

Tween 80 を利用した超音波製乾燥 BCG ワクチンについて

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

関 根 修

(受付 昭和 29 年 11 月 1 日)

1 緒 言

濃厚な結核菌菌液を一時に大量に、しかも簡易な操作で製造できることは、超音波法のすぐれた点である。超音波を用いて作った菌液からの乾燥 BCG ワクチン(以下超乾ワクと略す)を用いた動物実験、人体接種成績は既に報告¹⁾したが、特に人体接種の場合には、通常最も広く用いられている回転振盪法によるワクチンに較べる²⁾と、ツベルクリン反応陽転率が低いことを免かれなかつた。超音波の細菌に対する作用中、最も大きな影響を与えるものは菌体破壊による殺菌作用であることを考えると、超音波照射によつて菌液の分散度をよくしようとする程、菌の死滅及び生活力の減退は著しくなる訳であり、その結果、ワクチンの力価は低下すると考えられる。これがワクチンの製造に超音波を利用する場合に從來遭遇した欠点であつた。超音波法によつて菌液をつくる場合には、脱水菌体の塊に媒液を加えたものが被照射体となるので、菌側の条件及び超音波発生装置側の条件が一定であれば、媒液を改良して照射時間を短縮するように工夫することが当然帰着すべき一つの解決法であろう。ところが Dubos 及び Fenner は Pierce³⁾⁴⁾⁵⁾と共に、Tween 80 を加えた液体培地に深部培養された BCG がよく分散して発育することから、これをそのままワクチンとして用いることを企図した。又、North および Newman⁶⁾ は機械的に BCG 菌塊を分散させる場合に、Tween 80 を加えて分散の促進をはかっている。

超音波照射の場合にも、媒液中に Tween 80 のような分散剤を含ませれば、照射による機械的分散力と相俟つて、短かい照射時間で分散度良好でしかも生菌量の多いワクチンが得られ、従つてワクチンの力価の上昇を期し得られるであろうと考えられる。かかる見透しの下に、Tween 80 を adjuvant として用いて数回の実験を行い予想通り生菌量の多いワクチンを作ることができたので、水晶球入りフラスコ回転振盪法によつてつくつた乾燥 BCG ワクチンとの比較実験成績を報告すると共にその製造条件の安定性を吟味したいと思う。

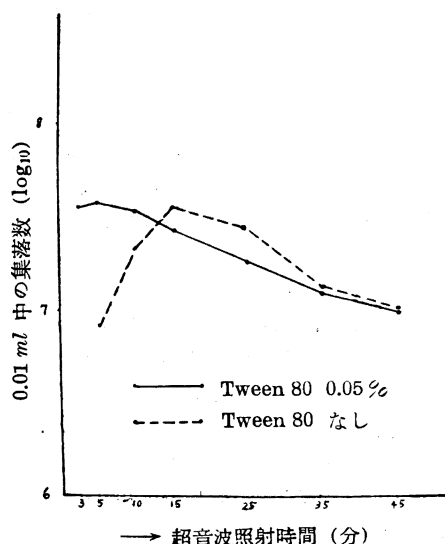
2 実験方法並びに実験成績

実験 1 Tween 80 の有無が菌液の集落数の消長に及ぼす影響

Sauton 培地二氏 7 日培養の BCG 菌膜を脱水、秤量

後 2 分し、それぞれ超音波照射用大試験管に入れた。1 本には脱水菌体をそのまま 3.14 g 入れ、これに 0.05 % Tween 80 溶液を加え、他の 1 本には脱水菌体 3.62 g に滅菌蒸溜水を加えて、共に 100 mg/ml 菌液となるようにした。超音波発生装置 (560 KC) に各試験管をとりつけて、陽極電流 260 mA、陽極電圧 3.0 kV、高周波電流 1800 mA、格子電流 40 mA の照射条件で 3 分乃至 45 分照射した。各照射時間毎に菌液をとり出し、1 mg/ml に希釈して Ziehl-Neelsen 法で染色鏡検すると共に、小川培地に定量培養して 0.01 ml 中の集落数を計算した。その成績は図 1 に示す如くである。すなわち Tween 80 を adjuvant として加えた方は、Tween 80 の添加による超音波の BCG 分散能促進のために、照射開始後 5 分ですでに肉眼的によく分散された状態となり、集落数も多い。従つてこの条件では、肉眼的な分散度がよく、集落数の多い点を目標にすれば、超音波照射時間は 5~10 分が適当である。之に対して Tween 80 を含まぬ場合には、同じ 5~10 分照射では大きな菌塊を多数含み、単孤菌は少なく、到底ワクチンとして使用できない分散状態であり、集落数が少ないのも分散度がわるいためと思われる。これを Tween 80 添加の場合に匹敵する均等な菌液にするには、15~25 分の照射時間が必要である¹⁾。

