

結核菌より分離抽出せる特異抗原性物質溶液による皮内 反応に関する研究 (I)

力 價 の 検 討

日本医科大学皮膚科教室(指導 丸山千里教授)

飯 田 康 衛

I 緒 言

わが教室において、従来一般に難治の疾患とされてきた皮膚結核に対し、人型結核菌の菌体より分離抽出せる特異抗原性物質溶液を以て、特異ワクチン療法が試みられてより早くも6カ年を経過した。この間、ワクチン調製方法、注射量、注射方法等の吟味に関し不撓の努力が続けられた結果、極めて良好な治療成績が収められ、その成績は既に丸山によつて報告せられた。

然し乍ら、皮膚結核患者の病型、病勢は各人各様であつて治療の難易また千差万別である。他方、ワクチン療法では劃一的な注射量を規定することができず、従て、病状に細心の注意を怠らず治療を実施するに非れば、寧ろ病勢を悪化せしめる危険が極めて多い。かかる危険をより少くするためには、臨床実験に並行して基礎的実験をも逐次実施し、抗原性物質の本態を正確に把握する必要がある。余は今回、該物質溶液を以て皮内反応を実施し興味ある成績を取めたので、その大要を報告する。

II 抗原調製方法(ワクチンA抽出法)

人型結核菌青山株の液体培養を濾別し、液体成分をすて、菌体のみを蒸留水に浮遊させ、水浴中で加熱(100°C 120分)し、菌体成分を充分浸出せしめる。次で、遠心沈澱を行い、沈澱をすて、上清をベルケフェルト濾過管で濾過し、この濾液に0.85%の比に食塩および3倍量の冷無水アルコールを加え、生ずる沈澱物質を遠心分離して、これに蒸留水を加え更に0.85%の比に食塩を、0.5%の比に石炭酸を加えて、本物質の1%溶液をつくり、これを原液として必要に応じ適宜に稀釈する。

該抽出物質は i) 含水炭素劃分(主として多糖類)を主とし、更に蛋白質劃分をも含有する(第1表)。ii) 健康動物(家兎、モルモット、マウス)並に結核動物(モルモット)に対し殆ど毒性を示さない。iii) 又本物質を以て免疫せる家兎血清中には補体結合性抗体を証明する。

iv) ツ・アレルギー賦与能力は証明できない。

第 1 表

反 応	成 績
Ninhydrin	±
Biuret	±
Millon	±
Xanthoprotein	+
Sulfosalicyls.	+
Trichloressigs.	+
Nylander	-
Molisch	卅

III 実験方法

2000倍稀釈標準旧ツ液を対照としてワクチンAの力価を検討することとした。被検者の前膊屈側中央に抗原0.1ccを皮内注射し、次で他側の前膊対称位置に2000倍稀釈旧ツ液0.1ccを皮内注射した。観察は注射後24時間と48時間の2回に亘り行い、成績の判定は学振法に準じた。発赤の大きさの比較には縦径と横径の算術平均値を以てし、二重発赤では外発赤の大きさをとつた。硬結は主としてその有無を検し、大きさが明瞭な場合には計測を行つた。なお、被検者には既往にBCG接種経験なき者を択んだ。

IV 実験成績

1) 特異抗原性物質溶液の5000倍、10000倍、25000倍各稀釈液の検討

特異抗原性物質溶液(以下ワクチンAと略記)の幾倍稀釈液が、2000倍稀釈旧ツ液(以下ツ液と略記)の力価に匹敵するかの大略の見当を知るために、外来患者41名につき右前膊にワクチンA、左前膊にツ液を皮内注射した。

5000倍液に就て(12名) : 24時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 24.3 mm, ツ液 20.8 mm。硬結触知数 ワクチンA 9例, ツ液 5例。二重発赤数とも に 4例。水泡形成数 ワクチンA 3例, ツ液なし。48時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 29.7 mm, ツ液 13.2 mm。硬結触知数 ワクチンA 8例, ツ液 2例。二重発赤数 ワクチンA 4例, ツ液 1例。水泡形成数 ワクチンA 3例, ツ液なし。

