

## BCG ワクチン中の微量強毒結核菌の検出に関する研究

## 第3報 in Vitro における大量菌対少量菌の干渉

山口 登

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

## 緒 言

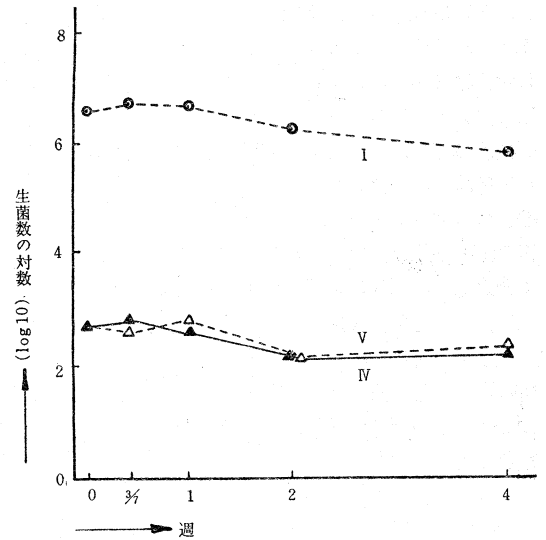
第2報<sup>1)</sup>で、BCG ワクチン中に含まれた微量の強毒菌が、強毒菌単独に比してテンジクネズミ体内での増殖生残を防げられる機序には、BCGによる抗菌免疫が関与するのはもちろんであろうが、そればかりでなく、むしろ大量菌接種局所や、所属リンパ腺等におこつた炎症過程により変化した組織の物理、化学的環境によつて、死滅が促進されることも大きな力があると考えられた。しかし、さらに、生体反応の関与しない in vitro の環境でも、大菌量群と小菌量群の干渉現象がみられるか否かを実験した。その結果を報告し、in vivo の成績と総括的に若干の考察を加えたい。

## 実験方法および成績

小試験管に 4.5ml の Kirchner 培地 (ストレプトマイシン加培地では、あらかじめ100 $\gamma$ /ml に薬剤を含ませた) を入れ、所要の菌株、菌量を蒸留水に浮遊させた菌液0.5ml を接種し、ゴム栓を施し、ふらん器または氷室内に放置し、一定期間後、各群2本あての試験管を取り出し、小川培地上で定量培養を行つた。4週間培養の小川培地4本以上の発生集落数の平均値をもつて、Kirchner 培地 1ml 中の生菌単位数を算定した。

実験 I 微量のH<sub>2</sub>をBCGに混合して37°Cに放置した場合

ストレプトマイシン(以下SM)耐性の強毒人型菌H<sub>2</sub>の微量を単独に、あるいは、SM感性的BCGの大量と混合して接種した。ただし、a 実験では0.2 $\times 10^{-5}$ mg/ml あるいは0.2 $\times 10^{-3}$ mg/ml のH<sub>2</sub> (生菌単位数、17 $\times 10^6$ /mg) を単独、あるいは0.6mg のBCG (生菌単位数、23 $\times 10^6$ /mg) に混合して接種し、b 実験では、H<sub>2</sub>の10 $^{-5}$ mg/ml、あるいは10 $^{-3}$ mg/ml (生菌単位数、4.5 $\times 10^6$ /mg) を単独、あるいはBCG 3mg (生菌単位数、11.5 $\times 10^6$ /mg) に混合して接種した。週を追つて定量培養を行い、BCGおよびH<sub>2</sub>の単独、混合時の各菌の消長をみた。ただし、H<sub>2</sub>はSM 100 $\gamma$ /ml 加小川培地で分離培養され、BCGはSM非添加の小川培地上の総菌数と、SM加培地上の菌数との差をもつて推定した。

図1 微量H<sub>2</sub>の37°C培養におけるBCG混合の影響 (Iのa)

注: 図2と同じ

成績は図1および図2のごとく、BCG単独接種群は最初の4週間は、ほとんど同じ菌密度を維持し、以後漸減し、11週後では接種時の約10 $^{-2}$ のorderであつた。H<sub>2</sub>単独接種群では、最初の2週間における増殖は旺盛で、4週後ではBCGとほぼ同じorderに達し、11週まで大体同じorderを維持していた。また、10 $^{-5}$ mg群では10 $^{-3}$ mg群よりも更に増殖が著しく、4週以後両群はほとんど同じorderであつた。これに対して、H<sub>2</sub>をBCGと混合接種した場合、BCGは単独時と変りない消長を示すが、H<sub>2</sub>は初期に旺盛な菌数増加を示さず、H<sub>2</sub>単独接種群との差が大きくなり、in vivo の場合と同様の関係がみられた。異なつていたのは、in vivo では、混入強毒菌数が比較的大であると、観察期間が長くなつた場合に、BCG混合の影響は次第に認めがたくなつたのに、in vitro の培養では、そのような傾向を認めなかつたことであつた。

