

INH 耐性 BCG に関する研究

第2報 動物体内における菌の運命

長 田 進

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和 35 年 8 月 27 日

緒 言

結核症の発病予防に、BCG 接種と抗結核剤の投与を併用する場合には、体内での BCG の増殖ないし存続が抗結核剤により阻止され、したがって免疫体の産生が阻害されることが懸念される^{1)~4)}。

われわれはこの矛盾を解決する目的で、INH 100 γ/ml 耐性 BCG を分離し、その耐性度の安定性について、試験管内実験の成績を前報告に述べた⁵⁾。

さてこの INH 耐性 BCG (以下 BCG・R・INH と略) が実用に供しうするためには、これが原株 BCG (以下単に BCG と記) と同様な免疫元性を示しうるかどうか確かめられねばならない。

そこで BCG・R・INH の免疫元性を推察するために、ハムスターおよびモルモットを用いて、生体内での菌の消長を追究したのでその成績を報告する。

実験 I ハムスター体内における菌の運命

実験材料ならびに方法

菌液: BCG, BCG・R・INH とともに 1% 小川培地 10 日培養の発育良好な菌苔を採り、手振法により 10 mg/ml および 1 mg/ml 菌液を作製した。

使用動物: 体重 100 g 前後のハムスター 20 匹を 1 群 5 匹宛の 4 群に分ち、上記菌液を次のように 1 ml 宛腹腔内に注射した。

I 群……BCG 10 mg (接種生菌数 13×10^7)

II 群……BCG・R・INH 10 mg (γ 43×10^6)

III 群……BCG 1 mg (γ 13×10^6)

IV 群……BCG・R・INH 1 mg (γ 43×10^5)

注射後 8 週目に全群を屠殺剖検して、肉眼的に病変の有無を観察するとともに、脾は全体につき、肝は一部について定量培養を行い、これらの臓器内生菌単位数を調べた。

臓器の定量培養には、ガラスホモジナイザーで臓器を磨碎後 1% NaOH 水を加えて乳剤とし、これに滅菌純水を加えて 10 倍段階希釈を行い、適当と思われる濃度段階の 0.1 ml 宛を、1 臓器 2 本の 1% 小川培地に接種培養した。培養 4 週後の集落数の平均から、臓

器 10 mg 宛の生菌単位数を算出した。

実験成績

実験期間を通じて 10~20 g の体重の増減がみられたが、とくに病的と考えられるものではない。

剖検所見では、接種局所、淋巴腺および臓器ともいづれも肉眼的に病的所見を全く認めなかつた。ただ I 群の脾および II 群の No 4 の脾が他に比べやや肥大していたが、いずれも肉眼的に病変は認められなかつた。

培養成績

脾、肝の定量培養の成績を表 1 に示した。表中の数字は臓器 10 mg 中の生菌数である。

表に示すように、I 群中の No 3 および No 5 の脾および肝の生菌数が他に比べ著しく少数であるが、その他の各群ではいずれも同程度であつた。

表 1 ハムスターの臓器 10 mg 宛中の生菌単位数 (培養 4 週判定)

実験群	I 群 BCG 10 mg 接種			III 群 BCG 1 mg 接種		
接種菌数	13×10^7			13×10^6		
動物No	臓器 脾重量 (mg)	臓器内生菌数		脾重量 (mg)	臓器内生菌数	
		脾	肝		脾	肝
1	240	>30,000	480	180	>3,000	46
2	250	>30,000	1,310	170	>3,000	30
3	230	360	20	150	>3,000	202
4	260	>30,000	1,050	140	>3,000	135
5	260	750	10	160	>3,000	24
実験群	II 群 BCG・R・ INH 10 mg 接種			IV 群 BCG・R・ INH 1 mg 接種		
接種菌数	43×10^6			43×10^5		
動物No	臓器 脾重量 (mg)	臓器内生菌数		脾重量 (mg)	臓器内生菌数	
		脾	肝		脾	肝
1	130	320	58	180	82	21
2	170	290	11	180	45	8
3	110	400	59	130	27	6
4	540	1,450	45	140	79	22
5	100	520	58	130	25	0

