

ツベルクリン反応に関する解析的研究

第2報 ツベルクリン反応からみた抗酸菌の近縁性について

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：西東利男教授）

福 山 裕 三

（受付：昭和41年6月15日）

緒 言

ツベルクリン反応の型特異性に関する問題は古くから論議されてきているが、最近、精製ツベルクリンの開発と非定型抗酸菌の研究が進むにつれてこれらに関する報告が多く見られるようになってきた。

すなわち、sensitin を用いた Magnusson¹⁾ の報告、 π を用いた武谷²⁾ らの報告等があり、臨床的にも PPD や π を用いて非定型抗酸菌症を結核症から鑑別する試みがなされ、実用³⁾ にも供されるようになってきている。

しかしながら、ツベルクリン反応の型特異性を論ずる場合、個体の感作状態と使用するツベルクリンの濃度について十分に検討されるべきであり、そのためには、精製ツベルクリンを用いた場合でもただ一濃度だけで反応を試みるのではきわめて不備であることを痛感した。著者

は先に数段階に希釈した精製ツベルクリンを用いて皮内反応を行ない、48時間後のツ反発赤径を各濃度に対しプロットすることにより得られる曲線⁴⁾（ツベルクリン反応度曲線）によりツベルクリン反応に関与する諸因子の解析的考察⁵⁾を行ない、この曲線は個体の感作状態に対応して一定の形を示すことを明らかにし、さらに H₃₇Rv 株感作動物に各種抗酸菌の o-Amino-phenol Azo-Tuberculin による皮内反応を行なった場合に得られるツ反応度曲線から H₃₇Rv 株とこれらの抗酸菌との近縁性を推測できることを報告⁶⁾した。

そこで、本報では各種抗酸菌感作動物について交差皮内反応を試み、各種抗酸菌間の近縁性について詳細な検討を行なったので、以下その成績について述べる。

実 験 材 料

- 1) 供試菌株：ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株、ウシ型結核菌 BCG 株、photochromogen P-22 株、scotochromogen 松本株、nonphotochromogen 甲府株、rapid grower 三林株および山本 S 株、スメグマ菌、以上 8 株についてツベルクリンの製造および動物の感作が行なわれた。
- 2) ツベルクリン：o-Aminophenol Azo-Tuber-

culin (AT) は上記 8 種の抗酸菌のソートン加熱培養濾液より伊藤・越村⁷⁾ の法により精製され、各 AT は 10, 25, 50, 100 γ /0.1 ml の系列に希釈して使用した。

- 3) 実験動物：300 gm 前後の白色の雄モルモット 72 匹を感作株別に 8 群に分けて使用した。

実 験 方 法

各群 9 匹の動物を上記 8 株中 1 株の死菌 5 mg を含む流動パラフィンワクチンで感作し、4 週後に AT 10, 25, 50, 100 γ /0.1 ml を一系列として 0.1 ml ずつ第 1 表のような組合せでモルモットの背部に交

差皮内反応を行ない、48時間後の発赤の長短両径の平均値を記録し、そのデーターからツ反応度曲線を描き比較検討した。

第1表 感作群と AT 系列の組合せ

AT の種類 動物数 感作群別			H ₃₇ Rv	BCG	P-22	甲 府	松 本	三 林	山 本 S	ス メ グ マ
H ₃₇ Rv	A	3	○	○	○		○	○		○
	B	3	○			○	○	○		
	C	3	○						○	○
BCG	A	3	○	○	○		○	○		
	B	3		○		○	○	○		
	C	3		○					○	○
P-22	A	3	○	○	○					
	B	3			○	○	○	○		
	C	3			○				○	○
甲 府	A	3	○	○	○	○				
	B	3				○	○	○		
	C	3				○			○	○
松 本	A	3	○	○	○		○			
	B	3				○	○	○		
	C	3					○		○	○
三 林	A	3	○	○	○			○		
	B	3				○	○	○		
	C	3						○	○	○
山本S	A	3	○	○	○				○	
	B	3				○	○	○	○	
	C	3							○	○
スメグマ	A	3	○	○	○					○
	B	3				○	○	○		○
	C	3							○	○

