

## ツベルクリン反応

日本BCG研究所 山本 三郎

ツベルクリンは、結核菌の培養濾液を加熱後部分精製して得られる蛋白質で、結核菌に特異的な抗原物質の集合体である。結核菌の感染を受けた人あるいはBCGワクチンの接種を受けて免疫が成立した人にツベルクリンを皮内接種すると、その局所に24~48時間をピークにした発赤・硬結を主体とする遅延型の皮膚反応が出現してくる。これがツベルクリン反応で、IV型アレルギー反応の代表であり、溶液中の結核菌抗原と生体の免疫T細胞が引き起こす免疫反応である。この反応は特異的かつ鋭敏で、結核の診断に有用であるほか、BCGワクチン接種が行われる際は、その対象の選択や評価に用いられる。

### ツベルクリンの歴史

結核菌を発見したRobert Kochは結核菌の培養濾液を濃縮したツベルクリン（旧ツベルクリン, old tuberculin: OT) が結核の治療に有効であると発表した（1890年）が、治療薬としては完全な失敗であった。その後Clemens von Pirquetはツベルクリンが結核菌感染の診断に有用であることを見いだした。ツベルクリン反応の検査法はいろいろ試みられたが、Charles Mantouxによって考案された皮内注射法（Mantoux test）が広く用いられている。1930年代になってFlorence B Seibertらによってツベルクリン反応を惹起する活性成分が蛋白質であることが示され、OTを塩析して精製されるようになった。Seibertははじめトリクロロ酢酸で、のちに硫酸アンモニウムを用いてOTから活性成分を沈殿させ、その物質をpurified protein derivative (PPD) と命名した（1934年）。このPPDには、低分子から高分子にわたる多数の抗原蛋白質が含まれるが、多糖抗原が少ないため、非特異的・即時的反応はOTに比べ少なく、反応の発赤・硬結が明瞭で測定しやすいとされた。1941年、SeibertとGlennはPPD-Sと呼ばれる大量のロットを製造し、のちに国際標準品として認定された。一方、WHOはデンマークの国立血清研究所（SSI）に依頼してRT-23と呼ばれるマスターバッチを製造し各国に頒布している。わが国では旧ツベルクリンに対し、PPDを精製ツベルクリンと称し、1968年から市販

している。

### わが国で開発された種々のツベルクリン

旧ツベルクリン（OT）の活性成分を抽出精製しようとする研究は古くから行われ、ドイツのMaschman-Kuster、米国のSeibertをはじめ欧米諸国では早くから研究が行われてきた。わが国でも種々の精製法が研究された。貝原はOTをエーテルおよびクロロホルムで処理した後、三塩化酢酸で沈殿させたものを $\pi$ と名付け<sup>1)</sup>、武田らはOTにメタノールを加えて得られた沈殿を水に溶解し、三塩化酢酸によってpH 4.0のものを集めてTA<sub>2</sub>と名付けた<sup>2)</sup>。また岡本はOTにo-aminophenolを加えてジアゾ化してo-aminophenol-azo-tuberculin (O.A.Azo-T) を作成し<sup>3)</sup>、山村は結核菌の脱脂菌体からツベルクリン活性ペプチド (tuberculin active peptide: TAP) の抽出を試みた<sup>4)</sup>が、いずれも実用化には至らなかった。

### わが国の精製ツベルクリンの開発

OT製造用株として、わが国においてはヒト型結核菌青山B株が用いられてきた。しかし、米国と英国においてはヒト型結核菌H37株、H37E株、DT株、C株、PN株など、デンマークとノルウェーではE9655株、E5株、E5M2株、E5M10株などが使われ、またわが国ではヒト型結核菌H2株、青山B株、ウシ型結核菌牛10株、牛RO株が使われてきた。青山B株の分離経過および保存などについての詳しい記録は残っていないが、浅見らは「青山B株の由来」を記している。それによると、1921年頃、伝染病研究所（伝研：現、東京大学医科学研究所）の芳賀によって青山内科の患者から分離された結核菌株があった。その後、結核の動物実験のため毒力が強い菌株が必要となり、本菌株をモルモットに数代継代したものを「青山B株」と名付けた。伝研でこの菌株をOT製造用に選んだ理由は明らかでないが、当時OTの力価試験は致死試験であったため、他菌株を使って合格した製品でも、人体に用いると反応が強すぎるものが多かった。しかし、青山B株で作ったOTは、人体における皮膚反応が適当であったので、本菌株をOT製造に用いるに

