

## 乾燥B.C.Gワクチンの力價検定方法の検討

柳 澤 謙 染 谷 四 郎 淺 見 望  
 宮 本 泰 穴 戸 昌 夫 川 村 達  
 林 久 子 關 又 藏

### I 緒 論

B.C.G ワクチンの力價ということはいままでもなく、そのワクチンの結核防禦能力を示す價をいうのである。この價はこれまでの諸研究によると第一には人體及びモルモット接種後のツベルクリン・アレルギーの強さに平行すること、第二にはワクチン中の生菌數に平行することは一般の一致した見解である。

液状 B.C.G ワクチンの力價については日本學術振興會第八小委員會（結核豫防）<sup>(1)</sup> に於て動物實驗と定量培養實驗に於て検討されているほか、最近、大林等<sup>(2)(3)</sup>によつてワクチンの脱水素酵素の定量による検定法が案出され、ついで海老名等<sup>(4)</sup>はワクチンの Urease の定量によりその力價を推定しようとし、また、熊谷<sup>(5)</sup>はワクチンの硝酸鹽還元作用により間接的に力價を検定することを試みた。

私達はこれ等の力價検定法が乾燥 B.C.G ワクチンにどの程度の正確さを以て應用出来るかを検討する意味に於て、人體接種の場合のツベルクリン反應の陽轉率を標準としてモルモットに於けるツベルクリン・アレルギーの強さ、ワクチンの定量培養法による集落數、脱水素酵素法による還元時間、Urease 法による PH の變化等を六つの乾燥 B.C.G ワクチンについて比較検討したので、その成績について述べようと思う。

### II 實驗方法

#### (1) 試験に用いた乾燥 B.C.G ワクチン

試験材料として取扱つた乾燥 B.C.G ワクチンは財團法人結核豫防會結核研究所製のもので、次の六種である。製造年月日、乾燥時間、残水量は第 1 表に示すようである。

#### (2) 人體接種法とツベルクリン反應の検査方法

第 1 表 試験に用いた乾燥 B.C.G ワクチン  
 (財團法人結核豫防會結核研究所製)

ワクチン番號	製造年月日	乾燥時間	残水量
No I	23.5.17	45時間	130
No II	23.5.17	21〃	180
No III	23.3.27	42〃	90
No IV	23.9.7	4〃	70
No V	23.9.10	20〃	170
No VI	23.3.16	17〃	170

- (註) 1. 残水量の數字は特殊の水蒸氣壓測定マノメータに表われた數字でこの數字の多いほど残水量が多い。  
 2. 検定研究日は 23.9.29 である。

一度も B.C.G ワクチンの接種を受けたことのないツベルクリン反應陰性又は疑陽性の小學校學童約 1500 名を六群に分け、各群にそれぞれ一種ずつのワクチンを接種した。

乾燥ワクチンはすべて 0.5% ゲラチン加生理的食鹽水を以て 1c.c. 中 B.C.G 0.4mg を含有する如く、丁寧に浮游液をつくり、その 0.1c.c. を左側上膊外側皮内に接種した。

ツベルクリン反應の検査は 2000 倍稀釋ツベルクリン液 0.1cc を左側前膊屈側皮内に注射し、注射後 48 時間の判定により發赤の大きさ 4mm 以下は陰性、5—9mm は疑陽性、10mm 以上は陽性とした。なお、硬結の觸知如何、二重發赤の有無をも調べ、アレルギーの強さの比較に供した。

B.C.G ワクチン接種後のツベルクリン反應の検査は接種後 21 日及び 54 日の兩回に行つた。

#### (3) モルモットに於ける接種法とツベルクリン反應の検査法

一度も B.C.G を接種したことのない、ツベルクリン反應陰性の體重 350g—500g の健康モルモット 120 頭を選び、これを六群に分ち、各群にそれぞれ一種ずつのワクチンを接種した。即ち B.C.G

