炭疽に関する最近の研究と新知見

N. STAMATIN 安藤敬太郎* 根本 久* 抄訳

炭疽の防疫のためわれわれは今日でもバストゥールワクチン、アスコリー反応および免疫血清の注射などを実際に応用している。これらの術式はいうまでもなく今から約80年前医学の黎明期に KOCH, PASTEUR および AS-COLI らによっていち早く完成された研究業績に基くものである。しかしながら炭疽の感染病理や免疫理論などの基礎的分野はその後長い間研究成果が十分でないまゝとに残されていた。この面の研究に新しい展開がもたらされたのは 1940 年代になってからである。アメリカではメリーランド州デトリックの陸軍研究所、イギリスでは供給省の微生物研究部およびフランスではバストゥール研究所を中心とした研究者の活動に負うところが大きい。この最近における炭疽研究の進展は医学微生物学領域で画期的なものの1つとして高く評価されているが、すくなくともわが国では一般によく知られていないように思われる。最近炭疽研究に精力的な活動をつづけた ST-AMATIN の労作になる総説†が発表された。この稿は編集委員の希望もあってその内容を解説的に抄訳したものである。

I 炭 疽 毒 素

炭疽浮腫液をモルモットや兎に注射すると局所に炎症がおこり、しかも注射された動物が免疫性を獲得することは非常に古くから知られていた (BAIL 1904)。その後 BAIL と WEIL (1911) は炭疽菌由来のこのような毒性物質を Aggressin と名付け、これは動物組織の抵抗性 (anthracidal factor) を中和し炭疽感染を助長させるといふ Aggressin 説を提唱した。BAIL らの aggressin は概念的には毒素であるが、その後に進められた炭疽菌の毒力に関する研究はもっぱら莢膜や菌体成分に主力がそそがれたきらいがある。

その結果莢膜、菌体成分のいずれにも毒性がみられず、また免疫血清中に産生された上記成分に対応する抗体 (沈澱素) は感染防禦能はもちろん浮腫液の毒性中和能も無いことをすべての研究者が認めざるをえなかった。また一方生体側の防禦機構である Anthracidal factor については、白血球の食菌作用を背景とするオプソニン説により説明されるのみで、実証的な裏付けは非常に乏しかった。さらに抗体 (沈澱素) がほとんど証明

されないにもかかわらず感染防禦に威力を示す炭疽生菌による免疫血清の有効性の解明にはほとんど成果がなかったといっても過言ではない。

A. *in vivo* での毒素

SMITH, KEPPIE およびその協同研究者ら(1954)は毒性物質が炭疽感染動物の浮腫液のみならず血漿中にも高濃度に、そして胸腔および腹腔液または脾にも低濃度ながら含まれることを明らかにした。この毒性血漿をモルモットの皮内に注射すると 4×15 mm 程度の浮腫が出現し、静脈内注射では致死的な毒性 (LD₅₀ 値, モルモットでは 5 ml, マウスでは 0.35 ml) のあることを報告した。その後 STANLEY と SMITH (1961) の毒性血漿についての物理化学的および生物学的研究により、毒性物質は蛋白質を主成分とする3因子の複合体であることが知られ、表1および2に示すような毒素としての基本的特性が明らかにされた。

表1 炭疽毒素の3因子の浮腫を起こす性質と致死作用

STANLEY et SMITH (1961) による

因 子	兎皮膚に対する 浮腫惹起能	マウスに対する 致死能
I	0	0
II	0	0
III	0	0
I + II	++++	+
I + III	0	0
II + III	0	++
I + II + III	++	++++
毒素原液	++	++++

炭疽毒素中における3因子の量的比率はその毒性和関連が深い。すなわち強い浮腫を惹起するが致死性の弱い株では因子Iが多く、因子IIIがすくない。他方マウスに浮腫を招来することなく致死させ、モルモットには病原性の微弱な株 (バストゥールII苗) は因子Iが微量かまたは認められないのに反して因子IIIが多いことが知られている。この事実などからモルモットの炭疽感染には因子IとIIを必要とするが、マウスでは因子IIのみで足りるものと考えられる。

