

マウスによる実験的結核症の免疫実験

第 1 報 BCG 及び結核菌加熱死菌の効果

慶応義塾大学医学部細菌学教室

(主任 牛場 大蔵教授)

阿 部 逸 夫

(昭和 28 年 4 月 8 日受付)

(本論文の一部は昭和 26 年 11 月第 5 回日本細菌学会関東支部総会において報告した)

マウスに対する結核菌の感染実験は、古く R.Koch¹⁾ の記載するところであるが、マウスは結核菌に対して抵抗力が強いこと、病変として定型的な結節を生じないこと、アレルギーを生じないこと等のために、従来結核症の実験動物として殆んど顧られなかつた。Raleigh & Youmans²⁾ は古今の広汎な文献を挙げてマウスの実験的結核症について論じ、従来の記載では一定の菌株の一定量を一定の感染方法で接種しても、その結果を予知することができないとして、マウスの静脈内に人型結核菌を感染させた時の病変を詳細に報告した³⁾。これより先 Youmans & McCarter⁴⁾ はストレプトマイシンの生体内における結核の治療実験にマウスを使用した⁵⁾が、以来抗結核剤の効果の判定にマウスが盛んに使用され始め、わが国でも岩崎・小川⁶⁾ 及び水之江⁷⁾ の報告がある。私はマウスにおける実験的結核症の基礎的実験を行つた後、マウスを使用して結核症の免疫実験を行い、マウスもこの種の実験に或程度使用できるという見解に達したので、ここにその成績を報告する。

実験材料

1) 使用マウス：体重 15g 前後の健康白色マウスで、同一時期に同一場所から購入したものを使用した。

2) 使用菌株：免疫用としての BCG 及び人型結核菌 H₃₇ 株は予研から分与され、以後教室で保存しているものを使用し、感染菌株は結核患者喀痰から分離した川津株を使用した。この菌株は分離後約 6 カ月を経過したもので、その 0.1mg を静脈内にさすと 30 日で約半数のマウスを斃す程度の毒力を有していた。

3) 死菌ワクチン及び感染菌浮游液：

a) 結核菌加熱死菌生理的食塩水浮游液（死菌ワクチンと略）は H₃₇ 株の Sauton 培地約 3 週培養のものを 100°C 1 時間加熱殺菌し、濾過洗浄後 37°C で乾燥、水晶玉入コルベン手振法で所要の濃度のものを作つた。

b) 結核菌加熱死菌流動パラフィン浮游液（流パラワクチンと略）は上記死菌ワクチンで生理的食塩水の代りに流動パラフィン（日本薬局方）を使用した他は全く同様に作つた。

c) 結核菌加熱死菌流動パラフィン抽出液（流パラエ

キスと略）は細い点の他はほぼ Choucrout⁷⁾ の方法に従つて作成した。すなわち上記 H₃₇ 株乾燥死菌を秤量して瑪瑙の乳鉢にとり、5 倍量の流動パラフィン（日本薬局方）を加えて混和後 37°C で 1 昼夜抽出し、さらに 40°C で 1 時間抽出後、4,000 回転 1 時間遠沈し沈渣にさらに 5 倍量の流パラを加え、50°C で 1 時間抽出後 4,000 回転 1 時間遠沈し、両者の上層をとつてさらに 7,000 回転 3 時間遠沈して、橙黄色透明の液を得たのでこれを使用した。しかしそのままではマウスに対して毒性を認めたので、実際には流パラで 10 倍に希釈したものを使用した。

d) BCG 及び感染菌川津株の菌浮游液は Sauton 培地又は岡・片倉培地から菌をとり、瑪瑙の乳鉢を使用して型の如く生理的食塩水浮游液とした。なおこの場合各菌液の生菌単位 (viable unit) は感染菌川津株は実験 I では 1mg 中 600 万、実験 II では 6,000 万、BCG は両実験ともに 6,000 万であつた。

