

## INH 耐性 BCG に関する研究

## 第 3 報 感染防禦力について

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 9 月 25 日

## 緒 言

著者の分離した INH 100  $\mu$ /ml 耐性 BCG (以下 BCG・R・INH と略) の in vitro, in vivo における性質についてはすでに報告した<sup>1) 2)</sup>。とくに前報告では、静脈内接種法によつて動物体内における菌の消長を追究した結果、本菌株の免疫元性は親株の感性 BCG (以下 BCG と略) に比べかなり劣ることが予想された。しかし結核症の免疫体は主に淋巴結節で産生されと考えられている点からすれば、免疫元性の検討は当然皮下接種法によつて確認する必要がある。そこで本実験では皮下接種によつて免疫したのち皮下に有毒菌を注射して攻撃を行い、免疫元性をしらべたのでその成績を報告する。

## 実験材料ならびに方法

菌液: BCG・R・INH は小川培地 10 日培養の発育のよい菌苔より手振法で 5 mg/ml, 0.5 mg/ml 菌液を作った。1 mg 中の生菌数;  $43 \times 10^5$ 。

BCG は凍結乾燥保存中のもの (BCG 会社製 Lot No. 5036 A) を滅菌生食水で、0.5 mg/ml, 0.05 mg/ml 菌液とした。1 mg 中の生菌数;  $60.6 \times 10^6$ 。

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 前後の白色モルモット 30 匹を 1 群 6 匹宛 5 群に分ち、左下腹部皮下に次のように菌液を接種した。

|       | 菌 株       | 接種菌量    | 接種生菌数              |
|-------|-----------|---------|--------------------|
| I 群   | BCG       | 0.5 mg  | $30.3 \times 10^6$ |
| II "  | "         | 0.05 mg | $30.3 \times 10^5$ |
| III " | BCG・R・INH | 5 mg    | $21.5 \times 10^6$ |
| IV "  | "         | 0.5 mg  | $21.5 \times 10^5$ |
| V "   | 対照        | —       | —                  |

菌液接種後 6 週目に有毒人型結核菌 H<sub>2</sub> 株 0.1 mg を右下腹部皮下に注射した。感染菌量;  $9.6 \times 10^5$ 。

有毒菌感染後 6 週目に屠殺剖検して肉眼的病変の有無を観察し、脾、肺の一部について定量培養を行った。培養方法および成績判定は前報告と同じである。

## 実験成績

## i) 肉眼的剖検所見

淋巴腺の病変は BCG 群 < BCG・R・INH 群 < 対照群の順に若干の進展がみられたが、特記すべき著明な変化はみられないので、ここには臓器の変化のみを図 1 に表わした。なお、各動物の下段の数字は脾の重量 (g) である。図 1 で明らかなように、BCG 群では個々動物の病変はほぼ一様で、しかも病変はきわめて軽く、脾では 0~2 コ、多くて 6~7 コの結節がみられたのみで、肺、肝では I 群の No. 6 の肺に 2 コの結節を認めたほかは、全動物に病変を認めなかつた。また I・II 群間に病変の相違はみられず、この程度の接種菌数の差はこの場合影響を与えぬようであつた。

以上の成績に対し BCG・R・INH 群では、病変のきわめて軽いものと重症なものゝ混在しており、ワクチンによる感染防禦が一様でなかつたことを示している。すなわち III 群では、No. 1~3 の病変はきわめて軽く、免疫効果はみられるが、他の 3 匹の脾にはかなりの結節があり、とくに No. 6 の病変は対照群と大差がなかつた。また IV 群ではいずれも対照群同様のひどい病変であつた。

