

原 著

BCG Tokyo 172株の抗結核効果：結核菌噴霧感染による
モルモット肺結核実験モデルを用いた防御効果の検討

^{1,2}山本十糸子 ²Susan PHALEN ³内田 和幸 ¹梅森 清子
¹野島 康弘 ⁴堀内 善信 ⁵後藤 義孝
²David N. MCMURRAY ¹山本 三郎

¹国立感染症研究所細菌・血液製剤部, ²Texas A&M 大学連合医科大学医学微生物免疫学部,
³宮崎大学農学部獣医学科家畜病理学講座, ⁴国立感染症研究所安全性研究部,
⁵宮崎大学農学部獣医学科家畜微生物学講座

PROTECTIVE EFFICACY OF BCG TOKYO 172 IN THE GUINEA PIG
MODEL OF PULMONARY TUBERCULOSIS

^{1,2}Toshiko YAMAMOTO, ²Susan PHALEN, ³Kazuyuki UCHIDA, ¹Kiyoko UMEMORI,
¹Yasuhiro NOJIMA, ⁴Yoshinobu HORIUCHI, ⁵Yoshitaka GOTO, ²David N. MCMURRAY,
and ^{1*}Saburo YAMAMOTO

^{1*}Dept. Bacterial & Blood Products, National Institute of Infectious Diseases, ²Dept. Medical
Microbiology & Immunology, College of Medicine, Texas A & M University, ³Dept. Veterinary
Pathology, Miyazaki University, ⁴Dept. Safety Research on Biologics, National Institute of
Infectious Diseases, ⁵Dept. Veterinary Microbiology, Miyazaki University

BCG Tokyo 172 strain was examined for its protective efficacy against pulmonary tuberculosis in a guinea pig model. Guinea pigs were vaccinated with an intradermal injection of 10^3 CFU of BCG Tokyo 172 strain. BCG Copenhagen 1331 was employed as a control strain. Eight weeks after the vaccination, the animals were infected with about 10^7 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv by a respiratory route in an aerosol chamber. Five weeks after infection, the animals were euthanized and their spleens, lungs and livers were obtained for enumeration of *M. tuberculosis* H37Rv and histopathological examinations. The mean \log_{10} CFU of *M. tuberculosis* H37Rv recovered from right lower lung lobes of guinea pigs vaccinated with BCG Tokyo 172 (frozen), BCG Tokyo 172 (freeze-dried), BCG Copenhagen 1331 (freeze-dried) and placebo were 4.72, 4.23, 4.35 and 5.76, respectively. The mean \log_{10} CFU of the bacteria recovered from spleens were 2.11, 1.51, 1.37 and 5.90, respectively. There was a significant difference in bacterial recovery from both lung and spleen between the vaccinated and the non-vaccinated groups. No significant difference was seen among the groups vaccinated with different strains of BCG in any organ. The lungs exhibited just small granulomatous nodules and the spleens showed no

*〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

* 4-7-1, Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011 Japan.
(Received 9 Nov. 1999/Accepted 24 Jan. 2000)

granulomatous nodules in the BCG-vaccinated guinea pigs. On the other hand, the lungs and spleens from non-vaccinated guinea pigs showed much larger granulomatous nodules with central necrosis. These histopathological difference between the vaccinated and the non-vaccinated guinea pigs was consistent with the difference of bacterial growth between them. The results of this study have clearly indicated that BCG Tokyo 172 strain possesses a significant protective efficacy against *M. tuberculosis* as well as BCG Copenhagen 1331 strain. These results have also shown that the respiratory infection model in guinea pigs is very useful to evaluate efficacy of vaccines against pulmonary tuberculosis.

Key words: BCG, Vaccination, Protective efficacy, Experimental airborne tuberculosis, Guinea pig pulmonary tuberculosis

キーワード: BCG, ワクチン, 防御効果, 結核菌噴霧感染, モルモット肺結核モデル

緒言

現在世界の結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染者の総数は20億人を超え、結核発病者は年間800万人、死亡者は300万人で、感染症の中で結核は最大の死亡原因となっている。また近年増加している HIV 感染者の結核感染は直ちに結核発病につながる率が非常に高く「エイズと結核の共感染」は重大な脅威となっている。さらに最近不適切な化学療法による多剤耐性結核菌の出現が治療を困難にしている。このような事態に対し、WHO は1993年に緊急事態宣言を発した¹⁾²⁾。この世界的規模の非常事態を克服するために、結核に対する唯一のワクチンとして用いられてきた生菌ワクチン BCG (Bacille Calmette-Guérin) に加え、より安全で効果的なワクチン—BCG の改良、弱毒ヒト型結核菌ワクチン、栄養要求変異株ワクチン、死菌ワクチン、サブユニットワクチン、DNA ワクチン等—の開発が期待されている^{2)~4)}。

