

BCG 乾燥菌体の流動パラフィン抽出液の生物学的性質

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

(昭和 26 年 6 月 20 日受付)

I 緒 言

加熱結核死菌を流動パラフィン(以下「流パラ」と略す)中に浮遊して動物に接種すると、その生理的食塩水浮遊液では起し得ない強い永続的なツベルクリンアレルギーを生ずることは、Couland⁽¹⁾が固形パラフィンを用いた実験に端を発して、Saenz⁽²⁾、Hensel⁽³⁾、Rist⁽⁴⁾、Freund⁽⁵⁾、金光⁽⁶⁾、生沼⁽⁷⁾等多くの研究者達によつて確認され、特に岡等⁽⁸⁾の系統的な研究は、生菌 BCG ワクチンに匹敵し得る動物実験成績を報告しているが、我々も一応その事実を動物実験で追試確認し、且つ人体接種後のそのツベルクリン反応陽転効果についても経験を得たので、成績を「結核」誌上⁽⁹⁾に報告した。

Mudd⁽¹⁰⁾や Reed 及び Rice⁽¹¹⁾の研究によつて明らかである如く、結核菌は水相よりも油相に親和性を有しており、流パラ中に浮遊された結核菌が、この油相を媒介として、生体組織と生物学的に反応し得るか否かをみることは、この流パラ結核死菌ワクチンの作用機序研究の一端として興味ある問題である。すなわちこのワクチン中の菌が生体内で流パラの相から少量ずつ絶えず組織液の水相に移行して、生体に抗原として作用するか、或いは油相への、より強い親和性のため、常に流パラの相に存在しつつ菌体成分を流パラ中に溶解して抗原として働くものか、二様の考え方が可能であろう。Rist⁽⁴⁾は彼の実験より、流パラ死菌ワクチンより菌体を全く除いた濾液には、なん等生物学的作用のないことを報告しているが Hehre⁽¹²⁾は結核菌を含んだ流パラの微少な油滴を水に分散させて、このものが単なる結核菌の水浮遊液と同じく、補体結合反応において同一態度を示したことから、流パラ中に抗原物質の抽出される可能性を暗示した。一方、1939年以後の Choueron 女史の研究^(11, 12, 13, 14)によつて、結核加熱死菌の流パラ抽出液中に抗原性の異なる二種の物質が含まれていることが示され注目を引いている。我々はまず Choueron の方法に準じて BCG の乾燥菌体より流パラ抽出液を作り、このものの毒性、抗原性、感染防禦性について研究し、流パラ死菌ワクチンの作用機序研究の一端とした。

II 実 験

1) BCG 乾燥菌体の流パラ抽出液の製法

ソートン合成液体培地上 37°C 4 週培養 BCG を濾斗上に収穫し、蒸溜水にて濾液が無色となる迄繰返し洗滌

した。後、菌体を濾紙にて吸湿しペトリ皿に移し、37°C のふ卵器で乾燥した。この間、時々菌体を散乱させて乾燥を促進した。約 5 日間で湿潤質量の大約 1/4 となつて、それ以後は殆んど変化はない。この乾燥菌体 20gm を流パラ 100cc に混じて 50°C の電気恒温器中に 48 時間放置し、その間時々攪拌する。次に 4000 R.P.M. で 1 時間遠心沈澱すると、全く透明な薄い上清と半濁状の中間層が菌塊と分離する。上の二層を信量のエーテルで稀釈し、更に 4000 R.P.M. で 1 時間遠心沈澱すると、今後は全く透明なる上清が得られる。沈澱菌体には、もう一度流パラ 50cc 加えて、同一処置で抽出してから遠沈し上清二層を同様エーテルで稀釈遠沈し、全く清澄となつた上清を前の上清に加える。この上清は Berkefeld 型細菌濾過器 N を通すことによつて菌体は全く除かれ、更に減圧でエーテルが除かれた。得られた液は透明な黄色又は橙黄色の粘稠な流動状の液体である。これを実験に供した。

