Effect of Sonic Vibration on the Property and Potency of Lepromin.

MASAHIDE ABE AND TETSU NAKAYAMA
National Institute for Leprosy Research

NOBORU TACHIKAWA AND KAZUKO OKAMURA
National Leprosarium Tama Zensho-en

When the standard lepromin was treated with the sonic vibration (9.5 kilocycle per sec.), the coarse tissue fragments were dispersed in fine particles, and at the same time the number of leprosy bacilli diminished exponentially. Under the conditions of the experiment, about half of the bacilli was destructed within 5 minutes. The complement-fixing ability of the lepromin with leprous serum was, however, increased by the sonic vibration showing that the active substance was not destroyed by this treatment. Comparison of potency tests on leprosy patients gave the results that the lepromin sonic-vibrated for 30 minutes elicited weaker early reactions than the untreated standard lepromin, while there was no significant difference between them with respect to the late reactions. Consequently, it is considered that the late reaction may be caused not only by the intact leprosy bacilli but also by the mechanically destructed bacilli.

レプロミンの性状並びに力価に対する音波の作用

阿 部 正 英 中 山 哲 (国立多摩研究所)

立 川 昇 岡 村 和 子 (多磨全生園)

(受付, 6月8日, 1963)

レプロミン (光田抗原) による皮内反応の実施に際して、誰れもが経験する不安は、注射器内で粗い粒子が沈澱するために、注射量が不平等になる恐れであろう。これを解消する一つの手段として、レプロミンに音波を作用させ、粗い組織成分を分散させる試みを行った。すでに、北野ら¹⁾は超音波によりレプロミンの力価が低下することを報告している。音波の作用は超音波のそれと幾分異るとはいえ、癩菌を破壊することは中山及び林²⁾の報告にも見られるので、音波の作用によりレプロミンの力価がどのような影響を受けるかを確めるとともに、癩菌の破壊を最小限に留め組織成分の分散をよくする如き条件を見出すことを試みた。

材料並びに方法

1) 使用抗原 この実験に用いたレプロミンは昭

和35年7月作製の lot 12であり、これの菌数は1 ml中に約1億5千万であった。

2) 音波処理 音波発生装置 (久保田製作所) を用い、容積約100 ml のステンレス容器内にレプロミンを約10 ml 入れ、容器の周囲を流水で冷却しながら、出力200W, 9.5 キロサイクル/秒の音波を作用させたのち、内容をガラス小瓶に移し密封して保存した。音波作用時間は5, 10, 30, 60 分の4種類を試みた。

3) 菌数計算 林の方法³⁾により行った。鏡検にさいし、定型的な癩菌のみを数え、菌体崩壊物と思われる抗酸性顆粒は除外した。また音波による菌塊 (Globi) の大きさ並びに数の減小にも注意を払った。

4) 補体結合反応 無処理並びに音波処理レプロミンを抗原とし、癩患者混合血清による補体結合反応を、Kabat and Mayer の定量的方法⁴⁾に多少の改変

を加えて行った。すなわち、Ca⁺⁺ および Mg⁺⁺ を加えた Veronal 緩衝食塩水 (pH7.4)⁵⁾ を用いて、上記レプロミンの 8.5 倍希釈液 1 ml, 56°C 30 分加温癩血清 10 倍希釈液 1 ml, および標準溶血系統により 50% 溶血法で測定した補体 (モルモット血清) の 50 単位を混和し、全量を 5 ml として、37°C に 1 時間おいたのち、混合液の一定量を適当に希釈して、標準溶血系統により残存補体単位を測定し、50 単位から差引いて補体結合単位を求めた。さらに、抗原並びに癩血清単独により不活化される補体量を同様に測定して、それらを上記の値から差引いた残りを真の補体結合単位とした。なお、希釈抗原を 20,000 rpm 1 時間遠心沈澱して得た透明な上清について、上記と同じ条件で補体結合反応を行っ

た。
5) レプロミン反応 多摩全生園の患者 85 例 (癩腫型 66, 非癩腫型 19) について、無処理レプロミンと音波 30 分処理レプロミンとによる早期並びに晩期反応の大きさを常法通りに計測した。注射部位差を除くため、約半数の患者で左右前膊に注射するレプロミンの種類を入れかえた。

成 績

1) 音波作用によるレプロミンの性状の変化
音波を 5, 10, 30, 60 分作用させたレプロミン中の菌数を計算し、音波作用時間と菌数の減少との関係性を求めた結果を図 1 に示す。

Table 1. Effect of sonic vibration on the number of globi in standard lepromin.

