

Streptomycin 依存性結核菌の分析に基いた結核症

の感染と免疫に関する実験的研究

第4報 Streptomycin 依存性菌による

てんじくねずみの抗結核免疫

国立予防衛生研究所結核部 部長 柳沢 謙

橋本 達 一 郎

(受付 昭和30年7月9日)

Streptomycin(SM) 依存性結核菌 18-b 株は、そのまま生菌免疫原として用いられた場合、生体内増殖力の面から考えれば最もよく免疫原性物質を保持している死菌ワクチンの接種に近似すると考えられるが、一方接種された菌が長く生体内に生存を続け、接種量が少くともツベルクリン・アレルギーの発現が認められる点から、単なる結核死菌の接種とは同一に考えられない。

種々の結核死菌を用いて抗結核免疫を発現させようとする試みは従来数多くなされているが、弱毒生菌を用いる免疫法にくらべると効果が少ない。しかし生菌ワクチンでも、生体内で全く増殖を行わない無毒結核菌 H₃₇Ra 株は、生菌ワクチンとして効果がないことを Dubos 等は報告している¹⁾。この場合、彼等は無毒菌の増殖力喪失のために、抗原量が生体内で免疫に有効な水準に到達しないためと考えている。これらの報告に基づけば、第3報の成績から菌力のない結核菌の範囲に入るべき18-b 株には免疫力を期待することはできないはずである。しかしこの点においても、18-b 株は結核死菌や Dubos 等の報告における H₃₇Ra 株と異つて、てんじくねずみに抗結核免疫を発現させることができたので以下その成績を報告し、この菌が生菌ワクチンとして免疫力発生に与える意義について若干考察を行つてみようと思ふ。

実験方法

実験動物は体重 300~400g のてんじくねずみに限定し、感染、臓器培養および病変の判定方法は前報²⁾に記載した通りである。ツベルクリンアレルギーは100倍稀釈旧ツベルクリン液を用い、その 0.1ml を皮内に注射後24時間目に硬結の大きさを測定した。凍結乾燥菌は氷室に保存したものを蒸溜水で再浮游して用いた。

実験成績

実験Ⅰ．皮下感染攻撃における防禦効果

18-b 株(第22代)および H₃₇Ra 株のいずれも凍結乾燥菌を用い、それぞれ 1mg (湿菌量)を各群5匹ずつ

のてんじくねずみの左下腹部皮下または足静脈内に注射して免疫した。接種生菌単位数は 18-b : 12×10⁶, H₃₇Ra : 20×10⁶ である。免疫処置後6週間、非免疫対照群の動物10匹とともに放置し、6週後に H₂株(凍結乾燥菌 Lot 18) 0.1mg (73.6×10⁴) ずつ全群の各動物の右下腹部皮下に注射して攻撃感染を行つた。感染直前に免疫動物のツベルクリンアレルギーを測定したが、各群とも平均 15mm 以上の硬結を示していた。感染後更に7週間放置して全群を屠殺剖検したが、その際の各群の動物のリンパ腺および内臓の肉眼的結核性病変は表1に示すとおりである。

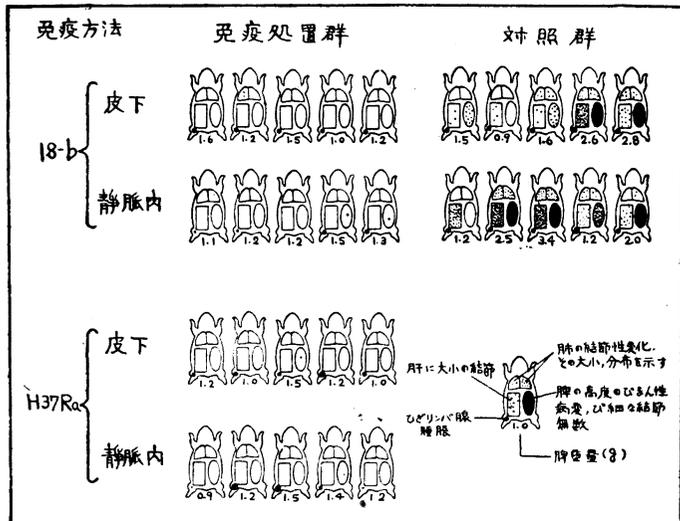
免疫処置をしなかつた対照動物は大部分著しい結核性変化を示していたが、免疫群は肺および脾に1~2個の粟粒大結節を認める少数の外は内臓に全く結核性病変を認めることができなかつた。したがつて免疫方法および免疫菌株による防禦効果の差異はほとんど区別されない。また各群の動物中、感染菌接種部位所属リンパ腺が腫張しているものはかなり存在した。

