



Title	結核加熱死菌によるマウスの抗結核免疫に関する研究
Author(s)	信太, 隆夫; SHIDA, Takao; 板倉, 益夫 他
Description	
Citation	結核の研究, 7, 40-48
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26629
Type	departmental bulletin paper
File Information	7_P40-48.pdf



結核加熱死菌によるマウスの抗結核免疫に関する研究

信太 隆夫 板倉 益夫
沼田 達夫 平野 五郎

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原達教授)

緒 言

BCG による結核生菌免疫を死菌免疫に置き換えたいと云う望みは結核予防上に於ける以前からの大きな問題である。しかし今日なお BCG ワクチンが生菌であると云う種々なる不便を持つにも拘らず、これにとつて代るべき予防接種法は見当らず、結核菌が動物体内に存している間のみ結核症の免疫が成立すると云う Calmette 原則は理論的にはともかく実際的には依然打ち破られそうにない。

生菌免疫と死菌免疫との差が質的なものか量的なものかは未だ議論の余地があるところであるが、若しこの差が量的なものに過ぎないならば、BCG が生体内で増殖するであろう量に匹敵するだけの量を用うるならば死菌を以てしても十分免疫は可能な筈である。この場合実際的には菌の免疫原性を出来るだけ消失せしめないで、如何にして菌を殺すかが問題になる。この点についても幾多の努力が傾けられて来たが、これまでに得られた死菌免疫の成績は BCG 生菌に比して余りにも貧弱なものであつた。しかし Coulaud⁽¹⁾ は加熱死菌を固形パラフィンに包埋することによつて強い永続的な免疫を得ることに成功し、Saenz⁽²⁾ はその後固形パラフィンに代つて流動パラフィンを用い、より以上の好成績を得たと報告した。それ以来死菌免疫の研究は適当な adjuvant の探究に焦点がむけられて来た感がある。Saenz の研究は内外に多数の追試者を見たが、多くの学者は、モルモット及び家兎に於いて、流動パラフィンは加熱死菌の免疫原性を亢め、感染防禦力を増し、且強いツベルクリンアレルギーを惹起せしめ得ると報告している。岡、山田等⁽³⁾ は最近系統的な研究によつてこれを更に人体実験に迄発展せしめているし、金井⁽⁴⁾、山口ら⁽⁵⁾ も加熱死菌に対する流動パラフィンの意義を再確認しているが、しかしなお生菌に匹敵し得る程の成績は得られなかつたようである。

近年モルモットや家兎に代つてマウスが実験的結核症に用いられる頻度は非常に多くなつて来たが、我々も今回マウスを用いて結核加熱死菌の免疫効果と BCG のそれ

とを比較して見た。免疫実験におけるマウスの有用性は多くの学者によつて確認されているところであるが、1,2の文献を尋ねて見るに Swedberg⁽⁶⁾ はその総説においてマウスに見られる免疫は家兎やモルモットに見られる免疫と大差ないと述べ Dubos ら⁽⁷⁾ は免疫を条件付ける諸因子を広く検討した上でマウスの有用性を指摘している。本邦においては、阿部⁽⁸⁾⁽⁹⁾、石原⁽¹⁰⁾ などがマウスを用いて結核免疫を研究しており、BCG のこの動物に対する効果を確認している。

マウスが實際上扱い易く統計的に意義のある頭数を描き易いと云う利点のみを取上げてても他の動物の追従を許さないところであるが、今日迄惹起し得ないと考えられて来たツベルクリンアレルギーさえ証明されるに至つて⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ 結核感染実験にマウスが用いられる頻度は今後更に一層増すものと考えられる。

Dubos ら⁽¹³⁾、Bloch ら⁽¹⁴⁾、阿部⁽⁸⁾ などは加熱死菌のマウスに於ける効果は期待出来ないと報告し、Dubos ら^(13,15) は更にフェノール死菌や Nègre らの“Antigène méthylique”の効果を指摘している。これは加熱死菌でモルモットや家兎に得られた成績とかなり異つている。しかし加熱死菌の効果は流動パラフィンを adjuvant とした場合に限られていると云つても過言ではないし、加熱死菌自身の免疫原性は決して高いものではないらしく、事実今日迄モルモットでも分析反論の見られたところである。われわれはマウスに対する加熱死菌の効果がかなり認められ、これを流動パラフィンに包埋することによつて BCG と殆んど匹敵するのではないかとさえ思えた成績を得た。マウスがこの種の実験に用いられるならば、その特徴を充分生かすことによつて防禦抗原の選択や分析がより精細に且広汎に行うことが出来ると考えるものである。

実験材料及び実験方法

1) 使用動物。市販の白色マウス(スイス系)ですべて同一場所より購入したものである。実験1では体重17g前後の雌雄両性を同数使い、実験2では15g前後の雄のみ

を用いた。

2) 使用菌株。免疫の目的には ECG 予研株と研究室保存の毒力人型結核菌仲野株のソートン培養菌を用いた。感染菌株としては同じく仲野株を用いた他牛型結核菌 Ravenel 株も使用したが何れもこれらは 1% KH_2PO_4 小川培地に培養されたものである。

3) 死菌ワクチン。ソートン培地 4 週間培養の仲野株より 3 種の加熱死菌ワクチンを調製した。即ち型の如き手振り法により per cc 5mg と 10mg の 2 種の菌液を調製した後、それぞれ流動パラフィン、生理食塩水及び水酸化アルミニウムゲルの三者に浮遊せしめ、これを 120°C にて 30 分内加熱滅菌した。斯くして得た加熱死菌ワクチン（それぞれ流パラワクチン、生食ワクチン及びアルミゲルワクチンと略記す）は氷室に保存し全実験を通じ同一 lot のものを使用した。

