

結核菌の免疫学的性状に及ぼす亜硝酸の 影響について

第 3 報

亜硝酸殺菌結核菌の免疫効力に対する 菌培養日数の影響についての検討

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤亮教授）

吉	村	政	弘
後	藤		進
三	神	文	彦
岡	野		務

（受付：昭和36年2月16日）

緒 言

結核菌ワクチンに関しては古くから幾多先人によつて考査尋究の術を尽して研究が行われて来ているのであるが、今日人体に應用してその効果を広く一般に認められるに至つたものとしては BCG ワクチン唯一つあるのみである。しかし、その BCG ワクチンも、これが弱毒化菌の生菌ワクチンであるため、製品の免疫効力の均一恒常性を期することが至難であつたり、保存が出来ないと言ふような実用上の不利を伴なうのみならず、他方生体内における毒力復活に対する危惧の念を完全に払拭し切れないと言ふ学理上の障害もあつて、結核ワクチンとして完璧のものとは言えない。そこで BCG ワクチンに代わるものとして、高度の免疫活力と安全性を兼備した死菌ワクチンの実現性如何の問題が再検討されるようになり、すでに結核菌の新しい理化学的処理法による死菌ワクチンの免疫性能に関して報告された研究も少なくない。^{1,2,3)}

当研究室では、さきに吉村⁴⁾によつて、低温・弱酸性で強毒人型結核菌に亜硝酸 (NA) を作

用させると菌はすみやかに殺されること、及びこの亜硝酸処置結核菌ワクチン（以下単に NA 菌ワクチンと略称す）がモルモットの結核感染に対し BCG ワクチンに比して優るとも劣らない程度の顕著な免疫効果を發揮することが報告された。次いで向坂⁵⁾は BCG 菌に対する NA の影響を検して、BCG ワクチンの免疫活性が NA 処置によつて殆んど障害を受けないことを確かめた。

ところで、さきの吉村⁴⁾の研究では、結核菌の NA 処置時間の長短が NA 菌ワクチンの免疫活力に大きく影響することが実証され、その結果吉村は強力活性の NA 菌ワクチンの作製には NA 処置 8 時間が最適であるとした。この成績は NA 菌ワクチンの作製の際における実験条件の重要性を示すものであるが、高度活性のワクチン調製のためにはまた一方菌株の種類や菌の培養環境等によつて決定される菌の生物学的性状の相違についても一応検討が加えられるべきである。

そこで著者等は本研究において、培養日数を指標として結核菌の老若度と NA 菌ワクチン

の免疫活性との影響関係について検索を行った。

実験方法

実験方法はすべて既報の方式^{4, 5)}に準じて行った。

1. 菌株, 亜硝酸処置実験には強毒人型結核菌 H₂ を, また免疫試験の対照ワクチン用として BCG を使用した。何れも当研究室の保存菌株である。また菌培養には Sauton 培地を用いた。

2. ワクチンの調製, ワクチンの調製に当つてはすべての操作が無菌的に行われるよう特に注意した。

a) 亜硝酸処置ワクチン。

人型結核菌 H₂ の, 培養日数が 1, 2, 4 及び 8 週目に相当する 4 群の Sauton 培養 Lot から, それぞれ菌体を濾紙上に採集し, 蒸留水でよく洗滌した後, 各菌体を濾紙間に狭んで水分をできるだけ吸除する。次に各菌体 Lot からそれぞれその一定量を秤量し (半湿潤量), これを適宜数の水晶小球 (直径約 4 mm) を容れた 4 個の肉厚フラスコに入れ, 更に菌量の 50 倍容量の食塩水を加えて, フラスコを約 1 時間回転振盪する。かくして得られた 4 個の菌懸濁液について氷冷下で結核菌の亜硝酸処置を次の如くに行った。

先づ菌液にこれと等量の 4N NaNO₂ 液を加える。この混合液に 2 倍量の 1/2M 酢酸緩衝液 (pH4.1—4.2) を少量宛徐々に混和する。緩衝液を加え終つた後, フラスコ内容を注意しながら静かに別の容器に移し, 容器をそのままの状態を氷冷下に 8 時間静置する。この際, 特に注意して, ガラス壁に菌液が附着残留することのないように, すなわち薬液と接触しない菌が絶無であるように慎重を期して NA 処置を行った。

