

## 第 43 回 総 会 シ ン ポ ジ ウ ム

## I. 結 核 の 免 疫 と ア レ ル ギ ー

座 長 山 村 雄 一

## The 43rd Annual Meeting Symposium

## I. IMMUNITY AND ALLERGY OF TUBERCULOSIS\*

Chairman : Yūichi YAMAMURA (The Third Department of Internal Medicine, Osaka University School of Medicine)

Reporters : Masahiko YONEDA (Research Institute from Microbial Diseases Osaka University)

Ichiro AZUMA (The Third Department of Internal Medicine, Osaka University School of Medicine)

Shiro SOMEYA (The Institute of Public Health)

Yoshihiro YAMAMURA (National Sanatorium Toneyama Hospital)

Shunsaku ŌSHIMA (Chest Diseases Research Institute Kyoto University)

Mitsuo HORI (Research Institute for Microbial Diseases Osaka University)

In this symposium, we discussed on the chemical investigations of immunity and allergy of tuberculosis.

Yoneda reported the purifications of immunogenic substance which was designated CULF from BCG shaking culture. The CULF consists of protein (70%), lipid (22%) and trace of sugar and nucleic acid. The median survival days of mice vaccinated with 5 mg of CULF in Freund incomplete adjuvant were comparable to those of mice vaccinated with 0.1 mg of living BCG when challenged with 0.015 mg to 0.03 mg of living Ravenel strain.

Azuma described the purification of four kinds of polysaccharides, glucan, mannan, arabinomannan, and arabinogalactan, from defatted cells, culture filtrate and wax D of human tubercle bacilli. In guinea pigs sensitized with heat-killed tubercle bacilli, arabinomannan and arabinogalactan provoked anaphylactic shock when injected intracutaneously; and Arthus type reaction when injected intracutaneously. On the other hand tuberculin active peptide (TAP) showed delayed type skin reaction.

Someya showed the adjuvant effect of wax D fraction of tubercle bacilli using tuberculin active peptide (TAP), bis-diazo-benzidin TAP (BDB-TAP) and PPDs as antigen. In guinea pigs sensitized with TAP or BDB-TAP and wax D subfraction in Freund incomplete adjuvant, tuberculin reaction could not be developed when tested with PPDs, however, when immunized with PPDs and wax D subfraction, tuberculin reaction was developed. The mechanism of development of tuberculin hypersensitivity was also discussed by Someya.

Yamamura reported the effects of desensitization with bacterial cells, culture filtrate, protein C, tuberculin active peptide (TAP), mycolic acid and mycobacterial polysaccharide. Cavity formation and tuberculin reaction were prevented by desensitization with protein and TAP

\* From the Third Department of Internal Medicine, Osaka University School of Medicine, Kita-ku, Osaka, Japan.

fractions but could not be prevented by polysaccharide or mycolic acid.

Oshima and Hori discussed on the passive transfer of delayed hypersensitivity. Oshima showed the possibility of passive transfer of tuberculin allergy by the extract of alveolar exudative cells obtained from sensitized rabbit. Two kinds of fractions obtained from sensitized rabbit and human plasma showed the transfer activity as well as the extract of alveolar exudative cells of sensitized rabbit.

However, Hori reported that it was impossible to transfer the tuberculin allergy by the serum of sensitized rabbit.

## は じ め に

座 長 山 村 雄 一

### Introduction

Chairman : Yuichi YAMAMURA

結核の免疫とアレルギーに関する研究は古くから数多くの研究者によつて行なわれてきており、枚挙にいとまのない程である。このシンポジウムにおいてそのすべてを論ずることは不可能であるので化学的な研究に焦点においてシンポジウムをまとめた。

すなわち BCG に比肩できる防御抗原性物質（米田）の研究は結核の免疫に関するもので、アレルギーに関す

る研究としては沈降抗原または即時型アレルギー反応を惹起する抗原としての菌体多糖体の純化精製（東）、アジュバント活性を有する蠟質の役割（染谷）、空洞形成阻止をパラメーターとする結核脱アレルギー物質としての蛋白またはペプチドの役割（山村）、ツ・アレルギーの受身伝達活性物質の追求と批判（大島、堀）などについて相互に有機的に関連づけながら論ずる。

### 1. BCG 振盪培養より得た可溶性画分の実験的マウス 結核症に対する防御効果

大阪大学微生物病研究所 米 田 正 彦

#### 1. Induction of Protection in Mice by Vaccination with a Soluble Product Derived from BCG Shaking Cultures against Experimental Tuberculosis

Masahiko YONEDA

BCG 生菌によるワクチン接種は、現在、結核菌感染防御における最も有効な手段の一つとして実験的に証明されまた実際にも普及しているが、その反面、この感染防御がいかなる機構で成立するかはほとんど明らかにされていない。しかし、たとえその機構がいかなるものであろうとも、BCG 生菌ワクチンによる感染防御は、結局はその生菌の作る特定の物質ないし物質群の作用に対する生体の反映をあらわすものと考えられよう。したがって、まずこの様な“もの”を見つけ出し取り出してその性格を調べ、感染防御における菌側の物質的背景を明

らかにすることがその機構解明への有力なアプローチの一つとなるものと思われる。

また、この様な方向の研究は、生菌に代わる、しかもより優れた利点をもつ“もの”としてのワクチンを開発するうえで重要な意義をもつものである。われわれは以上述べた如き考え方および意図のもとに感染防御物質の探索を進めつつあるが、最近、BCG の振盪培養から得た可溶性の粗画分が、少なくともわれわれの用いた assay system では、BCG 生菌とおおよそ比肩のできる防御効果を示す事が明らかにされてきたので、まだ研究



Table 3. The Effect of the Size of the Vaccinating Dose of CULF on the Survival of CF1 Mice Challenged with Strain Ravenel

	Vaccinating dose (mg)	Challenging dose (mg)	Median survival day (95% confidence limits)
CULF	0.0	0.015	21
	0.5		—
	1.5		36
	5.0		50 (Approx.)
	15.0		36
	30.0		—
	CULF		0.0
0.5		17	
1.5		19	
5.0		22	
15.0		20	
30.0		19	
BCG		0.1	0.015
	0.1	0.03	23

接種群はすべて非接種群より延命し、更に 5 mg の場合では 0.1 mg BCG 生菌とほぼ同程度の延命効果のあることが明らかとなった。ここで興味ある事実は、それ以上 CULF を増量すると延命効果が減ることである。同様な現象は BCG 生菌(腹腔内接種)による vaccination の場合も観察されている(データ省略)。現在、この現象の機構がいわゆる immunological paralysis によるものかあるいは BCG 菌体や CULF に存在するかも知れない毒性因子が生体の vaccination に対する反応能力を弱めるために起こるものかは不明である。それはともかく以上の結果は、CULF がその適量接種(5 mg/マウス)によつて BCG 生菌(0.1 mg/マウス)とほぼ同等の防御活性を現わすことを明らかに示している。われわれの研究室ではこの assay system で旧ツベルクリン、非加熱静置培養濾液、 $\alpha$ および $\beta$ 蛋白抗原、細胞壁標品

Fig. 1. Density-Gradient Sedimentation Analyses (sucrose; 5.20%) of Ribosome and Ribosomal RNA Prepared from  $H_{37}Ra$  Cells in Hitachi Ultracentrifuge

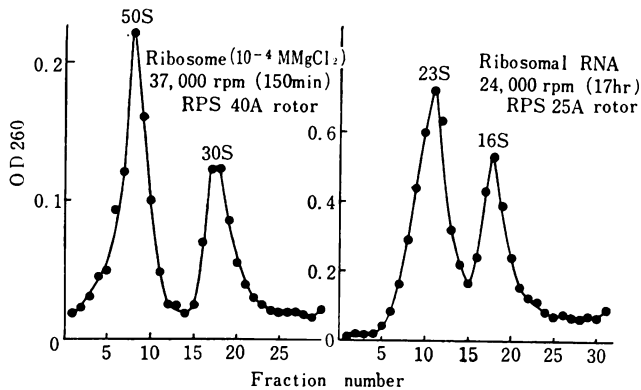
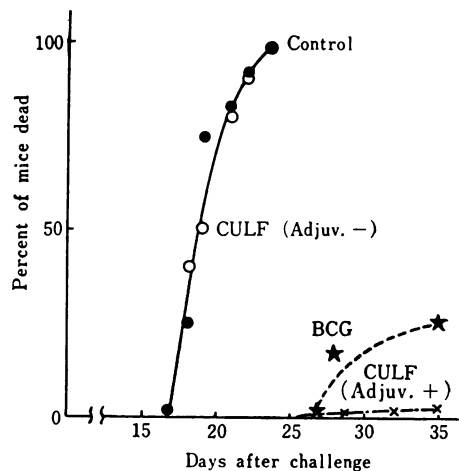


Table 4. Immunogenic Activity of Ribosomal RNA Derived from  $H_{37}Ra$

Vaccine	Vaccinating dose	Challenging dose (mg)	Median survival days (95% confidence limits)
Ribosomal RNA	19 $\mu$ g	0.02	21
	57		21
	190		22
Non-vaccinated			22
BCG	0.1 mg		40 (Approx.)

Fig. 2. Distribution of Cumulative Percent of Deaths of Control & Vaccinated Mice



など種々の結核菌培養画分についてそれらの防御活性を調べているが、現在までのところ CULF のそれに匹敵するものは未だ見つけられていない。最近 Youmans らは  $H_{37}Ra$  菌より得た ribosomal RNA が高度の防御抗原性をもつことを報告している。しかし表 4 に示した様に、われわれの assay system では、 $H_{37}Ra$  ribosomes (図 1 左) 由来の RNA (図 1 右) は、全く防御活性を示さずその接種群は非接種群と全く同じ態度を示した。

2) CULFの防御活性発現における adjuvant の必要性

従来報告されている結核感染防御抗原たとえは Youmans の画分などはその効果の発現に油性 adjuvant の存在が必要であるといわれているが、CULF の場合も全く同様であつて少なくとも Freund の不完全 adjuvant なしではその防御活性は全く現われない。図 2 は、等量の Freund 不完全 adjuvant を添加した CULF および無添加の同標品(それぞれ 5 mg/マウス)で vaccination したマウスの 0.015 mg Ravenel 菌感染後における死亡累積曲線を示したものである。

この図から明らかなように CULF の防御活

性の発現は, adjuvant 添加の有無によつて全く異なり, adjuvant 添加 CULF で vaccination したマウス (×—×) が BCG 接種マウス (★—★) 以上に Ravenel 菌の攻撃に耐えて生残したのに対し, adjuvant 無添加の CULF で vaccination したマウス (○—○) は対照マウス (●—●) と同様, 攻撃後 17 日から 24 日の間に全部結核死した。現在, 燐酸アルミ, 百日咳ワクチンなどの如くいわゆる adjuvant 効果を示すものについて, これらが CULF の防御活性の発現にいかなる影響を与えるかを検討中である。

3) CULF vaccination の感染菌 *in vivo* 発育に及ぼす影響

1), 2) の実験から, 延命効果の点では, CULF (5 mg/マウス) が BCG 生菌と匹敵する防御活性を示すことが明らかにされた。そこで, この防御効果が感染菌のマウス体内における発育に対してどのように反映しているかを調べるために次の実験を行なつた。まずマウス群 (1群 24 匹) をあらかじめ 5 mg/マウスの CULF (Freund の不完全 adjuvant を等量添加) および 0.1 mg/マウスの BCG 生菌でそれぞれ vaccination し, 2 週間後,  $1.8 \times 10^6$  viable units/マウスの対数増殖期にある Ravenel 培養で攻撃した。なお対照として Freund の不完全 adjuvant—振盪培地混合物を注射したマウス(群)も同様攻撃し, 攻撃後 1, 3, 7, 11, 14, 18, 21 および 24 日目にそれぞれの群から 3 匹ずつのマウスを無作為に取り出し, その臓器 (脾, 肝, 肺) 内の viable units を測定した。その結果は図 3 に示した。この図から明らかに, CULF あるいは BCG 生菌接種マウス群では, 攻撃後少なくとも 1 週までは肺内での菌の増殖は全く認められず, 3 週後においてもその数は対照群のそれに比

べて約 2 logs 少ない。同様な実験を 3 回繰返し行なつたが, 実験結果はほとんど一致し, CULF 接種マウス群の肺内菌数は対照群のそれに比べ 1.3~2.0 logs 低い値を示した。脾, 肺における viable units も大体肺におけると同様な傾向がみられる。ともかく以上の結果は, 延命テストにおけると同様, *in vivo* 発育抑制テストにおいても CULF が BCG 生菌と同程度の防御活性をもつことを示している。

4) air-borne 感染による実験的マウス結核症に対する CULF の防御効果

小数の結核菌を噴霧させた閉室内にマウスないしモルモットを放置しその肺に直接, 結核菌の感染を起こさせる方法は, 自然感染に最も近い実験的的手法として推奨されまた 2, 3 の研究者により実際に用いられている。そこでわれわれは, CULF による vaccination がこの様な感染方法で引き起こされる実験的結核症に対しどの程度の防御効果を示すものかを明らかにしようと考え, Smith 教授 (Wisconsin 大学) との協同研究のもとに以下の実験を行なつた。使用したマウスは生後 5 週目の Swiss albino でまずこれらのマウスを 4 群に分け次の如き方法で vaccination した。1) BCG 生菌 (0.1 mg/マウス) を背部皮下に注射, 2) Freund 不完全 adjuvant を背部皮下に注射, 3) CULF-Freund 不完全 adjuvant 混合物 (CULF 5 mg/マウス) を背部皮下注射, 4) 3) の混合物を 2 回, 5 週間隔で注射。以上の vaccination 後 3 週目に下記の如き条件下でマウスを air-borne 感染室に入れ  $H_37Rv$  株による攻撃を行なつた。攻撃菌浮遊液:  $3.45 \times 10^6$  viable unit/ml, 噴霧に用いた菌浮遊液量 1.49 g, 攻撃菌との接触時間: 15 分間。また感染防御効果の判定は感染後 4 週目における肺および脾における viable units を測定することにより行なつた。

その結果は表 5 に示した。この表に見られる様に, CULF 接種マウス肺および脾の生菌数はいずれも対照マウスのそれより少なく, 特に CULF 1 回接種群でのそれは約 1.3 logs 少なく明らかに CULF の防御効果が現われている。また予想した如く CULF 2 回接種ではその防御効果が極めて弱く発現した。ともあれ以上の実験結果は使用マウス, 攻撃菌株さらに感染方法における大

Fig. 3. Change in Viable Units in Lungs of Non-vaccinated and Vaccinated Mice

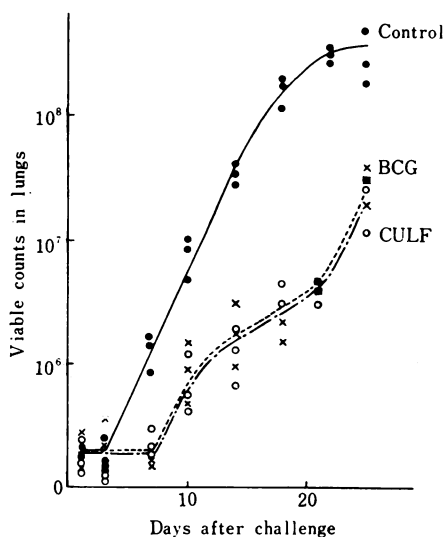


Table 5. The Effect of CULF-vaccination on the Number of Viable Units in Lungs & Spleen after Air-borne Infection (From Dr. Smith date)

Vaccine	Log <sub>10</sub> Lung VC (Mean ± std. dev.)	Log <sub>10</sub> Spleen VC (Mean ± std. dev.)
BCG (0.1 mg)	3.461 ± 1.95	2.180 ± 1.42
Oil (Non-vaccinated)	5.853 ± 0.71	2.857 ± 1.27
CULF once (5 mg)	4.564 ± 1.43	1.918 ± 1.54
CULF twice (5mg × 2)	5.206 ± 0.63	1.907 ± 1.50

Table 6. Immunogenic Activity of Gel-filtration Fractions Derived from CULF-0.05

Vaccine	Vaccinating dose	Challenging dose	Median survival days (95% conf. limits)
CULF-0.05	F 1 39 $\mu$ g	0.02 mg	22
	F 2 60 $\mu$ g		21
	F 3 32 $\mu$ g		30
	F 4 17 $\mu$ g		22
Non-vaccinated			20
BCG	0.1 mg		34

きな違いに拘らず CULF の vaccination によつて感染防御が成立することを示すものとして意義がある。なおこの air borne 感染による実験的結核症での CULF の防御効果については現在さらにその vaccination 量に関し検討しつつあるのでその結果は改めて報告したい。

5) gel-filtration による CULF の分画と各画分の防御活性

種々の濃度の Tween 80 を含む培地で BCG を振盪培養しその全培養から CULF を調製してその防御活性を調べた結果、0.05% Tween 80 を含む培地での培養より得た CULF は、収量が少ない反面、約 100~200  $\mu$ g/マウスの量で従来の CULF (5 mg/マウス) とほぼ同程度の活性を示す場合のあることが明らかにされた(表を省略)。そこでこの新しく開発した CULF (0.05) を原材料とし gel filtration によるその分画を行ない活性画分の分離を試みた。gel filtration は 2×90 cm の sephadex G-200 column で行ない borate phosphate buffer (0.1  $\mu$ , pH 8.3) で溶出した。gel filtration の結果、溶出される画分は 4 つの peak (OD 280 m $\mu$  で測定) となつて elution diagram 上に現われる。そこでそれらの画分を溶出される順に従つて F 1, F 2, F 3 および F 4 画分と名づけそれぞれの画分についてマウス延命テストによる防御活性の測定を行なつた。vaccination および感染の条件は実験 1) と同様である。表 6 はその代表的結果を示した。ここに見られるように 4 画分中 F 3 画分のみが防御活性を示し、この画分で vaccination したマウスではその延命時間(中央値)は、BCG 生菌ワクチンのそれ(34 日)にかなり近接した値(30 日)となつている。しかもこの様な効果を見出す F 3 画分の量がマウス当り 32  $\mu$ g (蛋白として)であることは活性成分の分離を gel filtration によりかなりの程度まで行

Table 7. Some Characterization of F3 Fraction of CULF-0.05

Protein %	Lipid %	Sugar %	RNA %	DNA %	E 280/260
70	22	2.5	0.1	0.1	1.26

The weight of samples was estimated by drying measured volumes to constant weight at 100C. Protein, Sugar, RNA and DNA contents of samples were measured by Lowry's, Scott's, Mejsbaum's and Burton's methods respectively. Total lipid was extracted by Folch's method and the content was expressed as dry weight.

ないうことを期待させるものである。予備的段階ではあるが表 7 に F 3 画分の化学組成を示した。これから判断すると F 3 画分はリポ蛋白が主体となつていられる。さてこの F 3 画分(CULF 0.05 も同様な傾向がみられる)のもつ難点の一つは、標品によつてその防御活性にかなりのばらつきが見られることである。このばらつきがいかなる原因に由来するか現在明らかでないが、原 CULF が常に安定した防御活性を示すことから考えると、原 CULF に存在する F 3 画分とは別の物質がその防御活性の発現に何等かの役割を演ずる、つまり、その共存が必要であるのかも知れない。

以上、BCG 振盪培養から得た可溶性粗画分(CULF)の結核菌感染防御効果についてわれわれが行なつてきた研究結果を要約述べたが、この研究はようやく緒についたばかりで、1) 防御活性の特異性、2) CULF 構成因子の協同作用、3) 防御因子の化学的実体、4) 防御因子と菌体構造との関連性、5) 防御効果と delayed type hypersensitivity との関係などなお多くの未解明の問題が残されている。今後これらの問題について研究を進める考えである。

(協同研究者: 堀三津夫, 山之内孝尙, 福井良雄)

結果の統計処理にご助力下さつた結核予防会大阪府支部、西窪博士に感謝する。

#### 文 献

- 1) Yoneda, M. and Fukui, Y. : Amer. Rev. Resp. Dis., 92 (December, Part 2) : 9, 1965.
- 2) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. . J. Bacteriol., 91 : 2146, 1966.
- 3) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. . J. Bacteriol., 89 : 1291, 1965.