○印は使用した AT の種類を示す。

実験成績および考案

実験から得られた発赤径をもとに各感作群ごとに各AT系列別にツベルクリン反応度曲線を描くと第1図のように表わされる。

H₃₇Rv 感作群では H₃₇Rv-, BCG-AT 系列が強く反応するが、低濃度では前者が幾分強く反応する。次いで松本-, 甲府-, P22-AT 系列がほとんど同様の強さの反応を示して続き、三林-, スメグマ-, 山本 S-AT 系列ははるかに弱い反応しか示さない。

BCG 感作群でも H₃₇Rv 感作群とほとんど

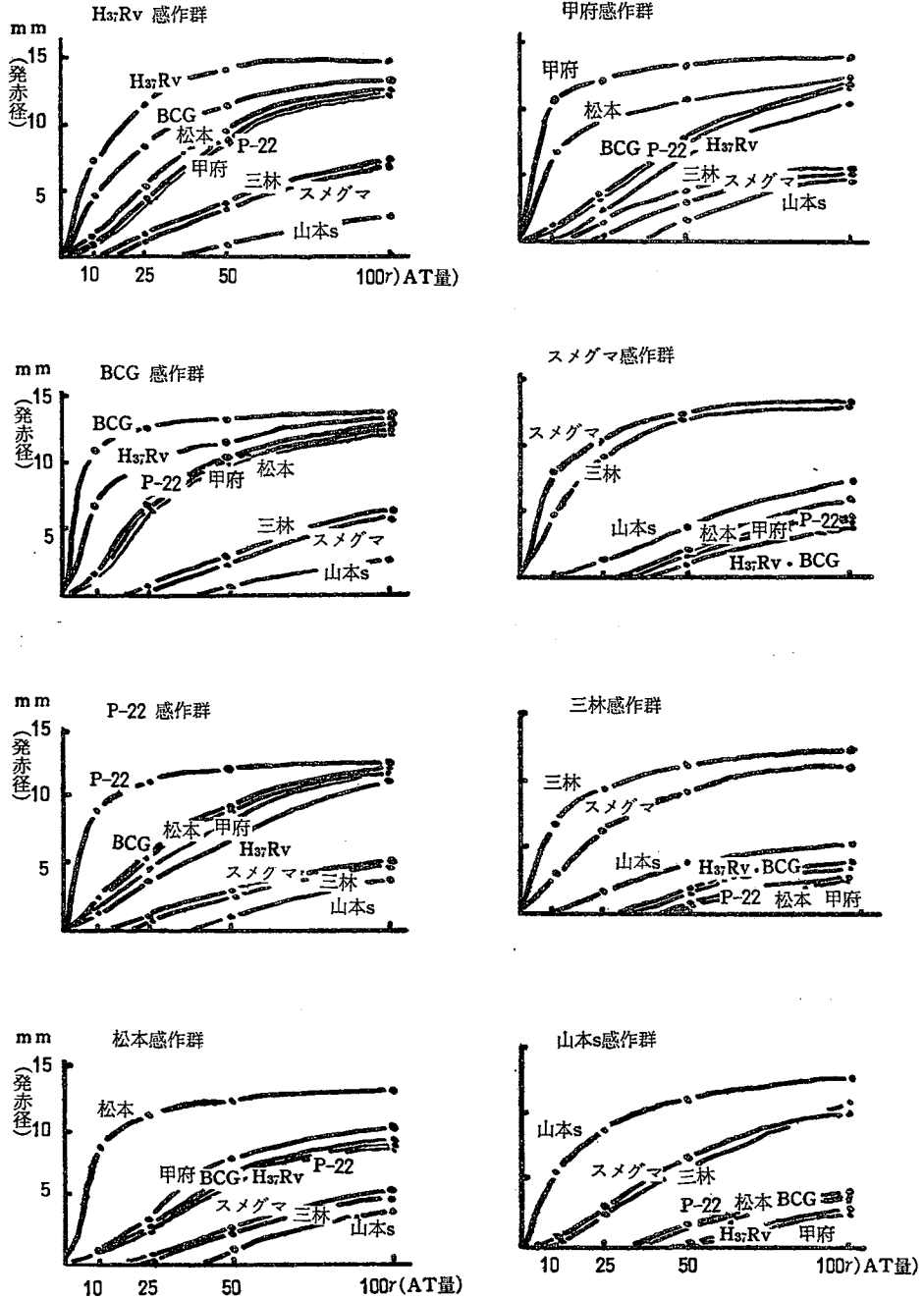
同様の傾向を示すが、感作株に対応する BCG-AT 系列は H₃₇Rv-AT 系列より幾分強く反応することが認められる。

