飯匙蛇毒を以てする馬匹免疫法並に 該抗毒血清の試験管内力價測定法に就いて

三宅 忠雄

東京大学傳染病研究所第一研究部 (指導 細谷省吾教授)

[受付: 4月1日, 1952年]

1. 緒言

抑々蛇毒免疫は1895年 Calmette¹⁾によりその可能性が示唆されて以来、其の免疫方法は種々改良研究されたけれども満足すべき成績をあげる迄には至らなかった。即ち加熱滅毒抗原或は次亜クロール酸カルシウム又はホルマリン等により滅毒又は無毒化したものを以てする免疫法では細菌性毒素に見られる様な成果は得られなかつたのみならず大量の毒素を必要とする大きな欠点を持つて居る。

然るに昭和16年田中²⁾は細谷研究室に於て台湾産の5種の蛇毒に就いてその微量より徐々に増量し乍ら連日注射する事によりほとんど全く副作用を起す事なく、3乃至4ヵ月以内に免疫動物の100%に於て充分治療に供し得る程度の抗毒血清を作る事に成功した。次いで同門桑島³⁾は之を追試承認した。

私は昭和16年以来細谷教授指導の下に蛇毒免疫作業に従事中奄美大島産飯匙毒の抗原性は既報の様に比較的弱く高單位血清を得る事は困難であるのに反し、同じ Agkistrodon Beau に属する本邦産蝮蛇毒の抗原性は強大であつたので、或は両者の混合免疫によつて好結果が得られるのではないかと考え、実験を行つた処比較的短期間に高價な血清が確實に得られる事を知つた。尙お之等蛇毒血清の力價測定は従来 *in vivo* に於てのみ行われ、試験管内では測定出来ないように考えられて居た。即ち1904年 Lamb⁴⁾は Precipitation によつて力價測定をしようとしたが不成功に終り、1909年 Calmette¹⁾は試験管内力價測定の可能性を示唆したにすぎない。その後1936年 Mallick¹²⁾は蛇毒血清の力價測定は試験管内試験では不可能であると報告して居る。

私は実験動物の入手困難な折から何とかして試験管内力價測定法を確立し様と種々研究の結果 Ramon¹³⁾の Flocculation test を用いて満足出来る様な結果を得たので免疫方法と併せてここに報告する次第である。

II. Flocculation による使用毒素量の測定

先づ Flocculation 用標準血清として No. 222 血清を選び、嚴密な動物実験の結果その1mlは80單位を含有する事を確めた後、第1表 a に示す様にその1ml宛を10本の試験管にとり、予め飯匙蛇毒を生理的食塩水1ml中に0.75mgの割に溶かしたものを1mlより2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9ml及び10mlと通増的に加え、よく振盪混和後45~50°Cの恒温水浴中に放置する時は12時間目に毒液7mlを加えた試験管に初発絮反應の出現を認めた。従つてこの場合蛇毒の1Lf價は0.065625mgと云う事になる。然しながら果してこの蛇毒のLf價が蛇毒の多寡或は添加量の大小によつて変動を来さないか何うかを知らうとして次の様な実験を試みた。即ち第1表 b 及び c に掲げた様に1ml中に3.75mg及び7.5mgの蛇毒生理的食塩水溶液を作り a の場合の様に血清1ml宛を各10本宛の試験管にとり、前述の各蛇毒液を0.1mlより通増的に加え45~50°Cに放置する時は b の場合は、毒液1.4ml, c の場合は0.7ml添加した試験管に於て初発絮反應の出現を認めた。この場合に於ても蛇毒の1Lf價は0.065625mgでその絶対値には変動を認めなかつた。併し Kf は蛇毒濃度の高いものを少量加えたもの程短く、a の場合は12時間もかゝつたものが、b の場合は2時間、c の場合は1時間で初発絮反應が起つたのである。

斯る実験結果から私は1ml中に3.75mgの蛇毒生理的食塩水溶液を Flocculation test 用の抗原として使用する事とした。

次に任意の免疫血清5種を選びマウス單位と Flocculation 單位とを比較する事とした。

MIYAKE Tadao: On the horse immunization with a Trimeresurus flavoviridis venom and titration of the antivenin by means of flocculation test. Institute for Infectious Disease. Tokyo University. Jap. J. of Bact. 7(5): 507-610, 1952.
(本論文の要旨は昭和19年傳染病研究所學術集談会に於いて発表した。)

