

結核アレルギーの組織学的研究

第 7 報

ツベルクリン分画による皮内反応の組織学的研究

第 1 編

ヒト型結核菌感作ウサギにおける実験

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任： 柿下正道教授）

稲 葉 隆

（受付： 昭和34年9月9日）

緒 言

ツベルクリン（以下「ツ」と略記）の皮膚反応活性因子は先人のおびただしい研究の結果、その蛋白分画に存することが明らかにされ、今日結核の皮膚反応原の研究は精製「ツ」の方向に指向されていることは周知のところである。しかし精製「ツ」あるいは「ツ」蛋白分画による皮膚反応の組織学的研究は、断片的に Sabin & Joyner¹⁾, Angevin & Seaston²⁾, 仙場³⁾および安平⁴⁾等により行われておるにすぎない。一方当研究所の創製にかかる o-aminophenol azo-tuberculin “Human”（以下 OA-Azo-T “Human” と略記）および o-aminophenol azo-tuberculin “BCG”（以下 OA-Azo-T “BCG” と略記）による皮膚反応の組織学的研究成績は先に教室の中川⁵⁾⁶⁾により報告され、荒井⁷⁾は更にこれを組織化学的に観察している。さてこの中川、荒井の成績から注目し値する点を要約すると両 OA-Azo-T の使用による

ヒト型菌陽転と BCG 陽転の鑑別の可能性が指摘されている点であろう。そこで私はヒト型結核菌および BCG に由来する OT（以下それぞれ OT “Human” および OT “BCG” と略記）より得た蛋白分画による皮膚反応の組織学的ならびに組織化学的検討を系統的に行つて、先人の成果をふえんとともに中川⁵⁾ および荒井⁷⁾らの OA-Azo-T “Human” および OA-Azo-T “BCG” の成績と対比した。

一方安平⁴⁾ および平田⁸⁾らは菌体多糖体分画について、Seibert¹⁰⁾, 戸田¹¹⁾, 武田¹²⁾¹³⁾ および安平⁴⁾らは「ツ」多糖体分画についてその皮膚反応原を検討して報告しているが、その成績は必ずしも一致していない。またこれを組織学的に追求した文献はきわめて少ない。私は更に「ツ」多糖体分画反応についても「ツ」蛋白体におけると同様な検索を行つた。

ここにその成績の概要を報告する。

実験材料ならびに実験方法

1) 実験動物： 体重 3kg 前後の健常ウサギで OT “Human” および OT “BCG” の10倍希釈液 0.1 ml による皮膚反応がいずれも陰性なることを確かめた後使用した。

2) 動物の感作： 熱殺ヒト型結核菌青山 B 株の乾燥菌体を 10 mg/ml の割に流動パラフィンに浮遊し、その 2ml を両側大腿部筋肉内に分割注射した。

3) 反応に用いた標品およびその使用濃度： いづ

れもヒト型結核菌青山B株およびBCG予研株のSauton培地8週培養の培養ろ液より作製した。

a) OT “Human”ならびにOT “BCG”：いずれも型のごとくにして得られた教室保存のものを生理的食塩水で10倍に希釈して用いた。

b) OA-Azo-T “Human”ならびにOA-Azo-T “BCG”：伊藤、越村¹⁴⁾の方法により当研究所において作製されたものでOA-Azo-T “Human”は10γ/0.1ml, OA-Azo-T “BCG”は100γ/0.1mlの割合に碳酸緩衝生理的食塩水(pH 7.8)に溶解して用いた。

c) 蛋白および多糖体分画の作製: OT “Human”およびOT “BCG”より登谷¹⁵⁾の方法に準じて作製し、得たる蛋白分画PF_I “Human”, PF_{II} “Human”, PF_I “BCG”およびPF_{II} “BCG”はいずれも碳酸緩衝生理的食塩水(pH 7.8)に10γ/0.1mlとなるごとく溶解して用いた。また多糖体分画CF_I “Human”, CF_{II} “Human”, CF_I “BCG”およびCF_{II} “BCG”は滅菌生理的食塩水に10γ/0.1mlの割合に