## 2. 結核菌菌体成分とアレルギー —多糖体抗原を中心に—

大阪大学医学部第三内科 東 市 郎

### 2. Chemical and Immunological Studies on Mycobacterial Polysaccharides

Ichiro AZUMA

結核菌菌体成分のうち、蛋白、多糖体、磷脂質、糖脂質(ロウD)、リポ蛋白等が結核の免疫とアレルギーに重要な役割を果たしていると考えられるが、著者は結核菌多糖体の化学的、免疫学的研究に関する最近の知見を著者らの研究を中心に述べる。

#### (1) 菌体多糖体<sup>1)2)</sup>

ヒト型結核菌青山B株の脱脂菌体を1N-NaOH溶液

Table 1. Fractionation of Polysaccharide  
Extracted from Human Tubercle Bacilli  
(Aoyama B strain)

Fraction	Ethyl alcohol added (%)	Polysaccharide recovered	
		Wt(g)	%
1 AB-20	0 ~ 20	1.7	9.5
2 AB-35	20 ~ 35	3.5	19.6
3 AB-50	35 ~ 50	0.3	1.6
4 AB-66	50 ~ 66	3.8	21.3
5 AB-75	66 ~ 75	1.8	10.1
6 AB-80	70 ~ 80	5.1	28.6
7 AB-80 S	Supernatant fluid	1.2	6.7

で70°C, 24時間抽出し、遠心後上清を酢酸で中和し遠心する。上清を流水で4日透析、濃縮後5倍量のエタノールを加えて粗多糖体を得た。粗多糖体を水に溶解し、エタノールによる分画をし表1に示す結果を得た。

各画分はDowex 50, DEAE cellulose カラムを使用してイオン交換クロマトにより精製し、更にSephadex G-75, G-200によるゲル濾過で分画した。精製多糖体の化学分析の結果、Table 1に示すように、各多糖体はほとんど蛋白を含まず、 $[\alpha]_D$ , 構成糖からこれら主としてglucan, mannan, arabinomannan, arabinogalactanの4種の多糖体からなることが明らかにされた。

これら4種類の多糖体の血清反応活性は死菌で免疫して得た兔抗血清について検討された(Table 3)。

Glucan, mannanは沈降反応、間接血球凝集反応等の血清反応において弱い抗原価しか示さなかつたがarabinomannanおよびarabinogalactanは強い血清反応を示した。結核患者における皮内反応でこれら4種類の多糖体はいずれもツベルクリン型の皮内反応活性は陰性であつた。また死菌で免疫したモルモットに対しarabinomannanおよびarabinogalactanを静注すると

Table 2. Chemical Properties of Purified Polysaccharides

Fraction	$[\alpha]_D^{25}$ (in water)	Elementary analysis (%)	Sugar composition (ratio)
1 AB-20 Aa	Turbid	Not analyzed	Glucose Arabinose (trace)
2 AB-35 Aa	+160.9 ( $c=0.943$ )	C, 41.98 H, 6.53 N, trace	Glucose
3 AB-50 Aa	Turbid	Not analyzed	Arabinose (0.6) Mannose (1.0) Glucose (6.7)
4 AB-66 Aa	+81.0 ( $c=1.052$ )	C, 41.56 H, 6.32 N, trace	Mannose Arabinose (trace)
5 AB-75 Aa	+67.8 ( $c=1.055$ )	C, 40.91 H, 6.50 N, 0	Arabinose (1.6) Mannose (1.0)
6 AB-80 Aa	+25.4 ( $c=0.986$ )	C, 40.73 H, 6.67 N, 0	Arabinose (4.8) Galactose (1.0)
7 AB-80 S	+14.1 ( $c=1.101$ )	Not analyzed	Arabinose (6.5) Galactose (1.0)

Table 3. Immunological Activities of Purified Polysaccharides

Polysaccharide	Precipitin reaction (Ag titer) <sup>a</sup>	Complement fixation test <sup>b</sup>	Passive hemagglutination test <sup>c</sup>	Tuberculin activity at 100 $\mu\text{g}^d$
AB-35 Aa (glucan)	1 : 4,000	Not examined	1 : 40	Negative
AB-66 Aa (mannan)	1 : 32,000	Not examined	1 : 160	Negative
AB-75 Aa (arabinomannan)	1 : 256,000	Ag 0.024 $\mu\text{g}$ (Ab 1 320)	1 : 5,120	Negative
AB-80 Aa (arabinogalactan)	1 : 1,024,000	Ag 0.012 $\mu\text{g}$ (Ab 1 640)	1 20,480	Negative

a Antigen titer was determined by the "ring test" using rabbit antiserum.

b Results are expressed as micrograms of antigen necessary for 50% lysis in the system.

c The titer is expressed as the highest dilution of rabbit antiserum which gave positive grade 2+.

d Skin reaction was carried out in the tuberculous patients.

Table 4. Anaphylactic Shock Activity of AB-80 Aa and AB-75 Aa in Sensitized Guinea Pigs

Fraction	Doses (mg)	Symptoms <sup>a</sup>
AB-75 Aa (Arabinomannan)	2	++
	1	++
	1	++
AB-80 Aa (Arabinogalactan)	1	###
	1	###
	0.5	###
	0.5	###
	0.1	###
	0.1	###
	0.05	++

a Symbols: ###, death as early as 5 min after the administration of antigen; ++, guinea pigs did not die despite serious symptoms; +, mild symptoms; -, no symptoms of anaphylaxis.

強いアナフィラキシーショックを引き起こした (Table 4)。

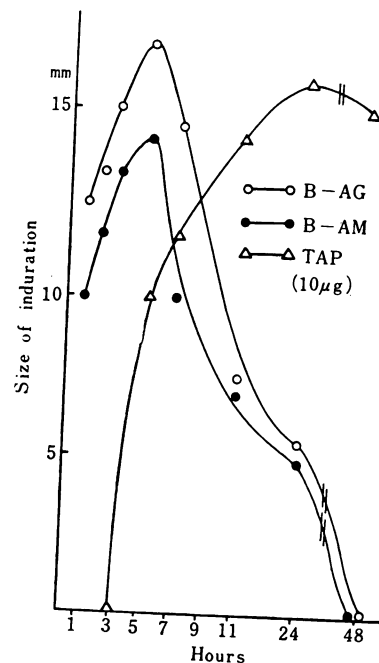
兎抗血清を使用し、モルモットで PCA 反応、逆アナフィラキシーショックの誘起も可能である。死菌で免疫したモルモットおよび兎において arabinogalactan および arabinomannan はアルサス型の皮膚反応を示し、一方山村らの方法で精製した Tuberculin Active Peptide (TAP) では遅延型の皮膚反応を示した (Fig. 1)。

更に著者らはウシ型結核菌 10 株, *M. phlei*, *M. smegmatis*, 非定型抗酸菌 P<sub>1</sub> 株の脱脂菌体についても多糖体を分画し、その化学的、免疫学的性状を明らかにしたが、そのいずれの菌体からも、ヒト型結核菌青山 B 株の場合と同様に glucan, mannan, arabinomannan, arabinogalactan の 4 種多糖体が精製され、arabinomannan および arabinogalactan は強い血清反応活性を示した。またこれらの菌体から精製された多糖体は強い交叉反応を示し、arabinomannan および arabinogalactan はこれら mycobacteria の共通抗原であろうと考えられる。

## (2) 培養濾液の多糖体<sup>3)~5)</sup>

山村ら<sup>3)</sup> はヒト型結核菌青山 B 株の培養濾液のエタノール 50% 沈殿上清から多糖体を精製し、この多糖体が死菌免疫のモルモットに対し強いアナフィラキシー

Fig. 1. Skin Reaction of AB-75 Aa, AB-80 Aa, and Tuberculin-active Peptide (TAP) in Sensitized Guinea Pigs



B-AG: AB-80 Aa (arabinogalactan) purified from bacterial cells of human tubercle bacilli Aoyama B strain. B-AM: AB-75 Aa (arabinomannan) purified from bacterial cells of Aoyama B strain. TAP: tuberculin-active peptide purified from the bacterial cells of Aoyama B strain.

ック活性を有することを報告した。著者<sup>4)</sup>はこの多糖体を更に精製し、arabinogalactan が活性多糖体であることを明らかにした。

最近、著者ら<sup>5)</sup>はヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株の培養濾液を分画し、先に述べた脱脂菌体からの多糖体の場合と同様に、glucan, mannan, arabinomannan, arabinogalactan の 4 種多糖体を精製し、そのうち、arabinomannan および arabinogalactan は免疫学的に活性であることを明らかにした。これら多糖体はすべてツベルクリン活性は陰性であり、感作モルモットに皮内注射すると arabinomannan および arabinogalactan はアルサス型



の皮膚反応を示す。

### (3) Wax D 多糖体

Wax D は mycolic acid, 多糖体および alanine, glutamic acid, diaminopimelic acid 等を主とするペプチドで構成される結核菌の特異な糖脂質であり、免疫反応におけるアジュバント活性、ラットにおける実験的関節点などの生物活性を有することが知られている。

Wax D の化学構造については著者ら<sup>6)</sup>は mycolic acid が Wax D の多糖体の arabinose にエステル結合していることを明らかにしたがその他の構造については明らかでない。著者ら<sup>7)</sup>は今回 Wax D 多糖体の化学的免疫学的性質について検討した。

青山B株 Wax D を田中らの方法によつて無水酢酸でアセチル化後、珪酸カラムでクロマトを行ない、D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> の4画分に分画した。ペプチドは D<sub>3</sub> および D<sub>4</sub> 画分に存在しアジュバント活性も D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> 活性に認められた。青山B株 Wax D においてペプチドを含まない(アジュバント活性を有しない)画分は全体の70~80%にも及ぶ。著者らは D<sub>2</sub> 画分をアルカリ水解し、水溶部を透析後エタノールで沈殿させて得た多糖体を DEAE-cellulose のイオン交換クロマトで精製して得た多糖体について検討した。上記の方法で精製した青山B株 Wax D の sub-fraction D<sub>2</sub> 画分の多糖体は  $[\alpha]_D = +22.2$ , 構成糖として arabinose と galactose を 2.8 : 1.0 の割で含む。本実験で得られた arabinogalactan は死菌で免疫して得られた兔抗血清に対し強い血清反応を示した。Wax D を加水分解して得られる多糖体は中性構成糖として arabinose, galactose のほかに mannose も含む。寒天ゲル内沈降反応で Wax D 多糖体として上記 arabinogalactan のほかに arabinomannan も含まれることが明らかにされた。しかし Wax D 多糖体の大半は arabinogalactan で構成され、mycolic acid は arabinogalactan の末端 arabinose にエステル結合しているものと考えられる。ペプチド部分についてはアジュバント活性発現のためには必須と考えられるがその構造その他の化学的免疫学的性状については明らかでない。

## 総 括

結核菌の培養濾液および脱脂菌体の多糖体を分画し、glucan, mannan, arabinomannan および arabinogalactan の4多糖体を精製した。また結核菌の特異な糖脂質である Wax D の多糖体部分は主として arabinogalactan であり、少量の arabinomannan も含まれることを明らかにした。これら4種類の多糖体のうち、arabinomannan および arabinogalactan は死菌で感作した兔抗血清に対し強い血清反応を示す。免疫モルモットに両多糖体を静注すると強いアナフィラキシーショックを引き起こす。また免疫モルモットに皮内注射するとアルサス型の皮膚反応を示す。Arabinomannan および arabinogalactan は結核菌のみでなく、その他の mycobacteria, 非定型抗酸菌の菌体多糖体としても分画精製され、上に述べた青山B株, H<sub>37</sub>Rv 株から分離される arabinomannan, arabinogalactan と同様の免疫活性を有しており、各菌株の間に強い交叉反応が認められることから arabinomannan および arabinogalactan は mycobacteria および非定型抗酸菌に共通な血清反応、アナフィラキシーショック抗原であろうと考えられる。

## 文 献

- 1) Azuma, I., Kimura, H., Niinaka, T. and Yamamura, Y. J. Bacteriol., 93 : 770, 1967.
- 2) Azuma, I., Kimura, H., Niinaka, T., Aoki, T. and Yamamura, Y. J. Bacteriol., 95 : 263, 1968.
- 3) Yamamura, Y., Okada, Y., Nagamatsu, S. and Imada, T. Amer. Rev. Res. Dis., 91 : 839, 1965.
- 4) Azuma, I., Kimura, H. and Yamamura, Y. Amer. Rev. Res. Dis., 96 : 536, 1967.
- 5) Azuma, I., Kimura, H., Niinaka, T., Aoki, T. and Yamamura, Y. Japan J. Microbiol., 印刷中.
- 6) Azuma, I., Kimura, H. and Yamamura, Y. J. Biochem., 57 : 571, 1965.
- 7) Azuma, I., Kimura, H. and Yamamura, Y. J. Bacteriol., 印刷中.

## 3. 結核菌 Wax 画分のアジュバント効果に関する研究

国立公衆衛生院 染 谷 四 郎

## 3. Studies on Adjuvant Activity of Wax D Fraction of Mycobacteria

Shiro SOMEYA

## I. 研究目的

結核菌体成分特に精製蠟のアジュバント作用に関しては Raffel<sup>1)2)</sup>の研究以来数多くの報告がなされている。Lederer ら<sup>3)4)</sup>および田中ら<sup>5)6)</sup>は人型結核菌蠟質画分(Wax D)の実験動物において卵白アルブミンに対する血清抗体産生, 卵白アルブミンに対する角膜反応さらに動物の脳物質注射による脳脊髄炎の惹起などから, 結核菌体と同様のアジュバント作用を有することを報告し, その化学的構造を明らかにしている。

本研究においては結核菌の各種蠟質とツ活性ペプチド, Bis-Diazo-Benzidin TAP (BDB-TAP) または PPDs とを混合し, これらを用いて, 動物を免疫し, ツ反応の発現状況を観察し, ツ・アレルギー産生の機序について検討した。

## II. 実験方法

本研究に使用した Wax 画分および TAP は人型結核菌青山B死菌体より精製したものであり, BDB-TAP と共に大阪大学山村教授より分与を受けたものである。実験動物としては白色毛, 体重 350 g 前後の♀モルモットを用いた。TAP, PPDs および BDB-TAP は生食水に溶解し, Wax 画分は Arlacel-A (2容) と Drackeol No. 6 (8容) との混合液に溶かし, 水溶液とアジュバントとを等量宛混合, water-in-oil emulsion として, モルモットの大腿筋肉内に接種した。

各種 Wax 画分のうち単独ではツ感作原性を示さない画分を選び, これらと TAP, BDB-TAP および PPDs とを混合し, アジュバントとを混合してモルモットを免疫した。Wax 画分の精製法は表1に示した。

## III. 研究結果

1. Wax 画分のアジュバント効果について実験した。4種類の Wax 画分単独および PPDs 0.1 mg との混合液によりモルモットを免疫し, その後のツ反応発現状況を観察した。その成績は表2および3に示す通りである。表で明らかのように Wax I は単独免疫により著明なツ反応陽転を示したが, Wax III および Wax IV の両画分には著明なアジュバント効果のあることが知られる。

2. アジュバント作用の明らかな Wax III 画分を用い, これと TAP および BDB-TAP との混合液によりモルモットを免疫し, ツ・アレルギーの発現状況を観察した。その成績は表4に示す通りである。表に示すように, PPDs (0.1 mg)+Wax III 免疫モルモットでは明らかなツ反応の陽転が認められたのに反し, TAP (3 mg)+Wax III および BDB-TAP (3 mg)+Wax III 免疫群では全くツ反応陽転は起こらなかった。すなわち, TAP も更に TAP が結合してより大きな粒子となつている BDB-TAP もアジュバント作用の著明な Wax III と混合してモルモットを免疫してもツ・アレルギーを発現しえなかった。

Table 1. Preparation of Wax Fractions

Acetone-dried human tubercle bacilli, Aoyama B strain extraction with alcohol and ether(1:1)			
↓			
Residue			
↓			
Extraction with chloroform			
↓			
Chloroform soluble fraction			
↓			
Filtration through Seitz filter pad			
↓			
Chloroform was evaporated			
↓			
Dried material			
↓			
Dissolved in ether			
↓			
Precipitated with metanol			
↓			
Purified wax components			
↓			
Two extractions with boiling acetone, each time for 4 hours			
↓			
Acetone insoluble material			
↓			
Acetylation for 24 hrs at 37°C with pyriding and anhydrous acetic acid. After cooling precipitation by the addition of 5 volumes of ethanol			
↓			
Acetylated wax fractions			
↓			
Silicic acid-celite (1:1) column chromatography			
Wax I	Wax II	Wax III	Wax IV
Eluted with Benzene	Eluted with Chloroform-methanol (95:5)	// (9:1)	// (8:2)

Table 2. Tuberculin Reactions Elicited by TAP (25 mcg) and PPDs (5 mcg) in Guinea Pigs Immunized Intramuscularly with Various Kinds of Wax Fractions Alone and with PPDs at the 4th and 8th Week after Immunization (1)

Antigen used for immunization (dose)	No. of guinea pigs	4th week				8th week			
		24 hours		48 hours		24 hours		48 hours	
		TAP	PPDs	TAP	PPDs	TAP	PPDs	TAP	PPDs
Wax I (3 mg)	1	7×8	17×18	0	15×11	0	19×14	7×6	12×12
	2	18×14	22×15	14×9	17×13	17×14	16×15	6×6	14×13
	3	11×9	22×14	8×7	14×13	13×12	15×15	11×10	13×12
	4	14×14	13×17	0	16×12	0	0	14×13	12×12
	5	15×14	23×14	11×10	17×16	13×13	12×11	15×13	13×12
	6	15×15	22×18	10×9	18×16	17×16	20×17	14×12	17×16
	7	15×12	21×14	12×10	14×12	0	17×13	0	0
	8	20×19	21×21	17×11	16×16	20×15	15×14	4×4	12×12
	Mean	13.6	18.3	8.0	14.8	9.6	11.9	8.1	11.3
Wax I (3 mg) + PPDs (0.1 mg)	9	17×16*	27×26*	14×12*	24×20*	17×16	23×19	15×14	21×18
	10	14×13	25×23*	11×10	20×19*	15×14	25×19*	14×14	18×17*
	11	18×18*	16×16*	16×12	17×13*	15×11	16×15*	12×12	14×13
	12	19×17	18×17	13×13	17×15*	18×14	21×19	12×12	16×15
	13	17×12	22×16	11×10	19×18*	16×15	16×14*	13×12	17×16*
	14	17×15	25×24*	11×10	18×13*	20×16	21×20	18×17	20×16
	15	18×12	21×20*	11×10	20×16*	16×14	22×17	12×11	16×15
	16	19×16	24×20*	13×11	19×17*	17×15	19×17	14×11	20×19
Mean	16.1	21.3	11.8	17.8	15.6	18.9	13.7	17.0	
Wax II (3 mg)	17	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	
Wax II (3 mg) + PPDs (0.1 mg)	25	10×10	13×12	0	7×7	14×14	15×15	13×10	13×12
	26	5×5	0	0	0	14×13	0	0	0
	27	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	10×10	14×10	0	0	15×12	14×13	9×8	12×12
	29	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	15×13	0	12×10	0
	32	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	3.1	3.1	0	0.9	6.7	2.3	3.9	3.1	
PPDs (0.1 mg)	33	0	0	0	0	13×13	0	0	0
	34	12×12	11×11	9×9	8×7	15×15	0	0	0
	35	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	14×14	15×14	0	0
	38	0	0	0	0	0	0	0	0
	39	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	1.5	1.4	1.1	0.9	5.3	1.3	0	0	

\*: Hemorrhage or necrosis

Numerals indicate the size of induration.

Tuberculin reactions were observed at 24 and 48 hours after injection of TAP and PPDs.