## 実験II 微量のSM耐性菌をBCGに混合して、SM加培地で37°Cに放置した場合

Ibと同じSM耐性H<sub>2</sub>とBCGからなる5種の菌液、

図2 微量H<sub>2</sub>の37°C培養におけるBCG混合の影響 (Iのb)

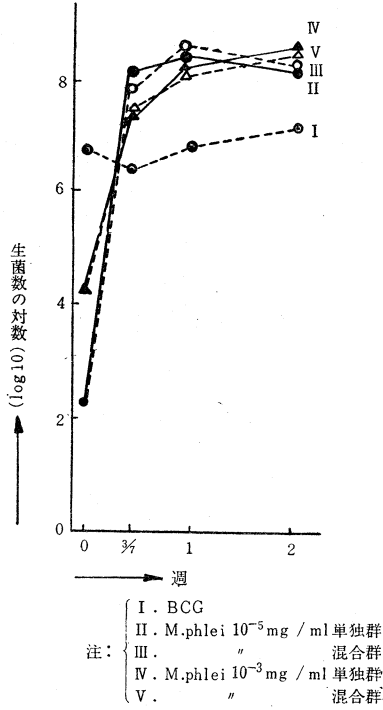
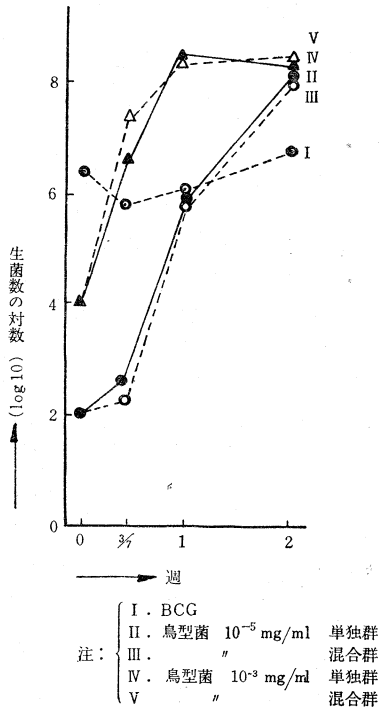


図3 微量耐性菌のSM培地内培養におけるBCG混合の影響 (IIのa)



Gを単独に、あるいはSM感性的BCG 1mgと混合して、SM加Kirchner培地に接種した。後者における生菌単位数(以下V.U.)はそれぞれ、耐性菌は63×10<sup>6</sup>/mg、感性菌は24×10<sup>6</sup>/mgであった。

図4 微量耐性菌のSM培地内培養におけるBCG混合の影響 (IIのb)

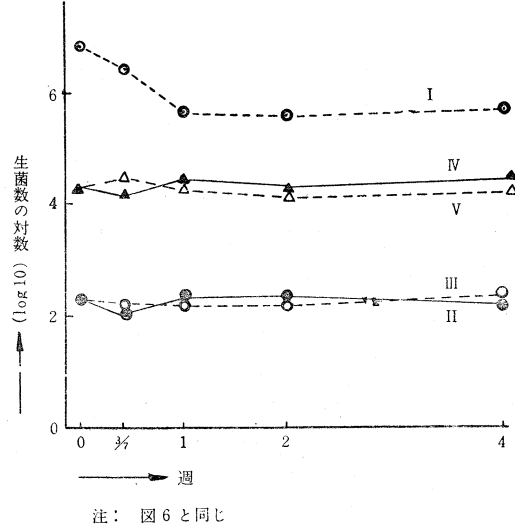
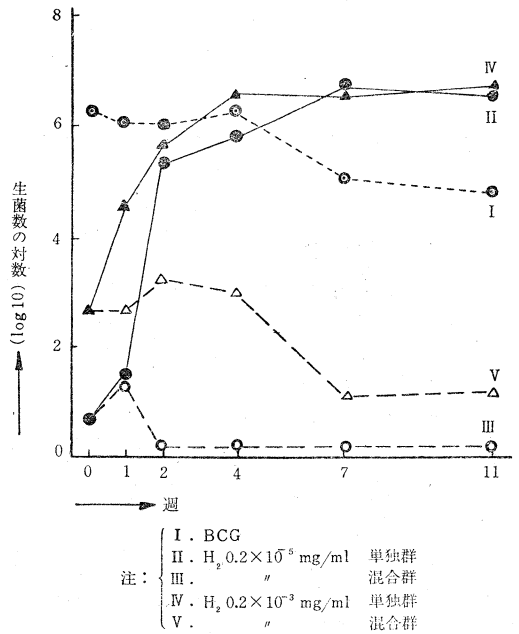