Times of sonic vibration (minutes)	Numbers of globi in 100 microscopic fields			
	Estimated numbers 5-9	of bacilli in 10-19	one globus: 20-	Total
0	58	23	3	84
5	9	6	2	17
10	10	4	0	14
30	3	1	0	4
60	0	0	0	0

Fig. 1. Effect of sonic vibration on the number of bacilli in standard lepromin.

Fig. 2. Quantitative complement-fixation reactions of leprosy sera with the lepromin and its supernatant treated with the sonic vibration in various times. ●—● Sonic-vibrated lepromins diluted in 1:8.5 ○—○ Supernatants of the above after centrifuging 20,000 rpm. for 1 hour.

菌数の対数と音波作用時間との間には、明らかに直線関係が認められた。音波5分の作用により、菌数はもとのレプロミンの約 $\frac{1}{2}$ となり、30分の作用により約 $\frac{1}{30}$ に減少する。また菌塊 (Globi) の数と大きさも、表1に示すごとく、著明な減少を起す。他方組織成分の粗大な粒子は音波5分の作用ではいくらか残存するが、10分以上作用させた場合にはほとんど消失した。

音波処理レプロミンおよびその遠沈上清を抗原とし、それと癩患者血清との補体結合能力をしらべた結果を図2に示す。抗原と抗体の量は一定であるにかかわらず、音波作用により補体結合単位の増加が起るが、この増加は音波10分処理で最大となり、30分以上作用させるとやや減少する傾向が見られた。音波処理抗原を20,000rpm 1時間遠沈して、粒状成分を完全に除去した上清を用いた場合には、補体結合単位はかなり低下し、音波処理による増加はさほど顕著でなかった。

2) 音波作用によるレプロミン力価の変化

音波を30分作用させたレプロミンと無処理のものとの皮内反応の比較試験を行った。図3は早期反応の相関を、図4は晩期反応の相関をあらわす。これら

Fig. 3. Correlation, by sizes of early reactions, between standard and sonic-vibrated lepromins.

• Lepromatous cases ○ Non-Lepromatous cases

の図から力価に差があるか否かを直観的に知ることが困難なので、推計学的に検討するために、無処理レプロミンと音波処理したものとの反応の大きさの差を各患者について調べ、差の平均値を0とみなしうるか否かを調べた。その結果、早期反応においては差の平均値は2.14となり、これは1%以下の危険率で有意差といえることができるが、晩期反応においては差の平均値は0.588であり、これは有意差であるとはいえなかった。

Fig. 4. Correlation, by sizes of late reactions, between standard and sonic-vibrated lepromins.

• Lepromatous cases ○ Non-Lepromatous cases

考 察

レプロミン反応の本態に関しては、なお疑問の点が多いが、Fernandezの早期反応はツベルクリン反応と同様に癩菌水溶性成分(恐らく蛋白)による遅延型アレルギーであり、光田晩期反応は癩菌体そのものが主役を演ずる細胞性免疫反応であるという解釈⁶⁾が広く認められている。癩結節からクロロホルムその他の有機溶媒により分離した癩菌浮遊液では早期反応は起るが晩期反応が弱いこと^{7, 8)}、北野¹⁾の超音波処理レプロミンが晩期反応の減弱を起すことなどから、Wade⁷⁾は intact な癩菌の存在が晩期反応に不可欠であると考えている。