実験方法

実験は 2 回に分けて行つた。実験 I ではマウスを 5 群に分ち、第 1 群は BCG 0.1mg (0.2ml) を静脈内に、第 2 群は BCG 1mg (0.5ml) を皮下に接種、第 3 群は死菌ワクチン総量 1mg を約 7 日間隔で 4 回に分けて注射、第 4 群は流パラワクチン 1mg (0.3ml) を 1 回皮下に注射、第 5 群は無処置対照群とした。流パラワクチン注射箇所は流出を防ぐためにコロヂオンで封じた。

実験 II では前処置はすべて腹腔内に行い、全体を 4 群に分ち、第 1 群は BCG 0.2mg (0.2ml) を接種、第 2 群は死菌ワクチン総量 1mg を 4—7 日の間隔で 5 回に分けて注射した。第 3 群は 10 倍の流パラエキスを 0.1ml を注射し、第 4 群は無処置対照とした。

感染はすべて静脈内に行い、川津株 0.1mg (0.2ml) を実験 I では免疫開始後 5 週に、実験 II では 6 週後に接種した。

全観察期間を通じて毎日臨床的症状を見るときともに、定期的に体重を測定した。

感染後は 60 日迄 5—10 日の間隔で各群 2—3 匹宛のマウスをエーテルで屠殺剖検・定量培養その他の諸検査

を行つた。定量培養はホモジナイザー⁸⁾を使用した他はほぼ小川⁹⁾の方法に準じて行つた。なお各群 10 匹宛のマウスについて、生死・体重の変化等を観察した。

実験成績

1) 免疫処置後の各前処置群のマウスの平均体重は、対照群と同様に時とともに漸増し、各群の間に差はなかつた。

2) 臓器の定量培養の結果は、実験Ⅰでは第1図に示す如くである。これは各臓器 1mg 中の生菌単位を示したもので、各群各時期に屠殺したものの平均である。まず肺(第1図A)について見ると、無処置対照群では感染後 30 日迄対数的に増加し、その後は動揺を示しているがやや漸減の傾向にある。これに反して BCG 接種群は静脈内接種群も皮下接種群も 15—20 日迄は対照と変

りがないが、その後の増殖が阻止されて、対照における如き高い頂点を示すことなく僅かに漸増(静脈内)或いは漸減(皮下)の傾向にあつた。死菌ワクチン・流パラワクチン両群では対照との間に殆んど差を認めることができなかった。

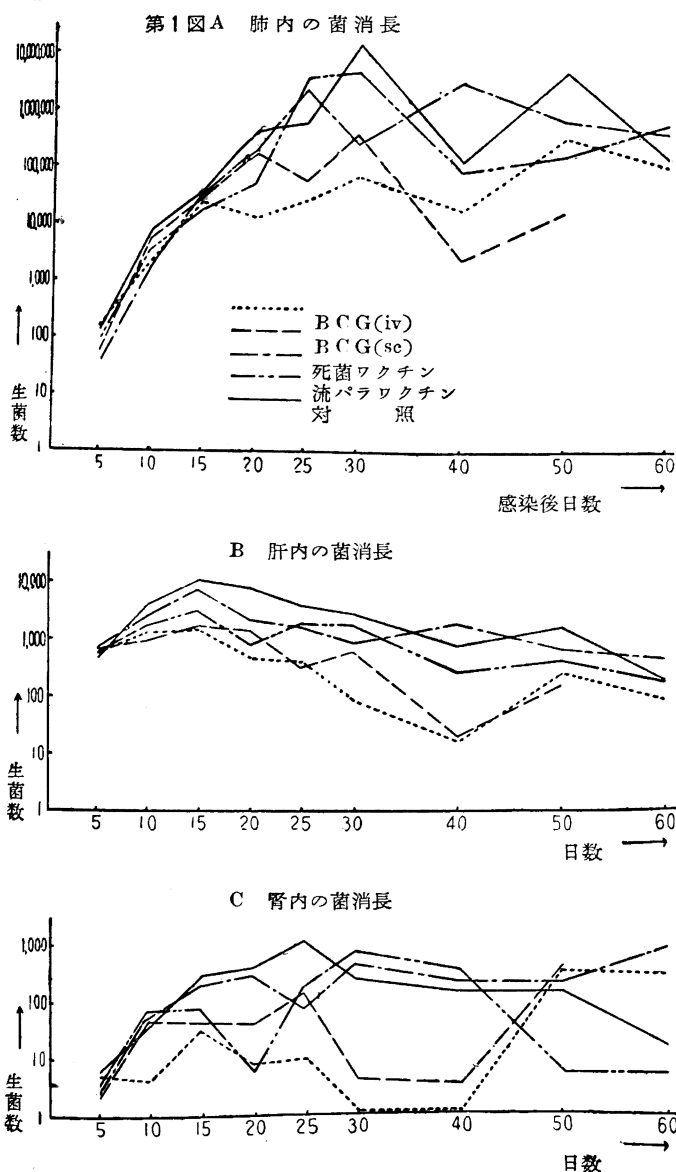
肝・脾における結果は全く同様といつていい程よく一致していたので、ここには肝の結果のみを示した(第1図B)。これを見ると対照群では感染後 5 日の菌数は肺よりも多いが、その後の増殖は緩やかであり、15 日ですでに頂点に達し以後漸減している。肝においても BCG 接種群は両群ともに対照に比して菌増殖の抑えられていることは明らかで、5 日後から一路漸減の経過を辿つていた。死菌ワクチン・流パラワクチン両群では、この中間に位していた。

