

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 (補遺)

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎龍郎)

下 出 久 雄

国立療養所東京病院 (院長 砂原茂一)

受付 昭和 43 年 10 月 12 日

EXPERIMENTAL STUDY ON EVALUATION OF BCG-IMMUNITY IN GUINEA PIGS BY AIRBORNE INFECTION (Supplemental Study)*

Mareichi TOYOHARA and Hisao SHIMOIDE

(Received for publication October 12, 1968)

It has already been reported by the same authors that the airborne infection method was useful to measure the degree of immunity induced by BCG vaccination in the experimental tuberculosis of guinea pigs. As the interval between BCG vaccination and the challenge infection seems to be an influential factor on the evaluation of the manifestation of immunity, a supplemental experimental was carried out on this point comparing the airborne and subcutaneous infection methods.

The design of experiment is shown in Fig. 1. 10^{-3} mg or 10^{-1} mg of BCG was inoculated subcutaneously into the left abdomen of guinea pigs. The number of viable unit of the employed BCG was 2.4×10^7 per mg. Virulent tubercle bacilli of the human type (Kurono strain) grown 7 days in Dubos media were employed as the source of the challenge inoculum. The concentration of bacillary suspension was adjusted to 0.02 mg/ml by photocolormeter (Hitachi EPO), and then it was passed through a filter paper of Toyo Roshi No. 101 to get the filtrate containing only single bacilli.

For the airborne infection, guinea pigs were exposed to this filtrate for 30 minutes. For the subcutaneous infection, 0.5 ml of the same filtrate was inoculated subcutaneously into the right abdomen.

Figs. 2 and 3 show the macroscopic findings of the airborne infection group and of the subcutaneous infection group, respectively. In the case of the airborne challenge conducted at 3 week interval after BCG vaccination, the degree of immunity is demonstrated by the pathological changes of the extra-pulmonary organs such as the spleen and the liver (Fig. 2 A). If the airborne challenge is made at 6 week interval after BCG vaccination, the degree of immunity is demonstrated by the changes of the lung (Fig. 2 B). In the case of subcutaneous challenge, the existence of BCG immunity is clearly shown, though no significant difference in the degree of immunity is found according to the dose of BCG (Fig. 3).

The result of viable bacterial count of organs is shown in Table 1. In the case of the airborne challenge conducted at 3 week interval after BCG vaccination, viable bacterial count

* From Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo 180-04 Japan.

in the lung and the spleen is much smaller than that of the non-vaccinated group. Comparing the viable unit in the spleen, the group vaccinated with 10^{-1} mg BCG showed smaller figures than the group vaccinated with 10^{-3} mg BCG.

In the case of airborne challenge made at 6 week interval after BCG vaccination, the viable bacterial count in the lung and the spleen is less in the group vaccinated with 10^{-1} mg BCG than in the group vaccinated with 10^{-3} mg BCG.

On the other hand, in the case of the subcutaneous infection conducted at 3 week interval after the vaccination by 10^{-1} mg BCG, the multiplication of challenged bacilli is markedly inhibited, while this inhibition is seen only slightly in the group vaccinated with 10^{-3} mg BCG. If the challenge is carried out subcutaneously at 6 week interval after BCG vaccination, the multiplication of challenged bacilli is markedly inhibited even in the group vaccinated with 10^{-3} mg BCG.

I. 緒 言

前報¹⁾において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が有用であることを述べたが、更に BCG 接種と攻撃との間隔が BCG 免疫度を知るための実験条件の重要な因子となつたので、この点につき検討を加え前論文の補遺としたい。なお前実験と同じく吸入感染法の対照感染方法として皮下感染法を選んだ。

II. 実験方法

1. 実験計画

図1に示す。

実験群を12群に分ち各群5匹。体重400~500gの白色3モルモットを用いた。

2. 使用 BCG

凍結乾燥 BCG を滅菌蒸留水により 0.2 mg/ml, 0.002 mg/ml の菌液とし、2, 5, 8, 11 群には 10^{-3} mg (2×10^{-3} mg/ml の 0.5 ml), 3, 6, 9, 12 群には 10^{-1} mg (2×10^{-1} mg/ml の 0.5 ml), を左腹壁皮下に接種した。BCG の生菌単位は 2.4×10^7 /mg であつた。吸入感染では1, 4群, 皮下感染では7, 10群を無処置対照群とする。