接種菌数についてみると、BCG・R・INH 1 mg 中の生菌数は、BCG のそれの約 1/5 であるから、等量の菌液を接種した I, II 群間、および III, IV 群間の比較では、BCG 群の臓器内生菌数が BCG・R・INH 群のそれより多いことは当然であろうが、表のように、両群間の臓器内生菌数の差はかなり著明であつた。すなわち脾については、BCG 群では I 群では 0.1mg の、また II 群では 1 mg の稀釈段階の培養でさえ、培地上の集落数はそれぞれ 300 をこえ、正確な集落数の計測は不能であつた。これに対し BCG・R・INH 群では、II 群で 1 mg の、IV 群では 10 mg の稀釈段階の培養で十分集落数を計測しえた。

肝については I 群のみが 1 mg の稀釈段階で、その他の群はいずれも 10 mg の稀釈段階の培養で集落数を計測しえた。以上より両群の臓器内生菌数は、脾ではほぼ 100 倍の、肝ではかなりの程度の相違があると考えられる。また II, III 群について比較すると、この場合は BCG・R・INH の接種菌数が BCG のそれよりやや多いが、分離菌数では脾では明らかに BCG 群が BCG・R・INH 群を上まわっている。

小括

以上の成績からみると、BCG・R・INH はハムスター体内でかなり長期間生存しているが、残存菌数は BCG に比べはるかに少ないことが判る。また肉眼的には、接種局所、リンパ腺、臓器のいずれにも病的所見は認められず、BCG・R・INH はハムスターに対してきわめて弱毒であろうと考えられる。

実験 II モルモットに静脈内接種された場合の菌の運命

実験材料ならびに方法

菌液：BCG, BCG・R・INH のそれぞれ 0.1mg/ml, 0.01 mg/ml 菌液を、実験 I に準じて作つた。

使用動物：100 倍旧ツ液による皮内反応が陰性で、体重 350~400 g の白色モルモット 68 匹を、I 群 17 匹宛の 4 群に分ち、次のように菌液を後肢静脈内に注射した。

- I 群…BCG 0.1 mg (接種菌数 2.3×10^5)
- II 群…BCG・R・INH 0.1 mg (" 5.8×10^4)
- III 群…BCG 0.01mg (" 2.3×10^4)
- IV 群…BCG・R・INH 0.01mg (" 5.8×10^3)

以後 24 時間、1, 2, 4, 6, 8 週目に各群 at random に 2~4 匹宛屠殺剖検し、肉眼的病変の有無を観察するとともに、脾、肺の一部について定量培養を行つた。培養方法および成績判定は実験 I と同じである。

なお 4 週目の剖検のさい、II, IV 群の脾について、直接法により分離菌の耐性検査を行つた。またツ・アレルギーを、4, 6, 8 週目に、100 倍旧ツ液をもつて調べた。

実験成績

i) 生体内における菌数の消長

臓器内生菌数の消長を図 1 に示した。図中(a)は脾の、(b)は肺における成績である。また動物個々の成績は表 2 に示した。表中の数字は各臓器 10 mg 中の生菌数である。

図 1 静脈内接種後の両菌株の消長

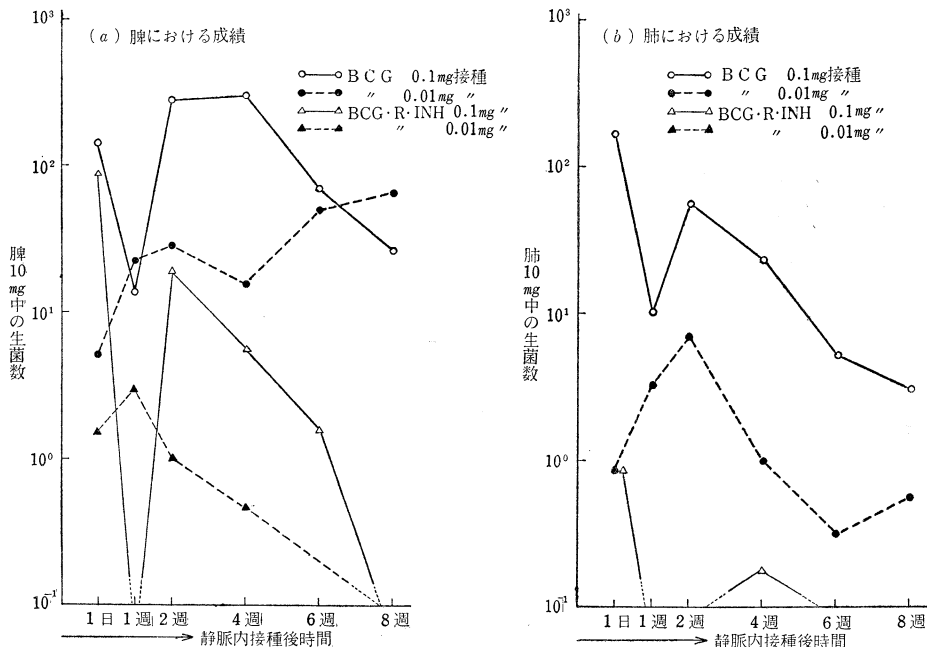


表2 静脈内接種モルモット臓器 10 mg 中の生菌単位数 (4週判定)

