BCG「ワクチン」ノ保存ニ關スル研究

(其一)　BCG「ワクチン」調製用「メヂューム」ニ就テ

(7月22日受領)

九州帝國大學醫學部細菌學教室(主任　戸田忠雄教授)

吉田　長之

目次

緒論
實驗ノ部
第一實驗
1) 實驗方法
2) 實驗成績
第二實驗
1) 實驗方法
2) 實驗成績
總括竝ニ考按
結論
主要文獻

緒論

日支事變勃發以來國民體位向上ニ對スル認識ハ急激ニ目醒メテ來タ感ガアル。特ニ忠勇ナル皇軍勇士ヲ始メ、銃後ノ青少年ニシテ結核ノタメ健康ヲ害セラルル者ガ極メテ多ク、之ガ爲ニ朝野ヲ擧ゲテ結核問題ヲ眞劍ニ考ヘナケレバナラヌ時期ガ到來シタ。

然ルニ今回偶々、恐レ多クモ皇后陛下ニオカセラレテハ結核豫防及治療ノタメ巨額ノ御下賜金ヲ賜ツタ。吾々國民ハ此ノ御仁慈ニ唯々感激スルノミデアル。

昨年5月ヨリ、學術振興會デハ結核豫防對策ノ一手段トシテ、BCG ノ豫防注射ニ關スル研究ヲ始メタ。於玆吾々ノ教室ニ於テモ戸田教授指導ノ許ニ、各種團體ニ對シテ BCG 豫防接種ヲ昨年5月ヨリ施行シ現在被接種者ハ相當ノ數ニ及ンデヰル。

然ルニ玆ニ問題トナルコトハ、BCG「ワクチン」ヲ製作シテカラ人體ニ接種スルマデノ時間デアル。現在我々ノ教室デハ、「ワクチン」製作當日若シクハ翌日迄氷室ニ保存セルモノヲ用ヒテヰルガ、BCG「ワクチン」ヲ製作シテヨリ何日位實際上使用シ得ルカニ就テハ深ク研究セラレテヰナイ。故ニ「ワクチン」製作場所ヨリ遠ク離レタ場所ニ於テ豫防接種ヲ行ハントスル場合、コノ問題ノ解決ガ必要デアル。

BCG「ワクチン」製作後、時日ノ經過ト共ニ生菌ハ如何ナル經過ヲ採ツテ死滅減少スルモノカ、或ハ亦、BCG 菌自身ノ免疫能力ハ如何ナル變化ヲ蒙ルカ、此ノ二ツノ點ガ先ヅ考ヘラレネバナラナイ。

現在我々ノ教室デハ BCG「ワクチン」稀釋溶液トシテ滅菌生理的食鹽水ヲ使用シテヰルガ、フランスニ於テハ、ソートン氏液ノ4倍稀釋液ガ用ヒラレテヰル。今回自分ハ各種稀釋溶液ヲ試作シ、之ヲ以テ BCG「ワクチン」ヲ作リ、如何ナル組成ヲ有スル稀釋液ガ最モ保存ニ好適デアルカ、或ハ又、「ワクチン」製作後何日位迄實際上使用シ得ルカニ就テ研究シタノデ、今日迄ノ

成績ヲ一先ヅ報告シ御批判ヲ乞フ次第デアル。

實驗ノ部

第一實驗

1)　實驗方法

豫備實驗ノタメ次ノ如キ BCG「ワクチン」調製用稀釋培地ヲ選擇シタ。卽チ、

(1) 0.85％食鹽水

(2) 1％葡萄糖溶液

(3) 4倍稀釋ソートン氏液

(4) 0.5％「マルトーゼ」溶液

(5) 5倍稀釋キルヒネル氏血清培地

以上5種ノ培地ヲ製作シ、4.5 cc 宛實驗管ニ分注シ、(1)、(3)ハ30分3回、(2)、(4)ハ15分3回、(5)ハ60度30分3回滅菌シテ置ク。之ニ豫メ細心ノ注意ヲ以テ無菌的ニ調製シタ BCG 平等浮游液(0.5 cc 生理的食鹽水中ニ BCG 含有量 0.2 mg)0.5 cc 宛ヲ、豫メ準備シテアル數種稀釋用培地 4.5 cc 內ニ入レル。斯クスルコトニ依ツテ人體接種用 BCG「ワクチン」ト同等ノ濃度ヲ有スル BCG 浮游液ガ出來タワケデアツテ、之ヲ冷暗所ニ保持スル意味デ、敎室ニアル大冷室ノ外部屋ニ保存スルコトトシタ。之レヲ毎日取リ出シテ豫メ振盪シテカラソノ1白金耳ヲペトラニアニ氏培地斜面ニ可及的平等ニ塗布シ、之ヲ38度ノ孵卵器ニ納メ、約1箇月半ニ渉リBCG集落ノ發生狀況ヲ觀察シテ、發育良好ナルモノハ(十)ノ數ニ依ツテ表示スルコトヽシタ。