第 1 図 超音波を照射せる BCG 菌液における Tween 80 の有無が集落数の増減に及ぼす影響



既に報告したように⁷⁾, 照射開始後ある程度菌塊が分散するまでは, 菌液の定量培養による集落数は上昇を示すが, 大きな菌塊が殆んど分散してしまうと, その後は照射時間が長くなる程集落数は減少してゆく。図1の曲線はそれを示し, Tween 80 を含む方では照射開始5分後に, 含まぬ方では15分後に夫々集落数の最高点が現れていることは, Tween 80 の存在がいかに菌塊の分散を助けているかを明示していると思う。

実験 II Tween 80 を加えた場合における超音波照射時間と菌分散度の関係

実験 I から, 0.05% Tween 80 を加えた場合に, 5分乃至10分の照射時間が菌液中の集落数を最も多くすることを知ったが, さらに菌分散度と発生集落数との最大公約点を求めるために, 照射時間5分乃至11分の間の各時間毎に各菌液をとり出し, 1mg/ml に希釈して Ziehl-Neelsen 法で染色鏡検した。すなわち各照射時間毎に各菌液につき3白金耳滴の各々の任意の10視野すなわち総計30視野に就いて, 各視野中の菌塊数及び菌塊を構成する菌数を計測して, 分散度を調べた。その成績は第1表に示す如くで, 菌分散度から見ると, 9分前後が照射時間としては適当であると考えられる。

第1表 0.05% Tween 80 加 5% Lactose-100mg/ml BCG 菌液の超音波各照射時間における30視野中の菌分散度

各菌塊を構成する菌数	各照射時間における単弧菌又は各菌塊の百分率			
	5分後	7分後	9分後	11分後
1	85.6	91.0	92.5	86.1
2 ~ 5	9.2	6.5	6.2	11.5
6 ~ 10	4.2	2.0	1.0	2.0
11 ~ 20	1.0	0.5	0.3	0.4
21 ~ 30	0.04	0.04	0.02	0
31 ~ 50	0.04	0	0.07	0
50 ~	0.08	0.02	0	0
30視野中の単弧菌又は各菌塊の総数	2256	3418	4118	2344

実験 III 同一 BCG 培養より超音波法および回転振盪法で作った乾燥ワクチンの比較

a) ワクチンの生菌単位数及び凍結乾燥後の生残率について

実験 II から Tween 80 を 0.05% に加えた 100mg/ml 超音波照射菌液では, 照射時間9分程度が最適であると思われたので, この条件の下に, Sauton 8日培養の BCG 菌膜を用いて菌液を作り, 水晶球入りフラスコ回転振盪法によって同一菌膜から作った菌液と同時に凍結乾燥して比較した。回転振盪法による製造条件は次の如くである。すなわち 1l コルベンに脱水菌体 1.11g を入れ, 回転振盪機により 200 r.p.m. で 5分回転, 次に媒液 1ml

を加えて2分回転, さらに 1ml 加えて1分回転し, 最後に残りの媒液全部を加えて 5% Lactose-80 mg/ml 菌浮游液とする。

凍結乾燥には多岐管式乾燥機を用い, 両菌液の乾燥条件が同じになるようにアンプルをとりつけた。成績は第2表の如くで, 生菌数及び生残率共に大差がない。又これを前報告の成績, すなわち Tween 80 を含まない超乾ワクの乾燥前後の生菌数及び生残率が夫々 9.7×10^6 mg, 36.3×10^5 mg 及び 33.4% であったことに比較すれば, 遙かに生菌数が高い。数回この実験を行つたが, 略々恒常的に同じような成績をうることができた。

