



Title	実験的結核症における各種免疫測定法の比較研究
Author(s)	丸谷, 竜司; MARUYA, Ryuji
Citation	結核の研究, 27-28, 19-34
Issue Date	1968-03-28
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26783">https://hdl.handle.net/2115/26783</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_28_P19-34.pdf



# 実験的結核症における 各種免疫測定法の比較研究

丸 谷 竜 司

(国立小樽療養所 所長 菅野保次 博士)

(北大結核研予防部 主任 高橋義夫 教授)

## 緒 言

実験的結核症における免疫の研究にあたっては、感染あるいは抗原接種に続いて獲得される、個体の抵抗性や防禦力の度合いを免疫力として表現するわけであるが<sup>1)</sup>、実際には、前処置した動物に対して毒力結核菌による攻撃感染を行ない、その後の感染経過から、逆に免疫の程度を知ろうとするのが一般的な方法である。しかしながら、個体の免疫状態における複雑な変化や微妙な差異を、よりよく知るためにはいかなる測定方法を採用すべきであろうか。このことは、BCGが広く実用に供されるようになってすでに久しい今日、なお結核ワクチンの研究が各国で行なわれていることから、また結核の免疫とアレルギーという、古くてなお新しい命題の追究という面からも、それ自体がわれわれに与えられた大きな研究テーマであるといえよう<sup>2)</sup>。

免疫効果測定の目的で、従来一般に用いられてきた結核病変度の判定標準は、感染動物の生存期間を目標とするもの、それらの剖検所見によるもの、および動物臓器内における感染菌の消長を追究するものなどに大別される。

一方実験動物としては、その良好な感受性のためにモルモットがもっとも多く用いられてきているが<sup>3)</sup>、なかでも皮下感染によって生じた結核病変や臓器内生菌数を、対照と比較する方法がもっとも一般的のようである。そのほか静脈内感染後に臓器内生菌数を測定する方法<sup>4)</sup>や、有馬・山本ら<sup>5) 6)</sup>によって考案された脾組織培養による方法<sup>7)</sup>もある。

近年、抗結核剤についての大規模な実験的研究が行なわれはじめから、マウスの価値が再検討<sup>8) 9) 10)</sup>されて、広く免疫実験にも用いられるようになった。とくにマウスは他の動物に比べて、比較的容易に近交系ものを入手できるようになり、それら近交系マウスによる実験の意義と応用についても詳細な研究<sup>11)</sup>がなされている。

マウスを用いての免疫測定には、毒力菌感染後の平均生存日数や生存率曲線による方法、30日生存率の方法<sup>12)13)</sup>、および定量培養によって臓器内生菌数を測定する方法がある。また剖検による病変度評価法としては、いくつかの肺の肉眼的判定方法<sup>14)15)</sup>が提案されており、さらに肺病変の程度をその重量や比重によって表現する方法<sup>16)17)</sup>などもある。

免疫測定法としての、これらの結核病変度判定法はいずれも特徴のある方法ではあるが、かならずしもすべての条件を満足させる理想的なものとはいえない。しかし現在なお、実験的結核症やヒトの結核感染において、免疫反応を適確に知る方法がまだないので<sup>18)</sup>、それらの方法は適宜用いられなければならない。そこで問題になるのは、実験成績が判定方法によって少なからず影響される<sup>19)</sup>ということであって、実験成績から免疫効果を適正に評価するためには、個々の判定法の価値を充分知っておく必要がある。この目的のために、著者は種々の量のBCG生菌ならびに結核死菌によって免疫したモルモットおよびマウスに対して、一定期間後に毒力結核菌による攻撃感染を行ない、従来提案されている種々の方法を用いてそれらの免疫効果を測定し、広く一般に行なわれてきたモルモットを用いる方法について再検討するとともに、その方法と脾組織培養法による成績とを比較し、さらにマウスを用いる一連の方法の価値について検討した。

## 実験材料、および実験方法

### 1. 使用動物

市販の健康モルモット、体重400g前後、および北大結核研究所で交配飼育したCF1系マウス、生後4～6週、体重20～30gを、雌雄の別なく使用した。

### 2. 免疫方法

モルモットおよびマウスをそれぞれ5群にわけて、その中の1群を非免疫対照群とし、他の4群を免疫群として、次のように種々の抗原量を接種した。

### I 生菌免疫実験

BCG 生菌の生食水浮遊液を作って、モルモットにはその 0.001~1mg/0.5ml を下腹部皮下に、またマウスにはその 0.0001~0.1mg/0.25 ml を腹腔内に、各1回注射した。(生菌単位は1mg あたり  $20.0 \times 10^6$  であった。)

### II 死菌免疫実験

ヒト型毒力菌仲野株の加熱死菌を、Arlacel・Drackeol (1:9) をアジュヴァントとして、モルモットには皮下に、マウスには腹腔内にそれぞれ注射したが、死菌量はモルモット、マウスともに湿重量 0.001~1mg とした。

### 3. 感染方法

#### I 生菌免疫実験

モルモットにおいては免疫処置の5週後にヒト型毒力菌仲野株を、マウスにおいては6週後にウシ型毒力菌 Ravenel 株を感染させた。(両菌株の生菌単位は1mg あたり、それぞれ  $70.0 \times 10^6$ ,  $50.0 \times 10^6$  であった。)

#### II 死菌免疫実験

モルモットは免疫6週後に、マウスは7週後に攻撃感染を行なった。使用菌株は生菌免疫実験の場合と同様である。(生菌単位は両菌株ともに1mg あたり  $30.0 \times 10^6$  であった。)

攻撃感染菌量ならびに感染経路は各測定法によってそれぞれ異なるので別に表示した(表1)。

表1 各種免疫測定法における使用動物、ならびに攻撃感染方法と測定時期

実験	測定方法	動物		攻撃菌量 (mg)	感染経路	測定時期**
		動物	数*			
I 生菌免疫実験	1 剖検・脾定量培養	モルモット	8	0.004	下腹部皮下	6週
	2 脾定量培養		4	0.001		後肢静脈
	3 脾組織培養		2	0.5	3日	
	4 生存期間・体重	マウス	20	0.3	尾静脈	—
	5 肺定量培養	マウス	9	0.5		直後 2週 4週
	6 剖検・肺重量・比重		12			
II 死菌免疫実験	1 剖検・脾定量培養	モルモット	7	0.002	下腹部皮下	6週
	2 脾定量培養		4	0.001		後肢静脈
	3 脾組織培養		3	0.5	3日	
	4 生存期間・体重	マウス	20	0.3	尾静脈	—
	5 肺定量培養	マウス	9	0.5		直後 2週 25日
	6 剖検・肺重量・比重		18			

\* 各群の使用動物数

\*\* 攻撃感染より測定までの期間

### 4. 測定方法

各測定法の概要は一括して表示し(表1)、さらに詳細はそれぞれの実験成績に付記した。なお実験動物はすべてエーテルによって致死せしめて剖検した。

### 5. ツベルクリン反応

モルモットに対しては100倍OT液、0.1ml を下腹部皮下に注射して、24時間後に測定する通常の方法で行なった。ツ反実施時期は、生菌免疫実験では免疫3

週後、死菌免疫実験では感染直前(免疫6週後)であった。

### 実験成績

実験1 皮下攻撃感染モルモットの肉眼的所見と脾内生菌数、ならびにツベルクリン反応

#### (1) 肉眼的所見

攻撃感染の6週後に剖検して、脾重量を測定すると

表2のI BCG免疫モルモット皮下攻撃感染6週後の肉眼的所見

○印は乾酪化病変を示す

実験群	動物番号	局所所見*	リンパ腺所見**										臓器所見			脾重量(g)	
			K D		I D		A D		R P D	P D	R S D	B D		肝	肺		脾
			r	l	r	l	r	l				r	l				
I 非免疫 対照群	1	G++	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	-	+	++	1.1
	2	G++	-	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	4.3
	3	G⊕	⊕	⊕	+	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	⊕	1.9
	4	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	+	⊕	⊕	+	+	⊕	1.8
	5	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.6
	6	G+	⊕	⊕	+	+	-	-	⊕	⊕	⊕	+	+	+	+	⊕	1.4
	7	G++	⊕	⊕	+	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.3
	8	G+	⊕	⊕	-	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	⊕	1.5
II 0.001mg 免疫群	16	A+	⊕	⊕	-	+	-	-	⊕	⊕	-	-	-	-	-	-	1.3
	17	H	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.9
	18	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	-	+	+	+	⊕	1.8
	19	H	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-	1.5
	20	G⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	+	+	1.4
	21	H	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	+	+	+	-	-	+	0.8
	22	G++	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.9
23	H	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	+	-	-	+	-	1.1	
III 0.01mg 免疫群	31	A+	+	⊕	-	±	-	-	⊕	±	-	-	-	-	-	-	0.9
	32	H	-	⊕	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1.1
	33	A+	-	⊕	-	-	-	-	⊕	+	-	-	-	-	-	+	0.8
	34	A+	⊕	⊕	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0.7
	35	A+	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.8
	36	A+	⊕	⊕	-	-	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	1.1
	37	A++	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	-	-	-	-	-	+	1.3
	38	A+	⊕	⊕	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	1.1
IV 0.1mg 免疫群	46	A+	⊕	⊕	-	+	-	-	⊕	-	-	-	+	-	-	-	0.8
	47	H	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.7
	48	H	-	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	-	-	-	+	-	-	-	1.2
	49	A+	⊕	⊕	-	+	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	0.8
	50	G⊕	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	1.3
	51	A+	⊕	⊕	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	1.0
	52	H	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	1.2
53	G++	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	⊕	1.3	
V 1 mg 免疫群	61	H	-	⊕	-	-	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.7
	62	A+	-	⊕	-	⊕	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1.0
	63	H	-	-	-	+	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	0.5
	64	A+	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	+	-	-	-	-	-	-	1.2
	65	A+	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1.1
	66	H	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	1.1
	67	H	-	⊕	-	+	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	+	1.3
	68	H	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0.9

