腸チフスクロームワクチンの研究

I 検定方法について

下 條 寛 人

傳染病研究所第5研究部 (部長 安東洪次)

〔受付: 12月27日, 1952年〕

ワクチンの副作用を軽減し Vi 抗原を保存して免疫原性を高める方法として, 安東氏等¹⁾²⁾ によつて発表されたクロームワクチンは現行の腸チフスワクチンより優れていると考えられるが, 以下にクロームワクチンを中心として, チフスワクチンの検定法, クローム処理の條件及び人体に應用した結果について報告する。

クロームワクチンの製法の概略は, 完全な V 相チフス菌 (多くの場合 Ty₂ 株) を培養, 收菌, 食塩水に浮游, クローム明礬とホルマリンを加え, 3~5 日後遠心沈澱, 沈澱を洗滌再浮游したもの (100 mg/ml) を原液とし, 目的に従つて適宜に稀釈して用いる。クローム処理を行う時の菌濃度, クローム塩濃度がクローム処理の程度に影響するが, 多くの場合, 菌濃度 100 mg/ml クローム塩濃度 0.4~0.005% の範囲で行つた。この処理によつて, 加えたクロームの量の半量の内外が菌体に結合する³⁾。対照としてホルマリンワクチン及び 56° 1 時間加熱後石炭酸 0.5% を加えたワクチン (加熱ワクチンと略称する) を用いた。

1) 被凝集性検定

完全な V 相チフス菌は O 凝集性で Vi 血清に凝集する。此のような菌液はマウスに有効な感染防禦免疫を興え, ウサギに注射すると O 抗体の外に Vi 抗体の良好な産生を示し, 人体に接種すると Vi 抗体の産生が認められワクチンの有効な事を推定させる。ワクチンの O 及び Vi 血清に依る被凝集性の検定は最も簡単な力價検定法である⁴⁾。実験結果によると, クロームワクチンは V 相の性状を保ち, 現行の加熱ワクチンは Vi 凝集を示さず著明な O 凝集を示し, ホルマリンワクチンは調製直後は V 相の性状を示すが保存中徐々に O 凝集を呈するようになり, Vi 被凝集性は一時的に僅かに高まつた後徐々に減少遂に消失する。クロームワクチンが安定である事は保存してもこの V 相の性状が保たれる事によつて知られ

るが, 更に加熱しても依然として V 相の性状を保っている。逆に, 此の事はクローム処理の程度を知るのに用いられる。実験の 1 例を表 1 に示す。O 血清及び Vi 血清の 1:100~1:12,800 の範囲で凝集反応を行い, 陽性を示す最終稀釈をもつて表し, 表に附したような規準で大まかに (一) (±) (+) (H) (HH) に分けたものである。表示した 3 種のワクチンは同時に作つたもので, 13-C はかなり強いクローム処理を, 13-e は弱いクローム処理を施したもので, 13-f はホルマリンワクチンである。13-C は 100° 30 分の加熱後も V 相の性状を保つが, 13-e は 60° 30 分の加熱には耐えるが, 100° 30 分では O 凝集が表れてきている。尙この実験に用いた Vi 血清の Vi 凝集素價は 1:800 であるが, 表では 1:400 になっている。Ty₂ 株は Vi 抗原量が多いと Vi 被凝集性が却つて低下する傾向は屢経験されたが, 之は Carlinfanti の Vi 低凝集性 (Hypoagglutinabilité Vi)⁵⁾ の所見と一致する。

チフス菌以外の菌については, 現在迄の所凝集反應に意味をもたせる事は出来ない。

2) 溶出試験

ワクチン原液 (100 mg/ml) を加熱後遠心沈澱した上清 (コクチゲン) には O 抗原その他の菌体成分中の溶出したものが含まれている。クローム処理によつて菌体が固定されると菌体成分の溶出する割合が少くなる。ワクチンの毒性は体内で溶出する所謂菌体内毒素によると思われる。この試験で溶出の割合が少い事は毒性の表れ方の少い事を推定させる。溶出の程度は沈降反應による溶出した O 抗原の定量によつて行い得る。100 mg/ml の原液をコツホ内で 100° 30 分加熱, ついで 4,000 r.p.m. 30 分以上遠心沈澱, 上清を原液とする。この原液を 1:2.5

SHIMOJO Hiroto: Studies on typhoid chrome vaccine. I On the methods of assay. —Jap. J. of Bact., 8(3): 281-285, 1953.

