血清抽出によつて得られる百日咳菌易熱性 毒素の抗毒原性に就て

森 禧 子

傳染病研究所第一研究部 (指導 細谷省吾教授)

[受付: 9 月 21 日, 1951 年]

緒 言

百日咳の症状は百日咳菌の易熱性の菌体内毒素に基づく事は夙に Bordet et Gengou¹⁾ によつて病原菌発見當時記載されたが、その後「病原細菌の菌体内毒素は一般に耐熱性である事」が確認されて以来、Bordet の菌体内毒素病因説は各國學者から烈しく論議されるに至つた。

近年この菌の菌体を磨碎して得られた抽出液或は超音波によつて菌体を破壊抽出した所謂 Sonic extract に易熱性毒素と凝集元性物質とが含有されている事が大体承認された²⁾。

同じ易熱性毒素が *H. pertussis*, *H. parapertussis*, 及び *H. bronchisepticus* から得られ、又 *H. pertussis* toxin に対する抗毒素が後 2 者の毒素をも中和する事が Evans 及び Maitland³⁾ によつて見出された。

筆者と同門の井口氏⁴⁾も最近この菌の菌体の超音波抽出液中の毒素の抗毒元性を肯定した。一方 *H. pertussis* の液状培養の無菌的濾液にも易熱性毒素が見出されるに到つたが Wood⁵⁾ はこの毒素の免疫元性即ち抗毒元性を証明する事は出来なかつた。又桑島氏⁶⁾、塚口、関口氏⁷⁾はこの毒素の抗毒元性を否定している。

然るに Roberts 及 Ospeck⁸⁾ はこの菌の特定の菌株の液状培養に於ける易熱性毒素の抗毒元性を明確に証明した。

細谷、江上、林及筆者⁹⁾は「溶血性連鎖状球菌を核酸加ブイオンに培養した場合、普通ブイオン培養の場合よりも溶血毒素が著しく増加される」と云う岡本氏¹⁰⁾の業績の重要性に鑑み之を復試して大体承認したが、更に進んでこの事実が「溶血性連鎖状球菌菌体の血清抽出によつて得られる Weld¹¹⁾ の溶血毒素」との間に関連性をもつていように思われたので核酸ナトリウム水溶液を以て溶連菌菌体を振盪し、浸液に多量の溶血毒素を証明する事が出来た。

続いて極く最近阪大微研、塚口、関氏¹²⁾は百日咳菌の

菌体を非動物性馬血清、或は核酸ナトリウム水溶液を以つて振盪して易熱性毒素を抽出する事に成功したがその抗毒元性を証明する事は出来なかつた。

このように百日咳菌毒素の抗毒元性の有無に關しては諸家の一致を見るに至らず現在細菌學に於ける重要な研究対象になつてゐる。筆者は細谷教授指導の下に百日咳菌体の馬血清抽出によつて得られた易熱性毒素が特異抗毒元性を有する事を証明したので茲に報告する。

実 験

1. 使用菌株: 当教室保存の百日咳菌植木株
2. 毒素の抽出方法:

脱纖維牛血液を 10% に添加した Bordet-Gengou 培地に 37°C 48 時間培養した百日咳菌菌体をかきとり 10mg per ml の割合に新鮮馬血清に加え、滅菌試験管に入れ滅菌ゴム栓を以て密封し烈しく上下に約 20 分間振盪した後、30 分間高速遠心 (8000 r.p.m.) して得られた全く透明な上清を実験に使用した。

3. 血清抽出毒素の毒性:

体重 300 gr 以上の白いモルモットの背部の毛を刈り血清抽出毒素 0.1 cc を其の皮内に注射すると 24 時間後注射部位に特有な出血性潰瘍を生ずる。この周囲には貧血性の白色輪をつくりその外には発赤が囲んでいる。出血斑は漸次潰瘍化して陥凹浸潤し、5 日目頃から痂皮形成が起り、注射後 7~10 日後痂皮は脱落して後に癰痕を貽して治癒する。

モルモットの個性及び毒素試料により強弱の相違はあるが潰瘍の直径は 5~40 mm である。本抽出毒素の最小潰瘍惹起量(M.N.D.)は 32 倍稀釈液 0.2 cc 即ち 0.006 cc

MORI, Yoshiko: The Antitoxic Antigenicity of thermolabile toxin of *Hemophilus pertussis* obtained by serum extraction method. The Institute for Infectious Diseases, Tokyo University. Jap. J. of Bac., 7 (3): 201-204, 1952.