3. 攻撃菌の調製

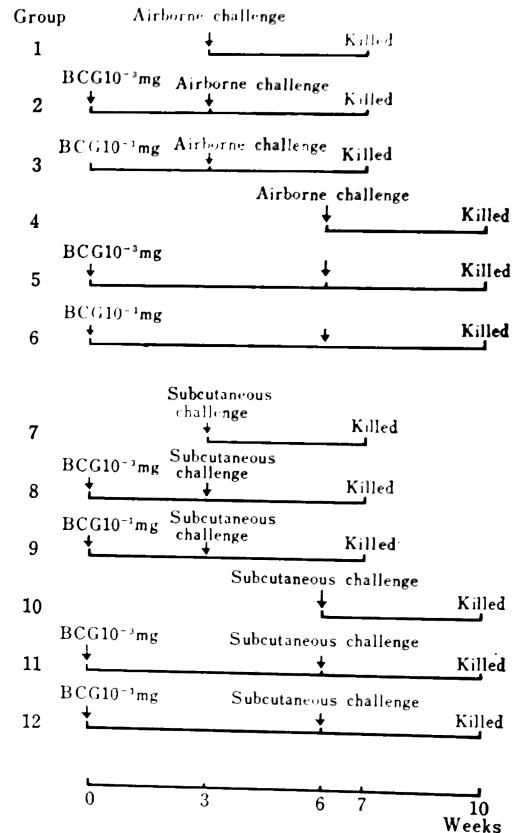
強毒結核菌黒野株の Dubos 培地培養7日菌より比濁により 0.02 mg/ml の菌液を作り、これを東洋濾紙 No. 101 で濾過し吸入感染に用いた。またこの 0.5 ml を皮下感染用として右腹壁皮下に接種した。使用菌液の生菌単位は第1回目すなわち BCG 接種3週後に感染した時は 2×10^4 /ml, 第2回目すなわち6週後に感染した時は 1.3×10^4 /ml であつた。吸入時間は30分である。

III. 実験成績

1. 剖検時の肉眼所見

吸入感染による結果を図2, 皮下感染による結果を図

Fig. 1. Experimental Design



3に示す。

肉眼所見による病変度の基準は工藤氏法²⁾によつた。

BCG 接種3週後に吸入感染した場合は図2のAにみごとく肺の所見は対照群に比し BCG 接種群がわずかに少ない程度で BCG 接種量による差は認められない。しかし肝、脾では BCG 非接種対照群の変化はすでに強いが BCG 10^{-3} mg 接種群は軽度、 10^{-1} mg 接種群では肉眼変化を認めなかつた。

Fig. 2. Macroscopic Findings of Organs and Lymphnodes in Airborne Infection Group According to Dose of BCG and Interval between Vaccination and Challenge (Guinea pigs)