水酸化アルミニウムゲルの製法は Welker & Tracy¹⁶⁾ 及び大原⁷⁾ 等の行った方法に従った。即ち 1% アンモニア明礬溶液に 1% NH_4OH を静かに加えると次第に白濁して柔かい沈澱を生ずるが、之を暫く放置した後その上清をカピラールピペットで捨て、沈澱を蒸溜水で数回洗い、最後に適量の水を加えてゲルとした後 pH を中性に修正して使用した。

4) 動物の観察。ワクチン接種後毎日各マウスの臨床的症状を見ると共に隔週に体重測定を行つた。免疫効果の判定には主として生存日数の観察と定量培養法を行つたが、併せて肉眼的病理変化をも観察した。定量培養は小川¹⁸⁾ の方法に従い、各臓器の単位体重当りの生菌単位を求めた。

ワクチンの接種方法及び毒力菌感染方法は各実験によつて異なるので具体的な方法については実験の項に述べる。

実験成績

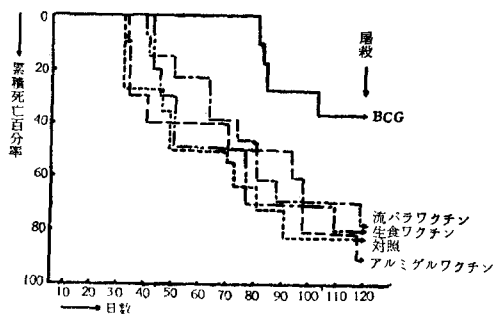
実験 1：人型菌仲野株感染に対する各ワクチンの防禦効果

A. 仲野株大量感染に対する効果：BCG 生菌ワクチン及び 3 種の加熱死菌ワクチンを各群 16 匹から成る 4 群のマウスに接種した。菌量はすべて 1 mg (percc 5mg の浮遊液 0.2 cc 宛)、接種場所は何れも腹腔内である。ワクチン接種後 5 週目に仲野株 3 mg (0.2 cc) を 16 匹の無処置対照マウスと共に静脈感染せしめ、各群マウスの生死を観察すると共に、感染後 5 週目には各群とも任意の 4 匹を撰んで剖検し、肺及び脾の定量培養を行つた。

感染菌仲野株は再三に亘りマウスを通過したのを用いたのであるが、マウスに対して強毒とは云い難く生存日数の観察は感染後 120 日で中止した。各群の生存日数の幅

は非常に広く且全群共に 120 日を越えてなお数匹が生存していた。第 1 図は観察日数に対してマウスの死亡を累積百

第 1 図 仲野株 3 mg 感染各群マウスの死亡率



分率で示したものであるが無処置対照群と各死菌ワクチン接種群との間に殆んど差はなく BCG 接種群においてのみ可なりの生存日数の延長が見られ 120 日でもなお 60% 以上が生存していた。

第 1 表は感染後 5 週目に於ける定量培養の成績を示すものである。BCG 接種群の肺内生菌数は対照の約 1/100 乃至 1/1000 で著明な増殖阻止が認められた。流パラワクチンの効果は BCG に次いで顕著であつたが、生食ワクチ

第 1 表 仲野株 3 mg 感染による定量培養成績

群別	ワクチン接種方法	肺	脾
B 接	1mg/0.2cc 回 腹腔	350	96
C 種		710	196
G 群		120	90
		1630	330
ン流接	同 上	530	650
バラ種		210	490
ワ種		470	70
クチ		2030	830
生接	同 上	3100	230
食種		8000	120
ワ種		25000	500
クチ		35000	500
クア接	同 上	3700	490
チ種		5100	370
ン種		47000	510
ミゲル		14000	350

群 別	ワクチン 接種方法	肺	脾
対	無処置	89000	830
		33000	340
101000		870	
550000		1100	

補 1) 生菌単位は ECG: 3.1×10^7 , 仲野株: 8.6×10^8
 2) 各値は小川培地 3 本の平均値で臓器 0.1 mg 当りの生菌単位を示す。

ン及びアルミゲルワクチン接種群は上記の 2 群に較べると効果が 1 桁落ち対照との差は余り著明でなかつた。脾の定量培養成績ではこの差が縮まり BCG 接種群に幾分差が見られるだけで死菌ワクチン接種群は何れも対照群と著差を認めなかつた。

定量培養のために屠殺したマウスも生存期間観察中に死亡したマウスと共に肺には明らかな肉眼的結核性病変が見られたが、肺以外の臓器には殆んど病変を認め得なかつた。肺には極めて小さい点状の灰白色結節が全表面に密集し同時に肺の充血と膨大が認められたが、Ravenel 株の静脈内感染に見られる場合¹⁹⁾より病変は単純な様で結節内に殆んど大小不同はなく、更に結節が癒合したり又軟化した如き所見は認められなかつた。定量培養時の剖検所見では感染菌が大量に過ぎたためか BCG 免疫マウスの病変が僅かに軽い様に思えた程度で、すべての群に殆んど同程度の病変が観察された。

ワクチン接種後の各群平均体重の推移は第 2 表に示した。概して処置群は無処置群に比し体重増加が妨げられていた。1 週目の体重減少は流パラワクチン接種群において

第 2 表 ワクチン接種時より感染時迄の各群平均体重の推移

群 別	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
BCG	-0.3 ^g	+0.2 ^g	+0.2 ^g	+0.7 ^g	+1.6 ^g
流パラワクチン	-1.2	-0.1	+1.4	+1.6	+2.0
生食ワクチン	+1.0	+1.0	+1.6	+1.3	+2.1
アルミゲルワクチン	-1.1	-0.6	-1.0	-0.4	-0.6
無処置対照	+0.3	+1.4	+2.1	+3.0	+3.7