1mg を 0.5cc の 0.5% ゲラチン加生理的食鹽水に浮游して皮下に接種した。接種後 4 週及び 7 週にツベルクリン・アレルギーの強さを檢べた。ツベルクリン・アレルギーの強さの検査方法は 10 倍、100 倍、1000 倍稀釋ツベルクリン 0.1cc を皮内に注射し、注射後 24 時間判定に於て 10mm 以上の腫脹のあるものをツベルクリン反應陽性とした。

(4) ワクチンの定量培養による方法

0.5% ゲラチン加生理的食鹽水 1cc に B.C.G  $10^{-3}$ mg,  $10^{-1}$ mg 及び  $10^{-5}$ mg をそれぞれ浮游せしめ、この三種の稀釋液 0.1cc 宛を小川培地<sup>(6)</sup> 10 本宛に流し、37°C の孵卵器内に培養した。

培養後 14 日、21 日、22 日、24 日、25 日、27 日及び 50 日に於て生じた B.C.G 集落を數え、培地 10 本の平均集落數を算出した。

(5) 脱水素酵素の定量法

大林等<sup>(2)</sup>の行つた方法に準じた。

(a) 菌液: 蒸溜水 1cc 中 B.C.G 40mg を含む菌浮游液をつくり、その 0.5cc を用いる。

(b) 標示薬:  $\frac{M}{500}$  2-6-Dichlorphenolindophenol 0.5cc

(c) 基質: 乳酸 0.5cc

(d) 緩衝液: Sørensen 磷酸緩衝液 PH 6.8 0.5cc

(e) 容器: Thunberg 試験管

Thunberg 試験管の主室に (a) (d) を、副室に (b)(c) を入れ、ロータリーポンプで 10mm Hg まで減壓し、更に 10 分間排氣、40°C の恒温槽中に 10 分間放置したのち混和し、再び 40°C 恒温槽中におき、對照液と同程度まで脱色するに要する時間を測定した。

對照液とは上記の菌液 0.5cc、緩衝液 0.8cc 2-6 Dichlorphenolindophenol 0.2cc を混和、さらに乳酸の代りに蒸溜水 0.5cc を加え、全量を 2.0cc にしたものである。

(b) Urease の定量法

蒸溜水 1cc に B.C.G 10mg を浮游せしめた菌液と 0.2% Urea 溶液をそれぞれ 5cc 宛混合し、それに Phenol Rot 0.5cc を加え、37°C の孵卵器内に入れ、30分、60分、120分毎に PH の變化を比色法により測定した。

### III 實驗成績

#### (1) 人體接種成績

第 2 表 人體接種後のツベルクリン反應成績

接種後 日数	ワクチン No	被檢人員	ツベルクリン反應			硬結觸知數 + ±	二重 發赤數	力價順位
			+(%)	±(%)	-(%)			
21日	No I	228	70(30.7)	43(18.9)	115(50.4)	22 16	7	
	No II	251	188(74.9)	30(12.0)	33(13.1)	4 6	1	
	No III	186	49(26.4)	35(18.8)	102(54.8)	18 2	8	
	No IV	163	75(46.0)	31(19.0)	57(35.0)	5 6	3	
	No V	278	63(22.6)	65(23.4)	150(54.0)	20 13	7	
	No VI	154	22(14.2)	17(11.1)	115(74.7)	15 4	5	
54日	No I	238	32(13.4)	21(8.9)	185(77.7)	38 21	0	2
	No II	246	83(33.7)	35(14.6)	127(51.6)	16 21	4	4
	No III	175	24(13.7)	11(6.3)	140(80.0)	24 65	4	2
	No IV	150	33(22.0)	17(11.3)	100(66.7)	5 35	4	3
	No V	167	12(7.2)	24(14.4)	131(78.4)	34 22	2	2
	No VI	149	13(8.7)	16(10.7)	120(80.7)	28 15	0	1

