結核菌の Cord Factor に関する研究

第2報 抗 Cord Factor 血清の免疫学的作用について

新 明 美 仁

北海道大学結核研究所細菌部 (主任 大原 達教授)

〔受付: 10 月 20 日・1958 年〕

結核菌の示す毒力乃至は病原性を菌体成分の化学的分析によって解明せんとする試みは、ここ数年活潑に行われており、これに関し Choucroun¹⁾ の分離した Pmko や Spitznagel & Dubos²⁾ の分離した毒性物質はそれぞれ注目を惹くものであるが、結核菌の毒力を追求して行く上に最も重要であり且最も優れた業績を残しつつあるのは、云う迄もなく Bloch ら³⁾⁻¹⁰⁾ の所謂 cord factor に関する一連の研究である。彼の cord factor はその後色々な研究者によつて追試、研究されているばかりでなく Bloch 自身も Lederer, Noll, Sorkin 等の化学者と協同して更に深く研究を進め、現在ではその構造式を推定し得る段階にまで至っている^{11), 12)}。

然しその半面において、この物質の免疫学的な性状に関する研究は極めて乏しく、化学的性状を追求した多彩な研究報告に較べれば、殆んど何も知られていないと云つても過言ではない。著者は前報¹³⁾において cord factor の生物学的性状を調べマウスに対する毒性を確認したが、今回はその免疫学的事項に関し若干の知見を得たので、以下主として抗 cord factor 血清の作用について報告したいと思う。但し本実験に用いた material は未だ完全に精製されたものではなく、従つてこのものを cord factor と呼ぶ事の可否、及び cord factor なる名称そのものの妥当性については議論の存する所であるが、これらについては既に前報において述べた通りである。

実験材料及び実験方法

1) Cord factor: 前報と同様にして人型毒力結核菌 仲野株より抽出した。尚本物質はその収量の関係により何回にも分けて採取された為、その融点、窒素含有量等はその都度多少相違していたが、著者の得た 3 つの material は次の如き性状のものである。

material 1, m.p.=38°—43°C, N=1.7%

material 2, m.p.=38°—45°C, N=1.6%

material 3, m.p.=40°—50°C, N=0.8%

このうち今回の実験においては主として material 2 及び 3 が用いられた。

2) 抗 cord factor 血清の調製: cord factor はその分子量から見て単独で抗体産生の刺激たり得るか否か疑問であつた為、“Schlepper”としてこれに等量の豚血清を加えて家兎を免疫した。免疫操作は次の如くである。

10mg の cord factor を 1 ml の propylene glycol に溶解し、これに 1 ml の豚血清を加えて十分振盪した後隔日に 3 回家兎に注射、1 乃至 2 カ月の間隔でこの操作を数回繰り返す。最終注射より 3 週間後に一部採血して沈降反応を行い、十分強い陽性成績を示したものを全採血して実験に供した。かくして得た抗 cord factor 血清のほか、比較のため次の 4 種の血清を対照として本実験に用いた。

(i) Schlepper を加えず cord factor 単独で上と同様に免疫した家兎血清 (上記の抗 cord factor 血清と区別する為以下 C F 血清と略記す)。(ii) 豚血清と propylene glycol (cord factor の solvent) の等量混合物を以て免疫した家兎血清 (以下抗豚血清と略記す)。(iii) 仲野株死菌を以て免疫した家兎血清 (以下結核血清と略記す)。(iv) 正常家兎血清。

3) 使用菌株及び使用動物: 感染に用いる結核菌としては牛型菌 Ravenel 株、実験動物には雑系白色マウスを使用した。

SHIMMYO Yoshihito: Studies on the cord factor of the tubercle bacillus. 2. Immunological activities of the anti-cord factor sera. Department of Bacteriology, Research Institute for Tuberculosis, Hokkaido University. —Jap. J. of Bact., 14(5), 383-388, 1959.