補 各値はワクチン接種時平均体重に対する増減を示す最も等しく平均 1.2 g を減じたが 2 週目には漸く接種時体重に戻りその後は他の処置群と大体同じ程度に回復した。全群を通じ最も体重増加が妨げられたのはアルミゲルワクチン接種群で最初減少した体重がその儘 5 週後の毒力菌感染時迄続いていた。BCG 及び生食ワクチンの場合も減少こそ見られなかつたが対照マウスに較べれば可なりその体

重増加は抑えられていた。尚流パラワクチン及びアルミゲルワクチン接種マウスの大半はかなり衰弱して毛を逆立てワクチン接種後 3 乃至 4 週頃迄この状態が続いた。更に剖検所見では腹膜癒着が認められた。

以上の成績から感染菌量を減ずることによつて、各群の免疫効果の差を明瞭に出来るかも知れないと考え次の実験を行つた。

B. 少量菌感染に対する防禦効果: 第 3 表に示す如き実験 A 及び B の 2 つを行つた。何れもマウスの感染は仲野株 0.1 mg を尾静脈内に接種して行われた。実験 A は各 4 匹宛のマウスに流パラワクチンとアルミゲルワクチンを前実験同様に接種し(接種菌量は 10mg/cc のもの 0.1cc)対照の 4 匹と共に感染後 4 週目に肺のみの定量培養を行つた。実験 B は各群 6 匹のマウスを用いたもので BCG ワクチンは静脈内に 1 回、他の死菌ワクチンは腹腔内にそれぞれ 2 回注射し、何れの動物も最初の注射より 5 週後に菌を感染せしめた。1 回のワクチン接種量は各群を通じて 0.5 mg であるが死菌ワクチン接種後は初回注射後 2 週間たつて同量を再び接種したので合計 1 mg の菌を接種された事になる。各群とも感染後 2 週間に任意の 3 頭を撰んで剖検後肺の定量培養を行い、残りの 3 匹は 4 週後に殺して肺と脾の定量培養を行つた。

第 3 表 仲野株 0.1 mg 感染による定量培養成績

群 別	ワクチン 接種方法	感染後 2 週 肺 0.1mg 当りの生 菌単位	感染後 4 週				
			肺 0.1mg 当りの生菌 単位 肉眼的病変	脾 0.1mg 当りの 生菌単位			
A							
流パラワ クチン	1mg/0.1cc 腹腔内 1 回		360	+			
			470	+			
アルミゲ ルワク チン	同 上		2200	+			
			2700	+			
			590	+			
			1300	+			
対 照	無 処 置		13700	+			
			13800	+			
			8100	+			
			26000	+			
			29000	+			
			57000	+			
			B				
			BCG	0.5mg/0.2cc 静脈内 1 回	13	10	±
27	87	±					
流パラワ クチン	0.5mg/0.1cc 腹腔内 2 回	47	97	±			
			83	103	±		
			60	257	+		
			3	11	±		
			120	±			
			60	180	±		

群 別	ワクチン 接種方法	感染後 2 週	感染後 4 週		
		肺0.1 mg 当りの生 菌単位	肺		脾 0.1 mg 当りの 生菌単位
			0.1mg当りの生菌 単位	肉眼的病変	
生 食 ワクチン	同 上	43	103	+	130
		40	390	+	190
		97	810	+	220
アルミゲ ル ワク チン	同 上	91	130	+	230
		140	550	+	120
		250	1800	+	—
対 照	無 処 置	77	5000	+	350
		110	17700	+	980
		320	29000	+	1200

補) 生菌単位: BCGは 6×10^8 , 仲野株は行はなかつた。

肺病変度: 土……微少結節僅かに認められるもの
 +……結節が点状に散在するもの
 十……点状結節の少々多いもの
 卍……結節が肺表面の 1/2 又はそれ以上を占めるもの
 卍……結節が肺表面に密集するもの

実験 A の結果は、表に見られる如く生菌単位数において流パラワクチン接種群と対照群との内には多少の差が認められたが、アルミゲルワクチン接種群にはその程効果が見られず殆んど対照と差がないと云つてよい程であつた。実験 B においてはワクチン 1 回接種の実験 A に比して死菌ワクチンの効果が明確に現われていた。2 週目に定量培養した肺の生菌単位数は無処置、処置群間に大差を見なかつたが、4 週目において BCG 接種群はかなりの菌増殖阻止を示しており、死菌ワクチンでもその種類を問はず対照との間には $10^1 \sim 10^2$ order 程度の差が認められた。4 週目の脾内生菌数の比較においても同様な関係が見られる様であるが肺程の著明な差は認められなかつた。

実験 A において肉眼的病理所見では処置マウスと無処置マウスとが殆んど同程度の変化を示していたのに反して、実験 B においては肺病変にかなりの差があり、第 3 表に記録されている如く定量培養の結果と略々並行関係があるようであつた。

実験 2: 牛型結核菌 Ravenel 株感染に対する各ワクチンの防禦効果

A. Ravenel 株大量感染時における生存日数からの観察 84 匹のマウスを各群 12 匹宛 7 群に分ち、内 1 群は無処置の対照群とした。BCG 生菌ワクチンは 0.2 mg (0.2 cc) を静脈内に 1 回、死菌ワクチンは実験 1-B に同じく 2 回に分割し各回 0.5 mg (0.1 cc) 宛注射したが、これを皮下接種群と腹腔内接種群との 2 群に分けた。牛型菌 Ravenel 株の静脈内感染量は 1 mg (0.2 cc) で

ある。感染後は全動物が死亡する迄観察し、Litchfield²⁵⁾ の graphic solution により median survival time (ET₅₀) とその 95% 信頼限界を求めて各群マウスの生存日数を比較した。