至ったとのことである。また、青山B株は、昭和24年制定のツベルクリン基準においても製造用菌株とされたが、伝研において古くから多くの研究者によって使用され、結核予防会結核研究所においても、本菌株から作ったOTを一般に使用していたことから、本菌株をツベルクリン製造用株と定めたようである<sup>5)</sup>。本菌株の毒力はモルモットの脳内に0.1 mgを接種すると24日で動物は斃死する<sup>6)</sup>。なお、同じ青山B株と称されるもので、違った施設でさまざまな方法で長く継代されている間に、ツベルクリン蛋白質の収率、力価などに差が生じていることは否定できない。したがって、製造用株は国立予防衛生研究所（現、国立感染症研究所）の交付する株を用いることとした。

精製ツベルクリン（PPD）の製造に関してWHOが推奨する特定の結核菌株はなかったため、わが国で長く用いられてきた菌株であり、OTを作るのに適していることがわかっていたヒト型結核菌青山B株を製造用株に指定した。そこで国立予防衛生研究所は、Seibertの方法を改良した製法でPPDを大量に製造した。Kochが結核菌を培養してOTを製造する際には、グリセリン・ブイヨン培地を用いていたが、わが国では、初期のOT製造の頃から、余分な蛋白質成分の混入を防ぐ目的で無蛋白質培地が使われていた。PPD製造用培地は、ツベルクリン活性物質を高純度・高収率に得るため結核菌用無蛋白質培地であれば、ソートン培地に限らず、例えばリンドbII培地などでもよい。製造のための培養に移す前には、その製造用培地に移植し、8～14日間培養して生じた薄い菌膜を、新しい培地にさらに2回同様に移植したものを種培養として用いる。これをソートン培地など製造用培地表面に6週間静置培養した後、菌膜を回収し、集めた培養液を加熱殺菌・除菌濾過し、限外濾過で液量を30分の1以下に濃縮後、等量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加えて濾液中の蛋白質を沈殿させる。硫酸アンモニウムをゲル濾過によって脱塩後、溶液を凍結乾燥して精製ツベルクリン原末を得る。ゲル濾過はセファデックスG-50などによって、分子サイズの一定範囲を回収することが可能となり、成分の安定したPPD原末が得られるようになった。

#### 個人用PPD製品の開発

従来、わが国で市販されていた診断用PPDには、一般診断用（強反応者用を含む）と確認診断用の別があり、いずれも約20用量あるいは約100用量として作られた製品であった。これらのPPD製品はいったん溶解すると比較的速やかに力価が減弱することから、溶解後はなるべく速やかに使い切り、残部を保存して使用することのないよう指示されていた。当時はBCGワクチンの定期

的な集団接種が、0～3歳時、小学1年生時および中学2年生時のみ実施され、それぞれの接種前にツベルクリン検査が義務づけられていたが、結核感染発見の主要な手立てとして、こうした定期集団検診のほかに、きめ細かな定期外健康診断や、診療時のツベルクリン反応検査の比重が増大することが予想された。このことは、結核診断やBCG免疫効果の判定に、個人単位にPPDを使用する機会が増加する可能性を示唆していた。また生物学的製剤の一般的な形態として、1人1針1容器という形式はますます望ましいとされる。しかし、PPDの場合、1回の使用量が0.05  $\mu\text{g}$ という超微量であって、それを正確にかつ無菌的に分注し、凍結乾燥し、包装し製品化することは、技術的にきわめて困難なことと考えられた。しかし、日本BCG研究所により注射針中に微量のPPDを分注し、凍結乾燥する技術が開発され「PPDディスプレイ」が完成した<sup>7)</sup>。

