ウェルシュ菌菌體抽出液の免疫元性(抗毒元性)に就て

研究生 唐 司 藏 人

Tonosu, Kurando

傳染病研究所第一研究部(指導: 細谷教授)

(受付: 昭和 19 年 8 月 7 日)

(この論文の要旨は昭和 19 年 4 月 20 日傳染病研究所學術集談會に於て發表した)

I. 緒言と文獻

Exotoxin なるものは還境即ち培養液或は生體內に向つて分泌されるものと堅く信ぜられてゐた。然るに志賀菌の若い菌體は菌體外毒素を含有するこゝが細谷教授一門⁽¹⁾及び Boivin⁽²⁾の研究により東西時を同うして闡明された。又細谷教授は寺田清二氏と共にベスト菌菌體が Exotoxin を含有することを明らかにした⁽³⁾が之等の事實は Exotoxin なるものの研究に向つて新しい途を拓いたものであつて理論上實際上重大な知見である。

戦時疾患として被害の甚しい瓦斯瘡疾患中出現頻度の最も多い *Cl. welchii* の菌體外毒素に就ては先人の業績に依つて克明に報告されてゐるが菌體成分中の毒素及び免疫元性に關しては今猶全然不明であるので私は細谷教授の指導の下に超音波裝置を應用して洗滌菌體を破碎した抽出液に就てこの問題の究明を試みた。

先づ Welch 菌毒素に關する主要文獻を概観するに Welch 菌が菌體外毒素を產生する事は第一次世界大戰の後期 Bull 及び Pritchett (1917)⁽⁴⁾の報告に端を發する。即ち彼等は本菌毒素は實驗動物に對し靜脈内に注射すれば溶血性に作用し筋肉内注射時は炎症竝に壞疽を起す有毒物質の複合體であつて 70°C 30 分加熱によつて完全に毒性を喪失する易熱性毒素であることを述べてゐる。次いで Weinberg 及び Nasta (1920)⁽⁵⁾は本菌溶血毒素は同一菌株でも或時は非常に強く現はれ又或時は全然缺如する性狀のある事を報告してゐる。續いて Henry (1923)⁽⁶⁾⁽⁷⁾は Welch 菌毒素中には溶血毒以外に Myotoxin の存在することを記載し且この Myotoxin は in vitro の溶血毒檢定によつて算出出来るこゝから溶血試験に據る抗毒素檢定の可能性を暗示した。Mason 及び Glenny (1928)⁽⁸⁾はこの暗示を布衍して硫酸安門飽和に依つて生ずる本菌沈澱毒素を用ひた in vitro の抗溶血試験成績はマウス靜注法による in vivo の抗毒素檢定成績に該當することを主張した。又 Neil (1926)⁽⁹⁾は酸化によつて溶血能を失つた Welch-lysin は生物學的乃至化學的操作に依つて再び活性 Lysin に復歸するが加熱された Lysin にはこの再歸能がないこゝ及び Lysin 酸化の際 pH が 7.0 以上ならば經過が甚だ迅速である事實を確めた。この報告の頭初に彼は肺炎雙球菌溶血毒素が菌體內毒素であるに反し Welch 菌溶血毒素は菌體外毒素であるこゝ述べてゐるが片柳 (1929)⁽¹⁰⁾は本菌の食鹽水 3 回洗滌菌體を 10 數回反復氷結融解して得た菌體內物質中に溶血毒素の存在することを證明した。之に前後して Weinberg 及び Barotte (1929)⁽¹¹⁾は本菌菌體外毒素中には溶血毒の外に神經毒及び筋肉毒

の存するこゝを報じたが Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling 及び Ross 等 (1933)⁽¹²⁾ の協同研究の結果も亦本菌毒素は α , β , γ , δ , ϵ の 5 因子より成る多元的毒素であるから マウス靜注法ではその單一毒素因子の毒素抗毒素反應を測定し得ないこゝを指摘した。Wilsdon (1933)⁽¹³⁾ も亦彼自身の分類した本菌 A, B, C, D 4 型の毒素中には W, X, Z なる 3 毒素構成因子があつて血清學的検査による W 因子は 4 型の總てに存在し Z 因子は B, C 兩型のみにあり X 因子は D 型に主として存するが B 型にも少量含有するから結局 B 型のみは 3 因子全部を包攝するこゝ述べた。その後 Mc Clean (1936)⁽¹⁴⁾ は本菌培養濾液中には組織滲透性を著明に増大せしめる成分がありこのものはホルムアルデヒドを 0.4% に加へ室温に放置しても變化を認めないが 37°C に置けば單にそれ丈で破壊されるこゝを記載してゐる。