表 1 Cord factor の毒性に及ぼす
各種家兎血清の影響

使用家兎血清	群別	使用マウス数	注 射 量		注射回数	死亡数	死亡率	体重減少率(%) (第6回注射)
			CF (mg)	血清 (cc)				
抗 Cord factor 血清	1 A	10	0.1	0.025	7~8	3	33%	-6.9
	1 B	10	0.1	0.01	6~9	3		-10.5
CF 血清	2 A	10	0.1	0.025	3~8	7	75%	-10.3
	2 B	10	0.1	0.01	3~9	9		-18.3
抗豚血清	3 A	10	0.1	0.025	4~8	7	70%	-11.6
	3 B	10	0.1	0.01	6~9	7		-21.5
正常血清	4 A	9	0.1	0.025	4~8	7	84%	-21.1
	4 B	10	0.1	0.01	6~9	9		-27.1
結核血清	5 A	10	0.1	0.025	5~8	1	35%	-2.5
	5 B	10	0.1	0.01	4~9	6		-11.4
正常血清	6 A	6	0	0.025	8	0	0	-0.6
	6 B	6	0	0.01	9	0		-4.9
—	7	6	0.1	0	3~9	6	100%	-25.2

註：(1) CF=Cord factor

(2) 各群共注射部位はすべて腹腔内
注射間隔 1~2 日

表 2 CF 及び H₂ 抗原に対する各
種家兎血清の抗体価

前 処 置	抗 原		CF	H ₂
	家兎	番 号		
抗 Cord factor 血清	1		16	0
	2		4	4
CF 血清	11		0	0
	12		0	0
抗 豚 血 清	21		0	0
	22		0	0
正常家兎血清	31		0	0
	32		0	0
結 核 血 清	101		8	64
	102		16	32

実 験 成 績

1, Cord factor の毒性に対する抗 cord factor 血清の作用について

Cord factor に対する抗血清中には cord factor の毒

性に拮抗するような何らかの因子が存在するのではなからうかとの想定のもとに, cord factor に抗 cord factor 血清を混じてマウスの腹腔内に反復注射して見た。マウスは全部で 117匹を用い, 抗 cord factor 血清のほかに対照として CF 血清, 抗豚血清, 結核血清, 正常家兎血清等にも同様に cord factor を混じ同じく腹腔内に注射した。マウスの群別及び注射の方法は表 1 に示した通りである。即ち第 1 群より第 6 群までは更にこれを A, B の subgroup に分ち, 表に記載した血清を各 A 群には 1 回 0.025ml, 各 B 群には 1 回 0.01ml 宛それぞれ注射した。これらの血清の cord factor 及び H₂-antigen

(人型菌 H₂ 株の中性水加熱菌体抽出液) に対する抗体価は表 2 に示す如くである (表 2 に掲げられた血清中家兎番号 1, 11, 21, 31, 101 の血清は A 群に, 家兎番号 2, 12, 22, 32, 102 の血清は B 群に注射された)。この実験において A 群のマウスは最高 8 回, B 群のマウスは最高 9 回に至るまでそれぞれ隔日に注射をうけたが, 途中で斃死したものはその都度記録した後病理所見を調べた。尚 7 群中第 6 群のみは cord factor を省いて正常血清と propylene glycol の等量混合物を注射し, 又第 7 群には血清を与えずに cord factor のみを注射した。以上の実験成績は表 1 に示す通りである。表において A 群の死亡数は最終注射より 10 日後, B 群のそれは最終注射より 5 日後に記録されたもので, この時生き残っていたマウスはすべて屠殺して病的所見の有無を肉眼的に検査した。最後の欄の体重減少率は, 実験開始時における各群マウスの平均体重を 1 として第 6 回注射後に測定した同じ平均体重の減少度を百分率で表わしたものである。

この表において最も注目すべき事実は, 第 1 群及び第 5 群の死亡率が他の群に比して著明に低い事である。即ち cord factor に正常家兎血清を混じて注射した第 4 群は A B, 両 subgroup を通じて 19 匹中 16 匹が斃死しており (死亡率 84%), CF 血清, 抗豚血清注射の第 2, 第 3 群の死亡率もそれぞれ 70% を越す高率であるに反し, 抗 cord factor 血清を与えた第 1 群は 20 匹中僅か 6 匹 (33%) しか死亡せず, 結核血清を注射した第 5 群も 20 匹中 7 匹即ち 35% しか死亡していない。これらの差は推計学的に有意と認められた。この成績から見て, 抗 cord factor 血清と結核血清の両者は, cord factor の毒作用を低下せしめる作用を持つているものと思われる。

図 1 及び 2 図は各群マウスの体重の推移を図示したもので, 1 図は各 A 群, 2 図は各 B 群についてそれぞれ群毎に体重の平均をとって纏めたものである。各 A

