



| | |
|------------------|---|
| Title | 結核菌菌体成分の免疫学的研究 |
| Author(s) | 桑島, 核; KUWAJIMA, Tadashi |
| Description | |
| Citation | 結核の研究, 13, 1-12 |
| Issue Date | 1960-09 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/26698 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 13_P1-12.pdf |



原 著

結核菌菌体成分の免疫学的研究

桑 島 核

(北海道大学結核研究予防部 主任 高橋義夫教授)
(国立療養所旭川病院 院長 小野英夫博士)

(昭和35年6月1日受付)

従来、結核免疫はいわゆる感染免疫として、即ち生き
た結核菌が生体内に存在している間だけ免疫が存在して
いるものとして理解されて来た。このような考え方から
いわゆる生菌ワクチンとしての BCG が生れて、これが
現在世界各国において結核予防の一端を担っている事は
周知の事実である。しかしながら近年は結核死菌体乃至
は脱脂菌体でも、これらを大量に実験動物に接種する
と、かなり強力な免疫が賦与される事が明らかにされた
ので¹⁻⁴⁾、感染免疫という考え方が次第にうすれて、現
在この方面の大部分の研究者は結核においては生菌免疫
も死菌免疫も本質には変りはないと考えるようになって
た⁵⁾。このように結核免疫に対する考え方が変るにつれ
て、結核菌菌体成分による対結核能動免疫の試みが次第
になされて来ている²⁾⁵⁾⁻⁹⁾。

結核菌体成分といえば蛋白、多糖体、リポイド、核酸、
色素、酵素等であるがこのうち免疫血清学的に現在のと
ころ重要なのは蛋白、多糖体、リポイドであつて、近年
高橋¹⁰⁾及び協同研究者は結核患者及び結核動物の血流中
には蛋白、多糖体、磷脂質に対する抗体が独立して生産
され消長している事を明らかにした。又、他方、従来免
疫血清学的研究の対象となつて来たものは同じくツベル
クリン乃至は菌体蛋白、多糖体及び菌体磷脂質であるが、

そのいづれも強力且つ確実な免疫元になるという実験
的根拠がない。然しながら現在一般には結核免疫は蛋白
乃至はこれが関連した物質によつて惹起され、多糖体は
たとえ強い試験管内抗原性はあつても、免疫元にはなら
ないと考えられている。しかしこの考えとても実験的事
実から引き出されたものではなく、ただ漠然とそのよう
に考えられているというに過ぎないようである。この点
に関して近年、PPD-s に Adjuvant として結核菌体の
ワックス及び Paraffin oil を加えて動物に注射すると強
力なツベルクリンアレルギーが出現するが著明な免疫効
果はみられないという実験事実が報告され¹¹⁾¹²⁾⁴⁴⁾、又菌
体多糖体の或物は BCG 程ではないが、かなりの免疫元

性をもつことが報告された事は¹³⁾¹⁴⁾⁴⁵⁾、以上の考え方が
もう一度反省する必要がある事を示すものであろう。

以上のように結核菌菌体成分の研究は、結核における
アレルギーと免疫の問題に直接関連して、近年益々重要
視されて来ている。アレルギーと免疫の異同問題も、各
菌体成分の免疫血清学的性格が明らかにされない限り、
結局は水かけ論に終るように思われる。そこで私はこの
点を考慮しつつ、菌体成分の免疫学的研究を試みたので
あるが、現在迄のところ、結核においてはアレルギーを
賦与するものは蛋白であり、反対に免疫を賦与するもの
は多糖体及び脂質、特に多糖体であり、アレルギーと免
疫とは互に独立して消長する生物学的現象である事を強
く示唆する結果に到達した。以下はその実験報告である。

実験材料及び方法

使用した菌体成分の中 PPD-s は国立予防衛生研究所
より分与されたもの、他はすべて北大結核研究所高橋教
授より分与されたものである。それらの製法、性状の概
略は次の如くである。

磷脂質：

Pd-N：ヒト型結核菌仲野株の ソートン培養菌体より
高橋法¹⁰⁾により抽出したもの。N：0.30%，P：2.4%，
Anthrone (Glucose として)：23.3%

Pd-B：ソートン培養の BCG 菌体より高橋法により
分離したもので、N：0.39%，P：2.3%，Anthrone：22.8%

Pd-ha：ソートン培地のヒト型結核菌 H 37 Rv 株及び
青山 B 株の菌体を等量に混合したものから同じく高橋法
によつて抽出したもの。N：0.35%，P：2.8%，Anthrone
16.9%

以上3種類の磷脂質は感作赤血球凝集反応及び感作カ
オリン凝集反応の感作元となり、この方面の研究はす
でに深江¹⁵⁾が行なつている。

ワックス：

Wax-BCG：磷脂質を抽出した後の菌体残渣からクロ

ロホルムで抽出，メタノールとアセトンで精製したもの。
N: 0.03%, P: 0.1%, Anthrone: 0.4%

蛋白質:

PPD-s: N: 13.6%, 還元糖 3.2% (予研)。これは Middlebrook-Dubos 反応及び Boyden 反応の感作元になる。

多糖体:

仲野 TP_{II}: 仲野株のソートンツベルクリンより分離したもので，30% メタノールで沈澱する画分，これはいわゆる Seibert の Tuberculin polysaccharide II に相当し，白色ゼラチン様の高分子の多糖体で殆んど N を含まない。試験管内抗原性はなく，感作赤血球凝集反応の感作元にならない。

H 37 Rv TP_s: H 37 Rv 株のソートンツベルクリンより抽出したもので，polysaccharide II を除去し，85% メタノールで沈澱する画分。N: 0.59%

仲野 BP_s: 仲野株 ブイオン培養の脱脂菌体より 20% ウレアで抽出したもので。N: 0.11%

H 37 Rv BP_s: H 37 Rv ブイオン培養の脱脂菌体より 10% ウレアで抽出したもので。N: 0.72%

以上 4 種の多糖体のうち仲野 TP_{II} 以外の 3 種は試験管内抗原性あり Middlebrook-Dubos 反応の感作元になる。但し Boyden 反応の感作元にならない。

以上の菌体成分を単独で，又は色々に組合せて，Adjuvant として Paraffin oil 及び表面活性剤を用い，モルモットに注射し，100 倍旧ツベルクリンでツベルクリン反応を追及しながら，一定期間後強毒菌仲野株で challenge し，一定期間後エーテルで動物を致死せしめ，解剖して内臓病変を比較，同時に脾臓の定量培養をした。詳細は実験の都度記載する。実験は 4 回行なった。

実験 I. 燐脂質による免疫実験

菌体燐脂質が結核の免疫元になることを初めて報告したのは Boquet-Nègre でいわゆる Boquet-Nègre の 'Antigène méthylique' として知られているが¹⁶⁾，この「メチル抗原」は菌体のメタノール抽出液そのもので，精製された燐脂質ではなく，蛋白質，アセトン可溶性脂肪を含んでいる。そこで私は比較的純粋な Pd-B (以下 Pd と略) を用いてこの問題を検討した。この際，Coulaud¹⁷⁾，Saenz¹⁸⁾，Freund¹⁹⁾ 等によつて効果の認められている流動パラフィン (以下流パラと略) を Adjuvant として用いる方法を検討した。

実験方法

モルモット，400~500 g，40 匹を 8 匹づつ 5 群に分けた。

第 1 群: Pd 1 mg/ml 生理的食塩水浮游液 0.5 ml を隔日 10 回注射。

第 2 群: 第 1 群と同じ液 0.5 ml を隔日 3 回注射。

第 3 群: 生理的食塩水に 10% の割に流パラを加えた液に Pd を 1 mg/ml に浮游させたもの (超音波により均等化した) の 0.5 ml を隔日 3 回注射。