斯様に Welch 菌毒素が多元的組成を有するこゝに著眼されつゝあつた時 Prigge (1936)⁽¹⁵⁾ は血清學的所見を根據として本菌毒素の眞正毒素作用は α 毒素に由來するのではなく全く別な毒素によつて惹起されるこゝを結論的に主張したが是は Zeissler (1936) や Görzen (1937)⁽¹⁷⁾ 等によつて確證支持された。更に Prigge (1937)⁽¹⁶⁾ はこの α , ζ 兩因子は菌株及び培養條件が同一でも尙その量的含有比が毎常幅廣く動搖する性質があつて例へば或濾液では 1 m. l. d. (マウス i. v.) 中に 500 m. h. d. の α 毒素が介入してゐるのに他の場合には僅か $\frac{1}{2}$ m. h. d. を含むに過ぎず又 Na_2SO_4 にて鹽析し毒素を除去した α 毒素の 100 m. h. d. は 1 m. l. d. に匹儔し得ないこゝを證明してゐる。Weinberg 及び Guillaumie (1939)⁽²¹⁾ も亦細密な追試に依つて前述の Wilsdon の説を肯定してゐるが彼は本菌の如く菌體外毒素のみならず菌體內毒素をも兼有し加之菌體外毒素が複雑な組成を有するから治療血清檢定の場合致死毒 (神經毒) のみの抗毒素價を以て判定するこゝは不可であるこゝ述べた。續いて Ipsen, Llewellyn Smith, Sordelli, Davoli 等 (1939)⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ も本菌毒素中には ζ , α , η なる因子の存在するこゝを極めて理論的に證明したが彼等の實驗成績によれば第一因子 ζ は恐らく Prigge の ζ 因子と同一のものでマウスを斃し海狸皮膚に壞死を起し弱い溶血作用をも有するこゝ第 2 因子 α は Prigge の α -lysin と同様らしいがこの α 因子は極めて輕微な致死作用があり (1,000 乃至 2,000 m. h. d. ならば 1 m. l. d. とする) 又海狸皮膚に出血 (壞死に非ず) を起す弱い皮膚反應物質を含むこゝ第 3 因子 η は致死作用のみを有し溶血及び壞死作用を全く闕如するものであるがこの η 毒素を明瞭に認め得るのは Weinberg の Lechien 株をペプトン含有量の少い V. F. ブイヨンに培養した時に限るこゝ及び強い α 毒素產生はペプトンの種類及び量に關係するこゝ等を究明し明確に本菌毒素が多元的組成を有するこゝを主張してゐる。最近細谷研究室同人の桑島 (1943)⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾ は V. F. の培養の本菌毒素 (Seitz EK 濾液) を 100°C 5 分加熱し之を免疫元として家兎を免疫するこゝ抗溶血素は認められないが感染防禦の意味での免疫が成立するこゝを報告した。

尙超音波に關する文獻は細谷研究室新井⁽²⁸⁾ 安藤⁽²⁹⁾ 久保田 (滿)⁽³⁰⁾ の業績に詳細引用されてゐるので省略する。

II. 實驗方法

供試菌株： 瓦斯壤疽血清委員會より分與を受けた傳研保存の Welch 菌 A 型 „PB 64” 株を用いた。この菌株の形態學的・生物學的性狀は成書の記載に一致し標準血清に依る毒素抗毒素の中和關係も完全に成立する。

超音波發生裝置： 實驗に用ひたのは當教室所在の久保田製作所製品で性能は波長 536m (560KC) 水晶振動子 5mm×50mm 最大入力 2KW 供給電力 100V (50~60C) で油槽部に水冷裝置が附屬し冷却された油の一部は更に被射試験管にも灌注し内容の溫度上昇を阻止してゐる。(油槽内溫 30°C 試験管内 38°C 以下)

超音波に依る菌體內分の抽出法： 肝片加肝臓ブイヨン 37°C 20 時間培養から肝片を除いた後遠心して得られた新鮮菌體を生理的食鹽水で 3 回洗滌し 1cc 30mg (濕菌) の生理的食鹽水又は肝ブイヨン (食鹽水 3 倍稀釋) 浮游液を作り之を滅菌超音波用大試験管に入れ次の條件で曝射する。即ち高周波電流 800mA 格子電流 40mA 陽極電流 185mA 陽極電壓 2.8KV 出力 4. スくて一定時間處置された菌液を高速 (毎分 10,000 回) 遠心によつて上清と沈澱に分け上清部を Seitz EK にて濾過 (濾過板は東洋濾紙製品) するに淡黄透明なる液が得られる。

免疫血清の諸検査： 免疫血清は 56°C 30 分加熱し非働性として用ひた。

抗毒素價…… PB 64 株の乾燥毒素 (硫酸安門分割沈澱法による) を作り食鹽水に溶かし 13gr 内外のマウス靜脈法によつて最少致死量を定めその 1 乃至 2 m.l.d. を使用した。實驗に用ひた乾毒 No. 16 の 1 m.l.d. は 0.25mg で被檢血清に毒素を加へ之を 37°C 孵卵器内に 30 分置きマウス靜注法に依つて 4 日間觀察その生死により判定した。對照毒素も同様の條件に従つた。