\* A:膿瘍, G:潰瘍, H:治癒

\*\* KD:しつへき腺, ID:そけい腺, AD:腋窩腺, RPD:後腹膜腺  
PD:門脈腺, RSD:後胸骨腺, BD:気管支腺

表2のII 結核死菌免疫モルモット皮下攻撃感染6週後の肉眼的所見

○印は乾酪化病変を示す

実験群	動物番号	* 局所所見	リンパ腺所見**										臓器所見			脾重量(g)		
			K D		I D		A D		R P D	P D	R S D	B D		肝	肺		脾	
			r	l	r	l	r	l				r	l					
I 非免疫 対照群	1	G+	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.5	
	2	G⊕	-	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.7		
	3	G⊕	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	⊕	⊕	1.6	
	4	A⊕	-	⊕	-	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	2.2	
	5	G⊕	-	⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	1.8	
	6	A⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	+	-	-	-	+	+	⊕	0.8	
	7	G⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.5	
II 0.001mg 免疫群	15	G⊕	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	⊕	2.8
	16	G⊕	⊕	⊕	-	-	-	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	+	⊕	1.0	
	17	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	+	+	+	+	⊕	1.8	
	18	G⊕	-	⊕	-	⊕	⊕	-	⊕	+	-	-	-	-	+	⊕	0.7	
	19	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	+	⊕	1.2	
	20	G⊕	⊕	⊕	-	+	-	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	2.5	
	21	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	+	⊕	1.8	
III 0.01mg 免疫群	29	G⊕	⊕	⊕	-	+	-	-	⊕	-	⊕	+	+	⊕	-	⊕	1.4	
	30	G+	+	⊕	-	-	-	-	⊕	-	-	+	+	-	+	+	1.3	
	31	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	+	-	+	+	-	+	+	1.0	
	32	G⊕	+	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	+	+	⊕	⊕	⊕	1.4	
	33	G⊕	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	1.0	
	34	A⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	⊕	2.0	
IV 0.1mg 免疫群	43	G+	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	-	+	-	+	-	-	+	0.9	
	44	H	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	-	-	+	⊕	-	-	+	0.8	
	45	G+	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	+	-	-	-	+	-	+	1.0	
	46	H	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	+	0.8	
	47	H	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	+	-	-	-	-	-	+	1.3	
	48	G⊕	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	-	-	⊕	+	-	+	1.4	
	49	H-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	1.1	
V 1mg 免疫群	57	A+	-	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	-	1.3	
	58	G⊕	⊕	⊕	+	⊕	-	-	⊕	⊕	-	+	-	-	-	+	0.9	
	59	A+	⊕	⊕	-	-	-	-	⊕	-	-	⊕	-	-	-	+	1.0	
	60	H	⊕	⊕	-	⊕	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-	-	+	1.2	
	61	G+	⊕	⊕	-	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	+	-	+	-	-	0.8	
	62	G+	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	+	-	-	-	+	1.2	
	63	H	+	⊕	-	-	-	-	+	-	⊕	-	+	-	-	-	0.8	

\* A:膿瘍, G:潰瘍, H:治癒

\*\* KD:しつへき腺, ID:そけい腺, AD:腋窩腺, RPD:後腹膜腺

PD:門脈腺, RSD:後胸骨腺, BD:気管支腺

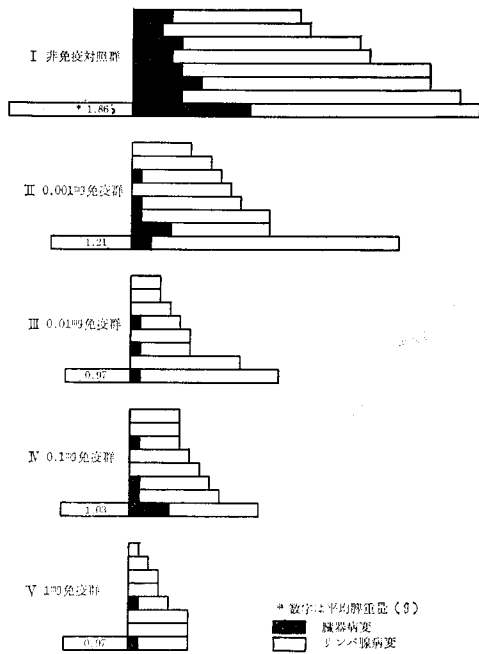


図1のI BCG免疫モルモット皮下攻撃感染6週後の肉眼所見 (ヒストグラム)

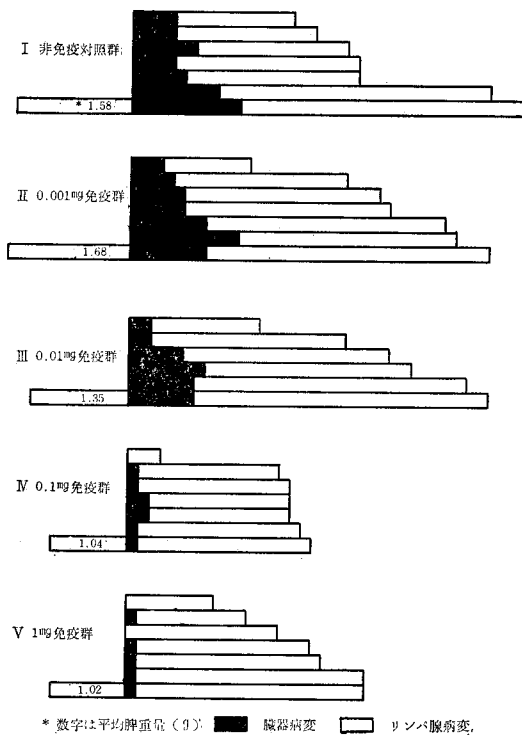


図1のII 結核死菌免疫モルモット皮下攻撃感染6週後の肉眼所見 (ヒストグラム)

もに、感染局所、各リンパ腺、および脾、肝、肺について結核病変を肉眼的に観察した(表2のI、II; 図1のI、II)。

ツ反応は生菌および死菌免疫実験のいずれの場合も0.001 mg 免疫群は陰性であったが、他の群はおおむね抗原量に応じた強さの反応を示した(表3のI、II)。

表3のI BCG免疫モルモット免疫3週後のツ反応成績 (24時間後測定値)

	I	II	III	IV	V
動物番号	非免疫 対照群	動物番号 0.001 mg 免疫群	動物番号 0.01 mg 免疫群	動物番号 0.1 mg 免疫群	動物番号 1 mg 免疫群
1	-	16 ±	31 $\frac{+}{14 \times 13}$	46 $\frac{\pm}{16 \times 13}$	61 $\frac{+}{20 \times 15}$
2	-	17 -	32 $\frac{+}{14 \times 10}$	47 $\frac{+}{13 \times 11}$	62 $\frac{+}{18 \times 15}$
3	-	18 -	33 -	48 $\frac{+}{15 \times 13}$	63 $\frac{+}{19 \times 12}$
4	-	19 -	34 $\frac{+}{14 \times 11}$	49 $\frac{\pm}{12 \times 12}$	64 $\frac{+}{21 \times 15}$
5	-	20 -	35 ±	50 $\frac{+}{13 \times 13}$	65 $\frac{+}{22 \times 20}$
6	-	21 -	36 $\frac{+}{14 \times 11}$	51 $\frac{+}{18 \times 18}$	66 $\frac{+}{17 \times 15}$
7	-	22 -	37 $\frac{\pm}{13 \times 12}$	52 ±	67 $\frac{+}{21 \times 17}$
8	-	23 -	38 $\frac{+}{17 \times 12}$	53 $\frac{\pm}{12 \times 10}$	68 $\frac{+}{13 \times 16}$
9	-	24 -	39 $\frac{+}{13 \times 12}$	54 $\frac{+}{19 \times 14}$	69 $\frac{+}{19 \times 16}$
10	-	25 -	40 $\frac{\pm}{11 \times 10}$	55 $\frac{+}{16 \times 14}$	70 $\frac{+}{16 \times 14}$
11	-	26 -	41 $\frac{\pm}{13 \times 13}$	56 -	71 $\frac{+}{18 \times 16}$
12	-	27 -	42 $\frac{\pm}{12 \times 12}$	57 $\frac{+}{16 \times 16}$	72 $\frac{+}{20 \times 17}$
13	-	28 -	43 $\frac{\pm}{12 \times 11}$	58 $\frac{+}{15 \times 13}$	73 $\frac{+}{22 \times 16}$
14	-	29 -	44 -	59 $\frac{+}{21 \times 19}$	74 $\frac{+}{21 \times 18}$
15	-	30 -	45 -	60 -	75 $\frac{+}{21 \times 16}$

