

京 都 大 学

結 核 研 究 所 紀 要

第 9 卷 第 1 号

原 著

結核免疫における血清蛋白の意義

[第1報] Ring 法による検討

京都大学結核研究所第5部 (主任 教授 辻 周介)

辻 (旧姓 武岡) 純 子

辻、大島及び武岡¹⁾は、かつて *in vitro* において血清の結核菌発育に及ぼす影響を分析する一新培養法を考案し之を“Ring 法”と名付けると共に、此方法を用いて H37Rv 生菌、加熱死菌牛 RM 菌流パラ浮游液、及び BCG 生菌の夫々による免疫家兎に於ける血清の意義を検討し報告した。その結果によると、免疫家兎血清は毒力人型菌に対し一定の発育抑制力を有し、且つ食塩水稀釈血清培地での培養成績から考えると、この血清の結核菌発育抑制作用の原因の一つに、正常血清の有する結核菌発育促進力が免疫時に低下することにあることが想像された。併し、免疫に対して、結核菌発育抑制作用が増加する可能性も全く除外は出来ないと考えた。

こゝには、更に其後に行つた追加実験の結果を報告する。

実験材料及び方法

Ring 法の手技其他の詳細については、原著に譲り、こゝにはその原理のみを述べる。

本法は次の2つの原理から成立つている。(1) 血清を含む培地を2日目毎に新たに交換することにより、可及的新鮮な血清が常に結核菌に作用し得る如く工夫

した事。(2) 培地を次の2種に作成したこと。即ち、一方は血清を生塩水で稀釈したものと、他方血清を Kirchner の原液で稀釈したものとを作成し、前者によって、血清の菌発育促進作用を、後者によって、血清の菌発育抑制作用を観察し得る如く工夫したのである。

正常の家兎、モルモット、人間及びラットの血清を用いて、之等の動物の結核に対する自然抵抗力としての血清の作用を観察し、免疫動物としては、家兎及びモルモットを用いた。

実 験 結 果

(1) 流パラ浮游加熱死菌 H37Rv による家兎の免疫実験

前報に於て、流パラ浮游加熱死菌牛 RM 株は大量に用うるならば、只1回だけの筋肉内注射によつても家兎血清中に著明な結核菌発育抑制作用を出現せしめ得ることを報告した。

今回の実験では、死菌の比較的少量を2回乃至数回注射して免疫を行つた。

体重約 2.5kg の家兎 8 匹を 4 群に分ち、第 1 群は 10mg H37Rv 死菌を 2 週間隔に 2 回、第 2 群は同じ菌及び菌量を 1 週おきに 4 回、第 3 群は同じ菌 50mg を 2 週間隔に 2 回、第 4 群は同

じ菌 100mg を 2 週間隔に 2 回接種した。

最終接種後 4 週後に、心穿刺により採血し遠心して血清を分離した。この血清を用いて行った Ring 法の成績は、第 1 表に示す如くである。

第 1 表の成績から、第 3 及び第 4 群 (50mg 及び 100mg 接種群) では、明らかに血清中の菌発育促進作用の低下を証明し得たのであるが、第 1 及び第 2 群の如き少量接種群では、対照無処置の動物と殆ど差異がないことが判る。即ち、血清の菌発育抑制作用は、十分に免疫処置が行われた時にのみ著明となるものであること及び免疫血清の菌発育抑制力という現象は、本態的には正常血清中に存在した菌発育促進作用が免疫時に低下するためであることが分つた。

(2) 流パラ浮游加熱死菌 H37Rv による
モルモットの免疫実験

約 600g のモルモット 20 匹を用い、このうち 15 匹を 10mg H37Rv 死菌を 1 週おき 2 回接種して免疫し、最終接種後 3 週後に採血した。採血

時動物はすべてツベルクリン陽性反応を呈していた。これらの血清を混合して、Ring 法によつて H37Rv 菌の発育に対する影響を検した結果が第 2 表である。

表に示す如く、正常血清中では、生塩水稀釈培地でも又 Kirchner 稀釈培地でも、H37Rv 菌はよく発育するに対し、免疫血清中では、Kirchner 稀釈培地中では良好な発育を見るが、生塩水培地中では全く発育が阻止されている。