表1 被凝集性検定 (Ty 2株 ワクチン)

	處 理	O 血 清								最 終 價	判 定	Vi 血 清								最 終 價	判 定
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800			1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800		
0.08% クローム ワクチン (13-c)	無 處 理	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
	60°30分	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
	100°30分	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
0.02% クローム ワクチン (13-e)	無 處 理	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
	60°30分	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
	100°30分	+	+	+	+	+	-	-	-	1:1600	++	+	+	+	+	-	-	-	-	1:800	++
ホルマリン ワクチン (13-f)	無 處 理	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	1:400	++
	37° 5日	++	++	++	++	+	+	+	+	1:12800	++	+	-	-	-	-	-	-	-	1:100	±
	60°30分	++	++	++	++	+	+	+	+	1:12800	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100°30分	++	++	++	++	+	+	+	+	1:12800	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

判定の規準: O血清 1: 6.400~1: 12.800 ++ Vi血清 1: 800 -
 1: 1.600~1: 3.200 ++ 1: 400 ++
 1: 400~1: 800 + 1: 200 +
 1: 100~1: 200 ± 1: 100 ±
 1: 50以下 - 1: 50以下 -

表2 溶出試験 (Ty2株 ワクチン・O血清)

ワ ク チ ン	條 件	抗 原 稀 釋										沈 降 原 價	固 定 度	マウス毒性 (LD ₅₀)
		1:2.5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	對 照			
クロームワクチン (0.08%)	100° 30分	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	1:10	4	>80mg
クロームワクチン (0.02%)		++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	1:40	2	28mg
クロームワクチン (0.005%)		++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	1:80	1	14mg
ホルマリンワクチン		++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	1:160	0	7mg
クロームワクチン (0.08%)	60° 30分	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(≥7)	
クロームワクチン (0.02%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(≥7)	
クロームワクチン (0.005%)		++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	1:20	(3)	
ホルマリンワクチン		++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	1:160	(0)	

~1:320に稀釈したものを抗原とし、血清としては対応する菌のウサギ免疫血清 (O血清) を用いて重層法による沈降反応を行い、1時間後に伴定する。1例を表2に示す。溶出の度合は100 mg/ml 菌液の「コクチゲン」のO血清と沈降反応陽性を示す最終稀釈を以て表す事が出来るが、対照として100 mg/ml のホルマリン菌液の「コクチゲン」を置けば、別々に行つた実験結果の比較が可能になる。ホルマリン菌液の場合の固定の度合を0とし培養稀釈の試験管数を逆算して表せば数的に比較出来る。ホルマリン菌液のコクチゲン (沈降原價1:160) を0として、

1:80は1, 1:40は2, 1:20は3……である。

3) マウス毒性 (致死) 試験

ワクチンの種々の量をマウスに腹腔内注射、1週間生死観察、LD₅₀を算出する。この結果は人体接種の場合の全身的副作用と併行する。本試験でクロームワクチンが著明に減毒されている事は既に発表されている。¹⁾²⁾

4) マウス毒性 (体重変化) 試験

稀釈したワクチンの毒性試験としてマウスの体重変化の観察による方法が用いられる。この試験には純種マウス (吾々は D.D 系マウスを用いた) をよい条件で管理さ

れたものを用いなければならない⁶⁾。ワクチンは防腐剤の影響をなくすため、遠心沈澱した沈渣を防腐剤のない滅菌食塩水に再浮游したものをを用いる。5匹1群とし、各0.5 mlを腹腔内に注射、体重を毎日一定時刻に測定する。1例を示すと、強いクローム処理をしたワクチン ($LD_{50} > 80$ mg) を接種した群、注射しない対照群ではすべてのマウスは体重の減少を示さないでむしろ徐々に増加したが、加熱ワクチン ($LD_{50} = 7$ mg) 接種群では全マウスの体重が減少し、弱いクローム処理をしたワクチン ($LD_{50} = 28$ mg) は5匹中3匹が体重減少を示して、両者の中間であつた。