OT (100X) ;  $\frac{\text{硬結の有無}}{\text{発赤の大きさ (mm)}}$

表3のII 結核死菌免疫モルモット免疫  
6週後のツ反応成績

(24時間後測定値)

I		II		III		IV		V	
動物 番号	非免疫 対照群	動物 番号	0.001 mg 免疫群	動物 番号	0.01mg 免疫群	動物 番号	0.1mg 免疫群	動物 番号	1 mg 免疫群
1	-	8	-	15	-	22	+	29	++
					18×15		32×14		26×21
2	-	9	-	16	-	23	+	30	++
					12×11		22×16		30×22
3	-	10	-	17	-	24	+	31	++
							24×18		30×20
4	-	11	-	18	±	25	++	32	++
					17×12		30×23		30×20
5	-	12	-	19	±	26	++	33	++
					16×11		25×18		30×20
6	-	13	-	20	-	27	+	34	++
							24×18		27×17
7	-	14	-	21	-	28	++	35	++
							25×19		30×23

OT (100 X) ;  $\frac{\text{硬結の有無}}{\text{発赤の大きさ (mm)}}$

生菌免疫実験：対照率に比較して、0.001 mg 免疫群ですでに病変の抑制が明らかにみられた。対照群の感染局所はすべて潰瘍を呈したが、免疫群では治癒所見を呈していたものも多く、病変も潰瘍を作るまでには至らずに、膿瘍形成の段階にとどまる傾向が強かった。また病変はしつへき腺、そけい腺、および後腹膜腺などに顕著にみられたが、一般に感染側において腫張や乾酪化が高度であった。臓器では脾の病変が著明であった。なお各群の肉眼的所見の程度はヒストグラム(図1のI)に明瞭に示されているように、おおむね抗原量と平行した。各免疫群の平均脾重量はいずれも対照群の約2/3であった。

死菌免疫実験：0.001 mg 免疫群と0.01 mg 免疫群は対照群とほぼ同程度の病変を示したが、0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群では明らかに軽度であった。この傾向は感染局所にも同様に認められ、平均脾重量もこの両群では対照群の約3/4であった。肉眼的病変は生菌免疫実験におけるよりも一般に高度であり、また0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群のツ反応はとくに著明であった<sup>4)</sup>(表3のII)。

(2) 脾内生菌数

脾重量を測定したのち、その一部を摘出して1%苛性ソーダを加えて磨砕、適宜希釈して1%小川培地に定量培養<sup>20)21)22)23)</sup>し、約4週後に判定して脾組織1g中の生菌数を測定した(表4のI, II)。

表4のI BCG免疫モルモット皮下攻撃感染  
6週後の脾内生菌数

実 験 群	生 菌 単 位	
	脾1g中 の菌数	平均値
I 非免疫対照群	14.5×10 <sup>3</sup> 41.5×10 <sup>3</sup> 43.5×10 <sup>3</sup> 49.0×10 <sup>3</sup> 51.5×10 <sup>3</sup> 61.0×10 <sup>3</sup> 13.0×10 <sup>4</sup> 37.0×10 <sup>4</sup>	95.1×10 <sup>3</sup>
II 0.001 mg 免疫群	0 0 0 80.0×10 19.0×10 <sup>2</sup> 79.0×10 <sup>2</sup> 11.0×10 <sup>3</sup> 56.0×10 <sup>3</sup>	97.0×10 <sup>2</sup>
III 0.01 mg 免疫群	0 0 0 0 0 50.0 55.0×10 16.5×10 <sup>3</sup>	21.3×10 <sup>2</sup>
IV 0.1 mg 免疫群	0 0 0 50.0 10.0×10 95.0×10 40.5×10 <sup>2</sup> 62.0×10 <sup>3</sup>	83.9×10 <sup>2</sup>
V 1 mg 免疫群	0 0 0 0 0 50.0 10.0×10	21.4

表4のII 結核死菌免疫モルモット皮下攻撃  
感染6週後の脾内生菌数

実験群	生菌単位	
	脾1g中の菌数	平均値
I 非免疫対照群	28.5×10 <sup>3</sup> 51.5×10 <sup>3</sup> 55.0×10 <sup>3</sup> 80.5×10 <sup>3</sup> 86.0×10 <sup>3</sup> 16.3×10 <sup>4</sup> 28.5×10 <sup>4</sup>	10.7×10 <sup>4</sup>
II 0.001mg 免疫群	20.0×10 <sup>3</sup> 57.5×10 <sup>3</sup> 59.0×10 <sup>3</sup> 97.0×10 <sup>3</sup> 10.2×10 <sup>4</sup> 12.7×10 <sup>4</sup> 15.4×10 <sup>4</sup>	88.0×10 <sup>3</sup>
III 0.01mg 免疫群	71.0×10 <sup>2</sup> 14.7×10 <sup>3</sup> 24.0×10 <sup>3</sup> 31.5×10 <sup>3</sup> 99.5×10 <sup>3</sup> 14.6×10 <sup>4</sup>	53.8×10 <sup>3</sup>
IV 0.1 mg 免疫群	0 10.0×10 <sup>2</sup> 15.0×10 <sup>2</sup> 18.5×10 <sup>2</sup> 21.5×10 <sup>2</sup> 22.5×10 <sup>3</sup> 24.0×10 <sup>3</sup>	75.7×10 <sup>2</sup>
V 1 mg 免疫群	0 0 14.0×10 <sup>2</sup> 23.0×10 <sup>2</sup> 85.5×10 <sup>2</sup> 17.7×10 <sup>3</sup> 46.5×10 <sup>3</sup>	10.9×10 <sup>3</sup>

生菌免疫実験：各免疫群の脾における感染菌増殖抑制効果は対照群に比較して明白であり、各群が示した成績は臓器病変の肉眼的所見に平行した。

死菌免疫実験：生菌免疫実験の成績よりは著しく劣っていたが、それでも対照群に比較すると、0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群の菌増殖抑制効果は明らかであり、0.01 mg 免疫群の生菌数は対照群の約1/2であった。

#### 実験2 静脈内攻撃感染モルモットの脾内生菌数

モルモットの後肢静脈より攻撃感染を行ない、2週後に実験1と同様に、定量培養法によって脾組織1g中の生菌数を測定した(表5のI, II)。

表5のI BCG免疫モルモット静脈内攻撃感染  
2週後の脾内生菌数

実験群	生菌単位	
	脾1g中の菌数	平均値
I 非免疫対照群	21.0×10 <sup>4</sup> 54.0×10 <sup>4</sup> 73.5×10 <sup>4</sup>	49.5×10 <sup>4</sup>
II 0.001mg 免疫群	14.5×10 <sup>4</sup> 25.5×10 <sup>4</sup> 35.0×10 <sup>4</sup> 42.0×10 <sup>4</sup>	29.2×10 <sup>4</sup>
III 0.01mg 免疫群	12.0×10 <sup>4</sup> 17.5×10 <sup>4</sup> 23.5×10 <sup>4</sup> 67.0×10 <sup>4</sup>	30.0×10 <sup>4</sup>
IV 0.1 mg 免疫群	20.0×10 <sup>3</sup> 55.0×10 <sup>3</sup> 60.0×10 <sup>3</sup> 14.5×10 <sup>4</sup>	70.0×10 <sup>3</sup>
V 1 mg 免疫群	25.0×10 <sup>3</sup> 25.0×10 <sup>3</sup> 80.0×10 <sup>3</sup> 16.5×10 <sup>4</sup>	73.7×10 <sup>3</sup>