抗溶血素…… 1% 家兎血球浮游液使用。肝片加肝臓ブイヨン 37°C 20 時間培養によつて得られた新鮮毒素の 2 乃至 4 m.h.d. を用ひ 37°C 孵卵器内 2 時間後の成績に據り判定した。

凝集反應…… 本菌の O 凝集反應と H 凝集反應を比較すれば各々の凝集價は略々同價を示すので O 凝集價を省略した。抗原は生菌を用ひた。即ち食鹽水を以て 1 回洗滌した菌體を食鹽水 1cc に 1 mg の割に浮べ一夜 4°C に保存し翌日その homogen なる部をとり被檢血清 1cc に 0.5cc を加へ 37°C に 2 時間置いた後判定した。(H-凝集素)

沈降反應…… 黒屋教授の所謂 „酸性加熱沈降元”⁽³¹⁾ を抗原とし免疫血清に重層 37°C 2 時間後判定。兩液の接觸面に生ずる含水炭素沈降反應の菲薄な白色輪の有無により (+) (-) を表はした。

III. 實驗成績

1) 本菌に及ぼす超音波の影響

a) 菌體： 本菌體に對して超音波の破壊力が何の程度に作用するかを檢查する目的で先づ食鹽水 3 回洗滌菌體を 1cc 30mg の食鹽水浮游液を作り之に前記の條件で超音波を 10 分作用せしめるに 10 視野鏡見平均菌數は 4.4 ケ、20 分で 3.0 ケ、60 分で 1.1 ケ、120 分で 0 となるが各々の培養試驗を行

ふみ肝片加肝ブイオンでは總てが陽性、寒天斜面(好氣性培養)では全部陰性であつた。即ち 1 cc 10 mg では 2 時間作用するミ鏡見で菌數算定が不可能な程度迄菌體の大部分は破壊されるが完全に死滅してはゐないことが證明された。次に 1 cc 30 mg の菌液では超音波 30 分作用後の 10 視野平均菌數は 26 ケを算するがこの場合の Gram 染色性に變化はない。(超音波この 1 cc 30 mg 菌液に超音波 30 分處置の抽出液に就て次の實驗を行つた)。

毒性試験……Seitz EK 濾液では 5 分, 15 分, 30 分の何れに於てもその原液 1 cc を以てはマウスを斃すことは出来なかつた。1 萬回遠心上清では 15 分處置の原液 1 cc を注射した場合マウスは翌日死んだ 5 分, 30 分のところは生存した。1 萬回遠心沈澱は之を原量の食鹽水に浮べ同様の方法で毒性を見たが之は 5 分, 10 分處置では未處置菌液と殆んど大差なく(翌日死) 30 分のは僅かに減弱を示した。

溶血試験……先づ食鹽水で 3 倍に稀釋した肝ブイオンに 1 cc 30 mg の割に菌を浮べ之に超音波を 5 分, 15 分, 30 分を作用せしめるミ各々の破碎抽出液中に明らかに溶血毒を證明し得るが(5 分處置 1 萬回遠心上清で第 2 管迄完溶 15 分, 30 分同上清 3 管迄完溶)その Seitz EK 濾液中の溶血毒は本菌抗毒素馬血清によつて完全に中和され溶血は阻止される。反之健馬血清では影響なく又 100°C 3 分加熱によつて溶血性は破壊される。次に同菌量を生理的食鹽水に浮べ同様の操作を試みたが或る程度の差はあるが略々同様に溶血毒を證明することが出来た。(第 1 表) この兩者の實驗中屢々遭遇した事は培養基及び菌液の製法, 超音波の條件等が全く同様であるにも不拘毒素の抽出が全く不成功に終つた事が一再に止まらなかつた事である。尙この溶血毒素は非働性健康馬血清で Welch 生菌を洗滌することによつては抽出出来なかつた。

第 1 表 超音波處置菌液の溶血試験(NaCl 水浮游液)

管	數	1	2	3	4	5	6	7
NaCl 水 稀 釋		1 ×	2 ×	4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×
30 分	Seitz EK 濾液	+++	+++	++	+	—	—	—
	30 分處置そのまゝの菌液	+++	+++	+++	+	±	—	—
	1 萬回遠心沈澱	—	—	—	—	—	—	—
	1 萬回遠心上清	+++	+++	+++	+	—	—	—
對 照	15 分處置 1 萬回上清	+++	+++	+++	++	+	—	—
	5 分處置 1 萬回上清	+++	+++	++	+	—	—	—
	未 處 置 菌 液	—	—	—	—	—	—	—
	培養液遠心上清	+++	+++	+++	++	+	—	—
	3 回 目 洗 液	—	—					
	抗毒素馬血清+30 分 Seitz F	—	—					
	健馬血清+30 分 Seitz F	+++						
	100°C 3 分加熱の 30 分 Seitz F	—						
	NaCl 水	—						