2) 流パラ抽出液の抗原性について

a) 抽出液接種のモルモットに与えるツベルクリンアレルギー

体重 300gm 前後の 33 匹の健康モルモット(10 倍旧ツベルクリンで陰性)を 7 群に分ち、第 I 群(3 匹)は無処置、第 II 群(3 匹)は流パラのみ皮下へ 0.5cc、第 III 群(8 匹)は抽出液 0.1cc を皮内接種、第 IV 群(6 匹)は 10mm × 10mm の十字を下腹部に 3 個乱切し、抽出液を塗布し、第 V 群(4 匹)は抽出液 0.5cc ずつ筋肉内接種し、第 VI 群(4 匹)は抽出液 0.5cc ずつ腹腔内接種し、第 VII 群(5 匹)は生菌 BCG 30mg を皮下接種した。後、各群動物を 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に 100 倍稀釈旧「ツ」で、ツベルクリンアレルギーの発展を追求した。0.1cc 皮内注射後 24 時間の硬結の長短径を mm で測定記載した。成績を第 1 表として総括したが、抽出液 0.1cc の皮内接種の惹起するツベルクリンアレルギーが最も強く、生菌 BCG 30mg 接種に匹敵するのがまず注目される。筋肉内又は腹腔内に 5 倍量の 0.5cc 接種しても、0.1cc の皮内接種に及ばないこと、乱切法によつても抽出液の「ツ」反応陽転効果のみられることは興味がある。又、アレルギー最強の時期が 2、3 ヶ月目になつているが、更に長期観察するため前実験の如く、皮内接種群 2 匹、乱切接種群 2 匹のモルモットを用いて、8 ヶ月にわたつて

第1表 BCG乾燥菌体の流動パラフィン抽出液接種のモルモットに与えるツベルクリンアレルギー(I)

群	処置	動物番号	体重(g)	ツベルクリンアレルギー			
				2週	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
I	抽出液	615	275	0	0	0	0
		675	365	0	0	0	0
		617	320	0	0	0	0
II	抽出液	592	290	0	0	0	0
		67	290	0	0	3x4	d
		68	290	0	0	0	0
III	抽出液	794	300	6x6	9x8	25x22	22x18
		795	300	0	20x18	30x32	18x19
		804	335	9x8	13x14	25x20	15x16
		805	370	10x8	13x15	30x25	23x22
		876	260	7x8	0	12x14	10x12
		877	270	0	7x8	14x14	21x21
		878	235	13x13	13x14	23x25	25x21
		879	245	13x11	4x4	23x23	23x17
IV	抽出液	789	300	9x10	10x10	12x14	18x15
		790	300	6x9	10x9	15x13	16x13
		799	315	10x7	13x12	15x15	14x11
		800	300	8x8	9x11	17x19	11x10
		809	325	10x9	9x6	13x10	3x4
		810	315	3x4	5x5	7x5	6x5
V	抽出液	860	250	11x13	5x6	15x13	6x7
		865	265	17x17	12x13	10x10	7x7
		870	225	7x7	9x8	15x17	17x13
		875	270	d			
VI	抽出液	881	270	0	10x10	10x9	15x17
		883	315	9x9	0	10x13	0
		884	280	0	5x6	12x13	15x12
		885	310	6x5	7x7	7x7	10x9
VII	生菌	866	310	10x11	8x7	25x22	21x19
		867	320	0	13x13	23x22	24x20
		868	300	10x9	7x7	28x23	17x17
		861	275	6x7	6x6	32x25	17x21
		871	305	0	5x5	22x24	18x17

(註) 第1, 2表においてツベルクリンアレルギーは100倍O.T. 0.1cc 皮内接種後24時間判定で反応硬結の長短径を記載した。
d. は死亡

第2表 BCG乾燥菌体の流動パラフィン抽出液接種のモルモットに与えるツベルクリンアレルギー(II)

群	処置	動物番号	体重(g)	ツベルクリンアレルギー								
				1ヶ月	2	3	4	5	6	7	8	
I	抽出液	671	360	4x4	6x6	10x8	0	0	0	0	0	0
		672	400	6x8	13x12	7x9	0	0	0	0	0	0
II	抽出液	676	400	7x8	20x21	22x20	18x19	11x10	6x7 (24x20)	9x9	0	0
		677	380	11x15	19x14	15x12	22x23	14x12	11x10 (23x22)	12x19	12x12	0

「ツ」アレルギーを追求した。第2表に示した成績の如く2~4ヶ月目に最強で、しかも皮内接種では、8ヶ月も存続し得る如くである。

b) Kochの現象より観察した抽出液の抗原性

生菌BCG30mgの皮下接種によつて、前感作されている体重400~550gmのモルモット8匹に健康モルモット1匹を対照として、腹部4ヶ所に動物毎に接種位置を交換しつつ、流パラ抽出液、加熱死菌BCG 1mg/cc 流パラ