溶解して使用した。以上の各標品濃度は多糖体分画を除いては自然感染者の皮膚反応じやく起力における等力価量より換算したものであつて、多糖体分画は蛋白分画と同希釈液として用いた。しかしてこれら標品のうちOT “Human”より得たPF_I, PF_{II}およびCF_Iの化学的性状は第1表のごとくである。(いずれも1%溶液として測定)

4) 標品注射ならびに注射局所組織採取方法
ウサギの背部皮内に互いに5cm以上の間隔をおいて上記各希釈標品の0.1mlをあてを同時に注射し、組織の採取は注射後1, 3, 6, 12, 24, 48, 72および120時間目に行つた。

5) 組織標本作製術式

採取組織はフォルマリン固定後、型のごとく7ないし10μのパラフィン連続切片とし、その一部はHaematoxylin-Eosin重染色を行つて組織学的観察に供し、他の一部はMethylgreen, pyronin染色, PAS染色, Alkaline phosphatase (Al-Ph. ase) 染色および5 Nucleocytase (5-Nucl. ase) 染色を行つて組織化学的観察に供した。

実験成績

A 肉眼的所見

12種標品による皮内反応の24時間値および48時間値は第2表に示すごとくである。これによると多糖体分画を除き、他のいずれの標品によつても注射48時間後を最大とする著明な発赤の出現が認められ、かつ標品による差は明らかではなかつたが、硬結じやく起能はOTに著明でありPF_I “Human”, PF_I “BCG”およびOA-Azo-T “Human”これにつぎ、PF_{II} “Human”, PF_{II} “BCG”およびOA-Azo-T “BCG”では認められなかつた。しかるにいずれの多糖体分画によつてもほぼ3時間ないし6時間より淡い発赤が現われ漸次増大するが、12時間ないし24時間を頂点として急激に消失し、かつ全経過を通じて硬結は認められなかつた。

B 組織学的所見

組織標本の検索は中川¹⁶⁾に準じて皮膚乳頭層、網状層ならびに皮下の血管神経系を中心に観察した。

1) OT “Human”およびOT “BCG”によ

る反応(第1図)

先に中川¹⁶⁾が感染動物において観察した所見と類似し、ともに早期の多核白血球の浸潤が強く、かつ遷延し、後期の細胞反応も強盛で、血管系の反応もこれに伴なつて強かつた、Al-Ph. ase反応陽性細胞の出現はOT “Human”反応においてOT “BCG”反応におけるより大であつて、前者では24時間ないし48時間目に、後者では6時間ないし24時間目に最高であり、また神経線維の陽性反応が目立つた。5-Nucl. ase反応陽性細胞の出現でも前者の方がやや優勢であり、24時間ないし48時間目を頂点として出現し、その時間には小血管壁の反応陽性度もやや著明であつた。ピロニン好性細胞の出現はともに軽度であつた。

2) OA-Azo-T “Human”およびOA-Azo-T “BCG”による反応(第2図)

OA-Azo-T “Human”によつては早期より血管結合織の変化が著明であり、早期の多核白血球の浸潤も相当に強く、48時間以後は単球を

主とし、類上皮細胞を混じた結節性肉芽性炎の像を呈し、典型的なツベルクリン型の組織像を認めた。OA-Azo-T.“BCG”では早期の多核白血球を主とした細胞性反応は前者とほぼ同程度であつたが、既に24時間後単球を主とした後期細胞反応に移行した。

Al-Ph. ase 反応陽性を示す細胞の出現は両者においてともに相当に認められたが、やや OA-Azo-T “Human”の方に優勢であり、また OA-Azo-T “BCG”では12時間ないし24時間および120時間目に神経線維に陽性反応が認められた。5-Nucl. ase 反応陽性細胞の出現率は、両者ほぼ同率であるが、前者では48時間目、後者では24時間目および120時間目に最も高く、ともに一部小血管壁に陽性反応を認めた。ピロニン好性物質含有細胞の出現も両者間で差がなくいずれも軽度であつたが、前者では48時間目に、後者では反応終期の120時間目にやや多かつた。

3) PF_I “Human” および PF_{II} “Human” による反応 (第3図)

