

BCG 菌株に関する研究

第 1 報 日本株、アメリカ(R) 株及びフランス株の培養並びに形態学的性状について

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

室橋豊穂・関 又蔵・高野袈裟男・吉田幸之助

(昭和 26 年 11 月 21 日受付)

1 緒 言

BCG 菌株が各国に分与され、広く人体に接種されるようになってから、菌株そのものの差異に基くと思われるような問題、例えば接種局所変化の程度¹⁾や、ツベルクリン・アレルギー発現状態の相違²⁾や、或いは又菌の形態学的な差異³⁾というような点についての報告が見受けられるようになった。このような差異がどうして起つたかは未だ充分明らかにされてはいないが、Calmette 以後の菌株の継代培養方法が、各研究者において必ずしも同一でないということに由るのかも知れない。例えば何代も Sauton 液体培地に継代培養することは、BCG に対して決して好適な保存条件ではないという報告⁴⁾や、牛胆汁加グリセリン馬鈴薯培養とグリセリン水馬鈴薯培養とは菌の生物学的諸性状が相違するという報告^{5)~9)}などは、この間の消息を物語るものであろう。従つて現在各国に保存され、或いはワクチン製造に用いられている菌株の比較を試みることは、BCG の効果を比較論議したり、菌株の保存条件を決定したりする上に重要な問題であると考えられる。

この種の研究は、既に Böel¹⁰⁾ や Aronson¹¹⁾ などによつても報告されているが、我国においては、1925年に菌株が分与されて以来、牛胆汁加グリセリン馬鈴薯培地に継代培養したものをワクチン用菌株として保存してい

るに拘らず、これを他の国々において用いられている菌株と比較する試みは、従来全く行われていなかった。幸にわれわれは、1949 年夏 S. R. Rosenthal の作製にかかる乾燥 lactose vaccine を、また 1950 年夏 Pasteur 研究所製の乾燥 glucose vaccine を入手したので、それぞれ鶏卵培地 (岡・片倉及び小川) に移植し、それから得た集落をさらに各種の培地に移植培養して、予防衛生研究所保存の BCG 菌株と比較観察を行うことができた。つぎにその成績を報告しようと思う。

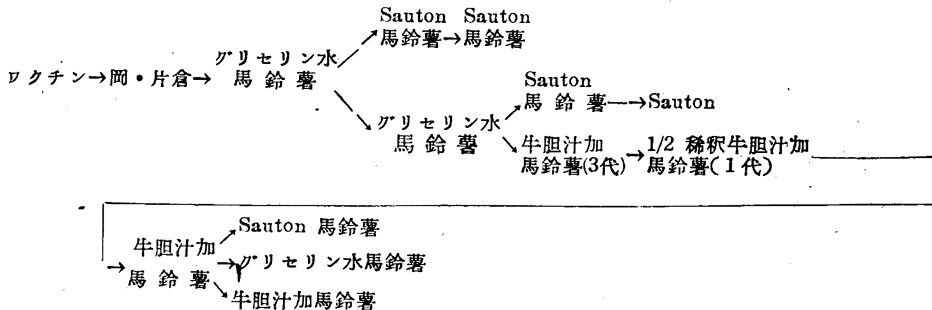
便宜上これ等の菌株をそれぞれアメリカ(R)株、フランス株及び日本株と仮に命名した。日本及びフランスにおいては、現在ともにこれ等の菌株からワグチンを作製しているの、それぞれ代表的な菌株と考えてよいと思われるが、アメリカにおいては少くとも 3 種の異なる菌株があるように聞いているので、ワグチン製造者 Rosenthal の頭文字を附してアメリカ (R) 株としたのである。

