百日咳菌毒素に関する研究

第3報 百日咳菌毒素等による皮内反応の増強について

中 目 幡 雄

東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)

〔受付: 9月24日・1957〕

緒 言

1929年 Duran-Reynals は牛の睾丸抽出液が Vaccin Virus の皮内反応を増強する事を認め、その後彼自身並に多くの学者により、その有効因子はヒアウロナーゼであろうとされた¹⁻³⁾。

私は或る機会に、家兎の副腎抽出液が百日咳菌毒素の皮内反応を著しく増強する事を知り、且つ他の多くの家兎を用いた場合も全く同様である事を確めたので、此の事実に興味を持ち、果して副腎成分中何が有効因子であろうか、更にその作用機転、他の菌及び毒素等の皮内反応に対する態度、並びに類似薬剤の作用等につき検討を行つたので、その知見を報告する。

実験材料及び実験方法

実験動物 としては無処置家兎脱毛背部の皮膚を用いた。

皮内反応には主として百日咳菌毒素液を用いた。毒素液の抽出方法については諸家の報告があるが^{4,5)}、本実験には温和な方法である凍結融解法を用いた。即ち第1表に示す如く、B-G 培地に37°C、2日間培養せる飯田株I型菌を、氷室⁶⁾、善義寺⁶⁾の方法に依る炭末加ザミノアシド培地に接種、37°C、5日間培養し、DeLaval 遠心器に依り分離した菌体を、凍結融解法(液体空気にて凍結、20°C水浴にて融解)30回行い、菌体を破壊し(電子顕微鏡にて判定)、pH 7.8の蒸溜水にて反復抽出したものである。(以下文中毒素とあるはこれを示す。)

次に副腎より抽出液を作る場合、副腎に対し生塩水を100mg/ccになる如く加え、ホモジナイザーにて5分間磨砕したる後、遠心3000回転10分せる上清を副腎抽出液(10倍溶液)とした。

この抽出液に毒素を加えて皮内反応を行う場合、毒素と副腎抽出液とを同量宛混和したる後、室温に1時間静

第1表 百日咳菌粗毒素液抽出法

置し、その 0.4cc を家兎の皮内に注射し、反応は24~48時間後に判定した。

実験成績

〔I〕毒素の皮内反応を増強する副腎抽出液中の有効成分の性状について

i) 家兎の副腎の他、牛の副腎抽出液にも同様に増強物質を認める。

ii) 副腎抽出液を作る際、溶媒として生塩水及び蒸溜水、更に充分に抽出する手段として凍結融解法10回を加

NAKANOME Hatao: Studies on Pertussis Toxin III. Strengthening Effect upon Intracutaneous Reaction produced by Pertussis Toxin. Dept. of Bacteriology, School of Medicine, Tohoku University, Sendai. — Jap. J. of Bact., 12(12), 991-995, 1957. 本論文の要旨は昭和31年4月5日、第29回日本細菌学会総会において講演した。

えた3者につき、それぞれ毒素を加えて皮内注射を行った所、殆んど同様の反応増強を示し、即ち抽出され易い物質である事を認めた。

iii) コーチゾン (25mg/cc.) , ドーカー (5 mg/cc) 等の所謂副腎皮質ホルモン 0.2ccに毒素 0.2ccを加えて皮内反応を行った場合、反応の増強は認められなかった。

iv) 牛副腎を皮質と髓質とに分け、各々抽出液を作り毒素を加えて皮内反応を行った所、髓質にのみ著明な反応増強を認めた。

v) 副腎抽出液を等電点法 (HCl pH 4.5) にて分割すると上清にのみ反応増強物質を認める。

vi) 副腎抽出液をアルカリ性にて加熱 (pH 9.0, 56°C-30分, 80°C-30分, 100°C-30分) する事により、増強作用が著しく減弱される。

以上の実験により、有効成分はアドレナリンであろうと推定し、アドレナリンについて作用を検した所、副腎抽出液と略々同様の増強を認めたので、有効成分の本態はアドレナリンであると決定した。

尚アドレナリンの有効濃度は第2表に示す如くであり、故に以下の実験には確実な有効濃度にして、且つ対照のアドレナリン単独では何等局所反応を起さない所のアドレナリン 25,000 ~ 50,000 倍稀釈溶液を用いて種々の実験を行った。

