

マウスをもつてする BCG の研究

北 里 研 究 所

石 原 定 次

(受付 昭和 30 年 8 月 18 日)

1 緒 言

Calmette と Guérin は牛型結核菌の 1 株を分離して 1908 年以来グリセリン加牛胆汁馬鈴薯培地に継代培養すること 12 年余におよんで、動物実験上本菌株の弱毒化を認めこれを人体用結核ワクチンに使用し得ると見なして 1920 年に公表した¹⁾。これが *Bacille Calmette-Guérin* 略称 BCG である。欧米の諸学者は直ちにこの成績を追試し幾多の業績が発表されたが、大多数のものは BCG が無害で免疫能力があることを認めた。それらの実験には、大動物を除いては主として海馬と家兎が使用された。最近 Hauduroy 等²⁾ はハムスターの一種を用いて、BCG がこれに対して病原性があることを報告したが、反論もあつて一般に承認されていないようである。一方、マウスは従来結核研究上不適当な動物であると見なされており、したがつて BCG 研究に用いられたことはほとんどなかった。しかるに近年抗結核剤研究の進展に伴い、化学療法の結果を多数の動物において迅速に判定するためにマウスを利用することが取上げられ、大量の結核菌を静脈内より感染させれば短期間にマウスに致命的結核症を惹起させ得ることが明らかとなつた。かくて BCG 研究にマウスを使用した報告も若干散見されるに至つたが、その数は甚だ少く、かつ病理組織学的検索を併せ行つたものはほとんど皆無という現状である。著者は本問題を追求し、些少の見るべき所見を得たので、ここに報告し大方の批判を仰ぐ次第である。

2 実験方法

BCG 株は慶応義塾大学医学部細菌学教室より分与され当研究所で岡、片倉培地に継代せるもので、14~21 日培養のものをを用いた。マウスは市販の体重約 15 g 前後の白色マウス雄を使用した。BCG の接種菌量は一般には 0.5mg (湿菌量) を、ある実験では 4.5mg をマウス尾静脈内、皮下、皮内、腹腔内に接種しあるいは鼻腔内点滴、経口投与を行い、15, 30, 50 日後に屠殺した。免疫実験では BCG 0.5 mg を上記諸経路より 1 回予防接

種し 30 日後に人型結核菌黒野株³⁾ 0.1mg または 0.05mg をもつて静脈内に接種攻撃し、さらに 14~22 日後に屠殺した。屠殺したマウスは、一部は主要臓器 (肺, 脾, 肝, 腎) の定量培養に供し、他は主要臓器 (肺, 脾, 肝, 腎, 心) を 10% フォルモール固定パラフィン包埋約 4mm の切片とし、H. E. および Ziehl-Neelsen 染色を行い、要すれば Mallory, Pap, 染色等を行つた。

3 実験成績

(1) BCG 接種マウスの病理組織学的変化

A. BCG 0.5mg を静脈内、腹腔内、皮下、皮内、経鼻、経口接種して、15, 30, 50 日後に 5 匹屠殺し 2 匹宛検索した。肉眼的にはいずれにも全く異常を認めない。組織学的変化も甚だ微弱である。15 日群。静脈内接種群においては、肺では肺泡隔壁の肥厚、単核細胞集簇による小巣形成があるが、血管、気管支周囲細胞浸潤は認められない。肝ではクツペル氏星細胞が肥大し、実質内には、胞体大きくエオジンに淡染し核形種々で核質乏しき類上皮細胞より主として形成され、大単核細胞、時には淋巴球の加わる小結節が散在する。その肝小葉内の出現部位は一定しないがややグリソン氏鞘に多い。該部には時に小円形細胞の浸潤が見られる。脾、腎、心には著変がほとんど認められない。BCG は Ziehl-Neelsen 染色によつて上記の肺内小巣と肝内小結節の中に数コ~10 数コ検出された。静脈内 30 日群では肝の変化は増強し、肺の変化は変わらず、菌は少数検出されるが、同 50 日群ではすでに肺に変化が見られず、肝の変化は減弱して居りもはや菌は検出されない。その他の群では、肺の変化は 15 日群の腹腔内群、皮内群にやや認められるが菌は検出されず、30 日群では一般に全群共に胞隔肥厚があつて、軽度の限局性巣状肥厚を示すものがあるが、菌は経鼻群に認められるのみである。50 日群ではいずれにも著変が認められず菌も検出されない。肝変化は 15 日、経口群、皮下群 (菌陰性)、30 日、皮下群 (菌陽性)、50 日経鼻群 (菌陰性) に認められたばかりである。

B. BCG 濃厚菌液を 1000~1500rpm 10 分間 3

回遠沈して得たかなり均等な菌液の 0.5 mg (湿菌量) に相当する量をマウス静脈内に接種し、直後、24, 96時間、7, 14, 21, 28, 35, 49, 154日後に各 2 匹宛屠殺検索した。前実験と同じく主要臓器には肉眼的に著変は認められず、組織学的にも、脾、腎、心には著変が認められない。肺には各時期を通じて肺胞隔壁の多少の肥厚があり、浸潤あるいは増生せる単核細胞の巣状集簇は14日頃に強いようである。しかし本実験では菌は直後と24時間後に顆粒状または短桿状の Z・N・法で赤染せるものが少数胞隔細胞内に認められるのみであつた。これに反して、肝では主として類上皮細胞より成り少数の大単核細胞、淋巴球を周囲にめぐらす小結節は14日後に最も発達し、以後減少し構造も粗となり次第に吸収されて行くようであるが、154日後においてもなお認められる。菌は7日後迄はクツペル氏星細胞内に、以後は主として小結節内に、少数ながらほとんど全例に検出される。脾には網状内皮細胞の限局性増生は認められぬが、菌は24~96時間 21~49日にわたり少数脾髄内に検出される。腎、心には全例共組織学的に著変が認められず菌も検出されない。