また炭疽毒素は不安定な性状で、凍結乾燥には耐えるが0℃では2週間、37℃では8時間、60℃では30分でその活性を失なう。

* 農林省家畜衛生試験場

† 原著 Recueil Med vet., 410, 639-685(1964)

〃

140, 735-753(1964)

表2 炭疽毒素の性状

因子	活性	他の因子との共同作用	超濾過	遠心	毒性プラズマの精製法	成分(%)				検査法
						アミノ酸(N)	含水炭素(ブドウ糖)	リン酸	灰分	
I	浮腫(起炎性)	因子2と混ざることが必要, この場合マウスに致死作用も現われる	沈殿	吸着	DEAE-C*を通してから連続溶出	10.1	6	0.7	10~13	モルモット, 兎の皮内注射
II	防禦(免疫原)	因子3と混ざることが必要, この場合マウスに致死作用も現われる	上清	通過	硫酸沈殿後CYセリット円柱内クロマトグラフによるか, DEAE-Cとリン酸緩衝液での連続溶出	13.9	3.7	0.2	1.6	ラッテ, マウス, モルモットの静脈内注射
III	Co-factor	因子1と2の混合物に加えるとむしろ因子2の免疫原性を減弱させる	上清	吸着	クロマトグラフにかけてから硫酸で沈殿	15.1	0.5		0.5	

* DEAE-C.....Diethylaminoethyl-Cellulose

B. *in vitro* での毒素

1958年 HARRIS と SMITH は強毒株または浮腫を惹起しうる無荚膜株をモルモットの脱繊維血または血清中に接種し, 20%にCO₂を含む空気を流通させながら振盪培養して, モルモットの皮内注射により局所性の浮腫を起こす毒性の培養濾液をうることに成功した. しかもこの濾液の毒性は濾液または生菌接種の免疫血清により中和されることを確認した. その後に THORNE とその協力者(1960)も BELTON や STRANGE (1954) が防禦抗原を得るために用いた10%の割合に馬血清を含むカザミノ酸培地に強毒株を培養し, 毒素と防禦抗原が含まれる濾液をえた.

C. 毒素の感染成立に対する役割

CROMARTIE ら(1947)は炭疽感染の過程を詳細に観察した. それによると組織に侵入した炭疽菌はそこでまず発芽し荚膜を形成する. 細胞外液は増殖に好適環境であるため直ちに菌は増殖を開始し同時に毒素を産生する. 一方組織の側ではこれに対する反応として毛細血管の拡張, 充血および白血球の遊走などの一連の炎症機転が起こり, やがて局所に浮腫液が貯留するようになる. 菌がある程度侵入局所で増殖するとリンパ管に流れこみ当然リンパ節に抑留される. リンパ節内ではほとんど殺菌されることなく増殖が続く. やがて増殖菌数が抑留能力の限界を越えると, 血液循環系に入り全身的に分配される. 全身の臓器組織に分散された菌はそこでも増殖を開始するので, リンパ節と同様増殖菌が組織の包容力以上に達した場合流血中に放出されるようになる. 血中への各臓器からの流入菌量の増加に伴ない血液の防禦因子の作用も次第に麻痺し敗血症の末期には血液中においても菌が増殖するようになる.

炭疽死の原因 KEPPIE と HARRIS-SMITH (1955) らはモルモットの敗血症の種々の時期にストレプトマイシンを注射し血中における菌の消長と死への関係を調べた. その結果血中の炭疽菌数が $3 \times 10^6/\text{ml}$ にまで増加しない

うちにストマイを投与すると敗血症は消退しもちろん炭疽死も救えた. しかし血中の菌数がこの臨界値以上に増加した後のストマイ処置では菌は著しく減少するが, 結局は1~3日後死亡してしまうことを知った.

この事実から炭疽死の本質的原因を炭疽菌の増殖以外に求め頻死期のモルモットに現われる変化を詳細に検討した. その結果炭疽死の場合にも他の細菌の外毒素(ブドウ球菌, ウェルシ菌またはグラム陰性菌など)の注射によるショック死の際にみられるつぎのような一連の特徴的障害の起こることを確認した.

