

# 腹腔内感染モルモットによる抗結核免疫の観察

原 沢 道 美・小 山 寛 二 郎

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和 31 年 10 月 8 日

## I 緒 言

従来、免疫処置を受けたモルモットの免疫効果をみる方法としては、強毒結核菌による皮下感染を行い、一定期間後に生じた結核性病変や臓器内結核菌数を対照と比較する方法が最も多く用いられてきた。しかしこの場合にみられる現象は、接種局所から感染菌の体内侵入を防ぎ、またその体内における増殖を阻止するという2つの現象の組合せであり、しかもこれには、感染局所のアレルギー反応がこれに関与しているため、その現象は一層複雑であり、臓器における免疫効果を菌の消長の面からはかるのには、本法は不適當であることが指摘<sup>1)</sup>された。そして、これらの批判をさけるため、感染菌を直接静脈経路を介して免疫動物の臓器に撒布し、その後の感染菌の消長を病変の推移とともに追求する方法が、近時盛んに用いられている。すなわち、Lurie<sup>2)</sup>はカトにおいて、Dubos<sup>3)</sup>はハツカネズミにおいて、橋本<sup>4)</sup>、金井<sup>5)</sup>らはモルモットにおいて、それぞれ静脈内感染により免疫動物に攻撃を行い、臓器内の感染菌の増殖が著しく抑制されることをみ、この増殖抑制作用を抗結核免疫の本質としている。

ところで、その他の感染法の一つである、腹腔内感染法によつて、かかる抗結核免疫の測定が可能であるかどうかについての検討は、現在までのところほとんど認められず、僅かにハツカネズミについての2, 3の報告<sup>6)</sup>があるのみであるが、その成績も一致していない。そこで著者らは、モルモットについて、この点についての検討を加えてみた。

なお、さきに著者ら<sup>8,9)</sup>は、年令の異なる3群の免疫動物に静脈内経路により攻撃を行い、臓器内感染菌の消長を観察したところ、それが年令によりそれぞれ異なることを明らかにしたが、この点についても、腹腔内感染法により検討を加えてみたので、その成績も併せてここに報告する。

## II 実験材料および実験方法

動物：生後3週(体重200~300g)の健康モルモット52匹を実験に使用した。これらの動物を2群に分け、1群にはBCGによる免疫操作を加え、他の群はそのまま放置し、非免疫対照群とした。

BCGによる免疫：Sauton 培地 8日培養のBCGを

凍結乾燥し、保存してあるものを蒸留水で再浮遊し、2mg/mlの菌液としてその0.5mlをモルモットの右下腹部皮下に注射して免疫した。動物1匹あたりの接種量は1mgで、 $23 \times 10^6$ 生菌単位である。

感染法：BCG免疫処置後6週目に、非免疫対照群とともに、0.01mg/mlの割にグリコゲン含有する生理的食塩水にて作った、人型結核菌H<sub>2</sub>株の0.01mg/mlの菌液、10ccずつを、すべての動物の腹腔内に接種した。H<sub>2</sub>株は凍結乾燥して予め菌力、生菌単位数の既知のものを用い、動物1匹あたりの接種量は0.1mgで、 $38 \times 10^5$ 生菌単位であつた。