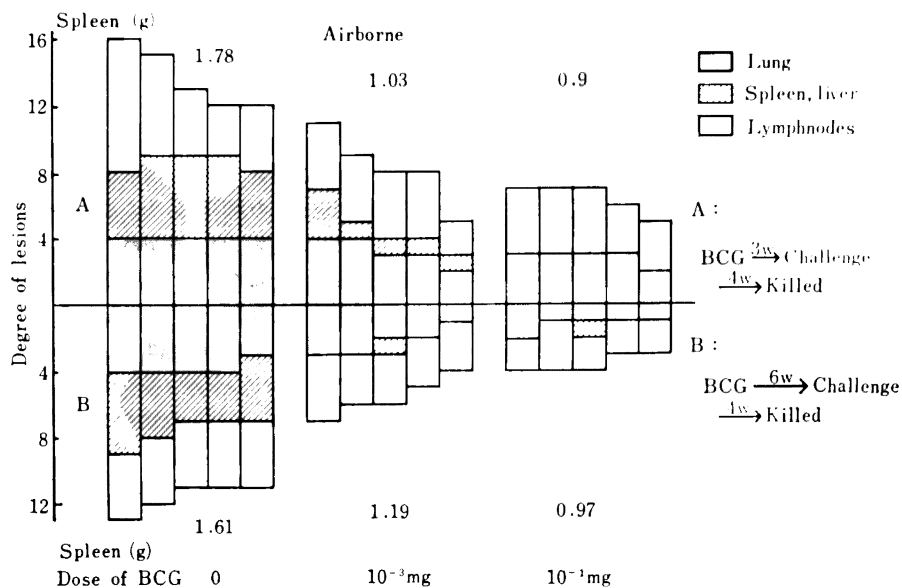
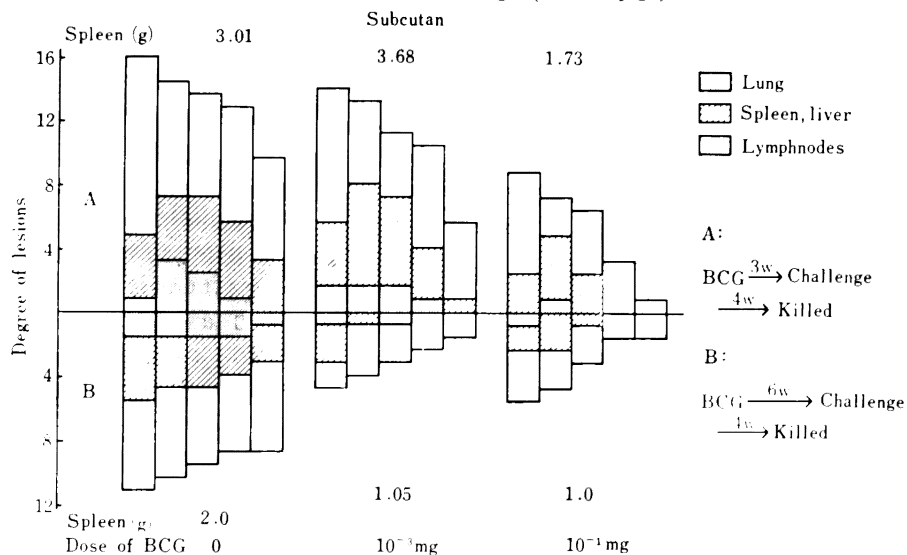


Fig. 3. Macroscopic Findings of Organs and Lymphnodes in Subcutaneous Infection Group According to Dose of BCG and Interval between Vaccination and Challenge (Guinea pigs)



次に BCG 接種 6 週後に吸入感染した場合は図 2 の B にみるように肺の変化も BCG 群は対照群より軽く、また 10⁻¹ mg 接種群は 10⁻³ mg 接種群より更に軽い。

脾、肝等他臓器への進展は BCG 10⁻³ mg, 10⁻¹ mg 接種両群ともほとんど阻止されており無処置対照群との間に著明な差がある。

リンパ節の変化は気管リンパ節、後胸骨リンパ節の腫大が主たるものであつた。吸入感染の場合は BCG 接種群は対照群に比し、やや軽度という程度で、それほどの差はなかつた。

吸入感染群に対し BCG 接種 3 週後に皮下感染した場合は図 3 A にみるように 10⁻³ mg ではまだ病巣の形成阻止がみられない。しかし 10⁻¹ mg ではすでに相当の免疫効果を認めた。

BCG 接種 6 週後に皮下感染した場合は図 3 B にみるように 10⁻³ mg でも著明な病巣形成阻止が認められ 10⁻¹ mg 接種群との間に差を認めなかつた。

2. 臓器培養成績

表 1 に結果を示す。

表中の吸入 A 群にみるように吸入感染の場合、BCG

Table 1. Viable Bacterial Count in Lung and Spleen According to Dose of BCG and Method of Challenge Infection (Guinea pigs) Cultivation

BCG	0		10^{-3} mg		10^{-1} mg	
	L	S	L	S	L	S
Airborne A	792	279	79	23	58	2.8
Airborne B	1,040	130	20	0.8	8	0.02
Subcutan A	47	414	20	376	1.3	32
Subcutan B	28	228	9.2	57	2.2	32

L : Lung S : Spleen

A : BCG $\xrightarrow{3w}$ challenge $\xrightarrow{4w}$ killed

B : BCG $\xrightarrow{6w}$ challenge $\xrightarrow{4w}$ killed

Number indicates mean of recovered bacilli in 1mg of each organ.