- 1) 血量の減少 (25~40%)
- 2) 血圧の低下 (健康値の18%)
- 3) 血液濃度の上昇
- 4) 浮腫と出血, それに伴なう血漿蛋白の減少.
- 5) 体温の下降
- 6) 血漿無機磷の上昇 (170~250%)
- 7) プラズマ N^+ イオンの減少. Mg^{++} , Ca^{++} , K^+ イオンの増加
- 8) 血液凝固時間の遅延 (タール様血液)
- 9) 敗血症初期の過血糖, 頻死期の低血糖
- 10) 血中尿素の増加, 尿量の減少 (腎障害)
- 11) 血液および尿中アルカリフォスファターゼの増加と腎での消失.

以上の所見から KEPPIE らは炭疽死の原因を古くから考えられていた器械的なもの(血管栓塞)や掠奪的なもの(窒息, アミノ酸, カルシウム欠乏)でなく, 炭疽毒素によるショック死と断定した. また手術や過敏症のとき起こるショックと区別し, 炭疽死の場合は Secondary shock とよんだ.

II 炭疽菌の組成とその役割

A. 荚膜

炭疽菌の荚膜成分は他の多くの有荚膜菌のそれが多糖体であるのに反し蛋白系の物質, すなわち d(-) gluta-

myle polypeptide であることが特徴である。(IVANOVICS と BAUCHNER) ZWARTOUWET と SMITH (1956) はこの物質が莢膜成分となっている外体液中にも存在することを明らかにした。したがって d (-) glutamyl polypeptide は古くから知られた白血球の食菌作用を妨害する莢膜型と体液中に溶存し動物体の Anthracidal factor に抵抗する液状型の 2 種がある。

炭疽菌の毒力またアグレッション作用は毒素の存在が確認されなかった時代には多くの矛盾や疑問点を含みながらも莢膜にその根源を求める傾向が強かった。しかしながら近頃報告されている毒性のある無莢膜株 (THORNE と BELTONE の OA 株 1957) や弱毒の有莢膜株 (STAMATIN と SCHÄFER 1944) などの人工変異株の出現は毒力を莢膜のみに結びつけては説明不可能の例として挙げられよう。

B. 菌 体

IVANOVICS (1940) は炭疽菌の菌体は galactose と d-N acetyl glucosamine の同比率からなっている多糖体であることを明らかにした。それぞれの成分は hapten で一方のみでは抗体産生能を現わさないことも知られている。(TOMSCIK と IVANOVICS 1940)

また有莢膜株の菌体成分も無莢膜株のそれも全く同じで菌の毒力とは無関係と考えられている。しかしながら菌体由来の多糖体は炭疽感染組織中に莢膜由来蛋白成分とともに多量に存在するので、アスコリー反応の抗原としての役割を果している。さらに galactose と glutamyl peptide はいわゆる類炭疽菌のうちのあるものの菌体構成成分でもあるため、炭疽菌とこれらの間には当然ある程度の類属反応が出現する。(BARBER 1957, BAUMANN-GRACE 1958) またさらに galactose や acetyl glucosamine は肺炎球菌 XIV 型または A 型血液にも含まれ、これらとの間にも血清学的に関連性のあることが知られている。(IVANOVICS 1940)

III 生体側の防禦因子

生体の感染に対する防禦機構は古くから Anthracidal factor とよばれてきたが、今日ではそれが白血球の殺菌性因子と血清中の炭疽抗毒素であることが一般に知られている。

BLOOM とその協力者 (1947) は白血球から塩基性のポリペプチットを分離し *in vitro* で炭疽菌の呼吸を抑制する事実を報告した。この物質はその後 GLADSTONE と JOHNSTON (1955) が報告したオプソニン作用をもつリゾチウムとみなされ、有毒株の毒力を減弱することが確認された。また NORDBERG と THORSELL (1955) はリゾチウムが pH 6.0~7.2 の環境で炭疽菌の連鎖を切断し、多糖体を溶解し菌の崩解を容易にすることを明らかにした。