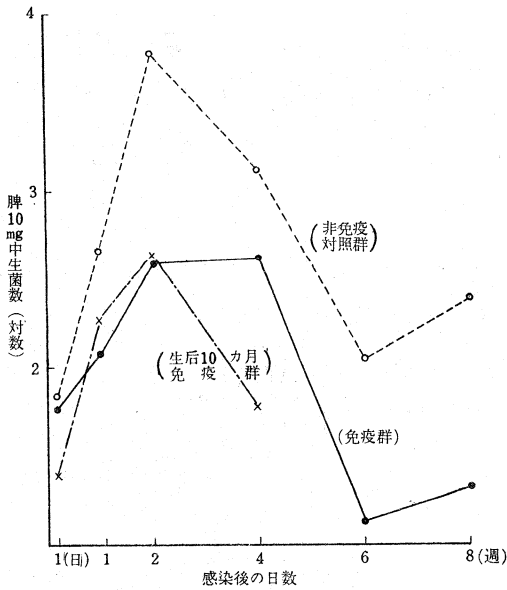
臓器内生菌単位数測定法：H<sub>2</sub>腹腔内感染後、1時間、24時間、4日、1週、2週、3週、4週、6週および8週目に両群の動物を2~4匹ずつ屠殺剖検し、肉眼的に淋巴腺、肺、肝、脾の結核性病変を観察した。剖検と同時に、肺、肝、脾、後腹膜・門脈淋巴腺、腹腔内単核細胞の定量培養を行つた。その方法は、臓器の一部を切除し、素焼乳鉢中で、1%苛性ソーダを組織重量の9倍量に至るまで加えつつ磨砕し、乳剤とする。それよりさらに10倍稀釈を蒸留水を用いて繰り返し、適当な稀釈と思われるものを0.1mlずつ3本の小川培地に接種して培養し、1本の培地に100以下の集落数を生じた段階から臓器および淋巴腺の10mg中の生菌単位数を換算した。なお、腹腔内単核細胞の洗出方法およびその定量培養の方法はすでに報告<sup>10)</sup>した如くで、生菌単位数は腹腔滲出液10ml中のものに換算して記載した。

## III 実験成績

### 1. 非免疫対照群における感染菌の消長

H<sub>2</sub>菌0.1mg ( $38 \times 10^5$ 生菌単位)腹腔内注射後の、非免疫モルモットにおける感染菌の消長は表1に示す如くである。肺、肝、脾の各臓器とも、接種24時間後にそれぞれ大体一定数の結核菌が分布し、それは感染後2週目を最高峰として定型的な増殖死滅曲線をえがいている。すなわち、脾10mg中に約 $10^{10}$ の密度で撒布されたH<sub>2</sub>菌は、2週後最高値を示し、その値は24時間値の約100倍を占めている。以後は減少し、6週以後では24時間とほぼ同じ密度に下がっている。次に、肺、肝では、その10mgにつき約 $10^9$ の密度で撒布されたH<sub>2</sub>菌は、2週後に増殖は最高値を示し、それは24時間値の約10倍を占めている。4週でも同じ密度を示すが、6週以後では減少す

図 H<sub>2</sub> 0.1mg (38×10<sup>5</sup>生菌単位) 腹腔内注射後の各群の脾10mg 中の生菌数の消長



る。脾10mg 中の生菌数は図に示す如くである。

以上の結果は、さきに著者らが静脈内にH<sub>2</sub> 菌の0.01 mg を接種した、実験的モルモット結核症でえられた成績<sup>3)</sup> とほぼ一致しており、局所で相当数の菌がとらえられ分布菌の絶対数が少ないことを除外すれば、非免疫群

の臓器内結核生菌の消長に関して、腹腔内感染と静脈内感染の間に著しい差異はないように思われる。

接種局所のうちでは、腹腔滲出細胞中に10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>の密度に、淋巴腺(後腹膜・門脈)中には10~10<sup>2</sup>の密度にそれぞれとらえられているが、しかしその分布は大体一定している。なお、腹腔滲出細胞中の菌は、そのまま大して増殖することなく漸次減少し、また淋巴腺中の菌増殖の消長は、大体脾のそれと一致している。

肉眼的結核性変化は、表2にみる如くで、感染後1週目までは肉眼的に全く変化なく、2週目から内臓に著しい病変を呈し、以後8週目まで大体同程度の病変が認められる。脾重は2週よりその増大が認められ、4週以後では更に著明となつている。

