

BCG ワクチン中の微量強毒結核菌の検出に関する研究

第2報 動物通過における微量強毒菌消滅の機序

山口 登・関 根 修

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和 31 年 8 月 18 日

緒 言

前報¹⁾で、BCG 3~30mg 中に強毒菌が $10^{-5}mg$ 以下に混在していても、てんじくねずみ接種では、体重、ツベルクリン反応はもちろん、剖検所見や臓器の培養上、混在を確認することは困難であることを述べた。強毒菌単独の場合には、培養不能な位の微量でも、特に単孤菌でも、動物によつては発症しうるといわれる^{2)~4)}。それでは、大量BCG中に混在する場合のみ、病原性の低下ないし強毒菌の分離検出不能の場合があるのは、いかなる機序によるものであろうか。以下、前実験成績の確認と、機序に関する若干の検討を試みた。

実験方法および成績

実験 I 分離培養に対する検討

前報の実験では、混入強毒菌はストレプトマイシン(以下SM)耐性菌で、SM加培地上で分離算定された。ところで、薬剤耐性菌は感性菌や、感性菌の抽出物ないし培養濾液等に接触する場合には、感性化されるといわれる^{5)~8)}。それで、大量BCG中の微量耐性強毒菌も感性化されたために、耐性培地上で検出する場合、みかけ上、菌の減少ないし消失とみられたのではないかという疑問が起る。

そこで、前回とは逆に、SM 1000 γ 耐性のBCG(生菌単位数、 $45 \times 10^6/mg$) 5mg 中に、SM感性のH₂(生菌単位数、 $71 \times 10^8/mg$) を $10^{-3} \sim 10^{-5}mg$ 混入した菌液を静脈および皮下に接種し、6週および9週後に屠殺剖検し、臓器の定量培養を行った。

表1に示すように、静脈内接種では、皮下接種より病変が強かつたが、H₂ $10^{-5}mg$ 混入では、9週目でほとんど

表 1 H₂混入、SM耐性BCG接種による病変および臓器内生菌数

接種方法	接種菌液	臓器 10mg 中の生菌単位数									病 変 度								
		BCG-RSM						H ₂						6 週			9 週		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
(静脈)	BCG + H ₂ 10 ⁻⁵ mg	0	1	1	0	1	0	1	0	470	0	0	0	+	+	+	+	+	-
		0	0	1	0	0	0	0	0	6	0	0	0	-	+	-	-	-	-
		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
(内)	H ₂ 10 ⁻⁵ mg							2	14	240	1	14	800	+	+	+	+	+	+
								1	10	180	0	2	500	+	+	+	+	+	+
								1	6	60	0	1	230	-	+	+	-	+	+
(皮)	BCG + H ₂ 10 ⁻³ mg	4	7	2	3	0	0	16	85	850	46	110	1600	+	+	+	+	+	+
		3	3	1	0	0	0	5	27	130	24	44	450	+	+	+	+	+	+
		0	2	1	0	0	0	0	0	26	2	19	310	+	+	+	-	+	+
(下)	H ₂ 10 ⁻³ mg							45	300	1700	21	150	1500	+	+	+	+	+	+
								21	150	1500	15	140	1200	+	+	+	+	+	+
								20	80	1400	4	42	900	+	+	+	+	+	+
(下)	BCG + H ₂ 10 ⁻⁵ mg	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	+	-	+	-	-
		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
(下)	BCG + H ₂ 10 ⁻³ mg	0	0	1	0	0	0	1	3	39	0	0	2	-	+	+	+	+	-
		0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	-	+	+	-	-	-
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+	-	-	-

計：病変度，+~冊，肉長の結節の程度を表す。○乾酪化以下同様

と認めるべき内臓病変がなく、強毒菌も分離できない。H₂ 10⁻³mg 混合菌静脈内接種では、内臓病変は顕著で、9週後の病変は6週よりも進行的であり、菌数においても、9週後の菌数は6週よりも多いようであった。それ

でも、単独接種の場合に比較して、臓器の病変は軽く、発見菌数は少なかった。皮下接種では、H₂ 10⁻⁵mg 混合群ではほとんど病変がみられず、強毒菌もほとんど分離できず、10⁻³mg 混合群では、病変は軽度で、9週後

