
 原 著

BCG に対する超音波の作用に関する研究^(a)

第 1 報 試験管内実験

北海道大学結核研究所細菌部

高 橋 義 夫

(昭和 26 年 7 月 19 日 受付)

I 緒 言

結核菌に対する超音波の影響に関する研究には、まず最初に松崎・林・加藤・横縄の業績がある⁽¹⁾。氏等は結核菌上池株より生理的食塩水菌液をつくり、1cc に $\frac{1}{50}$ mg を含有せしめ、これに超音波(0.2A, 450kc)を各々 3 分、5 分、10 分、20 分作用せしめ、それを海狸の腹腔内に 0.5cc 宛注射、1ヶ月後マントー反応により「ツ・ア」の状況を検し、結核菌は以上の作用時間では著変を蒙らないとの結論に達している。BCG に関するこの方面の研究には辻岡⁽²⁾、柳沢及び大林⁽³⁾、畑⁽⁴⁾等の報告がある。辻岡は 1cc 2mg 含有の生理的食塩水 BCG 浮游液に超音波をそれぞれ 30 分、60 分、90 分作用せしめ(久保田製, 560kc, 180mA, 3kv)、その 0.5cc を海狸に接種して免疫実験をなし、BCG の「ツ・ア」及び免疫賦与力は超音波の作用時間延長とともに漸減し、超音波作用 BCG 免疫元は接種局所に皮膚変化を起さないと結論している。柳沢・大林は超音波(久保田製)の出力及び作用時間を加減すれば 10~15 分の短時間で平等菌液が製造でき、培養試験によるとこの程度の超音波作用は BCG の発育力に見るべき影響を与えず、また超音波ワクチンは手摺ワクチンに比べて、人体に接種した場合、膿潰瘍の形式が遙かに軽いと報告している。畑は柳沢、大林とはほぼ同様の成績を得、なお超音波によつて BCG は破壊死滅するが、5~15 分の作用では生菌数に変りがないことを培養試験によつて知り得たと報告している。

以上の諸研究者の業績を総合すると、短時間の超音波作用は結核菌の「ツ・ア」賦与力及び BCG の免疫度及び発育力に見るべき影響を与えず、又 BCG に超音波を作用せしむれば膿潰瘍の形成を減弱するという結論になる。我々もまた先人の後を追つて BCG に対する超音波の影響を検べた。今まで得た結果には先人のそれとささか異つた点がある。

II 実験材料及び方針

超音波発生装置は久保田製で、水晶板は厚さ 0.5cm、直径 5cm、毎秒 560kc。作用条件は陽極電流 180~200 mA 前後、陽極電圧 2.8~3.0kv 前後とした。本装置には直接出力を調節する装置がなく、出力調節器を一定に

しておいても、日によりまた時間によつて電流電圧がかなり変動するのが認められたが、この点は致し方なかつた。水晶板より油面までの距離は 5cm とした。使用した BCG 菌株は大阪株とパスツール株である。その由来は前報に発表した。

以上の BCG 株の Sauton 培地培養 3 週間前後のものから、瑪瑙乳鉢手摺法によつて菌液をつくりこれに超音波を作用せしめた。方法は次の通りである。

まず滅菌濾紙間に菌苔の適量を取り、手で圧迫して水分を吸取り、その 30~60mg を秤量して直径 20cm の大瑪瑙乳鉢に移し、生理的食塩水で所定の通り磨砕し 1cc 1mg あるいは 1cc 3mg の菌液を製造した。次いでこれ等の菌液の 15~30cc を久保田製の超音波用試験管に取り(試験底の厚さ 0.5mm という)、試験底が油面にすれすれになるように装置に取付け、記述の条件の下に超音波を作用せしめた。しかしして一定時間毎にその内容から 1~5cc を取出し、染色鏡檢、菌数計算及び培養試験を試みた。

III 実験成績

顕微鏡的所見：1cc 1mg 含有の BCG 菌液に超音波を各々 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 及び 60 分作用せしめたものから標本をつくり抗酸性染色を施して鏡檢したところ、実験の都度程度の差はあつたが、菌体が破壊せられて顆粒状を呈するもの、または膨脹して楕円形を呈するもの等がみられた。超音波の作用時間が長くなれば正常の形態を有する菌体及び顆粒状の菌体の数は減少する傾向を示し、30分作用せしめたものでは、メチレン青で淡染する無定形の物質が認められる。この物質は超音波の作用時間とともに増加し、逆に菌体は増々減少してくる。60分作用のものでは 1乃至数視野に 1~2 箇の膨脹した菌体を認めるにすぎなかつた。

