

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第5報 流動パラフィン加血清 Kirchner 液による 振盪培養 BCGの免疫効果について

広島医科大学細菌学教室 (主任 占部 教授)

松 尾 吉 恭

(昭和 26 年 12 月 19 日 受付)

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

先に私は(1)~(4)私のいわゆる流動パラフィン(以下流
パ)加 Kirchner 液による振盪培養の結果結核菌並びに
BCG の充分に均等培養された菌液をうることに成功し、
該培養菌の形態学的並びに生物学的諸性状よりして本培
養菌液は優れた均等度を示すばかりではなくて幼若な強

い活性をもつ生菌を多数含むのではないかと考えられる
旨を述べ、更に本培養 BCG 液の生存期間が、従来の手
摺り BCG 液のそれに比してより長い事実をも立証しえ
た。

今回はかかる振盪培養均等 BCG 液の免疫賦与能につ
いて追究する目的で以下の実験を行つた。

第 1 表 Römer 反応の推移並びに局所及び所属淋巴腺の変化

動物群	性別	Römer 反応 (mm)				培養 状況	局所並に所属淋巴腺の変化						
		2週	4週	6週	12週		2週	4週	6週	8週	10週	12週	
I 群	♂	12x	14x	14x	6x	Im Ch	S L	I (+)	K (+)	K (+)	I (+)	I (+)	(-)
		21	17	16	8	S L	+	+	+	+	+	+	
	♂	10x	12x	15x	14x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	(-)
		14	14	15	16	S L	+	+	+	+	+	+	
II 群	♂	9x	11x	15x	13x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	(-)
		10	12	17	16	S L	+	+	+	+	+	+	
	♂	4x	14x	18x	13x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
		5	15	21	16	S L	+	+	+	+	+	+	
III 群	♂	3x	12x	13x	20x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	(-)
		5	14	15	22	S L	+	+	+	+	+	+	
	♂	8x	9x	15x	16x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
		10	12	17	18	S L	+	+	+	+	+	+	
(対照)	♂	6x	7x	10x	4x	Im Ch	S L	I (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		7	11	11	5	S L	+	+	+	+	+	+	
	♂	7x	11x	19x	9x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
		8	12	20	10	S L	+	+	+	+	+	+	
♂	16x	16x	13x	18x	Im Ch	S L	I (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	17	16	13	19	S L	+	+	+	+	+	+		
♂	12x	12x	15x	20x	Im Ch	S L	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	I (+)	(-)	
	14	13	17	21	S L	+	+	+	+	+	+		

註: Im.: ワクチン接種側, Ch: 結核菌感染側, S: 局所, L: 所属
淋巴腺, K: 痂皮形成, I: 硬結, A: 膿瘍, U: 潰瘍
-: 変化なし, +: 米粒大, †: 小豆大, ‡: 大豆大, ††: 蚕豆
大, 週数はワクチン接種後の週を示す

実験方法

1 実験動物: Römer 反応陰性, 体
重 300~350g の健康モルモット。

2 動物群の編成並びに供試ワクチン
の種類と接種量:

I 群: 4 頭。ほぼ 1mg/cc の含菌量を示す流パ加 Kirchner 液による 4 週間振盪培養 BCG 液(A ワクチン)を 1cc ずつ右膝壁部皮下に接種。

II 群: 3 頭。含菌量同前の血清加 Kirchner 液による同上振盪培養 BCG 液(B ワクチン)を同上接種。

III 群(対照): 3 頭。血清加 Kirchner 液による静置培養菌膜よりの生塩水による手摺り 1mg/cc BCG 液(C ワクチン)を同上接種。

3 結核菌感染方法: ワクチン接種 4 週後に卵培地上 2 週間培養の人間型 Frankfurt 株よりの 0.01mg/0.5cc 生塩水平等浮遊菌液を 0.5cc ずつ右膝壁部皮下に注射した。

実験成績

1 体重の推移

平均体重の逐週の推移は特にいほどのことはなかつたが振盪培養ワクチンを用いた I, II 群に比して手摺りワクチンによる III 群では増加の程度がより少なかつた(表略)。

