Studien über B C G-Aufschwemmung.

I. Mitteilung.

Von

Toshiaki Ebina, Yasaburo Takahashi und Hisayuki Ishikawa.

(海老名敏明)

(高橋彌三郎)

(石川久之)

*(Aus der Medizinischen Klinik an der Tohoku Kaiserlichen
Universität zu Sendai.*

Leiter: Prof. Dr. T. Kumagai.)

Seitdem Calmette und Guérin BCG (Bacille Callmette-Guérin) als antituberkulöses Vaccin gebraucht haben, ist B C G allorts vielfach eingehenden Studien unterworfen worden, und es liegen sogar auch mehrere Versuche vor, diese Bazillen praktisch anzuwenden, trotzdem diese Schutzimpfung noch keine allgemeine Anwendung gefunden hat. Für die praktische Anwendung ist eine der wichtigsten Vorbedingungen, dass die B C G-Aufschwemmung eine gewisse Zeit lang unveränderlich haltbar bleiben muss. Als Aufschwemmungsmedium brauchten Calmette und seine Mitarbeiter¹⁾ vierfach verdünnte Sautonsche Nährflüssigkeit und Aronson²⁾ 4% Glyzerin in 1% Glukoselösung. Gewöhnlich nimmt man physiologische Kochsalzlösung als Aufschwemmungsmedium, aber diese Salzlösungsaufschwemmung hält nicht lange an. Wir haben nun versucht, zu finden, was für Lösungen für diesen Zweck geeignet sein könnten. B C G wurde auf 5% Glyzerinkartoffeln etwa 10 Tage lang gezüchtet und die erste Aufschwemmung wurde in einem Achatmörser mit physiologischer Kochsalzlösung so dicht gemacht, dass in 1,0 ccm 1 mg Bazillenmasse enthalten war. Diese Aufschwemmung wurde mit verschiedenen zu untersuchenden Medien weiter verdünnt, so dass 1,0 ccm 0,01 mg Bazillenmenge enthält.

Um eine homogene Aufschwemmung zu bekommen, haben wir die B C G-Kulturmasse mit ausserordentlich wenig Flüssigkeit bzw. Medium in einem kalten Achatmörser so vorsichtig verrieben, dass eine

dünne Bazillenmembran auf dem Boden des Mörsers gebildet wurde, und dann haben wir die Mediumflüssigkeit tropfenweise hinzugefügt. Solche Aufschwemmungen, von denen 1,0 ccm 0,01 mg Bazillenmasse enthielt, wurden in 2 Teile geteilt und der eine bei Zimmertemperatur, der andere im Eisschrank stehen gelassen. Eine bestimmte Menge dieser Aufschwemmung wurde auf dem Eiernährboden nach Oka und Katakura³⁾ unserer Klinik in 16 cm lange und 1,5 cm dicke Röhrchen gezüchtet. Die schräge Fläche dieses Nährbodens betrug beinahe 15 cm². Die Röhrchen wurden bei 38°C gehalten und nach einem Monat die gewachsenen Kolonien gezählt.

Versuchsergebnisse.

Versuch I.

Als Medien benutzten wir physiologische Kochsalzlösung (PH 6,0), 5% Glycerinlösung (PH 6,6), 4fach verdünnte Sautonsche Flüssigkeit (PH 7,2) und 4fach verdünnte Kirchnersche Nährflüssigkeit. Jeden Tag wurde 0,05 ccm jeder Aufschwemmung mit einer Pipette auf die schräge Nährbodenfläche gegossen und dann mit einer Öse sorgsam und gleichmässig auf der Fläche eingerieben.

Gleich vor der Züchtung haben wir die Röhrchen sorgsam und gründlich geschüttelt, um jedes Mal eine gleichmässige Verteilung der Bazillen in der Aufschwemmung zu bekommen. Bis zum zweiten Tag war die Kolonienzahl aller bei Zimmertemperatur und 4°C gehaltenen Aufschwemmungen fast gleich. Danach machten sich deutliche Un-

Tabelle I.

