ジフテリアトキソイドの精製に関する研究

村田 良介・山田 隆子・黒川 正身・久保田憲太郎

予防衛生研究所検定部 (部長 中村敬三博士)

〔受付: 7月7日, 1950年〕

ジフテリア精製トキソイドの臨床的應用は、細谷教授¹⁾により早くから提唱されているが、最近欧米でも成人のジフテリアの流行が屢々起る²⁾ので、その予防のために精製トキソイドが用いられている。殊に Pappenheimer³⁾により、副作用の本態の問題が詳細に検討され、ジフテリアに感受性のある人は、菌体蛋白には敏感でも純粹のトキソイドによる副作用は少いことが明らかになったので、純度の高い精製トキソイドの臨床的應用が望まれる。又免疫化学の進歩につれて、毒素抗毒素間の反應の研究にも出来るだけ純度の高い材料を用いることの必要性が痛感される。

さてジフテリアの毒素やトキソイドの精製に関しては、今までに色々^{4) 5) 6)}検討されているが、色々の培地でつくつたトキソイドについて比較検討した結果、簡単に純度の高いものを得ることが出来たので、その免疫学的性状をしらべた。

実験材料並びに実験方法

1. 使用菌株は PW 8 トロント株で、マルタンブイオンにうえ、充分菌膜をつくらせた後、毒素用培地にうえた。

2. 毒素用培地は次の四種を用いた。

(1) マルタンブイオン: Taylor⁷⁾の方法による豚胃消化液と細谷研究室の方法⁸⁾による牛肉醋酸浸出液を用いた。

(2) Pope & Smith のトリプシン消化培地⁹⁾: Pope の原法によつたが酵母は用いながつた。

(3) ベプトン培地: ベプトンを窒素源として、これに Mueller¹⁰⁾の第2液及び第3液を添加してつくつた。Lf 40~70位のものが常時得られる。0.4%のホルマリンを加えると2週間位で無毒化される。

(4) 無蛋白培地: 谷¹¹⁾はベプトンの硫酸及びバリット分解液を用い、ビウレット反應陰性の培地でボトリヌス毒素をつくつたが、私等はこれを應用し、Mueller¹⁰⁾の培地をつくつた。材料としてはポリベプトンを用い、硫酸分解液及びバリット分解液を等量混合したものを第1液として用いた。この方法は塩酸分解よりも、食塩の濃度が低く、容易に一定の成績が得られる。吾々の用い

た菌株では、硫酸分解液のみの場合よりも、バリット分解液を加えた方が Lf の高い毒素を得た。又酸分解液にトリプトファンを加えてもよい。通常 50~90(100) Lf のものが容易に出来る。この毒素にホルマリンを 0.4%に加えると、pH 7.0 で 37°C 12~14日で完全に無毒化する。

3. 精製後の収量は、すべて Lf 単位により測定し計算した。最終の Lf は 5%の間隔で測定した。

4. 純度は 1 Lf 当りの窒素を測定し、最純なものを 0.00046 mg N/Lf¹²⁾として比較し算定した。窒素量はマイクロキールダール法により全窒素を測定したが、三塩化醋酸で沈澱させ測定した蛋白窒素量より算出した價も併記した(PN と記した)。

5. pH はすべてアンチモン—甘汞電極で測定した。

以上四種のトキソイドの性状は第1表に示す通りである。

実験成績 (其の1)

肉を主成分とした培地よりつくつたトキソイドの場合

1. Ca による沈澱

マルタンブイオン及び Pope の培地では、CaCl₂ を 2%迄加えても殆んど有効成分が沈澱しない。又その上清の純度にも著しい変化が認められない。予め Na₂HPO₄を加えたトキソイドに CaCl₂ を 1%以上に加えると始めて有効成分が沈澱する。この際苛性ソーダを加える必要はない。沈澱からクエン酸ソーダによりトキソイドを抽出出来るが、沈澱しただけの量を完全に恢復することが出来ないことがある。抽出されたトキソイドの純度は 4%(マルタンブイオン……PN)に過ぎない。

2. Al による沈澱

マルタンブイオンのトキソイドに Schmidt¹³⁾のアルミナクリームを用いると、トキソイド量の 3/4 量迄加えても大部分は吸着されない。その上清の純度は殆んど原トキソイドと差がないから、粗トキソイドに直接この方法

MURATA, Ryosuke; YAMADA, Takako; KUROKAWA, Masami and KUBOTA, Kentaro: Studies on The Purification of Diphtheria Toxoid. Japan. J. Bact., 5(6): 407-411, 1950.

