ペスト菌菌体外毒素に関する研究

第2報 ペスト抗毒素に就て

降 旗 武 臣

東京大学傳染病研究所第一研究部 (部長 細谷省吾教授)

〔受付: 5 月 7 日, 1951 年〕

ペスト菌の抗原性物質に就ては先進により幾多の業績が輩出した。細谷教授が池上氏¹⁾⁶⁾⁷⁾と共にこの菌の液状培養の無菌的濾液の中に、又寺田氏²⁾⁶⁾⁸⁾と共に志賀赤痢菌の場合と同様に若き菌体の抽出液中に、一般菌体外毒素の定義に全く一致する毒素の存在を発見し、余も亦前報³⁾に詳報したようにこの菌の Exotoxin の存在を確証した。総ての菌体外毒素産生菌によつて起る疾患が、該当する抗毒性免疫を生体に能動的に賦與する事によつてある限度内では確実に感染が阻止される事が細谷教授及び一門の多年に亘る研究によつて立証された以上、ペスト免疫に於いてもこの事があてはまるかどうかを決定する事は理論上並びにペスト予防治療の實際上重大な研究題目であらねばならない。此線にそつて余の研究が行われ、次のような興味ある知見が得られたので報告する。

実 験

実験 I 菌体外毒素免疫モルモットの血清に抗毒素の証明

1) 実験試料 矢野株の液状培養濾液から部分的に精製された (partially purified) ペスト菌体外毒素粉末 (以下精製毒素と略記する)

2) 免疫法 精製毒素を滅菌生理食塩水に 0.1mg/0.2 cc の濃度に溶かし (マウス静脈内注射に於ける 100 mld に相当する) 0.2 cc 宛 200 g 内外の雄のモルモットの皮内に注射し 1 週, 2 週, 3 週及び 4 週目に 夫々心臓穿刺によつて採血し, その血清各 0.5 cc に等量宛の毒素溶液を混合し, 37°C 60 分加温後混液 0.2 cc 宛をマウス 3 匹の静脈内に注射を行い 5 日間観察した。

3) 成績 免疫第 1 週目にマウスの $\frac{2}{3}$ に於いて 2 A.U./cc (1 mld の毒素を中和する抗毒素を便宜上 1 A.U. = 1 Antitoxin Unit と定めた。)第 2 週に 4 A.U. 第 3 週目以後には 8 A.U. 程度の抗毒素の形成を認めた。

実験 II ホルモルトキソイド免疫マウスに於ける抗毒性免疫の成立

1) 精製毒素の一定量を取り生理食塩水に溶かし 0.4

% に局方ホルマリンを加え 37°C 24 時間でトキシoid 化, 第 1 群には 10 mld 相当量を, 第 2 群には 50 mld 相当量を, 第 3 群には 100 mld 相当量を。各群 20 匹宛に 1 回皮下注射を行い各週の終りに各群 3 匹宛に 2 mld の毒素液を静脈内に注射し, 抗毒性免疫の有無, 及び強弱を知らんとした。即ち 10 mld 相当量免疫群では第 2 週目以後多少の免疫の発生を認め, 50 mld 及び 100 mld 免疫群では 2 mld の毒素を以てする攻撃試験に充分耐過出来る程度の抗毒性免疫の成立を認めた。

2) トキシoid 注射量を極く少量とし, 1 週間隔で 2 回注射し最後の注射から 2 週目に 2 mld の毒素を静脈内に注射した場合の成績は相当明瞭に抗毒性免疫の発生を認める事が出来た。

実験 III 各種のペスト抗原を以て免疫された兎の血清中の抗毒素量

1) 免疫試料

a) 毒素免疫

- i) 液状培養濾液に於ける菌体外毒素
- ii) 精製菌体外毒素
- iii) 100°C 30 分加熱された精製菌体外毒素
- iv) 0.4 % ホルマリン添加によりトキシoid 化された精製菌体外毒素

b) 生菌免疫

- i) Otten の Tjiwidej 株⁴⁾
- ii) 春日の M II₁₀ 株⁵⁾

c) 菌体由来の抗原

- i) 粘稠性強力株 (矢野株) の 0.4 % ホルマリン殺菌ワクチン (1 mg/cc)
- ii) 同菌株の 100°C 30 分加熱殺菌ワクチン (1 mg/cc)

