

# Vole Bacillus (Wells) に関する研究

## 第6報 Vole Tuberculin に就いて

国立予防衛生研究所 結核部(部長 柳沢 謙)

室橋 豊穂・伊東 恒夫

(昭和 28 年 11 月 24 日受付)

### 1 緒言

Vole Bacillus の産生するツベルクリン物質に就いては、A.Q. Wells<sup>1)</sup>が肝エキスを加えたグリセリン抜きDouglas 馬鈴薯培地或いは1%結晶馬血清アルブミンを加えた合成培地を用いて、又 E. Grasset<sup>2)</sup>が Apodemus Sylvaticus 通過によつて得た彼のいわゆる eugonic な変異株を Sauton 及びグリセリン・ブイオン培地に培養して、それぞれその培養濾液に就いて実験を行い、感作動物に対しては旧ツベルクリン(OT と略称)と同様な皮膚反応を呈せしめうることを述べ、更に最近林<sup>3)</sup>が Sauton 培養濾液について同様なことを報告している程度で、未だ殆んど研究が積まれていない。それはこの菌の液体培養が、BUG や他の結核菌の如くには容易に行い得ないという理由に基くのである。

然しながら既に報告したように<sup>4),5)</sup> われわれは Vole Bacillus D<sub>15</sub> 株を、Sauton 培地及びその他の液体培地に表面培養し、更に進んでこれを継代することができるので、これに基いて、Sauton 培養の濾液につき、ツベルクリン物質の検索を試みた<sup>6)</sup>。以下その成績を報告する。

### 2 実験方法

#### 1) Tuberculin の製法

300cc 容量の三角コルベンに Sauton 培地 100cc 宛を分注したもの 37 本を用意し、Sauton 培養 3 週の同一種培養の菌膜から一渦巻白金耳宛移植培養した。培養後 8 週、10 週及び 12 週末に、それぞれ 14 本、12 本及び 11 本宛をとり出して 100°C、30 分間滅菌、菌体濾過後 1/10 容に濃縮し、これを Vole Tuberculin 原液(便宜上 V-T<sub>8-12</sub> と略称)とした。濾液の PH は凡て酸性(5.4~4.8)であつた。

次にこれ等の原液各 100cc を、伊藤・越村<sup>7)</sup>の方法を用いて処理し、Ortho-Amino-Azo-V-Tuberculin (O-A-A-V-T と略称)を作つた。原液 100cc 当りの収量は 121~136mg であつた。

2) 以上の如くにして作製した Vole Tuberculin 及び O-A-Azo-V-Tuberculin の力価を検討する為、感作天竺鼠について標準 O-T と比較すると共に、ツ反応陽

性学童に就いて、力価確認試験を行つた。

3) 天竺鼠の感作には、Vole Bac. 及び人型青山 B 株を用い、いずれの菌株も凡て加熱死菌として、これを流動パラフィン中に 10mg/cc に含ませたものの 0.6cc(6mg) 宛を筋肉内に注射した。

4) 力価検定は国家検定基準<sup>8)</sup>に従い、天竺鼠の場合は 1 群を 6~8 疋とし、ラテン方格法により部位差の起らぬように注意して背部 4~8 カ所皮内に注射し、注射後 24 時及び 48 時間後の反応の硬結を計測して、その Ratio (標準 O-T の呈する反応に対する比率) を求めた。又人体における確認試験は、左右交互注射法により、48 時間後の反応の発赤によつた。

### 3 実験成績

実験 I 培養日数を異にする V-T 相互の力価の比較(第 1 表)

加熱死 Vole-Bac. 感作動物に就いて：感作後 8 週目に、各 V-T の 2000 倍食塩水稀釈液を皮内注射して得た成績は表の如くで、V-T<sub>8</sub> を標準とした場合、これに対する V-T<sub>10</sub> 及び V-T<sub>12</sub> の呈する反応の Ratio より見れば、これ等三者の間には力価の差異を認めることができない。