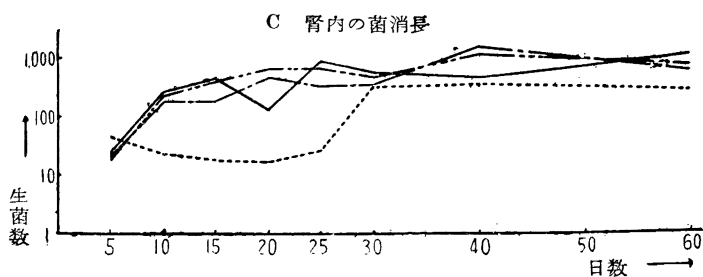
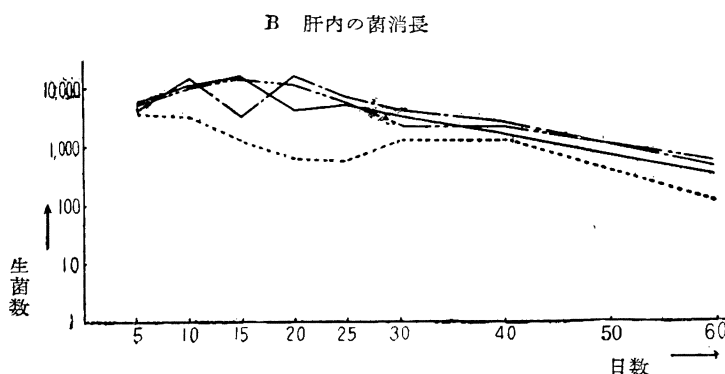
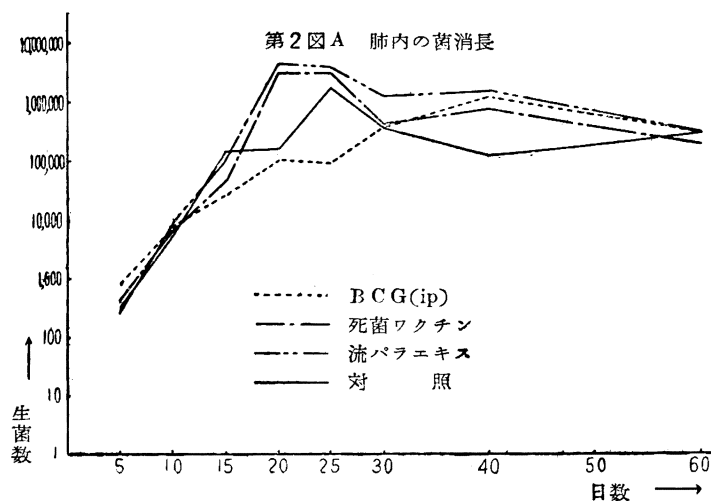
腎においては(第1図C)菌の絶対数が肺に比して非常に少なくなつてはいるが、対照では肺におけると同様の増殖形式を示し、25 日迄増加し以後やや減少の傾向を示した。ここでも BCG 群は増殖が抑えられていたが、感染後 50 日以上になると急に増加して、そのために曲線が非常に乱れた感を与えている。この点に関しては後に考察したい。流パラワクチン群では時期によつて対照より菌数の少ない時があつたが、死菌ワクチン群では対照とほぼ同様であつた。

