

# 結核ワクチンBCG—日本の貢献

日本BCG研究所 戸井田一郎

## 1. カルメットとゲランの胆汁菌： オリジナルBCGの誕生<sup>1)</sup>

パスツール研究所（リール，フランス）のLeon Charles Albert CalmetteとJean Marie Camille Guérinは，強毒力の*Mycobacterium bovis*，Nocard株をウシ胆汁-グリセリン-馬鈴薯培地に繰り返し継代培養することによって馴化し，結核予防のためのワクチン株であるBacille (bilié) Calmette-Guérin（カルメットとゲランの胆汁菌：BCG）の樹立に成功した。動物実験を繰り返して弱毒化が確認され，1921年に一人の乳児に初めて経口投与されて以来，実用化された唯一の結核予防ワクチンとして90年にわたり全世界の新生児，乳幼児，若年成人に用いられてきた。ここでは，BCGおよびBCGワクチンに関連した日本の研究者・技術者の貢献に焦点を当てて述べることとし，BCGの結核予防効果や副反応（有害事象）などの一般的な問題については文献<sup>2)3)</sup>を参照されたい。

## 2. オリジナルBCGに最も近い日本のBCG： BCG Tokyo 172<sup>4)</sup>

オリジナルBCGは，リールからパリのパスツール研究所へ移ったCalmetteによって多くの国に分与され，それぞれの国でBCGワクチンの製造が行われるようになった。それぞれの国の製造所が，それぞれの国で調達可能なウシ胆汁や馬鈴薯という天然物を用いてCalmetteの原法に準じながらもそれぞれ独自の方式で継代を繰り返した結果，それぞれの国のBCG株はCalmetteの原株（オリジナルBCG）とは多かれ少なかれ性状を異にする亜株として分化していった。日本へのBCGの導入は，1924年に北里研究所の志賀潔が国際赤痢血清委員会に出席のためヨーロッパに渡航した際に，Calmetteから直接分与されて持ち帰ったことによる。このBCG株は，北里研究所の渡辺義政，東京帝国大学伝染病研究所（“東大伝研”，東京大学医科学研究所の前身）の佐藤秀三と今村荒男（今村は後に東大伝研から大阪医科大学に移った。大阪医科大学は大阪大学医学部の前身）等によってまず取り上げられた。1938年からは，国家プロジェクト

としての日本学術振興会第八小（結核予防）委員会による多施設協同研究によって結核予防効果が確認され，その結果BCG接種はわが国の結核対策において中心的な役割をになうこととなった。Calmetteの原法に忠実に従った継代培養によって志賀→渡辺→今村と引き継がれた日本のBCG株は，その後，財団法人結核予防会（“予防会”，1939年設立で現在は公益財団法人）にわたり，予防会の製造所でもCalmetteの原法に従いBCGワクチンの製造が行われた。1947年に国立予防衛生研究所（“予研”，国立感染症研究所の前身）が設立されワクチンの国家検定が行われることになった。予防会から予研へBCG株がわたり，予研でもCalmetteの原法どおりの継代培養を繰り返すことによってBCG株を維持・管理することになった。予研でのウシ胆汁-グリセリン-馬鈴薯培地継代数が172代目の培養菌を凍結乾燥したBCG Tokyo 172株がワクチン製造のシード・ロットに採択され，1981年以降は初代のBCG Tokyo 172株から拡大製造されたBCG Tokyo 172-1株がシード・ロットとなり現在に至っている。

一方，パスツール研究所は，BCGをBacille bilié（胆汁菌）と名づけたCalmetteの遺志に反して，Calmetteの死後間もなくウシ胆汁培地の使用を年に3回までに減らし，1961年には1173代目の継代菌についてsingle colony selectionを行い，Pと名づけた一つのコロニーを選択し，このコロニーから培養した菌を凍結乾燥してワクチン製造のシード・ロットBCG Pasteur 1173P株を作成した。このような操作の結果，パスツール研究所のBCGはCalmetteのオリジナルBCGとはかなり異質のものとなり，忠実にウシ胆汁培地で継代を続けてきたBCG Tokyo 172株のほうがオリジナルBCG本来のBacille biliéの姿を受け継いでいるといえる。ちなみに，現在，BCG Pasteur 1173P株を用いたBCGワクチンはいくつかの旧フランス植民地国で自国用に製造されているのみでフランス本国でも他のヨーロッパ諸国でも使用されておらず，高い頻度の副反応のためにWHO-UNICEFによる国際的なBCGワクチン供給システムからも排除されている。