海狸皮内試験…… 300gr 内外の健康海狸背部皮内に各 0.1cc を注射し 48 時間観察した。超音波 30 分處置菌液の 1 萬回遠心上清及び Seitz EK 濾液 5 分 15 分處置の 1 萬回遠心上清では何れも壊死が起らなかった。

b) 毒素:

致死毒の消長……肝片加肝臓ブイヨン 20 時間培養液 (pH 7.8→5.8) の 4,000 回轉 10 分遠心上清を従前の条件で超音波處置をなし對照として未處置毒素を同様に稀釋してマウス尾靜脈法により比較したが兩者間に差異を認めなかった。

溶血毒……同様の方法により溶血毒の消長を比較検査したがこの場合も亦特記すべき變化はなかった。

超音波使用時當然考慮される酸化作用は既掲の實驗時果して何の程度のものであるかを知る一助として Cystein-HCl [$\text{HS}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$] を用ひニトロプルシッドナトリウム反應を試みた。即ち初め 0.1% Cystein-HCl 水溶液を作り中和して之を原液とし原液 10 倍, 100 倍の各々に就き同反應を行つた結果は原液(+) 10 倍(±) 100 倍(-) の成績であつたから原液 (0.1%) を用ひ従前の条件で超音波を 5 分, 10 分, 20 分, 30 分, 60 分作用せしめたが結果は何れも陽性であつた。

2) 超音波處置菌體液の家兎實驗

免疫元: 先述の規定條件に據つて 30 分處置した菌液を Seitz EK 濾過板にて濾過し 2% NaOH を以て pH 7.0 に補正し之を免疫元とした。

免疫方法: 體重 3 kg 内外の成熟健康家兎 (免疫前 Welch 菌の抗致死毒素抗溶血毒素凝集素沈降素のないもの) を選び 4 日間隔にて耳靜脈内注射法により原液 1.0cc より始めて體重並に一般狀態を考慮し乍ら漸次増量して 5.0cc に至つた。3~4 回免疫時より次回免疫直前に一部採血を行つた。尙後處置して一定免疫後 Welch 菌の無菌毒素 (培養液の Seitz EK 濾液) 免疫を續行し抗毒素價上昇の變化を検査した。

抗毒素價: a) 免疫第 1 群 (超音波 30 分處置菌液の各部分を免疫元とする) ……超音波 30 分處置菌液そのまゝのもの (No. 70) 及び 1 萬回遠心沈澱を以て免疫せる家兎 (No. 4) では 1 萬回遠心上清 (No. 38) 並に Seitz 濾液 (No. 87) に比し抗毒素の成立が早期且高度であるが或る限度に達するこそれ以後免疫を重ねても抗毒素の上昇は免疫回数の頻度に平行しない。Seitz 濾液免疫 (No. 87) が最も晩く成立し低度であるが明らかに抗毒素を認める事が出来る。即ち 15 回免疫後の檢定で 120m.l.d./cc を示した。(第 2 表)

b) 免疫第 2 第 3 群 (Seitz EK 濾液免疫群) ……本群に於ては第 3 表表示の如く 4 回免疫後 4 日目既に抗毒素の發現を見るがその力價は極めて低く爾後免疫を重ねても僅かに No. 8 が 14 回免疫後その血清 1 cc は約 80m.l.d. を中和するに過ぎずその後は却つて減退し 20 回免疫時に於て No. 8, No. 9 は零に至つた。この Seitz EK 濾液免疫が基礎免疫元としての價值如何を知る爲に 17 乃至 20 回免疫後本菌の肝片加肝ブイヨン 20 時間培養液の Seitz EK 濾液 (生毒を略稱す) を以て免疫を續行し

第2表 第1群(超音波30分處置菌液の各部を以て免疫)抗毒素價

免疫回数	免疫前	3 回	6 回	9 回	12 回	15 回
家兎No.						
No. 70(超音波 30 分そのまゝ)	0	0	40mld.	>400	200	<200
No. 4(同 1 萬回遠心沈)	0	0	>30 切迫採血			
No. 38(同 1 萬回遠心F)	0	0	0	>200	200	>200
No. 87(同 Seitz F)	0	0	0	0	0	120

た。(この免疫元のマウス m.l.d. は 0.025cc で間隔 4 日, 免疫量は 原液 0.1cc より始めて回を重ねる毎に 0.1cc 宛増量した) その結果は No. 9 が 3 回免疫後 120m.l.d./cc を示す程度でこの成績は後述の対照(生毒免疫群)に比して特に著明な差異ありきは認められない。