我々が用いた9.5KCの音波には、組織成分を分散させるのみならず、癩菌をも破壊する作用があるので、レプロミンの音波処理により早期反応は増強され、晩期反応は減弱すると予想される。しかし事実は全く逆であり、音波30分処理により癩菌数はもとの約 $\frac{1}{30}$ に減少し、*in vitro*における補体結合抗原性は処理前に比べるとやや増加したにもかかわらず、早期反応には明らかな減弱を起し、晩期反応にはほとんど変化を生じなかった。これらの事実は次のように解釈しうる。音波の作用により、癩菌体から水溶性成分が遊離すると同時に、不溶性の菌体並びに組織成分も細かく分散されるので、その表面に水溶性成分の吸着が起り、遊離の状態のものはかえって少なくなるために、早期反応が弱くなるのであろう。図2に示した如く、音波処理によりレプロミンの補体結合量は増加するが、高速

遠心沈澱により粒状成分を除き、水溶性分のみを抗原とした場合には、補体結合量の増加がさほど顕著でないことは、上述の如き分散状態の変化を示唆するようになる。他方、晩期反応は細胞性の反応であるから、分散状態の変化した抗原成分でも、*intact* な癩菌と同様に細胞内にとりこまれるので、反応の強さに影響を及ぼすことはないと思われる。あるいは、細胞内に入りにくいような粗い粒子（ないし菌塊）が分散されることにより、細胞反応が促進される可能性も考えられる。いずれにせよ、晩期反応には *intact* な癩菌が必要であるという説は我々の実験結果から否定するように思われる。北野らの超音波処理の条件は不明であるが、恐らく超音波の酸化促進作用により、抗原の活性が失われたのであろう。9.5KC の音波の作用は超音波より緩慢であり、酸化も起りにくいことは、*in vitro* における抗原性が音波60分作用後にも保持されていることから明らかであろう。

音波の作用により、レプロミン中の癩菌数が指数曲線的減少を起すことは、この反応が一次反応であることを示す。図1の直線の傾斜すなわち菌破壊速度恒数は、さきに中山、林²⁾が結節からある程度集菌した人癩菌および単癩菌について得られた値にほぼ等しく、従って組織成分の有無に関係なく癩菌の破壊が進行し、その半減期はおよそ5分であると推定される。他方、組織成分中の粗大な粒子を完全に分散させるには、5分以上の作用時間が必要であったので、我々が当初の目的とした組織成分のみを分散させる如き音波処理条件を見出すことは失敗であった。しかし、音波により癩菌数が減少しても、晩期反応の力価に変化は起らぬことがわかったので、粗い組織成分を分散させることは、レプロミン注射量の不均一をなくするためには役立つように思われる。

総 括

レプロミンに 9.5KC/秒の音波を作用させると、粗い組織の成分分散が起ると同時に、癩菌数にも指数的

減少が起り、用いた条件下では5分で菌数は半減した。しかし、レプロミンと癩患者血清とによる補体結合単位は、レプロミンの音波処理により増加を起した。音波30分処理レプロミンと無処理のものを用いて、癩患者に皮内反応の比較試験を行った結果、早期反応の大きさは音波処理により減少を起すが、晩期反応の大きさは両者間に有意差を示さなかった。従って、レプロミン晩期反応は完全な癩菌体の存在を不可欠とするものではなく、機械的に破壊された癩菌によっても起りうるように思われる。

文 献

- 1) 北野博一, 井上猛夫, 林文雄: 超音波ワクチンによる光田氏反応(抄) レブラ, **12**, 211 (1941)
- 2) 中山哲, 林喜久夫: 音波による大腸菌, 結核菌, 癩菌の破壊について, 日本細菌学雑誌 **15**, 587 (1960)
- 3) 林喜久夫: 癩菌の菌数計算法およびそれを使って算定された各種臓器中における癩菌数, レブラ **28**, 13 (1959)
- 4) Kabat, E. A. and M. M. Mayer: *Experimental Immunochemistry*. C. C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA (1948)
- 5) Mayer, M. M. et al: The activating effects of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement, *J. Exp. Med.* **84**, 535 (1946)
- 6) Transactions of the 7th International Congress of Leprology, p 463 (1958)
- 7) Wade, H. W: WHO Expert Committee on Leprosy: Second Report (1959) (邦訳, レブラ, **29**, 250 (1960))
- 8) Wade, H. W. et al: Lepromin vs purified bacillus suspension. II. Comparative tests with a purified bacillus suspension, *Internat. J. Leprosy*, **30**, 27 (1962)