C. マウスに対する BCG の耐量を調べる目的で 4.5mgを皮下および静脈内にそれぞれ5匹宛接種した。皮下群では肉眼的組織学的に 0.5 mg 群との間に全く相違が認められなかつた。静脈内群ではマウスは24時間以内に全例死亡し肉眼的には全身臓器の充満血が著明であつた。組織学的には、肺には高度の血管充盈、浮腫があり、肺胞隔壁の肥厚は軽度であるがすでに巣状の細胞集簇が見られ、多数の塊状の抗酸菌が検出される。肝では血管充盈が著明であるが組織反応はほとんどなく、やや肥大せるクツペル氏星細胞内に少数の抗酸菌が認められる。脾も血管充盈高度であるが菌は1例に認められたのみであり、腎、心には血管充盈の他著変を認めず菌も陰性である。

D. 小括。要するにBCGをマウスに接種すれば接種経路別では静脈内接種によるものに最も病変が強く、接種後日数別では14日前後が最強と思われる。その変化は専ら組織学的で、主要臓器の内、肺、肝に限られる。肺には軽度ないし中等度の胞隔肥厚が起り胞隔細胞、浸潤細胞の限局性巣状集簇が見られるが、明らかな類上皮細胞化傾向を示さず、いわんや細胞の変性、崩壊、壊死、乾酪化等の、強毒結核菌マウス接種に際して認められる諸変化は起らない。肝では胞体大でエオジンに淡染し核質乏しい大単核細胞(類上皮細胞と見なされる)が初期には密に集簇しいわゆる小結節を形成し、その配列は玉葱状に見えることもあり、互に境界不鮮明でジンチチウムように見えることもある。いずれも周囲の肝細胞と鮮明に境界されていることが多い。成立せる結節は次第に配列が粗となり大きさを減じ結節周囲に大単

核細胞、淋巴球の縁取りが現れ、結節内には毛細管網らしきものも認められることがあり、遂には吸収され消失すると考えられる。強毒結核菌接種3日目に見る如き多核白血球を混ざる大きい限界不明瞭な結節は認められなかつた。かくして、BCGによる病変はマウス体内において組織学的には一度成立するが、進展せずに病巣は次第に吸収せられて自然治癒に向うと考えられる。なお BCG 4.5 mg 静脈内接種群の所見は肺毛細管内菌栓塞による急激な循環障害を思わせ、24時間以内にマウスの死亡したのはBCGによる感染発症のためではなく、機械的毒素的要因によるものと考えられる。臓器内BCGの定量培養成績が切片内の菌検出成績と必ずしも一致しないのは生菌数少なきためであろう。

(2) 免疫試験

(前後数回にわたり実験を行つたが以下主なるものを記す。)

A. マウスの皮内、皮下、腹腔内、経鼻、経口、静脈内に各7匹宛、BCG 0.5 mg を接種し、30日後に人型結核菌黒野株 0.1 mg を以て静脈内より接種攻撃すればその生存日数および死亡日数中央値(マウスの生存日数を短いものから長いものへとならべて、その中央にある日数。略称 TDM。)は第1表の如くである。攻撃14日後に屠殺剖検した。この実験では、攻撃菌量大なるためか、対照群の死亡日数中央値は18日であつて、免疫群のそれとの間に顕著な相違を認めることが出来ず、また病理組織学的所見も、皮下接種群が病変やや軽度であつたが大体大同小異の様相を呈し免疫効果の著明な立証は得られなかつた。

Table 1

Groups	Survived Days	TDM
I C	15 ~ 23	18
S C	18 ~ 20	20
I P	17 ~ 22	21
I N	18 ~ 22	20.5
P O	15 ~ 18	18
I V	17 ~ 29	20
Controls	15 ~ 18	18

I C Intracutaneously vaccinated

S C Subcutaneously vaccinated

I P Intraperitoneally vaccinated

I N Intranasally vaccinated

P O Per Os vaccinated

I V Intravenously vaccinated

TDM: Middle value of Survived Days

B. BCG 0.5 mg を種々の経路で接種し10日および20日後に人型結核菌黒野株をもつて静脈内より接種攻撃すれば、10日群は、対照に較べて相違が認められないが、20日群では、予防接種群は対照群に比して生存日数の延長を示す。(第2表)

Table 2

Challenged after	Groups	Survived Days	TDM
10 days	I C	18 ~ 23	19.5
	S C	18 ~ 23	20.5
	I N	19 ~ 26	20.5
	I V	18 ~ 23	21
	Controls	17 ~ 23	19
20 days	I C	22 ~ 47	25
	S C	22 ~ 42	32.5
	I N	22 ~ >50	44.5
	I V	24 ~ >50	27
	Controls	20 ~ 28	24

C. BCG 0.5 mg を上記諸経路でマウス各10匹に接種し30日後に人型結核菌黒野株 0.05 mg をもって静脈内より接種攻撃すれば、その生存日数および死亡日数中央値は第3表の如くである。攻撃20日後に各群2匹を屠殺剖検した。対照群。(BCG を接種せず。)肉眼的に肺は腫大し、帯黄灰白色帽針頭大の隆起せる結節で一面に蔽われ、組織学的には、結核性病変がクローバ状に肺全野に散在し、あるいは融合し、病巣中心部は無構造硝子様でエオジン淡染し、あるいは核破片の散在せる壊死組織を示し、周辺肺胞内外には類上皮細胞、少数の多核白血球、多数の核破片細胞崩壊部を認め、周囲肺組織は充血浮腫が強く抗酸菌は巢内に多数に検出される。肝には類上皮細胞結節が実質内に散在し、クツベル氏星細胞は肥大増生し、グリソン氏鞘に小円形細胞浸潤があり、抗酸菌は結節内に数コ~10数コ検出される。脾では濾胞萎縮し、脾髄増生し、赤白両髄内に網状内皮細胞の限局性増生巣が散在し、巢内には抗酸菌が数コ~10数コ検出される。腎、心には著変が認められない。

Table 3

Groups	Survived Days	TDM
I C	23 ~ >50	38
S C	22 ~ 40	30
I P	22 ~ 35	32
I N	20 ~ 47	21
P O	19 ~ 21	21
I V	22 ~ >50	32
Controls	18 ~ 24	20

免疫群。静脈内BCG接種免疫マウスでは肺に結核病巣少くかつ小さく、病巣中心の壊死はほとんど認められず、浮腫は軽度で、血管、気管支周囲に軽度の塩基性大単核細胞浸潤があり、巢内の抗酸菌は極めて少ない。皮下および経鼻免疫群では、上記諸変化がやや増強する。皮下および腹腔内免疫群では病変は一層対照群に近ずき、経口免疫群では全く対照との相違がなく、間質性炎症も認められない。肝、脾の変化は対照群に比して若干

軽度であるが、各群相互の比較を許す程の相違を認めることは困難である。

本群の臓器定量培養の成績は第4表の如くである。培養は攻撃後20日目に行った。

Table 4

organs groups	Lung	Liver	Spleen	Kidney
I C	210×10 ⁴	10×10 ⁴	5×10 ⁴	4.5×10 ⁴
S C	7,950× "	20× "	30× "	11× "
I P	22,700× "	10× "	25× "	2× "
I N	2,500× "	5× "	5× "	0.5× "
P O	86,000× "	100× "	1,250× "	30× "
I V	2,050× "	10× "	5× "	0.9× "
Controls	30,000× "	100× "	300× "	30× "

Figures present the numbers of acid fast bacilli in 1 g of the organs.