PF_I “Human” 注射後細胞反応をみるに1時間目より乳頭層下、ことに網状層下の血管網を中心として、かなり著明な多核白血球を主体とせる細胞浸潤が認められ3時間目には最高となり、以後急激に減少して12時間目より著明な単核細胞性浸潤と交代し、これに組織球、大単核細胞が混じて血管周囲に集合し、結節性肉芽性炎の像を呈するにいたつた。しかし結核結節に一致するような所見は認められなかつた。120時間目になると細胞反応は著明に消退する。結合織および血管系の変化についてみると、小血管の充えい、拡張、浮腫、淋巴管の拡張、膠原線維の膨化、離断更には血管の血流停止後、ろ出性出血などが6時間目より認められるが、72時間目を境として以後は急激に消退した。

組織化学的には Al-Ph. ase 反応陽性を示す細胞が、6時間ないし24時間目に最高に達し以後漸減し、5-Nucl. ase 反応陽性細胞は6時間ないし72時間目まで平均して著明に認められ

た。ピロニン好性物質を持つ細胞の出現は全般に軽度であつたが、12時間目、72時間目および120時間目にやや多かつた。

PF_{II} “Human” による反応は、前者とほぼ同様な経過をたどるが、早期の多核白血球の浸潤の消退は遷延した。

Al-Ph. ase 反応および 5-Nucl. ase 反応陽性細胞はともに12時間ないし24時間目に最高を示し、ピロニン好性物質を持つ細胞の出現は前者より軽微であつた。

4) PF_I “BCG” および PF_{II} “BCG” による反応 (第4図)

早期よりかなり著明な血管周囲性の多核白血球浸潤がみられたが、24時間以後単核細胞の浸潤と交代した。しかし注目すべき点は後期の単核細胞の増加が軽度であり、かつ結節性肉芽性炎の像をみるのがなかつたことである。血管系および結合織の変化も軽度であり、出血像はついにみられなかつた。

Al-Ph. ase 反応陽性細胞の出現は24時間目に最も多く、5-Nucl. ase 反応では48時間目を中心と多かつた。ピロニン好性物質を有する細胞の出現は24時間目に少数みられたに過ぎなかつた。

PF_{II} “BCG”によつても前者ときわめて似通つた反応像を示したが、多核白血球の浸潤は前者より更に弱く、単球の浸潤も軽度であつたが、血管系および結合織の変化はやや著明であつた。

Al-Ph. ase 反応陽性細胞および 5-Nucl. ase 反応陽性細胞の増加は48時間目を頂点とし、ピロニン好性物質含有細胞もその前後に顕著な増加を示していた。

5) CF_I “Human” および CF_{II} “Human” による反応 (第5図)

CF_I “Human”によつては12時間目まで血管周囲性に多核白血球を主とする細胞の浸潤が目立ち、かつつ血管、浮腫、線維の膨化等血管結合織の障害もこれに伴なつてかなり著明であつた。24時間以後それら反応は急激に消退する

が, 120時間目にいたるもなお軽度に認められた。

Al-Ph. ase 反応陽性細胞の出現は, 6時間ないし12時間目に, 5-Nucl. ase 反応陽性細胞は24時間目に著明に認められた。

CF_{II} “Human” では前者に比し多核白血球の浸潤は12時間目ではかなり弱い, 24時間目ではかえつて強く, 血管系および結合織の障害はやや軽度であつた。しかし48時間後には諸反応は急激に消退したが, なお120時間目にいたるも軽度に認められた。

Al-Ph. ase 反応および5-Nucl. ase 反応陽性細胞の出現はともに12時間目に最高であつたが, 前者よりは軽度である。

6) CF_I “BCG” および CF_{II} “BCG” による反応(第6図)

CF_I “BCG” では6時間ないし12時間まで, 血管周囲性に少数の多核白血球を主とする細胞

浸潤と軽度の血管障害像を示したが, 以後はこれら変化は急激に消退したが, 細胞浸潤はびまん性となる。120時間まできわめて軽度に持続した。

Al-Ph. ase 反応陽性細胞の出現は1時間目および24時間目に強く, 5-Nucl. ase 反応陽性細胞は24時間目に認められた。

CF_{II} “BCG” ではこれに反して早期より血管周囲性に多核白血球を主とする細胞反応がきわめて著明であり, 血管系および結合織の障害として小出血, うつ血および浮腫等がこれに伴つて著しかつた。しかしこれら変化は48時間目以後急速に消退した。

