

耐熱性乾燥BCGワクチンに関する研究

37°C保存の免疫原性に及ぼす影響について

張 仲 鑲・大林 容 二

岩 崎 竜 郎・川 崎 二 郎

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受付 昭和31年10月20日

緒 言

著者ら^{1)~3)} はあえて培養試験および人接種試験により、従来の、蔗糖を媒質とする乾燥BCGワクチンの保存性を3年間にわたって追及した結果、これらのワクチンは温度5°C内外の氷室保存の場合は勝れた耐久性を示し、人体に対する力価(アレルギー原性)も、少なくとも2年間は十分に保持されることを認めた。しかし、一方これらのワクチンを30°C、37°C等の高温度に保存するか、または夏季の室温に放置すれば含有生菌量は急速に減少し、ワクチンの人体に対する力価も低下することが知られた。

以上の点は、乾燥BCGワクチンを熱帯、亜熱帯地方で使用する場合の大きな障害となることが予想されるので、この点を改善して、ある程度室温保存の可能な乾燥BCGワクチンを作ることを目標として、著者らはさらにワクチンの媒質に関する研究を行った⁴⁾⁵⁾。その結果、グルタミン酸ソーダを媒質とする乾燥BCGは、従来の蔗糖ワクチンよりも高温度における耐久性が遙に強く、37°Cに6~8ヵ月保存しても、その間の生菌の減少は比較的軽度であることが見出された。

今回の報告は、以上の培養試験によつて得られた所見を、さらに動物に対する免疫実験によつて確かめようとしたものである。

実験方法

1. ワクチンの製法

BCGのSauton 2代目9日培養を用いて20mg/ml菌液(蒸溜水浮游液)を作り、グルタミン酸ソーダ、または蔗糖の2%溶液により10mg/mlに希釈、0.5ml あてアンプルに分注する。乾燥は日常のワクチン製造の方法⁶⁾により箱型乾燥器による凍結乾燥を行った。出来上りのワクチンを5°Cまたは37°Cに6ヵ月保存後動物に接種した。ワクチンの培養試験は乾燥直後および動物接種時に行った。

2. ワクチンの接種

体重280g内外の、ツベルクリン反応陰性のモルモッ

ト60匹を12匹あての5群に分け、以下のようにワクチンの接種を行った。

動物群	接種ワクチン媒質	保存温度
1	1%グルタミン酸ソーダ	5°C
2	1%グルタミン酸ソーダ	37°C
3	1%蔗糖	5°C
4	1%蔗糖	37°C
5	非接種対照群	

乾燥ワクチンを滅菌生理的食塩水で0.2mg/mlの濃度に希釈、その0.5ml(0.1mg)を動物の左側腹部皮下に接種した。

接種後2週毎に1mgの旧ツベルクリンによりアレルギーの消長を調べた。

3. 攻撃試験

6週後に接種動物および対照動物(全数53匹)の右側腹部皮下に人型結核菌KH₁株 Sauton 3週培養0.01mgを接種した。同時に行つた小川培地による培養試験(4週判定)によると、この菌液1mg中の生菌単位数は 2.52×10^7 であった。

4. 剖検

感染6週後に全動物を剖検に附し、結核病変の肉眼的および組織学的検索を行った。肉眼所見の記載は次の方法によつた。

リンパ腺の腫脹はその大きさにより+(米粒大)、++(大豆大)、+++ (えん豆大)、++++(そら豆大)の記号によつて表わし、また臓器の結核病変の程度は、結節の数に応じて+(少数)、++(やや多数)、+++ (多数)、++++(甚だ多数)の4段階に分つた。

また動物の肝臓の定量培養試験を行い、臓器内結核菌の増殖度を調べた。これには重量約0.3gの肝片を乳鉢で磨り、1%苛性ソーダ溶液で希釈し、100mgおよび10mg相当量(肝重量にして)を各5本の小川培地に接種し、37°Cに4週間放置後発生集落数を算えた。

実験成績

使用ワクチンの培養成績は表1に示す通りで、グルタミン酸ソーダワクチンの生菌単位数は蔗糖ワクチンに較

べ、乾燥直後および5°Cに6ヵ月保存後でもやや多いが、両者の差は37°Cに6ヵ月保存した場合には顕著に現われた。

表1 使用ワクチンの保存による生菌量の消長

ワクチンの種類	1 mg 中の生菌単位数		
	乾燥直後	5°C 6ヵ月保存	37°C 6ヵ月保存
1%グルタミン酸 ソーダワクチン	3.8×10^7	4.13×10^7	4.7×10^6
1%蔗糖ワクチン	1.8×10^7	1.27×10^7	0.7×10^4

