

## 吸入感染法によるマウスの 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 44 年 5 月 12 日

### EXPERIMENTAL STUDY ON EVALUATION OF BCG-IMMUNITY IN MICE BY AIRBORNE INFECTION\*

Mareichi TOYOHARA and Hisao SHIMOIDE

(Received for publication May 12, 1969)

The authors reported previously that the airborne infection method was useful to measure the degree of BCG-immunity in guinea pigs. There are already some reports on tuberculosis immunity of mice using the airborne infection method, but we have no fundamental experiment to prove this method to be useful as a method for challenge. The authors studied whether or not the airborne challenge method was useful to measure the degree of tuberculosis immunity in mice as well as in guinea pigs. The experiments were carried out comparing the airborne and intravenous infection methods.

#### 1. Materials and methods

The experimental design is shown in Table 1. Ten male mice of DD strain were employed in each group. 0.1 mg or 0.001 mg of dried BCG was inoculated into tail vein of a mouse of the vaccination groups. The number of viable units of the employed BCG was  $8.5 \times 10^6$ /mg. Virulent tubercle bacilli of human type (Kuronos strain) grown 7 days in Dubos media were employed as the source of challenge inoculum. Mice were challenged with a large size or a small size of virulent bacilli for both the airborne infection and the intravenous one.

For the airborne infection with a large size of virulent bacilli, the number of virulent bacilli fixed in lungs was 45 per mouse and in the case of small size the number of bacilli fixed in lungs was 5 per mouse.

In the case of the intravenous challenge with a large size, bacilli of  $2.2 \times 10^5$  were inoculated into a mouse, and for the groups to be challenged with a small size, a mouse was inoculated with the bacilli of  $2.2 \times 10^6$ .

#### 2. Results and comment

Table 2 shows the results of the airborne challenge, and Table 3 shows those of the intravenous challenge. When mice were challenged by the airborne route, the degree of tuberculosis immunity by BCG was observed to correspond with the dosis of vaccination both in challenge by large size and in challenge by small size.

On the contrary, by the intravenous challenge the immunizing effect of vaccination with

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

0.001 mg of BCG was not proved.

As shown in Table 4, not a small number of BCG survives particularly in the spleen even at the fourth week after the intravenous inoculation. When mice are challenged intravenously at such a time, some undesirable reaction as tuberculin shock might appear among the host, challenge bacilli and BCG.

In the case of airborne infection, there is hardly any possibility of such undesirable reaction because both the surviving number of BCG in the lungs and the number of inhaled virulent bacilli will be relatively small.

From the above-mentioned points, it is considered that the challenge method by airborne route is useful to decide the degree of BCG immunity.

### 1. はじめに

現在、BCG 免疫の実験に用いられる動物としてはモルモット、マウスが主である。もともとマウス結核症は、その感染に伴う宿主側の種々相が人間の場合とかなり異なるので人の結核症の発生、進展あるいは免疫の実態を探るには問題があると思うが結核菌に感受性の高いマウスの供給が容易になつたこと、多数を飼育あるいは実験に供することが出来ることなどの理由から近年、免疫実験にも盛んに用いられるようになって<sup>1)~3)</sup>。また最近結核死菌ワクチンあるいは菌体成分によるBCG以外の免疫原の開発の研究も新しい視点から行なわれている<sup>4)~10)</sup>。しかし免疫形成あるいは免疫の程度をはかるための実験モデルが確立されていないため免疫原の評価も人により一定しない。

著者らは先に BCG 免疫度の測定のためモルモットについて実験を行ない吸入感染法が有用であることを報告した<sup>11)12)</sup>。マウスの免疫実験についても攻撃に吸入感染法を応用した報告はすでにいくつかあるが<sup>13)14)</sup>、それらの論文は吸入感染法が免疫後の攻撃方法として、優れていることを先験的に認めているようであり、これを立証する基礎的実験に乏しい。そこで著者らはマウスを用いる場合でもモルモットの場合と同じように BCG 免疫度を知るために吸入感染法が有用であるか否かを検討した。対照攻撃法としては静脈内感染法を用いた。

### 2. 実験材料ならびに方法

1. 使用マウス：DD 系 3 マウス。実験開始時の体重 25 g 前後。各群 10 匹。

2. 接種 BCG 量および接種方法  
凍結乾燥 BCG を用い接種群には 0.1 mg あるいは 0.001 mg をマウス尾静脈内に接種した。

生菌単位は  $8.5 \times 10^6$ /mg。なお BCG を静脈内に接種したのはマウスに対しては BCG の皮下あるいは腹腔内接種に比し免疫効果がより確実なためである。