D マウス各9匹をBCG 0.5 mg をもってそれぞれ皮下、経鼻、経口、静脈内に予防接種し、30日後に人型結核菌黒野株 0.05 mg をもって静脈内より接種攻撃し、22日後に各群2匹を屠殺剖検した。その生存日数および死亡日数中央値は第5表の如くである。

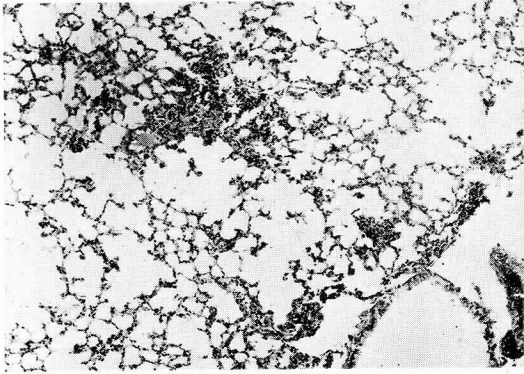
Table 5

Groups	Survived Days	TDM
S C	26 ~ 36	27.5
I N	22 ~ 38	38
P O	22 ~ 25	22
I V	28 ~ 48	38
Controls	22 ~ 26	22

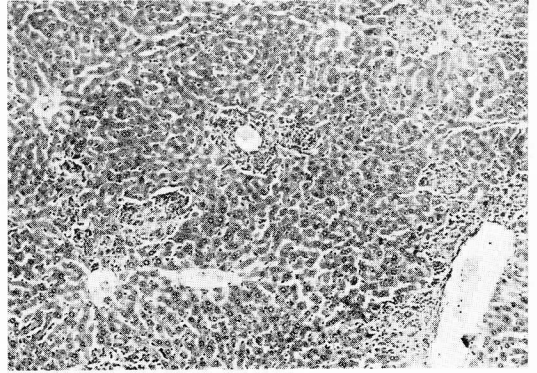
死亡日数中央値に基いて免疫効果大なる順にならべると、静脈内、経鼻、皮下予防接種群であつて、経口群は対照群と相違を認められない。経鼻群では組織学的には、結核性病巣小さく且つ少なく、壊死性変化をほとんど認めず、間質性炎症が比較的強く、切片内菌数も少い。肝、脾の病変は対照群のそれよりやや軽いが著明な相違は認められない。静脈内群の変化は経鼻群に比してやや増強している。肺の結核病巣の中心部に軽度の壊死が認められるが、肝、脾の所見は上記群と大差がない。皮下群の肺の病変は対照群のそれと比較して病巣の大きさと拡がりには大差がなく壊死のみが比較的軽度である。

Table 6

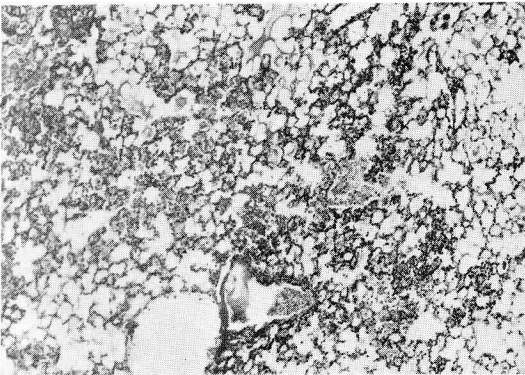
organs groups	Lung	Liver	Spleen	Kidney
S C	16,100×10 ⁴	83×10 ⁴	59.5×10 ⁴	12.5×10 ⁴
I N	2,000× "	0.5× "	0.1× "	11.5× "
P O	—	—	—	—
I V	6,000× "	11× "	175× "	23× "
Controls	60,000× "	60× "	320× "	32.5× "

Fig. 1

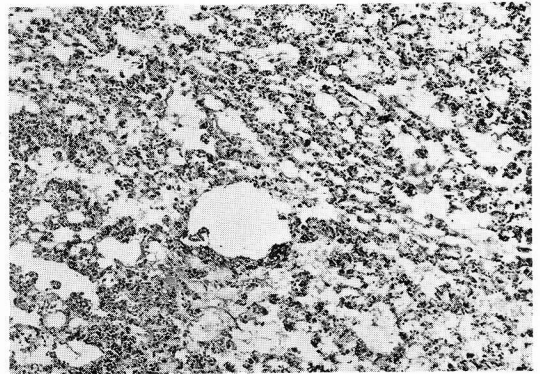
Lung of the mouse inoculated intravenously with 0.5mg of BCG. Killed after 15 days. slight proliferative lesions

Fig. 2

Liver of the mouse of Fig. 1. Formation of epithelioid cell tubercles

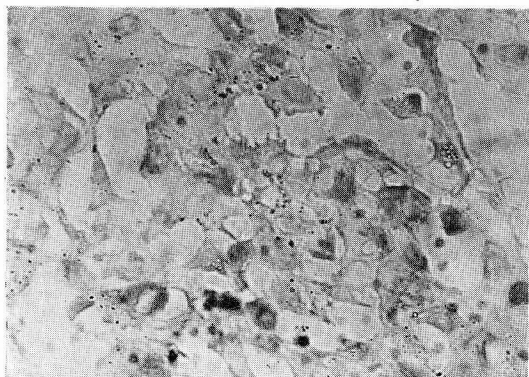
Fig. 3

Lung of the mouse inoculated intravenously with 4.5 mg of BCG. Died within 24 hours. Congestion, edema & interstitial cellular infiltration.