5) ウサギ毒性 (白血球減少) 試験

ワクチンをウサギの静脈内に注射すると著明な白血球の減少を示すが、クローム処理をすると白血球減少を示さなくなる。ウサギに静脈注射後の白血球数を測る事は、全身的副作用を知るための毒性試験として用いる事が出来る。ウサギの正常の白血球数を測定後被検ワクチンを静脈内注射、3時間後採血して白血球数を測定する。種々の菌量で時間的に白血球数の変動を測り3時間前後が検定として最も適すると結論されたものである。加熱ワクチンでは0.1 mg でもかなりの、1.0 mg 以上では著明な白血球減少を示すが、強く固定されたクロ-

ムワクチンでは10 mg でも殆ど白血球数の減少を示さず、弱くクローム処理されたものは両者の中間の成績を示す。本試験は稀釈したワクチンにも用いる事が出来る。

6) ウサギ皮内反應

強くクローム処理をしたワクチンは動物実験に於て著明に減毒され、人体に接種された場合も直に発熱その他の全身的副作用を表すことがない。然るに、このようなワクチンは体内に非常に長く留る。之は実用的には問題となる点である。皮下接種すれば硬結は2週間以上も残り、時に無菌膿瘍となり夫に伴つて発熱する事もある。皮内に注射されると時に膿疱となり又屢々跡に色素の沈着を残す。このような経験から、全身的副作用が抑えられて局所に残存する程度も余り甚しくない弱い固定のクロームワクチンを用いる事が考えられる、局所に残存する程度を調べるための検定法が必要となつた。

此の検定にウサギの皮内反應が應用出来る。ホルマリソワクチンをウサギ皮内に注射すると翌日発赤硬結が認められ、以後徐々に弱まつて1~2 mg なら4日前后で殆ど消失する。クロームワクチンでは翌日は殆ど変化が認められないが4日目頃から徐々に発赤硬結が表れ2週間以上におつて硬結は残存し屢々化膿する。硬結の残存

表 3 ウ サ ギ 皮 内 反 應

ウ サ ギ	注 射 量	ワ ク チ ン	硬 結					化膿14日
			2 日	4 日	6 日	8 日	14 日	
No. 79	10mg	クロームワクチン (0.4%)	—	8	12	11	10	+
	"	" (0.2%)	tr	14	18	15	12	+
	"	" (0.1%)	12	13	14	14	8	++
	"	" (0.05%)	15	14	14	14	7	++
	"	" (0.025%)	15	13	13	13	6	++
	"	ホルマリソワクチン	18	18	13	13	6	+
No. 83	2 mg	クロームワクチン (0.4%)	tr	6	6			+
	"	" (0.2%)	tr	12	13			+
	"	" (0.1%)	tr	14	17			+
	"	" (0.05%)	8	14	14			+
	"	" (0.025%)	12	10	6			—
	"	ホルマリソワクチン	16	8	tr			—
No. 84	2mg	クロームワクチン (0.4%)	—	tr	5	8	6	+
	"	" (0.2%)	tr	6	13	12	10	+
	"	" (0.1%)	tr	6	10	10	10	+
	"	" (0.05%)	5	7	7	10	11	+
	"	" (0.025%)	8	10	7	6	4	—
	"	ホルマリソワクチン	13	10	tr	tr	—	—

程度、化膿の有無はクローム処理の程度のみならず、注射菌量とウサギの個差に支配される。

ウサギ皮内反応の結果は人体の成績と並行する。チフス菌 No. 58 株の種々のクローム明濁度で作ったワクチンをウサギ皮内に 0.1 ml 中に表に記した菌量が含まれるようにして注射し以後毎日観察した成績を表 3 に示した。クローム処理をしない対照ワクチン或はクローム処理の弱いものは発赤硬結が早く表れ早く褪消するが、クローム処理が強い場合硬結は徐々に表れ 7 日以後稍軟化し 14 日頃強く押すと排膿する。時には自潰排膿する事もある。培養に依つて無菌膿瘍である事も確められる。同じワクチンを 1 mg/ml に希釈したもの 6 種の各の 0.1 ml を同一人の上膊皮内に注射した 1 例を表 4 に、同様の事を行つた 9 人の成績の総括を表 5 に示す。クローム

表 4 人体皮内判應
(0.1 mg 皮内注射の 1 例)