2 Römer 反応

表 1 に示すようにツベルクリン・アレルギー(以下ツ・ア)の発現状況は I 群

とⅢ群とでは特にいうべき差は認められなかつたが、Ⅱ群では陽性転化の時期がより遅かつた。なお剖検直前に各群1頭ずつの試験が陰性乃至疑陽性に転化したのがこれは陰性アレルギーの状態になつたものと考えられる。

3 ワクチン及び結核菌接種局所並びに各所属淋巴腺の変化

観察期間中の局所の変化並びに所属淋巴腺腫脹の程度は表1に示す通りである。

第2表 肉眼的剖検所見(ワクチン接種 13 週後)

動物群	I				II				III		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
直接塗抹標本	肺	2	0	4	0	3	2	0	10	3	2
	肝	4	5	3	0	2	1	2	8	4	3
	脾	7	9	7	0	7	5	10	28	12	4
	腺	45	13	23	17	5	22	23	57	13	8
	腺	52	6	24	47	42	31	26	67	24	16
	腺	19	48	10	18	7	19	14	29	11	17
組織切片標本	肺	0	0	1	0	0	0	0	3	1	0
	肝	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0
	脾	1	0	0	0	2	1	0	3	1	0
	腺	11	10	3	12	11	18	8	18	5	2
	腺	13	11	21	31	23	15	27	34	17	14
	腺	7	18	5	8	11	4	15	21	6	7

註：淋巴腺の大きさ、-：変化なし、+：米粒大、++：小豆大、+++：大豆大、++++：蚕豆大、○：乾酪化内臓の変化、-：変化なし、+：軽度、++：中等度、+++：結節稍多数、++++：結節多数、∞：結節無数

右：ワクチン接種側、左：結核菌感染側

第3表 直接塗抹並びに組織切片標本よりの結核菌検出成績

動物群	I 群				II 群				III 群(対照)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
動物番号	90	93	93	93	93	93	90	89	93	93
生存日数(生死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)	(死)
剖検時の結核菌変化(肉眼的所見)	局所転化	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註：いずれも各標本100視野中の菌数

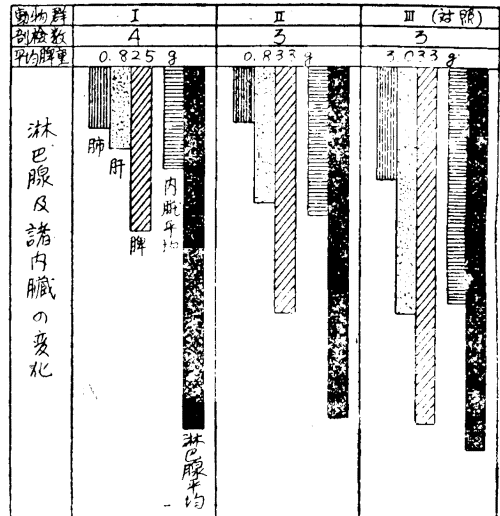
すなわちワクチン接種局所並びに所属淋巴腺の変化の程度は I > II ≃ III の順であり、結核菌感染側におけるそれらの変化の程度もほぼこれと並行した。

4 剖検時の肉眼的病理所見

肉眼的病理所見は一括して表2に掲げ、これを判り易くヒストグラムで示したのが図1である。

すなわち全般的にワクチン接種局所には局限して僅かに脂肪組織の増殖が認められたにすぎないが、結核菌感

第1図 肉眼的剖検所見総括



染局所には膿瘍乃至潰瘍の形成又は残存が全試験に認められ、その程度は I > II ≃ III の順であつた。各淋巴腺の変化度は各群間に著差はなかつたが強いて差を求めれば III > I > II の順となるようである。ところが内臓においては著しい差が認められ、その程度は III > II > I の順でしかも各群間にかんがりの開きがあつた。

第4表 淋巴腺及び内臓よりの定量培養成績(8週培養)

動物群	I				II				III	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
肺	∞	++	++	+	+++	++	+++	∞	+++	+
肝	∞	+++	+++	++	∞	+	+++	∞	+++	+++
脾	∞	∞	++	+	∞	+	∞	∞	∞	+++
腺	∞	++	∞	∞	∞	++	+++	∞	∞	++
腺	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
腺	∞	∞	++	∞	+++	∞	+++	∞	∞	∞

