

# 家兔皮下に接種せるヒアルロニダーゼ添加 BCG の 侵入状況並びに体内組織に及ぼす変化

——早期変化について——

矢 島 忠

信州大学医学部戸塚内科一指導 戸塚忠政教授

## 【緒 言】

著者はさきに小学生を対象として、BCGにヒアルロニダーゼを添加して接種することにより、BCGのツ反応陽性効果を高めうることを報告した<sup>1)</sup>。前報<sup>2)</sup>においてはその作用機序を明らかにする目的をもつて、家兔にヒアルロニダーゼ添加BCGを接種し、菌侵入の状況ならびに体内組織に及ぼす変化をBCG接種後11日より115日まで観察し、菌接種局所の組織に特異所見が現われ、かつ対称BCG接種群よりも、局所リンパ腺および肝における組織変化がやや強く出現し、局所リンパ腺に到達する菌数もやや大なることを認めて報告した。今回はさらに、ヒアルロニダーゼ添加BCG接種、1時間、3時間、9時間、12時間、3日、7日後の比較的早期変化につき観察した。

## 【実験材料および方法】

実験材料および方法は前報<sup>2)</sup>にやや詳述したので、前回と異なる事項を主に記載するとどめる。体重2.0~2.5 kgのツ反応陰性家兔(5倍稀釈ツベルクリン液 0.1cc皮内反応)24匹を実験動物とし、これを2群に分ち、1群は対照群(BCG群)としてBCGのみを、他群はヒアルロニダーゼ添加BCG群(「ヒ」添加BCG群)とし、両側前肢に菌量0.5mg宛皮下注射、添加ヒアルロニダーゼは10単位で前報と全く同様な方法にて注射した。BCG 1mg中の生菌数は28,300,000(小川氏定量培養)であった。BCG接種後1時間、3時間、9時間、24時間、3日、7日に各群2匹宛エーテル、クロロフォルム麻酔にて殺し、前報同様にBCG接種局所および内部臓器、リンパ腺の肉眼的ならびに組織学的検索を行い、あわせて菌の定量培養を実施した。なお今回は、BCG接種局所を普通寒天培地にも培養し、24時間後判定した。

## 【実験成績】

### 1) 肉眼的解剖所見

BCG接種局所は、接種7日後の観察期間まで両群と

も潰瘍の発生は見られなかつたが、接種24時間後の剖検においては、「ヒ」添加BCG群のNo.19, No.20は皮下に粟粒大の膿瘍を形成し、爾後の剖検例では、漸次増大する傾向が見られた。BCG群においてはやや遅れ、接種3日後に至り、No.9, No.10は粟粒大の膿瘍形成が見られ、爾後の剖検例ではやや増大した。しかし「ヒ」添加BCG群に比すれば膿瘍の大きさは小さく、かつ膿瘍形成の時期が遅れていた。局所リンパ腺としての腋窩腺および、他のリンパ腺には両群とも、腫脹、結節、乾酪変性等全くなく、内部臓器、肺、肝、脾、腎にも両群とも特に変化は認められなかつた。

### 2) 接種局所、臓器およびリンパ腺のBCG定量培養成績

表中、BCGの培養基面に発育せるもの+の記号で、発育せざるものを-の記号で示し、+の横の数字は0.02 g中の集落数を示してある。Hは集落発生100個以上のものである。すなわち接種局所からは、両群とも各剖検時において、100個以上の多数の集落が発生した。腋窩リンパ腺からは、BCG群では、接種9時間後の剖検において、No.5は3個、接種24時間後においてはNo.7は7個、No.8は9個、接種3日後においてはNo.9は5個、No.10は7個、接種7日後においては、No.11は4個、No.12は6個の集落が発生した。「ヒ」添加BCG群では接種3時間後の剖検時において、すでにNo.15は14個、No.16は19個、接種9時間後においては、No.17は62個、No.18は38個、接種24時間後においては、No.19およびNo.20はそれぞれ19個、接種3日後においては、No.21は7個、No.22は15個、接種7日後においては、No.23は8個、No.24は13個の集落が発生した。すなわち「ヒ」添加BCG群では、BCG群に比し、早期に局所リンパ腺としての腋窩腺より菌が培養せられ、かつ多数の菌集落数が認められた。その他のリンパ腺および臓器からはいずれの剖検時においても菌は培養陰性であった。

