

## 吸入感染法によるモルモットに対するBCG 免疫度の測定法に関する実験的研究

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

下 出 久 雄

国立療養所東京病院 (院長 砂原茂一)

受付 昭和 42 年 8 月 11 日

### EXPERIMENTAL STUDY ON MEASURING THE DEGREE OF BCG-IMMUNITY IN GUINEA PIGS BY AIRBORNE INFECTION\*

Mareichi TOYOHARA and Hisao SHIMOIDE

(Received for publication August 11, 1967)

The significance of airborne infection method in measuring the degree of BCG immunity for experimental tuberculosis of guinea pigs was studied. This method was compared with the subcutaneous infection method under the same condition.

1. As shown in Fig. 1. guinea pigs were divided into eight groups, each consisting of four to six white male guinea pigs weighing 400~500 g.

One milliliter of the bacillary suspension prepared from dried BCG was inoculated subcutaneously into right abdomen in three degrees of concentration, such as, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml and 0.01 mg/ml. The number of viable unit of the employed BCG was  $2 \times 10^7$ /mg.

As tubercle bacilli for challenge ten days' culture of Kurono strain in Dubos media was employed. The guinea pigs inhaled for thirty minutes the bacillary suspension previously adjusted to 0.2 mg/ml concentration by photospectrometer (Hitachi EPO).

The number of bacilli fixed in the whole lung was 240 in average for each guinea pig. For the subcutaneous infection, 0.2 mg of the same bacillary suspension as in the airborne infection was inoculated into left abdomen. The number of bacilli inoculated was  $8.5 \times 10^8$  per animal.

#### 2. Experimental result

##### 2-1. Change of tuberculin allergy

As seen in Figs 2 and 3, tuberculin reaction of the fourth and eighth groups which were inoculated with 0.01 mg of BCG was weaker than that of the other groups, but after challenge with the virulent tubercle bacilli the intensity of tuberculin reaction became almost the same in each group.

##### 2-2. Macroscopic findings

Degree of macroscopic tuberculous findings of the internal organ was classified into ten grades. Sign of 1+ means tubercles less than twenty, size of the tubercles being also considered for evaluation.

\* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

Signs of the lymphnode involvement were defined as follows; 1<sup>+</sup> was swelling less than 1 cm in diameter, 2<sup>+</sup> that of 1~2 cm, 3<sup>+</sup> that of 2~3 cm, and 4<sup>+</sup> was the swelling more than 3 cm in diameter.

Fig. 4 and 5 show the histogram of macroscopic findings. BCG revealed a remarkable protective effect for both airborne and subcutaneous challenge infections.

While by the subcutaneous challenge infection, the difference in the degree of immunity by the inoculated dose of BCG could not be revealed, in the airborne infection, macroscopic tuberculous changes were observed to decrease by the increase of immunizing dose of BCG.

### 2-3. Result of cultivation of organs

As shown in Table 3, both in airborne and subcutaneous infections, multiplication of bacilli for challenge was remarkably checked by BCG vaccination.

In the case of airborne infection, the difference in number of bacilli in the spleen between the group vaccinated with 1 mg and that with 0.1 mg was significant at 5% level, but among other groups no significant difference was found. Whereas in the subcutaneous infection no significant difference in the number of bacilli in the spleen was found among all the groups tested.

### 2-4. Pathohistological findings

The histological examination was carried out on the lungs of the groups of the airborne infection. The progressive lesions were found in every group, but the lesions of the vaccinated groups were not so severe as those of the non-vaccinated group.

The number of tubercle bacilli in the tissue in vaccinated groups was significantly less than that of non-vaccinated group.

### 3. Conclusion

The significance of the airborne infection as the infection method was studied in order to see the degree of immunity by BCG using guinea pigs. The result of the subcutaneous infection was compared with that of the airborne infection.

By the airborne infection the pathological changes were the severest in the lungs, and in the case of non-vaccinated groups the pathological changes were very severe not only in the lungs but also in the spleen and the liver. In vaccinated groups even by vaccination with 0.01 mg of BCG the involvement of the spleen and the liver was slight. By increasing the dose of BCG, the macroscopic tuberculous findings, especially those of the spleen and the liver, were decreased. There was a significant difference both in  $\sqrt{\text{spleen index}}$  between the groups inoculated with 0.1 mg and 0.01 mg of BCG, and in the result of cultivation of spleen between the groups inoculated with 1 mg and 0.1 mg of BCG.