この成績は 18-b 株が H₃₇Ra 株と同様に、皮下接種された強毒結核菌による内臓結核症の進展を著しく阻止することを示している。

実験Ⅱ．静脈内攻撃感染における抗菌免疫の測定

SM含有培地継代第25代の SM200γ/ml-Kirchner 寒天 11日培養 18-b 株から蒸溜水浮游菌液をつくり、皮下または静脈内に 0.4ml ずつ注射した。一方同一菌液を 100°C、60分加熱殺菌し、同じく 0.4ml ずつ静脈内に注射した。また同一菌体から流動パラフィン(流パラ)浮游加熱死菌菌液をつくり、0.2ml ずつ皮下に注射した。以上 18-b 株を用いた各免疫群の動物1匹の接種菌量はすべて 1mg (湿菌量)で、生菌抗原の生菌単位数は 71×10⁶/mg である。別に2群の動物には実験Ⅰと同じ凍結乾燥 H₃₇Ra 株をそれぞれ 1mg ずつ静脈内または皮下に注射して免疫した。以上6群の免疫群は無処置の対照群と共に38日間放置後、実験Ⅰと同じ凍結乾燥 H₂株(Lot18) 0.01mg (58.6×10³)を足静脈内に注射し

表1 18-b株またはH₃₇Ra株各1mgで各経路より免疫処置したてんじくねずみの強毒菌H₂株0.1mg皮下感染に対する防禦力



て攻撃感染を行い、感染後1日、2週、4週目に各群からそれぞれ2匹の動物を屠殺して剖検し、肺および脾の定量培養を行った。感染後1日目の肺培養は動物1匹についてのみ行った。定量培養にはすべて小川培地を用いた。免疫処置後35日目にしらべたツベルクリンアレルギーでは免疫6群の中、18-b加熱死菌蒸溜水浮游菌液接種群だけがほとんどアレルギーの出現を認めなかったが、他はいずれも強いアレルギー反応を呈した。

表2は各免疫群の動物の臓器10mg中の生菌数の消長を比較して示す。BCG免疫において観察したと全く同様に、肺の方が脾より免疫動物の菌増殖抑制作用が強い。いずれの臓器においても18-b株生菌免疫群では菌の増殖の抑制が著明であるが、加熱死菌蒸溜水浮游液免疫群は対照と同じように菌の増殖を許し、抑制はほとんど認められない。これにくらべ加熱死菌流パラ浮游液で免疫したものは、生菌免疫群にくらべると弱いが、増殖抑制作用を認めることができ、殊に肺においてはかなり著明である。H₃₇Ra株免疫群はその接種生菌数から考えると直接18-b株免疫群と免疫効果を比較することは困難であるが、やはり相当の抗菌力を与えることが認められ、肺では著明に攻撃菌の増殖を抑制している。

静脈内感染後の内臓の肉眼的結核性病変はいずれの群も感染後2週目には著明に発現し、4週目ではさらに著しい。免疫群各群の間では病変の程度にほとんど差がなく、対照群とも著しい差がなかったが、ただ対照群および加熱18-b死菌の蒸溜水浮游液免疫群の4週目の観察において、結核結節の壊死におちいつたものが多くみられる点が他群と異っていた。

実験Ⅲ. 18-b株からの逆変異菌の増殖の検討

第2報³⁾の逆変異菌出現頻度から考えると、第1⁴⁾または第3報²⁾において動物に接種した18-b株1mgの生菌群の中には少数のSMを必要としない逆変異強毒菌が混在していたと思われるが検出されなかった。したがって上述の18-b株による抗菌免疫効果が、同時に接種された少数の強毒逆変異菌によるのではなからうかという疑いはこれ迄の成績からも否定しうるが、さらに多数の逆変異強毒菌を含むと思われる大量の18-b株を接種してこの問題を再び検討することにした。これはまた同時に18-b株を生菌ワクチンとして用いる場合の安全性にも関連してくることである。

継代第27代の18-b株のSM200γ/ml-Kirchner寒天11日培養菌を採取し、25mg/mlの濃厚菌液をつくつて13匹

ずつ2群にわけたてんじくねずみに、1群は足静脈内に、他の1群は右下腹部皮下に10mg(0.4ml)ずつ注射した。注射後3カ月観察し、3カ月目に全動物を屠殺剖検した。屠殺直前に測定したツベルクリンアレルギーの測定値は静脈内注射群では平均19.9mm、皮下接種群では平均18.2mmで強く発現していた。なお臓器培養はSM200γ/ml-Kirchner寒天培地とSMを含まない小川培地を併用して行った。3カ月を通じて接種経路の如何にかかわらず、衰弱または死亡した動物はなかった。