2007年にはBCG Pasteur 1173P株のDNA全塩基配列が

報告され、あわせて主要なBCG亜株の系統図が提示されたが、2008年にはBCG Tokyo 172株のDNA全塩基配列も日本BCG研究所の関らによって明らかにされた。すべてのBCG亜株では遺伝子DNAのRD1領域が欠損しており、このことが強毒力の*Mycobacterium bovis*, *Nocard*株から弱毒化BCGが分化した要因と考えられているが、このRD1の欠損に加えてBCG Pasteur 1173P株では、1926年以降にパスツール研究所から分与を受けた国々のBCG亜株（例えばデンマークのBCG Danish 1331株など）と同様に、RD2領域も欠損している。一方、BCG Tokyo172株では、1926年以前に分与を受けた国々のBCG亜株（例えばロシアのBCG Russia株など）と同様に、RD2領域は保持されている。このような最近の遺伝子分析の結果もBCG Pasteur 1173P株よりBCG Tokyo 172株のほうがCalmetteのオリジナルBCGに近似していることを示唆している。

### 3. 凍結乾燥BCGワクチン、とくに “耐熱性”乾燥ワクチン<sup>5)</sup>

BCGの研究およびBCGワクチン製造における日本の研究者・技術者の最大の貢献は凍結乾燥ワクチンの開発・改良である。凍結乾燥の技術がまだ開発されていなかった当時においては、BCGワクチンは培地から収穫した菌をそのまま均等に懸濁した液体ワクチン、いわゆる“生(なま)”ワクチンであった。低温に保存しても有効期間はせいぜい1~2週間にすぎず、使用前に有効性・安全性の試験を完了することも遠隔地へ輸送することも不可能であった。この問題の解決のために、日本では世界に先駆けて戦争中からBCG凍結乾燥の研究が進められた。1943年、林武夫は5%乳糖を媒剤としてBCGの凍結乾燥に成功し、5カ月以上保存しても生菌数が減少しないことを報告した。翌1944年には凍結乾燥BCGワクチンの結核予防効果を人体試験によって証明、報告している。林の成績は「陸軍軍医学校防疫研究報告」に発表されたため一般にはあまり知られておらず引用されることも少ないが、林の研究を基礎にして、大林容二らはチャンバー式の大規模凍結乾燥装置による凍結乾燥BCGワクチンの大量生産に成功し、この技術開発によって、30歳以下のツベルクリン反応陰性者全員に対するBCG一律接種を国の政策として打ち出すことが可能になった。林および大林らの業績は、BCGワクチンの歴史の上でCalmetteとGuérinによるBCG樹立に次ぐ最大の成果と評価できる。大林の業績は日本人で初めてのWHO出版の単行本World Health Organization Monograph Series No.28として刊行され（英文、のちに仏文にも翻訳されたとのこと）、世界中のBCGワクチンは生ワクチンから凍結乾燥ワクチンに切り替えられていった。

初期の凍結乾燥媒剤として蔗糖を用いた凍結乾燥

BCGワクチンは、有効期間は生ワクチンと比べて画期的に延長できたが低温（5℃以下）での保管を必要とした。BCGの必要度が最も高い発展途上国では、輸送中や保管のためのコールド・チェーンが整備されておらず、ある程度の期間、亜熱帯~熱帯地域の室温に耐えられる製品がなによりも望まれていた。この問題を解決したのも日本の研究者・技術者であった。大林容二・張仲鏤らは凍結乾燥の媒剤として多種多様な物質をいくつかの濃度で試み、1%グルタミン酸ソーダを媒剤にした凍結乾燥BCGワクチンが37℃、6~8カ月の長期保存に耐えることを明らかにした。この成績はWHO Tuberculosis Research Office（コペンハーゲン、デンマーク）の追試・追加試験と併せてBulletin of World Health Organizationに数報にわたって発表され、全世界の注目を集めた。この画期的な技術革新は、当時の結核予防会専務理事 隈部英雄の英断によって敢えて特許が設定されず、世界のほぼすべてのBCGワクチン製造所がグルタミン酸ソーダを凍結乾燥の媒剤に採用して耐熱性の向上したワクチンを製造できるようになった。