2 培養性状の比較

写真のように培養性状は可成り相違する(P. 303)。

A. アメリカ (R) 株

乾燥ワクチンを岡・片倉培地に 5 代累代した後、集落をグリセリン水馬鈴薯培地に移植した。継代培養状況はつぎの如くである。



1) 馬鈴薯培地

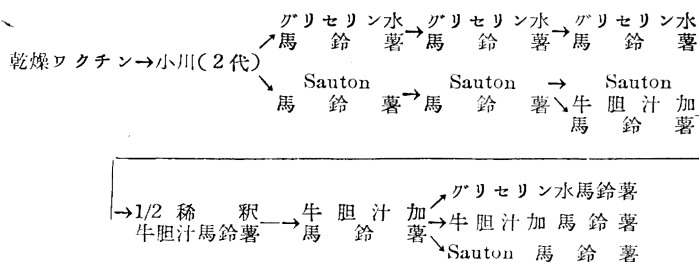
グリセリン水馬鈴薯初代の発育は不良であつたが、2 代目からは良好となつた。その初代または 2 代目から移植した Sauton 馬鈴薯培地上の発育は旺盛であつた。グリセリン馬鈴薯培地 2 代の培養から牛胆汁加グリセリン

馬鈴薯培地に移植したところ、発育は甚だ不良で、3 代を経ても思わしい発育を示さなかつたので、胆汁を 1/2 に稀釈したところ、やや発育を見うるようになった。これを再び通常濃度の牛胆汁培地に移植し、以後累代するに及んで漸次良好な発育を示しつつあるが、日本株の如

くではない。

2) Sauton 液体培地

Sauton 馬鈴薯に培養して生じた管底液面の菌膜を Sauton 液体培地に移植したところ、初代は菌膜の発育が思わしくなかつたが、2代目は相当旺盛な発育を示した。その菌膜は日本株やフランス株とは性質を異にし、湿潤性で重く、白味を帯びた淡黄色調を呈し、培養7~10日頃になると、極めて僅かな振動に依つても、菌膜の一部が液面下に沈下し、その後液面に残つた菌膜から全く同様な性状の厚い湿潤性菌膜を形成し、2週目には管壁に登るような旺盛な発育を示す。Sauton 培地に累代す



1) 馬鈴薯培地

小川培地2代の培養からグリセリン水馬鈴薯、及び Sauton 馬鈴薯に移植した。グリセリン水馬鈴薯上の発育は甚だ悪く、3代目に漸く発育を見るようになった。Sauton 馬鈴薯上の発育は初代はそれ程旺盛ではなかつたが、2代目からは極めて旺盛である。この培養から牛胆汁加グリセリン馬鈴薯培地に移植したところ、殆んど発育を見なかつたので、1/2 稀釈牛胆汁加馬鈴薯に移植、旺盛な発育を示し、以後は通常濃度の牛胆汁培地に良好な発育を見るようになった。これをグリセリン水馬鈴薯に移植すると、アメリカ(R)株のような旺盛な発育は示さない。

2) Sauton 液体培地

Sauton 馬鈴薯2代培養の菌膜を Sauton に移植し、旺盛な菌膜発育を認めた。菌膜は初代から発育が良好で、黄色調がやや強く、皺襞が細かくかつ深く、相当厚い菌膜で、2週目には管壁に登るような発育を示したが、アメリカ(R)株のように湿潤性ではなく、液面下に沈下することはない。3代継代の菌膜は、2代目に比すれば発育速度が稍々遅延し、皺襞の稍々浅い、しかもところどころ断裂のある菌膜を作つたが、2週末には管壁に登るようになった。

C. 日本株

1) 馬鈴薯培地

牛胆汁加グリセリン馬鈴薯、Sauton 馬鈴薯培地には発育が甚だ良好である。グリセリン水馬鈴薯培地上の発育はフランス株程不良ではないが、アメリカ株程良好ではない。

2) Sauton 液体培地

ると、3代目頃から発育速度がやや遅くなるが、菌膜の性状は2代目と全く同様で、一部は液面下に沈下し、その後生じた菌膜が2週目には管壁に登るようになった。このような性状の菌膜は、従来われわれが BCG においては全く経験を持たなかつたものであるが、Aronson¹¹⁾の報告に述べられている第3型に該当するものであらうと考えられる。

B. フランス株

乾燥 glucose vaccine をまぜ小川培地に移植した後の継代培養はつぎの如くに行われた。

Sauton 培地上の菌膜は、3代目においても著しい発育遅延を示さなかつた。菌膜の皺襞は細かいが、フランス株程の深い皺を伴わない。黄色調はフランス株よりやや淡いが、蠟様の光沢を帯び乾燥性である点は殆んど同様で、アメリカ(R)株のような湿潤性で厚い寧ろ白味をおびた菌膜を作つたり、液面下に菌膜が沈下したりする傾向は少しも認められなかつた。

