硫酸亞鉛ワクチンの基礎的研究

第 1 報

高橋市五郎

傳染病研究所第一研究部 (指導 西沢行藏博士)

[受付: 8 月 23 日, 1951 年]

緒 言

細菌性傳染性疾患の予防法としては従来から各種ワクチンの接種が専ら行われて居る事は周知の事実である。独り結核に於ける B.C.G. の生菌ワクチンを除けば其他は一般に死菌ワクチンで従つて是等ワクチンの多くは当該細菌の理化学的方法により殺菌或は滅毒したものか又は細菌体より理化学的処置により毒素を抽出せるものに過ぎないのである。殊に赤痢ワクチンの如きは菌体に強毒なる物質の存在するがため反應は局所的或は全身的に強烈にして使用困難なる現状にあるのである。是等ワクチンの要は免疫原性を消失破壊することなく滅毒し且つ反應少なく或は全く無毒無、反應にして菌体を大量に使用し得ることを理想とするものであるが今日實際に應用せられつゝある感作ワクチン及び血清ワクチン等を以てしても尙お且つ反應は強烈にして吾々日常作業に従事するものは相当なる困難を経験する現状にあるを遺憾とし是れが研究に着手し専ら赤痢菌株に志賀菌及びチフス菌に應用し些か其の成績を得しを文献に徴するに今日迄赤痢及びチフスワクチンの如き殊に毒性強き赤痢志賀菌の免疫原性を保持しつゝ滅毒せんと試みし実験的研究は実に其の數少しとせず。即ち 1903 年志賀氏は感作ワクチンを以て好成績を得たと、1916 年 Thomson は血清ワクチンは尙お効果不十分なりとし 0.5% 石炭酸加ワクチンを主張し Adamson は赤痢志賀菌に対し過酸化水素及びオイゾールを用い、Colombo は稀薄塩酸に赤痢菌を浮遊せしめ約 50 度に於て 1 時間加温しアルカリを用いて反應を中和し之れを以て効果ありと報告されている。

藤本氏は鳥瀉氏のコクチゲンの優秀性を認め大山氏は酸化剤の酸化機轉を利用し滅毒を計りしも十分なる成績を挙げ得ざりしと。

1930 年星氏は諸種の吸着剤 (白陶土、アドース、骨炭末等) を用いて強く滅毒せりと、1927 年矢追、江島両氏は鳥瀉氏のコクチゲンよりも全菌を含有する煮沸ワクチンの優秀なる事を主張され其滅毒度は普通加熱ワクチンの約 4 分の 1 で凝集素発生状況及び感染防禦素発生等の

点に於ても優る事を、又村江氏は志賀菌にフォルマリンと明礬を以て処置せる志賀菌ワクチンが確に其の優秀性なる事を報告されている。其他枚挙に遑あらざるも以上是等の業跡はワクチン製造作業並に研究上見逃す事の出来ない学跡なりと思わる。

実験方法

実験材料の製造法

本実験に使用した菌株は傳染病研究所ワクチン室保存の菌株で細菌学的或は血清学的検査を行い其の確実なる菌株を選び其の S 型なる事は論を待ず (赤痢志賀菌は宮崎株、チフス菌は須藤株) 是等菌株を茄子型試験管普通寒天斜面上で (pH 7.2) 攝氏 37 度に於て 20 乃至 24 時間培養のものを予め重量を計測せる滅菌秤量壺に入念に撚取り再び秤量して其の重量を求め滅菌生理食塩水を以て 1 cc 中 10mg を含有する菌浮遊液を作り之れに 5% の割合に硫酸亞鉛を加え 1 夜室温に放置し菌体の完全に吸着沈降するを俟て翌日之れを遠心器に裝し上清液を捨て再び沈降せる菌体に 0.5% 石炭酸加滅菌生理食塩水を以て遠心器に懸け遠心洗滌を行い硫酸亞鉛の有無を検し其の全く陰性なるときに滅菌生理食塩水を以て元液に復し、ブイヨン、普通寒天斜面、葡萄糖高層寒天、カウフマン氏培地により培養試験を行い 4 日間の觀察により其の純粹なるときに殺菌及び防腐の目的に 0.5% の割合に石炭酸を加え更に培養試験を行い死滅且つ純粹なるときに本実験に供した。