### 4. 結核発病の初感染学説とBCGの結核予防効果<sup>6)</sup>

BCGの結核予防効果に関する多くの論文には「BCGは結核性髄膜炎や粟粒結核のような子供の重症型結核を非常に良く防御するが、成人の肺結核に対しては防御効果があまり無い」とほとんど決まり文句のように述べられている。日本語の読めない外国の学者はともかく、先達日本人学者の業績に精通していなければならないはずの日本の結核病学専門家の論文にもしばしば同様の記述が見られるのが著者には不可解である。戦前・戦中・戦後まもなくの日本では思春期~若年成人を中心に結核が猖獗を極めた。当時の日本の結核の特徴は、ヨーロッパ先進国におけるよりも遅い思春期前後の年齢で初感染を受け、初期変化群（肺内初感染原発病巣および/または肺門リンパ節病巣）から直接に肺結核症や肺外諸臓器の結核症に進展し、しばしば死に至る型の結核であった。岡治道らは多数例の臨床経過と病理解剖所見とを対比し、Ranke, KEの結核症進展の3期理論を援用しつつ「結核の初感染発病学説」を確立した。当時の日本の結核対策は、この学説を理論的根拠に、思春期~若年成人の初感染からの結核症発病防止を主目標として構築された。日本学術振興会第八小（結核予防）委員会によるBCGの臨床試験もこの主目標にそって若年成人を対象として行われて効果が証明されたのである。日本のみではなく、スカンジナビア諸国でもBCGの効果は女性看護師を主とした思春期~若年成人での試験によって証明されているし、イギリスのBritish Medical Research Councilの試験は14~15歳の生徒について行われ、ほぼ10年間

持続する80%の防御効果が証明されている。日本やスカンジナビアの試験は無作為割り付け試験でないとの批判もあるが、大阪大学の今村荒男による臨床試験は小規模ではあるが非の打ち所のない無作為割り付け対照比較試験であるといえる。日本で乳幼児へのBCG接種が普及したのは1960年代後半以降のことであり（1963年の全国結核実態調査では0～4歳でのBCG既接種率は28.5%）、それまではBCGは主として学童～思春期青年に接種され、この年齢層の結核の減少に大きく寄与したことを軽視すべきではない。

#### 5. 日本のBCGワクチンはWHOの国際参照品である<sup>7)</sup>

WHOは第18回（1965年）生物製剤標準化専門委員会「乾燥BCGワクチンの製剤基準（Minimum Requirements）」を制定し、BCGワクチンの製造はシード・ロット・システムに依らねばならないと定めた。同じ委員会で、数年前から議論され数種類の候補ワクチンについて選考のための試験が行われていた凍結乾燥BCGワクチンの「初代国際参照品（The First International Reference Preparation）」に日本BCG研究所がBCG Tokyo 172株を用いて製造した凍結乾燥ワクチンが選ばれた。その後何回か参照品を別の製品に置き換えようという動きがあり新しい候補製品が試験されたがBCG Tokyo 172製品に優る製品は得られず、Tokyo 172製品が引き続き国際参照品（International Reference Preparation: IRP）としてイギリスのPotters BarにあるNational Institute for Biological Standards and Controlに保管され、各国の検定機関などの求めに応じて配布され、凍結乾燥BCGワクチンの品質管理・検定などの際の参照品として用いられてきた。