第1表 原トキシノイドの性状

トキシノイド	LF/co	Kf (分)	N 量		N/LF		純 度	
			(全) mg	(蛋白) mg	(全)	(蛋白)	(全) %	(蛋白) %
マルタン原	20	間接法	3.02	0.131	0.15	0.0065	0.3	7.0
H原(ポーブ)	26	80	2.38	0.155	0.92	0.0060	0.041	7.0
K原(ペプトン)	60	48	2.36	0.108	0.039	0.0018	1.2	25.0
PII 原(無蛋白)	60	25	3.05	0.163	0.050	0.0027	0.92	17.0

第2表 肉を主成分とする培地よりつくつたトキシノイドの精製

1. 酸による沈澱

martin 培 地			Pope & Smith 培地		
pH	收 量 %	純 度 %	pH	收 量	純 度
4.0	68.7	7.7 (PN 25.6)	4.2	33.0	5.4 (PN 18.4)
3.8	93.7	11.5 (" 28.8)	3.7	46.5	7.1 (" 27.1)
3.6	93.7	11.5 (" 23.0)	3.2	33.0	6.1 (" 12.1)
3.4	100.0	7.9 (" 30.0)	2.7	±	
3.8	100.0	7.1 (" 23.0)	(酸沈2回)		
3.2	87.0	5.9 (" 19.1)		18.0	12.8
2.7	91.0	6.5 (" 21.9)	(硫酸 1/3 飽和+酸)		
2.2	67.5	5.1 (" 14.4)	4.6	86.0	22.0 (PN 27.0)

2. 併 用 法

番 號	培 地	精 製 方 法	純 度	
			收 量 %	N/LF
H6B	ポーブ	Zn 沈→抽出→硫酸分劃2回→透析	36	7 0.0064
H12N	"	Ca 上清→硫酸分劃→2回→透析	75	4 0.0120
H12Z	"	Ca 上清→Zn 沈→抽出→透析	60	11 0.0043
H14	"	Zn 沈→抽出→硫酸分劃2回→透析	52	22 0.0021
H17B	"	"	24	35 0.0013
H18	"	Zn 沈→抽出→硫酸 1/3 F→HCl 沈	48	29 0.0016(PN)
MI	マルタン	"	58	26 0.0018()
MI I	"	"	×	16 0.0028()

を用いるのは適当でない。次に明礬を用いると1%位で最もよく沈澱し、クエン酸ソーダにより抽出出来る。マルタンブイオンでは収量90%で、純度は5~6(PN)%のものが得られ、Popeの培地の場合もほぼ同じで、純度の高いものは期待できない。又明礬を加えるとpHが5.0近くに下るので注意を要する。

3. Zn 及び Cd による沈澱

Zn は細谷、宮田法¹⁰⁾として知られており、Cd は Eaton⁹⁾ が好んで用いた。これ等の沈澱剤は抽出が容易なことと、中性附近で処理出来、低温を用いる必要がない

等が前二者より有利である。ZnCl₂ でも CdCl₂ でも大差がない。ZnCl₂ で沈澱させ、0.2%の ZnCl₂ でよく洗い、Na₂HPO₄ により抽出する。この際加える ZnCl₂ 量、及び pH は培地により多少の差があるが、大体 ZnCl₂ 0.5~1%で、中性か弱酸性で処理すると大過なく、大体90%(殆んど100%近く) 恢復する。純度はマルタンブイオンでは4%(PN 14%)、Pope 培地で5~7%(PN 15%)が普通である。

4. 硫酸安門による精製

トキシノイドに硫酸安門溶液を加え、0.3~0.5 飽和の間の沈澱を集め、蒸溜水にとかした後0.05%の NaHCO₃ に対し氷室で透析を行う。精製の結果は、マルタンブイオンでも Pope の培地でも大差がなく、1回の分劃では収量75~80%、純度2.5%位となり、3回分劃をくりかえしても純度は4%以上にならず、収量が50%以下に下るので、硫酸のみを単独に用いることはあまり効果的な方法でない。

5. 酸による精製(第2表参照)

