廿日鼠に於ける第Ⅲ型肺炎雙球菌の感 染防禦に關する實驗的研究

宮 村 守 人

Miyamura, Morito

東京帝國大學傳染病研究所第七研究部 (部長 長谷川秀治教授)

〔受付：昭和19年5月10日〕

本報告の要旨は昭和19年4月の傳染病研究所學術集談會に於て演述した。

緒 言

Avery, Heiderberger 一派に依る肺炎雙球菌々體成分の研究が、1923年に發表されて以來俄然その免疫學的應用への研究が促進され、遂ひに。Goebel⁽¹⁾⁽²⁾は、實驗的に Cellobiuron-酸ミ蛋白質ミの化合物を人工的に合成し、之を以て、廿日鼠を免疫して、第Ⅲ型肺炎雙球菌に對する感染防禦力を附與し、且つ之を以て、家兎を免疫して、得た免疫血清に依り、動物に高度の被動性免疫を與へ得ることを證明した。其の後、陸續ミして、本菌の免疫に關する研究が、總ゆる角度から行はれ實に枚舉に遑ないのであるが、Avery, Dubos, Francis, René 等の本菌の菌體毒物を消化する酵素に依る感染防禦能に關する研究等は益々本菌多糖類の研究に、從つて諸々の免疫學的研究に、限り無き希望を抱かせるのである。一方、毒素に依る、本菌の免疫學的研究は、未だ決定的のものなく、完成の域に、途遠しの感がある。Coca⁽³⁾⁽⁴⁾は、彼の培養方法に依り、本菌の菌體外毒素を得た。ミ云つたが、感染防禦能に乏しく、今尙ほ、本菌々體外毒素の產生は、困難視されてゐる。

今回、私は、長谷川教授指導の下に於て、細谷教授一門のペプトンを種々な方法で、加水分解して得た培地に、種々な菌を培養し、毒素產生、その他に應用された實驗方法⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾に示唆されるところあつて、馬肉をババインにて消化して得たブイオンに、第Ⅲ型肺炎雙球菌を培養し、其に就て、實驗した結果、或る程度に、本菌の感染防禦力を示すことを、廿日鼠の體内に於て、認めたので、茲に報告し、大方の御批判を仰ぐ次第である。

實 驗

菌株 傳染病研究所第7研究部に於て、第Ⅲ型肺炎雙球菌を感染させて、斃死した廿日鼠の脾臓を鹽化カルシウムにて乾燥し、氷室に1938年10月以來保存してあるものを、滅菌乳鉢にミり、細挫して、適量のブイオンに浮游させた乳劑を、廿日鼠の腹腔内に接種し翌日その心血を血液寒天平板に培養、分離した後に、血清學的に、第Ⅲ型肺炎雙球菌ミ決定したものを、本實驗に供した。その最少致死量は、13g 前後の廿日鼠に對して、 10^{-7} mg である。

培養基の製法 馬肉 300g を、常水 1l と共に、容量 2l のコルベンに入れ、ババイン 5g を投入して、50°C 乃至 55°C に於て、4 時間浸出し、同時にババインを馬肉に充分作用させる。次いで、その儘直ちに 15 ポンド 20 分間高壓滅菌を施し、濾紙にて、濾過し、その濾液 1l につき、食鹽 5g を加へ、充分に混和して、溶解させた後に、苛性曹達にて、pH を 7.4 に修正し、再び煮沸、濾過した後、300cc 容量の三角コルベンに、100cc ずつ分注して、100°C 30 分間宛 3 回間歇滅菌を行ひ、更に、豫め 100°C 15 分間宛 3 回間歇滅菌を行つた葡萄糖溶液を、0.5% になる様に、無菌的に添加して、培養に供した。

一方、丸川ペプトンを用ひて、作つた普通ブイヨンに、前記の様にして、葡萄糖を加へたものを、對照實驗に供した。

ババインは、日本酵素工業株式會社製造のものを、Willstätter 氏法に則つて、精製したものを、用ひた。

培養法 普通ブイヨンに、18 時間宛 3 代繼代培養した。上記菌株を、駒込ビベットにて、約 0.5cc 宛、上記 2 種の培地に移植し、37°C にて、18 時間培養した。記載の便宜上、實驗培地に培養したものを、第 I 液、對照培地に培養したものを、第 II 液と名づけることにする。

實驗に用ふる液の製法 上記第 I、第 II 兩液を、各々 3000 回 30 分間宛、遠心沈澱し、その上清を、Seitz 型東洋濾紙濾過板にて、水道水による吸引濾過を行ひ、夫々第 III 液、第 IV 液と名づける。他方遠心沈澱の折の沈澱を、生理的食鹽水に浮游させて、1cc 中 1mg の菌液をつくり、夫々第 V 液、第 VI 液と名づける。