動物接種と同時に接種菌液はSM200γ/ml-Kirchner寒天とSMを含まない小川培地に接種培養し18-b株の生菌数および動物接種量中に含まれる逆変異菌数を計算した。小川培地に対する18-b株の接種菌量が多いと逆変異菌集落の発生が妨げられる現象が観察されたが、0.4mg接種培地にはすべてに逆変異菌集落の発生が認められ培養8週では平均22個の集落が生じた。これから18-b株10mg中の逆変異菌数を計算すると、各動物は550の逆変異菌を含んだ1.14×10⁹のSM依存性菌を静脈内または皮下に接種されたことになる。

皮下接種群は剖検時内臓に結核性病変を呈しているものは1匹もなかった。接種部位所属のひざリンパ腺も1匹が大豆大に腫張して膿を証明し、3匹がそれぞれ米粒大に腫張していたが、これら4匹のひざリンパ腺からの培養は陰性であった。ひざリンパ腺以外のリンパ腺には変化なく、他の9匹ではすべてのリンパ腺が無変化であった。皮下接種の13匹は脾だけを培養したが、いずれの脾からもSMを含有する培地にも含有しない培地にも菌を分離することができなかった。

静脈内接種群は表に示すように肺または脾に2~3個

表2 各免疫処置後38日目に強毒結核菌H₂株0.01mg(59×10⁹)を静脈内感染したてんじくねずみの各時期における臓器10mg中の結核菌(H₂)の消長

各免疫原(1mg) および 免疫方法	免疫後5週目のツベルクリンアレルギー(平均値)	肺 10mg 中の生菌数			脾 10mg 中の生菌数		
		1日	2週	4週	1日	2週	4週
対照 (無処置)	4.0	93	2,100	2,200	75	18,000	23,000
18-b生菌 静脈内	21.0	64	10	12	34	650	280
18-b加熱死菌 静脈内	5.0	55	6,100	600	26	20,000	2,750
18-b生菌 皮下	19.0	30	10	30	47	850	750
18-b加熱死菌 流パラ浮游液 皮下	20.0	42	10	15	36	1,800	1,300
H ₃₇ Ra生菌 静脈内	19.4	32	0	8	78	1,800	700
H ₃₇ Ra生菌 皮下	19.0	23	10	12	54	270	550
			140	/	42	3,900	/

注 臓器中の生菌数は各時期における動物2匹の測定値
但し肺における1日目の測定値は動物1匹についてのみ行つた /: 測定せず

の粟粒大結節を示す動物が各1匹ずつ認められた以外は、内臓やリンパ腺系に結核性変化がみられた動物はなかつた。脾の培養ではどの動物からもSMを含まない培地には集落を分離できず、SMを含む培地によつては表に示すように(各動物の頭上に記入)脾10mgにつき平均3.5個の依存性菌が分離された。脾は皮下接種群のそれと異なり、腫脹の痕をとどめるものがあつて脾重量の動物差が著しかったが、この中脾重量の著しいもの6匹についてその肺を培養した。その結果、SM含有培地によつて肺10mg中2個の菌が分離された動物が1匹のみで、他はSMを含まない培地をも含めてすべて培養陰性であつた。

静脈内接種群の動物はすべてその脾を組織学的に検索したが、その成績は次の通りである。リンパ濾胞の萎縮強く、脾髄の反応も正常脾以下と思われる1匹を除いては、脾の反応としては共通で脾髄と濾胞とのHyperplasiaが認められる。充血や白血球数の異常も少ないが、脾髄に核崩壊物を認めるものがかなり多い。次に結核性病変としては全体に極めて軽微である。その大きさから、結核結節というよりは類上皮細胞からなる結節性の構造物といった方がよいような結節を確実に認めたのは13匹中2匹だけである。この極めて小さい結節の意義についてはその組織像から次のように考えられる。すなわちその性状は新生したばかりのものと思えず、むしろ退

行過程にあるものと考えたく、鍍銀標本では銀線維が全くないか極めて少い。したがつて強毒の逆変異菌によつてできたものと考えよりは、むしろSM依存性菌によるものと判断したい。