第1表 Flocculation 使用毒素量の測定

No. 222 免疫馬血清(80 AE マウス)に対する各種毒素量を以て使用毒素量の絶対量を測定せんとす

(a)	<div>血清量 毒素量</div>	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc
	7.5mg in 10cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc	9 cc	10cc
	結 果							++ Kf 12時間			

(b)	<div>血清量 毒素量</div>	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc
	3.75mg in 10cc	0.2cc	0.4cc	0.6cc	0.8cc	1.0cc	1.2cc	1.4cc	1.6cc	1.8cc	2.0cc
	結 果							++ Kf 2時間			

(c)	<div>血清量 毒素量</div>	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc
	7.5mg in 10cc	0.1cc	0.2cc	0.3cc	0.4cc	0.5cc	0.6cc	0.7cc	0.8cc	0.9cc	1.0cc
	結 果							++ Kf 1時間			

第2表 大島産飯匙蛇毒単独免疫馬血清及び
蝮蛇毒大島産飯匙蛇毒混合免疫馬血清のマ
ウス單位及び LF 單位の比較
(使用毒素量 37.5 mg in 10ml)

免疫元 種 類	免疫 馬 No.	單位 種類	マウス單位	LF 單 位
大島産飯匙蛇毒免疫馬血清	No. 188		60~100AE	70 AE (Kf 2時間)
	No. 182		140~180AE	160 AE (Kf 2時間)
蝮蛇毒大島産飯匙蛇毒混合免疫馬血清	No. 244		600~800AE	750 AE (Kf 1時間50分)
	No. 249		400~600AE	550 AE (Kf 1時間50分)
	No. 169		600~700AE	550 AE (Kf 1時間50分)

即ち第2表に示す様に低單位のもの或は高單位のものを問わず大体に於てマウス單位とよく一致する事を知り得た。

尙おこの種の実験は30数例に就き行つたが何れもマウス單位によく一致する事を確め得たので以後の実験は主として Flocculation によつて血清の力價測定をする事とした。

III. 奄美大島産飯匙蛇毒及び蝮蛇毒との混合免疫

同門久保田²²⁾は蝮蛇毒の抗毒性について調べ、飯匙蛇毒よりもその抗毒性の強大な事を報告した。私は蝮蛇毒はその抗毒性の点に於て飯匙蛇毒と類似性を有するばかりでなくはるかに勝つて居る処から、之等両者の

混合毒を以て馬匹を免疫する事により免疫効果が上げられるのではないかと考え次の様な実験を行つた。即ち第3表に示す様に馬6頭を選び奄美大島産飯匙蛇毒0.05 mg, 蝮蛇毒0.0005 mg, の混合溶液を5日間連続注射し、次で飯匙毒0.15 mg, 蝮蛇毒0.0015 mg の混合液を5日間連続注射、斯くして第3表に示したように両毒を増量的に皮下に連日注射し免疫を行つた処、免疫開始後38~44日目には全免疫馬に於てその血中抗毒價は20~100單位, 53日乃至59日目には急激に上昇し, No. 245, 246馬は950單位, No. 240は900單位, No. 244は750單位, No. 247, は500單位となつた。只1頭 No. 248馬は免疫の途中原因不明の死を來したのみで、從來経験した事のない好成績を得たのである。

次に第4表に提げた様に之等の馬匹の中4頭から一部採血を2回行つた処、その抗毒價は No. 244馬の一部採血第2回目の血清が150單位の低下を見たのみで、他の3頭から得た血清の抗毒價は第1回, 第2回共, 同等若しくは上昇して居るのを認めた。又 No. 247馬は衰弱の徴が見えたので一部採血を行わず直ちに全採血を行つた。

以上の一部採血及び全採血の血清量並びに抗毒價の平均値は, 1頭当り666單位の血清を15.11採取し得た事となる。

その後31頭の馬匹を同様の方法で免疫したが途中斃死したもの僅かに3頭, 免疫終了をまたず全採血を行つ

第3表 奄美大島産飯匙及び蝮蛇混合毒を以てした馬匹免疫成績

第4表 奄美大島産飯匙及び蝮蛇混合毒を以てした馬匹免疫成績採血量並に抗毒價成績

免疫馬番號	一 部 探 血					全部採血	合計量平均價
	採 血 回 數	一 回	二 回	總血清量	一回平均		
No. 240	血 清 量 LF 價	3.81 900 AE	5.11 950 AE	8.91	4.41 925 AE	12.21 900 AE	21.11 912 AE
No. 244	"	4.11 750 AE	5.21 600 AE	9.31	4.61 675 AE	7.81 750 AE	17.11 700 AE
No. 245	"	4.31 950 AE	4.91 950 AE	9.21	4.61 950 AE	9.71 700 AE	18.91 933 AE
No. 246	"	4.71 950 AE	4.91 950 AE	9.61	4.81 950 AE	14.91 950 AE	25.51 950 AE
No. 247	"					8.31 500 AE	8.31 500 AE
No. 248	"	斃 死					
6 頭平均	"			6.11	3.01 583 AE	8.81 633 AE	15.11 666 AE