Table 3. Tuberculin Reactions Elicited by TAP (25 mcg) and PPDs (5 mcg) in Guinea Pigs Immunized Intramuscularly with Various Kinds of Wax Fractions Alone and with PPDs at the 4th and 8th Week after Immunization (2)

Antigen used for immunization (dose)	No. of guinea pigs	4th week				8th week			
		24 hours		48 hours		24 hours		48 hours	
		TAP	PPDs	TAP	PPDs	TAP	PPDs	TAP	PPDs
Wax III (3 mg)	41	0	0	0	0	12×10	0	0	0
	42	0	0	0	0	0	0	0	0
	43	0	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0	0	0
	46	0	0	0	0	0	0	0	0
	47	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean	0	0	0	0	1.4	0	0	0
Wax III (3 mg) + PPDs (0.1 mg)	49	15×14	21×20	12×10	18×17	16×15	20×18	16×15	20×18
	50	18×17	24×23	13×10	17×16*	21×16	22×19	14×13	17×16
	51	14×13	12×11	10×9	8×7	13×13	15×14	10×8	12×11
	52	23×16	20×15	8×9	9×7	17×15	15×13	12×12	10×9
	53	17×15	27×22	10×9	19×14	14×12	16×15	11×11	15×14
	54	12×11	22×21	7×7	14×10	17×12	20×13	13×11	16×14
	55	17×15	18×17	12×10	14×11	18×15	19×17	14×13	16×16
	56	16×15	16×16	12×9	14×14	16×14	17×16	14×13	16×13
Mean	15.5	19.1	10.0	13.1	15.8	16.7	12.6	14.6	
Wax IV (3 mg)	57	0	0	0	0	12×10	0	0	0
	58	0	0	0	0	0	0	0	0
	59	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0	0
	61	0	0	0	0	0	0	0	0
	62	7×6	5×5	0	0	0	0	0	0
	63	0	0	0	0	14×14	15×14	0	0
	64	0	0	0	0	11×9	0	0	0
Mean	1.6	1.4	0	0	4.6	3.3	0	0	
Wax IV (3 mg) + PPDs (0.1 mg)	65	19×14	23×22	11×10	16×15	18×14	17×16	13×13	15×12
	66	17×15	22×15	5×5	17×16	17×14	15×13	14×12	14×13
	67	15×14	20×18	19×11	16×14	18×18	17×16	14×13	15×14
	68	16×14	20×19*	11×11	17×16*	18×15	16×15	14×13	15×12
	69	16×11	20×20	8×7	16×15	17×14	19×16	16×14	17×16
	70	20×17	20×20	12×11	16×15	15×15	21×18	13×10	17×15
	71	24×22	20×18	15×12	17×15	18×14	20×20	18×15	18×17
	72	15×15	20×19*	11×10	16×14*	17×16	18×17	14×14	15×14
Mean	17.1	19.8	9.9	16.0	16.1	17.1	13.8	14.9	

\*: Hemorrhage or necrosis

Numerals indicate the size of induration.

Tuberculin reactions were observed at 24 and 48 hours after injection of TAP and PPDs.

この TAP のツ感作原性のないことについてはすでに著者ら<sup>7)</sup> によつて詳細に報告しているところであるのでここでは省略する。

### 3. 考察

結核菌蛋白がツ感作原性を發揮するための条件として蛋白質以外の結核菌体成分の存在が必要であり、その主役は結核菌 Wax D 画分が演じていることについては一

般に認められているところである。

Lederer ら<sup>8)</sup> および田中ら<sup>9)</sup> によれば結核菌 Wax D 画分のアジュバント作用は結核菌多糖体と結合してペプチドを形成している alanine, glutamic acid, meso- $\alpha\alpha'$ -diamino pimelic acid の存在によるものであるという。

本研究において単独ではツ感作原性を示さなかつた量

Table 4. Tuberculin Reactions Elicited by TAP (25 mcg) and PPDs (5 mcg) in Guinea Pigs Immunized Intramuscularly with BDB-TAP (Bis diazo benzidine TAP), TAP, PPDs, BDB-TAP+Wax III, TAP+Wax IV and PPDs+Wax III at the 5th and 7th Week after Immunization

Antigen used for immunization (Dose)	No. of guinea pigs	Observation periods after immunization				Antigen used for immunization (Dose)	No. of guinea pigs	Observation periods after immunization			
		5th week		7th week				5th week		7th week	
		TAP (25 mcg)	PPDs (5 mcg)	TAP (25 mcg)	PPDs (5 mcg)			TAP (25 mcg)	PPDs (5 mcg)	TAP (25 mcg)	PPDs (5 mcg)
BDB-TAP (3 mg)	1	0	0	0	0	PPDs (0.1 mg)	21	0	0	5×5	0
	2	0	0	5×5	0		22	0	0	0	0
	3	0	0	0	0		23	0	0	0	0
	4	0	0	0	0		24	0	4×4	0	0
	5	0	0	0	0		25	0	0	0	0
TAP (3 mg)	6	0	0	0	0	PPDs (0.1 mg) + Wax III (3 mg)	26	17×15	20×20	24×21	28×26
	7	0	5×5	0	0		27	11×11	17×15	24×24	30×25
	8	0	0	0	0		28	12×10	18×17	20×20	24×22
	9	0	0	0	0		29	10×9	21×16	16×15	23×20
	10	0	0	0	0		30	14×13	22×20	23×21	26×25
TAP (3 mg) + Wax III (3 mg)	16	0	0	0	0	Wax III (3 mg)	31	0	0	0	0
	17	0	6×6	0	0		32	4×4	0	0	5×5
	18	0	0	0	0		33	0	7×6	0	0
	19	0	0	0	0		34	0	0	0	0
	20	0	0	0	0		35	0	0	0	0

Wax III: H614-III-2

Numerals indicate the size of induration.

Tuberculin reactions were observed at 24 hours after injection of TAP and PPDs.

(0.1 mg) の PPDs が Wax 画分の存在によつて、ツ・アレルギー産生能を發揮したのに反し、TAP または BDB-TAP ではツ感作原性を示しえなかつたことについて、次の理由が考えられる。その一つは PPDs と TAP とが化学的に異なる蛋白質ではないかということである。この事実は著者ら<sup>9)</sup>がすでに報告しているようにツ反応性、赤血球凝集および溶血反応の抗原性において PPDs と TAP とが異なる性状を示すことから予想されるところである。その2は結核菌蛋白がツ感作原性を發揮するためには、これらが結核菌体内で他の菌体成分と形作つている複合体としての一定の構造が必要であるのではなからうかということである。これらの点についての説明については今後さらに研究を行なう考えである。

本研究は、公衆衛生院動物実験中央研究室山崎省二、小山憲次朗らとの共同研究により実施されたものである。

る。

文 献

- 1) Raffel, S. . Am. Rev. Tuberc., 54 : 564, 1946.
- 2) Raffel, S. . J. Inf. Dis., 82 : 267, 1948.
- 3) White, R. G., Bernstock, L., Johns, R. G. S. and Lederer, E. Immunology, 1 54, 1958.
- 4) White, R. G., Jolles, P., Samour, D. and Lederer, E. : Immunology, 7 : 158, 1964.
- 5) 石橋凡雄・宮田黎子・藤原晋輔・田中国雄・田中渥・杉山浩太郎 : 結核, 41, 506, 1966.
- 6) 田中国雄・黒田吉男・田中渥・古賀敏生・杉山浩太郎 : 結核, 41 : 507, 1966.
- 7) Someya, S., Hayashi, O. and Yamamura, Y. : Am. Rev. Resp. Dis., 86 : 542, 1962.
- 8) Someya, S., Koyama, K., Asami, N., Kataoka, T. and Yamamura, Y. : Jap. J. Microbiol., 10 : 221, 1966.
- 9) Someya, S. and Awano, R. : Am. Rev. Resp. Dis., 96 : 314 . 1967.

## 4. 結核空洞形成阻止と脱アレルギー

国立療養所刀根山病院 山村好弘

## 4. Prevention of Tuberculous Cavity Formation by Desensitization with Various Mycobacterial Components

Yoshihiro YAMAMURA

結核性空洞が侵入した結核菌と宿主に形成された抗体との間のアレルギー反応の結果形成されることは、すでに阪大山村雄一教授および本院の研究陣によつて実験的に明らかにされている。さてツベルクリンを頻回に結核感動物に注射すると、ツベルクリン反応が抑制され、いわゆる脱感作が成立することは Koch 以来述べられてきたところである。そして山口らはこの方法を利用して、家兎にツベルクリンの頻回注射を行なつて、空洞形成が実験的に阻止されることを認めた。今回はこの空洞形成を結核アレルギー反応をあらゆる1つのパラメーターとして、いかなる菌体成分が脱感作にあずかるかを化学的に解析し、同時に空洞形成阻止とツベルクリン反応、血中抗体との関係についても考察を加えたのでここに報告する。

## 1. 各種菌体成分による脱感作 (筋注法)

## 1) 空洞形成に与える効果

動物としては体重 2~3 kg の家兎を用い、8~20 匹をもつて1群とした。そしてこれらの家兎に牛型結核菌三輪株の生菌 10 mg (湿量) または BCG 生菌 50 mg を生理的食塩水 (以下生食水と略記) に懸濁して筋肉内に注射して感作を行なつた。そして 40 日後にツベルクリン反応 (以下「ツ」反応と略記) が陽転するのを確認してのちそれぞれの群について次の如き菌体成分を注射して脱感作を行なつた。まず第1群は結核菌加熱培養濾液 1~2 ml を毎日筋肉内注射、第2群は武谷の法で調製したツベルクリン蛋白  $\pi$  S 3~5 mg、第3群は結核菌より抽出したミコール酸 10 mg、第4群は山村教授より分与された結核菌体より抽出されたツベルクリンペプチドである TAP (Tuberculin Active Peptide) をそれぞれ流動パラフィン (以下流パラと略記) と脱水ラノリン (以下脱ラと略記) 混液 (3:1) に溶解して家兎の筋肉内に1週1回注射した。この場合培養濾液を用いた場合には「ツ」反応の陰性化するのには脱感作を開始してから70日を要するが、第2~第4群の方法では30日で「ツ」反応が陰性化する。そこでこの脱感作により「ツ」反応が陰性化したのを確かめてのち結核加熱死菌三輪株 5 mg を 0.1 ml の流パラ・脱ラ混液に懸濁して家兎の両

側の肺内に注射した。そして 30~60 日後に屠殺剖見した。なお脱感作処置は家兎屠殺時まで継続した。また同様の方法およびスケジュールで感作、肺注を行なつた家兎で脱感作操作を行なわなかつた家兎を対照群とした。その結果は表1に示す如くである。すなわち培養濾液、ツベルクリン蛋白  $\pi$  S、およびツベルクリン・ペプチド; TAPで脱感作した場合には空洞形成の阻止を認め

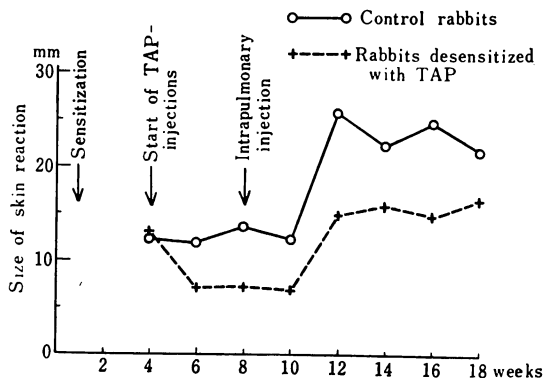
Table 1. Rate of Cavity Formation in the Lungs of Rabbits Desensitized with or without Various Mycobacterial Components

Exptl. No.	Substance used for desensitization	Sacrificed time	
		30 days	60 days
1	None	2/ 5*	4/6
	Culture filtrate	1/ 5	0/6
2	None	6/ 9	2/3
	$\pi$ S	2/11	0/7
3	None	3/ 4	4/4
	Mycolic acid	5/ 8	6/8
4	None	3/ 4	4/4
	TAP	4/10	3/9

Mycobacterial components were injected intramuscularly or subcutaneously.

\* Numerator, number of rabbits which produced cavity in their lungs; denominator, number of rabbits which were used in the experiment.

Fig. 1. Effects of Desensitization with TAP on Tuberculin Reaction



るが、ミコール酸で脱感作した場合には対照と差を認めず空洞形成阻止作用は認められなかった。

2) 「ツ」反応に及ぼす影響

上記実験における TAP で脱感作を行なった家兎と対照家兎との「ツ」反応の平均値の推移は図1に示す如くである。すなわち結核菌の注射により陽転した「ツ」反応は脱感作によつて漸次弱い反応に転じていくが、結核菌の肺内注射によつて再び漸次陽性化する傾向が認められるが、対照家兎に比べて一般に弱い反応を示しているようである。なお  $\pi$ S, 培養濾液で脱感作を行なった家兎でも同様な傾向を認めたが、ミコール酸で脱感作された家兎と対照家兎との間には「ツ」反応の間に大きな差を認めなかった。

3) 血中抗体価に及ぼす影響

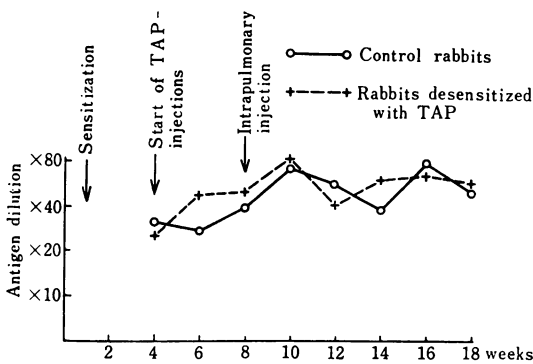
Seibert の蛋白 A を抗原として 100 mcg/ml を  $\times 1$  液として抗原希釈により家兎血清との間に高層沈降反応を行ない、沈降線の認められた抗原の最大希釈濃度をもつて抗体価を表現した。使用した血清は TAP で脱感作された家兎血清と非脱感作対照家兎血清である。その結果は図2に示す如く脱感作群と対照群とは血中抗体価に大きな差を認めなかった。なお培養濾液脱感作群およびミコール酸脱感作群でも同じように対照群と差を認めなかった。したがつて脱感作処置では血中抗体価に全く影響を与えないように思われる。

2. 菌体および菌体成分による脱感作 (静注法)

1) 結核菌体の静注による脱感作

今までの実験成績から培養濾液、ツペルクリン蛋白およびペプタイドでは脱感作が可能であり、空洞形成が阻止されるので更に結核菌体で脱感作が可能かどうかについて検討した。まず対照群は結核加熱死菌 20 mg を流バラ・脱ラ混液 1 ml に懸濁して1週間隔にて2回筋注したのち30日後に人型結核菌  $H_{37}Rv$  株の加熱死菌 5

Fig. 2. Effects of Desensitization with TAP on Circulating Antibody



Tuberculin Protein A was used as an antigen and the sera were obtained from the rabbits desensitized with or without TAP, and the precipitation reaction was observed.

mg を流バラ・脱ラ混液 0.1 ml に懸濁して両側の肺内に注射し、30日後に屠殺剖見して空洞形成の有無を観察した。実験群としては、同様の感作、肺注を行なった家兎に感作前15日前より  $H_{37}Rv$  株の加熱死菌 3 mg を生食水に懸濁して1週間に3回の割合にて屠殺時まで静脈注射を行なった。さらに別の対照群として同様に結核菌の感作・肺注を行なった家兎に結核加熱死菌の代りに *Staphylococcus aureus* 加熱死菌 5 mg を生食水に懸濁して1週間に3回の割合にて同様のスケジュールで静脈注射を行なった。その結果は表2に示す如く結核菌の頻回静注による脱感作を行なった群では対照非静注群に比べて空洞形成は抑制されているが、*Staphylococcus aureus* の静注群では空洞形成の抑制は認められない。このような結果から結核菌体の静注でも脱感作による空洞形成阻止効果は認められ、また *Staphylococcus* の静注ではその効果は認められないことからある程度の抗原特異性のあることが考えられる。なお結核菌の静注により空洞形成が

Table 2. Effects of Repeated Intravenous Injections of Bacterial Cells on Tuberculous Cavity Formation in Rabbits

Bacteria injected	Lesions in the lungs		
	Cavernous	Necrotic	Granulomatous
None	○○○○○ ○○○	○○	
Heat-killed tubercle bacilli	○○○		○○○○○
Heat-killed staphylococcus aureus	○○○○○ ○○	○○○○○	

Fig. 3. Preparation of TAP by Yamamura's Method

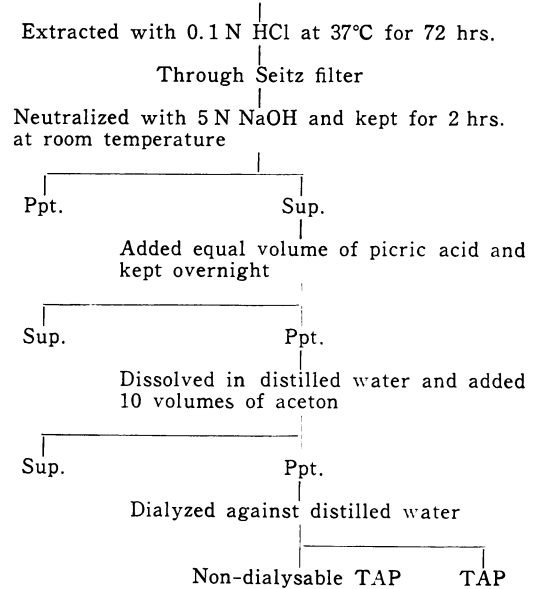






Table 5. Effects of Desensitization by Various Mycobacterial Components on Cavity Formation, Tuberculin Reaction, Circulating Antibody and Other Allergic Reactions

Substance injected	Cavity formation	Tuberculin reaction	Circulating antibody	Allergic reaction
Bacterial cells	↓	↓	↔	+
Culture filtrate	↓	↓	↔	+
Protein C	↓	↓	↔	+
Tuberculin active peptide	↓	↓	↔	-
Mycolic acid	↔	↔	↔	
Polysaccharide (Anaphylactic substance)	↔	↔		(-) in rabbits

例は皆無で、上記のような炎症は認められなかつた。このような結果から結核菌体、蛋白Cでは強いアレルギー反応が認められるが、ペプチドでは全くアレルギー反応は認められないように思われる。

### 3. 総括

今までの結果から脱感作処置にあずかる菌体性分を化

## 5. ツベルクリンアレルギーの transfer

京都大学結核胸部疾患研究所 大島 駿 作

### 5. Passive Transfer of Tuberculin Hypersensitivity

Shunsaku ŌSHIMA

ツベルクリン・アレルギーの passive transfer については Chase 以来多数の研究報告があり、感作動物のリンパ節細胞、脾細胞あるいは腹腔渗出細胞を正常動物に注射することによりツベルクリン感受性を伝達しうることは周知の事実である。ただし、その実験条件としては生細胞を用いることが必須の条件とされ、破壊した細胞材料や抽出液をもつてする伝達は不可能であると信じられていた。

1955年 Lawrence<sup>1)</sup> はヒトの末梢白血球破砕液を用いて初めて「ツ」アレルギーの passive transfer に成功したと報告し、その活性因子を“Transfer Factor”と命名した。この transfer factor (T.F.) についてはその後 Baram ら<sup>2)</sup> による詳細な研究が行なわれ、その結果2種類の活性因子が存在すると報告した。すなわち

学的に分類して、空洞形成、「ツ」反応、血中抗体、アレルギー反応に及ぼす効果を表示すると表5の如くである。すなわち空洞形成、「ツ」反応は結核菌体、培養濾液、ツベルクリン蛋白およびペプチドの頻回注射によつて抑制されるが、ミコール酸、多糖体の注射によつては影響を受けない。そして空洞形成と「ツ」反応の強さはほぼ平行するようと思われる。これに対し血中抗体は脱感作処置によつて全く影響されない。したがつて脱感作にあずかる物質は蛋白またはペプチドであると考えられる。この場合、蛋白を用いた場合にはかなり強いアレルギー反応が現われるが、ペプチドを用いた場合にはアレルギー反応が全く現われなかつた。したがつて脱感作処置によつて空洞形成の阻止を行なう場合には、ツベルクリン蛋白よりもペプチドを用いることが副作用が少なく効果的であると思われる。