更に對照として、血液寒天斜面に、18 時間培養した本菌を、生理的食鹽水に浮游させて、1cc 中 1mg の菌液を得、之を第 VII 液と呼ぶ。

斯くして、上記第 I、第 II、第 III、第 IV、第 V、第 VI、第 VII の各液に、局方フォルマリンを、0.2% の割に加へ、37°C に 10 日間放置することにより、所要の液を得た。

所謂第 III、第 IV 液の毒素としての實驗

即ち、この兩液のフォルマリン添加以前の狀態に於て、廿日鼠に對する最少致死量 (以後 M. L. D. と書く)、海狸皮膚に對する最少壞死發生量 (以後 M. N. D. と書く)、牛血球に對する最少溶血價 (以後 M. H. D. と書く) を決定し、並びに、牛腸膜に依る透析性の有無、熱に對する態度等を檢した。

(イ) M. L. D. の決定には、これら 2 液の種々な量を、夫々 1 群 4 匹宛の廿日鼠の皮下に注射して、48 時間後に、その生存數に依り、判定した。この場合の廿日鼠の體重は 12g 前後であつた。

(ロ) M. N. D. の決定には、白色雄性の海狸 2 匹を用意し、その背部の毛を刈り、脊柱に對し、對稱的に、これら 2 液の生理的食鹽水による、各種の稀釋液を、0.1cc 宛皮内に注射し、24 時間後に、判定した。

(ハ) M. H. D. の決定には、脱纖維した、新しい牛血液を、2000 回 5 分間宛 3 回、生理的食鹽水

で、洗滌したものを、生理的食鹽水に1%の割に浮遊させたものを用ひた、即ち、これら2液を生理的食鹽水で、種々な濃度に稀釋した液を、0.5cc 宛小試験管に分注し、それに前記血球浮游液を0.5cc宛加へ、充分振盪して、37°C に2時間置き、次いで室温に1晝夜放置して、判讀、判定した。この場合に對照として、蒸溜水と生理的食鹽水とを置いた。

(ニ) 透析には、牛腸膜2個を用ひ、その各々に第Ⅲ、第Ⅳ液の適當量を容れ、此を、晝間時約15°C 前後の流れてゐる水道水の水槽に、1晝夜懸吊した後に、その内容に就て、M.H.D. のみを檢した。透析方法以外の實驗條件は、凡て、前述(ハ)の場合と同様である。

(ホ) 熱に對する態度は、一定時間、一定温度に、夫々の液を中試験管に容れて、保つた後に、その内容について、前と同様な實驗條件の下に於て、M.H.D. のみを決定した。

動物實驗 體重13g 前後の廿日鼠10匹を1群とし、上記のフォルマリンを添加した液を廿日鼠の皮下に、隔日に0.1cc, 0.15cc, 0.15cc宛注射し更に、1日隔いて、0.15ccを皮下注射し、その後直ちに、M.L.D. の100倍量の第Ⅲ型肺炎雙球菌を腹腔内に、感染させた。即ち、血液寒天斜面上に18時間培養した本菌を、ブイヨンに浮遊させて、その 10^{-5} mgを、廿日鼠に腹腔内注射したのである。

この場合、對照として、無處置の廿日鼠10匹に、同量の菌を感染させた。

更に、本實驗培地そのものに、本菌の免疫元様物質が存するや、否や、を檢するために、本培地に依り、前記處置方法と同様に、前處置した1群の廿日鼠を用意し、此に、同量の菌を感染させた。而して、感染後72時間目に成績を判讀、決定した。

第1表

第一液	實驗培地に培養したもの
第二液	對照培地に培養したもの
第三液	第一液を遠心沈澱し、その上清の濾液
第四液	第二液を遠心沈澱し、その上清の濾液
第五液	第一液を遠心沈澱し、その沈渣の浮游液
第六液	第二液を遠心沈澱し、その沈渣の浮游液
第七液	第Ⅲ型肺炎雙球菌の浮游液

第2表

Ninhydrin	—
Biuret	+
Xanthoprotein	+
Millon	+
Hopkins-Cole	+
PbS	+
Molisch	—

(註) — は陰性
+ は陽性
Ninhydrin 試薬は
Bayer-Meister-Lucius

第3表

	M. L. D.				M. N. D.			M. H. D.							
	0.5cc	0.1cc	0.05cc	0.01cc	原液	10×	50×	100×	10×	50×	100×	200×	500×	1000×	蒸 食
第Ⅲ液	生	生	生	生	±	—	—	—	±	++	+	±	—	—	++ —
第Ⅳ液	生	生	生	生	±	—	—	—	++	++	++	+	±	—	++ —

