

# 超音波照射による濃厚 BCG 菌液作製並びに その凍結乾燥ワクチンについて

予防衛生研究所結核部 (部長 柳 沢 謙)

関 根 修

(昭和 29 年 2 月 8 日受付)

結核菌に対する超音波の作用については笠原<sup>1)</sup>、石川<sup>2)</sup>、津川<sup>3)</sup>、浮田<sup>4)</sup>、G. Veltmann<sup>5)</sup>等の報告があるが、いずれも照射時間の増大と共にその菌液の定量培養によつて得られる集落数に減少が見られることを述べている。その場合夫々の実験における超音波のエネルギー、照射を受ける菌の条件などが一定でないでその減少の率も種々である。これらの報告に対し高橋<sup>6)</sup>は、BCG に対して超音波を照射すると菌体及び菌塊を破壊するが、短時間(5~10分)作用では発育を却つて促進し、培養による集落数の増加がおこることを報告している。

辻岡<sup>7)</sup>、津川<sup>3)</sup>、海老名等<sup>8)</sup>及び高橋<sup>9)</sup>は動物実験により、超音波の作用を受けた BCG ワクチンのツベルクリンアレルギー発現能力は弱い、感染防禦力は殆んど一般の BCG ワクチンと差異がないことを示している。更に海老名等<sup>8)</sup>及び浮田<sup>4)</sup>は超音波製ワクチンを人体接種し、共に高い陽性率を得たが、その場合接種局所反応が弱かつたことを報告している。

このように超音波の BCG に対する作用及びそのワクチン抗元性については今迄に多くの研究がなされているが、最近 BCG の経皮接種の研究がすすむと共に菌量の多い乾燥ワクチンが必要となり、その製造に超音波法を採用すべきことが考えられるに至つた。それは超音波法の長所として、菌の分散度のよいワクチンを大量にしかも濃厚な菌液を簡単につくりうるからである。そこで超音波法による濃厚 BCG ワクチンの作製とこれを用いた凍結乾燥 BCG ワクチンの製造条件に再検討を加えると共に動物実験、人体接種を行つたのでその知見を述べて超音波法による BCG ワクチン製造の一資料としたい。

## 実験 I 超音波の BCG に及ぼす影響

この実験では BCG に対する超音波の短時間照射が、菌の発育を特異的に促進するかどうかを調べた。

Sauton 培地 2 代目 7 日培養の BCG の脱水菌体 1mg をメノー乳鉢にとり手摺り法で 2% 馬血清 0.05 mg/ml 菌液を作り、この菌液を 3000 R.P.M. で 15 分間遠沈して単菌のみを浮遊する上清と多くの菌塊を含む沈渣とに分けた。

この沈渣を 2% 馬血清で再浮遊して沈渣菌液をつくつた。その各々の菌液に超音波を次の同一条件で作用させて作用時間毎に定量培養を行い、作用時間と集落数の消

長との関係を見た。

図 1 超音波の 7 日培養 BCG に及ぼす影響

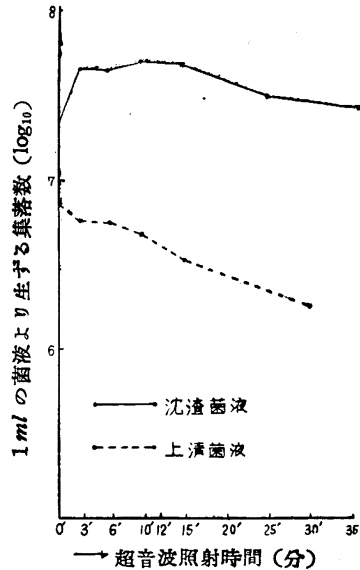
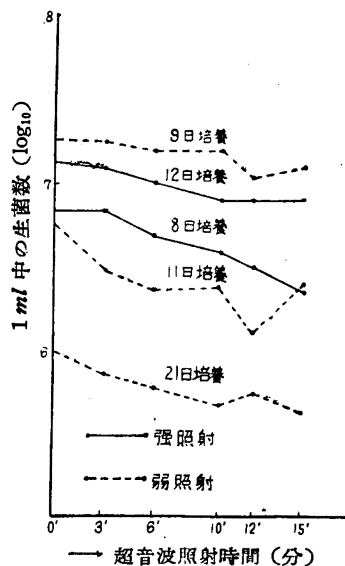


図 2 強及び弱エネルギーの超音波を各培養日数の BCG に照射した場合の生菌数に及ぼす影響



この成績は図 1 に示す。

照射条件：周波数 560 K. C. 高周波電流 1800 m. A. 格子電流 40 m. A. 陽極電流 260 m. A. 陽極電圧 3.0 K. V.