P-22, 松本感作群では感作株に対応する AT 系列が最も強く反応し、次いで松本-または P-22-, 甲府-, H₃₇Rv-, BCG-AT 系列がほとんど同じくらいの強さの反応を示すが、他の AT 系列ではきわめて弱い反応を示す。

甲府感作群では前2群に似た交差反応を示すが、松本 AT 系列とかなり強い反応を示す点

第1図 各種抗酸菌のAT交差皮内反応

—2 mg 死菌流パラ感作4週後 AT 10, 25, 50, 100r 皮内反応実施—



が異なっている。

スメグマおよび三林感作群では感作株に対応する AT 系列が最も強く反応し、またこの両株の間はかなり強い交差反応が認められる。しかし他の AT 系列ではいずれも弱い反応を示すにとどまっている。

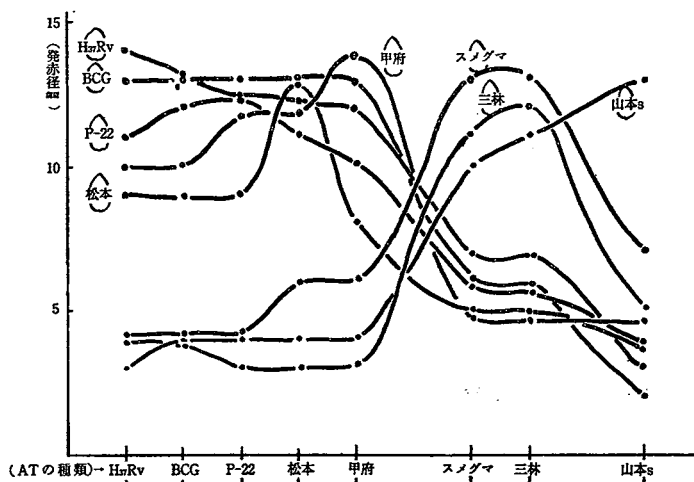
山本 S 感作群では、スメグマ、三林-AT 系列にかなりの交差反応を認めることができるが、他の AT 系列ではきわめて弱い反応しか示さなかった。

このように 8 群の感作動物に 8 種の AT 系列で交差皮内反応を行なった結果、感作菌株に対応する AT 系列が最も強く反応し、次いで比較的交差反応の強いもの、弱いもの、ほとんど交差反応の認められないものに区別されることがわかる。また、高濃度の AT を用いた場合には交差反応は全般に強く現われ、低濃度の AT を用いた場合は感作株に対応する AT にも強い反応が認められる。

