

ツベルクリン感作赤血球凝集反応の免疫学的意義について

第2報 ツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価と
Slide Cell Culture 法による全血静菌力との関係

吉 田 清 一

東京大学冲中内科

受付 昭和31年5月1日

I 序 論

結核に罹患したものが、結核の再感染に対して免疫性を持つという事実については、今日、異論のないところであるが、その免疫機構に関しては、古来からの多くの研究にもかかわらず、未だ決定的な結論がえられていない。

結核菌の感染、あるいは結核免疫は、貪食能を増強する Opsonin の産生を速進するとするもの¹⁾、また他の感染症と同じく、流血中に凝集素²⁾、沈降素³⁾、補体結合反応抗体⁴⁾の出現を見とす者等、現在まで種々の方法により種々の血中抗体が報告せられてきたが、それらのおおのが結核免疫においていかなる役割を演じているかについては、なお明らかではない。

一方、近年 Middle brook-Dubos によりツベルクリン感作赤血球凝集反応が提唱せられ⁵⁾、その後の多数の報告により⁶⁾、結核症において、本反応が従来の血清反応に比して、より特異的であることが認められてきた。著者らも本反応を追試し、本法が結核症においてかなり特異的に陽性反応を示すこと⁶⁾、および本反応の抗体が、血清 γ -グロブリン分割に含まれると思われる所見をえ⁷⁾、これをすでに前報に報告した。次に著者は、本反応が結核免疫といかなる関係を有するかを明らかにするために、実験的家兔結核症について、本反応凝集価と Slide Cell Culture 法による全血静菌作用の変動を経過を追って観察したので、その成績をここに報告する。

II 実験材料および実験方法

1) 実験材料: あらかじめ、100倍旧ツベルクリンによる皮内反応が陰性であることを確かめた体重2kg前後の健康家兔27例を実験に使用した。なおこれらの家兔は、その自然抵抗力の個体差を除外する意味で、実験前の Slide Cell Culture において、全血静菌力をほとんど有しないもの(±あるいは-)のみを選んだ。

2) 実験方法: 上記家兔に、岡・片倉培地にて培養3週目の人型結核菌 Frankfurt 株および H₂ 株をそれぞれ下記の如く接種した。すなわち、4例には Fr株30mg

を皮下接種し、5例には同株3mgを静脈内に、10例には同株30mgを腹腔内に、また8例には H₂株20mgを腹腔内に接種した。そしてこれらの動物につき、ツベルクリン感作赤血球凝集反応と Slide Cell Culture による全血静菌力の変動を、経過を追って約3カ月間観察した。なおこのうちの10例について、接種後約1カ月目より脱感作を行い、これら両反応の変動を併せて観察した。

ツベルクリン感作赤血球凝集反応の手技に関しては前報⁶⁾に述べた通りであるが、今回は抗原として、パスツール研究所製ツベルクリン感作赤血球凝集反応用抗原を使用した。

Slide Cell Culture 法の手技については、本間⁸⁾の方法に倣った。すなわち両端に厚さ0.07mm前後の紙片を貼付した1枚の Slide glass に、他の Slide glass 1枚を重ねて1組とし、乾熱滅菌しておく。菌浮遊液は約3週間培養した Fr 株を秤量し、瑪瑙乳鉢で滅菌蒸留水を加えて磨碎し、10m⁻/ccの浮遊液を作り、後3,000回転5分間遠心沈澱し、均等となつた上清を使用する。実施に当つては、菌浮遊液0.04ccに被検血液0.4ccを加え、毛細管ピペットで充分混和後、Slide glass 内2カ所に滴下、2枚の Slide glass を接着せしめ、直径約10mmの円盤となる如くし、周囲を加熱融融せるパラフィンで密封する。37°Cの孵卵器内に1週間培養し、取り出してパラフィンを去り、2枚の glass を引離し、5%フォルマリン溶液中で溶血、固定を行い、充分水洗後、カルボールフクシンにて染色、次いで3%塩酸アルコールで脱色、後染色を行つて鏡検する。対照は同様の操作で培養のみを除外したものと、無処置健康家兔の血液について同一操作を行い、同様に培養して、毎回菌の発育力の対照とした。顕微鏡検査では、血液円盤の周辺に集落について、一つの集落を形成する菌数を計算し、10⁺の集落の平均数を取り、これを次の5段階に分けた。