#### PPDの品質管理

PPDは結核菌由来の製剤であるので結核菌をまったく含まず、感染性もないことを確かめるため、培養濾液および脱塩濃縮濾液をそれぞれ培養する「結核菌培養否定試験」と、脱塩濃縮濾液をモルモットに注射して結核が発症しないことを確かめる「動物接種による結核菌否定試験」を行って安全性を確かめる。ツベルクリン力価試験は、歴史的には、結核感染モルモットにOTを注射してツベルクリン死をもたらす方法が最初であったが、正確な力価検定には適応しがたかった。戦後、わが国では、米国から導入された方法によって、感作モルモットの同一動物の背部の一側には標準液を、他側対称部に被験液の種々な希釈を皮内注射し、24時間および48時間後の硬結を計測し、標準液による硬結径の合計と被験液による硬結径の合計の比（ratio）によって力価を決定していた。今日までに、標準品との間で結核菌青山B株死菌免疫モルモットによる力価試験と、ヒトでの力価確認試験を行い、標準PPDの力価に相当する重量で力価を定めることとした。さらに日常的な品質管理に必要な力価測定法として逐次検定法を確立した<sup>8)9)</sup>。

この活性に基づき原末を精密に秤量して0.5%乳糖液に溶解し、バイアル瓶に1.0 mlまたは0.5 mlを正確に分注し、凍結乾燥してPPD小分製品とする。したがって、小分製品1容器中の乳糖含量は、それぞれ5.0 mgと2.5 mgとなる。国内で市販されるPPD製品は汎用の一般診断用（1人用）、一般診断用（1  $\mu\text{g}$ ）のほか10倍量のPPDを含有する確認診断用がある。なお開発当初には、一部のバイアルは常圧下で密封されていたが、現在ではすべて減圧下で密封されている。低濃度のツベルクリン蛋白質は、溶液中でガラス容器やプラスチック容器の壁面に

吸着して生物活性が減弱するため、WHOはRT-23溶液に0.0005% Tween 80を添加して吸着を防ぐこととしている。一方、わが国ではTween 80添加によりツベルクリン皮膚反応が不鮮明に修飾されることなどから、Tween添加は行わず、上述のようにバイアルに少量ずつ分注・凍結乾燥する技術を開発し製品化した。

### ツベルクリンの免疫応答

ツベルクリン反応は、典型的な遅延型過敏症 (delayed-type hypersensitivity; DTH) 反応でツベルクリン型アレルギーとしてIV型アレルギーにあたる。DTH反応は、注射された抗原に特異抗体が反応して惹起される即時型局所炎症反応とは異なり、24~48時間をピークに発現する局所皮膚のアレルギー性炎症で、発赤・硬結として認識される。炎症局所の病理組織学的所見も、即時型アレルギーが浮腫と好中球浸潤を主体とした滲出性炎症であるのに対し、DTH反応ではリンパ球とマクロファージからなる単核球の浸潤がみられる。

結核菌やBCGが生体に感染すると、好中球やマクロファージによる菌体処理を経て、細胞性免疫が成立する。結核菌の培養濾液から精製したツベルクリンには、数百とも言われる多数の蛋白質が含まれる。この中にはDnaK (71 kDa), GroEL (65 kDa), GroES (12 kDa) などストレス蛋白質または熱ショック蛋白質 (heat shock protein; HSP) や分泌蛋白質として主要な $\alpha$ 抗原など、高い抗原性を示す多数の因子を含む<sup>10)</sup>。PPDの抗原蛋白質は、皮内注射で体内に入ると、皮膚局所のランゲルハンス細胞など抗原提示細胞のプロセッシングを受け、断片化した抗原蛋白質は、細胞表面で主要組織適合抗原 (MHC) クラスII分子とともに、それぞれの抗原に特異的なCD4陽性T細胞クローンに抗原提示し、細胞の活性化・増殖・分化を誘導する。こうして産生したTh1タイプのサイトカインであるIFN- $\gamma$ や炎症性サイトカインであるIL-8やTNF- $\alpha$ 、あるいはMIP-1- $\alpha$ 、MIF、GM-CSFによって、注射局所で血管の透過性が亢進し、単核球の浸潤がもたらされる。これが皮膚の発赤・硬結として観察されるツベルクリン反応で、典型的な遅延型過敏反応である。