註：集落数は卵培地3本の発生平均集落数を以てし、記号はそれぞれ、+：10以内、++：11~50、+++：51~100、∞：101~200、∞：200以上を示す

以上の諸変化を総合すれば肉眼的病変度は III > II > I の順となること図1に示す通りである。

5 各淋巴腺並びに諸内臓における結核菌鏡検成績 直接塗抹並びに組織切片標本についての結核菌検出成績

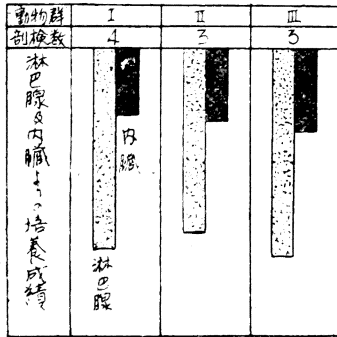
績は一括して表3に示した。

すなわち兩種標本における成績を総括すると結核菌の分布度は $III > II \approx I$ という順序となつた。

6 内臓及び淋腺よりの結核菌定量培養成績

肺・肝・脾及び左右除糞並びに腸骨淋腺よりの結核菌定量培養成績は表4及び図2に示した。

第2図 定量培養成績総括



すなわち之によつて判るように菌分布度はやはり、 $III > II \approx I$ の順であつたこと鏡検成績の場合と同然であつた。

7 病理組織学的所見

病理組織学的所見による成績判定には未だ一定の規準は設けられていないようであるが、ここには便宜上弓削⁶⁾の記載に倣つて判定し、その所見は表5に掲げた。

すなわち一般に病巣の形成数や病機の程度からみると、進行性の病像を示す傾向は $III > II > I$ の順となるものので、I群では他の2群の場合に比して病機がある程度停止性乃至治癒性の傾向をとりつつあつたのではないと思わせる様相が散見された。

考 察

私が今回実験に用いたA, B両ワクチンはこれを正確に1mg/cc菌液として用いることは測定上の難点から不可能であつたので、止むをえず既報²⁾の如く鏡検上1mg/ccの手摺り菌液のそれと比較対照して、ほぼそれに匹敵する含菌量を示す培養菌液であることを確めた後使用したのであるが、念のためこれらの 10^{-3} 稀釈液を0.1ccずつ卵培地4本に移植して発生集落数を検査したところ、A, Bワクチンよりの発生集落平均数はそれぞれ32.5コ, 23.0コでCワクチンよりのそれは30.5コであつた。Bワクチンは単に血清加Kirchner液による振盪培養菌液であるためになお大きい菌塊がかなり含まれていた関係上、A, (ワクチンよりの発生集落数はほぼ相等しかつたのに反してBワクチンよりのそのみか23.0コというようにより少ない結果となつたと思われるし、他方前記のように鏡検上含菌量はほぼ等しいものに作られてあるのでまず大体BワクチンもA, C両ワクチンと生菌量においては大きな差はないものと考えて差支えなからう。

ところで古くよりBCGワクチンに代替しうべきワクチンを求めようとする試みは数多く⁶⁾、ことに流バ又はワ

ゼリンその他油性物質を結核死菌に添加してかなりみるべき免疫効果をあげうる域に達してきており^{7)~19)}、更に教室の梶原^{20)~22)}は加熱による有効物質の1部喪失を懸念して自然死流バ加ワクチンにはじまり、活性炭加死菌ワクチンに至る1連の研究を行い注目すべき成果をあげつつある。

さて結核死菌に流バ乃至種々の油剤を添加してもツ・アの増強を来さない⁸⁾と否定する人^{23)~24)}もあるが多くの人は肯定的であり^{8)15)25)~28)}、またツ・アと感染防禦能とはこの場合並行しないと²⁹⁾と並行するといふもの³⁰⁾³¹⁾とがあつて、この面においても必ずしも意見の一致をみていないことは周知の通りである。私の場合、用いたBCGは生菌であり、しかもAワクチンは流バを含むとはいへんに培養操作上極めて微量添加されたにすぎないから、如上の諸家の成績と同日に論ずることはできないが、供試した3種ワクチン間にはツ・アに関する限り著差を認めえなかつた。