2)　實驗成績

BCG「ワクチン」調製後1時間、24時間、2日、3日、4日ト日ヲ追ツテ一白金耳宛ペトラニアニ氏培地ニ塗布シ集落ノ發生狀況ヲ觀察スルト第1表ノ如クデアル。卽チ最モ優秀ナルモノハ、5號培地(5倍稀釋キルヒネル氏血清培地)デアツテ4日迄 BCG「ワクチン」內ノ菌ガ相當數生存スルコトハ確實デアル。

次ニ良好ナルモノハ4倍稀釋ソートン氏培地デアツテ4日目迄生存スル。0.5％「マルトーゼ」含有溶液ハ之ヨリモ稍ゝ劣リ、4日目デハ辛ジテ生存スルモノガアルト言フ程度デアル。

次ハ、1％葡萄糖含有溶液デアツテ、3日目迄 BCG ハ可成リ生存スル。之ヨリモ更ニ少シク不良ナルモノハ生理的食鹽水培地デアツテ、「ワ

Table I. Preservation of BCG Vaccine

Growth of BCG / Component of medium	Time after preparation of BCG Vaccine									
	1 hour	24 hours	2 days	3 days	4 days	5 days	7 days	8 days	9 days	11 days
1. 0.85％ NACL Solution	+	++	++	++	−	−	−	−	−	−
	±	+	++	++	−	−	−	−	−	−
	±	+	++	++	−	−	−	−	−	−
2. 1％ Glucose Sol.	+	++	++	+++	+	−	−	−	−	−
	±	±	+++	+++	−	−	−	−	−	−
	±	+	++	++	−	−	−	−	−	−
3. 4X diluted Sauton med.	+	++	+++	+++	++	−	−	−	−	−
	+	++	++	+++	++	−	−	−	−	−
	±	+	++	+++	+	−	−	−	−	−
4. 0.5％ maltose sol.	++	+	+++	+++	+	−	−	−	−	−
	++	+	++	+++	±	−	−	−	−	−
	++	+	++	+++	+	−	−	−	−	−
5. 4X diluted Sauton med.	++	+++	+++	++++	++	−	−	−	−	−
	++	++	+++	+++	++	−	−	−	−	−
	++	++	++	+++	+	−	−	−	−	−

クチン」調製後生存確實ト思ハレルモノハ3日間ニ過ギヌ。

第二實驗

1) 實驗方法

第一實驗ノ成績ニ依ツテ、大略豫想ガ著イタノデ第二實驗トシテハ次ノ如キ BCG「ワクチン」稀釋用培地ヲ使用シタ。

(1) 0.85％食鹽水
(2) 0.5％「マルトーゼ」含有ノ5％「グリセリン」水
(3) 0.5％「グリユコーゼ」含有ノ5％「グリセリン」水
(4) 0.5％「マルトーゼ」含有ノ4倍稀釋ソートン氏液
(5) 0.5％「グリユコーゼ」含有ノ4倍稀釋ソートン氏液
(6) 4倍稀釋ソートン氏液
(7) 生理的食鹽水內ニ5％ノ割ニ「グリセリン」ヲ含ムモノ
(8) 生理的食鹽水中ニ1％ノ割ニ「グリセリン」ヲ含ムモノ
(9) 生理的食鹽水中ニ10％ノ割ニ「グリセリン」ヲ含ムモノ
(10) 8倍稀釋ソートン氏液

以上各種培地ヲ試驗管ニ4.5 c.c. 宛分注シ、糖類含有培地ハ15分3回、他ハ30分3回滅菌シテ冷暗所ニ貯ヘ實驗ニハ各組4本宛用フル。然ル後豫メ調製セル BCG 浮游液(0.5 c.c. 生理的食鹽水中ニ BCG ヲ0.2mg 宛含有セルモノ)ヲ0.5 c.c. 宛注加スル。卽チ斯クスル事ニ依リ、人體接種 BCG「ワクチン」ト等シイ濃度ノ浮游液ガ得ラレルワケデアツテ、之ヲ搖氏12度ノ冷暗所ニ保存スルコトヽシタ。此ノ一白金耳ニ含マレタ BCG 浮游液ハペトラニアニ氏培地ノ斜面デ凝結水カラ約1糎ノトコロニ塗布シ、此ノ部ヲ中心トシテ上ニ3回斜面ヲ輕クコスル樣ニシテ成ル可ク菌ヲ平等ニ塗布スル樣ニ努メタ。塗布スベキ試驗管ハ各組4本宛ノペトラニアニ氏培地ヲ使用シ專ラ正確ヲ期スル樣ニシタ。