Fig. 4

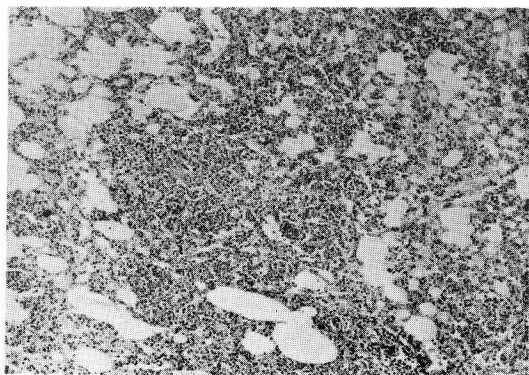
Lung of the mouse, vaccinated intravenously with 0.5mg of BCG and after 30 days challenged intravenously with 0.05 mg of virulent Human tubercle bacilli. Killed on the 20th day of challenge. Slight tuberculous lesions.

Fig. 5



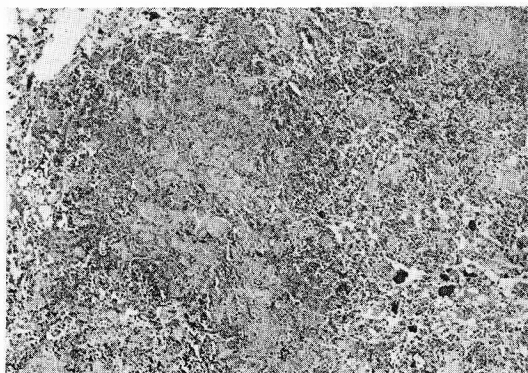
Tubercle bacilli in the lung of the mouse of Fig. 4. A few bacilli are seen in the central area.

Fig. 6



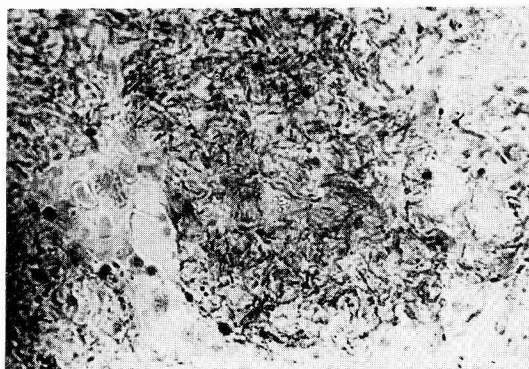
Lung of the mouse, vaccinated & challenged as same as fig. 4.-mouse. killed on the 48 th day of challenge. Moderate tuberculous lesions.

Fig. 7



Lung of the mouse inoculated intravenously with 0.05mg of virulent human tubercle bacilli. Killed after 20 days. Extensive exudative-necrotic lesions.

Fig. 8



Numerous tubercle bacilli in the lung of the mouse of Fig. 7.

各群の肺の切片内菌数は上記の病変の程度とよく平行しており、さらに臓器定量培養の菌数の多寡（第6表）も病理組織学的所見の軽重と略平行している。（臓器定量培養は攻撃後22日目に行つた。）

E 小括。マウスをBCGをもつて予防接種し一定の期間後に強毒人型結核菌をもつて静脈内より接種攻撃すれば、予防接種の経路および攻撃菌量の如何によつては、ある程度の免疫効果が認められることが上述の諸実験により証明された。予防接種が有効な場合には、マウスは対照感染群に比して、明らかに生存日数の延長が認められ、肉眼的にも、肺結節が小さく少なく、臓器の定量培養における菌数も少く、組織学的に、肺の結核病巣は対照に見られる如き大なる融合巣を示さず、比較的限局した小病巣が散在し、その中心に壊死性変化がほとんど認められず、巣内の菌も著しく少なく、さらに巣外の肺組織に浮腫がなく、血管、気管支周囲の大単核細胞浸潤より成る間質性炎症を認める。攻撃菌量は0.05mg以下が適当であり、0.1mgでは菌力強きため有意義な相違を対照群との間に認めることが出来なかつた。予防接種の経路中いずれが有効であるかを決定することは困難な問題であるが死亡日数中央値、臓器定量培養、病理組織学的所見の3方面より検討した。死亡日数中央値は対照群の20日前後に対して、30日を越えるものは、(C)実験では、皮内、静脈内、腹腔内、皮下の諸群であり、(D)実験では、経鼻、静脈内群であつて、皮下群も27.5日で若干延長が見られた。臓器定量培養（肺）では、(C)では皮内、静脈内、経鼻、皮下群が、(D)では経鼻、静脈内群が菌数が少い。病理組織学的変化の程度はおおよそ定量培養の成績に一致している。したがつて、(C)、(D)に共通せる静脈内接種群および経鼻接種群に免疫効果が強く現われ、皮下接種群がこれに次ぐと考えられる。ただし経鼻接種の場合は、すでにBCG単独接種において経験したことであるが、肺内にBCGの有効量が到達してBCG性変化を起すか否かは、手技の如何に相当左右されるためか、常に一定の成績を得ることは困難であつた。また皮内接種もマウスにおいては手技上皮下接種と厳格に区別され得るや否や疑問の存するところであろう。

要するに、免疫効果比較のための基準として死亡日数中央値は大体の見当を与えるものであるが、臓器定量培養および病理組織学的検索をもつてこれを確認することが望ましいと考えられる。後2者において著明な差異を示す臓器は肺のみであつて、他臓器の培養成績では大体肺に準じて菌数の多寡が認められるが、その相互の差異は僅少であり、その病理組織学的変化に至つては必ずしも肺病変の程度と平行しない。肺病変の組織学的比較に際しては、病巣の数、大いさ、拡がり、病巣中心部の壊死、病巣周囲の浮腫、肺組織内の間質性炎症の有無等が

判定の基準として有用であると考えられる。なおBCG予防接種マウスでは、免疫効果の認められたものでも、その病変は本質的には対照の結核菌感染マウスの病変と相違がなく、また重感染によるアレルギー性変化の如き所見は認められなかつた。

4 考 案

実験動物におけるBCGの問題は大別して、その病原性または毒力の有無、および免疫原性（免疫賦与能）の有無の2問題に集約されると考えられ、諸家の関心もまたこの2点に集中し幾多の実験を重ねられたのであつた。