この結果は、正常モルモット血清中に存する菌発育促進作用が免疫血清では低下していることを示すものである。且つ、免疫の場合に予想される如き菌発育抑制作用の増強は検証されなかつたのである。之等の点は、家兎の実験の場合と全く同様である。

(3) H37Ra 菌を用いての培養実験

既往の Ring 法による実験では被検菌としては通常 H37Rv 菌を用いて来たのであるが、H37Rv 菌は毒力が強く、そのため免疫血清中に菌発育抑制作用の増強を認めないことが、H37Rv

第 1 表

Results Obtained by the Ring Method Using Sera of Rabbits Immunized with Heat-Killed H37Rv Vaccine Suspended in Paraffin Oil

Quantity of vaccine	Growth of H37Rv Strain	
	Medium diluted with saline	Medium diluted with Kirchner's liquid
4 times 10 mg	++	+++
2 times 10 mg	++	+++
2 times 50 mg	-	+++
2 times 100 mg	-	+++
Control	++	+++

第 2 表

Results Obtained by the Ring Method Using Sera of Guinea Pigs Immunized with Heat-Killed H37Rv Vaccine Suspended in Paraffin Oil

		Growth of H37Rv Strain	
		Medium diluted with saline	Medium diluted with Kirchner's liquid
Immunized guinea pig		-	++
Control	Normal guinea pig	++	+++
	Normal rabbit	++	+++

菌の持つ動物体液中での発育能力の強すぎる故であり、もしもつと毒力の弱い菌株を用いて検するならば免疫血清の発育阻止作用を証明し得るかも知れないという疑問が残るのである。そこで通常無毒菌と呼ばれる H37Ra 株を被検菌として本実験を行った。

免疫処置は第3表に示す如き4種の群に行い、其他は既述の手順に従つて Ring 培養を行った。表に示される如く、流パラ浮游加熱死菌 H37Rv 10mg 2回免疫群は全く対照無処置群と差異がない。他のより強力に免疫された群では、生塩水稀釈培地中で血清の菌発育促進作用の著明な低下が認められたのに対し、Kirchner 稀釈培地中での菌発育抑制作用の増強は証明出来なかつた。

同様の実験結果は、モルモットを用いても証明された。モルモットを流パラ浮游加熱死菌 H37Rv 10mg を以て隔週2回免疫し、3週後に

ツベルクリン陽転するのを見て採血した。Ring 法による実験結果は、第4表に示す。生塩水稀釈培地中での H37Ra 株の発育は完全に阻止されているが、Kirchner 稀釈培地中では対照と全く差異がなかつた。

(4) 種々の菌株及び動物を用いての実験

既報の如く、Chamber 法を用いての in vivo の実験結果では、各種動物体液中での各種の菌株の初期の増殖は、用いた菌株の動物に対する毒力によく平行することが分つている。同様の関係が Ring 法による in vitro の実験によつても認められるかどうかを検したのがこの実験である。

家兎、モルモット、健康人及びラットを用い、菌株としては、H37Rv、H37Ra、鳥京株、BCG 及び Myco. 607 の各株を用いた。結果は第5表に示す。

こゝに用いたすべての菌株が家兎血清の生塩

第 3 表

Growth of H37Ra Strain Demonstrated by the Ring Method Using Sera of Rabbits Immunized with Heat-Killed H37Rv Vaccine Suspended in Paraffin Oil

Quantity of vaccine	Growth of H37Ra Strain	
	Medium diluted with saline	Medium diluted with Kirchner's liquid
4 times 10 mg (at 1 weeks interval)	—	++
2 times 10 mg (at 2 weeks interval)	++	++
2 times 50 mg (at 2 weeks interval)	—	++
2 times 100 mg (at 2 weeks interval)	—	++
Control	++	++

第 4 表

Growth of H37Ra Strain Demonstrated by the Ring Method Using Sera of Guinea Pigs Immunized with Heat-Killed H37Rv Vaccine Suspended in Paraffin Oil

	Growth of H37Ra Strain	
	Medium diluted with saline	Medium diluted with Kirchner's liquid
Immunized guinea pig	—	++
Control	Normal guinea pig	++
	Normal rabbit	++

第 5 表

Growth of Various Strains of Mycobacteria Demonstrated by the Ring Method Using Sera of Various Species of Animals