第2表 アドレナリン有効濃度

	アドレナリン溶液 (1mg/ml)						対塩 照水 生
	8倍	16倍	32倍	64倍	128倍	256倍	
百日咳毒素	+++	+++	++	++	++	+	+
対照生塩水	-	-	-	-	-	-	-

0.3cc 皮内注射, 24時間判定

出血壊死の大きさ (直径)

+++ 2.5 cm 以上 ++ 2.0 cm 以上

++ 1.0 cm 以上 + 0.5 cm 以上

〔Ⅱ〕作用機転

作用機転として先ず次の3つが考えられるが、それ等につき検討を加えた。

イ) アドレナリンが直接に毒素に作用して、之を強める事。

ロ) 全身的に作用して局所反応を強める事。

ハ) 局所皮膚組織に作用して、局所反応を強める事。

イ) 毒素に直接作用するか否か。

毒素は等電点法 (HCl pH 4.5) で沈澱し、[アドレナ

リンは上清に残るので、予め等電点法で分割せる毒素に 12,500 倍稀釈アドレナリン溶液を等量混和、1時間室温にて作用させた後、等電点法を行い、その沈澱を稀薄アルカリ液を加えて蒸留水にて原量に溶解、更に同様に等電点法を2回繰返し、遊離のアドレナリンを除去した所、その最後に得られた毒素による皮内反応は、対照の無処置毒素のそれに比べ、殆んど差を認めなかったのて、アドレナリンが毒素に直接作用するとは考えられない。

ロ) 全身的作用

同一家兎にアドレナリンを加えた毒素を数ヶ所注射し、それに隣接して対照毒素を注射すると、アドレナリン加の方は著しく増強せらるゝに對し、対照毒素には全く作用の増強が認められない。この事實は第2表その他同一家兎を用いての実験において局所アドレナリンの有無により、反応の程度が異なる事によつても立証される。

次に副腎を通じての影響を検べる手段として家兎の副腎を摘出し、アドレナリン加毒素の皮内反応に対する影響につき実験を行った。即ち、予め 12,500 倍アドレナリン 0.2cc を毒素 0.2cc に加えたもの、並びに生塩水 0.2cc を毒素 0.2cc に加えたものを皮内注射し、その反応を測定せる同一家兎につき、先ず片側の副腎を摘出、次いで1週間後他側の副腎を摘出すると共に、同量のアドレナリン加毒素、並に対照毒素を皮内注射した所、第

第3表 (イ) 副腎摘出家兎における皮内反応

	百日咳毒素 0.2cc	
	アドレナリン 0.2cc	生塩水 0.2cc
副腎摘出前	18.0×22.5mm (++)	8.2×9.0mm (+)
〃 摘出後	11.5×15.0mm (++)	5.0×6.5mm (+)

(ロ) アドレナリン毒性に及ぼす影響

	百日咳毒素 0.25cc		
	原液	2倍稀釈	4倍稀釈
アドレナリン 25000 0.15cc	● ● ●	○ ○ ○	○ ○ ○
対照生塩水 0.15cc	● ● ●	○ ○ ○	○ ○ ○

● 死 ○ 生

3表 (イ) に示す如く、副腎摘出後において反応の減弱が認められたが、この事は対照の毒素単独の場合にも同様に反応減弱を示して居り、一方アドレナリン加毒素の場合、副腎摘出後も対照毒素に比し増強を認めて居る。この事実により未摘出の副腎を通じての全身的影響があるものとしても、尚アドレナリンの局所作用を否定する

ことは出来ない。

又百日咳菌毒素のマウス致死作用に対して、アドレナリンが如何に影響するか実験を行った。即ち18匹のマウス（体重 9.0gr）を用いて第3表（ロ）に示す如く、毒素及びアドレナリン加毒素を腹腔内に注射した。その結果はアドレナリンに依る影響が全く認められず、即ちアドレナリンに依る全身性の毒素増強は無いものと思われる。

