

BCGワクチン中の微量強毒結核菌の検出に関する研究

第1報 動物通過における微量強毒菌の運命

山口 登・関 根 修・立 花 暉 夫

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳 沢 謙)

受 付 昭 和 31 年 8 月 18 日

I 緒 言

強毒牛型結核菌を牛胆汁加培地に長年月継代して弱毒化されたBCGは、1930年以來安定した弱毒性のまま、普通の継代培養や動物通過による毒力の復帰はないといわれる¹⁾。

著者はさきに、BCGをストレプトマイシン(以下SM)耐性培地上で菌力と無関係に解離しえた変異菌も、親株と同じ菌力にあることを述べた²⁾。もちろん、変異菌の出現率から考えて、強毒変異菌が出現しようとしても、SM耐性菌として取り出すことはほとんど不可能である。しかし、橋本³⁾や金井⁴⁾が、強毒菌群を同様薬剤耐性菌として解離した場合、意外の高比率に弱毒性菌をえていることから、BCGが主として、安定した弱毒菌のみから構成されていると思われた。

ところが、SM依存性菌から、SM非添加の培地上で、 10^{-7} 位の率で分離できる逆変異菌は、依存菌の親株と同じ強毒性であるのに⁵⁾、依存菌全体としては極めて弱毒性で、SM非投与の動物体内では積極的な菌増殖がみられない^{6,7)}。故に、Yegian がてんじくねずみにおいて実験的に検討した通り、BCGでも強毒性の逆変異菌が出現しえても、極めて低率と考えられるから、大量のBCGに影響されて、動物通過によつても検出しえないのであるまいか。一方、Miller⁹⁾は最少270コの強毒菌を10,700倍のBCGと共にマウスに接種した場合、大量のBCGに覆われることなく、病理組織学的に混在を識別しうるので、もし変異率をこの程度にまで高めうれば、BCGからの強毒変異菌出現の可否を確かめうらうという。

現在のところ、強弱混合菌中から強毒菌のみを選択的に分離するためには、動物通過による以外に方法がない。それも、依存菌の成績から考えられるごとく、一定限界があるに違いない。著者は、ワクチンの安全試験に関連して、この限界を探る目的で、耐性強毒菌を大量BCG中に混合しててんじくねずみに接種した場合の、微量強毒菌の分離培養における運命を追求した。

II 実験方法および成績

A. 第1実験

菌株: BCG-Sauton 8日培養菌から、超音波装置を使って、90mg/mlの0.05%Tween 80浮游液を作つた。強毒人型菌—100 γ /ml SM加固形培地上で、one stepに分離されたH₂RのSMの完全耐性菌。(凍結乾燥保存)

実験動物: Römer 反応陰性、健康雄性てんじくねずみ、体重 300~400g。

実験群: I. BCG単独, II. H₂R-SM, 10⁻⁵mg, III. BCG+H₂R-SM 10⁻⁵mg, IV. H₂R-SM 10⁻³mg, V. BCG+H₂R-SM 10⁻³mg,

以上、0.5ml中に所要菌株、菌量が含まれる菌液を接種。

(接種方法)(BCG量)(屠殺の時期)(屠殺匹数)

| | | | |
|-------|------|---------------------|-----|
| 大腿筋肉内 | 30mg | 6週, 12週 | 3~4 |
| 足背静脈内 | 3mg | 1日, 1, 2, 4, 7, 11週 | 2~3 |

培養: 臓器 500mg前後を乳鉢で細砕、1%のNaOHで100mg/ml乳剤とし、以後は蒸留水で10倍稀釈をくりかえし、各段階の稀釈液を普通の小川培地か、SM 100 γ /ml加小川培地に接種し、4週間以上培養した。培地4本以上の集落数の平均をもつて、臓器10mg中の生菌数を算定した。

成績:

a) 筋肉内接種

ツベルクリン反応および体重—2週以後、全群に強いツベルクリン(以下「ツ」)アレルギーの発現あり、体重も順調に増加し、群間の差は認められなかつた。

肉眼的剖検所見—(表1) BCG単独接種群は、6週後、接種局所には小膿瘍あり、所属リンパ腺の軽度の腫脹がみられたが、乾酪化はなかつた。肺に肉眼的に結節と思われる病変を認めたものもあるが、その他の臓器には変化を認めなかつた。12週後の病変は、6週よりも少ない感じであつた。

強毒菌単独接種群では、10⁻⁵mg群でも局所の膿瘍、所属リンパ腺の乾酪化を伴つた腫脹がみられたが、内臓には肉眼的に病変をほとんど認めなかつた。10⁻³mg群では、かなりの内臓病変があり、一般に、12週後の病変は6週よりも増強的であつた。

