

人型結核菌並にBCG菌体蛋白とそれ等の o-Aminophenol Azo-Protein との動物に 於ける皮膚反応比較実験

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下教授）

専攻生 紺 田 康

Yasushi Konda

（受付昭和28年7月17日）

Yasushi Konda: Comparative Skin-Test Experiments with protein of Human Tubercule Bacilli, BCG and these o-Aminophenol Azo-Proteins in Animals.

緒 言

ツベルクリン反応（以下「ツ」反応と略記）が結核の診断上重要な価値を有する事は今さら喋々を要しない処であるが、結核予防の目的に「ツ」反応陰性者に対し広く BCG が接種せらるゝ様に制定せられた現今に於ては、単に「ツ」反応のみによつて両者を鑑別する事は極めて困難なるのみならず、場合に依つては不可能なる為、従来の旧ツベルクリンに依る皮膚反応の結核早期診断的価値は低下されつゝある。その原因は本質的には相違せる菌の感染に依るものではあるが、アレルギーの発現は同一機序に依る為と他方には「ツ」反応活性因子が化学的に純化されていない為である。

この為各国に於て精製「ツ」に関し、研究が続けられ、吾が国に於ても亦戸田¹⁾、武田、²⁾³⁾伊藤、日置⁴⁾、槽谷⁵⁾等の綿密な研究があるがまだ両者の鑑別可能の域には達していない。

然るに余等⁶⁾の研究室に於ては伊藤・越村⁷⁾に依り創製されたオルトアミノフェノールアゾツベルクリン (o-A-Azo-T. と略記) を中心に由利⁸⁾以来殆ど教室全員に依つて系統的に極めて広汎な調査研究が進められている。

他方ツベルクリン以外の物質即ち結核菌々体

蛋白に関しては古くより幾多の研究が行われ、Laidlow 及び Duely⁹⁾、Coghil¹⁰⁾、Johnson 及び Renfrew¹¹⁾、Pinner¹²⁾ 等はその生物学的意義として抗原性を有すること並に「ツ」活性の存すること等を述べ、吾国でも森谷¹³⁾、蔵¹⁴⁾等は人体につき実験を行い「ツ」活性の存在を認めている。

更に蔵¹⁴⁾は結核菌々体蛋白をオルトアミノフェノール・チアゾニウム塩をもつてアゾ化せる所謂 o-Aminophenol-Azo-Tuberculo-protein が人体に於て皮膚反応惹起力を有し、その0.005mg. は標準旧「ツ」 $\frac{1}{2000}$: 0.1cc. と等力価で而も毒性は極めて弱いとの成績を発表した。

私¹⁵⁾は先に o-A-Azo-T. に就いて動物実験に於て皮膚反応交錯試験を行い、その型特異性の存する事を認めたので、今回更に結核々体蛋白、BCG 菌体蛋白、並にそれ等を o-Aminophenol Diazonium Chlorid を以てアゾ化せる材料を Old Tuberculin を対象として、結核菌並に BCG を感染せしめた動物に就いて皮膚反応惹起力の有無及びその型特異性の有無を検せんが為、交錯試験を行つたのでその成績を報告する。

実験方法

1) 抗原の種類

結核菌並に BCG 菌体蛋白は教室の蔵¹⁶⁾の法に準じ製した。

オルトアミノフェノール・アゾ菌体蛋白は精製菌体蛋白を伊藤・越村⁷⁾の法により製した。

上記各抗原は各々その 10mg. を N/10NaOH 1 滴を加えた滅菌生理的食塩水 10cc. に溶解せるものを原液とし必要に応じ稀釈して使用した。

Old Tuberculin は青山 B 株を Sauton 培地に 7 週間培養後 100°C. 1 時間殺菌し, Seitz 濾過器にて濾過し, 濾液を培養前培地量の 1/10 に濃縮, 之に 0.5% の割に純石炭酸を加えて原液とし, 滅菌生理的食塩水にて必要濃度に稀釈使用した。而して

- 各抗原を下記の如く略記した。
- 旧ツベルクリン (青山 B) O.T.
- 結核菌菌体蛋白 (青山 B) P“H”