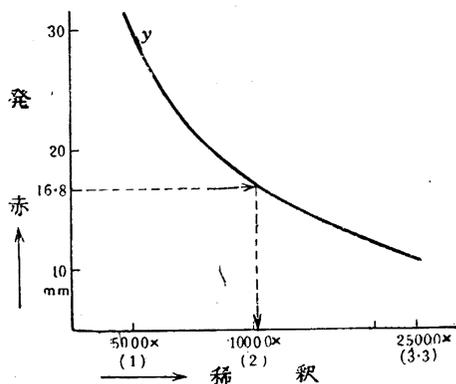
10000 倍液に就て(13名) : 24時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 16.7 mm, ツ液 18.4 mm。硬結触知数 ワクチン A 10 例, ツ液 8 例。二重発赤数とも に 2 例。48 時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 17.2 mm, ツ液 17.2 mm。硬結触知数 ワクチンA 10例, ツ液 8 例。二重発赤数 ワクチンA 2 例, ツ液 1 例。

25000 倍液に就て (16名) : 24時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 10.9 mm, ツ液 16.6 mm。硬結触知数 ワクチンA 5例, ツ液 10 例。二重発赤数 ワクチン A 1例, ツ液 5 例。48時間値一発赤の大きさの平均 ワクチンA 10.5 mm, ツ液 19.3 mm。硬結触知数 ワクチンA 5 例, ツ液 7 例。二重発赤数 ワクチンA 1 例, ツ液 5 例。

いま、ワクチンAの各稀釈液による発赤の大きさの平均値(48時間値)から、濃度と発赤の大きさの関係を表わす傾向線yを図示して、対照のツ反応の発赤の大きさ

の平均値 16.8 mm に対応するワクチンAの近似濃度をみると、約 10000 倍稀釈であることが分る(第1図)。

第1図 ワクチンAの各稀釈液による発赤とツ反応の発赤の大きさの関係



又、硬結触知数、二重発赤数、水泡形成数等を比較検討するも、ワクチンAの 5000 倍液はツ反応に比し反応強きものの如く、10000 倍液はほぼ相一致し、25000 倍液はツ反応に比し反応弱きものの如く考えられる。この関係は第2表に挙げた数例の測定成績によつてよく了解される。

第 2 表

番号	年齢	性別	稀釈	24 時 間		48 時 間	
				ワクチンA	ツ	ワクチンA	ツ
12	19	♀	25000 X	$\frac{-}{9 \times 6(21 \times 20)}$	$\frac{-}{7 \times 7(30 \times 25)}$	$\frac{-}{25 \times 17}$	$\frac{20 \times 20}{20 \times 20(50 \times 40)}$
20	23	♂		$\frac{-}{6 \times 6}$	$\frac{+}{12 \times 12}$	$\frac{-}{4 \times 4}$	$\frac{+}{13 \times 13}$
1	22	♀	10000 X	$\frac{-}{4 \times 4}$	$\frac{-}{6 \times 5}$	$\frac{-}{0}$	$\frac{-}{0}$
4	34	♂		$\frac{+}{17 \times 16}$	$\frac{+}{22 \times 18}$	$\frac{11 \times 9}{14 \times 13}$	$\frac{10 \times 10}{14 \times 10}$
24	25	♂	5000 X	$\frac{+}{11 \times 11(21 \times 18)}$	$\frac{+}{10 \times 7}$	$\frac{+}{14 \times 13}$	$\frac{-}{7 \times 6}$
32	17	♀		$\frac{+}{20 \times 20}$	$\frac{-}{30 \times 27}$	$\frac{14 \times 14}{14 \times 14(49 \times 39)}$	$\frac{-}{14 \times 14}$