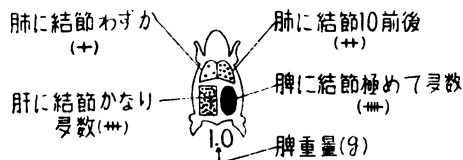
b) Tween 80 添加超音波乾燥ワクチンを用いた動物実験

Tween 80 を加えることにより, BCG が virulence の上昇, 抗元性の変化を来す懸念はないと思われるが, Tween 80 による局所障碍の増大, それに伴う力価の増減をしらべるためにてんじくねずみを用いて実験を行つた。virulence test としては, 任意の 4 Lot を選び, 1 Lot 10 疋宛のてんじくねずみの皮下及び筋肉内に1疋宛 30 mg を接種して 8 カ月間観察した後屠殺剖検した。何れの群に於ても, リンパ腺及び内臓に肉眼的には結核性病変を認めることができなかった。

第2表 同一 BCG 培養より超音波法および回転振盪法で作ったワクチンの比較































ワクチン製法	1 mg 中の BCG 生菌単位数		生残率(%)
	凍結乾燥前	凍結乾燥後	
超 音 波 法 (0.05% Tween 80)	($\times 10^6$) 33.2	($\times 10^6$) 21.6	65.0
回 転 振 盪 法	24.2	17.2	71.1

次にワクチンの感染防禦力試験を行つた。上記 (a) において作った Tween 80 加超乾ワクと回転振盪法による菌液からの乾ワクを用いて乱刺法及び皮下法によつてワクチンの効果を比較した。乱刺法には, Tween 80 加超乾ワクは 100mg/ml, 回転振盪法による乾ワクは 80mg/ml の菌液を 予め脱毛した左下腹部に一滴宛落し, 径 8 ~ 9mm に拡げて, 種痘用乱刺針で 30 回乱刺した。皮下法には, いずれのワクチンも 10^{-2} mg/ml に希釈し, 1.0 ml 宛を左下腹部皮下に注射した。BCG 接種後6週目に, 乾燥人型結核菌 H 37 Rv 株再浮游液 0.01mg 宛を BCG 非接種対照と共に全群の右下腹部皮下に注射感染し, さらに6週間観察後, 屠殺剖検して, 肉眼的に感染防禦効果をしらべた。剖検所見は次の如くに記録した。



成績は第3表に示す如くである。Tween 80 加超乾ワクチンは、乱刺法、皮下法のいずれの接種法によつても、回転振盪法による乾ワクチンと同様の顕著な感染防禦力を示している。さらに乱刺法、皮下法、いずれの接種方法においても Tween 80 加超乾ワクチンによる局所障害の増大はみられず、Tween 80 の有無は局所変化に殆んど無関係である。

第3表 同一 BCG 培養からつくつた2種のワクチンを接種したてんじくねずみにおける結核症防禦効果

対 照							
		1.2	1.5	1.6	1.1	1.0	0.9
超音波ワクチン	10 ⁻² mg 皮下注射						
		0.7	1.2	0.8	0.9	0.9	0.8
超音波ワクチン	100mg/ml 乱刺接種						
		1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	0.9
機械振盪ワクチン	10 ⁻² mg 皮下注射						
		1.0	0.8	0.8	1.0	0.8	0.8
機械振盪ワクチン	80mg/ml 乱刺接種						
		0.8	1.0	0.8	1.3	0.7	0.8

* 事故死

c) Tween 80 加超音波乾燥ワクチンの人体接種成績
実験 IV により、Tween 80 加超乾ワクチンは動物に充分強いツベルクリンアレルギーを惹起せしめ、顕著な感染防禦効果を与える上に、Tween 80 添加による何等の障害作用をも及ぼさないことを認めたので、このワクチンの人体における接種効果をみた。

この実験には、凍結乾燥後 5 カ月間 5°C 以下に保存した Tween 80 加超乾ワクチンと、対照としての回転振盪法乾ワクチンの2種を用いたが、接種時の生菌数は10⁻⁶mgにつき夫々 20.5, 26.4 でほぼ等しかつた。この培養成績は一面 Tween 80, 0.05% の存在が乾燥状態に在る BCG の生存に対して何等の障害作用をも与えぬことを示すと考えられる。接種対象には、静岡県御殿場小学校の児童で既往に BCG を接種したことのないものをえらび、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つた。接種方法はすべて乱刺法により、第1群には Tween 80 加超乾ワクチンを、第2群には回転振盪法乾ワクチンを用い、夫々 80 mg/ml に稀釈したワクチン1滴ずつを皮膚上におとし、径 8~9 mm の円形に拡げて、種痘用乱刺針を用いて 30 回乱刺した。ツ反応の検査は、BCG