3 菌の長さ・形態・染色性

Sauton 馬鈴薯(初代7日培養)、Sauton 液体培地上の菌膜(2代、14日培養)及び牛胆汁加グリセリン馬鈴薯(日本株35代、アメリカ(R)株3代、フランス株2代の各28日培養)からそれぞれ菌液を作り、載物硝子に径1cm程度に塗抹し、Ziehl-Neelsen Sauton 染色を施したものについて、染色性、形態及び菌の長さを比較した。

菌の長さは各菌株の上記各培養についてそれぞれ凡そ600~1000個以上の菌体について測定し、その平均値を求めた(第1表)。Sauton 馬鈴薯培養の菌の大きさの度数分布は第1図に示す如くである。いずれの培養においても日本株が最小、フランス株が最大、アメリカ(R)株はその中間に位した。

菌の形態及び染色性はつぎの如くで、アメリカ(R)株は、日本株及びフランス株の中間的性質を示した。

1) 日本株：いずれの培養からのものも、平等に好染し、Sauton 及び牛胆汁加培地のものは一般に短形、Sauton 馬鈴薯のものも一般に短形ではあるが、やや大小不同が見られた。顆粒はいずれも濃染し、1~3ヶ程度。束状や長い連鎖状の排列は見られなかつた。

2) アメリカ(R)株：牛胆汁加培地の菌は濃淡が見

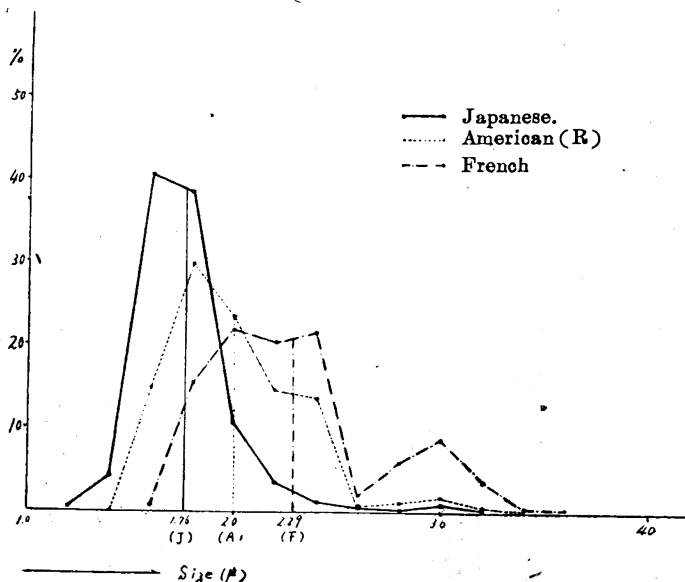
Table 1. Average size of bacillus

Culture media	Strain	Size (μ)			σ	n
		max.	min.	M.		
Sauton-potato (7 day culture)	Japanese	3.2	1.2	1.76	0.25	1976
	American (R)	4.4	1.4	2.00	0.32	1141
	French	3.6	1.6	2.29	0.39	1024
Bile-potato (28 day culture)	Japanese	4.0	0.8	1.52	0.34	625
	American (R)	4.8	0.8	1.78	0.51	684
	French	6.0	1.0	2.29	0.80	619
Sauton-Liq. (14 day culture)	Japanese	3.0	1.2	1.81	0.26	800
	American (R)	4.2	1.2	2.18	0.55	732
	French	4.8	1.0	2.18	0.60	635

Note :

- 1) Differences between these three strains are significant on Sauton-potato, as well as on bile-potato.
- 2) Difference between the cultures on bile-potato and Sauton-liq. of french strain is insignificant.

