

BCG 菌株に関する研究

第 4 報 日本株とスカンデナヴィヤ

諸国保存株との比較

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

室 橋 豊穂・関 又 蔵・吉田幸之助

(昭和 29 年 2 月 25 日受付)

1 緒 言

Pasteur 研究所及び Tice Laboratory にそれぞれ保存されているフランス株及びアメリカ(T)株*と、1925 年以来牛胆汁培地に継代保存されている日本株との性状の比較は既に報告した¹⁾。天竺鼠に対するそれ等の Virulence や免疫元性には本質的な差異がないとしても^{2), 3)}, 培養基上における発育性状や菌の形態学的性状に見られた差異は、長期間に亘る菌株の継代保存に当つての些細な培養条件の差異に恐らくは大きく影響されているように思われる。スカンデナヴィヤ各国に保存されている菌株にしても、例えばデンマーク株は Sauton 培地のみに長く継代されており、F. van Deinse の指摘するところに従えば^{4), 5), 6)}, 原株として Pasteur 研究所に保存されているものとはかなり違つた生物学的性状を示しているようである。しかも氏の菌株から作られたワクチンが、現在 WHO の標準ワクチンとして広く使用されている以上、わが国保存株との比較を行う必要のあることは言う迄もない。著者の一人室橋は北欧三国の BCG 研究所を訪ねて菌株の保存やワクチン調製の実際を見る機会を得たが、同時に各国保存株の分与を受けたので、この 3 株と日本株との比較実験を試みた。前実験の成績と比較しうるようになんと同一の実験方法によつて行つた。

2 培養性状の比較

分与された菌株は次の如くである。

ノールエー株：Bergen の細菌研究所 BCG 研究室 (Dr. J. Bøe) 保存株。牛胆汁馬鈴薯培養を入手。移植後 20 日目。

スエーデン株：Göteborg の細菌研究所 BCG 研究室 (Dr. O. Sievers) 保存株。牛胆汁馬鈴薯培養を入手。移植後 8 日目。

デンマーク株：Copenhagen の国立血清研究所 BCG 研究室 (Dr. K. Tønderlund) 保存株。Sauton 馬鈴薯培養を入手。移植後 24 日目。

1) 馬鈴薯培地上の発育

3 株とも馬鈴薯培養を分与された為に、菌株の継代は甚だ容易であつた。すなわち分与されたものから直ちに、グリセリン水馬鈴薯、Sauton 馬鈴薯及び牛胆汁馬鈴薯に移植し、次いでそれぞれ継代したところ、牛胆汁馬鈴薯培地には 3 株とも初代から発育は相当よく、3 週目には滑かな菌苔を作つた。又グリセリン水馬鈴薯及び Sauton 馬鈴薯には、移植初代は余り思ひしい発育を示さなかつたが、2 代目以後は旺盛に発育した。

この 3 種の馬鈴薯培地のいずれにも、ノールエー株は最も旺盛な発育を示した。

以上の成績はフランス株、アメリカ(T)株が牛胆汁馬鈴薯培地に継代が困難であつたことから考えて、大きな相違である。

2) Sauton 培地上の発育 (附図 1)

Sauton 馬鈴薯 2 代乃至 3 代培養の、Roux 試験管底部液面に生じた菌膜をとり、Sauton 培地に移植し、それから 10 日毎に 2 回継代した。Sauton 培地 3 代目の菌膜についてみると、9 日培養の菌膜は次のようであつた。