第3表 第2, 第3群(超音波30分處置菌液の Seitz 濾液を以て免疫)血清の抗毒素價

免疫回数		免疫前	4 回	7 回	11 回	14 回	17 回	20 回	生毒免疫 1 回	同 2 回	同 3 回
家兎No.											
第 2 群	No. 8	0	10m.l.d.	20	10	>80	0	0	10	60	30
	No. 9	0	／下痢	>10	<10	5	5	0	0	<30	120
	No. 10	0	／下痢	40	10死						
第 3 群	No. 11	0	10	>40死							
	No. 12	0	／下痢	0	>20	20	0		20	<30	<30
	No. 13	0	／下痢	>40	>40	40	5		40	<30	240

抗溶血素: 第1免疫群に於ては No. 70(超音波 30 分處置そのまゝ) No. 4(同 1 萬回遠心沈) No. 38(同 1 萬回遠心F)は何れも 6 回免疫後血清中に明らかに抗溶血素を認めたがそれは 免疫回数 の頻度に比例して上昇はせず 6 乃至 9 回を限度とし其後はむしろ下降した。即ち No. 70 は 9 回免疫に於

第4表 第1群 抗 溶 血 素

免疫回数	免疫前	3 回	6 回	9 回	12 回	15 回
家兎 No.						
No. 70(超音波30分處置そのまゝ)	0	0	16mld.	96	32	0
No. 4(同 1 萬回遠心沈)	0	0	128 切迫採血			
No. 38(同 上清)	0	0	32	96	32	0
No. 87(同 Seitz F)	0	0	0	0	0	0

て 96m.h.d. の抗溶血素價を示したが 15 回免疫に至つて全然認められなかつた。No. 4 は 6 回免疫時既に 128m.h.d. に上昇したが體力消耗と下痢の爲其後の觀察を行ひ得なかつた。No. 38 は大略 No. 70 と同様の成績を示したが No. 87 は 6 回免疫以降 15 回免疫時に於ても僅かに 第 1, 第 2 管が溶血の阻止傾向を示すに止まつた。Seitz EK 濾液を以て免疫した第 2 (No. 8, No. 9, No. 10) 第 3 群 (No. 11, No. 12, No. 13) に於ては弱度乍ら抗溶血素が比較的早朝に發現してゐる事が認められる。然し此所でも免疫を重ねる事が直ちに力價を強める事にはならなかつた。即ち No. 8 は 4 回免疫で 32

m.h.d. を中和したが 11 回免疫に至り 2 m.h.d. に低下した。No. 9 は 11 回免疫時も遂に 零に終り No. 10 は 11 回免疫時 2 m.h.d. を示したに止り No. 11, No. 12 は 7 回免疫時夫々 4 m.h.d. 中和の力價を示し No. 13 が同時期に 8 m.h.d. に達した。

凝集反應：凝集片は粗大顆粒状を示すものが多かつた。凝集價は大體免疫回数に比例して増大し (第 5 表参照) No. 8, No. 9, No. 12, No. 13 は 17—20 回免疫に至つて急激に凝集價が飛躍上昇したが生毒免疫に移つてから又急に下降した。

第 5 表 凝 集 反 應

免疫回数 家兎 No.	4 回	7 回	11 回	14 回	17 回	20 回	生毒免疫 2 回	同 3 回
No. 8	200× +	/	100× ±	800× +	10× ++	3,200× ++	400× +	100× ±
No. 9	/	/	10× +	400× ±	10× ++	1,600× +	400× +	10× +
No. 10	/	/	10× + 死					
No. 11	/	30× + 死						
No. 12	/	10× -	10× +	10× ++	3,200× +		50× ±	50× ±
No. 13	/	10× -	10× +	10× ++	3,200× +		10× +	50× ±

第 6 表 沈 降 反 應

免疫回数 家兎 No.	7 回	11 回	14 回	17 回	20 回	生毒免疫 2 回	生毒免疫 3 回
No. 8	/	-	-	-	1× +	-	-
No. 9	/	-	-	-	8× +	1× +	-
No. 10	/	- 死					
No. 11	- 死						
No. 12	1× ±	-	-	8× +		-	8× +
No. 13	1× +	-	-	1× +		-	-

沈降反應：第 2, 第 3 群共全免疫過程を通じて沈降反應は微弱にしか現はなかつた。即ち No. 9 が 20 回免疫後 8 倍中等度陽性、又 No. 12 が 17 回免疫後同様の成績を得たのが最高で生毒の後續免疫に依つては No. 8, No. 9, No. 13 は總て沈降價下降し僅かに No. 12 が生毒 3 回免疫時後續免疫前の 8 倍陽性の成績に復したに止まる。(第 6 表)