第 4 群: 流パラ 0.5 ml を隔日 3 回注射。

第 5 群: 無処置対照群。

注射部位はすべて左下腹部皮下とした。注射開始以後毎週体重を測定し，2 週毎に 100 倍ツベルクリン液を以てツベルクリン反応を検査した。

注射終了後 10 日目にヒト型結核菌仲野株小川培地 2 週培養のものより 0.004 mg/ml の菌液を作り，その 0.5 ml を全動物の右下腹部皮下に接種した。この際の生菌単位は 1 mg 当り 2.6×10^6 であつた。

感染後 8 週目に全動物をエーテルで殺し，剖検，リンパ腺及び内臓の病変を肉眼的に検索し，同時に脾内の生菌数を小川培地を用いる定量培養方法により求めた。

実験成績

(1) 体重: 実験開始時と剖検前を比較して各群共に著明な差は認められなかつた。

(2) ツベルクリン反応: 全群共感染までに陽転したも

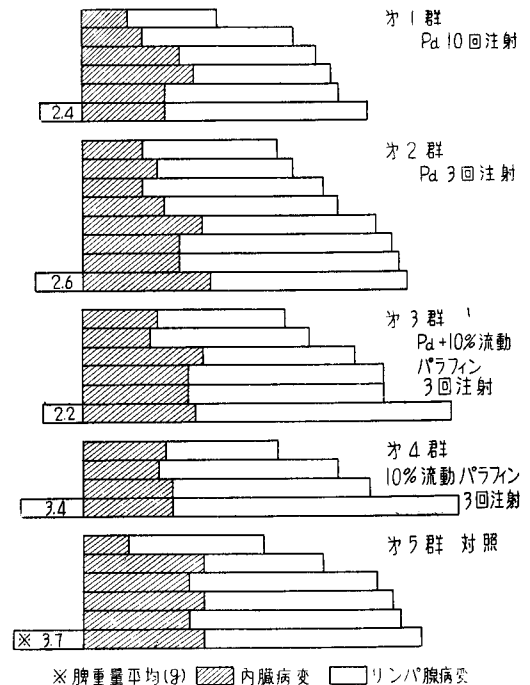


図 1. 内臓及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム

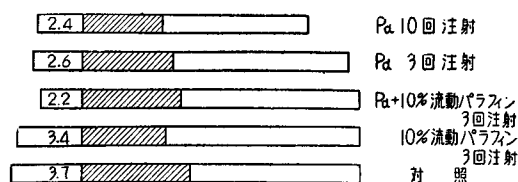


図2. 内臓及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム (平均値)

のなく、感染後は第3週目より陽転し始め、第5週目ですべて陽転した。各群の間に差は認められなかつた。なお第1群2匹、第3群2匹、第4群4匹、第5群2匹が実験中死亡したので成績より除いた。死亡は抗元の毒性によるものではなく、他の感染症のためであつた。

(3) 剖検成績：肉眼的病変をヒストグラムとして図1に示し、各群の平均は図2に示した。両図より明らかなように、免疫群はいずれも対照群と同程度の病変を示し免疫効果があるとは思えなかつた。但し脾重量は免疫群の方が対照群より軽かつた。

(4) 脾内生菌数：各群の平均脾内生菌数をg当りで表1に示した。肉眼的所見と同様各群間に著差がみられなかつたが、第1群のPd 10回注射群が僅かに少なかつた。

表1. 脾内生菌数 (g当り平均)

| | |
|-------------------|-------------------|
| 1. Pd 10回注射 | 2.7×10^5 |
| 2. Pd 3回注射 | 5.2×10^5 |
| 3. Pd+流動パラフィン3回注射 | 6.1×10^5 |
| 4. 流動パラフィン3回注射 | 4.5×10^5 |
| 5. 対 照 | 6.0×10^5 |

考 察

はじめのべたように Boquet-Nègre¹⁶⁾ のメチル抗元及び Anderson²⁰⁾ の磷脂質の研究に始まつて結核菌磷脂質の免疫元性に関する実験は数多く行なわれているが、結核菌磷脂質に確たる免疫元性があるかどうかまだはつきりした実験データはないようである⁴⁶⁾。本実験で採用した免疫方法では、実験成績に見られるように、なんらの免疫効果もあげられなかつた。

しかし、このことから直ちに結核菌磷脂質の免疫元性を否定するわけにはいかないようである。この点に関しては Adjuvant の工夫が必要と思われるが、Weiss & Dubos²⁾ は水又は塩類溶液よりも oil adjuvant mixture のサスペンションの方が効果が強く、且つ延長するという。第3群には流パラを Adjuvant としたものを注射したが、この流パラは生理的食塩水に1/10加えられたものであつたので、或いはこれでは不十分であつたかと思わ

れる。又、流パラと生食水の混合のために超音波を用いたが、十分均等化出来なかつた事も考慮しなければならない。流パラのみでワクチンを調製再検討すべきであろう。

Raffel²¹⁾ は磷脂質単独注射でもツベルクリンアレルギーを賦与することは出来なかつたと報じているが、本実験でも本実験条件の範囲内では、磷脂質単独ではツベルクリンアレルギーを賦与することは出来なかつた。

結 論

結核菌体磷脂質のかなり大量を、生食水浮游液又は10%流動パラフィン加生食水浮游液としてモルモットの皮下に数次にわたつて注射、仲野株で攻撃感染、8週後に剖検、肉眼的観察及び脾定量培養を行なつて主として免疫効果を見た。磷脂質注射群と対照群との間に著しい差は認められなかつた。又各群とも強毒菌感染前にはツベルクリン反応陽転したものはなかつた。

実験 II. 各種菌体成分の単独及び組合せによるモルモット免疫実験

実験 I では結核菌体磷脂質のみを用いて実験を行ない磷脂質が単独で免疫元になるという確証は得られなかつたが、今回は更に蛋白とワックスを加えて、各々の性質の相違及び3者相互の組合せによつて生ずる効果を検討することにした。既に菌体成分の妨きについては多くの研究がなされているが、材料、方法の違いから結果は一致してはいない。蛋白を中心としてワックスが協同して防ぐとの報告⁵⁷⁾⁸⁾²²⁾、磷脂質と菌体内顆粒が抵抗性を高めるとする説²³⁾、メチル抗元の効果は実際にはその磷脂質と含まれている蛋白との効果であるという説、逆に窒素量をへらした方が抗元性は増すという説²⁴⁾等区々である。前実験で十分免疫効果をあげ得なかつたのは Adjuvant が不十分であつたためとも考えられたので、今回はすべて流パラそのものを Adjuvant として使用することとした。

実験方法

使用した菌体成分：Pd-N (以下Pdと略)、Wax-BCG (以下Wと略)及びPPD-s (以下Prと略)。対照として小川培地培養の青山B株より作つた菌液を20分間煮沸殺菌したものを使用した。

健康モルモット74匹(250~300g)を9群とし、第5群と第7群は9匹、他は8匹にした。

- 第1群 Pr 単独注射群
- 第2群 Pd 単独注射群
- 第3群 W 単独注射群
- 第4群 Pr+Pd 混合注射群

- 第5群 Pd+W 混合注射群
 第6群 W+Pr 混合注射群
 第7群 Pr+Pd+W 混合注射群
 第8群 加熱死菌注射群
 第9群 流パラ注射群

各成分とも流パラを Adjuvant として 1 mg/ml になるように手振法で調製した。成分混合の場合にはそれぞれの成分 1 mg が 1 ml に含まれるように調製した。かくして調製したワクチンをモルモットの両側大腿内側部筋肉内に 0.5 ml あて計 1 ml 注射した。注射部位は永く硬結を残した。流パラはワクチンの効果を増強し延長するとの報告から考えて、注射回数は 1 回とした。