考 察

古典的な皮下接種による攻撃感染では免疫処置経路の如何をとわず、18-b株もH₃₇Ra株もよく感染防禦効果を示しているが、いずれを前処置に用いた場合もかなり強いツベルクリンアレルギーが出現しているので、感染菌がアレルギー性炎症によつて皮下注射部位に阻止滞留されることを考慮せねばならない。しかし皮下攻撃感染菌に対するKoch現象を免疫現象の一端とみるならば、この意味において18-b株およびH₃₇Ra株は菌力の喪失または微弱性にもかかわらず、著しい免疫力を示すといわねばならぬであらう。Seagle等は1953年に紫外線照射結核死菌を1.5mgずつ皮下または静脈内経路からてんじくねずみに接種し、この実験と同様な方法で感染防禦効果をしらべたが全く否定的な成績をえた。したがつて18-b株と紫外線による死菌とは生体内増殖を無視しうる点では共通でも、免疫力発現に与える宿主との反応においては異なるところがあると考えられる。

攻撃感染法を静脈内経路にとると、臓器に散布された感染菌に対するその臓器自体の抗菌作用を直接追究することができ、皮下注射部位に感染菌が抑留されるために免疫群と対照群とでは臓器散布菌数そのものが異なるという疑を免れることができる。この方法においても、18-b株生菌免疫群は皮下又は静脈内のいずれの経路によつて免疫しても、肺および脾に、侵入菌の増殖阻止または遅延作用を出現させることができた。これに対し生菌と同一接種菌量で、静脈内経路からひろく体内に散布されたにもかかわらず、18-b株加熱死菌蒸溜水浮游液は臓器に全く抗菌力を与えることができず、ツベルクリンアレルギーの発現も認められなかつた。この理由としてまず、免疫原性をもつ菌体成分の加熱による破壊が考えられる。加熱死菌が抗菌免疫を与えることに失敗した報告はおびただしく、なかんずくDubos等⁶⁾は、フェノール殺菌にくらべて加熱殺菌では免疫原性物質の喪失が著しいことを示した。

しかしながら加熱死菌を流パラに浮游させて同一菌量接種した場合、蒸溜水浮游液の場合と抗原性物質の量は同一と考えられるのに、抗菌免疫力およびツベルクリンアレルギーの出現を回復させることができるので、単に加熱によつて免疫原性物質が喪失することを想定するの

表3 550の逆変異菌を含む18-b株10mg(1.14×10⁹)
を各てんじくねずみに接種後3カ月目の剖検
所見および脾10mg中の18-b株の生菌数



は疑問である。…細沼⁷⁾…は加熱結核死菌を反覆接種することにより、感染防禦力を惹起できることから同様な疑問をのべている。しかも平行して消長するツベルクリン・アレルギーにおいては、その抗原の耐熱性が強いことは周知のことである。したがって免疫力発現における18-b株の生菌と加熱死菌との差異は免疫原性物質の量的差異にもとづくよりは、むしろそのような物質と宿主細胞との交渉における面での相違によると考えられる。

結核症と同じく生菌免疫が最も重視されるブルセラ症において、ブルセラ菌のSM依存性菌がすぐれた免疫力をもつことを Herzberg等⁸⁾、Olitzi⁹⁾等が報告しているが、その際 Herzberg 等はその生菌ワクチンが長期間生体組織内に証明される理由は、菌の単なる生残ではなく依存性菌体内に蓄えられたSMによる分裂増殖の継起によるものであろうと想像している。18-b株にも同じ事情があてはまる放に、この菌の動物組織内の消長曲線のみから、生体内での分裂増殖が全くないと断定することは困難かもしれないが、加熱死菌流パラ浮游液が免疫力を示すことから考えて免疫原性物質が必要量存在すれば免疫力発生のために生体内での菌の分裂そのものを必要とする理由はない。免疫力発現における18-b株の生菌と加熱死菌との差異は免疫原性物質の量的差異にもとづくのではないとすれば、次のような可能性が考えられる。第1には、生菌は死菌よりも有効に体内組織に分布し、その場で長く持続するという点で、抗菌力の発現にはこの条件を必要とする。第2は、種々の殺菌処置によつて変性する或種の菌体物質が生菌ワクチンの場合には宿主細胞との交渉に当って Adjuvant として有効に働くのではなからうか。いずれの場合も統一するところは同じになるかもしれない。

H₃₇Ra 株の増殖力については Mackaness等¹⁰⁾の成績とは一致するが、全く増殖力を認めない Dubos 等の観察¹⁾とは異なり、弱い増殖力ならびに著しい免疫力を明かに認めることができた。Dubos 等の成績との差異は宿主動物が異なるという点よりは、むしろ H₃₇Ra 株自体の菌力の変動によると考えられる。BCGをも含めてこれらの弱毒結核菌は弱毒化の本能が明かでないために、菌力の変動も明確にとらえることができず、したがって