### 3) 組織学的所見

#### i) BCG接種局所

接種1時間後の所見は、両群とも、(No.1, No.2 およ

		B C G 群										「ヒ」添加 B C G 群													
家 兎 番 号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
性 別		♂	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♀	♂	♂	♂	♀	♀
感 染 後 生 存 時 間		時 間 1	1	3	3	9	9	24	24	3 日	3	7	7	時 間 1	1	3	3	9	9	24	24	3 日	3	7	7
体 重		2.50	2.40	2.28	2.00	2.35	2.10	2.46	2.30	2.25	2.15	2.35	2.40	2.45	2.30	2.50	2.38	2.41	2.10	2.00	2.33	2.30	2.22	2.15	2.25
死 因		殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺	殺
B C G 定 量 培 養 成 績	接 種 局 所	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	腋 窩 腺	-	-	-	-	+3	-	+7	+9	+5	+7	+4	+6	-	-	+14	+19	+62	+38	+19	+19	+7	+15	+8	+13
	頸 部 腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	頭 部 腸 間 膜 腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	左 結 腸 腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鼠 蹊 腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	肺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	肝	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	脾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
腎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注 1) + : 集落 100 個以上  
 2) + の横の数字は培地 3 本の平均集落数 (培養 5 週後判定)

びNo.13, No.14) 注射部位の出血と、結合織の粗鬆化が見られるが、細胞浸潤は未だ見られない。結合織の粗鬆化の程度は、「ヒ」添加 B C G 群に強い。接種 3 時間後の所見は、両群とも (No.3, No.4 および No.15, No.16) すでに接種皮下組織には、リンパ球を主とした細胞浸潤が見られる。この時期には、B C G 群は多少強い細胞反応を示し、「ヒ」添加 B C G 群では、結合織の粗鬆化がやや強い。接種 9 時間後の所見は両群とも (No.5, No.6 および No.17, No.18) 接種皮下組織に、リンパ球を主とした細胞浸潤がますます強くなり、その程度は B C G 群の方がやや強いが両群間に著明な差は認められない。接種 24 時間後の所見は (図 1 および 2) 両群とも (No.7 No.8 および No.19, No.20) 接種皮下組織には、相当高度の細胞浸潤が見られる。この時期になると、「ヒ」添加 B C G 群は急激に膿瘍形成を示してくる。しかし膿瘍壁の形成は全く見られない。接種 3 日後の所見は、(図 3 および 4) 極めて明らかな両群間の差異が認められるに至る。すなわち B C G 群 (No.9 および No.10) では、接種皮下組織に膿瘍形成が認められるが、限局性で、しかも大きさは小さい。「ヒ」添加 B C G 群 (No.21 および No.22) では、接種皮下組織の壊死を伴った膿瘍形成は大となり、膿瘍の限局化の傾向が弱い。接種 7 日後の所見は、(図 5 および 6) B C G 群 (No.11 および No.12) では、接種皮下組織の膿瘍は限局性で小さく、すでに大型

の明るい泡状核を有するいわゆる類上皮細胞に相当する細胞が浸潤細胞の主体をなしている。これに反し、「ヒ」添加 B C G 群 (No.23 および No.24) では、膿瘍はますます大きくなり、皮下組織をほとんど埋め尽す程度となり、しかも浸潤細胞は依然として、白血球ないし小型のリンパ球様細胞で占められ、類上皮細胞の出現は見られず、膿瘍壁形成の傾向がほとんど認められない。

ii) リンパ腺および肺、肝、脾、腎

ときに充血等が見られるものがあるが、両群間に著明な差異は認められない。

iii) 結核菌染色標本

両群とも接種局所には、各剖検時において、常に抗酸菌が認められた。また「ヒ」添加 B C G 群の No.17 の接種 9 時間後の腋窩リンパ腺標本にて、細網細胞内に摂取せられた抗酸菌が認められた。(図 7) その他のリンパ腺および内部臓器からは、標本では両群ともいずれの剖検時においても抗酸菌は認められなかった。