表2 動物の体重の消長

動物群	接種後の 期間(週)		6 有 毒 菌 感 染	7	8	10	12
	0	2					
1	285	324	367	395	413	454	469
2	284	323	362	404	423	458	463
3	282	336	374	390	425	428	467
4	285	347	360	424	458	450	477
5 (対照群)	280	334	366	398	426	426	450

※ 各群動物の体重平均値 (g) によって示す

表3 ツベルクリン反応の消長

動物群	接種後の 期間(週)		6 有 毒 菌 感 染	7	8	10	12
	0	2					
1	0	16	19	24	25	27	29
	0	19	22	20	24	23	29
2	0	15	18	19	23	24	28
	0	17	19	20	23	24	28
3	0	15	22	20	24	23	26
	0	17	23	20	24	23	26
4	0	10	18	20	25	23	29
	0	12	21	20	25	23	29
5 (対照群)	0	0	0	0	17	20	29
	0	0	0	0	17	20	29

1mg OT皮内注射24時間後に判定、分母、分子はそれぞれ発赤、硬結の平均値を示す

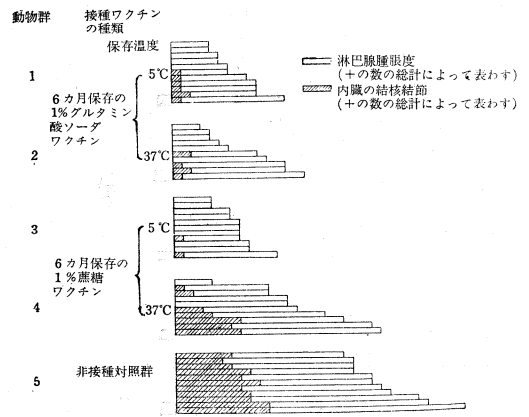
また各群動物の体重平均値の推移は表2に示す通りで、体重の動揺は少なく、実験期間中一定の増加傾向を示している。

ワクチン接種後および攻撃試験後の動物のツベルクリン反応成績は表3に示す通りで、接種2週後の試験では第1, 2, 3群の反応が第4群の反応よりもやや強かつたが、この差異は以後の試験では認められなかつた。また攻撃試験後2週間までは、ワクチン接種群の反応が対照群のそれよりも強かつたが、以後は両者の差異は認められなかつた。

動物の結核病変の肉眼所見は表4および図1に示すようである。第1, 2, 3群の間にはほとんど結核病変の程度に差がなく、いずれも軽度の病変を認めるのみであるが、第4群(37°Cに6ヵ月保存の蔗糖ワクチン接種群)はリンパ腺、臓器のいずれにおいても病変はより著明であ

る。非接種対照群の病変は5群中最も顕著であつた。

図1 有毒結核菌感染6週後のリンパ腺および臓器の結核性変化



組織学的検索の成績もほぼ同様であつた。

対照群では有毒菌感染局所の潰瘍は大きく、結核性浸潤は皮下組織より時には筋肉内にまで及んでいる。また、しばしば壊死を伴う結核結節が潰瘍の中心部および周辺部に多数認められた。第1, 2, 3群では局所の潰瘍は小さく、結核性浸潤は対照群におけるほど拡がっていない。潰瘍底には結核結節は見られず、また、中心部に壊死を伴う結核結節を見ることも稀である。第4群では局所の潰瘍の大きさは一定でなく、対照群と同程度のものも、またもつと小さいものもあつた。潰瘍中心部の結核性浸潤の程度も対照群のそれに近かつた。

局所リンパ腺の腫脹は第4群と対照群とに著明で、リンパ腺中には、多くの軟化壊死組織と集合結核結節とが認められた。他の群の動物ではリンパ腺の腫脹はもつと軽度で、多少の壊死巣と結核結節はすべての群に見られるが、なお多くの正常組織を残している。

次に内臓の病変については、対照群では肝、脾、肺および門脈腺に大きな結核結節が多数認められ、また脾および門脈腺の結節の中心部には壊死が多く見られた。なお、モルモットの結核の進展に伴って起る胆管の増生も認められた。第4群の臓器の変化は大体対照動物のそれに近いが、ただ、脾の結核結節中には壊死を伴わぬものもあつた。第1, 2, 3群では肝、脾、肺の結核結節は小さく、数も僅少で、また脾の結核結節中心部の壊死は極めて稀である。第2, 3群では門脈腺の変化が他臓器の変化よりも著明で、中心部に壊死巣を囲む小被包乾酪巣よりなる集合結核結節が認められた。第1群の動物中には、門脈腺の結核性変化が見られぬものと、第2, 3群と同程度の変化を認めるものもあつた。