主として塩酸を用いた。3°C以下で沈澱をつくり、濾過し集め、稀酸緩衝液にとかした。遠心 10°C以下に保たれるならば、短時間の遠心により沈澱を集めてもよい。2, 3の例について塩酸と醋酸とを比較したが、著明な差は認められなかつた。マルタンブイオンにては沈澱域が広く、pH 3.4~4.0の附近で、1時間半以上放置した場合が最もよく、収量90%(100%)以上で、

純度もこの附近の pH で最高で、7~11%(PN で 23~30%)のものが得られ、今迄のべた精製方法の中で最もいい成績が得られた。Pope の培地では pH 3.7~3.9 附近が最高で、純度は7%(PN で 27%)位であるが、収量は46%位が最高でマルタンブイオンに比し成績が悪い。又酸沈澱を更に反覆すると純度はよくなる(12%)が、収量は低下する(18%)。この際上清を中和してLfを測定すると、殆んど定量的に残存していることが知られるから、酸により破壊されるのではなく、マルタンブイオンの場合に比べて沈澱しにくいと思われる。そこで硫

安を加え $\frac{1}{3}$ 飽和で生ずる沈澱を除き, 上清に酸を滴下し pH を 4.6 位にすると, 殆んど大部分の有効成分が沈降し, 収量 86% 純度も 21% のものが得られる (PN 26 %).

6. 併用法

以上のべた様に単独の精製ではあまり純度の高いものが得られないので色々の方法を併用してみた。

(1) Pope の培地で, CaCl_2 を 1% 加え沈澱を除き, この上清を硫酸分割, 又は ZnCl_2 による沈澱抽出を試みたが, 純度は稍々高くなるが収量は低下し, ZnCl_2 の場合で収量 60%, 純度 10% 位であり効果的でない。

(2) 次に ZnCl_2 処理後硫酸による反覆分割を試みると, 純度は 34%~21% で非常によくなるが収量は 24~52% となる。

(3) 次に ZnCl_2 処理後硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和沈を除き, 塩酸で pH 4.0 にし沈澱させる方法を試みた。マルタンブイオンで収量 58% 純度 25%, Pope の培地では収量 48%, 純度 28% となつた。水野¹⁰⁾ はマルタンブイオンで, 硫酸-酸法を反覆して極めて純度の高いものを得るに成功した。しかしこの方法を反覆すると収量が著しく低下することを免れない。

実験成績 (其の 2)

上述の様に 2, 3 の方法を併用し可成り純度の高いものを得たが, 30% 以上に到達することは仲々困難であつた。この原因は Norlin¹⁰⁾ ものべた様に, 培地の組成にも関係がある。Eaton⁴⁾ はプロテオーゼペプトンを用い, Pappenheimer⁵⁾ は無蛋白培地より出発した。Linggood

¹¹⁾ も培地を改良することにより精度の高いものを得るに成功した。吾々もペプトン培地, 無蛋白培地について精製を試みた。

7. 予備試験

酸沈澱を試みると第 3 表に示す様に純度はペプトン培地及び無蛋白培地でそれぞれ 34% (PN 46%) 及び 10% (PN 80%), 収量は 40~50% 位のものが容易に得られるが, Kf が著明に延長するので好ましくない。硫酸を加えておいて, 酸沈澱すると Kf は殆ど延長せず収量も 80% に上る。次に無蛋白培地のトキソイドに硫酸を直接加えると, 有効成分は 10% 位しか沈澱しない。Pappenheimer 等は, 低温濃縮して後硫酸を用いたが, ZnCl_2 にて沈澱抽出することにより約 10 倍濃縮は可能で, 殆んど% に近く回収出来, Kf より見た変性も殆どなく, 極めて手軽に行えるので私等はこの方法を用いた。特に ZnCl_2 の濃度, pH の影響が大きいからその都度定めなければならないが, 大凡 ZnCl_2 0.5~1% 弱酸性で行う。

8. Zn-硫酸-酸法

以上の成績を綜合して, ZnCl_2 で処理濃縮後, 硫酸 $\frac{1}{3}$ 飽和沈を除き, その上清に酸を加え pH 4.0 とする方法を試みた。

第 3 表に示す様に, 収量 30~50% で, 僅か 1 回の連続操作により, 純度 80% 以上殆んど純粋に近いものが簡単に得られた。又 ZnCl_2 処理後硫酸分割を反覆してもよい。酸沈法に比し, Kf が非常に短かく, 変性も少いと考えられる。ペプトン培地では, ペプトンの種類によつても可成りの差が認められる。又 1 cc 当りの Lf 價の

