Studies on the Preparation, Standardization and Preservation of Lepromin

V. Comparative tests with the Dharmendra antigen containing lipid fraction of leprous nodule

MASAHIDE ABE and HIKOJI HIJIOKA

(National Institute for Leprosy Research)

NOBORU TACHIKAWA and KAZUKO OKAMURA

(Tama Zenshoen)

SHIGENORI ISHIHARA

(Suruga Leprosarium)

and SHIGENOBU KOBAYASHI

(Kuryu Rakusenon)

Having been found that the Dharmendra antigen combined with certain lipid fraction of leprous nodule (the "combined" antigen) gives stronger cutaneous reactions than the regular antigen in guinea pigs sensitized with leprosy bacilli, comparative tests between the above antigens as well as with a standard lepromin were done in leprosy patients, in order to find whether the effect of lipid fraction is seen in Fernandez reactions and/or Mitsuda reactions. The combined antigen was prepared by adding dried residue of the alcohol-insoluble lipid fraction to the Dharmendra antigen so that a weight-ratio of lipid to bacilli is 1 : 4, considering the yields of them from the same pool of leproma.

The results of comparative tests between the combined antigen and the Dharmendra demonstrated that the former gives more strong Fernandez reactions than the latter in 85 cases of non-lepromatous type, since a mean of differences in reaction-sizes to the both antigens is statistically significant; while that in 406 cases of lepromatous type is not. With respect to the Mitsuda reactions, however, these antigens showed no difference in reaction-size of lepromatous as well as non-lepromatous cases.

Comparing with the standard lepromin, the combined antigen gave somewhat strong Fernandez reactions in 21 cases of non-lepromatous type. On the contrary, the combined antigen gave weaker Mitsuda reactions than the standard lepromin in 98 cases of lepromatous type.

These results indicated that the alcohol-insoluble lipid of leproma has an intensifying effect only to the Fernandez reactions in non-lepromatous cases. In spite of this fact, usefulness of Mitsuda or late reactions to the Dharmendra or combined antigen was discussed, so far as observations in leprosy patients, according to a criterium of positive reactions different from that used for a lepromin.

レプロミンの製法，力価試験並びに保存に関する研究

第5報 結節脂質添加 Dharmendra 抗原による比較試験

阿 部 正 英 肱 岡 彦 二
(国立多摩研究所)

立 川 昇 岡 村 和 子
(多磨全生園)

石 原 重 徳
(駿河療養所)

小 林 茂 信
(栗生楽泉園)

(昭和39年7月24日受付)

Dharmendra 抗原は Fernandez の早期反応を強く起すけれども，光田晚期反応が弱いことは周知の事実であり，その理由はクロロホルム・エーテル処理により菌の抗原性が修飾されるためと考えられている。Wade¹⁾は結節のクロロホルム抽出液にアセトンを加えて，菌とともにアセトン不溶脂質を沈澱させ，この脂質を含んだ菌浮遊液を抗原として，光田抗原と比較試験²⁾を行なった。その結果，この抗原による晚期反応は，光田抗原にくらべると，なお明らかに弱かったとのべている。

前報³⁾のごとく，われわれも動物実験において，アセトン不溶脂質添加により，Dharmendra 抗原の早期反応が増強されることを明らかにしたが，この脂質をさらにアルコールで分画すると，増強作用はアルコール不溶分画にのみ見出され，アルコール可溶分画の添加は反応をむしろ弱くすることがわかった。そこで，前者の脂質のみを加えた Dharmendra 抗原を作り，標準の Dharmendra および光田抗原との比較試験を多数の癩患者について試みた。

材料および方法

1) 抗原 プールした癩結節 55.5 g から，Dharmendra の方法⁴⁾に従い集菌し，乾燥菌体 227 mg を得た。これより Dharmendra 抗原 (Dh) Lot 19 を作製した。クロロホルム集菌の際抽出された結節脂質のエーテル溶液を原料として，既報の方法⁵⁾に従い，各脂質分画を得た。それらの収量は表 1 に示すごとくであった。菌とアルコール不溶脂質との収量の比は約 4 : 1 であったので，この割合に脂質を含む Dharmendra 抗原 (Dh+L) を作製した。すなわち，アルコール不溶脂質の必要量を含むクロロホルム溶液を乳鉢にとり，室温に放置してクロロホルムを蒸発させたのち，Dh を滴下しながら乳棒でよく混和した。脂質は食塩水中に容易にコロイド状に分散し，粗い塊は生じなかった。出来上った Dh+L は 0.5 % 石炭酸加食塩水 1 cc 中に 0.1 mg の癩菌と 0.025 mg のアルコール不溶脂質を含む。なお，比較に用いた光田抗原 (M) は別の結節プールから作製した標準レプロミン Lot 19 である。

Table 1. Yields of leprosy bacilli and lipid fractions from a pool of autoclaved leprosy nodules.