菌数	菌増殖	静菌力
1. 対照と同じく菌分裂せず	—	+++
2. 菌数5 ⁺ 以下	±	++
3. 菌数6 ⁺ 〜10 ⁺	+	+
4. 菌数11 ⁺ 〜20 ⁺	++	±

5. 菌数21以上 卅 一

注射を行った。

脱感作は予研製旧ツベルクリン原液の10,000倍稀釈液
0.1ccから、原液0.1ccまでを漸次増量しながら連日皮下

III 実験成績

表 1 Fr株30mg 皮下接種群における
凝集価と菌増殖との消長

家兔No.	日数	↓菌接種				
		Vor	1 週	2 週	ツ反応	4 週
No. 1	Aggl. T.	1/4	1/512	1/1024	-	1/2048
	S. C. C.	卅	-	+	21×21	-
No. 2	Aggl. T.	1/4	1/128	1/256	+	1/256
	S. C. C.	卅	-	+	24×21	±
No. 3	Aggl. T.	1/4	1/256	1/1024	+	1/2048
	S. C. C.	卅	±	-	16×14	-
No. 4	Aggl. T.	1/4	1/64	1/1024	+	1/2048
	S. C. C.	卅	±	±	22×24	-

注 Aggl. T. … ツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価
S. C. C. … Slide Cell Culture 法における菌増殖
以下同じ

表 2 Fr株3 mg 静脈内接種群における
凝集価と菌増殖との消長

家兔No.	日数	↓菌接種				
		Vor	2 週 (ツ反応)	3 週	6 週	8 週
No. 5	Aggl. T.	1/4	1/64 (+)	1/16	1/32	1/16
	S. C. C.	卅	+	(13×13)	+	+
No. 6	Aggl. T.	1/4	1/64 (-)	1/256	1/512	1/512
	S. C. C.	卅	+	(14×14)	±	±
No. 7	Aggl. T.	0	1/256 (-)	1/64	1/32	1/64
	S. C. C.	卅	±	(16×16)	±	±
No. 8	Aggl. T.	0	1/128 (+)	1/512	1/256	1/256
	S. C. C.	卅	±	(18×18)	-	-
No. 9	Aggl. T.	0	1/128 (-)	1/512	1/256	1/256
	S. C. C.	卅	±	(22×22)	-	±

表 3 Fr株30mg 腹腔内接種群における凝集価と菌増殖との消長

家兔No.	日数	↓菌接種												
		Vor	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	ツ反応	7 週	8 週	ツ反応	9 週	11週	12週
No. 10	Aggl. T.	1/4	1/32	1/16	1/64	1/64		-	1/128	1/64		1/64		1/32
	S. C. C.	卅	+	+	±	±		3 × 2	卅	卅		卅		+
No. 11	Aggl. T.	1/4			1/64		1/32	-		1/16		1/64		1/64
	S. C. C.	卅			+		+	21×18		+		+		+
No. 12	Aggl. T.	1/4	1/256	1/256	1/128	1/256		±	1/256	1/128		1/256	1/64	
	S. C. C.	卅	±	±	±	±		18×18	±	±	(-)	±	+	
No. 13	Aggl. T.	1/4	1/8	1/4	1/8	1/8		+	1/16	1/32		1/32	1/8	
	S. C. C.	卅	+	±	卅	卅		26×24	卅	+	(-)	+	卅	
No. 14	Aggl. T.	1/4	1/4	1/16	1/32	1/32		+	1/32	1/64		1/64	1/32	
	S. C. C.	卅	卅	+	+	+		17×19	+	+	(-)	+	卅	
No. 15	Aggl. T.	1/4	1/64	1/128		+								
	S. C. C.	卅	+	±										