この成績は第 4 表 A に示した如く、処置群のマウスは無処置群に比して明らかに生存日数の延長が見られ、又ワクチンの効果は概して皮下接種より腹腔内接種に於いて大であつた。特に流パラワクチン腹腔内接種群の ET₅₀ は対照群のそれと 15 日の差があつた。この実験において BCG 接種群の生存日数が流パラワクチン接種群より短いのは多

第 4 表 Ravenel 1. mg 感染各群マウスの生存日数

群 別	ワクチン 接種方法	ET ₅₀	95% 信頼限界			生存日 数の幅
A						
BCG	0.2mg/0.2cc 静脈内 1 回	(日)	(日)	(日)	(日)	(日)
		28	26.5~30.2	26~33	8	
流パラワ クチン	0.5mg/0.1cc 腹腔内 2 回	35	32.1~38.1	28~41	14	
		28	23.1~33.1	24~35	11	
生食ワク チン	0.5mg/0.1cc 腹腔内 2 回	32	29.1~34.9	29~41	13	
		31	28.8~34.1	27~41	15	
アルミゲ ル ワクチ ン	0.5mg/0.1cc 腹腔内 2 回	25	22.1~28.3	16~37	22	
		25	22.3~28.0	16~35	20	
対 照	無 処 置	20	17.4~23.0	13~29	17	
B						
BCG	0.2mg/0.2cc 静脈内 1 回	30	27.0~33.3	27~44	18	
〃	0.5mg/0.2cc 〃	35	32.4~38.8	28~51	24	
対 照	無 処 置	21	19.0~23.1	18~27	10	

補 生菌単位は BCG: 実験 a; 1.2×10^6 ,
 実験 b; 1.5×10^7 /1mg
 Ravenel: 実験 a; 6.4×10^7 ,
 実験 b; 4.8×10^7

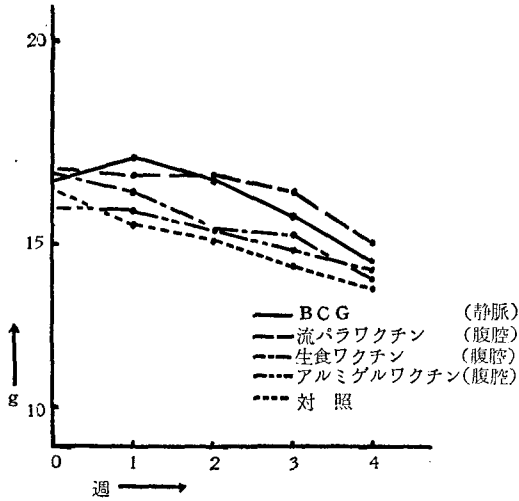
少意外であるがこの成績に関する限りでは BCG 0.2g よりも流パラワクチン 1 mg の方が免疫効果は大であると云い得る。生食ワクチン群の生存日数も予期以上に長かつたがこれに反しアルミゲルワクチン群は皮下、腹腔内何れの接種群も ET₅₀ は対照と大差なかつた。然しこの場合の成績は死菌に効果がない事を示すのではなく、アルミゲルに毒性のある事を示すのではあるまいか？

第 2 図においては上記実験に伴う各群マウスの平均体重の推移を示した。処置及び無処置群の体重曲線は互に殆んど類似しており、体重の点においてはワクチンの効果を推察することは出来なかつた。

第 4 表 B は BCG 免疫効果について再度実験を行つた

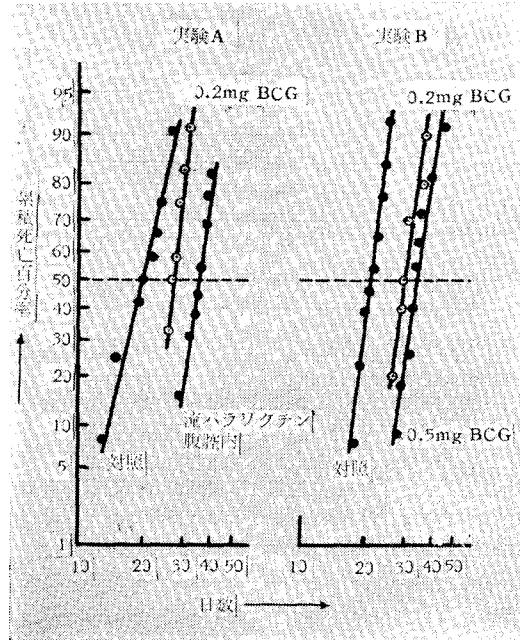
第2図

Ravenel 1 mg 感染各群マウスの平均体重の推移



第3図

Ravenel 1 mg 感染各群マウスの黒積布亡分死



もので、BCGの接種量として0.2 mg のほかに0.5 mg を用いたる以外は実験 A と全く同様に行つた。之等2群のBCG接種マウスのET₅₀は対照とそれぞれ9日及び14日の差があつた。