Although in the subcutaneous infection a significant difference was proved between vaccinated groups and non-vaccinated ones, among the vaccinated groups the degree of immunity could not be differentiated.

From the above viewpoints the airborne infection is considered to be a useful method for examining the degree of immunity.

## 1. 緒 言

結核免疫の形成さらにその程度を知るためには免疫後の動物に有毒結核菌を感染し一定期間後の肉眼所見, 病理組織学的所見, 臓器培養等により判定する。判定の方法あるいはその方法の評価についてはすでに多くの報告

があるが<sup>1)~4)</sup>感染方法ことに吸入感染法により結核免疫をみた報告は少ない<sup>5)~8)</sup>。一般に感染方法としてはモルモットでは皮下, 時として筋肉内, 静脈内感染法が用いられる。しかしこれらの方法では感染菌の皮下感染局所滞留, 非特異反応等により免疫の強弱—いまこれ免疫度とよぶ—を正確に把握しうるか否か不明である。免疫原

に BCG を用いたとき、免疫度はある範囲内では BCG 接種量と関連するのではないかということは概念的には考えられる。しかし皮下感染法でみると必ずしも接種免疫原量に応じた結果を示さず BCG 接種量が多かろうと少なかろうと上述の判定法でみるかぎり BCG による免疫度はほとんど変わらぬという知見もあるが<sup>9)</sup>、これは感染方法が皮下のため真の免疫度を正しく表現していないのかもしれない。その点自然感染法に最も近い吸入感染法を用いれば肺が感染局所となり他臓器への進展阻止の程度等から BCG 接種量により免疫度に差があることを知ることができるかもしれない。そこでモルモットを用い、BCG 量を3段階にわけ接種し一定期間後に強毒結核菌を吸入感染法により感染しさらに一定期間後の肉眼所見、臓器培養成績により免疫度が BCG 量に応じた結果を示すか否かを検討した。なお対照感染法として皮下感染法を用い比較した。

2. 実験方法

(1) 実験群を8群に分ち各群 4~6 匹の体重 400~500 g 白色モルモットを用いた。

(2) 免疫賦与菌として凍結乾燥 BCG を用いた。滅菌蒸留水により 2 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.02 mg/ml の菌液をつくり 2, 6 群には 1 mg (2 mg/ml の 0.5 ml), 3, 7 群には 0.1 mg (0.2 mg/ml の 0.5 ml), 4, 8 群には 0.01 mg (0.02 mg/ml の 0.5 ml) を右腹壁皮下に接種した。1, 5 群は無処置対照群とする。使用 BCG の生菌数は  $2 \times 10^7$ /mg であった。

(3) 感染菌の調製

強毒結核菌黒野株の Dubos 培地培養 10 日菌より比濁により 0.4 mg/ml になるよう菌液をつくる。これを2倍にうすめ 0.2 mg/ml とし吸入感染用に用いた。また 0.4 mg/ml の菌液の 0.5 ml を皮下感染用として左腹壁皮下に接種した。接種菌数は  $8.5 \times 10^8$  であった。したがって吸入感染用菌液の濃度は  $8.5 \times 10^8$ /ml である。

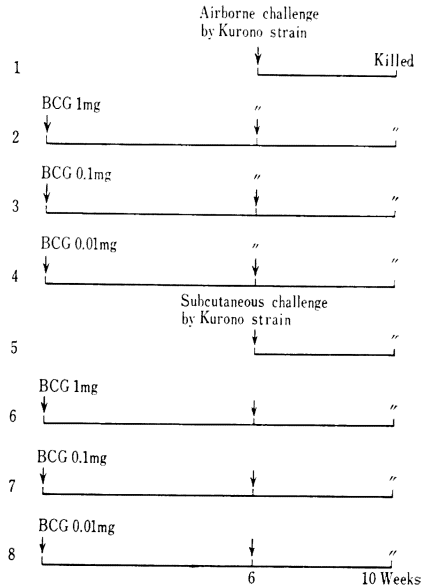
特殊吸入感染装置<sup>14)</sup>を用い吸入時間は 30 分。吸入感染 3 時間後に 3 匹を殺し肺の一部を培養し吸入菌数を推算したところ 1 匹につき平均 240 コであった。