実験Ⅱでは第2図(A・B・C)に示す通りであつて、各臓器ともに実験Ⅰとほぼ同様の結果が得られた。すなわち BCG 群では感染菌の発育増殖の阻止乃至遅延が認められたが、死菌ワクチン・流パラエキス両群では対照との間に差が認められなかつた。

3) 臓器の肉眼的変化は肺の他は殆んど認められず、ただ肝に時々帯黄灰白色の斑点が認められたが、結核菌と無関係の病変であつた。肺の変化は著明で、灰白色微小の結節から黄灰白色乾酪様の結節に至る迄種々の程度のものが見られ、又病変部の占める広さも種々で肺の大部分を占める程のもの迄見られた。この病変が高度の場合は、肺が著るしく膨大し結節の間は強い暗赤色を呈し、健康と思われる部分は殆んどなかつた。この肺の変化は、肺における生菌数とほぼ平行し、対照では感染後 25—30 日迄漸次増強しその後は余り変化しなかつた。

各群を比較して見ると、全般的に著る





しい差を認めなかつたが、実験ⅠのBCG群特に静脈内接種群では感染後20日・25日の病変が対照に比してやや軽度であつた。

4) 脾の重量については、体重による差を少なくするために、体重との比をもつて表わしたが、非常に区々の値を示し、この値の大きなものには肺の病変を認めたが、必ずしもこの大きさと肺の病変とは一致せず、従つて各群の間に一定の傾向を見出し得なかつた。

5) 感染後一定期間生死を観察した結果は第3図に示す通りであつて、実験Ⅰ(図A)では40日迄観察したが、対照では30日前後で死亡するものが多く、40日で

は10匹中6匹が死亡した。これに反してBCG静脈内接種群では8匹中全部が生残した。その他の前処置群も対照に比して生残数が多くなつていた。

実験Ⅱでは(図B)60日迄観察したが、対照は実験Ⅰと同様30日前後で死亡するものが多く、結局10匹中8匹が死亡した。この場合はBCG群は生残数が多かつたが、その他の前処置群では対照と殆んど同様であつた。

なおこれら生死観察群の体重の変化を見ると実験Ⅰ・Ⅱともに各群とも平均体重が2—4g減少していたが、BCG群は減少の程度が少なく、静脈内接種群では僅かながら増加していた。しかし各群間の差はそれ程大きくはなかつた。