(1) BCGの毒力の有無

BCGが生体内で結核性変化を起すか否かの問題は Calmette et Guérin¹⁾ が牛に全く無害であると発表したのを始めとし大小の各種動物について知見が発表された。殊に海狸および家兎においては Tzekhnovitzer,⁴⁾ Kraus⁵⁾, Lange und Lydtin⁶⁾, 渡辺他⁷⁾等。海狸については Gerlach⁸⁾, 今村高橋⁹⁾, Remlinger et Bailly¹⁰⁾, Chiari et al¹¹⁾, Okell & Parish¹²⁾, Schilling¹³⁾, Jensen et al¹⁴⁾, Feldman¹⁵⁾, Birkhaug¹⁶⁾等。家兎については Coulaud¹⁷⁾, Zeyland et Zeyland¹⁸⁾, Lurie¹⁹⁾, Schwabacher & Wilson²⁰⁾等の研究が詳しい。Coulaud¹⁷⁾によると家兎の静脈内に10~15mgのBCGを接種すれば、肺、肝、脾に一種の粟粒結核を起すが、この病変は一過性で乾酪化せず速やかに自然治癒に向う。肺は24時間後に胞隔肥厚し、淋巴球、単球、多核球が所々巣状に集簇し、肺胞の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ は単球、多核球、大貪食球による肺炎を呈し、9~10日後にはすでに類上皮細胞より成る小結節が肺胞に一致して形成され、そのあるものは淋巴球に囲まれる。巨細胞は極めて少く抗酸菌も少い。20~40日後気管支周囲淋巴装置は腫脹し一方病巣は乾酪化することなく次第に減少し150日後には全く消失する。肝には7~9日後に類上皮細胞、淋巴球、時に形質細胞、多核球を混ざる大小の結節が形成され、20~30日後には結節は類上皮細胞と大単核細胞より成り、淋巴球は減じ、巨細胞が現われ、60日後には結節の大部分は消失し、150日後には全く正常である。脾では8~10日後に濾胞内に数々の類上皮細胞の集簇が現われ、12~14日後に類上皮細胞は洞内に増生し、30~60日後に洞内はほとんど類上皮細胞で占められ、中心には小型巨細胞が現われ一方濾胞の類上皮細胞は減少する。200日後には全く正常に戻る。その他腎、副腎、脾、甲状腺には変化が認められぬという。Zeyland et Zeyland¹⁸⁾によればBCG20mgの家兎心内に接種し組織内に菌塊栓塞を作らせるようにすると、15日後に肺の類上皮細胞結節の中心がしばしば変性壊死に陥るが、これは加熱結核死菌接種においても見られる現象で菌体内毒素の作用

であるという。Chiari et al¹¹⁾は海狸腹腔内にBCG 15mgを接種し、4週後に大網、小腸漿膜に多数の黄色小結節を認め、組織学的にこの結節は腸腸性で乾酪壊死ではなく、周辺に類上皮細胞、巨細胞に富む肉芽腫が形成されるのを認めた。また肝、脾に組織学的に小病巣の散在を認め、その中心は核破片、多核球、周辺は類上皮細胞、巨細胞より成るとした。彼はBCG性変化の初期は多核白血球浸潤を伴う滲出性過程であり、これに類上皮細胞、巨細胞形成より成る増殖性過程が合併し、定型的凝固壊死(乾酪変性)を欠くことをもって結核性変化と鑑別されたとした。Jensen et al¹⁴⁾は海狸皮下にBCG 10mgを接種し局所に膿瘍形成を見、36日後肝、肺に類上皮細胞より成る小病巣を認め抗酸菌を巢内に証明したが、巨細胞も乾酪化も見られなかった。また静脈内に10mgを接種すると、肺に24時間後に胞隔内の多核球集簇、肺胞内の多核球出現を見、2~14日後には胞隔または肺胞内に類上皮細胞より成る小巣が形成され、菌も若干検出されるが間もなく退行消失するという。Schilling¹³⁾は海狸静脈内にBCG 1~2mgを接種し、抗酸菌が肺内で一部は組織内に沈着し、融解、吸収され、一部は毛細管内栓塞を作り菌塊が増殖し、組織は始め多核球をもつて反応するが、これを処理せず次いで類上皮細胞より成る肉芽腫が菌塊周囲に形成されるのを見た。しかしこの肉芽腫は壊死を起さず、巨細胞は稀で、たゞ多核球のみ崩壊し、45日後までは認められるが47~61日後には結締織性に変化退行し、抗酸菌も次第に変性、消失するとした。

これらの実験成績は種々の実験条件(菌液の均等度、菌量、接種経路、動物の感受性その他)が区々であるため必ずしも一致した結果を与えないが、要約すれば、海狸および家兎にBCGを接種すれば、①菌の一部は2~4週まで動物体内で増殖し、以後次第に変性崩壊消失する。(ただし臓器培養実験でBirkhaug¹⁶⁾は海狸体内に577日迄菌を検出している。②菌に対して初期に多核白血球反応が起るが、菌はこれによつて破壊されずむしろ多核球の崩壊が起る。(Lurie¹⁹⁾によれば菌は類上皮細胞内で破壊される。)③10~20日後に主として類上皮細胞より成り淋巴球、大単核細胞、時に多核球を混える小結節(肉芽腫)が形成される。(Schilling¹³⁾はこれを結核性変化と見做す。)④この肉芽腫は、静脈内接種では、肺、肝、脾に、腹腔内接種では大網に、皮下接種では局所皮下組織内に形成される。⑤肉芽腫内には抗酸菌が検出されるが、一般にラ氏型巨細胞は少く、乾酪変性(凝固壊死)に陥ることはない。(極めて大量の菌塊により生ずる壊死はZeyland et Zeyland¹⁸⁾によれば菌体内毒素の作用と考えられる。)⑥この肉芽腫を主体とする病変は2~4週後に最も強く、以後進展することなく次第に吸収され、150日後には全く消失する。(Schilling¹³⁾

は結締織増殖期があるという。)