混合群では、強毒菌単独の場合よりも病変は少なく、ことに、BCG30mg+H₂R-SM10⁻⁵mg群では、BC

表1 微量強毒人型菌混入BCGワクチン筋肉内接種における肉眼的剖検所見

| 期間 | 実験群 | 局所 | しつぱき 左右 | そけい 左右 | えき 左右 | 後腹膜 左右 | 門脈 | 気管 | 肺 | 肝 | 脾 | 脾重 | 体重 | 体重増加 | 「ツ」反応 | |
|-----|---|----|------------|-----------|----------|-----------|----|----|---|---|---|-----|-----|------|-------|----|
| 6週 | I BCG30mg | a | -- | -- | ++ | +- | - | - | + | - | - | 0.6 | 480 | 100 | 24 | |
| | | a | ++ | ++ | ++ | ++ | - | + | - | - | - | 0.7 | 460 | 60 | 20 | |
| | | a | -- | ++ | -- | -- | - | + | - | - | - | 0.6 | 420 | 70 | 15 | |
| | II H ₂ R10 ⁻⁵ mg | a | ++ | ⊕- | -- | ⊕- | - | + | + | - | - | 0.6 | 510 | 70 | 17 | |
| | | a | ++ | ⊕- | -- | ⊕- | + | + | - | - | - | 0.7 | 440 | 50 | 24 | |
| | III BCG30mg + H ₂ R10 ⁻⁵ mg | a | ++ | +- | -- | +- | + | - | - | - | - | 0.5 | 500 | 100 | 26 | |
| | | a | ++ | -- | -- | +- | + | + | + | - | - | 0.5 | 550 | 100 | 24 | |
| | IV H ₂ R10 ⁻³ mg | A | ++ | ⊕- | -- | ⊕- | + | + | + | - | + | 1.1 | 530 | 70 | 25 | |
| | | G | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | + | + | + | - | + | 0.6 | 600 | 150 | 25 | |
| | | A | +- | ⊕- | -- | ⊕- | + | + | + | - | + | 0.6 | 480 | 110 | 18 | |
| | V BCG30mg + H ₂ R10 ⁻³ mg | - | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | + | - | + | + | - | 0.7 | 470 | 60 | 24 | |
| | | a | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | + | + | + | - | + | 0.6 | 510 | 90 | 21 | |
| | | | a | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | - | + | - | - | 0.8 | 460 | 90 | 25 | |
| | 12週 | I | - | +- | -- | -- | +- | - | - | + | - | - | 0.7 | 710 | 230 | 16 |
| | | | A | -- | -- | -- | ++ | - | - | - | - | - | 0.7 | 590 | 220 | 17 |
| - | | | -- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 0.8 | 650 | 110 | 16 | |
| II | | a | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | + | - | - | - | - | 0.9 | 610 | 210 | 19 | |
| | | a | ⊕- | ⊕- | ++ | ⊕- | ⊕ | - | - | - | - | 0.9 | 570 | 120 | 19 | |
| | | a | ⊕- | ⊕- | +- | ⊕- | ⊕ | ⊕ | ⊕ | - | - | 1.0 | 650 | 110 | 19 | |
| III | | - | +- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 0.7 | 510 | 160 | 17 | |
| | | - | -- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 0.9 | 640 | 240 | 18 | |
| | | - | ⊕- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 0.8 | 670 | 270 | 17 | |
| IV | | a | +- | ⊕- | -- | ⊕- | ⊕ | ⊕ | ⊕ | + | + | 1.2 | 640 | 220 | 19 | |
| | | - | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | ⊕ | + | - | + | + | 1.4 | 650 | 270 | 17 | |
| V | | a | ⊕- | ⊕- | -- | ⊕- | + | - | - | + | + | 1.1 | 590 | 230 | 17 | |
| | | - | ⊕- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 1.6 | 750 | 310 | 21 | |
| | | - | +- | -- | -- | +- | - | - | - | - | - | 0.9 | 660 | 310 | 20 | |
| | | | - | +- | +- | -- | - | + | - | - | - | 0.8 | 650 | 270 | 19 | |

注：生菌単位数；BCG 25×10⁶/mg
 H₂RSM 17×10⁶/mg
 混合比；1/4.1×10⁶~1/4.1×10⁴
 a~A；小~大膿瘍 ++⊕：凝縮の程度
 G：潰瘍 ○：乾酪変性