しかし、製造から50年以上を経過して残存ストックが乏しくなり生菌数が製造直後の半分以下に減少したために、WHO Informal Consultation on Characterization of BCG Vaccineの2005年会議であらためて参照品の更新が議論され、これまでのようにすべてのBCGワクチンのためのIRPではなく、世界で汎く使用されているBCGワクチンの重株それぞれについての複数のreference reagents (RRs)を定めるという新方針のもとに、Danish 1331, Russian BCG- I, Tokyo 172-1のBCG 3重株から製造された凍結乾燥製品をRRs候補として9カ国11研究機関に委託して試験が行われた。この結果、Tokyo 172-1株とDanish 1331株からの製品は2009年10月から、Russian BCG- I株からの製品は2010年10月から、WHOのRRsとして採択された。このように、日本のBCGはこの制度が始まって以来一貫してWHO参照品（IRPまたはRR）として世界のBCGの品質管理・検定の標準化に貢献している。

このRRs選定のための試験成績から各製品の1アンブルあたり生菌数と37℃4週間保存後の生残率を示すと、

Danish 1331:  $7.29 \times 10^6$ , 29.47%; Russian BCG- I :  $3.39 \times 10^6$ , 27.89%; Tokyo 172-1:  $49.37 \times 10^6$ , 67.47%で、日本のBCGワクチンの単位重量あたり生菌数の多さ（力価の高さ）と熱安定性をあらためて印象づける成績であった<sup>8)</sup>。

#### 6. 世界の4主要BCGワクチン製造所による相互の製品の比較試験<sup>9)</sup>

複数のBCG重株を研究室内で培養し、細菌学・免疫学的性状を比較してそれぞれの重株から製造されるBCGワクチンの優劣を論じている研究論文をしばしば見受けるが、このような実験の結果からワクチンの優劣を論じるのはあまりにも短絡的であって正当とはいえない。培養方法、凍結乾燥工程などを含む製造技術の問題や副反応との関連で定められる用量設定の問題など、製剤としてのワクチン固有の問題が抜け落ちているからである。人体への接種に使用されるものと同じ規格・方法で製造されたワクチンを相互に比較した研究はそれほど多くないが、代表的なものとして、上述のWHO参照品選考のための試験のほかに、1976年に当時の世界の主要BCGワクチン製造所であるパスツール研究所（パリ）、デンマーク国立血清研究所（コペンハーゲン）、グラクソ研究所（ロンドン）、日本BCG研究所（東京）の4製造所が参加したBCGワクチン比較の協同研究をあげることができる。この研究は、4製造所がそれぞれの製造用シード・ロットを交換し、各製造所で4種類のシード・ロットから各自の日常製造法で4種類の凍結乾燥BCGワクチンを製造し、お互いに製品を交換しあって計16種類のワクチンを4製造所の品質管理部門でそれぞれ検査し、結果を集計するという計画であった。この協同研究の結果は部分的にいくつかの論文として公表されているが、残念ながら全体を総括するまとめの論文は公表されていない。利用できる資料からは、どの製造所においてもBCG Tokyo 172から製造したワクチンは他の重株から製造したワクチンと比較して、①単位重量あたりの生菌数が圧倒的に多い、②37℃保存後の生残率が格段に高いことが明らかで、ワクチン製造用株としてのBCG Tokyo 172の優秀性が主要製造所の間での競合的協同研究によってあらためて証明された。

#### 7. 9本針管針を用いた経皮接種<sup>10)</sup>

日本では生後6カ月までの乳幼児に管針を用いた経皮法で事前のツベルクリン反応検査なしでBCG接種をするように予防接種法で定められているが、実際には生後3～6カ月の間に接種が行われている。9本針管針を用いた経皮接種は朽木五郎作らによって日本で開発された方式で、残念ながら皮内接種と比較して経費が高つくため経済的に恵まれていない結核高蔓延国では普及して

