腸チフスワクチン有効成分の温度による游出と安定性について

中 村 敬 三 富 沢 万 之 助

国立予防衛生研究所

〔受付: 5 月 20 日 1955 年〕

緒 言

腸チフスパラチフス混合ワクチンの国家検定は昭和22年3月から開始されたが、第1年度は検定を行うだけで精一杯であった。第2年度は前年度の経験を生かし完全な検定を実施した。第3年度からは、第1年度及び第2年度において相当数のものが不合格となつたので、その原因が何によるものであるかの究明に着手した。本ワクチンは基準によつて用いる菌株が一定しており、又製造法も示されているので、各製造業者によつて作られ国家検定に提出されて来る製品は、略々同等な力価を有するものと思つていたが、案に相違して、検定当初においては力価試験で不合格となるものが多かつた。その原因が何によるものであるか判然としないが、先づ考えられるものは、使用菌株の保存法、培地、培養温度及び時間、殺菌法、防腐剤などの諸点であろう。敗戦後間もない昭和22~23年には、すべて物資が不足しており、本ワクチンを作るのにも容易な業ではなかつたようだ。従つて以上の諸点が大なり小なりにワクチン製造に影響を及ぼしたものである。腸チフスワクチンにとつて最重要因子である Vi 抗原は、牛肉汁寒天培地では発育が良いが、肉エキス寒天培地では悪い。又培養温度²⁾ 及び時間³⁾ によつても、Vi 抗原の発育と收量とは影響を受けるものである。使用菌株の保存法が悪ければW型になることも考えられる。事実われわれもこのような例に遭遇している。なお殺菌法が適当なものでなければ、これまた免疫原性に影響を及ぼして来る。Felix と Bhathagar¹⁾ (1935)は、0.5% 石炭酸加腸チフスワクチンで免疫した家兎血清中には、Vi 抗体が認められない、従つてマウスを用いての被動免疫においても防禦力のないことを報告しているが、1938年に至つて Felix と Petrie²⁾ は前言を改めている。Luippold⁴⁾ の実験では影響がないようである。勿論濃度の高いものや、不純なものは影響を及ぼすものと思われる。こゝではワクチンの力価の不合格となる原因を追及する手懸りの一つとして、殺菌のための加熱温度による影響を、ワクチンとその上清及び沈

澱菌とについて実験を行つてみた。

実験方法

菌量は標準白金耳で測り、1 cc 1 mg の割合で生理食塩水に浮遊させ、56°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°C の恒温槽中で各々1時間加熱し、次でこれらの一部を遠心沈澱して上清と沈澱菌とに分け、この沈澱菌には原容量と同量の生理食塩水を加えた。次に上清、沈澱及びワクチンをそれぞれ10, 100, 1,000, 100,000倍に稀釈し、その0.5 cc ずつをマウス腹腔内に注射し、14日目に5%のムチン液に浮遊させた63菌株の1,000 MLDで攻撃してみた。上清については、更に Vi 血清と O 血清とをもつて重層法による沈降反応を行い、室温で3時間観察した。

使用菌株は 58, Vi I, 63 などの腸チフス菌である。

70°~80°C で加熱されると、非常に粘稠性を帯びて来て、遠心沈澱し難くなる。この沈澱菌を生理食塩水に再浮遊させる段になると、これまたその粘稠性のために、平等に浮遊することが容易でなく、他の加熱温度の沈澱菌に比して菌量において正確さを欠く憾がある。

力価の判定は腸チフスパラチフス混合ワクチンの基準⁵⁾によつた。

沈 降 反 応

加熱温度の異なることによつて、遊離する Vi 抗原量が異なつて来るのではないかと、即ち加熱温度が高くなればなる程遊離する Vi 抗原量が多くなるのではないかと考え、上清を倍数稀釈した後、Vi 血清の一定稀釈液(25~50倍)に重層して沈降反応を行つてみた。その成績は第1表に示すように、Vi 抗原の発育の良い Vi I 菌株が最も沈降素価が高く、Vi 抗原の発育の悪い 63 菌株は最も低い価を示す。そして加熱温度の高くなるに従つて沈降素価の上昇することは殆んど認められず、菌株毎に

NAKAMURA, Keizo and TOMIZAWA (SHIMIZU), Mannosuke: The sterilization and stability of typhoid vaccine. The National Institute of Health, Japan. — Jap. J. of Bact., 10(11), 939-943, 1955,