図1 各 A 群マウスの体重の推移

図2 各 B 群マウスの体重の推移

群は実験開始時の平均体重が15g前後、各B群は13g前後であったが、第6群を除き、いずれの群にも程度の差はあれ一様に体重減少の傾向が見られた。第6群の体重に殆んど変化が見られなかったのは、この群のみが

cord factor の注射を受けていない事による当然の結果である。

他の5群のうちでは抗 cord factor 血清の注射を受けた第1群及び結核血清の注射を受けた第5群の体重が第2,第3,第4群のそれに比してA, B両 subgroup 共に減少率が低い。1, 2図における体重の平均は何れも斃死せるマウスを除いて求めたもので、注射回数を重ねる後期になると死亡数が多く意義のある数字とは云い難くなる為、死亡数の比較的少い第6回注射時における体重減少率を求めて比較したのが前述の如く1表の最後の欄に掲げられた数字である。これによれば死亡率の低い第1,第5群は体重減少率もまた低く、この点から見ても抗 cord factor 血清と結核血清は cord factor の毒性を低下せしめる作用があるように思われた。

2, 結核感染に対する抗 cord factor 血清の作用について

上述の実験において抗 cord factor 血清及び結核血清中には cord factor の毒性を低下せしむるような因子が含まれている如き成績が示されたので、この同じ因子が結核菌自身の病原性に対しても何らかの作用を示すか否かについて検討してみた。

この目的のために86匹のマウスを5群に分ち、各群は更にA, Bの subgroup に分つて最初全マウスに表3に掲げたそれぞれの血清を菌感染と同時に1回注射した後、各B群には週2回宛表記の血清注射を反覆した。即ちB群においては血清が一部治療的な意味に用いられた。マウスの感染に用いた結核菌は牛型菌 Ravenel 株であるが、この strain に対しては雑系マウスでも可な

表3 結核感染に及ぼす抗 Cord factor 血清、抗結核血清の影響

群	使用マウス数	感染菌量mg	使用家兎血清	死亡数	死亡率%	体重減少率*	ET ₅₀ (95%信頼限界)** 日
1 A	11	1.0	抗 Cord factor 血清	11	100	-15.1	17 (14.7—19.7)
1 B	11	1.0		11	100	-15.1	16 (13.6—18.9)
2 A	9	1.0	結核家兎血清	9	100	-17.0	17 (15.5—18.6)
2 B	7	1.0		7	100	-24.8	15 (13.2—17.1)
3 A	10	1.0	抗豚血清	10	100	-11.3	17 (14.5—19.9)
3 B	8	1.0		8	100	-13.9	18 (16.1—20.2)
4 A	9	1.0	正常家兎血清	9	100	-13.6	17 (14.4—20.0)
4 B	9	1.0		9	100	-14.1	18.5 (16.8—20.4)
5	12	1.0	—	12	100	-12.7	18 (16.4—19.8)

註：* 感染2週後に測定、** Litchfield の方法により測定。

りの感受性を示し、感染菌量として1mgを用いれば満足すべき均等な死亡分布が得られる事を既に教室の信太¹⁴⁾が発表している。感染マウスはすべて Litchfield¹⁵⁾の方法によつて median effective time (ET₅₀) を算出したが表3はその実験結果を纏めたものである。

表から明らかな様に、実験に用いた5群のマウスはどれも100%死亡し、特に抗 cord factor 血清及び結核血清が結核感染からマウスを保護すると云うような成績は全く認められなかつた。のみならず抗 cord factor 血清又は結核血清の反復注射は、かえつてマウスの生存期間を短縮するように思われた。即ち血清を与えないか又は正常血清を注射した対照マウスの median survival time が平均して18日であるのに対し、抗 cord factor 血清を反復注射した1B群はこれが16日、結核血清を反復注射した2B群は15日と平均生存日数が明らかに短縮するのを認めた。特に後者においては生存期間が短かつたばかりでなく、体重減少率も他の群に比し著しく高度であつた。

3. Cord factor のアレルギー賦与能力について

Cord factor によつて感作された動物が結核動物のようにツベルクリン・アレルギーを示すか否かを知らんとして、この実験に用いた抗 cord factor 血清採取家兎及び対照家兎全部に対しツベルクリン反応を検査した。即ち10倍、100倍及び1000倍の3段階に希釈した旧ツベルクリンを型の如く家兎の皮内に注射し、24時間後及び48時間後に接種局所の反応を調べた。その結果は、表を省略したが、陽性と思われる成績を示したものは予め仲野株死菌で免疫された家兎を除き1例も無かつた。従つてこの成績に関する限り、cord factor にはアレルギー賦与能力がないように思われる。