図3および図4の如く、SM感性的BCGの増殖は顕著に阻止され、2ないし4週後にはBCGを検出しえなかつた。これに対して、微量のSM耐性菌の方は混合菌液の場合も旺盛な菌数増加を示し、単独群、混合群において、微量菌の消長に差異を認めなかつた。

図5 微量H<sub>2</sub>の5°C培養におけるBCG混合の影響



および10<sup>-5</sup>mg/mlあるいは10<sup>-3</sup>mg/mlのSM耐性BC

**実験Ⅲ 微量のH<sub>2</sub>をBCGに混合して、氷室に放置した場合**

Ibと同じSM耐性H<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup>mg/mlを単独あるいはBCGと混合してKirchner培地に接種し、氷室に放置して菌の消長をみた。

図5の如くBCGおよびH<sub>2</sub>は徐々に漸減して、単独群および混合群におけるH<sub>2</sub>の菌数の消長は全く同じであった。

**実験Ⅳ 発育速度の早い微量菌をBCGに混合して培養した場合**

小川培地上で、3日間で単集落を形成するM. phleiや、それよりはやや発育速度の遅い鳥型菌F株の10<sup>-3</sup>mg/mlおよび10<sup>-5</sup>mg/ml(V.U., 18×10<sup>7</sup>/mgおよび11×10<sup>7</sup>/mg)を単独あるいは、1mgのBCG(V.U., 63×10<sup>6</sup>/mgおよび24×10<sup>6</sup>/mg)に混合して接種し、37°Cに放置した。

図6 微量M. phleiの37°C培養におけるBCG混合の影響

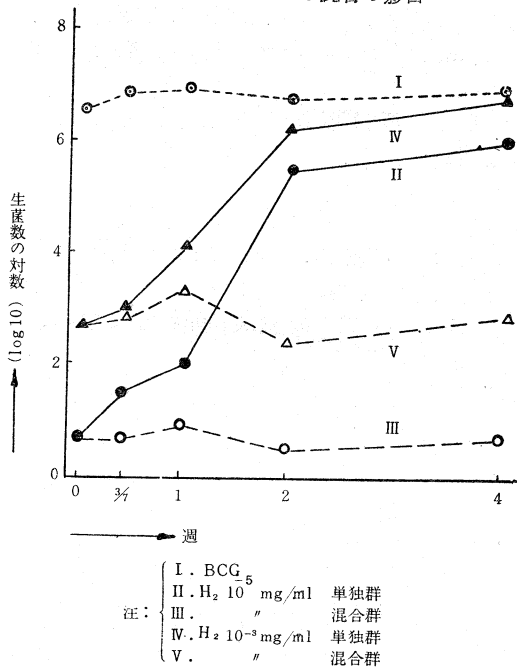


図6および図7に示す如く、これらの発育速度の早い菌は短期間でBCGを、りようがするほどの旺盛な発育を示し、単独の場合も、BCGと混在する場合もほとんど同じ菌数増加を示した。