第1表 種々の温度で殺菌して作ったワクチンの上清で行った沈降反応

菌 株	加熱温度 (各1時間)	Vi 沈 降 素 価	O 沈 降 素 価
63	56°C	8	4(8±)
	60°C	8	8
	70°C	8	8
	80°C	8	8
	90°C	8	8
	100°C	8	8
58	56°C	8(16±)	4(8±)
	60°C	8(16±)	4(8±)
	70°C	8(16±)	4(8±)
	80°C	8(16±)	4(8±)
	90°C	8(16±)	4(8±)
	100°C	8(16±)	4(8±)
ViI	56°C	16(32±)	2
	60°C	16(32±)	1(2±)
	70°C	32	2
	80°C	32	4
	90°C	32	4
	100°C	32	4

一様な価を示す、即ち 58 菌株は 8 (16±)、Vi I 菌株は 32、63 菌株は 8 の沈降素価を示す。以上のことから、Vi 抗原は 56°C 1 時間の加熱によつて大部分のものが菌体からメヂウム中に遊離して了うことが判る。そしてそれ以上の加熱温度によつて遊離する Vi 抗原量は、多少は増量するとしても、それは倍数稀釈法では認められない程の量と思われる。次に O 血清 (25 倍稀釈液) について沈降反応を行つてみた、O 沈降素価は Vi 沈降素価とは反対に、Vi 抗原の発育の悪い 63 菌株が最も高い価を示し、Vi 抗原の発育の良い Vi I 菌株が最も低い価を示す、加熱温度による差異は殆んど認められないが、たゞ Vi I 菌株の 56~70°C 加熱の処が低いようである。即ち 58 菌株は 4(8±)、63 菌株は 8 であるが、それ以上の価を測っていないので不明である。Vi I 菌株は 56~70°C 加熱のものは 2.80°C 以上に加熱されたものは 4 という沈降素価を示す。

力 価 試 験

上述のようにして作ったワクチンを更に上清と沈澱菌とに分け、加熱の免疫原性に及ぼす影響を、又この影響が上清と沈澱菌とではどのような差異を示すものであるかを、ワクチンを対照として比較してみた。

沈降反応では加熱温度の上昇によつて沈降素価の上る

第2表 種々の温度で殺菌して作ったワクチンの力価試験

菌 株	注 射 菌 量 (mg)	加 熱 温 度 (1 時 間)						対 照
		56°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C	
63	ワ 0.05	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/10
	チ 0.005	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	1/5	
	ク 0.0005	0/5	2/5	1/5	1/5	5/5	4/5	
	ン 0.00005	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	上 0.05	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	
	0.005	1/5	1/5	1/5	0/5	1/5	3/5	
	0.0005	3/5	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5	
	0.00005	4/5	3/5	4/5	4/5	4/4	4/4	
	沈 0.05	0/5	1/5	0/5	0/5	2/5	3/5	
	0.005	0/5	0/5	2/5	2/5	4/5	5/5	
	0.0005	0/5	3/4	4/5	4/5	4/5	5/5	
	0.00005	4/5	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5	
58	ワ 0.05	0/5	1/4	0/5	1/5	1/5	0/5	10/10
	チ 0.005	1/5	1/5	1/5	2/5	2/5	3/5	
	ク 0.0005	1/5	2/5	4/5	5/5	4/5	4/5	
	ン 0.00005	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	上 0.05	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	0.005	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	3/5	
	0.0005	1/5	0/5	4/5	3/5	4/5	5/5	
	0.00005	3/5	4/5	4/5	3/5	4/5	5/5	
	沈 0.05	0/5	0/5	0/5	1/5	0/3	2/5	
	0.005	0/5	1/5	0/5	4/5	3/5	4/5	
	0.0005	0/5	1/5	4/5	4/5	4/5	5/5	
	0.00005	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5	
ViI	ワ 0.05	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	9/10
	チ 0.005	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	
	ク 0.0005	1/5	1/5	1/5	2/5	2/5	2/5	
	ン 0.00005	3/5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	
	上 0.05	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	
	0.005	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5	
	0.0005	0/5	2/5	1/5	2/5	2/5	2/5	
	0.00005	5/5	5/5	4/5	5/5	4/5	5/5	
	沈 0.05	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5	
	0.005	0/5	1/5	3/5	3/5	4/5	5/5	
	0.0005	1/5	2/5	3/5	5/5	3/5	5/5	
	0.00005	2/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	