本研究にあたりご指導とサンプルの分与をいただいた山村雄一教授およびご協力を賜つた山口寿刀根山病院長に深謝する。

(協同研究者：小川弥栄、仁土賢一、山縣英彦、遠藤一男、山口正民)

adenine, guanine, cytosine を含むが uracil を含まない polynucleotide と、他の一つは rG を含む globulin および RNA に由来すると推定される ribose を含む画分である。したがつて「ツ」アレルギーの passive transfer はヒトに関する限り、細胞抽出液の一定画分を用いても可能であると見なされるに至つた。

一方動物については、破壊した細胞材料中より「ツ」アレルギーの transfer factor を証明したという信頼できる報告はなかつた。1964年我々は BCG 死菌により感作および challenge (死菌静注) を行なつたウサギ(以下“VC ウサギ”と呼ぶ)の肺胞渗出細胞抽出液より「ツ」アレルギーを伝達しうる活性画分の分離に成功して J. Immunology 誌上<sup>3)</sup> に報告した。すなわち細胞を冷凍融解操作により破壊して作製した抽出液をセロフ

Table 1. Summary of Passive Transfer Experiments with Alveolar Macrophages or Those Fractions Obtained from Rabbits Sensitized and Challenged with Heat-killed BCG

1. Living cells	(+)	
2. Disrupted cells (Freezing & thawing)	(-)	
3. Cellular extract (Supernatant after centrifugation 20,000 g, 90 min.)	(-)	
Dialysis through cellophane membrane against distilled water (24 hrs., 4°C)		
Inner fluid	Water-soluble fraction (Supernatant)	(+)
	Water-insoluble fraction (Percipitate)	(-)
Outer fluid	(-)	
4. RNA fraction of cellular extract (Kirby's method)	(-)	
5. Fractions of cellular extract obtained by zone electrophoresis		
α-globulin	(+)	
β-globulin	(-)	
γ-globulin	(-)	
6. "FC 3" of cellular extract obtained by sephadex G 200 gel filtration	(+)	
"PC 1" of FC 3 obtained by sephadex G 25 gel filtration	(+)	
Transfer factor Molecular weight 15,000~70,000 Sedimentation coefficient 3.2 S U. V. absorption maximum at 280 mμ		

ァン膜を用いて蒸留水中で 24 時間透析した後、その透析内液による伝達実験を行なった。実験方法はすべて材料を実験動物の静脈内あるいは腹腔内に注射するいわゆる systemic passive transfer によつた。その結果透析内液投与群では注射後 3 日目に明瞭に「ツ」感受性を認めたが、透析しない同細胞抽出液投与群では反応はすべて陰性の結果を得た。更にこの透析内液に再び外液を添加した材料を投与した動物では「ツ」感受性をほとんど証明しえなかつた。この実験成績より我々は細胞抽出液中には T. F. と共にその活性阻害因子 "inhibitor" が存在し、透析によつて inhibitor が除去されたため透析内液中の T. F. の活性が顕われたものと考えている。したがつて、従来多くの研究報告に見られるように細胞抽出液それ自身による passive transfer がすべて不成功に終つた理由としては、この inhibitor の存在を挙げなければならない。

細胞中の T. F. については殿粉カラムによる分域電気泳動や Sephadex G-200 および G-25 によるゲル濾過による分画実験を行なった結果、表 1 に総括したような成績を得た。すなわち T. F. の本体は低分子の蛋白と推定される。

一方 VC ウサギの血清中からも細胞抽出液中の T. F. と同一と思われる活性因子を分離しえた。すなわち血清

Table 2. Summary of Passive Transfer Experiments with Serum or Serum-fractions of Rabbits

VC: Rabbits sensitized and challenged with heat-killed BCG

V: Rabbits sensitized with heat-killed BCG  
N: Normal rabbits

1.

Treatment		Serum			
		N	V	VC	
Dialysis	Inner fluid	Supernatant	-	-	+
		Percipitate	-	-	-
	Outer fluid	-	-	-	
Control (before dialysis)		-	-	-	

2. Fractions of VC serum

- a. Fractions obtained by zone electrophoresis
  - Albumin (-)
  - α-globulin (+)
  - β-globulin (-)
  - γ-globulin (-)
- b. Fractions obtained by sephadex G 200 gel filtration
  - FS 1 (mainly 19 S macroglobulin) (+)?
  - FS 4 (Molecular weight less than 70,000) (+)
- c. Fractions obtained by sephadex G 25 gel filtration
  - FS 4
    - P 1 (Molecular weight more than 10,000) (+)
    - P 2 (Molecular weight less than 10,000) (-)

The transfer factor found in VC rabbit-serum (FS 4. P 1) and VC rabbit-alveolar-macrophage-extract (FC 3. P 1) seems to be the same.

を細胞抽出液の場合と同様、殿粉カラムによる分域電気泳動あるいは Sephadex G-200 および G-25 を用いたゲル濾過により分画した結果、細胞抽出液の場合と同一の分画 (FS 4-P 1) に T. F. としての活性を証明した。この実験成績を表 2 に総括した。表中に見られるようにこの T. F. は VC ウサギ血清中のみ証明され、正常ウサギ (以後 N ウサギと呼ぶ) や感作のみ行なつて challenge を行なわぬウサギ (以後 V ウサギと呼ぶ) の血清中には証明されなかつたことより、おそらく細胞由来の T. F. が challenge という特殊な処置によつて一時流液中に放出されたものと考えられる。Kochan & Bendel<sup>4)</sup> のモルモットにおける実験で OT ないし OT で感作したヒツジ赤血球を感作動物の静脈内に注射するか、あるいは in vitro で感作細胞を OT で処理すると感作細胞中の T. F. が細胞から遊離するという報告は challenge により細胞から血液中へ T. F. が放出されるという我々の考え方を支持するものとして興味深い。

また血清中には細胞抽出液の場合に認められなかつた

Table 3. Results of Passive Transfer of Tuberculin Hypersensitivity with Dialyzed Human Serum

Donor: Tuberculin positive donors were injected intracutaneously with 0.1 ml of 1:100 OT.

Two days after the injection serum of the donors was collected and dialysed through cellophane membrane against distilled water for 24 hrs. (4°C)

Transfer: Intracutaneous injection of 0.5 ml of the material.

Donor (age, sex)	Recipient (age, sex)	Tuberculin reaction (Diameter (mm) of induration 48 hrs after PPD inj.)					Judge	
		Day of test after injection						
		0	1	3	7	21		
Tuber- culin positive	██████ ♀ 42	██████ ♀ 6	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	—
		██████ ♀ 14	+ 32×25	+ 12×12	++ 31×22	+ 28×20	++ 26×17	+
	██████ ♂ 38	██████ ♂ 6	— 0×0	+ 14×13	++ 16×15	++ 17×15	+ 18×17	+
		██████ ♂ 14	+ 15×15	+ 13×13	+ 18×14	+ 12×12	+ 13×12	+
		██████ ♂ 14	± 6×6	+ 11×11	+ 11×11	++ 22×22	++ 21×21	+
		██████ ♂ 48	██████ ♀ 15	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	—
		██████ ♂ 24	██████ ♂ 9	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	—
			██████ ♀ 10	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	—
Tuber- culin negative	██████ ♂ 1	██████ ♂ 6	— 0×0	— 0×0	— 0×0	*— 0×0	— 0×0	—
	██████ ♂ 3	██████ ♂ 5	— 0×0	— 0×0	— 0×0	— 0×0	± 0×0	—
	██████ ♀ 4	██████ ♀ 4	— 0×0	— 0×0	— 0×0	*— 0×0	— 0×0	—

\* Tuberculin reaction on 10th day.

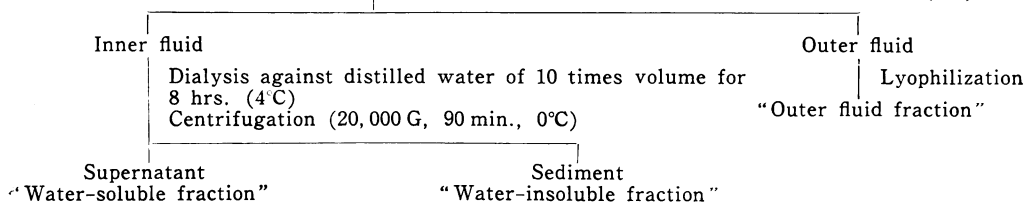
Table 4. Material and Procedure on Experiments of "Inhibitor"

Experimental material:

1. Extracts of alveolar macrophages from rabbits sensitized and challenged with heat-killed BCG
2. Serum from rabbits sensitized and challenged with heat-killed BCG
3. Serum from normal rabbits
4. Serum from normal goats

Starting material

Dialysis through cellophane membrane against distilled water of the same volume with the material for 16 hrs. (4°C)



Test material was mixed with an active fraction containing "transfer factor" and kept in a refrigerator for 24 hours. The material was intravenously injected to normal rabbits. Tuberculin skin tests were performed with 1:10 OT.

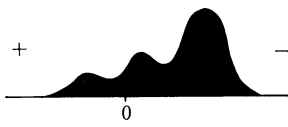
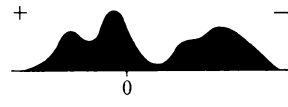
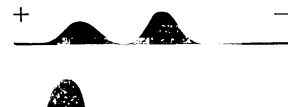
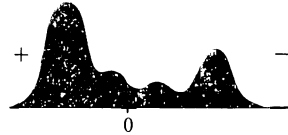
Table 5. Fractionation of Serum Protein Using Ammonium Sulfate

Rabbit serum

Added with half volume of saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (33% final saturation)  
Centrifugation (10,000 r.p.m., 30 min., 0°C)

<p><u>Sediment</u></p> <p>Rinsed 3 times with 33% saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution</p> <p>Dissolved in saline (1/3 original volume)</p> <p>Dialyzed through cellophane membrane against saline</p> <p><u>Fraction A</u></p>	<p><u>Supernatant</u></p> <p>Added 1/3 volume of saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (50% final saturation)</p> <p>Centrifugation (10,000 r.p.m. 30 min., 0°C)</p>
<p><u>Fraction B</u></p> <p>Rinsed 3 times with 50% saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution</p> <p>Dissolved in saline (1/3 original volume)</p> <p>Dialyzed through cellophane membrane against saline</p>	<p><u>Supernatant</u></p> <p>Dialyzed through cellophane membrane against saline</p> <p><u>Fraction C</u></p>

Table 6. Passive Transfer of Tuberculin Hypersensitivity with Fractions of VC Rabbit Serum

Fraction of VC serum	Tuberculin reaction (Diameter (mm) of redness at 24hrs., 1:10 OT)				Judge	Antibody titer (Middlebrook-Dubos haemagglutination)	Electrophoretic pattern (Cellulose acetate electrophoresis)
	Day of test after injection						
	0	1	3	7			
A	18 × 15 ±	—	—	24 × 21 +	±	5120	+  -
	—	—	—	18 × 18 +	—		
	—	—	—	—	—		
B	Immediate type	—	18 × 14 +	25 × 19 +	+	1280	+  -
	Immediate type	—	15 × 10 +	10 × 9 +	+		
	19 × 18 +	18 × 15 +	22 × 20 +	19 × 17 +	+		
C	—	—	—	22 × 20 +	—	80	+  -
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	23 × 17 +	—		
Control (Serum)						10240	+  -

別の因子が FS1 分画すなわち 19S macroglobulin 分画中に証明された。しかし本分画は未だ精製不十分であつて、多量の“conventional antibody”の混在を認め、かつこの分画を注射した動物の反応が典型的な遅延型でなく即時型の混在が疑わしいため、その本体については更に検討を必要とする。

更に我々はヒトにおいても「ツ」アレルギーの T.F.

の検索を行なつた。すなわち「ツ」陽性者を更に OT 皮内注射することにより血清透析内液に T.F. としての活性を証明しえた。表 3 はこの実験成績を示したものであるが、この場合動物実験と異なる点は recipient が長期間 (最長 51 週間) に亘つて「ツ」感受性を獲得することであり、この点では先に Lawrence<sup>1,5)</sup> が報告した成績と同様であつた。

Table 7. Inhibitory Effects of Various Fractions of Cellular Extracts of Serum against Transfer Factor Activity

Material	Tuberculin reaction (Diameter mm of redness at 24 hrs., 1:10 OT)				Judge	
	Day of test after injection					
	0	1	3	7		
Fraction B of VC rabbit serum (30 ml)	“Outer fluid fraction” of VC rabbit serum	— —	— —	— —	— —	— —
	“Water-insoluble fraction” of VC rabbit serum (Sediment)	—	—	18×16 ±	15×13 ±	±
		—	30×22 +	14×22 ±	15×13 +	+
		—	—	20×20 ±	20×20 +	±
	“Outer fluid fraction” (VC serum) + “Water-insoluble fraction” (VC serum)	—	Immediate type	19×12 ±	23×22 ±	±
—		—	19×15 ±	25×25 +	±	
—	Immediate type	—	18×14 +	25×19 +	+	
	Immediate type	—	15×10 +	10×9 +	+	
	19×18 +	18×15 +	22×20 +	19×17 +	+	
Dialyzed alveolar macrophage extract of VC rabbit (5 ml)	“Outer fluid fraction” of VC rabbit macrophage extract (5 ml)	— —	— —	— Immediate type	— —	— —
	“Outer fluid fraction” of VC rabbit macrophage extract (10 ml)	— —	— —	— —	— —	— —
	—	— —	Immediate type 20×20 +	17×17 + 23×20 +	28×24 + —	+ +

以上の実験成績より我々は従来不可能であるかの如く考えられていた細胞抽出液あるいは血清材料による動物の「ツ」アレルギーの passive transfer に成功し、その T.F. についてある程度まで性質を明らかにしえた。一方透析によつて除去される inhibitor については次のような実験を行なつた。

すなわち実験方法としては表4の如く、試験材料を T.F. 活性分画と混合して recipient である正常動物に静脈注射した。注射後前述の transfer 実験と同じ方法で recipient の「ツ」反応を経時的にテストし、注射直後、1日目および3日目の反応がすべて陰性の場合、混合した材料に Inhibitor としての活性があると判定した。

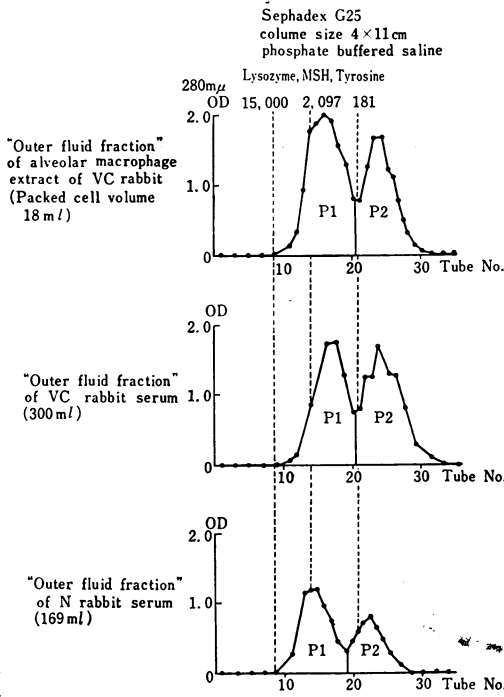
実験動物としてはウサギを用いた。実験成績の確かを期するため、T.F. 活性分画としては VC ウサギの肺胞滲出細胞抽出液透析内液の他に血清硫酸分画 B (1/3 飽和硫酸液中で可溶性で 1/2 飽和液中で沈殿する分画……表5) を用いて両者の実験成績を比較検討した。この血

清硫酸分画 B は表6に見られるように著明な T.F. 活性を有し、かつ conventional antibody の大部分を含む多量の夾雑物が除去されていることが電気泳動や抗体価測定の実験成績から明らかである。本分画を更に蒸留水中で透析した後、その透析内液を T.F. 活性分画として実験に使用した。

細胞抽出液あるいは血清をセロファン膜を用いて蒸留水中で透析すると表4の如く ① 透析内液水可溶性分画(上清)、② 同水不溶性分画(沈殿)、③ 透析外液分画の3分画を得る。このうち②および③の両者について T.F. 活性阻害作用を試験した。その実験成績は表7の如く、透析外液分画に著明な阻害作用を認めながらも拘らず沈殿分画にはほとんど阻害作用を認めなかつた。この血清あるいは細胞抽出液の透析外液中の inhibitor は VC ウサギのみならず、Nウサギ血清やヒツジ血清の透析外液についても認められたことより本因子は免疫学的特異性を有しないものと思われる。

更にこの inhibitor の性質を明らかにするため、Nウ

Table 8.



Transfer factor	Inhibitor	Tuberculin reaction (Diameter mm of redness at 24 hrs 1 : 10 OT)				Judge	
		Day of test after injection					
		0	1	3	7		
"Outer fluid fraction" of alveolar macrophage extract of VC rabbit (Packed cell volume 18 ml)	Subfraction of "outer fluid fraction" of VC rabbit serum	P1	-	24×20+	14×12+	-	+
		P2	-	20×19+	-	-	-
Fraction B of VC rabbit serum (30ml)	Subfraction of "outer fluid fraction" of N rabbit serum	P1	-	17×14±	17×16+	17×15±	+
		P2	-	10×10±	-	-	±
"Outer fluid fraction" of VC rabbit serum (300 ml)	Control		-	12×12+	11×9±	10×9±	+
			-	12×12+	11×9±	10×9±	+
"Outer fluid fraction" of N rabbit serum (169 ml)	Subfraction of "outer fluid fraction" of VC rabbit macrophage extract	P1	-	-	-	-	-
		P2	-	-	-	13×11+	-
Dialyzed alveolar macrophage extract of VC rabbit (5ml)	Control		-	11×10±	14×14+	-	+
			-	11×10±	14×14+	-	+

サギ血清, VC ウサギ血清および肺胞滲出細胞抽出液のそれぞれの透析外液について Sephadex G-25 カラムによるゲル濾過を行なつて分画し, 各分画中の inhibitor について試験した。表 8 はその実験成績を示したものであるが, 各材料についてそれぞれ P1 および P2 と呼ぶ 2 分画を得た。これら各分画による T. F. 活性阻害作用は表の如く, 3 種類の実験材料のすべてにおいて比較的分子量の小さい分画 P2 に著明な阻害作用を認めた。この阻害作用は 100°C 30 分の加熱に安定であり, かつ本因子の分子量が極めて小さいことよりその本体として簡単な化学構造を有する塩類を想像させるのであるが, 本因子が免疫学的特異性を有していないこととあわせ考えて, この因子のみがいわゆる inhibitor のすべてとは考えがたく, inhibitor の全貌を明らかにするためには更に研究が必要である。

以上我々が行なつた「ツ」アレルギーの T. F. および inhibitor に関する実験成績について記述したが, 最近 Dunn & Patnode<sup>6)</sup> は結核感作モルモットの肺胞滲出細胞, 腹腔滲出細胞, 脾細胞および末梢白血球より細胞抽出液を作製し, 我々と類似の方法で Sephadex ゲル濾過により分画して, 「ツ」アレルギーの T. F. として 2 種類の活性因子すなわち分子量 50,000 以下の蛋白様因子と分子量 10,000 以下の RNA 様因子を証明したと報告している。

また Rothman & Lidén<sup>7)</sup> はモルモットを用いて DNCB 接触アレルギーおよび「ツ」アレルギーの T. F.

について実験を行ない, 感作モルモットの血清より分離した IgA の投与により DNCB 接触アレルギーにおいては 6 匹中 6 匹, 「ツ」アレルギーにおいては 6 匹中 3 匹の transfer に成功した。

このような実験報告は, 「ツ」アレルギーにおける T. F. の本体については蛋白あるいは核酸という点で必ずしも一致していないけれども, いずれも感作動物の細胞抽出液あるいは血清より活性因子を分離し, かなりの程度までこれを精製しえたという点で我々の実験成績と軌を一にするものである。T. F. の化学構造を決定できる可能性が現実のものとなつてきた現在, この方向からのアプローチが遅延型反応機構の解明に重要な鍵を提供することを期待している。

文 献

- 1) Lawrence, H.S. : J. Clin. Invest., 34 : 219, 1955.
- 2) Baram, P., Yuan, L. and Mosko, M.M. : J. Immunol., 97 : 407, 1966.
- 3) Tsuji, S., Oshima, S., Oshiro, M. and Izumi, T. : J. Immunol., 93 : 838, 1964.
- 4) Kochan, I. and Bendel, W.L. : J. Allergy, 37 : 284, 1966.
- 5) Lawrence, H.S. : Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive States, Edited by H.S. Lawrence, p. 279, Paul B. Hoeber Inc., New York, 1959.
- 6) Dunn, D.J. and Patnode, R.A. : J. Immunol.,

99: 467, 1967.