上記六種の乾燥ワクチンを人體皮内に接種して、接種後 21 日及び 54 日に於けるツベルクリン反應の成績を見るに、第 2 表に示すようである。即ち、その陽性率、硬結觸知數及び二重發赤形成數より判定すれば No VI のワクチンが最も力價高く、それについて No III, No V, No I

が略等力價、ついで No IV のワクチン、最も力價の低いのは No II のワクチンのように推定される。

#### (2) モルモット接種成績

六種のワクチンを接種したモルモットのツベルクリン・アレルギーの強さをワクチン接種後 4 週

第3表 モルモット接種後のツベルクリン・アレルギーの強さ

ワクチン 番 号	4週成績				7週成績				力價順位
	動物数	ツベルクリン反応陽性数			動物数	ツベルクリン反応陽性数			
		1:10	1:100	1:1,000		1:10	1:100	1:1,000	
No I	19	13	7	0	19	16	12	—	2
No II	20	19	2	0	20	18	12	—	3
No III	18	17	6	0	17	15	13	—	2
No IV	13	16	3	0	16	15	8	—	3
No V	20	20	16	1	20	19	13	—	1
No VI	20	20	15	0	20	19	17	—	1

及び7週で観察した成績が第3表に示すようである。接種後7週の成績では各ワクチンとも大差はないけれども、接種後4週の成績では最も力價の高いのは No V 及び No VI のワクチン、次位は No I 及び No III のワクチン、最も力價の低いのは No II 及び No IV のワクチンということになる。

## (3) 定量培養成績

1cc 中 B.C.G  $10^{-3}$ mg,  $10^{-4}$ mg,  $10^{-5}$ mg に稀釋して、その 0.1cc 宛を小川培地各々 10 本の斜面に流して  $37^{\circ}\text{C}$  孵卵器内に培養し、培養後14日、21日、22日、24日、25日、27日、及び50日に培地 10 本ずつの平均集落を算出したものが第4表に示すようである。この成績から判するに No V

第4表 定量培養成績

ワクチン 番 号	B.C.G 培養 量 (mg)	培養日数							力價 順位
		14日	21日	22日	24日	25日	27日	50日	
No I	$10^{-4}$	0	1.3	15.0	37.7	47.5	53.7	變化せず	3
	$10^{-5}$	0	0	1.5	3.7	6.5	8.4	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0	0	0.5	1.3	〃	
No II	$10^{-4}$	0	0	3.3	16.0	25.2	33.7	〃	4
	$10^{-5}$	0	0	0.3	0.7	1.3	1.8	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0	0	0	0.3	〃	
No III	$10^{-4}$	3.3	40.3	83.9	107.9	117.2	123.0	〃	2
	$10^{-5}$	0	0.7	5.2	10.0	13.2	16.0	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0	0.3	1.1	1.4	〃	
No IV	$10^{-4}$	0	0	0	0	0	0	〃	5
	$10^{-5}$	0	0	0	0	0	0	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0	0	0	0	〃	
No V	$10^{-4}$	0	7.0	67.7	148.4	184.3	209.8	〃	1
	$10^{-5}$	0	0.5	9.0	30.9	36.0	43.0	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0.1	1.1	2.1	2.4	〃	
No VI	$10^{-4}$	0	1.5	28.5	42.9	134.2	154.6	〃	2
	$10^{-5}$	0	0	0.2	2.5	5.6	11.3	〃	
	$10^{-6}$	0	0	0	0.6	0.6	0.6	〃	

のワクチンが最も生菌数多く、それについては No III 及び No VI のワクチン、更にそれについて No I について No II、最も生菌数の少いと

推定されるのは No IV であつた。

## (4) 脱水素酵素の定量成績

第5表に示すように、No II 及び No V のワ

第5表 脱水素酵素による還元時間

ワクチン番號	還元時間	力價の順位
No I	25分	4
No II	20"	1
No III	24"	3
No IV	26"	5
No V	20"	1
No VI	22"	2

