皮内反応による抗酸性菌の抗原分析に関する研究

第2報 未知菌感作動物における皮内反応

浅 見 望 三 浦 馨 長 田 進

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳 沢 謙)

[受付: 9月24日・1958年]

I. 緒 言

前報¹⁾において研究室保存の既知菌7種及び単癩菌の死菌感作動物に対し、夫々のPPD及び菌体を用いて皮内反応による抗原分析を行つた成績から、抗酸性菌を皮内反応によつて分類することが出来た。

今回は未知菌14種を用い、前回と同一の方法によつて皮内反応による抗原分析を行つた、なお、癩菌による感作実験も別報の如く成功したのでこれについても同様皮内反応を実施した。これらの成績を報告する。

II. 実験方法

1. 使用菌株

これら各菌株の種類及び由来は表1の如くである。未知菌のうち、M. balnei は Zettergen²⁾ が水泳プールより、M. ulcerans は MacCallam³⁾ が皮膚膿瘍から、芝A株は宋戸⁴⁾ が中学生喀痰より、石井株は染谷⁵⁾ が結核患者喀痰から、小谷及び日比株は川口が癩患者結節部より、西一以下6株は太田及佐藤⁶⁾ が癩患者結節及び血液等から、Maccoy 及びGHA株も外国において癩患者から分離したものである。

また、これら各菌の小川培地上における色調は、黄色5株 (Johne 菌, Phlei 菌, 石井, 小谷及び日比株), 茶褐色2株 (竹内 CC3 及び木戸黄株), クリーム色2株 (関口及GHA株), その他12株は乳白色であつた。

2. 菌体及びPPDの分離

これらの分離法は前報と同一方法によつた、但し、M. balnei 及び M. ulcerans は30℃で10~12週間培養した。また、癩菌は別報⁷⁾ のトリプシン消化法によつて結節から分離した。

3. 動物の感作法

本実験は2回に分けて行い、各回とも体重 350~400

gのアルビノモルモットの雌 (1群9匹) を用い、各死菌体を Freund Adjuvant をもつて 2 mg/cc 乳剤を作りその 0.5cc を各動物の両股筋肉内に接種して感作した。

4. 皮内反応術式

使用抗原としては菌体を用いる場合は各10γ/0.1 ccを用いた。PPDを用いる場合は、はじめ 0.2γ/0.1 ccを用い、48時間判定において同種感作群における反応が甚だ強い、弱い場合には更に、濃度をかえて注射した。また、単癩菌は 2γ/0.1 cc, 癩菌は10γ/0.1cc を用いた。皮内注射は感作8週後に行い、注射方法は部位差を相殺するためラテン交絡法によつた、判定は注射後24及び48時間目におこない、硬結の大きさを計測した。

III. 実験成績

1. 菌体及びPPDの収量 (表2)

培地1立当りの菌体収量の最大は M. balnei (11.7 g) 次で日比, BCG, 芝A, 小谷等 (7.5 ~ 8.2 g), 最少は関口 (2.8 g) であつた。

培地1立当りの PPD 収量の最大は西一 (470 mg) 及び木戸黄 (332 mg), 次で石井, 芝 A, M. balnei 等 (160 ~ 180 mg), 最少は M. ulcerans (23mg) であつた。

PPDのN量は M. balnei, 石井, 木戸黄等 (7~9%) ではやや少ないが、その他のものでは10~12%で菌種による差異は著しくなかつた。

2. 菌体による皮内反応

ASAMI Nozomu, MIURA Kaoru & NAGATA Susumu: Studies on the antigen analyse of acid-fast bacilli for skin reaction. Part 2. Skin reaction of sensitized animals by unknown strain. Tuberculosis Division, National Institute of Health, Tokyo. —Jap. J. of Bact., 14(4), 262-265, 1959.