表5のII 結核死菌免疫モルモット静脈内攻撃  
感染2週後の脾内生菌数

実験群	生菌単位	
	脾1g中の菌数	平均値
I 非免疫対照群	75.0×10 <sup>4</sup> 13.0×10 <sup>5</sup> 15.5×10 <sup>5</sup> 23.5×10 <sup>5</sup>	14.8×10 <sup>5</sup>
II 0.001mg 免疫群	36.0×10 <sup>4</sup> 12.5×10 <sup>5</sup> 16.0×10 <sup>5</sup> 16.0×10 <sup>5</sup>	12.0×10 <sup>5</sup>
III 0.01mg 免疫群	95.0×10 <sup>4</sup> 11.0×10 <sup>5</sup> 21.0×10 <sup>5</sup> 23.0×10 <sup>5</sup>	16.1×10 <sup>5</sup>
IV 0.1 mg 免疫群	24.0×10 <sup>4</sup> 54.0×10 <sup>4</sup> 75.5×10 <sup>4</sup> 10.5×10 <sup>5</sup>	64.6×10 <sup>4</sup>
V 1 mg 免疫群	16.5×10 <sup>4</sup> 18.0×10 <sup>4</sup> 26.0×10 <sup>4</sup> 46.5×10 <sup>4</sup>	26.7×10 <sup>4</sup>

生菌免疫実験：0.001 mg 免疫群と 0.01 mg 免疫群の示した生菌数は、対照群よりは少なかったが、明らかな差異は認められなかった。それらに比較して、0.1 mg 免疫群と 1 mg 免疫群の菌増殖抑制効果は明らかであったが、対照群との間の差異は、皮下攻撃感染におけるほど大きくはなかった。

死菌免疫実験：0.1 mg 免疫群と 1 mg 免疫群にはある程度の菌増殖抑制効果がみられたが、対照群との間の菌数の差異は生菌免疫実験のそれよりもさらに少なかった。0.001 mg 免疫群と 0.01 mg 免疫群には対照群とほとんど同程度の菌数が認められた。なお肉眼的には生菌、死菌両免疫実験とも、各群すべて同程度に高度の病変を伴っていた。

#### 実験3 モルモット脾組織培養

組織培養は有馬・山本らの方法<sup>5)6)7)</sup>に従った。すなわち免疫モルモットに対して後肢静脈より攻撃感染を行ない、3日後に脾を無菌的に摘出して細胞浮遊液を作り、37℃で3日間培養したのち、チール・ネールセン氏法で染色鏡検して細胞内外に認められる菌数を測定し、室温に24時間放置した非培養対照の菌数との比を増殖率として比較した(表6のI, II)。

表6のI

BCG 免疫モルモット組織培養成績

実験群	動物番号	菌数		増殖率
		対照 室温24時間	培養 37℃ 3日間	
I 非免疫対照群	1	5	15	3.0
	2	5	18	3.6
II 0.001 mg 免疫群	3	2	2	1.0
	4	7	8	1.1
III 0.01 mg 免疫群	5	4	5	1.2
	6	4	6	1.5
IV 0.1 mg 免疫群	7	3	3	1.0
	8	2	4	2.0
V 1 mg 免疫群	9	2	2	1.0

表6のII

結核死菌免疫モルモット組織培養成績

実験群	動物番号	菌数		増殖率
		対照 室温24時間	培養 37℃ 3日間	
I 非免疫対照群	11	13	375	28.0
	12	20	380	19.0
	13	33	505	15.3
II 0.001 mg 免疫群	14	15	332	22.1
	15	47	343	7.3
	16	23	613	26.6
III 0.01 mg 免疫群	17	23	159	6.9
	18	13	79	6.0
	19	13	95	7.3
IV 0.1 mg 免疫群	20	4	10	2.5
	21	3	6	2.0
	22	5	9	1.8
V 1 mg 免疫群	23	3	5	1.7
	24	3	4	1.3
	25	5	10	2.0

生菌免疫実験：免疫処置に用いたBCG生菌自体が、感染菌数の測定に影響を及ぼすか否かを確認するために、各免疫群ごとに1匹ずつの非感染対照をおいたが、鏡検によっていずれにも菌を検出できなかった。各免疫群の菌増殖率はすべて2.0以下の低率であり、これは非免疫対照群の1/2～1/3であって、0.001 mg 免疫群ですでに菌増殖抑制効果を示していた。これは皮下攻撃感染による定量培養成績にやや類似していたが、各免疫群の増殖率の間にはほとんど差異が認められず、したがって免疫に用いたBCG接種量とは平行しなかった。

死菌免疫実験：0.001 mg 免疫群においては菌増殖抑制効果は明らかに認められなかったが、非免疫対照群に比較して0.01 mg 免疫群ではその1/2～1/4、0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群では約1/10であった。しかも各免疫群における菌増殖率には皮下攻撃感染による成績よりも、むしろ適確に抗原量に平行する傾向がみられた。

実験4 マウス生存期間と体重の推移

(1) 平均生存日数と生存率曲線

攻撃感染後のマウスの生存日数を plot して各群の平均日数を求め(図3のI, II), 生存率曲線を描いた(図3のI, II)。

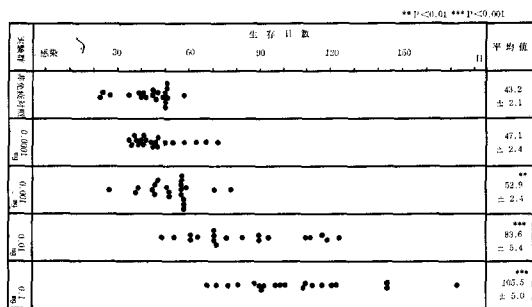


図2のI

BCG免疫マウス攻撃感染後の生存日数

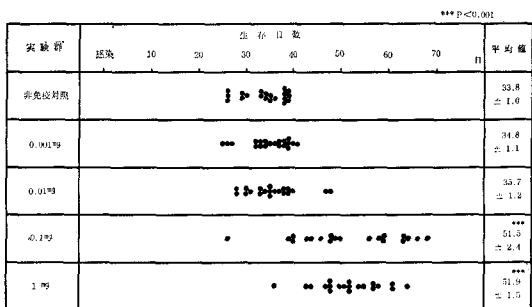


図2のII

結核死菌免疫マウス攻撃感染後の生存日数

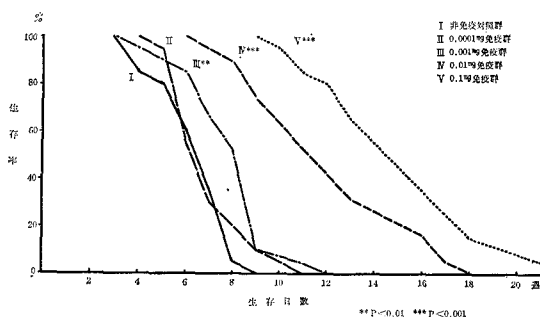


図3のI

BCG免疫マウス攻撃感染後の生存率曲線

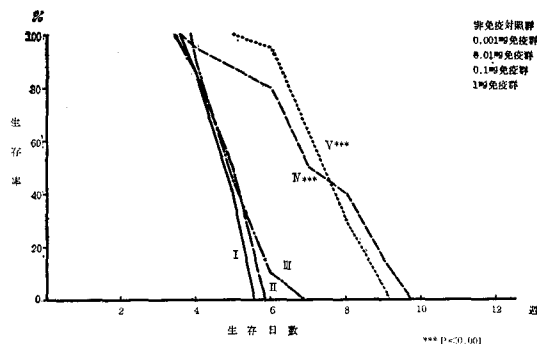


図3のII

結核死菌免疫マウス攻撃感染後の生存率曲線

生菌免疫実験：マウスは攻撃感染後25日前後から死亡しはじめており、対照群は約60日で全部死亡した(平均値, 43.2日)。各免疫群の平均生存日数はいずれも対照群より延長して、おおむね抗原量に平行する傾向がみられた(0.0001 mg 免疫群, 47.1日; 0.001 mg 免疫群, 52.9日; 0.01 mg 免疫群, 83.6日; 0.1 mg 免疫群, 105.5日)。推計学的には 0.01 mg 免疫群と 0.1 mg 免疫群が  $P < 0.001$  で、0.001 mg 免疫群が  $P < 0.01$  で対照群との間に有意差のある延命効果を示した。対照群の大部分は40~50日で死亡し、死亡時期がほぼ一定していたが、免疫群では分散する傾向が強く、これは生存日数の延長していた群ほど大きかった。

死菌免疫実験：マウスが死亡しはじめたのは攻撃感染後約25日で、生菌免疫実験の場合とほぼ一致していたが、対照群が全部死亡したのは約40日後であって、生菌免疫実験におけるよりも20日ほど早かった(平均値, 33.8日)。0.001 mg 免疫群と 0.01 mg 免疫群は対照群とほぼ同様の死亡経過を示しており(平均値, 34.8および35.7日)、0.1 mg 免疫群と 1 mg 免疫群には40日前後から死亡がみられ(平均値, 51.5および51.9日)、この両群には推計学的にも  $P < 0.001$  で対照群との間に有意差のある、明らかな延命効果がみられた。しかし一般に生菌免疫実験におけるよりも各群の平均日数は短く、死亡時期の分散も小さく、各群間の差異も大きくはなかった。