加熱死青山 B 感作動物に就いて：感作後 21 週目に、全く同様の方法を以つて、1000 倍稀釈 V-T<sub>8-12</sub> の力価を相互に比較したが、この場合にも三者の間に力価の差異を認め得なかつた。このいずれの実験でも V-T は充分著明なツベルクリン反応を呈した。

Table 1. Comparison of the Potency between three sort of Vole Tuberculin

Sensitization of guinea pigs with heat-killed	Ratio of the Reaction						Dilution of V-Tuberculin tested
	V-T <sub>8</sub> (Standard)		V-T <sub>10</sub>		V-T <sub>12</sub>		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
Vole Bacillus	1.00	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	2000×
Aoyama-B (H)	1.00	1.00	0.99	1.00	0.99	1.00	1000×

#### 実験 II 標準 O-T と V-T との力価の比較

実験 I によつて培養日数を異にする三種の V-T の力価は等しいと見做し得るので、まず V-T<sub>8</sub> を用いて O-T の力価と比較した。

V-T<sub>8</sub> を食塩水を以つて 1500, 1800, 2000, 2200 倍及び 2500 倍に稀釈し、食塩水稀釈 2000 倍 O-T を標

準として、加熱死青山B感作天竺鼠6匹に、前記の方法で皮内反応を行った。その結果、V-T<sub>8</sub>の2000倍O-Tに対するRatioは、1500倍稀釈液を以つてしても0.89にすぎず、従つて青山B感作動物を用いる場合、等力価を示すV-Tの稀釈度は更に低いものと予想することができた。

次にV-T<sub>8~12</sub>をそれぞれ1000倍に稀釈し、全く同一の方法で2000倍O-Tと比較した。そのRatioは、24時間後0.96~0.97、48時間後1.00~1.03で、V-T<sub>8~12</sub>の1000倍稀釈液がO-Tの2000倍稀釈液と略々等

力価であろうと考えることができた(第2表)。この実験でV-T<sub>10</sub>及びV-T<sub>12</sub>を同時に用いたのは、実験Iの成績を確認する為である。

実験III O-A-Azo-V-Tの力価の検討

青山B培養濾液から作られたO-A-Azo Tは標準O-T 2000倍稀釈液に対して凡そ0.1~0.2Yが等力価であると考えられている<sup>9)</sup>ので、実験IIの成績に基づいて、O-A-Azo V-T<sub>8~12</sub>の各0.5Y/0.1ccを青山B感作天竺鼠8匹に注射し、2000倍O-Tとその力価を比較した。Ratioは0.79~0.84を示し、0.5Yでも稍々低力価のように思われた。

次にVole Bac.及び青山B両菌株の同一死菌量を以つて同時に感作された2群の天竺鼠に対し、両種のO-A-Azo T 0.5/0.1ccを以つて交叉実験を行った。成績は第3表の如くである。青山B感作群のO-A-A-V-Tに対する反応は明らかに弱く、これに対してVole Bac.感作群における反応が強く出ているので一見菌型による特異性のように見えるが、同じ青山BのO-A-A-Tの反応がVole Bac.感作群では青山B感作群のそれよりも稍々強く出ていることから考えると、死菌による感作の程度がこの両株によつて異なる為であると考えるのが妥当のように思う。強く感作されているVole Bac.群においても、O-A-A-V-Tの反応は、O-A-A-Tに較べれば稍々弱いのであり、このような成績のみから特異性に遑言及することは不可能であろう。

更にわれわれは両株のOld Tuberculinを用いて交叉実験を試みているが、これについては更に詳しい検討を重ねて報告したいと思う。

実験IV 人体における力価確認試験  
a) V-T<sub>8~12</sub>の力価の検討  
動物実験によつて一応その

Table 2. Comparison of the Potency between Vole Tuberculin (1000x) and Standard Old Tuberculin (2000x)

