

原 著

BCG 経口接種モルモットの抗結核免疫力

室橋豊穂・三浦馨・高橋宏
木ノ本雅通

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 53 年 5 月 9 日

ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNITY OF GUINEA PIGS
INOCULATED BCG ORALLYToyoho MUROHASHI*, Kaoru MIURA, Hiroshi TAKAHASHI and
Masamichi KINOMOTO

(Received for publication May 9, 1978)

Adult guinea pigs weighing 350~400 g were inoculated orally with freeze-dried BCG vaccine in amount of 80 mg as one dose resuspended in physiological saline inserting a specially provided inoculation instrument deeply and quickly into oesophagus. Thereafter, body weight increase, tuberculin reactions and the fate of BCG were investigated in the 1st experiment. In all animals, body weight increased fairly well and tuberculin reactions converted to positive as early as at the 4th week after inoculation. The viable bacilli recovered from organs revealed that BCG absorbed through Peyer's patches distributed rather quickly to the remote organs such as bronchial lymph nodes representing large number of viable units accompanying marked swelling of lymph nodes in earlier stage after inoculation.

In the 2nd experiment, animals were divided into 4 groups of 6 guinea pigs each. The 1st group was inoculated with living BCG, the 2nd with heat-killed BCG, the 3rd with heat-killed BCG in Freund's incomplete adjuvant (F.I.C.A.), respectively, and the 4th was left as untreated control. The former 3 groups were inoculated orally either with living or heat-killed BCG of the same concentration as living BCG twice at 3 weeks interval. Three weeks after the 2nd oral inoculation, *i.e.* at the 9th week when all animals of the 1st group showed positive tuberculin reactions, while those of the remaining 3 groups were negative except an animal each of the 2nd and the 3rd groups, all animals were infected subcutaneously with H₃₇Rv strain. After additional 3 weeks, they became strongly positive to tuberculin. Then, 3 animals each were sacrificed at the 3rd and the 6th week after infection. The macroscopic findings and the number of virulent tubercle bacilli recovered from organs revealed that the animals of the 1st group alone were affected obviously slighter than those of the remaining 3 groups. Among the latter 3 groups, no statistically significant difference existed. Serological test revealed that only in one animal of the 3rd group, which was positive to tuberculin, haemoagglutination titer was demonstrated as high as 32 fold.

The present study showed clearly that even the adult guinea pigs could be sensitized fairly well to tuberculin and immunized against virulent tubercle bacilli infection by the oral

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

administration of BCG vaccine, provided that the vaccine of high viability is inoculated into empty stomach.

実験材料と方法

Calmette の始めた BCG 経口接種¹⁾ は、定量性を欠きかつツ反応陽転率が低く、したがってすぐれた結核予防効果を期待し難いとして、皮内あるいは経皮などの非経口の接種方式に代えられ、主としてWHO 援助下の地域では、現在でも皮内接種が行なわれている。他方ブラジルではごく最近まで、Calmette の原法を改変した大量無差別経口接種が de Assis の主唱の下に行なわれて、結核のみならず癩の発病防止にも多大の効果をおさめたという²⁾。このブラジル方式は、大量の BCG を必要とするための不経済性や、ツ反応陽転の確認を欠いていたことや、厳密な非投与対照群を設けぬ観察成績の統計学的不正確などを理由に、ついに WHO の賛同を得るには至らなかった²⁾。しかし現在の免疫学的見解、特に腸管関連リンパ系組織について明らかにされつつある知見³⁾ からすれば、この経口接種法、したがって経腸管免疫法が今まで軽視され続けてきたことの方がむしろ不思議と言える。少量のワクチンでこと足る非経口接種法が行政的立場において、実用性や経済性ですぐれていることはいうまでもないが、経口接種に伴うワクチン量産あるいは皮内注射用接種技術者養成などに要する経費の多寡とか、接種手技の難易、巧拙、副作用の軽重などのワクチン接種に直接付随する諸問題から暫く離れて、純免疫学的立場から、BCG による免疫力賦与の1方法としての経口接種を再考することが必要だと思う。これは、結核予防のみならず、最近約10年来広く試みられつつある癌の BCG 免疫療法にも関連して、実際的には極めて重要な意義をもつからである。