表 1 使用菌株の由来

菌 株	分 離 及 分 与 者	分 離 及 分 与 年	分 離 材 料	小川培 地上の 色 調	皮内反応 の 抗 原		備 考	
					菌体	PPD		
1. 人結核青山B	伝染病研究所	1930頃		乳 白	×	×	1952. 家畜 衛試より分 与	
2. BCG	Pasture 研究所	1925		〃		×		
3. Vole	Aronson	1949		〃		×		
4. Johne, 18	Bureau of Animal Industry u. S. A.	1952		黄 白		×		
5. 鳥結核, 3717	Mayo Foundation Exp. Path.	1951	ブルー 皮 膚 学生喀痰 結核患者喀痰 癩患者結節 癩患者結節 癩患者結節及血液 癩患者結節 癩患者結節 鼠癩結節	乳 白	×	×		
6. Phlei				黄	×	×	1956. 東北 大抗酸研よ り分与	
7. Smegma				乳 白	×	×		
8. Balnei	Inst. Hyg. and Bact. Lausaune Swiss Alfred Hosp. Prabren Australia	1955		〃	×	×		
9. Ulcerans P.D.		1954		〃		×		
10. 芝 A	尖 戸	1948		〃	×	×	1956. 東北 大抗酸研よ り分与	
11. 石 井	染 谷	1950		黄	×	×		
12. 小 谷	川 口	1950		〃	×	×		
13. 日 比				〃	×	×		
14. 西 一				乳 白	×	×		
15. 竹 内	太田, 佐藤	1930~ 1931		〃	×			
16. 田 中				〃	×			
17. 関 口				クリーム	×			
18. 竹内 CC 3				茶 褐	×			
19. 木戸黄				〃	×	×		
20. Maccoy	Mccoy	1941	癩患者結節	乳 白	×			
21. GHA, 204	Graham	?		クリーム	×			
22. 癩 菌	石 原	1949	癩患者結節		×	×	1956. 東北 大抗酸研よ り分与	
23. 鼠癩菌	西 村	1949	鼠癩結節			×		

13種の未知菌株と4種の既知菌株との菌体を用いた場合の48時間における反応のうち12mm以上を呈したものの数値をもつて正方形を描けば図1の如くである。

各感作群と各菌体とにおける関係をみるに、石井, Balnei, 鳥型, Phlei等の菌体は同種感作群のみに強く反応し、小谷と日比との菌体は両感作群にほぼ同大に反応し、人型結核菌体は同種感作群の外 Balnei 感作群にも反応した、また、癩菌体は人型結核感作群に強く、Balnei 感作群に弱く反応し、芝A菌体は同種感作群の外竹内 CC 3, Maccoy 及び Smegma 等の感作群にやや弱い反応がみられた。更に、癩患者から分離された西一、竹

内、竹内 CC 3, 田中、関口、木戸黄, Maccoy, GHA 等8菌体は Smegma と同一 Pattern を示した。

2. PPDによる皮内反応

菌体による皮内反応の成績から同一 Pattern に属するもののうち数種を選び、新たに数種の菌株を加えた17種の感作群に対し、夫々のPPD(但し、癩及び単癩は菌体)を注射した後24及び48時間とにおける反応の算術平均値をとり、このうち11mm以上の反応を呈したものの数値をもつて正方形を描けば図2の如くである。

PPDによる反応はほぼ菌体における反応と同一傾向であるが、一般にPPDは菌体よりも特異性が明瞭に表

表2 菌体及 PPD の収量

菌 株	培養週	培養量 (l)	菌 体		PPD			備考
			量 (g)	g/l	量 (mg)	mg/l	N. %	
人結核, 青山B	7	6.3	46.3	7.4	500	87	13.0	第一報記載菌株
Vole	7.5	8.1	53.6	6.6	2,031	251	10.2	
Johne 18	13	6.6	31.5	4.8	1,237	187	10.2	
鳥結核, 3717	7	6.7	25.3	3.7	166	24	11.4	
Phlei	4	6.3	57.5	9.2	490	74	10.8	
Smegma	4	8.1	38.6	4.8	1,257	155	13.2	
BCG	7	14.7	116.8	7.9	1,138	77	12.2	PPD は製造せず
Balnei	10	4.2	49.3	11.7	677	161	9.0	
Ulcerans PD	12	1.5	7.1	4.7	35	23	10.0	
芝 A	6	1.2	9.3	7.7	217	180	10.4	
石 井	6	1.2	4.0	3.3	195	165	7.6	
小 谷	6	6.0	45.0	7.5	603	100	10.4	
日 比	6	1.8	14.6	8.2	162	90	10.6	
西 一	6	0.9	3.6	4.0	423	470	10.6	
木戸黄	6	0.9	3.0	3.3	298	332	9.0	
竹 内	6	0.9	3.7	4.1				
田 中	6	0.9	3.1	3.5				
関 口	6	0.9	2.5	2.8				
竹内 CC3	6	0.9	3.1	3.5				
Maccoy	6	0.9	3.8	4.2				
GHA	6	0.9	2.8	2.8				

れた, 各菌株の Pattern を群別してみると, 3 菌株が同一抗原を有するものは a) 西一, 木戸黄, Smegma, b) 人型結核, BCG, Vole, c) 鳥型, Johne 単癩等であり, 2 菌株が同一抗原を有するものは小谷と日比である。2 菌株の感作原性が抗原性に共通性のあるものは Balnei と Ulcerans である。また, 同種感作群のみに反応する抗原を有するものは石井, Phlei であり, その他, 芝 A と癩とは同種の外 2, 3 異種感作群に反応する抗原を有した。

