

o-Aminophenol Azo-Tuberculin 及び o-Aminophenol Azo-Tuberculo-protein による結核菌感染防禦実験

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 : Immunological Studies with o-Aminophenol Azo-Tuberculins and o-Aminophenol Azo-Tuberculo-proteins in Animals.

緒 言

Calmette et Guérinに依つて創製されたBCGは、今日広く結核免疫原として使用されているが、これとても絶対的なものでなく、更に完全な免疫原を得るため今日尚幾多の研究が行われている。

之等業績中結核菌々体蛋白に就いてみるに、Zinsser¹⁾²⁾及びPetroff、戸田・箭頭³⁾等は動物実験に於て一程度の免疫性を賦与せしめ得ると云つてゐるが、税所⁴⁾等は之を否定している。

又ツベルクリンに関してはKoch以来その報告は枚挙にいとまないが、吾が国に於ても戸田³⁾、税所⁴⁾、岩西⁵⁾等の報告にみる如く、今日では、旧ツベルクリンは不完全抗原と考えられ、生体に免疫性を賦与せしめる事は不可能とされている。精製ツベルクリンに就いても戸田³⁾、Seibert⁶⁾等は旧ツベルクリンと同様感染防禦能を認めていない。他方今牧⁷⁾は旧ツベルクリンは免疫原としての価値を認め得ると云つてゐるが、然し今日一般にツベルクリンは結核の診断に使用せらるる他一部には刺戟療法剤と見做さ

れている。

然るに最近柳沢⁸⁾は流動パラフィン-ツウイン加精製ツベルクリン乳剤を以て免疫実験を行い、感染防禦能の賦与も不可能ではないと発表している。

さきに当教室の蔵⁹⁾、大山¹⁰⁾はo-Aminophenol-Azo-Tuberculin “Human” 及びo-Aminophenol-Azo-Tuberculo-proteinに就き免疫学的性状を研究しそれ等は反応元性は無いが免疫原性を保有すると発表した。私は教室の結核免疫研究の一環として上記o-Aminophenol-Azo-Tuberculin “Human”, o-Aminophenol-Azo-Tuberculo-protein及び先に余¹¹⁾¹²⁾が実験に使用せるo-Aminophenol-Azo-Tuberculin “BCG”, o-Aminophenol-Azo-BCG-protein等に就き動物に対し感染防禦能を賦与せしめ得るや否やを検せんが為、柳沢⁸⁾の報告に準じ抗原の流動パラフィン-ツウイン加乳剤を以て免疫実験を行つたので、その成績をここに報告する。

実 験 方 法

1) 実験動物

体重300~400瓦の白色健康海豚にして、旧ツベルク

リン (1/10; 0.1cc.) にて皮膚反応陰性なるものを使用した。

2) 免疫原の種類及び免疫法

本実験に使用せる免疫原は

- (1) o-Aminophenol-Azo-Tuberculin "Human" (A. T. "H" と略記す)
- (2) o-Aminophenol-Azo-Tuberculin "BCG" (A. T. "B" と略記す)
- (3) o-Aminophenol-Azo-Tuberculo-protein (A. P. "H" と略記す)
- (4) o-Aminophenol-Azo-BCG-protein (A. P. "B" と略記す)

にして之等各抗原の 8 mg. を秤量し、之を乳鉢に入れ、N/10 NaOH 1~2 滴を加え、更に 10% Tween 80 加滅菌生理的食塩水 2 cc. 及び滅菌流動パラフィン 6 cc. を攪拌しつつ徐々に加え、十分均等な乳剤となる迄攪拌振盪した。即ち各流動パラフィン乳剤 1 cc. 中には A. T. 及び A. P. をそれぞれ 1 mg. 宛含有せしむる如く製した。

之等乳剤の 1 cc. を下記の如く 4 群の海狸の肢の筋肉内に注射し

- 第 I 群……A. T. "H" 流動パラフィン乳剤
- 第 II 群……A. P. "H" 流動パラフィン乳剤
- 第 III 群……A. T. "B" 流動パラフィン乳剤
- 第 IV 群……A. P. "B" 流動パラフィン乳剤
- 第 V 群は無処置対照群とした。

3) 感染方法

実 験 成 績

1) 体重 (第 1 表参照)