Al-Ph. ase 反応陽性細胞の出現は24時間を最高として, その前後にやや強く認められ, 5-Nucl. ase 反応陽性細胞の出現もこれと軌を同じくした。

総括ならびに考案

Diens & Mallory¹⁶⁾ は結核モルモットについて「ツ」蛋白分画による皮膚反応を行い, これを組織学的に検討すると, 注射後6時間目までと24時間目以後の単核細胞反応が特異的であると述べており, Sabin & Joyner¹⁷⁾ もまた Seibert の「ツ」蛋白を結核ウサギ皮内に注射することにより, 単球の滲出が促進され, そのうち少数は類上皮細胞となると論じ, 一方 Angevin & Seaston²⁾ は PPD を結核モルモットの皮下, および腹腔内に注射した場合の初期滲出細胞は白血球であると述べている。仙場³⁾ は Sauton 「ツ」より得た蛋白分画および PPD を結核モルモットの皮内に注射した場合, 初期には白血球性反応が出現し, これが漸次単球性反応に置換されると述べている。私も中川⁹⁾ の観察方法に準じ, まず「ツ」蛋白分画をヒト型結核菌感染ウサギの皮内に注射し, 注射局所の皮膚毛細血管網を中心とした細胞反応と血管反応を OT あるいは OA-Azo-T のそれと比較観察し

た。

その実験成績を通観するに OT “Human” および OT “BCG” では既に指摘されているごとくとも早期の多核白血球浸潤が強く, かつ遷延する傾向を示し, 加うるに OT “BCG” においては後期細胞反応に結節様構造が認められた。

OA-Azo-T “Human” および OA-Azo-T “BCG” については, 先に結核感染ウサギについて行つた中川⁹⁾ の成績と近似の成績を得た。すなわちともに「ツ」型組織反応を示したが, OA-Azo-T “Human” では後期細胞反応として, 単核細胞の浸潤が強く現われ, 72時間目以後はそのなかに類上皮細胞を認めたが, OA-Azo-T “BCG” では後期の単核細胞の浸潤がやや軽度であり, 類上皮細胞を認めなかつた。しかしその後期反応においてはともに結節様構造を示した。ここに OA-Azo-T “Human” の反応像が中川⁹⁾ の述べた成績に比較してやや

強度であるが、これは中川が生菌感染動物を用いたのに反し著者は流動パラフィン死菌浮遊液感作動物を用いたことおよび抗原の使用量の相違等に起因するものと考えられる。

さて PF_I “Human”, PF_{II} “Human” による反応はともにほぼ「ツ」型組織反応を示し、早期細胞反応が比較的すみやかに後期の単球増殖と交代し、組織学的にみてある程度精製「ツ」としての性格を備えているごとく考えられる。

PF_I “BCG” および PF_{II} “BCG” ではこれに反して、両者ともに比較的軽度の反応を示し、かつ後期細胞反応に結節様構造を認めることもなかった。

次に「ツ」多糖体分画による感染動物の皮膚反応について検討した安平⁹⁾は多糖体注射後早期は多核球反応で単球反応がこれに後続すると述べているが、私も多糖体の注射によりほぼ同様の結果を得た。すなわち CF_I “Human” および CF_{II} “Human” によつてともに多核白血球を主とする早期細胞反応がすみやかに消退しわずかな単球を主とする軽度の後期反応に移行する。血管等の障害像も早期にはかなり認められるが、これもすみやかに回復する。次に CF_I “BCG” および CF_{II} “BCG” による反応をみるに前者では早期細胞反応ならびに後期細胞反応ともに軽度に推移するが、後者ではやや趣を異にして、前者に比し早期(24時間目まで)の細胞ならびに血管系の反応はともにきわめて著