以上各群マウスのRavenel株感染に対する反応は凡て対数正規確率紙上で直線関係を示し、そのmedian

survival time を求めることは極めて容易であつた。第3図はこの関係を確率紙上に示したものである。

B. Ravenelg株少量感染時の定量培養成績及び肉眼的病理的变化から見た死菌の免疫効果 各群8匹のマウスを用い、ワクチン接種方法は前実験と同様であるが、死菌ワクチンは腹腔内だけにのみ接種した。感染はRavenel

第5表 Ravenel 株 0.01 mg 感染による定量培養成績

群 別	ワクチン接種方法	1 週		2 週				4 週		5 週			
		肺	脾	肺	脾	肝	腎	肺	脾	肺	脾	肝	腎
BCG	0.2mg/0.2 cc 静脈内 1 回	27	2700	600	5800	8100	20	6300	3700	1100	280	450	24
		45	4700	700	6900	14000	40	2200	1900	3600	670	710	30
流パラワクチン	0.5mg/0.1 cc 腹腔内 2 回	20	7800	730	26000	2000	30	9800	2300	2200	510	560	21
		10	3500	550	25000	4500	20	2700	13000	6700	2100	410	2
生食ワクチン	同 上	23	1100	1500	146000	44000	230	12000	14000	3900	980	970	110
		20	4600	5500	—	82000	420	34000	9500	36000	2400	1400	5
アルミゲルワクチン	同 上	10	7900	3600	130000	33000	110	44000	4900	12000	4700	2200	95
		13	14200	4400	110000	20000	170	11000	14000	48000	5200	1300	60
対 照	無 処 置	11	6500	2600	150000	83000	670	110000	29000	89000	9400	1300	93
		13	8900	1100	160000	76000	380	550000	48000	130000	3900	1600	72

補 1) 生菌単位は BCG; 4.4×10^6 , Ravenel; 4.8×10^5

2) 各値は臓器 1 mg 当りの生菌単位を示す。

3) —: 雑菌のため算定出来ず。

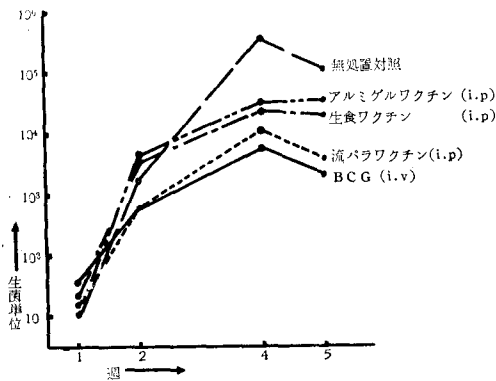
株 0.01 mg (0.2 cc) を尾静脈に行つた。感染後 1 週, 2 週, 4 週, 5 週に各群 2 匹宛のマウスを屠殺剖検し, 1 週及び 4 週では肺と脾を, 2 週と 5 週は肺, 脾, 肝及び腎をそれぞれ定量培養に供した。

定量培養の結果は第 5 表の如くである。初めの週目では処置及び無処置群間に殆んど差を認めなかつたが, 2 週以降では何れの臓器でも処置マウスの生菌単位は 1, 2 の例外を除き対照に比して少なく, 特に肺に於いてその差は顕著であつた。BCG 接種群は流パラワクチン接種群に比し菌増殖の抑制が強かつた。しかし脾のみが少々異つた結果を得ているのを除けば, BCG 及び流パラワクチン接種マウスの生菌単位は殆んど同じ order であると云つても良い様で, この両者の肺の生菌単位数は 5 週になると対照と 10^2 乃至 10^3 order の差が認められた。生食ワクチンの菌増殖阻止力は流パラワクチンに次ぎ, 最も効果が悪いの

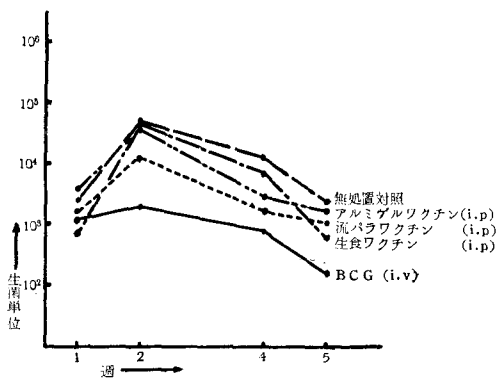
はアルミゲルワクチンであつた。第 4 図は 5 週を通じて定量培養を行つた各群マウスの肺と脾の生菌単位を平均して菌増殖の推移を示したものである。4 乃至 5 週になると同一群内の臓器生菌単位差がかなり開いている場合があり, マウスの個体差が後期になるに従い現われて来たので, 之を平均するのに危険を感ずる事もあつたが大体の傾向は図の如きものである。無処置対照マウスの肺及び脾内菌増殖は何れも対数的に増加し脾では 2 週で最高となつて同時期の肺内菌数を遙かに凌駕していたが, その後は漸減して専ら菌は肺に見られるようになった。第 4 図 A の成績から免疫効果においては 3 つの group が区別出来る様に思われた。即ち BCG 生菌免疫と流パラワクチンは略々効果が同じく, 生食ワクチンとアルミゲルワクチンの効果がこれに次いで 1 group をなし, 無処置対照はこれらとやや離れた group を形作つているようである。

各臓器の剖検所見は実験 1 と同様殆んど肺に限られていた。対照マウスの肉眼的病変は 5 週目に屠殺したのも強い病変を示していたのに反し, 処置群のそれは高々肺表面の 2 分 1 のを占める程度の結節が散在しているに過ぎなかつた。しかし肺の膨大と充血は著明であり, 仲野株感染による対照マウスより結節も大きく肺表面より隆起し且気管に迄小結節が見られるのもあつた。病変の程度を纏めたものが第 5 表であるが, これらの病変と定量培養の成績との間には略々並行関係が見られた。肝には僅かに小結節

第 4 図 A. Ravenel 0.01mg 感染の肺内菌消長



B. Ravenel 0.01mg 感染の脾内菌消長



第 6 表 Ravenel 株 0.01 mg 感染による肺の肉眼的病変の推移

	1 週	2 週	4 週	5 週
BCG	— —	— —	++	++
流パラワクチン	± —	± ±	++	++
生食ワクチン	± ±	± ±	++	++
アルミゲルワクチン	± ±	± ±	+++	+++
無処置対照	— —	± ±	+++	+++