に発見される菌数は6週に比して少なかった。SM耐性であるBCGは常に少数しか検出されなかつたから、SM非添加の小川培地上で算定された総菌数はほとんど強毒菌によると考えられるが、如上の所見は、前報の成績とよく一致していた。故に、前報で、内臓所見に一致した混合耐性強毒菌の減少がみられたのは、耐性培地上で判定することにより生じた見かけ上の減少ではなかつたと思われる。

実験II 接種部位に関する検討

6匹あての4群に、強毒菌H₂R-SM 0.01mg(生菌単位数, 65×10⁶/mg)を左下腹部皮下に接種した。ただし、I群は対照とし、II, III群は右腋窩皮下, あるいは左大

表2 BCG接種部位と病変ないし臓器内生菌数との関係

実験群	BCG接種	臓器10mg中の強毒菌数			病変度		
		肺	肝	脾	肺	肝	脾
I	せ	17	47	1000	++	+++	⊕
		8	30	700	++	+++	⊕
		1	9	350	++	++	++
		0	4	120	++	++	++
II	ず	0	2	100	++	++	++
		0	1	50	+	+	+
		27	47	410	++	+++	++
		22	35	360	++	++	++
III	右腋窩	14	22	220	++	++	++
		11	7	210	++	++	++
		5	7	150	—	—	++
		1	5	100	—	—	++
IV	左大腿	30	18	190	+	+	+
		12	17	180	—	—	++
		5	12	91	—	—	++
		2	12	65	—	—	++
IV	左(混合)下腹	1	8	40	—	—	+
		1	2	19	—	—	++
		1	2	10	—	—	++
		0	1	5	—	—	—
		0	0	4	—	—	—
		0	0	4	—	—	—

腿筋肉内にBCG 30mg(生菌単位数, 29×10⁷/mg)を同時に接種し、IV群はBCG 30mgと混合した菌液として接種した。6週後剖検し、臓器の定量培養を行った。

体重、「ツ」反応においては各群間に大差がみられず、表2の通り、内臓病変は混合菌液接種群は極めて軽微で、BCGを場所を違えて同時に接種した他の2群は、対照よりやや軽度であつた。臓器内生菌数においても、混合菌液は明らかに少なかったが、他のBCG同時接種群では、対照よりやや少ないかと思われる程度であつた。

実験III 接種時期に関する検討

強毒菌感染前4週(I), および1週(II), 感染と同時に(III), および感染後1週目(IV)にBCGを接種した4群と、非接種の対照群(V)を、同時にH₃₇Rv R-SMを以て感染した。BCGはあらかじめSauton培養菌を凍結乾燥保存した同一lotを用い、生菌単位数は5~12×10⁶/mgで、その0.05mg, あるいは5mgを左大腿筋肉内に接種した。感染は皮下では右大腿皮下に0.01mgを、静脈内では0.001mgを接種した。(生菌単位数, 13×10⁶/mg)皮下感染群は8週後屠殺し、肺、脾および左後腹膜リンパ腺の定量培養をSM加小川培地で行い、静脈内感染群は、感染後2週、4週および8週後に、各群2匹あてを屠殺し、脾の定量培養を行った。

100倍旧「ツ」液による感染時の「ツ」反応は、BCG 5mg 4週前接種群のみに強い反応がみられ、0.05mg 4週前接種群でも10mm以上の反応であつたが、感染1週前に接種された群では10mm以上の反応はみられなかつた。皮下感染後8週目の剖検所見では、表3に示すように、IおよびII群の病変は軽度で、検出される強毒菌数も少なく、IIIおよびIV群はV群と同様に強い病変を表