FURIHATA, Takeomi: Studies on the exotoxin of *Pasteurella pestis* II. The Institute of Infectious Diseases, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

第1表 ベスト各種抗原を以て免疫した兎免疫血清の抗毒素量

區別	抗 原		兎番號	免 疫				體 重 (kg)		抗毒素量 (A.U.)
				回 數	間 隔	總 量	日 數	免疫前	免疫後	
毒 素	粗 毒 素		14 17	13	5 日	15.45 mg	74	0.6 1.3	1.3 1.9	400 200
	精 製 毒 素	無 處 置	466 467	7	5	23.5	42	2.3 2.0	2.7 2.1	4000 2500
		100°C 30 分加熱	60 61					1.8 2.9	2.2 3.4	0 0
		ホルマリソ無毒化	81 82					2.1 1.9	2.5 1.5	3000 2000
生 菌	オツテン Tjiwidej 株		150 157	6	7	30.0	49	2.0 2.3	2.8 1.4	3000 1500
	春日: MII ₄₀ 株		160 163					2.1 2.0	1.6 1.4	1000 1000
死 菌	矢 野 株	100°C 30 分加熱	200 201	6	7	30.0	49	2.0 1.8	2.4 2.4	20 0
		ホルマリソ無毒化	229 249					1.9 1.8	1.2 2.3	1000 1600
	高 松 株	100°C 30 分加熱	50 51					2.0 1.8	2.4 2.3	0 0
		ホルマリソ無毒化	55 56					1.9 2.0	2.4 2.4	800 400

註: 免疫は總て靜脈注射による

iii) 非粘稠性強力株 (高松株) の 0.4%ホルマリソ殺菌ワクチン (1 mg/cc)

iv) 同菌株の 100°C 30 分加熱殺菌ワクチン (1 mg/cc)

これらの抗原を夫々 1.8 kg 以上の白色兎 (雄) の靜脈内に 5~7 日おきに繰返し注射し、最後の注射から 2 週間目に全採血した。抗毒素單位 (A.U.) の測定は各血清の生理食塩水稀釈液 0.5 cc 宛に毒素 0.5 cc (0.1 cc に 1~2 mld) を加え、全量を 1 cc とし 37°C 60 分放置後その 0.2 cc をマウス (10~15 g 白色) 3 匹宛の靜脈内に注射し 5 日觀察した。

第 1 表に示されたように毒素免疫兎血清の内粗毒素免疫血清 1 cc は 200 及び 400 mld を、精製毒素免疫血清は 3,500 及び 4,000 mld、精製ホルモールトキソイド免疫血清は 2,000 及び 4,000 mld を中和したのに反して 100°C 30 分加熱毒素免疫血清は全然抗毒素を含有しなかった事は毒素の 100°C 30 分加熱による破壊を意味するものとして重要な成績である。

対照実験としての菌体内由来の抗原免疫の場合は生菌

免疫では E 産生菌株が非産生菌株より抗毒素発生力が強かつた。死菌免疫では抗毒原性弱く、加熱抗原では全然抗毒原性を欠如した。この事実は加熱毒素抗原と同様に重要である。

実験 IV 抗毒素血清の感染防禦性

細谷教授及び一門は多年の研究により「抗毒性免疫を生体に能動的或は被動的に賦與する時は之に該当する總ての菌体外毒素産生菌の感染を防禦する事の可能である事」を立証し細谷学説⁶⁾を主張している。

余はベスト抗毒素血清をマウスに注射して被動的に抗毒性免疫を成立させる事により、菌力大なるベスト菌の感染が阻止出来るかどうかにかつて次の如き実験を行った。

1) 試 料

a) 抗毒素血清: 精製毒素免疫血清 No. 466 (4,000 A.U./cc) (実験 III, 第 1 表記載)

b) 対照血清:

i) 矢野株 100°C 30 分加熱ワクチン免疫血清 No. 249 (0 A.U./cc) (実験 III, 第 1 表記載)