菌数及び菌塊計算成績：鏡檢によつて得られた成績を具体的に適確に知る目的で、以下に記載する方法で、超音波の作用時間の異なる菌液相互間の菌数を比較した。

まず 1cc 1mg の菌液で超音波の作用時間がそれぞれ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 のものから一定の白金耳(特に菌数計算のために作ったもの)で 1 滴宛をよく清淨

した載物硝子に取り替かに自然乾燥した後で抗酸性染色を施し、ギッターを使用して各滴中の任意の 10 視野の一定面積中の（ギッターの柵目 $3 \times 3 = 9$ 箇）の正常形態を有する菌体の数を計算し、これを全部合計したものを該菌液中の菌数の比較数としたのである。第 1 表がその成績であるが、表中「実数」とあるはこのようにして計算した菌数である。

第 1 表 菌数計算成績

| 菌株 | 回数 | 作用時間 | 0分 | 5分 | 10分 | 15分 | 20分 | 25分 | 30分 |
|-------|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 実数 | % | 実数 | % | 実数 | % | 実数 |
| パスツール | I | 実数 | 576 | 489 | 369 | 234 | 149 | 91 | 87 |
| | | % | 100 | 85 | 64 | 41 | 26 | 16 | 15 |
| 大坂 | II | 実数 | 554 | 481 | 368 | 219 | 150 | 91 | — |
| | | % | 100 | 87 | 66 | 40 | 27 | 16 | — |
| 大坂 | I | 実数 | 879 | 590 | 376 | 263 | 114 | 69 | 50 |
| | | % | 100 | 67 | 43 | 30 | 13 | 8 | 6 |
| 大坂 | II | 実数 | 590 | 448 | 254 | 165 | 116 | 69 | 26 |
| | | % | 100 | 76 | 43 | 28 | 20 | 12 | 5 |

この表に明らかなように、既述の条件下で BCG に超音波を作用させると、作用時間 25 分あたりまでは、5 分毎に 10~15% 内外の菌体が破壊されて減少して行くことが認められる。

次に、短時間の超音波作用が菌体及び菌塊(顕微鏡的)に対していかなる影響を与えるかをしらべた。すなわち 1cc 1mg の菌液を製造し、全然超音波を作用せしめないものと、超音波を 7 分作用せしめたものから各 1 白金耳滴を載物ガラス上に 10 箇とり、前述の菌数計算の場合と同様な方法で、その中任意の 5 滴をえらび、各滴中の任意の 10 視野すなわち合計 50 視野中の比較菌数、菌塊数及び菌塊の大きさを測定した。菌塊の大きさはその前後直径をギッターの柵目の 1 辺を 10 として目測したものである。実験は製造直後と、標本を氷室に保存しておいて、その後 5 日間続けて行われた。

第 2 表がその成績であるが、菌数及び菌塊数は菌液

第 2 表 短時間の超音波作用が PCG の菌体及び菌塊に及ぼす影響

| 菌液 | 検定日 | 菌塊数 | 菌数 | 菌塊数/菌数比 | 菌塊の大きさ(前後直径) | 工標準偏差 | 備考 |
|--------------|-----|-----|-------|---------|-------------------|-------|--------------------------|
| 1cc 1mg 含有菌液 | 直接 | 90 | 7,452 | 0.012 | 7.8±3.2 × 5.7±2.7 | — | 50 × 50 × 2mm |
| | 1日目 | 62 | 1,737 | 0.036 | 7.0±3.0 × 6.2±2.7 | — | 30 × 25 × 20 × 15mm |
| | 2 | 56 | 2,130 | 0.026 | 7.1±3.3 × 5.9±2.6 | — | 30 × 25 × 20 × 10 × 15mm |
| | 3 | 83 | 2,425 | 0.034 | 7.2±3.9 × 5.5±3.1 | — | 30 × 25 × 15mm |
| | 4 | 82 | 2,452 | 0.033 | 7.3±3.2 × 5.6±1.4 | — | 20 × 15 × 20 × 15 × 10mm |
| | 5 | 42 | 2,383 | 0.018 | 8.1±3.3 × 6.0±2.1 | — | 20 × 15 × 10 × 10 × 15mm |
| | 平均 | 69 | 2,097 | 0.035 | 7.6±3.3 × 5.8±2.4 | — | — |
| | 直接 | 85 | 1,167 | 0.073 | 5.8±2.6 × 4.9±1.9 | — | 20 × 17 × 7mm |
| | 1日目 | 45 | 1,374 | 0.032 | 4.0±1.9 × 3.1±1.5 | — | — |
| | 2 | 54 | 2,158 | 0.025 | 7.3±2.9 × 5.4±2.0 | — | — |
| 同上 7分 | 3 | 42 | 1,770 | 0.024 | 5.5±2.2 × 4.0±1.6 | — | — |
| | 4 | 45 | 2,476 | 0.018 | 7.7±2.4 × 5.6±2.3 | — | 20 × 15 × 7mm |
| | 5 | 53 | 2,234 | 0.024 | 5.3±2.5 × 4.5±1.7 | — | 23 × 20 × 15 × 10 × 7mm |
| | 平均 | 54 | 1,865 | 0.032 | 5.9±2.4 × 4.5±1.8 | — | — |