免疫試験

先づ免疫開始前動物の自然免疫を保有しおるや否や即ち其の個性を知る爲め一部採血を行い其の凝集價を調べて見たが其の成績は大体凝集價は 20 倍から 80 倍内外である。

免疫後凝集反應

TAKAHASHI, Ichigoro: Fundamental studies on the Zinc Sulphate Vaccine. I. Institute for Infectious Diseases, Tokyo University. Jap. J. Bact., 7(2): 107-110, 1952.

チフス赤痢何れも第1表に示す如く50mg から100mg迄を皮下又は静脈注射を行い最終注射後7日目に採血、血清を分離して其凝集價を調べて見たがチフスに於ては50mg 皮下注射にて凝集價は5120倍陽性、10240倍は(±)乃至(+) 50mg 皮下注射5mg 2回静脈注射にて凝集價40560倍(++)陽性を示し以下菌量を増加するに従い

益々其上昇するを見るのである。

又赤痢に於ても50mg 皮下1回注射にて其凝集價は2560倍(+)陽性、50mg 皮下1回注射5mg 静脈注射にて凝集價は10240倍(+)陽性を示し以下表に示す通り菌量を増加するに従いチフスと同様凝集價の上昇するを見る。

第1表 家兔免疫後凝集反應

菌種	血清稀釋 倍數 動物番號	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	對照	注 射 量	
チ フ ス	1 號	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±	±	—	—	50mg	皮下
	2 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	50mg 5mg	1回 靜注
	3 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	70mg	皮下
	4 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	60mg 5mg	1回 靜注
	5 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	80mg 5mg	1回 皮下 靜注
	6 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	80mg 5mg	2回 皮下 靜注
	7 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	100mg	皮下
赤 痢	8 號	++	++	++	++	++	++	++	+	±	±	—	—	—	50mg	皮下
	9 號	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	±	—	—	50mg 5mg	皮下 靜注
	10 號	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	±	—	—	70mg 5mg	皮下 靜注
	11 號	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—	—	80mg	皮下
	12 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—	80mg 5mg	皮下 靜注
	13 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±	—	—	80mg 3mg 5mg	皮下 靜注
	14 號	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	±	—	80mg 5mg 5mg	皮下 靜注

第2表 硫酸亞鉛及び加熱處置による凝集反應の比較

菌種	血清稀釋 倍數 種 類	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	對照	注 射 量	
チ フ ス	硫酸亞鉛	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±	±	—	5mg	皮下
	加 熱	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±	—	—	—	0.5mg 1mg 2mg	靜注
赤 痢	硫酸亞鉛	++	++	++	++	++	++	++	+	±	—	—	—	—	50mg	皮下
	加 熱	++	++	++	++	++	++	±	±	—	—	—	—	—	1/100 1/50 1/20 1/5 1/2 mg	靜注

本表は硫酸亞鉛及び加熱處置による凝集價を比較するにチフスに於ては50mg 皮下1回注射にて既に其凝集價

は10240倍(+)陽性を示し、加熱處置によるものは反應の關係上1回の注射不可能なる爲め0.5mg, 1mg, 2mg,

2mg, と4回に亘り静脈注射を行い各注射間隔は注射当日より7日目毎に最終注射後7日目に採血して其凝集價を検するに5120倍(+)陽性を示す。又赤痢に於ては硫酸亜鉛処置によるものチフスと同様最終注射後7日目に採血其凝集價を調べて見たが2560倍(+)陽性, 又加熱処置によるものは又反應の關係上100分の1mg, 50分の1mg, 20分の1mg, 5分の1mg, 2分の1mgの5回に亘り静脈注射各注射間隔は7日目毎に行い最後に採血凝集價を見るに1280倍(+)陽性を示す。