注射直前より毎週体重を測定し隔週に 100 倍ツベルクリン液を以てツベルクリン反応を検査した。

注射後 6 週目に結核菌仲野株小川培地 2 週培養のものから 0.002 mg/ml の蒸留水浮游液を作り、その 0.5 ml を右下腹部皮下に接種した。この際の生菌単位は 1.6×10^6 /mg であった。

感染後 6 週目に全動物をエーテルで殺し、剖検、肉眼的に臓器及びリンパ腺の病変を検索し、同時に脾内生菌数を小川培地を用いる定量培養法により測定した。

実験成績

(1) 体重：実験開始時 250~300 g であったが途中死亡した第 1 群 3 匹、第 3 群 2 匹、第 6 群 第 7 群 第 8 群各 1 匹を除いては、500~600 g に増加し対照群との間にも差は見られなかった。

(2) ツベルクリン反応：硬結の直径の平均値を表 2 に示した。第 1 群 (Pr 群) は 6 週目に 5 匹中 2 匹疑陽性、第 4 群 (Pr+Pd 群) は 8 匹中 1 匹が 2 週目から疑陽性、第 7 群 (Pr+Pd+W 群) は 8 匹中 2 匹が 2 週目から陽性で、第 8 群 (加熱死菌群) は 2 週目から 7 匹中 3 匹陽性 2 匹疑陽性であった。他の群は感染前の検査では全例陰性

表 2. ツベルクリン反応の推移 (平均値 mm)

| 群 | 週 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|------------|---|-----|-----|-----|------|------|
| 1. Pr | | 0 | 0 | 5.5 | 5.1 | 20.7 |
| 2. Pd | | 0 | 0 | 0 | 0 | 22.4 |
| 3. W | | 0 | 0 | 0 | 0 | 22.4 |
| 4. Pr+Pd | | 2.8 | 2.4 | 1.7 | 4.8 | 18.5 |
| 5. Pd+W | | 0 | 0 | 0 | 9.7 | 17.5 |
| 6. W+Pr | | 0 | 0 | 0 | 8.6 | 21.5 |
| 7. Pr+Pd+W | | 5.8 | 6.5 | 5.2 | 8.0 | 12.2 |
| 8. 加熱死菌 | | 9.9 | 9.6 | 9.8 | 12.0 | 16.4 |
| 9. 対 照 | | 0 | 0 | 0 | 10.5 | 18.2 |

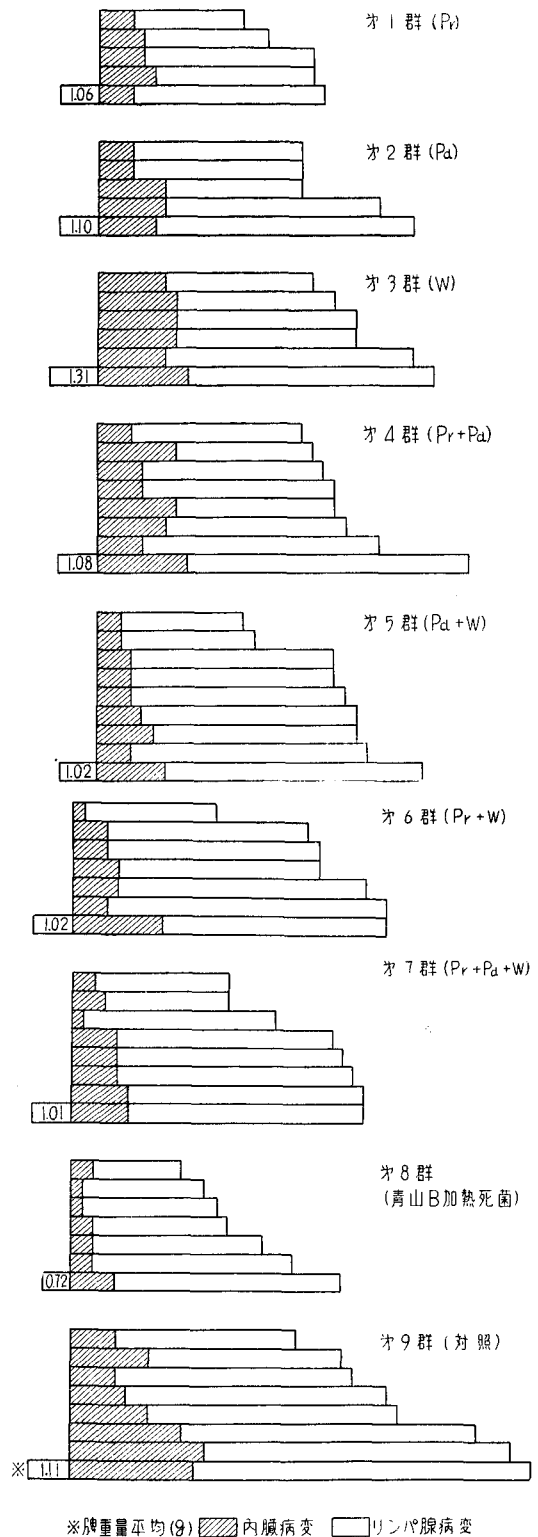


図 3. 臓器及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム

であつた。感染後4週では第4, 5, 7, 9群の各1匹を除いては陽性、感染後6週では全例陽性であつた。

(3) 剖検成績：図3に臓器及びリンパ腺の病変をヒストグラムで示し、各群の平均値の比較を図4に示した。第1群から第7群までの菌体成分注射群間には病変の程度、脾の重量に大差はなく、その中では第3群(W単独群)に稍病変が強かつた。加熱死菌注射群は他に比し病変は明らかに軽度であり免疫効果を示していた。対照の第9群は最も病変が強かつたが、免疫群との差は少なかつた。

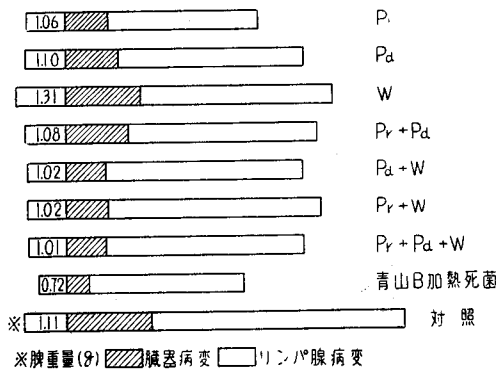


図4. 肉眼的病変のヒストグラム (平均値)

(4) 脾内生菌数：各群の平均脾内生菌数をg当りで示したのが表3である。比較的多かつたのは第3, 4, 9群で、比較的少なかつたのが第1群と第8群であつた。

表3. 脾内生菌数 (g当り平均)

| 群 | 注射成分 | 脾内生菌数 |
|---|---------|-------------------|
| 1 | Pr | 1.1×10^4 |
| 2 | Pd | 2.6×10^4 |
| 3 | W | 8.6×10^4 |
| 4 | Pr+Pd | 8.5×10^4 |
| 5 | Pd+W | 1.7×10^4 |
| 6 | W+Pr | 4.4×10^4 |
| 7 | Pr+Pd+W | 6.1×10^4 |
| 8 | 加熱死菌 | 1.2×10^4 |
| 9 | 流パラ | 7.3×10^4 |