Tag d. Kultur	Physiologische Kochsalzlösung		5% Glycerin- Wasser		4fach verdünnte Sautonsche Nährflüssigkeit		4fach verdünnte Kirchnersche Nährflüssigkeit	
	PH 6,0		PH 6,6		PH 7,2			
	4°C	Zimmer- temperatur	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.
1		42		74		42		74
2	43	35	75	44	33	43	84	63
3	22	7	68	10	61	15	63	34
4	20	5	15	5	20	5	29	20
6	7	8	12	8	7	0	33	20
8	19	1	10	0	17	7	14	
10	1	0	9	0	3	0	14	
13	5	0	17	0	9	1	8	
15	2	0	10	0	2	0	8	
18	2	0	9	0	2	0	8	
23	1	0	3	0	2	0	0	
29	0	0	0	0	0	0	0	

B C G 0,01 mg in 1,0 ccm Aufschwemmung enthalten.

Z. T. bedeutet Zimmertemperatur.

terschiede bemerkbar. Vom dritten Tag an nahm die Kolonienzahl der im Zimmer stehen gebliebenen Aufschwemmungen und vom vierten Tag an der im Eiskeller gehaltenen Aufschwemmungen ab. Nach dem zehnten Tag konnten wir keine Kolonien mehr aus den im Zimmer stehen gebliebenen Aufschwemmungen kultivieren, dagegen liessen sich aus den im Eiskeller gehaltenen bis zum 20sten Tage noch einige Kolonien züchten.

Aus diesem Versuche kann man schon sehen, dass die B C G-Aufschwemmung im Eisschrank haltbarer als bei Zimmertemperatur ist.

Versuch II.

Im zweiten Versuche wurden wieder physiologische Kochsalzlösung, 5% Glyzerinlösung, 5% Traubenzuckerlösung, 5fach verdünnte Sautonsche Flüssigkeit und 5% Glyzerinbouillon als Aufschwemmungsmedien gebraucht.

Die Wasserstoffionenkonzentration dieser Aufschwemmungen betrug meistens 6,0. Wie die Tabelle II zeigt, konnten wir am vierten Tag nur aus 5% Glyzerinlösung fast so viele Kolonien wie am ersten Tag züchten, dagegen aus anderen Aufschwemmungen nur stark verminderte Kolonien.

Tabelle II.

Medium Tag d. Kultur	Physiologische Kochsalzlösung		5% Glyzerin- wasser		5% Glukose- lösung		5fach ver- dünnte Sa- utonsche Nährflüssig- keit		5% Glyzerin- bouillon	
	P _H 6,0		P _H 6,6		P _H 6,0		P _H 6,0		P _H 6,0	
	4°C	Zimmer- temperatur	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.
1		169		181		195		155		167
2	190	48	213	93	166	16	171	94	159	
4	49	24	118	58	12	20	47	44	35	
6	23	13	48	6	3	0	14	4	47	
11	7	4	15	24	3	0	12	7	16	
14	9	3	39	0	0	0	25	31	19	
19	5	1	15	0	2	0	7	11	7	
22	1	0	2	0	0	0	2		0	

B C G 0,01 mg in 1,0 ccm Aufschwemmung enthalten.

Versuch III.

Im dritten Versuche prüften wir Leitungswasser und 5% von jeder der folgenden Lösungen als Aufschwemmungsmedien: Glukose-, Maltose-, Mannit-, Laktose-, Laevulose- und Galaktoselösung. Die Wasserstoffionenkonzentration des Leitungswassers betrug ca. 7,0, die der 5% Laktoselösung 6,2. Bei den anderen war sie stets 6,0. Nach

dieser Untersuchung war die BCG-Aufschwemmung in 5% Mannitlösung am haltbarsten, wenn sie im Eisschrank gehalten wurde. Wir konnten nach dem zwölften Tag eben so viele Kolonien aus derselben kultivieren wie gleich nach der Herstellung der Aufschwemmung.

Tabelle III.

Tag d. Kultur	Medium		Leitungswasser		5% Glukose- lösung		5% Maltose- lösung		5% Mannit- lösung		5% Laktose- lösung		5% Lävulose- lösung		5% Galaktose- lösung	
	PH		7,0		PH 6,0		PH 6,0		PH 6,0		PH 6,2		PH 6,0		PH 6,0	
	4°C	Zimmer- temperatur	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.
1		53		41		84		81		55		97		39		
2	27	11	38	14	61	61	62	66	74	39	52	9	29	27		
4	7	1	3	3	26	16	50	27	10	5	5	0	21	4		
6	16	0	4	3	3	3	30	17	4	2	1	0	34	2		
8	11	2	2	3	28	20	50	40	3	2	2	0	22	2		
12	6	3	0	0	17	6	50	16			0	0	1	1		
19	2	0	0	0	2	2	32	0	0	0	0	0	0	0		

BCG 0,01 mg in 1,0 ccm Aufschwemmung enthalten.