以上述べた実験成績を考え合わせる時、此等アドレナリンの作用は、局所の皮膚組織特に毛細血管に作用すると考えるのが妥当の様である。

次にアドレナリン及び毒素注射の時間的關係を検する為、次の実験を行った。

同一家兎脱毛背部を11個所に区分し、第4表に示す如き時間毎に毒素とアドレナリンとを皮内接種した。即ちこの場合毒素は同時に11個所に 0.2cc 宛皮内注射し、アドレナリンは毒素注射前後の各時間毎に同一部位に 25,000 倍稀釈 0.2cc 宛皮内注射を行った。その結果は第4表に示す様に毒素注射前にアドレナリンを注射した場合

第4表 毒素及びアドレナリン注射の時間と増強との関係

			判定 (3 匹平均)
アドレナリン注射時間	毒素注射前 6 時間		14.3×16.7mm ++
	” 4 ”		14.3×17.3 ++
	” 2 ”		15.0×17.3 ++
	同 時 (混合注射)		19.3×23.0 +++
	毒素注射後 2 時間		20.7×23.0 +++
	” 4 ”		20.3×25.3 +++
	” 6 ”		19.3×24.7 +++
	” 8 ”		16.0×18.0 ++
	” 10 ”		17.0×18.7 ++
	” 12 ”		18.5×19.5 ++
対 照			14.7×17.3 ++

は、対照に比し大差を認めなかったが、混合注射の場合、及び毒素注射後 6 時間迄にアドレナリンを注射した場合は、表示の如く反応の増強を認めた。即ち毒作用により出血壊死がおこる時間に、アドレナリンの局所血管に対する作用が、併存する場合に増強が起るものと推察される。

（尚この場合の毒素は前野株を用い、抽出方法は同様なるも、遠心は 12,000 r. p. m. 1 時間行い、その上清を毒素液として用いた。）

病理組織学的検討

実験系列

- 1) アドレナリン (25,000 倍) 0.2cc + 生塩水 0.2cc
- 2) 毒素 0.2cc + 生塩水 0.2cc
- 3) アドレナリン (25,000 倍) 0.2cc + 毒素 0.2cc

以上 3 系列につき、それぞれ家兎皮内注射後 1, 3, 5, 8, 12, 18, 24, 48 時間目の各々に亘り皮膚を採取ホルマリン固定後ヘマトキシリンエオジン染色を行い、組織学的検討を加えた。

実験成績を要約すると、本病変の特徴である血管の変化、出血、神経細胞の変性、細胞浸潤、潰瘍形成、壊疽等の変化は、毒素単独の場合及びアドレナリン加毒素の場合も共に同様に認められ、著明な差は見出せなかった。但し多少興味ある事は、毒素単独の場合、出血と血管の変化が比較的中心より周囲に拡大する傾向があるのに対して、アドレナリン加毒素の場合、広範囲に比較的一斉に出血、血管の変化を示す傾向にある事が認められた。尚アドレナリン単独の場合は、注射後 3 時間目において既に局所毛細血管の充血が認められたが、この事はアドレナリン加毒素の場合、単に局所毛細血管の収縮、組織の乏血、毒素の吸収遅延等のみが増強の原因ではなく、恰もアドレナリンに依る充血期と毒素に依る出血とが協同作用を行い、一層増強拡大せるが如き観を抱かせた。

〔Ⅲ〕種々の生菌、毒素、並びにツベルクリンの皮内注射におけるアドレナリンの影響

- 1) 使用生菌 インフルエンザ菌、髄膜炎菌、ブルセラ菌 (Br. suis) 百日咳菌。
- 2) 使用毒素：ジフテリア、破傷風。

実験方法：それぞれの生菌及び毒素に対し、表示の通り 12,500 倍アドレナリン溶液を加え、1 時間放置後、その 0.4cc を家兎の皮内に注射した。実験結果は第 5 表に示した如く、百日咳菌程著明ではないが、大部分の皮内反応において多少の増強が認められた。特に対照が弱い皮内反応を起す程度の、弱毒の場合にアドレナリンを加えると差が現われる様である。

尚反応時間の遅いジフテリア、破傷風の場合は、毒素とアドレナリンを混合して注射するよりも、毒素注射後 12~24 時間後に同局所に 25,000 倍アドレナリン溶液 0.2cc 皮内注射し 48 時間後に判定した方が増強を認められる。このこともアドレナリンの作用が局所的であることを考えさせる。結核感染モルモットにおける、ツベルクリン反応に対するアドレナリンの影響については次の