実験群	臓器		脾						肺					
	接種後 期間	接種菌数	24hr	1W	2W	4W	6W	8W	24hr	1W	2W	4W	6W	8W
I BCG 0.1mg	2.5 × 10 ⁸	255	30	300	180	185	39	182	18	50	20	4	1	
		63	10	3.0	370	35	27	187	1	50	27	9	2	
			6.5	230	330	6	15		10	72	24	2	7	
		159	16	280	290	76	27	185	10	57	24	5	3.3	
II INH・R・ BCG 0.1mg	5.8 × 10 ⁴	158	0	15	9	4	0	1	0	0	0.5	0	0	
		38	0	14	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
			0	27	3	1	0	0	0	0	0	0	0	
		98	0	19	6	1.7	0	0.5	0	0	0.2	0	0	
III BCG 0.01mg	2.5 × 10 ⁴	11	5	18	21	32	118	0.5	0	8	1	0.5	1	
		0	13	28	7	43	20	0.5	3	4	2	0	0	
			51	34	19	76	68	108	4	12	0	0.5	0	
		5.5	23	27	16	50	78	0.5	3.3	8	1	0.3	0.4	
IV INH・R・ BCG 0.01mg	5.8 × 10 ⁸	1	2	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2.5	7	1.0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	
			0	1.5	1.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0	
		1.7	3	1.0	0.7	0.2	0	0	0	0	0	0		

脾についてみると、BCG 群では I 群では 1 週目に一時菌数は減少するが、2, 4 週と接種直後の菌数とほぼ同程度を示し、6 週より減少の傾向がみられる。III 群では 1 週後より菌数は増大し、6 週以降になつても減少するにいたらなかつた。なお I 群の 24 時間、6 週目、および III 群の 8 週目の分離生菌数にばらつきがみられるが、これは動物の個体差、あるいは臓器内の菌の分布差等の実験誤差によるものであらうと思われる。

これに対し、BCG・R・INH 群では、24 時間後の定着菌数では BCG 群と著しい差はみられないが、菌数の消長は明らかに異なり、II 群では 2 週後に、IV 群では 1 週後にわずかながら菌数の増加がみられた程度で、BCG に比べ明らかに早期かつ著明に菌数を減じ、8 週後には全く菌を分離しえなかつた。

肺についての菌数の消長は、ほぼ脾と同様な傾向を示した。また分離菌数について動物の個体差と思われる相違はみられなかつた。すなわち図 1 (b) のように、BCG は感染後 2 週目に最大値を示し、以後徐々に減少した。これに対し、BCG・R・INH は、24 時間後を除いては、II 群で 4 週目に 1/2 コロニーを分離したにとどまり、他は全く菌を分離しえなかつた。

ii) 分離菌の耐性度

分離された菌数は少数であるが、表 3 のように INH 100 γ/ml 含有培地上に対照培地上とほぼ同数の発育を

示し、本菌株が動物体通過によつても耐性度に影響をうけない安定した菌株であることを示している。

表3 脾より分離した菌の耐性検査成績

動物 No	培地内 INH 含有量		
	0 γ/ml	10 γ/ml	100 γ/ml
81	8.6	10.3	7.1
82	7.0	8.3	2.1
83	3.0	4.0	6.6
99	0	1.0	0
100	2.6	1.3	2.1
101	4.0	1.6	4.3