Versuch IV.

0,02 mg BCG-Aufschwemmung in 5% Mannitlösung wurde teils in Reagensgläsern teils in Ampullen und zwar im Eisschrank gehalten.

Jede Ampulle war 5 ccm gross und wurde mit 2,0 ccm Aufschwemmung gefüllt. Jeden Tag wurden neue Ampullen auf ihre lebende Bazillenzahl nach der oben beschriebenen Weise geprüft. Wie man aus der Tabelle IV sieht, konnten wir bei allen Versuchen in beiden Teilen Kolonien in ungefähr gleicher Zahl herauszüchten. Aus diesem Versuche ist ersichtlich, dass

Tabelle IV.

Tag d. Kultur	Reagensglas	Ampulle
1	98	
2	118	
3	66	94
4	63	98
5	69	71
6	115	66
7	95	85
9	49	80
11	71	90
14	36	72
17	21	59
20	46	43
22	38	24
24	51	42
29	10	29

0,02 mg in 1,0 ccm 5% Mannitlösung enthalten.

die B C G-Aufschwemmung in Ampullen ebenso gut haltbar ist wie in Reagensgläsern.

Versuch V.

In diesem Versuche wurden folgende Flüssigkeiten geprüft: physiologische Kochsalzlösung, 5% Mannitlösung, 2fach verdünnte Sautonsche Flüssigkeit, 4% Glukoselösung mit 1% Glyzerinzusatz, 5% Glyzerinwasser, 5% Mannitlösung mit 0,1% Stärkezusatz und *modifizierte Lockemannsche Flüssigkeit mit 0,005% zitronensaurem Eisenoxydammonzusatz. Die Wasserstoffionenkonzentration aller Medien war P_H 7,1. 1,0 ccm dieser Aufschwemmungen enthielt 0,0005 mg B C G. Das Kondenswasser wurde zuerst aus den Gläsern weggegossen und 0,05 ccm dieser Aufschwemmung in Reagensgläser derart hineingegossen, dass die Oberfläche des Nährbodens mit dieser Flüssigkeit gleichmässig bedeckt wurde. Dann wurden die Reagensgläser bis zum nächsten Morgen auf dem Tisch liegen gelassen, damit die Aufschwemmung auf der Oberfläche des Nährbodens gänzlich von demselben absorbiert werde. Sonstige technische Einzelheiten waren dieselben wie bei den anderen Versuchen. Aus diesem Versuche konnten wir ersehen, dass 5% Mannitlösung oder 5% Mannitlösung mit 0,1% Stärkezusatz für diesen Zweck geeignet ist.

Tabelle V.

Tag d. Kultur	Medium		Physiologische Kochsalz- lösung		5% Mannit- lösung		2fach ver- dünnte Sau- tonsche Flüssigkeit		4% Glukose in 1% Gly- zerinlösung		5% Glyzerin- lösung		5% Mannit in 0,1% Stärke- lösung		Modifizierte Locke- mannsche Flüssigkeit mit 0,005% Fe	
	P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1		P_H 7,1	
	4°C	Zimmer- temperatur	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.
1		32		43		43		50					25		44	
2	16	24	30	27	31	32	22	34	19	16	33	33	19	5	6	
3	12	10	6	23	17	12	11	12	5	3	15	17	5	3		
5	11	7	16	13	12	13	6	11	2	3	26	31	5	2		
7	4	1	10	10	15	10	6	6	0	1	15	19	2	0		
9	1	1	7	1	3	4	4	4	1	1	11	4	3	0		
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
23	1	0	4	0	2	0	2	0	0	0	4	1	0	0		
30	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0		

B C G 0,0005 mg in 1,0 ccm Aufschwemmung enthalten.

Versuch VI.

Geprüft wurden in diesem Versuche folgende Flüssigkeiten: Kir-

* Anstatt Asparagins der Lockemannschen Nährlösung brauchen wir glutaminsaures Natrium in dieser Nährflüssigkeit.

chnersche Nährflüssigkeit, 5% Mannitlösung mit 0,2% Gelatinzusatz, 5% Mannitlösung mit 1% Stärkezusatz und modifizierte Lockemannsche Nährflüssigkeit mit 0,005% zitronensaurem Eisenoxydammon- und 5% Mannitzusatz. PH war in allen Medien 7,1. Diese Bazillenaufschwemmungen enthielten 0,02 mg Bazillenmasse pro 1,0 ccm. Technische Einzelheiten waren die gleichen wie bei Versuch V.