CROMARTIE とその協力者 (1947) は強毒株を自然抵抗性の強い犬や豚の皮下に攻撃すると、初め 2~4 時間では増殖し、感受性動物と同じ組織病変が出現するが、その後菌の消失が起こり治癒する事実を観察した。また SLIAHOV (1963) は感染を耐過したりまたはワクチン注射を受けた人間は炭疽毒素に過敏の状態にあることから、アレルギー性の機転も感染像に関連するものと考察している。

IV 免疫物質

炭疽菌由来の免疫原物質については BAIL (1904) の報告以後ほとんどみるべきものがなかったが、毒性物質の研究の進展につれて、この面も急速に解明されるに至った経緯は前項で若干ふれた。

1946 年によく GLADSTONE が免疫物質を *in vitro* でうことに成功し、これが刺激となって以後炭疽免疫理論の解明の面で多くの研究成果が生れるようになった。

A. 免疫物質産生のための培養条件

GLADSTONE (1946, 1949) は血清と重炭酸ソーダを含む複雑な組成の培地に炭疽菌を培養し、その培養液を注射すると兎、山羊および猿が炭疽免疫を獲得することを知り、この物質を Protective antigen とよんだ。

in vitro で免疫物質をうるその後の研究によって 2 種類の優秀な培地が報告された。そのひとつは WRIGHT と PUZISS (1954) による純合成培地で、この研究は免疫物質の分析に大きく貢献するだけでなく、実際面でも異種血清を含む培養液を注射した場合生ずる感作を排除できる点で有意義である。他のひとつは BELTON と SIRANGE (1954) による カザミノ酸と酵母エキスを主体とし炭末を添加する半合成培地で、前者の培地に比し著しく組成が簡易な点の特徴である。

培地成分の役割 炭疽菌自体の発育増殖に必要な成分が必ずしも免疫物質産生上重要ではなく、またその逆も成立する。免疫物質産生上必須なものとしては重炭酸ソーダ、マグネシウム塩、鉄、ブドウ糖、そしてアミノ酸としてはイソロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、メチオニン、トリプトファンおよびグアニンなどである。

WRIGHT とその協力者ら (1962) は合成培地について検討し数々の改良を行なった結果、もっとも多量の抗原物質が産生される No. 1095 培地を発表した(表 3)。

菌株 炭疽菌の強毒株はいずれも免疫物質産生能をもつことが知られている。しかし stamatin-sterne 型の変異株(無莢膜で浮腫のみを起こす弱毒株)も産生能があるが無毒株ではほとんど産生能がみられない。

免疫物質を収獲する実際面では、有莢膜強毒株よりも無莢膜弱毒株の方が安全で、しかも無菌通過も容易なの

表3 培地 No. 1095 の組成 (WRIGHT ら 1962)

成分 (a)	g/l	成分	g/l
Glycine	0.022	L-histidine, HCl	0.096
Lalanine	0.009	Guanine, HCl (b)	0.009
DL-valine	0.060	Adenosine	0.001
DL-leucine	0.128	Thiamine, HCl	0.0004
DL-isoleucine	0.064	Pyridoxal, HCl (c)	0.001
DL-sérine	0.021	Biotine	0.0004
DL-thréonine	0.060	Glucose	1.0
DL-méthionine	0.030	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.015
DL-acide Asparatique	0.064	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.010
L-acide glutamique	0.168	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.004
L-proline	0.030	KH ₂ PO ₄	0.680
DL-phenylalanine	0.068	K ₂ HPO ₄	0.870
L-tryptophane	0.010	NaHCO ₃ (c)	
L-arginine HCl	0.021	Fe(SO ₄)·7H ₂ O	0.0015

- a) Pyridoxal, リン酸塩, 重曹, 硫酸鉄を除くすべての成分は 25 倍の濃厚なものを保存液とし, 用いるに臨んでこれを薄めて用いる。
 b) 少量の濃塩酸であらかじめ溶解する。
 c) 別々に溶解し滅菌して保存液とし, 滅菌培地に無菌的に加える。

で多くの研究者に用いられる。

接種菌量と培養時間 PUZISS と WRIGHT (1954) は培地 1 ml 当り接種芽胞数は 500 個が適当であり, この場合免疫物質は 23~46 時間培養の際多量に産生されることを知った。またその濃度は 46 時間以後急速に培地より消失することを認め, 培地中のブドウ糖の消費とこれが密接に関連することを報告した。