2. BCG免疫群における感染菌の消長

H<sub>2</sub>腹腔内注射後24時間目の、肺、肝、脾の各臓器10mg 中の菌数は、表1にみる如く、対照群、免疫群いずれもほぼ同じ値を示し、生残BCGの菌数またはBCG免疫処置による接種局所の影響は、ほとんど認められない。このことは、注射後24時間目の腹腔内滲出細胞および後腹膜・門脈淋巴腺中の菌数が、非免疫対照群のそれとほとんど同じである点からも、充分予想せられることである。

その後の感染菌の消長は、対照群に比すればその増殖は強く抑制せられており、それは表1および図にみる如く、対照群において菌増殖の旺盛な感染後2週までが、

表1 H<sub>2</sub> 0.1mg (38×10<sup>5</sup> V.U.) 腹腔内注射後の免疫および非免疫モルモットにおける感染菌の消長

群別	培養臓器	感染後の期間								
		1時間	1日	4日	1週	2週	3週	4週	6週	8週
非免疫対照群	肺	0	18	57	25	220		87	540	155
		1	6	145	27	110		570	230	153
		83	37	11	15	180		160	0	2
	肝	1	32	31	75	780		80	170	180
		1	15	43	115	450		890	110	92
		13	32	6	22	260		480	0	166
	脾	96	13		46	260		940	410	
		2	109	160	1,900	4,600		5,800	290	280
		76	34	170	1,900	10,600		1,300	20	240
	りんば腺	32	118	35	170	3,900		880	60	250
47		38		300	4,500		600	410		
8		34	12	1,200	12,600		6,000	310	190	
腹腔滲出細胞	0	82	340	3,600	15,400		4,800	150	180	
	66	92		680	11,800		6,200	790	160	
	140	70		6,800	13,400		1,360	1,400		
	32,000	50,000	1,180	7,200	160		6	0	6	
	600	1,600	24,000	8,000	60		6	0	60	
	90,000	7,600	13,800	11,000	0		420	160	0	
	92,000				8,400		20	46	66	
BCG免疫群	肺	3	30	16	0	30		53	1,030	0
		4	6	10	9	4		29	0	0
	肝	2	49	38	4	49		39	120	18
		1	19	9	6	34		53	12	1
	脾	19	40	43	49	510		1,180	200	65
		29	69	180	290	290		860	10	9
	りんば腺	64	36	72	8	2,100		1,400	340	180
		0	86	22	160	480		520	11	25
	腹腔滲出細胞	1,180	153,000	1,600	120	0		0	1.2	20
		1,420	13,600	1,040	560	20		6	0	12

注：数値は、腹腔滲出細胞の場合は、同滲出液10cc中の生菌数、その他は臓器10mg 当りの生菌数を示す

特に著しい。

表2に示す結核性病変の肉眼的変化でも、対照群に比すればやや病変が少なく、また対照群にみられたような4週以後の脾臓の腫大は認められなかった。

表2 H<sub>2</sub> 0.1mg (38×10<sup>5</sup> V.U.) 腹腔内注射後の免疫および非免疫モルモットにおける結核病変

接種後日数	1時	1日	1	2	3	4	6	8(週)
非免疫対照群								
	0.9	0.8	0.7	2.2	/	3.0	4.2	5.5
	0.7	0.8	0.7	1.7	/	4.4	2.8	2.2
BCG免疫群								
	0.9	0.9	0.7	2.4	/	2.0	1.1	3.4
	1.1	0.8	0.7	2.9	/	2.6	1.6	
BCG免疫群								
	0.8	0.7	1.0	1.5	/	1.6	1.1	1.0
BCG免疫群								
	0.8	0.6	1.0	1.0	/	1.9	0.9	1.0

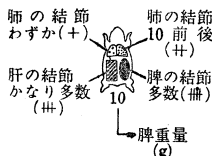


表3 H<sub>2</sub>菌 0.1mg (38×10<sup>5</sup> V.U.) 腹腔内注射後の生後10カ月免疫モルモットにおける成績 感染菌の消長