接種後 1, 3, 6 及び 12 カ月目に行い、2000 倍ツベルクリン 0.1 ml 皮内注射 48 時間後の発赤径 10 mm 以上を陽性とした。一年目のツ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つて再び著しく強度を増したものの、及び最強反応を一年後も示すものは、自然感染例を疑わしめるものとして集計から除外した。又 BCG 接種局所変化は、発赤を伴つた硬結、痂皮、潰瘍、癰疽、無変化等と見たままの性状を記載した。

陽性率は第4表に示す如くで、いずれのワクチンも1年間を通じて 80% 以上の陽性率を維持しており、両種のワクチン間に顕著な差異を認めることはできない。しかし硬結触知率や2重発赤形成率の面から質的にツ反応の強さを観察すると、超乾ワクチンによつて惹起されたツ反応は、回転振盪法乾ワクチンによるものより明らかに弱く、同様のことが接種局所変化の消長にも認められる。しかし前報告の Tween 80 を加えない超乾ワクチンと比較すると、ツベルクリン反応を惹起する力において著明な向上を認めることができる。

第4表 同一 BCG 培養からつくつた二種のワクチンの人体接種後1年間におけるツベルクリン反応及び接種局所変化の経過

ワクチンの種類		超音波ワクチン				機械振盪ワクチン			
接種後経過月数		1	3	6	12	1	3	6	12
被 検 人 数		76	76	78	73	58	72	74	71
発赤平均値 mm	0 ~ 4	3	8	5	3	0	5	2	2
	5 ~ 9	0	2	7	6	1	4	3	6
	10 ~ 14	6	10	16	13	1	4	17	16
	15 ~ 19	27	29	35	23	11	21	36	25
	20 ~	40	27	15	28	45	38	16	22
陽 性 率 (%)		96.1	86.8	84.6	87.1	98.3	87.5	93.2	88.7
硬 結 触 知 率		82.9	55.2	5.1	9.9	94.8	72.2	6.7	15.5
二重発赤形成率		35.5	3.9	5.1	0	62.1	11.1	6.7	0
接種局所変化 %	硬結+発赤	31.6	0	0	0	6.9	0	0	0
	痂 皮	67.1	32.8	0	0	79.3	30.5	0	0
	潰 瘍	1.3	0	0	0	13.8	1.3	0	0
	癰 瘍	0	67.2	100	98.6	0	68.1	100.0	100.0
	無 変 化	0	0	0	1.4	0	0	0	0

実験 IV Tween 80 加超音波乾燥 BCG ワクチンの試験製造

超音波を用いる BCG 乾燥ワクチンの製造に関するこれまでの条件の中で、最も高い力価を与える条件をえらび、3 Lot のワクチンを試験製造して、製造条件と製造の安定性を見た。製造条件は BCG 培養、超音波照射条件乾燥条件を通じてできるだけ一定にするようにした。BCG 培養は Sauton 培地継代第2代の7日培養菌膜を用いた。照射用大試験管に約 3g の脱水菌塊を入れ、

そのままで菌濃度が 100 mg/ml になるように 0.05 % Tween 80 加 5 % Lactose 溶液を加え、次の条件で照射した。陽極電流 240 mA, 陽極電圧 3.0 kv, 格子電流 40 mA, 高周波電流 1500 mA, 照射時間は 9 分、但しこの条件に達するまでに 2 分を要する。100 mg/ml の菌液は照射後直ちに 1 ml ずつアンプルに分注し、次の条件で凍結乾燥した。すなわち予備凍結 -30°C, 10 分、室温平均約 20°C で 7 時間乾燥した。密封時の真空度は Philipps gauge で 50 μ A (total pressure を表現) で、殆んど一定していた。乾燥後直ちに蒸留水で再浮遊し、乾燥前の菌液と同じく Coleman の spectrophotometer で 1 mg/ml 稀釈液について濁度測定及び小川培地による定量培養を行った。人体接種には、乾燥後 6 月間 5°C 以下に保存したものの中から at random に 1 アンプルをとり出し (Lot 1) 乱刺法 (30 刺法) を以つて BCG 初接種の保育園児に接種し、約 1 カ月後 2000 倍ツベルクリン注射 48 時間後判定法でツ・アレルギーをしらべると共に局所反応をみた。成績は第 5 表及び第 6 表に示す如くである。spectrophotometer による濁度から見て菌分散度は安定しており、乾燥前後の生菌単位数及び生残率もほぼ一定している。乾燥後の生菌単位数は回転振盪法乾ワクに劣らず、1 カ月目の人体接種成績がこれをうらぎっている。