## ii) 定量培養成績

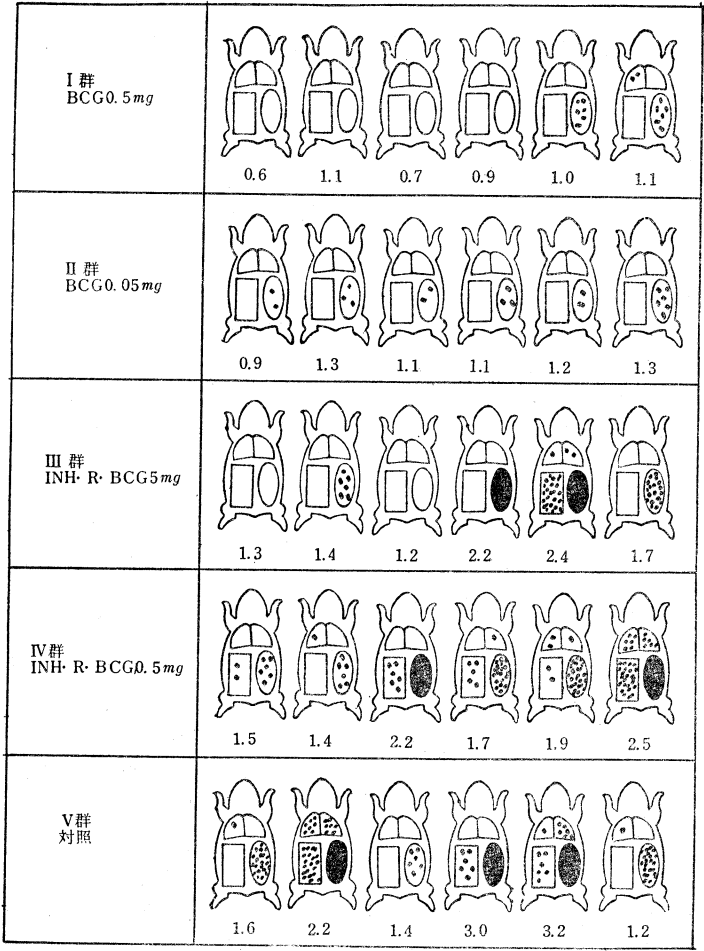
表 1 に脾、肺の定量培養成績を示した。表中の数字は臓器 10 mg 中の生菌単位数である。臓器中の生菌単位数は肉眼的剖検所見とほぼ平行した値を示した。

これを各群別にみると、BCG 群では I, II 群間には分離菌数に大差がなく、脾からは 0~ $3 \times 10^2$  の間に、肺よりはきわめて少数の菌が分離されたにすぎない。BCG・R・INH 群では、脾についてみると、III 群の 6 匹中 3 匹からは 0~ $2 \times 10^2$  コの少数の菌を分離したが、他はいずれも  $10^3$  台と多数を分離しており対照群と大差ない成績で、また IV 群も対照同様の成績であつた。肺についても脾同様の傾向がみられ、III 群の過半数からの分離菌数は少数であるが、その他は対照群と同程度の結果を得た。

## iii) ツ・アレルギー

成績は図 2 に示した。ツ・アレルギーは IV 群を除いて

図 1 肉眼的剖検所見

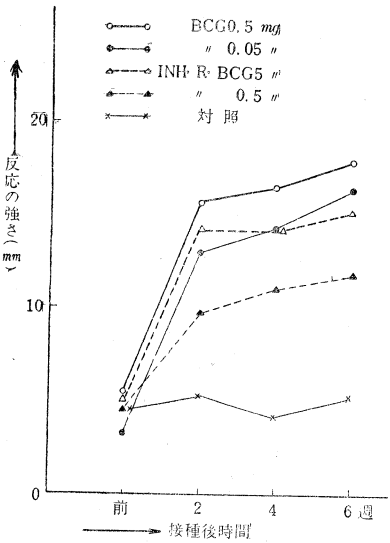


下段の数字は脾の重量である

表 1 臓器 10[mg]中の生菌単位数

| 臓器 | 実験群<br>接種動物<br>菌数<br>No. | BCG接種                    |                          | I N H・R・<br>B C G接種    |                        | 対<br>照 |
|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------|
|    |                          | 30.3<br>×10 <sup>6</sup> | 30.3<br>×10 <sup>5</sup> | 21×<br>10 <sup>6</sup> | 21×<br>10 <sup>5</sup> |        |
|    |                          |                          |                          |                        |                        |        |
| 脾  | 1                        | 0                        | 0                        | 410                    | 780                    | 1,950  |
|    | 2                        | 0                        | 16                       | 1                      | 290                    | 1,400  |
|    | 3                        | 3                        | 33                       | 1,010                  | 1,240                  | 2,700  |
|    | 4                        | 300                      | 58                       | 1,350                  | 530                    | 510    |
|    | 5                        | 167                      | 37                       | 3,200                  | 2,400                  | 550    |
|    | 6                        | 254                      | 152                      | 12                     | 770                    | 2,200  |
| 肺  | 1                        | 0                        | 0                        | 0                      | 0.3                    | 29     |
|    | 2                        | 0                        | 0                        | 0                      | 1.3                    | 31     |
|    | 3                        | 0                        | 0                        | 1                      | 26                     | 86     |
|    | 4                        | 0                        | 5                        | 2                      | 1                      | 0.5    |
|    | 5                        | 0                        | 0                        | 22                     | 47                     | 33     |
|    | 6                        | 0.6                      | 0                        | 0                      | 7                      | 208    |