補) 肺病変度: ±; 微少結節が僅かに認められる
 +; 点状の結節が散在する
 ++; 少々大きい結節が少数にある
 +++; 結節が大小多数にある
 ++++; 結節が融合して多数ある

が認められたのもあつたが, 脾及び腎には先づ病変はなかつたと云つて良い。各群マウスには何れも脾腫が証明され時を経るに従い漸増して行つたが, 無処置及び処置マウスにはさしたる差がなく脾の重量と定量培養成績とは必ずしも並行していなかつた。

総括並びに考按

毒力人型菌仲野株 3 mg 静脈感染による生存期間の観察、定量培養成績及び肉眼的病理所見からは、BCG の有効性が認められたのみで加熱死菌ワクチンの効果は殆んど見られず僅かに流パラワクチンが勝っていた程度である。しかし 0.1 mg の少量感染によつて死菌免疫の効果を見れば毒力加熱死菌 1 mg の効果は 0.5 mg BCG に及ばないにしても大量感染によつて調べた場合よりもその効果は遙かに明瞭に表現されている。感染菌量として余りに大量を用いる事は免疫効果の微妙な差異を見る上に得策でないことは言うまでもないが、我々の場合仲野株の菌力が雑系マウスに対し極めて弱いため一応かかる量を用いたものである。感染菌量 3 mg の場合若し用いられた BCG ワクチンの量が 1 mg と云う大量でなくもつと少量であつたならば果して BCG の効果を認め得たかどうか疑問であるから死菌の免疫効果がなかつたのは寧ろ当然であろう。

即ち感染菌量が大量の場合は弱い程度に動物の持つている菌増殖阻止能力の限界を越してしまうため免疫効果が表現されないことになる。又最近水之江²⁰⁾は菌塊の多い菌浮游液を静脈内に感染せしめた場合程肺に定着する菌数が多く、したがつて早期にマウスを斃すと報告しているが Challenge に大量の菌を用いる事はそれだけ接種量中の濃度が高くなり従つて充分な均等状態を得ない故に弱毒菌の大量の菌力が少量の強毒菌のそれに及ばなくても、早期に動物を斃すことは十分あり得る。この様な場合の成績には余り信を置き得ない。結局毒力の低い菌をもつて免疫効果を判定する場合は少量感染による定量培養又は病理所見に依存するしか道はない。

なお、この実験に用いた人型菌仲野株は上述の如くスイス系の所謂雑系マウスに対して決して強毒とは云い難いがモルモットに対しては 0.001 mg 程度の皮下接種によつて 1 カ月前後で全身性の結核性病変を惹起する毒力を有していることを附記しておく。

一方、仲野株より調製した加熱死菌 1 mg (湿潤量) はかなりの毒性を有しているらしく、之を 1 回接種した場合のマウスの状態は余り良好でなく、体重増加も円滑であるとは云えなかつた。殊に流パラワクチンは毒性が強く接種後 1 週の体重減少は、生食ワクチンに比してかなり高度認められた。一般に adjuvant を用いることによつて結核死菌の毒性が亢まることは、これ迄屢々報告されて来たところである。^{3,4,15,23,24)}しかし既に述べた如く 1 mg を 2 回に分割して接種すると何れのワクチンもマウスに与える影響は少なかつた。

以上の考察から各ワクチンの免疫効果の差を最も良く

表現するためには、大体次の二つの条件が必要であると考えられる。第一には出来る限り強毒な感染菌をしかも少量用いることである。この点に関しては少くとも雑系マウスに関する限り Ravenel 株を攻撃菌として撰ぶことが望ましい。我々¹⁹⁾は牛型結核菌 Ravenel 株が白色マウスに対し安定した強い毒力を有し、1 mg の静脈感染によつてマウスは 5 週以内に 100% 死亡し且均一な反応を示すと云うことを観察したからである。第二には使用ワクチンの毒性を出来るだけ少なくする様な方法を選ぶことである。このためには adjuvant として毒性の少いものを用ふ必要がある事は云う迄もないが、死菌自体の毒性も考慮してこれを分割投与することが望まれる。

以上実験 1, 2 を通じ総括して見ると、BCG 及び流パラワクチンの有効性は明らかに認められ、又生食ワクチン並びにアルミゲルワクチンも無効であるとは云えなかつた。染谷、川岡²⁰⁾は BCG のマウスに於ける免疫効果を否定しているが、BCG の接種量、方法及び判定方法などが、適当であるならば、BCG の効果がモルモットには認められてマウスに認められぬ筈はなく事実われわれ及び Dubos, ら⁷⁾、Bloch & Segal¹⁴⁾ 阿部^{8,9)}、石原¹⁰⁾ その他多くの学者^{27)~30)}の成績を見てもマウスにおける BCG の効果は否定し得ないところである。

一方流パラワクチンの効果は、之を 1 回接種したのみではそれ程の効果はなかつたのであるが、同量を 2 回に分割接種する事によつてその効果は非常に高まり、Ravenel 株 1 mg 感染に対する ET₅₀ は腹腔内ワクチン接種の場合対照と 15 日の差があつた。実験 2 における A 及び B 実験共全く同一条件でワクチンを接種したに拘わらず、定量培養成績に於いて BCG が勝り、生存日数の比較からは逆に流パラワクチンが ECG の効果を凌いでいるような結果が得られた。その理由は分らないが、このような矛盾のあるところに、方法論として定量培養と ET₅₀ 測定の何れが優れているか検討する必要があるように思う。死亡分布が均一でさえあれば、主観と実験誤差を除き得る点で後者が理論的に優れていると云い得るが、現在の成績だけからは乍ら両者の優劣を論ずる段階ではない。流動パラフィンの結核死菌に対する意義と多少異なる意義をもつと思われる吸着剤としてのアルミゲルが、むしろそれ自身の毒性が障碍となつてその adjuvant としての効果を見ることが出来なかつたのは遺憾であるが、Ravenel 株感染による場合生存日数の幅が非常に広がつていたことから見ると、その毒性に耐えたマウスにはかなり生命の延長があつたことが分る。又加熱死菌生食浮游液の場合は流パラワクチンに及ばなかつたが生存日数からも定量培養成績からもその効果を否定し去る程のものではなかつた。