又各培養日数のものについて上清菌液に超音波を作用させた成績は図 2 に示す。この実験では超音波エネルギーの強弱、BCG の培養日数の長短が、菌の発育に如何なる影響を与えるかを検討する為に強弱二種の照射を行つた。

弱照射の照射条件：高周波電流 1500 m. A. 格子電流 27 m. A. 陽極電流 220 m. A. 陽極電圧 2.3 K. V.

図 1, 2 に示すように沈渣部よりつくつた菌浮遊液についてみると、菌集落数は 10 分迄は作用時間と共に増

大し10分を頂点としてそれ以後は時間と共に減少する。これは超音波によつて菌塊が破壊されて菌の分散する速度が菌の破壊される割合よりも照射10分迄は大であり、10分を過ぎると菌塊減少のためにその関係が逆になることを示すものと思われる。

特に3分の短時間照射で集落数が急激に増大しているのは注意すべき点である。殆んどすべてが単孤菌からなる上清菌液に超音波を照射した場合に照射超音波のエネルギーの強弱やBCGの培養日数如何にかかわらず時間と共に集落数を減じた。

#### 実験Ⅱ 超音波を作用した菌液の凍結乾燥

Sauton 培地上の同一菌膜より移植した各培養日数のBCGを用いて同一条件下に超音波照射及び凍結乾燥を行い、乾燥前後の生菌数を見た。その成績は表1に示す。超音波照射条件は実験Ⅰと同一で、10分間照射した後多岐管式乾燥機で5時間乾燥した。

表1 超音波 BCG ワクチンの凍結乾燥

BCG の 培養日数	1mg (湿菌量)中の生菌量 (viable unit)		生 残 率 (%)
	乾 燥 前 ( $\times 10^5$ )	乾 燥 後 ( $\times 10^5$ )	
7	44.3	23.3	52.5
8	104.3	19.6	18.7
10	79.3	26.0	32.7
12	80.0	7.9	9.8
14	56.0	2.7	4.8
17	9.3	0.7	7.5
21	8.7	0.7	8.0

表1の成績から培養日数の若いBCGの方が凍結乾燥に対する生残率が高く、培養日数12日を過ぎるとその生残率は10%以下に低下していることがわかる。例えば7日培養と14日培養のBCGを比較すると、乾燥前の生菌量はやや後者の方が多いが、凍結乾燥に対する生残率がそれぞれ52.5%、4.8%と大差を示すために、乾燥後の生菌量についてみると後者は前者の $\frac{1}{10}$ 程度に減少している。すなわち培養日数の若い対数期のBCGは乾燥前の生菌量が多く、且つ凍結乾燥に対する生残率が高く、従つて乾燥後の生菌量が多い。この成績より超音波を作用させて作ったBCG菌液を凍結乾燥する場合にもSauton 培地培養10日以前のBCGを用いれば生菌量の低いワクチンをつくる危険が少ないといえるのである。

#### 実験Ⅲ 超音波照射による濃厚菌液作製条件

以上の実験により超音波製乾燥BCGワクチンの生菌数は、超音波照射量が一定であれば照射時間及びBCG培養日数によつて規定されることを知つたが、更に菌に対する超音波照射量には照射を受ける菌液の濃度如何によつて、いかなる照射条件が選ばれるべきかをみなくてはならぬ。そこで3g前後の脱水菌体に5%

Lactose 溶液を加えて約30mlの容量とし超音波照射によつて100mg/mlの菌液になるようにし、菌の分散度と生菌量との二点から超音波の至適照射条件を求めた。

この実験に実験Ⅱの強照射条件を用いたところ約25分の照射を必要とした。これより短時間では大きい菌塊が多く、長時間では菌の分散はよくなつても菌体破壊産物の増加が著しくなり生菌数は減少する。そこでBCGの培養日数を10日以前とし以上の照射条件凍結乾燥条件を以て経皮用乾燥BCGワクチンをつくる方針とした。