- ii) 元大連衛生研究所製ベスト治療用馬免疫血清
No. 700 (3,200 μ)¹⁰⁾(倉内)

(本血清は昭和15.2.5より昭和16.7.26まで
免疫。P₂株(オツテンのTjiwidej株)生菌総
量211.5mgを始め頸部皮下注射を繰返し免
疫終了に近づきP₃₅₀株(矢野株)加熱死菌総量
1172mgを大量静脈内注射した由)

- iii) 健康兔血清

2) 効果検定試験 各種血清 0.1cc を予めマウスの
腹腔内に注射し, 4時間後強力菌矢野株の37°C 45時間
培養菌の生理食塩水浮游液を作りその0.1cc内に所定
の菌量を含むさせ皮下注射した。マウスは各群5匹宛,
2週間観察, 死亡後直に解剖に附し鏡検並に培養により
諸臓器の菌検索を嚴重に実施し成績を判定した。

成績は対照血清の健康兔血清群は攻撃後8日目以内
に, No. 249血清群は12日目以内に全部感染死を遂げた。
No. 700血清群は攻撃菌量大なる場合は防禦出来なかつ
たが10³mld以下の場合は感染を阻止する事ができた。

然るに抗毒素血清 No. 466群は10⁶mld迄の攻撃菌
量には完全に全マウスを感染死から免れさせた。(表略)

実験V 精製トキソイド免疫マウスの感染防禦試験

細谷, 池上氏¹⁰⁾はベスト菌横浜株液状培養濾液から
作られた濃縮明礬トキソイド免疫マウスに横浜株生菌の
10,000mldを注射し, 高率に感染死を免がれる事を報
告した。

1) 試料 液状培養から出発した精製ホルモールトキ
ソイド, 及び同精製毒素を100°C 30分加熱により無毒
化したもの, 矢野株菌体の0.4%ホルモールワクチン及
び100°C 30分加熱ワクチンを以て免疫原とした。

2) 実施法 マウス50匹宛を群別に総体重400gと
なるように区分した。之に夫々所定の抗原を0.2cc内
に含有させ皮下に注射した。2週間後生き残つたマウス
の数及び総体重を記載し, 矢野株生菌(マウスに対する
mld=10⁻⁸mg) 37°C 45時間培養菌の生理食塩水懸濁液
を作り, その0.2cc内に夫々の菌量を含むさせ, 各組
5匹宛皮下注射して2週間観察し, その間死亡したもの
は之を解剖鏡検及び培養を行いベスト敗血症死である事
を確め生残率を比較し成績を判定した。

第2表に見られるように精製トキソイド免疫群は極め
て優秀な感染防禦成績を示したが, 100°C 30分加熱毒素
即ち抗毒素性を全然欠如する毒素製剤で免疫された群は
全然感染防禦性を示さなかつた。この事実は抗毒性免疫
がベスト予防上如何に重要意義を有するかを如実に示し
たものである。同じ関係は菌体ワクチン免疫の場合にも

第2表 精製ベストトキソイド免疫マウスの
感染防禦試験

群別	總體重 (g)		攻撃 菌量 (mg)	結 果					生 存		
	前	後		1	2	3	4	5	數	計	%
精 ト キ ソ イ ド	400/50	420/48	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7	9	11				3 5 5 5 5 5	28/30	93
對 加 ト キ ソ イ ド	400/50	450/46	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7	5 5 4 5 5 6	5 5 6 7 8 9	6 6 7 8 9 9	6 6 7 8 9 9	6 7 8 9 9 9	0 0 0 0 0 0	0/30	0
ホ ル モ ル ワ ク チ ン	400/50	400/40	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7	7 8 9 9 9 9	9 10 9 9 9 9	9 10 9 9 9 9	9 10 9 9 9 9	9 10 9 9 9 9	2 3 3 5 5 5	23/30	77
加 熱 ワ ク チ ン	400/50	380/36	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7	5 4 6 7 9 8	5 5 7 8 8 10	6 6 7 8 8 10	7 7 8 8 8 10	7 7 8 8 8 10	0 0 1 2 4 3	10/30	33
健 康	400/50	518/48	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7	3 3 3 3 4 4	3 3 4 4 5 5	4 4 4 5 5 6	4 4 5 5 6 6	5 5 6 6 6 6	0 0 0 0 0 0	0/30	0

