百日咳菌の液体培養基に関する研究

II 液体培養菌の性状及び液体培地から試製したワクチンの効果

浅 野 浅 雄

大阪市立医科大学細菌学教室(主任 桑島謙夫教授)

[受付: 5月20日 1954年]

I 緒 言

Cohen and Wheeler¹⁾, Gray²⁾, Verwey³⁾, 増井⁴⁾等は液体培地を用いて, I 相百日咳菌ワクチンを調製し, 効力検定を行い, Bordet-Gengou 培地から調製した現行のワクチンに何等遜色ないことを認めている。又, 彼等の指摘する如く, 現在百日咳菌ワクチンの調製には, Bordet-Gengou 培地発育菌が使用されているが, 該培地はワクチン調製上, 技術的, 経済的に多くの不利を残している為, 液体培養より調製したワクチンを使用するのが, 現在最も合理的である。筆者は此の点に鑑み, 吸着剤を含まない液体培地の考案を志し, 硝子玉を使用して, I 型百日咳菌を培養することが出来た⁵⁾。本報に於ては本培地に発育した I 型百日咳菌の生物学的性状を検討し, 更にその全培養液又は培養菌体から調製したワクチンが, 現行の Bordet-Gengou 培地培養菌から製造したワクチンと同等以上の効力を有することを知つたので以下にその成績を記載する。

II 実験材料及び方法

1. 使用培地: 培地は前報⁵⁾に記載した I 型百日咳菌用液体培地を使用した。

2. 使用菌株: 菌株は I 型菌なることを確めた 18-323 株を使用した。

3. 培養方法及び接種: 概ね前報に記載した通りである。300 ml の三角コルベンに 30 ml の前記培地と硝子玉数個を投入し, 約 1 mg/ml の I 型百日咳菌浮遊液を 1 乃至 1.5 ml 加え, 2 乃至 3 日間, 37°C で静置培養を行つた。

4. 生物学的性状の検査: Gundel 反応は, 培養液約 0.2 ml を体重約 300 g の白色 モルモットの背部皮内に接種し, 72 時間後に判定した。I-凝集価は春日等⁶⁾の方法にて調製した I-因子血清を用いて測定した。

5. ワクチンの調製法: 全培養ワクチンは液体培地に 2 乃至 3 日培養後, 500 倍マーゾニン液を 1/10 容に加

え氷室に保存し, 生菌の存在しないことを確めた後, 使用に際して 5,000 倍マーゾニン加生理的食塩水で稀釈し,

光電比色計を用いて, 所要の濃度に調製した。菌体ワクチンは, 全培養を 5,000 倍マーゾニン加生理的食塩水にて, 2 回遠心洗滌し, 更に原量に戻して氷室に保存し使用時に比色計を用いて所要の濃度に調製した。尚各ワクチンは生菌の存在しないことを確めた後に使用した。対照に用いた現行ワクチンは, 薬局方⁷⁾記載の方法に準じ, Bordet-Gengou 培地上発育菌を用いて調製した。

6. 試製ワクチンの効力検定法: 各ワクチン共 11~12 g の健康マウスの腹腔内に, 0.5 ml 宛接種し, 10 日後に, Kendrick その他の方法⁸⁾を稍々変更して, 18-323 株の Bordet-Gengou 培地 48 時間培養菌体を, 1% Casamino acid 溶液に浮遊させ, その 0.025 ml 宛を, マウスの脳内に注射し, 14 日間マウスの生死を観察した。

III 結 果

1. 生物学的性状(第 1 表参照)

液体培地に継代毎に, 培養菌を染色検鏡し, 菌形の変化を検討したが, 原菌と大差なく, 発育は 8 代後より速になつた。

液体培養菌の I-凝集価は, 第 1 表に見られる如く, 4 代迄は原菌の凝集価を保ち, 以後継代を続けるに従い次第に低下して行くのが認められた。

各代毎に, Bordet-Gengou 培地, Chocolate 寒天培地, 普通寒天培地に移植した。Bordet-Gengou 培地上

ASANO Asao: Studies on the fluid culture medium for *H. pertussis*. II. Biological characteristics of *H. pertussis* grown in the fluid medium and the protective effect of the pertussis vaccine prepared from the whole fluid culture. Department of Bacteriology, Osaka City Medical School — Jap. J. of Bact., 9(10), 825-827, 1954.

第1表 硝子玉加培地培養菌の生物學的性状

継代	凝集価	溶血	普通寒天	チョコレート寒天	Gundel 反応(直径)
					mm
1	6,400	+	—	—	14×18
2	6,400	+	—	—	14×16
3	6,400	+	—	—	14×11
4	6,400	+	—	—	14×13
6	3,200	+	—	—	11×12
8	3,200	+	—	±	6×9
10	1,600	+	—	+	5×5
対照	6,400	+	—	—	15×18

には良好に發育し、10代迄溶血が認められた。Choco_{late} 寒天培地上には發育を認めず、10代後僅かに發育が認められた。普通寒天培地上では10代迄全く發育は認められない。Gundel 反応は6代迄陽性を示した。

