コレラワクチンに於けるホルマリン処理と加熱処理 との比較に就て (I)

長 田 富 香 山 田 昇

北 里 研 究 所 (指導 平野憲正博士)

[受付: 10 月 20 日, 1952 年]

コレラワクチンの調製方法に関しては、その根本目標たる抗原性の保護と安定性に関し、必ずしもコレラワクチン基準りに示された従来の加熱ワクチンを以て我々は満足することは出来ない。何となれば、殺菌のために 56°C 30 分熱すれば、菌浮游液は時に色々の程度に粘稠性を帯び、事後の操作に非常な不便を来し、又原液を希釈保存中に、均一であるべきワクチンに屢々不均一な菌塊を生じ、更に急速に自家融解を来して濃度が著しく薄くなること等の欠点がある。これ等の欠点を除こうとする目的で以下述べる如き実験を試み、いさゝか満足すべき結果を得たのでここに報告し御批判をおおきたいと思う。

研究実施計畫

Oscar Felsenfeld 等は²⁾、ストレプトマイシン、オーレオマイシン、ネオマイシンで殺菌処理したコレラワクチンのマウスに於ける効果を、ホルマリン及び石炭酸で殺したワクチンを標準として、力價試験により比較し、その効力に差のない事を述べている。

我々は従来のコレラワクチンが、加熱により粘稠性となり、石炭酸添加により菌の自家融解は促進され、又不均一な不純物の浮游を来す事にかんがみ、ワクチン調製にホルマリンを使用し、従来の加熱、石炭酸添加ワクチンとの比較を行つた。

両者の比較にあたり、石炭酸ワクチンは自家融解により濁濁度が急速に低下するため、ワクチンの総室素量測定を行い、これと従来の秤量をもとにしての濃度と、光電管比色計による濁濁度との関係をしらべた。

両処理ワクチンにつき、基準に従い、同定試験、安全試験、力價試験を行い、両者の優劣を比較した。

尚おこれら二種類のワクチンにつき、調製後1年間の上記諸検定成績の推移については第2報に述べる。

実験方法

原型菌として博多株、異型菌として大津株を 37°C で

約20時間ブイヨン培養し、之を寒天培地に分注し、 37°C で20時間培養する。この純粹培養された菌苔を小型滅菌シャーレに採取し、化学天秤で正確に秤量し、ホルマリン及び石炭酸を加えた最終濃度が 120mg/cc になる様に計算量の緩衝生理的食塩水を加え均等な浮游液を作つた。次で加熱ワクチンは恒温槽の中で注意深く 56°C 30分加熱し、 0.5% の割合に石炭酸を加えた。ホルマリンワクチンは、加熱することなく生菌浮游液に 1% の割合にホルマリンを加え、各々 120mg/cc の濃度の原液として 4°C 氷室に保存した。之等のワクチンは基準に従いチオグリコレート培地に注入し、生菌の残存していない事を確めた後使用した。

実験成績

1. 比濁度と総室素量との関係

ワクチン調製の翌日 120mg/cc の原液を30倍に希釈して 4mg/cc とし、光電比濁計で各々の比濁度を測定し、同時に総室素量を測定した。数回の実験の結果秤量により 4mg/cc に希釈したワクチンは、光電比濁計による測定では標準ワクチンに換算して、 $\text{O.D.}=0.4$ 即ち、 6billion/cc 、そのものの室素量は平均 0.1mg/cc に相当する事を知つた。

秤量による濃度と、光電比濁計による濁濁度と、室素量と、此等3者の関係は、原型菌と異型菌、ホルマリン処理と石炭酸処理等の差異に関係なく一致する事が認められた。又生菌、ホルマリン処理、加熱処理により、或は菌株の異なる事により、秤量により濃度を一定にしたワクチン間に、光電比濁計による濁濁度の差が認められる否かを2回の実験結果より、推計学により、繰返し

OSADA Fuka, and YAMADA Noboru: Comparison of immunizing capacity produced by heated cholera vaccine and the formalized vaccine (I) Kitazato Institute for Infectious Diseases. — Jap. J. of Bact., 8(2): 211-214, 1953.