2) 實驗成績

上記ノ如ク菌ヲ塗布シタ培地ヲ30日乃至40日38度ニ保持スルト BCG ノ小集落ガ生ジテ來テ、急激ニ增殖シテ來ル。此ノ集落ノ數竝ニ發育狀況ヲ比較スルコトニ依リ各種稀釋培地內ニ於ケル BCG ノ死滅狀況ヲ推論シ得ルワケデアツテ、實驗ノ結果、第2表ノ如キ成績ヲ得タ。表中(＋)ノ數ハ集落ノ數竝ニ發育狀況ヲ示シテヰル。卽チ、BCG 調製後5日間ノ成績ヲ綜合スルト、4號培地、(卽チ4倍稀釋ソートン氏培地ニ0.5％ノ割ニ「マルトーゼ」ヲ入レタモノ)及ビ5號培地、(卽チ0.5％葡萄糖含有4倍稀釋ソートン氏培地)ガ最モ保存ニ適シテヰルト言ヒ得ル。卽チ、「ワクチン」强製5日後、之ヲペトラニアニ氏培地ニ塗布スルト一白金耳ノ「エムルジヨン」デ相當量ノ BCG 集落ガ發育スル。而シテ第3表ニテ判明スル如ク、兩者ノ間ニハ著差ガナク强ヒテ言フナラバ、「マルトーゼ」含有培地ノ方ガ極メテ僅カナガラ優ル樣デアル。之レハ豫備實驗タル第1表(第1實驗)ニ於テ、0.5％「マルトーゼ」含有溶液第4號培地ガ、1％葡萄糖含有溶液ヨリモ少シク優秀ナルコトト對比シテ興味深キ點デアル。

以上第2表ニ於ケル第4號及ビ第5號培地ニ次デ良好ナルモノハ第6號培地(0.5％葡萄糖含有5％「グリセリン」水デアル。次ハ第2號培地(0.5％「マルトーゼ」含有、5％「グリセリン」水)デアル。以上ノ3培地ハ何レモ「ワクチン」調製後4日目迄ハ辛ジテ死滅セザル BCG ガ存在スル。然シ乍ラ4日目ニテハ「ワクチン」ヲ實驗上使用スル場合生菌數ガ相當減少セルモノト解スベキデアル。

以上ニ次グモノハ第10號培地(8倍稀釋ソートン氏液)デアツテ「ワクチン」調製後4日目ニテモ死滅セザル生菌ガ僅カニアルコトヲ示シテヰル。

更ニ之ニ次デ、第8號培地(1％「グリセリン」含有生理的食鹽水)ハ3日目迄辛ウジテ生存菌ガ存在スル。

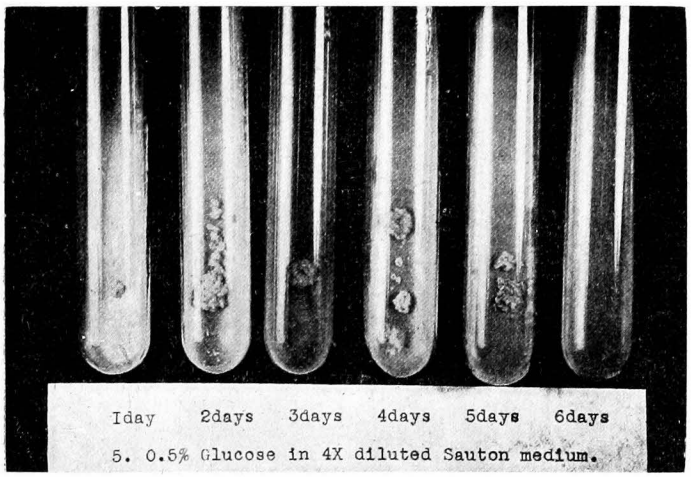
第1號培地(生理的食鹽水)デハ3日迄 BCG 生存菌ガアルコトヲ示シテヰルガ、此ノ成績ハ豫備實驗ニ於ケルモノト一致スル。