浮游液、生菌BCGワクチン1mg/cc蒸留水浮游液及び純流パラをそれぞれ0.1ccを皮内接種し、局所変化を数日おきに観察した。成績を第3表として総括した。すなわち流パラのみでは接種翌日には多少の無発赤の腫脹が局所に見られたが、2日後には殆んどみるべき変化がなかつた。一方抽出液では次第に硬結となり、更に発赤は度を加えて、頂点に痂皮を帯びるようになり、多くの場合更に潰瘍に至つた。しかも興味あることは、加熱死菌BCG 1mg/cc 流パラ浮游液や生菌BCG 1mg/cc液の場合よりも変化のつよく長期続く場合の多いことである。又対照動物においては18日以後から、抽出液及び加熱死菌流パラ浮游液接種局所に発赤硬結を示してきたことは、この時期になつてアレルギーが増強してきて、局所にまだとどまつていた抗原のため Kochの現象を起したものと考えられる。

更に流パラ抽出液によつて感作されたモルモットを用いて同種実験を行い、同様の成績を得た(第4表)。

Kochの現象におけるBCG乾燥菌体の流動パラフィン抽出液の抗原性
第3表 第4表

群別	動物番号	体重(g)	接種回数	Kochの現象					接種後経過	
				2日	6日	12日	18日	25日		
生菌BCG30mgによる前感作動物群	1	430	18x	+	+	+	+	+	I	
			17	-	-	-	-	-	II	
	2	430	12x	+	+	+	+	+	I	
			11	+	+	+	+	+	II	
	3	550	20x	+	+	+	+	+	I	
			18	+	+	+	+	+	II	
	4	480	18x	+	+	+	+	+	I	
			18	+	+	+	+	+	II	
	5	525	18x	+	+	+	+	+	I	
			21	+	+	+	+	+	II	
6	350	11x	+	+	+	+	+	I		
		13	+	+	+	+	+	II		
7	500	15x	+	+	+	+	+	I		
		12	+	+	+	+	+	II		
8	470	5x	+	+	+	+	+	I		
		5	+	+	+	+	+	II		
対照群	9	400	0	-	-	-	-	-	I	
				-	-	-	-	-	II	
抽出液による感作動物群	B	876	470	10x	+	+	+	+	+	I
				12	+	+	+	+	+	II
	C	877	460	21x	+	+	+	+	+	I
				22	+	+	+	+	+	II
	D	878	470	25x	+	+	+	+	+	I
				21	+	+	+	+	+	II
	E	879	460	17x	+	+	+	+	+	I
				23	+	+	+	+	+	II
	F	882	350	0	-	-	-	-	-	I
					-	-	-	-	-	II
G	886	350	0	-	-	-	-	-	I	
				-	-	-	-	-	II	
H	871	370	0	-	-	-	-	-	I	
				-	-	-	-	-	II	
I	877	370	0	-	-	-	-	-	I	
				-	-	-	-	-	II	

(註)

第3表接種に抗元おえけ
I) 抽出液
II) 加熱死BCG流パラ浮游液1mg/cc
III) BCGワクチン1mg/cc
IV) 流パラそれぞれ0.1cc皮内接種

第4表接種に抗元おえけ
I) 抽出液
II) 加熱死BCG流パラ、浮游液1mg/cc
III) 100倍O.T.
IV) 流パラそれぞれ0.1cc皮内接種

- 第3お (一) 無変化
3い (±) 10mm×10mm 以下の腫脹又は硬結で発赤なきもの
第4表に (十) 発赤を伴う 10mm×10mm 以上の硬結
(廿) 痂皮凝血、膿を伴う硬結
(卅) 潰瘍形成

局所潰瘍は定型的に穿掘して、結核性変化を思わせるが、最後には痂皮を形成して治癒してしまつた。顕微鏡的には、抽出液による潰瘍変化は潰瘍下層に出血部と壊死部とを混えた細胞浸潤部が筋層に迄及び、その中には、巨態細胞、単球、白血球がみられ、更に結合組織には充血と浮腫が著明である。単に流バラのみの接種局所には潰瘍はないが、又細胞浸潤も少く殊に白血球の出現が殆んどない。たゞ流バラ滴の跡と思われる空胞が多数見られる。抽出液接種の場合はこの空胞が少く細胞浸潤が著しい。

3) 抽出液接種のモルモットに与える感染防禦力について

体重 350~450gm の健康モルモット28匹(10倍旧「ツ」で陰性)を4群に分ち、第1群(10匹)は対照とし第2群(7匹)には抽出液 0.1cc を、第3群(7匹)には加熱死 BCG の流動パラフィン媒質浮游液 1mg/cc のもの 0.1cc