ワ ク チ ン	2 日	4 日	6 日	8 日	14 日
クロームワクチン (0.4%)	±	+	P	P	S
〃 (0.2%)	±	P	P	P	S
〃 (0.1%)	±	P	P	P	S
〃 (0.05%)	+	P	P	P	S
〃 (0.025%)	++	+	—	—	—
ホルマリンワクチン	+++	±	—	—	—

— ± ++ +++ 発赤の程度
P 膿 疱 S 痂 皮

処理が強いと 2 日以内は著しい変化はないが 4~6 日頃から黄色の膿疱を作り、次第に褐色になり痂皮となる。

弱いクローム処理では膿疱或は痂皮形成はない。ウサギと人体の成績との並行する事はこれらの表から明かであらう。

検定方法としてウサギ皮内注射後の最少化膿量、最少

表 5 人体皮内反 應
(0.1 mg 皮内注射 9 名)

ワ ク チ ン	膿 疱 7 日	痂 皮 14 日
クロームワクチン (0.4%)	6	6
〃 (0.2%)	8	8
〃 (0.1%)	8	7
〃 (0.05%)	7	6
〃 (0.025%)	1	1
ホルマリンワクチン	0	0

硬結量を決定するのが合理的である。ウサギ背部一侧の皮内に被検クロームワクチンの 5 mg, 2.5 mg, 1.25 mg, 0.625 mg を注射、他側に対照のホルマリンワクチンの同じ菌量を注射、14 日後に於ける化膿が認められる最少量或は明らかに硬結が認められる最少量を決定する。例を表 5 に示す。一方のウサギ (No. 102) では最少化膿量と最少硬結量がきめられたが、他方 (No. 103) では最少化膿量は決定出来なかつた。併し No. 102 の例から推定されるように最少化膿量と最少硬結量はクローム処理の条件及び菌量に従つて並行的に変化しているから、最少硬結量の対照ワクチンとの比較に依つてウサギの固差の影響なしに判定する事が可能になる。

7) 他の動物に於ける皮内反応

マウス及びモルモットに於いてウサギと同様にして皮

表 6 ウサギ皮内反 應 最少化膿量最少硬結量の決定 (14 日)

ウ サ ギ	ワ ク チ ン	反 應	注射菌量 (mg)				最少化膿量 (mg)	最少硬結量 (mg)
			5	2.5	1.25	0.6		
No. 102	クロームワクチン (0.2%)	化膿硬結	+	+	+	+	≤0.6	≤0.6
	クロームワクチン (0.05%)	化膿硬結	+	+	+	—	1.25	1.25
	クロームワクチン (0.0125%)	化膿硬結	+	—	—	—	5.0	2.5
	ホルマリンワクチン	化膿硬結	—	—	—	—	>5.0	2.5
No. 103	クロームワクチン (0.2%)	化膿硬結	—	—	—	—	>5.0	1.25
	クロームワクチン (0.05%)	化膿硬結	—	—	—	—	>5	5
	クロームワクチン (0.0125%)	化膿硬結	—	—	—	—	>5	5
	ホルマリンワクチン	化膿硬結	—	—	—	—	>5	5

内反應を試みたが、マウスでは皮膚が薄いため注射の手法の僅かな差が大きく結果に影響するので、又モルモットでは対照ワクチンでもかなり長期間皮内に残りクロームワクチンとの差が著しくないので、何れも実用的な検定方法としては適さなかつた。

8) マウス力價試験

マウスに於ける力價検定法として免疫量を一定にして感染攻撃量を変え最大感染防禦量を測定する方法と免疫量を変え感染攻撃量を一定にして最少免疫量を測定する方法があるが後者の方が優れている事は既に証明されている⁷⁾。感染攻撃の方法として食塩水に浮游した生菌(ブイオンを用いても同様と考えられる)を用いる方法と、ムチンに浮游した生菌を感染させる方法とがある。Batson 等⁹⁾はムチン法の方が著明な差を示すからムチン法の方が優れていると結論しているが、それは Batson 等が感染攻撃用に用いた No. 58 株の菌力が低かつたため、我々の用いた Ty₂ 株のような菌力の強いものを用いれば食塩水菌液法でも十分明確な結果が得られる。我々は食塩水法と同様に考えられるブイオン法を主として採用し、屢々ムチン法をも並行した。