接種量が 10^{-3} mg でも 10^{-1} mg でも BCG 接種 3 週にしてすでに攻撃菌は著明に増殖を阻止される。この時点における肺の肉眼所見では BCG 接種群と非接種群の間にほとんど差を認めなかつた点を考えると、これは肺の肉眼所見と培養成績との大きな差異といつてよいであろう。

BCG 接種量による生菌単位の差は肺では著明でないが脾では明らかに 10^{-1} mg 接種群の方が少ない。したがって脾における肉眼所見と培養成績は一致しているといつてよい。

次に BCG 接種 6 週後に吸入感染を行なつた場合 (表 1, 吸入 B 群) をみると対照群との間に著明な差があることは A 群と同じであるが、肺、脾の生菌単位は A 群に比し更に少なく、また肺の生菌単位も BCG 接種量の多い方が明らかに少ない。

次に皮下感染について観察しよう。

表 1 皮下 A 群にみるように BCG 10^{-3} mg 接種 3 週では攻撃菌の増殖阻止はまだ十分でないが、 10^{-1} mg では 3 週ですすでに対照に比し生菌単位は 1/10 以下と少ない。

これに対し BCG 接種後 6 週に皮下感染すると表 1 皮下 B 群にみるように 10^{-3} mg でも生菌単位は対照に比し明らかに少ない。

IV. 考 察

BCG に匹敵するような死菌あるいは菌体成分による non living vaccine の研究は数多い³⁾。これは結核免疫の機序を知らんとする純粹に基礎的な興味ばかりでなく生菌免疫にみられるツベルクリン・アレルギーを惹起せしめることなく免疫を賦与したいとか BCG 潰瘍を全く発生させない可能性がないかなどの実用的効果を狙つてのためであろう。しかし、ある人が有効であると発表した non living vaccine を他の人が追試すると無効に近いということがしばしばである。この原因の一つに vac-

cine の評価の基準あるいは方法が統一されていないということを見逃すわけにはいかない。すなわち実験モデルの検討の必要性が強調される所以である⁴⁾。

免疫実験に影響を与える主要な因子として考えられるものを列挙してみると、(1) 接種する免疫原量、(2) 免疫と攻撃までの期間、(3) 攻撃菌の感染方法、(4) 攻撃菌の毒力および菌量、(5) 生残率をみるものでなければ攻撃より剖検までの期間ということになる。

前報りにおいて著者は攻撃菌の感染方法として吸入感染法の結核免疫を知るための理論的背景と、この方法が免疫度測定に有用な方法であることを述べたが、今回は上にあげた因子の中で (1)、(2)、(3) 殊に前回は検討をしなかつた (2) に中心をおいて知見を加えた。

吸入感染の場合、免疫と攻撃までの期間が 3 週だと感染局所である肺の肉眼所見は BCG 接種量に拘らず BCG 非接種対照群と大差なかつたが肺内から還元された生菌単位からみると BCG の免疫効果はすでに十分に認められる。なお BCG 接種群から分離された菌には BCG は含まれておらず、すべて攻撃菌と考えてよい。また脾、肝等他の臓器への進展は BCG 接種より感染までの期間が 3 週でも対照に比し肉眼所見、培養成績いずれの面からみても阻止されていた。したがって感染局所である肺以外への臓器への進展程度をみるという方法をとれば BCG 接種 3 週後に吸入感染を行ない 4 週後に動物を殺すことによつて比較的短期間に免疫の有無のみならず、その程度をも知ることができる。

BCG 接種から 6 週後には免疫はほぼ完成に近いと考えられ、この時点で感染を行なうと 3 週では差を認めなかつた肺にも BCG 接種量により病巣形成阻止の程度差がみられるようになる。リンパ節や肺以外の臓器、殊に後者については BCG 10^{-3} mg でも 10^{-1} mg でも強い免疫形成がみられ BCG 接種量による差は肉眼的には認めがなくなる。しかし攻撃菌の生菌単位は接種量により差を認める。