こゝにBCGがそれ自身動物に対して無害であることは問題なく承認されているが、無毒(avirulent)または非病原性(apatogen)であるか弱毒であるかは諸家の見解の別れるところである。毒力または菌力(virulence)をもつて菌が生体内に増殖し、病的過程を惹起せしむる能力と定義すれば⁴⁴⁾、微弱なBCGが生体内で増殖し一種の組織変化を起す(ただし主として組織学的変化であつて、肉眼的、臨床的变化ではない。)ことが明らかであるから、無毒とするよりは弱毒と見做す方が妥当であろう。

なおBCGが動物体内または培地通過後病原性を獲得するという実験は若干発表されたが、いずれも有毒結核菌の混入を疑われているようである。

Hauduroy et Rosset²⁾はハムスター(Mesocricetus auratus)の皮下にBCGを接種し、8~12月後に、また腹腔内接種では1~4月後に動物が死亡し、組織学的に、肺、肝、脾に結核性病変が起るのを見た。この追試に成功しなかつたという報告²¹⁾もあり、Berger und Puntigam²²⁾はこの追試を行つてハムスターの死亡は結核性変化の進展によるものではないとし、BCGの菌体物質または新陳代謝産物の毒性に死因を帰している。

(2) BCGの免疫原性

Calmette et Guérin¹⁾は生後8月の犢にBCG 1.5mgを1月間隔で2回静脈内より予防接種し、その後1~12月の各時期にわたり強毒牛型結核菌 3mgを静脈内より接種攻撃すると対照感染犢は発症して粟粒結核のため34日目に死亡するが、免疫群は発症せず剖検上結核性変化を認めないという。海狸および家兎についての免疫実験は、Eekhnovitzer⁴⁾、Kraus⁵⁾、Langund Lydtin⁶⁾、渡辺他⁷⁾、Lohkott et Levitan²³⁾等、海狸についてはGerlach⁸⁾、今村・高橋⁹⁾、Dwikott et Masourowski²⁴⁾、Chiavi et al¹¹⁾、Okel & Parish¹²⁾、Rist et Misiewicz²⁵⁾、Kirchner²⁶⁾、Buschman²⁷⁾、Elbert et Galberg²⁸⁾、Schilling¹³⁾、Birkhaug¹⁶⁾等、家兎についてはOpie & Fveund³⁰⁾、Schwabacher & Wilson²⁰⁾等により行われた。免疫方法(菌量、経路、回数等)攻撃方法(菌株、菌量、経路、免疫後攻撃までの期間等)により、動物の種類により、所見は必ずしも一定しないが、諸家の知見を要約すれば、①免疫群は対照群に比して生存日数が延長する。②免疫群では病変の進行が緩慢である。③初期には、免疫群では肺の間質性炎症、肺胞上皮の広汎な増生、肺淋巴装置の肥大増生を認める。(Schilling¹³⁾)④末期には免疫対照両群の間に病変の本質的相違が認められぬが、肺にはfibroseが強く、肝、脾では網状内皮系統の反応が強い(Lohkott et Levitan²³⁾)。かくしてBCGがある程度の免疫賦与能を有することは明らかであるが、動物を結核菌の重感染ないし再感染より完全に

防禦するものであるか否か、またどの程度防禦出来るものであるかということは、BCGの免疫能(免疫原性)と感染結核菌の毒力との間の相対的比重関係に基づくと考えられ、甚だ困難な問題であつて、諸家も多大の保留条件を附けているようである。

また Calmette 等は生体内にBCGが存在する期間動物は結核菌の重感染に抵抗するとしている。これは Sergeant³¹⁾の前免疫(Prémunition)の意思によるものであり、(菌は動物に慢性感染症を起して臨床的治癒後も体内に潜伏し、その間動物は重感染に抵抗するが、菌が体内より消失した時は免疫は残らず動物は再感染に抵抗出来ぬ)弱毒生菌免疫の諸様相はこのような説明を有利ならしめる。しかし、菌の増殖—病巣の形成—菌の消失—病巣の消失の如き一連の過程を想定すれば免疫の消失がどの点において起るかは俄に断定し難いところであると思われる。

(3) マウスを用うる結核の実験

Koch³²⁾以来マウスは結核菌の研究に時折使用されていたが、ツベルクリン反応の出現せぬこと、結核菌に対し感受性低きこと等の諸点より、実験動物として不適当であると見做されて来た。しかし緒言に述べた如き理由で近年マウスが結核菌の実験に用いられるに至つた。マウスの利点としては、多数の動物を使用し迅速に成績を判定し得ることの他、結核の自然感染がほとんど皆無であること、個体差による成績の動揺が比較的少いこと、安価な事等も挙げられている。

実験的マウス結核症の諸問題は Raleigh & Youmans³³⁾の綜説に詳述されているが、強毒結核菌を接種せるマウスの病理組織学的研究に関しては、Stamatin et Stamatin³⁴⁾, Raleigh & Youmans³³⁾, Stewart³⁵⁾, Stewart & Tamargo-Sanchez³⁶⁾, Grün und Klinner³⁷⁾, 水之江³⁸⁾, 小沢³⁸⁾, 小沢³⁹⁾, 岡島⁴⁰⁾等の記載がある。菌株の毒力、マウスの種類その他によつて成績の動揺はあるが、諸家の知見を概括すれば、① 0.1~1 mg の強毒人、牛型結核菌の静脈内接種によりマウスは20~30日以内に死亡する。②この方法によりマウス体内に粟粒結核症が惹起される。③病変は、肺においては滲出性壊死性で類上皮細胞の出現、乾酪変性(凝固壊死)を見るがラ氏型巨細胞及び空洞の形成は認められない。④肝、脾では主として類上皮細胞より成る限局性結節性病巣を形成する。⑤病巣が強ければ心、腎にも病巣を認める。⑥病巣内には抗酸菌が検出される。⑦上記諸変化は、特に肺においては、臓器定量培養時のまた切片内検索時の菌数とよく平行する。⑧ツベルクリン反応の出現は認められない等の諸点が挙げられる。(ただし最近マウスにツベルクリン・ショックを起させた報告がある⁴¹⁾)。かくして、結核に関する実験をマウスをもつて行うことは可能であり、意義があると考えられるに至つた。