註 1. 精製トキソイド: 精製毒素に } 無毒化100mld
0.4%ホルマリン加 } 相当量皮下1回
加熱トキソイド: 精製毒素に } 注射
100°C 30分加熱

ホルモールワクチン: 矢野株0.2mg/cc生理食塩水
浮游液 0.4%ホルマリン加無毒化皮下1回注射

加熱ワクチン: 矢野株0.2mg/cc生理食塩水浮游
液 100°C 30分加熱無毒化皮下1回注射

健 康: 無處置

2. 免疫期間: 2週間

3. 攻撃方法: 矢野株37°C 45時間培養菌生理食塩水
浮游液0.1ccに夫々の菌量を含め皮下注射

4. 結 果 欄: 1~5はマウス番號, 表中に示された數
字は夫々のマウスの死亡日を示す

見られ, 抗毒免疫原性を有するホルモールワクチンは感
染防禦性を發揮したのに対し, 抗毒免疫原性を全く欠如
している100°C 30分加熱ワクチンは防禦性に乏しい事
が立証された。

この実験により細谷学説¹⁰⁾はベスト免疫にもあてはま
り, 抗毒性免疫を與えられたマウスに菌力強大な生菌が

第3表 由来を異にしたベスト精製毒素明礬トキソイド免疫マウスの感染防禦試験

區別	由來別	總體重 (g)		試験數	經 過 (日)														生存	
		免疫前	免疫後		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	數	%
精製毒素	液體	510/50	510/40	各群別30匹宛								1	1		4	1	1	22	73	
	E	520/50	540/46									1	1	2	1	1		24	80	
	菌體	500/50	590/48										2	1		1	1	25	83	
對照	オツテン株生菌	520/50	500/40	30匹宛					1			1		3	3	1		21	70	
	春日株生菌	510/50	480/35						1		2	1	1	1	3	1	1	19	63	
	衛研ベストインムノゲン	500/50	480/38						1	1		2	4	3	2	1	1	15	50	
	健康	500/50	600/48						2	4	8	9	7					0	0	

- 註：1. 免疫方法 a. 精製毒素明礬トキソイド群は夫々由来を異にした精製毒素の 10 mld 相当量を皮下 1 回注射 14 日免疫
b. オツテン株 (Tjiwidej) 春日株 (MIL₄₀) 群夫々生菌 0.2 mg 皮下 1 回 14 日免疫
c. 衛研⁹⁾のベストインムノゲン群は 0.2 cc (6 μ=生菌 6 mg 相当) 皮下 1 回 14 日免疫
d. 健康群は無処置
2. 攻撃方法 矢野株 37°C 45 時間培養菌生理食鹽水浮游液 10⁻⁶mg (100 mld に相当) 皮下注射
3. 經過欄 14 日間觀察期間中の死亡マウス數

浸入しても感染が確実に阻止されるのである。

実験 VI 抗毒性免疫の成立したマウスの体内に侵入した強力生菌の運命

前実験でトキソイド免疫の生菌感染防禦性の極めて強大である事が証明されたので茲ではトキソイド注射によつて抗毒性免疫が成立したマウスに強力生菌を皮下注射し逐日之を殺し、解剖して菌の体内における運命を追求した。

実施法 免疫群及び対照の無処置群に 100 mld に相当する 10⁻⁶mg の生菌を皮下注射し逐日 2 匹宛エーテル麻酔死させた後解剖し、注射局所、所属淋巴腺、心、肺、脾、肝臓を培養して菌の傳播の状況を知らんとした。

