

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第 3 報 流動パラフィン加血清 Kirchner 液による
振盪培養 BCG の生存期間について

広島医科大学細菌学教室(主任 占 部 教 授)

松 尾 吉 恭

(昭和 26 年 9 月 3 日 受付)

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

平等浮游結核菌，殊に生菌ワクチンとしての均等浮游 BCG が調製後比較的短期間の保存によつて著しく生菌数を減少し，生菌ワクチンとしての意義並びに有効性が速かに減殺されることは，今日なお BCG の免疫元性に対して疑義を抱く人々によつて強く指摘されているところであり^{1)~3)}，これが対策については多年に亘り研究されてきたが未だ充分とはいえないようである^{4)~6)}。他方，凍結乾燥法によりその有効期間を延長しようとの試みも数多く^{7)~16)}，今日かなり見るべき成績をあげうる域に達してきてはいるものの，それとてもなお未だしの感があり，今後の検討改良に俟つ点が多い。

ところが Dubos ら^{28), 31)}は Tween 80-Albumin 培養液における拡散培養 BCG の生存数は 6 週間冷蔵後もなお新鮮なもののそれとえらぶところがないといつてゐる。そこで今回私は，既報^{17), 18)}の私の所謂流動パラフィン(以下流パ)加 Kirchner 液による振盪培養の結果えられる，均等な BCG の生存期間について在来の手摺り BCG のそれと比較検討してみることにした。

実 験 I

A) 供試ワクチン並びに実験方法

A ワクチン：既報^{17), 18)}の流パ加 Kirchner 液による 4 週間振盪培養 BCG 液(鏡検上ほぼ手摺り 1mg/cc 菌液に匹敵する含菌量を示す)。

B ワクチン：流パ加血清アルブミン Kirchner 液による同上振盪培養 BCG 液(同上)。

C ワクチン：血清加 Kirchner 液に 4 週間静置培養の液面菌膜よりの生塩水による手摺り 1mg/cc BCG 液。

上記 3 種ワクチンより生塩水を以て各 10^{-3} 稀釈液を調製して $3^{\circ}\sim 10^{\circ}\text{C}$ の氷室に冷蔵しておき，毎週それぞれより 5 本宛の卵培地上に 0.1cc ずつ移植後 4 週間 37°C に培養し，そのさい発生する集落の量乃至数をよみとつた。従つて該移植菌量は各 10^{-4}mg でこれは乾燥 BCG ワクチンの検定規準¹⁹⁾に一致するものである。なお以下述べるワクチンの種類 A, B, C は凡べて生塩水による 10^{-3} 稀釈液を指すものである。

B) 実験成績

各ワクチンよりの発生集落平均数は表 1 にまとめた。

第 1 表

ワクチン	冷蔵期間							
	直後	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週
A	冊	29.6	31.2	28.6	25.0	10.2	2.6	0
B	冊	28.0	30.4	28.6	28.0	11.8	2.0	0
C	冊	11.0	1.2	0	0	0	0	0

註：ワクチンは A, B, C は本文参照

冊は 100 コ以上の集落数で計測ほぼ可能なもの

数字は各 5 本の岡・片倉培地上における発生平均集落数を示す

第 1 表に示すように，ワクチン調製直後その 10^{-4}mg 菌量の卵培地移植では A, B, C 各ワクチンとも多数の集落を発生しそれらの間にみるべき生菌乃至生存菌塊数の差はなかつたが，冷蔵期間が長くなるに従いワクチンの種類によつて著差が認められるようになった。すなわち，A, B 両ワクチンでは C ワクチンに比してその中に含まれる生菌乃至菌塊の生存期間が確かに長く，しかも調製直後より短期間内には急激に死菌が増加するもののその後は比較的安定な期間が続いた。このことは乾燥ワクチンがその 10^{-4}mg 移植で集落を発生しうれば可とされている点からみると，生菌数に関する限り A, B 両ワクチンは乾燥ワクチンに劣らないものと見得べく，また生存期間からいえば A, B 両ワクチンは生塩水による手摺りの C ワクチンに遙かに優るものといつてよからう。