第1表 兩処理ワクチン凝集價の比較

菌 型	血 清	原 型	異 型	中間型
	處 理			
原 型 菌 ワ ク チ ン	ホルマリン	1280	1280	640
	加 熱	640	640	80
異 型 菌 ワ ク チ ン	ホルマリン	640	10240	1280
	加 熱	160	5120	160

(註) 中等度陽性(++)を示した血清稀釋倍数を以てそのワクチンの凝集價とす。(例えばホルマリン處理原型菌ワクチンでは++強度の終末凝集價は1280倍)

のある二元配置法により差の有意性を検定した所、処理間及び菌株間に有意の差は認められなかつた。

2. 固定試験

兩処理ワクチンのグラム染色所見は、加熱処理された菌体は自家融解により不明瞭であるのに比し、ホルマリン処理では、コマ状に彎曲した鮮明な菌体が認められた。凝集反應については、原型博多株、異型小川株、中間型彦島株の家兎免疫血清において、第1表に見る如く、ホルマリン処理ワクチンは加熱処理のものに比し常に高度に凝集された。

3. 安全試験

120 mg/cc の原液をホルマリン処理と加熱処理、及び原型と異型別に光電比濁計を用いて 6 bil./cc になるように 0.5 %緩衝生理的食塩水で希釈した。体重 16~18 g のマウスを一群 10 匹とし上記ワクチン 0.5 cc を腹腔内に注射し、7 日間にわたり、毎日餌を與える直前に体重測定を行い、各群間のマウスの体重の変化に有意の差

第2表 安全試験における検定の要因分析表

要 因	變 動	自 由 度	不 偏 分 散
A	4.21	1	4.21
B (A C)	463.94	36	12.89**
C	34.52	1	34.52
D	176.06	7	25.15**
A × C	32.70	1	32.70
A × D	3.71	7	0.53
C × D	33.15	7	4.77*
A × C × D	7.81	7	1.11
E	324.28	252	1.29
ABCD	1080.36	319	

Aは處理の種類

Bはマウスの個體差

Cは菌型の種類

Dは注射後の日數

が認められるか否かを、実験計画法を應用して検定した。即ちワクチンについては、処理による違い、菌型による違い、マウスの体重に関しては、各群における個体差とワクチンの種類との関係及び注射後の日数による体重の変化等の因子及び此相互の交互作用につき、三元配置法を適用して検定した結果は要因分析表に示す如く、ホルマリン処理と加熱処理ワクチン間にマウスの体重に及ぼす変化に有意の差を認めなかつた(第2表参照)。

4. 力價試験

i) マウスの免疫：前記の原液より、原型及び異型菌を等量ずつ含む 6 bil./cc のホルマリン及び加熱処理ワクチンを作り、更に生理的食塩水で10倍及び100倍に稀釈し、1 cc 当り 6 bil., 0.6 bil., 0.06 bil., のワクチンの夫々 0.25 cc を体重 11~12 g の白色ドイツマウスの雌のみの一群 60 匹に腹腔内注射した。

ii) マウスの攻撃：原型稻葉株、異型大津株の 37°C 5 時間培養菌の 4 %ムチン水溶液(Wilson 製 Type 1701-W) 浮游液を作り、予めマウスに対する LD₅₀ を調べた所、数回の反復実験の結果、兩株共に 1 cc 当り 0.1 bil. の浮游液 0.5 cc 即ち 0.05 bil. であつた。免疫注射後 14 日目に、ホルマリン処理及び加熱処理ワクチン免疫群の各々 60 匹のマウスを更に 2 群に分ち、各々に原型及び異型菌の 37°C 5 時間培養、1 cc 当り 1.0 bil. の 4 %ムチン水溶液浮游液 0.5 cc を腹腔内接種した。

iii) 検定：攻撃注射後 72 時間目の生存率は第3表に見る如くで、之より Fisher の方法³⁾を用いて ED₅₀

第3表 力價試験における攻撃後の生存率

ワクチンの種類	免疫量 攻撃菌型	6 bil/cc	0.6 bil/cc	0.06 bil/cc
	原 型	19/25	18/25	17/25
ホルマリン處理	異 型	19/25	13/25	14/25
加熱處理	原 型	14/25	7/25	9/25
	異 型	14/25	14/25	8/25