G単独群に比して大差ない位であった。

臓器培養成績—(表2) BCG単独接種群では、6週後、脾および接種側の後腹膜リンパ腺から生菌を証明しことに、リンパ腺中の密度は高かつたが、肺からはほとんど検出しなかつた。12週目では、後腹膜リンパ腺や内臓からBCGを検出しえなかつた。

強毒菌単独接種群からは、後腹膜リンパ腺には多数の菌を証明し、脾からも、10⁻⁵mg接種群で一部陰性例もあつたが、10⁻³mg群からは、すべてに若干の菌を、6週後はもちろん、12週後にも証明した。

これに対し、混合群では、リンパ腺からは、12週後も相当数の耐性菌を検出したが、肺、脾からは、10⁻³mg混入群の一部に、6週後のみ、少数の強毒菌を分離したのみで、混合群は強毒菌単独群よりも、発見強毒菌数においても減少していた。

b) 静脈内接種

「ツ」反応および体重—100倍稀釈旧「ツ」液による「ツ」反応では、2週目頃から10mm以上の反応を示すものが現われ、3週以後は全群が強い反応を示し、ほぼ同様の推移傾向を辿り、群間の差は顕著でなかつた。体

表2 微量強毒人型菌混入BCGワクチン筋肉内接種における臓器内生菌数

| 実験群 | 6週 | | | 12週 | | |
|--|------|---|----|------|---|-----|
| | 後腹膜 | 肺 | 脾 | 後腹膜 | 肺 | 脾 |
| I BCG 30mg | 65 | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| II H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 1400 | 0 | 2 | 1400 | 0 | 620 |
| | 800 | 0 | 0 | 600 | 0 | 0 |
| | 660 | 0 | 0 | 590 | 0 | 1 |
| III BCG 30mg + H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 40 | 0 | 3 | 280 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| IV H ₂ R10 ⁻³ mg | 880 | 0 | 0 | 210 | 0 | 0 |
| | 560 | 0 | 0 | 160 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 55 | 0 | 0 |
| V BCG 30mg + N ₂ R10 ⁻³ mg | 210 | 0 | 57 | 600 | 3 | 30 |
| | 1800 | 0 | 12 | 400 | 0 | 9 |
| | 1500 | 0 | 8 | 500 | 0 | 20 |
| V BCG 30mg + N ₂ R10 ⁻³ mg | 90 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V BCG 30mg + N ₂ R10 ⁻³ mg | 1200 | 0 | 2 | 440 | 0 | 0 |
| | 450 | 0 | 0 | 210 | 0 | 0 |
| | 85 | 0 | 0 | 140 | 0 | 0 |

重の著差も、7週以後の各群間でみられなかつた。

肉眼的剖検所見—BCGを単独ないし混合的に接種した群に、2週以後、相当の脾腫があり、菌塊によると考えられる治癒傾向の強い肉眼的肺結節が1週以後にみられた他は、筋肉内接種の場合と同様の関係にあり、強毒

菌単独群に比して混合群の病変は軽度で、 $10^{-5}mg$ 混合群の病変は、BCG単独群と大差がないほどであつた。

臓器培養成績—(表3) BCG単独群では、初期には、肺、脾から多数の生菌を証明したが、4週以後は漸減し、11週後ではほとんど証明しなくなつた。強毒菌単

表3 微量強毒菌混入BCGワクチン静脈内接種における臓器内生菌数 (その1)

| 実験群 | 肺 | | | | | | 脾 | | | | | |
|---|------|----------------|--------------|-----------|--------------|-------------|-------|---------------|--------------|--------------|------------------|------------------|
| | 1日 | 1週 | 2週 | 4週 | 7週 | 11週 | 1日 | 1週 | 2週 | 4週 | 7週 | 11週 |
| I BCG 3mg | 5000 | 6600 6100 | 3000 420 | 300 77 | 12 3 | 2 1 6 | 8300 | 20000 8400 | 650 400 | 82 12 | 1 0 | 0 0 |
| II H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 2 | 63 16 | 100 0 | 0 0 | 2 0 | 1 0 0 | 0 | 4 1 | 450 87 | 950 530 | 370 1 | 1600 120 3 |
| III BCG 3mg + | 6000 | 32000 31000 | 6500 2500 | 65 8 | 50 32 | 1 1 0 | 13000 | 14000 3800 | 2400 2000 | 500 24 | 1 1 | 0 0 0 |
| III H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 0 | 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 0 |
| IV H ₂ R10 ⁻³ mg | 2 | 1 1 | 49 2 | 41 0 | 45 1 | 7 0 | 5 | 26 24 | 3100 560 | 2000 1400 | 1600 1400 | 910 210 |
| V BCG 3mg + | 4500 | 31000 29000 | 1600 1400 | 600 78 | 15 8 3 | 2 1 | 5500 | 11000 6400 | 1000 800 | 370 47 | 30 30 2 | 0 0 0 |
| V H ₂ R10 ⁻³ mg | 0 | 2 0 | 1 0 | 3 0 | 0 0 | 0 0 | 1 | 1 1 | 0 0 | 8 1 | 230 240 11 | 710 240 |