ここで一言したいのは吸入感染における肉眼所見と培養成績の相当な食い違いである。

図 2 A にみるように BCG 接種 3 週後に攻撃し 4 週後に殺した時、BCG 接種群の肺の肉眼的変化は対照に比しわずかに少ない程度で相当数の結核結節が肺全体に認められ乾酪化しているものもあるが、その中の生菌単位は BCG 接種群と対照群との間に著明な差がある。これはおそらく免疫が完成していない時点で肺が感染局所になつた時は BCG 接種群でも、いつたん菌は増殖し、それに伴い細胞浸潤が起こる⁵⁾と共に肺における Koch 現象もこれに関与していると考えたい。菌の増殖は対照群に比べれば勿論少ないし、いつたん増殖しても再び減少するが、肉眼的形態的变化は早急には消退しないためであろう。したがって吸入感染の場合、殊に BCG 免疫が

不十分な時は肺の肉眼所見で免疫度をみることは問題があるかもしれない。生菌単位の方がよりよく免疫の有無あるいは程度をあらわすものであろう。

次に皮下感染の場合は図3AにみるようにBCG接種3週後に皮下感染したときはBCG 10^{-8} mgでは肺、脾、肝等内臓諸器官の変化は対照とはほぼ同じで病巣形成阻止効果が明らかでないが、生菌単位も肉眼所見とはほぼ平行し、この時点では菌の増殖阻止は認められない。この点、肺の肉眼所見は強いのに生菌単位は少なかつた吸入感染による結果と異なっている。皮下感染の場合は感染局所が皮下であるがゆえに吸入感染の肺にみられたようなKoch現象は各臓器にみられないからである。

BCG接種6週後に感染した時はBCG 10^{-8} mgでも 10^{-1} mgでも免疫効果に差はなく、いずれも強い病変および菌増殖阻止を認めた。したがって皮下感染法でも免疫の有無を知ることはできるが免疫度を知ることは困難である。

BCG接種量をいろいろかえ皮下感染した時は、BCG接種量のある範囲内では免疫効果に有意差がないという報告⁶⁷⁾もあり、免疫には悉無律のごとき現象があるのではないかという考え方もあるが、適当な実験条件を設定した吸入感染法を用いれば、この差を拡大して示すのかもしれない。また、これには肺の局所免疫の存在も関与しているのかもしれない。

V. むすび

吸入感染によるモルモットの結核免疫の効果判定のための実験条件としてBCG接種より有毒菌による攻撃までの期間について検討を加えた。

i) BCG接種3週後に吸入感染を行ない更に4週後に剖検するという実験条件では脾、肝等、感染局所である肺以外の臓器への進展程度を肉眼的に観察すると共に肺、脾、殊に脾における攻撃菌の生菌単位をみることにより免疫の有無および程度を判定することができる。

ii) BCG接種と吸入感染による攻撃との間隔を6週とすると肺の病変により免疫度を判定できる。肺以外の臓器(脾、肝)への進展は十分阻止されているため、免疫の有無を知ることは勿論できるがBCG接種量による差を知ることは困難である。しかし臓器中の攻撃菌の生菌単位をみることにより免疫度を知ることができる。

iii) BCG接種がしてあると吸入感染後肉眼所見では、非接種群との間に差をあまり認めない場合でも臓器中の生菌単位には著差が認められる。したがって臓器培養は励行されなければならないが、培養に供する臓器の全培養を行なわない時は、その採取量や部位等、細心の注意が必要であらう。

iv) 皮下感染の場合、BCG接種から攻撃までの期間が3週だとBCG 10^{-8} mgによる免疫効果はまた十分に認められず、BCG接種から攻撃までの期間が6週だとBCG 10^{-8} mgでも 10^{-1} mgでも十分な免疫効果が認められ免疫度を知ることは困難である。

謝 辞

岩崎所長のご校閲を謝すと共に本研究の技術的協同作業をしていただいた望月テラ技師の労に謝意を表す。

なお本論文の一部は第43回結核病学会要望課題において発表した。

文 献

- 1) 豊原希一・下出久雄：結核，42：505，昭42.
- 2) 工藤賢治：第43回日本結核病学会要望課題講演，4，昭43.
- 3) Smith, D. W., Grover, A. A. & Wiegshaues, E.: Adv. Tuberc. Res., 16: 191, 1968.
- 4) The 3rd tuberculosis, leprosy and malnutrition joint panel meetings U.S.-JAPAN, 8, 1968.
- 5) 下出久雄・豊原希一：結核，43：209，昭43.
- 6) 結核予防審議会：BCGに関する調査書，1952.
- 7) 高井鏝二：結核，43：237，昭43.