BCG は1921年から液体生菌ワクチンとして用いられ始め、1950年ころから凍結乾燥菌ワクチンとして用いられている。わが国は、1924年⁵⁾に Calmette から分与された BCG 菌株を原法に従って忠実に継代し、1961年にワクチン株として BCG Tokyo 172株をシードロットに採用した。BCG のシードロットとしてはほかに London 1077株 (Glaxo株、最近は Pasteur-Merieux 株と呼称されている)、Copenhagen 1331株、Pasteur 1173P2株等がある。BCG ワクチンは最も安全性の高いワクチンの1つと考えられているが、これらの中でも、Tokyo 172株は新生児化膿性リンパ節炎等の副作用が少なく⁶⁾、さらにわが国では経皮法で接種されるので局所の潰瘍、膿瘍等の副作用の頻度は著しく低い⁷⁾。BCG ワクチンの結核予防効果に関しては、極めて有効から無

効まで幅広い報告があるが^{8)~11)}、現在は Colditz らの「結核性髄膜炎や粟粒結核などの重症結核には高い有効性を認め、肺結核は50%発病率が低くなる」という結論¹²⁾が世界の BCG 評価のコンセンサスとなっている。

BCG ワクチンの結核予防効果の差異の原因の1つとして、BCG ワクチン亜株の有効性の違いが考えられた。ヒト野外実験でのワクチン株の種類と防御効果に関する直接的なデータはないので、ケースコントロール実験の結果を再解析し、その相関関係を評価しようとする試みがなされたが、明確な結果は得られなかった⁴⁾。しかしながら、BCG Tokyo 172株はより弱毒化されており⁶⁾ また Comstock¹¹⁾により限定的ながら BCG Tokyo 172株は、Pasteur 1173P2株や Copenhagen 1331株よりも有効であることが示唆され、国内のみならず海外でも多く使用されている。動物実験による評価もさまざまに試みられたが、それぞれの動物実験の方法(使用動物、ワクチン投与スケジュール、感染菌株、感染菌量、感染経路、防御効果判定法等)が異なり、相互に正確な比較をすることが困難であった⁴⁾。

近年 Lagranderie ら¹³⁾により、5種類の BCG 亜株をマウスに免疫し、その後の残存 BCG 菌数、チャレンジした組み換え型 BCG (rBCG) の定着阻止能、遅延型アレルギー反応 (DTH)、サイトカイン産生能、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性および抗体産生能を比較し Tokyo 172株は免疫原性が低いという成績が報告された。その後この成績に対する評価は行われていないにもかかわらず、この成績から直ちに Tokyo 172株のヒトに対する結核予防効果が低いのかのような誤解を生じている場合もあるので、今回著者らはモルモットにワクチン接種後、低菌量の強毒結核菌を噴霧感染させ、惹起された肺結核の程度でワクチンの有効性を評価する実験系¹⁴⁾を用いて BCG Tokyo 172株の抗結核防御効果を検討

したので報告する。

材料および方法

動物：SPFのハートレイ系モルモット（200～250g，雌雄は問わず）はCharles River Laboratories Inc.（Wilmington, MA, U.S.A.）より購入した。モルモットは随時市販のモルモット用飼料（Ralston Purina Inc., St. Louis, MO）と水を摂取できるポリカーボネイト製飼育箱に1匹ずつ入れて、気温、湿度、および明暗を一定に保持し、空気濾過のできる動物飼育室で飼育した。

免疫：BCG Tokyo 172株は凍結乾燥標品（日本ビーズジー製造，東京）および培養直後に -80°C で保存した冷凍標品を用いた。対照のBCG 亜株としてテキサスA & M大学の結核ワクチン前臨床試験の標準株であるCopenhagen 1331株（凍結乾燥品，Statens Serum-institut, Copenhagen, Denmark）を用いた。いずれのBCGも使用直前に生理的食塩水で希釈して生菌数を 10^4 CFU/mlに調整した。モルモットを無作為に振り分け5匹を1群とし，BCG懸濁液0.1mlを皮内接種した。対照群には生理的食塩水0.1mlを皮内注射した。

ツベルクリン反応：BCG免疫8週後にモルモット腹部の毛を除去し，ツベルクリンPPD（Connaught Laboratories, Toronto, Canada）250 TUを皮内注射した。24時間後に硬結をキャリパスを用いて測定した。