考 察

実験Iでは磷脂質のみを用いて免疫実験を行なつたが効果は満足すべきものではなかつた。今回は更に蛋白、ワックスを加えて各々の単独又は組合せの効果を検討した。高橋²⁵⁾によれば結核菌系抗原抗体反応は非常に複雑な抗原抗体系の集つたものであり、少なくとも蛋白、磷

脂質、多糖体系の抗原抗体反応は互いに独立していることが明らかにされたので、菌体成分の各画分について系統的に実験を行えば、どの画分がツベルクリンアソルギー賦与に、又は免疫賦与に関連をもつかを知り得るのではないかと考えた。一方各成分の symplex が感作元として有効である²⁵⁾とされているので、菌体成分を混合してこれに近いものとしてその作用を追求した。

既にツベルクリンアレルギーには蛋白系抗原抗体反応が関与することは知られている²⁶⁾²⁷⁾。しかし PPD-s だけでは抗体を作つて来ないが⁵⁾²²⁾²⁸⁾、PPD-s に Wax-D を加えて注射するとツベルクリンアレルギーを惹起し、又或程度の免疫を生じるという⁵⁾²²⁾⁴⁴⁾。又、ワックス単独では抗原性がないとする報告が多い⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾。

本実験の結果をみると、ツベルクリンアレルギー賦与力については、Pr, Pd, W ともに単独では効果がなく、2種の組合せも略同様であつた。僅かに3者を混合した場合に若干の効果が見られた。加熱死菌によるツ・アレルギー賦与も本実験では余り強くは見られなかつたが、他の免疫群よりはかなり強かつた。又 Raffle⁵⁾²²⁾と異なり Pr+W 群が全くツ陰性であつたことが注目された。

剖検成績から免疫効果をみると各感作群間の病変に著しい差はなく、その間の優劣はつけ難く、加熱死菌群には及ばない結果となつた。しかし無処置群と免疫群とは僅かの差があり、弱い免疫効果を与えたとも考えられる。前回3~10回注射でも Pd 単独では無効だつたが、流パラをそのまま Adjuvant とした今回の実験では Pd 単独でも多少免疫効果があるように思われた。この事から流パラの影響が考えられる。

結 論

菌体蛋白、磷脂質及びワックスを単独又は色々に組合せてモルモットに注射し、免疫元としての効果を検討した。各菌体成分注射群間に見るべき差はなく、アレルギー化でも免疫効果でも加熱死菌に劣つていた。しかし無処置対照群よりは僅かにすぐれていた。

実験 III. 多糖体を中心とする各種菌体成分の組合せによるモルモット免疫実験

実験I, 実験IIに於いて Pr, Pd, W 各結核菌体成分の単独及び組合せをモルモットに注射し、結核に対する抗抵性が賦与されるかどうかを検討した。今回は Pd と W に菌体又は培養濾液より得られた多糖体を加えて、同様の実験を試みた。多糖体は感作赤血球凝集反応の抗原として注目されて居り³²⁾³³⁾、Seibert³⁴⁾らの polysaccharide II は沈降素を動物に作らせるといふが、従来多糖体画分を主体とした免疫実験は行なわれていない。こ

れは多糖体には免疫元性はないと一般に考えられているためと思われる。

実験材料

使用した菌体成分：多糖体としては、仲野 TPs II, H 37 Rv TPs, 仲野 BPs の 3 種を用い、磷脂質は Pd-ha, ワックスは Wax-BCG を使用した。対照の加熱死菌としては、小川培地上 2 週間培養のものより菌液を作り 20 分間加熱殺菌したものを使用した。

実験方法

モルモット、300~400 g, 82 匹を 11 群に分け、第 1 群から第 9 群までは各 8 匹、第 10 群・第 11 群は各 5 匹とした。

- 第 1 群 仲野 TPs II+W
- 第 2 群 仲野 TPs II+Pd
- 第 3 群 仲野 TPs II+Pd+W
- 第 4 群 H 37 Rv TPs+W
- 第 5 群 H 37 Rv TPs+Pd
- 第 6 群 H 37 Rv TPs+Pd+W
- 第 7 群 仲野 BPs+W
- 第 8 群 仲野 BPs+Pd
- 第 9 群 仲野 BPs+Pd+W
- 第 10 群 仲野加熱死菌
- 第 11 群 流動パラフィン

各菌体成分及び加熱死菌が 1 mg/ml に含まれるように流パラを Adjuvant としてワクチンを作り、動物の両側大腿内面に 0.5 ml あて計 1 ml 筋注した。注射回数は 1 回である。注射開始時より毎週体重を測定、隔週にツベルクリン反応検査を 100 倍ツベルクリン液を用いて行った。

注射後 6 週目に小川培地 2 週間培養の仲野株の蒸留水浮游液を手振法で 1/500 mg/ml となるように作り、その 0.5 cc を右下腹部皮下に接種した。この際の生菌単位は 1.1×10^6 /mg であつた。感染後 6 週目に全動物を剖検、肉眼的病変を観察、脾内生菌数測定に定量培養法を行った。

実験成績

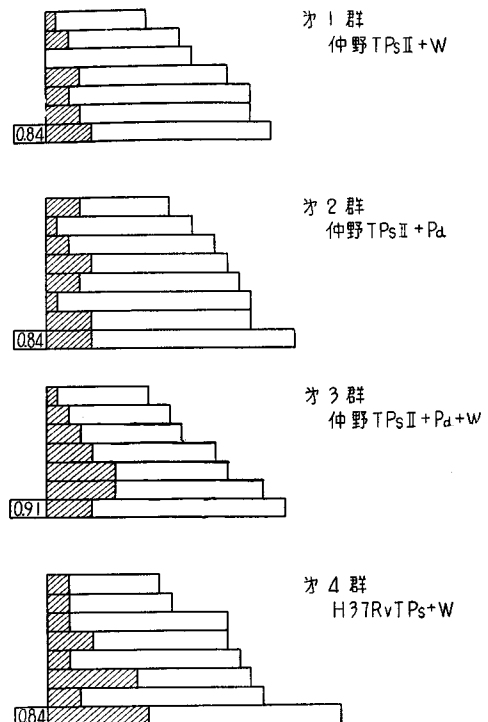
(1) 体重：実験中第 1 群で 1 匹、第 3 群で 1 匹が肺炎により死亡したので成績から除いた。死亡例の他には体重減少したものはなく、剖検前には 450~500 g に増加していて、各群間に差異はなかつた。