7) Rothman, U. and Lidén, S.: Acta derm.-ve-

nereol., 47: 1, 1967,

## 特 別 発 言

## ツベルクリンアレルギーの受身伝達の研究

大阪大学微生物病研究所 堀 三 津 夫

## Studies on the Passive Transfer of Tuberculin Allergy

Mitsuo HORI

Chaseによるツ・アレルギーの受身伝達の成功は、遅延型アレルギーの機作の研究に一つの有力な手段をもたらしたので我々もまた以下のような観点からツ・アレルギーの機作の研究を行なつてきた。

その第1は、ツ・アレルギーの受身伝達には感作動物の生細胞を用いなくてはならないか、もしそうだとするならばその理由は如何、であり、その第2は感作動物の死細胞を用いてもツ・アレルギーの受身伝達が可能なのではないか、もしそうだとすればこの伝達に因する因子を細胞から取り出しえないか、またこのような因子は抗体様物質であろうか、それとも Lawrence のいわゆる transfer factor のようなものであろうか、の問題である。

過去数年来の我々の研究はもつぱら第2の問題に集約されてきたが、結論的にいつて、陽性の成績は得られていない。今日まで得られた成績の主要なものを要約すると以下の様である。

1) 細胞を殺す方法あるいは破碎する方法としては、凍結乾燥あるいは音波による方法が優れているようであり、比較的しばしば陽性の結果が得られたが、冷アセトン処理、凍結融解あるいは単なる蒸留水処理などでは、陽性の成績はほとんど得られなかつた。

2) 死細胞あるいは破碎細胞などでツ・アレルギーの受身伝達を検する実験手技として、Prausnitz-Küstner (P. K.)法を利用することは、資料が少量で済むこと、また比較的高率に陽性成績が得られることから、有用な方法と思われるが、この方法がこの種の研究に果たして適切な方法であるか否かは現在なお明らかでなく、現段階ではあくまで資料が受身伝達をもつ可能性を screening する方法に止めるべきであり、また P. K. 反応の場合には非感作動物の細胞を用いてもあるいはツの代りにブイヨンを用いても、弱いながらも陽性反応が得られることがあるので、この点は常に留意されねばならない。

3) 我々の実験では感作動物の血清を用いてのツ・ア

レルギーの受身伝達は不成功に終わっている。

## 考 察

ツベルクリン・アレルギーの passive transfer の動物実験に際しては、常に少なくとも以下のような諸事項<sup>1)</sup>が考慮されなければならない。

## 1) 能動感作を否定しうるか

市販の実験用小動物にはごく微弱なツベルクリン(ツ)反応陽性を示す動物が含まれており、また旧ツ、PPDなどは弱いながらも動物に対してツ・アレルギー感作能をもつており、recipient の動物に transfer 材料を投与する前後には必ずツ反応を実施しなければならないが、このことによつて動物を active に感作することがないか、更にはまた transfer 材料には微量であるとしても抗原物質が含まれていることも考えられるので、このものが動物を active に感作するのではないか、などが常に考慮されねばならない。ことに感作動物(donor)の細胞破碎物または抽出液、血清などには抗体産生を促進する物質が含有されているとする人もあり、もしそうであるとするならば、recipient の動物にみられるツ・アレルギーが Jones-Mote 型の遅延型過敏症である可能性も考えにいれることが必要であろう。

これらの事柄を考慮すると、この種の実験に用いる抗原(反応原)としては、できるだけ単一物質でしかも動物に対する感作能の極めて弱いかまたは認められない抗原が使用されることが望ましい。この意味において、現時点では、山村教授の tuberculin active peptide (TAP) が反応原として優れていると思われる。

また transfer 材料に抗原物質が混入するおそれの多い challenge という操作(donor の動物の静脈内に結核死菌を注射する)は原則として避けられるべきである。

## 2) Arthus 型の反応を否定しうるか

遅延型アレルギーの抗原-抗体反応では、determinant group の存在よりもむしろ抗原、抗体の蛋白部分の一次

構造が重視されている。したがって体液抗体とは反応し  
がたい抗原によつても遅延型の皮膚反応は惹起される。

結核死菌で感作された donor の動物の体液中には当  
然種々の抗体が存在するから、transfer の材料として血  
清を用いることは好ましいとはいいがたく、むしろよく  
洗滌された細胞材料が用いられることが望ましい。どう  
しても血清を用いることが必要であるならば、recipient  
の動物にみられる皮膚反応に Arthus 型の反応の関与を  
できるだけさけるために、1) の項に述べたような反応  
原が実験に用いられることが必要であり、この場合も血  
中抗体との反応が極めて弱いとされている TAP の使用  
が優れていると考えられる。

なお Arthus 型および遅延型の組織反応は病理組織学  
的にそれぞれある程度の特徴を示す事が知られているの  
で、欲をいえば反応局所の経時的な組織像をあわせて追  
求されることが希望され、単に時間の factor だけで局  
所の皮膚反応が遅延型であると断定することはさけられ  
るべきである。

### 3) 局所の反応の特異性の問題

Passive transfer によるツ反応もその基底は抗原-抗  
体反応であるから、recipient の動物におけるツ反応に  
もこの意味での特異性が求められなければならない。

donor の動物の血清、ことに challenge という操作  
を行なつた後に得られた血清には、ヒスタミン、セロト  
ニン、アセチルコリン様物質など、あるいは Menkin の  
炎衝因子(ネクロシン、リューコタキシンなど) 更には  
血管の透過性を变化させる蛋白性の物質、たとえば  
LNPF (lymph node permeability factor), GF (globulin

factor), PF/dil. (血清を dilution することによつて得  
られる permeability factor), 等々がかなりの量に含ま  
れていることが推測されるので、このような材料を投与  
された recipient の動物では血管系の透過性の変化をは  
じめいろいろの反応性の変化が起こりうることは想像に  
かたくなく、したがって反応原を注射された局所の炎衝  
が非特異的に増強される事もありうると考えられる。こ  
のような場合には局所に注射される反応原が特異物質で  
なくても反応が現われうるので、十分な実験対照をおく  
ことが要望され、また特異反応原もできるだけ単一物質  
あるいはそれに近いものであることが望ましい。また  
challenge という操作も、もしそれが絶対に必要でない  
かぎりには、さけるべきであろう。

更にまた transfer 材料を静脈内に投与する場合は、  
材料の投与と反応原の局所注射との時間的間隔が短時間  
であるから Shwartzman 現象様の反応も考慮すること  
が必要であると思われる。

我々はツ・アレルギーの passive transfer の実験に  
際して、抗体様物質あるいは Lowrence の transfer  
factor 様物質の存在を否定しるものではなく、正直な  
ところ何かあるのではないかという希望を持つて研究を  
続けているが、我々の実験では、先に成績の一端を示し  
たように、donor の動物の腹腔細胞の凍結乾燥標品、音  
波処理破砕物などで一応 transfer ができたとみえるよ  
うな場合もあるが、成績の再現性に乏しく、上記の討論  
のような検討を行なうには遙かに遠い段階というのが現  
状である。



## 第43回総会シンポジウム

## III. 薬剤耐性結核菌感染

座長 内藤 益一 (京大結核胸部研第一内科)  
 報告者 篠田 厚 (九大胸研)  
           青柳 昭雄 (慶大五味内科)  
           大里 敏雄 (結核予防会結研)  
           中井 準 (京大結核胸部研第一内科)  
           川村 達 (国立公衆衛生院)  
 特別発言 後藤 正彦 (国療佐賀)

## The 43rd Annual Meeting Symposium

## III. PRIMARY DRUG RESISTANCE IN TUBERCULOSIS\*

Chairman : Masukazu NAITO (Chest Disease Research Institute, Kyoto University)

Reporters : Atsushi SHINODA (Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University)

Akio AOYAGI (Faculty of Medicine, Keio University, Tokyo)

Toshio OHSATO (Japan Antituberculosis Association, Tokyo)

Hitoshi NAKAI (Chest Disease Research Institute, Kyoto University)

Itaru KAWAMURA (The Institute of Public Health, Tokyo)

Isn't Primary Drug Resistance in Tuberculosis Due to the Infection of Natural Resistant Bacilli?

(Shinoda) Because we can find the marked difference in the frequencies of primary resistance between in the cases of young and old age, we believe, the great part of the primarily resistant cases are due to the infection of acquired resistant bacilli.

Chronological Progress of the Frequency of Primary Drug Resistance in Tuberculosis (SM, PAS, INH)

(Aoyagi) The frequency of at least one drug resistant cases at hospitalization in the data by the "Ryoken" (TB Research Committee supported by the Ministry of Health and Welfare) was 11.9%, in 1957, 15.8% in 1959, 19.3% in 1961, 15.0% in 1963 and 13.9% in 1966.

(Shinoda) For the past eight years we have found the frequencies between 10.6~11.5% and there was no marked difference.

(Ohsato) According to our studies the mean value was 10.8% and we could not find a tendency to increase.

(Nakai) At present we can not find a tendency to increase and the mean value is over ten %.

Chronological Progress of the Frequency of the Cases with Resistant Bacilli as Source of Infection

(Aoyagi) The frequency of the cases with resistant bacilli as source of infection at hospitalization was 54.0% in 1957, 58.1% in 1959, 62.3% in 1961, 65.4% in 1963 and 62.3% in 1966.

(Shinoda) Only recently the frequency is decreasing a little.

\* From Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyō-ku, Kyoto, Japan.

(Ohsato) From 1958 to 1963 the frequency was increasing.

Chronological Progress of the Frequency of Primary Drug Resistance in the Cases with roentgenologically fresh lesion.

(Aoyagi, Nakai) Recently we can not find any increase.

Chronological Progress of the Frequency of Primary Drug Resistance in Young Cases

(Aoyagi) No increasing at present.

Virulence of INH-Resistant Bacilli

(Shinoda) The frequency of primary INH-high-resistance comparing with the frequency of the cases with INH-resistant bacilli as source of infection is especially low.

(Ohsato) The virulence of INH-high-resistant bacilli against guinea pig decreases. Selection of INH-low-resistant or sensitive bacilli is recognized in guinea pigs.

(Kawamura) According to my experiment the virulence of INH-resistant bacilli against guinea pig decreases.

Regional Differences

(Aoyagi) Where the frequency of the cases with resistant bacilli as source of infection is high in Japan, the frequency of primary resistance is also high.

In Okinawa

(Ohsato) From 1963 to 1965 we found there, the frequency of primary resistance was 9.8%, lower than in the inland. However only that of INH-resistance was higher than in the homeland.

(Nakai) In 1967 that of SM-resistance increased and that of INH-resistance and PAS-resistance decreased.

The Difference between in Japan and in Western Countries

(Ohsato) Apparently the frequency of primary resistance in our country is higher than in Western countries, but the laboratory method differs from country to country.

Discussion of the Laboratory Methods

(Kawamura) In the research by the "Ryoken" the drug resistance was tested at several central laboratories in whole country (Bacilli Center) besides testing at each hospital. On the whole the data at each hospital showed higher resistance than those at Bacilli Center.

(Nakai) Following our experiments the data of the drug sensitivity test vary owing to the kind, preparation and perservation of culture medium, preparation of bacilli suspension and inoculum size. We usually take two inocula in sizes,  $10^{-1}$  mg and  $10^{-3}$  mg.

(Shinoda) Actual count method shows a good reproducibility.

Error owing to Incomplete Anamnesis

(Aoyagi) We can not neglect it.

Should the Low Resistance be Neglected?

(Ohsato) The effect of SM is markedly decreased against the tuberculosis of guinea pig, which is infected with 1.0 mcg/ml SM resistant bacilli. But INH is effective against the tuberculosis of guinea pig, which is infected with 0.02 mcg/ml INH resistant bacilli.

(Kawamura) After the triple regimen for four weeks in original treatment, SM resistance was found only in one case among 17.

Niacin Test Negative *Mycobacterium*

(Nakai) 1.2% in 1,049 strains.

Exogenous Reinfection

(Nakai) In our study we found 96 cases, whose tuberculin reactions had been already positive without BCG vaccination before the appearance of the drug. Among them we can find five cases of primary resistance. This fact is highly indicative of exogenously infected cases.

(Aoyagi) We find also always a few such cases.

(Shinoda) We have also some such experiences.

(Goto) Four among 12 cases of primary resistance in employee in hospitals were highly indicative of exogenously infected cases.

The Effect of Chemotherapy in the Cases with Primary Resistance

(Aoyagi) Of course the effect in those cases is relatively low but improved by application of secondary drugs.

Primary Resistance in the Cases without Bacilli in Sputum

(Nakai, Aoyagi) We can find sometimes such cases.

Primary Secondary-Drug Resistance

(Kawamura, Shinoda, Nakai) The frequency of such cases is very low yet, but we must pay attention to the progress.

Prospect of Primary Drug Resistance in Our Country in the Future

(Naito) I wish to summarize the views of all the speakers.

The increase of the frequency of primary drug resistance in the past is without doubt due to incomplete and unsuccessful chemotherapy. But why the frequency remains on the almost same level for several years, it is very difficult to answer.

The decrease of the virulence of INH-high-resistant bacilli might play a part.

However we can not declare that the frequency of primary resistance does not increase in the future.

The conclusions of this symposium are following.

1) We must reexamine the laboratory methods for sensitivity test for the purpose of discussion on primary drug resistance in tuberculosis.

2) All the doctors must agree in the opinion that they should not produce any case with drug resistant bacilli and they should isolate all the cases beforehand, who are afraid to become to discharge drug resistant bacilli.

## 緒 言

座 長 内 藤 益 一

薬剤耐性結核菌感染という問題の持つ意義の内で最も重要なものは、ある患者で今までかつて使われた事のない結核化学療法剤の通常期待される効果が低下ないし消滅している恐れがあるという点であろう。われわれの日常にこれは大変な問題であるが、もしそのような症例がふえてくると、社会的にも結核の治療に重大な支障を来たす事にもなるから、本問題の疫学的研究は一国の結核対策の根幹となるべき資料を提供する事になる。

またこの問題は結核治療術式の効果比較の研究に重大なる誤差の原因となり、旧くしてなお新しい結核の外因性再感染可能性の究明に一つの手がかりを与えるかもしれない。

また薬剤耐性結核菌の人体に対する毒力が感性菌とは変化する可能性のあるものかどうかという、極めて重要

な問題を包含している。

ところで本シンポジウムのメンバー各位の提出された成績は、最初大部分が広範囲の調査結果であり、かつ各位の間に大きな意見の相違がなかつたので、数回に亘る打合せの上、種々のサブテーマにつき成績をまとめてもらいあるいは新しい調査や実験を開始してもらい、この大きな主題を皆で協同して取上げるという事にした次第である。

まずいわゆる一次抗結核薬の耐性結核菌感染の疫学的調査の成績から論じていただきたいと思うが、それに先立つておことわりしておかねばならない事は、本問題を疫学的に検討しようとする場合、治療開始前における喀痰中結核菌陽性例中の未使用薬剤耐性菌検出例すなわち初回耐性証明症例の頻度を取上げざるをえなかつた事で

ある。

さて最初に当面する最も素朴な疑問は、そのような初回耐性例が自然耐性菌感染例ではあるまいかという事であろう。

#### 自然耐性菌か

〔篠田〕現在の未治療耐性例（化療開始前の耐性検査で SM, PAS, INH のいずれか 1 剤以上に耐性を有するもの）が自然耐性菌による感染か、獲得耐性菌による感染かを検討するため、まず未治療例のうち自然陽転時期判明の 46 例についてみると、このうち 8 例の耐性例は全例抗結核剤が本邦で比較的広く常用され始めた昭 25 年以降の陽転者からであった。

これら 46 例中 44 (95.7%) は 25 歳までに自然陽転しており、この結果を全例に敷衍することはいささか危険であるが、少なくとも昭 25 年当時 25 歳以上、すなわち大正 13 年以前出生者の大多数は抗結核剤が常用される以前、いわゆる獲得耐性菌が出現する以前にツ反既陽転であったことが推測される。

この推測に基づき、昭 36 年以降の対象 307 例を大正 13 年以前および以降出生の 2 群に分け、両群の耐性菌感染頻度を比較すると、4.9% (4/82) : 13.8% (31/225) と両群間には 5% の有意水準下に有意差がみられた。

これらのことより、もし耐性菌感染例の全例が自然耐性菌による感染と仮定すると、昭 25 年当時を境としてそれ以後耐性菌感染頻度に有意差を生ずるほど急激な自然耐性菌の増加が発現したことになり、かかることは事実上極めて考えがたいことである。

これよりすれば現在の未治療耐性例はいわゆる獲得耐性菌による感染が主体をなしていると思なすのが妥当であろう。

#### 一次抗結核薬初回耐性頻度の薬剤別、年次別推移

〔座長〕疫学的に日本の一次抗結核薬の初回耐性を最も広範に検索したものとして療研の成績がある。その結果の中からまず薬剤別、年次別推移を取上げる。

〔青柳〕私は療研の成績を中心として、そのうち年次的推移をはじめとする臨床的、疫学的分野を担当して報告する。

療研においては昭 32 年より隔年ごとに入院時薬剤耐性の調査を行なってきたが、昭 41 年度には、入院前化療の有無の再確認をより確実にするために prospective な調査に切りかえると同時に各地区に 15 の菌検査センターを設けて、各施設にて分離された結核菌について耐性検査を再検することとした。

したがって昭 41 年度の入院時薬剤耐性検査成績は、各施設における成績（現地成績）と菌検査センターにおける成績（センター成績）とについて別個に集計を行な

つた。

薬剤耐性の基準は現行医療基準により、医療基準に達しない耐性を低耐性と判定した。

入院前化療を受けたことのない調査対象患者は昭 32 年 772, 34 年 1,094, 36 年 1,004, 38 年 1,501, 41 年 1,783 例であり、耐性例はそれぞれ 92 (11.9), 173 (15.8), 194 (19.3), 225 (15.0), 249 例 (13.9%) である。

したがって化療なし群の年次的推移をみると、昭 36 年をピークにして減少の傾向がみられているといえよう。

しかしながら昭 41 年の 2 剤以上の耐性の頻度は 4.5% で、38 年の 4.4% に比して減少の値を示していない。

薬剤別に耐性の年次別推移をみると、SM では昭 32 年 6.4, 34 年 8.3, 36 年 9.4, 38 年 8.9, 41 年 9.4% であり、PAS ではそれぞれ 6.3, 7.8, 10.2, 7.1, 6.0% であり、INH ではそれぞれ 4.2, 4.2, 6.8, 4.5, 3.8% である。

したがって SM では減少の傾向を示さず、PAS, INH では減少傾向がみられている。

また各薬剤の高度耐性の年次別推移をみると SM では減少を示さず、PAS, INH では著明に減少した値を示している。

〔篠田〕九州大学胸研および関連施設における昭 34 ~ 42 年 9 年間の未治療耐性例頻度は、九大胸研耐性基準（胸研基準：SM 3 mcg 100%, 10 mcg 10%, 100 mcg 1%, PAS 1 mcg 100%, 3 mcg 30%, 10 mcg 10%, INH 0.1 mcg 100%, 0.3 mcg 30%, 1 mcg 10% 以上の耐性分布を示す場合）で 11.3% (47/417), 現行医療基準で 8.2% (34/417) である。

年次的に 34~36, 37~39, 40~42 年の 3 年平均頻度の推移は、胸研基準で 11.4, 10.6, 11.5%, 医療基準で 7.3, 7.5, 9.0% と有意の増減の傾向は認められない。