### 3. 攻撃菌および攻撃方法

有毒結核菌黒野株の Dubos 培地培養 7 日菌を用いた。攻撃方法は吸入感染法と静脈内感染法とし、それぞれに大量感染と小量感染を行なう群をおく。

吸入大量感染群の肺内定着菌数はマウス 1 匹につき平均 45 コ、吸入小量感染の肺内定着菌数はマウス 1 匹平均 5 コ。

静脈内大量感染群の感染菌数はマウス 1 匹につき  $2.2 \times 10^8$ 、小量感染群の場合は  $2.2 \times 10^5$  である。

### 4. 実験計画

BCG 接種 4 週後に攻撃を行ない更に 6 週後に全動物を殺し肺における肉眼所見<sup>15)</sup>、肺重、および肺内生菌数をみた。

実験群を表 1 に示す。

### 3. 実験成績

吸入感染によつた場合の結果を表 2、静脈内感染によつた場合の結果を表 3 に示す。

Table 1. Experimental Plan

BCG (i. v.)	Challenge		Killed
	4 w		10 w
Experimental groups	Size of BCG vaccination (mg)	Route of challenge	Size of challenge
1	0	Airborne	Large size
2	0.1	"	"
3	0.001	"	"
4	0	Intravenous	"
5	0.1	"	"
6	0.001	"	"
7	0	Airborne	Small size
8	0.1	"	"
9	0.001	"	"
10	0	Intravenous	"
11	0.1	"	"
12	0.001	"	"

Table 2. Relation between Inoculum Size of Vaccination and BCG Immunity Using Airborne Infection

Groups	1	2	3	7	8	9
Body weight (g)	25	22.9	26.4	27.2	26	26.7
Lung weight (mg)	257	201	242	227	191	214
Degree of lesion of lungs <sup>13)</sup>	3.1	1.0	2.2	1.6	0.6	1.1
Log viable units per mg in lung tissue	3.66±0.38	2.69±0.48	3.21±0.33	3.06±0.55	2.09±0.20	2.41±0.57
Inoculum size of BCG (mg)	0	0.1	0.001	0	0.1	0.001
Size of challenge	Large			Small		

Numbers indicate average of ten mice.

Table 3. Relation between Inoculum Size of Vaccination and BCG Immunity Using Intravenous Infection

Groups	4	5	6	10	11	12
Body weight (g)	23.1	23.9	28.6	26.7	26.7	25.2
Lung weight (mg)	423	224	500	256	230	296
Degree of lesion of lungs <sup>13)</sup>	4.8	2	3.9	3.4	1	2.7
Log viable units per mg in lung tissue	4.63±2.6	3.78±0.30	4.54±0.18	3.31±0.69	2.73±0.36	3.43±0.42
Inoculum size of BCG (mg)	0	0.1	0.001	0	0.1	0.001
Size of challenge	Large			Small		

Numbers indicate average of ten mice.

表中の数値は、いずれもマウス 10 匹の平均値を示している。

攻撃方法として吸入感染法を用いた場合は表2にみるように大量感染、小量感染いずれの場合も免疫の指標となる肺重量、肺の肉眼病変度、肺内生菌数からみて BCG 接種群では BCG による免疫効果を認めた。かつ BCG 0.1mg 接種群は 0.001mg 接種群より強い免疫効果を示した。

これに対し攻撃方法として静脈内感染法を用いた場合は表3にみるように攻撃菌数の大小を問わず BCG 0.001 mg 接種では免疫効果が認められない。しかし 0.1mg 接種では効果を認めた。

#### 4. 考 察

マウスの結核免疫の有無あるいは程度を知るには本質的にはモルモットの場合と同様、攻撃菌の体内における増殖阻止の程度をみることであろう。これに付随して肉眼所見の観察も重要である。モルモットとマウスで異なる点はマウスでは生菌数を含め脾における諸変化が、あまり信用おけず、生菌数を含め肺の変化に重点をおいて観察しなければならないことと、肉眼的に著変がなくとも組織内での菌増殖は著しいことが多いことである。モルモットの場合、免疫が存在すると肉眼的変化が強くとも生菌数は極めて少ないことが多いが<sup>11)12)</sup>、マウスの場合は逆で、むしろ肺の肉眼所見の方が免疫の有無あるいは

Table 4. Change of Numbers of BCG in Lung or in Spleen after Intravenous Inoculation

Time after inoculation	1 hour	1 week	2 week	3 week	4 week
Numbers of BCG in 1mg of lung	130	10.1	8.5	2.8	7.6
Numbers of BCG in 1mg of spleen	20.6	84.0	76.5	89.5	71.0

Numbers indicate average of six mice.