Fig1. Comparison of the Size of bacillus.
(7day culture on Sauton-potato)



られたが、Sauton 及び Sauton 馬鈴薯のものはいずれも平等に好染した。いずれの場合も菌体は日本株よりもやや長く、Sauton 馬鈴薯のものでは長短不同や軽度のS字状を為すものもみられ、束状の排列を示すものもあつた。顆粒は判然と染色しているものが少なかつたが、長いものでは4~5個みとめられた。

3) フランス株：いずれの培養のものも染色不平等で、大きさも又不同、多型であり、連鎖状或は束状の排列をなすものもあつた。顆粒は Sauton 及び Sauton 馬鈴薯の菌では黒紫色に濃染していたが、牛胆汁培地のものでは、判然と顆粒の見られるものは甚だ少なかつた。

4 総括・考按

Calmette から分与されて各国に保存され、或はワク

チン製造に用いられている BCG 菌株について、それ等を相互に比較した研究報告は余り多く見られないが、Böe¹⁰がスウェーデン・デンマーク・ノールウェー及び Pasteur 研究所の菌株につき、又 Aronson¹¹がスウェーデン・デンマーク・ノールウェー及びアメリカ(3株)の6菌株につき、ともに Jensen 法による毒力 Virulence の比較研究を行つたところでは、何等相違を示さなかつたという。他方 Holm¹²及び Jensen¹³は、デンマークに保存された菌株と、Pasteur 研究所の菌株とを人体

及び動物について比較し、この両者の間に毒力の差が見られること、Sauton 液体培地に継代培養した菌株を牛胆汁加培地に移植すると毒力が増強されることを報告したが、これに対して、Van Deinese⁴は、デンマークにおいて長年月にわたり Sauton 液体培養を行つた為に BCG の Vitality が弱まつたことに基く現象であると思われること、牛胆汁が培地が毒力を高めたのではなくして、寧ろその Vitality を高めるように作用したのであろうと結論している。Van Deinese が F-Macholada¹³とともに報告したところによると、デンマーク株とフランス株の間には形態学的にも可成りの相違があつたようで、例えば、Vaccine については、菌の大きさの平均値が前者では 2.07 μ 、後者では 3.11 μ であつたことや、また F. Sénéchal¹⁵とともに報告した

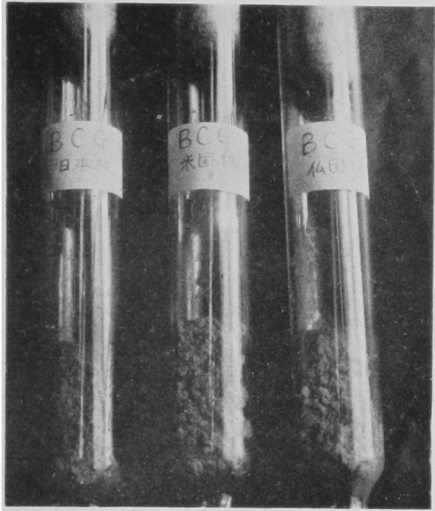
成績では、Sauton 培地に長く継代培養すると、菌の大きさが小さくなることを述べており、デンマークの研究者の発表に対して独自の見解を述べているのは甚だ興味深い。

Sauton 培地のみに継代培養してゆくと、菌膜の発育が思わしくなくなることや、菌の大きさが漸次変化するという事実を、われわれもまた日常の実験に當つて認めているが、Van Deinese のいう如く、牛胆汁加馬鈴薯培地を通過せしめなくとも、Guérin の考案に基いて 1933 年以来 Pasteur 研究所において行われているように、時々 Sauton 培地から Sauton 馬鈴薯培地を通過せしめるだけで充分であるということは、BCG の菌株を保存する上に重要な知見であるに相違ない。ただ Sauton 馬鈴薯

BCG 菌株に関する研究(第1報)