しかし上記 3 年毎についてみた未治療患者喀出菌集団の耐性菌分布（各例の喀出菌につき対照培地集落数に対する各薬剤耐性培地上的集落数の百分率より、たとえば INH 0.1 mcg 未満の菌、あるいは 0.1 ~ < 1 mcg 等の菌が排菌の何 % を占めるかを算出し、その平均を求めたもの）にはある程度の変動が認められる。すなわち SM 耐性菌 (3 mcg 以上) は 4.7, 3.0, 9.1%, PAS 耐性菌 (1 mcg 以上) は 5.6, 5.6, 7.2% とこの最近 3 年間に共に増加、INH 耐性菌 (0.1 mcg 以上) は 6.5, 7.4, 4.9% と減少の傾向にある。

更に各薬剤耐性菌につきその内容をみると、SM では 100 mcg 以上高耐性菌が 40~42 年の 3 年間に急激に増加しており (34~39 年 0%, 40~42 年 5.3%), PAS では 100 mcg 以上高耐性菌は 37 年頃より姿を消し、SM

とは反対に1〜<10 mcg 低耐性菌が増加し(34〜36年2.7%, 37〜39年4.5%, 40〜42年5.5%), INHでは10 mcg 以上高耐性菌はPAS同様37年頃より姿を消し、次いで1〜<10 mcg 耐性菌が次第に減少の傾向(37〜39年3.7%, 40〜42年1.4%)をみせている。

〔大里〕 昭33〜42年の10年間の都内予防会施設の1,550例の初回耐性は平均10.8%, 年次別には6.3〜13.9%で多少の変動を示すが特に増加傾向を認めることはできなかった。

〔中井〕 演者は昭37年以来、京大胸部研および研究協力施設に入院した未治療肺結核患者の治療開始前の分離菌株を京大胸部研に集めて、同一の方法で耐性検査を行ない、耐性菌感染の実態を明らかにしようと企てた。

後述する様な理由から、演者は耐性検査に常に培地1本当たり $10^{-1}$  mgと $10^{-3}$  mgの2種類の接種菌量を用いているが、いずれの接種菌量の場合も、耐性菌感染の頻度は昭38年を最高としてその後著明な増加が見られず、概ね数十%当りのところで横ばいといつてよい成績である。

#### 感染源とみられる側の耐性の年次別推移

〔座長〕 大体10%から数十%で、少なくとも最近増加の傾向が見られないといえようである。

では感染源と見られる側の患者の内の耐性菌喀出者の頻度は年次別にどう変わっているであろうか。

〔青柳〕 癌研の成績で化療あり群の耐性の年次別推移は昭32年54.0, 34年58.1, 36年62.3, 38年65.4, 41年62.3%であり、逐年的に増加がみられた耐性の頻度は41年度には減少の傾向がみられている。

化療なし群にみられる耐性症例が、化療あり群の耐性症例よりの感染、発病の結果であるとすれば、化療なし群の耐性の頻度は化療ありの耐性頻度によつて大きく左右されることは当然考えられる。そこで化療なし、化療ありの薬剤の濃度別の耐性の率の関係をみると、両群に密接な相関が存することが認められるが、INH高度耐性のみは化療なし群において極めて低率である。化療あり群に比して化療なし群においてINH高度耐性の率のみ低い値を示すことはINH耐性菌の毒力の問題と関連して興味あることであり、この成績は各年次における調査成績において常に認められている。

しかしながら化療なし群の耐性の頻度に影響を与える因子が、化療あり群の耐性の頻度のみであるとすれば、昭36年、38年の化療なしと化療ありの成績は矛盾がみられる。

そこで調査年度の菌陽性者総数でその年度の耐性の総数を除した値を年次別にみると、この年次別推移は初回耐性の年次別推移と同様な傾向を示すことを認めた。

したがって初回耐性の頻度に影響を与える感染源の因子としては、調査年度の化療ありの耐性の率のみでなく、化療あり、なしを含めた耐性の率も問題になると思われる。

〔篠田〕 自宅より入院した既治療患者(感染源群と見なす)の耐性菌喀出頻度は、昭37〜42年の207例中、胸研基準で70.5% (146例)、医療基準では59.4% (123例)で、未治療群に比し $\times 6 \sim \times 7$ の耐性菌保有率である。

3年毎の平均頻度は胸研基準で37〜39年73.3, 40〜42年68.6, 医療基準で37〜39年64.0, 40〜42年56.2%とこの3年間にやや減少の傾向にある。

感染源患者喀出菌集団の3年毎の耐性菌分布率を各薬剤についてみると、SM耐性菌は37〜39年34.9, 40〜42年35.4%と横ばい状態、PAS耐性菌は34〜36年35.7, 37〜39年35.4, 40〜42年22.9%とこの3年間に減少の傾向がみられる。INH耐性菌は他の2剤より高率に存在するが、年次的には34〜36年50.4, 37〜39年と59.6, 40〜42年51.3%と37〜39年に増加したものがこの3年間で再び減少の傾向を示している。

更に各薬剤耐性菌の内容は、SM耐性菌ではこの3年間に3〜<10 mcg耐性菌の増加(37〜39年9.5, 40〜42年18.1%), 100 mcg<耐性菌の減少(37〜39年15.7, 40〜42年6.8%)がみられ、SM耐性菌の横ばいはこの両者の相殺によるものであり、前述の未治療群における100 mcg<高耐性菌の増加とは逆の推移にある。PAS耐性菌では100 mcg<耐性菌の逐年的減少(34〜36年7.1, 37〜39年4.9, 40〜42年2.4%)がみられ、また1〜<10 mcg低耐性菌が40〜42年の間に前3年間に比し著明に減少(37〜39年22.9, 40〜42年12.9%)し、これも未治療群とは逆の現象にある。INH耐性菌は各程度耐性菌共37〜39年に増加したものが40〜42年にはやや減少の傾向にあるが、いずれの年次にあつても未治療群とは異なり10 mcg<高度耐性菌の高率な存在がみられる。(34〜36年15.2, 37〜39年19.4, 40〜42年17.9%)

#### 厚生省結核実態調査成績よりみた耐性菌感染の分析

〔大里〕

在宅治療中の感染性患者は33年→38年は123,000→73,000であり、このうち耐性を有する例は55,000→40,000と推定されるが、在宅感染性患者は566,000→284,000と減少著しいため、在宅感染性患者中の耐性菌保有率は9.7%→14.1%に増加していると推定される。しかし薬剤別にみるとSM耐性は1.5倍に、PAS耐性は1.1倍に増加したがINH耐性は3倍に激増していると考えられる。INH耐性菌に毒力の低下があるとすれば上記の耐性率の増加は耐性菌感染の増加に結び付かない。

い可能性がある。また年間の新発生は29年0.37, 34年0.23, 39年0.17と減少しているが、新発生の年齢構成は漸次高年齢に移行しており、これは初回耐性を低下させる方向に作用している因子と考えられる。

〔座長〕 もちろん感染と菌検出との間の年月は千差万別であろうから、対象をせばめてツ陽転後比較的短期間の初回耐性頻度の年次的変遷を見たかったが、適当な調査成績がなかった。次善の手段として、比較的新鮮なX線の病型を選んで見ていただく事と若年者と小児における初回耐性頻度を年次別に見ていただくことにした。

#### 新鮮病型における初回耐性の年次別推移

〔青柳〕 昭41年の調査成績で学研病型別に初回耐性の頻度をみると、A型においてはB型、C型よりもやや高率であり、センターの成績ではこの傾向は更に明らかとなる。

発病より発見までが比較的新しいと思われる学研ABE型ならびに非硬化壁空洞を有する症例のみを選び、耐性の年次別推移をみたが、これらの群に特に高率となる傾向は認められない。

〔中井〕 学研分類のA、B型で硬化壁空洞を持たない症例を、比較的新鮮な病巣を有するものとして選り出して、耐性菌感染の頻度を検討すると、古い病型をも含めた場合よりも、耐性菌感染の頻度は高くなる。しかしその年次推移はやはり増加の傾向がみられない。

#### 年齢別初回耐性の年次別推移

〔青柳〕 治療なし群の耐性状況を年齢別に年次的にみると、各調査年次においては若年者は一般に高率で高年者は低率であるが、若年者において年次別に増加を示す傾向は認められない。

治療あり群では逆に高年者に高率であることが認められている。

#### 小児における初回耐性

〔大里〕 12歳未満の未治療小児結核例より分離された結核菌を全国の参加施設より集め一次3剤の耐性検査を実施しているが、耐性例については治療歴の再調査と耐性の再検査を実施するようにし、その結果対象より除外されたものもあるが、現在までの95例のうち13例13.7%に初回耐性が認められた(医療基準)。

うち1剤耐性11.6、2剤耐性2.1%で、薬剤別にはSM 7.4、PAS 5.3、INH 3.2%を示した。感染源は約2/3の例において判明しているが、患児と感染源の発見がほぼ同時期の場合は23例中に患児の耐性を認めたものはなく、これに比し患児の結核発見前から感染源であったもの一多くは治療歴があると思われる一では12例中7、58.3%の小児に耐性が認められた。感染源の菌の耐性の判明している例における耐性と小児側の耐性との関係を見ると、治療歴のある8例ではPASおよびSMの耐

性はかなり密接な関連が認められたが、INHの耐性は小児側において少なく、ほとんど関連は認められなかった。未治療感染源で耐性のない例および、既治療例でも耐性のない場合には小児の耐性を認めたものはなかった。感染源の結核自覚率は34.3% (発見時期明らかな35例中12)で、38年実態調査の感染性患者の自覚率58.2%より低く、小児結核の発生には家族的、社会的因子の関与する可能性が考えられた。そこで都内対象2例の家族、住居、収入などの調査を管轄保健所の協力の下に実施した。このうち5例は日赤産院の集団発生例であるが、これを対照として他の27例の状態をみると、偶発発生27例では、アパート居住、1部屋のみ、8畳未満のものの率が高く、家庭年収入は50万円未満の率が高く不良な社会条件に偏つていると思われる結果が得られた。これらの成績は年次別に比較できるほどの症例数に達していないので年次別の分析はさしひかえる。

#### INH 耐性菌の毒力の変化

〔座長〕 以上種々の角度から見て、初回耐性頻度はある所まで上昇して、現在は横ばい、あるいは多少低下の傾向が見られ、少なくとも次第にふえる傾向は窺われない。これが何によるものか、そして将来の見通しはどうか、これこそ本シンポジウム最大の課題であろうが、これについては最後にメンバー各位のご意見をまとめる事にするが、ここに1つ極めて重大な問題が既に現われている。すなわち療研の成績をはじめとして、既治療患者中のINH高度耐性群の頻度に比べて未治療患者中のINH高度耐性群の頻度が目立つて低い事である。この説明の1つの可能性としてINH耐性菌の毒力の変化という問題が浮び上がってくるのである。

〔篠田〕 INH高度耐性菌の「ひと」に対する毒(菌)力を昭34~42年の9年間に我々が対象とした感染源群および未治療群の耐性菌分布率比の点より検討した。

各薬剤別にみた「未治療群」対「感染源群」の耐性菌分布率比はSM 1:5.4 (6.5%:35.2%)、PAS 1:4.8 (6.4%:30.4%)と両者はほぼ類似の値を示すが、INHでは1:9.1 (5.9%:53.4%)と未治療群の耐性菌分布率は感染源群に比しSM、PASより有意差を以て低率である。更にこの低率の原因がどの程度のINH耐性菌によるものであるか検討すると、INH 0.1<1mcg耐性菌では1:6.7 (3.7%:24.7%)、また1~<10mcg耐性菌では1:6.3 (1.8%:11.4%)とSM 3~<10mcg耐性菌(1:5.5)、10~<100mcg(1:7.8)、100mcg<~(1:4.2)、PAS 1~<10mcg耐性菌(1:3.6)、10~<100mcg(1:6.7)、100mcg<~(1:9.2)とほぼ同様の値を示すが、INH 10mcg<~耐性菌では1:43.3 (0.4%:17.3%)と未治療群にあつては感染源群

に比し極めて低い分布率を示しており、INH 耐性菌分布率比の低率である原因は 10 mcg 以上高耐性菌に起因するものであることがいえる。

未治療群において回収された菌が感染源群の保有する菌によつて感染が行なわれた代表であると思なし、かつ各耐性菌の「ひと」に対する感染あるいは感染より発病に至るまでの態度がほぼ同様であると仮定するならば、未治療群対感染源群の各薬剤各耐性菌の分布率比はほぼ同値を示すことが予想され、現に INH 10 mcg 以上耐性菌以外はほぼ同率比を示している。しかるに INH 10 mcg 以上耐性菌のみが有意差を以て低比率であることは「ひと」に対する感染および発病に至るまでの態度が SM, PAS 耐性菌あるいは INH 10 mcg 以下の耐性菌に比べ異なることを示唆するものであり、これを比較的漠然と菌の毒力と見なすならば、少なくとも INH 10 mcg < 耐性菌は「ひと」に対して毒力(菌力)が低下しており、「ひと」に対して感染を起こしえないか、あるいはたとえ感染を起こしたとしても「ひと」の体内で淘汰されやすく、すでに発病時には回収されえないのではないかと推測される。

(注：今回は INH 0.1, 1, 10 mcg の3濃度段階につき検討を行なつていたので、上記の結果を得たが、未治療患者耐性検査において、すでに 3~5 mcg 程度に集落の発育をみるのが少なく、この程度の INH 耐性菌においても毒力が低下していることが予想される)

〔大里〕初回耐性において INH 高度耐性例の少ないことは興味のあることであるが一予防会の成績でも INH 耐性例中の6%が 5 mcg 完全耐性であつたが SM 耐性例中の 54% が 100 mcg 完全耐性を示した—この原因につき幾つかの仮説を設定し実験を行なつた。

1. 感染源における INH 5 mcg 完全耐性は必ずしも少なくないが、ルチンの検査では完全耐性とされた場合でも full population でないことが多いのではないか—という仮定の下に 5~9 株について SM 100 mcg 完全耐性株と比較して population を調べたが、INH 耐性株に full population でない株が多いという成績は得られなかつた。

2. INH 耐性菌の reverse mutation の可能性の検討：INH 5 mcg 完全耐性菌の感染を受けても体内で reverse mutation が起こり、発見時の菌は低耐性として表現される可能性を仮定し、in vitro, in vivo の実験を行なつた。in vitro で SM・INH 2 剤耐性菌(Schacht 株)の微量(推定 1.4 個)の継代培養を行なつた Dubos 培養菌液 10 本について SM, INH の耐性分布を調べたが、reverse mutation は認められなかつた。in vivo ではこの株と INH 50 mcg 耐性  $H_{37}Rv$  の2株をモルモット(皮下 1 mg), マウス(0.1~0.001 mg 静脈内)に接種し 9 カ月まで観察したが、9 カ月でモルモット臓器

から菌の分離されたものはなく、マウスでは肺から多数の菌が分離されたが reverse mutation は認められなかつた。

3. INH 高度耐性菌の実験動物に対する毒力の検討：前述の保存株 2 株を接種したモルモットでは内臓に肉眼病変を認めず毒力は明らかに低下していたが、マウスでは肺に進行性病変を認め 9 カ月でも多数の菌が分離され、両種動物に対する毒力は異なつていた。患者分離の 50 mcg 耐性の 6 株を接種したモルモットでは明らかに肉眼病変を認めたが、感性株に比し軽度であり、かつ菌株間の差が著明であつた。50 mcg 完全耐性株を接種したモルモットの臓器内の菌の INH 耐性は変動を示さなかつたが、1 mcg 100%, 5 mcg 74%, 50 mcg 7.8% 耐性株を接種したモルモットの臓器内菌の耐性は明らかに低下を示し(肝内菌—1 mcg 15.4, 5 mcg 13.2, 50 mcg 2%, 肺内菌—1 mcg 0.4, 5 mcg 0.2%, 脾内菌—1 mcg 0.2, 5 mcg 0.2%), 低い耐性への selection がみられた。

4. INH 高度耐性菌のモルモットに対する毒力を増強する試み

(1) 菌の条件を変化させた場合

(a) 5% CO<sub>2</sub> 下で 3 代培養した INH 50 mcg 耐性  $H_{37}Rv$  の皮下、吸入感染を行なつたが毒力の増強は認められなかつた。

(b) 5% CO<sub>2</sub> 培養菌と普通培養の前記耐性菌をマウスに静脈感染し、4 週後肺を均等化した濾液—in vivo 菌—をモルモット皮下に接種したが毒力の増強は認められなかつた。

(2) 動物の条件を変化させた場合

(a) プレドニゾロン投与：前述保存耐性 2 株を接種し、1 月後より 1~2 月間プレドニゾロンを投与し 9 カ月まで観察したが内臓病変の形成は認められなかつた。

(b) ツベルクリン感作：INH 50 mcg 耐性  $H_{37}Rv$  株皮下接種ではモルモットの臓器に肉眼病変を認めなかつたが、3 週間注射(100 倍 OT 0.2 ml→10 倍 OT 1 ml に漸増)—感染—ツ統行 3 週剖検, 3 週間注射—感染—放置 6 週剖検, 1 週間注射—感染—ツ統行 6 週剖検, 感染—10 倍注射 6 週剖検の各群では肺あるいは肝に肉眼病変を認めたものがかなりあつた。

結論：以上の実験成績から、INH 高度耐性菌の毒力の低下(したがつて感染発病には生体側の条件が必要と思われる)、生体内での低い耐性への selection などの因子が影響し、その結果として、INH 高度耐性菌の感染が少なく表現されているものと考えられる。

未治療結核患者から分離した INH 耐性菌のモルモットに対する毒力〔川村〕

初回耐性の研究(療研)で演者の手許に集められた約

1,000 菌株 (関東甲信越) の中から、感性菌 1 と INH に種々な耐性を示した 5 菌株を選びモルモットに対する毒力を検討した。

#### 1. 静脈内感染後早期における脾内増殖

感染翌日の脾の v. u を 1 とし、12 日後のそれを見ると、感性菌では約 300 倍になつており、われわれの従来の実験の強毒菌のそれにほぼ一致する。

これに対して 0.1 mcg 不完全耐性菌株は約 70 倍、1 mcg 不完全耐性菌株は約 50 倍、1 mcg 完全耐性菌株は約 25 倍、5 mcg 不完全耐性菌株は約 20 倍であつて、この範囲では耐性と増殖速度の平行関係は顕著であつた。

ただ、1 mcg 完全耐性菌株のみはその順序をはずれ約 10 倍に止まつたが、この菌株が、培地内でも発育がかなり悪く、集落がやや滑であることとも関係すると考えられる。

#### 2. 皮下感染後 6 週の剖検所見

前記の 6 菌株について見た剖検所見の強弱は、前項の増殖速度と平行関係にある成績が得られた。しかし、増殖速度、剖検所見とも最低であつた 1 mcg 完全耐性の菌株でもかなりの病変を作つており、感染発病を起こすに必要な毒力は保持されているというべきものと考えられた。

#### 3. 初回耐性例に INH 高度耐性菌が少ないことに関する考察

5 mcg 完全耐性菌株は、上記 6 菌株の母集団である約 1,000 菌株にはなかつたのであるが、体内増殖速度がより一層低下しているとすれば、BCG や SM 依存菌のそれとも考えあわせると、宿主の特殊な抵抗力の減弱などを前提としなければ、発病の機会は当然極めて低率になるものと考えられる。

#### 初回耐性の地域差

〔座長〕 以上 INH 耐性菌の毒力について示唆に富む研究成績が提出されたが、次に初回耐性の地域差を取上げる。

#### 療研成績における地区別耐性

〔青柳〕 昭 41 年調査において最も低率な地区は東北で、最も高率な地区は近畿であり、この傾向は化療なし、化療あり群共に認められる。したがつて化療なし群の耐性は化療あり群よりの獲得耐性菌による感染・発病であることが推定される。

#### 沖縄における初回耐性

〔大里〕 昭 38 年 4 月～40 年 6 月に未治療例から分離された菌の耐性は 184 例中 18、9.8% (6 週判定—医療基準) で、同時期の予防会の 11.5% に比しやや低い。SM 耐性 2.7、PAS 3.3、INH 5.4% で予防会の成績に比し SM、PAS 耐性は少なく、INH 耐性率は高い。1