Sauton 9日培養のBCGを用い上述の照射条件によつて作った100mg/mlの菌液1mlをアンプルに分注し凍結乾燥して1アンプルに100mgのBCGを含む乾燥ワクチンをつつた。このワクチンの凍結乾燥前後の1mg中の生菌数はそれぞれ $9.7 \times 10^5$ 、 $36.3 \times 10^5$ であり、凍結乾燥に対する生残率は33.4%であつた。製造後1週間5°C以下に保存して動物実験に用いた。

#### 実験Ⅳ 超音波ワクチンの virulence 並びに免疫元性について

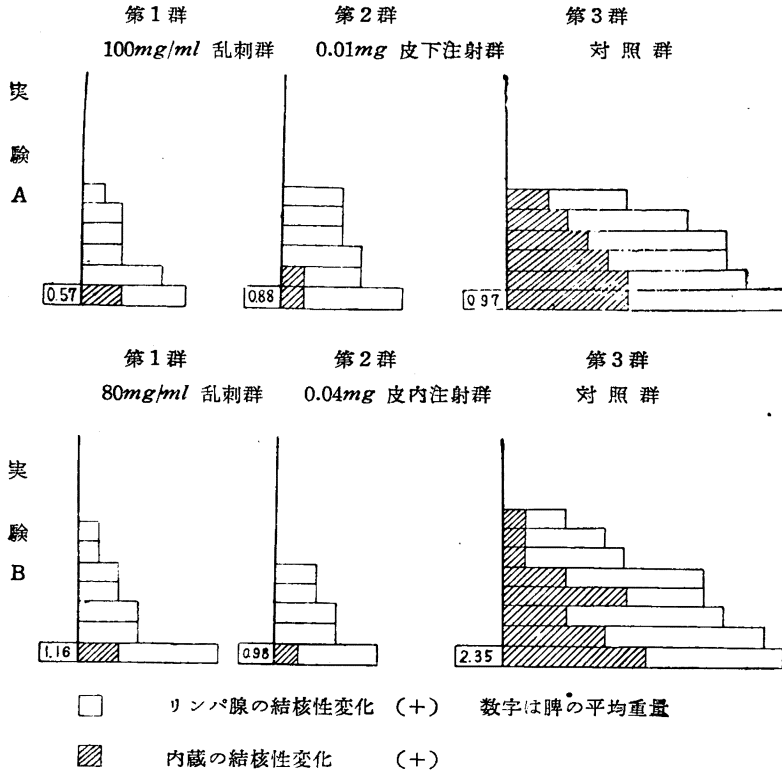
超音波照射によりBCGのvirulenceの変化、特に上昇に対する懸念をしらべる為に、先ず超音波を用いて作った菌液を天竺鼠に接種してvirulence testを行つた。すなわち4 Lotについて各30mg宛を1 Lotにつき10匹の天竺鼠の皮下及び筋肉内に接種して3ヵ月放置後屠殺剖検を行つてリンパ腺及び内臓の結核性変化を調べたが内臓には肉眼的に結核結節を認めることができなかった。すなわち超音波照射によつてもBCGのvirulenceには上昇が見られないのである。

次に免疫元性は天竺鼠の感染防禦力試験によつて行つた。すなわち上記の超音波乾燥BCGワクチンにつき、乱刺法・皮下法及び皮内法によつて次のように行つた。

A) 天竺鼠を3群に分け第1群(6匹)には予め脱毛した左下腹部に100mg/ml BCGワクチンを一滴落し、径8~9mmに拡げて種痘用乱刺針で30回乱刺した。第2群(7匹)には同一ワクチンを $10^{-2}$ mg/mlに稀釈し1.0ml宛左下腹部皮下に注射した。第3群(6匹)は対照としBCG接種を行わない。ツベルクリン・アレルギーはBCG接種後4週から6週迄100倍ツベルクリンで追求した。BCG接種後6週目に人型結核菌H<sub>2</sub>株0.02mg宛を全群の右下腹部皮下に感染し更に6週放置した後屠殺剖検して肉眼的に感染防禦効果をしらべた。