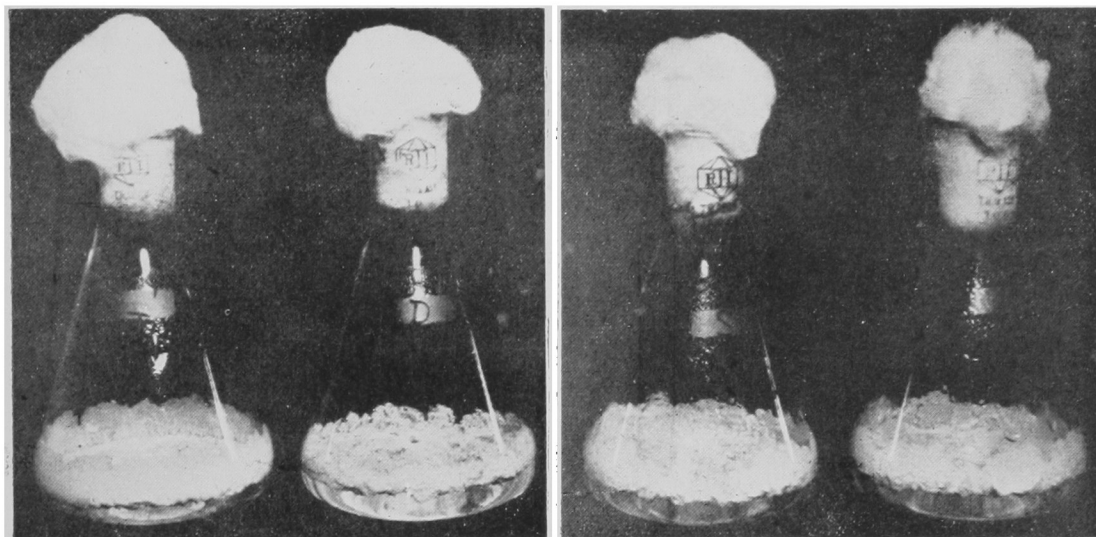
日本株の菌膜は比較的薄く、コルベンの全面に拡つて良好な発育を示し、デンマーク株のそれは菌膜が厚く表面が粗雑顆粒状で発育は稍々劣り、また、スエーデン株、ノールエー株ともに菌膜が厚く皺襞も大きく、発育は良好であつたが、特に前者はフランス株に似て黄色調が幾分強かつた。

Sauton 培地上の発育を更に比較追求する為に、次の実験を行つた。

実験：日本株及びスカンデナヴィヤ 3 株をそれぞれ牛胆汁馬鈴薯培地から Sauton 馬鈴薯に移植し、継代 2 代目の管底液面に生じた菌膜を Sauton 培地に移植し、Sauton 培地 2 代目の菌膜を種培養とした。各菌株につき Sauton 100 cc を入れた 300 cc 容量のコルベン 12 個宛を用意し、各種培養 7 日目の菌膜から 1 渦巻白金耳宛菌膜を移植、培養後 7 日、9 日、11 日及び 14 日目に各株とも 3 個宛コルベンを取り出し、菌収量 (3 個の平

* 前報告にはワクチン製造者 Rosenthal の R を付して、アメリカ (R) 株と仮に名付けたが、研究所名を付する方が正しいと思うので、アメリカ (T) 株と訂正する。

I. 10 day culture on Sauton's medium
(2nd generation)



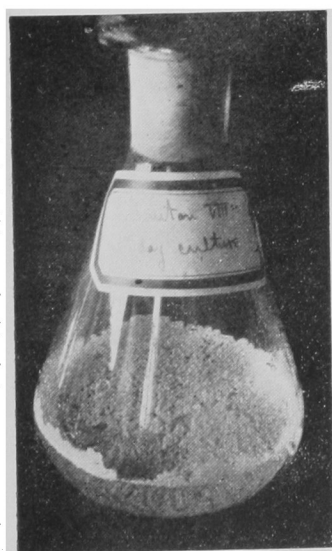
Japanese

Danish

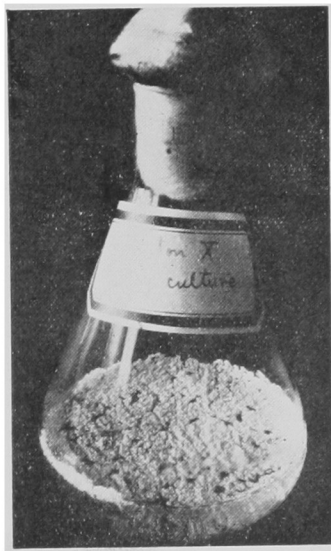
Swedish

Norwegian

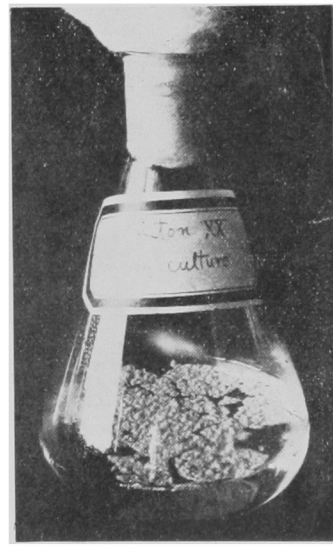
II. Influence of the successive cultivation on
Sauton's medium upon the growth of
BCG (Japanese) strain
(Comparison of 7 day cultures)