剤耐性は 8.7% で予防会の 8.2% と大差はないが、多剤耐性は 1% で予防会の 3.3% に比し低かつた。

〔中井〕 那覇保健所のご協力により、昭 41 年の暮から 42 年夏頃までに、沖縄の主として那覇市およびその周辺の未治療患者から得られた菌株を、京大胸部研に集めて耐性検査を行なつた。この成績を 42 年の内地の耐性菌感染頻度と比較すると、SM はほぼ同じ、PAS、INH は内地より低頻度であつた。更に 38～40 年に大里博士が沖縄の耐性菌感染をお調べになつた成績と比較すると、SM は増加、PAS は減少、INH はやや減少という成績である。

#### 欧米各国における初回耐性成績

〔大里〕 欧米の代表的文献は英 (M. R. C.) の 4.1%～仏 (Canetti) の 9.8% の開きがあるが、ほぼ同時期の療研の 15% に比し低い耐性頻度を示している。欧米の耐性基準は日本より低いが、培地を含めた手技を同一にして検討する必要がある、頻度のみを比較することは無理であろう。

#### 耐性検査法の吟味

〔座長〕 国が代われれば耐性検査法も違う。どこが多い、どこが少ないという前に検査方法を吟味しなければなるまいと思われる。それを含めて耐性検査法そのものを吟味していただくことにする。

#### 一次 3 剤に対する初回耐性の研究 (療研) における耐性検査の再検査成績 [川村]

療研の前 4 回の成績はすべて全国 70 の参加入院施設がそれぞれに実施した日常検査成績の集積であつた。欧米の 1 研究室に菌株を集めての報告に比し、この点に精度の上での問題を指摘されることがあつたのは止むをえない。この点を解明するため、療研は 5 回目にあたる今次研究では、全国 15 の専門研究機関を菌検査センターとし、これに全菌株を集めて耐性検査再検査を行なつた。

ここでは、入院施設の日常検査成績とセンターの再検査成績が照合しえた 1,320 菌株について両成績の相互関係を中心とする報告を行なう。

#### 1) 耐性検査再検査の方法について

検査方法はほぼ検査指針によるものであるが、継代に小川培地・Dubos 培地のいずれを用いるか、耐性検査を通気の有無いずれの条件で行なうかは各センターの選択にまかされた。しかし得られた耐性度分布は、継代培地の種類 (菌液作製法) および通気の有無による差を全く示さなかつた。

また対照培地の発育菌量も、かなりの幅 (接種生菌単位で 25～10 万前後に及ぶ) があつたが、3 剤共それによる耐性度分布の差はみられなかつた。



Table. Correlation between the Results of Resistant Test of Hospitals and Central Laboratories

SM		Centre		Hosp.		Total	
	100 Complete	100 Incomplete	10 Complete	10 Incomplete	Susceptible		
100 Complete	30	9	1	3	3		46
100 Incomplete	5	6		1	7		19
10 Complete	4	5	8	13	21		51
10 Incomplete	1	2	3	6	50		62
Susceptible	1	1	7	15	1,128		1,142
Total	41	23	19	38	1,199		1,320

INH		Centre		Hosp.		Total	
	5 Complete	5 Incomplete	1 Complete	1 Incomplete	0.1 Complete	0.1 Incomplete	Susceptible
5 Complete	1	3					2
5 Incomplete		1	1	3	1	1	13
1 Complete	1		3	4	1	2	2
1 Incomplete			3	3	1	5	19
0.1 Complete		1		3	7	12	21
0.1 Incomplete			1	1	8	11	57
Susceptible		2	2	4	9	37	1,074
Total	2	7	10	18	27	68	1,188

PAS		Centre		Hosp.		Total	
	10 Complete	10 Incomplete	1 Complete	1 Incomplete	Susceptible		
10 Complete	2	8	1	1	1		13
10 Incomplete	1	11			4		26
1 Complete		4	1	8	14		27
1 Incomplete		6			16		89
Susceptible		8			18	1,117	1,143
Total	3	37	2	47	1,231		1,320

2) 両成績の相互関係

相関表に示すように、3剤共全体としては両成績がよく一致しているが、極端に食い違っている例もあり、一

般に、入院施設成績の方が高い耐性を示す傾向がみられる。

この相関表で一段違いまでを一致としてみると、一致率は3剤共95%前後の高率となる。

また医療基準の線で見ると、入院施設成績が基準以上であつたのにセンター成績では基準より低くなつた例は、SMでは116例中41.4%、INHでは39例中74.4%、PASでは66例中57.6%で、INHに特に高い。その逆の、センター成績で基準以上になる例は3剤共1%程度の低率であつた。結局医療基準の線での初回耐性の率は、SMでは8.8%と6.3%、INHでは2.9%と1.4%、PASでは5.0%と3.2%となり、3剤総合でも12.8%と8.5%であつて、いずれもセンター成績の方が低い。両成績の差の原因としては、センター成績は、すべて間接法であること、継代が2代前後多いこと、耐性検査培地保存期間が1週以内に限定されていることがあげられよう。

なお現行の耐性検査は再現性という面からみた場合、感性例では99%に及ぶ高い信頼度があるが、耐性となつた例にはかなり慎重な態度で対処する必要があることにならう。

3) 対象菌株の選定ないし検査条件を変化させた場合の初回耐性の率の変化について

療研の成績には、2週程度までの短期間治療を受けた患者の菌も、従来の成績に差がみられなかつたために含まれてきた。しかし今回の研究では、薬剤別でも3剤総合でも、治療全くなしのものよりも高い傾向がある。

すなわち青柳の報告にある1,783例の入院施設成績は13.8%であるが、そのうちの治療全くなし1,343例ならば13.0%となり、同じ入院施設成績でもセンターに集められ同定整理された1,320例では13.1%、そのうちの治療全くなし990例ならば11.8%、更にこの1,320例のセンター成績をとれば8.5%、そのうちの治療全くなし990例ならば7.9%となる。

どれが、わが国の初回耐性の真の姿に近い数字であるかは簡単に決定しにくい、菌株の蒐集整理の過程で約1%、対象を治療全くなしに限定することで約1%、両検査で約4%減少し、もし、最後の7.9%をとれば、数字のうえだけからは、欧米の初回耐性の率に比し著しく高いものではないということにならう。

4) 欧米との検査法、耐性基準の相違について

欧米で使用されている7H10・Löwensteinなどの培地と小川培地を、それぞれのSM慣用耐性基準濃度で比較し、阻止力は小川培地の20mcg(添加濃度)が最も弱く、L10mcg、7H102mcgの順に強いという成績を得ている。このような点に十分な検討が加えられなければ初回耐性を各国の間で正しく比較することは困難であつて、今後の結核対策の評価のためにも、より立ち

入った研究が進められることを望みたい。

#### 耐性検査手技について〔中井〕

以前に演者らは、研究協力施設の耐性検査成績に基づいて、耐性菌感染の頻度を検索した事があるが、それら施設における耐性検査がどのような方法で行なわれ、また、それが耐性検査成績にどのように反映しているかを知るため、人為的に耐性菌を混合した菌株、および患者分離菌株を12の施設に送付して耐性検査を依頼し、その成績と、耐性検査方法とについて調査を行なった。人為的に作製した耐性株の組成は、A株はSM 10,000 mcg 耐性菌を10%、PAS 50 mcg 耐性菌を1%、INH 5 mcg 耐性菌を0.1%の割合にH<sub>37</sub>Rv感受性株に混じたものであり、B株は上述SM耐性菌を1%、PAS耐性菌を0.1%、INH耐性菌を10%の割合にH<sub>37</sub>Rv株に混じたものであり、C株はSM耐性株を0.1%、PAS耐性株を10%、INH耐性株を1%の割合にH<sub>37</sub>Rv株に混じたものである。演者らは、これら供試菌株に混じられた耐性株がいずれも不完全耐性として判定されることを、つまり10%に混じた耐性株が完全耐性と判定されないこと、および0.1%に混じた耐性株が感受性と判定されないことを期待したのであるが、12の施設において、A、B、Cの3株のうちの3種の耐性菌について、完全耐性と判定されたのが21、感受性と判定されたのが8、不完全耐性と予期通りの判定を得たのが79であった。どちらかといえば、不完全耐性を完全耐性に誤られる場合の方が、不完全耐性を感受性に誤られる場合よりも多かつたのである。

次にこれら耐性検査成績の差異が、どのような原因によつて起るのかを明らかにするために、各施設での耐性検査方法を調査したのである。培地の側の要因として、培地作製法、添加薬剤の種類、添加量、培地保存期間などと、菌の側の要因として、菌液作製法、菌液濃度判定法、接種菌量などについて調査した。添加薬剤としては、INH、PASについては問題がなかつたのであるが、SMは衛生検査指針所載のDihydrostreptomycinを使用せず、複合SMを使用していた施設が3カ所あつた。薬剤添加量については、SMは2倍量、PASはNatrium塩を使用するため1.38倍量を培地に入れるのが検査指針に示されている方法であるが、SMを3倍量入れていた施設が2カ所、PASを1倍量入れていた施設が10カ所あつた。更にこの耐性検査はすべて間接法で行なう様依頼したのであつたが、1%小川培地を使用したのが5施設、3%小川培地を使用したのが7施設であつた。

菌液作製法では10施設が指針に示されているガラス玉コルペンを使用していたが、他の2施設は試験管壁で白金耳を用いて菌塊を擦り潰していた。菌液濃度判定法については、0.15 mg/mlの硫酸バリウム液と比濁する

検査指針の方法を採用していたのは3施設で、他は標準液として結核菌を秤量して作った菌液を使用した3施設、チフス診断液を使用した1施設、1白金耳を2mgとして換算した4施設などで、1施設は不定という回答であつた。接種菌量については10<sup>-1</sup> mgが3施設、10<sup>-2</sup> mgが4施設、10<sup>-3</sup> mgが4施設、10<sup>-5</sup> mgが1施設であつた。

以上の如く種々の要因について調べると、各施設での耐性検査方法にはかなりの差異があり、衛生検査指針と全く一致した方法をとつていた施設は1つもなかつたのである。

このような耐性検査法の差異は当然その成績に現われてくると考えられるのであるが、その中で検査成績に最も大きな影響を与える要因は、接種菌量であろうと推定された。接種菌量が大きければ耐性は比較的高く表現され、逆に接種菌量が小さければ耐性は比較的低く表現される様である。そこで演者らは耐性検査をすべて2種類の菌量、つまり培地1本当たり10<sup>-1</sup> mgと10<sup>-3</sup> mgとの両方を接種して、それぞれ耐性検査の目的に従つてその成績を使いわけているのである。化学療法の治療術式を比較検討する様な場合には、少しでも耐性の疑わしい症例は除外するために、接種菌量の大きい方の耐性検査成績をとり、また、その薬剤がまだいくらか有効であるかどうかをみる場合には接種菌量の少ない方の成績をとるとするのがその1例である。

前述の如く耐性検査成績はその手技の差異によつてかなりの変動を来たすものであるから、耐性を比較するには、同一の方法によつて検査された成績を比較する必要があると考えられる。このため演者らは、昭和37年以来、未治療株はすべて京大胸部研に集めて、同一の方法で耐性検査を行なつて、耐性菌感染の実態をより正確に把握しようと努めてきたのである。

#### 耐性検査手技差による耐性検査成績の差〔篠田〕

耐性検査の目的が病巣内菌の耐性populationを知るためと解釈するので、我々は従来より直接定量培養法を行なつているのが、間接法の場合もこれに準じ、いずれの場合でも対照培地のcolony数が50~500、理想的には100~200となる様、すなわちcolony count可能な如きいわゆるactual count法を行なつている。使用耐性培地は自家製で、作製後室温保存1週以内に使用し、止むをえぬ場合でも2週以内を限度としている。

かかる一定の手技方法で未治療患者の耐性検査を実施した場合の検査成績差につき1、2の検討を行なつた。なおこの検討では小川鶏卵培地を用い、耐性判定は胸研基準によつた。

##### (1) 直接法と間接法との成績差

21例につき直接法で行なつた結果と、その対照培地に

発育した菌を材料として再び間接法で行なつた結果とを比較すると、SM は全例一致、PAS, INH では共に1例のみ不一致であつた。

#### (2) 間接法2回実施時の成績差

34例につき間接法で行なつた結果と、更にその対照培地発育菌を材料として再度実施した結果では、SM, PAS は全例一致、INH では1例のみ不一致であつた。

これらの結果から、一定の手技方法で正確に耐性検査を行なう場合は、耐性検査自体が未治療耐性頻度に影響を及ぼすほど重要な因子となりうることはないと考えられる。

#### アナムネーゼの信頼性

〔座長〕 初回耐性を論ずる場合の最も基礎的な重要問題は耐性検査方法にあるべきであるが、この点にもまだまだ検索すべき問題が残っている様にみえる。

次はよく指摘されるアナムネーゼの信頼性を取上げる。

〔青柳〕 菌検査センターで感受性の低下が認められた158例について既往の化学療法の再確認を行なつたところ、12例(7.6%)が2週以上の化療を受けていたことが判明した。これらの症例の薬剤別、濃度別の耐性状況を見ると、INH では高度耐性が多く、SM, PAS では低濃度の耐性が多いことが認められた。

〔座長〕 さて我々は一定の人工的な線を引いて、耐性菌と感染菌というふうに分けているし、初回耐性の問題も今までの考え方で論じてきたが、はたしてそれで良いのか、現行医療基準で明らかな耐性と出ない程度の低耐性菌をはたして無視して良いかという問題を取上げた。

#### 低耐性菌に関する実験的研究

〔大里〕 野性株200株の薬剤培地発育状況は株によつてかなりの差がみられた。またSM 10mcg耐性菌の含有率も $1/1.35 \times 10^2 \sim 0/1.17 \times 10^7$ の開きがみられ、INH 0.1mcgでは $1/8.9 \times 10^3 \sim 0/1.75 \times 10^6$ の含有率を示した。またこれらの培地に発育した菌の耐性をみるとSM 100mcgあるいはINH 5mcgに完全耐性を示すものもみられた。したがつて、これら低耐性菌を高率に含有する例に対して不十分な化学療法が実施された場合には、高度耐性菌が出現しやすく、治療効果の劣る可能性を否定できないが、臨床的にはこれの検討はほとんど不可能である。そこで低耐性菌を感染した動物に対する当該薬剤の治療効果を検討することにした。

1) SM 低耐性菌感染: SM 1mcg含有Dubos培地発育クロノ株をモルモット(0.01mg)、マウス(0.1mg)の静脈内に接種し、3週放置後4週間SM, KM, VM, CPMの治療を行ない剖検した。モルモットの肉眼病変、 $\sqrt{\text{比肺重}}$ 、脾臓内生菌数を指標とした場合、SM 10mg

の治療効果は認められなかつた(KMは効果あり)。マウスでも $\sqrt{\text{比肺重}}$ 、肺内生菌数より見た場合、SM 1mgの効果は認めにくく、再実験でも同様の結果を示した。これら動物の臓器内菌のSM耐性は、接種菌に比して10mcg耐性菌の率が高くなつており、この傾向は放置群においても認められ、SM耐性菌は体内で高い耐性へのselectionの起こる可能性を否定できなかつた。

2) INH 低耐性菌感染: INH 0.02mcg含有Dubos培地に発育したクロノ株を静脈内に接種し、3週放置後4週間のINH治療を行ない剖検したモルモット、マウスではINHの効果明らかに認められた(INH 2mgおよび0.5mg/モル、0.2mgおよび0.05mg/マウス)。この場合モルモット脾臓、マウス肺臓内の菌のINH耐性は低下し、接種菌は0.02mcg耐性菌を64%に含有したが、臓器内の菌には0.02mcg耐性菌はほとんど見出されなかつた。

結論: SM低耐性菌感染動物はSMの治療効果を認めにくく、同様の関係はKM, VM, CPMの低耐性菌感染の場合にも認められたが、INH低耐性菌感染の場合にはINHの治療効果は明らかに認められた。このことはSMは体内で高次耐性への、INHでは低い耐性への菌のselectionが起こることと関連を有するものと考えられる。治療効果の面から一特に単独治療の場合には一低耐性菌感染も十分考慮に入れておく必要があると思われる。

〔座長〕 ここにも我々は反省すべき大きなものを痛感する。

次の問題として、4週間位の化学療法で耐性ははたしてどの程度変化するものかを検索していただいた。

#### 短期間の化学療法と初回耐性の関係

〔川村〕 2週程度の化療を受けているとされた患者からの分離菌株を、初回耐性の研究対象に含めてよいかどうかの問題を考究する資料を得る目的で、シンポジウムのメンバーが行なつた共同研究の結果は次の通りである。

全く結核の化療を受けたことがない患者で、一次3者併用を受けながら開始後4週まで毎週結核菌の分離に成功した症例について、化療開始前の菌株を含む5菌株の耐性を同時に検査した。検査法は指針に準拠したが、わずかな耐性度変化をも把握するために、薬剤濃度は下記により、 $10^{-1}$ mgの大量菌接種をも平行して行なつた。

SM 1.5mcg, 3mcg, 6mcg, 10mcg, 100mcg

PAS 0.1mcg, 0.2mcg, 0.4mcg, 1mcg, 10mcg

INH 0.05mcg, 0.1mcg, 0.2mcg, 1mcg, 5mcg

集め得た対象患者17例の中には、3例の初回耐性例(SM 100mcg耐性の2例とSM 10mcg, PAS 10mcg, INH 0.1mcg耐性の1例)があつたが、それらをも含めて16例までは、化療開始前および後(1~4週)の5

分離菌が、発育をみた最高濃度とその発育菌量の対照に対する割合において、かなり微細な点にいたるまで一致し、この期間内の耐性が意外なほど変化しないものであることを示した。

ただ1例において、開始前 SM に 1.5 mcg 不完全であつたのに1週で 3 mcg 不完全、2, 3週で 10 mcg 不完全という成績を得た。かなり急速な耐性上昇というべきであるが、この例でも他の2剤の耐性度は低くかつ全く不変であり、4週以後は排菌陰性となつている。

以上の成績は、正確な既往歴が得がたい事と共に、前記の問題が極めて微妙であることを示すものであろう。

〔座長〕 仮にアナムネーゼにおいて結核化学療法を受けた事なが正しかつたとしても非結核性疾患に対する SM 注射が初回耐性を示す原因となる可能性はないものであろうか。

慢性呼吸器疾患に対する SM の影響 (療研)

〔青柳〕 入院前に非結核性疾患に対して SM を注射した既往のある症例は 24 例である。これらの症例の SM の耐性状況を菌検査センターの成績よりみると、SM 100 mcg 完 1 例、3 mcg 完 1 例、3 mcg 不完 4 例であり、低濃度において感受性の低下せる症例がやや高率である傾向が認められた。したがって潜在性肺結核を有する症例に、非結核性疾患治療の目的で SM を注射する事により、病巢中結核菌は低濃度の耐性上昇が起こりうるものであると考えられる。

#### 非定型抗酸菌の頻度

〔座長〕 非定型抗酸菌を万一無視したら、アメリカ辺りでは初回耐性の頻度は大変高いものにならう。わが国ではいかがであろうか。

〔中井〕 昭和 37 年から 42 年までの間に得た未治療株 1,049 株中ナイアシンテスト陰性の株は 13 株、1.2% であつた。

〔大里〕 当所における昭和 42 年 1 月～11 月の培養件数 24,480 件のうち結核菌検出数は 1,938、7.9% (入院 14.5%, 外来 3.0%) であるが、結核菌と紛わしい非着色性の抗酸菌 (非定型抗酸菌と同意義ではない) の検出数は 261、1.1% (入院 0.5%, 外来 1.5%) であつた。したがって非着色性の抗酸菌 (含結核菌) 検出件数 2,199 のうち結核菌以外の菌は 261、11.9% を占め (入院 3.5%, 外来 33%) していた事になる。これらの菌は抗結核薬に自然耐性を示すことが多いのであるから、分離菌株の鑑別を慎重に行なわれない場合には初回耐性の頻度にかかりの影響を与えるものと考えられる。