しかしここで考えねばならぬことは，供試したワクチンはいずれも原液を冷蔵したのではなくそれぞれよりの 10^{-3} 稀釈液であるということ及び C ワクチンの媒質が凡べて生塩水であつたのに対して，A, B 両ワクチンでは生塩水で各 10^{-3} に稀釈したとはいいいながらなお原液としての血清加乃至血清アルブミン加 Kirchner 液の成分が多少なりとも含まれていた筈であるということであつて，既にワクチンの濃度が高い程長く生存に耐えるという報告^{6), 20), 21)}や，血清成分の菌保護作用^{22)~25)}に関する知見等よりしてこれらの点は再検討を要するものといわねばなるまい。そこで次のような実験を行うに至つた。

実 験 II

A) 供試ワクチン並びに実験方法

a ワクチン： 実験 I の A ワクチンと同じ。

b ワクチン： 血清加 Kirchner に 4 週間静置培養の液面菌膜よりの、同種培養液による手摺り 1mg/cc BCG 液。

上記の兩種ワクチンを原液とし、それより生塩水を以

てそれぞれ 10^{-1} 、 10^{-2} 及び 10^{-3} の各稀釈液を調製して $3^{\circ}\sim 10^{\circ}\text{C}$ の氷室に冷蔵しておき、毎週それぞれより 3 本宛の卵培地上に各 0.1cc ずつを移植後、前出同様培養した。

B) 実験成績

実験成績は一括して第 2 表に掲げた。

第 2 表

ワ ク チ ン			冷 蔵 期 間										
種類	稀釈	移植量	直 後	1 週	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "
a	原液	10^{-1}	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
b		∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	
a	10^{-1}	10^{-2}	∞	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
b		"	∞	冊	冊	90	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
a	10^{-2}	10^{-3}	冊	60.0	58.0	33.3	36.0	30.0	27.0	11.3	2.0	0	0
b		"	冊	24.3	16.0	13.0	11.3	6.0	1.0	0	0	0	0
a	10^{-3}	10^{-4}	30.6	11.0	6.3	5.0	5.6	5.3	2.3	0.3	0	0	0
b		"	29.6	3.0	2.0	0	0.6	0.3	0	0	0	0	0

註： ワクチンの種類 a, b. は本文参照

∞は発生集落数多数で数えられないもの、冊は 100 コ以上の集落数でほぼ数えられるもの
数字は各 3 本の岡・片倉培地上における発生平均集落数を、それぞれ示す

表 2 に示されるように、原液並びに 10^{-1} 稀釈液よりの発生集落数は a, b 両ワクチン共に冷蔵 10 週後に至るもお無数乃至多数で、両ワクチン間には殆んど差が認められなかつたが、 10^{-2} 及び 10^{-3} 稀釈液よりのものでは a ワクチンの方が b ワクチンの場合よりも生存期間がより長いことが判つた。

すなわち、 10^{-3} 稀釈液の場合には b ワクチンよりの発生集落数は冷蔵 1 週後において既に遙かに a ワクチンよりのそれに劣り、3 週以後には激減し、生存期間についてみて a ワクチンの 7 週間に対してようやく 5 週間にすぎなかつた。また b ワクチンと実験 I の C ワクチンとを比較してみると、冷蔵 1 週後頃迄は両者共生菌数の減少度において殆んどいべき差はなかつたが、その後の経過をみると b ワクチンの方が C ワクチンよりも生存期間が比較的長く、C ワクチンでは 3 週後には既に集落の発生がなかつたのに対して b ワクチンは細々ながら 5 週後迄はその発生を維持しえていた。

10^{-2} 稀釈液の場合にも a, b 両ワクチン間の発生集落数の関係はほぼ上記の 10^{-3} 稀釈液の場合と同様であつたが、より濃厚液であつたためかこのさいには両ワクチンともその生存期間の延長が認められた。ここに注目すべきことは、この場合の b ワクチンと先の 10^{-3} 稀釈の a ワクチンとの関係であつて、冷蔵 4 週後迄はなお

この b ワクチンよりのの方がより多数の集落を形成したが、5 週後では両者よりの集落がほぼ同数となり、6 週後にはむしろ 10^{-3} 稀釈の a ワクチンよりのの方がこの b ワクチンよりの集落発生に比してより多くなつた。すなわち、ワクチンの生存期間は 10^{-3} 稀釈の a ワクチンの方が 10^{-2} 稀釈の b ワクチンの場合よりもより長いということになつたのである。

考 按

以上 2 つの実験から、流バ加 Kirchner 液による振盪培養 BCG の生存期間は、手摺り BCG 液の生塩水又は血清加 Kirchner 液のいずれを媒質としたものよりもかなり長いことが判つた。