Materials	Total amount	Yield (%)	Ratio of bacilli : lipid
Original leprosy nodule	55.5 g	100	
Leprosy bacilli	227 mg	0.41	
Acetone soluble lipid	1,660 mg	3.01	1 : 7.3
Alcohol soluble lipid	193 mg	0.35	1 : 0.85
Alcohol insoluble lipid	62 mg	0.11	1 : 0.27

2) 皮内反応 Dh+L と Dh との比較試験には, 栗生楽泉園, 多磨全生園, 駿河療養所の患者総計 491例 (癩腫型 406例, 非癩腫型85例) を選んで行なった。また, Dh+L と M との比較は栗生楽泉園において, 合計 119例 (癩腫型98例, 非癩腫型21例) の患者について行なった。患者の左右前膊に各抗原を常法通り注射し, 早期ならびに晩期反応の大きさを計測した。抗原の注射部位差をなくするために, 各患者群とも, その約半数ずつで左右に注射する抗原を交換したが, 駿河療養所の患者のみは右側にDhを, 左側に Dh+L を注射した。

成 績

通常の Dharmendra 抗原 (Dh) と結節脂質添加抗原 (Dh+L) とによる早期反応の大きさの相関を, 癩腫 (L) 型406例, 非癩腫 (non-L) 型85例についてしらべた結果を表2および表3に示す。L型では大多数の例が斜線の上またはその近くにあり, 両抗原の力価に差はな

いように思われる。しかし, non-L型では斜線より下方に多くの例があり, Dh+L の方が反応が強いことが明らかである。

次に, 標準光田抗原 (M) と Dh+L とによる晩期反応の相関を, L型98例, non-L型21例についてしらべた結果を表4および表5に示す。L型においては, 斜線より上方に多くの例があり, Mに比して Dh+L の晩期反応が弱いことがわかる。他方, non-L型の場合には, 検査例数が少いために, 明らかな差は見られなかった。

以上の直観的所見を推計学的に検討するために, 各患者について, 2つの反応の大きさの差をしらべ, それらの分布および平均値から, この平均値が0でないといふるか, 換言すれば, 2つの抗原の力価に差があるといいうるか否かをしらべた。その結果を表6に示す。なお, 相関表は省略したが, Dh+Lと Dh とによる晩期反応および M と Dh+L とによる早期反応についても, 同様に反応の大きさの差を検討した (表6)。差の平均値

Table 2. Correlation between the size of early reactions to the Dharmendra antigen (Dh) and that to the combined antigen (Dh+L) in 406 cases of lepromatous type.

	Size of reaction to Dh antigen(mm)																Total
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
Size of reaction to Dh+L (mm)	0	22		40	6	2				1							71
	2			3	2												5
	4	3		119	27	5											154
	6	2	1	18	40	11	4			1				1			78
	8	1		6	5	11	11	1	1								36
	10				3	4	3	1	1								12
	12	1			2		2	2	1		1						9
	14			1	1	1		1	4	1							9
	16				1				2	2				1			6
	18							1	2	1	2						6
	20			1			1			1		1					4
	22							1	1	1							3
	24										1	1			1	1	4
	26										1					1	2
	28															1	1
	30													1	1	4	6
Total	29	1	188	87	34	21	6	11	7	4	4	2	2	2	1	7	406

と不偏分散の値から、Fisherの t 分布をしらべると、 t が0.01以下の確率で有意となる場合は、Dh と Dh+L との比較では、non-L 型の早期反応であり、M と Dh+L との比較では、L 型の晩期反応である。すなわち、Dh+L は non-L 型における早期反応は強く起すけれども、晩期反応は Dh と差がなく、M の晩期反応にくらべると明らかに弱いと結論しうる。

以上は反応の大きさを主眼とした所見であるが、次に反応の陽性率の比較を行なった。早期反応の陽性限界および陽性度を第7回国際癩学会（1958年、東京）における提案に従うと、Dh と Dh+L との病型別陽性率は表7のごとくになる。L 型の場合には Dh と Dh+L との陽性率は14.0%と14.3%とになり、各陽性度ともに有意差は見られない。他方、non-L 型の場合には、陽性率は85.9%と89.4%とになり、有意差は見られぬが、陽性度3+すなわち反応の大きさ 20mm 以上の例数は Dh よりも Dh+L の方が多い。これは表3の相関表からも明