Guinea-pig No	Site of Reaction	Tuberculin Reaction (Average size in mm)							
		24h				48h			
		O-T	V-T <sub>8</sub>	V-T <sub>10</sub>	V-T <sub>12</sub>	O-T	V-T <sub>8</sub>	V-T <sub>10</sub>	V-T <sub>12</sub>
2866	L	18.0	18.0	18.0	17.5	11.0	11.5	12.5	13.5
	R	17.5	15.5	18.0	16.5	13.0	10.5	11.5	12.0
2867	L	19.5	20.0	18.5	20.5	13.0	13.0	12.5	15.5
	R	20.0	17.0	21.5	17.0	12.0	14.5	12.5	13.0
2872	L	20.0	17.0	18.0	17.0	16.0	11.0	15.5	14.0
	R	16.0	20.0	17.5	17.5	13.0	15.5	13.0	13.5
2873	L	16.5	15.5	17.0	13.5	15.0	15.5	17.0	15.0
	R	18.5	15.0	15.0	16.0	14.5	14.0	12.5	18.0
2874	L	20.0	17.5	18.0	20.0	15.0	15.5	15.5	16.5
	R	17.5	17.0	19.0	17.5	16.5	14.0	16.5	15.0
2827	L	17.0	18.5	13.0	18.5	10.5	13.0	8.5	13.5
	R	15.5	15.0	14.5	14.0	12.0	12.0	12.5	12.0
2882	L	19.5	16.5	16.5	17.5	16.0	14.0	16.0	15.5
	R	15.0	18.5	15.5	16.0	15.5	18.0	13.0	15.5
2880	L	19.0	18.0	19.0	14.5	15.0	12.5	15.0	10.5
	R	17.0	18.0	15.0	18.5	14.0	15.0	14.0	15.0
Ratio(V-T/O-T)		1.00	0.97	0.96	0.96	1.00	1.00	1.00	1.03

Note: Guinea-pigs were sensitized with Aoyama-B (H) strain.

Table 3. Comparison of the Potency between two sort of Ortho-Amino-Azo-Tuberculin in concentration of 0.5Y/0.1cc

Sensitized with	Guinea-pig No	Tuberculin Reaction (Average size in mm)			
		O-A-Azo-O-T		O-A-Azo-V-T	
		24h	48h	24h	48h
Aoyama-B	71	10.5	8.5	8.5	0
	76	16.5	16.0	12.0	10.0
	75	13.5	16.0	16.0	17.0
	77	14.5	16.5	10.0	14.0
	81	20.0	20.0	16.0	18.0
	82	16.5	15.0	12.0	16.5
Ratio		1.00	1.00 (Standard)	0.81	0.83
Vole Bac.	1	19.5	22.0	23.0	22.5
	5	16.5	16.0	14.0	14.0
	6	17.5	20.5	14.0	16.0
	7	15.0	14.0	20.0	16.0
	11	18.5	22.0	20.0	18.0
	12	17.5	15.0	17.0	12.0
Ratio		1.00	1.00 (Standard)	1.03	0.90

力価を検討したが、更に検定基準に従つて人体における確認試験を行った。

前記3種の V-T 原液を食塩水でそれぞれ 800, 1000, 1200 及び 2000倍に稀釈し、標準 O-T 2000倍稀釈液とその力価を比較した。成績は第4表の如くで、動物実験の場合と同様に、V-T<sub>8-12</sub>の間には相互に培養日数による力価の差異はなく、共々その 1000 倍稀釈液が標準 O-T 2000 倍稀釈液と略々等力価であると思われた。