生理的食鹽水ヨリ更ニ不良ナルモノハ第7號培地(5％「グリセリン」含有生理的食鹽水)及ビ第9培地(10％「グリセリン」含有生理的食鹽水)デ

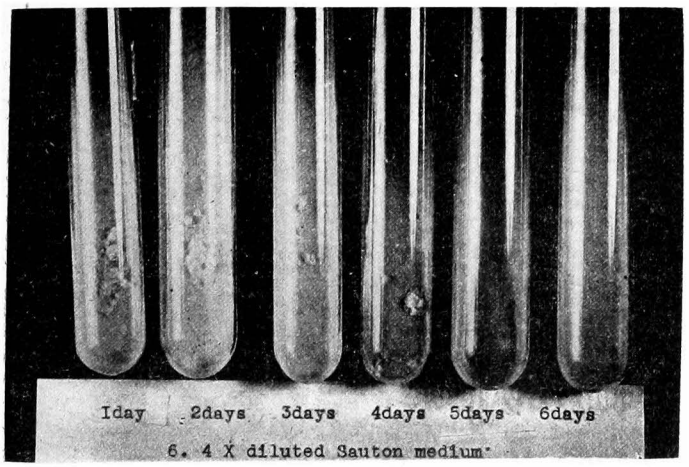
Table 2. Preservation of BCG Vaccine

Growth of BCG / Component of medium	Time after preparation of BCG Vaccine							
	24 hour	48 hour	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	13 days
1. 0.85 % NACL Solution	+	+	+	−	−	−	−	−
	+	+	+	−	−	−	−	−
	+	+	−	−	−	−	−	−
	+	−	−	−	−	−	−	−
2. 0.5 % Maltose in 5% Glycerolwater	++	++	++	+	−	−	−	−
	++	++	++	−	−	−	−	−
	+	+	+	−	−	−	−	−
	+	−	−	−	−	−	−	−
3. 0.5 % Glucose in 5% Glycerolwater	+++	+++	+++	++	++	−	−	−
	+++	++	+++	−	−	−	−	−
	++	+	++	−	−	−	−	−
	−	−	+	−	−	−	−	−
4. 0.5 % Maltose in 4X diluted Sauton med.	+++	++	+++	++	++	−	−	−
	+++	+++	+++	++	++	−	−	−
	++	++	+	++	++	−	−	−
	+	−	−	+	−	−	−	−
5. 0.5 % Glucose in 4X diluted Sauton medium	++	+++	+++	++	++	−	−	−
	++	+++	++	++	++	−	−	−
	+	++	+	+	++	−	−	−
	+	−	+	+	+	−	−	−
6. 4X diluted Sauton med.	++	+++	++	++	−	−	−	−
	++	+++	+	+	−	−	−	−
	++	++	+	+	−	−	−	−
	+	+	+	c	c	c	c	c
7. 5 % Glycerol in 0.85 % NACL Solution	+	++	+	−	−	−	−	−
	+	+	−	−	−	−	−	−
	+	+	−	−	−	−	−	−
	+	−	−	−	−	−	−	−
8. 1 % Glycerol in 0.85 % NACL Solution	++	+++	+	+	−	−	−	−
	+	++	+	−	−	−	−	−
	+	++	±	−	−	−	−	−
	−	+	±	−	−	−	−	−
9. 10 % Glycerol in 0.85 % NACL Solution	++	++	−	−	−	−	−	−
	+	++	−	−	−	−	−	−
	+	+	−	−	−	−	−	−
	+	−	−	−	−	−	−	−
10. 8X diluted Sauton mod.	++	+++	+	+	−	−	−	−
	++	+++	+	+	−	−	−	−
	+	++	±	+	−	−	−	−
	+	−	±	+	−	−	−	−

第1圖　4倍「ソートン」培地ニMaltose ヲ0.5%ノ割ニ入レタ培地ヲ使用シテ、BCG「ワクチン」ヲ作ッタ場合



第2圖　4倍 Sauton med ニGlukose ヲ0.5%ノ割ニ入レタ培地ヲ使用シテ BCG「ワクチン」ヲ作ッタ場合、調製後5日迄有效



第3圖　4倍「ソートン」液ヲ以テ BCG「ワクチン」ヲ作ッタ場合、4日迄有效デアル

アツテ「ワクチン」調製後3日目ニハ生存セル　BCG菌ハ殆ンド存在シナイ樣デアル。

總括竝ニ考按

第1實驗ニ依リ、5倍キルヒネル氏培地ヲ「ワクチン」稀釋溶液トシタ場合、BCG菌ハ4日後モ尙相當程度生存シテヰルコトヲ知リ、且ツ「マルトーゼ」及ビ「グリコーゼ」モ保存用培地成分トシテ適當ナルコトヲ識ツタ。