図 2 ツ・アレルギーの消長



はいずれも2週目に15 mm 前後に強く陽転し、反応はその後の検査でもほぼ同一の強度を維持ないしはやや増強する傾向がみられた。この場合Ⅰ～Ⅲ群間の反応の強さに大差はみられなかったが、Ⅳ群のみ陽転の時期は4週目で、反応もかなり弱い成績である。しかしこの群でも反応は週を追って増強する傾向がみられた。

## 総 括

以上の成績を総括すると、まずツ・アレルギーの消長では、BCG・R・INH 接種群の反応は前報告の静脈内接種時における反応とかなり違った成績を得た。すなわち、陽転の時期は、静脈内接種群の6週に対し皮下接種群では2週でかなり早い。また反応の強さは、前者では陽転時に10 mm をやや上回る程度の弱い反応で、しかも2週後に陰転する、いわば一過性の反応であったのに対し、後者では、接種菌数の多い群では14 mm の反応で、この強度はその後も維持され、接種菌数の少ない群でも反応は週を追って増強する傾向を示した。

以上菌の接種方法の相違によつて起つたツ・アレルギーの相違は、BCG 群においてはみられなかった現象で、このことはBCG・R・INH の菌力の弱さに起因するものと思われる。すなわち静脈内接種の場合は、体内での菌の死滅、排泄が速やかなため、十分な抗体産生の時間がなかったためと考えられ、皮下接種の場合は、接種された菌が所属淋巴腺にとり入れられ、ここでもかなりの抗体の産生が行われたと考えられる。したがって本菌株のように菌力の弱い菌株の免疫元性は、皮下接種法によつてはじめて正確に把握されるものと考えられる。

ただこの場合、BCG・R・INH による抗体の産生がBCG のそれに及ばないことは、肉眼的剖検所見、臓器定量培養成績が表わす感染防禦力の差として示される。すなわち、BCG 接種群では病変の進展阻止が著明で、とくにその防禦力が各動物にはほぼ一様で、この程度の接種菌数の違いは防禦力に影響を与えず、Ⅰ・Ⅱ群ともほぼ同様な成績を示した。これは従来のBCG の防禦力の critical dosis が $10^{-2}$  程度という成績<sup>4)</sup>からすれば当然の結果で、BCG の十分な抗体産生、それに基く高度の感染防禦力を示すものといえよう。

他方BCG・R・INH 接種群では、Ⅲ群では病変の進展阻止がBCG 同様に著明であるものと、対照群と大差ないものが相半ばしており、その防禦力は非常に不安定であつた。またⅣ群の成績からはワクチンとしてのBCG・R・INH の効果はほとんどみられなかった。

接種菌数では、Ⅰ・Ⅲ群、Ⅱ・Ⅳ群ではほぼ同数で、したがって上述の感染防禦力の差は両菌株間の生体内に

おける増殖力の差異としか考えられない。また、接種菌数の多寡によつて生じたⅢ・Ⅳ群間の成績の相違はBCG 群ではみられなかった現象で、このことからBCG・R・INH の菌力の弱さがうかがわれる。

なお、ワクチンの免疫効果判定にさいしては、攻撃菌の菌力がその成績を左右することは橋本ら<sup>5)</sup>の指摘するところで、今回の実験ではこの点に注意して、免疫および攻撃の方法ならびに接種菌数等は生物学的製剤基準<sup>6)</sup>に基いて行い、攻撃は人型有毒結核菌H<sub>2</sub>株の凍結乾燥菌によつた。この凍結乾燥菌は国家検定用のものであり、その菌力の強さおよび安定性については既知のものである。

したがって本実験の攻撃試験はかなり強力なもので、この攻撃に対応する両菌株の防禦力の相違は、われわれが日常使用するBCG とBCG・R・INH との免疫力の差であるといえる。

## 考 案

INH 耐性BCG の免疫元性については、Canetti<sup>7)</sup>、Schaefer<sup>8)</sup>、中山<sup>9)</sup>、小林<sup>10)</sup>らの報告があるが、いずれも「原株同様の免疫元性を有する」と述べている。

しかしINH 耐性BCG を従来のBCG に代る免疫元として使用しようとする立場からすると、獲得した耐性菌について細心の検討が各方面から加えられねばならない。この点以上の諸氏の報告に多少不十分と考えられる点がみられるので、それらについて2, 3考案を加えてみよう。

INH 耐性菌を用いる実験において、耐性菌の純粋性、耐性度の安定性はもつとも重要な点であることはMeiβner<sup>11)</sup>、Szybalski<sup>12)</sup>らの強調するところであるが、この点4氏ともstep-by-step 法3~20代によつて耐性菌を獲ているにもかかわらず、以上の点についてはほとんどふれていない。