試験感染に至る迄の体重増加に就いて観るに第 I 群は他群に比しその増加度は劣つていたが、その他の群に於ては大差なく殆んど同率に増加した。

感染後より剖検に至る期間に於ては、その増加は第 III 群最も著しく他の群は 6 週頃より減少の傾向を示し、対照群と略々同様の経過を辿つた。

2) 感染局所の変化 (第 2 表参照)

感染後 10~14 日目頃より対照群に、これよりやや遅れて他群も局所に硬結を触れた。

経過中及び末期に於ける変化は第 I 群最も軽微で膿瘍、潰瘍等を認めず、僅かに硬結を触知するに過ぎなかつた。

免疫原注射後 90 日目に人型結核菌 H₂ 株 (Kirchner 培地に 4 週間浮游培養せるもの) 0.1mg. を滅菌生理的食塩水 1 cc. 中に含有する菌液を作り、各群海狸の右大腿内側皮下に夫々 0.1cc. 宛注射した。

4) 使用ツベルクリン液

Römer 反応を検する為に O. T. (旧ツベルクリン) 1/10; 0.1cc., A. T. "H" 10γ/0.1cc., A. T. "B" 100γ/0.1cc. の 3 種を使用した。

5) 観察方法

免疫後 7, 28, 60, 90 日目にツベルクリン・アレルギーの発現状況及びその推移を検し、更に試験感染後 3, 5, 7 週目にもツベルクリン反応を行つた。

尙有毒菌感染後は毎週 1 回以上体重の推移及び感染局所、所属淋巴腺の変化を検し、第 5 週目には各群より 1 頭宛撲殺剖検し、残りの海狸は第 8 週後に全部撲殺し、各淋巴腺、内臓々器の罹患状態を検索した。

局所、淋巴腺及び内臓病変度の表現は小林¹³⁾の報告に準じた。

6) 臓器内結核菌の培養法

脾、肺並に肝臓より 0.2g. 宛を切除し、之を乳鉢にて碎挫しながら、1% NaOH を 2 cc. 加えて均等な乳剤となし、之を毛細管ピペットによりその 2 滴宛を 1% 小川培地に流注し、臓器内結核菌定量培養を行い、4 週後に発生せる集落を算定して比較検討した。

第 III, IV 群は何れも各 1 例宛潰瘍を生じたが治癒傾向強く、第 II 群は他群に比しやや病変度が大きかつた。然し全般より観て何れの処置群も対照群に比し、局所の変化は幾分軽微であつた。

3) 所属淋巴腺の所見 (第 3 表参照)

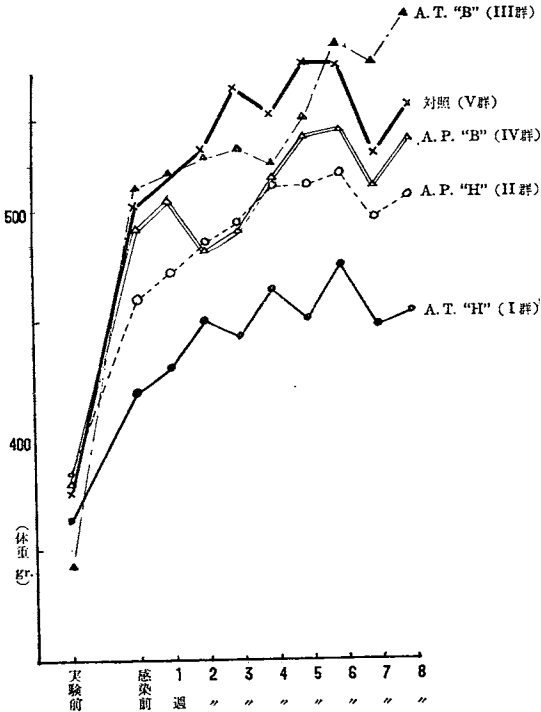
平均病変度は表に示す如く、対照群に比し処置群は何れも軽度で、就中第 I 群が最も軽るかつた。

4) ツベルクリン反応成績 (第 4 表参照)