注□内は脱感作群

表 4 Fr株30 mg 腹腔内接種群における凝集価と菌増殖との消長

家兔No.	日数	↓菌接種												
		Vor	1 週	2 週	3 週	ツ反応	4 週	5 週	6 週	ツ反応	8 週	9 週		
No. 16	Aggl. T.	1/4	1/256	1/256	1/4	+								
	S. C. C.	卅	±	±	+									
No. 17	Aggl. T.	1/4	1/64	1/64	1/64	-	1/64	1/256	1/256		1/32	1/64		
	S. C. C.	卅	±	±	+	16×16	+	+	+	(-)	卅	+		
No. 18	Aggl. T.	1/4	1/16	1/16	1/32	+	1/32	1/32	1/32		1/64	1/64		
	S. C. C.	卅	±	+	卅	15×13	卅	卅	±	(-)	卅	+		
No. 19	Aggl. T.	0	1/256	1/256	1/256	+	1/128	1/64	1/64		1/64	1/128		
	S. C. C.	卅	-	-	-	21×19	+	+	±	+	18×18	±		

表5 H₂株20mg腹腔内接種群における凝集価と菌増殖との消長

↓菌接種

家兎No.	日数		Vor	1 週	2 週	ツ反応	3 週	5 週	6 週	ツ反応	7 週	8 週	10 週
No. 20	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/64	1/512	+	1/512	1/512	1/128	(-)	1/32		
		+	+	±	+	20×14	±	±	+	±	+		
No. 21	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/256	1/512	+	1/512	1/1024	1/1024	(-)	1/256	1/1024	1/512
		+	±	±	±	24×18	+	±	+	±	±	+	±
No. 22	Aggl. T. S. C. C.	0	1/4	1/64	1/128	+	1/64	1/128	1/128	(-)	1/512	1/128	1/128
		+	+	+	+	54×25	+	±	+	±	+	+	+
No. 23	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/1024	1/512	+							
		+	+	±									
No. 24	Aggl. T. S. C. C.	0	1/4	1/512	1/512	+	1/512	1/512	1/1024	(-)	1/1024	1/512	1/512
		+	±	±	±	22×30	-	±	±	±	±	+	+
No. 25	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/512	1/512	+	1/512	1/1024	1/512	(-)	1/128	1/512	1/512
		+	±	±	±	18×16	-	+	±	±	±	+	+
No. 26	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/512	1/256	+	1/256	1/512	1/256	+	1/128	1/128	1/128
		+	±	±	±	25×20	-	-	+	+	+	+	+
No. 27	Aggl. T. S. C. C.	1/4	1/4	1/128	1/128	+	1/64	1/128	1/64	+	1/128		
		+	±	±	±	15×20	±	-	+	+	+	+	

Fr株30mg皮下接種群におけるツベルクリン感作赤血球凝集反応凝集価と Slide Cell Culture 法における菌増殖との関係の推移は表1に、同株3mg 静脈注射群のそれを表2に、同株30mg 腹腔内接種群のそれを表3、4に、またH₂株20mg (v. u. 57×10⁻⁶) 腹腔内接種群のそれを表5に示した。これらに見られるように凝集価の推移に関しては、前報に報告した如く、大部分は接種後1週間で凝集価の上昇を認め、3~6週で最高に達し、約2~3ヵ月間陽性を持続するが、幾分下降する傾向が認められた。Slide Cell Culture においてもやはり接種後1週間で凝集価の上昇に伴い、静菌作用が認められ、多少の変動はあるが、2~3ヵ月間静菌力を維持しながら経過する。