らかであり、Dh と Dh+L との反応の大きさの差の分布を片寄せたのは強陽性者によることがわかる。

次に、晩期反応の判定基準を求めるために、柳沢らの方法⁶⁾に従い、各抗原別の検査全例について、その病型別度数分布曲線を描き、両者の交差する点を求めると、図1のごとく、Dh と Dh+L とでは交差点は4 mmと5 mmの間にあることがわかった。そこで5 mm以上を陽性と判定した場合の陽性率を図中に示した。Mの検査例数は少いので、Mのみを検査した例数を加えて度数分布曲線を求めると、交差点は5 mmと6 mmの間になるので、6 mm以上を陽性とした場合の陽性率を図中に示した。これらの陽性率から明らかなごとく、晩期反応と癩の病型との一致を目的とする場合には、判定基準を適当に変えれば、Dh あるいは Dh+L による晩期反応でもMのそれと同程度に、病型とよく一致することがわかった。

Table 3. Correlation between the size of early reactions to the Dharmendra antigen (Dh) and that to the combined antigen (Dh+L) in 88 cases of non-lepromatous type.

	Size of reaction to Dh antigen (mm)																Total
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	
0		1															1
4		2	1														3
8		3	2														5
12			2	1	2												5
16			1		12	1											14
20					11	5	2	2									20
24						6	1	1									8
28					2	1	2	1	1								7
32								1					1				2
36						1		1		1							3
40						1											1
44												1	1				2
48							2	1		1			1				5
52											1	1		1			3
56											1				2		3
60															1	2	3
Total	0	6	6	1	27	15	5	8	2	1	2	2	4	0	4	2	85

考 察

この研究の最初の目的は、結節脂質のアルコール不溶分画の添加により、Dharmendra 抗原の晩期 反応を増強させることにあったが、比較試験の結果は否定的であり、標準光田抗原の晩期反応に比較すると、脂質添加 Dharmendra 抗原の反応は明らかに弱いことが確認された。この結果は Wade ら²⁾の報告と一致している。彼らの用いた“Purified bacillus suspension”(PBS)は早期反応においても光田抗原より弱かったと報告されているが、われわれの脂質添加 Dharmendra 抗原はふつうの抗原よりも、non-L型における早期反応を強く起すことが明らかになった。このような相違は恐らく抗原の製法の差にもとづき、前報³⁾のごとく、結節脂質のアセトン不溶分画には、早期反応を抑制するアルコール可溶脂質が含まれるので、これを除いたアルコール不溶脂質のみを加えたわれわれの抗原の方が早期反応の増強を著

明に呈したのであろう。しかしまた、比較試験の方法の相違も考えねばならぬ。Wade らは光田抗原とPBSとの早期反応陽性率のみを比較しているが、われわれは、Dharmendra および光田抗原との比較を行なった。早期反応陽性率に関しては、これらの抗原と脂質添加抗原とは有意差を示さぬが、反応の大きさ 20mm 以上の強陽性例においては、脂質添加抗原の方が明らかに大きな反応を呈した。L型の場合にはこのような効果は見られないので、アルコール不溶脂質は癩菌で強く感作された個体におけるアレルギー反応を特異的に増強させるといううる。

前報のごとく、アルコール不溶脂質のみを癩菌感作モルモットに注射しても、皮内反応は起らぬので、この脂質分画中に菌体ないしその破片が、Seitz 濾過板を通り抜けて、混在した結果とは考え難い。むしろ、結節中には癩菌の代謝産物ないし崩壊物質が含まれ、それらがレプロミンの抗原性に何らかの役割を演ずるという説⁷⁾に

Table 4. Correlation between the size of late reactions to the Mitsuda antigen and that to the combined antigen(Dh+L)in 98 cases of lepromatous type.