しいが、それ以後はほとんど同程度となる。

さて先に教室の荒井⁸⁾は OA-Azo-T 反応を組織化学的に検討し既に報告しているが、私も「ツ」の蛋白分画および多糖体分画による反応を組織化学的に追求した。まず蛋白分画について実験を行った結果、PAS 反応陽性物質含有細胞は全般に陰性を呈し、ピロニン好性物質含有細胞の出現も軽度であつた。しかるに Al-Ph.ase 反応陽性細胞は一般に12時間ないし24時間目までにかなり増加が認められ、5-Nucl.ase 反応陽性細胞もこれと同時にあるいはやや遅れて増加し、かつ反応後期まで認められた。

各標品別にながめると Al-Ph.ase 反応および 5-Nucl.ase 反応とも一般に「ツ」蛋白分画反応において最も強く出現し、OT および OA-Azo-T 反応の順にこれに続いた。ただし神経線維における Al-Ph.ase 反応および小血管壁における 5-Nucl.ase 反応は OT 反応に最も強く、OA-Azo-T 反応と「ツ」蛋白反応とではほとんど等しい関係にあつた。また各「ツ」蛋白反応における Al-Ph.ase 反応および 5-Nucl.ase 反応を比較すると PF_I “Human” 反応 ≒ PF_{II} “Human” 反応 > PF_I “BCG” 反応 ≒ PF_{II} “BCG” 反応の傾向にあることが認められた。次に多糖体分画についてみると OT “Human” と OT “BCG” に由来する多糖体反応の間に明らかな組織化学的所見の差異を認めることができなかった。

結

ヒト型結核菌感作ウサギにヒト型結核菌ならびに BCG に由来する OT, OA-Azo-T, OT 蛋白分画 (PF_I, PF_{II}) および OT 多糖体分画 (CF_I, CF_{II}) を皮内注射して、その局所所見を組織学的ならびに組織化学的に比較観察して次の結果を得た。

1) 各標品による組織反応に強弱の差はあつても、いずれもすべて「ツ」型反応の特徴を示した。

2) OT “Human” および OT “BCG” によ

論

る反応はともかなり強度で組織学的に「ツ」型を示したが、同時に非特異性の像が認められた。

3) OA-Azo-T “Human” および OA-Azo-T “BCG” ではともに典型的「ツ」型反応を呈するが、OA-Azo-T “Human” による反応は OA-Azo-T “BCG” のそれよりやや強かつた。

4) PF “Human” および PF “BCG” はそれぞれ OA-Azo-T “Human” および OA-Azo-T “BCG” と類似の反応像を示した。

5) PF_I “Human” と PF_{II} “Human”, PF_I “BCG” と PF_{II} “BCG”, CF_I “Human” と CF_{II} “Human” および CF_I “BCG” と CF_{II} “BCG” はそれぞれに近似の組織学的反応像を示し, その間に著明な差を認め難かつた.

6) 組織反応からみて PF_I “BCG” および PF_{II} “BCG” による反応はともに PF_I “Hu-

man” および PF_{II} “Human” による反応に比べてかなり微弱で型特異性の存在が推定された.

7) CF “Human” と CF “BCG” による反応の間には病理組織学的にかなり相異を認められたが, 組織化学的には著差を認めなかつた.

文

- 1) Sabin, F.R. & Joyner, A.L. : J. Exp. Med., 68(5), 659, 1938.
- 2) Angevin, D.M. & Seastone, C.V. : Am. J. Path., 26(4~6), 1011, 1950.
- 3) 仙場 博 : 札幌医大紀要, 2(4), 184, 1952.
- 4) 安平公夫 : アレルギー, 2(6), 304, 1954.
- 5) 中川栄一 : 金大結研年報, 12(中), 49, 1954.
- 6) 中川栄一 : 金大結研年報, 13(上), 85, 1955.
- 7) 中川栄一 : 金大結研年報, 13(上), 93, 1955.
- 8) 荒井正宏 : 金大結研年報, 17(上), 207, 1959.
- 9) 平田ともゑ : 日本血液学会雑誌, 12(4~5),

献

- 10) Seibert, F.B., Stacey, M. & Keunt, P.W. : Biochim. Biophys. Acta, 3, 632, 1949.
- 11) 戸田忠雄 : 日新医学, 41(7), 351, 1954.
- 12) 武田徳晴 : 医学と生物学, 1, 336, 1945.
- 13) 武田徳晴 : 日新医学, 34, 211, 1947.
- 14) Ito, R., & Koshimura, S. : Jap. Med. J., 1, 427, 1948.
- 15) 登谷栄作 : 金大結研年報, 16(上), 31, 1958.
- 16) Dieves, L. & Mallory, T. : Am. J. Path., 8, 689, 1932.