2) 特異抗原性物質溶液の 7000 倍、8000 倍、9000 倍、10000 各稀釈液の検討

前項の実験成績にもとずき、更にワクチンAとツ液との間における力価の関連を詳細に追求するため、上記の如くワクチンAの4種の稀釈液を調製し、川崎市内某会

社従業員 211 名につき、ツ反応との比較実験を実施した。

注射方法—ワクチンAの 7000 倍液と 9000 倍液は左側前膊に、ツ液を右側前膊に、ワクチンAの 8000 倍液と 10000 倍液は右側前膊に、ツ液を左側前膊に夫々皮内注射した。

第3表 ワクチンA各稀釈液による発赤の度数分布

発赤mm	0-4	5-9	10-20	21-54	55-	硬結	二重発赤	合計
反応原								
ワクチンA 7000×	0	7	26	21	1	26	19	55
ツ	7	2	31	13	2	12	16	55

発赤mm	0-4	5-9	10-20	21-54	55-	硬結	二重発赤	合計
反応原								
ワクチンA 8000×	0	6	20	25	0	24	15	53
ツ	7	0	29	13	4	11	17	53

発赤mm	0-4	5-9	10-20	21-54	55-	硬結	二重発赤	合計
反応原								
ワクチンA 9000×	0	9	34	7	0	31	3	50
ツ	1	3	36	9	1	25	6	50

発赤mm	0-4	5-9	10-20	21-54	55-	硬結	二重発赤	合計
反応原								
ワクチンA 10000×	1	6	35	11	0	35	8	53
ツ	2	1	36	13	1	30	12	53

以下注射後 48 時間における測定成績のみについて検討する。

i 発赤の度数分布

第3表に示す如く、9000 倍液と 10000 倍液では陽性或の度数分布がよくツ反応に並行しているが、7000倍液と 8000 倍液では 10~20 mm, 21~54 mm 各級間の頻度がツ反応と喰い違つており、反応度がツ反応に比較して強いことを思わせる。疑陽性域は各群ともワクチンAの頻度多く、陰性域は各群ともツ反応の頻度が多い。これは、9000 倍液と 10000 倍液ではツ反応陽性者が疑陽

性を示すことがあり、7000 倍液と 8000 倍液ではツ反応陰性者が疑陽性を示すことがあるものと考えたい。

硬結触知数はワクチンAの9000 倍液と 10000 倍液ではツ反応と大差なく、7000 倍液と 8000 倍液ではツ反応の2倍以上を示した。二重発赤数は各群ともツ反応と大差がない。

陽性率は第4表に示す如く、ワクチンAの7000 倍液と 8000 倍液は対照のツ反応と可成りよく一致した。然し9000 倍液と 10000 倍液はツ反応に比較して約8~10%低い。

第4表 ワクチンA各稀釈液による反応の陽性率

稀釈	7000 ×	8000 ×	9000 ×	10000 ×
反応原				
ワクチンA 陽性率	87.27%±4.49	83.03%±5.16	82.00%±5.43	86.79%±4.65
ツ 陽性率	83.64%±4.49	86.79%±4.65	92.00%±3.84	94.34%±3.17
$\frac{x}{o}$	0.54	0.54	1.50	1.34
P	0.5892	0.5892	0.1336	0.1802

ii 発赤曲線

上記4群において、ワクチンAの各稀釈液による発赤

の大きさの傾向線(y)と、対照のツ反応の発赤の大きさの傾向線(y')を最小自乗法によつて決定すれば

$$y = 2.3x + 20.6$$

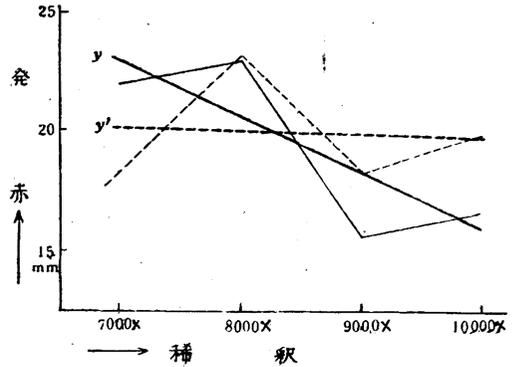
$$y' = 0.07x + 19.9$$

で、これらの2直線の交点は、ワクチンAの約 8300 倍稀釈に相当する(第2図)。傾向線を拋物線によつて決定すると、2曲線の交点はワクチンAの約 8000 倍稀釈に相当する。