培養臓器	感染後の期間						
	1時間	1日	4日	1週	2週	3週	4週
肺	4 3	0 1	16 4	1 10	37 42		19 42
肝	8 9	1 3	17 6	46 37	17 37		25 45
脾	10 75	40 12	31 35	120 310	260 660		66 45
リンパ腺	56 0	144 4	28 36	30 74	820 1,120		640 1,160
腹腔滲出細胞	30,000 11,600	13,400	1,520 360	1,240 80	40 400	20 20	26 0

肉眼的結核性病変

接種後日数	1時	1日	1	2	3	4(週)
肉眼的結核性病変						
	0.9	1.1	1.4	1.7	/	1.7
肉眼的結核性病変						
	1.1	1.0	1.2	1.8	/	2.4

この結果は、静脈内感染法により観察した著者らの成績<sup>9)</sup>とはほぼ一致しており、腹腔内感染法によつても、抗菌免疫に及ぼす年令の影響を、明らかにしえたものと思われる。

なお、結核性病変の肉眼的所見は、生後3週の免疫モルモットのそれと大差は認められない。

IV 総括ならびに考察

3. 年令の異なるBCG免疫群における感染菌の消長  
生後10カ月の健康モルモット(体重700~850g)にBCG免疫処置を行い、6週後H<sub>2</sub>菌を腹腔内に感染し、肉眼的結核性病変の変化および感染菌の消長を、4週間に亘り観察した。BCG免疫処置法、腹腔内感染法、結核性病変および感染菌の消長等の観察方法は、すべて上述のモルモット群と同一の方法によつた。

その成績は表3に示す如くで、表1と比較すると、肺、肝における感染菌の消長は、ほぼ生後3週のBCG免疫モルモットにおけるそれと一致している。興味のあるのは脾における成績(図)で、生後3週のモルモットでは、注射後2週までは対照群に比し明らかに増殖がおさえられているが、4週でもそれが少しく増殖し、対照群とはほぼ同じ密度になるに反し、生後10カ月のモルモットでは、2週までは同じに経過するが、4週に至ると著明に減少し、前者の約1/3になることである。

結核症の消長が、感染菌の臓器内での発育、増殖をもとにしている以上、抗結核免疫の観察方法としては、一定の方法で免疫動物の臓器に結核菌を撒布し、その後の菌増殖の消長を追求し、これを対照動物のそれと比較するのが、最も定量的で、また方法論的にも優れていると思われる。しかしこの方法の絶対条件として、菌の撒布状態が両群ともほぼ同じでなければならないことは、いうまでもない。その点で、皮下感染法が静脈内感染法に比して、不適当であることについては、すでに緒言にふれた如くである。

著者らは、その他の感染法としてしばしば用いられる、腹腔内感染法によつて、かかる抗結核免疫の測定が可能であるかどうかについて検討したところ、上述の如くほぼ満足すべき成績が得られた。すなわち、表1にみる如く、各臓器とも24時間後には、免疫動物、正常動物を問わずほぼ一定数の結核菌が撒布しており、この点では静脈内感染法に匹敵する成績が認められた。さきにPierceら<sup>6)</sup>は、ハツカネズミにおける実験で腹腔内感染

の場合は臓器内菌分布が不定であるとしているが、加藤<sup>7)</sup>はこれを否定し、感染早期から各臓器に大体一定数の菌数が分布することを報告している。著者らの成績も菌の分布状態については、ほぼそれと一致した成績が認められた。

しかしながら、腹腔内感染法の欠点として、静脈内感染法に比して、遥かに多数の菌が接種局所でとらえられ、そのため各臓器に撒布する菌の絶対数が少ないことが挙げられる。すなわち、著者らの検索しえた腹腔内滲出細胞、後腹膜・門脈淋巴腺中にも、かなり多数の菌がとらえられており、静脈内感染法と同量の菌を各臓器に撒布させるには、腹腔内感染法では静脈内感染法のほぼ10~100倍の接種生菌数を接種しなければならない。しかし、この接種局所にとらえられる菌数にも、免疫群、非免疫群の間に大差は認められなかった。