また耐性BCG の性質については、in vitro の成績については中山、小林が述べているのみで、in vivo の性質については全くふれていない。しかも両氏の報告からin vitro での耐性菌の vitality が親株より弱いことがうかがわれ、このことからin vivo での菌力の弱いが予想される。

事実、小林のマウスを用いた静脈内接種による実験では、耐性BCG の免疫力は5週までは親株のそれに匹敵するが10週の成績は劣ると述べている。動物は異なるが、著者の行つたモルモット体内でのBCG・R・INH の消長<sup>2)</sup>からすると、この点ある程度の解明がつくと思われる。またモルモットを用いたSchaefer、中山の実験では、耐性菌によるツ・アレルギーは親株より弱い反応を示している。以上の点からみると、諸氏の報告による耐性株のin vivo での菌力はいかなる程度で

あるか、問題の存するところである。

ワクチンの免疫元性の検査においては、攻撃菌の菌力および感染菌数の多寡がその成績を左右する要素であることはすでに述べた。この点 Canetti は INH 耐性 BCG 1 mg で免疫を行い、攻撃には  $H_{37}Rv$  1/500 mg (v.u.  $52 \times 10^3$ ) という少量を用いている。もとより INH 耐性 BCG は多少の免疫元性を有する訳であるから、親株同様の防禦力を示したとする彼の報告は当然であるといえよう。

また Schaefer を除いてはいずれも  $H_{37}Rv$  株を攻撃菌として用いている。この菌株は菌力の一応安定した有毒菌として広く使用されているが、なおその菌力にかなりの動揺があることは Steenken<sup>13)~15)</sup>、橋本<sup>5)</sup>らの指摘するところである。したがってとくに INH 耐性 BCG を実用に供しようとする立場からすると、感染時の攻撃菌の菌力がどの程度の強さであつたかは十分に検討を要する点であろう。

一般に INH 耐性菌の菌力は低下するといわれるが、親株同様の菌力を有する菌についての報告もあり<sup>16)</sup> 17), BCG においても当然この可能性は起りうると考えられる。しかし上述の諸報告がはたしてこうした菌株によるかどうかは詳細な記述のない現在不明である。いづれにしても免疫法および攻撃法についての細心の検討が加えられてはじめて INH 耐性 BCG の免疫力に言及しうるのではあるまいか。

## 結 論

前報告に引き続き INH 100  $\gamma/ml$  耐性 BCG の免疫元性について、モルモットを用い、皮下接種法により検討を加えた。

その結果、INH 100  $\gamma/ml$  耐性 BCG の免疫元性は、親株の感性 BCG に比べかなり劣る成績を得た。

またツベルクリン反応は、静脈内接種時の反応とはかなり異なり、陽転は早くみられ、反応も強くかつ長く持

続した。

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導、御校閲を戴いた柳沢部長、室橋主任に深く感謝します。また終始御協力戴いた橋本博士に感謝します。

## 参 考 文 献

- 1) 長田進：結核，33：699，昭33.
- 2) 長田進：結核，33：770，昭33.
- 3) 金井興美：細菌学雑誌，10：499，昭30.
- 4) Research Committee of Tuberculosis Japan : Recent Investigations on BCG Vaccine, 69, 1954.
- 5) 橋本達一郎・吉田幸之助：結核，29：221，昭29.
- 6) 生物学的製剤基準，厚生省，59，昭32.
- 7) Canetti G. & Brettey J. : Annals de l'Institute Pasteur, 92 : 441, 1957.
- 8) Schaefer W.B., Cohn L. M. & Middlebrook G. : Am. Rev. Tbc., 75 : 656, 1956.
- 9) 中山秀三：熊本医学誌，31(補3)：415，昭32.
- 10) 小林千鶴：東京女子医大誌，26：532，1956.
- 11) Meißner G. : Fortschritt der Tuberculose vorschung, 7 : 64, 1956.
- 12) Szybalski W., Bryson V. : Am. Rev. Tub., 65 : 768, 1952.
- 13) Steenken W. Jr. & Gardner, L.U. : Am. Rev. Tub., 54 : 62, 1946.
- 14) Steenken W. Jr. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 33 : 253, 1935.
- 15) Steenken W. Jr. : Am. Rev. Tub., 38 : 770, 1938.
- 16) 柴田一郎：結核研究の進歩，-22，69，昭33.
- 17) 三木勝治・加藤允彦・松永清輝：結核，33：568，昭33.