この関係をより明確に示すために、この交差

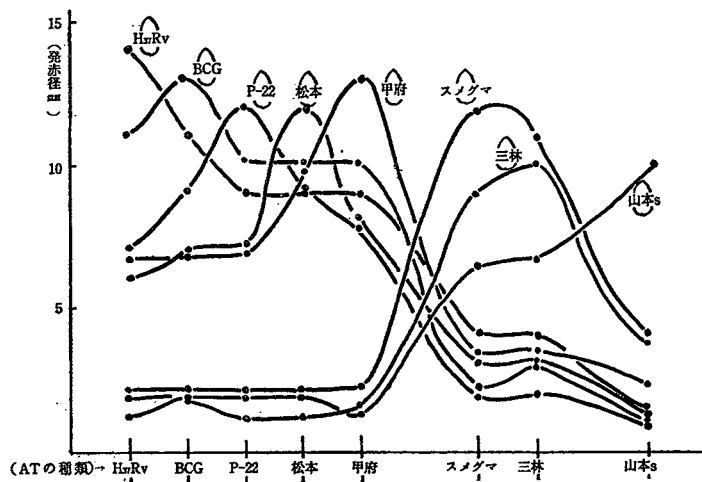
第 2 図 各種抗酸菌の AT 交差皮内反応

—2 mg 死菌流パラ感作 4 週後, 100r AT にて交差皮内反応—



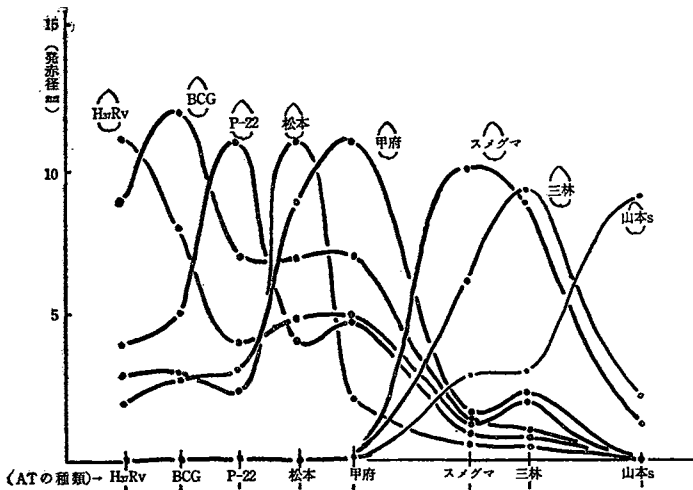
第 3 図 各種抗酸菌の AT 交差皮内反応

—2 mg 死菌流パラ感作 4 週後, 50r AT にて交差皮内反応—



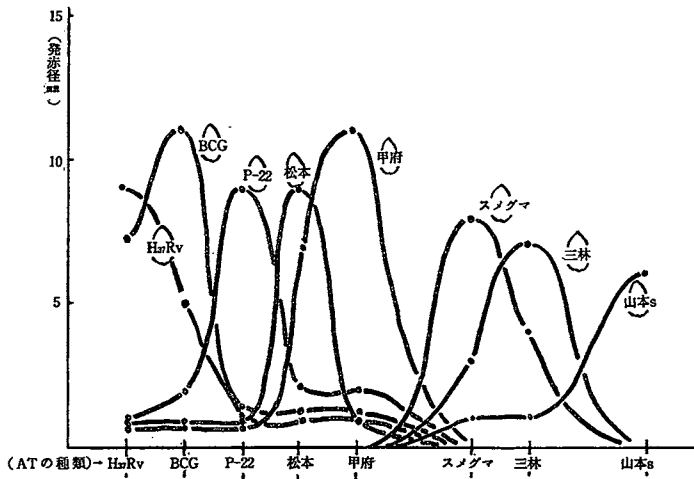
第4図 各種抗酸菌の AT 交差皮内反応

—2 mg 死菌流パラ感作4週後, 25r AT にて交差皮内反応—



第5図 各種抗酸菌の AT 交差皮内反応

—2 mg 死菌流パラ感作4週後, 10r AT にて交差皮内反応—



皮内反応の成績を濃度別に図示して検討した。

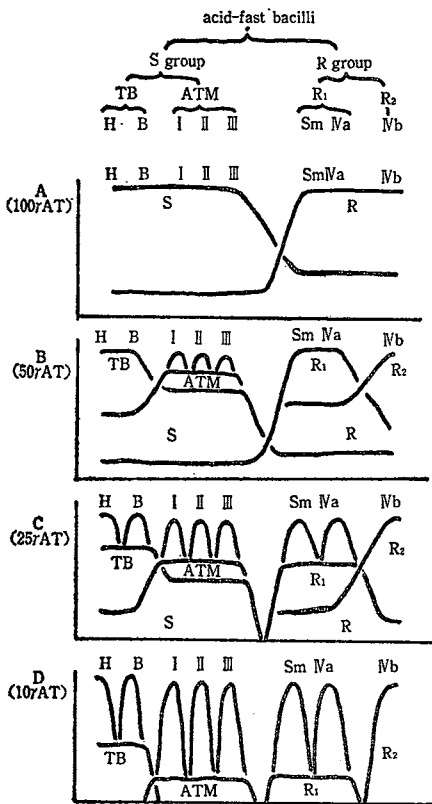
これらの図では種々の AT に対し該当する皮内反応の発赤径をプロットし、各感作群ごとに各点を結んで曲線を作り、それらの曲線の形を相互に比較した。この際図の横軸に配した AT の種類の順序は、この実験で得られた AT 交差皮内反応の成績を基礎にして、H₃₇Rv 株感作群に強い交差反応を示す順に各 AT を配列し、また各感作群に対する交差反応の強弱も充分に考慮して決定したものである。

100r AT を用いた場合は H₃₇Rv-, BCG-, P-22-, 松本-, 甲府-AT に強く交差反応を示す感作動物群と、スメグマ-, 三林-, 山本S-AT に強く交差反応をおこす群にわかれる。50r AT を用いた場合は、前者は slow grower 全般に強く交差反応を呈する結核菌感作群 (H₃₇Rv および BCG 感作群) が P-22, 松本, 甲府感作群とわかれて亜群を形成し、後者もスメグマ, 三林感作群と山本S感作群の2亜群に区別されるようになる。25r AT を用いた場合に