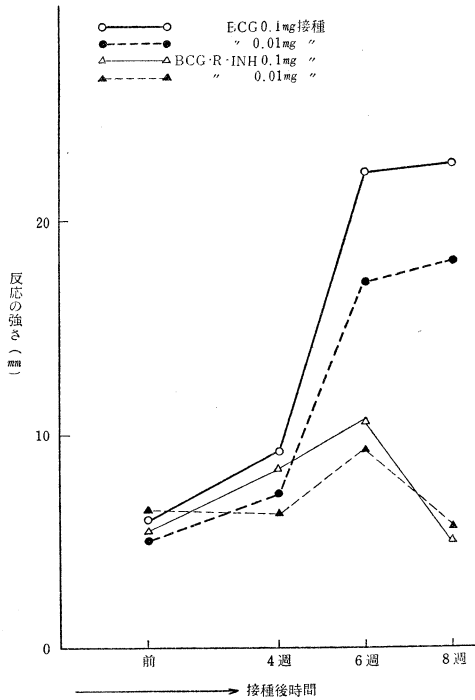
iii) ツ・アレルギーの消長

図 2 のようにツ・アレルギーの出現は、各群ともに 6 週目に発現した。すなわち BCG 群ではいずれも 4 週目の反応は 10 mm 以下であるが、6 週目に I 群は 23 mm に、III 群は 17 mm に飛躍的に増大し、8 週にいたつても強度の反応は持続している。これに対し BCG・R・INH 群では、BCG 群に比べ反応は著しく弱く、II 群は 6 週目に 10 mm をやや上まわつた程度で、8 週目に再び陰転し、また IV 群では一層弱い反応であつた。

小括

モルモット静脈内に 2 種の BCG を接種し、臓器

図2 静脈内接種モルモットのツ・アレルギー



内菌数の消長を観察するとともに、分離菌の耐性を調べ、さらにツ・アレルギーを比較したところ、BCG・R・INH 群では BCG 群同様、全期間を通じて肉眼的病変は全く認められなかつたが、動物体内における消長をみると、BCG よりもはるかに速く減少する。このことが BCG・R・INH 群におけるツ・アレルギーが BCG 群に比べ著明に弱いことの原因をなすものであろう。なお分離時の耐性は動物体通過後も変わらずに保持されていることが判つた。

総括ならびに考察

安東⁶⁾はその著書の中で、“免疫は感染現象を無視して考えられず、免疫とは、換言すれば、微生物またはその成分と宿主の間の反応、およびその結果生ずる抵抗性の増強である。”と要約している。

結核症の免疫成立の機序においても、同様に宿主側および菌側の条件が種々挙げられるが、Bloch⁷⁾は宿主側の条件として、“侵入した菌を生体から eradicate する力よりも、むしろ一定の条件下に菌と共存することが重要である。”と述べ、菌側の条件として、金井⁸⁾は、“必要な抗原性の保持という質的な条件と、その抗原の適量存在が必要である、という量的な条件の2つが満足される必要がある。”といっている。

そこで実験動物をある動物に限定して、宿主側の条件を一応同等なもののみとし、菌側の条件についてのみ考えると、生体内での菌の増殖力、換言すれば菌力の強弱

が免疫元性にもつとも影響を与える因子となると考えられる。

そこでわれわれは、BCG・R・INH の免疫元性を検討するために、以上の実験を行い、その菌力を BCG と比較した。

すなわち、実験 I では、ハムスターの腹腔内に BCG・R・INH および BCG を注射して、8 週間における臓器内菌数を比較した。結核菌に対するハムスターの免疫体産生能がはなはだ弱く、BCG のような弱毒菌でもハムスター体内で一定期間生存、増殖しうることについてはすでに多くの報告^{9)~12)}がある。われわれの実験においても BCG は、とくに脾においてかなり多数に証明された。これに対し、BCG・R・INH の臓器内生菌数は、明らかに劣ることが示された。すなわち BCG・R・INH の接種菌量が BCG のそれのほぼ 3 倍量であるにもかかわらず、臓器よりの分離菌数は脾ではかなり下まわる成績であつた。もとよりこれは菌接種後 8 週目という、一断面についてのいわば静的な観察であり、これのみで BCG・R・INH の菌力の強弱は決定しえず、生体内での菌の消長を辿るための、いわゆる動的な観察が必要となる。

そこでモルモットを使って実験 II を行つた。BCG を家兎またはモルモットに静脈内接種を行つた場合の臓器内の菌数の消長は、Lurie¹³⁾、橋本¹⁴⁾、金井¹⁵⁾らによつて明らかなように、一定期間弱いながらある程度の分裂増殖を示し、ついで急速に減少消滅することが報告されている。本実験においても、BCG はほぼ同様の消長を示し、2, 4 週まではほぼ同一水準を維持し、以後減少するが、BCG・R・INH は接種菌数を上まわつて増えず、しかも BCG よりもはるかに早く臓器から消失する傾向を示した。このような菌数の消長に示された相違は、モルモットのツ・アレルギーにもある程度反映されている。