注：生菌単位数 表1注に同じ

独接種群では、1週後までの検出菌数は少ないが、2週後では急増し、特に脾では、11週後まで相当数の感染菌が検出された。しかし、混合群においては、 $10^{-5}mg$ では終始耐性菌を分離できず、 $10^{-3}mg$ 混入の場合も、肺からの分離耐性菌は単独群に比して少なく、脾でも4週後までの分離耐性菌数は著しく少なかつた。

B. 第II実験 (表4)

Sauton 8日培養のBCGから水晶球入り丸コルペンで作つた菌液を用いて、第1実験と同一条件で静脈内接種し、4週および6週後に剖検培養した。

BCG単独接種群では、リンパ腺、脾臓の軽度の腫脹を認めた以外には、内臓に肉眼的結節は全くみられなかつた。肺、脾からはかなり多数の生菌を証明したが、4週よりも6週目では検出菌数は少なかつた。

強毒菌単独群では、 $10^{-5}mg$ 接種群では、4週後内臓の肉眼的病変なく、1例に少数菌を脾から分離し、6週後では、1例に脾結節を認め、同時に感染菌を証明した。肺からは生菌を証明しなかつた。 $10^{-3}mg$ では、リンパ腺、内臓の病変は著明で、脾からは、4、6週とも同様に多数の菌を証明し、肺からも、6週後生菌を証明した。

混合群のうち、強毒菌 $10^{-5}mg$ をBCGに混合した場合には、病変はBCG単独と変わらず、内臓からも全く強毒菌を分離しなかつた。 $10^{-3}mg$ 混入群では、病変は単

表4 微量強毒菌混入BCG静脈接種における臓器内生菌数 (その2)

| 実験群 | 4週 | | 6週 | |
|---|-------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| | 肺 | 脾 | 肺 | 脾 |
| I BCG 3mg | 200 180 150 | 1700 1500 820 | 95 45 23 | 140 29 24 |
| II H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 0 0 0 | 8 0 0 | 0 0 0 | 150 0 0 |
| III BCG 3mg + | 800 300 100 | 800 480 180 | 90 70 | 160 100 |
| III H ₂ R10 ⁻⁵ mg | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| IV H ₂ R10 ⁻³ mg | 0 0 0 | 3400 340 300 | 12 1 0 | 2200 370 200 |
| V BCG 30mg + | 870 240 150 | 1500 1400 600 | 83 80 | 150 90 |
| V H ₂ R10 ⁻³ mg | 0 0 0 | 75 15 6 | 5 5 | 110 31 |

注：生菌単位数 BCG 33×10^6
H₂RSM 14×10^6
強毒菌/BCG $1/7.1 \times 10^5 \sim 1/7.1 \times 10^3$

独群よりも軽度であり、脾からは単独群に比してかなり少ないけれども、強毒菌を分離し、肺からも6週後に少数菌を証明した。

この成績は、BCG接種群に肺結節がみられなかつた以外は、第1実験と全く同様であつた。

III 考 察

混合菌接種後の各菌株の生体内消長は、耐性菌と分離耐性培地との組合せにより、容易に追求できるようになり、金井¹⁰⁾は強、弱毒菌の混合菌液をてんじくねずみに接種した場合、強毒菌の発現する強い免疫力により、弱毒菌が選択的に抹殺されるが、強毒菌そのものの消長には影響がないことから、動物通過によつて菌力が回復することを説明した。加藤¹²⁾らは、マウスの全身ホモナイズ法により、SM依存性菌と強毒菌を混合した場合、両菌の消長は単独接種の場合と同一であり、総生菌数の消長は強毒菌のそれと一致することから、結核菌の菌力はその菌群を構成する強毒菌と弱毒菌の比率によつてきまるとする Steenken の考えを疑問視している。また、Miller⁹⁾は、微量強毒菌の混入は大量BCGに覆われることなく、マウスにおいて、病理組織学的に識別できるといふ。