對照實驗：菌體外毒素を免疫元とした場合の抗毒素產生狀況を知る 目的から 上記實驗の免疫方法に準じて次の對照實驗を行つた。

a) 對照實驗 I …… PB 64 株培養 Seitz 濾液 (生毒) 免疫群で免疫元は本菌株の肝片加肝ブイオン 37° C 20 時間培養液を 4,000 回轉遠心 10 分の上清を Seitz EK にて濾過せるものでこの免疫元の 1 マウス m.l.d. は 0.025cc であつて培養試験により雜菌のないことを確めた。免疫方法は 3 kg 内外の健康家兎を用ひ原液 0.1cc (耳靜内注射) より始め 4 日間隔を以て漸増 0.6cc に至つた。その成績は (免疫家兎 2 羽) 3 回免疫時 No. 53 は 40m.l.d. No. 54 は 160m.l.d. 5 回免疫では No. 53 が 160m.l.d. No. 54 が同じく 160m.l.d. 7 回免疫時は No. 53 が 160m.l.d. No. 54 が 640m.l.d. 9 回免疫に至つ

て No.53, No. 54共に 480m.l.d. 中和の力價を示した。

b) 對照實驗 II……Formoltioxid 免疫群(家兎)であるが免疫元は對照實驗 I の免疫元と同一材料に出發した Seitz EK 濾液に局法ホルマリンを 0.1%に加へ 48 時間室溫に 放置したもので之はマウスに 1.0cc 海狸に 5.0cc 皮下注射して 4 日間觀察し完全にトキソイド化せること竝に培養試験によつて雑菌のない事を確めた。免疫方法は對照實驗 I と同然。成績は 3 羽中 No. 102 は 7 回免疫後も遂に血中に抗毒素を認めなかつたが 3 回免疫時 No. 70, No.106 は夫々 5m.l.d. 中和の力價を示した。(No.70 は翌日死) No.106 は 5 回免疫で 10m.l.d. 6 回免疫で 80m.l.d. 7 回免疫で <80m.l.d. を中和する血中抗毒素を證明した。

3) 菌體抽出液の濃縮竝に培養基成分としての性格

本菌菌體の超音波抽出液は既述の様にそれ自體には動物を斃すに足る毒素を證明されないのに抗毒性としての免疫元性を具有するのは微量毒素の存在に由來するためではないかとの疑問が生じたので菌體抽出液に就て細谷教授の菌體外毒素新精製法⁽²²⁾に従つて次の方法により濃縮を試みた。即ち菌體抽出液の Seitz EK 濾液(1 マウス m.l.d. 0.01cc 溶血は 32 倍迄完溶) 95cc に $\frac{1}{10}$ 量の 50 g/d ZnCl_2 を加へ 5,000 回轉 10 分遠心の(上清は pH 6.2 で ZnCl_2 を加へても沈澱を認めない。)沈澱に 40cc の水を加へて 1 回洗滌し之に $\frac{1}{7}$ 量の 10% Na_2HPO_4 液を加へ 37°C 水浴中にて 5 分間振盪後 4,000 回轉 10 分遠心によつて得た上清(pH 8.4)が即ち $\frac{1}{7}$ 濃縮液でその小許をとり $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ を加へて ZnCl_2 の残なきことを確め) 2% HCl で pH 7.0 に補正した。濃縮は食鹽水浮游菌液の抽出液と肝ブイヨシ浮游液より出發した抽出液の兩者に就て試みたが兩者共マウスを斃さない。(i. v. に濃縮原液 0.5cc 或は大腿皮下に 1.0cc 注射) 又海狸皮内に濃縮原液 0.1cc を注射しても全然壞死及び出血を起さないし溶血毒も亦證明されなかつた。

次にこの超音波抽出液の抗毒性免疫賦與の機序が酵素近似の „Protoxin“ とも稱すべき物質の存在に起因するのではないかとの疑ひを抱いたので次の實驗を實施した。即ちカルノペプトン透析外液粉末の 2% 溶液に Na_2HPO_4 を 0.1% l-Cystin を 0.01% の割に 添加して pH を 7.8 とし 30cc 宛大試験管に分注滅菌したものに菌體抽出液を 10% 1% の比に加へたものと及び全然加へぬものに本菌新鮮培養液を各々 0.5cc 宛移植後ワゼリンを重層して 37°C に培養し 1 時間毎に溶血毒新生の有無を檢查した。結果は 3 者共 1 時間及び 2 時間後では溶血毒を認めないが 3 時間後では全く同程度の溶血が明瞭に起つたけれども成績は菌體抽出液を添加しない對照と同様であつた。唯こゝに興味あることは培養 20 時間に至る一旦產生された溶血毒が著しく低下することであり是は使用培養基が短時間培養による溶血毒產生に好適であることを意味するのであらう。尙溶血毒の現はれる 3 時間培養液では致死毒(マウス i. v.) も壞死毒(海狸皮内)も證明されない。