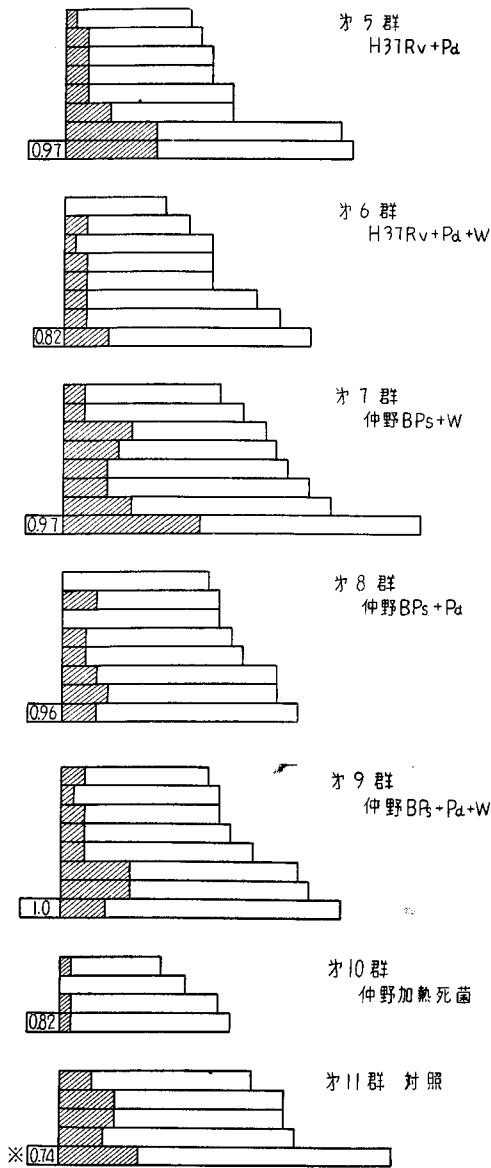
(2) ツベルクリン反応：表 4 に硬結の直径の平均値を示した。最も強い反応を示したのは加熱死菌群で、これに次ぐものは第 6 群 (H 37 Rv TPs+Pd+W) と第 9 群 (仲野 BPs+Pd+W) であつた。第 3 群 (仲野 TPs II+Pd+W) と第 11 群 (対照) は 6 週まで全例陰性であつた。

表 4. ツベルクリン反応の推移 (平均値 mm)

| 菌体成分の組合せ | | 週 | | | | | |
|-------------|-------|-----|------|------|------|------|------|
| | | 群 | 2 週 | 4 週 | 6 週 | 8 週 | 10 週 |
| 仲野 TPs II | +W | 1. | 0 | 4.1 | 5.3 | 7.2 | 15.4 |
| | +Pd | 2. | 0 | 3.5 | 4.6 | 8.6 | 14.1 |
| | +Pd+W | 3. | 0 | 0 | 0 | 8.4 | 16.2 |
| H 37 Rv TPs | +W | 4. | 4.6 | 6.7 | 9.1 | 17.4 | 18.5 |
| | +Pd | 5. | 0 | 4.2 | 7.4 | 9.6 | 16.6 |
| | +Pd+W | 6. | 7.4 | 9.9 | 10.3 | 15.4 | 17.4 |
| 仲野 BPs | +W | 7. | 2.1 | 1.8 | 4.7 | 9.7 | 14.5 |
| | +Pd | 8. | 2.8 | 8.4 | 7.5 | 12.0 | 12.8 |
| | +Pd+W | 9. | 7.4 | 12.9 | 10.3 | 13.6 | 16.6 |
| 仲野加熱死菌 | | 10. | 13.4 | 18.1 | 24.0 | 25.8 | 22.4 |
| 対照 (流パラ) | | 11. | 0 | 0 | 0 | 3.8 | 16.2 |

感染前の第 6 週目の陽転率は第 1 群 1/7, 第 2 群 1/8, 第 3 群 0/7, 第 4 群 2/8, 第 5 群 2/8, 第 6 群 3/8, 第 7 群 1/8, 第 8 群 2/8, 第 9 群 2/8, 第 10 群 4/5, 第 11 群 0/5 であつた。感染後 4 週で第 2 群の疑陽性 1 匹の他は全例陽性となつた。





※脾重量平均(%) 臓器病変 リンパ腺病変

図5. 臓器及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム

(3) 剖検成績: 図5及び図6に示す通り, 各群病変の間に認むべき差異はなく, 加熱死菌群の病変が稍軽度であり, 対照群と菌体成分注射群とは殆んど差がなかった。脾重量にも有意の差は認められなかった。

(4) 脾内生菌数: 表5に示すように, 加熱死菌群が非常に少ない菌数を示したが, 他は対照群も含めて著しい差は認められなかった。

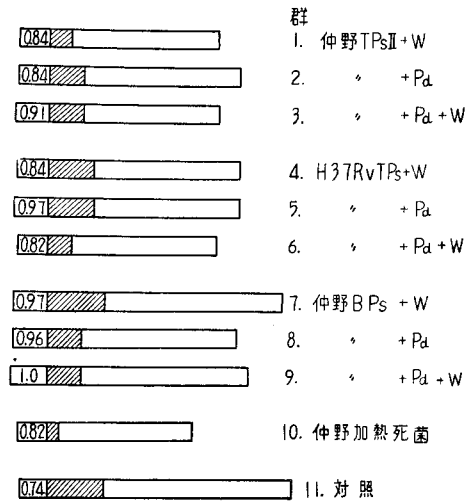


図6. 臓器及びリンパ腺肉眼的病変のヒストグラム(平均値)

表5. 脾内生菌数 (g 当り平均)

| 群 | | 脾内生菌数 |
|----|----------------|----------------------|
| 1 | 仲野 TPs II +W | 39.8×10 ⁸ |
| 2 | " +Pd | 29.7× " |
| 3 | " +Pd+W | 41.0× " |
| 4 | H 37 Rv TPs +W | 96.3× " |
| 5 | " +Pd | 33.6× " |
| 6 | " +Pd+W | 27.7× " |
| 7 | 仲野 BPs +W | 54.1× " |
| 8 | " +Pd | 43.6× " |
| 9 | " +Pd+W | 41.0× " |
| 10 | 仲野加熱死菌 | 1.7× " |
| 11 | 対 照 | 35.0× " |

考 察

実験 I 及び II では, 菌体磷脂質, 蛋白, ワックスについて検討を加えたので, 本実験では多糖体を中心にして実験を行なつたが, 前回の実験と同様顕著な効果はみられなかった。なお今回の実験では蛋白 (PPD-s) は用いながつたが, 実験動物中のあるものは弱いながらツベルクリンに反応するようになった。これは用いた多糖体の化学的性状から見て, この中に未だかなりの量の蛋白が含有されていたためと思われる。殆んど N の認められない仲野 TPs II の注射群ではこのような傾向が非常に弱かつたのはこのことを裏書していると思う。菌体内の多糖体は独立した構成成分として含まれることはなく他の構成

分と結合していると考えられている。即ち磷脂質、ワックス、核酸、核蛋白の構成成分として、又蛋白、脂質と結合して高分子シンプレックスとしても存在する。従つて単独で抽出された多糖体は沈降反応やアナフィラキシーの抗原としては尙くが、それ自体では生体内抗原性はないとされており²⁶⁾、今回の実験成績もそれを裏書しているようである。

多糖体に興味のあるのは他の成分と結合して尙く場合であるが、Crowle²⁹⁾は多糖体は蛋白と混合しても免疫はできないという。不破³⁰⁾は H37 Rv より得た菌体脂質 F₁ は糖脂質であつて弱いながら抵抗性を与えるという。Choucroun¹³⁾¹⁴⁾ は加熱結核菌の流パラ抽出物から得た画分いわゆる PMKo を菌体蛋白と共に動物に注射してツベルクリンアレルギーを惹起せしめたが、この画分は糖脂質であつた。しかしその構成成分である遊離のミコール酸や多糖体を単独又は混合して用いても不活性だつたという。この PMKo は Asselineau³⁶⁾ らの Wax-D に類似しているというが、この Wax-D もまた 1 種の糖脂質であることが知られている²⁰⁾。本実験では多糖体に磷脂質及びワックスを混合して菌体内に於ける状態に近似させてその効果のみよとしたが、どの群にも殆んど差はなく、ツベルクリンアレルギーは勿論顕著な免疫効果も得られなかつた。菌体内における多糖体と脂質の複雑なシンプレックスと単なる混合物とでは大きな差があるといわなければならない。