次に全症例27例につき、これら2つの反応に関してその凝集価と静菌作用の強さとの関係を比較検討した。そ

図1 全血静菌力と凝集価との関係

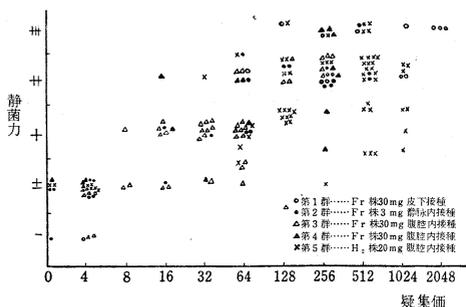
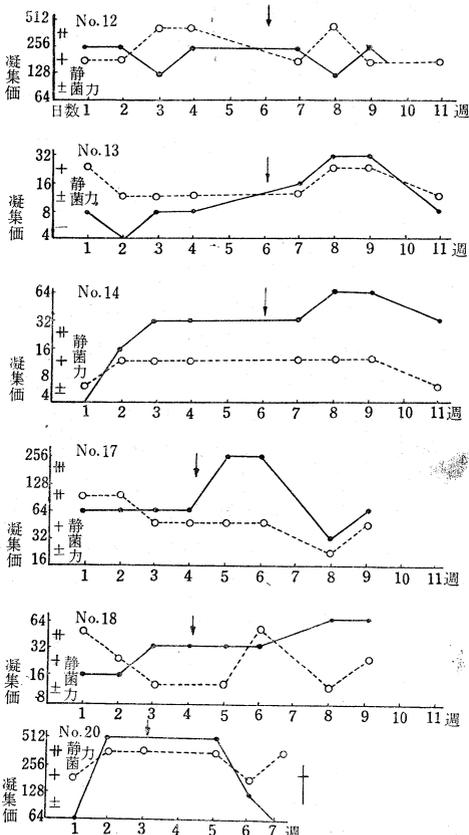
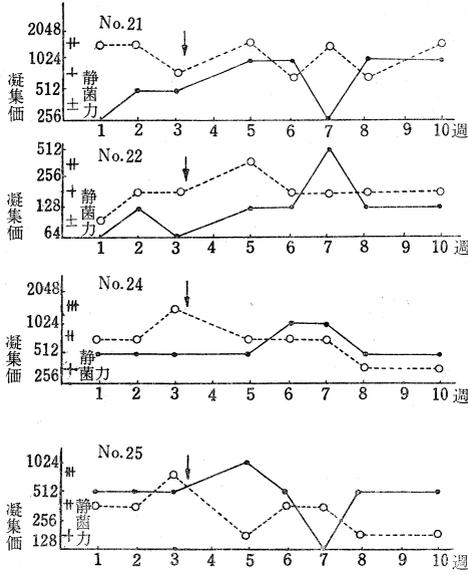


図2





註 (●——● 凝集価, ○.....○ 静菌力, ↓脱感作開始)

の成績は図1に示す如くで、兩者の間に密接な関係を有することを認めた。すなわち、ツベルクリン感作赤血球凝集反応の凝集価の上昇するにつれて、全血静菌作用も増強し、その間にある程度の平行関係が見られるが、就中64倍ないし128倍以上の凝集価を有する家兎では、その全血静菌作用が著明であつた。

次にツベルクリン液により脱感作を行つた際の凝集価および全血静菌力の変動に関しては、図2に示す如くである。すなわちツベルクリン脱感作により凝集価の若干の上昇は見られるが、一部には上昇を示さない例もあり、静菌力においては認むべき一定の変動を示さなかつた。

IV 考 案

結核免疫を測定する方法としては、第1に菌の増殖抑制を示標としなければならない点については異論がないと思われるが、この点について充分満足すべき臨床的な検査方法は未だ認められていない。

Wright⁹⁾は1923年、Slide Cell Culture法を用いて、人または動物が結核菌に感染すると、その全血中に結核増殖阻止作用が発現ないし増強することを報告した。以後 Bannermann¹⁰⁾, Meissner¹¹⁾, 今村¹²⁾, 佐藤¹³⁾, 伊藤¹⁴⁾, 緒方, 渋川¹⁵⁾, 芦村, 高橋¹⁶⁾らにより、本法に種々の改良が加えられ、この静菌作用は免疫の成立と或程度一致するということが認められた。また当教室の本間¹⁷⁾は、この全血静菌力を測定することにより、広く有機的な生体の防衛反応の機序ならびにこれを規定する諸要因について考察を行つた。すなわち本方法は、その実験方法から見て、必ずしも結核免疫の実体を捕捉するものとしては満足すべきものとはいえないが、現在の種々