尚ツ反応と平行して cord factor に対する皮膚反応も同時に調べた。この場合 0.1mg の cord factor を propylene glycol に溶解して注射したが、被検家兎はすべて注射局所に発赤及び腫脹を示した。然し反応の程度において免疫動物と対照動物との間に全く差を認めなかつたから、この反応はアレルギー性の反応ではなく、cord factor の毒性によるものと考えられる。

考 察

結核菌の表わす種々なる複雑な生物学的作用と、この菌が多量に含有している脂質との間に、何らかの関係がある事は以前より注目されていたが、1950年 Bloch によつて分離された毒性を有する lipid、即ち彼の所謂 cord factor は、結核菌の毒力と直接のつながりを持つ物質と

して結核の研究分野に大きな反響を呼んだ。この物質の化学的性状に関しては、その後 Bloch をはじめとする多数の研究が行われ、現在までに判明した所では分子量約2850の、trehalose を含む mycolate であるとされている。然しこの物質の示す免疫学的な性状に関しては、先にも述べた如く、いまだに極めて僅かの研究に接し得るに過ぎない。故に著者は cord factor の諸性状を主として免疫学的な観点から研究して行き度いと考え、(i) in vitro における cord factor の抗原性、(ii) 結核の感染経過に及ぼす cord factor の影響、(iii) 抗 cord factor 血清のもつ免疫学的な作用、並びに cord factor のアレルギー賦与能力、等について追求して見た。(i)、(ii)に関してはそれぞれ本研究の第3報及び第4報に述べることにし、本報においては主として抗 cord factor 血清が cord factor の毒性に対し抑制的な働きを持つていか否かについて検討を加えて見たいと思う。

本研究に用いられた cord factor は、その 0.1mg の腹腔内反復注射によつて、3乃至9回注射までは被検マウスの100%を致死せしめるだけの毒力を有するものであつたが、今回の実験により、抗 cord factor 血清の同時投与はこの物質の毒性を著明に減少せしめるものである事が明らかになつた。即ち抗 cord factor 血清の少量(0.01~0.025ml)を cord factor に混じて与えることにより、マウスは cord factor の反復投与に対してある程度の抵抗を示し、表1に見る如く、20匹中僅か6匹の死亡、即ち33%の死亡率が見られたに過ぎなかつた。生き残つたマウスは病理学的に見て殆んど所見なく、対照血清注射群の死亡率との差も推計学的に有効であつた事から見て、著者の用いた抗 cord factor 血清に cord factor の毒作用を低下せしめる作用のある事は疑いない所と思われる。然しその作用が毒素に対する抗毒素の如く、cord factor の毒性を直接中和するものであるか否かは未だ不明であり、真の作用機序については今後の研究に俟つべきものと考えられる。cord factor を結核菌の持つ一種の毒素であると考えれば、これに対する抗毒素的な性格を示しても敢て不思議ではないが、cord factor 自体が結核菌の毒力を代表するものであるか否かについて意見の一致を見ていない今日、こゝではその機序について深く立ち入ることを控えたいと思う。

但し抗 cord factor 血清の作用は Virus 性疾患における中和抗体の作用とは本質的に異なるように思われる。何となれば、前述の如く、抗 cord factor 血清には結核菌の菌力を低下せしめるような働きは全く認められなかつたからである。然し抗 cord factor 血清が cord factor

の毒性に対し抑制的な効果を持つと云う著者の実験成績は、その機転が何であるにせよ、これまで全く報告されていない事実であるだけに興味あるものと考えられる。尚この実験において抗 cord factor 血清は cord factor の毒性を完全には消失せしめていないが、それが質的な理由によるものであるか量的な理由によるものであるかについては、更に研究を要するものと思う。

以上の如き cord factor に対する拮抗的な作用は、仲野株死菌を以て免疫した家兎血清(表1における結核血清)にもまた認められた。結核菌はその構成成分中に cord factor を含むものであるから、結核血清にかゝる作用のある事は当然期待し得られる所である。然し実験終了時に生き残ったマウスを屠殺して肉眼的に検査した所見によれば、抗 cord factor 血清注射群には殆んど所見がなかったのに反し、結核血清注射群には他の対照群に見られた所見と余り変らぬ程度の顕著な肺出血と腹膜炎様症状が constant に認められた。その割に後者の群の死亡率や体重減少率が低かつたのは奇異に感ぜられた点であるが、今後更に検討して見なければその理由について判断を下し得ない。なお、われわれの経験上、cord factor は一般に流動パラフィンに溶解するより propylene glycol に溶解した時の方が幾分毒性が弱いようであり、これに血清(正常血清でも)を加えた時には更にその毒性が低下するように思われた。これは血清そのものがある程度マウスに対し抵抗を与える為か、あるいは血清の膠質状態が何らかの保護作用を持っている為か不明であるが、この点については尚検討の余地があると思われる。