結 論

3 種の多糖体画分と菌体磷脂質及びワックスを組合せて動物に注射し、感染後剖検、脾培養を行なつた。対照の加熱死菌群の病変が軽かつただけで、他には免疫効果は殆んど認められなかつた。ツベルクリン反応も加熱死菌群に強く、他の群ではきわめて弱かつた。

実験 IV. 各種菌体成分の混合による免疫

実験——注射回数と Adjuvant の検討

これ迄の実験では、それぞれ磷脂質、蛋白、多糖体を中心に、又 Adjuvant としては流パラだけを使用して免疫効果のみて来たが、顕著な効果はみられなかつた。結局抽出された菌体成分 1 つ 1 つでは生体内抗原性は弱く、又これらをいくつか組合せたといつても、それは単なる混合物であつて菌体内に存在している symplex とは自ら性格が異なるために抗原性も弱いと考えられる。しかしここにもう 1 つ重要な問題は流パラは結核死菌菌体を免疫元とする場合は、アレルギー及び免疫効果増強の作用がある事は既に報告があるが¹⁷⁾⁻¹⁹⁾³⁷⁾³⁸⁾、本実験のように菌体成分そのものを免疫元として使用する場合は、果

して流パラのみで十分であるかどうかという事である。そこで今回は Adjuvant を再検討する意味で表面活性剤として Arlcel A を用い mineral oil として Drackeol を用いてみた。菌体成分はそれぞれ追加混合していく方法をとり、注射回数は 1 回及び 3 回を比較した。

実験材料

多糖体は H37 Rv BPs (以下 Ps)、磷脂質は Pd-ha (以下 Pd)、蛋白は予研 PPD-s (以下 Pr) 及びワックスとして Wax-BCG (以下 W) を用いた。Drackeol と Arlcel A の混合比は 9:1 にした。

加熱死菌としては小川培地 2 週培養のヒト型菌仲野株の 1 mg/ml 流パラ浮游液を 15 分間加熱殺菌したものをを用いた。

実験方法

前回までと略同様であつて、健康モルモット 400~500 g のもの 68 匹を 10 群に分け、第 1 群から第 8 群までは各 7 匹、第 9 群、第 10 群は各 6 匹とした。

- | | |
|--------|-------------------|
| 第 1 群 | Ps 1 回注射 |
| 第 2 群 | Ps+Pr 1 回注射 |
| 第 3 群 | Ps+Pr+Pd 1 回注射 |
| 第 4 群 | Ps+Pr+Pd+W 1 回注射 |
| 第 5 群 | Ps 3 回注射 |
| 第 6 群 | Ps+Pr 3 回注射 |
| 第 7 群 | Ps+Pr+Pd 3 回注射 |
| 第 8 群 | Ps+Pr+Pd+W 3 回注射 |
| 第 9 群 | Adjuvant のみ 3 回注射 |
| 第 10 群 | 加熱死菌 1 回注射 |

各抗原は上記の Drackeol と Arlcel A の 9:1 の混合物を Adjuvant として、各成分がそれぞれ 1 mg/ml の割合に含まれる様に調製した。これらのワクチンを動物の両側大腿内側に 0.5 ml あて計 1 ml 筋注射した。3 回注射群は初回後 1 週目に第 2 回を、2 週目に第 3 回を行つた。

初回注射時より毎週体重を測定し、隔週にツベルクリン反応及びワクチン注射局所の変化を観察した。

初回注射後 6 週目に小川培地 2 週培養のヒト型菌仲野株 1/250 mg/ml 蒸留水浮游液を 0.5 ml あて全動物の右下腹部皮下に接種した。この際生菌単位は 2.6×10^6 /mg であつた。

感染後 6 週目に全動物をエーテルで殺し剖検、内臓器及びリンパ腺の肉眼的病変を検査し、更に脾内生菌数を小川培地を用いて定量培養法により測定した。

実験成績

(1) モルモットは 68 匹中第 1 群の 1 匹が感作後 2 週で死んだ他は、対照群も含めて剖検直前には実験開始時

よりも100~200gの体重増加をみた。注射局所には強い硬結を生じ、特に3回注射群では大腿がはれあがり、初めは跛行するものもあつたが、特に障害をのこしたものはみられなかつた。

(2) ツベルクリン反応：硬結の直径の平均値を表6に示した。

表6. ツベルクリン反応の推移 (平均値 mm)

| 群 | 週 | 週 | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 2回 | 3週 | 4週 | 6週 | 8週 | 10週 |
| 1. Ps | 1回注射 | 2.0 | 7.5 | 7.0 | 6.9 | 7.9 | 17.2 |
| 2. Ps+Pr | 1回注射 | 3.3 | 6.5 | 15.6 | 14.1 | 11.1 | 18.1 |
| 3. Ps+Pr+Pd | 1回注射 | 10.9 | 18.8 | 24.6 | 22.4 | 24.6 | 22.7 |
| 4. Ps+Pr+Pd+W | 1回注射 | 15.4 | 25.2 | 29.8 | 27.4 | 26.4 | 24.2 |
| 5. Ps | 3回注射 | 1.9 | 10.3 | 13.1 | 11.7 | 19.3 | 17.8 |
| 6. Ps+Pr | 3回注射 | 4.8 | 3.9 | 4.6 | 12.6 | 12.5 | 19.5 |
| 7. Ps+Pr+Pd | 3回注射 | 6.8 | 10.7 | 15.8 | 19.7 | 20.3 | 22.0 |
| 8. Ps+Pr+Pd+W | 3回注射 | 10.2 | 21.5 | 22.5 | 22.9 | 21.0 | 25.0 |
| 9. 対 照 | | 0 | 0 | 0 | 2.9 | 7.9 | 16.8 |
| 10. 加 熱 死 菌 | | 10.0 | 13.8 | 16.9 | 22.0 | 21.9 | 23.0 |