結核菌噴霧感染：*M. tuberculosis* H37Rv（ATCC 27294）株は，0.05% Tween 80を含むDubos broth（Difco, Detroit, MI, U.S.A.）で8～10日間培養増殖後集菌し，single cell suspensionとした後1mlずつ分注し， -80°C で保存した¹⁵⁾。噴霧感染直前に冷凍菌液を融解し使用した。*M. tuberculosis* H37Rv株の生菌数はMiddlebrook 7H10寒天平板（Hardy Diagnostics, Santa Monica, CA）で培養することにより確認した。ツベルクリン反応測定の翌日，噴霧装置内でモルモットに*M. tuberculosis* H37Rvを噴霧し肺胞内に5～10 CFUを感染させた¹⁴⁾。噴霧は生物学的封じ込めレベル（BSL）3の動物実験室で行い，感染後のモルモットは，随時飼料と水を摂取できるステンレス製飼育箱に1匹ずつ入れ感染防止カバーで覆いBSL3動物飼育室で飼育した。

臓器摘出：感染5週後にモルモットに100mg/kgのsodium pentobarbitalを腹腔注射し安楽死させ脾臓と右肺下葉を無菌的に摘出して*M. tuberculosis* H37Rvの臓器内生菌数測定に使用した。脾臓の一部，左肺下葉並びに肝臓は摘出後ホルマリン固定し病理組織学的観察に付した。

M. tuberculosis H37Rvの臓器内生菌数測定：無菌的に摘出した右肺下葉および脾臓を4.5mlの無菌生理的食塩水中に浸し，ホモジナイザーで均質化した後生理的食塩水で希釈し，各々0.1mlをMiddlebrook 7H10寒天平板に接種した。寒天平板を培養缶に入れ 37°C で培養し3週後にコロニー数を計測した。

統計解析：ツベルクリン反応による硬結，並びに結核菌感染後の体重変化の計測値は分散分析法により解析した。肺および脾臓の結核菌生菌数計測値は，対数変換した後，分散分析法により解析した。また脾臓の生菌数については，必要に応じ下側1.65での打ち切り標本として分散および平均値を最尤法により推定した。結果の有意性判定は危険率5%の水準で行った。

病理組織学的検索：10%ホルマリン液で固定した肺，肝，および脾臓は，肉眼的に結核結節の有無を観察した後，定法に従い各々パラフィン包埋し， $2\mu\text{m}$ 切片とした。切片にヘマトキシリン・エオジン染色，チール・ネルゼン染色を施し，病理組織学的に検索した。

結 果

ツベルクリン反応：BCG Copenhagen 1331株，BCG Tokyo 172株（凍結乾燥標品および冷凍標品）で免疫したモルモットは，ツベルクリンPPDによりほぼ同程度に陽性の遅延型アレルギー反応（DTH）を示した。対照群はDTH陰性であった（Table 1）。

M. tuberculosis H37Rv感染後の体重変化：各BCG免疫群並びに対照群のモルモットの*M. tuberculosis*感染後の体重の変化をTable 2に表示した。いずれの群でも体重増加がみられ，ワクチン群間にも，またワクチン群と対照群の間にも有意な差は認められなかった。

M. tuberculosis H37Rv臓器内生菌数測定：右肺下葉並びに脾臓から回収された菌数と統計学的評価の結果をTable 3に示した。肺内生菌数はいずれのワクチン群でも非免疫対照群に比べ有意な減少がみられた。また脾臓の生菌数についてはワクチンの効果は著明で，対照群に比べておおむね 10^4 の減少がみられた。統計学的な評価の結果，肺，脾臓いずれも免疫群と対照群の間には有意な違いが認められたが，用いたワクチン間に有意な効果の違いは認められなかった。

病理学的検索結果：固定後の肺，肝，脾の肉眼所見，および病理組織学的検索結果をTable 4に，また肺と脾の病理組織写真をFig.に示した。ほとんど全検体で，肉眼的に肺の白色結節病変が観察された。一方，対照群の全例において脾に明瞭な結節病変が観察されたのに対し，BCG免疫群では，脾に肉眼的異常がみられるものは極めて稀であった。病理組織学的結果は，それぞれの

Table 1 The induration by PPD^{a)} of vaccinated^{b)} and non-vaccinated guinea pig

BCG strain	Mean radius of induration (mm) (95% confidential limits)
Tokyo 172 (Frozen)	19.35 (15.28 - 23.43)
Tokyo 172 ^{c)} (Freeze-dried)	17.11 (14.63 - 19.58)
Copenhagen 1331 ^{d)} (Freeze-dried)	18.66 (13.34 - 23.98)
Placebo	3.21 (0.69 - 5.73)

- a) Guinea pigs were shaved on the abdomen and injected with 250 TU of PPD (Connaught Laboratories, Toronto, Canada) intradermally. Induration was measured 24h after injection by using calipers.
 b) Each animal received a single, intradermal injection of 10³ CFU of viable *M. bovis* BCG in 0.1ml of saline 8 weeks before skin test.
 c) Japan BCG Laboratory, Tokyo Japan.
 d) Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.