実験 II の a, b 両ワクチンにおいて原液及び 10^{-1} 稀釈液の状態で冷蔵した場合には、10 週後においても未だ両ワクチンの間に生存期間の差が認められず、かつ共に無数乃至多数の集落発生をみたのであるが、これらの a, b 両ワクチンが究極どの程度迄生存し、そのさい両者の間にどのような差を生ずるかという点についてはなお今後の検討に俟たねばならないが、ここに示した成績に関する限りワクチンの濃度とその生存期間との間には密接な関係があつて、その生存期間はその濃度が高い程長くなるものであるということを物語るものと思われる。既にこの関係については柳沢ら²⁰⁾、細沼²¹⁾、佐藤ら⁶⁾の

報告があり、おおむねこれらの業報と一致するもののようにあつた。

ワクチンの媒質とその生存期間とに関しては既に吉田²⁶⁾、海老名²⁷⁾、柳沢ら²⁰⁾、佐藤ら⁶⁾の業報があり、また Dubos²⁸⁾ は氏らの Tween-80-Albumin 培液で拡散発育した BCG そのままで長期間保存に耐えると述べている。他方乾燥ワクチン調製用媒質については舌間⁸⁾、林⁹⁾、加藤¹³⁾、岡田ら²⁹⁾の業報があり、これらの報告によれば液体ワクチン、乾燥ワクチンの別をとわず、研究者によつてその保存用媒質に関する見解はいくらか相異しているようであるが、実験 I 及び II を通覧して判るように私の成績では、生塩水による手摺りワクチンの生存期間は 10^{-8} mg 菌液の状態冷蔵した場合には、流バ加 Kirchner 液並びに同血清アルブミン加 Kirchner 液による振盪培養 BCG 液、及び血清加 Kirchner 液による手摺り BCG 液よりの、各生塩水による同程度稀釈菌液の同様冷蔵された場合のそれぞれの生存期間に較べて遙かに短く、冷蔵 3 週後に既に還元培養陰性となつた。勿論かかる差は単一な因子によるものではありえないが、実験 I の C ワクチン以外は凡べて血清成分を含む Kirchner 液を基液としている点よりして、もし Dubos²²⁾—²⁶⁾らのいうように血清成分に菌発育促進作用のみならず保護作用もまたあつて死菌増加を抑制するものであるならば、ワクチン中の血清蛋白が、たとえその含量は微々たる状態に稀釈されているとはいえ、やはり生塩水を基液としたものの場合に比してワクチンの生存期間延長という点で若干の役割を演じているものと見做すことも許されよう。

しかるに 10^{-2} 及び 10^{-3} mg ワクチンの生存期間についてみると、a ワクチンでは微量の流バを含みかつ振盪培養によつてえられた均等培養よりの生塩水による稀釈液であるのに較べて、b ワクチンでは流バを含まない手摺り菌液よりの生塩水による稀釈液である点を除いては、両ワクチン共基質は同じく血清加 Kirchner 液でありながら、両者間にかかりの開きが認められたのはいかなる機作に基づくものであろうか。Fenner³⁰⁾ は Dubos²⁸⁾、³¹⁾の研究を更にすすめて、Sauton 液の液面菌膜より同液により作られた BCG 液における急激な死菌増加は血清アルブミンの添加によりある程度防げるが、その保護作用はさして大きくはないことを、Sauton 液面菌膜からのワクチンでは急激に生菌数が減少するにも拘らず、Tween 80-Albumin 液内で拡散発育した BCG を洗つて Sauton 液に再浮游したワクチンでは生菌数の減少が少いという実験によつて確かめ、次でアルブミンを含まない Tween 液内で拡散発育した BCG では標準ワクチンの場合よりも生存期間がより長いと報告している。すなわち、均等に培養された BCG は菌自体が強い生活力をもっているためにこれを洗つて Sauton 液に再浮游して

も標準ワクチンよりもより長く生存するものであろう。

他方私¹⁸⁾が既に報告したように、流バ加 Kirchner 液による振盪培養 BCG 液は秀れた均等度をもつており、その形態学的諸性状からこのさい幼若な強い活性をもつ菌が多くなるのではないかと示唆したのであるが、今回の実験において示されたように、振盪培養による BCG 液の生存期間が媒質を生塩水とした手摺りワクチンのそれのみならず、媒質を血清加 Kirchner 液とした手摺りワクチンのそれに比してもより長いという成績、及び先の Fenner の報告、さらにまた生活力の旺盛な BCG ほど長く生存に耐えるという先人⁶⁾、³²⁾、³³⁾の報告などよりして、流バ加 Kirchner 液による振盪培養 BCG は発育旺盛な、生存期間の長い均等培養菌であり、かかる点では注目すべきワクチンたりうる資格をもつものと考えて差支えないように思われる。