iii 反応度

上記4群において、両反応の発赤の大きさの差 5 mm を標準にして、反応度の一致又は強弱を決定し、これを集計すると第5表の如くであつて、一致率はワクチンAの 9000 倍液が最高を示し、10000 倍液がこれに次ぎ、7000 倍液と 8000 倍液とは 50% に満たない。反応度の強弱

第2図 ワクチンAの各稀釈液による発赤とツ反応の発赤の大きさの関係



第5表 ワクチンA各稀釈液による反応とツ反応の反応度の比較

反応度	7000 ×		8000 ×		9000 ×		10000 ×	
	例数	百分率	例数	百分率	例数	百分率	例数	百分率
ワクチンA > ツ	20/55	36.36 ± 6.49	15/53	28.30 ± 6.19	3/50	6.00 ± 3.36	6/53	11.32 ± 4.35
ワクチンA = ツ	27/55	49.09 ± 6.74	22/53	41.50 ± 6.77	34/50	68.00 ± 6.59	31/53	58.49 ± 6.77
ワクチンA < ツ	8/55	14.55 ± 4.75	16/53	30.20 ± 6.21	13/50	26.00 ± 6.16	16/53	30.19 ± 6.21
$\frac{x}{\sigma}$		2.71		0.22		2.85		2.49
P		0.0068		0.8258		0.0044		0.0128

に差異を認めた例数の比では、ワクチンAの 8000 倍液が最小であつて、これを交点として強弱例数の関連が交又する状態は発赤曲線の場合と同型である。

iv 反応域の喰い違い

ワクチンAの稀釈度を無視して、全被検例 221 例につき、ツ反応との喰い違いを調べると、ツ反応陰性でワクチンAの反応疑陽性 9 例、陽性 5 例。この合計 14 例中 7000 倍液群に 7 例、8000 倍液群に 5 例が含まれるから、かゝる反応域の喰い違いは 9000 倍液、10000 倍液には少ない。ツ反応陽性でワクチンAの反応疑陽性を示したものの 14 例。この 14 例中 9000 倍液群に 6 例、10000 倍液群に 4 例が含まれるから、かゝる反応域の喰い違いは 7000 倍液、8000 倍液に多い。これらの事実、発赤の度数分布表についての観察で前述せる推測に合致する。

3) 特異抗原性物質溶液の室温保存による力価の変動に関する検討

ワクチンAを稀釈後室温に保存した場合の力価の変動を検討した。これを正確に知る実験を行うことは勿論困難であるが、ワクチンAと同様に室温に保存せられたツ液に力価の変動がないものと仮定して、比較実験を実施

した。

昭和 23. 10. 前項 2) の実験を実施後、ワクチンAの9000 倍液を密封して室温に保存。昭和 24. 5. 該保存液の濁濁していないことを確かめた上、同様に保存せる旧ツ液と共に使用した。

被検者一川崎市内某会社従業員 231 名。内 127 名は右前膊屈側に保存 9000 倍液、左側にツ液、104 名は左前膊屈側に保存 9000 倍液、右側にツ液を夫々皮内注射した。観察は注射後 24 時間および 48 時間に行つた。

i 反応率

両群の測定成績を一括して、各反応率を表示すれば第6表の如くである。

即ち、第4表のワクチンAの 9000 倍液の陽性率 ($\frac{x}{\sigma} = 1.50$) と第6表の保存9000倍液の陽性率 ($\frac{x}{\sigma} = 5.61$) には著しい相違があつて、保存による影響があると疑われる。

疑陽性率は保存 9000 倍液が著しく高率であるが、これはツ反応陽性者中に保存 9000 倍液で疑陽性を示す例があるからである。然しかゝる反応域の喰い違いの傾向

第6表 ワクチンA室温保存による力価の変動(反応率)