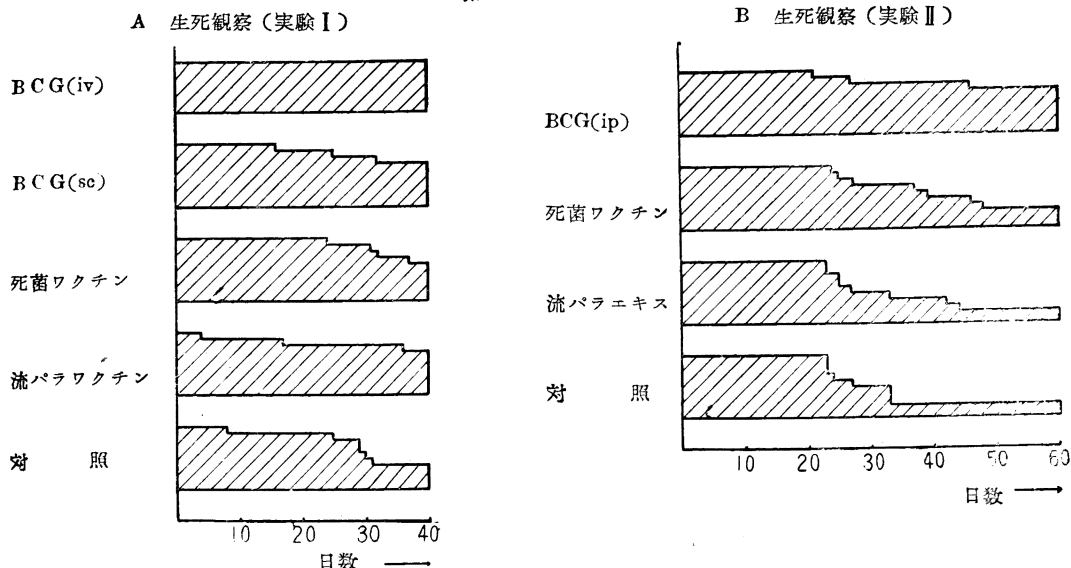
6) 組織学的検査は代表的なものについて行つたが、肺について述べるに肉眼的に灰白小結節を認めるものでは類上皮細胞様の明るい核を持つた円形細胞の集簇が認められ、黄灰白色乾酪様の病変を有するものでは広汎な壊死が認められた。いずれの場合にも繊維化は認められなかつた。又病変部には多数の抗酸性菌が認められた。

総括及び考案

以上の実験を総括して見ると、種々の点でBCGの有効性が認められ、特に静脈内接種群に最も著明であつた。これを個々の点について検討してみると、まず体内結核菌の消長については、対照群の急激な菌の増殖がBCG接種によつて或程度阻止されたと思われるのであるが、勿論完全に抑制された訳ではなく、比較的問題であつて肺のように菌の増殖が非常に旺盛なと

ころでは、BCG接種群でも或程度迄の増殖が見られ、特に実験Ⅱの腹腔内前処置群では肺においてはその他の臓器における程菌の増殖抑制が著明ではなかつた。又肺においては観察の末期に至る迄僅かながら増殖を継続して、末期になると対照との差が殆んどなくなつて来ている。腎においてはBCG群の増殖阻止作用が観察末期になると失われる如く見えて、菌の増殖は肺におけるより一層著明であつた。しかしこれを仔細に観察して見るとそれ迄余り著明でなかつた個体差が感染後40日を過ぎる頃から著明となり、そのため観察を一層複雑にしているのである。そしてこの個体差は免疫群の腎におい

第 3 図



て殊に著しく、例えば実験Ⅰの腎の定量培養の成績について見ると、感染後 10 日では対照群が 1mg 中 34, 32, 60; BCG 静脈内接種群 4, 4 であるのに対し、50 日では対照 53, 305; BCG 群 1, 800 となっており、実験Ⅱでも感染後 10 日では対照 145, 435, 107; BCG 群 17, 42, 6 であるのに対し、60 日では対照 2100, 900, 500; BCG 群 0, 900, 0 となっていた。

・これで見ると BCG 接種群は観察の末期になつても腎内の菌増殖が抑えられているものが多いことが分るが、対照と同様に増殖しているものがあることは個体によつて感染菌の増殖阻止力が破れていることを示すもので、BCG 接種は菌増殖を完全に阻止するものではなく、急激な増殖を一時的に抑え遅延させているものというべきであろう。次に肝及び脾内の菌消長を見ると、実験Ⅰ・Ⅱともに比較的簡単であつて、BCG 接種群は全く増殖が阻止されていて菌は漸次減少していつた。この場合もやはり観察の末期では対照との差は認め難くなつていた。

次に以上の定量培養の成績をその他の所見と合せて考えて見ると、対照においては肺内の菌が最高に達する 30 日前後においては肺の肉眼的変化も最も著しく、又死亡するものも最も多かつた。そしてこれら死亡例では例外なく急激な体重の減少と高度の肺病変を示し、染色培養ともに多数の菌を保有していることが認められた。この時期を過ぎると肺内の菌数は徐々に減少していつたが、肺の肉眼的変化も幾分軽度となつており、又死亡するものも殆んどなかつた。