肝臓の定量培養試験の成績は表5の通りで、肉眼的および組織学的剖検所見と一致する傾向が認められた。すなわち結核菌生菌単位数は対照群が最大で、第4群がこれに次ぎ第1, 2, 3群では遙に少ない。

表 4 有毒結核菌感染6週後の剖検肉眼所見

(局所変化 A=膿瘍 S=痂皮 u=潰瘍
+記号 括弧は乾酪化を示す)

動物群	モルモット番号	局所変化	淋 巴 腺										内 臓						
			左膝囊腺	右膝囊腺	左鼠蹊腺	右鼠蹊腺	左腋窩腺	右腋窩腺	左頸腺	右頸腺	後胸骨腺	後腹膜腺	門脈腺	気管腺	肺臓	肝臓	脾臓	腎臓	脾重量
1	1	u	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1
	2	S	(+)	(#)	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	0.8
	3	u	(+)	(#)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	+	-	-	+	-	1.0
	4	u	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	-	0.8
	5	u	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	0.85
	6	S	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	0.9
	7	u	+	(#)	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0.85
	8	u	+	(#)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	0.9
	10	u	-	(#)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0.7
	11	u	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0.8
	12	u	(+)	(#)	-	-	-	-	-	-	(+)	+	(+)	-	-	-	+	-	1.4
	2	14	u	(+)	(#)	-	+	-	-	-	-	+	(#)	-	-	-	-	-	1.0
15		u	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1.05	
16		u	-	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0.5	
17		u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	+	+	-	+	0.85	
18		u	(+)	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	
19		u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0.85	
21		u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	0.9	
22		u	(#)	(#)	-	+	-	+	-	-	-	+	(+)	+	-	-	-	1.3	
23	u	(+)	(#)	-	(+)	-	-	-	-	-	+	(#)	+	+	-	+	1.1		
24	u	-	(#)	-	(+)	-	-	-	-	-	(#)	(#)	-	-	-	-	1.1		
3	25	S	-	(#)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	0.8	
	26	S	+	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0.5	
	27	u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	0.8	
	28	u	-	(#)	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	0.85	
	29	u	(+)	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	0.75	
	31	u	(#)	(#)	-	+	-	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-	+	0.7	
	32	u	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1.3	
	33	u	(+)	(+)	-	+	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	0.8	
	34	u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	0.75	
	35	u	+	(#)	-	(+)	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	0.75	
36	u	+	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	0.7		
4	37	u	(#)	(#)	-	(+)	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	0.6	
	39	u	(#)	(#)	-	(+)	-	-	-	+	(+)	(#)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1.3	
	40	u	(+)	(#)	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	(+)	+	+	+	(+)	1.05	
	41	u	(+)	(#)	-	+	-	+	-	-	-	(#)	(+)	-	-	-	-	0.85	
	42	u	(+)	(#)	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(#)	+	+	(+)	(+)	1.5	
	44	u	(+)	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	+	-	-	+	0.85	
	45	u	(+)	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.05	
	46	u	+	(#)	-	+	-	+	-	-	-	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	1.6	
47	u	-	(#)	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	1.25		
48	u	+	(#)	-	+	-	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	(+)	1.1		
5	49	u	(+)	(#)	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	1.0	
	50	u	(+)	(#)	-	(+)	+	-	(+)	-	(+)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	1.9	
	51	u	(+)	(#)	-	(+)	-	-	-	-	+	(+)	(+)	+	(+)	(#)	(#)	1.4	
	52	A	(+)	(#)	-	+	-	+	-	-	-	(+)	(#)	+	+	(#)	(#)	0.95	
	53	u	(+)	(#)	-	(+)	-	-	-	-	+	(+)	(+)	+	+	(#)	(#)	1.5	
	54	u	(#)	(#)	-	(+)	-	-	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	1.1	
	55	u	+	(#)	-	+	-	-	-	-	+	(#)	(+)	+	+	(+)	(#)	1.2	
	56	u	(#)	(#)	-	+	-	+	(+)	-	+	(+)	(#)	(+)	(#)	(#)	(#)	2.8	
	58	u	(#)	(#)	-	(+)	+	-	+	-	-	(#)	(+)	(#)	(+)	(#)	(#)	1.2	
	59	u	+	(#)	-	+	-	-	-	-	+	+	(#)	+	+	(+)	(+)	1.9	
60	u	(+)	(#)	-	+	-	-	-	-	+	(+)	(#)	(#)	(+)	(+)	(+)	1.4		