また THORNE と BELTON (1957) は静置培養では免疫物質の最高濃度が 22~40 時間後にみられるが, 振盪培養すると 16~18 時間後になることを認めた。

B. 化学的性状

BOORE と TRESSELT (1955) は免疫物質をつぎの方法で精製した。

培養濾液を NaSO₄ の 1.74~2.5% 液または (HN₃)₂SO₄ の 3.3~4.6% 液で沈澱させ, 冷水に溶かしたものを 4℃で透析, 脱塩する。このものを凍結乾燥して濾液 1 ml 当り乾燥物が約 5 mg えられた。このものは -5℃で pH 6.9 のとき 25% のエチールアルコールで, pH 5.2 のときは 40% のエチールアルコールで沈澱するをみ, 以上の成績と電気泳動の所見から免疫物質を彼らは α-グロブリンであると結論した。

培養濾液の免疫原性は 4℃で速かに低下するが, 凍結すると最短 30 週間保持され, この際ホルマリンを添加すると抗原性の保持に役立つことが知られた。

培養濾液は全く毒性を欠くが, これで免疫された動物は強毒炭疽菌の攻撃に対し強固な免疫を獲得し, その血

清中には防禦抗体が証明される。この事実から免疫物質が炭疽菌の産生する毒性物質の 1 構成因子であることが予測される。その本態が炭疽毒素の因子 II を主体とすることは前項で述べたが, 生体と異なりある一定の培養条件下で免疫物質のみを産生する機構は今後の研究課題とされよう。

C. 免疫原性の測定

感染防禦試験 モルモット (PUZISS と WRIGHT 1954, MCGANNAT 1961) または兎 (BELTON と STRANGE 1954, BOOR 1955) に一定量の防禦物質を免疫注射してから, 無処置対照動物とともに強毒株で攻撃し, 致死防禦または延命効果によって測定する。

中和試験 破傷風毒素単位の検定法に似たもので BELTON と HENDERSON (1956) により報告された。

培養濾液の段階希釈のそれぞれに一定希釈の標準血清を加え 37℃2 時間, さらに 0~4℃に 1 夜感作してフロキュレーションを起こさせる。この反応で血清中の抗体と結合した濾液中の抗原量は間接的に遠心血清液中に残存する抗体量を測定することにより決定出来る。それには上清に一定量の毒素を加え 0~4℃に 2 時間置いた後兎の皮内に注射し, 上清の毒素中和能を浮腫の出現状況によって測定する。

寒天ゲル内沈降反応 THORNE と BELTON (1957) が報告した Ouchterlong 法を用いる測定法である。生菌免疫馬の標準免疫血清を中心の穴に, 培養濾液の段階希釈液をそれぞれ周囲の穴に入れ, 1 沈降線を生ずる濾液 (抗原) 濃度から抗原単位を算出する。この検定法による成績と動物を用いる他の検定法の成績はよく合致するといわれる。

補体結合反応 免疫物質の補体結合原性とモルモットでの感染防禦試験成績間に相関関係がみられることを MCGANN (1961) が報告した。方法は合成培地での濾液を凍結乾燥し, 抗原として用い兎の免疫血清で抗原性を検定する。

D. ワクチンとしての有効性

SCHLINGMAN (1956) は培養濾液より作った明礬ワクチンが羊および牛に対し良好な成績を示し, 免疫持続期間の点では羊は免疫注射後 6~7 カ月で可成り免疫力が低下したが, 牛では 8~12 カ月後でも十分な免疫性を保持したと報告している。また TACKSON (1957) が 305 頭の牛で検討した成績では, 注射後 1 カ月で攻撃すると 5 ml のワクチン注射群では 52% の生存率を, 同量 2 回注射群では 100% の生存率を示した。

BELTON と STRANGE (1954) および DARLOW (1956) は猿に 60γ を 3 回に分け免疫した場合, 2 年後に呼吸器感染で攻撃しても炭疽死を免れ, 免疫を保持したことを報告している。