さてわれわれは、接種局所変化をなくすために BCG 経口接種の効果を改善すべく実験を重ね、幼若モルモットでは 50mg 経口接種で皮下 1mg 接種と同等の抗結核免疫力を示したこと⁴⁾ や、成熟モルモットの十二指腸あるいは胃内へ臓器壁を通して直接注入すれば1~10mg でも充分な免疫効果を発揮しうる⁵⁾ のをみて、BCG 経腸管免疫の有望性を述べたことがある。これらの実験で得た知見は、現在では腸管壁のパイエル板を中心とする腸管関連リンパ組織での感作リンパ球の迅速な増生と全身への循環の結果として理解され、マウスを用いて先年もこの点を確かめた⁶⁾。そこで、過去に必ずしも常には成功と言ひ難かつた成熟モルモットへの経口投与も、接種条件如何によつては充分な抗結核免疫力を与えうる可能性が考えられるので、条件を吟味しつつ、再びこの問題を取り上げた。

1. 動物：第1実験では、体重 250~420 g の正常モルモット15匹を5匹宛の3群に分け、BCG 1回接種群、2回接種群および無処置対照群とし、BCG 接種後経時的にツ反応と BCG の体内分布状況をしらべた。第2実験では、体重 450 g 前後の正常モルモット24匹を6匹宛の4群に分け、BCG 生菌群、加熱死 BCG 群、[加熱死 BCG+不完全 adjuvant(F.I.C.A.)] 群および無処置対照群とした。

2. BCG 接種法と接種生菌数：市販の経皮接種用乾燥 BCG ワクチン (80mg/アンプル) を用いた。生理食塩水で 80mg/0.5 ml に溶解し、BCG 生菌群1匹当たり 0.5 ml を接種した。同一菌液の一部を加熱殺菌し、死菌液として加熱死菌群および [加熱死菌+F.I.C.A.] 群に用いた。経口接種は次のごとくに行なつた。ガラス製の 2 ml 注射筒に、長さ 15 cm のマウス用ゾンデを接続し、これに長さ 20~25 cm のポリエチレン・チューブ (No. 6) を接続したのち、上記菌液を吸い上げ、ポリエチレン・チューブをモルモットの口から食道深く挿入し、0.5 ml の菌液を素早くかつ確実に注入した。器具を図1に示す。

BCG 生菌群モルモット1匹当たりの接種生菌数はそれぞれ次のごとくであつた。第1実験の第1回接種では 56×10^8 v. u. (70×10^6 /mg)、2週後の第2回接種では 35.2×10^8 v. u. (44×10^6 /mg)。第2実験では初回接種 8.8×10^8 v. u. (11×10^6 /mg) とやや少なかつたが、6週後の追加接種では 51.2×10^8 v. u. (64×10^6 /mg) であつた。第2実験では、加熱死菌群、[加熱死菌+F.I.C.A.] も共に BCG 生菌群同様、2回経口接種を行なつた。

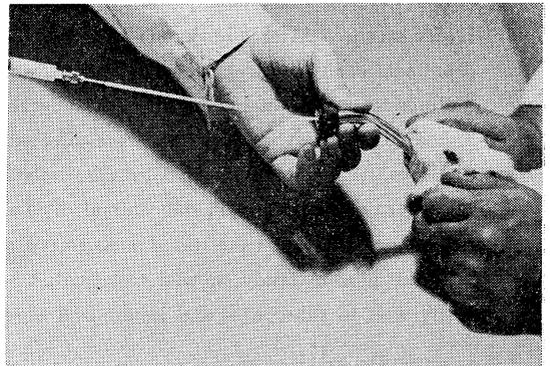


Fig. 1

なお BCG 接種前にはモルモットを空腹にしておく必要があるので、飼育ケージの床は金網のみとし、敷藁を全く用いず、かつ接種前18~24時間は水のみ与え、餌抜きとした。

3. ツベルクリン反応：PPD 10 TU でしらべた。第1実験では、第1回接種後2,4および6週と、第2回接種後の8週目にしらべた。第2実験では第1回接種後6週目と、第2回接種後3週目にしらべた。判定は24時間後の発赤、硬結の大きさによつた。成績は硬結の長短径の平均値で示した。