(2) 30日生存率

これは Youmans<sup>12)</sup>、金井ら<sup>13)</sup> が報告している方法であって、毒力菌感染後30日目において、なお生存しているマウスの百分率をとって対照と比較するものである。この方法によれば、対照群は攻撃感染後30日以内に100%死亡するように、実験条件が調整されていなければならない。しかし本実験では生菌、死菌両免疫実験と

もに、感染後30日以内に死亡したマウスはごく少数であったので、この方法によってそのまま比較するのは適当でないと考え、対照群の全部が死亡した時期（生菌免疫実験、60日；死菌免疫実験、40日）において、同様の方法で各群の生存率を求めてみた。したがってこれらを仮りに60日生存率、40日生存率とした。

生菌免疫実験：60日生存率（表7のI）は0.0001 mg

免疫群と0.001 mg 免疫群がそれぞれわずか15.0%および10.0%であったが、0.01 mg 免疫群は89.5%、0.1 mg 免疫群は100.0%の生存率を示した。

死菌免疫実験：40日生存率（表7のII）からみて、延命効果が明らかであったのは0.1 mg 免疫群（80.0%）と1 mg 免疫群（95.0%）であった。

表7のI BCG 免疫マウス攻撃感染後60日生存率

\* 攻撃感染60日後における各群の生存率

実験群	動物数	60日以前死亡			60日以後死亡			* 60日生存率 (%)
		動物数	平均日数	死亡日数	動物数	平均日数	死亡日数	
非免疫	20	20	43.2 <sup>日</sup>	23~58 <sup>日</sup>	0	— <sup>日</sup>	— <sup>日</sup>	0
0.0001 mg	20	17	43.4	35~58	3	67.3	63~72	15.0
0.001 mg	21	19	50.5	27~59	2	74.5	71~78	10.0
0.01 mg	19	2	51.5	49~54	17	87.4	61~124	89.5
0.1 mg	20	0	—	—	20	105.5	68~173	100.0

表7のII 結核死菌免疫マウス攻撃感染後40日生存率

\* 攻撃感染40日後における各群の生存率

実験群	動物数	40日以前死亡			40日以後死亡			* 40日生存率 (%)
		動物数	平均日数	死亡日数	動物数	平均日数	死亡日数	
非免疫	20	20	33.7 <sup>日</sup>	26~39 <sup>日</sup>	0	— <sup>日</sup>	— <sup>日</sup>	0
0.001 mg	20	19	32.4	25~40	1	41.0	41	5.0
0.01 mg	20	18	34.3	28~40	2	47.5	47~48	10.0
0.1 mg	20	4	36.2	26~40	16	55.2	43~68	80.0
1 mg	20	1	36.0	36	19	52.7	43~64	95.0

### (3) 体重の推移

実験経過を追ってマウスの体重を測定し、各群の平均を比較するとともに、対照として無処置の正常マウス6匹についても測定を行なった。さらに攻撃感染時においてすでに存在した各群間の体重差を考慮して、攻撃感染時の測定値と一定期間後（5~6週）における値との比を増減率として求めた（4図のI, II）。

生菌免疫実験：攻撃感染までは各群ともほとんど同程度の体重増加を示したが、非免疫対照群では攻撃感染後に急激な減少がみられ、0.0001 mg 免疫群もそれとほぼ同様に経過した。0.001 mg 免疫群は攻撃感染後も一時や

や増加したが間もなく減少しはじめ、また0.01 mg 免疫群と0.1 mg 免疫群とは無処置正常群と同様に増加しつづけ、4週以後になって徐々に減少の傾向を示した。すなわち感染6週後において、これらの3群はいずれも攻撃感染時に比較して体重は増加しており、体重減少抑制効果が認められた（ $P < 0.05 \sim 0.001$ ）（図4のI）。

死菌免疫実験：0.001 mg 免疫群と0.01 mg 免疫群は非免疫対照群とほとんど一致した経過で体重減少を示した。0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群は、2週後までは無処置正常群と同様に増加し、その後減少しはじめたが、感染5週後において、この両群には体重減少抑制効果が

示された ( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。しかし各群とも、非免疫対照群との差異は生菌免疫実験におけるよりは小さかった (図4のII)。

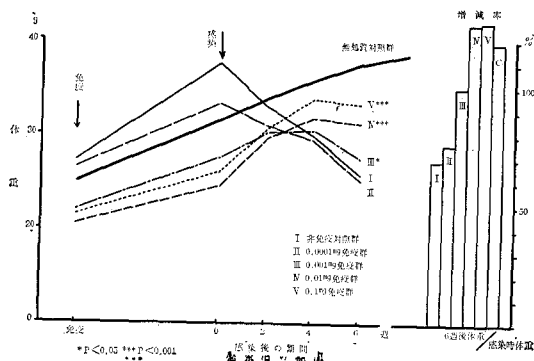


図4のI  
BCG免疫マウス攻撃感染後の体重の推移

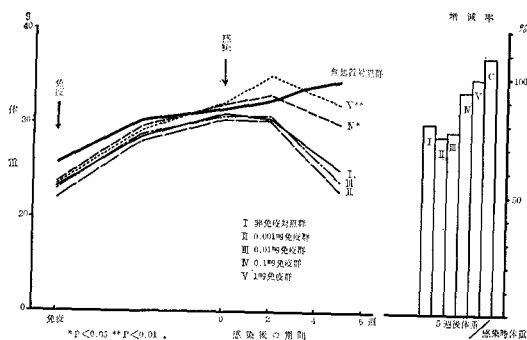


図4のII  
結核死菌免疫マウス攻撃感染後の体重の推移

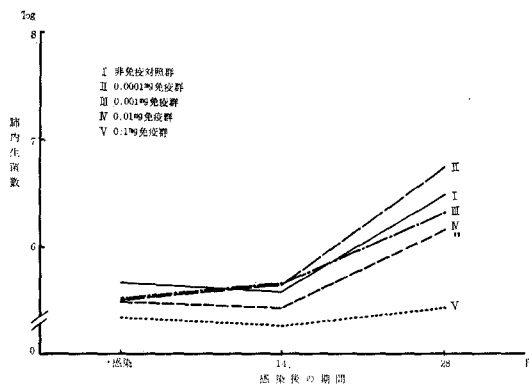


図5のI  
BCG免疫マウス攻撃感染後の肺内生菌数  
(肺1g中の菌数)

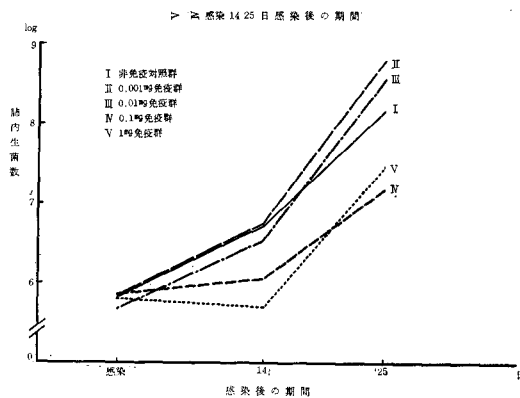


図5のII  
結核死菌免疫マウス攻撃感染後の肺内生菌数  
(肺1g中の菌数)

実験5 マウス肺内生菌数

攻撃感染直後、14日後、および対照群が死亡しはじめた時期の3回にわたり、定量培養法<sup>24)25)26)27)</sup>によって肺内生菌数を測定し、各群の平均を対数であらわした (図5のI, II)。培養方法<sup>28)29)</sup>はモルモットの場合と同様である。

生菌免疫実験：攻撃感染14日後までは各群とも生菌数に増減がほとんどみられなかった。28日後では、0.1 mg 免疫群においてのみ、対照群に比較してきわめて明らかな菌増殖抑制効果が示され、また 0.01 mg 免疫群の生菌数は対照群の約1/2であった。しかし本法によって示された抑制効果は一般に延命効果ほど明らかなものではなかった。

死菌免疫実験：各群の生菌数の推移は生菌免疫実験のそれとほぼ同様であったが、一般に肺内での感染菌の増殖はより著しかった。攻撃感染25日後では、0.1 mg 免疫群と 1 mg 免疫群の菌数は対照群の1/5~1/10で、明らかな菌増殖抑制効果が示された。