一方、阿部⁸⁾はマウスに対し H₃₇ 株の加熱死菌乾燥量 1 mg の流動パラフィン又は生理食塩水浮游液は免疫効果を持たないと述べ Dubos⁷⁾ も H 37 Ra 生食加熱死菌はマウスに対して殆んど効果がなく、フェノールで殺した死菌のみが効果を持つと述べている。しかし山口⁹⁾は最近加熱死菌の効果を再検討し、モルモットに於いてフェノール死菌は最も効果があつたが加熱死菌も著しくこれに劣る程ではなかつたと云つてゐる。実際これ迄モルモットに於いて加熱死菌が有効であると必ずしもすべての研究者が認めているわけではなく、今日でも諸家によつてその効果の程度が相当異つてゐる。これには菌株及び接種方法の相違又は感染時迄の免疫期間の長短など色々原因が考えられるのであろうが、ワクチンの調製法自身の相違も原因していることは否めないであろう。我々はアルミゲルワクチン調製の際これを中性に修正するのを忘れその儘滅菌したところ全く免疫効果のなかつたことを経験している。

さて、ECG の効果が死菌よりも優つてゐるのは死菌と本質的に違つた免疫原性を持つてゐるためであらうか、それとも単に BCG の体内増殖に伴う量的増加が死菌と差を生ぜしめた原因なのであろうか？。Eloch & Segal¹⁴⁾ はマウスに ECG を接種した後 INAH を投与して ECG の体内増殖を抑えた場合と INAH を与えない場合とについて免疫効果を比較して見たが両者の間に差は見られず何れの場合も死菌よりは遙かに勝れた効果が得られた。この事から彼等は ECG が死菌に勝る免疫効果を發揮するためには必ずしも生体内増殖を不可欠な要因としている訳ではないと述べて居り、Dubos⁷⁾ も同じくマウス体内での増殖能力を欠いた H 37 Ra に充分免疫効果のあることを観察している。Mackaness³¹⁾ によると ECG のマウスに於ける増殖力は低く、始めの 8 日間に肝及び脾で 2~3 倍程度の増殖しか示していないし、又佐藤³²⁾ の成績ではマウス臓器内で ECG は全く増殖していない。我々も試みに実験 2 の A で用いた同じ ECG 0.1mg を静脈内接種して肺のみを 3 週迄定量培養してみたのであるが、初めの 2 日目で得られた生菌単位は 3 週迄少しも増加しなかつた。又 BCG の体内増殖をモルモットについて調べた我々の以前の研究においても ECG は皮下接種後、附近のリンパ腺において多少増加の傾向を認めるがその後全体としては漸減の一途をたどり、その増殖能はわれわれが考えていたよりも遙かに低いものである事を知つた。但しこの際にも考察した如く、ECG は体内で増殖する一方において絶えず一部分が死滅して行くであらうから定量培養において仮令増加の傾向は見られなくても生菌プラス死菌の総和は単に死菌を接種した場合の比ではないに違ひなく上述した事実から BCG ワクチンの死菌ワクチンに対する量的優位性

を考慮の外におくことは誤りかも知れない。しかしわれわれは流パラワクチンを 2 回に分割して接種することによつて殆んど BCG 接種と匹敵する成績を得た。流動パラフィンの adjuvant としての意義は、死菌をして長く接種局所に残留せしめ同時にその組織内への侵入力³⁴⁾ を与えるもので組織に良性の結核性変化を惹起せる事にあると一般に考えられている様である。^{23, 35-41)} われわれの成績から見ると死菌ワクチン調製に加熱以外のものつと適当な方法を採用し、更に adjuvant として適当なものを用いるならば生菌免疫に十分匹敵し得るワクチンが得られるのではないかと云う期待が持たれる。

最後にマウスによる免疫効果の判定基準について考察して見たい。Raleigh & Youmans⁴²⁾ は広汎な基礎実験に基き化学療法剤の効果判定基準としてマウスの生存日数、体重の推移及び病理組織学的変化の 3 つをあげ、又肝、腎、脾の組織学的変化及びその抗酸菌数は normal frequency distribution curve と平行してゐたと報告している。我々は全実験を通じ肺の肉眼的病変、その生菌単位数及び生存日数は略々並行関係にあることを認めた。生存日数からの観察は極めて簡易な方法で客観性に富み且マウスを用いる利点を十分に生かした方法であつて、Martin⁴³⁾、Rake, ら⁴⁴⁾、Eaker ら⁴⁵⁾、Youmans & Youmans⁴⁶⁾、Malone⁴⁷⁾、染谷⁴⁸⁾ などは抗結核剤の効果判定に、Dubos⁷⁾、Eloch & Segal¹⁴⁾、Youmans⁴⁹⁾ などは抗結核免疫の判定に、それぞれマウスの生存日数を示標として充分な成績をあげている。岩崎・小川⁵⁰⁾、阿部⁸⁾ などは肺内結核菌の消長を示標とし、阿部はこれに生存日数及び病理所見を併せ観察しているが、生体内菌の消長では後期になる程生菌数に個体差が現われて data が不均一になつて来る。更に定量培養には操作そのものが極めて煩雑である上に実験誤差もある程度避けられない弱点がある。勿論実験の目的如何によつては定量培養法に依らざるを得ない場合もある事は云う迄もないが、本報の如き免疫実験においては寧ろ生存日数の観察が定量培養法よりも推賞すべき方法と考える。何となれば既に我々が報告した如く⁹⁾ マウスの死亡分布がモルモットには到底見られない程美事な均一性を持つてゐる以上、生存日数の観察によつて得られた結論は極めて精度の高いものであり、煩雑な操作を必要とせずとも短期日で結果が判定出来る点定量培養より遙かに勝つてゐるからである。