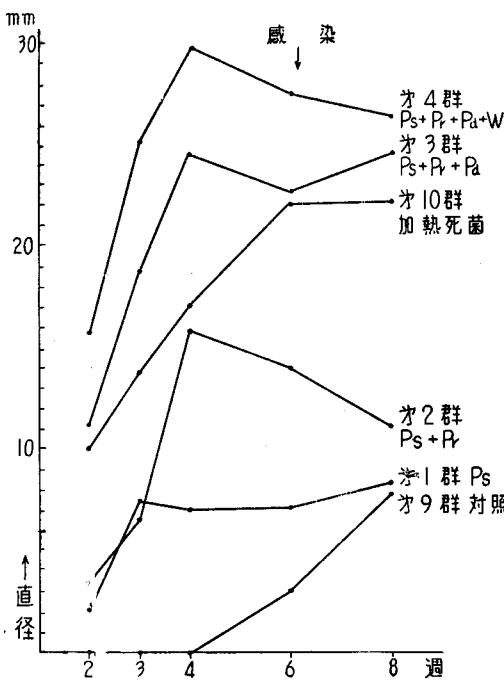


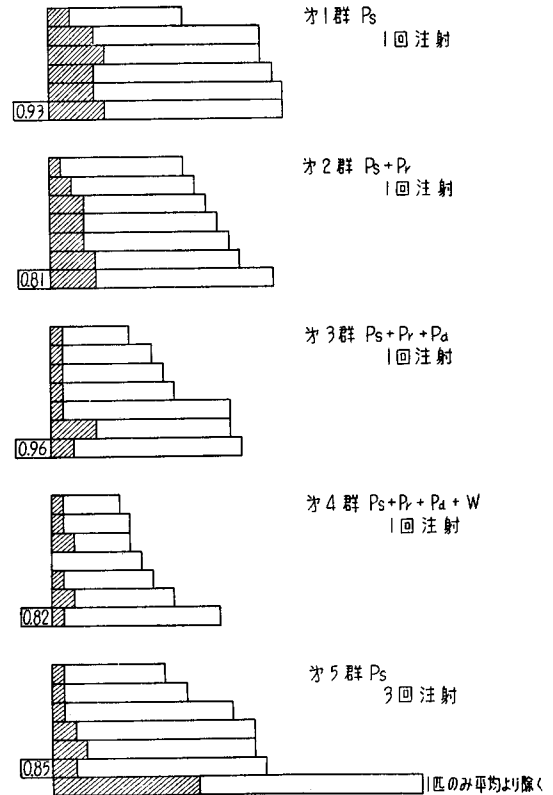
図7. ツベルクリン反応の推移

1回注射群についてみると、第1群から第4群になるにつれて直径も陽転率も大となつた。直径に関しては第

1群と第2群、第2群と第3群の間には推計学上有意の差があり、第3・第4群の間には有意の差はなかつた。Ps単独の第1群は対照の第9群と大差はなかつたが、第3群と第4群は加熱死菌の第10群よりも強い反応を示した。この関係は図7に示した。

次に3回注射群についてみると1回注射群程各群間の差は大ではないが、同様に第5群から第8群になるにつれて反応の強くなる傾向がみられた。1回注射群より3回注射群の方が反応が弱かつたのは、ワクチン反復注射による脱感作のためと考えられる。感染前の第6週目の陽転率をみると、直径10mm以上を陽性として第1群0/6、第2群5/7、第3群7/7、第4群7/7、第5群5/7、第6群3/7、第7群6/7、第8群7/7、第9群0/6、第10群6/6であつてPs+Pr+Pdを含む群及び加熱死菌群にツベルクリンアレルギーの強いことがみられた。感染後4週目には全例ツ陽性となつた。

(3) 剖検成績：図8と図9に示した。図9には各群の平均を示した。但し第5群中の1匹は病変が異常に強く結核に対する特異体質の個体と考えられたので平均値には加えなかつた。



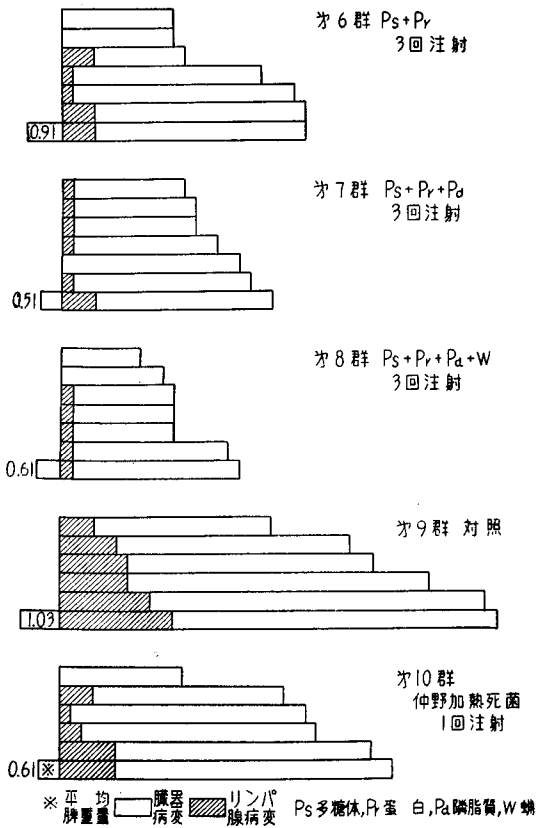


図8. 臓器及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム

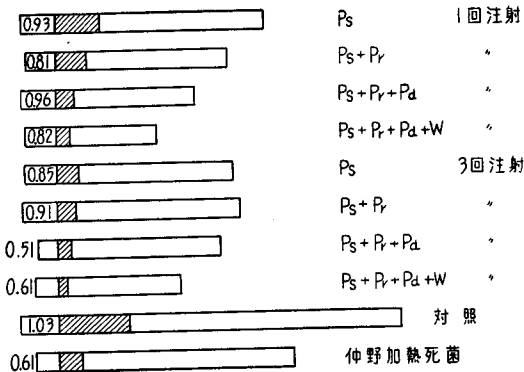


図9. 臓器及びリンパ腺の肉眼的病変のヒストグラム(平均値)

これらの図から明らかなように、対照群に比べると各群とも病変は著しく軽減され、ことに興味をひくことは、毒力菌感染前は弱いツベルクリンアレルギーしか見られなかつた第1群のPs単独1回注射群においても、病変は加熱死菌注射群と同程度に軽減していた事である。又

Psに順次Pr, Pd, Wを混合するに従つて病変は次第に軽減され、最後のPs+Pr+Pd+W群には、1回注射群3回注射群とも病変らしいものが認められず、経験上BCG 1mg接種の場合に見られる免疫効果にまさるとも劣らない結果であつた。脾の重量も対照に比べると著しく軽く、ことにPs+Pr+Pd及びPs+Pr+Pd+Wの3回注射群では正常脾と殆んど変りがなかつた。

1回注射群と3回注射群を比較すると軽度ながら3回注射群に免疫効果が強く出現した。

(4) 脾内生菌数: 表7に示した。

表7. 脾内生菌数(g当り平均)

| 群 | ワクチンの種類 | 注射回数 | 脾内生菌数 |
|----|------------|------|-----------------------|
| 1 | Ps | 1回 | 46.9×10 ³ |
| 2 | Ps+Pr | 〃 | 37.5×10 ³ |
| 3 | Ps+Pr+Pd | 〃 | 8.1×10 ³ |
| 4 | Ps+Pr+Pd+W | 〃 | 1.7×10 ³ |
| 5 | Ps | 3回 | 22.3×10 ³ |
| 6 | Ps+Pr | 〃 | 15.5×10 ³ |
| 7 | Ps+Pr+Pd | 〃 | 13.9×10 ³ |
| 8 | Ps+Pr+Pd+W | 〃 | 13.2×10 ³ |
| 9 | Adjuvantのみ | 〃 | 222.0×10 ³ |
| 10 | 加熱死菌 | 1回 | 12.4×10 ³ |

対照群に比べるといづれの群においても生菌数は著しく少なく、又病変の肉眼的所見に平行して、各成分を追加混合するに従つて生菌数が減少している事が目立つ。

考 察

各菌体成分が密接に結合したシプレックスがアレルギー又は免疫元として効くもので、成分単独でも混合でもシプレックスには及ばず、結局シプレックスとしての生菌乃至は死菌体が抗原として最も有効であろうというのが前回までの実験成績から得た考え方であつた。しかしこの考え方は今回の実験成績からみて変更せざるを得ないようである。今回の実験が前回までの実験とちがうところはAdjuvantとしてmineral oilに加うるに表面活性剤としてのArlacel Aを加えた点である。今回の実験においてはこの表面活性剤が共存する菌体成分相互間の物理的親和性をたかめるか、或いはそれらを細胞に近づけてより強い細胞反応をおこし、その結果としてアレルギー及び免疫が生菌乃至死菌免疫に匹敵する程強く現れたものと考えられるが、いづれにせよ生体に対して強力な免疫乃至はアレルギーを賦与するために、個々の菌体成分がシプレックス状態で存在しなくてもいい事