観察期間中、ワクチン接種局所並びにその所属淋腺の変化がAワクチンの場合、流バを含めぬB及びCワクチン接種の場合よりもより強かつたことは諸家の死菌ワクチンを用いての成績と同然であつたが、このことは生菌であると死菌であると問はず、たとえ微量であつても流バ添加によりそうでない場合に比してより強い局所反応が起ることを物語るものと考えてよからう。

それはそれとして、それのみか結核菌感染局所並びにその所属淋腺の変化もまたI群において最も高度であつたのにかかわらず、剖検時のことに内臓における肉眼的病理所見、結核菌分布度及び病理組織学的所見を総合した結果では、 $I < II < III$ の順であつたこと、いかえれば感染防禦能においてAワクチンが最も優れていたといふことは次のような理由に基くものではなからうか。すなわち、

既報²⁾³⁾のように優れた諸性状を具えた私の流バ加Kirchner液による振盪培養BCGが、或いはAdjuvantとして意義をもつかも知れない微量流バの添加によつてワクチンとしての有効性をより高めたのではなからうか。

ところで油加死菌ワクチンに有効性を賦与する第1因子としては、注射局所に菌体が長く留り常に抗体を産出させているのではないかという点に重きがおかれているようであるが、また流バ中の菌は局所に留ると同時に速かに肺に転移する傾向があると述べている人々^{11)32)~34)}もあり、さらにWestwater³⁵⁾は局所に抗原が貯えられるが抗体産生は局所以外であろうとしている。他方、流バには菌を局所に留める作用はなく、該ワクチンの有効性は局所の炎性反応に基く細胞性乃至体液性因子と死菌自体の物理化学的作用による結核病変形成のためであると唱える人々^{29)36)~38)}もあるようである。

私は本実験においてワクチン中に含まれる流バの機作

第 5 表 病理組織標本鏡檢所見

動物群		I 群				II 群			III 群 (对照)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
各 內 臟	肺	結節	+	+	-	-	+++	+	+++	+++	+	+
		乾酪化	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
		壞死	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		空洞形成	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		細胞浸潤	+++	++	+	+	+++	++	+	+++	+++	+
		巨細胞	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		結合織	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		乾酪性	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		出血	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
病 巢 所 見	肝	結節	+++	++	+	-	+++	+	+++	+++	+	
		乾酪化	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
		壞死	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
		細胞浸潤	++	+	+	-	++	+	+	+++	++	+
		巨細胞	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		結合織	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		出血	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
		結節	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+
		乾酪化	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
各 淋 巴 腺	右 腋 腺	結節	+++	++	-	+++	+++	+	+++	+++	+	
		乾酪化	+++	+	-	+	+++	+	+++	+++	-	
		壞死	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
		細胞浸潤	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
		巨細胞	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
		結合織	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		出血	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
		結節	+++	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
		乾酪化	+++	+	-	+	+++	+	+++	+++	+++	-
病 巢 所 見	左 腋 腺	結節	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	
		乾酪化	+++	+	-	+	+++	+	+++	+++	-	
		壞死	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
		細胞浸潤	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		巨細胞	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
		結合織	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
		石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		出血	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		結節	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	
		乾酪化	+++	+++	+	+	+	+++	+	+++	+++	
病 巢 所 見	胸 骨 腺	結節	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	
		乾酪化	+++	+	+	+	+	+++	+	+++	+++	
		壞死	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
		細胞浸潤	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
		巨細胞	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
		結合織	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		出血	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		結節	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	
		乾酪化	+++	+++	+	+	+	+++	+	+++	+++	

については追究しえなかつたが、兎にも角にも流ベ加 Kirehner 液による振盪培養 BCG 液を接種した場合に手摺りワクチン接種の場合に比してより強い感染防禦能を示したことは否めないようであり、このことは前にもふれたこのワクチンの均等性並びに高度活性に負うほかに、上述の諸家の成績より考察して少なくとも流ベ加 Adjuvant として、免疫賦与になんらかの役割を演じていることも一つの因子として考慮さるべきではないかと思う。