8 時間の NA 処置終了後, 菌体を遠沈し (4,000rpm, 15 分間) これを蒸留水で反復洗滌し, 洗液が沃度澱粉紙による亜硝酸反応陰性となつたことを確かめた後, 菌濃度が 1 mg/ml となるように食塩水を加え, よく攪拌振盪して可及的均等な菌浮游液とした。

b) BCG ワクチン

Sauton 培地に 7 日間培養した BCG 菌を濾紙上に集め, 水分を濾紙間で吸除した後, その一定量を乳鉢にとつてよく磨砕しながら食塩水を加えて菌濃度

1 mg/ml の浮游液とした。

3. NA 菌ワクチンの無生菌性検査, NA 菌ワクチンの無生菌性に関しては, さきに吉村⁴⁾によつて精査検討されており, その成績によれば所定条件下では 40 分間の NA 処置によつてすでに結核菌は完全に殺菌されることが実証されている。前項において調製した NA 菌ワクチンについて次の如く in vitro 試験を行つてその無生菌性を確かめた。すなわち各 Lot 毎にワクチン 0.2ml 宛を 7 本の小川培地に塗抹し, 37°C で 2 カ月間培養を行つたが, 何れの Lot にあつても菌の発育は全く見られなかつた。

4. 免疫試験, ツベルクリン皮膚反応陰性の健常雄モルモット (体重 450—500gm) を 1 群 7 匹宛の 6 群に分ち, 各群に下記の如くワクチンの腹腔内接種を 1 回行つた。

第 1 群: NA 菌ワクチン (1 週間培養菌) 1 ml (1 mg)

第 2 群: NA 菌ワクチン (2 週間培養菌) 1 ml (1 mg)

第 3 群: NA 菌ワクチン (4 週間培養菌) 1 ml (1 mg)

第 4 群: NA 菌ワクチン (8 週間培養菌) 1 ml (1 mg)

第 5 群: BCG ワクチン 1 ml (1 mg)

第 6 群: 非接種 (対照群)

ワクチン接種後 4 週目に対照群をも含めて全動物に一斉に, 25 日間培養の強毒 H₂ 菌 0.1mg (半湿潤量) を左岸腰部に皮下接種して結核菌感染を行つた。感染後 2 カ月目に生き残つた全動物をクロロホルム致死せしめ, 各動物の脾, 肺, 肝及び菌感染局所リンパ腺における肉眼的結核病変の程度を Feldman 法⁶⁾に従つて区分して記録し, それらをいわゆる Feldman 指数 (Feldman Index; F.I.) として示した。また脾では同時に重量測定を行つてその値をも付記した。尚実験途中において斃死した動物は記録から除外した。

実験成績

第 1 表は前章に述べたように, 培養日数を異にした H₂ 菌 Lot を材料として作られた 4 つの

NA 菌ワクチン並びに BCG ワクチンをもつて, モルモットの結核感染に対する比較免疫試験を

行つて得られた実験成績を一括表示したものである。

この実験では当初、ワクチン接種動物及び非接種動物総計42匹のモルモットのうち、強毒菌による結核感染後2カ月目の実験終了時まで残存した動物は31匹であつた。今まで、各群の平均総Feldman指数について見るに、NA菌ワクチン接種動物群では、第1群の1週間培養H₂菌を材料としたワクチン(1週菌ワクチンと称す；以下同様)接種群では34.6、第2群の2週菌ワクチン接種群で42.1、第3群の4週菌ワクチン接種群では60.9、第4群の8週菌ワクチン接種群では65.3という数値を示した。また第5群のBCGワクチン接種動物群並びに非接種の対照群では夫々52.3及び78.7であつた。このF.I.数値からうかがえる様に、さきに吉村⁴⁾によつて報告された如く、NA菌ワクチン接種動物群にあつては何れの群においても結核侵襲は対照群に比して軽症であつて(就中1及び2週菌ワクチン接種の両群ではBCG接種群よりも軽症である)、而もここで特に重視すべきは、菌の培養週数の小なるもの程病変軽減が顕著であると言う事である。この様な菌の陳旧化に伴なうNA菌ワクチンの免疫活性低下の傾向は、また脾重量値(各群の平均脾重量値は、NA菌ワクチン群では1週菌ワクチン群1.8gm、2週菌ワクチン群1.9gm、4週菌ワクチン群2.9gm、