更に ZnCl_2 による $\frac{1}{7}$ 濃縮菌體抽出液を添加して同様の實驗を試みたが之も亦陰性の結果に終つた。

IV. 考 按

細菌體より抗原性を有する特異性物質を分離抽出する法として Boivin⁽²⁾ はグラム陰性菌より三鹽化醋酸を用ひて菌體內毒素を抽出し細谷教授一門は^(33/34) チフス菌バラチフス A 菌同 B 菌赤痢菌大腸菌ゲルトネル菌百日咳菌大原菌等の水浸液より各々 pH 2.0 に於てアセトンにて沈降せしめ、完全抗原としての抗原性を有する特異性有毒物質を分離し又同門の久保田(満)⁽³⁹⁾ は超音波を用ひて志賀菌を破壊し、菌體外毒素と菌體內毒素とを抽出することに成功した。黒屋教授一門^(35/36/31) はチフス菌コレラ菌瓦斯壞疽菌等より菌體磨碎浸出液又は鹽酸酸性浸液を作り等電點法に據り PF と CF に分割し夫々の化學的免疫學的性狀を記載した。尙教室の新井⁽²⁷⁾ は超音波を應用して肺炎雙球菌菌體より溶血毒を抽出したがこのものは抗原性がなかつた。是等の先人の業績に従つて私は Welch 菌菌體に超音波を作用せしめて比較的容易に抽出液を得たがこのものは強力な毒性物質ではなかつた。即ち Prigge 及び Ipsen の範疇に従つて本菌毒素を溶血毒と致死毒(壊死毒)とに大別すれば該抽出液中には明らかに溶血毒の存在が證明されるけれども致死毒(壊死毒)は少くともマウス及び海狸を斃す程は含まれてゐない。(勿論海狸皮内に注射しても壞疽は起らなかつた)。抽出された溶血毒は本菌抗毒素馬血清により完全に中和され 100°C 3 分加熱によつても溶血能は全く阻止される。Weld の法に従ひ本菌の生菌體を健康馬血清で洗滌したが溶血毒を移行せしめることは出来なかつた。

超音波に依る本菌菌體抽出液は單に溶血毒のみの見地から見れば(致死毒壊死毒については不明)菌株、培養基、培養時間、溶媒及び超音波條件等が同一であつたにも不拘溶血毒を全く認め得ぬ場合に屢々遭遇した。これは桑島氏も認めてゐるが(V. F. ブイオンを用ひて本菌體振盪による溶血毒抽出) 這般の事實が如何なる要因に由來するかは明確に指摘し難いが少くとも浮游液の pH には影響されないこと培養基調製後の時間的経過が或程度不利な因子となることは述べ得ると思ふ。

しかも興味あることは斯様な抽出液の Seitz EK 濾液を免疫元として家兎を免疫するに弱度ではあるが比較的早期に抗溶血素のみならず抗致死毒素をも血中に證明し得ることである。一旦產生された之等抗毒素力價は免疫回数に平行して上昇はしなかつたが之は曩に Weinberg 及び Barrotte が本菌の抗菌血清は通例抗毒素血清よりも抗溶血清が遙かに低いこと及び免疫元として菌體のみを用ひた場合抗毒素(抗致死毒+抗溶血毒)產生最も劣る(Anacultur が最も優秀)と指摘したことを聯想させる。

又本實驗に於て免疫血清中に證明し得た凝集素(3, 200×陽性)及び沈降素(8 倍陽性)は何れも抗毒素力價と平行しなかつたことは嘗て同門の五十嵐が本菌の凍結乾燥菌體の磨碎浸出液(Seitz EK 濾液)を以て家兎及び海狸を免疫した實驗で血中に凝集素沈降素が著明に出現せるにも不拘感染防禦の意味での抗毒素は遂に證明されなかつた成績(未發表)と半ば軌を同うする。石村⁽³⁷⁾ は本菌の生菌免疫と濾液免疫を比較して生菌免疫は注射回数に比例して抗毒素量も漸増し一旦產生された抗毒素は 2 週 3 週を経過するも減少せず却つて稍々増加するに反し濾液免疫は一度抗毒素の生ずるや直ちに最高力價に達し(第 1 週目)以後反復免疫するも力價は減退を示すものであると報じた。私の免

疫實驗は免疫元が菌體成分である故この規範を以て直ちに律することは出来ないが比較して興味ある事實を思ふ。又牛圓⁽³⁸⁾は本菌の菌體及び菌體成分の免疫實驗の結果菌體(生菌)免疫血清に於てのみ homolog の菌に對する凝集素と沈降素を認めたが菌體成分分割の核蛋白質は免疫元性極めて輕微であり殘餘抗原及び類脂體は何れも免疫元性なしと報告してゐるが該血清の感染防禦能については記載がない。

瓦斯壞疽病が第1次世界大戰時特にその初期に於て洵に眼を蔽はしむる如き慘禍を與へてより爾來25年その間細菌毒素學領域の駸々乎たる進歩にも拘はらず本疾患豫防に就ては能動性免疫と受動性免疫の何れを採るべきか又抗菌血清と抗毒素血清の感染防禦に關する「本態的機轉」にその效果の優劣如何についても猶幾多の餘白が残されてゐるのではなからうか。