以上の報告はいずれも、混合菌群中の強毒菌は、動物接種において弱毒菌の影響をうけないとしているが、岩崎¹⁴⁾は、強毒人型菌がBCGに比して少ないときには、同量の強毒菌のみを注射して起る結核病変より弱く、BCGと強毒人型菌の混合比率の差が大きいほど、結核変化の差も著しいことから、BCGによつて発現した免疫のために有毒菌の毒性発揮が抑制されるとした。有馬¹⁵⁾も同様所見を観察して、大量BCGの局所免疫力によると考察した。Yegian⁸⁾も、3年半の観察の結果、BCG中の極く少数の有毒菌は、てんじくねずみの生体通過で検出しないことを示し、依存菌の場合に、強毒性の逆変異菌が微量に混在していても、動物通過により検出しないことを証した。

今回の実験では、 $10^{-3}mg$ の強毒菌を混入したBCGは、BCG単独の場合に比して肉眼的病変強く、強毒菌のみを純培養的に臓器からうる可能性があるが、 $10^{-5}mg$ 混合の場合には、「ツ」反応、体重はもちろん、肉眼的所見においても、BCG単独接種群と識別が困難であり、強毒菌単独の場合と異なつて、混合有毒菌が臓器から早期に消滅することが観察された。

したがつて、強毒菌と弱毒菌の混合菌液を動物に接種した場合、強毒菌の比率が比較的大であれば強毒菌が優勢になつて、動物通過による菌力上昇とみられ、強毒菌が比較的少なくなれば、強毒菌単独に比して病原性の低下となり、さらに、強毒菌の比率が極めて小さい場合には、弱毒菌単独と区別しえぬようになり、強毒菌のみを分離することは不可能になるのであろう。

かく、てんじくねずみにおいて、BCGワクチン中に微量の強毒菌が混入していても、確認しえない限界があ

るので、安全試験¹⁶⁾を経たBCGワクチンも必ずしも、無強毒菌ワクチンと断定できない悩みがある。しかし、現行安全試験法で、 $10^{-4}mg$ 位までの有毒菌混入は間違いないと検出でき¹⁷⁾、てんじくねずみと人体の結核菌に対する感受性ないし抵抗性の相以からして、動物試験において安全なワクチンは、人体に應用して差支えないと考えられる。そして、所属リンパ腺の培養を併用すれば、安全度を更に高め、また、静脈内接種では皮下筋肉内接種に比して少量のワクチンで検定可能と思われる。

IV 結 論

BCGにSM耐性の強毒人型菌を微量に混合した菌液をてんじくねずみに接種し、強毒菌の生体内消長に及ぼす影響をみた。

- 1) BCGに強毒人型菌を混合した場合、強毒菌単独接種に比して病原性が低下することが、肉眼的病変や、臓器内生菌数から観察された。
- 2) BCG 3~30mgに $10^{-5}mg$ 程度の強毒菌が混入していても、肉眼的病変より混入を判定したり、臓器から強毒菌を分離することは困難である。しかし、 $10^{-3}mg$ 位に混在した場合には、3ヵ月後、明らかに混入を判別し強毒菌を分離培養することは可能である。
- 3) 静脈内接種によつて、皮下接種の少なくとも10分の1の菌量で菌力試験が可能であり、皮下接種の場合、接種3ヵ月後の所属後腹膜リンパ腺の培養は安全試験の精度を高めうる。

終りに、御指導、御校閲を賜つた柳沢部長、橋本達一郎氏に深甚の謝意を表す。

文 献

- 1) Irvine, K.N.: The BCG Vaccination, Oxford Univ. Press, 1951.
- 2) 山口 登: 医学と生物学, 38: 1, 1956.
- 3) 橋本達一郎・関根修: 結核, 29: 383, 1954.
- 4) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 10: 791, 1955.
- 5) 橋本達一郎: 結核, 30: 237, 1955.
- 6) 橋本達一郎: 結核, 30: 461, 1955.
- 7) 加藤允彦^註 2: 医学と生物学, 38: 81, 1955.
- 8) Yegian, D. & Budd, V.: Am. Rev. Tuberc., 72: 539, 1955.
- 9) Miller, R. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 70: 1053, 1954.
- 10) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 10: 427, 1955.
- 11) 勝山茂・金井興美: 医学と生物学, 35: 141, 1955.
- 12) 加藤允彦^註 2: 医学と生物学, 37: 161, 1955.
- 13) Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 62: 22,

- 1950.
- 14) 岩崎彌一郎：結核，10：82，1932.
- 15) 有馬純・山本健一：結核，26：501，1951.
- 16) 生物学的製劑基準：厚生省，1955，P. 71.
- 17) Studies on dried BCG vaccine, The Japan BCG Research Council, 1952, p. 63.