以上兩者の凝集價を比較するに加熱ワクチンに比し硫酸亜鉛処置によるもの其の優秀なるを見る。

免疫前家兎血清に於ける感染防禦價を調べて見たがチフス赤痢共に血清 0.2cc, 0.1cc, 0.05cc の3種に分けてチフスは最少致死量(150分の1 Ose)のみ注射し対照共に斃死するを見る。

又赤痢に於ても血清量はチフスと同様に0.2cc, 0.1cc 0.05cc 及び対照をおき最少致死量(百分の1 Ose)のみを注射するに何れも生存せざりき。

赤痢及びチフスに於ける免疫後の感染防禦試験を調べて見たが各注射量の異なるに従い血清量は最大量は0.2ccより最少量0.0005ccに至る。方法は同時法による即ち血清と菌液とを混合して攝氏37度の孵卵器内に15分間入れよく感作して後マウスの腹腔に注射し4日間の観察により其生死如何を見て中和作用を定めたので使用菌液は血清と同様に各注射量の異なるに従い菌液も加減し最少致死量或は其の2倍量又は其の5倍量と各段階に区分して実験を試みたのである。

是れによる時は注射少量なるときは血清量も多く従て菌液も最少致死量のみを中和し増量するに従い血清量も少なく又菌液も最少致死量の2倍或は其の5倍量を中和させるを見るのである。

チフス及び赤痢に於ける受働性感染防禦試験を試みたのであるが使用動物は体重11乃至12瓦のマウス11頭を選び内1頭は対照とし他の10頭に硫酸亜鉛処置によるワクチンを腹腔内に注射しおき30日後に最少量をチフスは(150分の1 Oseを, 赤痢は 100分の1 Ose)注射するにチフスに於ては対照のみ死滅し其の他は全部生存するを見る。只赤痢に於ては対照は申すまでもなく死滅し其の他11頭中1頭が3週日の後死の轉帰を取り解剖所見に於て培養するに純粹に赤痢菌を証明し得た其他は皆生存せるを見る。

硫酸亜鉛及び加熱処置によるワクチン免疫による免疫血清中に沈降素の存在するや否やを検せり。

其の沈降抗原はチフス及び赤痢菌の20乃至24時間寒天

培養のものを搔取り秤量なし滅菌生理食塩水1cc中に10mgを含有する菌液を作り攝氏100度に於て15分間煮沸後ザイツ濾過器にて濾過し其の濾液を使用し兩者の沈降反應を比較するに先づ免疫血清は57度30分加熱し非働性となし免疫血清の上層に沈降原の原液2倍4倍と順次稀釈せるものを積層し白濁層の發生如何を観察したのである。

其結果はチフスに於ては硫酸亜鉛処置によるもの256倍陽性, 加熱処置によるもの64倍陽性を示す。

又赤痢に於ては硫酸亜鉛処置によるもの64倍陽性, 加熱処置によるもの32倍陽性を示し兩者共に硫酸亜鉛処置によるものは加熱処置によるものより其優秀なる成績を示しておる。

治療血清製造に対する大動物免疫は果して家兎並にマウスに於ける成績と同様なるや否やを試みたのである。

2000mg皮下に注射した場合其の凝集價は12800倍迄陽性, 又5400mg皮下注射した場合25600倍迄陽性を示し家兎に於ける成績と一致せるを認められ即ち其の増量さるゝに従い漸次其の免疫價の上昇せらるゝを見るのである。

免疫血清中に於ける抗毒價を測定したのである。動物は体重11乃至12gr内外のマウスを採ひ免疫血清は数段に分ち(0.002~0.000025)最少致死量の5倍量を混じ攝氏37度の孵卵器内に於て15分間感作し然る後マウスの腹腔に注射し4日間の観察に於て其の生死を確めたのであるが何れも最少致死量の5倍量を中和されて居る。かゝる事実よりして治療血清製造に対し一時に大量を注射し而かも短日間に所期の目的を達せらるゝものと信ずるのである。