の臨床的な実験方法のうちでは、上述の如く菌の増殖を示標としている点で最も優れていると思われる。

しかし本現象の本態については、なお明らかではない。Wrightは、菌増殖阻止力が白血球と密接な関係を有するとし⁹⁾, 近年 Lurie¹⁸⁾は家兎前眼房内単核球接種実験において、また Suter¹⁹⁾は単核球の組織培養法により、これを裏付ける所見を報告している。しかし一方、Lurie²⁰⁾, 辻²¹⁾, 小谷²²⁾らの報告にある如く、この場合血清中の抗体の作用も無視しえないと思われ、本現象の本態は一方において、恐らく循環血の殺菌あるいは静菌力、白血球および抗体等の体液性防禦機転と、他方においては、血球、血清等の菌発育促進環境との相反する両面の総合作用により決定されると思われる。

さて、本実験において著者は、結核免疫の示標としてかなり満足すべきものと思われる本反応と、ツベルクリン感作赤血球凝集反応の変動とが、ほぼ平行関係にあることを認めた。この成績より、直ちに本反応の抗体が、結核免疫そのものの本態であると結論することはもちろんできないにしても、本凝集反応において凝集素として捉ええた抗体が、血中の細胞成分となんらかの関連において、全血静菌作用の一端を担うものと考えられる。

次に、結核免疫における免疫とアレルギーとの関係については、Kochの現象²³⁾が発表されて以来、実に多数の先人の業績を数えるが、就中 Rich一派のすぐれた一連の業績²⁴⁾はその著書に余すところなく示されている。Rich & Jenning²⁵⁾は Pneumococcus あるいは Pasteurella 感染時に、脱感作によりアレルギーと免疫とを完全に分離せしめることに成功した。この脱感作法に倣い、Rothschild²⁶⁾が結核モルモットにおいて、旧ツベルクリンを用いてこの分離に成功し、脱感作により免疫力はいささかの影響もうけないことを見出し、J. Siegel²⁷⁾も同様の見解を示し、その他 Branch & Kropp²⁸⁾, Derick, Branch & Crane²⁹⁾, Page³⁰⁾ら脱感作後も免疫の残存を認める者が多い。これらの報告においては、再感染時の菌接種部位の反応の欠如、再感染後の臓器結核の軽微なこと等を免疫力測定の尺度としているが、脱感作時、血中抗体の変動を観察した者では、Clawson & Baker³¹⁾が、補体結合反応および凝集反応を行い、抗体とツベルクリンアレルギーとの間に相関関係のないこと、およびBCG死菌での脱感作で抗体価の上昇をみることを認め、Boyden & Suter³²⁾も結核モルモットで、ツベルクリン注射により凝集素価の上昇をみており、大原³³⁾は沈降反応を用いて結核死菌およびツベルクリンによりそれぞれ脱感作を行つた際に、沈降素価の上昇を認め、また脱感作群モルモットの生存期間が対照に比し延長していることから、抗体価の上昇が結核に対する抵抗力の増強を示すものと見做している。

Baker³⁴⁾も同様に、補体結合反応の抗体がアレルギー

とは平行せず、Resistance に平行するように思われると述べており、Hughes³⁵⁾も家兎血清中抗体の増加は、生結核菌に対する細胞の、Phagocytosis を促進するとしている。しかし Higginbotham³⁶⁾は脱感作により、血中の補体結合反応性抗体の消失をきたさないこと、またそのツベルクリン処置により、抗体価の上昇をも見ないことを報告している。

著者の実験においては、上記の如く、ツベルクリン液による脱感作により、一部に凝集価の軽度の上昇を見るが、静菌力においては、ほとんどその変動を示さなかつた。これは凝集素価の変動が Slide Cell Culture に反映して、その静菌作用を増強せしめるには、余りにも僅少なためかと思われるが、この点についてはさらに実験を継続中である。

V 結 語

1) 実験的家兎結核症において、ツベルクリン感作赤血球凝集反応と Slide Cell Culture 法による全血静菌力の消長を経過を追って観察したところ、凝集価の上昇に伴い、全血静菌作用の増強を認めた。しかし両者の間に密接な平行関係を認め、特に64倍ないし128倍以上の凝集素価を示す血液においては、その静菌作用は著明であつた。