になる。もう1つ注目すべき点は、今回の実験条件の下に於いては、菌体多糖体単独でかなりの免疫効果があらわれ、しかも此の場合ツベルクリンアレルギーは極めて弱く、多糖体に蛋白として PPD-s を加えると強いツベルクリンアレルギーが出現するが、免疫効果には、蛋白を加えても加えなくても、さ程差が認められなかつた事実である。この事実とはりもなおさず、結核におけるアレルギーと免疫とは互いに独立した別個の生体反応乃至は状態であつて、菌体成分からみると、アレルギーは菌体蛋白によつて惹起され、免疫は菌体多糖体によつて惹起されるという可能性を強く示唆しているものと思われる。高橋及び協同研究者は1% 塩酸アルコールで結合脂質を完全に除去した脱脂菌体残渣及び1% 塩酸で加水分解して完全に抗酸性を失つた菌体残渣は、それら単独では動物に対して何らアレルギー賦与力も免疫力もないが、これに今回の実験に用いたのと同じ Wax-BCG を混合し、流パラを Adjuvant として動物に注射すると、BCG 免疫に匹敵する程の免疫効果が見られるが、ツベルクリンアレルギーは殆んど出現しない事実を見ている³⁹⁾。このことと今回の実験成績を合せ考えれば、結核におけるアレルギーと免疫とは全く異なつた独立した機能に属すると考えざるを得ない。この点に関する詳細は目下追及中である。

又今回の実験で免疫効果はワクチン3回注射群の方が1回注射群より軽度ながらすぐれていたが、ツベルクリンアレルギーの強さは1回注射群より弱かつた。これは3回注射群においては注射の都度脱感作されたためと思われるが、この事実もまた免疫とアレルギーとが同一機転に属さない事を示しているものと思われる。

結 論

菌体多糖体、ツベルクリン蛋白、菌体磷脂質及びワックスと順次に菌体成分を追加混合し、Adjuvant として表面活性剤 Arlacel A 及び Drackeol を用いてモルモットに注射し、免疫効果及びツベルクリンアレルギー発現状況を検討して次の結果を得た。

(1) 菌体多糖体単独でもかなりの免疫効果がみられ、逆に此の場合はツベルクリンアレルギーは極めて弱かつた。

(2) ツベルクリン蛋白 (PPD-s 予研) を追加するとツベルクリンアレルギーが強力に出現する傾向がみられたが、それによつて免疫効果はそれ程増強されなかつた。

(3) 多糖体、蛋白に磷脂質及びワックスを順次追加するにつれて免疫効果は増大し、加熱死菌群のそれをはるかに凌駕した。

(4) 脾内生菌数はほぼ病変に平行した。

総 括

以上4回実験を繰返して、最後に、とにもかくにも、結核菌体成分をワクチンとして、死菌免疫乃至は BCG 免疫に匹敵する程の強い免疫効果とアレルギー効果を動物に賦与する事に成功したわけである。従来結核菌体成分の免疫学的研究は各人各様の方法で行なわれていて、考え方も研究者によつてまちまちであるが^{2) 4) 40) - 43)}、その際大概の場合 Adjuvant として流パラが用いられている。この種の研究に Adjuvant として流パラのみでは不十分なことが今回の実験成績から明らかにされた。今回の実験で流パラに加えるに表面活性剤として Arlacel A を用い、顕著な効果が得られた事は注目に値すると思う。

又、はじめに述べたように、従来結核免疫は感染免疫と考えられていたが、今回の実験事実からみて、この考えはすてられるべきであると思う。

終りにあたり御懇篤な御指導と御校閲を賜つた高橋教授に深謝し、御指導御援助をいただいた有馬助教授、山本講師に感謝の意を表す。又御協力いただいた小野院長、医局の諸兄姉及び試験室の諸氏に感謝する。

文 献

- 1) Opie, E. L. & Freund, J.: J. exp. med., 66, 761, 1937.
- 2) Weiss, D. W. & Dubos, R. J.: J. exp. med., 103, 73, 1956.
- 3) Weiss, D. W. & Dubos, R. J.: J. exp. med., 101, 313, 1955.
- 4) Dubos, R. J. et al.: Am. Rev. Tuberc., 73, 781, 1956.
- 5) Raffel, S. et al.: J. exp. med., 88, 485, 1948.
- 6) Smith, D. W. & Kubica, G. P.: Proc. soc. exp. biol., 90, 629, 1955.
- 7) 山口 登: 日本細菌学雑誌, 12, 277, 1957.
- 8) 山口 登: 同上, 12, 377, 1957.
- 9) 高木重敏: 結核の研究, 第8集, 121, 1957.
- 10) 高橋義夫: 未公表 (結核の研究に発表予定)
- 11) Raffel, S.: J. Inf. Dis., 82, 267, 1948.
- 12) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 10, 1003, 1955.
- 13) Choucroun, N.: C. R. Acad. Sci., 226, 1477, 1948.
- 14) Choucroun, N.: ibid., 229, 145, 1949.
- 15) 深江 肇: 未公表 (結核の研究に発表予定)
- 16) Boquet, A. & Nègre, L.: Ann. Inst. Pasteur., 37, 787, 1923.
- 17) Coulaud, E.: Rev. Tuberc., 2, 850, 1934.
- 18) Saenz, A.: Compt. rend. soc. biol., 120, 1050, 1935.
- 19) Freund, J.: Am. Rev. Microbiol., 1, 291, 1947.

- 20) Anderson, R. J.: Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe, 3, 145, 1939.
- 21) Raffel, S.: Am. Rev. Tuberc., 54, 564, 1946.
- 22) Raffel, S. et al.: J. exp. med., 90, 53, 1949.
- 23) Youmans, A. S.: Proc. soc. exp. biol., 96, 762, 1957.
- 24) Pinner, M.: Am. Rev. Tuberc., 17, 86, 1928.
- 25) 高橋義夫: 胸部疾患, 3, 486, 1959.
- 26) 山村雄一: 結核菌の生化学, 共立出版, 1955.
- 27) Seibert, F. B. et al.: J. Biol. Chem., 140, 55, 1941.
- 28) Seibert, F. B.: J. immunol., 65, 297, 1950.
- 29) Crowle, A. J.: Bact. Rev., 22, 183, 1958.
- 30) 宮森正孝: 金沢大学結核研究所年報, 16 上, 11, 1958.
- 31) 佐々木卓也: 結核の研究, 第5集, 68, 1956.
- 32) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 62, 233, 1950.
- 33) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 29, 1480, 1950.
- 34) Seibert, F. B. & Stacey, M.: Biochim. Biophys. Acta, 3, 632, 1949.
- 35) 不破博徳: 名古屋医学, 68, 374, 1954.
- 36) Asselineau, J. & Lederer, E.: C. R. Acad. Sci., 228, 1892, 1949.
- 37) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 10, 499, 1955.
- 38) 金井興美: 医学と生物学, 36, 202, 1955.
- 39) 高橋義夫他: 未公表 (結核の研究に発表の予定)
- 40) Choucroun, N.: Am. Rev. Tuberc., 56, 203, 1947.
- 41) Choucroun, N.: ibid., 59, 710, 1949.
- 42) 山口 登: 日本細菌学雑誌, 12, 89, 1957.
- 43) 金井興美: 結核, 27, 124, 1952.
- 44) 染谷四郎: 第15回日本医学会総会学術集会記録(III) 445, 1959.
- 45) 荒見三郎: 胸部疾患, 3(4), 273, 昭34.
- 46) Rich, A. R.: The Pathogenesis of Tuberculosis. C. C. Thomas, 2nd ed. (1951)