(4) マウスをもつてするBCGの実験

マウスを用いたBCGの実験は誠に少い。Levaditi et Vaisman⁴²⁾はBCG乾燥ワクチンの20倍稀釈1 cm³をマウスの腹腔内に1, 6, 14日目に予防接種し、最終接種後10日目に人型結核菌 H512 株 1 mg を静脈内に接種攻撃すると、対照群は17~35日目に全例死亡するが、免疫群は攻撃後75日において死亡率50%であり、病変は軽度ないし中等度のものが生存マウスの約半数に見られたという。Siebenmann⁴³⁾はBCG 1 mg をマウス皮下に接種し、42日後に人型結核菌 H₃₇RV 株 0.5 mg を静脈内より接種攻撃したところ、攻撃後33日目に対照群の生存率 66.6% に対し、免疫群のそれは100%であり、免疫群は臓器塗抹標本および切片標本上菌数が著しく少く、組織学的には肺では肺胞の30~60%が滲出液で閉塞され、増殖性変化が著明であり、(対照群の肺胞は60~95%が閉塞され、滲出性変化が認められる)肝では、結節性変化がより著明で対照群よりもその限界明瞭で淋巴球に縁取られ、脾でも同様であるという。両実験は免疫条件、攻撃菌株等が違うが、BCGがマウスに相当の免疫を与えることを示している。なおLevaditi et Vaisman⁴²⁾によればBCGはマウス体内に少くとも109日迄検出されるという。著者の実験は1回免疫であるが、BCG静脈内、時に経鼻、次いで皮下接種によりマウスが強毒人型結核菌重感染に対する抵抗をある程度獲得することを、著者は、マウス生存日数の延長、菌数の寡少、組織学的所見の軽微なることより実証し、免疫の根拠として、BCG接種により、上記諸経路ではマウス体内に軽微な増殖性病変が肺、肝内に成立する事実を述べた次第である。

5 総括ならびに結論

- (1) BCGの研究にマウスを使用することが出来る。
- (2) BCGをマウスに接種すれば、殊に静脈内経路によれば、軽度の結核性変化を肝、肺に成立させることが出来る。
- (3) BCGによるマウスの結核性変化は乾酪変性におちることなく次第に吸収され自然治癒に向う。
- (4) BCGのマウス体内の消長もこの変化に平行するが、切片内では菌の方が早く検出されなくなる。
- (5) BCG接種により、特に静脈内、経鼻、皮下の諸経路においては、マウスは強毒結核菌重感染に対してある程度の免疫を獲得する。
- (6) マウスではBCG接種後20~30日頃結核菌重感染に対して免疫が獲得される。これはマウス体内にBCGによる組織学的変化の形成される時期とほぼ一致している。
- (7) 重感染に対する免疫は、生存日数の延長、臓器定量培養による菌数の寡少、病理組織学的変化の軽微なる

ことにより示される。

(8) 臓器定量培養および組織学的変化上免疫効果を比較する場合、肺においてその相違が最も明瞭に現われる。

北里研究所部長滝田順吾、岡本良三博士および水之江公英、小沢啓邦博士の御指導を深謝し、全容鉦学士の御援助を感謝する。

本論文の要旨の一部は第43回日本病理学会において発表した。

文 献

- 1) A. Calmette et C. Guérin: Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la tuberculose. *Ann. Inst. Pasteur* 34, 553~560, 1920.
- 2) P. Hauduroy et W. Rosset: Sensibilité du Hamster au Bacille BCG. *C.R. Acad. Sci.* 232, 445~446, 1951. *Id: Presse méd.* 59, 121, 1951.
- 3) 水之江公英: マウス結核症に関する研究, 第1報. 結核菌のマウスに対する毒力および体内における菌の消長, *日本細菌学雑誌* 7, 195~197, 1952, 同第2報, 感染方法のマウス毒力におよぼす影響ならびにツベルクリンアレルギーについて. 同, 199~200. 同第3報, 感染マウスに対する抗結核製剤の影響, 同, 293~296.
- 4) M. Tzekhnovitzer: Etude de la vaccination antituberculeuse par le BCG. *Ann. Inst. Pasteur* 41, 322~357, 1927.
- 5) R. Kraus: Ueber die Zulässigkeit der preventiven Schutzimpfung mit BCG nach Calmette und ihre Grundlagen. *Zent. Bakt. Orig.* 104, 65~71, 1927. *Id: Zur Frage der präventiven Schutzimpfung gegen Tuberkulose nach Calmette mittels BCG. Z. Immun.* 51, 230~256, 1927.
- 6) B. Lange und K. Lydtin: Experimentelle Untersuchungen am Meerschweinchen und Kaninchen über die Schutzimpfung der Kultur BCG (calmette). *Z. Tuberk.* 50, 45~60, 1928.
- 7) 渡辺・原沢・小野: Experimental immunization of tuberculosis with Calmett's BCG. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 9, 281~321, 1932.
- 8) F. Gerlach: Zur Frage der präventiven Schutzimpfung gegen Tuberkulose mit Calmette mit BCG. *Z. Int.* 51, 256~275, 1927.
- 9) 今村・高橋: Essais d'immunisation avec le BCG Calmette-Guérin. *Ann. Inst. Pasteur* 41, 1330~1333, 1927.
- 10) Remlinger et Bailly: Note sur l'innocuité du BCG pour le cobaye et sur son élimination par le tube digestif après absorption par voie buccale. *Ibid.* 41, 286~288, 1927.
- 11) H. Chiari, E. Nobel und A. Solé: Versuche mit dem BCG-stamms Calmettes. *Z. Tuberk.* 50, 24~38, 1928. H. Chiari: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei mit BCG geimpften Tieren. *wien Klin. Woch* 41, 798, 1928. E. Nobel: Tuberkulose immunität und Schutzimpfung nach Calmette mit BCG. *Ibid.* 798~800.
- 12) C. C. Okell & H. J. Parish: Vaccination of Guinea-pigs against Tuberculosis with BCG. *Brit. J. Exp. path.* 9, 34~42, 1928.
- 13) C. Schilling: Pathologisch-histologische Studien in bezug auf den Calmette schen Tuberkel bacillus (BCG). *Virchows Arch.* 278, 463~476, 1930.
- 14) K. A. Jensen, J. R. Mörch et J. Orskov: Recherches sur la virulence du bacille Calmette-Guérin. *Ann. Inst. Pasteur* 93, 785~798, 1929.
- 15) W. H. Feldman: A study of the pathogenicity of the Bacillus of Calmette-Guérin. *Am. J. Path.* 8, 755~767, 1932.
- 16) K. E. Birkhaug: Protection against tuberculosis with BCG Vaccination in guinea pigs. *Ann. Inst. Pasteur* 49, 636~652, 1932. *Id: Am. Rev. Tuberc.* 27, 6~31, 1933.
- 17) E. Coulaud: Effet des injections intraveineuses massives de Bacille bilié (BCG). *Ann. Inst. Pasteur* 41, 289~300, 1927.
- 18) J. Zeyland et E. P. Zeyland: Recherches expérimentales sur les lésions nécrotiques provoquées par les inoculations massives de BCG. *Ibid.* 42, 652~666, 1928. J. Zeyland: Progres du guérison des lésions nécrotiques provoquées par les inoculations massives de BCG. *Ibid.* 45, 157~161, 1930.
- 19) M. Lurie: The correlation between the histological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. *J. Exp. Med.* 55, 31~54, 1932.
- 20) H. Schmaabachen & G. S. Wilson: The vaccination of Guinea pigs with living BCG together with Observations on tuberculous Superinfection in Rabbits. *J. Path. Bact.* 46, 535~547, 1938.
- 21) 結核予防会編: BCGに関する調査書. 1952. 和田