第 1 表
被検標品の化学的性状

材 料		“Human”			“BCG”		
		PF _I	PF _{II}	CF _I	PF _I	PF _{II}	CF _I
蛋 白 反 応	Biuret	+	+	-	+	+	-
	Ninhydrin	+	+	-	+	+	-
	Millon	+	+	-	+	+	-
	Pauli	+	+	-	+	+	-
	Sakaguchi	+	+	-	+	+	-
	Adamkiewitz	+	+	-	+	+	-
	Potassium tetrabromo phthalein ethylester	+	+	-	+	+	-
糖 反 応	Molish	-	-	+	-	-	+
	Tollens	-	-	-	-	-	+
	Piclinic acid	•	•	+	•	•	•
	Orchinol	-	-	-	-	-	+
	Dish	-	-	+	-	-	-

〔注〕 CF_{II} については行わなかつた。

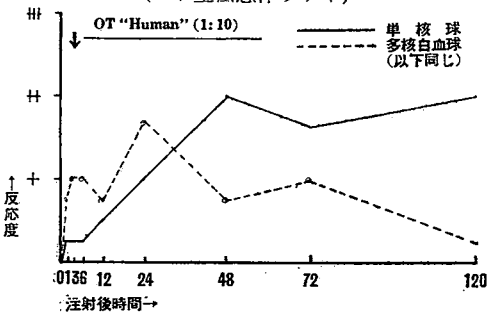
第 2 表
12種被検標品による皮内反応の肉眼的所見
(ヒト型結核菌感作ウサギ)

種 類	判定時間 濃 度	12時間	24時間	48時間
		OT “Human”	1:10, 0.1ml	•
OT “BCG”	1:10, 0.1ml	•	20×20 (i)	20×25 (i)
OA-Azo-T “Human”	10γ / 0.1ml	•	20×16	25×20 (i)
OA-Azo-T “BCG”	100γ / 0.1ml	•	18×15	18×18
PF _I “Human”	10γ / 0.1ml	•	20×20	25×15 (i)
PF _{II} “Human”	10γ / 0.1ml	•	20×20	25×20
PF _I “BCG”	10γ / 0.1ml	•	20×15 (i)	20×20
PF _{II} “BCG”	10γ / 0.1ml	•	20×15	20×17
CF _I “Human”	10γ / 0.1ml	10×7	10×10	(-)
CF _{II} “Human”	10γ / 0.1ml	7×7	12×10	(-)
CF _I “BCG”	10γ / 0.1ml	10×10	(-)	(-)
CF _{II} “BCG”	10γ / 0.1ml	11×15	8×8	7×7

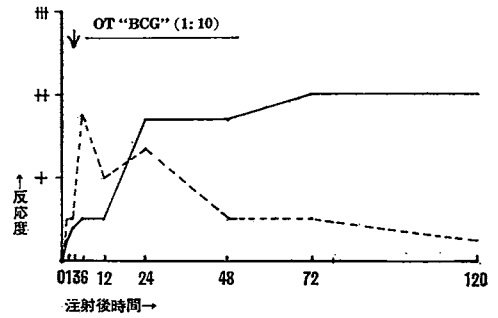
〔注〕 (i) は硬結を示す。

第 1 図 の 1

OT "Human" および OT "BCG" 注射による細胞反応の時間的推移 (ヒト型菌感作ウサギ)