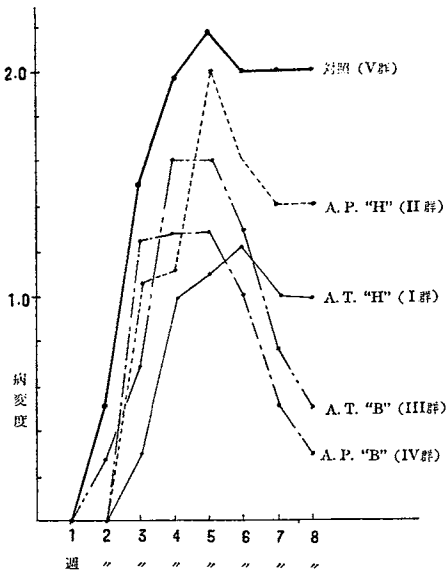
a) 感染前の成績

各処置群とも抗原注射後既に 7 日目に陽性となり 30, 60 日後に於ても尚大部分陽性反応を呈したが、90 日目には陰性或は疑陽性となつた。而して何れの群に対しても A. T. "B" を以てせ

第1表 平均体重



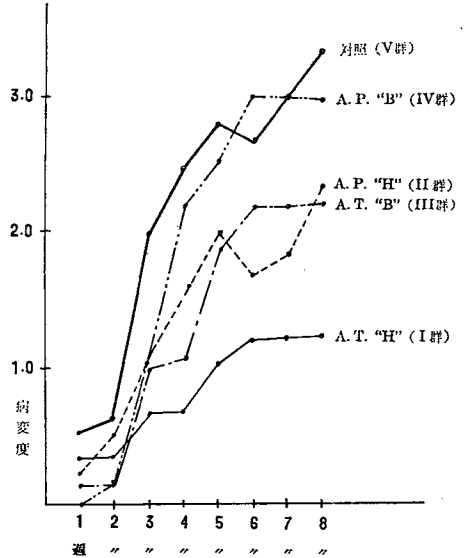
第2表 菌接種局所の平均病変度



註: 週は感染後の経過日数を示す。

病変度は最大病変度 (Ⅲ) を4とし、その平均病変度を算定した。

第3表 所属淋巴腺平均病変度



る反応は強く且つ群別に観れば A. T. "H" 及び A. P. "H" を以て感作せる海狸に於て強い皮膚反応の現われることを認めた。而して人型菌と BCG の間には本実験では型特異性を認めることは出来なかつた。

b) 感染後の成績

各群とも O. T. 竝に A. T. "H" に対し強陽性反応を呈し、その推移状態に於て、各群間に差異を認めなかつた。

5) 剖検時肉眼的所見 (第5, 6表参照)

感染後5週目に剖検せるものに於ても、亦8週目に剖検せるものに於ても、免疫海狸の淋巴腺及び内臓の変化は対照群に比し著明な差異は認められなかつた。然し第 II, IV 群の肝臓の病変度は対照群に比し僅かに輕微であつた。

即ち本実験の成績範囲では各抗原に感染防禦賦与能を有することを認むることは出来なかつた。

6) 臓器内結核菌培養成績 (第7表参照)