如く行つた。

実験方法：10匹のモルモットを用い、人型結核菌 H_{37} 株を4匹に0.5mg、3匹に0.1mgを腹部皮下に接種、残りの3匹を対照とした。ツベルクリンは動物用として抗酸菌研究所より分与を受け、その10倍稀釈溶液にて結核感染後、3週目と5週目の2度に亘り反応を行つた。即ち上述の稀釈ツベルクリン0.15ccに12,500倍及び25,000倍アドレナリン溶液0.15ccを加え、対照としてアドレナリンのみのものを置き、室温1時間放置後脱毛背部の皮内に注射し反応は24~48時間後に判定した。

実験成績：反応は第3週目において既に現れたが、12,500倍アドレナリン加の場合、反応は増強するも、対照のアドレナリン単独にても多少反応を示し、為に判定が困難であり、又25,000倍アドレナリン加の場合、単独にては局所に殆んど変化を認めないが、反応も亦それ程の増強を認めなかつた。5週目の場合も同様の結果を示した。即ちツベルクリン反応の場合、アドレナリンに依る影響については著明な差を認める事は出来なかつた。

〔Ⅳ〕アドレナリン類似薬剤、並に拮抗的薬剤の皮内反応に及ぼす影響

使用薬剤及び濃度：エフェドリン (10mg/cc, 1mg/cc), ホルデニン (10mg/cc, 1mg/cc), カフェイン (1mg/cc), ヒスタミン (0.2mg/cc), ウレタン (1mg/cc), ヒアウロナーゼ (500単位/cc), アセチルコリン (50mg/cc), アトロピン (0.5mg/cc), テオフィリン (15mg/cc), コーチゾン (25mg/cc, 2.5mg/cc), ドーカー (5mg/cc, 0.5mg/cc) 等。

上記薬剤0.2ccに百日咳毒素0.2ccを加え、皮内反応を行つたが、何れもアドレナリンの如き増強は認められず、著明な差は見出せなかつた。

考 按

以上述べた如く、百日咳毒素の皮内反応を増強する家兎の副腎抽出液中の有効成分はアドレナリンである事が確められ、その作用機転についても或る程度解明は得られたと思う。近年 Tonutti¹⁾ は細菌毒素の副腎皮質への影響について分類し、(1), 副腎皮質に何等の影響を与えぬもの、(2), 毒素の stressor としての性格により、副腎を障碍するもの、(3), 副腎を直接障碍するもの、とに分けているが²⁾、百日咳毒素は皮内接種では副腎皮質に反応は現われない。即ち彼の分類に従えば(1)に属する訳であるが、一方小此木等³⁾の実験に依ると、ACTHを予め投与しておく、副腎皮質に百日

咳毒素の影響と思われる壊死が認められる事を報告して居る。更に興味ある事はACTHの投与により百日咳毒素の皮内反応時間が目立つて短縮する事、即ちACTH投与による副腎皮質ホルモンの分泌亢進が、血管壁の透過性に影響して局所の出血反応を促進したものであらうと報告している。この説に従えば毒素の皮内反応におけるアドレナリンの意義についても、副腎皮質を通じての影響が考えられる訳であるが、然しアドレナリン加の場合は、毒素の反応が著明に増強せられるのに対して、前者の場合は反応時間の短縮のみで増強は認めて居ない。即ちアドレナリンの意義が或る程度副腎を介して居るとしても、主なる作用機転は、前に述べた実験成績と考える時、局所の皮膚組織、特に毛細血管に直接影響を与えるものと考えられる。

又、ツベルクリン反応におけるアドレナリンの影響については、1955年 A. Pepys¹⁰⁾ が Tuberculin patch test においてはアドレナリンにより反応が増強されるが、マントー氏反応では逆に弱まると報告し、又、町口¹¹⁾もツベルクリンにおける諸種物質の影響について述べて居るが、何れも本実験同様アドレナリンによる著明な増強は認めて居ない。