攻撃菌量……1.000 MLD(10⁻⁴)

分母は実験マウス数、分子はへい死数

ことは殆んど認められないようである、力価試験の方からみると、何れの菌株も加熱温度が高くなるに従つて、免疫原性が次第に減弱して来るようである、次に個々の菌株については第2表に示す通りである。63菌株の56°C加熱では、ワクチンと沈澱菌とが同じ成績を示し、上清がそれよりも悪い。60°C加熱のものは上清とワクチンとが殆んど同じ成績で沈澱菌が少しく悪い。70~80°C加熱のものは上清とワクチンとが殆んど同じ成績を示し、沈澱菌はこれよりも一段と力価が劣るようである。90°C加熱のものも、上清とワクチンとは殆んど同じ成績で、沈澱菌が一段と悪い。100°C加熱のものではワクチンの力価は90°C加熱のものと同じ成績を示すが、上清と沈澱菌とはその順に一段ずつ減弱を示すようである。

58菌株の56~60°C加熱のものは、上清、沈澱菌、ワクチンともに殆んど同じような成績を示す。70°C加熱のものは上清、沈澱菌、ワクチンともに同じような成績を示すが、力価は一段と低下して来るようである。80~90°C加熱のものは、上清とワクチンとが殆んど同じような成績を示すが、沈澱菌は更に一段と悪い。100°C加熱のものも、上清、ワクチンともに同じような成績を示すが、90°C加熱のものに比して一段と悪くなる。

Vi I 菌株を56°Cから100°Cまでの6段階に分けて加熱して力価を比較してみるに、加熱温度が上昇するに従つて(主として80~100°C)、力価が次第に減弱して来る傾向は認められるが、大体において、全加熱温度にわたつて、上清とワクチンとは殆んど同じような力価を示し、加熱による影響は少ないようである、このようなことは、63菌株や58菌株ではみられないことである、その原因は主としてVi抗原量の多少によるものと考えられる。

沈澱菌は上清と異なり、56~60°C加熱のものでは上清及びワクチンと同じような成績を示すが、それ以上の加熱温度になると急激に力価が低下して来るようである、そして菌株による力価の差異は認め難く、3菌株ともに殆んど同じような成績を示す。これは加熱によつて主としてVi抗原が菌体からメヂウム中に遊離して来うためと思われる。

56°C 1時間の加熱操作を繰り返して作った上清

前の実験では、56°Cから100°Cまでの3段階にわたつて加熱して作ったワクチンと、その上清及び沈澱菌とについて成績を比較してみたのであるが、それによると、Vi抗原保有の菌を生理食塩水に浮遊させて56°C 1時間加熱するならば、Vi抗原の大部分は上清中に遊

離して来る。そしてその遊離Vi抗原はワクチンと略々等しい力価をもっていることが判つた。そこで次には56°Cの加熱操作を繰り返して行つたならば、どのような成績を示すものであるかを実験してみた。

実験方法は2本の中試験管の寒天斜面に發育した菌量を5ccの生理食塩水に浮遊させ、56°Cの恒温槽中で1時間加熱した後遠心沈澱して上清をとり、沈澱菌には再び5ccの生理食塩水を加え56°Cで1時間加熱する操作を4回繰り返して上清をとつた。このようにしてとつた上清と最後の沈澱菌に原容量の生理食塩水を加えたものについて、それぞれ力価を比較してみた。上清についてはVi抗原及びO抗原の遊離状態を知るために沈降反応を行つてみた。

使用菌株は58, Vi I, Ty 2, 2Vなどの腸チフス菌とBallarap菌とである。

沈降反応

上述の上清をもつて純Vi血清(1:50)及びO血清(1:25)について沈降反応を行つてみた。その成績を第3表に示す。1回上清のVi沈降素価は256~512, 2回上清になると8~16に低下し、3回上清からはVi沈降

第3表 56°C 1時間の加熱操作を4回繰返して
採つた上清の沈降反応

菌株と上清	Vi 沈 降素価	O 沈 降素価	菌株と上清	Vi 沈 降素価	O 沈 降素価
1 58	256	16	3 58	0	4±
Vi I	512	16	Vi I	0	4
Ty 2	512	16	Ty 2	0	4
2 V	256	16	2 V	0	4
Ball.	512	0	Ball.	32	0
2 58	8	4	4 58	0	1
Vi I	16	4	Vi I	0	2±
Ty 2	16	4	Ty 2	0	2
2 V	16	4	2 V	0	1
Ball.	128	0	Ball.	4	0