個々の臓器の示す病変度と菌集落数との間には必ずしも平行的な関係は認めなかつたが、全般的に観て各処置群と対照群との間にも何等著明な差異を認めることは出来なかつた。

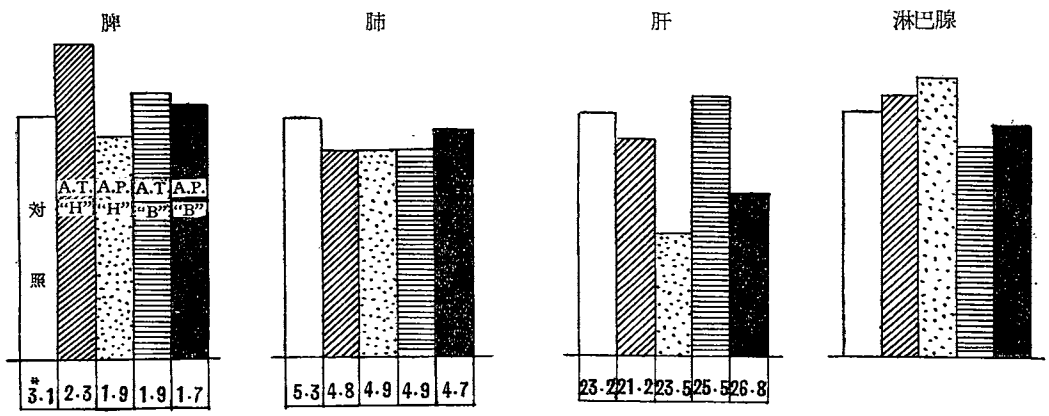
第 5 表 肉 眼 的 剖 検 所 見

免 疫 群 別	動 物 番 号	体 重		ツ反応		生 存 日 数	局 所 変 化	淋 巴 腺														内 臓															
				深腭				浅腭				膝 膈		仙 骨 部	腸 間 膜	肝 門 部	腋		下 氣 管 支	浅頸部		深頸部		顎 下		肺 臓		肝臓	腎臓		脾臓						
		右	左	右	左			右	左	右	左	右	左				右	左		右	左	右	左	右	左	右	左		右	左	重さ	病変	重さ	右	左	病変	重さ
A.T. "H"	1	430	- 15	0	20×20	35	-	+	C	+	+++	+	++	-	++	+	+++	-	-	+	++	C	-	-	-	-	-	±	±	4.6	±	20.6	-	-	+++	2.0	
	2	370	+	55	5×4	20×20	56	I	+++	+	+	C	-	+++	C	+	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	4.9	++	22.0	-	-	++	1.7	
	3	460	+	30	0	22×22	56	I	+	C	-	+	+	+++	C	-	++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	++	5.0	+	21.2	-	-	+++	3.2	
A.P. "H"	4	500	+	50	2×5	20×20	35	U	+	C	+	+++	C	+	+++	C	-	+++	+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	±	±	4.8	±	23.4	-	-	+++	1.8
	5	480	+	55	0	15×15	56	-	+	C	-	+++	+	++	++	+	+	++	-	-	+++	-	+	-	-	-	-	+++	+++	4.5	++	22.9	-	-	+++	2.9	
	6	450	+	65	不明	20×22	56	A	++	-	+++	+	+++	C	-	++	-	++	-	-	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	5.4	-	24.8	-	-	++	1.6	
	7	410	+	70	7×6	18×20	56	A	+++	C	-	+++	+++	++	-	++	++	+++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	+	4.7	-	22.9	-	-	+	1.2	
A.T. "B"	8	500	+	60	0	25×25	35	I	++	C	-	+++	+	++	C	-	++	+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+	4.5	+	24.0	-	-	+++	2.0	
	9	520	+	50	0	18×18	56	-	-	-	++	C	+	+++	C	-	+	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	++	6.5	++	25.7	-	-	+++	1.8	
	10	(S) 610	-	10	0	20×20	56	K	+	-	+++	C	++	-	-	++	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	3.8	+	26.7	-	-	++	1.9	
A.P. "B"	11	(S) 620	-	80	0	25×24	35	I	++	C	-	+++	C	-	+++	C	-	++	-	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+	4.7	±	26.8	-	-	+++	1.9
	12	450	+	80	0	25×25	56	-	+	C	-	++	C	+	+++	C	-	++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	5.0	++	24.5	-	-	+++	1.8
	13	540 (S) +170		0	0	22×25	56	K	++	C	-	+++	C	-	++	C	-	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	4.4	-	29.2	-	-	+	1.4
対 照	14	530	+	70	0	20×25	35	U	+	C	-	+++	C	++	-	-	++	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	++	+	5.2	±	26.0	-	-	+	1.6	
	15	450	±	0	0	25×25	56	U	+	C	-	++	C	+	+++	C	++	-	+	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	+++	5.5	++	17.7	-	-	+++	6.7
	16	540	+	130	0	20×21	56	I	+	C	-	+++	C	+	++	C	-	++	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	+	+	6.0	-	26.2	-	-	+	0.9
	17	490	+	10	0	22×27	56	A	++	C	-	+++	C	++	+++	C	-	++	++	+++	-	-	++	++	++	-	-	-	+	+	4.5	++	23.0	-	-	+++	3.0