- BCG 菌体蛋白 P“B”
- o-Aminophenol-Azo-The-protein (青山 B) AP“H”
- o-Aminophenol-Azo-BCG-protein AP“B”

2) 使用動物

体重 400g. 前後の健康白色海猿を選び, 之を 2 群に別ち, 一群には人型菌青山 B 株 0.1mg. を, 他群には BCG 5 mg. を皮下に接種し, 8 週後その一部に更に人型菌青山 B 株 0.1mg. を皮下に注射した。

3) 皮膚反応術式及び成績判定法

皮膚反応は感染後 4, 6, 8 週目に検した。尚 BCG 接種群はその一部に 8 週後人型菌を再感染したので更に 11 週目にも検した。

方法は海猿の背部に 5 種の抗原を夫々約 4 cm. の間隔を以て 0.1cc. 宛同時に皮内注射し, 24 及び 48 時間目に該部の発赤腫脹の横径及び縦径を測定した。

実験成績

1) 各抗原の性状及び使用量

菌体蛋白の性状は第 1 表に示す如く, アルカリ性生理的食塩水をもつて 0.1 溶液として検するに蛋白定性反応は総て陽性であった。

又各抗原は夫々 P“H” 30γ, AP“H” 100γ, O.T. 1/100 : 0.1cc, P“B” 30γ, AP“B” 100γ を使用したが, その量では健康海猿に何等皮膚反応を認めなかつた。

2) 結核海猿に於ける皮膚反応比較実験成

第 1 表 精製菌蛋白の性状

菌体蛋白	P “H”	P “B”
反 応		
Hellersche Probe	+	+
Sulfosalcilsäureprobe	+	+
Pikrinsäure-probe	+	+
Xanthoprotein-reaktion	+	+
Millonsche Reaktion	+	+
Biuretreaktion	+	+

第 2 表 結核海猿に於ける皮膚反応比較実験 (24時間値)

感染後の週 発赤 径	抗原	4 週					6 週					8 週				
		O.T.	P “H”	AP “H”	P “B”	AP “B”	O.T.	P “H”	AP “H”	P “B”	AP “B”	O.T.	P “H”	AP “H”	P “B”	AP “B”
0 ~ 4																
5 ~ 9																
10 ~ 14										2	3			1	4	3
15 ~ 19	*	4	6	6	8	8	6	8	6	7	5	6	9	7	6	7
20 ~ 24		5	4	4	2	2	4	2	4	1	2	4	1	2		
25 ~ 29		1														
平均値		19.7	18.2	18.9	17.4	18.2	18.7	17.6	17.7	16.4	16.3	18.5	16.5	17.1	15.0	15.9
Ratio		0.92	0.94	0.88	0.92	0.94	0.95	0.88	0.87	0.89	0.92	0.81	0.86			

註: 発赤腫脹径平均値
..... $\frac{\sum(\text{横径} + \text{縦径})}{2 \times \text{例数}}$

単位 mm.

Ratio: O. T. に依る
発赤縦横径の総和を分母としその他の総和を分子とした値。

*: 数字は動物の頭数を示す。

第 3 表 結核海猿に於ける皮膚反応比較実験 (48時間値)

発赤径	感染後の週														
	4 週					6 週					8 週				
	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"
0 ~ 4		1													
5 ~ 9						1									
10 ~ 14	2		2	6	4	3	4	7	8	8	1	1	1	4	3
15 ~ 19	7	8	6	3	5	7	5	3	2	2	8	8	8	5	6
20 ~ 24			1												
25 ~ 29															
平均値	16.5	14.9	15.6	13.6	14.7	14.6	13.9	14.0	13.2	13.0	15.1	13.7	14.5	12.9	13.9
Ratio		0.90	0.95	0.83	0.89		0.95	0.96	0.91	0.89		0.91	0.96	0.85	0.92

績 (第 2, 3 表参照)