時間 反応率	24 時間				48 時間			
	ワクチンA	ツ	$\frac{x}{\sigma}$	P	ワクチンA	ツ	$\frac{x}{\sigma}$	P
陽性率	65.80%±3.12	83.98%±2.41	4.61	< 0.0001	67.97%±3.07	88.31%±2.11	5.61	< 0.0001
疑陽性率	24.68%±2.83	7.36%±1.71	7.69	< 0.0001	22.51%±2.74	2.60%±1.04	6.79	< 0.0001
陰性率	9.52%±1.93	8.66%±1.84	0.32	0.749	9.52%±1.93	9.09%±1.88	0.16	0.68

第7表 ワクチンA室温保存による力価の変動(反応度)

時間 反応度	24 時間		48 時間	
	例数	百分率	例数	百分率
ワクチンA>ツ	5/231	2.16±0.96	5/231	2.60±1.05
ワクチンA=ツ	125/231	54.11±3.28	83/231	40.26±3.13
ワクチンA<ツ	101/231	43.72±3.26	132/231	57.14±3.26
$\frac{x}{\sigma}$	12.2		16.5	
P	< 0.0000		< 0.0000	

は既に前項の実験 2) において指摘せられたのであるから、その原因を総べて保存による影響に帰せしめることはできない。

陰性率は対照ツ反応に殆ど相等しい。

硬結触知数は全被検例 231 例中、保存 9000 倍液 129 例、ツ反応 179 例(48 時間測定)であつて、第3表中のワクチンAの 9000 倍液、10000 倍液の硬結触知数はいずれもツ反応と大差はないのであるから、当然保存による或る程度の影響があつたものと考えられる。

ii 反応度

両反応の反応度の比較成績を一括して第7表に示した。48 時間値の一致率は約 40.26% であつて、第5表の約 68.00% に比べると可成り低率である。ツ反応の反応度の方が強い例数も第5表に比べ増加の傾向が窺われる。

4) 組織学的検索

ワクチンAによる反応にはツ反応に比較して次の如き特徴がみられた。

i 硬結を伴う発赤において、ツ反応では硬結部は扁平な丘疹をなすに反し、ワクチンAによる反応では円錐形に隆起した丘疹がみられる場合が多い。

ii ワクチンAによる強反応者ではツ反応に比し長く癩痕を貽す場合が多い。

以上の事実より、両反応には組織学的に相違があるので

はないかと考え、9000倍液とツ液の注射後 48 時間における反応部位を切除し、フォルマリン固定、ヘマトキシリン・エオジン染色法により標本を作製して鏡検したが、該染色法によつては両反応間に特に挙げるべき差異を見出し得なかつた。他日、他の染色法により更めて検査したいと思う。

V 総括

結核菌の菌体より分離抽出せる特異抗原性物質溶液(ワクチンA)の力価について検討を加えた結果、該溶液の 10000 倍稀釈液の力価はほぼ 2000 倍稀釈標準旧ツ液の力価に匹敵することを知つた。従来、ツ反応実施に際し、ツ液の稀釈度の軽度の差異は陽性率に大なる影響を及ぼさないものとされているので、該溶液の 10000 倍稀釈液を 2000 倍稀釈旧ツ液の代用として使用することは充分可能と考えられる。

然し乍ら、結核菌の菌体より抽出したワクチンAと、結核菌の培養濾液である旧ツ液とは、両者の皮内反応における反応形態にある程度の相違があつて然るべきである。

実験 2) の成績によれば、ワクチンAの 9000 倍液と 10000 倍液による反応では、陽性発赤の度数分布がよく対照のツ反応に並行し、硬結触知数もツ反応との間に著差を認めないが、ツ反応陽性者の一部に疑陽性を示す例

がみられる。

ワクチンAの7000倍液と8000倍液による反応では陽性率においてツ反応に近似するが、陽性発赤の度数分布に交錯がみられ、硬結触知数もツ反応に比較して著しく多く、ツ反応陰性者に疑陽性を示す例がみられる。