B) 氷室に7週間保存した超音波ワクチンを用い、天竺鼠を3群に分けて第1群(7匹)には80mg/mlに稀釈したワクチンを30刺乱刺接種、第2群(7匹)には0.4mg/mlに稀釈したワクチンを0.1cc(人体接種量)皮内に注射、第3群(8匹)は対照とし、人型結核菌H37Rv株0.01mgを感染し、以後実験Aと全く同じに行つた。

図3 超音波乾燥 BCG ワクチンを接種した天竺鼠における結核症防禦効果

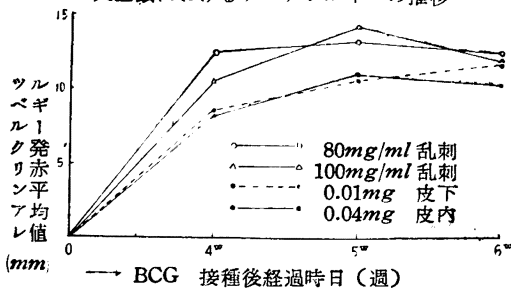


成績は図3に示すように超音波乾燥 BCG ワクチンは乱刺法・皮下法・皮内法のいずれの接種法によつても顕著な感染防禦力を示すことが認められた。すなわち剖検所見についてみると、感染局所の変化、リンパ腺の腫脹は免疫群は対照に比して軽度であり内臓では、肺は免疫群は全く結節を認めず、対照群はその殆んど全部の肺に数個宛の結節を認めた。肝、脾は対照群は全部多数の結節を有するが免疫群には殆んど肉眼的病変を認めない程度であった。

以上の成績から超音波を用いて作った乾燥 BCG ワクチンは、virulence の上昇を来すことなく、しかも充分の免疫元性を保持しているといえよう。

超音波乾燥 BCG ワクチンのツベルクリンアレルギー

図4 超音波乾燥 BCG ワクチン接種後6週間の天竺鼠におけるツ・アレルギーの推移



を惹起する力は図4に示す如くで乱刺法では4週で確実なアレルギーの発現を示している。乱刺群は皮内及び皮下接種群よりもアレルギーの発現は強く、皮内及び皮下接種群は時日の経過とともに強いアレルギーを示している。

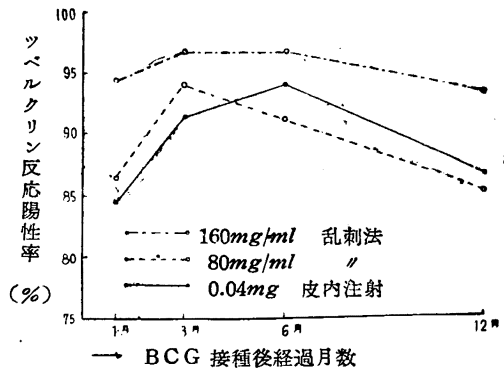
実験V 超音波乾燥 BCG ワクチンの人体接種

実験IVにより超音波乾燥 BCG ワクチンはいずれの接種法を用いても極めて顕著な感染防禦効果を与えることを認めたので、このワクチンの人体接種を行いその効果を見た。

この実験には凍結乾燥後3カ月間 5°C 以下に保存したワクチンを用いたが、接種時の生菌数は  $28.3 \times 10^6/mg$  であつた。

接種対象は静岡県御殿場小学校の児童で既往に BCG を

図5 超音波乾燥 BCG ワクチンの各種接種法による人体接種後、1年間におけるツベルクリン反応陽性率の経過



接種したことの無いものをえらび、ツベルクリン反応が陽性でないことを確かめた上で接種を行った。

接種は皮内法及び乱刺法により、いずれにも同一のアンブルからとり出した菌液を用いた。第1群には0.04mg (0.1ml) ずつ皮内注射、第2群には 80mg/ml、第3群には 160mg/ml に希釈したワクチンを1滴ずつ皮膚上におとし径 8~9mm の円型に拡げて種痘用乱刺針を用いて 30 回乱刺した。ツ反応の検査は接種後 1, 3, 6, 12カ月目に行いすべて同一 Lot (Lot 418) の 2000 倍