4) 接種局所の普通寒天培地培養成績

B C G 接種局所を、普通寒天培地に 24 時間培養したが、両群ともいずれの剖検時においても培養陰性であった。

総括ならびに考案

B C G 接種局所は、肉眼的には両群とも観察期間中い



ずれの時期においても潰瘍は発生しなかつたが、「ヒ」添加BCG群では、接種24時間後にすでに膿瘍の形成を見、対照BCG群の、接種3日後に初めて膿瘍形成を見たのに比して、早期に現われることが認められ、その大きさも大である。組織所見は、対照BCG群は膿瘍が限局性で小さく、7日後に、明るい泡状核を有するいわゆる類上皮細胞に相当する細胞が、接種部位の浸潤細胞の主体をなし、はつきりと限局化を示すのに対して、「ヒ」添加BCG群では、接種1時間および3時間後に、接種局所皮下組織の強い粗鬆化を示し、24時間後に至つて、急激な膿瘍形成が見られ、以後膿瘍は次第に増大し、接種7日後にはほとんど皮下組織を埋め尽くす程度となり、膿瘍壁形成の傾向がほとんど見られない。この時期にも未だ類上皮細胞の出現は見られず、前報<sup>2)</sup>に報告せる如く接種11日後に至つて、わずかに類上皮細胞が出現し、膿瘍限局化の萌を見るのみである。接種局所の結核菌染色標本では観察期間中、両群とも全例に多数のBCG菌を認め、局所のBCG定量培養成績も、両群間に差が認められない。両群ともに普通寒天培地では他菌の発生なく、膿瘍形成はBCG菌によるものであることが確認せられる。K. Birkhaug<sup>3)</sup>はBCGにヒアルロニダーゼを添加してモルモットに接種すると接種局所の反応は強く現われると述べ、八鍬<sup>4)</sup>もまた、ヒアルロニダーゼ添加BCGの人体およびモルモットの皮下接種は、BCG単独皮下接種に比し、局所反応は明らかに激しかつたと報じている。著者の前回における報告においても、人体皮下接種の場合<sup>1)</sup>、家兎皮下接種の場合<sup>2)</sup>ともに局所反応は強く出現している。

局所リンパ腺としての腋窩腺を検するに、定量培養成績は、BCG群では接種9時間後にNo.5が3個、接種24時間以後に、すべて10個以下の集落が発生したのに対して、「ヒ」添加BCG群では接種3時間後すでにNo.15 14個：No.16, 19個：接種9時間後No.17, 62個：No.18 38個の集落が発生し、対照BCG群よりも早期にかつ多数の菌が局所リンパ腺に到達することが分る。ただし24時間以後は菌数減少の傾向を示し、一定時間以後の菌の伝播は起らないことを思わせる。また両群ともに肉眼的には腋窩腺に腫脹、結節、乾酪変性等認められないが、組織反応を呈する時期に至つていないためと解せられる。

腋窩リンパ腺以外のリンパ腺および肺、肝、脾、腎は組織学的にときに充血等が認められるものがあるが、両群に著変なく定量培養および結核菌染色標本では菌が証明せられなかつた。

K. Birkhaug<sup>3)</sup>はモルモットにヒアルロニダーゼ添加BCGを接種しリンパ腺、および臓器の定量培養を行い、対照BCG単独接種の場合より、リンパ腺および臓器への菌の撒布が早く、かつ集落数の多いことを認めてい

る。八鍬<sup>4)</sup>も同様の成績をえている。家兎を用いた本実験においても、「ヒ」添加BCG接種はBCG単独接種に比して、明らかに局所リンパ腺への菌の拡散が早く、菌数も多いことが認められ諸家の報告と一致している。ただし菌は所属リンパ腺を越えて、内部臓器へ侵入したことを示す所見はえられなかつた。加藤<sup>5)</sup>は、家兎皮下にBCGを接種し、接種後2週間で菌は局所リンパ腺に達するも、その数は甚だ少なく、しかも菌はこれを越えて拡散せず、局所リンパ腺内にては、菌は増殖せず接種後60日に至れば菌は生存せざる所見をえたと報じている。