実験6 マウス肺病変

定量培養と平行して、それと同一時期における肺病変について観察した。

(1) 肉眼的病変

結核感染マウス肺の肉眼的病変度を0~5の5段階に評価する青木ら<sup>15)</sup>の方法によって判定し、各群の平均を比較した (図6のI, II)。

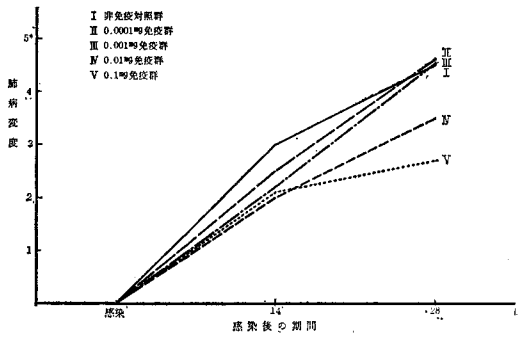


図6のI BCG免疫マウス攻撃感染後の  
肺肉眼所見  
\* 肉眼的評価は青木の基準による

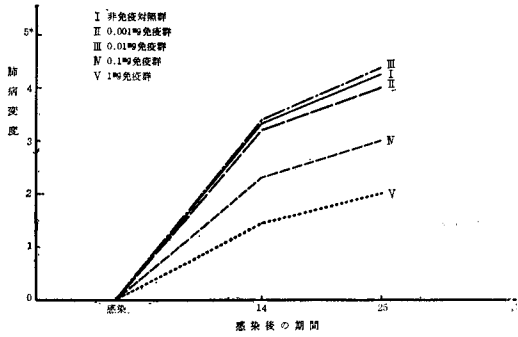


図6のII 結核死菌免疫マウス攻撃感染後の  
肉眼所見  
\* 肉眼的評価は青木の基準による

生菌免疫実験：攻撃感染14日後ですすでに対照群には2 mm 以上の大きな結節が出現していたが、これに反して免疫群には、いずれも微細な結節をかるうじて認めえたとにすぎなかった。28日後には各群とも、肺全体に無数の結節を認めるようになったが、0.1 mg 免疫群だけは大部分が小さい結節で占められていて、病変抑制効果が明白であり、これに近い効果が0.01 mg 免疫群にも示された。

死菌免疫実験：0.001 mg 免疫群と0.01 mg 免疫群は、攻撃感染14日後ですすでに対照群と同程度の高度の病変を伴っていたが、0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群の病変は軽微であった。同様の関係は25日後になっても変わらず、0.1 mg 免疫群には中等度の、1 mg 免疫群には軽度の、いずれも微細な結節しか認められなかった。

(2) 肺重量と肺係数(比肺重)

摘出した肺を肉眼的に観察したのち、その重量を測定した。しかし各群が示した肺重量には比較しうるような差異がほとんど認められなかったので、さらに肺重量(mg)/体重(g)の数値(肺係数<sup>30)</sup>、比肺重<sup>31)</sup>)を比較する方法を用いた(図7のI, II)。

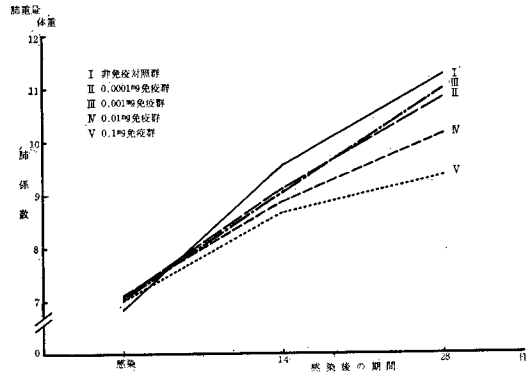


図7のI  
BCG免疫マウス攻撃感染後の肺係数

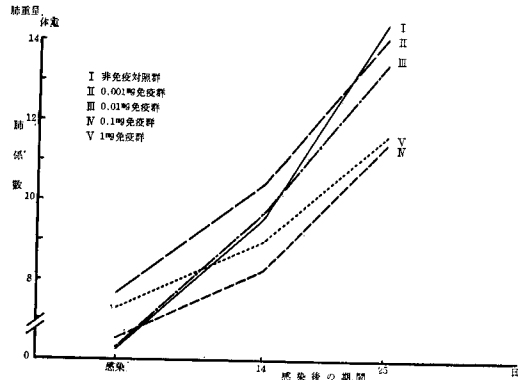


図7のII  
結核死菌免疫マウス攻撃感染後の肺係数

生菌免疫実験：各免疫群の攻撃感染14日後の肺係数は対照群に比較して若干の上昇抑制効果を示したようであるが、その差異は決して明確なものではなかった。しかし28日後では0.1 mg 免疫群に抑制効果が比較的明らかに示され、0.01 mg 免疫群にもこれに近い効果がみられた。

死菌免疫実験：攻撃感染14日後ですすでに対照群に比較して、0.1 mg 免疫群と1 mg 免疫群では肺係数上昇抑制効果が認められ、この傾向は25日後においてさらに著明となった。

(3) 肺比重

肺比重の測定は Crowle<sup>17)</sup>の方法にしたがい、各群の平均を比較した。これは病変の肉眼的観察や重量測定に用いた材料について同時に行なったものである。すなわち摘出した全肺の血液を濾紙で穏やかに除去し、あらかじめ準備しておいた標準比重液に投入して、肺の浮沈によって比重を決定するものである。この場合、アレルギー反応による非特異的比重増加を防止するために、測定前に酢酸コーチゾンの腹腔内注射を行なった<sup>32)33)</sup>。

生菌免疫実験：免疫群の比重は対照群よりも多少遅れて上昇する傾向がみられたが、0.0001mg 免疫群は対照群に近い推移を示した。攻撃感染28日後における各群間の差異はあまり大きくはなかったが、推計学的には0.1mg 免疫群と対照群との間に  $P < 0.05$  で有意差を認めた(図8のI)。

死菌免疫実験：各群とも攻撃感染14日後から同程度に急激な比重の上昇を示し、各群間の差異は生菌免疫実験におけるよりもさらに僅少で、推計学的には0.01mg 免疫群と1mg 免疫群が対照群との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

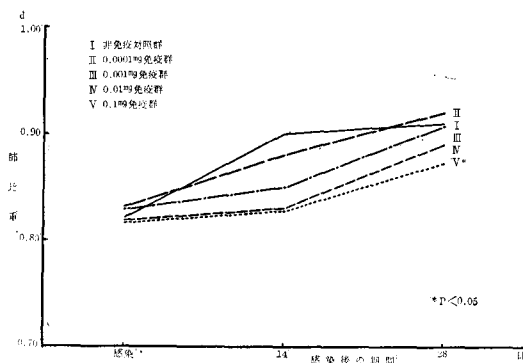


図8のI

BCG感染マウス攻撃感染後の肺比重

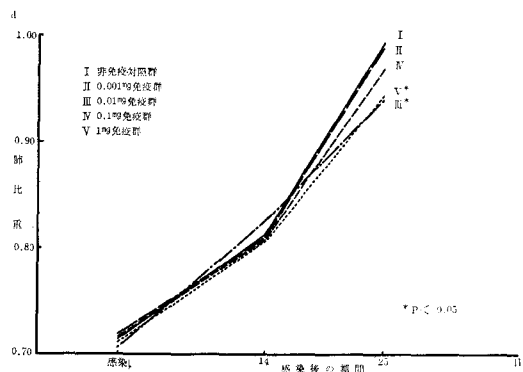


図8のII

結核死菌免疫マウス攻撃感染後の肺比重

を示したが、それは抗原量に平行した成績ではなかった(図8のII)。

総括ならびに考案

結核免疫実験において、抗原の免疫効果を敏感、かつ正確に表現しうる方法の確立が望まれることはいうまでもない。このことは実際問題として、結核ワクチンの研究の上からばかりでなく、結核免疫とアレルギーの関連を抗原組成の面から分析しようとする場合などにも、決して欠くことのできない要素といえよう。このような意味から、本実験ではモルモットとマウスを用いて、上述のような数種の免疫測定法について比較を試みたのであるが、個々の方法について検討を加える前に、実験に使用したモルモットとマウスの結核抗原に対する感受性について考えてみる必要がある。まず今回の実験成績から、各測定方法における抗原の最少有効量と、抗原の増量に伴う免疫効果の反映度の概要を総括して表示してみた(表8)。そこで1例をモルモット皮下攻撃感染法とマウス平均生存日数とにとってみると、BCGの最少有効抗原量は両者ともに0.001mgである。しかし接種抗原量をモルモットとマウスの体重の面から比較すると、その体重比はおおよそ20:1であって、モルモットはその割合だけマウスよりも鋭敏だということになる。