Table 2 The weight gain of vaccinated and non-vaccinated guinea pigs after infection with *M. tuberculosis* H37Rv

BCG strain	Weight gain (g) (95% confidential limits)				
	D8 ^{a)}	D15	D24	D29	D34
Tokyo 172 (Frozen)	42.6 (27.5 - 57.7)	60.2 (49.2 - 71.2)	74.6 (58.1 - 91.1)	81.8 (68.2 - 95.4)	96.2 (80.3 - 112.2)
Tokyo 172 (Freeze-dried)	24.4 (6.9 - 41.9)	36.8 (21.5 - 52.1)	52.2 (31.1 - 73.3)	67.4 (45.2 - 89.6)	65.6 (43.7 - 87.5)
Copenhagen 1331 (Freeze-dried)	24.6 (7.5 - 41.7)	44.2 (27.6 - 60.8)	39.4 (22.0 - 56.8)	67.8 (50.0 - 85.6)	43.0 (22.5 - 63.5)
Placebo	17.0 (7.4 - 26.6)	38.4 (28.5 - 48.3)	22.2 (5.8 - 38.6)	40.2 (20.6 - 59.8)	38.0 (14.6 - 61.5)

a) Days post challenge.

病変をスコア化して評価した。すなわち、組織球系細胞（肺胞マクロファージ、脾洞の組織球系細胞、肝のクッパー星細胞等）の増数はあるが肉芽腫形成のみられないもの（-）、小型の肉芽腫を少数認めるもの（+）、大小の肉芽腫を多数認めるもの（++）、および大小の肉芽腫を多数認め肉芽腫中心部に凝固壊死（乾酪壊死）を伴うもの（+++）に分類して記載した。対照群とBCG免疫群の相違は、Fig. のBとDに示されるように脾で極めて顕著であった。対照群のモルモット全例で、脾に中心性の凝固壊死部を有する大型肉芽腫結節が多数形成されていたのに対し、BCG免疫群では、脾に肉芽腫結節が形成されている例は極めて稀であった。肺について

は、全群・全症例で種々の程度で肉芽腫結節の形成が確認されたが、対照群において、特に大型で凝固壊死を伴った肉芽腫結節が形成される傾向が明らかであった（Fig. AとC）。なお、BCG Tokyo 172株の凍結乾燥標品および冷凍標品、BCG Copenhagen 1331株で免疫されたモルモットでは、各群の肺、肝、脾の病変はほぼ同程度であり、病理組織学的相違を明確にすることは困難であった。

考 察

ヒト肺結核の実験モデル動物としては現在モルモット、マウス、ウサギ等が用いられている。モルモットは *M.*

Table 3 (A) The numbers of *M. tuberculosis* H37Rv recovered from the tissues of vaccinated and non-vaccinated guinea pigs euthanized at 35 days after infection

BCG strain	Animal #	CFU	
		Spleen	Lung ^{a)}
Tokyo 172 (Frozen)	# 102	10,400	15,300
	# 107	<45	47,300
	# 110	<45	113,000
	# 114	225	46,800
	# 120	765	109,000
Tokyo 172 (Freeze-dried)	# 101	<45	22,300
	# 108	270	105,000
	# 112	<45	7,110
	# 116	495	24,100
	# 119	<45	3,420
Copenhagen 1331 (Freeze-dried)	# 103	<45	6,500
	# 106	135	78,300
	# 111	<45	23,600
	# 113	<45	13,800
	# 117	2,030	32,200
Placebo	# 104	414,000	311,000
	# 105	3,210,000	810,000
	# 109	5,430,000	1,120,000
	# 115	1,790,000	495,000
	# 118	24,900	455,000

a) The right lower lobe.

tuberculosis に感受性で特に炎症性刺激に対する肺の反応はヒトに非常に類似しており、加えて急性並びに慢性の炎症メディエーターに対する皮膚反応もヒトに非常に類似している。Calmette と Guérin による BCG の前臨床試験はモルモットを用いて行われ、また Koch の結核菌感染モルモットに結核菌を皮内注射することにより惹起される DTH (Koch 現象) の観察はツベルクリンの力価試験にモルモットが使用される基礎となった。

マウスは本来低菌量結核菌感染に対して低感受性で *M. tuberculosis* に対する抵抗性がヒトと異なり、ヒト肺結核の動物モデルとして適当ではない。しかし安価に入手できバイオハザードの点も含めて取り扱いが容易である。さらに現在では多種類の近交系マウス並びに特定遺伝子が欠落した近交系マウスが存在し、多種類のサイトカイン並びにそれらに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体が市販され容易に入手できる。そのため、近年マウスを用いて結核の感染防御機構が精力的に研究されている。

それに対し、モルモットのサイトカイン並びにそれに対する抗体、細胞表面抗原マーカーに対する抗体等が非

常に少なく入手困難であることが、モルモットを用いる感染防御機構の研究を困難にしている。さらに近交系モルモットが非常に少数で、入手が容易でないことが、結核に対する免疫学的・遺伝学的な研究に支障を来している。