IV. 総括及び考按

未知菌株14種について皮内反応による抗原分析を前報

図1 菌体10 γ による皮内反応成績

但し, 48時間値のうち12mm以上の反応を呈するものの数値をもつて正方形を描いた

図2 PPDによる皮内反応成績

但し, 24時間と48時間との平均値のうち11mm以上の反応の数値をもつて正方形を描いた

と同一方法によつて実施したところ, 数種の Pattern が認められた。これらの菌株のうち, 石井株は染谷⁹⁾により, 芝A株は矢戸⁴⁾により動物の皮内反応上人型結核菌とは異なると報ぜられ, また, M. balnei は Linell¹⁰⁾により人体の皮内反応上 Tuberculin とは異なると述べられている。今回の成績も同一であつた。また, 太田等⁶⁾が約20年前癩患者結節から分離した菌株は何れも Smegma と同一 Pattern に属していたことは興味ある知見である。なお, 小川培地及びソートン培地では黄色を呈した石井, 小谷, 日比, Phlei 等(但し, 小谷と日比は同一反応性を有する)は色調が同一でも皮内反応上からはそれぞれ別の Pattern に属していた。

次に, 癩菌による感作に成功はしたが, 他抗酸性菌に比しアレルギーの程度が弱いので, 特異性の判定は充

分には云い得ないが、この菌体が同種感作群の外人型結核菌及びBCG感作群に対しても反応したことは柳沢等⁹⁾の人体における成績と一致し興味が深い。

このように皮内反応によつて抗酸性菌の抗原分析を行うことが出来る。しかし、抗酸性菌は自然界に広く分布し、あらゆる場所のあらゆる物から分離されるので結核患者喀痰、癩患者結節等からこのような抗酸性菌が分離された場合、それが病因菌と誤られ易く、また、新菌株であるかの如き感を与えるので、病原性に関しては充分の検討を行う必要がある。そのためにも抗酸性菌の分類の統一が一日も早く実現することを望むものである。この意味において本実験が多少の参考になれば幸である。

多数抗酸性菌の皮内反応による抗原分析を行うような場合、勿論PPDを用うことが最良ではあるが、PPDは培養及び操作の上において時間と労力を要するので、多数菌株抗原性を調べるような場合には菌体を用いて差支えない。

一般に皮内反応によるアレルギーの実験を行うような場合、動物の飼養管理は大切なことである。特に、酷暑及び嚴寒の候、保温設備も無い場所で飼育するとアレルギーは殆んど上昇しない。故に、斯る設備のないところではこの時期外に実験を行うよう計画する必要がある。また、皮内反応による抗原分析を行うような際、抗原の濃度の適量を用うことが大切である、濃ければ異種感作群にも反応して特異性が不明となり、うすければ同種感作群にも弱反応しか表さないのてたとえ同一Patternに属する群があつても反応を表さない。故に、同種感作群において、注射後24時間における硬結15~20mmを呈する濃度を用うことが必要である。

V. 結 言

23種の抗酸性菌の死菌を Freund Adjuvant に包埋してモルモットを感作し、それらの菌体及びPPDを用い

て皮内反応による、抗原分析を行つたところ次の如き結果を得た。

1. 菌体による皮内反応の Pattern からみて、癩患者から太田等が分離した8株抗酸性菌は Smegma 菌と同一型に属することがわかつた。
2. PPD による皮内反応の Pattern から数群に別つことが出来る。
3. 本研究を行う上における動物実験について考察を加えた。

稿を終るに当り御指導御校閲を賜りました柳沢部長に感謝し、末君の援助を謝す、また、石井株を分与された公衆衛生院染谷部長、小谷株等を分与された伝染病研究所川口博士、芝A株を分与された横浜市医大矢戸助教授 Balnei 菌、Ulcerans 菌、その他癩患者から分離した多数の菌株を分与された東北大、抗酸病研究所佐藤教授並びに福田先生、癩結節を提供して下さつた松ヶ丘保養園荒川先生、鼠癩菌の菌体を分与された癩研究所林先生等々の御好意に対し満腔の謝意を表する。

文 献

- 1) 浅見, 三浦, 長田: 日本細菌学雑誌, 14, 193, 1959.
- 2) Zettergren, L.: Svenska läk. tidning, 49, 25 (1952).
- 3) MacCallam, P., Tolhurst, J. G., Buckle, G. and Sisson, S. H. A.: J. Path. and Bact., 60 93 (1948).
- 4) 矢戸: 結核, 23, 27 (1948).
- 5) 染谷及林: 日本細菌学雑誌, 7, 605 (1952).
- 6) 太田及佐藤: 東京医事新誌, 2722, 2729 (1931).
- 7) 柳沢及浅見: レブラ, 27, 107 (1958).
- 8) Linell, P. & Nordén, Å.: Mycobacterium Balnei, Acta. Tbc. Scand. Supplementum Copenhagen, (1954).
- 9) 柳沢・外: レブラ, 24, 353 (1955).