第 2 表に示す如く 4 週以後は全動物とも皮膚反応陽性となり、而も 24 時間の測定値は 48 時間値より大きかった。而して各抗原の O. T. に対する Ratio は常に略々 1 に等しく、即ち発赤腫脹径の平均値では O. T. との間に大差無く、各抗原は上記の使用量では O. T. (1/100:0.1cc.) と略々相等しい皮膚反応惹起力を有することを認めた。

3) BCG 接種海猿に於ける皮膚反応比較実験成績 (第 4 及び 5 表参照)

BCG 接種海猿群に於ける成績は

a) P "H" に就いて

P "H" の O. T. に対する Ratio は略々 0.8 で、結核海猿に於けるより僅に弱かった。

即ち P "H" の皮膚反応惹起力は BCG 接種海猿群に於ては結核海猿群より弱い、型特異性とまでは認め得なかつた。

b) AP "H" に就いて

O. T. に対する AP "H" の Ratio は 24 時間値 0.94~1.37, 48 時間値で 1.25~1.73 で発赤径の平均値は O. T. より僅かに大であつた。即ち BCG 接種海猿群に於ては AP "H" の皮膚反応惹起力は O. T. のそれよりもやゝ強力であつた。

c) P "B" に就いて

O. T. に対する Ratio は略々 1 に等しいが結

第 4 表 BCG 接種海猿に於ける皮膚反応比較実験 (24時間値)

発赤径	感染後の週														
	4 週					6 週					8 週				
	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"
0 ~ 4	1 ₋₁	3 ₋₁	1 ₋₁	2 ₋₁		1	2 ₋₁				3 ₋₁	4 ₋₁	5 ₋₁	5 ₋₁	1 ₋₁
5 ~ 9	3	4		4		1 ₋₁	5		5 ₋₁		1	2		2	
10 ~ 14	6	1	4	2	5	7	3	5	6		4	1	3	1	
15 ~ 19	2	4	6	3	5 ₋₁	5	4	8 ₋₁	3	13 ₋₁	6	7	5	6	10
20 ~ 24			1	1	2			1		1			1		3
25 ~ 29															
平均値	10.7	9.3	14.6	10.5	15.8	12.4	9.8	15.5	11.2	16.8	11.8	10.2	11.2	9.9	17.8
Ratio		0.86	1.37	0.98	1.48		0.79	1.25	0.90	1.35		0.86	0.94	0.84	1.51

第 5 表 BCG 接種海猿に於ける皮膚反応比較実験 (48時間値)

発赤径	感染後の週														
	4 週					6 週					8 週				
	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"	O.T.	P "H"	AP "H"	P "B"	AP "B"
0 ~ 4	1	3		1		4	5	4	6		5	7	5	7	
5 ~ 9	4	3		2		6	7	3	2		2	2	2		
10 ~ 14	6	4	8	7	5	2	1	3	4	4	6	3		3	3
15 ~ 19		1	2	1	6	1		3	1	9		1	6	3	10
20 ~ 24			1												
25 ~ 29															
平均値	8.3	6.8	12.5	8.6	14.1	6.0	4.0	8.0	6.8	14.6	6.5	4.8	9.3	6.7	15.7
Ratio		0.82	1.51	1.04	1.70		0.68	1.38	1.14	2.43		0.74	1.43	1.04	2.42

核海猿に於けるよりもやゝ大であつた。即ち結核海猿と BCG 海猿とは O. T. と P "B" をもつてせる皮膚反応では鑑別することは出来なかつた。

d) AP "B" に就いて

AP "B" の O. T. に対する Ratio は 24 時間値では 1.35 ~ 1.62, 48 時間値では 1.70 ~ 2.43 にして、発赤腫脹平均値は常に O. T. のそれに比して大で AP "B" の皮膚反応惹起力は常に O. T. のそれより強力であつた。而してその差は 48 時間値の方が幾分著名であつた。