ウサギは *M. bovis* には感受性が非常に高いが *M. tuberculosis* に対する感受性は低い。しかしながら、*M. tuberculosis* の感染病巣に空洞を形成するので病理組織学的研究には有用である。研究の目的により使用する動物種を選択することが必要である。

M. tuberculosis の実験的感染経路として静脈内、腹腔内、気道等がある。気道感染は定量的感染技術とバイオハザード阻止の点で困難さがあるが、1950年代に入りヒトの結核菌感染経路に近似の噴霧感染系を作成する試みがなされた¹⁶⁾。Smithらの研究グループは長年にわたる基礎的な研究により低菌量(5~10CFU)の結核菌をモルモットに噴霧感染し肺結核を惹起する実験系を確立し¹⁴⁾その実験系を用いて、結核菌感染初期の病像の研究、BCG等のワクチン効果の研究等を推進した^{14) 15) 17)~20)}。

抗結核ワクチン効果を正確に評価するためには、動物

Table 3 (B) Analysis of variance table for viable number of *M. tuberculosis* H37Rv

Lung ^{a)}				
Factor	Sum of Sq.	DF	Mean Sq.	F
Treatment	6.616	1	6.616	40.121*
Vaccine	0.673	2	0.337	2.041
Error	2.639	16	0.165	
Total	9.928	19		
Vaccine	n	Mean log ₁₀ CFU	95% confidential limits	
Tokyo 172 (F) ^{b)}	5	4.72	4.28 - 5.16	
Tokyo 172 (FD) ^{c)}	5	4.23	3.52 - 4.93	
Copenhagen 1331 (FD)	5	4.35	3.84 - 4.85	
Placebo	5	5.76	5.49 - 6.03	
Spleen				
Factor	Sum of Sq.	DF	Mean Sq.	F
Treatment	67.277	1	67.277	52.795*
Vaccine	1.552	2	0.776	0.609
Error	20.389	16	1.274	
Total	89.218	19		
Vaccine	n	Mean log ₁₀ CFU	95% confidential limits	
Tokyo 172 (F)	5	2.11	0.62 - 3.61	
Tokyo 172 (FD)	5	1.51	0.23 - 2.80	
Copenhagen 1331 (FD)	5	1.37	0 - 2.88	
Placebo	5	5.90	4.74 - 7.07	

* Significant ($p < 0.01$). ^{a)} The right lower lobe. ^{b)} Frozen. ^{c)} Freeze-dried.

実験に際しヒトに使用される予防接種の条件およびヒトの結核感染条件に近似の条件を用いることが必要である。Wiegshaus と Smith²¹⁾ はワクチン効果評価のための動物実験では①ワクチン量は防御効果を期待できる最低量であること、②非特異的な抵抗性を排除するためにワクチン投与後6週以降に有毒結核菌でチャレンジすること、③チャレンジは気道感染によること、④チャレンジ量は動物に感染惹起可能な最低菌量（マウスおよびモルモット1匹当たり5~10 CFU が妥当である）で行うこと、⑤予備試験によりチャレンジ後ワクチン効果が最大に示される期間を求めておき、その期間内の早期に動物を安楽死させてワクチン効果を評価することなどが必須であると報告した。その条件下で Smith ら¹⁹⁾ は10種類の BCG 亜株をヒトに投与する 1/600 量でモルモットを免疫しその抗結核効果を評価した。その結果、試作段階の1株以外の9株は効果に若干の差異はあるが、有効な抗結核効果を示した。使用 BCG 亜株はすべて匿名で記載されているが、論文の内容から有効な9株の中には Tokyo 172 株と Copenhagen 1331 株が入っていると

推定される。今回われわれは彼らとほぼ同様な方法¹⁴⁾ で Tokyo 172 株の抗結核効果を検討し、Tokyo 172 株は凍結乾燥標品も冷凍標品も Copenhagen 1331 株と同等の防御効果を示す結果を得た (Table 1, 3, 4)。

Lagranderie ら¹³⁾ は BALB/c マウスを用いて BCG Pasteur 1173P2 株, Glaxo 1077 株, Russian 株, Prague 株および Tokyo 172 株の免疫原性を① BCG 各株 (10^6 CFU) を静脈注射し脾臓内での増殖、② BCG 各株 (10^6 CFU) を静脈投与で免疫後、rBCG (10^6 CFU) を静脈注射でチャレンジし、rBCG に対する防御能、③ BCG 各株 (10^9 CFU) を皮下投与で免疫後リンパ節細胞を採取し PPD で刺激してその細胞の BCG 感染肺胞マクロファージに対する CTL 活性、④ BCG 各株を静脈投与 (2×10^7 CFU, 2 回) あるいは経口投与 (5×10^9 CFU) で免疫した後の抗 PPD 抗体産生能、⑤ BCG 各株 (10^9 CFU) を皮下投与で免疫後リンパ節細胞の PPD 刺激による増殖能、⑥ BCG 各株 (10^9 CFU) を皮下投与で免疫後、リンパ節細胞の PPD あるいは ConA 刺激による IFN- γ と IL-2 産生能、⑦