空極豊徳・関 又蔵・高野袈婆男・吉田幸之助

附 図 I



Sauton 馬鈴薯 14日培養

附 図 II



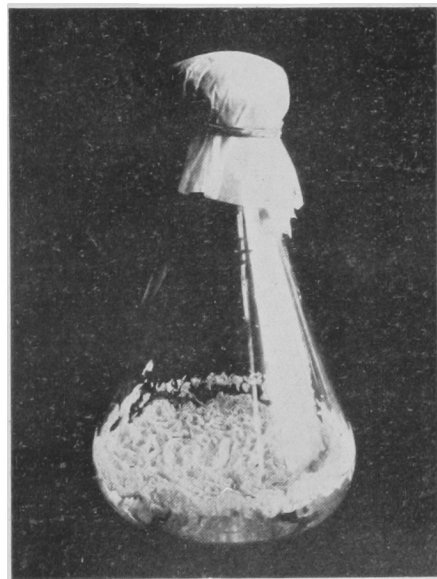
日本株 : Sauton 2代, 14日培養

附 図 III



アメリカ(R)株 : Sauton 2代, 14日培養

附 図 IV

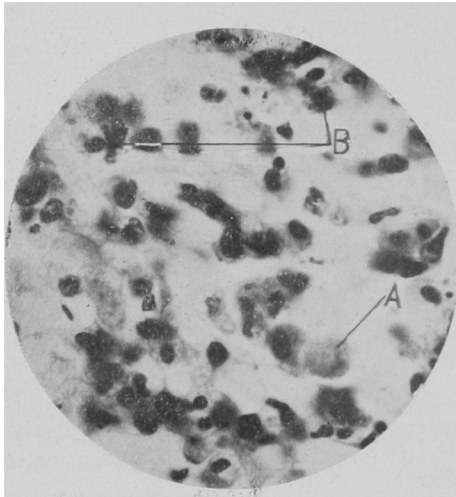


フランス株 : Sauton 2代, 14日培養

初感染結核症における菌運搬者としての単球と病巣の転移

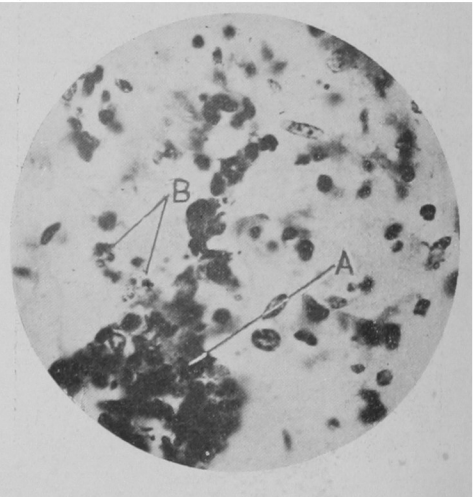
大野 乾・青山 攝

Fig 1 肺病変部過沃度酸酸化の多糖類反応と Feulgen 核反応との組み合わせ



- A 大滲出細胞原形質の消化された結核菌 DNA
- B 結核菌の寄生を受けた多糖類単球

Fig 2 肺壊死巣部の同組み合わせ反応



- A 最初の壊死巣は、崩壊した多糖類単球の核破片と原形質外へ逸出した菌とよりなる
- B 崩壊した多糖類単球より菌の逸出するところ

Fig 3 結核菌に対する単球系細胞の態度



- A 多糖類単球：寄生する菌は Hotchkiss 氏多糖類反応陽性、Ziehl 染色弱染
- B 幼若単球：原形質塩基好性のもは菌を含まず
- C 類上皮細胞：貪喰された菌は多糖類反応弱陽性、Ziehl 染色好染

培地、Sauton 培地継代培養によつて減弱した BCG の Vitality を、如何なる機序の下に高めるのか、という点は現在迄の所明らかでなく、また牛胆汁加馬鈴薯培地と Sauton 馬鈴薯培地とが同じく菌の Vitality を高めるにしても、菌の発育に対して与える影響の異同如何という点については、直ちには結論しえないようである。

われわれがここに比較観察した BCG 菌株の内、日本株は周知の如く 1925 年に分与をうけて以来 20 余年間牛胆汁加馬鈴薯培地に継代培養してきたものであり、アメリカ(R)株も同様の継代培養方法によつて保存されたものの由に聞いているが、フランス株のみは、Van Deirse に由れば長く牛胆汁加培地を 通さずに Sauton 馬鈴薯培地に累代したものであるといわれている。

しかも各種培地上の発育状態の差異、就中 Sauton 培地上の菌膜の性状の相違や、各種培養からとつた菌の塗抹標本について見られた菌の染色性、形態乃至は菌体の大きさの差異などが、元は同じく Pasteur 研究所から分与され、原法通りの継代培養方法を以つて保存されたに拘らず、何故現れたかについては大きな疑問が残されるのである。