免疫群では注射局所に生菌が証明されるだけで、各臓器は勿論、所属淋巴腺にさえも菌は存在しない。第 2 日目迄は相当多数の生菌を証明した局所でも、第 3 日以後は日毎に菌數激減して第 7 日目には 2 匹共局所にさえ菌を証明する事が出来なかつた。

対照の非免疫群は局所の発赤強度で浸潤が強く、ゲラチン様の粘稠な時には出血をまじえた滲出液を認め、ここからは菌が毎常無数に証明された。肺の充血、心臓の鬱血も見られ第 4 日及びそれ以後に敗血症死した。

即ちこの実験により能動的に抗毒性免疫の成立した生体に強力菌が侵入した場合局所より先きに傳播し得ない事が証明された。(表略)

実験 VII 由来を異にした菌体外毒素から出発した明礬トキソイド免疫による感染防禦試験

ジフテリアトキソイドよりその明礬トキソイドの方が免疫發生力の強い事が一般に認められている。(細谷ジフテリア予防法)

余は前報⁹⁾に記載したベスト菌液培養濾液 (粗毒素) E 分離液及び洗滌菌体より細谷、宮田氏法で抽出精製したベスト菌体外毒素を 0.4% にホルマリンを加えてトキソイド化し、10% 加里明礬溶液量 1/10 を加えて生じた沈澱を遠心で集め原量の生理食鹽水に平等懸濁した明礬トキソイド 3 種 (10 mld 相当量) を以て各群 50 匹宛 1 回皮下注射し、14 日目に矢野株生菌 10⁻⁶mg=100 mld を以て攻撃し 2 週間觀察した。

対照としては Otten の Tjiwidej 株生菌⁹⁾、春日氏 MIL₄₀ 株⁹⁾ 生菌を 0.2 mg 皮下 1 回注射した群及び倉内⁹⁾のベストインムノゲンを以て免疫された群にも同様に 14 日後同量の生菌の攻撃を行つた。

第 3 表に示されたように 3 種の由来を異にした精製毒素から出発した明礬トキソイドは略々同等の耐過率 (73~83%) を示し兩種生菌免疫及びインムノゲン免疫のそれより好成績を示した。

總 括

以上の余の実験から大略次のことを要約出来る。

1. ベスト菌体外毒素免疫によりモルモット、マウス及び兎の血清中にその毒素を特異的に中和する抗毒素の產生を定量的に証明し得た。

2. ベスト菌体外毒素免疫による抗毒性免疫兎血清は強力ベスト菌の攻撃を完全に防禦し得る強大な被働性免

疫をマウスに成立させ得た。

3. ベスト菌体外毒素により能動的に抗毒性免疫を賦與された生体に強力ベスト菌が侵入した場合ベスト菌は局所より先に進出する事ができない。

4. ベスト菌体外毒素のホルモールトキシイド及び明礬トキシイドによる能動的免疫を賦與されたマウスは強力ベスト菌の攻撃を高率に防禦し得た。

稿を終るに当り本研究の御提案, 御指導及び御校閲を賜わりたる恩師細谷教授に深甚の謝意を捧げ貴重な助言の労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 献

- 1) 細谷, 池上: 第15回聯合微生物学会記録, 24頁, 昭16.
- 2) 細谷, 寺田: 日本臨床, 3巻, 8号, 177頁, 昭20.
- 3) 降旗: ベスト菌菌体外毒素に関する研究, 第1報(前文).
- 4) Otten, L.: Gen. Tijdschr. v. Ned.-Indië, 74, 2948, 1934.
- 5) 春日: 日本医学及び健康保険, 3213, 9, 昭15.
- 6) 細谷: 臨床, 第1巻, 第3号, 346頁, 昭23.
- 7) 細谷: 日本臨床, 8巻, 7号, 571頁, 昭25.
- 8) 細谷: 日本臨床, 8巻, 7号, 572頁, 昭25.
- 9) 倉内: 東京医事新誌, 2964号, 99頁, 昭11, 細菌学雑誌, 493号, 121頁, 昭12.