2. 試製ワクチンの感染防禦効果

Bordet-Gengou 培地培養菌から現行法に従つて製造したワクチンと、液体培地2日間全培養から調製したワクチンの効力を比較すると、3547 LD₅₀の攻撃に対し、現行ワクチンに比して優るとも劣らない成績を得た。しかしながら液体培地9日培養液から調製したワクチンは効力が稍劣っていた。又3日培養液ワクチンは6026 LD₅₀の攻撃に耐え優秀な成績を示した。又液体培養菌体のみから調製したワクチンは全培養ワクチンと同等の成績を示した。以上の成績から液体培地から調製したワクチンは Bordet-Gengou 培地培養菌体から製造したワクチンと同等或いはそれ以上の成績を示し、且つ最も發育の良好な3日培養から製造することが可と考えられる。(第2, 3, 4表参照)

IV 考 察

現行の百日咳ワクチンは Bordet-Gengou 培地培養菌

第2表 3種ワクチンの感染防禦力の比較

種 類	菌 量 (億)	免疫回数	免疫日数	攻 撃 量	マウス数		
					全	生	死
B. G. 培 地 ワ ク チ ン	15 3	1回	10日	3547 LD ₅₀	7	2	5
					9	3	6
2日培養液体培地 地 ワ ク チ ン	15 3				9	4	5
					7	4	3
9日培養液体培地 地 ワ ク チ ン	15 3				11	4	7
					8	3	5

第3表 3日培養全培養ワクチンの感染防禦力

種 類	菌 量 (億)	免疫回数	免疫日数	攻 撃 量	マウス数		
					全	生	死
3日培養液体培地 地 ワ ク チ ン	15 3 0.6	1回	10日	6026 LD ₅₀	9	7	2
					7	4	3
					6	2	4

第4表 全培養ワクチンと菌体ワクチンの効力の比較

種 類	菌 量 (億)	免疫回数	免疫日数	攻 撃 量	マウス数		
					全	生	死
2日培養 液体培地 ワ ク チ ン	15 3 0.6	1回	10日	1×10 ⁻³ mg	8	7	1
					7	4	3
					10	3	7
2日培養 液体培地 菌 体 ワ ク チ ン	15 3 0.6				8	8	0
					9	5	4
					9	3	6
対 照	—				10	1	9

体を材料としたワクチンである為、極めて経費も高く、且つ大量生産の目的の為には種々の困難が伴っている。しかもワクチンの製造にはI型菌を用いなければならぬという事が明らかになつてから⁹⁾、極めて型変異を起し易いI型菌を Bordet-Gengou 培地から大量得ることは、種々の隘路が存する現状である。このような難点は、液体培地を用いることによつて解決することが出来るが、現在迄の液体培地は炭末や澱粉の如き吸着剤を含有して居り、我国で最も広く行われている炭末加培地は炭末を除くために、種々の苦心が必要である。又澱粉加培地を用いると、I型菌の發育は極めて不良で、ワクチンの製造には不適である。液体培地の培養液をそのままワクチンとすれば、培地中に拡散した可溶性抗原の損失がなく、又固形培地培養菌を洗滌する為に生ずると考えられる表面抗原の損失も無い。以上の欠点を除外し得たと考えられる硝子玉加培地から調製した全培養ワクチンは、現行法によつて調製したワクチンに比し、効力は優るとも劣らず、数回の実験に於て、常に同一傾向を示した。以上の事実からしても、著者の方法は百日咳菌ワクチンの製造方針に新たな示唆を与え得たと考えられる。即ち液体培養濃液がワクチンに匹敵する免疫効果を有する¹⁰⁾ことからして、全培養ワクチンの場合には、更に効力の増強が認められるのであろうと想像されるからである。しかし予想に反して、そのような事実は大して

認められず、且つ全培養ワクチンの効果が、液体培養菌体から調製したワクチンと略々同等の効果を示した。この事は免疫の成立には抗原の投与によつて、マウスの抗体産生能が最大に発揮出来得ることが必要であり、菌体の有する毒性がマウスの生活機能に影響を与えたと考えらるべきであろう。又ワクチンの製造には *I*-凝集価、毒力その他の生物学的性状から推して、Bordet-Gengou培地から移植後3～4代迄が使用出来るものと考えられる。

V 結 論

1. 硝子玉加培地に発育した *I* 型百日咳菌は3代位までは *I* 型菌の性状を保持するが、以後次第に *I*-凝集価は低下する。

2. 液体培地の全培養から調製したワクチンは現行の Bordet-Gengou 培地から調製したワクチンと同等の効果を示した。

本稿を終えるに当り、絶えず御懇切なる御指導御校閲

を賜つた桑島教授、増井助教授に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) Cohen, S. M. and Wheeler, H. W.: A. J. P. H., 36, 371, 1946.
- 2) Gray, D. F.: J. Immunol., 67, 35, 1949.
- 3) Verwey, W. F. and Sage, D.: J. Bact., 49, 520, 1945.
- 4) 増井正幹: 細菌学雑誌, 5, 319, 1950.
- 5) 浅野浅雄: 日本細菌学雑誌, 9, 279, 1954.
- 6) 春日忠善, 中瀬安清, 浮島光威, 高津邦芳: 日本細菌学雑誌, 8, 814, 1953.
- 7) 第六改正日本薬局方註解, p. 997.
- 8) Kendrick, P. L., Eldering, G., Dixon, M. K. and Misner, J.: Am. J. Hyg., 37, 803, 1947
- 9) 春日忠善, 中瀬安清, 浮島光威, 高津邦芳: 日本細菌学雑誌, 9, 99, 1954.
- 10) 桑島謙夫, 増井正幹, 浅野浅雄: 第27回日本細菌学会総会, 講演, 1954.