ツベルクリンを用い、その 0.1cc を皮内注射後 48 時間で反応をしらべ、10mm 以上を陽性とした。1 年目のツベルクリン反応測定成績において途中で一旦減弱した反応が硬結を伴って再び著しく強度を増したものと及び最強反応を 1 年後も示すものは自然感染例として集計から除外した。BCG 接種局所反応の検査は発赤を伴った硬結・痂皮・潰瘍・癬痕・無変化と外から見たままに区別した。

陽性率は図 5 に示す如くいずれの接種方法によつても 1 年間を通じて 80 % 以上の陽性率を維持しており、160 mg/ml で乱刺接種を行つた群では、1 年間 90 % 以上の陽性率を保持している。従つて超音波乾燥ワクチンは乱刺法によつても、皮内注射によつても人体接種に用いて充分の効果を期待することができるというのであろう。

表 2 超音波乾燥 BCG ワクチンの各種接種法による人体接種後、1 年間における接種局所変化の経過

ワクチン接種方法	0.04 mg 皮内注射				80 mg/ml 乱刺法				160 mg/ml 乱刺法				
	1	3	6	12	1	3	6	12	1	3	6	12	
接種後経過月数	1	3	6	12	1	3	6	12	1	3	6	12	
検査回数	72	72	70	63	73	71	72	71	36	35	34	32	
接種局所変化 (%)	硬結+発赤	80.6	0	0	0	84.9	0	0	0	72.2	0	0	0
	痂皮	12.5	15.3	0	0	9.6	1.4	0	0	25.0	2.9	0	0
	潰瘍	2.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	癬痕	0	84.7	100	28.5	0	98.6	100	8.4	0	97.1	100	25.0
	無変化	4.2	0	0	71.5	5.5	0	0	91.6	2.8	0	0	75.0

しかし硬結触知率や 2 重発赤形成率の面から質的にツベルクリン反応の強さを観察すると、超音波乾燥ワクチンによつて惹起されたツベルクリン反応は水晶球入りフラスコ回転振盪法でつくつたワクチンより弱い。同様なことは接種局所変化の消長からも知ることができる。超音波を用いないワクチンでは皮内法・乱刺法を問わず、接種 1 年後殆んど 100% に癬痕が残存しているのに対して、表 2 に示すように超音波を用いたワクチンでは接種局所の癬痕が殆んど跡をとどめずに消失している例が極めて多く、これら力価の減弱は専ら生菌数の減少に帰せられるべきであらう。

#### 考 按

超音波の細菌に対する作用については種々の考察が下されている。その中最も大きな影響は殺菌作用であるが、この作用が如何なる過程によつて行われるかは明らかでない。しかし照射時間の延長とともに、照射を受けた菌が増殖力を失つてゆき、又形態学的変化も甚しくなることは多くの成績より明らかである。

一方 BCG 菌液製造に超音波を用いる目的は、よく菌の分散された浮遊液を得たいためである。ところが生菌ワクチンとしての BCG ワクチンはなるべく多くの生菌が一定重量中に含まれていることを同時に要求するので、菌の分散をよくしようとして照射時間を長くする

と、超音波の殺菌作用のために生菌数が減少してワクチンとしての価値を減ずることになる。BCG ワクチン製造に超音波を利用した多くの研究者の研究の重点も結局、ワクチンの生菌数になるべく多くてしかも菌液の分散状態ができるだけ理想に近い条件をえらぶことにあつたようである。

しかし超音波照射の至適条件は、照射エネルギーを測定することがむづかしいので、それを以て規定するわけにはゆかず、結局用いる超音波発生装置に即応して、最適点をえらぶようにせねばならない。その上菌塊の分散には照射をうける菌液の濃度のみならず菌液の容量もまた大きな影響を与えるので、このような因子をすべて一定して、菌塊の分散状態を顕微鏡的にみ同時に培養によつて生菌数の消長を追いつつ機械毎に照射至適条件をき

めなくてはならない。

#### BCG ワクチンの

vitality という面から見ると、高橋の研究の如く短時間の超音波照射が菌の増殖力を増大するという観察は興味あることであり、BCG 以外の菌についても同じような報告がある<sup>10) 11)</sup>。しかし