(4) 実験計画

図 1 に示した。BCG 接種後 6 週目に黒野株を吸入あるいは皮下感染し、さらに 4 週後に殺し肉眼所見、肺重、脾重をはかりさらに肺、脾および局所リンパ節（吸入感染のときは気管リンパ節、皮下感染のときは左膝へきリンパ節）の一部を培養し臓器内生菌数をみた。また組織標本をつくり病理組織学的変化をみた。

なお BCG 接種前、有毒菌感染前、殺前に  $100 \times$  OT でツ・アレルギーをみた。

Fig. 1. Experimental Scheme



3. 実験成績

(1) ツ・アレルギーの変動

図 2, 3 に示した。

BCG 0.01 mg 接種群のツ反応は他の 2 群に比しやや弱い感染により、いずれの群もほぼ同じ強さになった。

(2) 剖検時の所見

内臓の肉眼所見は今回は便宜上 10 段階に分け病変の判定基準は 1+ は結節数 20 とし結算の大きさを加味した。これは吸入感染における肺の変化が強く従来の佐藤

Fig. 2. Change of Tuberculin Allergy —Airborne infection—

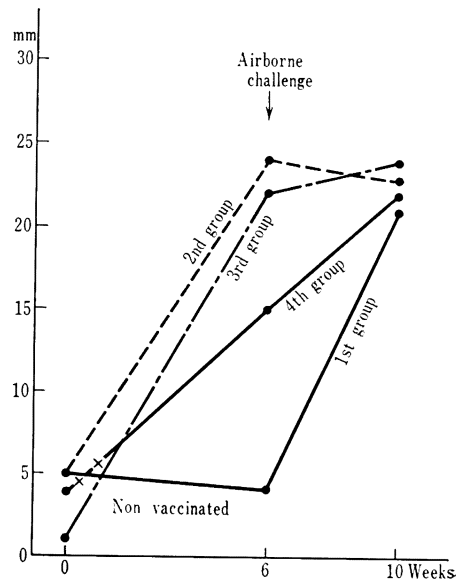


Fig. 3. Change of Tuberculin Allergy  
—Subcutaneous infection—

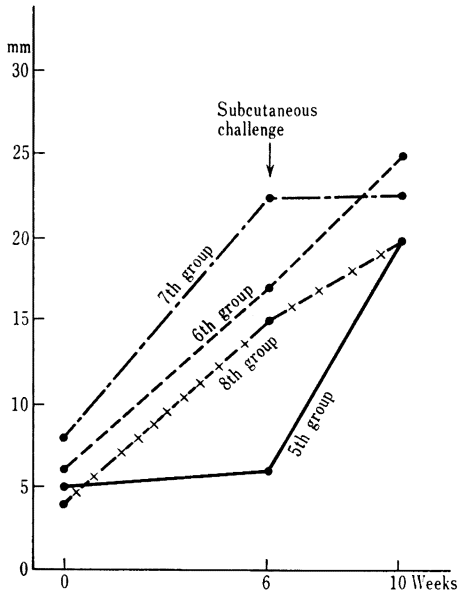


Fig. 4. Macroscopic Findings by Subcutaneous Infection

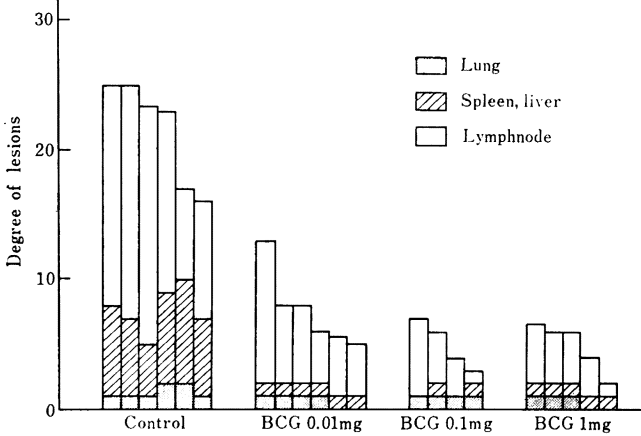
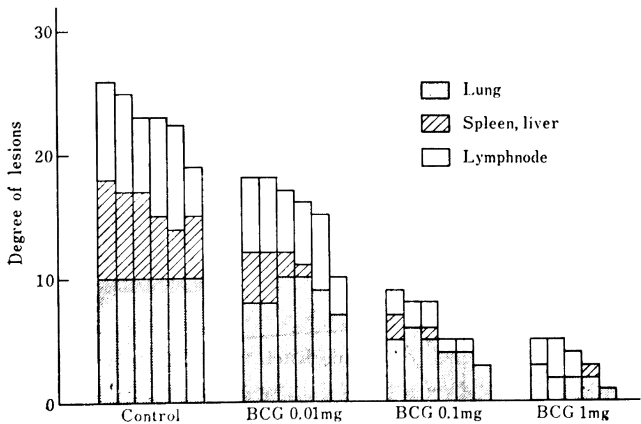


Fig. 5. Macroscopic Tuberculous Findings  
by Airborne Infection



氏法による判定基準では、実体と病変指数とを対比させることが困難であつたからである。

リンパ節の変化は直径 1 cm 以内を +, 1~2 cm を 2+, 2~3 cm を 3+, 3 cm 以上を 4+ とした。

肉眼所見をヒストグラムによつて図示すると図 4, 5 のようになる。

図にみるように皮下感染法では対照群と BCG 接種群には著明な差があるが BCG 接種群間には差がみられない。これに対し吸入感染法では BCG 接種量が増加するに伴い内臓の変化は次第に減弱する傾向を示した。

次に各群の体重, 肺重, 脾重,  $\sqrt{\text{spleen index}^{10)}$  の平均値を一覧表と表 1 に示した。

$\sqrt{\text{spleen index}}$  については各群間の統計学的有意差の有無を検定した。表 2 に示すごとく吸入感染群では無処置対照群の 1 群と 2, 3, 4 群との間に危険率 1% 以下で有意差を認めた。BCG 接種群では 3, 4 群間に 5% 以下の危険率で有意差を認めたが, その他の群間には有意差を認めなかつた。