反応を現わさなくなる。但しBallarap菌の上清はこれと異なり、1回上清は512, 2回上清は128, 3回上清は32, 4回上清でもなお4という価を示した。これはVi抗原の發育が非常に良いためと思われる。これに反して、O沈降素価はVi沈降素価程には高く現われないが、4回上清でもなお1~2の価を示す。

力価試験

上述のようにして作った1回から4回までの上清と、

第4表 56°C 1時間の加熱操作を4回繰返して
とつた上清の力価試験

菌 株	注 射 量	1 回 上 清	注 射 量	2 回 上 清	3 回 上 清	4 回 上 清	4 回 沈 澱
58	0.00005	0/5	0.05	0/5	0/5	1/5	0/5
	0.000005	3/5	0.005	0/5	1/5	3/5	0/5
	0.0000005	5/5	0.0005	2/5	3/5	4/5	1/5
	/		0.00005	5/5	4/5	5/5	/
Vi I	0.00005	1/5	0.05	1/5	0/5	0/5	0/5
	0.000005	4/5	0.005	2/5	1/5	2/5	0/5
	0.0000005	5/5	0.0005	2/5	5/5	3/4	3/5
Ty 2	0.00005	0/5	0.05	0/5	1/5	1/5	0/5
	0.000005	3/5	0.005	0/5	1/5	1/5	0/5
	0.0000005	5/5	0.0005	2/5	3/5	4/5	0/5
	/		0.00005	3/4	5/5	5/5	3/5
2 V	0.00005	0/5	0.05	0/5	0/5	0/5	0/5
	0.000005	2/5	0.005	1/5	2/5	0/5	1/5
	0.0000005	4/5	0.0005	1/5	4/5	4/5	1/5
	/		0.00005	3/5	5/5	5/5	3/5
Ball.	0.00005	0/5	0.05	0/5	0/5	1/5	1/5
	0.000005	3/5	0.005	0/5	1/5	1/5	0/5
	0.0000005	5/5	0.0005	2/5	3/5	3/5	1/5
	/		0.00005	5/5	4/5	5/5	3/5

注射量……2寒天斜面に發育した菌量を基とした。

上清をとつた最後の沈澱菌をもつて同じように10倍から1,000,000倍まで稀釈し、その0.5ccずつをマウス腹腔内に注射し、14日を経て1,000MLDで攻撃して力価を比較してみた。その成績を第4表に示す。1回上清が最も力価が良く、これは前の実験によればワクチンと等しい成績と見做すことが出来る、そして2回、3回4回と加熱操作を繰返して行くと、次第に力価が減弱して行くようである、腸チフス菌の3回～4回上清はVi沈降反応を現わさなくなるが、力価は原液の200倍まで良い成績を示す、然し1回上清に比すれば $1/100$ 以上の減弱となるようである。但しこれらの上清はなおO沈降反応を現わすので、主として遊離のO抗原が免疫原として働くものと思われる。Ballerup菌の上清は4回目のものでも遊離のVi抗原が証明されるので、この遊離のVi抗原が免疫原として働くものと思われる。4回処置後の沈澱菌は2回上清よりやゝ良い力価を示すようである、これはO抗原の外にVi抗原が免疫原として働く

から、比較的良い力価を示すものと思われる、Vi抗原は56°C 1時間の加熱操作を繰返して行くと、3～5回で上清中には証明されないようになるが、これは菌体にVi抗原がなくなつたからではなく、56°C 1時間の加熱で遊離して来なくなつただけである。それ故に加熱温度を56°Cより高めれば再びVi抗原が遊離して来るようになる⁹⁾。

考察及び総括

ワクチンはその加熱温度が高くなるに従つて力価も次第に低下して来るがこの力価の低下の度は、Vi抗原の發育の良い菌株と悪い菌株とで異なるようである。ワクチンとその上清との力価を比較してみると、菌株によつてその成績は異なるが、同一菌株で作つたものは略々同じような成績を示す。