はこれらの亜群の形成が一層はっきり識別できるようになる。10r AT を用いた場合は群および亜群の形成は不明瞭となり、各 AT の特異性がはっきり見られるようになる。しかし H₃₇R_v および BCG 感作群間とスメグマおよび三林感作群間では交差反応が残るが、これは H₃₇R_v 株と BCG 株、スメグマ菌と三林株がきわめて近縁な関係にあることを示唆するものと思われる。

この関係をシェーマ化してみれば第6図のようになる。

第6図 ツ反からみた抗酸菌の近縁性



すなわち、高濃度の AT 交差皮内反応ではまず slow grower AT に交差反応を示す群 (S群) と rapid grower AT に強く交差反応を示す群 (R群) に大別される。AT の濃度を下げるに従い、S群は結核菌 AT に強く交差反応を示す TB 亜群と結核菌 AT に弱い交差

反応を示す ATM 亜群にわかれ、同様に R群は R₁ 亜群と R₂ 亜群にわかれるようになる。さらに濃度を下げれば群および亜群の識別は困難となり、個々の AT 特異性のみが残るが、この場合、反応自体もかなり弱くなっている。

以上のことからツベルクリン交差皮内反応における型特異性は高濃度の抗原を用いれば群特異性を示し、濃度を下げれば群特異性は亜群特異性を示すようになり、さらに濃度を下げれば亜群特異性は種特異性として示されるようになるものと推察される。

このような関係は o-Aminophenol Azo-Tuberculin (AT) 特有のものではないと思われるので他の精製ツベルクリンである sensitin および π について文献から引用して同様の作図法により図示し検討した。

第7図は Magnusson¹⁾ の報告に基づくもので、0.2r sensitin を用いた各種抗酸菌の交差皮内反応を示したものである。この図は第6図Bに相当すると思われるが、AT を用いた場合に比べて全般的に特異性の差が少なく、亜群の形成もはっきりしないように思われる。

武谷²⁾ らの π を用いた交差皮内反応の成績から引用したのが第8図である。この図も第6図Bに相当するものと思われるが、sensitin に比べて、特異性の差もかなり強く亜群の形成も認められ、AT に近い成績を示している。

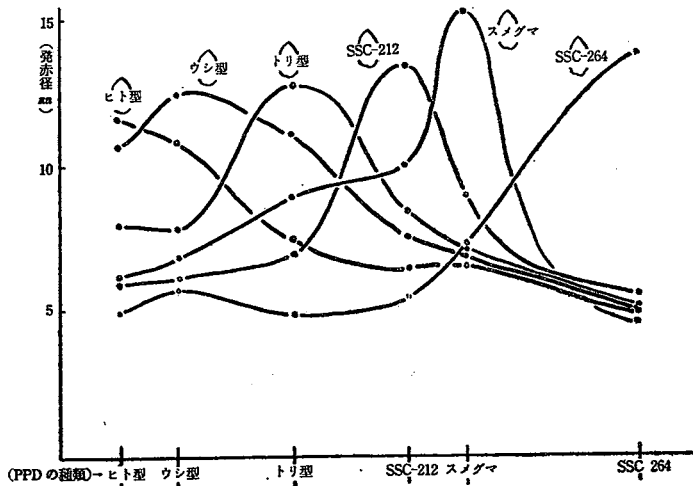
この二つの場合はいずれも感作期間に相当幅があり感作状態が一定しておらず、また1~2段階の濃度で実験しているので、o-Aminophenol Azo-Tuberculin と sensitin, π の三者の皮内反応における型特異性の判別能力の優劣を論ずることは困難であると思われる。

これらの精製ツベルクリンに比べて old-tuberculin (OT) を用いた場合はどのような図が得られるかは興味ある問題であろうと思われる。そこで福山³⁾ の成績から引用して作図した OT 交差皮内反応の成績を第9図に示す。