これに対し皮下感染群では対照群の 5 群と 6, 7, 8 群との間には 1% 以下の危険率で有意差があつたが BCG 接種群間には有意差を認めなかつた。

(3) 臓器還元培養成績

肺, 脾, 局所リンパ節の還元培養を行なつた。結果を表 3 に示した。

吸入, 皮下いずれの感染方法によつても BCG 免疫群は非免疫対照群に比し有意差をもつて菌の増殖を阻止した。

BCG 免疫群間についてみると吸入感染の場合, 脾において BCG 1 mg 接種群と 0.1 mg 接種群の間に 5% 以下の危険率で有意差を認めたが他の群間に有意差を認めなかつた。これに対し皮下感染では BCG 接種量の増加に伴い菌の増殖がより強く阻止されるという結果はみられなかつた。

(4) 病理組織所見

吸入感染群の肺の組織標本をつくり BCG の免疫効果をみた。

病巣のひろがり, 最大病巣の大きさからみると各群とも進行性病変をつくつてはいるが, BCG 群では対照群におけるごとく, 融合した大きな病変が少なく, また中心壊死を伴つた病変は BCG 群においては対照群におけるほど, 著明ではなかつた。しかし BCG 接種群間には差はなかつた。肺組織内菌所見についても対照群では多数の菌がみられた。BCG 接種群では対照群に比し, 明らかに菌数は少なかつたが群間の差はほとんど認められなかつた。

Table 1. Mean Value of Guinea Pigs which were Killed after the Airborne or the Subcutaneous Challenge

Group	Airborne challenge				Subcutaneous challenge			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Weight of body (g)	593.4 ±34.6	726.0 ±49.2	699.2 ±78.3	675.0 ±70.0	606.7 ±96.1	756.0 ±86.5	797.5 ±74.1	732.5 ±37.3
Weight of lung (g)	15.1 ±3.6	11.1 ±3.1	11.1 ±3.3	11.7 ±1.7	5.3 ±0.7	5.4 ±1.0	6.3 ±1.3	5.7 ±1.5
Weight of spleen (g)	3.4 ±1.6	1.1 ±0.3	1.0 ±0.2	1.3 ±0.2	3.7 ±1.7	0.9 ±0.2	1.4 ±0.6	0.9 ±0.2
$\sqrt{\text{Spleen index}}$	0.74 ±0.19	0.39 ±0.05	0.37 ±0.02	0.43 ±0.05	0.78 ±0.17	0.34 ±0.05	0.42 ±0.08	0.35 ±0.05