Table 4. Potency test of Vole Tuberculin on human subjects

Dilution of Vole Tuberculin	Number examined	Ratio against standard old Tuberculin (2000×)	
800×	V-T <sub>8</sub>	98	1.04
	V-T <sub>10</sub>	77	1.04
	V-T <sub>12</sub>	110	1.04
1000×	V-T <sub>8</sub>	77	0.97
	V-T <sub>10</sub>	78	1.02
	V-T <sub>12</sub>	84	1.02
1200×	V-T <sub>8</sub>	70	0.96
	V-T <sub>10</sub>	66	0.97
	V-T <sub>12</sub>	58	0.95
2000×	V-T <sub>8</sub>	63	0.89
	V-T <sub>10</sub>	93	0.93
	V-T <sub>12</sub>	89	0.88

b) O-A-Azo V-T<sub>8-12</sub> の力価の検討

O-A-Azo V-T<sub>8-12</sub> をそれぞれ 0.1, 0.2 及び 0.5Y/0.1cc の稀釈液とし、a) と同様にして力価を検討した。成績は第5表の如くで、Vole Bac. 培養濾液から作ったアゾ・ツベルクリン相互には差異を認めずいずれも 0.5Y/0.1cc の力価が標準 O-T 2000 倍稀釈液よりも僅かに低い程度であつた。動物実験における程著しい相違を示さなかつたことは、人体を用いる場合と、動物を用いる場合とでは、感作の方法、程度乃至は反応性を異にする為であろうと思う。

Table 5. Potency test of O-A-Azo-Vole Tuberculin on human subjects

Dosis(Y) of O-A-Azo V-T	Number examined	Ratio against Standard Old Tuberculin (2000×)	
0.1	V-T <sub>8</sub>	36	0.65
	V-T <sub>10</sub>	41	0.73
	V-T <sub>12</sub>	43	0.68
0.2	V-T <sub>8</sub>	61	0.82
	V-T <sub>10</sub>	67	0.86
	V-T <sub>12</sub>	59	0.79
0.5	V-T <sub>8</sub>	84	0.92
	V-T <sub>10</sub>	88	0.97
	V-T <sub>12</sub>	80	0.93

4 総括考按

Vole Bacillus の産生するツベルクリン物質に関する

研究は緒言にも述べたように甚だ少ない。

A.Q. Wells<sup>1)</sup> は、一つの実験ではグリセリン抜ききの牛肝エキス加 Douglas 馬鈴薯培地の培養濾液を 1/10 容に濃縮したものを原液とし、その 20 倍稀釈液を Medical Research Council の標準 O-T 80倍稀釈液と共に Vole Bac. の生菌を接種した天竺鼠に注射して、同様に陽性反応を認めたことを、又他の実験では、1% 結晶馬血清アルブミン加グリセリン抜ききの合成培地培養濾液を 1/10 容に濃縮して原液となし、その 100 倍稀釈液を前記標準 O-T の 100 倍稀釈液とともに結核菌感染(菌株不詳)天竺鼠に注射して、前者が後者よりも稍々弱く反応したことを述べている。

又 E.Grasset<sup>2)</sup> は、Apodemus Sylvaticus 通過のいわゆる eugonic Variant を 5% グリセリン加 Sauton 或いはグリセリン・ブイオンに培養し、その 5 週目の培養濾液を Chamberland L<sub>5</sub> で濾過したものをそのまま原液とし、その 10 倍液並びに 100 倍稀釈液が eugonic variant を接種した動物に同じように陽性反応を呈したことを述べて、彼の得た変異株の同定に資している。

これ等の実験はいう迄もなく Vole Bacillus 或いはその変異株が液体培地中にツベルクリンを産生したことを示すものであるが、使用した培地が特殊な成分を含むものであつたり、動物感作方法の検討や使用するツベルクリンの濃度に対する顧慮が払われていないので、ツベルクリン産生という事実を認め得ても、その力価の強弱とか、もし存在するとすれば菌株による特異性の有無とかいう点に就いては、明確に指示するところがない。もしツベルクリン相互の力価を比較しようとするならば、対象動物をして反応に個体差を生ぜしめ得ぬ程度に充分感作するとともに、試験に供するツベルクリンの稀釈度を更に高くして、現れる反応の強さの差異に注目すべきであろう。