8th Generation



10th Generation



20th Generation

Fig 1 Growth curves of BCG strains on Sauton medium

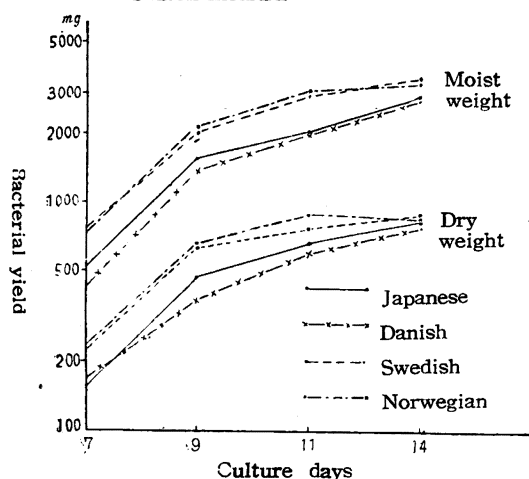


Table 1 Viable units per mg in varying culture days on Sauton medium

Strain	Culture days			
	7	9	11	14
Japanese	23.2×10^6	10.3×10^7	27.0×10^6	12.2×10^6
Danish	20.6×10^6	32.6×10^6	6.0×10^6	12.8×10^6
Swedish	15.4×10^6	10.1×10^7	8.4×10^6	6.0×10^6
Norwegian	9.6×10^6	25.6×10^6	1.4×10^6	2.6×10^6

均値)及び生菌単位数を測定した。

成績は第1図及び第1表の如くである。

菌収量はスウェーデン株及びノールエー株では殆んど同程度で、日本株及びデンマーク株よりも多かつたが、培養7日～11日迄の発育曲線は略々平行しており発育速度には殆んど差がないと考えることができる。次に生菌単位数が、培養9日を最高としている点ではいずれの株も同様であるが各培養日数毎に得られた生菌単位数には菌株相互に差異があり、発育の略々等しいスウェーデン株とノールエー株との間にも培養14日目には約 $1/20$ 程度の開きがあり、又日本株とノールエー株との間には培養14日目には $1/60$ 程度の開きがある。培養9日以後ノールエー株の発育曲線が軽度の下降を示しているところからこれは説明しうるかも知れない。

3) 菌の形態学的性状

Sauton 馬鈴薯9日培養の菌苔から塗抹標本を作り、Ziehl-Neelsen 染色を施して、菌体の大きさ、染色性及び形態を比較した。

菌体の大きさは、各株とも1000個の菌体に就いて計測しその平均値によつて比較した。大きさの分布は第2図に示す如くで、日本株、デンマーク株及びスウェーデン株は殆んど同形の分布曲線を示し、前報告¹⁾の日本株のそれと

Fig 2 Distribution curves of bacillary size

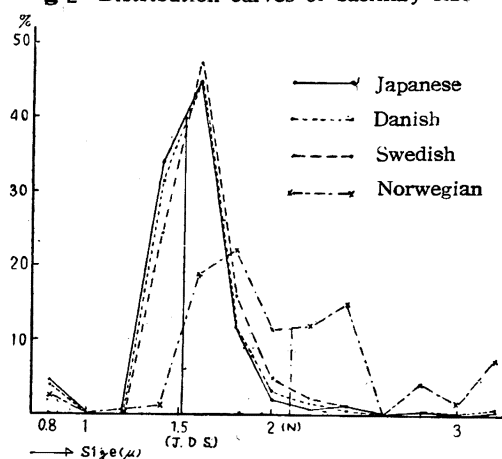


Table 2 Mean size of bacterial cells from the bacillary mass of 9 day culture on Sauton-potato medium.