いないが、接種局所の副反応を軽減し醜い瘢痕を残さない被接種者に優しい優れた接種法である。例えば韓国では公的には皮内注射による接種が勧奨されていて無料であるが、韓国の新生児の大部分はかなりの金額の自己負担にもかかわらず管針式経皮接種を選択している。よく「経皮接種は技術的に難しい」という議論を聞くことがあるが全くの誤解で、1~2時間の技術講習を受ければ医療技術者なら誰でも容易に確実に正しい経皮接種を行うことができる。これに反して皮内接種は、とくに乳幼児の場合、技術的に非常に難しく、熟練者でも100%確実に皮内接種を行うことは不可能で、ややもすれば皮下注射になって副反応を引き起こしてしまう。事実、経皮接種が普及していたイギリス (Bignell社の器具による) やフランス (Monovaxによる) で製造所の都合でこれらの経皮用ワクチンが製造されなくなり皮内接種に切り替えざるをえなくなったとき、接種担当者たちは技術の困難さに困惑して接種を避けるようになり、また接種局所の副反応が激増したと報告されている。2001年から2004年にかけて南アフリカのケープタウン大学で、同じBCG Tokyo 172-1株を用いた皮内接種用ワクチンと経皮用ワクチンの比較臨床試験が実施され、有効性に差がないことが発表されている。この日本で開発された優れた接種方式の利点が十分に生かされることが望まれる。

#### 8. 世界各国へのBCGワクチンの供給源<sup>11)</sup>

UNICEFは、WHOの事前認定を受けた製造所からBCGワクチンを購入し、経済困窮国にその困窮の程度に応じて無償ないし低価格で供与している。事前認定を受けるには、WHOが派遣する専門家の厳密なGood Manufacturing Practice (GMP) 査察を受けるなど、多くの要求事項に適合しなければならない。現在、WHOの事前認定を受けUNICEFにBCGワクチンを供給しているBCG製造所は、日本BCG研究所、デンマークのStatens Serum Institut (SSI)、インドのSerum Institute of India, Ltd. (SII)、ブルガリアのBB-NCIPD, Ltd.の4製造所だけである。特に、日本BCG研究所は約50年前から毎年大量のBCGワクチンをUNICEFに供給し続けている。かつてBCGワクチン

供給元として実績があったドイツのBehring社、フランスのパスツール研究所、同じくAventis-Pasteur-Merieux (Sanofi-Pasteur) 社、イギリスのGlaxo-Evans (GlaxoSmith-Kline) 社などが相次いでBCGワクチン製造から撤退したため、自国で製造できない世界の結核高蔓延国へBCGワクチンを提供する日本の責務はますます重大になってきている。

用量あたり生菌数が多く(力価が高い)、副反応が少なく安全な、耐熱性の高いワクチンを必要な時期に使用する側に確実に届けるのは容易なことではない。製造・検定・包装・配送・輸出など各部門のスタッフの日常的な努力と技術研修なしには成し遂げられないことである。長い年月にわたり世界の結核蔓延国の乳幼児に優秀なBCGワクチンを供給してきたすべての関係者にこの機会にあらためて感謝と敬意を捧げたい。

謝辞：日本ビーシージー製造株式会社取締役・総務部長 鳥畑秀延氏には数々の貴重な助言を頂いた。厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 兼松・戸井田一郎：『日本におけるBCGの歴史』、『日本におけるBCGの歴史』出版委員会(東京), 2009, の序章の1, 第1章(以下書名を『歴史』と略す)
- 2) 戸井田一郎：BCGの歴史：過去の研究から何を学ぶべきか。呼吸器疾患・結核資料と展望, 2004; 48: 15-40.
- 3) 戸井田一郎：結核予防ワクチンBCG—光と影。臨床とウイルス, 2006; 34: 319-328.
- 4) 『歴史』：序章の5, 第1, 3, 4, 5章, 第14章のI, 第21章の1).
- 5) 『歴史』：第10, 13章.
- 6) 『歴史』：第9章.
- 7) 『歴史』：第14章.
- 8) Markey K, Ho MM, Rigsby P, et al.: International Collaborative Study to evaluate and establish WHO Reference Reagents for BCG vaccine of three different substrains. WHO/BS/09.2114, 2009.
- 9) 『歴史』：第17章.
- 10) 『歴史』：第15章.
- 11) 『歴史』：序章の7.