これは第6図Cの場合に相当し、群および亜群の形成が見られ、精製ツベルクリンとあまり変わらないように見える。しかし OT は培養条

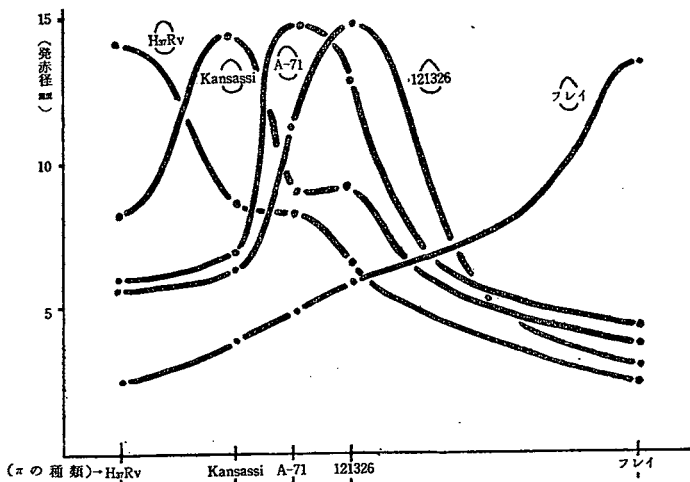
第7図 各種抗酸菌の Sensitin 交差皮内反応

—4 mg 死菌流パラ・Bayol-F 感作4 21後, 0.2r sensitin にて交差皮内反応—



第8図 各種抗酸菌の π 交差皮内反応

—6 mg 死菌流パラ感作4~8 週後, 1r π にて交差皮内反応—



件によりツベルクリン反応物質にかなりの差があると考えられるためにこの種の実験には不適当であろうと考えられる。

このようにして、ツベルクリン交差皮内反応により各菌株間の交差反応の強弱から抗酸菌を要領よく分類できるものと思われる。また各抗酸菌間の交差反応の強弱により配列した順位はこれらの抗酸菌相互の近縁関係を示すものであろうと推測される。

そこで、この推測の妥当性を検討するために

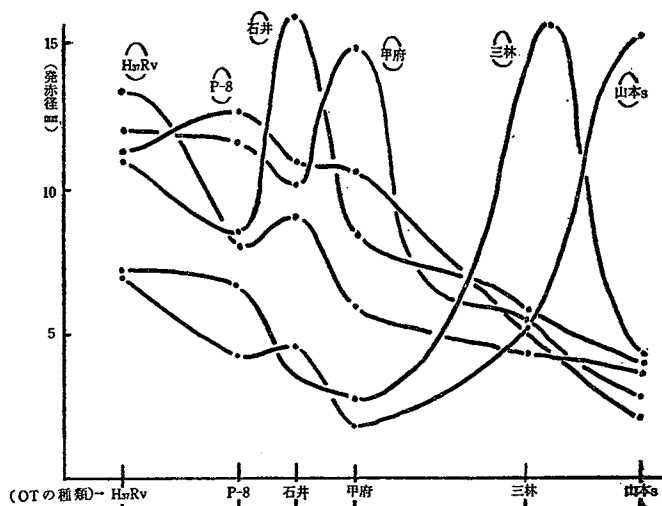
AT 交差皮内反応から得られた抗酸菌の配列順位と15種の主要な抗酸菌の性状との関係を第2表に示し検討した。

ここに挙げた抗酸菌の分類法はいずれも例外が非常に少なく、従って充分信頼に足るものを集めたものである。肉太の記号は抗酸菌の分類上重要な所見を示したものである。

この肉太の記号の配列状態はニコチンアミダーゼ・テスト以外はいずれの試験でも一つのグループをなして連なり、この実験で得られた各

第9図 各種抗酸菌の OT 交差皮内反応

—5 mg 死菌流パラ感作5週後, 10倍 OT にて交差皮内反応—



第2表 各種抗酸菌の諸性状とツ反による分類との関係

ツ反による分類	群 亜群	S 群					R 群		
		TB 亜群		ATM 亜群			R ₁ 亜群		R ₂ 亜群
		ヒト型	ウシ型	I	II	III	スメグマ	IV b	IV a
分類法	株	H ₃₇ Rv	BCG	P-22	松 本	甲 府	スメグマ	三 林	山本S
ナイアシンテスト ⁹⁾		+	—	—	—	—	—	—	—
コード形成 ¹⁰⁾		+	+	±	—	—	—	—	—
中性紅反応 ¹¹⁾		+	+	—	—	—	—	—	—
病原性	モルモット	+	+	±	—	—	—	—	—
	ウサギ	+	+	±	—	—	—	—	—
	マウス	+	+	+	±	±	—	—	—
ニコチン アミダーゼ反応 ¹³⁾		+	—	+	+	+	+	—	—
光発色性		—	—	+	—	—	—	—	—
ウレアーゼテスト ¹⁴⁾		+	+	+	—	—	+	+	+
アリル サルファターゼ反応 ¹⁵⁾		—	±	+	+	+	+	+	+
25°C の発育		—	—	+	+	+	+	+	+
3日以内の発育		—	—	—	—	—	+	+	+
フォルム アミダーゼテスト ¹⁶⁾		—	—	—	—	—	+	+	+
アリルサルファターゼ ¹⁷⁾ 3日テスト		—	—	—	—	—	—	+	+
PAS 黒化反応 ¹⁸⁾		—	—	—	—	—	—	+	+