**実験Ⅴ 発育速度の早い微量菌をBCGに混合して氷室に放置した場合**

IV実験と同じM. phleiとBCGからなる5種の菌液を接種した培地を氷室に放置した。

図8のごとく、4週間の間、M. phleiは同じorderにあり、単独群でも混合群でも菌の消長はかわりなかつ

図7 微量鳥型菌(F株)の37°C培養におけるBCG混合の影響

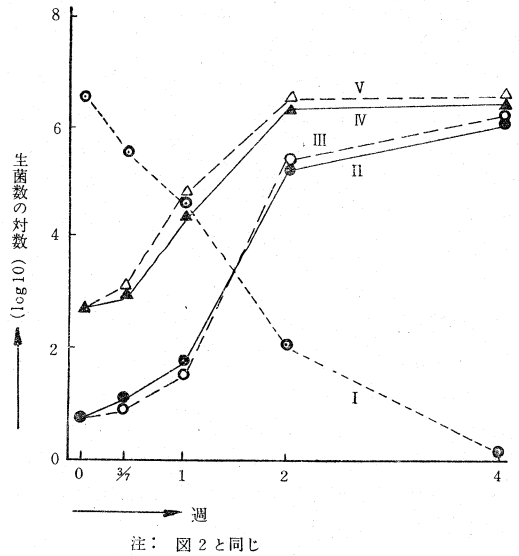
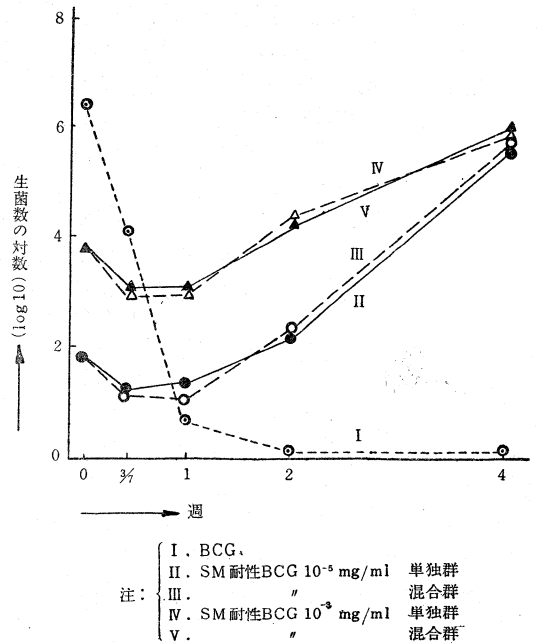


図8 微量M. phleiの5°C培養におけるBCG混合の影響



た。

**考 察**

生体反応の関与しないin vitroでも、発育速度の等しい2種の混合菌を液体培地で培養した場合、微量菌群は単独接種に比して、増殖生残が抑制されている。このことから、混合微量菌の増殖には、菌増殖の場が大きく影響し、混合群では大量BCGにより増殖に不利な物理

化学的環境が早期に形成されるので、単独接種に比して充分な発育を維持することが困難になるものと考えられ、混合菌群間の干渉が、自然抵抗性ないしは免疫とは無関係にも成立するものといえよう。

次に、低温保存の場合には、混合および単独接種において、微量菌の菌数の消長が同じで、また、SM加培地で培養したために、SM感性であるBCGの増殖が阻止されているときには、微量耐性菌の増殖は大量BCGと混在することにより影響をうけないので、大量菌のmetabolismによる増殖の場の変質が問題になるのではあるまいか。

微量の混合菌でも、微量菌のみが増殖を許される環境や、微量菌の増殖速度が大量菌に比して大であるときには、遂には微量菌株の方が優勢を示すようになりうる。結核菌培養の途中で雑菌の汚染をうけた場合に、結核菌の増殖がみられないことや、化学療法上しばしば経験される菌交代症の事実と符合する。強弱混合菌を動物通過した場合に、強毒菌が優勢を示すようになるのも、生体が弱毒菌を強く淘汰するためで、SM耐性菌および感性菌からなる混合菌をSM加培地で選択した場合と同様の機作が働くものであろう。

しかし、BCGから強毒性の逆変異菌が出現しようと仮定しても、変異率は極めて低率であり、かつ変異菌の発育速度が特別に大であるとは考えられず、かえって、BCGもてんじくねずみ接種初期にはかなり増殖しうるときえ考えられるので<sup>2)</sup>、その結果、早期に菌増殖を維持するのに不利な臓器環境ができ上り、いわゆる動物通過を行つても、強毒菌のみを分離しえなかつたのであろう<sup>3)</sup>。故に、最初からBCGの増殖を許さないが、強毒菌のみは旺盛に増殖可能である動物か、人工培地が発見さ

れぬ限り、BCGワクチン中の微量の強毒菌を実際的に分離することは不可能であろう。

## 結 論

1) 生体反応の関与しない *in vitro* においても、大量BCG中に混在する微量強毒菌は単独接種に比し、増殖生残が阻害される。

2) 大量菌も少量菌も増殖しえない低温環境や、大量菌のみが増殖を阻止され、少量菌の発育は阻止されない特殊培地内では、少量菌は混在時も単独時と同様な菌数の消長を示す。

3) 少量菌の増殖速度が大量菌に比して早い場合、および、大量菌の増殖のみが阻害される環境では、混在少量菌は単独時と同様に旺盛に増殖し、大量菌をりようがしうる。

4) BCG中の微量有毒菌を生体通過によつて分離することが難しいのは、BCGによる接種初期の組織環境の変化（一つは大量接種菌による炎症による変化と、他の一つは大量接種菌による代謝物質による変化）が、非特異的に菌の増殖、生残を阻害するためと考えられる。

終りに、御指導、御校閲を賜つた柳沢部長、橋本技官に深甚の謝意を表す。

## 文 献

- 1) 山口登・関根修：結核，32：69～72，1956.
- 2) 山口登：医学と生物学，38：7，1956.
- 3) 山口登・関根修・立花暉夫：結核，32：36～40，1956.