#### 外因性再感染の疑濃厚な症例

〔座長〕 耐性菌はいわばラベルした様な菌であるから外因性再感染ないし重感染、広い意味で外因性再感染問

題を窺う一つの眼鏡として初回耐性問題が利用できるのではないと思われる。

〔中井〕 昭和 37 年から 42 年までの未治療菌陽性肺結核患者のうち、ツベルクリン反応の陽転時期の明らかなものが 200 例あり、このうちに薬剤師の市販以前、つまり SM では昭和 22 年、PAS では昭和 25 年、INH では昭和 27 年以前にツベルクリン反応が BCG によらずに陽転していたものが 96 例あり、その中に耐性菌感染であつた症例が 5 例発見された。これは外因性再感染が非常に疑わしい症例である。

〔青柳〕 ツベルクリンの陽転時期別に耐性の状況をみると、常に昭和 27 年以後に陽転した群に高率であり、昭和 19 年以前に陽転した症例のうちより常に耐性例が数例認められている。

昭和 41 年調査では昭和 19 年以前に陽転した症例のうち既往に BCG なしが明らかで菌検査センターの成績が耐性を示した症例は 1 例であつた。

〔篠田〕 既述の如く我々の対象とした未治療患者のうち、耐性菌感染の可能性が極めて少ないと目される大正 13 年以前出生者 82 例中、初回耐性は 4 例 (SM 100 mcg 完 2 例、INH 1 mcg 完 1 例、PAS 1 mcg 完、10 mcg 不完および INH 0.1 mcg 完 1 例) であるが、これらの胸部レ線像は今回発病の新鮮病巣と共に硬化病巣あるいは石灰化巣が明瞭に併存しており、一応外因性再感染が疑われる例である。しかもこれらの症例が発病時 58～67 歳と比較的高年齢に属するもののみであることは、外因性再感染の成立に一つの示唆を与えるものであろう。次に感染源が判明しており (家族内感染)、しかも外因性再感染と思われる症例を経験したので報告しておく。

感染源は父 (発病時 39 歳) で、被感染者はその長男 (13 歳) である。長男は昭和 35 年小学校入学時「ツ」反応既陽性で、41 年 5 月肺結核を発見されるまで毎年の学校健診で異常を指摘されたことはない。父は生来健康であつたが、37 年 6 月咯血、自宅にて SM、PAS、INH の治療を受けた。38 年 6 月の検痰成績は G VI 号であつたが、その後は無治療のまま 41 年 5 月住民健診 (この時 G VIII 号。この間常時排菌であつたと推測される) で入院再治療を強要されるまで放置していた。長男は生来父と別居したことはない。

我々は 41 年 5 月父の再治療前および長男の初回治療前の喀出菌につき耐性検査を行なつたが、両者の SM、PAS、INH、KM、TH、CS 6 剤の耐性 population はよく類似しており (共に PAS および INH に対し耐性) また catalase 反応 (共に ⊕)、peroxydase 反応 (共に ⊖) も同様の性状を呈していた。これらのことから長男は一度誰かから感染を受けた後、更に父の常時喀出する菌によつて再感染を受けたと見なすのが最も妥当と考え

られる。

この症例からは外因性再感染の成立に関し、また別の示唆が与えられると思う。

医療従事者に見られた薬剤耐性結核菌感染、特に外因性再感染発病の疑濃厚なるものについて〔後藤〕

我々が九州地区の国立結核療養所の協同研究の一つとして9年間に亘り初回耐性例の調査研究を行なってきたが、その間に16例の医療従事者を発見した。そのうちの12例が一次抗結核剤に対し結核予防法に示す基準以上の耐性を示した。12例の職業は医師2名、看護婦8名、痰コップ消毒婦、洗濯夫それぞれ1名であり、薬剤耐性は3剤耐性3例、SM、PAS 2剤耐性2例、SM単独4例、PAS単独3例であった。

我々はこの12例のうちの4例を外因性再感染発病の疑濃厚なるものと解釈した。その根拠の第1は以前に全く抗結核剤を使用していないこと。第2は入院時、化学療法を開始する以前の検痰成績においてすでに一次抗結核剤に耐性を有しており、その耐性度は予防法の基準以上を示していたこと。第3はBCG接種を受けたことなく、ツ反応陽転より発病までの期間がほとんど10年以上であり、ツ反応陽転の時期は一次抗結核剤がそれぞれ漸く使用し始められた時期あるいはそれ以前であるということ、などである。

〔座長〕終戦後第1回の近畿地方会で今は亡き今村荒男先生が耐性菌感染が外因性再感染の可能性を証明する手掛りを与えるかも知れぬと私に言われたのを感慨深く思い出す。

#### 初回耐性例に対する化学療法の効果

〔青柳〕1) 耐性薬剤を変更しない群の治療成績

昭和36、38年に入院時薬剤耐性を調査した症例のうち入院前治療なしでB型非硬化壁空洞を有しSM、PAS、INHの3者併用療法を行なった1,059例について、入院時の菌量別、耐性程度別に培養陰性化率を検討した。

a) 入院時培養 $\geq 3$ 以上の群：この群の治療6カ月の培養陰性化率は耐性群75.4%、低耐性群89.2%、感受性群92.5%であり、耐性群のうち1剤耐性群81.6%、2剤以上の耐性群53.3%であり、1剤耐性群のうちSM耐性77.8%、INH耐性83.4%、PAS耐性87.5%である。

b) 入院時培養 $\leq 2$ 以下の群：この群の治療6カ月後の培養陰性化率は耐性群92.1%、低耐性群97.8%、感受性群98.1%である。

したがって耐性薬剤を変更しない初回薬剤耐性症例の菌陰性化率は感受性群に比して有意の差で劣ることは明らかであり、特に入院時培養成績が $\geq 3$ 以上の群では顕

著であり、耐性薬剤別ではSM耐性が最も劣った成績を示すことが認められた。

2) 耐性薬剤を変更した症例を含む群の治療成績

昭和41年の調査対象患者のうち入院前治療なしで学研病型B型で菌検査センターで耐性と判定された症例を選び、これとなるべく同一施設内で年齢、入院時菌所見、空洞の性状がmatchする感受性症例群との治療効果について検討した。

症例はそれぞれ50例であり、耐性例中には2剤耐性が28%含まれており、二次薬への変更率は6カ月までに37.8%、9カ月までに57.8%である。

両群の背景因子を比較すると多量排菌者、NTA高度の症例が感受性群にやや高率である。

感受性群、耐性群の治療3、6、9、12カ月の培養陰性化率はそれぞれ75.6%、60%；100%、85.7%；94.8%、97.3%；100%、94.2%であり、治療3、6、9カ月の感受性群、耐性群の全X線の中程度以上改善率はそれぞれ13.6%、4.4%；43.2%、27.9%；55.5%、56.7%である。

したがって耐性薬剤を二次薬に変更した症例を含めた群の治療成績は二次薬への変更率の高率となる6カ月以降において感受性群にほぼ近い優れた成績を示すことが認められた。

治療7カ月までの耐性薬剤の二次薬への変更率は昭和36年12.5%、38年33.1%、41年52%と逐年的に高率となつていくから、初回耐性の治療成績は今後さらに向上すると思われる。

#### 喀痰中結核菌陰性者の耐性菌感染

〔座長〕さて初回耐性を発見しえたら薬剤変更等然るべき手段が講じられる道があるが、初回に結核菌が培養陽性でない例がもし耐性菌感染例であつたら、耐性不明のままに無効あるいは性能の低い化学療法が長期間続けられる恐れがある。また事実菌陰性の耐性菌感染例は必ず存在するはずである。

〔中井〕排菌陰性のため、耐性検査によつて直接証明することはできなかつたが、耐性菌感染の疑われた症例が2例あつた。いずれもSM、PAS、INHの3者併用では臨床症状の改善を見ず、二次抗結核薬を含む併用療法に変えたところ著明に好転したので、SM、PAS、INHのいくつかの耐性菌感染であろうと考えられた。

〔青柳〕菌陰性の肺結核患者または結核性肋膜炎、脳膜炎などで結核菌の培養陰性の症例に初回耐性例がどの位の頻度に存するかは治療上大きな問題であり、私も右湿性肋膜炎でSM、PAS、INH、Steroidの治療にも拘らず、赤沈、胸部X線所見の改善がみられず、入院2カ月後に肺野に新陰影を生じた症例を経験している。

療研では常にNTA病型別に耐性の頻度を検討してい

るが、化療あり群では NTA 高度の症例では耐性の率は高率であるが、化療なし群では NTA 病型別に耐性の率に差がみられない。したがって菌陰性者または菌検出不能の結核患者の未治療耐性の頻度は菌陽性未治療肺結核患者の率と同じく 10% 以上存するものと推定される。

### 二次薬耐性菌感染

〔川村〕 二次薬に対する初回耐性は、現在の成績を正確に把握しておかないと、将来に向かつての出発点が不明確になる危険がある。療研は全国の菌検査センターに集まった未治療患者からの分離菌 1,320 菌株のうち約 5 分の 1 (228 菌株) を抽出し、表の 6 剤についての耐性を検査した。

Drugs	Concentration added mcg/ml			
	12.5	25	50	100
KM	25	50	100	100
VM	25	50	100	100
CPM	25	50	100	100
TH	25	50	100	100
CS	10	20	40	80
EB	1.25	2.5	5	10

二次薬に対する実際的な耐性基準は、医療基準に記載されているものをも含めて、未確立のものが多いため、われわれは、228 菌株が 6 剤に対して示した耐性度の分布から、KM・VM・CPM の 3 剤はすべて 50 mcg, TH は 25 mcg, CS は 40 mcg, EB は 5 mcg のそれぞれ完全耐性を、まず妥当な基準と考えた。その線で初回耐性とすべきものは KM・CPM は 2 例ずつ (0.9%), TH・CS は 1 例ずつ (0.4%), VM・EB は 0 となつた。すなわち 2~3 の二次薬に対する初回耐性は、低率ながらすでないといえぬ状態であることが示された。

〔藤田〕 昭和 41~42 年入院の未治療患者喀出菌のうち、KM, TH, CS 耐性検査には 107 株、VM, CPM, EB 耐性検査には 52 株を用いた。検査方法は 1% 小川培地使用、間接法である。なおこの項における薬剤濃度はすべて培地添加濃度である。

これら菌株の KM, VM, CPM ~ < 20 mcg, 20 ~ < 50 mcg, 50 ~ < 100 mcg, 100 mcg ~ < 耐性菌の分布率は KM (61.0, 36.8, 2.0, 0.2%), VM (59.8, 35.3, 4.2, 0.7%), CPM (63.6, 33.3, 2.9, 0.2%) と類似した状態にあり、各薬剤共 95% 以上は 50 mcg 以下の菌によつて占められていた。TH では 92.5% が 20 mcg 以下、99.4% が 50 mcg 以下で 100 mcg 以上の菌は見られない。CS では 68.1% が 20 mcg 以下、89.4% が 30 mcg 以下、98.9% が 50 mcg 以下で、EB では 84.3% が 2 mcg 以下、99.7% が 3 mcg 以下であり、5 mcg 以上の菌は存在していない。

これら未治療患者喀出菌が耐性と判定される薬剤別頻

度は、我々の胸研耐性基準 (KM : 30 mcg 90%, 50 mcg 50%, 100 mcg 0%, TH : 20 mcg 40%, 30 mcg 15%, 50 mcg 5%, 100 mcg 0%, CS : 20 mcg 70%, 30 mcg 25%, 50 mcg 1%, EB : 2 mcg 100%, 3 mcg 50%, 5 mcg 10% 以上の耐性分布を示す場合) によると KM 0.9% (1/107), TH 1.9% (2/107), CS 14.9% (16/107), EB 0% で、現行医療基準では KM, TH 共 0%, CS 4 週培養 0%, 6 週培養 21.4%, VM 4 週培養 25%, 6 週培養 50% である。すなわち KM, TH, EB ではいずれの耐性基準においても無ない極めて低率で現時点では獲得耐性菌による感染が生じているとはいえない頻度であるが、CS 殊に VM の耐性頻度は極めて高率である。しかしこれは両剤の耐性検査方法あるいは耐性判定基準に多分に問題が存在すると思われる、今後この点の検討を繰返す必要があるであろう。

昭和 41 年に我々は福岡市およびその周辺在住の登録在宅患者の一部につき調査を行ない、その際菌を回収しえた 47 例の耐性検査を実施したが、薬剤別にみた耐性の頻度は胸研基準で KM 17% (8/47), TH 2.1% (1/47), CS 12.8% (6/47), 医療基準では KM 12.8% (6/47), TH 0%, CS 17.0% (8/47) と TH, CS の耐性頻度は未治療患者と有意差はなく、また未治療患者および在宅患者両群菌集団の耐性菌分布も極めて類似した状態にあつた。しかし KM 耐性のみは有意差をもつて在宅患者に高率であり (胸研基準で 17.0% : 0.9%, 医療基準で 12.8% : 0%) しかも在宅患者群では 1,000 mcg 以上高耐性の存在がみられ (耐性菌分布 : 在宅患者群 4.6%, 未治療群 0%), もし KM 高度耐性菌が「ひと」に対し既述の SM 高度耐性菌と同様の感染、発病の態度をとるならば、今後 KM 1,000 mcg 以上高度耐性菌による感染発病が徐々に出現する事も予想され、更に感染源側に対する十分の対策を講ずる必要があろう。

〔中井〕 川村博士と同じ耐性基準 (KM 50 mcg 完全、または 50 mcg および 100 mcg 不完全 : CS 40 mcg 完全または 40 mcg および 80 mcg 不完全 : TH 25 mcg 完全または 25 mcg および 50 mcg 不完全 : EB 2.5 mcg 完全または 2.5 mcg および 5.0 mcg 不完全 : VM 50 mcg 完全または 50 mcg および 100 mcg 不完全・いずれも添加濃度) をとると、初回耐性と考えられたものは KM 0.2%, CS と TH とは 0%, EB 0.5%, VM 1.5% で、いずれも非常に低率であつた。

〔座長〕 以上でメンバーの方々の発言を一応終わり、フロアからの追加をお願いする。

印刷工業界における耐性菌保有状況 (最近 5 年間の集団検診成績から) [千葉胤夫・他 3]

38 年以来郵送培養法を利用して、結核高率地帯の印刷業界の検診を行ない、3 年間の成績を昨年の本学会に発

表、耐性菌感染の実例を揚げ幾つかの問題点を指摘した。引続き耐性患者の発掘と職場からの排除に努めた結果、ようやくこの2年間に予期通りの成績を治めえたので追加する。要医療率は0.6%台から0.2%台に減じ、殊に未治療新発症率は0.11%までに減じた。培養陽性率が14%から4%に著減、うち未治療新発症と既治療再発症の減少が主であつて、就業治療例はまだまだ減らすまでに至っていない。したがつて培養陽性の耐性保有率

も下降を示さず、中でも就業治療者ではすべてが耐性で、この5年間の平均でも80%、既治療再発症で50%、そのうえ未治療新発症に至つては平均30%の高率を維持している。この事は依然事業所内での耐性菌の感染源となつている事を示す。それゆえ今もなお就業治療者の周辺から新発症の実例に接する。耐性患者の強力な探索と共に、就業治療を続ける主治医の猛省を促したい。

## 今後の見通しとむすび

座長内藤益一

本シンポジウムの最大の課題は初回耐性頻度があるところまで上昇して後現在大体横這いを続けているのは何に原因するのか、そして将来いかなる変遷を迎えるであろうかという点にありうと考える。これについてメンバー各位のお考えをまとめて座長から述べる。

まず初回耐性率の上昇の要因と、これを阻止する要因とを分けて考えてみる。

### 初回耐性率上昇の要因

1) 在宅感染性患者中の耐性菌喀出患者頻度の増加  
療研や実態調査の成績からみて、少なくとも少し以前までのところ増加の傾向を示しているのが事実である。これはいうまでもなく、化学療法の普及、殊に隔離されずに行なわれた不完全な治療に起因する。

2) 在宅感染性患者の中で特に耐性菌喀出患者の感染危険度が高くなつてきた場合

療研の成績で化療あり群に重症患者がふえてくる傾向がみられる。

### 初回耐性上昇阻止の要因

1) 在宅感染性患者中の耐性菌喀出患者頻度の減少  
その原因としては、a) 化学療法が励行されねば減るであろう。極端にいえば化学療法が行なわれなくなれば著明に減るであろう。しかしこのような事は将来共に考えられない。b) 治療法の成功とでもいうか、少なくとも喀痰中結核菌培養陰性持続に成功した症例の頻度がふえれば減少するであろう。この場合二次薬の適切な使用が役演じるであろう。c) 以上に失敗しても隔離が厳重に実施されればされる程減少するであろう。

然し今回報告の範囲では在宅耐性患者の頻度は少し以前までのところふえているのが現実であるのは上述の通りである。

2) 無自覚無治療放置感染性患者に比べて化学療法施行患者の方がたとえ耐性菌を喀出していても咳嗽喀痰減少および本人の注意により他人に感染させる頻度を少なくしているかもしれない。もしこの傾向が年と共に強くなつてきたと仮定すれば、耐性菌感染率上昇阻止に幾分

役立っているかもしれない。

3) INH 高度耐性菌の毒力の低下が INH<sup>r</sup>耐性菌による感染発病菌喀出に至る患者を少なくしているかもしれないし、同時に INH 高度耐性となつた SM や PAS の耐性菌による感染発病菌喀出に至る患者を少なくしているかもしれない。

4) INH 耐性菌に感染した場合、上述と同じ原因により混在した INH の比較的低い耐性菌や感受性菌だけが喀出されるに至る、すなわち selection を受け、実際には相当高い INH 耐性菌を含む菌群の感染を受けていながら、感受性菌感染を受けた症例であるかの如く表現される場合も考えられる。

5) これは単に見せかけだけの事であるが、アナムネーゼの確実性が高まってくると、初回耐性率がより正確な値を示し、そのため外見上減少を示す可能性が十分あろう。

6) 感染と発病の時間的距離が長くなり、新発見患者の年齢構成が高年層に移動しつつある事は、化学療法発現以前の感染例の増加を想像させ、初回耐性証明例の上昇阻止の方向に影響しているかもしれない。

以上考えた要因その他ここに考え及ばなかつた要因が、両方の側にあつて互いに牽制し合つた結果が、初回耐性率の変遷として現われているものと思われる。

将来どうなつていくであろうかについては全く予想がつかない。わが国の医師の努力により、隔離しないで不完全な化学療法を実施する事を絶滅すれば耐性菌感染率を低下せしめる事は十分可能であり、またそうしなければならぬという点についてはメンバー各位の意見は一致したけれども、昔と違つて感染から菌喀出に至る期間のかなり長い年月の者が多くなつている事を考え合せて、現在までの時点における不完全不成功の化学療法の結果がかなり遠い将来に初回耐性発見例の増加を来すかもしれないという警告も出た。

私自身の考えでは初回菌陽性例中の耐性例の頻度もさる事ながら、感性菌感染も減らしたいし、耐性菌感染も

減らしたい、ただし後者の方に、医師の反省と努力とによる実りがより多いであろうと思う。

現在帳面づらでは初回耐性十数%で横這いと出たけれども、はたして残りの八十数%の治療効果は15年前の同じ治療法の効果と全く等しいであろうか、現行の治療効果判定方法の範囲では著明な差異はない様に、私自身漠然と考えてはいるものの、もし遙かに精密なものさしがあつたら、治療効果がじりじりと低下しているのを見せつけられるのではあるまいかという証拠のない不安を感じるものである。これは全く私の個人的な考えにすぎないが、今眼の前に見ているものは、海面に浮ぶ氷山の

大きさであり形にすぎないのではないかという不安を禁じえないのである。

最後に本シンポジウムの結論として、次のステップをいかにふみ出すべきかという問題を討議した結果を申し上げる。

第1に耐性菌感染の究明を目的とした耐性検査法の技術面における再検討が望まれる。

第2には全国の医師が心を合わせて耐性菌喀出患者を作らない事、第3には作る恐れがある場合や不幸にして作ってしまったら隔離する事、以上の3項という極めてありふれた結論である。