上述したわれわれの実験も、この意味から Vole Bacillus の産生するツベルクリンの性質を充分明らかにしえたとは勿論思わない。然しながら以上の実験成績からすれば、青山B感作の天竺鼠や人体における反応から、Vole Tuberculin は青山Bの8週培養濾液から得たO-Tに比してその力は明らかに劣つており、Vole Bac. 9週培養濾液を用いて略々同程度の反応を認めたと述べている林<sup>3)</sup>の報告にはそのまま同意することはできない。O-A-Azo Tuberculin を以つてした実験もこれを裏書きしているように思うのである。

このことは、Sauton 培地に培養され場合に Vole Bacillus のツベルクリン産生能が青山Bのそれに劣るといふこと、換言すれば、両者の培養濾液中のツベルクリンの量的差異をそのまま示すものと考えられるかも知れない。Sauton 培地上の Vole Bacillus の発育が、青山Bは勿論他の結核菌のそれに比して遙かに dysgonic であ

るりということは、その培地上における物質代謝が明らかに異なることを示すものであり、それが産生されるツベルクリンの量的な差異となつて現れているのかも知れない。

以上述べた Vole Tuberculín の低い力価に対して、加熱死 Vole Bac. を以つて感作された動物においては青山Bを以つて感作された動物に比していずれのアゾ・ツベルクリンに対しても強く反応したという点は興味が深い。すなわち同時に同一湿重量の加熱死菌を以つて感作したに拘らず、この両群の呈するツ反応の強さに差異の見られたことは、感作に対する動物の個体差を考慮に入れるとしても、両菌株の感作能に差異のあることを示すように思われる。これに就いては勿論実験を繰返してみなくてはならぬであろう。そして恰かも菌型特異性の如くに見受けられるツベルクリン反応の現われ方の相違については、培地条件如何による菌の発育とツベルクリン産生量との関係などについて、更に詳細な追求を試みて始めてその理由を掴みうるものと考え次第である。

#### 5 結 論

Vole Bacillus D<sub>15</sub> 株を Sauton 培地に培養し、8、10 及び 12週目に各培養濾液を 1/10 容に濃縮したものを原液として Vole Tuberculín を作り、更にそれ等から Ortho-Amino-Azo Vole Tuberculín を作つて、その両者の力価を検討した。

各 Vole Tuberculín の力価は、人体においても感作天竺鼠においても、相互に略々等力価で培養日数による差は認められず、Sauton 培地 8 週培養の青山B株を用い

て作つた標準 Old-Tuberculín に比してその略々 1/2 の力価に相当していた。又 O-A-Azo T の力価もこの成績に略々等しかつた。このような Vole Tuberculín の低い力価は、Sauton 培地中に産生されるツベルクリン物質が、dysgonic に発育する Vole Bacillus の場合には、量的に少ないことに由るものであらうと想像される。

但し天竺鼠に対して加熱死 Vole Bacillus が加熱死人型青山Bよりも強い感作を与えたことは興味のある点である。

#### 文 献

- 1) Wells A.Q.: Medical Research Council Special Report Series, No 259, 1946.
- 2) Grasset E.: Annales de l'Inst. Pasteur T. 78, No4, 444~458, 1950.
- 3) 林 治: 日本細菌学会雑誌 6 卷, 5 号, 45~49, 1951.
- 4) 室橋・関・吉田・高野: 結核, 27 卷, 5 号, 250~254 1952.
- 5) 室橋・関: 結核, 29 卷, 1 号, ~5, 1954.
- 6) 室橋・伊東: 文部省科学研究費総合研究結核研究委員会 昭25年度(237) 及び昭26年度(161~162) 究研業績.
- 7) R. ITO & S. Koshimura: Jap. Med. Journ. Vol 1, No5, 427~430, 1948.
- 8) 生物学的製剤基準(厚生省), 150~153, 1953.
- 9) 柳沢・浅見・細井・土屋: 結核, 27 卷, 4 号, 204~206, 1952.