この反応は菌の感染から免疫の成立までには2~10週間程度が必要で、抗原注射に伴うDTH反応には24~48時間を要すると言われる。この免疫状態は数年から十数年にわたって持続するが、時間とともに漸減していく。結核菌死菌や菌体成分の免疫ではDTHは誘導するが、結核防御免疫は誘導しないとされてきた。しかし、DNAワクチンや成分ワクチンの投与を受けた生体では結核防御免疫の成立が確認されるなど新しい展開がみられる。

### 非結核性抗酸菌に由来するツベルクリン

種々の抗酸菌に由来するツベルクリンを用いて感染した菌型を探索した例は多い。これらを総括すると、哺乳動物に病原性のある抗酸菌 (ヒト型結核菌、ウシ型結核菌) の間では型特異性は非常に弱く、またトリ型結核菌、スメグマ菌など哺乳動物に対して結核症を起こさない菌から作ったツベルクリンと、哺乳動物型結核菌から作ったツベルクリンとの間には、明らかな型特異性が認められている。Edwards & Palmerと中島は、それぞれ*M. kansasii* (yellow bacillus) から作ったPPD-Yと*M. intracellulare* (Batty bacillus; *M. avium*-*M. intracellulare* complex) から作ったPPD-Bとを用い、結核菌由来のツベルクリンであるPPDとの比較を人体で試みている。結核患者および健康人について0.1  $\mu$ g/0.1ccを用いて検査した成績によると、*M. kansasii*を認めた患者と結核患者とにPPDとPPD-Yを用いたときには両反応間に差はなかったが、*M. intracellulare*を認めた患者と結核患者にPPDとPPD-Bを用いたときには両反応間に差を認めている<sup>11)12)</sup>。

BCGワクチンの結核予防効果は多くの野外試験が繰り返されているが、その結果は0%から80%まで大きく変動している。その理由として、使用されたBCGワクチンの力価の違い、対象集団の栄養状態、地域に蔓延する結核菌の毒力の違いなどとともに環境中の非結核性抗酸菌の蔓延状態が挙げられる。たとえば、南インド・チングルプット地区の全住民を対象に1968年に開始した試験では、15年追跡調査の結果、BCG接種は成人に対して防御効果を示さなかった。これに対し、この地区の非結核性抗酸菌の感染状況をPPD-Bで調べたところ、9歳までの子供の3分の2が、15歳から19歳では97%が陽性であったという。さらに、これらを用いた研究で、BCGワクチンの予防効果が北米地域より低い成績であった米国南西部においては非結核性抗酸菌感染がかなりの頻度でみられることが明らかとなった<sup>13)</sup>。

### ツベルクリン反応検査の今後

ツベルクリン反応検査は、結核感染の診断、BCG接種対象者の選別やその評価に用いられてきた。日本では結核予防法により、BCGワクチン接種時にツベルクリン反応検査を行い、陰性者にのみ、BCG接種を行うとされていたが、2003年度から、小学1年生と中学1年生のBCG再接種が廃止となり、さらに2005年度からは、乳児期のBCGワクチン接種も生後6カ月までにツベルクリン反応検査なしのいわゆるダイレクト接種として行われている。わが国ではこれまで積極的にBCGワクチン接種を推進し、その適応判断にツベルクリン反応検査を用いてきたので、BCG接種後、ツベルクリン反応が陽性を示せ