(論文の要は昭和 24 年 9 月 29 日傳染病研究所、予防衛生研究所學術集談会に於て発表した)。

である。

血清抽出毒素を馬血清、ブイヨン、或は生理的食塩水で倍数稀釈し、各稀釈液 0.2 cc 宛を多数のモルモットの背部皮内に注射すると、16~32 倍稀釈液に至る迄局所に黒紫色出血性潰死を生ずる事を確めた。

4. 抽出回数と潰死発生状況：

血清で抽出し高速遠心によつて得られた菌体を更に最初と同量の新鮮馬血清で 20 分振盪し、再び高速遠心して得られた透明な上清(第 2 回抽出液)と菌体とに分ち、更にこの菌体を新鮮馬血清により抽出した。

この操作を都合 5 回行い各回の抽出液を新鮮馬血清を以て倍数稀釈を行い夫々 0.1 cc 宛を同一モルモットの皮内に注射した。

その結果第 1~3 回抽出液まではその M.N.D. は 10 倍稀釈液 0.1 cc であるが第 4 回及び第 5 回抽出液のそれは各々原液 0.1 cc までしか潰死は起らなかった。即ち第 4 回以降は抽出毒素の減弱を示した。細谷、江上、林及筆者の等が核酸ナトリウム水溶液或は馬血清を以て溶血性連鎖状球菌の菌体を振盪した場合は得られた各回の溶血毒素は常に End-titer 迄完全溶血を示したが百日咳菌を血清を以て数回振盪抽出した場合の成績とは趣を異にする。

5. 血清抽出毒素の性状：

(イ) 血清抽出によつて得られた毒素は易熱性である。即ち血清抽出液を 56°C の水浴中に 30 分加温後原液 0.1 cc をモルモットの皮内に注射しても局所に全く異状を認めない。

(ロ) ホルマリンによる無毒化

毒素液にホルマリンを 0.2% の割に加え 37°C 48 時間放置後原液 0.1 cc をモルモットの皮内に注射しても局所に特有の変化を生じない。

対照として同じ毒素液にホルマリンを加えないで 37°C 48 時間放置した後 0.1 cc を同じモルモットの皮内に注射したが局所に著大な潰死を生じた。

(ハ) 抽出毒素の濾過性

予め Bouillon を通過させた Seitz E. K. 濾過板を用いて血清抽出毒素を濾過した場合濾液には潰死毒素が証明出来なかつたから Sonic extract の場合と同様血清抽出毒素はザイツ濾過板に吸着される。

6. 能動免疫：

血清抽出毒素を毎回新たに作り夫々 0.2 cc 宛を多数のモルモットに毎日 1 回宛皮内注射を続けて行くと第 1 表に示されたように 5~6 回目頃から局所反應が次第に弱まり遂に注射部位に肉眼的変化を起さないように

なる。

即ち使用モルモット 13 匹中 3 匹は途中で斃死したが、残り 10 匹中 5 匹は 6 回注射後最早局所に潰死を生じなくなつた。残りの 5 匹は衰弱したため注射を打切つたが恐らく休養させて体力を恢復させてから注射を再開すれば免疫の発生を見る事が出来よう。

即ち個性差はあるがモルモットを血清抽出毒素を以て免疫すれば能動的に之に抗毒性免疫を賦與する事が出来る事が証明された。

第 1 表 抽出毒素を連続注射回数と潰死直径

モル番號	注射回数	潰死直径 (mm)	注射回数	潰死直径 (mm)
1	3	15×20	7	25×13
2	4	15×20	8	—
4	3	15×15	5	—
6	5	10×8	9	—
8	7	10×10	8	—
9	3	10×10	6	—
17	3	10×10	6	死 亡
18	3	10×16	6	死 亡
42	3	15×15	8	7×7
53	2	25×20	7	10×10
33	2	20×10	3	20×10
72	4	10×12	7	10×10
25	1	20×20	5	死 亡

7. 被動性免疫：

前項の能動免疫によつてこれ以上血清抽出毒素を皮内注射してもその部位に変化を起さなくなつたモルモットから心臓穿刺により採血し得られた血清に抗毒素が含まれているかどうかを次のように実験した。

(イ) 免疫血清と抽出毒素を等量混合した場合：

上記免疫血清と抽出毒素とを等量宛混合し 37°C 1 時間放置後モルモットの皮内に混液 0.2 cc を注射し、24 時間目と 48 時間目とにその成績を判定したが、免疫処理を受けた事のない健康モルモットの血清と毒素液とを

第 2 表 海狸血清の毒素中和試験

免疫血清+毒素	潰死直径 (mm)
免疫海狸 No. 2 血清+毒素	20×20
免疫海狸 No. 9 血清+毒素	20×20
抽出毒素のみ	20×20

註： 各血清と血清抽出毒素液とは同量宛を混合し 37°C 1 時間後皮内注射を行つた。

等量宛混合し 37°C 1 時間放置後皮内注射した対照部位に比較して、少しも中和の傾向を認める事は出来なかつた。

(ロ) 抽出毒素を稀釈して免疫血清に混合した場合:

(イ) に於ける実験の失敗は恐らく抗毒素が存在するとしてもその力價が比較的低いため使用毒素を中和出来なかつたためではなからうかと想像されるので、抽出毒素を馬血清を以て 4 倍 (この 0.1 cc は 8 M.N.D. に相当する) に稀釈したものに免疫血清の倍数稀釈液の等量宛を加え 37°C 1 時間置いた後その 0.2 cc 宛をモルモット皮内に注射した。