第 3 表

番 號	培 地	精 製 方 法	収量	純 度		Kf 分	原トキソイド Kf 分
				%	N/LF		
KIA	ペプトン	Zn 沈→抽出→硫酸 $\frac{1}{3}$ F→HCl 沈→透析	※	98	0.00047	25 (60)	48 (60)
KIB	"	"		89	0.00052	23 (80)	"
KIC	"	"		—	—	40 (50)	"
KID	"	"		96	0.00048	35 (65)	"
PSSC-BC	"	"	30	77	0.00060	70 (25)	128 (22)
P II	無蛋白	Zn 沈→抽出→硫酸 $\frac{1}{3}$ F→HCl 沈	52	89	0.00052(PN)	65 (25)	25 (60)
P II (b)	"	"	38	52	1.00088 (")	93 (35)	52 (50)
PSSC-03	ペプトン	"	53	42	0.00110	80 (60)	90 (23)
P IV	無蛋白	"	30	38	0.00120 (")	23 (38)	70 (40)
P III	"	HCl 沈	40	82	0.00056 (")	210 (30)	60 (35)
KO	ペプトン	"	52	47	0.00096 (")	92 (99)	48 (60)

註 1. Kf 欄 () 内は Kf を測定した時の LF 價

2. ※ 事故による損失あり算出不能

第4表 精製トキソイドの安定性

稀 釋 液	日 数	原 液		37 °C						氷 室			
				7 日		27 日		35 日		17 日		35 日	
				LF	KF	LF	KF	LF	KF	LF	KF	LF	KF
食 鹽 水		20	50	17	50	16	143	14	180	20	80	18	120
磷酸緩衝液(ゲラチン加)		20	50	20	50	20	143	20	180	20	80	20	110
磷酸緩衝液		20	50	20	50	20	143	20	180	20	80	20	110
硼砂緩衝液(ゲラチン加)		20	50	20	70	19	143	19	180	20	100	20	120

註 1. 磷酸緩衝液は Michaelis, 硼砂緩衝液は S'rensen を用い、緩衝液 1 に食鹽水 3 の割合のものを使用した。

2. ゲラチンは 0.02%に加えた。

高い程精製が容易である。この様に適当な培地さえ選ばば、極めて簡単な方法で容易に純度の高いものが得られる。

9. 精製トキソイドの安定性

1 cc 650 Lf として氷室に保存したものは極めて安定で 6 カ月間 Lf Kf 共に殆んど変化がなかった。次に精製トキソイドを色々の溶媒で Lf 20 になる様に稀釈し 37°C 及び 2°~5°C に保存し時々 Lf を調べた。第4表に示す通り、食鹽水が最も不安定で、ゲラチンを加えた緩衝液がいゝことを知つた。

10. 抗原性試験

抗原性試験の方法は既に報告¹⁸⁾したので細部は省略する。肉を含む培地より出発した精製度が低いトキソイド(30%以下)では原トキソイドに比し大差なく、精製法による差も認められない(既報)。ペプトン培地及び無蛋白培地より得られた殆んど純粋なトキソイドについては、1 cc 10 Lf とし 2 cc 20 Lf を 1 回注射すると、第5表

に示す様に、p II b (50%純度) では食鹽水で稀釈し注射しても対照の原トキソイドと大差がないが、純度の高い KID (93%) の場合は、食鹽水稀釈のものは著明に抗原性が低いことが見られる。しかし稀釈液にゲラチンを加えたものは原トキソイドと大差がない。この様に純度の高いトキソイドでは溶媒に注意を拂う必要がある。精製トキソイドが抗原性が悪い¹⁹⁾という報告や、あるいは反対に成績がいゝという報告²⁰⁾もあるが、溶媒に対する簡単な注意で差が出たり、あるいは又抗原性の比較の方法に幾多の検討すべき点があるので²⁰⁾、この点注意を要する。