更ニ第2實驗ニ依リ、4倍ソートン氏液ニ0.5％ノ割合ニ「マルトーゼ」乃至葡萄糖ヲ附加シタモノモ、BCG「ワクチン」保存用トシテ極メテ卓越セル事ヲ認メタ。

然シ乍ラ、以上ノ實驗ハ保存BCG「ワクチン」ヲ攝氏12度ノ冷暗所ニ保存シタ場合ノ成績デ、尙、溫度ヲ零度以下ニシタ場合及ビ、更ニ高溫度ニナシタ場合ナモ實驗シテ見ナケレバナラヌ。

私ガ以上ノ溫度ヲ選ンダ理由ハ人體接種ヲナス場合之ヲ遠方ニ持參スルコトヲ考ヘテ、實地上ニ零度ニ保ツ事ハ不可能デアルト考ヘタカラー過ギナイ。

更ニ本實驗ハ試驗管內ニ於ケル BCG ノ死滅狀況ヲ示スノミデ、日數ノ經過ト免疫力ノ變化ヲ動物實驗ニ依リ闡明スルコトモ極メテ重要ナ事デアル。

而シテ、ソートン氏培地ヲ稀釋シテ4倍液ヲ作ルトキハ生理的食鹽水ヲ用ヒテ稀釋スル方ガヨイ。何トナレバ BCG「ワクチン」皮下注射時、局所ノ疼痛ヲ輕減スルカラデアル。此ノ際蒸餾水ヲ以テ稀釋スルト、生理的食鹽水ヲ使用シタ場合ヨリモ注射局所ノ疼痛ガ大デアツタ。勿論「ワクチン」注射ノ際、單ニ生理的食鹽水ヲ用ヒタ場合ノ方ガ注射局所ノ疼痛ガ少イコトハ確カデアル。然シ此ノ場合ハ調製後2回以內ニ使用シタ方ガ安全デアル。

尙是等ノ「メヂユーム」ノミヲ皮下注射シタ場合局所ノ疼痛ノ程度ヲ知ルタメ、自ラ之レヲ注射サレテ比較サレタ、敎室員諸氏ノ御厚意ヲ此處ニ深謝スル。

結　論

BCG「ワクチン」調製用稀釋溶液トシテ數種ノ稀釋用培地ヲ試作シテ實驗シタトコロ、BCG「ワクチン」保存用培地トシテ0.5％「マルトーゼ」含有4倍ソートン氏培地竝ニ0.5％葡萄糖含有4倍稀釋ソートン氏培地ガ極メテ優秀ナルコトヲ識ツタ。卽チ、本稀釋用培地ヲ使用スルナラバ BCG「ワクチン」調製後少クモ4日間ハ使用シ得ル。但シ、BCG「ワクチン」調製後成ル可ク冷暗所ニ保存スルヲ良シトスル。餘リ高溫ナル所ハ保存ニハ不適當ト考ヘル。

更ニ5倍稀釋キルヒネル氏血淸培地モ前者ニ劣ラズ有效デアルガ、血淸ヲ加ヘナケレバナラヌトコロニ不便ナ點ガアル。

BCG「ワクチン」ヲ作ル場合稀釋溶液トシテ生理的食鹽水ヲ使用シタ場合ハ調製後2日ノ間ニ成ル可ク接種シタ方ガ確實デアル。

ソートン氏液ヲ4倍ニ稀釋スル際、生理的食鹽水ヲ用フル方ガ蒸餾水ヨリモ注射局所ノ疼痛ヲ減ズル。

稿ヲ終ルニ臨ミ、恩師戶田忠雄敎授ノ御懇篤ナル御指導竝ニ御校閱ヲ謹謝スル。

本研究ハ日本學術振興會第8小委員ニ於ケル研究報告ノ一部デアル。委員長長與博士ノ御指導ニ感謝ノ意ヲ表ス。　(戶田記)

References

1) **S. R. Rosenthal,** Studies with BCG. Amer. Rev. Tbc. Vol. 35, No. 5, 1937. 2) **Tadao Toda,** Preparation of BCG Vaccine. (BCG「ワクチン」ノ調製法). Osaka Ijishinshi, Vol. 8, No. 11, 1937.