これに対して BCG 処置群では感染後 30 日前後の肺内の菌の急激な増殖が抑えられているのに一致して、この時期における肺の肉眼的変化も未だ比較的軽度であ

り、死亡するものも殆んどなかつた。それ以後になると肺の病変も幾分か高度となり、又僅かながら死亡するものもでてきた。このように肺内の菌の消長は肺の肉眼的変化や生死と非常によく一致した成績を示し、肺内で菌が極度に増殖し、肺に高度の病変を起し、その結果死亡するものと考えられる。なお感染後比較的早期（2 週以内）に死亡したものは、種々の点から結核死とは考えられなかつた。

以上のことからマウスにおいても BCG が有効であつたと考えるのであるが、観察の末期になつて BCG 処置群と対照群との差がなくなつてくるのは、すでに述べたように個体によつて BCG 接種による増殖阻止作用が破れて漸次菌が増殖してくるもののあることの外に、対照群では感染後 30 日前後で病勢の最高に達して死亡するものが多いので、それ以上生存したものは元來抵抗力強いものであつたことも考えられ得る。

次に BCG 接種群以外の前処置群では、実験Ⅰにおいて肝脾腎の定量培養、生死において、特に流パラワクチン群においてやや対照より良好な成績が得られたが、BCG 程明らかな効果を認めることができなかった。又実験Ⅱでは流パラエキスは死菌ワクチンと同様対照と差を認めることができなかった。

一般に適当な Adjuvant¹⁰⁾ を用いる時は死菌においても著しく抗原性が高まり、感染防禦能をも与え得るということは古くからいわれており、結核菌においても Coulaud¹¹⁾, Saenz¹²⁾ の研究以来内外で多くの追試者を出しているが、最近わが国の岡・山田ら¹³⁾ は系統的にこの実験を行い、結核加熱死菌に流動パラフィン又はラノリンを加えて家兎・海狸にさすと強いツベルクリン・アレルギーを生じ、又海狸においては BCG に劣らぬ感

染防禦能が得られたと報告しており、金井ら¹⁴⁾、工藤¹⁵⁾もほぼ同様の成績を得ている。

又 Choucrour⁷⁾ は結核加熱死菌の流動パラフィン抽出液が海豚にツベルクリン・アレルギーと感染防禦能を与えたといい、さらにこれを毒性分画と感作性分画に分けており、金井ら¹⁶⁾は BCG 加熱死菌からの流バエキスで同様の成績を得ている。

一方植田・遠藤¹⁷⁾は結核死菌免疫における Adjuvant の効果を否定し、Rist¹⁸⁾は結核加熱死菌の流バエキスの生物学的活性を否定している。

われわれのマウスにおける実験から流動パラフィンの Adjuvant としての作用や流バエキスの有効性を云々することは早計であり、なお検討を要するものと考えられる。

次にマウスによる結核症の免疫実験は、これ迄余り行われていないが、結核菌を静脈内に感染させたマウスについて Schwabacher & Wilson¹⁹⁾(皮下或いは静脈内接種)、Aronson & Schneider²⁰⁾(皮下或いは腹腔内) Siebenmann²¹⁾(皮下) らは BCG による免疫効果を認め又 Hauch (1945) も BCG 接種マウスの感染防禦実験を行つてゐるが定量培養による体内菌の消長によつてその効果を見たものはない。染谷・川村²²⁾は BCG の生菌及び死菌を静脈内に接種して、私と殆んど同じ実験方法の下に、BCG 生菌免疫群と対照群との間に差を認めなかつたといつてゐるが、感染菌(牛型菌¹⁰株)の体内での増殖が私の使用した株に比して著しく弱かつたことや、観察期間が3週間であつたこと等のために BCG の有効性が認められなかつたのではないかと思われる。

人及び種々の動物において有効とせられてゐる BCG が、その本態がかなり異なるであろうと思われるマウス結核症においても、種々の点で免疫効果を認め得たことは興味のあることであり、結核症免疫の研究にマウスもまた有用であることを思わせる。