一般に静脈内接種による場合、ツ・アレルギーの出現が、皮下または筋肉内接種等の場合に比べ、やや遅れる傾向があるといわれるが¹⁶⁾、この実験においても、ツ・アレルギーは 4 週目では全群 10 mm 以下で、6 週目にいたつて BCG 群では I 群 22 mm、III 群 17 mm 程度の強い反応を示し毎常経験している皮下接種の場合に比べ、はるかに陽転が遅い。ところが BCG・R・INH 群では II 群のみが 6 週目にわずかに 10 mm をこえ、8 週目には 10 mm 以下であつた。この場合接種菌数からみれば、II 群では 5.8×10^4 、III 群では 2.5×10^4 であるから、ツ・アレルギーの両群間の著しい差は両菌株の菌力の差によるものとは考えられない。この点に関して金井¹⁷⁾は、“結核菌の菌力と免疫に関する実験で、免疫は淋巴結節で著しく形成される。”と述べており、BCG・R・INH のように、臓器内菌数の消長

からみて菌力が弱いと思われる菌株では、静脈内に接種された菌が、淋巴結節内で十分増殖せず、抗体を産生するにいたらずに死滅、排泄されることが推察される。したがって BCG・R・INH の免疫賦与力、あるいはこれによるツ・アレルギーに関しては、皮下接種の方法によつて確認する必要がある。

なお実験Ⅱの動物の脾からの分離菌について、4週目に直接法によつて耐性検査を行つたが、その耐性度はきわめて安定していた。すなわち前報告では主に試験管内実験による本菌株の耐性度の安定性を述べたが、*in vivo* においてもその耐性度が安定していることが証明された。

なお、実験Ⅰ、Ⅱを通じ、剖検時に全動物に肉眼的に病変が認められず、一応本菌株の毒力はきわめて弱いと考えられる。

結 論

INH 100 γ/ml 耐性 BCG の免疫元性を察知する一方法として、ハムスターおよびモルモットを用いて臓器内における菌数の消長を調べ、次の結果をえた。

1) INH 100 γ/ml 耐性 BCG は、ハムスターに接種後 8 週目でも、なお体内に生残しているが、臓器よりの分離菌数は BCG に比べはるかに少数である。

2) モルモット静脈内接種後の臓器内菌数の消長からみると、INH 100 γ/ml 耐性 BCG は原株 BCG に比べて著しく速やかに消失する。

3) 静脈内接種後のツ・アレルギーは臓器内菌数の消長とある程度平行し、INH 100 γ/ml 耐性 BCG 群ではツ・アレルギーは一過性で、原株 BCG に比べ著しく弱かつた。

4) 臓器内から分離した菌の耐性度は安定しており、動物体を通過しても変わらないことが判つた。

摺筆に臨み御校閲および御指導を戴いた柳沢部長、室橋主任に深謝します。また終始御協力を戴いた橋本博士に感謝します。

参 考 文 献

- 1) Robinson, A., Meyer, M. & Middlebrook, G. : New Eng. J. Med., 252 : 983, 1955.
- 2) 江頭靖之 : 病理学会雑誌, 42 : 290, 昭28.
- 3) 小池英也 : 結核, 33 : 306, 昭33.
- 4) 川俣順一 : 日本臨床, 14 : 659, 昭31.
- 5) 長田進 : 結核, 33 : 699, 昭33.
- 6) 安東洪次 : 感染と免疫, 丸善, 昭22.
- 7) Bloch, H. & Segal, W. : Am. Rev. Tbc., 71 : 228, 1955.
- 8) 金井興美 : 細菌学雑誌, 10 : 427, 1955.
- 9) 室橋豊穂 : 結核, 29 : 239, 昭29.
- 10) 和田明二 : 細菌学雑誌, 8 : 225, 1953.
- 11) 今村荒男・河盛勇三 : 文部省結核研究員報告, 135, 昭27.
- 12) 草光宜平 : 結核研究の進歩, -12, 201, 1955.
- 13) Lurie, M.B. : J. Exp. Med., 60 : 163, 1934.
- 14) 橋本達一郎・山口登 : 医学と生物学, 31 : 239, 昭29.
- 15) 金井興美 : 細菌学雑誌, 10 : 321, 昭30.
- 16) 有馬純・山本健一 : 医学と生物学, 43 : 23, 昭32.
- 17) 金井興美 : 細菌学雑誌, 10 : 499, 昭30.