Strain	size in μ				
	Max.	Min.	M		
Japanese	3.2	0.8	1.55	0.26	1,000
Danish	3.2	0.8	1.57	0.29	1,000
Swedish	4.8	0.8	1.67	0.30	1,000
Norwegian	6.4	0.8	2.18	0.79	1,000

完全に一致している。独りノールエー株は異つた分布曲線を示し、前報告のフランス株と同形である。菌の大きさの平均値は第2表の如くで、分布曲線に一致して日本、デンマーク及びスウェーデン各株の間に殆んど差異がなく小形であるが、ノールエー株のみは最大で、フランス株と略々似た値であつた。

染色性はいずれの菌株も平等で良く、日本、デンマーク及びスウェーデン各株は1～3個の顆粒を、ノールエー株は2～5個の顆粒を示し、後者には大小不同のみならず、多少彎曲した形態を持つものも見られた。

4) Virulence Test

BCGのVirulenceは低く固定されているので、大量の接種ではその間の差異を見ることができない。少量の皮内注射によるJensen法は現在世界の凡ゆるBCG研究室で用いられているが、これも的確な成績を与え得ないようである。low Virulenceの分析は又別の接種経路によつて行われなければならぬと考えるが、他の報告及び前実験の成績と比較する為に、Jensen法を用い、0.1～0.001mgを天竺鼠皮内に接種し、局所反応を追求してみた。成績は第3表の如くで、菌量による差異は認め得ても、菌株による差異は認められなかつた。

5) 免疫元性について

実験：Sauton 培地 10 日培養の各菌株から、同時に同一方法を以て菌液を作製、各々 0.1~0.001mg を天竺鼠皮下に接種し、6 週間後人型結核菌 H₂ 株 0.01 mg (24.2×10⁴ 生菌単位) を以て感染を行い、更に 6

週を経て剖検した。成績は第 4 表に示す如くである。罹患度の記載は佐藤秀三法により、臓器或いは淋巴腺に就いて+数の 1 頭平均値の対照動物 1 頭の値に対する百分率を以て表わした。

Table 3 Virulence Test

Inoculum (mg)	Local site	Japanese					Danish					Swedish					Norwegian				
		days after inoculation																			
		3	5	7	14	21	3	5	7	14	21	3	5	7	14	21	3	5	7	14	21
0.1	+++	4*					1	4	1	1			5	2							
	++	6	9	10	3		9	5	8	8	2	8	5	8	5	1	5	8	8	6	5
	+		1			7	1		1	1	8	2			5	6	4	1	1	3	3
	-					9										3					1
0.01	+++	1										2	5	8				3	4	3	2
	++	9	6	5	4		10	4	5	5	2										
	+		4	5	6	9		6	5	5	1	8	5	2	8	4	10	7	6	7	6
	-					1				7					1	5					2
0.001	+++																	2			
	++	9					4														
	+	1	8	9	8	1	6	8	10	8	3	10	6	8	6	2	10	5	8	3	
	-		2	1	2	9		2		1	7		4	2	3	7		3	2	7	10

Note: +++ size of reaction 8~10 mm

++ " 5~7

+ " less than 4 mm

* number of animals

Table 4 Comparison of the immunogenicity

Group	Tuberculin reaction immed. before challenge (mm)	Body weight increase (gr) during 12 weeks observ.	Tuberculosis Index		Spleen weight (gr)	V.U. of BCG inoculated (per mg)
			Lymph-Nodes (%)	Viscera (%)		
Control	0	+ 100	100 (6.0)	100 (3.7)	1.16	0
BCG-Group :						
0.1mg	16.4	+ 217	25	5.4	1.17	57.8×10 ⁵
J. 0.01	19.6	+ 65	65	13.5	1.07	
0.001	18.7	+ 171	51	8.1	1.34	
0.1	18.7	+ 169	55	10.8	1.35	25.2×10 ⁵
D. 0.01	17.8	+ 183	43	2.7	1.25	
0.001	17.7	+ 176	50	8.1	1.26	
0.1	17.2	+ 172	45	8.9	1.28	15.6×10 ⁵
S. 0.01	11.5	+ 156	45	5.9	1.43	
0.001	12.7	+ 96	75	20.2	1.37	
0.1	15.6	+ 62	62	14.8	1.50	1.6×10 ⁵
N. 0.01	17.0	+ 71	60	16.2	1.20	
0.001	13.0	+ 89	68	14.8	1.13	