Table 2. Analysis of Statistical Significance of  $\sqrt{\text{Spleen index}}$ 

Groups of airborne challenge	P
1 & 2	** 0.01 >
1 & 3	** 0.01 >
1 & 4	** 0.01 >
2 & 3	0.05 <
2 & 4	0.05 <
3 & 4	* 0.05 >
Groups of subcutaneous challenge	P
5 & 6	** 0.01 >
5 & 7	** 0.01 >
5 & 8	** 0.01 >
6 & 7	0.05 <
6 & 8	0.05 <
7 & 8	0.05 <

## 4. 考 察

BCG による能動免疫の強さは接種する抗原量に相関するものであろうか。抗原量が多くなれば、それに応じて抗体量も多くなり有毒菌攻撃に対する感染防御力として示される免疫度にも差が出てくるであろうということは免疫の本質が細胞性か体液性かあるいは両者の共合したものか不明であるとはいえ、十分推測しうるころである。しかしいままでの攻撃方法としてはモルモットの場合、皮下感染法が常用されており、これによると BCG

接種量の大小にかかわらず表現される免疫度には大差ないことが報告されている<sup>9)</sup>。

本実験においても皮下感染においては BCG 免疫群と非免疫群の間には肉眼所見、 $\sqrt{\text{spleen index}}$ 、肺、脾の培養成績いずれの面からみても有意差があつたが 1, 0.1, 0.01 mg 3段階の BCG 接種量の差によつては免疫度に有意差はみられなかつた。本実験に用いた BCG の生菌数は  $20 \times 10^6/\text{mg}$  であるから 0.01 mg は  $20 \times 10^4$  に相当し菌数としてはかなりの大量と考えてよいので産生される抗体量も BCG 接種 6 週後には 100 倍量にあたる  $20 \times 10^6$  接種による抗体量と大差なくなるとことが考えられる。BCG 接種量をどこまでへらすと皮下感染に対する免疫度に有意差が出てくるかを知ることは、能動免疫の形成機序を推察するためにも興味ある課題であろう。

吸入感染は肺が感染局所であることが皮下感染を含め他の感染方法による病変の生成、進展と様相を異にする最大の要因である。

肺結核症の発生、進展を実験的にみるためには結核菌感染が経気道的に行なわれる以上、吸入感染法が感染方法として最もよい方法であることは明らかであり、吸入感染法による実験結核症についてもすでにいくつかの報告がある<sup>11)~14)</sup>。

しかし免疫度を測定するときの感染方法として吸入感染は適当であろうか。吸入感染法による免疫度測定の理論的背景を列挙してみよう。

(1) 肺が感染局所であり、菌はある期間、肺に滞留

Table 3. Number of Bacilli in 1 mg of Each Organ at the Fourth week after Challenge

Vaccination	None	BCG			None	BCG			
		1 mg	0.1 mg	0.01 mg		1 mg	0.1 mg	0.01 mg	
Challenge		Airborne			Subcutaneous				
Viable counts	Lung	9,700	63	104	170	350	0	0.1	2
	Spleen	5,350	0.9	3	7	780	18	0.1	18
	Regional lymphnode	2,500	133	140	300	440	118	117	250

Number indicates mean of recovered bacilli from guinea pigs of each group.