このような生物学的諸性状が、結核菌のみならず他の細菌の場合と同様に、培地成分の異同や培養日数乃至培養代数の差異によつて影響を受けることは当然であるが、われわれの比較した菌株の継代培養方法に違いがないとするならば(殊に日本株とアメリカ(R)株の場合のように)、培地成分の異同にその原因を求めなくてはならぬであろう。前述したように、牛胆汁加培地におけるアメリカ(R)株やフランス株の発育が当初は甚だ不良であつたことは、それぞれの国において用いられている胆汁そのものに何等かの差異があるのではないかを想像せしめる。またわれわれが日常結核菌の培養に当り、所謂男爵種を最も好適な馬鈴薯と考え、Aronson もまた、Pennsylvania の馬鈴薯は好適であるのに対して Idaho の馬鈴薯では思わしい発育を見ないと述べていることからみると、馬鈴薯自体の差異が相当大きい影響を与える因子であるようにも思われる。その他グリセリンその他の培地成分についてもまた同様なことが考え得るのであり従つて、菌株の保存に使用される培地成分のこのような差異が、長期にわたる継代培養の間に菌の生物学的性状を変えるように作用するのかも知れない。

BCG の 3 菌株に見られた形態学的な差異や、培養性状の異同などについては、培養方法や培地成分等の異同の及ぼす影響について比較検討すべき多くの問題が、なお残されているように思うのである。

5 結 論

S. R. Rosenthal から送られた乾燥 BCG lactose vaccine 及び Pasteur 研究所で製造された乾燥 BCG glucose vaccine からそれぞれ移植培養した BCG 菌株

(アメリカ(R)株、フランス株)と、予防衛生研究所保存の BCG 菌株(日本株)とについて、その生物学的性状を比較した。

1) Sauton 馬鈴薯培地にはどの菌株も旺盛に発育する。牛胆汁加グリセリン馬鈴薯培地にはアメリカ(R)株、フランス株は初めは殆んど発育しなかつたが、代を累ねてから漸次順調な発育を示している。グリセリン水馬鈴薯培地にはアメリカ(R)株は比較的良く発育したが、他の株の発育は思わしくない。

2) Sauton 液体培地上の菌膜は、アメリカ(R)株ではやや白味をおびた湿潤の厚い菌膜で、7~10 日頃に僅かな振動で液面下に沈む性質があり、フランス株では賣色調がやや強く、大きな深いうねりを伴つて細かい皺襞がみられ、菌膜は厚いが少しも湿潤性ではない。日本株の菌膜はフランス株に似ている。

3) 菌体の長さの平均値は、フランス株が最大、アメリカ(R)株が之に次ぎ、日本株は最小であつた。

4) 菌の染色性は日本株が最もよく顆粒も鮮明であつたが、フランス株は大小不同や不平等な染色を示し、アメリカ株はその中間的な性質を示した。

擲筆に臨み、御校閲を戴いた柳沢部長に謝意を表する。

本研究は文部省科学研究費援助によつて為され、総合研究結核研究委員会及び予研伝研集談会において報告された。結核研究委員会委員長今村博士、細菌科会長戸田博士に謝意を表する。

文 献

- 1) Jensen K. A. : Acta tbc. Scandinav. vol. 21, 1, 1946.
- 2) Jacox R. F. and Meade G. M. : Am. Rev. tub., vol. 60, 541~546 1949.
- 3) van Deirse F. et Sénéchal F. : Bull. World Health Org., 2, 347~354, 1950.
- 4) van Deirse F. : Am. Rev. Tbc., vol. 58, 571~575, 1948.
- 5) Treng O. : Ann. de l' Inst. Pasteur, Tom 64, 196~202, 1940.
- 6) 柳沢謙, 金光正次 : 第16回聯合微生物学会記録, 78, 1942.
- 7) 菅野巖 : 東北医学雑誌, 31巻, 218, 1942.
- 8) 占部薫 : 日本医学及健康保険, No 3325, 535~537, 1948.
- 9) 佐藤守 : 抗酸菌病研究雑誌, 4巻, 1号, 33~41, 1948.
- 10) Böe J. ; Acta tbc. Scandinav., vol. 22, 125, 1948.
- 11) Aronson J. D. and Schneider P. : Am. J. of Public Health, vol 40, 533~544 1950.
- 12) Holm J. . Public Health Rep., vol 61, 1298, 1946.
- 13) van Deirse F. et Macholada F. : Ann. de l' Inst. Pasteur, Ton. 78, 591~601, 1950.