表5 肝臓の定量培養成績

動物群	動物番号	肝臓10mg中の生菌単位数	動物群	動物番号	肝臓10mg中の生菌単位数	動物群	動物番号	肝臓10mg中の生菌単位数	動物群	動物番号	肝臓10mg中の生菌単位数	動物群	動物番号	肝臓10mg中の生菌単位数
	1	0		14	0.7		25	3.0		37	0		49	5.4
	2	0		15	0		26	0		39	64.0		50	81.4
	3	0		16	0		27	0		40	5.4		51	83.4
	4	0		17	0		28	0		41	0.7		52	12.0
	5	0		18	0.4	3	29	0	4	42	3.4	5	53	63.0
1	6	0.4	2	19	0		31	0		44	0		54	6.4
	7	0		21	0		32	0		45	0		55	17.0
	8	0		22	0		33	0		46	17.0		56	70.0
	10	0		23	0		34	0		47	0		58	13.0
	11	0		24	0		35	0		48	10.0		59	39.0
	12	0					36	0					60	29.4

考 察

今回の実験により、乾燥BCGワクチンを37°Cに保存する場合、その免疫力は、グルタミン酸ソーダワクチンの方が蔗糖ワクチンよりも遥によく保たれることが明らかにされた。すなわち、蔗糖ワクチンの免疫力は37°C、6カ月の保存により著しく低下するに反し、同期間を5°Cおよび37°Cに保存したグルタミン酸ソーダワクチンを接種された2群の動物の間には攻撃試験後の結核性変化に有意の差が認められず、またこれらの動物の結核性変化は、対照動物および37°C、6カ月保存蔗糖ワクチンで免疫した動物の変化よりも遥に軽度であった。接種ワクチンの培養試験の結果によると、グルタミン酸ソーダワクチンの場合でも37°C、6カ月の保存により生菌量はやや減じているので、以上の免疫実験の結果より、グルタミン酸ソーダワクチンの免疫力が37°C、6カ月保存により少しも低下しないと考えるのは早計であろう。しかし少なくとも、グルタミン酸ソーダワクチンではこの程度の保存条件による免疫力の低下は僅少であつて、モルモットによる普通の免疫実験では検出されにくい程度のものであるとはいふ。

BCGワクチンの免疫力は、主として含有される生菌の活動によるものと見られるから、含有生菌量を測定することにより免疫力を間接に測ろうと試みることは当然である。しかし、与えられた2種類のBCGワクチンの含有生菌量を培養試験によつて正確に比較することは、これらのワクチン中の菌塊の分散度が全く同一である場合にのみ可能で、これは実際には中々得難い条件である。ことに本実験のように、違つた媒質を用いて作つた2種類の乾燥ワクチンの場合には、その保存性を比較するには培養試験のみでは不十分で、今回の実験はこのような理由に基いて行われたものである。

その結果は既述のように、グルタミン酸ソーダワクチンは現行の蔗糖ワクチンよりも37°Cにおける保存性が

著しく高いという、従来の培養試験の成績と一致する結果が得られた。

なお、このワクチンの人体接種実験は現在進行中で、近く報告される予定である。

総 括

グルタミン酸ソーダを媒質とする乾燥BCGワクチンの保存性と、従来の、蔗糖を媒質とするワクチンの保存性とをモルモットに対する免疫力の面から比較して次の結果を得た。5°Cまたは37°Cに6カ月保存したグルタミン酸ソーダワクチン、および同期間5°Cに保存した蔗糖ワクチンを接種した動物の間には、攻撃試験による結核病変に差異が認められなかつたが、37°C、6カ月保存蔗糖ワクチン接種動物の病変は前3者よりもかなり著明であつた。

対照のBCG非接種動物には全動物中最も顕著な病変が認められた。

文 献

- 1) 大林・川崎・吉岡・島尾・野口：結核研究の進歩，9：181，1955.
- 2) Obayashi, Y. : Dried BCG Vaccine, Geneva (World Health Organization : Monograph Series, No. 28), P. 137, 1955.
- 3) Obayashi, Y., Kawasaki, J., Yoshioka, T., Shimao, T. and Noguchi, T. : Bull. Wld. Hlth. Org., 14: 529, 1956.
- 4) 張：結核研究の進歩，9：191，1955.
- 5) Cho., C. and Obayashi, Y. : Bull. Wld. Hlth. Org., 14: 657, 1956.
- 6) Obayashi, Y. : Dried BCG Vaccine, Geneva (World Health Organization : Monograph Series, No. 28), P. 23, 1955.