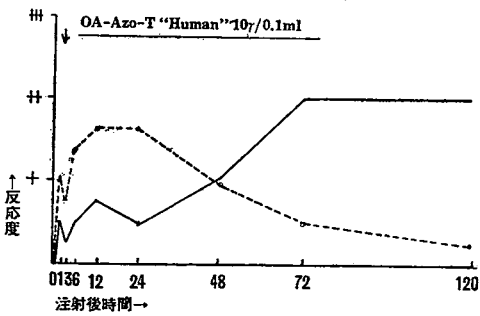


第 1 図 の 2

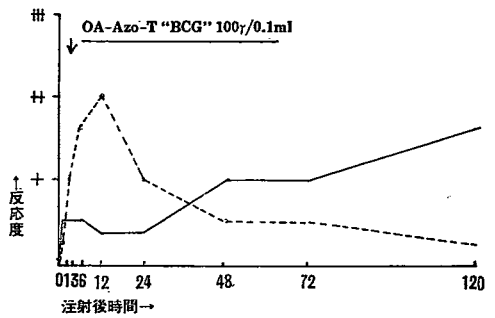


第 2 図 の 1

OA-Azo-T "Human" および OA-Azo-T "BCG" 注射による細胞反応の時間的推移 (ヒト型菌感作ウサギ)

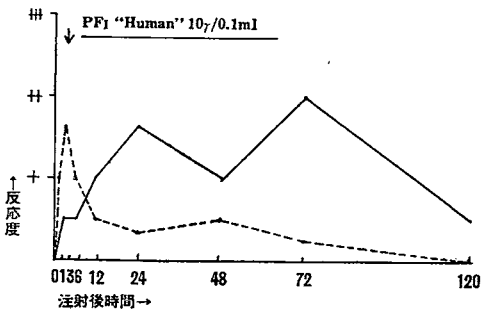


第 2 図 の 2

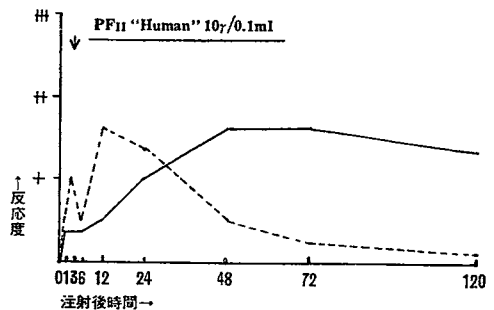


第 3 図 の 1

PF_I および PF_{II} "Human" 注射による細胞反応の時間的推移 (ヒト型菌感作ウサギ)

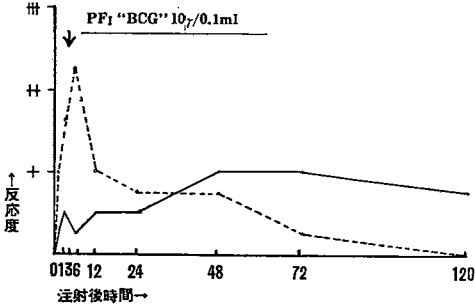


第 3 図 の 2

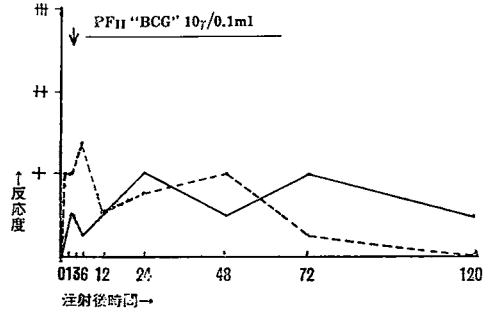


第4図の1

PF_I および PF_{II} “BCG” 注射による細胞反応の時間的推移
(ヒト型菌感作ウサギ)

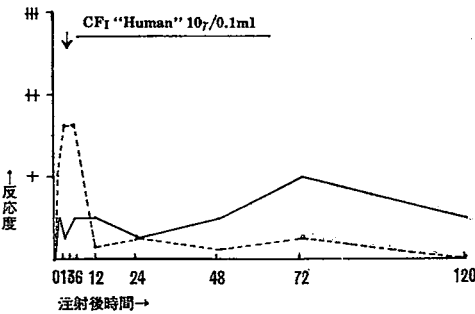


第4図の2

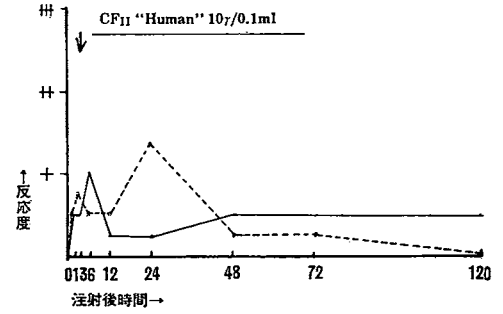


第5図の1

CF_I および CF_{II} “Human” 注射による細胞反応の時間的推移
(ヒト型菌感作ウサギ)