その後の各臓器中での菌の増殖・死滅曲線は、いずれも静脈内感染法でえられた曲線とほぼ一致している。まず、非免疫対照群では、いずれの臓器においても、感染後2週までは極めて旺盛な発育・増殖を認めるが、やがて体内で感染菌自体による免疫が発生するとともに、菌数の下降が生じてくる。それに反し、免疫群では、対照群の最も増殖の旺盛な感染後2週までにおいて、すでに、明らかに菌の増殖が阻止されているのが観察される。それ故、この感染後2週までの菌の消長を示標とすれば、腹腔内感染法によつても静脈内感染法と同様に、抗結核免疫の測定が十分に可能なことが認められた。

次に著者らは本法を用いて抗結核免疫の年齢による影響を観察してみた。すなわち、生後3週と10カ月のモルモットにそれぞれBCGを接種し、BCG接種後6週目に人型結核菌 H<sub>2</sub>株の0.1mgを腹腔内に感染させ、肺、肝、脾各臓器中の生菌数の消長を述べた。その結果、図1にみる如く、脾10mg中の生菌数の消長は、両群で異なっており、生後10カ月のモルモットは、生後3週のモルモットよりも、より免疫力発現能力のCapacityが大きいことが認められた。この成績は、さきに報告した静脈内感染法で検索した著者らの成績<sup>9)</sup>とほぼ一致し、実験的結核症における年齢差は、いわゆる自然抵抗性の差というより、その免疫力発現能力のCapacityが、年齢によつて異なるからであるという、著者らの見解<sup>8,9)</sup>を支持する一つの知見と思われる。

## V 結 語

モルモットの腹腔内に、一定生菌数の人型結核菌 H<sub>2</sub>株を感染させ、その後の各臓器内生菌数の消長を、定量培養法により感染後8週まで追求した。

1) 各臓器とも、免疫群、非免疫対照群を問わず、接種24時間後にはそれぞれ一定数の結核菌が分布している。

2) 非免疫対照群では、感染後2週を最高峰とする定型的増殖・死滅曲線を描いている。それに反し免疫群では、非免疫群で旺盛な菌数の増加のみられる感染後2週までにおいて、すでに、増殖が著明に阻止されている。

3) 接種局所で相当数の菌がとらえられるが、免疫群、非免疫群の間に大差は認められない。

4) 以上の成績より、局所で相当数の菌がとらえられ、分布菌の絶対数が少ないことを考慮すれば、本法は充分抗結核免疫の測定に利用しうるものと思われる。

5) さらに本法によつても、抗結核免疫発現能力のCapacityが、年齢によつて異なることを観察しえた。

御指導、御校閲を賜った柳沢部長、前田博士および種々の御援助を得た仲本、松山両氏に深く感謝する。

## 文 献

- 1) Dubos, R.J.: Am. Rev. Tuberc., 60: 670~674, 1949.
- 2) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 57: 181~200, 1933.
- 3) Dubos, R.J., Pierce, C.H. & Schaffer, W.B.: J. Exp. Med., 97: 207~220, 1953.
- 4) 橋本達一郎 他: 日本細菌学雑誌, 10: 219~223, 1955.
- 5) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 10, 321~327, 1955.
- 6) Pierce, C.H., Dubos, R.J. & Schaffer, W.B.: J. Exp. Med., 97: 189~205, 1953.
- 7) 加藤充彦: 医学と生物学, 32: 314~319, 昭29.
- 8) 原沢道美 他: 結核, 31: 540~543, 1956.
- 9) 原沢道美 他: 結核, 31: 印刷中.
- 10) 原沢道美 他: 医学と生物学, 40: 231~234, 1956.