4. BCG の体内分布の検査 (第1実験)：BCG 第2回接種後4,6および8週の各時期にモルモットを屠殺剖検し、空腸(パイエル板を含む)、腸間膜リンパ節、気管リンパ節および脾を定量培養して菌数をしらべた。すなわち各臓器に2%アルブミン水溶液を加えてガラスホモジナイザーで10mg/mlの乳剤を作り、その1mlおよび0.1mlを3本宛の小川培地に接種培養し、4週後の集落を数えた。

5. 感染防御試験 (第2実験)：強毒結核菌 H₃₇Rv の凍結乾燥菌を蒸留水に再浮遊し、その1ml (2.1×10⁶ v.u./モルモット) を BCG 第1回経口接種後9週目に右下腹部皮下に注射感染し、感染後3週目と6週目に各群3匹宛を屠殺剖検した。肝と脾を10倍乳剤とし、感染菌数を定量培養した。

6. 血清抗体価の測定 (第2実験)：BCG 経口接種後9週目の強毒結核菌感染直前に、各群から心臓穿刺で得た血清を56℃、30分間非動化し、三浦らの方法⁷⁾によつて間接的赤血球凝集価および溶血価を測定した。方法は次のごとくである。

予研製結核菌体 polysaccharide の1.5mg/6ml 生理食塩水で新鮮ヒツジ血球を感作し、これと倍数希釈血清を38℃、2時間作用させる。次いで4℃、18時間放置後、30分間室温におき、凝集の有無を判定。更に4単位の補体を加え、強く振盪し、38℃で1時間作用させたのち、溶血の有無を判定した。

成 績

I. 第1実験：BCG 1回接種後、2回接種後のいずれ

Table 1. Tuberculin Reactions (mm)* in Guinea Pigs after Oral BCG Inoculation

BCG inoculation	Weeks after inoculation			
	2	4	6	8
Once	8.2	16.3	16.0	/
Twice	7.4	13.8	17.0	14.5
(-)	3.4	3.0	3.6	2.6

* Mean of 5 guinea pigs.

においても体重は順調に増加し、6~8週後には700gを越した。ツ反応の成績は表1のごとくである。ツ反応は、接種後4週目には1回接種群16.3mm、2回接種群13.8mm、6週目にはそれぞれ16.0mm および17.0mmで、硬結の明確な反応を呈して陽転し(図2)、全身感作の成立を示した。

臓器定量培養による10mg当りの検出BCG集落数は表2のごとくで、パイエル板を含む空腸および脾からは4~8週を通じて10mg当り数個~20個程度の集落数を得たが、腸間膜リンパ節からはこれらより菌数が少なく、体内他部への速やかな移動のための通路であることを想像させた。これに応じて気管リンパ節は、4~8週にわたり、腫脹して重量も多く、1,200mg→270mg→190mgと推移し、これに相応して他の臓器よりもはるかに多い菌数が検出された。このことは腸管壁から吸収されたBCGが腸管膜リンパ節を経由して急速かつ大量に気管リンパ節に散布されたことを示唆している(表2)。

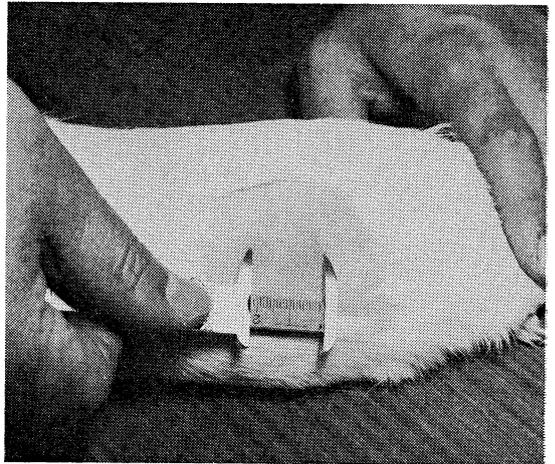


Fig. 2

Table 2. Fate of BCG after Oral Inoculation as Revealed by the Viable Units* per 10 mg of Organs

Organ	Weeks after inoculation		
	4	6	8
Jejunum (Peier's patch)	6.4	13.1	5.6
Spleen	17.7	1.8	0.7
Mesenteric lymph node	0.6	1.0	0
Bronchial lymph node (Weight in mg)	140<	25.7	2.3
	1,200	270	190

* Mean of 3 guinea pigs.