V. 結 論

以上の私の實驗から大略次のことを要約することが出来る。

1. Welch 菌體は超音波を應用することに依つて比較的容易に破碎される。
2. 斯くして得られた菌體抽出液の Seitz EK 濾液中には明らかに溶血毒が存在する。しかもこの溶血毒は家兎に對し免疫元性即ち抗毒元性を有する。
3. 抽出液 (Seitz EK 濾液) 自體はマウス及び海狸を斃し得ないが之を以て家兎を免疫する時は比較的早期に弱度ながら確實に抗毒素即ち抗致死毒の產生を證明し得た。
4. 同免疫家兎血清中には凝集素沈降素共に發現を見るが前者は著明であり後者は輕微であつた。そしてこの兩者は血中抗毒素(抗致死毒素及び抗溶血素)力價とは平行しない。
5. 依つて本菌にはその菌體成分として抗毒元性の意味に於ける免疫元性を有する特異性抗原物質が存在する。

稿を終るに當り本研究の提案指導を賜はりたる 恩師細谷教授に深甚の謝意を捧げ貴重な助言の勞を惜しまれなかつた教室の諸先輩に鳴謝して筆を擱く。

文 獻

- 1) 細谷, 川島, 道藤, 田中: 第11回聯合微生物學會記錄. 119, 昭12.
- 2) Boivin, A., Mesrobianu, I. et Mesrobianu, L.: C. R. S. B., 113, 490, 1933.
- 3) 細谷, 池上: 第15回聯合微生物學會記錄. 246, 昭16.
- 4) Bull, C. H. & Pritchett, I. W.: J. exp. Med., 26, 119, 1917.
- 5) Weinberg, M. et Nasta: Ann. Inst. Pasteur. 34, 690, 1920.
- 6) Henry, H.: J. path. & bact., 25, 1, 1922.
- 7) Henry, H.: ibid., 26, 497, 1923.
- 8) Mason, J. H. & Glenny, A. T.: ibid., 31, 629, 1928.
- 9) Neil, J. M.: J. exp. Med., 44, 215, 1926.
- 10) 片柳: 慶應醫學. 9, 651, 1077, 昭4.
- 11) Weinberg, M. et Barotte, J., C. R. S. B., 100, 733, 1929.
- 12) Glenny, A. T., Barr, M., Llewellyn-Jones, M., Dalling, T. & Ross, H. E.: J. path. & bact., 37, 53,

1933.

- 13) Borthwick, G. R.: Zentbl. f. Bakt., 134, 289, 1935. より引用
- 14) McClean, D.: J. path. & bact., 42, 477, 1936.
- 15) Prigge, R.: Z. f. Immunitätforsch., 89, 477, 1936.
- 16) Prigge, R.: ibid., 91, 457, 1937.
- 17) Görzen, J.: Zentbl. f. Bakt. I Org., 138, 366, 1937.
- 18) Zeissler, J.: Klin. Wschr., 13Jg. 23, 825, 1934.
- 19) Weinberg, M. et Guillaumie, M.: C. R. S. B., 199, 719, 1935.
- 20) Weinberg, M. et Guillaumie, M.: League of Nations, Bull. Health Organ., 7, Geneva, 818, 1938.
- 21) Weinberg, M. et Guillaumie, M.: Rev. d'Imm., 5, 5, 1939.
- 22) Ipsen, J., Smith, M. L. et Sordelli, A.: League of Nations, Bull. Health Organ., 8, Geneva, 797, 1939,
- 23) Ipsen, J.: ibid., 8, Geneva, 825, 1939.
- 24) Ipsen, J. & Davoli, R.: ibid., 8, 833, 1939.
- 25) Ipsen, J.: ibid., 8, 849, 1939.
- 26) 桑島, 寺田: 日本醫學及健康保險. 3340 號, 8 頁, 昭 18.
- 27) 桑島, 寺田: 日本醫學及健康保險. 3341 號, 8 頁, 昭 18.
- 28) 新井: 實驗醫誌. 24, 1184, 1314, 昭 15.
- 29) 安藤: 實驗醫誌. 26, 900, 昭 17.
- 30) 久保田(滿): 實驗醫誌. 27, 716, 734, 昭 18.
- 31) 小泉(金): 實驗醫誌. 27, 127, 昭 18.
- 32) 細谷, 出口, 利部: 實驗醫誌. 28, 420, 昭 19.
- 33) 細谷, 川島: 實驗醫誌. 20, 913, 昭 11.
- 34) 細谷, 横森, 大谷: 第 15 回聯合微生物學會記錄. 257, 昭 16.
- 35) 黒屋: 第 16 回聯合微生物學會記錄. 310, 昭 17.
- 36) 黒屋, 小泉(和): 東北醫誌. 29, 231, 昭 16.
- 37) 石村: 細菌學雜誌. 526 號, 773, 昭 14.
- 38) 牛圓: 十全會雜誌. 29, 2261, 昭 9.