表3 BCG接種時期と病変ないし臓器内生菌数との関係

BCG接種時期	皮下臓器10mg中の強毒菌数			感染病変度			静脈内臓器10mg中の強毒菌数			感染病変度		
	後腹膜	肺	脾	後腹膜	肺	脾	2週	4週	8週	2週	4週	8週
(BCG) I 4週前	80	0	0	—	+	++	940	1000	800	+++	⊕	+++
	0	0	0	—	—	+	450	900	700	+++	++	+++
	1500	0	28	++	—	++	1500	3000	300	++	⊕	+++
	140	0	19	++	—	++	1400	2200	200	++	⊕	+++
1/20 mg 同時	600	3	800	+	++	+++	5800	5600	350	+++	⊕	+++
	510	2	500	+	++	+++	5000	2000	300	+	⊕	+++
IV 1週後	900	80	1500	+	++	+++	5100	18000	1700	++	⊕	+++
	300	5	700	+	+	+++	2000	7800	1100	++	⊕	+++
(BCG) I 4週前	2	0	1	—	+	+	650	330	300	++	+	+++
	0	0	0	—	—	—	120	140	200	++	—	+++
	1200	7	9	+	—	++	2200	2800	3800	+++	⊕	+++
	190	0	4	—	—	++	1600	1200	600	+++	⊕	+++
5 mg 同時	1100	21	4300	++	++	+++	4500	3400	300	+++	⊕	+++
	112	0	3400	++	+	+++	2200	2200	250	+++	⊕	+++
IV 1週後	700	28	400	+	++	+++	3800	3800	530	++	⊕	+++
	300	5	80	+	—	+++	2000	2900	210	++	⊕	+++
V 非接種	300	10	450	+	++	+++	3300	4000	550	++	⊕	+++
	220	0	200	+	—	+++	1900	3000	500	++	⊕	+++

し、多数の感染菌が検出され、後3者間に著差はみられなかつた。静脈内感染においては、I群では2~4週後に脾から検出される菌数は少ないが、IIIおよびIV群ではV群と同じか、かえつて多い位で、II群は僅かに少ない傾向であつた。すなわち、「ツ」アレルギーの発現するような前時期に予めBCGを接種すれば、感染強毒菌の病原性ないし増殖生残は阻害されるが、充分アレルギーの発現しえない時期や、感染と同時に、あるいは感染後まだ「ツ」反応の出現しない時期に、BCGを場所を異にして接種しても、強毒菌の増殖生残に対する阻止の影響はみられなかつた。

実験IV 弱毒菌の抗原性に関する検討

第II実験において、BCGと微量の強毒菌を同時に接種した場合、混合菌液という最も近接した部位に接種された場合において、病原性ないし強毒菌の生体内増殖生残が強く阻害の影響をうけることが分つた。これが、有馬⁹⁾らのいう如く、いわゆる全身免疫に先行する局所免疫によるものか否かを検討する目的で、強毒人型菌に対する免疫原性がないとみなされている *M. phlei* をBCGにかえて実験した。

Sauton 4日培養の *M. phlei* 30mg/0.5ml を右腋窩に、人型強毒菌H₂ 10⁻⁴mg/0.5ml を左下腹部に同時に接種した群、両菌液の等量混合菌液 1ml を左下腹部に接種した群、および、H₂菌液のみを0.5ml、左下腹部に接種した群を6週後剖検し、肺、肝および脾の定量培養を行つた。*M. phlei* およびH₂の生菌単位数は、それぞれ15×10⁷/mg、45×10⁵/mgであつた。

混合菌接種群の「ツ」反応は、他の2群に比して弱く、表4のように、6週後の内臓の肉眼的所見はほとんどなく、生菌も内臓からはほとんど証明できぬ位であつた。

表4 微量強毒菌感染における*M. phlei*混合の影響

<i>M. phlei</i> 接種部位	肉眼的剖検所見							10mg中の強毒菌数			
	局所	左しつべき	左そけい	右こうきふ	右えきか	門肺	肝	脾	肺	肝	脾
I 右腋窩	a	⊕	-	⊕	⊕	+	-	+	1	2	190
	-	⊕	+	+	+	+	-	⊕	0	570	800
	a	⊕	-	+	+	+	+	-	1	1	54
	G	⊕	+	+	+	+	+	-	0	1	0
	G	⊕	+	+	-	-	+	⊕	0	1	280
II 左下腹部(混合)	K	⊕	-	+	-	-	-	-	0	0	0
	-	⊕	-	+	-	-	-	-	0	0	0
	K	⊕	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	-	⊕	-	-	-	-	-	-	0	1	0
	K	⊕	-	⊕	-	-	-	-	1	0	32
III 非接種	a	⊕	-	+	-	⊕	+	-	1	4	200
	G	⊕	+	+	+	+	-	⊕	0	300	500
	a	⊕	+	-	-	⊕	-	+	0	1	60
	G	⊕	+	-	-	⊕	-	+	0	16	30
	G	⊕	+	+	-	⊕	-	+	1	3	550
									1	8	70