3) BCG 接種後結核感染せしめた海猿に於ける各抗原の皮膚反応成績は (表略す) 結核海猿の成績と略々相等しい結果を得た。

之を要するに結核海猿群に於ては各抗原は前述の使用量で O. T. と同程度の皮膚反応惹起力を有するが BCG 接種海猿群に於ては差が認め

られ、その関係は次の如くで

$$AP "B" \gg O.T. \approx P "H" \approx P "B" < A.P. "H"$$

之は P "B" を o-Aminophenol で Azo 化することにより型特異性を増強するものの如くで、BCG 接種後結核に感染せしめることにより O. T. と AP "B" との皮膚反応惹起力の関係が O. T. \ll AP "B" なるものが O. T. \approx AP "B" と変化せる事実に依つても証明されているのである。(第 3 実験参照)

而して、AP "H" が結核海猿よりも、BCG 接種海猿に於て反つて強い皮膚反応を惹起せしめた事の原因に就いては更に今後検討を加えたい所存づある。

以上の成績より見て、AP "B" と O. T. の併用皮膚反応を人体に応用すれば BCG アレルギーと結核アレルギーとの判定をある程度可能ならしめ得る事が推察されるのである。

結 論

結核菌、BCG の菌体蛋白並にそれ等の o-Aminophenol-Azo-protein を用い、動物実験に依つて皮膚反応交錯試験を行い次の如き結果を得た。

1) 被検各抗原の結核海猿群に於ける皮膚反応惹起力の関係は、

抗原の種類	0.1cc. 中の含量
O. T.	$\frac{1}{100}$; 0.1cc.
P "H"	30 γ
P "B"	30 γ
AP "H"	100 γ
AP "B"	100 γ

であつた。

2) 之に反し BCG 接種海狸群に於ては、

a) P "H" (30 γ) 及び P "B" (30 γ) の皮膚
反応惹起力は結核海狸群に於けると同様 O. T.
($\frac{1}{100}$; 0.1cc.) と略々相等しかつた。

b) AP "H" (100 γ) の皮膚反応惹起力は感
染後 4~6 週目に於ては O. T. ($\frac{1}{100}$; 0.1cc.)
よりもやゝ強かつたが、有意の差とは認め難

い。

c) AP "B" (100 γ) の皮膚反応惹起力は O. T.
($\frac{1}{100}$; 0.1cc.) よりも著明に強かつた。

之を要するに AP "B" は BCG 接種動物に於
て皮膚反応惹起力に特異性が認められた。従つ
て之を人体に応用すれば自然感染による「ツ」
反応陽転者と BCG 陽転者との鑑別がより可能
となるであろう事が推察された。

文

- 1) 戸田：結核，20 (3)：111 (昭17)，福岡医学
雑誌，36 (7)：626 (1943)，医学と生物学，20
(2)：89 (昭26)。 2) 武田：医学と生物学，
10：176 (昭22)，医学と生物学，12：17 (昭23)。
3) Takeda, Y. and Watanabe, S.: J. of Biochem.,
34 (3)：385 (1941)。 4) 日置・倉金：十全会
雑誌，55 (1)：109 (昭28)。 5) 糟谷：東京医
事新誌，2946：9 (昭10)。 6) 柿下：東京医事
新誌，70 (1)：3 (昭28)。 7) 伊藤・越村：
Japanese Medical Journal, 1 (5)：427 (1948)，
2 (4)：185 (1949)。 8) 由利：金大結研年報，
8 (1)：85 (1949)。 9) Laidlow and Dudley：

献

- The Brit. J. Exp. path., 6 (4)：197 (1925)。
10) Coghill：J. of Biol. chem., 70 (2)：439
(1926)。 11) Johnson and Renfrew：Amer. Rev.
of Tbc., 18 (4)：505 (1928)。 12) Max Pinner：
Amer. Rev. of Tbc., 18 (4)：497 (1928)。 13)
森谷：日新医学，36 (1)：30 (昭24)。 14) 藏：
金大結研年報，8 (2)：52 (昭25)。 15) 紺田：
金大結研年報，10 (2)：183 (昭27)。 16) 藏：
金大結研年報，8 (1)：113 (昭24)。 17) 石井：
実験医学雑誌，24 (9)：1159 (昭15)。 18)
山崎：十全医学会雑誌，40 (7)：2834 (昭10)。