結 論

1) マウスは ECG 接種により強毒結核菌感染に対する免疫を獲得する。加熱結核死菌は流動パラフィンに包埋することによつてマウスに或る程度の免疫効果を与える

が、これを2回に分割接種することによつて免疫効果は更に亢まる。その程度は大体 BCG に匹敵するものであつた。

2) 結核症の免疫実験にマウスを用いることは可能であり、この判定にマウスの生存期間を示標とすることは簡単且客観性に富む方法と考えられる。

稿を終るに当り終始御指導御校閲を賜つた恩師大原教授に深く感謝する。

引用文献

- 1) Conland, E. : Rev. de la Tuberc. 11, 851, 1934
- 2) Saenz, A. : Compt. rend. Soc. de Biol. 120, 870, 1935
- 3) 岡捨己・山田俊一郎他・抗研誌
1, 25, 昭21; 2, 1, 昭22; 3, 53, 昭23; 4, 59, 昭24; 5, 25, 昭24; 6, 22, 昭25; 6, 106, 昭25
- 4) 金井興美他：結核, 26, 289, 昭26; 26, 319, 昭26
- 5) 山口登：医学と生物学：36, 227, 昭30; 36, 117, 昭30
- 6) Swedberg, B. : Acta med, Scand, 139 (Suppl, 250) 1, 1951
- 7) Dubos, R.J. et al : J. Exp. Med. 97, 207, 1953
- 8) 阿部逸夫：結核, 28, 374, 昭28
- 9) 阿部逸夫：結核, 28, 423, 昭28
- 10) 石原定次：結核, 31, 22, 昭31
- 11) Kirchheimer, W. F. and Malkiel, S. : Am. Rev. Tuberc. 68, 629, 1953
- 12) Gray, D.F. and Jennings, P.A. : Am. Rev. Tuberc. 72, 171, 1955
- 13) Dubos, R. J. et al : J. Exp. Med. 97, 221, 1953
- 14) Bloch, H. and Segal, W. : Am. Rev. Tuberc. 71, 228, 1955
- 15) Weiss, D.W. and Dubos, R.J. : J. Exp. Med, 101, 313, 1955; 103, 73, 1956
- 16) Welker & Tracy : J. Biol. Chem. 22, 55, 1915
- 17) 大原達：北海道医学雑誌, 25, 276, 昭25
- 18) 小川辰次：結核菌検索の基礎と応用, 保健同人社 昭28
- 19) 信太隆夫：本誌
- 20) 水之江公英：結核, 31, 344, 昭31
- 21) 新明美仁：本誌, 3, 63, 1955
- 22) Volkert, M. et al : J. Exp. Med. 86, 203, 1947
- 23) Rist, N. : Ann. Inst. Pasteur 61, 121, 1938
- 24) Casals, J. and Freund, J. : J. Immunol., 36, 399, 1939
- 25) Lichfield, J. T. : J. Pharmaco. & Exp. Therap., 97, 399, 1949
- 26) 染谷四郎：川村達：文部省総合研究結核研究委員会, 25, 11, 3,
- 27) Schwabacher, H. and Wilson, G.S. : Tubercle, 18, 498, 1937,
- 28) Levaditi, C. et Vaisman, A. : Compt. rend. Soc. Biol., 143, 312, 1949
- 29) Aronson, J. D. and Schneider, P. : Am. J. Pub. Hlth., 40, 533, 1950
- 30) Siebeumann, C.O. : J. Immunol., 67, 137, 1951
- 31) Mackaness, G.B. et al : Am. Rev. Tuberc. 69, 479, 1954
- 32) 佐藤直行：医学と生物学, 34, 90, 1955
- 33) 信太隆夫他：本誌, 2, 102, 1954,
- 34) Woodruff, C.E. et al : Am. Rev. Tuberc. 51, 574, 1945
- 35) Couland, E. : Compt. rend. Soc. Biol., 119, 368, 1935
- 36) Rist, N. : Advances in Tuberculosis Research, 4, 219, 1951
- 37) Laporte, R. : Ann. Inst. Pasteur, 72, 941, 1946
- 38) 生沼金夫：海軍軍医会雑誌, 33, 844, 1944
- 39) 河内重三：新潟医学雑誌, 68, 38, 1954
- 40) 金井興美：日本細菌学雑誌, 10499, 1955
- 41) 山口登：日本細菌学雑誌, 11, 185, 1956
- 42) Raleigh, G.W. and Youmans, G. P. : J. Infect. Dis., 82, 167, 1948; 82, 205, 1948; 82, 221, 1948
- 43) Martin, A.R. : J. Path. and Bact., 58, 580, 1946
- 44) Rake, W.P. et al : Am. Rev. Tuberc., 60, 121, 1949
- 45) Baker, M.J. et al : Ann. New York Acad. Sci., 52, 678, 1949
- 46) Youmans, G.P. and Youmans, A.S., Am. Rev. Tuberc. 64, 541, 1951
- 47) Malone, L. et al : Am. Rev. Tuberc, 65, 511, 1952
- 48) 染谷四郎他：日本臨床結核, 15, 28, 1956
- 49) Youmans, G.P. et al : J. Bact., 70, 557, 1955
- 50) 岩崎竜郎, 小川辰次：結核, 24, 173, 昭24