5 滴 50 視野中の総計比較数である。

この実験によると 7 分の短時間作用で菌塊数は減少しまた菌塊の大きさは小さくなっている。すなわち菌塊が破壊されることが認められる。と同時に菌数も全体として減少している。また本実験とは直接の関係はないが、菌塊数対菌数比は各菌液において、製造直後よりも日数を経過した方が遙かに小さくなっていることが分る。これは製造後日数を経過すれば菌塊は自然の振盪によつてかなり自壊することを意味するものであろう。

培養試験：超音波を各 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 分作用せしめた 1cc 1mg 含有菌液及び 1cc 0.1mg 含有菌液を、各液毎に Löwenstein 培地 8 本に培養、菌の発育状況を観察した。第 3 及び第 4 表は各菌液の 0.1cc 宛をピペット法によつて培養した成績で、第 5 表は各液の 1 白金耳宛を培養したものである。成績記載の方法は次の通りである。

冊：発育良好で無数のコロニーを認め、コロニー相互が密に合体しているもの

冊：無数のコロニーを認めるが、コロニー相互間の合体の程度弱きもの

第 3 表 培養試験成績(その 1, BCG-Pasteur株) (各試験管に 0.1cc 培養, 培養期間 25 日間)

| 試験管 | 時間 | 0分 | 5分 | 10分 | 15分 | 20分 | 25分 | 30分 |
|--------------|----------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| 1cc 1mg 含有菌液 | 2 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| | 3 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| | 4 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| | 5 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | + |
| | 6 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | — | + |
| | 7 | 冊 | 冊 | 冊 | C | 冊 | — | — |
| | 8 | 冊 | C | 冊 | C | 冊 | C | — |
| | 1cc 0.1mg 含有菌液 | 1 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| 2 | | + | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | + | + |
| 3 | | + | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | + | + |
| 4 | | + | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | ± | ± |
| 5 | | + | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | — | ± |
| 6 | | + | + | 冊 | 冊 | 冊 | + | — |
| 7 | | ± | + | 冊 | 冊 | 冊 | — | — |
| 8 | | ± | C | 冊 | C | 冊 | C | — |

第4表 培養試験(その2, BCG-大阪株)
(各試験管に0.1cc 培養, 培養期間 45 日間)

| 菌液 | 時間 試験管 | 時間 | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0分 | 5分 | 10分 | 15分 | 20分 | 25分 | 30分 | 30分 |
| 1cc 1mg 含 有 菌 液 | 1 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 2 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 3 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 4 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 5 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 6 | + | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | - |
| | 7 | - | - | 卍 | 卍 | 卍 | + | - | - |
| | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1cc 0.1 mg 含 有 菌 液 | 1 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 2 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | 3 | - | - | 卍 | - | 卍 | 卍 | - | - |
| | 4 | - | - | 卍 | - | - | 卍 | - | - |
| | 5 | - | - | 卍 | - | - | 卍 | - | - |
| | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - |

第5表 培養試験(その3, BCG-大阪株)
(各菌液1白金耳培養のもの培養期間 45 日間)

| 菌液 | 時間 試験管 | 時間 | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|--|
| | | 0分 | 5分 | 10分 | 15分 | 20分 | 25分 | 30分 | 40分 | 50分 | 60分 | | |
| 1cc 1mg 含 有 菌 液 | 1 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | |
| | 2 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | |
| | 3 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | |
| | 4 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | - | - | 卍 | - | 卍 | - | |
| | 5 | + | 卍 | 卍 | 卍 | - | - | - | 卍 | - | - | - | |
| | 6 | ± | 卍 | 卍 | - | - | - | - | 卍 | - | - | - | |
| | 7 | - | ± | ± | - | C | - | C | - | - | - | - | |
| | 8 | - | - | ± | - | C | C | C | - | C | C | - | |
| | 1cc 0.1 mg 含 有 菌 液 | 1 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | + | 卍 | 卍 | + | 卍 | 卍 | |
| | | 2 | - | 卍 | 卍 | 卍 | - | - | + | - | 卍 | - | |
| | | 3 | - | 卍 | 卍 | 卍 | - | - | - | - | - | - | |
| | | 4 | - | 卍 | 卍 | ± | - | - | - | - | - | - | |
| 5 | | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | | |

| 菌液 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7 | - | - | - | - | - | - | C | - | C |
| | 8 | - | C | C | C | C | C | C | C | C |