II. 第2実験：体重増加は第1実験同様に極めて良

Table 3. Tuberculin and Serological Reactions of Guinea Pigs in Exp. 2

Group	Guinea pig No.	Tuberculin reactions (mm) at weeks of			Serological reactions at 9th week	
		6	9	12*	H-agglutinin	H-lysis
Living BCG	1	7	15	20	—	—
	2	6	14	20	—	—
	3	4	17	22	—	—
	4	14	19	20	—	—
	5	11	15	22	—	—
	6	10	11	20	—	—
Heat-killed BCG in water	1	5	10	23	—	—
	2	3	5	24	—	—
	3	2	5	21	—	—
	4	7	5	17	—	—
	5	2	4	18	—	—
	6	2	5	22	—	—
Heat-killed BCG in Freund's I. C. Adj.	1	3	5	19	—	—
	2	4	6	20	—	—
	3	11	18	20	+(32×)	—
	4	3	5	24	—	—
	5	4	6	22	—	—
	6	3	5	21	—	—
Non-treated control	1	3	5	21	—	—
	2	3	5	19	—	—
	3	4	4	21	—	—
	4	4	4	22	—	—
	5	2	5	20	—	—
	6	0	5	18	—	—

* 3 weeks after virulent infection at 9th week.

好であつた。ツ反応は BCG 生菌第1回接種後6週目に6匹中の3匹が10mm以下で、陽転効果はあまり良好ではなかつた。これは接種生菌数が少なく、 8.8×10^8 で、第1実験の約1/5であつたためと思われる。そこで追加接種 (51.2×10^8) したところ、3週後には全例10mm以上の明確な陽性反応を呈し、充分な全身感作の成立を示した(表3)。他の3群ではツ反応は死菌群の各1匹に10mm以上を呈したものがあつたが、他はすべて5~6mmに止まつた。BCG 第1回接種後9週目に強毒結核菌を感染し、更に3週後のツ反応をしらべたところ全例20mm程度の極めて強い陽性反応を呈した。

強毒結核菌感染後3週と6週に半数ずつ屠殺剖検した。所見は表4に示すごとくで、BCG 生菌群と他の3群との間には、肉眼所見でも臓器還元培養でも明らかな差が認められる。すなわち BCG 生菌群に比べて他の3群からの培養菌数は10~100倍と多く、無処置対照群、加熱死菌2群の3群間には有意差はない。したがつて、加熱死 BCG に F.I.C.A. を混じても混じなくても、経口接種で抗結核免疫を与えなかつたと言える。ただし、

[死菌+F.I.C.A.] 群の1匹のみではツ反応が陽転し、他の5匹より結核罹患度がやや軽く、かつ血中抗体が32倍程度に証明された。

考 察

かつて行なつたモルモットへの BCG 経口接種実験で、われわれは上述のごとく幼若モルモットでは50mg (70×10^6 /mg) 1回接種で皮下1mg接種と同等の結核菌感染防御力を示したが、成熟モルモットではツ反応は陽転せず、感染を防ぎえなかつたこと³⁾、しかし胃壁あるいは十二指腸壁を通して直接 BCG を注入すれば、1~10mgでも成熟モルモットのツ反応を陽転せしめ、皮下1mg接種と同等の感染防御効果を発揮せしめうることを認めた。これらの実験結果から、胃液による障害を除くか、接種生菌量を充分大量にして有効数の生菌を十二指腸に到達させれば免疫力を賦与できるのではあるまいかと考えた。その後明らかにされた結核免疫の機作に関する知見は、細胞性免疫における経腸管免疫の重要性をも示唆し、改めて BCG 経口接種による抗結核免疫実験を企て

Table 4. Autopsy Findings of Guinea Pigs and the Number of Infected Tubercle Bacilli Recovered from Their Organs