以上の所見より案ずるに、接種局所はヒアルロニダーゼ添加によつて、膿瘍の形成が早期に起り、かつ高度で類上皮細胞の出現遅延し、膿瘍壁の形成、膿瘍の限局化が甚だ不充分となる。接種局所には常に大量の菌が残存し、両群間に差がない。ヒアルロニダーゼ添加により、BCG菌が接種局所より早期かつ多数に、局所リンパ腺に伝播する。ただし腋窩腺内の菌数がときとともに増加することがなく、一定時間以後減少することから接種局所からの菌の伝播は、長期にわたつて起るものでなく、局所リンパ腺に到達したBCG菌はリンパ腺内で漸次処理せられてゆくものであらうと考えられる。腋窩リンパ腺以外のリンパ腺、肺、肝、脾、腎には組織所見、定量培養所見に異常のないことから、接種せられた菌は局所リンパ腺たる腋窩腺を通過して、あるいは血行を介して全身に強く伝播せられるものでないことが認められる。高橋<sup>6)</sup>はBCGを接種する場合、同一製造方法による同一菌液であつても、BCG接種局所の変化の出現の仕方は、注射局所、注射方法等によつて、局所変化出現の仕方に著しい差を生ずることが歴然と認められると言つていながら、本実験においては菌の種類、および菌量、注射方法、注射局所は両群ともにいずれも同一であり、しかも八鍬<sup>4)</sup>の実験せる如く試験管内におけるBCGはヒアルロニダーゼの添加の如何にかかわらず、BCGの生菌数に著差は認め難く、またK. Birkhaug<sup>3)</sup>、八鍬<sup>4)</sup>の述べている如く、BCGにヒアルロニダーゼを添加しても、菌自体の毒力の増強が見られないとすれば本実験において、両群間の局所変化の出現方式に著しい変化を見たのは、ヒアルロニダーゼ添加により、注射局所の菌に対する反応形式が異つて現われたものと考えられる。

前回の報告<sup>2)</sup>は11日以降115日までの、接種後長時日を経過して一定の組織反応成立の状態を観察したものであるが、今回の実験は菌伝播と早期の組織反応の過程を明らかにしたものである。

## 【結 論】

1) 肉眼的解剖所見では、両群ともBCG接種局所には潰瘍は発生しなかつたが、「ヒ」添加BCG群ではBC

G群に比し、早期に膿瘍形成が認められ、大きさも大であつた。リンパ腺および肺、肝、脾、腎には両群とも著しい変化は見られなかつた。

2) 接種局所リンパ腺および臓器の定量培養では、両群とも接種局所より、各剖検時において多数の集落が発生し著明な差は認め難く、腋窩リンパ腺よりはBCG群では接種9時間後より、「ヒ」添加BCG群では接種3時間後より集落が発生し、「ヒ」添加BCG群の方が早期に局所リンパ腺への菌到達が見られ、かつ集落数も大であつた。その他のリンパ腺および臓器からはいずれの時期の試験材料からも培養陰性であつた。

3) 組織学的所見ではBCG接種局所は、BCG群では接種3日後に、限局性の小さい膿瘍形成が認められ、接種7日後には、すでに類上皮細胞の出現を見る。膿瘍は小さくその壁は限局化の傾向が強い。「ヒ」添加BCG群では接種24時間後に膿瘍形成が見られ、膿瘍壁の形成は見られず、大きさも大で接種7日後に至つても類上皮細胞の出現はなく、白血球ないし小型のリンパ球様細胞で占められ膿瘍は大でその壁の限局化の傾向はほとんど認められない。その他リンパ腺および肺、肝、脾、腎には両群間に著明な差はない。

結核菌染色標本ではBCG接種局所には、両群とも抗酸菌が常に認められた。「ヒ」添加BCG群の接種9時間後の腋窩リンパ腺からは、細網細胞内に摂取せられた抗酸菌が認められたが、その他のリンパ腺および臓器には両群とも認められなかつた。

4) BCG接種局所の普通寒天培地への培養では両群とも、いずれの時期にも培養陰性であつた。

終りに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師戸塚忠政教授ならびに組織所見につき種々御教示を賜つた本学病理学教室矢川寛一助教授に衷心より謝意を表します。

#### 〔文 献〕

- 1) 矢島忠：結核，28：785，1953.
- 2) 矢島忠：結核，30：123，1955.
- 3) K. Birkhaug：Am. Rev. Tuberc., 68：183, 1953.
- 4) 八鍬英一郎：抗酸菌病研究雑誌，9：182，1953.
- 5) 加藤銀次郎：結核，20：104，1942.
- 6) 高橋義夫：結核，27：171，1952.