2) 次にこれら結核家兎をツベルクリン液にて脱感作を行つた結果、ツベルクリン反応は陰転するが、凝集素価は低下することなく、また全血静菌作用の減弱をも証明しなかつた。

(本論文の一部は第27回日本結核病学会総会において発表した。)

稿を終るに当り御指導、御校閲を賜つた沖中教授ならびに北本教授に満腔の謝意を表するとともに、終始御指導、御鞭達を仰いだ長沢博士、本間博士、原沢博士、始め御協力下さつた研究室先輩諸兄に厚く感謝致します。

文 献

- 1) McCutcheon, M., Strumia, M., Mudd, S., Mudd, E.B.H. and Lucké, B.: J. Exp. Med., 49, 815, 1929.
- 2) Arlong, S. and Courmont, P.: Zt. f. Tbk., 1, 11, 1900.
Köppen, A.: Zbl. f. Bakt., 34, 6, 1903.
Karwacki, L.: Zt. f. Tbk., 9, 229, 1906.
Park, W.H.: Zbl. f. Bakt., 1, 7, 1900.
- 3) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tuberc., 21, 370, 1930.

- 4) Hughes, J.: J. Immunol., 25, 103, 1933.
- 5) Middlebrook, G. and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 88, 521, 1948.
- 6) 吉田・原沢: 結核, 29, 55, 昭29.
- 7) 吉田: 結核, 29, 134, 昭29.
- 8) 本間: 結核, 26, 617, 昭26.
- 9) Wright, A.E.: Lancet, 24, 365, 1923.
- 10) Bannermann, R.G.: Brit. J. Exp. Path., 8, 209, 1927.
- 11) Meissner, G.: Zbl. f. Bakt., 106, 210, 1928.
- 12) 今村・渋川: 結核, 11, 209, 昭8.
- 13) 佐藤: 実験医誌, 10, 871, 大15.
- 14) 伊藤種: 結核, 8, 291, 昭5.
伊藤他: 大阪医事新誌, 1, 5, 昭5.
- 15) 渋川・緒方: 結核, 10, 247, 昭7.
- 16) 高橋・芦村: 結核, 8, 312, 昭5.
- 17) 本間: 結核, 27, 1, 昭27.
- 18) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 75, 247, 1942.
- 19) Suter, E.: J. Exp. Med., 97, 235, 1953.
- 20) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 69, 555, 1939.
- 21) 辻他: 結核研究の進歩, 8, 215, 1954.
- 22) 小谷他: 大阪大学医学雑誌, 6, 13, 昭28.
- 23) Koch, R.: Dtsch. med. Wschr., 17, 101, 1891.
- 24) Rich, A.R.: The Pathogenesis of tuberculosis. 2nd Charles G. Thomas (Springfield III), 1951.
- 25) Rich, A.R., Jennings, F.B., Downing, L.M.: Bull. Johns. Hopkins Hosp., 53, 172, 1933.
- 26) Rothschild, H., Friedenwald, J.S. and Bernstein, C.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 54, 232, 1934.
- 27) Siegel, J.: Beitr. Klin. Tbk., 84, 311, 1934.
- 28) Branch, A. and Kropp, G.V.: Am. Rev. Tuberc., 37, 247, 1937.
- 29) Derick, C.L., Branch, E.A.G. and Crane, M.P.: Am. Rev. Tuberc., 32, 218, 1935.
- 30) Pagel, W.: J. Path. & Bact., 44, 643, 1937.
- 31) Clawson, B.J. & Baker, A.B.: J. infec. dis., 56, 297, 1935.
- 32) Boyden, S.V. & Suter, W.E.: J. Immunol., 68, 577, 1952.
- 33) 大原・中川・池端: アレルギー, 1, 29, 昭28.
- 34) Baker, A.B.: Am. Rev. Tuberc., 31, 54, 1935.
- 35) Hughes, J.: J. Immunol., 25, 103, 1933.
- 36) Higginbotham, M.W.: Am. J. Hyg., 26, 197, 1937.