Group	Guinea pig No.	Macroscopic findings								Tubercle bacilli recovered from 10 mg of	
		Organs				Lymph nodes				Spleen	Liver
		lung	liver	spleen (weight)		Knee-fold	retro-peritoneal	portal	retro-sternal		
Living BCG	1	-	-	-	(1.2)	-	+	-	-	20	10
	2	-	-	-	(1.3)	-	+	-	-	140	10
	3	-	-	+	(1.3)*	-	++	-	-	35	5
	4	-	-	+	(1.4)	+	+	-	-	33	4
	5	-	-	+	(1.5)	++	+	+	-	120	4
	6	-	-	+	(1.1)	+	+	+	-	53	0
Heat-killed BCG in water	1	-	-	++	(2.7)	-	-	+	-	580	0
	2	-	+	++	(1.7)	-	++	+	-	490	10
	3	-	+	++	(1.5)	+	+	+	-	1,200	5
	4	-	+	++	(0.9)	++	++	+	+	700	11
	5	-	-	++	(1.4)	++	+	++	+	1,100	19
	6	-	-	++	(1.9)	++	+	+	-	2,100	17
Heat-killed BCG in Freund's I.C. Adj.	1	-	+	++	(1.6)	++	++	+	-	1,500	105
	2	-	+	+++	(1.8)	++	++	+	-	1,850	120
	3	-	+	+	(1.4)	++	+	+	-	380	10
	4	-	-	++	(1.6)	+++	+	+	-	1,300	4
	5	-	+	++	(1.6)	+++	+	+	+	650	21
	6	-	-	++	(1.3)	++	+	+	+	1,100	26
Non-treated control	1	+	-	+	(2.4)	++	+	+	-	600	50
	2	+	+	++	(1.3)	+++	+	+	-	1,100	25
	3	+	++	++	(2.0)	+++	+	+	-	2,000	140
	4	++	++	+++	(5.3)	+++	++	+++	+	3,500	250
	5	++	++	++	(1.6)	+++	+++	+++	+	1,250	70
	6	++	++	++	(2.3)	+++	++	++	-	650	115

Note. 1. () * in living BCG group: number of macroscopic tubercle.

2. Guinea pigs No. 1~3 in each group were sacrificed 3 weeks after infection; No. 4~6 were 6 weeks after infection.

させるに至つた。

そこで本実験では、実験条件を既往の経験に徴して一層厳重にし、まず BCG 接種時にモルモットの胃が全く空であるように18~24時間厳格に餌止めをし、長いゾンデを食道深く挿入して、BCG を手早くかつ確実に注入した。手早い注入は嘔吐を防止できる。その結果は上述第2実験に述べたごとくで、生菌数の少なかつた第1回接種 ($8.8 \times 10^8/1$ 匹) では半数しかツ反応は陽転しなかつたが、第2回 (追加) 接種 ($51.2 \times 10^8/1$ 匹) 後には全例明確な陽性反応を呈して、充分な全身感作の成立を示した。しかも大量の BCG の2回接種にもかかわらず、体重増加は順調で、強毒結核菌感染をも充分防ぎうることを示した。

経口接種後の BCG の体内分布は実験1に述べたが、バイエル板から腸間膜リンパ節を経て急速に脾や遠隔のリンパ節 (気管リンパ節) に多数散布されており、腸管

関連リンパ系から呼吸器関連リンパ系へ急速に運搬されることが推測される。既往のわれわれの実験でも、接種24時間後には早くも気管リンパ節や頸下リンパ節にも BCG が検出されたが、本実験の成績と併せて考察すれば、このような BCG の体内分布からみて、腸管経由の生菌免疫が予想外に速やかに成立すると考えられる。しかも2回接種しても特別な変化を剖検上認めえなかつたが、再接種局所変化や全身反応などがしばしば問題となる非経口接種とは、宿主側の対応のし方が異なると言える。この点に関しては反復接種回数を増して検討している。

第2実験で対照とした加熱死菌2群では、それぞれ1匹を除きすべてツ反応は陽転せず強毒結核菌感染をも防ぎえなかつた。一般に adjuvant を加えた BCG 死菌を皮下、皮内あるいは経皮的に接種すれば、死菌のみとは異なり、BCG 生菌接種後と同様にツ反応は陽転し、あ