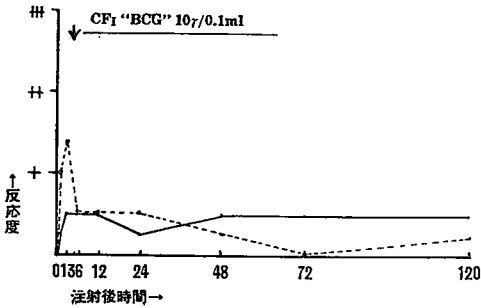


第5図の2

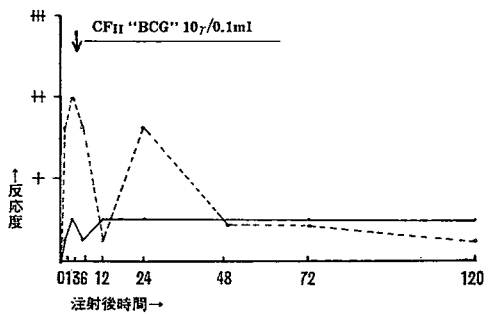


第6図の1

CF_I および CF_{II} “BCG” 注射による細胞反応の時間的推移
(ヒト型菌感作ウサギ)



第6図の2



付 図

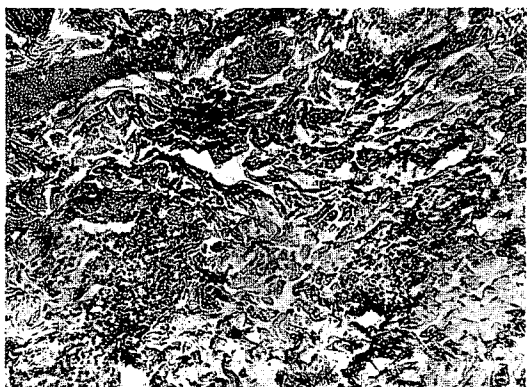
OT "Human" 48時間目
(ヒト型結核菌感作ウサギ以下同じ)



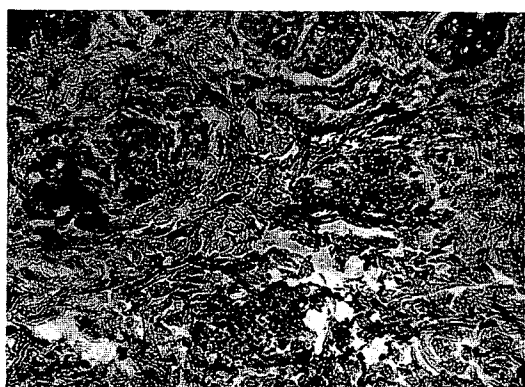
OT "BCG" 48時間目



OA-Azo-T "Human" 48時間目

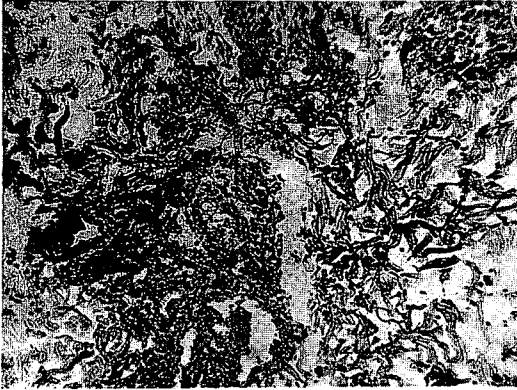


OA-Azo-T "BCG" 48時間目



付 図

PF₁ "Human"
48 時間目



PF₁ "BCG"
48 時間目



CF₁ "Human"
6 時間目



CF₁ "BCG"
6 時間目