	Size of reaction to Mitsuda antigen (mm)																Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	10		2	11	12	4											39
1																	0
2		1		1	5												7
3		1		9	6	6		1									23
4		1			5	5	1										12
5				1	2	2	3	1					1				10
6						1	1						1				3
7					1			1									2
8								1									1
9																	0
10																	0
11																	0
12																	0
13																	0
14																	0
15																1	1
Total	13	0	2	22	31	18	5	4	0	0	0	0	2	0	0	1	98

従い、このような物質の一部がアルコール不溶分画に含まれると解釈したい。しかし、宿主側の組織に由来する物質も当然考えねばならぬので、上述のごとき早期反応増強物質の本態はアルコール不溶脂質の化学分析の結果に期待したい。

なお、Wade⁷⁾は癩結節中の菌に由来する上記のごとき物質の存在を理由にして、レプロミンから組織成分を除くべきでないと主張しているが、前述のごとき、われわれの用いた脂質分画は少くとも晩期反応には影響がないように思われる。むしろ、レプロミン中の組織成分の量の如何⁸⁾により、あるいは正常皮膚組織乳剤⁹⁾により示されるごとき非特異的反応が晩期反応の大きさにかなり影響をおよぼすと考えられる。従って、組織成分を含め（もし含むとしても光田抗原にくらべればはるかに少い）Dharmendra 抗原による晩期反応の判定基準は光田抗原の場合と当然異ってよいはずである。事実、柳沢ら⁶⁾の方法に従い、病型別度数分布曲線の交差する点か

ら陽性限界を求めると、図1のごとく、Dharmendra 抗原および脂質添加抗原では、5 mm以上を陽性としてよいことがわかった。これは第8回国際癩学会（1963年、ブラジル）において提案された判定規準と一致している。この基準に従うと、Dharmendra 抗原あるいはそれに脂質分画を加えた抗原でも、陽性率の病型との一致はかなりよい。それに比して、光田抗原の場合には、上記の国際基準に従うと、L型の37.8%が陽性となるので、病型との一致をよくするためには、分布曲線の交差点から考えて6 mm以上を陽性とすべきであろう。このように、レプロミン反応を癩患者の病型あるいは予後の判定に役立てる場合には、反応の判定基準を適当に設ければ、Dharmendra 抗原による晩期反応でも十分に役立つように思われる。

しかし、レプロミン反応を近年一層重要性を増してきた疫学的調査研究に用いる場合、特に幼小児のレプロミン反応の観察においては、光田抗原と Dharmendra 抗原

Table 5. Correlation between the size of late reactions to the Mitsuda antigen and that to the combined antigen (Dh+L) in 21 cases of non-lepromatous type.

	Size of reaction to Mitsuda antigen (mm)																Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0				1	1	1											3
1																	0
2																	0
3																	0
4					1	2	1										4
5																	0
6							3	2									5
7						1		1	1			1					4
8							1										1
9							1		1								2
10																	0
11													1				1
12													1				1
13																	0
14																	0
15																	0
Total	0	0	0	1	2	4	6	3	2	0	0	1	2	0	0	0	21

Table 6. Distribution of difference in size of reactions to Dharmendra (Dh) or Mitsuda (M) antigens and that to the combined antigen (Dh+L).

Antigens compared		(Dh)-(Dh+L)				(M)-(Dh+L)			
Phase of reaction		Early		Late		Early		Late	
Type of disease		L	Non-L	L	Non-L	L	Non-L	L	Non-L
Difference in size of reactions (mm)	11-	3	2	0	0	1	2	0	0
	9-10	1	1	0	0	0	0	0	0
	7-8	4	1	0	1	1	0	1	0
	5-6	10	0	2	0	5	0	5	1
	3-4	63	9	55	6	12	2	24	3
	1-2	83	12	66	15	31	2	30	7
	0	154	6	182	24	17	1	28	5
	-1- -2	45	22	56	32	20	3	7	4
	-3- -4	23	11	33	6	2	1	3	1
	-5- -6	7	7	9	0	7	1	0	0
	-7- -8	7	4	1	0	1	2	0	0
	-9- -10	4	1	0	1	0	2	0	0
	-11-	2	9	0	0	1	5	0	0
Total		406	85	404	85	98	21	98	21
Mean of difference		0.384	-2.42	0.072	-0.26	0.408	-3.91	1.47	0.714
Unbiased variance		3.1	6.4	1.98	2.13	3.64	9.9	2.04	2.05
t		2.18	3.39	0.73	1.12	1.13	1.81	7.14	1.59
Probability		0.02-0.05	<0.01	0.4-0.5	0.2-0.3	0.2-0.3	0.05-0.1	<0.001	0.1-0.2

Table 7. Comparison of positive percentage in early reactions to the Dharmendra antigen (Dh) and those to the combined antigen (Dh+L).