総 括

1. 肉を主成分とした培地では、30%以上の純度のものを得ることは容易でない。

2. 毒素の製造にペプトン培地、水解培地を使用し、ZnCl₂ 沈澱で濃縮し、硫酸の存在のもとに酸沈澱又は硫酸による反覆分割を行えば、極めて手軽に非常に純度が

第5表 精製トキソイドの抗原性

トキソイド	シック陰轉	死亡率	血 中 抗 體		備 考
			プー ル	各 動 物 毎 に 測 定	
P II 原	6/6	0/6		1/2, 1/2, 1/2~1, 1/10, 1/20, 1/20~1/100	無蛋白培地 純度 52%
P II 精	4/5	0/5	1/5~1/2	1/2, 1/10, 1/10, 1/50, ×	
K 原	5/5	0/5	1/5	1/2 1/2 1/2 1/2 1/10~1/5	ペプトン培地 純度 96%, 食鹽水稀釋
KID 精 1	1/4	0/4	1/100~1/50	1/100>1/100>1/100>	
" 2	4/4	0/6	1/10~1/2	1/2 1/5 1/5 1/10 1/10 1/20	同上, ゲラチン磷酸緩衝液稀釋 マルタンブイヨン
マルタン原	5/5	0/5	1/5	1/2 1/5~1/2 × × ×	
マルタン精 II	6/6	0/6	1/10	1/5 1/5 1/20 1/20 1/50 ×	純度 16% 純度 58%(水野氏精製マルタンより)
MAPI	5/5	0/5	1/20	× × × × ×	

註 1. 血中抗體の測定は家兎皮内反應法による

2. 血中抗體プー ルは 4~5 匹分の血清を等量混合して測定したもの

高く、変性の少い精製トキソイドを得ることが出来る。

3. 精製トキソイドはゲラチン等を加えた緩衝液を用いて稀釈すれば安定である。

4. 精製トキソイドの抗原性は、稀釈液に注意を拂えば原トキソイドと大差がない。

終りに臨み、中村検定部長の御指導を深謝し、色々御忠言を戴いた傳研細谷教授、貴重な材料を分與された北里研究所沼田博士、予研水野傳一氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) S. Hosoya, E. Ozawa, T. Tanaka, S. Kawashima: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 114, 239, 1933.
- 2) L. Levine, L. Wyman, G. Edsall: *J. Immunol.*, 63, 219, 1949.
- 3) A. M. Pappenheimer, JR., H. S. Lawrance: *Am. J. Hyg.*, 47, 223, 1948.
- 4) M. D. Eaton: *J. Bact.*, 31, 347 and 367, 1936.
- 5) A. M. Pappenheimer, JR.: *J. Biol. Chem.*, 120, 543, 1937.
- 6) L. Pillemer, D. Toll, S. J. Badger: *J. Biol. Chem.*, 170, 571, 1947.
- 7) E. M. Taylor: *Ann. l'Inst. Past.*, 55, 474, 1935.
- 8) 細谷省吾: シフテリアの豫防, 161頁, 昭和22年 (1947).
- 9) C. G. Pope, M. S. Smith: *J. Path. Bact.*, 35, 573, 1932.
- 10) J. H. Mueller, P. A. Miller: *J. Immunol.*, 40, 21, 1941.
- 11) 谷茂: 實驗醫學雜誌, 18, 185, 昭和9年 (1934).
- 12) A. M. Pappenheimer, JR., E. S. Robinson: *J. Immunol.*, 32, 291, 1937.
- 13) S. Schmidt, A. Hansen, K. A. Kjaer: *Ann. l'Inst. Past.*, 46, 202, 1931.
- 14) S. Hosoya, S. Miyata: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 99, 773, 1928.
- 15) 水野傳一: 傳染病研究所集談會, 昭和22年9月 (1947).
- 16) G. Norlin: *Acta. Path. Microb. Scand.*, 24, 505, 1947.
- 17) C. G. Pope, F. V. Linggood: *Brit. J. Exper. Path.*, 20, 297, 1939.
- 18) 黒川正身, 村田良介, 久保田憲太郎, 中野豊策, 山田隆子, 大寺正光, 小堀元一: 日本細菌學雜誌, 5, 145, 1950.
- 19) 眞子憲治: 滿洲醫學雜誌, 27, 455, 昭和12年 (1937).
- 20) 黒川正身, 村田良介, 中野豊策, 久保田憲太郎, 山田隆子: 第23回日本細菌學會, 昭和25年 (1950).