Each mouse was inoculated with 0.01 mg of BCG (v. u.  $2.8 \times 10^7$ /mg) in tail-vein.

は強弱をはつきり示すようである。

次に BCG を皮下接種した時、モルモットでは BCG は短期間に減少するが<sup>14)</sup>マウスでは殊に脾に意外に長く多数残存している。これは有毒菌による攻撃時に何等かの影響をもつ可能性があろう。表4に BCG 0.01mg をマウス尾静脈に接種した時の肺、脾における BCG の消長をマウス 6 匹の平均値として示す。

表にみるように BCG は脾では増殖を示し4週後に至るも 1mg 中 71 の生菌数をみる。したがって、この時点で更に大量あるいは少量の有毒菌の静脈内攻撃が行なわれるとすると生菌および生体との間で何等かの相互反応の生ずる恐れがあろう。事実、BCG 0.1mg 接種後大量に有毒菌を静脈内感染した場合、感染後 2~3 日の内に斃死するマウスもいた。これはツベルクリンショックの一現象と考えられるかもしれない。

これに対し吸入感染の場合は肺への吸入菌数は肺全体

で5~45で、またこの時点におけるBCGの肺内生残数は表4にみるように少ない。したがってBCG、攻撃菌および生体との間に好ましからざる相互反応は、まず起こらないであろう。

次にマウスの場合にはBCGがかなり長期間残留するの肺、脾等の臓器培養を行なうとき攻撃菌と共にBCGが混入する可能性がある。このため10mcg/mlの割合にTCH<sup>16)</sup>を加えた小川培地を用いる配慮が必要である。

以上のごとき諸点を考慮して吸入感染と静脈内感染を比較すると吸入感染法を用いることによりBCG接種量に応じた感染防御力すなわち免疫度を肺の肉眼所見、生菌単位両者から知ることができる。攻撃菌数は少量(1匹平均5コ)でも大量(1匹平均45コ)でも同じであるが結節数を数えるためには少量の方がよい。

### 5. む す び

マウスに対するBCG免疫度を測定するための攻撃方法として吸入感染と静脈内感染を比較した。

(1) BCG接種4週後に1匹当たり5コあるいは45コの吸入感染を行ない、6週後に剖検し肺の肉眼所見および生菌単位をみることによりBCG接種量の大小に応じた免疫度を知ることができる。

(2) 同様の条件による静脈内感染に対してはBCG  $10^{-1}$ mg接種では免疫効果を示すがBCG  $10^{-3}$ mgでは免疫効果を示さない。

以上の所見からモルモットと同様、マウスの免疫度を知るためにも吸入感染法は有用である。

### 謝 辞

岩崎所長のご校閲を謝す。本実験遂行に当たり望月チル技師の労が多かつた。記して謝意を表する。

なお本研究の一部は第42回、43回結核病学会および1968年度日米医学協力会議結核部会において発表した。

### 文 献

- 1) Lévy, F. M.: Recherches sur le BCG. Édition médicales Flammarion, 1966.
- 2) Middlebrook, G.: Bacteriological Reviews, 25: 331, 1961.
- 3) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact., 87: 1346, 1964.
- 4) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact., 91: 2139, 1966.
- 5) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact., 91: 2146, 1966.
- 6) Ribí, E. et al.: J. Bact., 91: 975, 1966.
- 7) Ribí, E. et al.: J. Bact., 92: 869, 1966.
- 8) Smith, D. W. & Kubica, G. P.: Proc. Soc. Exp. Biol., 90: 629, 1956.
- 9) Smith, D. W. & Robertstein, J. A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 85: 398, 1962.
- 10) Smith, D. W. et al.: J. Bact., 88: 87, 1964.
- 11) 豊原希一・下出久雄: 結核, 42: 505, 昭42.
- 12) 豊原希一・下出久雄: 結核, 44: 7, 昭44.
- 13) 青木正和 他: 結核, 36: 355, 昭36.
- 14) 工藤賢治: 第43回日本結核病学会要望課題講演, 昭43.
- 15) Bönicke, R.: Naturwissenschaften, 45: 392, 1958.