Grade	Size (mm)	Lepromatous (406)				Non-lepromatous (85)			
		Dh		Dh+L		Dh		Dh+L	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Negative (-)	0-4	218	53.7	230	56.9	6	7.1	4	4.7
Doubtful (±)	5-9	131	32.3	118	29.1	6	7.1	5	5.9
Positive (1+)	10-14	28	6.9	26	6.4	11	12.9	9	10.6
	(2+)	13	3.2	13	3.2	28	33.0	26	30.6
	(3+)	16	3.9	19	4.7	34	40.0	41	48.2

とでは晩期反応の陽性率に癩患者の場合以上に差を生ずることが知られており²⁾, その理由として, 既存のアレルギーのない個体では, 光田抗原が“Microvaccination”の効果を有するのに対して, Dharmendra 抗原にはそれが乏しいことが主張されている⁷⁾. われわれは従来, 癩患者における比較試験を主とし, またそれに限定せざるを得ない事情にあったので, 脂質分画の添加により上記のごとき効果をあげうるか否かは今後の大きな課題としたい。しかしそれには, 光田抗原の非特異的反応を避け

るために, 菌の抗原性を変えずに組織成分のみを除去した精製菌浮遊液の作製ならびにそれを標準とした比較試験が必要であらう。

総 括

結節脂質のアルコール不溶分画を菌体の4分の1量加えた Dharmendra 抗原を作り, 標準 Dharmendra および光田抗原との比較試験を癩患者について行なった。

脂質添加 Dharmendra 抗原による早期反応は, 非癩腫

Fig. 1. Distribution curves, of lepromatous and non-lepromatous cases, by sizes of Mitsuda reactions to the following antigens: A. the Dharmendra antigen (Dh), B. the Dharmendra antigen combined with alcohol-insoluble lipid (Dh+L), and C. the standard lepromin (M). Numbers of cases tested and percentages of positive reactions are indicated in the figure, calculating from criteria that positive reactions to Dh and Dh+L are considered to be 5 mm or more in size, while those to M is 6 mm or more.

型85例においては、通常のDharmendra抗原の反応より明らかに強かったが、癰腫型406例では大差なく、また両抗原による晩期反応はいずれの病型においても有意差を示さなかった。

脂質添加Dharmendra抗原を光田抗原と比較すると、

非癰腫型21例の早期反応では前者がやや強かったが、癰腫型98例の晩期反応では、後者の方が明らかに強かった。

以上の所見から、結節脂質のアルコール不溶分画には、早期反応を強める作用はあるが、光田晩期反応を強める作用はないことが明らかになった。しかし、癰患者においては、Dharmendra抗原による晩期反応は、判定基準を適当に選べば、光田抗原による場合と同様に、病型判定に使用することができると考えられる。

(本研究の要旨は第37回日本癰学会総会において報告した。本研究はWHO研究補助金の援助を受けて行なわれた)

文 献

- 1) Wade, H. W. : Lepromin vs purified bacillus suspension. I. Preparation of a purified bacillus suspension (with a note of Nile-blue staining of smears). *Internat. J. Leprosy* 30, 19 (1962)
- 2) Wade, H. W. et al : Lepromin vs purified bacillus suspension. II. Comparative tests with a purified bacillus suspension. *ibid* 30, 27 (1962)
- 3) 阿部正英, 脇岡彦二 : レプロミンの製法, 力価試験ならびに保存に関する研究(4), 脱脂癰菌感作モルモットによる力価試験の基礎的研究, *レプラ*, 33, 22 (1964)
- 4) Dharmendra : The lepromin test—a review. *Leprosy Rev.* 18, 92 (1947)
- 5) Abe, M. : Serological relationships of leprosy, tuberculosis and syphilis. II. In vitro antigenicity of the lipid recovered from leprosy nodule. *La Lepro* 26~28 (Selected Article), 59 (1960)
- 6) 柳沢謙, 他 : Lepromin 反応に関する研究(2), 反応の判定基準, *レプラ*, 24, 328 (1955)
- 7) Wade, H. W. : Lepromin : Standardization and technique. Working document presented at the Expert Committee on Leprosy, WHO, Geneva, Switzerland (1959)
- 8) 阿部正英他 : レプロミンの製法, 力価試験ならびに保存に関する研究(3), レプロミンの力価基準におよぼす組織成分の影響, *レプラ*, 32, 133 (1963)
- 9) 前田道明他 : 組織およびその成分による皮内反応, *レプラ*, 33, 7 (1964)