表8 各免疫測定法における最少最効抗原量、ならびに免疫効果の反映度

使用動物	測定方法	BCG		結核死菌		
		最少有効抗原量 (mg)	免疫効果反映度	最少有効抗原量 (mg)	免疫効果反映度	
モルモット	皮下感染	肉眼的所見	0.001	卅	0.1	卅
		脾内生菌数	0.001	卅	0.01	卅
	静注感染	脾内生菌数	0.1	+	0.1	±
		脾組織培養	0.001	-	0.01	卅
マウス	生存期間	平均日数	0.001	卅	0.1	+
		30%生存率	0.01	+	0.1	卅
	体重推移	0.001	卅	0.1	+	
マウス	肺内生菌数	0.01	卅	0.1	±	
	肺肉眼的所見	0.01	卅	0.1	卅	
	肺係数	0.01	卅	0.1	+	
マウス	肺比重	0.1	±	0.01	-	

さらに攻撃感染に用いた毒力菌については、両動物に対する使用菌株に差異があるとしても、同様な効果をもたらすためには、マウスはモルモットのおよそ1000倍の菌量を必要としたことになる。これらのことは、マウスがいかに結核実験に鈍感な物差であるかを示している。

さてモルモット接種法について考察を行なってみよう。まず皮下感染法についてであるが、攻撃感染後の剖検によって結核病変を肉眼的に判定する従来の方法は、感染防禦効果をきわめて鋭敏かつ正確に表現するようである(表2, 図1)。とくに門脈腺のような深在性のリンパ腺が抗原量とよく平行していたが、病変がむしろ軽度であった肺や、菌接種反対側のリンパ腺にその傾向がみられた。また剖検時における脾重量も、肉眼的病変度とおおむね平行して増加しており、免疫効果測定の場合にもある程度の指標となりうるようである。このように、本法は安定した信頼性のある評価方法と考えられる。しかし攻撃感染より剖検までに長期間を要する欠点があり、また肉眼的判定法に共通の、主観の介入を避けることができない。そのため感染程度を数量的に表現する手段として、古くから Feldman index<sup>34)</sup>などがある。

臓器定量培養法は内外多くの基礎的研究<sup>20)~23)35)36)</sup>の結果、結核感染モルモットにおいて剖検所見とよく一致することなどから<sup>25)</sup>、免疫効果の測定法としても広く用いられてきている。本実験においても、皮下攻撃感染後の脾内生菌数は肉眼的病変度とよく平行しており(表4)、しかもより客観的に成績判定をなしうる点などから、本法もまた信頼性のある評価方法といえよう。しかし肉眼的観察法よりも手技が複雑であることや、判定までにはさらに長期間を必要とすることなどの難点がある。

静脈内攻撃感染後に脾定量培養を行なう方法は、感染後ただちに開始される攻撃菌と脾組織との反応の推移から免疫効果を測定しうるとして、近時橋本ら<sup>4)</sup>によって提唱されたものである。すなわち従来の皮下感染法では攻撃菌の侵入部位における固定や排除、および臓器に到達するまでの過程における生体側因子の何等かの抵抗などが考えられるが、本法ではそれらを除外して、臓器における抗菌作用の面のみから免疫効果を表現しうるわけである。さらに本法によれば、脾内生菌数は攻撃感染後2週を最高峰として増殖曲線を描くことから<sup>38)</sup>、皮下感染法よりも短期間で成績を判定しうる利点もある。本実験においては、本法は皮下法と同傾向の成績を示したが(表5)、各群間の攻撃菌増殖抑制効果の差異はそれほど明らかではなく、鋭敏性の点では皮下法に劣るようである。

モルモット脾組織培養法<sup>5)6)</sup>は結核免疫の本態を、主として細胞と攻撃菌との関係から追究するために重要であるが、有馬・山本ら<sup>7)</sup>は脾細胞の共存下で、感染毒力菌の増殖が明らかに抑制されることを報告している。本実験においても、攻撃菌増殖率によって皮下法と同程度の鋭敏性で免疫効果を判定することができた。加えて本法によれば、きわめて短時間で成績判定をなしうるばかりか、数値によって客観的に比較できることや、比較的少数の動物の使用で測定が可能であるなどの利点があり、多少手技の複雑さを除けば、免疫測定法としてすぐれた方法といえよう。ただし生菌免疫実験において抗原量に平行した成績がえられなかったのは、おそらく細胞浮遊液中の菌数が適当でなかったためであり、小野ら<sup>6)</sup>が指摘しているように、実施にあたっては注意すべき点であろう。

次にマウス実験成績について考察を進めよう。さきに述べたように、マウスの結核に対する感受性はモルモットに比較して著しく低く、その点では決して有利な免疫測定の手段を提供するとはいえない。しかしマウスには近交系や純系のもを比較的少ない費用で入手でき、しかも取扱いが容易であるために多数を使用することができ、したがって推計学的処理によって客観的な成績判定が可能であることなどの長所も少なくない。それで攻撃感染後の生存期間による免疫効果の測定は、このような利点を生かしたマウスに最適な方法であり、さらに比較的短時日で成績判定のできる、しかも主観の介入する余地のない正確な方法でもある。本実験においても、生存期間を指標とした方法は肺内生菌数や肺肉眼的病変度によるものよりも鋭敏に免疫効果を反映しており、その成績はむしろモルモット法に近く、マウス接種法の中でもっとも安定性がみられた。延命効果の判定には免疫群と対照群の生存日数の比(vaccination index<sup>39)</sup>)を用いる方法などもあるが、もっとも一般的なのは算術平均による代表値の比較であって、本実験においても本法を用いた(図2)。また代表値としては中央値<sup>40)41)42)</sup>なども用いられているが、免疫マウスに対してはたとえ適当な強さの攻撃感染を行なっても、正常マウスに少量菌を感染させた場合と同様に、死亡の推移は正規分布をとらないことが知られている<sup>12)43)</sup>。そのため中央値によって免疫効果を評価するよりも、攻撃感染後30日以上生存したマウスの百分率を比較するほうが適切だとして提唱されたのが30日生存率法<sup>12)13)44)</sup>である。しかし本法を行なうにあたって、すべての実験において感染後30日以内に、対照群が100%死亡するように条件を整えるのは決して容易なことではない。本実験においてもほとんど同

一条件で攻撃感染を行なったにもかかわらず、生菌、死菌両免疫実験ともに死亡開始時期はほとんど一致していたが、対照群の全部が死亡した日数は60日と40日で、そこには約20日の相違がみられた。したがって本実験では、厳密には30日生存率法を実施しえなかったわけである(表7)。これについては多くの問題があるが、技術的なことはもちろん、マウスの系統と攻撃感染菌株や菌量、すなわち host-parasite system<sup>43)</sup> などの実験条件についてもさらに検討する必要がある。本実験においては一応、対照群が全部死亡した時期(生菌免疫実験, 60日; 死菌免疫実験, 40日)を基準として生存率を求めたわけであるが、その成績は各群の平均生存日数とほぼ一致しており、このような方法も不完全ではあるがひとつの方法と思われる。

マウス臓器内生菌数によって免疫効果を測定しようとする試みは主として Dubos<sup>28)29)</sup> によってなされ、とくに肺内の菌消長がもっとも参考になるとして<sup>45)46)47)</sup>、今日では生存期間による方法とともに価値ある指標として<sup>11)</sup>一般に用いられている。本法の得失はモルモットの場合と同様であるが、本実験における菌数の消長は生存日数と必ずしも平行しておらず(図5)、抗原量との間にも明確な相関は認め難かった。

次に肺病変の肉眼的所見から免疫効果を評価する方法であるが、病変度判定法としては古くから Youmans<sup>14)</sup>の方法などもある。一方この方法は判定基準が比較的難しく、判定結果が片寄る傾向があるとして、青木<sup>15)</sup>はこれと原則的には同一であるが、評価基準の異なる方法を発表している。これらはいずれも感染程度を測定する手段として用いられているものであるが、本実験ではこれによって免疫効果の判定を試みたものである(図6)。その成績は肺内生菌数によるものとほぼ一致しており、本法が免疫実験においても有用であることが認められた。さらに病変の進展は菌数の増加に先行する傾向がうかがわれ、かつ定量培養よりも手技が容易であるばかりでなく、成績判定が迅速であることなどの利点もある。しかし判定が主観的になることは避けられず、とくに免疫の有無によって病変の出現態度に本質的な相違がみられるよう<sup>30)</sup>、結核結節のみについても同一基準では比較の困難な場合も少なくない。一般に対照群は少数でも大結節を作りやすく、免疫群には多数になっても微細なままの傾向がある。また肺だけが観察の対象であることなども、モルモットとは同一に評価できない点であって、本法を免疫測定法として応用する場合は、他の data を補う程度と考えるべきであろう<sup>17)</sup>。