BCG は機械的な外力を加えなくては菌塊を分散して均等な菌液とすることがむづかしいので、単孤菌浮遊液に超音波を照射する場合には、BCG はすでに何らかの物理的な作用を超音波照射前に受けているはずである。従つて超音波の照射が更に菌の増殖力に影響を与えるとすれば、機械的な力以外の何か超音波特有の作用があるのであろう。著者の実験ではこのような超音波特有の作用はなく、短時間の照射が菌の増殖力を高めるようにみえるのは、菌塊が単孤菌に分散することによる集落数の増加のためであることを確かめることができた。なお実際にワクチンを製造する場合には脱水菌体をそのまま適当な媒液中に入れ、直ちに超音波を照射して菌塊を分散させるので、照射時間は長くなり、短時間（例えば 10 分以内）の照射は用いられない。

BCG の Sauton 培地上の発育時期によつて、凍結乾燥に対する抵抗力を異にすることを橋本等は報告した<sup>12)</sup>、これはワクチンを製造する場合に BCG 菌側の条件を考慮に入れねばならぬことを示したものである。

超音波ワクチンを乾燥ワクチンとして用いる場合にも、その物理的外力の加重することを考えてなお一層 BCG 菌体の抵抗力を重視しなくてはならぬはずである。その意味から上述の如く著者は、BCG 菌側の条件、超音波照射エネルギーの条件を吟味して超音波乾燥 BCG ワ

ワクチンの製造を行つたのである。

超音波照射による BCG の菌力の変化、殊にその上昇の可能性は上述した実験成績からみて肯定しえないのである。むしろ、照射による生菌数の減少のために、菌力が見かけ上減少して、抗元性の低下がおこる点が問題であろう。著者のえた超音波照射条件では未だワクチンの生菌数の点からみて、従来水晶球コルベン振盪法によるワクチンに稍々劣ることは免かれない<sup>13)</sup>。しかし皮内法及び経皮法で行われた人体接種成績の陽転率、及び局所変化よりすれば、BCG ワクチンとして充分実用の域に達したものとというと思う。

濃厚な菌液を一時に大量に、而も非常に簡易な操作で製造できるということは、超音波法の極めてすぐれた点であるから、経皮用ワクチン製造にはこの利点を充分生かすことが必要である。それには生菌数の上昇に工夫をこらすことが今後の課題であろう。よく分散された状態でしかも生菌数が多いことをのぞむには、超音波照射時間を短縮する方向へ研究をすすめるべきであるが、既に著者等はこの方向に新しい知見を得つつあるので後に報告したい。

#### 結 論

超音波乾燥 BCG ワクチンの製造条件において、照射条件及び BCG 菌側の条件を検討し、菌の分散が良好でしかも生菌数の多い乾燥ワクチンを製造した。このワクチンは、動物実験において強い結核症防禦力及びツベルクリンアレルギーを賦与することができ、しかも人体接種では、皮内法でも経皮法によつても高い陽性率を1年間持続せしめることができた。

終りに臨み柳沢部長・室橋博士・橋本技官の御指導と御校閲を感謝すると共に研究室諸氏の御援助を深謝する。

なおこの研究の一部は文部省科学研究費、日本 BCG 研究協議会研究費によるものであつて、ここに謝意を表する。

#### 文 献

- 1) 笠原道夫：医学と生物学，1 (11)：507—508，1942.
- 2) 石川久之：抗研誌，5 (2)：127—130，1949.
- 3) 津川 弘：医学研究，16(5)：107—151，1942.
- 4) 浮田堅太郎：結 核，23(1—2)：1—16，1948.
- 5) Veltman, G. & Woeber, K.H. : Der Ultraschall in der Medizin, S. Hirzel, Zürich. : 233—237, 1949.
- 6) 高橋義夫：結 核，27(5)：215—218，1952.
- 7) 辻阿竜之助：医学研究，15(10)：63—79，1941.
- 8) 海老名敏明・加藤慶五・小林達郎：抗研誌，1(2)：1—7，1947.
- 9) 高橋義夫：結 核，27(7)：372—375，1952.
- 10) 矢追英武・中原和郎：The Japanese Jour. of Experimental Medicine, 12 : 131—135, 1934.
- 11) Hesselberg : Acta pathologica et microbiologica Scandinavica, Suppl. XC III, 1952.
- 12) 橋本達一郎：日本細菌学雑誌，7 (1)：43—47，1952.
- 13) 橋本達一郎・高野袈裟男：医学と生物学，27 (1)：12—16，1953.