Note: Challenge dosis with 0.01 mg of human type tubercle bacillus contained 24.2×10⁴ of viable units

J: Japanese, D: Danish, S: Swedish, N: Norwegian

接種された BCG 生菌単位数は日本株が $57.8 \times 10^5 \sim 10^8$ で最も多く、デンマーク株及びスウェーデン株は略々これと同一 Order にあつたが、ノールー株のみは $1.6 \times 10^5 \sim 10^6$ で明らかに低かつた。罹患度もこれに相応して、ノールー株群において稍々強かつたが、对照群の罹患度に比すればそれでもよく感染を防禦し得ており、この実験では、菌株による免疫元性の差異を認めることができなかった。但し更に免疫後の感染時期及び感染菌量に就いて検討を要するであろう。

3 総 括 考 按

われわれの持つ BCG 菌株と、スカンデナヴィヤ諸国保存の菌株とを比較した結果、Virulence 及び免疫元性には菌株間に本質的な差異を見出しえなかつた。Virulence Test としての Jensen 法の成績からは、ノールー株のみが他の菌株に比して弱い局所反応を示したが、これは接種された菌液中の生菌単位数が他のものよりも少なかつたことを以つて説明しようと思う。全く同様のことが感染防禦効果についてもいうことができる。

培養性状の内特に目につく点は、Sauton 培地上の菌膜の性状であつた。すなわち同一培養方法によつて牛胆汁馬鈴薯培地から Sauton 馬鈴薯培地を経て Sauton 培地に移植された各菌膜は、既に 1 週目にはかなり相違した外観を示し、日本株の菲薄なびのよい菌膜に対して、他の 3 株は旺盛な發育ではあるが相当厚い菌膜を作り中でもデンマーク株のそれは粗糙な感を与えた（附図 1）。この点からみて、菌膜の發育速度に差異のあることが想像されるが、培養 7 乃至 14 日の發育曲線を辿つてみると、7 日目には既に菌収量にかなりの開きが見られるのである。そして 7～11 日には菌収量こそ違え曲線が互に平行しているから、發育速度に大差ないと思えるが、11～14 日に至ると、菌収量の多かつたノールー及びスウェーデン株の發育曲線が水平に近づき、これに対して日本株及びデンマーク株の曲線が上昇を示していることから、後者の發育速度が前者より増したと考えられる。従つて前 2 者と後 2 者との間には Sauton 培地上の發育相が稍々異なると考えてよからうと思う。それにも拘らず、各時期における菌膜の単位重量中の生菌単位数からみるといずれも 9 日培養を頂点としているので、この發育相の差異も、生菌単位数の消長に影響しうる程の大きな差異ではないように思う。

Sauton 培地上の菌膜の外観についてみるに、ノールー株及びスウェーデン株はフランス株と相似ていたが、デンマーク株のみは粗糙な、稍々延びの悪い菌膜であつた。このような外観は Sauton 培地のみに 5～6 代継代

された場合には日本株に就いても認めうる性状である（附図 2）。現在デンマークでは甚だ延びの悪い Sauton 培地継代の菌膜のみをワクチン製造に用いているところから、このような dysgonic な菌膜の性状は、1～2 代の馬鈴薯培地通過によつては容易に失われ得ないのかも知れない。Sauton 培地に長く継代することの可否については、既に F. van Deinse が鋭い批判を下しているが、われわれの実験成績からみてもこれを認めうるのである。ただこのような發育を示す場合にも予想に反して単位重量中の生菌単位数は余り減少しないので、液体ワクチンとしての生菌単位数の面からは、余り影響しないと思うが、F. van Deinse のいうように菌自体に生理的或いは形態学的に変化が起りうるとすれば、かかる継代保存方法には賛同することはできない。特に凍結乾燥ワクチンを製造する場合には、継代培養に伴う dysgonic な發育相に対する結凍乾燥の影響が当然考慮されねばならぬからである。