を計算した。

先ず第3表より実測プロビットを求め、ホルマリン処理と加熱処理、免疫注射量、攻撃菌としての原型及び異型の区別、の三要因及びそれ等の交互作用の有意性を三元配置型として検定したがいずれも誤差に対し有意でなかつたため、各処理ワクチン接種群毎に原型及び異型菌による攻撃の爲の生存数を合計したものに付き ED₅₀ を求めた。ED₅₀ は計算の便宜上次の如き変換を行なつたものである。
$$Z = \frac{\log C - \log 0.6}{\log 10}$$
 (但し C の單位は

bil/cc) その結果は、ホルマリン処理ワクチン接種群の ED_{50} は -2.232 , 加熱処理ワクチン接種群では 0.5117 であった。

更に各々の價の誤差として、 ED_{50} の標本分散を計算し、 ED_{50} の 95 % を覆う範囲を求めると、ホルマリン処理ワクチン接種群では -2.232 ± 18.7728 , 加熱処理ワクチン接種群では 0.5117 ± 2.050 である。即ちホルマリン処理ワクチン接種群の誤差が大きいので、95 % を覆う範囲が $16.54 \sim -20.99$ の間にわたり、加熱ワクチン接種群のそれは $2.56 \sim -1.53$ で前者と重なってしまうため両処理ワクチン接種群の感染防禦力に有意の差があるとは認められない。

5. カイ自乗検定法による比較

i) 両処理ワクチン接種マウスの死亡率の比較

前述の力價試験に於て、ホルマリン及び加熱処理ワクチンの同濃度を同数のマウスの腹腔に注射し、14 日後の死亡率に差があると認められるか否かを検定した。

即ち一群 180 匹ずつにつき、その死亡率をあらわす 4 分表 (4 表) を作り、カイ自乗を計算すると、3.975 であった。カイ自乗分布の表によれば 5 % の有意水準が 3.84

第 4 表 ワクチン接種 2 週後の四分表

マウスの ワクチンの種類	生死	死	生	計
ホルマリン処理群		25	155	180
加熱処理群		17	163	180
計		42	318	360

であるから 5 % 以下の危険率で加熱処理ワクチンの方がマウスの死亡率が高いと云える。

ii) 両処理ワクチン免疫群の攻撃による死亡率の比較

上記マウスにつき両処理ワクチンの 3 階級の濃度の接種群を各々 50 匹づゝに揃え、免疫 2 週後に原型菌と異型菌を以て半数づゝ攻撃を行い 72 時間後の生存率につき ED_{50} を計算する一方、カイ自乗検定を行った。

第 5 表の 4 分表につきカイ自乗を求めると、15.59 で、この價はカイ自乗分布表によれば 0.1 % の有意水準より

第 5 表 攻撃注射後の四分表

マウスの ワクチンの種類	生死	死	生	計
ホルマリン処理群		84	66	150
加熱処理群		50	100	150
計		134	166	300

大きい。

従つてカイ自乗検定によれば、ホルマリン処理ワクチン免疫群は、加熱処理ワクチン免疫群に比し、2 週後の攻撃に対し遙かに有効な感染防禦力を示したものと認める事が出来る。

結 論

コレラワクチンの原液調製にあたり、基準に従つて 56°C 30 分加熱処理後 0.5 % に石炭酸を加えた場合と、加熱することなく、1 % の割合にホルマリンを加えた場合とにつき、比較し、次の如き結果を得た。

1. 秤量による濃度の調製と、光電比濁計 (501 型東方電機製) によるそれと、ワクチンの総室素量、とは比例関係にあり、平均して、秤量により 1 cc 当り 4 mg のものは比濁計により Optical Density 0.4 (6 bil) で、総室素量は 0.1 mg であった。