第 3 表 免疫血清の中和試験

モルモット 番號	No. 8 抗毒素血清稀釋倍數					對照 4 倍稀釋 毒素
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
No. 73	—	—	—	—	—	20×20
No. 74	—	—	—	—	—	20×20
No. 76	—	—	—	—	—	20×20
No. 77	—	—	—	—	—	20×20
No. 79	—	—	—	—	—	20×20

第 3 表に示されたように 4 倍にうすめられた血清抽出毒素だけを皮内注射した局所には直径 20 mm の著明な潰死を生じたのに対して、能働免疫されたモルモットの血清は 16 倍稀釈迄も明かに同一毒素量を中和する事が出来た。

即ち血清抽出毒素液を原液のまま同量の能働免疫モルモット血清と混合して皮内注射した場合全く中和が見られないで一見この毒素が抗毒元性をもつていないように思われたが毒素を適当に稀釈して用いると中和現象が明らかに証明された。

故に免疫血清の毒素中和能を見るためには使用毒素が過大であつてはならない。又この免疫血清は抽出毒素に対する上掲の中和抗体と共に明かに凝集素 (1024 倍迄陽性) の産生を認めた。

考 察

上述の如くして百日咳菌菌体を新鮮馬血清を以て振盪すれば易熱性毒素が得られ、モルモットの皮内に注射するとその部位に出血性潰死を生ずる事は塚口、関氏等の業績と一致する。然し両氏はこの血清抽出毒素免疫元性 (抗毒元性) を強く否定しているが、筆者は上述の実験によりこの抽出毒素も明らかに抗毒元性を有する事を証明する事が出来た。

この菌の抗毒元性を否定する学者が多いのは、恐らく

その中和実験に使用した毒素量が過大であつたためであろうと思われる。この問題は目下研究中である。

結 論

1. 百日咳菌菌体を新鮮馬血清を以て抽出しモルモット皮内に注射すれば局所に出血性潰死を生ぜしめる。
2. 同一菌体を数回抽出すれば 4 回抽出以降は毒素の含有量が低下する。
3. この毒素は易熱性である。
4. この毒素はホルマリンにより容易に無毒化する。
5. モルモット皮内に連続注射すれば能動的に抗毒性免疫を賦與する事が証明された。
6. 能動的に抗毒性免疫の成立したモルモットの血清は血清抽出毒素を明かに中和する事が証明された。

拙筆に際し提案指導を賜つた細谷教授に謝意を捧げ桑島謙夫教授の垂教を感謝する。(この研究は文部省科学研究費によつて行われた。謹んで謝意を表する)。

文 献

- 1) Bordet, G. H. et Gengou, O.: Zbt. Bakt. I. abt. Referate. 43; 273-280, (1909).
- 2) Evans, D. G. and Maitland, H. B.: J. Path. Bakt. 48: 67-78, (1938).
Evans, D. G.: Bruckner, E.: J. Path. Bakt. 49; 563-570, (1939).
Flosdorf, E. W. Bondi and Dozois: J. Immunol. 42; 133, (1941).
Stream, L. P. and Grant, G. A.: Canad. Med. Assoc. J. 43; 528-531, (1941).
Smolens, J. and Flavel, E. H.: J. Immunol. 57; 173-178, (1947).
Flasdorf, E. W. and Kimball, A. C.: J. Immunol. 39; 475-494, (1940).
Vorweg, W. E. and Theile, E. H.: J. Immunol. 61: 27-33, (1949).
- 3) Topley and Wilson: The principles of Bacteriology and Immunity. 3rd edition, 802-806, (1946). Edward Arnold & Co. London.
- 4) 井口光: 基礎と臨床. 2 卷. 5 号. 24-28, (1949).
- 5) Wood, M. L.: J. Immunol. 39; 25-42, (1940).
- 6) 桑島, 岩村, 平位: 1 報. 第 21 回日本細菌学会. 昭和 23 年発表.
桑島, 岩村, 平位: 2 報. 第 22 回日本細菌学会. 昭和 24 年発表.
- 7) 塚口, 関: Proc. Med., Faculty of Osaka Univ. Vol. 1. No. 1, 149. (1949).
- 8) Roberts, M. E. Ospeck, A. C.: J. Infect. Diss: 74; 14-21, (1944).
Roberts, M. E. Ospeck, A. C.: J. Infec. Dis. 71; 264, (1942).
- 9) 細谷, 江上, 林, 森: Japan. J. Exp. Med. Vol,

- 20, No. 1. 25-36, (1949).
基礎と臨床. 1報. 1: 6, (1948).
" 2報. 1: 6, (1948).
- 10) 岡本肇: Japan. J. Med. Sci. IV. (Pharmacology) 12, 168-208 (1940). 13 23-34 (1940).
- 11) Weld, J. T.: J. Exp. Med. 59; 83-95, (1934).
Weld, J. T.: J. Exp. Med. 61; 473-477, (1935).