8週菌ワクチン群3.6gmであり、一方BCG群では1.9gm、対照群では3.4gmであつた。)の比較からも容易にうかがい知ることが出来る。

吉村⁴⁾はさきにNA処置結核菌のモルモットに対する感染防禦賦与能が、NA処置時間の長短によつて著しい影響をこうむることを実証したのであるが、上記の実験成績によつてここに新たにまたワクチン原となる結核菌の老若性がNA菌ワクチンの免疫活力の強弱を左右する重要な一因子であることが明らかになつたわけである。

周知の如く、培養基上の細菌集落は、発育早期では分裂増殖の旺盛な菌集団を主体としたものであるが、時間の経過と共に菌の増殖活力は衰退し、静止菌集団や更に進んでは死菌の混在が漸次多くなる。このような生活環の位相の変遷に伴つて、ただに細菌の生化学的な代謝機能に顕著な違いが生じるのみならず、これと共に種々の生物学的性状にも大きな変異が現われる。この事は結核菌の如き発育の緩徐な細菌では一層著明なものがあると考えられるのであつて、この意味において本研究の成果は、結核菌の生活環位相と免疫学的性状との関係について興味ある新知見を開発したものである。

結 論

Sauton培地に1、2、4及び8週間培養した4Lotの人型結核菌H₂を、夫々亜硝酸処置法によつて殺菌して得た結核菌ワクチンについて、各々のモルモットの結核感染に対する免疫

効力を、BCG生菌ワクチンを対照として相互に比較検討して、亜硝酸処置ワクチンの免疫効力がワクチン原料として用いた菌の培養日数の若いもの程大であるという結果が得られた。

文 献

1) Dubos, R. J., et al. : J. Exp. Med., 79, 221, 1953. 2) Iland, C. N. and Lpool, M. B. : Lancet, II, 277, 1953. 3) Sarber, R. W. et al. : Amer. Rev. Tuberc., 62, 418, 1950.

4) Yoshimura, M. : Jap. J. Tuberc., 4, 145, 1956. 5) Mukozaka, K. : Jap. J. Tuberc., 5, 101, 1957. 6) Feldman, W. H. : Amer. Rev. Tuberc., 48, 248, 1943.

Table 1 Comparison of resistance established in guinea pig
vaccinated with nitrous acid-killed H₂
from cultures of different ages
and with living BCG

Group No.	Vaccine (Age of culture)	Guinea pig No.	Weight of spleen (gm)	Feldman Index by gross examination of organs				
				Inguinal Lymph nodes of the site of infection	Spleen	Lungs	Liver	Total F. I.
I	NA-treated H ₂ (1 week)	1	1.3	2	7	9	5	23
		2	2.2	5	28	12.5	12.5	58
		5	1.8	7	14	6	5	32
		7	1.9	4	10.5	6	5	25.5
		Average	1.8	4.5	15	8.4	6.9	34.6
II	NA-treated H ₂ (2 weeks)	9	1.4	9	7	9	5	30
		10	4.2	4	35	15	20	74
		11	1.1	5	7	9	5	26
		12	1.1	5	10.5	9	5	29.5
		13	1.6	8	10.5	15	5	38.5
		14	2.5	4	24	9	17.5	54.5
Average	1.9	5.8	15.7	11	9.6	42.1		
III	NA-treated H ₂ (4 weeks)	15	4.1	9.5	23	9	20	66
		16	2.0	7	21	9	5	42
		17	3.2	5.5	28	6	20	59.5
		18	2.8	7	35	9	10	61
		21	2.2	5.5	35	15	20	75.5
		Average	2.9	6.9	29.4	9.6	15	60.9
IV	NA-treated H ₂ (8 weeks)	23	2.4	4.5	30	12	12	58.5
		25	3.2	7	21	15	15	58
		26	4.8	3	35	20	15	73
		27	4.0	3	35	18	15	71
		Average	3.6	4.4	30.3	16.3	14.3	65.3
V	BCG	28	1.8	4	28	24	20	76
		29	1.7	6.5	28	9	10	53.5
		30	1.3	4	10.5	6	10	30.5
		31	2	5.5	28	12	15	60.5
		32	1.5	5.5	21	6	5	37.5
		33	1.2	7	14	9	10	40
		34	3.7	9	35	15	10	69
Average	1.9	6.0	23.5	11.4	11.4	52.3		
VI	Non-vaccinated (control)	36	4.9	4	35	24	25	88
		38	2.3	5	28	21	15	69
		39	2.5	4.5	35	15	20	74.5
		40	4.0	4	35	24	20	83
		Average	3.4	4.4	33.3	21	20	83