Table 4 The results of pathological examination

BCG strain	Animal No.	Gross lesion* (presence of nodules)			Histological score**		
		Lung	Liver	Spleen	Lung	Liver	Spleen
Tokyo 172 (Frozen)	# 102	+	+	+	++	++	-
	# 107	+	-	-	++	+	-
	# 110	+	-	-	++	+	-
	# 114	+	-	-	++	+	-
	# 120	+	-	-	++	+	-
Tokyo 172 (Freeze-dried)	# 101	+	-	-	+++	+	-
	# 108	+	-	-	+++	+	+
	# 112	-	-	-	+	-	-
	# 116	+	-	-	++	+	-
	# 119	-	-	-	+	-	-
Copenhagen 1331 (Freeze-dried)	# 103	+	-	-	+++	+	+
	# 106	+	-	-	+	+	-
	# 111	+	-	-	+	-	-
	# 113	+	-	-	++	+	-
	# 117	+	-	-	++	+	-
Placebo	# 104	+	-	+	+++	+++	+++
	# 105	+	+	+	+++	+++	+++
	# 109	+	-	+	++	++	+++
	# 115	+	-	+	+++	++	+++
	# 118	+	-	+	+++	++	+++

* +; visible nodules. -; no nodule.

** -; No granulomatous nodule (GN) but diffuse histiocytosis, +; a few small GNs, ++; many GNs varying in size, +++; many GNs with central coagulation necrosis.

BCG 各株を静脈投与 (10^7 CFU), 皮下投与 (10^9 CFU) および経口投与 (5×10^9 CFU) で免疫した後, PPD 特異的 DTH 等を比較検討した。その結果 BCG 5 株の間で免疫原性に差があることを報告した。その中でも Tokyo 172 株はいくつかの点 (上記①~④, ⑦) で低い成績を示した。Pasteur 1173P2 株は静脈注射により投与された後脾臓で増殖し, その後も脾臓中によく残存しているが, Tokyo 172 株は増殖することなく漸次減少している。12 週後の残存菌数は, Pasteur 1173P2 株の 10^6 CFU に対し Tokyo 172 株は 10^3 CFU であった。BCG は生菌ワクチンで, 投与後も残存することがワクチン効果に必須であるが, 効果を発揮するためにはどのくらいの菌数が必要であるかについては, 明確でない。Lagranderie ら²²⁾ が 10^2 CFU と 10^5 CFU の Pasteur 1173P2 株をモルモットに皮下投与で免疫後, $5 \sim 7$ CFU の *M. tuberculosis* H37Rv でチャレンジした結果では 10^2 CFU 投与も 10^5 CFU 投与もほぼ同等のワクチン効果を示している。Teulieres ら²³⁾ はヒト 1 歳未満児に Pasteur 1173P2 株を皮下投与した際に, 0.05 mg (2.5×10^5 CFU 相当) 群では 5.5% に, その半量の 0.025 mg

(1.2×10^5 CFU 相当) 群では 0.7% に化膿性リンパ節炎を認め, またツベルクリン反応で評価する限り両者のワクチン効果に差はなかったと報告している。これらの報告は, BCG 菌量が多ければワクチン効果が大きくなるわけではなく, かえって副作用を惹起することを明示している。Lagranderie ら¹³⁾ により示された Pasteur 1173P2 株等が投与後 8~80 倍増殖することがワクチン効果と副作用の両面にいかに作用するのか興味深い, マウスに 10^6 CFU 以上の BCG を投与する実験系で得られた結果が, ヒトに対するワクチン効果評価の基礎データになり得るかは疑問の残るところである。

近年 BCG に勝る抗結核ワクチン開発を目指して, 多くの rBCG, 栄養要求変異結核菌株ワクチン, 弱毒ヒト型結核菌株ワクチン, 死菌ワクチン, コンポーネントワクチン, DNA ワクチン等が作製され動物実験での評価が報告されている^{4) 24) ~ 29)}。ワクチン投与法は皮下注射, 皮下注射のほか筋肉注射, 粘膜免疫等が工夫され, ワクチン効果を *in vitro* 系で予備的に評価する試みもなされている。