ば「BCGによる免疫がついた」と判断してきた。結核を感染の段階で診断する方法は、ツベルクリン反応が唯一であり、ツベルクリン反応検査を結核患者に施行した場合、患者を陽性と判定する感度は95~96%と言われる。しかし、結核患者であっても、重症結核の場合やエイズ(AIDS)などT細胞機能が低下した免疫不全状態では反応は弱くなる。また、ツベルクリン反応はBCGワクチン接種の影響を受けるため、わが国のようにBCGワクチン接種を実施している国々では、ツベルクリン反応検査で結核感染による陽性とBCG接種による陽性を区別するのは困難である。さらに、非結核性抗酸菌のなかには、結核菌との高い抗原交差性を示すものがあり、こうした抗酸菌感染を受けた場合にも、特異性の低下が起こりうる。ツベルクリン反応検査がこのように特異性に問題が生じるのは、前述のようにPPDに多数の抗原が含まれていることによる。

最近、Coleら<sup>14)</sup>によって結核菌の全遺伝子配列が決定され、マイクロアレイ法などの遺伝子分析技術の飛躍的向上によって、結核菌とBCG間の遺伝学的相違が明らかにされ、BCGのすべての亜株に共通の欠損であるRD1上の遺伝子がコードする蛋白質を抗原にして、末梢血と培養し、IFN- $\gamma$ を放出させ、これをELISAで検出・定量して結核感染の有無を判断する体外診断薬としてクオンティフェロン<sup>®</sup>TBゴールド(Quantiferon-TB Gold; QFT-Gold)がCellestis, Ltd (Australia)により実用化され、国内では日本ビーシージー製造(株)から販売されている。またIFN遊離試験をELISPOT法により行うT-SPOT<sup>®</sup>.TBが開発され、一方、結核菌の培養濾液には存在するが、一部のBCG亜株には存在しないMPT64蛋白質を単一抗原に用いたツベルクリン皮膚反応による診断法も研究されている<sup>15)</sup>。

## 文 献

- 1) 貝原守一:「ツベルクリン」の本態に関する研究. 福岡医学会雑誌. 1943; 36: 597-613.
- 2) 武田徳晴, 河西 清, 青木良雄: 精製ツベルクリン蛋白に関する研究(第二報) 精製ツベルクリン簡易精製法について. 日本細菌学雑誌. 1951; 6: 369.
- 3) Okamoto H: The preparation and properties of the o-aminophenol azo-tuberculin derivative. J Med J. 1950; 3: 31-40.
- 4) 山村雄一: 精製ツベルクリン蛋白質の化学的諸問題. 結核. 1964; 39: 309-311.
- 5) 浅見 望, 細井正春, 松村謙一, 他: ツベルクリン製造用菌株に関する研究. 第一報 各研究所保存の青山B株について. 胸部疾患. 1959; 3: 912-915.
- 6) 高橋 宏: モルモットにおける実験的結核性髄膜炎. 脳内接種した結核菌の毒力. 結核. 1956; 31: 212-216.
- 7) 徳永 徹, 片岡哲朗, 山本三郎, 他: 個人用PPD製品の力価について. 結核. 1975; 50: 147-152.
- 8) ツベルクリン製法研究協議会(武田徳晴, 柳沢 謙, 他): ツベルクリン力価の均一化に関する研究. 胸部疾患. 1959; 3: 807-813.
- 9) 片岡哲郎: PPDsの力価検定法に関する研究. 逐次抽出法の確立および人体試験の精度との比較. 結核. 1965; 40: 271-275.
- 10) Bengard A, Brennan P: Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Bloom BR, ed., ASM Press, Washington DC, 1994, 307-332.
- 11) Edwards LB, Palmer CE: Epidemiologic studies of tuberculin sensitivity. I. Preliminary results with purified protein derivatives prepared from atypical acid-fast organisms. Am J Hyg. 1958; 68: 213-231.
- 12) 中島 昭: 非定型抗酸菌より精製せるPPD-BおよびPPD-Yによる疫学的研究. 胸部疾患. 1960; 4: 121-127.
- 13) Bloom BR, Fine PEM: The BCG Experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. In: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, Bloom BR, ed., ASM Press, Washington DC, 1994, 531-557.
- 14) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; 393: 537-544.
- 15) Haslov K, Andersen A, Nagai S, et al.: Guinea pig cellular responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63: 804-810.