第 5 表 試験製造超音波ワクチンの BCG 培養条件及び乾燥前後の菌液

Lot	BCG 培養			1 mg/ml の濃度 Coleman spectrophotometer 波長 420 m μ		10 ⁻⁶ mg 中の生菌単位数			含水量 (Abderhalden 法) (%)
	S _a ^a	培養 日数	Sauton 培地 pH	乾燥前	乾燥後	乾燥前	乾燥後 (2本の各 アンプル の値)	各アンプル 別の生 残率 (%)	
1	S ₂ ^a	7	7.8	0.055	0.052	64.0	16.8 16.8	26.8 26.3	0.7
2	S ₂ ^a	7	8.0	0.055	0.055	70.0	18.2 14.6	26.0 20.9	0.7
3	S ₂ ^a	7	8.0	0.050	0.049	66.0	14.0 16.6	21.2 25.2	0.9

S_a^a a は Sauton potato 継代代数
b は Sauton 継代代数

3 総括考案

超音波法で菌液を製造する場合に、脱水菌体の塊に媒液を加えたものが被照射体なので、媒液中に Tween 80 の如き分散剤を含ませれば、その効果を充分に發揮させることができるであろうことは容易に考えつくことである。上記の実験成績によれば、この添加は超音波の物理的分散力を一層促進する為に、照射時間を短縮せしめることができ、従つて菌に及ぼす殺菌作用の時間をできるだけ短縮して、よく分散された状態で生菌数の多い菌液をつくるのであつて、ワクチンとしての力価を上げることが可能となつたのである。

Tween 80 を人体接種用ワクチンに加える場合、考慮しなくてはならぬことは菌そのもの及び人体に対するその毒性である。しかし 0.05 % の濃度では、乾燥された BCG に対しても、経皮接種をうけた人体に対しても何等認むべき障害がない。

人体接種成績においては、回転振盪法による乾ワクに比較して、ツベルクリン反応陽性率では殆んど差がないが、二重発赤形成率、硬結触知率等のツ反応の強さ、並びに接種局所変化程度からみて、明らかに超乾ワクの力価がやや低いように思われる。BCG 接種後のツ反応の強さは、同一条件で接種された場合、接種時生菌数の多少に左右されることは多くの研究者⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾が認めているが、なお質的に BCG の生理的状態にも大きな関連をもつことは否めないと思う。両ワクチン間に菌の分散状態及び生菌単位数において殆んど差異を認めないのに、ツ反応に質的な差を生じた理由は、接種された BCG の生活力 (vitality) が異なるためではないかと思われる。すなわち Tween 80 下に超音波を作用させて分散させる場合には、回転振盪法によるよりも菌体が広範囲の傷害作用を受け、従つて菌の vitality が低下するのではなからうか。その結果として、通常の乾燥ワクチンと等量の生菌単位数を接種したにかかわらず、ツ反応の質的な面における弱さを示すこととなつたと思われる。一方形態学的所見

によれば、超音波照射をうけた菌の抗酸性染色において、照射時間の延長による菌分散と同時に菌体の変形、菌体顆粒の増加、さらに進んで菌体の破壊による抗酸性の喪失に伴う青染物質の増加等の形態学的変遷を認める。しかもこれらの変化に伴う集落数の

激減がみられない。しかも殆ど大多数が単孤菌であることから考えて、小川培地上の培養条件では恐らく種々の vitality を持つた菌が、夫々一個の集落として發育しているのではないかと思われる。従つて生菌単位数を一定にしても、接種対象の示す反応によつて評価されるワクチンの力価が必ずしも同一にはならぬ理由を、個々の菌の vitality の相違を以つて説明しうるのはあるまいか。なお試験製造された 3 Lot のワクチンは、BCG 菌体側の条件、超音波照射条件、媒液の条件、凍結乾燥条件等について力価の上昇に最良の影響を与える条件をえらんで作られたが、乾燥前後の生菌数及び分散度は、各 Lot の製造時期が異なるにも拘らず殆んど一定していた。