今回著者らが採用したモルモットにワクチン投与後低

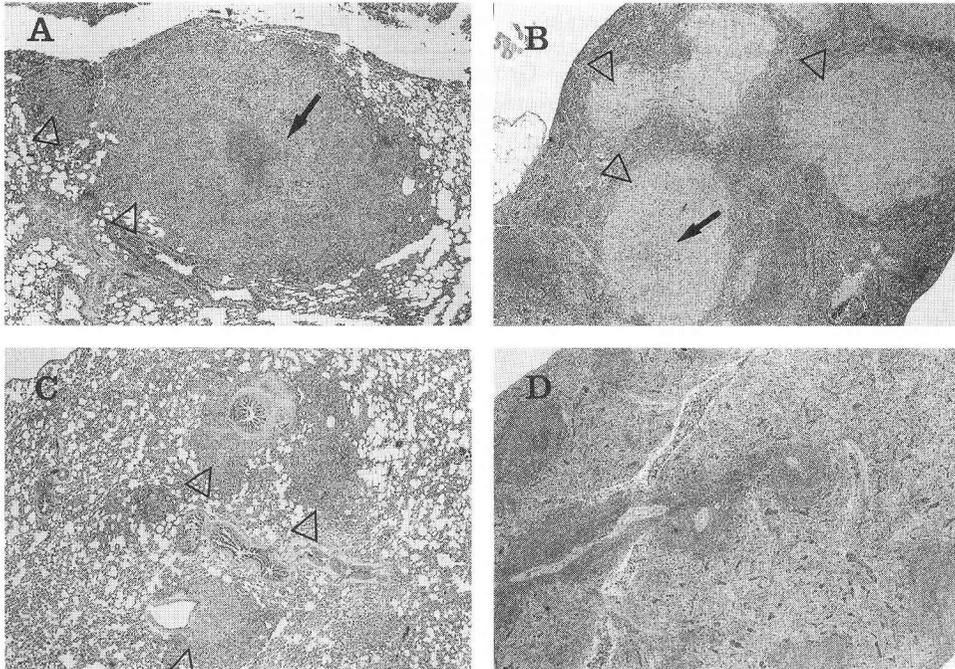


Fig. The histological lesions of lungs and spleens from BCG-vaccinated and non-vaccinated guinea pigs. Guinea pigs were euthanized and tissue sections were taken 5 weeks after infection with a low dose (5~10 CFU) of *M. tuberculosis* H37Rv by respiratory route in an aerosol chamber. The formalin-fixed tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. (A) The lung from a non-vaccinated guinea pig (#105) with large granulomatous nodules (arrow heads) with central necrosis (arrow). (B) The spleen from a non-vaccinated guinea pig (#105) with large granulomatous nodules (arrow heads) with central necrosis (arrow). (C) The lung from a BCG-vaccinated guinea pig (#107) with small granulomatous nodules (arrow heads). (D) The spleen from a BCG-vaccinated guinea pig (#107) with no granulomatous nodules but diffuse histiocytosis in sinuses. (Magnification, $\times 25$)

菌量の強毒結核菌を噴霧感染させ、惹起された肺結核症の程度で評価する実験系¹⁴⁾は現時点で実施可能なヒト肺結核に対するワクチン評価系として最も信頼されている。本研究でも病理組織所見 (Table 4) は臓器内菌数 (Table 3) をよく反映し、またこれらの結果はヒトの結核に対する BCG の「肺結核は 50% 発病率が低くなり血行性の結核性髄膜炎や粟粒結核などの重症結核には高い有効性を認める」という評価とよく一致し実験系の信頼性が確認された。しかしながら実験者自身が安全に強毒結核菌を動物に噴霧感染させ、感染した動物を飼育するためにはかなり大規模な BSL 3 の動物実験室並びに動物飼育室が必須である。今回の噴霧感染実験は設備の整った米国 Texas A & M 大学で行ったが、わが国でもすでに結核予防会結核研究所はその施設を有し、国立感染症研究所等も徐々に整備してきているので、将来的に

は国内で実施可能である。ヒト結核感染経路に近似の噴霧感染系を用いて多くの新たな抗結核ワクチン候補の評価が国内で実施され、現在の BCG よりも有効なワクチンが開発されることを願う次第である。

謝 辞

ご校閲賜った橋本達一郎筑波大学名誉教授と戸井田一郎日本 BCG 研究所所長に感謝申し上げます。また、動物実験は Dr. A. Jeevan, Ms. S. Sedberry, Ms. L. Sims, Mr. M. Lyons, Mr. T. Lasco (Dept. Medical Microbiology & Immunology, College of Medicine, Texas A & M Univ.) および実験動物研究室 (School of Veterinary Medicine, Texas A & M Univ.) の多大な協力のもとに遂行が可能であった。論文作成に際し豊生幸子氏 (国立感染症研究所細菌・血液

製剤部)の多大な支援を受けた。各位の労をいとわぬご協力に感謝致します。

この研究は厚生科学研究「新興・再興感染症研究事業(結核症及び非結核性抗酸菌症における生体防御機構の解明とその予防・診断・治療への応用)」、ヒューマンサイエンス振興財団「創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業(免疫増強性オリゴDNA配列を組み込んだ抗結核ワクチンの開発と評価技術の確立)」並びにヒューマンサイエンス振興財団「新興・再興感染症研究推進事業に係る外国への日本人研究者派遣事業」の支援を受け遂行された。