光電比濁計による濃度測定は、簡便にして、確實で再現し得ると云う理由で、良い方法であると共に、コレラワクチンに於いては、速かな自家融解と云う事を考慮に入れる場合は、薄くなつたワクチンにつき、総室素量を測定することは、その濃度推定にあたり信頼するにたるものである。

2. 同定試験において、グラム染色における所見は、当然ホルマリン処理の場合は、菌体の著るしい自家融解を認めない。又凝集反應上に於いてもホルマリン処理の場合は常に一管位高度の凝集價を示した。

元来ホルマリンは、従来の經驗上成可りの濃度に於ても抗原性に著るしい影響を與えないものと思われるが、我々の實驗に於ても、1 % の濃度でホルマリン処理ワクチンは、加熱石炭酸ワクチンに比し凝集反應上その抗原性保存に於いて優るとも劣らない事を知つた。

又ワクチン調製操作中及び原液長期保存中に於ける雑菌による汚染防止にも 1 % の濃度のホルマリンは 0.5 % の石炭酸より遙かに強力にして完全な殺菌作用を示した。

尙おワクチンを人体に注射する場合のホルマリンによる疼痛其他の副作用は、製品に於いては此の原液を更に 0.5 % 緩衝生理的食塩水で 30 倍に稀釈するため殆どその影響はないものと思われる。實際に少数の人体に両処理ワクチンを接種し、その副作用を比較した所何等の差異も認めなかつた。

3. 安全試験においては、基準に示された方法にならい、注射後 1 週間の体重觀察を行つた結果からは、推計学上有意の差は認められなかつた。

4. 力價試験については、Fisher の方法により ED_{50}

を求めた結果ホルマリン処理ワクチン接種群の誤差が大きいため、95%を覆う範囲が広く、加熱処理ワクチン接種群のそれは前者の範囲内に含まれてしまうため、両者の感染防禦力の差の有意性は本方法では検出出来なかつた。

5. 死亡率の比較はカイ自乗検定法によれば、両処理ワクチンを各々180匹のマウスに、同一濃度階級につき同数ずつ接種し、2週間後の死亡率を比較すると、5%以下の危険率で、加熱処理ワクチン接種群の方が偶然に起り得る以上に死亡率が高い事を認めた。

又上記免疫マウス各150匹につき、原型及び異型菌を夫々半数ずつに攻撃した場合の死亡率は、カイ自乗検定法によれば、0.1%以下の危険率で、ホルマリン処理ワクチン接種群の方が遙かに死亡率が低いと云える事を認めた。尙前述せる如く力價試験におけるED₅₀の観点からは両処理ワクチン間に有意の差があるとは認められなかつたが、死亡率の比較に着眼して、カイ自乗検定を行う時は明かに有意の差が認められる事を知つた。

6. ホルマリン処理原液は加熱処理のその如く粘稠性を帯びる事なきため、濾過、希釈等の事後の操作に極めて好都合である。

一年間の保存による濁濁度の減退及び不均一な菌塊の出現、其他凝集價、毒性、力價等の推移については、目下観察中である。

終りに臨み、御指導と御校閲とを賜つた恩師平野博士に厚く感謝の意を捧げる。又推計学の應用について御教示を賜つた東大物療内科高橋暁正博士に深甚な謝意を捧げる。尙おムチンの御分與其他の御便宜をいただいた北研長木博士に併せて謝意を表する。

本研究は文部省科学研究費の援助による。茲に謝意を表する。

文 献

- 1) コレラワクチン基準, 昭和25年1月25日, 厚生省告示第21号。
- 2) Felsenfeld, O., Young, V. M. and Ishihara, J. S.: American, Journal of Tropical Medicine, 30, 6, 863-864, 1950.
- 3) Fisher, R. A., & Yates, E.: Statistical Tables, for biological, agricultural and Medical Research Third Ed., Oliver and Boyd, London, 8-11, 1949.
- 4) 高橋暁正, 土肥一郎; 推計学入門, 医学書院, 昭26 (1951)。