備考：2, 5 の海狸に於ては大網に結核結節を認めた。

註：Sは妊娠を示す。

第 6 表 各臓器及び淋巴腺の病変度比較成績



第 7 表 臓器内結核菌培養成績

系統 種別	臓器 動物 番号	試験 番号	肺 臓					肝 臓					脾 臓				
			I	II	III	IV	計	I	II	III	IV	計	I	II	III	IV	計
A.T. "H"	1		18	19	10	6	53	23	20	15	31	71	300>	300>	300>	300>	1200>
	2		300	270	200	120	890	0	0	0	0	0	300>	300>	300>	300>	1200>
	3		0	160	170	96	446	5	5	0	2	12	300>	300>	300>	300>	1200>
A.P. "H"	4		0	0	0	0	0	15	4	9	0	28	165	200	112	130	607
	5		300>	300>	250	300>	1150>	72	300>	65	120	557>	300>	300>	300>	300>	1200>
	6		0	15	3	18	36	11	1	4	0	16	300>	300>	300>	300>	1200>
	7		0	0	0	0	0	1	0	5	12	18	62	69	100	86	317
A.T. "B"	8		12	1	13	9	35	6	0	0	1	7	300>	300>	300>	300>	1200>
	9		34	62	16	C	112C	0	1	2	26	29	300>	300>	300>	300>	1200>
	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	28	33	47	131
A.P. "B"	11		0	47	11	31	89	9	26	11	1	47	120	61	8	253	442
	12		20	42	C	63	125C	0	0	16	6	22	300>	300>	300>	300>	1200>
	13		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	24	30	16	163
対 照	14		0	0	0	0	0	4	0	3	18	25	26	23	39	8	96
	15		300>	300>	300>	300>	1200>	300>	300>	300>	300>	1200>	300>	300>	300>	300>	1200>
	16		6	35	20	C	61C	0	0	0	0	0	34	40	62	27	163
	17		3	8	12	35	58	5	0	11	C	16C	300>	300>	300>	300>	1200>

註： Cは成績不明なるものを示す。(雑菌のため)

総括竝に考按

余は柳沢⁸⁾の実験方法に準じ、A.T. "H", 料より流パラーツイン加乳剤を製し、その1
A.T. "B", A.P. "H", A.P. "B"の4種の材 cc.(抗原1mg.含有)を海猿の筋肉内に注射し、

O. T., A. T. “H” 並に A. T. “B” に対するアレルギー発現状態を観察し、更に抗原注射90日後に人型結核菌 H₂ 株 (0.01mg.) を接種し、それ等海猿の結核感染防禦能を検し、次の様な結果を得た。

(1) 各抗原接種に依り7日後60日以上に亘り或程度のツベルクリン・アレルギーを賦与せしめ得る事を認めた。

ツベルクリンを以てアレルギーを賦与せしめ得るや否やの問題に関する主なる研究報告中 Seibert¹⁴⁾, Smithburn, Sabin a. Geiger⁴⁵⁾ はその可能なる事を唱うるに反し、吾が國に於ては戸田³⁾, 山崎¹⁶⁾ 等は之を否定している。然し O. T. に牛痘, 豚血清¹⁷⁾ 等を添加して接種する場合ツベルクリン・アレルギーの発現が証明されて居り、最近柳沢⁸⁾ は流パラツウイン添加がその目的に最も好適なる事を指摘している。即ちツベルクリン単独にてはアレルギー賦与能は無いが、ある種の物質 (Schlepper) を加うる事に依り賦活されるものの如く、余の実験に於ても立証し得た。

他方結核菌々体蛋白に関しても亦戸田³⁾ はアレルギー発現可能なる事を認めているに反し、山崎¹⁶⁾, 税所⁴⁾ 等は否定している。余の実験はツベルクリンと同様流パラツウイン添加により、その可能なる事を認めた。

即ち従来定説を見なかつたこの問題に対し、結核菌々体或はツベルクリン蛋白を o-Aminophenol を以て Azo 化し、更に流パラ及びツウイン80の添加によりその可能なることを証明し得たものと思う。

(2) 次に各抗原注射後一旦発現したアレルギー状態の減弱せる時期に有毒菌を感染して観

察するに、局所変化並に淋巴腺の状態は、対照群に比し、軽度であつたが、剖検による各臓器の病変度、並に臓器中の結核菌定量培養成績に於ては対照群との間に差を認める事は出来なかつた。即ち本実験成績では感染防禦能賦与力は殆んど無いものと云えよう。

ツベルクリン・アレルギーと結核免疫との關係に就いては古來幾多論議されている處であつて、今日兩者間に平衡關係を認むるものに、岡¹⁸⁾, Henssel¹⁹⁾, 柳沢⁸⁾, 戸田³⁾ 等があり、反對論者として Coulaud²⁰⁾, 金光²¹⁾, 工藤²²⁾, 岩佐及び管原²³⁾, 田宮²⁴⁾ 等がある。