最後にこの際の効果判定について、Youmans & Raleigh²³⁾は化学療法剤の効果の判定にはマウスの生残日数・体重の増減・結核菌検査を伴う病理組織学的所見を三大示標とし、殊に最後の点を重視しているが、岩崎ら⁵⁾はマウスの組織反応は比較的簡單であつて、それよりむしろ肺内結核菌の消長に重点をおくべきであると述べてゐる。この点本実験でも肺内菌消長はその他の所見とよく一致し、最も重要な示標であると考ええる。

結 論

1) マウスの実験的結核症の免疫効果判定に際しては、肺内の菌消長が最も参考になるが、生死・肝などにおける菌消長も参考とすべきである。

2) マウスにおける免疫実験では、BCG は皮下・腹腔内・静脈内いずれの接種方法によつても有効であつたが、就中静脈内前処置が最も有効であつた。

3) BCG による体内菌の増殖阻止作用は対照群の大

多数が死亡する時期(本実験では 25—30 日)迄は著明であるが、それ以後は次第に認め難くなり、特に腎においてそうであつた。

4) 流バエワクチンは僅かに有効かと思われたが、BCG に比して劣り、流バエキスは死菌ワクチンとともに殆んど効果が認められなかつた。

5) 結核症の免疫実験をマウスを用いて行うことは、その本質の追求に関して意義あることと思われる。

(本研究は文部省科学研究費によつた。ここに謝意を表する。)

終りに御指導・御校閲を賜つた恩師牛場教授に謹謝する。

文 献

- 1) Koch, R.: Berl. kl. Wschr., 19: 221, 1882.; Mitteil. a. d. k. Gesundheitsamte, 2: 1, 1884.
- 2) Raleigh, G. W., & Youmans, G. P.: J. Inf. Dis., 82: 197, 1948.
- 3) Raleigh, G. W., & Youmans, G. P.: Ibid., 82: 205, 1948.
- 4) Youmans, G. P., & McCarter, J. C.: Am. Rev. Tuberc., 52: 432, 1945.
- 5) 岩崎竜郎・小川辰次・結核, 24: 173, 昭24.
- 6) 水之江公英: 日本細菌学雑誌, 7: 293, 昭27.
- 7) Choucrour, N.: Am. Rev. Tuberc., 56: 203, 1947.
- 8) 金沢 謙・佐藤文男: 日本臨床結核, 10: 46, 昭29.
- 9) 小川辰次: 結核, 24(2): 19, 昭24.
- 10) 医学のあゆみ, 10: 349, 昭25.
- 11) Coulaud, E.: Rev. de la Tuberc., Sér. 4, Tom. 2: 851, 1934.
- 12) Saenz, A.: C. R. Soc. de Biol., 120: 870, 1935.
- 13) 岡 捨己・山田俊一郎他: 抗研誌, 1: 25, 昭21; 2: 1, 昭22; 3: 53, 昭23; 4: 59, 昭24; 5: 25, 昭24; 6: 22, 昭25; 6: 106, 昭25.
- 14) 金井興美他: 結核, 26: 289, 昭26; 26: 319, 昭26.
- 15) 工藤祐是: 日本細菌学雑誌(抄録), 6: 167, 昭26.
- 16) 金井興美他: 結核, 27: 124, 昭27.
- 17) 植田三郎・遠藤勇三: 東京医事新誌, 3111号, 3051, 昭13.
- 18) Rist, N.: Ann. Inst. Pasteur, 61: 121, 1938.
- 19) Schwabacher, H., & Wilson, G. S.: Tubercle, 18: 498, 1937.
- 20) Aronson, J. D., & Schneider, P.: Am. J. Pub. Hlth., 40: 533, 1950.
- 21) Siebenmann, C. O.: J. Immunol., 67: 137, 1951.
- 22) 染谷四郎・川村 達: 文部省総合研究結核研究委員会, 昭25.11.3.
- 23) Youmans, G. P., & Raleigh, G. W.: J. Inf. Dis., 82: 221, 1948.