15~20 g のドイツマウスに人体用に希釈したワクチンの 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, 10^{-4} ml, 10^{-5} ml を 0.2 ml に含まれるように希釈し各群 5 匹に腹腔内注射, 7 日後 Ty₂ 株ブイオン 18~20 時間培養 $1/20$ ml が 0.2 ml に含まれるように希釈したもの(大体 30,000,000 の生菌を含み 5~10 LD に相当)を腹腔内注射, 72 時間生死観察して ED₅₀ を算出する。ムチン法では免疫はブ

イオン法と同じで感染攻撃に Ty₂ 株ブイオン培養 10^{-5} ml ($1,000 \sim 10,000$ LD に相当) が 5% ムチン 0.5 ml に含まれるように希釈したものを腹腔内注射して ED₅₀ を計算する。1 例を表 7 に示す。何れの方法を用いてもクロームワクチンは対照の加熱ワクチンの 100 倍内外の力値を示す。検査には必ず対照ワクチンを並行すれば、異つた時期に於ける実験結果の比較が可能になる。対照ワクチン (Reference vaccine) としてはコチゲン(菌液の加熱上清)が安定である事が知られているから⁷⁾、それによればワクチンの効力を単位で表す事が可能であらう。

9) ウサギ及びモルモットに於ける抗体産生

ウサギ¹⁰⁾ 或はモルモットを免疫して出来る抗体株に Vi 抗体はワクチンの力價を知る指標となる。ウサギではクローム・ワクチン 1 mg 注射でも 1 週後 1:200~1:400 の Vi 抗体が証明され、モルモットでクロームワクチン 6.25 mg 注射後 1 週間で 1:160 以上の Vi 抗体價が認められたが加熱ワクチンでは 25 mg, 12.5 mg, 6.25 mg の何れの注射後も著明な Vi 抗体の上昇は認められなかつた。

結 論

クロームワクチンを中心として腸チフスワクチン検定法を検討し、試験管内の検定法として被凝集性試験と溶出試験、動物実験による検定法として全身的副作用の指標としてマウスの毒性試験(致死又は体重変化)、局所的副作用の指標としてウサギ皮内反應、効力の検定にマウス力價試験が用いられる事を述べた。

文 献

- 1) Ando, K. & Nakamura, Y.: ap. J. Exp. Med. 22, 149-157, 1951.
- 2) 安東洪次, 田所一郎, 下條寛人: 医学通信第 7 年, 第 307 号, 3~4, 昭和 27 年.
- 3) 山岡静三郎, 古明寺隆子: 未発表
- 4) 安東洪次, 中村義治: 細菌誌 (昭和 17 年) 296 298.
- 5) Carlinfanti, E.: Ann. Inst. Pasteur 72, 765-782, 1946.
- 6) 下條寛人: 日本細菌学雑誌, 第 III 報
- 7) 安東洪次, 中村義治: 細菌誌 (昭和 17 年) 257-267.
- 8) Batson, H. C.: J. Exp. Med. 90, 233-253, 1949.
- 9) Batson, H. C., Landy, M. & Brown, M.: J. Exp. Med. 91, 219-229, 1950.
- 10) 安東洪次, 中村義治: 細菌誌 (昭和 17 年) 303-312.

表 7 マウス力價試験

ワクチン	免 疫 注射量	ブイオン法 ($1/20$ ml)		ムチン法 (10^{-5} ml)	
		死/検	ED ₅₀	死/検	ED ₅₀
クローム ワクチン (3種混合) (No. 22)	10^{-1} ml	0/5	$10^{-4.3}$ ml	0/5	$10^{-3.6}$ ml
	10^{-2} ml	0/5		0/5	
	10^{-3} ml	1/5		0/5	
	10^{-4} ml	1/5		5/5	
	10^{-5} ml	4/5		4/5	
加熱 ワクチン (3種混合) (市 販)	10^{-1} ml	1/5	$10^{-2.5}$ ml	1/5	$10^{-1.5}$ ml
	10^{-2} ml	1/5		4/5	
	10^{-3} ml	4/5		5/5	
	10^{-4} ml	4/5		5/5	
	10^{-5} ml	5/5		5/5	
対 照		LD ₅₀ =1/113ml		LD ₅₀ = $10^{-8.5}$ ml	