する。したがって免疫がある個体では、その間に抗体をもつ食細胞の湧出等により菌の増殖を阻止する環境がつけられるが逆に抵抗性のない場合は菌にとつて、むしろ増殖に都合のよい場所となる。

(2) 吸入感染では皮下接種におけるように感染局所において菌が体液と接触することが最初のうちは少ない。したがって早期にリンパ行性あるいは血行性に菌が定着部位以外に、運ばれる割合が少ない。

(3) 吸入感染では菌の他臓器への進展、増殖は肺である程度、菌が増殖したあとで起こり、抵抗性の有無によつて非常な差がある。

(4) 吸入感染では静脈内感染にみられがちな非特異反応や再感染によるアナヒラキシー ショックのごとき現象はみられない。

本実験成績からみると吸入感染法を用いた場合は臓器肉眼所見で BCG 接種量増加に伴い病変が次第に減少する傾向を示した。しかし肉眼所見は完全に客観的とはいえないので  $\sqrt{\text{spleen index}}$  で比較したところ、BCG 0.1 mg と 0.01 mg 接種群間に有意差を認めた。

次に臓器の還元培養では吸入感染では肺、脾、局所リンパ腺いずれにおいても BCG 接種量が多いほど生菌数は少なく、脾において BCG 1 mg と 0.1 mg 接種群間に統計学的に有意差を認めた。この点皮下感染法による成績とかなり相違する。

吸入感染群について病理組織所見をみたところ BCG 接種群は非接種群に比し中心壊死が軽かつたが還元培養成績にみられるほど著明な差はなかつた。また接種群間には差がみられなかつたことなどから考え、組織所見は免疫度の測定法としては適当な指標とは考えられない。

ともあれ感染防御力が BCG 接種量に比例するものではないにしてもなんらかの関連があることは推測できる。本実験では皮下感染法では BCG 免疫度を測定することはできなかつたが吸入感染法ではある程度、測定可能であつた。感染菌量、感染から剖検までの期間、感染菌株の毒力によつて免疫度をさらに正確に知りうる可能性もある。

## 5. ま と め

モルモット実験結核症に対する BCG 免疫度を測定するための感染方法として吸入感染法の意義につき検討を

加えた。対照感染法として皮下感染法と比較した。

吸入感染法では肺の所見が主で BCG 非免疫群は肺のみならず脾、肝の病変も強かつた。BCG 免疫群は BCG 0.01 mg 接種でも脾、肝への進展は軽度であつた。また BCG 接種量が多いほど肉眼所見、ことに脾、肝の病変が軽微となつた。客観的指標である  $\sqrt{\text{spleen index}}$  では BCG 0.1 mg と 0.01 mg 接種群に、臓器還元培養では BCG 1 mg と 0.1 mg 接種群に統計学的に有意差を認めた。

これに対し皮下感染法では BCG 接種群と非接種群との間には、明らかな差を認めたが BCG 接種群間では感染防御力に差を認めなかつた。

以上の所見から BCG 免疫度測定のための感染方法として吸入感染法は有用であると考えられる。

本実験遂行にあたり、ご鞭撻と論文のご検閲をいただいた岩崎所長に感謝します。また病理組織所見に労をわずらわした工藤賢治博士、終始実験の実務を忠実に果たしていただいた高橋テル技師に謝意を表します。

なお本論文の要旨は第 42 回結核病学会において発表した。

## 文 献

- 1) Youmans, G.P. & Youmans, A.S.: J. Immunology, 78 : 318, 1957.
- 2) Youmans, G.P., Millman, I. & Youmans, A.S.: J. Bacteriology, 70 : 557, 1955.
- 3) Williams, C.A. & Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 110 : 981, 1959.
- 4) Conge, G., Collin, E., Levy, F.M. & Dubos, R.J.: Amer. Rev. Tuberc., 79 : 484, 1959.
- 5) Lurie, M.B.: Resistance to tuberculosis. Harvard University Press., 1964.
- 6) 下出久雄: 結核, 35 : 570, 昭 35.
- 7) Smith, D.W. Wiegels Laus, E. et al.: J. Bact., 91 : 718, 1966.
- 8) Middlebrook, G.: Bact. Rev., 25 : 331, 1961.
- 9) 結核予防審議会: BCG に関する調査書, 1952.
- 10) 工藤賢治・続木正大・青木正和: 結核, 42 : 68, 昭 42.
- 11) 下出久雄・豊原希一: 結核, 36 : 727, 昭 36.
- 12) 下出久雄・豊原希一: 結核, 38 : 23, 昭 38.
- 13) 豊原希一・下出久雄: 結核, 41 : 274, 昭 41.
- 14) 下出久雄・豊原希一: 結核, 41 : 329, 昭 41.