然し一方、Stetson¹²⁾によれば、BCGで免疫された兎におけるツ反応の場合、epinephrinを同局所に注射する事により局所の反応が増強される事を報告して居る。Stetsonの場合 epinephrinは1000倍稀釈溶液0.5~1ccを局所注射して居り、更に epinephrin 単独にては局所に何等変化を示さないと報告している。

私の場合はアドレナリン単独にての局所変化を恐れ

第5表 その1) 生菌

		菌 量	
		0.4mg	0.04mg
百 日 咳 菌	アドレナリン	++	++
	0	++	+
インフルエンザ菌	アドレナリン	+	+
	0	±	-
髄 膜 炎 菌	アドレナリン	+	+
	0	±	-
ブ ル セ ラ 菌	アドレナリン	++	+
	0	++	+

アドレナリン 12500 倍溶液 0.2cc

各菌種は夫々表示の菌量を0.2ccの中に含む
(48時間判定)

その2) 毒素

	ジフテリア毒素 (モルモット MLD)		
	1/5	1/50	1/500
アドレナリン	++	+	±
対 照	++	+	±

	破傷風毒素 (マウス MLD)		
	1/5	1/50	1/500
アドレナリン	±	±	—
対 照	±	—	—

アドレナリン 12500 倍液 0.2cc + 毒素液 0.2cc を皮内注射

その3) 毒素注射後、各時間おきにアドレナリンを注射した場合

	アドレナリンの追加注射時間			対照
	12時間	24 〃	36 〃	
ジフテリア毒素 (モルモット MLD 1/500)	+	+	±	±
破傷風毒素 (マウス MLD 1/5)	+	+	干	干

Stetson の約 1/50 ~ 1/1000 を用い、モルモットにてツ反応を行つたが、前述の如く著明な差は見出せなかつた。

又同じく Stetson の実験によれば、髄膜炎菌毒素の皮内反応の際、epinephrin を同局所に注射する事により、局所の反応が著しく増強された事を報告している。私の場合も表 5 の如く、髄膜炎菌の皮内反応がアドレナリンにより多少増強されて居るが、この場合も同様に Stetson のそれに比しアドレナリンの量は約 1/50 を用いているに過ぎず、彼の実験成績の如き著明な差は認めない。

即ちこれ等の事は、ツ反応及び髄膜炎菌毒素のみならず、あらゆる皮内反応において、アドレナリン注射の量と時期とを適当に組合せる事により、種々の皮内反応が

増強される可能性があるものと思われ、更にこの事は、従来個体差として片付けられた、動物による皮内反応の強弱の差も、或る程度局所のアドレナリンが関与しているのでは無いかとの予想を抱かせるものがある。

結 論

1) 百日咳毒素と副腎抽出液とを混合して皮内注射する事に依り、毒素の皮内反応を増強する事を認めた。

2) この作用は副腎の成分中アドレナリンに依るものと考えられ、その作用機転としては局所の皮膚組織殊に毛細血管に直接作用して其の透過性を高めるものと思われる。

3) 百日咳菌以外の毒素及び生菌の皮内反応に対しても、アドレナリンは多少増強する様である。

4) アドレナリン類似薬剤及び拮抗的薬剤と考えられるものにつき、同様の実験を行つたが、アドレナリン以外には著明な増強物質を見付けて居ない。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師黒屋教授に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Duran-Reynals, F.: J. Exp. Med., **50**, 327, 1929.
- 2) Duran-Reynals, F.: Bac. Rev, **6**, 197, 1942.
- 3) 山本郁夫, 日新医学, **41**, 513, 1954.
- 4) Robbins, K. C. and Pillmer, L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **74**, 75, 1950.
- 5) 氷室功, 日細誌, **10**, 469, 1955.
- 6) 善養寺浩: 綜合医学, **8**, 377, 1951.
- 7) Tonutti, E.: "The mechanism of inflammation." 1953.
- 8) Selye, H.: The stress of life, McGraw-Hill Book Co., New York, 1956.
- 9) 小此木丘: 内分泌, **2**, 119, 1955.
- 10) Pepys, A.: Amer. Rev. Tuber., **71**, 49, 1955
- 11) 町口久男: 結核, **21**, 494, 1946.
- 12) Stetson, C. A.: J. Exp. Med., **101**, 421, 1955