WRIGHT (1954) は 660 人に 0.5 ml づつを 2 週間隔で

3回注射し、さらに6ヵ月後0.25ml追加注射した場合の注射反応について報告し、筋肉痛、軽度の頭痛、および異和などの全身障害を訴えたものが0.7%、注射局所の腫脹(15日以内に消失)を示したものが2.4%であり、これら反応の発現率は他の各種ワクチン注射による障害よりも軽微であり、また抗ヒスタミン剤がこれらに有効であったと述べた。またDARLOW(1956)らは精製した培養液の注射をうけた人間の血清中に抗毒素が産生されることを確認した。

炭疽の予防には従来から生菌ワクチンのみが有効とされていたが、免疫物質研究の成果として培養液による無菌予防液(バクテリア)の有効性が上述の各種報告で立証されるに至った。

しかしながら生菌ワクチン研究の分野でもSTERNE(1937)、STEMATIN(1938)らによりパストゥールⅡ苗予防液に代る優秀な弱毒生菌ワクチンが開発され実用に使われている。

バクテリアと生菌ワクチンを実際的な応用価値の観点から比較すると、バクテリアの方が製造経費がかさみ、

しかも動物での免疫持続期間が短いので生菌ワクチンの方が秀れるといえよう。

ま と め

原著の総括の項ではこれまで紹介した炭疽に関する研究の意義として次のようなことがのべられている。

1. 生体が菌の侵入を阻止する機構の疑問に対する解答。
2. 炭疽の病理発生と免疫の新知見は他の伝染病の感染過程を究明するための新しい方法論を提起する。
3. 化学的ワクチンの将来性。

以上が2部に分れた長編総説の概要であるが、訳者として一寸蛇足を加えたい。

最近の注目すべき研究にはこの総説に出て来たものの外に炭疽菌に対する特異ファージ(BROWNら1955)やペニシリン感受性を巧みに応用したパール・テスト(JENSENとKLEEMYER 1952)の研究などがあることである。これらは炭疽菌の同定や炭疽の診断に新しい手技としてすでに採用されていることを知っておく必要がある。

★炭疽の発生と防疫強化について

最近各地に炭疽の発生が相次ぎ畜産局衛生課の発表によれば7月12日現在15県32頭に達している。発生状況は別表の通りで、発生の畜種は牛が29頭で90%、そのうち22頭が乳用牛で、発生頭数の70%に相当している。月別発生状況は5月15頭で約50%近くを占めている。なおいまだに切迫と殺後の発見が多く、すでに16頭にも達し、発生頭数の50%にもおよんでいる。

このような事実のうらには特定銘柄の飼料が関与しているようではあるが日常家畜の診療業務にたずさわる獣医師の本病の病性、診断技術、防疫措置に対する再認識

と研修ならびに農家の啓蒙指導を行ない、本病的確かな防疫が確立されるよう要望されている。

獣 医 師 を 求 む (経験不問)

高給家族的優遇
なるべく独身者を望む
写真、履歴書を送られたし

神戸市葺合区中島通2丁目10
須磨獣医科病院
TEL (23) 6206

第121回日本臨床獣医学会(東京) 開催案内
第84回日本獣医公衆衛生学会(東京)

期日:昭和41年2月27日(日)

会場(予定):豊島区池袋東1の19 豊島振興会館

抄録の提出締切期日:昭和40年12月31日

抄録字数:1,000字以上2,000字まで

昭和40年炭疽の月別発生状況

月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	計
発生頭数	1	1	4	4	15	4	3	32

昭和40年炭疽の発生状況

県			計	北海道	福 島	千 葉	埼 玉	群 馬	静 岡	長 野	新 潟	愛 知	三 重	滋 賀	広 島	山 口	福 岡	熊 本
区 分																		
発生頭数	乳牛	頭	32	4	1	2	3	5	2	1	4	3	1	1	2	1	1	1
		牛	22	3	1	2	3	2	2	1	2	3	—	1	1	1	—	—
		牛	7	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—	1	—	1	—	1
		馬	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		豚	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	迫と殺	16	—	—	1	2	4	2	—	3	3	—	—	1	—	—	—	—
家畜保健衛生所で病 性決定		13	—	1	1	—	1	1	1	2	2	1	1	—	—	1	1	