注 局所(a-K) 小〜大皮膚病

しかし、異所接種群の病変および臓器内菌数は、強毒菌単独接種群とほぼ同程度であつた。

考 察

BCGワクチンに強毒菌が混在したときに、強毒菌の毒性発揮が抑制されることを観察した岩崎¹⁰⁾、有馬⁹⁾は、いずれも大量BCGによつて、全身性ないし局所的な免疫が早期に成立し、微量強毒菌の増殖を阻止するためとみている。もちろん、大菌量接種によつては、少量菌よりも早期に免疫が成立するであろう¹¹⁾。しかし、大量BCG接種によつても、全身的な免疫効果が現われるのには一定の期間が必要であつたから、全身性の免疫反応の結果とは考え難い。それでは、強毒菌がBCGと全く同一の場所に接種された場合のみ強毒菌の増殖抑制が顕著で、両者が隔つた部位に接種されるほど強毒菌に対する影響は少ないので、局所免疫が接種と同時に成立するためと見られるが、強毒菌に対する免疫原性のほとんどない *M. phlei* でも、混合菌液として接種すれば、微量強毒菌の増殖抑制効果を表すから、特異的な免疫作用とは考えられない。

むしろ、Dubos^{12,13)}が *in vitro* の成績から考察しているように、たとえ大量菌が弱〜無毒菌であつても、接種初期には、激しい炎症が接種局所や、所属リンパ腺におこりうるので、この炎症の結果、該部の組織環境がかわり、菌の増殖生残に不利な物理化学的条件が形成され、その結果おこる菌の死滅に微量強毒菌もまきこまれて消失するものと考えたい。そして、2~3週を経過すれば、いわゆる抗菌免疫がいよいよ成立するから、強毒菌が残存していても極く微量であれば、完全に増殖生残が封じられて、肉眼的病変を表わさず、臓器内強毒菌が検出しないことがありうるのではあるまいか¹⁴⁾。

もし、生体反応の関与しない *in vitro* でも大量菌の微量菌に対する干渉がありうるならば、大量弱毒菌が微量強毒菌の増殖生残を防げる機序には、免疫反応ばかりでなく、環境の物理化学的な要因が関与するか否かが、さらに判然とする筈であろう。次報では、これに関して更に検討を進めたい。

結 論

- 1) 微量強毒菌を大量BCGに混合して、てんじくねずに接種すれば、強毒菌単独接種に比し、微量強毒菌の増殖生残は阻止される。
- 2) 微量強毒菌を大量BCGと同時に接種した場合、同一局所に接種された場合には、強毒菌の増殖生残は阻害作用を強くこうむるが、部位がへだたると影響は弱まる。
- 3) ツベルクリン・アレルギーが発現するような前時期にあらかじめBCGを接種すれば、感染菌に対する抗菌作用がみられるが、感染と同時に、あるいは感染後に、

部位を異にしてBCGを接種しても、抗菌的影響はみられない。

4) かかる微量強毒菌に対する大量弱毒菌の干渉は、大量の *M. phlei* でもみられるから、むしろ非特異的なものと考えられる。

終りに、御指導、御校閲を賜った柳沢部長、橋本氏に深甚の謝意を表す。

文 献

- 1) 山口 登・関根 修・立花暉夫：結核，第1報。
- 2) Levinthal, W. : Zeitschr. Hyg., 107, 387, 1927.
- 3) Birkhaug, K.A. : C.R. Soc. Biol., 119, 156, 1935.
- 4) Bretey, J. : Ann. Inst. Pasteur, 70, 357, 1944.
- 5) Voureka, A. : Lancet, I, 62, 1948.
- 6) Welsch, M. : C.R. Soc. Biol., 153, 1282, 1949.
- 7) Linz, R. : C.R. Soc. Biol., 155, 146, 1951.
- 8) Saz, A.K. & Eagle, H. : J. Bact., 66, 347, 1953.
- 9) 有馬 純・山本健一：結核，26：501，1951.
- 10) 岩崎彌一郎：結核，10：82，1932.
- 11) Calmette, A. : L'infection bacillaire et la tuberculose, Masson et Cie, 1936, p. 621.
- 12) Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 92, 317, 1950; 97, 357, 1953. Am. Rev. Tuberc., 63, 119, 1951.
- 13) Hirsch, J.G. & Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 95, 191, 1952.
- 14) 橋本達一郎・加藤允彦：日本細菌学雑誌，10，311，1955.