むすび

先に報告した流ベ加 Kirehner 液により均等に振盪培養された BCG 液の実験モルモット結核における免疫効果について、在来の手摺り BCG 液を対照として比較検討してみた結果認めえたことを要約すると次のようである。

1) ワクチン及び結核菌接種局所並びに各所属淋巴腺の結核性変化乃至腫脹の程度は、流ベ加 Kirehner 液振盪培養 BCG ワクチン接種群において手摺りワクチン接種群におけるよりもより強かつた。

2) しかしながら肉眼的剖検所見、結核菌分布度及び病理組織学的所見を総合すると、前者により高度の発症阻止能の存在することが判つた。

3) 従つて流ベ加 Kirehner 液による振盪培養 BCG は、なお改善すべき点は多々あるであろうが、その結核免疫効果乃至発症阻止効果という点ではかなりすぐれたものといえよう。

〔脱稿に当り恩師占部教授に満腔の謝意を捧げる。〕

文 献

- 1) 松尾：結核，26，324～329，昭26.
- 2) 松尾：結核，27，177～180，昭27.
- 3) 松尾：結核，27，225～228，昭27.
- 4) 松尾：結核，27，278～282，昭27.
- 5) 弓削：久留米医学雑誌，13，347～360，昭25.
- 6) 戸田：結核菌と BCG，昭24，南山堂.
- 7) Saenz, A.: Compt. rend. soc. biol., 120, 870～873, 1935.
- 8) Hensel, G.: Beitr. Klin. Tbk., 90, 387～390, 1937.
- 9) Rist, N.: Compt. rend. soc. biol., 126, 185～187, 1937.
- 10) Balteanu, I., Toma, A. & Garaguli, A.: Compt. rend. soc. biol., 126, 522～524, 1937.
- 11) Freund, J., Casals, J. & Hosmer, E.P.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 37, 509～513, 1937.
- 12) Deinse, F. F.: Compt. rend. soc. biol., 127, 202～205, 1938.
- 13) Bretey, J.: Compt. rend. soc. biol., 129, 1031～1033, 1938.
- 14) Haefliger, E.: Z. f. Tbk., 82, 91～101, 1939.
- 15) Sgurdsson, B. & Tryggvadttin, A.G.: J. Bact., 59, 541～544, 1950.
- 16) 岡：結核，20(12)，21～22，昭17.
- 17) 岡：抗研誌，1，25～26，昭21.
- 18) 岡・山田：抗研誌，3，53～55，昭23.
- 19) 山田：抗研誌，4，59～65，昭24.
- 20) 梶原：抗研誌，7，48～53，昭26.
- 21) 梶原：日本結核病学会中国四国地方学会々誌，2，5～5，昭26.
- 22) 梶原：第4回日本細菌学会中国四国地方学会，昭26.
- 23) 植田・遠藤：東京医事新誌，3111，3051～3055，昭13.
- 24) 遠藤：結核，17，558～558，昭14.
- 25) Saenz, A.: Compt. rend. soc. biol., 120, 1050～1053, 1935.
- 26) Saenz, A.: Compt. rend. soc. biol., 121, 957～960, 1936.
- 27) Casals, J. & Freund, J.: J. Immunol., 36, 399～404, 1939.
- 28) Sigurdsson, B.: J. Bact., 58, 271～278, 1949.
- 29) 金光：東京医学会雑誌，58，452～465，昭19.
- 30) Hensel, G.: Beitr. Klin. Tbk., 93, 132～136, 1939.
- 31) Hensel, G.: Beitr. Klin. Tbk., 96, 81～88, 1941.
- 32) Rist, N.: Ann. Inst. Pasteur, 61, 121～171, 1938.
- 33) 生沼：海軍々医会雑誌，33，844～850，昭19.
- 34) 金井・志賀・伊藤：結核，26，289～295，昭26.
- 35) Westwater, J.O.: J. Immunol., 38, 267～272, 1940.
- 36) Saenz, A.: Ann. Inst. Pasteur, 60, 58～94, 1938.
- 37) 岡：東京医事新誌，67(2)，20～21，昭25.
- 38) 金光：東京医学会雑誌，58，466～477，昭19.

(本論文の要旨は昭和26年4月，第24回日本細菌学会総会において報告した。)