第 6 表 試験製造ワクチン (Lot 1) の人体乱刺接種後 5 週目の成績

被 検 人 数		57
発赤平均値 (mm)	0 ~ 4	0
	5 ~ 9	2
	10 ~ 14	16
	15 ~ 19	22
	20 ~	17
陽 性 率 (%)		96.5
硬 結 触 知 率		68.4
二重発赤形成率		7.0
接硬局所変化 (%)	硬結 + 発赤	5.8
	痂 痂	94.7
	潰 瘍	0
	皰 瘡	0
	無 変 化	0

BCG 接種法の改善につれて、接種局所変化の少ない経皮接種法が採用されるようになると、濃厚な菌液を必然的に必要とするために、先ず濃厚菌液を大量に製造する方法が要求される訳であるが¹²⁾、この場合超音波法の長所はこの要求に最も適していると思われる。従つて上記の如く、一定した条件で、力価の高いワクチンを恒常的に製造することができたことは、超音波法を濃厚乾燥 BCG ワクチン製造の実際面に応用する上に或程度の見通しをつけえたものと云いうると思うのである。

結 論

濃厚な BCG 菌液を作る場合に、Tween 80 を adjuvant として添加すると、超音波の照射時間を明らかに短縮しうることを知つた。照射条件を適当にえらべば、菌の分散度の良好な且つ生菌数の高い菌液を作ることができる。

この菌液から作った乾燥ワクチンは、同一 BCG 菌膜から作った回転振盪法菌液からのワクチンと同様に、動物に対し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し得た。また人体接種では、乱刺法によつて、80% 以上の高い陽性率を 1 年間持続せしめる事ができ、回転振盪法ワクチンに劣らぬことを示した。

さらに、これまでの実験成績を総合して定めた最良の条件下における試験製造の記録は、力価の高い濃厚乾燥 BCG ワクチンの製造が常に大きな安定性をもつて行いうることを示した。

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、BCG 接種研究協議会研究費の補助によるものであり、ここに

謝意を表する。

文 献

- 1) 関根 修：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、結核，29 (6)：216~220, 1954.
- 2) 橋本達一郎・高野袈裟男：経皮接種用 BCG 乾燥ワクチンの試験製造，医学と生物学，27 (1)：12~16, 1950.
- 3) Dubos, R. J. & Fenner, F.: Production of BCG vaccine in a liquid medium containing Tween 80 and a soluble fraction of heated human serum. I Production and viability of the culture., J. Exp. Med. 91: 261~268, 1950.
- 4) Fenner, F. and Dubos, R. J.: Production of BCG vaccine in a liquid medium containing Tween 80 and a soluble fraction of heated human serum. II Antigenicity of the culture after various periods of storage., J. Exp. Med. 91: 269~284, 1950.
- 5) Dubos, R. J., Fenner, F. & Pierce, C.: Properties of a culture of BCG grown in liquid media containing Tween 80 the filtrate of heated serum., Am. Rev. Tuberc. 61 (I): 66~76, 1950.
- 6) North, E. A. & Newman, W. C.: The use of a synthetic ester of oleic acid ('Tween 80') in the preparation of freeze-dried BCG vaccines—a preliminary report., Tubercle. 32 (11): 251~253, 1951.
- 7) 関根 修：超音波の BCG に及ぼす影響，医学と生物学，26 (4)：145~148, 1953.
- 8) 張 仲 鑾：BCG ワクチン接種方法，とくに接種菌量および生菌量について，結核予防会研究業績 1 (1)：89~95, 1951.
- 9) 染谷四郎：BCG 接種方法に関する研究（接種量の問題）第 1 報，公衆衛生学雑誌，1 (6)：427~432, 1947.
- 10) 染谷四郎外：BCG 接種方法に関する研究（接種量の問題）第 2 報，公衆衛生学雑誌，2 (1)：8~18, 1947.
- 11) 橋本達一郎：皮内に接種された乾燥 BCG の生菌単位と接種後 ツベルクリン反応陽性率の推移との関係について，医学と生物学，25 (5)：232~235, 1952.
- 12) BCG 接種研究協議会：BCG 経皮接種に関する研究，日本医事新報，No. 1572: 2423~2428, 1954.