結 論

以上の実験成績よりして赤痢菌及びチフス菌の硫酸亜鉛処置によるワクチン所謂醗酵ワクチンは赤痢, チフス菌の加熱ワクチンに比し免疫学上其の優秀なることを証明した。

1. 余の考案に係るワクチンを以てマウスを免疫するに其の予防的効果の甚だ優秀なることを実験的に証明し得た。

2. 加熱ワクチン免疫に於ては其の効果殆ど認め難し

3. 免疫処置後の感染試験は其の接種部位の異なると否とに係らず同様の予防効果を認め得た, 其生存率は殆ど100%に近き成績である。

4. 本ワクチンは接種後30日を経過するも其の予防効果に変化なく之れに依つても免疫性は長期間に亘り維持さるゝことを想像し得る。

5. 本ワクチンは注射後殆ど或は全く無毒、無反應で一時に大量を注射し得る。即ちマウスに於ては 20~25 mg モルモットに於ては 70mg 等である。

6. 家兎を免疫し血清中の抗毒を見るに感染防禦試験に於て血清 0.002~0.0005cc に於て最少致死量の 5 倍量を中和し得ることを確めた。

7. 馬に免疫するに第 1 回に 250mg, 第 2 回に 500mg を注射するに既に國際單位迄免疫價の上昇するを見る。

本研究要旨は昭和 18 年 4 月傳染病研究所集談会に於て発表した。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御鞭撻並に御校閲の勞を賜りたる恩師傳染病研究所第一研究部長西沢行藏博士に対し深甚の謝意を表し合せて終始御援助を賜りしワクチン室各位に謹謝す。

文 献

- 1) 村井通之: 実験医学雑誌. 昭和 15 年, 第 24 卷, 第 1 号.
- 2) 村井通之: 実験医学雑誌. 昭和 15 年, 第 27 卷, 第 8 号.
- 3) 森淳男: 日本医科大学雑誌. 昭和 15 年, 第 11 卷, 第 2 号.
- 4) 藤本照雄: 東京医学会雑誌. 大正 14 年, 第 39 卷, 第 9 号.
- 5) 杉本敬二郎: 衛生学傳染病学雑誌. 大正 15 年, 第 22 卷, 第 3 号.
- 6) 矢追秀武, 江島眞平: 実験医学雑誌. 昭和 2 年,

第 11 卷, 第 4 号.

- 7) 大山西一: 細菌学雑誌. 昭和 2 年, 第 375 号.
- 8) 満洲: 満洲医学雑誌. 昭和 5 年, 第 12 卷, 第 1 号.
- 9) 川島清: 軍医團雑誌. 昭和 5 年, 第 205 号.
- 10) 中富猪熊: 成医会雑誌. 昭和 6 年, 第 50 卷, 第 5-6 号.
- 11) 吉川吉次: 日本公衆保險協會雑誌. 昭和 7 年, 第 8 卷, 第 4 号.
- 12) 松本栄: 日本傳染病学会雑誌. 昭和 10 年, 第 9 卷, 第 5 号.
- 13) 細谷省吾, 川島四郎, 進藤寅二, 田中正一郎: 第 11 回聯合微生物学会記録. 昭和 12 年.
- 14) 志賀潔, 河村秀九, 土谷欽一郎: 細菌学雑誌. 第 339 号, 第 341 号, 第 348 号, 大正 13 年, 大正 14 年, (1924-5).
- 15) 河村秀九: 細菌学雑誌. 昭和 4 年, 第 40 卷.
- 16) 志賀潔: 満鮮之医界. 昭和 12 年, 第 97 卷.
- 17) 細谷省吾, 寺尾秀三, 高田眞: 実験医学雑誌. 昭和 8 年, 第 17 卷, 第 5 号.
- 18) 木村良恭: 大阪医学会雑誌. 昭和 4 年, 第 28 卷, 第 2 号.
- 19) 宮路重嗣: 微生物学.
- 20) 清野謙次, 里見三男: 免疫学及び其應用.
- 21) 秋葉朝一郎, 田中穰: 藥物領域の微生物学.
- 22) 松岡辰男: 実験医学雑誌. 昭和 17 年, 第 26 卷, 第 12 号.
- 23) 下條久馬一: 衛生学傳染病学雑誌. 大正 10 年, 第 16 卷, 第 34 号.