文 献

- 1) Kochi A: Tuberculosis as a global emergency. 結核. 1996; 71: 319-327.
- 2) 志村昭光, 他: 新時代の結核研究と対策について—1999年. 結核. 1999; 74: 623-652.
- 3) Davey S: Tuberculosis. In: State of the world's vaccines and immunization, WHO, Geneva, 1996, 63-66.
- 4) Bloom BR, Fine PEM: The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. In: Tuberculosis, pathogenesis, protection and control, Bloom BR, Am Soc Microbiol, Washington DC, 1994, 531-557.
- 5) 渡辺義政: カルメット氏 BCG 「ワクチン」ヲ似テセル結核免疫試薬. 結核. 1929; 7: 496-511.
- 6) Milstien JB, Gibson JJ: Quality control of BCG vaccine by WHO: A review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. Bull WHO. 1990; 68: 93-108.
- 7) 橋本達一郎, 山本三郎: BCG ワクチン. 治療学. 1998; 32: 1505-1509.
- 8) Fine PEM: The BCG story: Lessons from the past and implications for the future. Rev Infect Dis. 1989; 11 Suppl 2: 5353-5359.
- 9) 森 亨: BCG 接種の効果の証明. 資料と展望. 1992; 2: 1-13.
- 10) Rodrigues LC, Smith PG: Tuberculosis in developing countries and methods for its control. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1990; 84: 739-744.
- 11) Comstock GW: Identification of an effective vaccine against tuberculosis. Am Rev Respir Dis. 1988; 138: 479-480.
- 12) Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al.: Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA. 1994; 271: 698-702.
- 13) Lagranderie MRR, Balazuc AM, Deriaud E, et al.: Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. Infect Immun. 1996; 64: 1-9.
- 14) Wiegshauss EH, McMurray DN, Grouet AA, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis III. Relevance of microbial enumeration to acquired resistance in guinea pigs. Amer Rev Respir Dis. 1970; 102: 422-429.
- 15) Grouet AA, Kim HK, Wiegshauss EH, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis II. Reproducible infection by means of an inoculum preserved at -70°C. J Bacteriol. 1967; 94: 832-835.
- 16) Middlebrook GM: An apparatus for airborne infection of mice. Proc Soc Exp Biol Med. 1952; 80: 105-110.
- 17) Smith DW, Wiegshauss E, Navalkar R, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis I. Preliminary studies in BCG-vaccinated and nonvaccinated animals. J Bacteriol. 1966; 91: 718-724.
- 18) Smith DW, McMurray DN, Wiegshauss EH, et al.: Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis IV. Early events in the course of infection in vaccinated and nonvaccinated guinea pigs. Am Rev Respir Dis. 1970; 102: 937-949.
- 19) Smith D, Harding G, Chan F, et al.: Potency of 10 BCG vaccines as evaluated by their influence on the bacillemic phase of experimental airborne tuberculosis in guinea-pigs. J Biol Stand. 1979; 7: 179-197.
- 20) McMurray DN: Guinea pig model of tuberculosis. In: Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control, Bloom BR, Am Soc Microbiol, Washington DC, 1994, 135-147.
- 21) Wiegshauss EH, Smith DW: Evaluation of the protective potency of new tuberculosis vaccines. Rev Infect Dis. 1989; 11: 484-490.
- 22) Lagranderie M, Ravisse P, Marchal G, et al.: BCG-induced protection in guinea pigs vaccinated and challenged via the respiratory

- route. *Tubercle Lung Dis.* 1993 ; 74 : 38-46.
- 23) Teulieres L, Diouf MA, Chaud P, et al. : Comparative trial of administration of half (0.05 mg) and quater (0.025mg) dose of intradermal Pasteur BCG on 291 infants from birth to 1 year in French Guyana. *Vaccine.* 1991 ; 9 : 521-524.
- 24) Tascon R, Colston MJ, Ragno S, et al. : Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Med.* 1996 ; 2 : 888-892.
- 25) Huygen K, Content J, Denis O, et al. : Immunogenicity, and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med.* 1996 ; 2 : 893-898.
- 26) Zhu X, Venkataprasad N, Thangarai H, et al. : Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1997 ; 158 : 5921-5926.
- 27) Denis O, Tanghe A, Palfliet K, et al. : Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial Antigen 85A stimulates CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect Immun.* 1998 ; 66 : 1527-1533.
- 28) Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. : Differential protective efficacy of DNA vaccine expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 1702-1707.
- 29) Jackson M, Phalen S, Lagrandie M, et al. : Persistence and protective efficacy of *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun.* 1999 ; 67 : 2867-2873.