余の実験は既にアレルギーの減弱せる時期に感染実験を行つた為平衡關係に就いて明確な結論を与えることは出来ないが、とにかくツベルクリンアレルギー陽性であつた海猿に感染防禦力を認めることは出来なかつた。

以上の実験結果から直ちにツベルクリン或は結核菌々体蛋白の免疫原性を論ずることは出来ないが、蔵⁹⁾ 及び大山¹⁹⁾ の研究結果等をも考慮に入れて考察すれば、次の如く考える事が出来よう。

結核の免疫には免疫学上眞の意味の免疫即ち感染防禦力と生体防衛機能 (広義の抵抗力) の亢進によるものの兩者が考えられている。ツベルクリン或は結核菌々体蛋白免疫の意義は主として後者に求むべく、又アレルギー賦与力を明らかに証明し得た点よりすれば、一部は前者にも亦関与するものと考えなければならないが、何れにしてもその抗原性の弱いものである事は想像に難くない。

今後更に教室同人の協力のもとに本問題の解決に努力したい所存である。

結

論

o-Aminophenol-Azo-Tuberculin “Human” 及び “BCG”, o-Aminophenol-Azo-Tuberculo-protein, o-Aminophenol-Azo-BCG-protein を流動パラフィンツウイン加乳剤とし、免疫実験を行つた結果次の如き結論を得た。

1) 各乳剤の注射により、海猿に対しツベルクリン・アレルギーを賦与せしめ得た。

2) 然れども余の行つた実験の範囲内では、有毒結核菌に対する感染防禦賦与能を証明する事は出来なかつた。

文

- 1) Zinsser : J. of Exp. Med., 42 : 311 (1925).
J. of Imm., 9 : 227 (1924). 2) Petroff and
Zinsser : J. of Imm., 9 : 85 (1924). 3) 戸田,
箭頭 : 結核, 14 : 461 (昭11). 満洲医学雑誌,
19 : 799 (昭8). 4) 税所 : 結核, 6 : 1064 (昭
3). 5) 岩西 : 結核, 10 : 485 (昭7). 6)
Seibert : Proc. Soc. Exp. Biol., 30 : (1933). 7)
今牧 : 結核, 4 : 1 (1926). 8) 柳沢 : 日本細
菌学雑誌, 7 (3) : 147 (1952). 結核, 27 (9) :
533 (昭27). 9) 藏 : 金大結研年報, 8 (1) :
113 (昭24). 金大結研年報, 8 (2) : 52 (昭25).
金大結研年報, 9 (1) : 86 (昭25). 10) 大山 :
金大結研年報, 8 (2) : 23 (昭24). 金大結研年報,
9 (1) : 70 (昭25). 金大結研年報, 9 (2) : 42
(昭26). 11) 紺田 : 金大結研年報, 10 (2) : 183
(昭27). 12) 紺田 : 金大結研年報, 11 (2) : 掲
載予定 (昭29). 13) 小林 : 金大結研年報, 10

献

- (1) : 193 (昭27年). 14) Seibert : Amer. Rev.
of Tbc., 23 (23) : (1931). 15) Smithburn,
Sabin, a. Geiger : Amer. Rev. of Tbc., 29 (5) :
(1921). 16) 山崎 : 十全医学雑誌, 40 (7) :
2834 (昭10). 17) 涌谷 : 結核, 5 : 1195 (昭
2). 18) 岡 : 東北医誌, 28 : 912 (1941). 結
核, 20 : 21 (1942). 19) Henssel : Beitr. Klin.
Tuberk., 90 : 387 (1937). Beitr. Klin. Tuberk.,
93 : 132 (1939). Beitr. Klin. Tuberk., 96 : 81
(1941). 20) Coulaud : Compt. rend. soc. biol.,
119 : 368 (1936). 21) 金光 : 東京医学会雑誌,
58 : 452, 478 (1944). 22) 工藤 : 結核, 16 :
1498 (昭16). 23) 岩佐, 菅原 : 結核, 5 : 476
(昭2). 24) 田宮 : 日本細菌学雑誌, 7 (3) :
165 (1952). 25) 医学のあゆみ : 10 (6) : 349
(昭25).