たもの2頭であつて、他に総べて免疫に耐え、その血中抗毒價は70單位と100單位のもの2頭、他の24頭は総べて400單位以上1000單位に上昇した。

以上の免疫馬の一部採血及び全採血の血清量並びに抗毒價を平均すると斃死馬をも含めて1頭当り532單位の血清を9.41採取した事となる。而も採血に至るまでの日数は平均僅かに43日であつた。

この様に高單位血清を確實に、而も從來犧牲が甚だ大きく、且つその成績はほとんど見るべきものゝなかつた當時に比較して飛躍的發展を來たしたものと云う事が出来る。

IV. 結 論

1. この実験の範囲内に於ては抗蛇毒血清、少なくとも大島産飯匙蛇毒血清は Flocculation test によりその抗毒價を測定する事が出来る。而も斯くして得た Flocculation 單位はマウス單位とよく一致する事を認め、力價測定の一助として充分使用出来る。

2. 大島産飯匙蛇毒に、蝮蛇毒の微量を加え馬匹を免疫する。

事により、それ等免疫馬の血中抗毒價は最高 950 單位に上昇し、1 頭当り 660 單位の血清を 15.1 l 得る事が出来た。

終りに臨み恩師細谷教授の指導と宮崎正之助博士の垂教とに対し感謝の意を捧げる。

参考文献

- 1) Calmette, A. Kolle, W., Kraus, R. U. Uhlenhuth, P.: Handbuch d. Pathog. Mikroorg., Bd. III, 1, 1930.
- 2) Grasset, E. & Zoutendyk, A.: Brit. J. Exp. Path., XIV; p. 308, 1933.
- 3) 北島多一: 細菌学雑誌, 154 号, 541, 明治 41.
- 4) 山口謹爾: 台湾総督府中央研究所衛生部報告, 1 号, 大正 10.
- 5) Brazil, V.: Rev. Med., Saopaulo, 1902, 1906, 1907. Brazil Med., 1903, 1916.
- 6) 田中哲之助: 実験医学雑誌, 25, 159, 昭和 16.
- 7) 桑島謙夫: 医学の進歩, 1, 31, 昭和 18.
- 8) 田中哲之助, 三宅忠雄: 実験医学雑誌, 27, 1015, 昭和 18.
- 9) 田中哲之助, 三宅忠雄: 実験医学雑誌, 27, 1015, 昭和 18.
- 10) Lamb, G.: Brit. Med. Jour., April 2, p. 917, 1904.
- 11) Calmette, A. & Massol, I.: Ann. Inst. Pasteur, 23, 155-165, 1909.
- 12) Mallick, S. M. K.: Ind. Jour. of Med. Res., XXIII, 525, 1935.
- 13) Ramon, G. C. R.: Soc. Biol., 86, 661-663, et 711-712, 1922.
- 14) Calmette, A., Kraus, A. U., Werner, Fr.: Giftochlangen 154 頁引用.
- 15) Brazil, V.: 同上引用.
- 16) 岩瀬祐一: 台, 医, 30, 1370, 昭和 6.
- 17) 田中哲之助: 実験医学雑誌, 25, 89, 昭和 16.
- 18) Captain, S. M. K. Mallick, M. B., M. R. C. P., D. P. H., I. M. S.: The Indian Journal of Medical Research. 1936, Vol. 23, p. 525.
- 19) Nicolle, M., Cesaric, E. and Debains, E.: Ann. de l'Inst. past., 34, p. 596.
- 20) Moloney, P. J. and Weld, C. B.: J. Path. and Bact. 28, 4, p. 655, 1925.
- 21) Bronfenbrenner, J. J. and Philip, 1926, Reichert: J. of Exper. Med. 44, 4, 553, 1926.
- 22) 久保田久: 日本医学, 3388, 11, 昭和 19 年.