Strain of test bacterium	Animal species	Medium diluted with saline				Medium diluted with Kirchner's liquid			
		Rabbit	Guinea pig	Human being	Rat	Rabbit	Guinea pig	Human being	Rat
H37Rv		++	++	++	+	+++	++	++	+++
H37Ra		+			+	++			++
Avian Cho-Kyo		+++	++	+	+++	+++	++	+++	+++
BCG		+				++			
Myco. 607		++				++			

水稀釈及び Kirchner 稀釈培地のいずれにおいてもよく発育することは表示の如くであるが、毒力の差異に応じて発育程度にも幾分有意義の差異がある様にも思われる。併し、非病原性菌である Myco. 607 が良く発育し得る事実から考えると、かゝる in vitro での発育程度の差を菌の毒力と関連せしめることの無理なことは明らかである。

結局のところ、Ring法を用いて菌株の毒力を比較することは適当ではないと言う可きであろう。

考 按

既往の諸実験及び今回の実験結果から、家兎及びモルモットを種々の方法によつて十分に免疫した場合には、血清は人型菌の発育を抑制するようになることは明らかである。且つ、この菌発育の低下の原因が、免疫によつて特別な菌発育阻止作用が血清に発生したのではなく、正常にも存在する血清の菌発育促進作用が免疫によつて低下した結果、菌発育抑制作用として現われたものであることも亦明らかに証明出来た。この事実から考えると、免疫時に起る血清抗体の出現又は増加ということは、結核に対する体液性免疫には大して関与していないと考えられる。

併し、実験方法の点からはいづらか問題は残っている。殊に、Ring 法の様な in vitro の実験方法では、培地の pH の変化が非常に重大な結果を招来すると考えられる。併し、今回の我々の実験では、免疫血清と非処置正常血清との

間には問題視する程の pH の差異は存在しないことを確めてあるから、此点については疑問がない。

免疫血清に結核菌発育阻止作用が存在するかしないかに関しては、全く矛盾した多くの研究発表^{2)~9)}がある。併し一般には免疫血清にかゝる作用のある事を否定する見方がつよい。この故に、一般には所謂「液性免疫」なるものは結核症には存在しないと考えられているのである。今回の実験結果は、この一般的な考え方に反して、免疫血清は免疫状態が充分であれば、抗結核菌作用を具有することを明らかに証明したものであつて、現象的には免疫動物に液性免疫が存在するかの如く見えるのである。併し、事實は、結核菌発育阻止作用が発生したのではなく、結核菌発育増進作用が低下したに過ぎないのである。従つて、抗体の役目を全く重視するためには更に細かい分析を必要とするにしても、上述の免疫血清に関する現象を真の「免疫」と呼ぶよりも「獲得性抵抗力」と呼ぶ方が事實にふさわしいことが結論出来るであろう。

結 論

所謂 Ring 法を用いて、生菌又は死菌結核ワクチンを以て十分に免疫された家兎の血清には著明な抗結核菌作用が出現することを明らかに証明した。且つ、この抗菌作用は正常血清に存在する菌発育促進作用が免疫によつて低下した結果に基くことをも証明した。同様の所見は、モ

ルモットによる実験によつても確かめられた。Ring 法はこの様に、血清の結核菌に対する影響を観察するに便な方法ではあるが、この方法を用いて動物の各種ミコバクテリアに対する自然抵抗力の差を観察することは出来なかつた。

文 献

- 1) Tsuji, S. Oshima, S. and Takeoka, A. : Am. Rev. Tuberc. **77**: 524, 1958.
- 2) Pagel, W. : Tubercle **16**: 256, 1935.
- 3) Kallos, P. and Nathan, E. : Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **76** : 343, 1932.
- 4) 伊藤種次郎 : 結核 第8巻 291頁 昭5.
- 5) 洪川隆曹 : 結核 第8巻 523頁 昭5.
- 6) Myrvik, Q. and Weisser, R.S. : Am. Rev. Tuberc. **64** : 669, 1951.
- 7) Lurie, M. B. : Am. J. Path. **11** : 850, 1935.
- 8) Nagel, A. and Fenker, M. : Zentralbl. f. Bakt. **144** : 350, 1939.
- 9) Kirchner, O. : Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. Exper. Therap. **74** : 56, 1932.