第 4 表

	10×	50×	100×	200×	500×	1000×	蒸	食
第Ⅲ液	++	++	+	±	—	—	++	—
第Ⅳ液	++	++	++	+	±	—	++	—

第 5 表

度	分	液	10×	50×	100×	200×	500×	1000×	蒸	食
55	30	Ⅲ	++	+	±	—	—	—	++	—
		Ⅳ	++	+	±	—	—	—	++	—
55	60	Ⅲ	+	±	—	—	—	—	++	—
		Ⅳ	+	±	—	—	—	—	++	—
70	30	Ⅲ	—	—	—	—	—	—	++	—
		Ⅳ	—	—	—	—	—	—	++	—
100	10	Ⅲ	—	—	—	—	—	—	++	—
		Ⅳ	—	—	—	—	—	—	++	—

(註) M.N.D. の欄：±は 僅かな發赤

—は 變化なし

M.H.D. の欄：++は 完全溶血

+は 殆んど溶血

±は 稍々溶血

—は 溶血せず

實驗成績

實驗に使用した各液の名稱ミ、その成り立ちを、纏めて、第1表に示した。

實驗に供した、ババインによる消化培地の蛋白呈色反應の結果を、第2表に示す。

扱て、第Ⅲ、第Ⅳ兩液の毒素ミしての性状は、先づ第3表に示す如く、殆んど、その毒性を認め得なかつた。即ち、M.L.D. は決定出來ず、M.N.D. も亦決定出來なかつた。僅かに原液を注射した局所に輕度の發赤を示したのみである。且つ M.H.D. は第Ⅲ液で50倍、第Ⅳ液で100倍を示したに過ぎなかつた。第4表は、透析後の M.H.D. を示したのであるが、透析前の M.H.D. に比べて、變化を見なかつた。即ち、この兩液は非透析性であつた。第5表は、熱

に對するこの兩液の態度(M.H.D.)を示したのである。兩液共に、55°C 30分間の加温に依り、M.H.D.は10倍を示した。55°C 60分間の加温に依つては、既に、完全溶血を示したものは無かつた。而して、70°C以上に於ては、全然、溶血作用を認めなかつた。第1圖は即ち各液の、感染防禦實驗の結果を示したものである。即ち最も強い感染防禦力を示したのは第I液で10匹中6匹の生存を示し、之に次ぐものは第II液で10匹中4匹の生存を示した。その他のものは殆んぞ防禦力なしと見るべきであらう。

總括及び考察

斯くして、第III型肺炎雙球菌の毒素產生、從つて、抗毒素を產生せしめやうとしたが、第III、第IV兩液の性状は、毒素としての條件を、全部満足してゐない。唯透析性の無いこと及び熱に對し、相當に不安定であることを認めるのみである。

然し、感染防禦力に就て、考へるべき、第I液は、或る程度の感染防禦力を有してゐることを認め得る。而して他の諸々の液より有効である。

蓋し、本法に依つても、第III型肺炎雙球菌の菌體外毒素の產生は、困難であつて、唯感染防禦を或る程度有してゐるワクチンを作り得たのみである。

結 論

1. 馬肉を、パバインで、消化して、得たブイオンに、第III型肺炎雙球菌を培養し、フォルマリンを添加して、37°Cに10日間、保つことに依り、廿日鼠に、本菌に對する感染防禦力を、附與する物質を得た。

2. 然し、本法に依つても、本菌の菌體外毒素の產生は、不能であつた。

3. この感染防禦力を附與する物質の本態に就ては、尙ほ一段の生物學的、化學的の研索に俟たねばならない。

擧筆に當り御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた恩師長谷川教授に、深く深く感謝の意を表はす。尙ほ、研究室の諸兄の御厚情。並びに、化學療法研究所所員東風博士の御助言と元同人金員圭君のパバイン精製の御協力にも、限り無い謝意を表はす。

参 考 文 獻

- 1) Goebel, W.F.: J. Exp. Med., 69 353.
- 2) Goebel, W. F.: Ibid., 72, 33.
- 3) Avery, O. T. and his colleague: J. Exp. Med., 54, 73.
- 4) Francis, T., Terrell, E. E., Duboo, R. & Avery, O. T.: Ibid., 59, 641.
- 5) Coca, A.: J. Immunol., 30,
- 6) Coca, A.: Proc. Soc. Exp. Med., 29, 1042.
- 7) 細谷省吾及び共同研究者: 東京醫事新誌, 2829號, 5.
- 8) 進藤由二: 第十回聯合微生物學會記錄
- 9) 栃木: 實驗醫學, 26, 443.
- 10) 谷: 實驗醫學, 18, 135
- 11) 小田: 實驗醫學, 22, 197.