菌の形態学的性状のうち、菌体の大きさが分布曲線並びに平均値において、日本株、デンマーク株及びスウェーデン株の間では略々一致し、ノールー株のみが前報告のフランス株と殆んど同型の曲線及び大きさを示したことはノールー株が比較的最近 Pasteur から分与された菌株であることに由るものであろう。

本実験における馬鈴薯培地培養のうち牛胆汁加培地に移植初代からいずれも良好な發育を営んだことは興味がある。前実験でフランス株及びアメリカ (T) 株が容易に發育しえなかつた理由として、培地成分中の牛胆汁やグリセリンの質的な異同を一応考慮したが、本実験の成績からすればこれ等の菌株がむしろ 2 週間毎に牛胆汁加培地に継代保存されて来た経歴の方がより大きく影響しているように思う。フランス株は 1933 年以来牛胆汁培地に年 1 回 3 代移植されるにすぎず、通常は Sauton 馬鈴薯培地にのみ継代されているいわば Sauton 馬鈴薯株ともいえるものであるから、Pasteur 研究所の牛胆汁とは異つた* わが国の胆汁加培地にはなおさら容易に發育し得なかつたのではあるまいか。F. van Deinse がいうように、Sauton 馬鈴薯培地が BCG の Vitality 維持には好適であるとしても、BCG が始め牛胆汁加培地によつて選択的に解離された変異株であることを考えるならば、BCG に及ぼす牛胆汁加培地と Sauton 馬鈴薯培地との影響の異同について充分解明されない限り、原株の諸性状を保存するという意味から、依然として牛胆汁加培地に保存さるべきものと考えらる。

* Pasteur 研究所の牛胆汁は、採取後 6 カ月～1 年間室温に静置してから濾過したものを、わが国では 3 週間以上静置し、同様に処理したものを使用する。

4 結 論

スカンデナヴィヤ3国に保存されている BCG 菌株とわが国保存の菌株とを、培養性状及び免疫生物学的性状について比較した。

- 1) 馬鈴薯培地上の発育はいずれも良好で、牛胆汁加培地にも移植初代からよく発育した。
- 2) Sauton 培地における発育も良好であつたが、3 菌株共菌膜は厚く、日本株の菲薄な菌膜とは外観を異にしていた。
- 3) Sauton 培地上の発育は、スエーデン株及びノールエー株は迅速で菌収量も多かつたが、各培養日数毎の単位重量中の生菌単位数は日本株が最も多かつた。
- 4) Sauton 馬鈴薯培養について菌体の大きさを比較するに、スエーデン株及びデンマーク株は日本株と同様に小形で、ノールエー株のみがフランス株同様の大きさ及び形態を呈した。
- 5) Jensen 法による Virulence Test では、接種菌量による局所変化の差異を認めえたが、菌株毎の差を認めえなかつた。又感染防禦力についても同様の成績を得た。
- 6) 以上の実験成績及び前報告に述べたアメリカ (T)

株及びフランス株との比較実験成績から、BCG 菌株は、その生物学的性状を維持せしめるために、牛胆汁加馬鈴薯培地に継代保存さるべきものとする。

拙筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長に深謝する。

本研究は文部省科学研究費の援助によつてなされ、総合研究結核研究班々会議で一部報告された。今村班長、熊谷科会長に謝意を表する。

文 献

- 1) 室橋豊穂・関又蔵・高野袈裟男・吉田幸之助：結核，27 (6)，300～305，1952.
- 2) 室橋豊穂・関又蔵・吉田幸之助：結核，27 (8)，429～431，1952.
- 3) 室橋豊穂・関又蔵・高野袈裟男：結核，27 (10)，647～650，1952.
- 4) F. van Deinse & Sénéchal, F.: Bull. W. H. Org. 2, 347～354, 1950.
- 5) F. van Deinse & Petrova, A.: Ann. dl'Inst. Past. 74, 171, 1948.
- 6) F. van Deinse: Am. Rev. TBC. 58, 571～575, 1948.