従て、ワクチンAの稀釈液において、陽性率をツ反応に一致せしめると硬結触知率が高くなり、硬結触知率をツ反応に一致せしめると陽性率がやや低くなると考えられる。換言すれば、ワクチンAによる反応はツ反応に比較して硬結形成傾向が強いことが分る。

又、発赤の大きさの平均値、反応度等種々なる角度から両反応を比較するとき、総べての比較条件を同時に満足せしめる力価の一致点を求めることは困難と考えられる。

ワクチンAを稀釈後室温に放置した場合の力価の変動状況を検討することは重要であるが、定量的な検定方法がないのでその詳細を知ることは困難である。先ず、対照として使用したツ液につき、その保存と力価に関する先人の見解を求めると、橋本は Parisch, Okell がツ原液は一定期間効価不変なるにかかわらず4000倍液は3ヵ月で40%の効価消失を招くとせる報告を追試し、旧ツ液の10, 100, 1000倍各稀釈液が氷室、室温保存ともに1カ年は効価を持続し得ると報告した。その後岡、水口、相沢、戸田、本間、田川、安井・平野、柳沢等はいずれもツ稀釈液の力価が長期に亘り安定せることを認めた。これに反し、清水は石炭酸を加えざる2000倍ツ液が1年後に、松田は10000倍ツ液が室温保存1週間後に、池尻は無蛋白ツ液が稀釈後室内保存7ヵ月後夫々力価に低下を認めたという。かくの如く必ずしもそれ等の見解は一致をみていないが、無菌的に保存せられる場合には相当期間その力価に殆ど低下が認められないとする見解が現在一般に支持せられているようである。

7ヵ月間室温に保存せられた2000倍稀釈旧ツ液の力

価に変動がなかつたものとの仮定の下に、これを対照にして実施した実験③)の成績によれば、ワクチンAの9000倍液は、室温保存7ヵ月後、陽性率、反応度、硬結触知数等いずれの点より検討するも、その力価に低下を招来せるものと断定したい。従て、ワクチン療法遂行中、注射毎に容器の開口をなすときはこの点一応の考慮を必要とするものと思う。

VI 結 語

人型結核菌の菌体より分離抽出せる特異抗原性物質溶液(ワクチンA)を以て皮内反応を実施し、その力価を検討して次の成績に到達した。

- 1) 2000倍稀釈旧ツ液に比し、該特異抗原性物質溶液の5000倍液の力価は強く、25000倍液の力価は弱く、10000倍液の力価はほぼ相等しい。
- 2) 特異抗原性物質溶液の7000倍液、8000倍液による反応は陽性率においてツ反応(旧ツ2000倍液による)に近似するが、硬結触知数がツ反応に比し著しく多い。
- 3) 特異抗原性物質溶液の9000倍液、10000倍液による反応は硬結触知数においてツ反応に近似するが、陽性率がツ反応に比し低い。
- 4) 特異抗原性物質溶液による反応はツ反応に比し硬結形成傾向強く、両反応原による反応を完全に一致せしめる至適濃度を求めることは困難である。
- 5) 特異抗原性物質溶液の9000倍液は、室温保存7ヵ月後、その力価に低下が認められた。
- 6) 特異抗原性物質溶液による反応とツ反応との間に組織学的の差異を証明し得なかつた。

参 考 文 献

- (1) 丸山：日本医事新報、1228, 440(昭22)
- (2) 橋本：満洲医誌、24, 736(昭11)
- (3) 柳沢：公衆衛生学、479(昭23)

流動パラフィン結核加熱死菌ワクチンの研究

(第一報) 動物実験よりみた毒性に就て

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢謙)

金 井 興 美 志 賀 康 夫
伊 藤 文 子

I 緒 言

結核症の免疫の特長は結核菌が体内に存在している間

のみ成立することであると、生菌ワクチンを主張する Calmette は述べており、これは彼のBCGワクチンの基本的な免疫理論である。