ワクチンが最も脱水素酵素による還元時間短く、それについて No IV, No III, No I, 最も長いのは No IV のワクチンであつた。

#### (5) Urease の定量成績

ワクチンの Urease による PH の變化は第六表に示すようである。この混合液の初めの PH は

第6表 Urease による PH の變化

ワクチン番號	Urease による PH の變化			力價順位
	30分	60分	120分	
No I	7.7	7.9	8.5以上	2
No II	8.3	8.4	8.5以上	1
No III	7.7	8.1	8.5以上	2
No IV	8.3	8.4	8.5以上	1
No V	7.7	8.0	8.5以上	2
No VI	7.6	7.9	8.5	3

6.8 であつた。この成績によれば No II 及び No IV のワクチン最も PH の變化著しく、ついで No I, No III 及び No V のワクチンはほぼ同等、最も PH の變化の少ないのは No VI のワクチンであつた。

#### IV 總括及び考察

以上の成績を総合して検討するに、第7表に示すように、モルモットによる方法が最もよく人體接種成績と一致し、それについては定量培養法が一致するに思われる。脱水素酵素も大體に於て一致するのであるが、人體接種でも、モルモットによる方法でも、定量培養法でも力價の低いと思われる No II のワクチンが脱水素酵素の定量による方法では力價が最も高いものになつている。また、Urease の定量による方法できめた力價の順位は他のどの方法できめた力價の順位とも相當のくい違ひがある。このように綜合検討してみると、人體接種後のツベルクリン反應陽轉率を標準にして力價を判定すれば、モルモット接種、定量培養による力價檢定法はよく一致した成績を示すが、脱水素酵素の定量による檢定法には一息の研究が特に乾燥ワクチンによつて行われる必要があるに思ふ。Urease の定量による檢定法はこゝで用いた方法では他のいずれの方法より

第7表 六種のワクチンの各種檢定方法による力價順位一覽表

ワクチン番號	脱水素酵素法	Urease 法	培養法	動物接種法	人體接種法
No I	4	2	3	2	2
No II	1	1	4	3	4
No III	3	2	2	2	2
No IV	5	1	5	3	3
No V	1	2	1	1	2
No VI	2	3	2	1	1

感度が弱く、なお一層の研究が必要であると考えられる。脱水素酵素定量による方法にしても、Urease 定量による方法にしても、また他の酵素定量による方法にしても、これらの酵素定量による方法のいずれかが正しい力價を推定するに足ることが確證せられたなら、B.C.G ワクチンの力價の檢定は短時間内に決定し得る利益を持つてであらう。

#### V 結論

私達は乾燥 B.C.G ワクチンの力價檢定法について、人體接種後のツベルクリン反應の陽轉率を基準にして(1)モルモット接種後のツベルクリン・アレルギーの強さ(2)ワクチンの定量培養(3)脱水素酵素の定量(4) Urease の定量による力價檢定法を比較検討した。六種類の乾燥 B.C.G ワクチンについての實驗成績によれば、モルモット接種による方法が最も信頼に値する方法であり、それについて定量培養による方法が優れている。脱水素酵素による方法は大體に於て一致するも、なお、乾燥ワクチンについては今少しく研究を要する。

Urease はこゝに用いた方法では力價檢定法としては役に立たない。

(この研究の一部は文部省試験製造研究費によつて行われた。こゝに厚く感謝の意を表する。)

#### 文 献

1. 日本學術振興會第八小(結核豫防)委員會: 結核豫防接種に関する報告書、昭和18年
2. 大林容二、續木正大、古屋さと代: 醫學と生物學、10: 311—319、昭和22
3. 大林容二、日結、8、62—70、昭和24
4. 海老名敏明: 日本學術振興會第八小委員會にて發表、昭和23
5. 熊谷博: 抗酸菌病研究雜誌、4、42—46、昭和23
6. 小川辰次: 結核、昭24、發表豫定