Vi抗原の發育の良いViI菌株を56°Cから100°Cまでの6段階にわたつて加熱し、その力価を比較してみるに、80°C加熱のものから少しくその影響を受けるようではあるが、然し全加熱温度にわたつてワクチンもその上清も殆んど同じような成績を示し、加熱による影響は少ないようである。LuippoldはVi抗原をもつている大腸菌から1%の塩酸でVi抗原を抽出したものについて加熱に対する安定性を実験しているが、100°C30分の加熱では何等の影響のないことを報告している。又Schuetze⁵⁾は種々な方法でワクチンの殺菌を行つているが、殆んど同じような成績を得ている。従つてVi抗原は加熱に対しては安定性のあるものと思われる。いま3菌株のVi沈降素価をみると、63菌株は8,58菌株は8(16±), ViI菌株は32である。

58菌株もワクチンとその上清とは略々同じ成績を示す。そして70°C加熱のものから影響を受け、100°C加熱では更に強く影響されるようである。この菌株はViI菌株に比して70°C以上の加熱に対する影響が大きいようである。そしてVi抗原發育量の方からみれば、ViI菌株と63菌株との中間に位する菌株である。63菌株もワクチンとその上清とは略々同じような成績を示す。この菌株は90°C以上の加熱に強く影響されるようである。Vi抗原の發育量からみれば58菌株よりも少ないのであるが、力価の点からみればむしろ58菌株よりは良い成績を示す。これは攻撃菌量の少ないためと思われる。

次に沈澱菌についてみるに、加熱による影響は更に大きい。そしてVi抗原の發育の良い菌株と悪い菌株との差異が認め難いようになる。又加熱温度の高くなるに従つて力価も減弱して来る、これは加熱温度が高くなるに

従つて主として Vi 抗原が菌体から速かに且つその量もより多くメヂウム中に遊離するためと思われる。

生理食塩水で菌浮游液を作り 56°C 1時間加熱後遠心沈澱して上清をとり、沈澱に再び前同量の生理食塩水を加えて 56°C 1時間加熱する操作を4回繰り返して上清をとり、ワクチン有効成分の游出状態を実験してみると、回数を重ねるに従つて、次第に力価が低下して行くが、3~4回上清の処でもなお原液の200倍まで成績が良い。但しこれは1回上清に比すれば $1/100$ 以上の減弱を示す。沈降反応の方からみれば、遊離の Vi 抗原が証明されなくなり、O抗原だけしか証明されない。従つて力価には主として遊離のO抗原が関与しているものと思われる。

最後の沈澱菌は2回目の上清と略々同じ力価を現わすようである、上述の 56°C 1時間の加熱操作を6回繰り返し、7回目に 100°C 1時間加熱した処、再び遊離の Vi 抗原が証明された事実⁹⁾ から、4回処置後の沈澱菌の菌体に相当量の Vi 抗原がなお存在し、それが力価に関与して比較的良好な成績を示したものと思われる。

結 論

1 cc 1 mg 菌量の生理食塩水浮游液を 56°C から 100°C までの6段階にわたつて各々1時間加熱して作ったワクチンと、その上清及び沈澱菌についてマウスを用いて力価試験を行つてみた。加熱温度の上昇に従つて、

力価も次第に減弱して行くようであるが、Vi 抗原の発育の良い菌株では、悪い菌株に比して減弱の度が少ないようである。そしてワクチンと上清とはどの菌株でも殆んど同じような成績を示すが、沈澱菌は加熱による影響が非常に大で、Vi 抗原の発育の良い菌株と悪い菌株とでは殆んど差異がなく同じような成績を示す。

菌浮游液を 56°C 1時間加熱する操作を4回繰り返してみると、その上清の力価は次第に減弱して行く。4回処置後の沈澱菌は2回目の上清と略々等しい力価を示す。

本論文の要旨は昭和24年及び26年予研伝研集談会に発表した。

文 献

- 1) Felix, A. & Bhatnagar, S. S.: Brit. J. Exp. Path. 16, 422, 1935.
- 2) Felix, A. Bhatnagar, S. S. & Pitt, R. M.: J. Exp. Path. 15, 364, 1934.
- 3) Felix, A. & Petrie, G. F.: J. Hyg. Camb. 38, 673, 1938.
- 4) Luippold, G. F.: A. J. P. H. 36, 15, 1946.
- 5) Schuetze, H.: J. Hyg. 36, 559, 1936.
- 6) Shimizu, M.: J. J. Med. Scie. Biol. 5, 407, 1952.
- 7) 峯島茂: 細菌学雑誌, 529, 173, 昭和15年.
- 8) 富沢万之助: 日本細菌学雑誌, 9, 941, 1954.
- 9) 厚生省: 生物学的基準, 1954.