マウス肺病変度をできるだけ客観的に表現しようとし

て、肺重量<sup>16)</sup> や肺比重<sup>17)</sup> の測定方法が考案された。これらは数量化して評価できる点ではよい方法といえるが、手技がはなはだ複雑であり、かつ非特異性因子による影響<sup>30)</sup>がきわめて大きいことなどの次点がある。このことは、単なる感染実験<sup>15)30)48)</sup> の場合はともかく、免疫実験においては免疫操作そのものや、攻撃感染によるアレルギー反応などについても考慮を要することを示唆するものであろう。本実験において肺重量には一定の明確な傾向がえられず、また肉眼的所見とも相関がみられなかった。さらに肺重量には、体重におおむね平行した個体差もかなり大きく、それに感染の進行による体重減少などを考慮すると、肺重量そのものよりも、肺係数<sup>30)</sup>(比肺重<sup>31)</sup>)を比較するほうが合理的と考えられるので、本実験ではこれを採用した(図7)。本法によると、抗原量におおむね平行した成績をうることができたが、平均生存日数ほど明らかな差異は示さなかった。

肺比重によっても各群間に明瞭な差異が示されず、推計学的な有意差も抗原大量接種群にみられたにすぎない(図8)。しかもその成績は抗原量と必ずしも平行しておらず、肉眼的所見などとも一致したものではなかった。一方推計学的検討に対して十分な動物数が使用されたともいえない。本法は Crowle<sup>32)33)</sup> によってすでに免疫実験にも用いられている方法であり、本実験成績が不十分なものであったことは追試方法などにもさらに検討すべき点があるとしても、安定した方法とはいえないようである。またとくにアレルギーの関与によっては重大な誤差を生ずるものようである。

最後に体重の推移についてふれておこう。本法は結核菌の毒力測定<sup>26)</sup> や、化学療法剤の効果判定<sup>49)</sup> の補助手段として用いられているにすぎず、本実験においてもそのような意味から行なったのである(図4)。ところが各群の体重平均値は延命効果とほぼ平行し、生菌、死菌両免疫実験のいずれにおいても、免疫群の抵抗性の度合いが体重の推移によって、明らかに表現される傾向がみられた。したがってこのような簡単な手段も決しておろそかにすべきでないことを知った。

以上、本実験で試みた種々の測定法は、そのいずれもが免疫効果反映の鋭敏性や表現の正確度、および実験手技の簡易さ、あるいは成績評価の客観性や、判定までの所要期間などの点で必ずしも満足できる安全な方法とは思われなかった。故にいくつかの判定法を実験目的に応じて組み合わせ、最適な条件下で実施するのが最良の手段と考えられる。しかしここで結核免疫測定法の基準の私案をあえて提示するならば、著者はモルモット皮下感染法(肉眼的所見、および脾内生菌数)、モルモット脾組

織培養法、ならびに体重測定を伴なうマウス生存日数法とを挙げたい。

## 結 語

BCGと結核死菌を免疫抗原とし、モルモットおよびマウスを用いて、実験的結核症における種々の免疫測定法を比較研究し、次の結論をえた。

1) モルモットは感受性の点でマウスよりすぐれており、モルモット接種法は一般に結核免疫の効果を忠実に反映するが、とくに皮下感染後の病変度を肉眼的に評価する方法と、脾定量培養によって生菌数を比較する方法とは、もっとも安定した信頼性のある成績を示した。

2) モルモット静脈内攻撃感染による脾定量培養法はそれらに比較して、やや鋭敏性に欠けるきらいがあった。

3) モルモット脾組織培養によって攻撃菌の増殖率を比較する方法は、皮下法と同程度の正確さと鋭敏性を示し、かつきわめて短時日で、しかも比較的少ない動物数で成績判定を行ないうることなど、すぐれた方法といえる。

4) マウスは結核実験に鈍感な動物であり、免疫測定に必ずしも有利な手段を提供するとはいえない。しかし攻撃感染後の平均生存日数や生存率による方法からは、実験条件を慎重に考慮するならば、モルモット法に近いかなり信頼性のある成績がえられるようである。

5) したがってこれらのマウス接種法は、結核免疫の screening test として十分に利用されてよい方法と考える。

6) マウス肺病変の肉眼的所見は脾定量培養による生菌数の消長とほぼ一致する傾向があり、攻撃感染後の体重の推移などととも、免疫効果測定の補助手段として有意義といえよう。

7) しかしいずれの測定方法も、決してすべての点において満足できるものではなく、免疫効果測定にあたっては、いくつかの判定法によって総合的に判断することが必要と思われる。

本稿を終えるにあたって、終始ご懇篤なご指導をたまわった、北大結核研究所高橋義夫教授、有馬純助教授、ならびに種々ご指導、ご援助いただいた山本健一助教授に対して深甚な謝意を表するとともに、本研究の機会を与えられ、終始ご鞭達くださった、国立小樽療養所菅野保次所長に衷心よりお礼を申し上げます。

(本論文の要旨は日本結核病学会北海道地方会、第15回総会(昭和39年)、および日本結核病学会、第40回総会(昭和40年)において発表した。)

## 文 献

- 1) 山口 寿：医療，18，1，昭39.
- 2) 伝研学友会(編)：細菌学実習提要，丸善，昭37.
- 3) 柳沢 謙，他：日本結核全書，2の8，金原・克誠堂，昭32.
- 4) 橋本達一郎，他：日本細菌学雑誌，10，219，昭30.
- 5) 有馬 純，他：医学と生物学，49，237，昭33.
- 6) 小野英夫，他：結核の研究，12，1，昭34.
- 7) 有馬 純，他：医学と生物学，55，197，昭35.
- 8) Raleigh, G. W., et al : J. Inf. Dis., 82, 197, 1948.
- 9) Raleigh, G. W., et al : J. Inf. Dis., 82, 205, 1948.
- 10) 岩崎竜郎，他：結核，24，173，昭24.
- 11) 染谷四郎：結核，35，(特別号)，昭35.
- 12) Youmans, G. P., et al : J. Imm., 78, 318, 1957.
- 13) Kanai, K., et al : J. Bacteriol., 80, 607, 1960.
- 14) Youmans, G. P. : Am. Rev. Tbc., 61, 274, 1950.
- 15) 青木正和，他：結核，36，355，昭36.
- 16) Gray, D. F., et al : Am. Rev. Tbc., 78, 226, 1958.
- 17) Crowle, A. J. : Am. Rev. Tbc., 77, 681, 1958.
- 18) Bloch, H. : Advance Tbc. Research, 8, 1, 1957.
- 19) 高橋和男：結核の研究，12，81，昭34.
- 20) 小川辰次：結核，24，49，昭24.
- 21) 小川辰次：結核，24，55，昭24.
- 22) 小川辰次，他：結核，24，80，昭24.
- 23) 小川辰次，他：結核，24，97，昭24.
- 24) 小川辰次，他：結核，25，647，昭25.
- 25) 染谷四郎，他：結核，26，74，昭26.
- 26) Pierce, C. H., et al : J. Exp. Med., 86, 159, 1947.
- 27) Pierce, C. H., et al : J. Exp. Med., 97, 189, 1953.
- 28) Dubos, R. J., et al : J. Exp. Med., 97, 207, 1953.
- 29) Dubos, R. J., et al : J. Exp. Med., 97, 221, 1953.
- 30) 寺井武雄，他：結核，39，166，昭39.
- 31) 岩崎竜郎，他：結核，40，359，昭40.
- 32) Crowle, A. J. : Tuberc., 42, 470, 1961.
- 33) Crowle, A. J. : Tuberc., 42, 479, 1961.
- 34) Feldman, W. H. : Am. Rev. Tbc., 48, 248, 1943.
- 35) Lurie, M. : J. Exp. Med., 50, 747, 1929.
- 36) Lurie, M. : J. Exp. Med., 57, 181, 1933.
- 37) Dubos, R. J. : Am. Rev. Tbc., 60, 670, 1949.
- 38) 橋本達一郎，他：医学と生物学，31，115，昭29.
- 39) Bloch, H. et al : Am. Rev. Tbc., 71, 228, 1955.
- 40) Youmans, G. P., et al : Am. Rev. Tbc., 64, 534, 1951.
- 41) Youmans, G. P., et al : Am. Rev. Tbc., 64, 541, 1951.
- 42) Litchfield, J. T. : J. Pharmac. & Exp. Therap., 97, 399, 1949.
- 43) 寺井武雄，他：結核，37，283，昭37.
- 44) 金井興美：医学と生物学，59，74~93，昭36.
- 45) 阿部逸夫：結核，28，374，昭28.
- 46) Sever, J. L., et al : Am. Rev. Tbc. Pulm. Dis. 76, 616, 1957.
- 47) Conge, G. : Am. Rev. Tbc. Pulm. Dis., 79, 484, 1959.
- 48) Ceriotti, G. : Am. Rev. Tbc. Pulm. Dis., 69, 104, 1954.
- 49) Youmans, G. P., et al : J. Inf. Dis., 82, 221, 1948.