る程度の感染防御力を与え、同時に血中抗体価が上昇することはよく知られている。[BCG 死菌+F.I.C.A.] 群中の1匹が陽性ツ反応(18 mm)を示し、血中抗体が凝集価で32倍を示したことは、このモルモットでは adjuvant のよく混つた死菌体がパイエル板を通して吸収されたためと理解される。他の5匹では死菌体と adjuvant とが恐らくは消化液の作用で別べつに離れ、吸収されたとしても免疫力惹起には役立たなかつたのではあるまいか。これに対して生菌群では、血中抗体を全く証明しえなかつた。しかも BCG 生菌接種の反復が血中抗体出現を伴わずに抗結核免疫の強化にのみ役立つとみえる点免疫学的に重要だと思ふ。

緒言でも触れたように、最近広く試みられてその有用性の知られた癌に対する BCG 免疫療法においては、BCG による免疫系細胞の反復刺激を必要とするが、経口接種では非経口接種と異なり、知られる限りの副反応が最も少なく、反復接種に耐え、しかも良好な効果を期待しうることを、われわれはすでに人の肺癌症例などで確かめている⁹⁾。上述したように、経口接種後 BCG が速やかにしかも大量気管リンパ節などに散布される事実は、当然肺マクロファージを賦活化することを示唆するから、肺に感染散布された結核菌の消滅のみならず、肺癌をも含む多くの肺疾患における諸種の異物処理にもまた有用な細胞性免疫反応の発現を期待させる。

BCG 経口接種には大量の BCG を要するから、生菌量当りのツ反応陽転効率の低さや価格の高さが一応問題にはなるが、反面特殊な接種手技を要せず、したがって接種に伴う人件費は低廉ですみ、皮膚の傷痕その他の不快な副作用を対象に与えないことは、経済的に余裕のある社会では特に歓迎されるであろう。

細胞性免疫力増強を必要とする場合が今後ますます増えるので、BCG 経口接種は実用的な方法として再評価されて然るべきものと思ふ。

総 括

空腹状態のモルモットの食道深くゾンデを挿入して BCG を注入接種し、まずツ反応の陽転と BCG の体内分布をしらべた。その結果、ツ反応陽転には生菌数の高いワクチンの接種が必要なこと、再接種も障害なしに耐えうることならびに腸管パイエル板から吸収された BCG が急速に遠隔臓器に散布されることなどがわかつた。次に経口接種後、強毒結核菌を皮下感染したところ、BCG 生菌接種群のみは明らかな感染防御力を示したが、加熱死 BCG 群および〔加熱死 BCG+adjuvant〕群は対照無処置群と全く同様、防御力を示さなかつた。高い生菌数を含むワクチンを経口接種すればツ反応陽転効果したがって免疫効果を期待しえ、何らの副作用もなしに反復接種しうるので、結核のみならず細胞性免疫力を必要とする多くの疾患の予防に活用されるべき方法だと思ふ。

文 献

- 1) Calmette, A.: La vaccination preventive contre la tuberculose par le BCG, Masson et Cie., 1927.
- 2) Rosewberg, J. and da Rocha Passo Filho, M. C.: BCG vaccination by oral route. O Hospital, 78: 89, 1970.
- 3) Müller-Shoop, W. and Good, R. A.: Functional studies of Peyer's patches. Evidence for their participation in intestinal immune response, J. Immunol., 114: 1757, 1975.
- 4) 室橋豊穂・関又蔵・高橋宏: 結核, 33: 176, 1958.
- 5) 室橋豊穂・高橋宏: 51: 198, 1959; 52: 24, 1959.
- 6) 徳永徹・田口悟・片岡哲朗・室橋豊穂: BCG 生菌の経口投与, 第36回日本細菌学会関東支部総会, 1976.
- 7) 三浦馨・橋本達一郎: アレルギー, 15: 780, 1966.
- 8) 室橋豊穂・堀江栄一郎・大堀慶一・佐藤博: 最新医学, 33: 1663, 1978.