卍 : コロニー多数を認めるが, 相互間の合体殆んどなく計算可能なもの
 + : 5~50 箇のコロニーを認めるもの
 ± : 1~2 箇の独立したコロニーを認めるが, コロニーが小さすぎて判別に苦しむもの
 - : 全然コロニーの発生がないもの
 C : 雑菌迷入

以上数次の培養成績を見ると, いずれも作用時間5~10 のところに発育の山があり, それ以上大体時間と共に減少しているが, 60 分後も依然として生菌が存在していることが分る。

IV 追加実験

Ⅲの実験成績は超音波は短時間の作用でも BCG 菌体を破壊減少せしめること, 及び培養試験だけではこの傾向を明らかに見ることができないうで, この場合は却つて菌の発育がある程度促進せられる傾向を示している。これは実際問題としても非常に重要であるので, 我々は色色方法を変えて前後 10 数回の実験を試みた。その成績は程度の差はあつたが皆同様な傾向を示した。以下に報告するのはその実験の一部である。

第6表 菌数及び菌塊計算成績

| 作用時間 | 検査時間 | 検査滴数 | 検査視野数 | 総菌数 | 菌塊数 (菌体数を以て表わす) | | | | | | 計 |
|------|------|------|-------|-----|----------------------------|----|----|----|----|----|---|
| | | | | | 5 ~ 11 ~ 21 ~ 31 ~ 41 ~ 51 | | | | | | |
| | | | | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 以上 | |
| 0分 | 3 | 30 | 1,505 | 41 | 25 | 17 | 6 | 2 | 0 | 91 | |
| 2分 | 3 | 30 | 1,085 | 26 | 13 | 12 | 3 | 0 | 0 | 54 | |
| 5分 | 3 | 30 | 929 | 43 | 19 | 1 | 0 | 0 | 0 | 63 | |
| 10分 | 3 | 30 | 630 | 27 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 38 | |
| 15分 | 3 | 30 | 438 | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | |

方法 : 本実験には BCG の Pasteur 株を使用し, 菌液の製造は振盪法によつた (1L のコルベンに小硝子玉 150g を入れ, これに菌苔を入れて1分間 200 廻転, 10 分振盪した)。菌液は前回の実験と同様 1cc 1mg のもの。菌数及び菌塊計算も前回と同様。ただし今回はギッターを使用せず, 全視野中の菌数及び菌塊数を計算した。菌塊の大きさは今回は該当菌塊中に含まれている菌数を計算しその数により表わした。

培養試験には今回は菌液の高度稀釈培養法を実施して発生してきたコロニー数によりその成績を比較した。培地は岡・片倉培地である。超音波の作用条件は前回と同様である。

成績 : 第6及び第7表がその実験成績である。第6表に総菌数とあるは, 各液3白金耳滴の 10 視野すなわ

第7表 培養試験成績(培養 21日間)

| 培養菌量 | 試験管 番号 | 作用時間 | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------|-----|-----|-----|-----|
| | | 0分 | 2分 | 5分 | 10分 | 15分 |
| 0.002mg/cc 1白金耳量 (約5万分の1mg) | 1 | 180 | 162 | 187 | 178 | 90 |
| | 2 | 134 | 193 | 185 | 170 | 113 |
| | 3 | / | 191 | / | 181 | / |
| | 平均 | 157 | 182 | 186 | 176 | 101 |
| 同上5倍液 1白金耳量 (約25万分の1mg) | 1 | 31 | 39 | 49 | 40 | 36 |
| | 2 | 30 | 44 | 39 | 34 | / |
| | 3 | 28 | / | 37 | / | / |
| | 平均 | 30 | 41 | 42 | 37 | 36 |
| 同上25倍液 1白金耳量 (約125万分の1mg) | 1 | 8 | 13 | 3 | 3 | 3 |
| | 2 | 6 | 11 | 7 | 7 | 4 |
| | 3 | / | 6 | 4 | 4 | / |
| | 平均 | 7 | 10 | 5 | 5 | 3 |

ち総計 30 視野中の菌の総和である。この数の中には菌塊の菌数も含まれていること勿論である。

本実験成績においても、前回と同様、超音波は短時間の作用でも既に菌体及び菌塊を破壊するが、培養基上の発育状況にはかえつて好影響を与えることがうかがわれる。

V 結 論

1) 現在一般に使用されている 3 k. v. 200mA 前後 560kc の超音波は BCG 菌体を極めて顕著に破壊する。その破壊の程度は 5 分毎に 10~15% である。

2) 上記の超音波を短時間作用させると(5~10 分) BCG の培養基上の発育をかえつて速進する。

文 献 後 出