生菌ワクチンとしての立場からは、生体内抗原量変動による免疫力発現の変化を免れえないであろう。この点菌力喪失の機序が明かで、その変異が安定している18-b株は生菌免疫原としても安定であると思われる。さらに第3報によると、18-b株の生体内増殖力をSMによりある程度コントロールすることができるので、抗原量の増加という面から免疫力を一層強く、または任意の程度に上昇させたり持続させることが可能であろう。

18-b株を実際に生菌ワクチンとして用いる場合、第1に懸念されることは強毒逆変異菌の混在である。増殖力の面からみて18-b株の免疫量が余り少量では、抗原量が少いために免疫力発現の低下が予想されるので、免疫に用いる接種量が強毒逆変異菌を含む可能性は大きくなる。Miller¹¹⁾は1:10⁴~10⁵の比率で270~760の強毒結核菌をBCGと同時に接種すると、組織学的に混入強毒菌の存在を確かめることができたと報告している。しかし実験Ⅲの成績からは10⁹の無毒菌に混入した少くとも10⁸のorderの強毒菌は、肉眼的、組織学のおよびさらに鋭敏な培養法のいずれによつても、接種後3カ月を経たてんじくねずみの生体から検出することができなかつた。したがって著者は Miller の見解と異なり、BCGにおいても強毒菌への変異が18-b株と同じ位、あるいはそれ以下の率で生じていれば、その強毒変異菌の存在を動物実験によつて証明することはできないであろうと思う。18-b株はその特異なSM依存性という標識により in vitro で逆変異菌の出現を把握できるのであるが、接種後3カ月を経た感受性動物の最も菌集中度の高いと思われる組織から逆変異菌を培養できなかったことは、強毒菌が組織定着の当初に同時に接種された無毒生菌の干渉をうけて発育を抑制され死滅せしめられたと考えられる。この想定に基づけば、BCGやH₃₇Ra株等の弱毒結核菌が強毒逆変異菌を含む可能性を肯定しても、生体接種の場合は、特に変異率に変化が生じない限り実際的には18-b株と同じく無害の結核菌とみなしてよいであろう。

総括および結論

SM依存性結核菌18-b株はSM依存性のためにてんじくねずみ生体内では増殖を示さない無毒結核菌と考えられるにもかかわらず、皮下または静脈内接種法によりてんじくねずみに著しいツベルクリン・アレルギーおよび抗菌免疫力を発現させることができた。一方18-b株の加熱死菌は蒸溜水に浮遊させて接種されると全くアレルギーも免疫も発現できなかつたが、同一量を流パラに浮遊させて用いるといずれも著明に発現させることができた。このことから18-b株が結核生菌ワクチンとして有効な理由について考察が行われた。

18-b株生菌の免疫原性における逆変異強毒結核菌の意

義は、同時に接種された大量の無毒 18-b 株の干渉をうけて死滅するために考慮する必要がないと考えられるが、このことはまた 18-b 株の生菌ワクチンとしての無害性を示すものである。

さらに 18-b 株の菌力を SM 投与により任意に高めうる可能性は、免疫力の増強および持続を安全に調節できることを示唆する。したがって 18-b 株の分離は効力および安全性の限界を明確に把握できる結核生菌ワクチンの一種が分離されたとみなしうるであろう。

終に柳沢部長の御指導、室橋主任の御校閲に感謝する。組織学的検索については病理部江頭部長の御教示を深謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつたことを附記して謝意を表す。

文 献

- 1) Dubos, R. J., Pierce, C. H. & Schaefer, W.B. : J. Exp. Med., 97 : 207-220, 1953.
- 2) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 461-466, 1955.
- 3) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 237-241, 1955.
- 4) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 4-8, 1955.
- 5) Seagle, J. B., Karlson, A. G. & Feldman, W. H. : Am. Rev. Tuberc. 67 : 341-353, 1953.
- 6) Dubos, R. J., Schaefer, W. B. & Pierce, C.H. : J. Exp. Med., 97 : 221-223, 1953.
- 7) 細沼榮一 : 結核, 22 : 1~12, 1947.
- 8) Herzberg, M., Elberg, S. S. & Meyer, K.F. : J. Bact. 66 : 600-605, 1953.
- 9) Olitzki, A. L. & Szenberg, E. : Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 82 : 539-541, 1953.
- 10) Mackaness, G. B., Smith, N. & Wells, A. Q. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 479-494, 1954.
- 11) Miller, R. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 1053-1063, 1954.