菌の分類上の位置と他の分類法によるものとはほぼ一致しているように思われる。

このように AT 交差皮内反応から 推論され

た菌群の順位が菌分類上妥当性を有し、またこの順位は抗酸菌の近縁性の順位を示すものと考えてよいと思われる。

結

各種抗酸菌 8 株（ヒト型結核菌，ウシ型結核菌，非定型抗酸菌 I 群，II 群，III 群，スメグマ菌各 1 株，非定型抗酸菌 IV 群 2 株）の死菌流パラワクチン感作モルモットに各菌の加熱培養濾液より精製した o-Aminophenol Azo-Tuberculin (AT) 10, 25, 50, 100 r/0.1 ml の系列で交差皮内反応を行ない，AT の種類と皮内反応発赤径（48 時間値）の関係を各濃度ごとに各感作群別に調べた。

高濃度の AT を用いた場合には slow grower に交差反応を示す群 (S 群) と rapid grower に交差反応を示す群 (R 群) に大別される。AT の濃度を下げれば S 群はヒト型，ウシ型結核菌

論

に交差反応を示す亜群 (TB 亜群) と非定型抗酸菌 I, II, III 群に交差反応を示す亜群 (ATM 亜群) にわかれ，同様に R 群は R₁ 亜群と R₂ 亜群にわかれる。さらに AT の濃度を下げれば群，亜群の存在は認めがたくなり，各菌株の AT 特異性のみを認めうるようになる。

このようにして各種抗酸菌間の交差反応の強弱により配列した場合の順位（ヒト型～ウシ型～I 群～II 群～III 群～スメグマ～IVb 群～IVa 群）は抗酸菌の他の分類法による位置とはほぼ一致し，従ってこの順位は抗酸菌の近縁性を示していると解してよいと考えられる。

文

献

- 1) Magnusson, M. : Am. Rev. Resp. Dis., 83, 57, 1961.
- 2) Takeya, K., Zinnaka, Y., Yamamura, K., Toda, T. : Am. Rev. Resp. Dis., 81, 674, 1960.
- 3) Edwards, L. B., Palmer, C. E. : Am. J. Hyg., 68, 213, 1958.
- 4) 岡田 博, 河盛勇造, 重松逸造, 千葉保之, 今野 淳. : 日本医事新報, 1909, 14, 1960.
- 5) 福山裕三 : 金大結研年報, 23, 33, 1965.
- 6) 福山裕三 : 金大結研年報, 23, 121, 1966.
- 7) Ito, R., Koshimura, S. : Jap. Med. J., 1, 427, 1948.
- 8) 福山裕三 : 金大結研年報, 23, 23, 1965.
- 9) Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K. T., Sbarra, A. : Am. Rev. Tuberc., 77, 669, 1958.
- 10) Wayne, L. G., Krassnow, I., Huppert, M. : Am. Rev. Tuberc., 76, 468, 1957.
- 11) Tarshis, M. S. : J. Lab. Clin. Med., 57, 480, 1961.
- 12) Engbaek, H. C. : Acta Tuberc. Scand., 40, 35, 1961.
- 13) Konno, K., Nagayama, H., Oka, S. : Am. Rev. Resp. Dis., 81, 550, 1960.
- 14) Toda, T., Hagihara, Y., Takeya, T. : Am. Rev. Resp. Dis. 83, 757, 1961.
- 15) Kubica, G. P., Vestal, A. L. : Am. Rev. Resp. Dis., 83, 728, 1961.
- 16) Nagayama, H., Konno, K., Oka, S. : Nature, 190, 1219, 1961.
- 17) Wayne, L. G. : Am. J. Clin. Path., 36, 185, 1961.
- 18) 福山裕三 : 金大結研年報, 22, 1, 1964.