第5表 BCG乾燥菌体の流動パラフィン抽出液接種のモルモットに与える免疫効果

群別	対照	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	第9群	第10群	第11群	第12群	第13群	第14群	第15群	第16群	第17群	第18群	第19群	第20群	第21群	第22群	第23群	第24群	第25群	第26群	第27群	第28群
動物番号	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	5	6	7	25	26	27	28		
感染直前 反応(100×0.T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	14	16	14	10	13	14	14	22	20	21	18	18	0	0	0	0		
解剖直前 反応(100×0.T)	15	16	16	23	16	14	14	15	13	11	14	19	23	16	21	15	15	13	13	12	12	16	0	22	18	21			
感染後解剖時 迄の体重増減	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
局所変化	G	G	G	G	G	G	G	K	-	A	-	K	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	A	-		
淋 巴 腺	膝袋	左	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	右	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鼠蹊	左	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	右	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	後腹	左	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
右	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
気管	左	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
右	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝門	左	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
右	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
後肋骨	左	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
右	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
内 臓	肺	左	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	右	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	肝	左	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	右	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	脾	左	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
右	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脾重	1.5	1.7	0.8	1.7	1.3	0.9	1.1	1.2	0.8	1.1	1.4	1.5	1.2	1.2	1.4	1.4	0.8	1.7	1.2	1.3	1.2	1.0	1.0	2.6	0.8	1.0	1.0	2.6	0.8
脾培養	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- (註) 1 (一) 結節なきもの
(+) よくさがして発見し得る程
(廿) 一見して数個の結節
(卅) やや多数の結節
(卍) 非常に多数の結節
- 2 (一) 無腫脹
(+) 小豆大迄の腫脹
(廿) 大豆大迄の腫脹
(卅) それ以上の腫脹
○印は乾酪化
- 3 (A) 膿瘍 4 ツベルクリンアレルギーは 100 5 (分母 試験管数
(G) 潰瘍 倍 O.T. 0.1cc 皮内接種後 4本)
(K) 痂皮 24時間の硬結の長短径をmm で 分子 4本の集
測定記載した 培養 落数の和

を、第4群(4匹)には媒質に使用した流動パラフィンのみ 0.1cc をそれぞれ左下腹部皮内に接種、7 週後、有毒型結核菌 H-2 株 0.1mg を以て右下腹部皮下に感染を行い、感染後 6 週目に剖検、結核罹患度を肉眼的に比較した。その際、脾の一部を切除し、2%苛性ソーダの9倍量で乳劑をつくり、その 0.1cc をそれぞれ4本の小川培地に接種培養、4 週後の発生集落数を比較した。

実験終了迄に3匹の斃亡をみたが、これはいずれも連鎖球菌性肺炎によるものであつた。実験成績は第5表に示す如くで、流動パラフィン抽出液接種群の病変は流バラ死菌ワクチン接種群とともに流バラ接種群及び無処置対照群に比して軽微であり、培養成績に関しても同様のことがいえる。

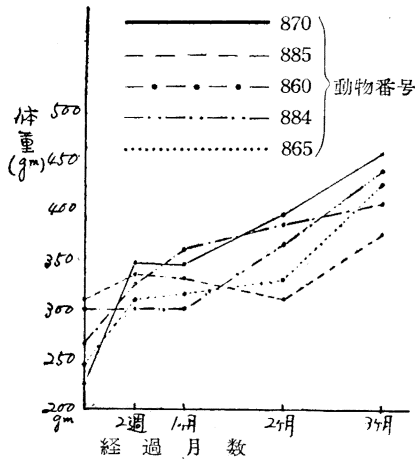
4) 抽出液の毒性について

10匹の体重 340~460gm の健康モルモットのうち5匹には抽出液 0.5cc、他の5匹には抽出に用いた流バラ0.5cc をそれぞれ腹腔内に接種した。3 週後、前群の動物は100 倍旧「ツ」に反応陽性となり、そのうち4匹は体重増加25gm~110gmを示し、1匹は5gm 体重減少したが、いずれも健康であつた。後群は 40gm~95gm の体重増加を全動物が示した。解剖を3週後行つたところ、後群には全く変化なく、腹腔内に滲出液の存在も

発見できなかったが、抽出液接種による前群の動物は例外なく接種部位の皮下組織、筋膜が肥厚し、滲出液又は膿をみる場合もある。又大網膜・横隔膜・腹膜にも肥厚がみられ、殊に横隔膜の下面には灰白色の粟粒大、点状の隆起結節が多数みられた。更に特長ある所見は大網膜と左腎及び脾の被膜が互に癒着結合して、これらの器官を互に分離することが困難なものであつた。肝の表面、時に辺縁部に灰白色又は黄緑色の結節、又は深く肝実質に及ぶ硬い病変があり、肺には Choucron⁽¹²⁾の記載した如く肉眼的に粟粒大の結核結節様の透明で光輝を帯びた結節が多数又は小数発見できた。外観は全く有毒菌による結核結節と区別が付きにくい。組織学的には目下検索中で後報にゆずる。又抽出液の与えるツベルクリンアレルギーを研究した際にも知られた如く、抽出液の0.5cc の腹腔内、筋肉内接種によつても動物は長く生存し、