- 明二：抗酸性菌の Hamster 脳内接種実験。日本細菌学雑誌 8, 225~229, 1953.
- 22) K. Berger und F. Puntigam: Über Infektionsversuche mit BCG-Keimen. Z. Hyg. 7, 1~12, 1953.
 - 23) D. D. Lekhoff et I. K. Levitan: Altérations anatomo-Pathologiques chez les lapins vaccinés avec le BCG. Ann. Inst. Pasteur 47, 45~51, 1931. Id: Etude anatomo-pathologique des lésions Produites chez les cobayes tuberculeux traités par le BCG. Ibid. 484~491.
 - 24) P. P. Dwijkoﬀ et L. P. Masourowski: Sur la vaccination par le BCG. Ibid. 41, 1194~1199, 1927.
 - 25) M. F. Rist et J. Misiewicz: Etude comparée Sur la réinfection intra péritonéale chez le cobaye tuberculeux et chez le cobayepremuni par le BCG. Ibid. 42, 945~955, 1928.
 - 26) O. Kirchner: Rechercher sur le BCG Ses propriétés pathogènes et immunisantes. Ibid. 43, 989~995, 1929.
 - 27) H. Buschmann: Contribution à l'étude de la vaccination antituberculeuse par le BCG. Ibid. 43, 838~856, 1929.
 - 28) E. Elbert et S. Galberg: Sur les propriétés pathogènes et vaccinales de BCG. Ibid. 44, 48~53, 1930.
 - 29) H. Selter: Zur Wirkung der Calmetteschen Tuberkulenschutzimpfung nach Beobachtungen an Meerschweinchen. Deutsch Med. Woch. II, 1081~1082, 1939.
 - 30) E. L. Opie & J. Freund: An experimental study of protective Inoculation with heated killed Tubercle Bacilli. J.Exp. Med. 66, 761~787, 1937.
 - 31) E. Sergent: De la prémunition. Bull. Soc. path. Exot. 22, 887~895, 1929. Id: Définition de l'immunité et de la prémunition. Ann. Inst. Pasteur 79, 787~797, 1950.
 - 32) R. Koch: Die Aetiologie der Tuberkulose. Mitteil. Kaiserl. Gesundh. 2, 1884.
 - 33) G. W. Raleigh & G. P. Youmans: The use of mice in experimental Chemotherapy of Tuberculosis. I. Rational & Review of the Literature. J. Int. Dis. 82, 197~204, 1928.
II. Pathology & Pathogenesis. Ibid. 82, 205~220, 1928.
 - 34) N. Stamatin et L. Stamatin: Virulence des trois types de bacilles tuberculeux pour la souris blanche. Ann. Inst. Pasteur 63, 269~292, 1939.
 - 35) G. T. Stewart: The pathogenesis of Tuberculosis in Mice infected intravenously with human Tubercle Bacilli. Brit.J. Exp. path. 31, 5~13, 1950.
 - 36) G. T. Stewart & M. Tamargo-Sanchez: An experimental Basis for estimating the virulence of Tubercle Bacilli. J.Hyg. 50, 37~72, 1952.
 - 37) H. Grün und W. Klinner: Die experimentelle Tuberkulose der weissen Maus-Virchaus Arch. 322, 311~355, 1952.
 - 38) 小沢: 実験的マウス結核症に関する若干の考察。日病会誌・42, 543~544, 1953.
 - 39) 小沢・岡本・石原・水之江: INAH 投与結核感染マウスにおける病理組織学的研究。北里実験医学雑誌 26, 55~64, 1953.
 - 40) 岡島: マウスにおける実験的結核症の組織学的研究。日病会誌(地方会号) 42, 175, 1953.
 - 41) W. F. Kirchheimer & S. Malkiel: Tuberculin Shock in Mice infected with Tubercle Bacilli. Am. Rev. Tuberc. 68, 629~630, 1953.
 - 42) C. Levaditi et A. Vaisman: Etude expérimentale de la vaccination antituberculeuse par le BCG. C. R. Soc. Biol. 143, 312~314, 1949.
 - 43) C. O. Siebenmann: Effect of BCG Vaccination and chemotherapy on experimental Tuberculosis in Mice. J. Immunol. 67, 137~150, 1951.
 - 44) 戸田: 結核菌と BCG. 1948.
 - 45) 柳沢: BCG とツベルクリン. 1948.
 - 46) N. Rist: Pathologie et thérapeutique expérimentales de la tuberculose. Fortschritte der Tuberkulosenforschung und-Behandlung 1, 55~132, 1948.
 - 47) 小沢・石原: BCG 接種マウスの病理組織学的研究。日病会誌・1954. 掲載予定.
 - 48) A. Calmette: La vaccination préventive de la tuberculose par BCG (Bacille Calmette-Guérin). Ann. Inst. Pasteur. 42, (suppl.), 1~58, 1928.
 - 49) F. Fenner: Bacteriological and Immunological Aspects of BCG Vaccination. Fortschritte der Tuberkulosenforschung 4, 112~186, 1951.