grange, E. & La Grange, M.T. : C.r. Soc. biol., 119, 701, 1935.
- 76) Griffith, A.S. & Glover, R.E. : J. Comp. Path. & Therap., 52, 57, 1939.
- 77) Giovanardi, A. : WHO Technical report, Series No. 88 : Sixth report of the Committee on Tuberculosis, Geneva, 1954.
- 78) Bloch, H. & Segal, W. : Am. Rev. Tuberc., 71, 228, 1955.
- 79) Palmer, C., Ferebee, S., Meyer, S.N. & Bloch, H. : Bull. World Health Organ., 12, 13, 1955.
- 80) Meyer, S.N. : Tubercle, 37, 11, 1956.
- 81) Henri-Cernovodeanu, V., Henri, V. & Baroni, V. : C.r. Acad. Sci., 151, 724, 1910.
- 82) Olson, B.J., Habel, K. & Piggot, W.R. : Publ. Health Rep., 62, 293, 1947.
- 83) Paterson, J.C., Crombie, D.W. & Coles, J.C. : Canad. J. Research, 27, 37, 1949.
- 84) Sarber, R. W., Nungester, W. J. & Stimpfert, F.D. : Am. Rev. Tuberc., 62, 418, 1950.
- 85) Baldwin, R.W., Gilbert, G.A., Iland, C.N. & Jones, A. S. : Biochim. et biophys. acta, 10, 402, 1953.
- 86) Iland, C.N. : Lancet, 2, 277, 1953.
- 87) Kress, F. : Wien. Klin. Wschr., 60, 597, 1948.
- 88) 辻岡滝之助 : 医学研究, 15, 2255, 昭 16.
- 89) 津川 弘 : 医学研究, 16, 941, 昭 17.
- 90) Yoshimura, M. : Jap. J. Tuberc., 4, 145, 1956.
- 91) Mukozaka, K. : Jap. J. Tuberc., 5, 101, 1957.
- 92) Smithburn, K. C. & Lavin, G. I. : Am. Rev. Tuberc., 39, 782, 1939.
- 93) Litchfield, J.T. : J. Pharmacol. & Exp. Therap., 97, 399, 1949.
- 94) Thiele, H. & Wolf, K. : Arch. Hyg., 57, 29, 1906.
- 95) Thiele, H. & Wolf, K. : Arch. Hyg., 60, 29, 1907.
- 96) Buchholz, J. & von Jeney, A. : Zbl. Bak., 133, 299, 1935.

- 97) Ehrismann, O.: Z. Hyg. Infekt., 111, 618, 1930.
- 98) Gates, F. L.: J. Gen. Physiol., 14, 31, 1930.
- 99) Ehrismann, O. & Noethling, W.: Z. Hyg. Infekt-kr., 113, 597, 1932.
- 100) Hollaender, A. & Claus, W. D.: J. Gen. Physiol. 19, 753, 1936.
- 101) Heinmets, F. & Kathan, R. H.: Arch. Biochem. Biophys. 53, 205, 1954.
- 102) Heinmets, F. & Lehman, J. J.: Arch. Biochem. Biophys. 59, 313, 1955.
- 103) 楠瀬正道・楠瀬恵美: 結核, 28, 34, 1953.
- 104) 楠瀬正道・楠瀬恵美・永井 定: 結核 28, 576, 1953.
- 105) 楠瀬正道・楠瀬恵美・山村雄一: 生化学 25, 458, 1954.
- 106) Barron, E. S. G., Ardao, M. I. & Hearon, M.: Arch. Biochem., 29, 130, 1950.
- 107) Aji, S. J.: Bact. Rev., 15, 211, 1951.
- 108) 高橋和男: 結核の研究, 8, 44, 1957.
- 109) 澄川栄一郎: 近く発表の予定
- 110) Widström, G.: Acta med. Scandinav., 1941, Supplement 124, p. 1.
- 111) V. Westenrijk, N.: Beitr. Klin. Tuberk., 78, 671, 1931.
- 112) 信太隆夫・平野五郎・石山司浪: 結核の研究, 7, 32, 1957.
- 113) Moussu, M. & Goupil, M.: C.r. Acad. Sc., 146, 44, 1908.
- 114) Streng, O. & Ryti, E.: Duodecim, 12, 1, 1930.
- 115) Van Deinse, F.: C.r. Soc. biol. 127, 202, 1938.
- 116) 大原 達: 日本の医学の1959年, III巻, 451, 1959.
- 117) V. Westenrijk, N.: cited from D. W. Weiss, Am. Rev. Resp. Dis. 80, 495, 1959.
- 118) Martin, A.R.: J. Path. Bact., 58, 580, 1946.
- 119) Rake, W.P.: Am. Rev. Tuberc., 60, 121, 1949.
- 120) Baker, M. J.: Ann. New York Acad. Sc., 52, 678, 1949.
- 121) Youmans, G. P. & Youmans, A.S.: Am. Rev. Tuberc., 64, 541, 1951.