健康を損うことなく、正常に体重を増加する(第1図)。

第 1 図
BCG乾燥菌体の流動パラフィン抽出液
0.5cc 筋内又は腹腔内接種後の体重変化



III 考 察

以上の実験によつて、我々はBCGの乾燥菌体の流パラ抽出液が抗原物質を含んでいると考えたい。Choucronは既にこの抽出液より、二つの物質を分離し、その一つは類脂体と炭水化物の複合体であつて、その1γを健康モルモットに接種しても肺に病変を生じ、且つ防禦抗体を発生させると考え、もう一つの物質は蛋白質性のもので、ツベルクリンアレルギーと考えており、菌体成分の上から免疫とアレルギーを分離している。

しかし、ともかくそれぞれの分離分割を再び流パラ中に溶解して、動物に接種している点は興味がある。それ自身では抗原性のない炭水化物である流パラが、抗原抽出剤として働くと同時に強力な Adjuvant としての性質も加わつて、この抽出液の性質を形成していると考えたい。生菌 BCG 30mg の大量接種によつても進行性の病変を起さず、肺に結節を形成することも極めて稀であることは、我々が常に BCG ワクチン毒力検定に際して経験しているが、この量の加熱死 BCG も流パラに浮遊して接種する際には、肺に多数の結節を生ずるのであり、これに関しては既に報告しておいた⁽⁹⁾。故に病変を生ずるといふ立場から毒力の問題を考えても、毒力は単に菌体成分のみの問題でなく、更に生物学的な寄生という現象を決定する要因と関連しているのである。このことは肺炎双球菌を中心とした Dubos⁽¹⁷⁾ の綜説からも理解されるところである。我々はBCG乾燥菌体の流パラ抽出液が単に抗原物質を含有しているという事実のみならず、流パラの Adjuvant としての作用も考慮して、

このものの生物学的作用を考えたい。

IV 総 括

- 1) BCG乾燥菌体より流動パラフィンで抽出液を調製した。
- 2) 抽出液 0.1cc 皮内接種は BCG 30mg 接種に匹敵するツベルクリンアレルギーをモルモットに与える。
- 3) Koch の現象の上からも、抽出液は強い抗原性をもっている。
- 4) 抽出液 0.1cc 皮内接種で免疫されたモルモットは有毒人型菌による二次感染に対して著明な防禦力を示した。
- 5) 抽出液 0.5cc の腹腔内接種後3週にモルモットの肺に結核結節様病変を発見した。

擧筆するに當つて御指導を賜つた柳沢部長と、組織検鏡所見を御指導下さつた予研病理部江頭博士に深謝する。

V 文 献

- (1) Coulaud, E.: Rev. de la Tuberc., 11, 851, 1934.
- (2) Saenz, A.: Compt. rend. Soc. de Biol., 120, 870, 1935.
- (3) Hensel, G.: Beitr. z. Klin. Tuberk., 90, 26, 1937.
- (4) Rist, N.: Ann. Inst. Pasteur, 61, 121, 1938.
- (5) Freund, J. & Casals, J.: J. Immunol., 38, 67, 1940.
- (6) 金光正次: 東京医学会雑誌, 58, 7, 451, 昭19.
- (7) 生沼金夫: 海軍軍医会雑誌, 33, 7, 844, 昭19.
- (8) 岡捨己及びその他: 抗酸菌病研究雑誌, 6, 22, 昭25.
- (9) 金井興美他: 結核, 26; 6, 7, 8, 昭26.
- (10) Hehre, E.: J. Immunol., 36, 285, 1939.
- (11) Choucron, N.: Compt. rend. Acad. d. Sc., 208, 1757, 1939.
- (12) Choucron, N.: Compt. rend. Acad. d. Sc., 210, 511, 1940.
- (13) Choucron, N.: Science, 98, 327, 1943.
- (14) Choucron, N.: Am. Rev. Tuberc., LVI, 203, 1947.
- (15) Mudd, S. and Mudd, E.B.H.: J. Exper. Med., 40, 633, 1924.
- (16) Reed, G.B. and Rice, C.E.: J. Bact., 22, 239, 1931.
- (17) Dubos, R.J.: Bact. Rev., 12, 173, 1948.