In diesem Versuche waren aufgewachsene Kolonien so zahlreich, dass man sie nicht zählen konnte.

Wie man aus der Tabelle VI sieht, konnten aus diesen vier BCG-Aufschwemmungen bei Zimmertemperatur und 4°C nach 10 Tagen eben so viel Einzelkolonien wie am ersten Tag herausgezüchtet werden. Am 27ten Tage zeigten BCG-Aufschwemmungen mit Kirchner-scher Nährflüssigkeit und Mannit-Gelatinlösung nicht so verminderte Kolonien. Am 37ten Tage konnten wir auch aus Kirchnerscher Flüssigkeit mehr Kolonien als aus den anderen kultivieren.

Tabelle VI.

Tag d. Kultur	Medium		Kirchnersche Nährflüssigkeit		5% Mannit- lösung mit 0,2% Gelatin		5% Mannit- lösung mit 1% Stärke		Lockemann- sche Flüssigkeit mit 0,005% Fe u. 5% Mannit.	
			PH 7,1		PH 7,1		PH 7,1		PH 7,1	
	4°C	Zimmer- temperatur	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.	4°C	Z. T.
1		+++		+++		+++		+++		+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	×	+++
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	+++	×	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
13	++	++	+++	++	+++	×	++	++	++	×
23	++	++	++	0	++	+	++	0	++	+
27	++	++	++	++	+	+	++	0	++	+
31	++	++	+	++	0	0	++	++	++	+
37	+++	++	+	++	0	0	+	+	+	+

+ Kolonie bis 99 ++ 100-199 +++ über 200 ++++ unzählbar
BCG 0,02 mg in 1,0 ccm Aufschwemmung enthalten.

Dieser letzte Versuch zeigte uns, dass BCG in Kirchnerscher Nährflüssigkeit und 5% Mannitlösung mit 0,2% Gelatinzusatz ziemlich lang leben kann.

Unsere Versuche sind also ein Beleg dafür, dass BCG-Aufschwemmung bei Zimmertemperatur und noch besser bei 4°C ziemlich lange haltbar ist, wenn sie mit geeigneten Medien hergestellt wird. Es gibt vielleicht verschiedene brauchbare Medien. Vier Nährflüssig-

keiten, die wir im letzten Versuche geprüft haben, nämlich die Kirchnersche Nährflüssigkeit, 5% Mannitlösung mit 0,2% Gelatinzusatz, 5% Mannitlösung mit 1% Stärkezusatz und modifizierte Lockemannsche Nährflüssigkeit mit 0,005% zitronensaurem Eisenoxydammon- und 5% Mannitzusatz sind zweckmässig.

Besonders ist die Kirchnersche Nährflüssigkeit nach unserer Untersuchung die beste, aber praktisch ist es zu schwer, eine grosse Menge derselben herzustellen. Deshalb gebrauchen wir jetzt 5% Mannitlösung mit 0,2% Gelatinzusatz als Medium, wenn wir B C G-Aufschwemmung einige Tage nach ihrer Herstellung parenteral impfen wollen.

Weitere Versuche, um noch geeignetere Medien zu finden, werden fortgesetzt. Wir werden in der zweiten Mitteilung weitere Ergebnisse folgen lassen.

Zusammenfassung.

Es wurde versucht, eine lange Zeit haltbare B C G-Aufschwemmung für die parenterale Impfung zu bekommen.

Für diesen Zweck sind die Kirchnersche Nährflüssigkeit und 5% Mannitlösung mit 0,2% Gelatinzusatz unter den von uns geprüften Medien am geeignetesten.

Diese Forschung wurde durch Bereitstellung von Mitteln seitens des Unterrichtsministeriums für wissenschaftliche Forschung ausgeführt, wofür herzlich gedankt sei.—Prof. Dr. T. Kumagai.

Literatur.

- 1) Calmette, Ztschr. f. Tbk., 1930, 58, 129.
 - 2) Aronson, Am. J. of Dis. of Children. 1935, 30, 1117.
 - 3) Oka, Katakura, Nihon Rinsyo Kekkaku, 1940, I, 59.
Oyama, Tohoku Journ. of Exp. Med., 1941, 39, 508.
-