む す び

私の所謂流バ加 Kirchner 液による振盪培養 BCG ワクチンと、生塩水並びに血清加 Kirchner 液による手摺り BCG ワクチンとの生存期間を比較検討し、次の成績をえた。

1) 液体 BCG ワクチンの媒質としては生塩水によるよりも血清加 Kirchner 液による方がワクチンの生存期間延長の点ではより有利である。

2) 媒質として血清加 Kirchner 液を用いた場合には、その調製法として振盪培養法によつた場合と手摺り法によつた場合との別をとわず、凡べて 1mg/cc の原ワクチン並びにそれよりの生塩水による 10^{-1} mg/cc ワクチンのような濃厚液では、冷蔵 10 週後もなお無数乃至多数の生菌を含み、両ワクチン間にこの点における著差はみられなかつた。

3) しかるに 10^{-2} 、 10^{-3} mg/cc の程度に生塩水により原ワクチンが稀釈されると、流バ加 Kirchner 液による振盪培養によりえられた原ワクチンよりの稀釈菌液の方が、手摺り法によりえられた原ワクチンの同稀釈液におけるよりも菌の生存期間がより長かつた。これは前者における秀れた均等発育に基づく幼若な強い活性のある菌の、より豊富な含量に基づくものではないかと思われる。

〔脱稿に当り御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師占部教授に満腔の謝意を捧げる〕

文 献

- 1) Dubos, R.J. : Am. Rev. The. , 60, 670, 1949.
- 2) 医学のあゆみ : 9, 230, 昭 25.
- 3) Anderson, R.J. & Palmer, C.E. : J. A. M. A., 143, 1048, 1950.
- 4) 戸田 : 日本臨牀, 8, 172, 昭 25.
- 5) 柳沢 : 実験治療, 249, 29, 昭 25.
- 6) 佐藤 : 抗研誌, 4, 83, 昭 24.

- 7) 小笠原：日本医学及健康保険，3313，7，昭 17.
 8) 舌間：日本微生物病理学雑誌，37，475，昭 18.
 9) 朴：日本医学及健康保険，3355，10，昭 18.
 10) 戸田・舌間・平野・山田：日本医学，3400，10，昭 21.
 11) 海老名・加藤・小林：抗研誌，1(2)，1，昭 22.
 12) 小林：抗研誌，1(2)，8，昭 22.
 13) 加藤：抗研誌，2，20，昭 22.
 14) 桜井：抗研誌，6，1，昭 25.
 15) Heckly, R.J.: Am. Rev. Tbc., 62, 99, 1950.
 16) Birkhaug, K.: Am. Rev. Tbc., 63, 85, 1951.
 17) 松尾：結核，26，324，昭 26.
 18) 松尾：結核，27，177，昭 27.
 19) 室橋：綜合医学，7，254，昭 25.
 20) 柳沢・大林・諏訪・金光：結核，20，505，昭 17.
 21) 細沼：結核，22(5~6)，21，昭 22.
 22) Dubos, R.J. & Davis, B.D.: J. Exp. Med., 83, 409, 1946.
 23) Dubos, R.J. & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 56, 334, 1947.
 24) Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 85, 9, 1947.
 25) Davis, B.D. & Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 86, 215, 1947.
 26) 吉田：結核，17，855，昭 14.
 27) 海老名：東北医学雑誌，28，914，昭 16.
 28) Dubos, R.J., Fenner, F. & Pierce, C.: Am. Rev. Tbc., 61, 66, 1950.
 29) 岡田・張・大森・朽木：結核，23 (9~10)，18，昭 23.
 30) Fenner, F.: Am. Rev. Tbc., 63, 714, 1951.
 31) Dubos, R.J. & Fenner, F.: J. Exp. Med., 91, 261, 1950.
 32) Rosenthal, S.R.: Am. Rev. Tbc., 35, 678, 1937.
 33) 柳沢：医学の進歩，第3輯，330，昭 21，南条書店.

協和
 ジビドロ
 ストレストマイシン 協和
 ペニシリン 協和
 協和醸酵工業株式会社