以上述べた如く抗 cord factor 血清並びに結核血清は、cord factor の毒性に対して拮抗的な作用を示したのであるが、一方においてこれらの血清が結核菌の感染に対し全く無力であつた事は注目されなければならない。両血清は結核の経過を少しも好転せしめなかつたばかりでなく、むしろこれら血清の反復注射は動物に対し有害な働きを示す結果となつた。即ち表1に見る如く、それぞれ抗 cord factor 血清及び結核血清の反復注射を受けた第1群B、及び第2群Bのマウスは対照群よりもかえつて早期に死んでいる。然し同様な成績は既にわれわれの教室において観察されており、石山¹⁰⁾は孵化鶏卵を用いての実験において、結核菌と免疫血清とのある割合の混合は、免疫血清を加えない場合より却つて卵の死亡を早める事を報告している。わが教室の見解に従えば、この事実は本来合目的たるべき抗原抗体反応が、この場合アレルギーと云う不測の表現を取つたものとして説明

されている。この実験に見られた上記の有害作用も同様にして説明し得ると考えるが、これについて詳細に論ずることは本論文の目的でないで別の機会に譲り度い。

翻つて考えるに、結核における免疫の本態は体液性の抗体に求むべきものではなく、組織性のものに帰せらるべきである事は一般的な通念となつてゐる。又結核のみならず他の如何なる細菌性疾患においても、免疫血清が菌感染に対し阻止的な効果を及ぼすのは極めて例外的な場合に限られている。かく見れば仲野株死菌免疫血清乃至は抗 cord factor 血清が結核菌感染に対し全く阻止的な効果を示さなかつたとしても何ら異とするに足りない。

然しながら抗 cord factor 血清が cord factor の毒性を低下せしむる能力を有する事と菌の毒力を低下せしむる能力を有しない事を併せ考えるならば、cord factor の生物学的な意義、ひいては結核菌の毒力を解明して行く上に、今後研究さるべき問題が幾多残されている事を誰しも感ずるであらう。

結 論

1) 家兎を免疫して得た抗 cord factor 血清は cord factor の毒性を低下せしむる作用を有する。かゝる毒性低下はマウスの死亡率が著明に減少することによつて示された。

2) 然しこの血清は、結核菌の感染に対しては何ら阻止作用を示さない。

3) cord factor は家兎に対してアレルギーを賦与しない。

稿を終るに当り、終始御指導、御校閲を賜つた大原教授並びに御協力を頂いた本研究所化学部関川講師に深謝する。尚本論文の要旨は第30回日本細菌学会総会(千葉)において述べた。

引用文献

- 1) Choucroun, N.: Am. Rev. Tuberc., 56, 203, 1947.
- 2) Spitznagel, J. K. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 101, 291, 1955.
- 3) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91, 197, 1950.
- 4) Sorkin, E., Erlenmeyer, H. & Bloch, H.: Nature, 170, 124, 1952.
- 5) Block, H., Sorkin, E. & Erlenmeyer, H.: Am. Rev. Tuberc., 67(5), 629, 1953.
- 6) Noll, H. & Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67(6), 828, 1953.
- 7) Asselineau, J., Bloch, H. & Lederer, E.: Am. Rev. Tuberc. 67(6), 853, 1953.

- 8) Bloch, H. & Noll, H. : J. Exp. Med., 97, 1, 1953.
- 9) Noll, H. Bloch, H. : J. Biol. Chem., 214, 251, 1955.
- 10) Bloch, H. & Noll, H. : Brit. J. Exp. Path., 36, 8, 1955.
- 11) Noll, H. & Bloch, H., Asselineau, J. & Lederer, E. : Biochim. Biophys. Acta, 20, 299, 1956.
- 12) Gendre, T. & Lederer, E. : Bull. Soc. Chim. France, 1478, 1956.
- 13) 新明美仁・関川勲 : 日本細菌学雑誌に投稿予定.
- 14) 信太隆夫・平野五郎・石山司浪 : 結核の研究, 第7集, 32, 1957.
- 15) Litchfield, J. T. : J. Pharmacol & Exp. Therap., 97, 399, 1949.
- 16) 石山司浪・大原達 : 結核, 32(特別号), 72, 1957.