

EL-TOR 菌ニ於ケル_Lイムペヂン¹ノ研究

第5報 EL-TOR 菌肉汁培養ニ於ケル_Lイムペヂン¹ノ吟味

京都帝國大學醫學部外科學研究室(鳥潟教授指導)

專修科生 横 田 宗 正

Erforschung über das Impedin bei El-Tor-Vibrionen

V. Mitteilung: Ueber das Impedin bei Bouillonkulturen

Von

Dr. M. Yokota

[Aus dem Laboratorium der Kais. Chir. Universitätsklinik Kyoto

(Prof. Dr. R. Torikata)]

Testmaterialien

1. *Das native Antigen (NF)*

Eine 7 tägige Kultur von El-Tor-Vibrionen in Bouillon mit pH=8,0 wurde durch halbstündige Erhitzung bei 60°C sterilisiert. Die Kultur enthielt ca. 0,001 ccm Erreger auf 1,0 ccm Medium. Das klare Kerzenfiltrat wurde in 0,5 proz. Carbolsäure versetzt und als das native Antigen (NF) zur Prüfung herangezogen.

2. *Das abgekochte Antigen (FK30')*

Das native Antigen (NF) wurde teilweise in einem bei 100°C siedenden Wasserbade eine halbe Stunde lang abgekocht und mit der Abkürzung FK 30' dem nativen NF nebeneinander gestellt.

Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der Prüfung, in welchem Grade die beiden Testmaterialien die normale Phagozytose der Staphylokokken, die sich in der Blutzirkulation normaler Meerschweinchen vor sich geht, zu beeinflussen imstande wären, gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle I

Die Wirkung der Testmaterialien, NF u. FK30', die normale Phagozytose von Staphylokokken zu fördern

Testmaterialien	Menge ccm	Koeffizient der Hyperleukozytose ¹⁾	Phagozytat ²⁾	Prozentwerte
NF	0,25	0,84	29,3	100
FK 30'		0,98	39,0	133
NF	0,5	0,87	27,9	95
FK 30'		0,87	39,9	136
NF	1,0	0,72	22,1	75
FK 30'		0,65	27,1	92

1)=Zeichen der Toxizität

2)=Zeichen der Antigenavidität

Zusammenfassung

1. Trotz der sukzessiven Erhöhung der Testdosen von 0,25 ccm auf 1,0 ccm wurde das Phagozytat beim Nativantigen (NF) immer kleiner, während beim Kokiigen (FK30') eine Vergrößerung der Phagozytose bei 0,5 ccm verzeichnet worden ist.

2. Dies sagt uns, dass die Wirkungsbreite bei NF viel kleiner ist als die bei FK30'; d. h. mit anderen Worten, die Erhöhung der Testdosis bei NF leicht zu einer negativen Phase führt und somit die Erfolge der antigenen Wirkung eher gehemmt werden als gefördert.

3. Die noch erreichbare maximale Phagozytose war 39,9 bei FK30' und 29,3 bei NF. Die maximalen antigenen Erfolge von FK30' als Phagozytat waren also um 36 Proz. grösser als die von NF.

4. Dabei war die Toxizität der beiden antigenen Präparate (NF u. FK30') keinem grossen Unterschiede unterworfen, weil die Verschiebung der Zahl der Leukozyten im zirkulierenden Blute der Versuchstiere fast die gleiche war.

5. Somit kommen wir zum Schlusse, dass auch bei 7 tägiger Bouillonkultur von El-Tor-Vibrien die davon hergestellten Kokiigene viel grössere Antigenavidität entfalten als die nativen Immunogene, ohne dass die Toxizität der beiden Präparate einen merklichen Unterschied an den Tag zu bringen.

(Autoreferat)

緒 言

余等ハ 糞 = El-Tor 菌 ノ _Lアルカリ¹性寒天斜面24時間培養 = 就テ 催食菌性抗原能働力及ビ特殊凝集素產生能働力ヲ檢シタルニ、生抗原即チ_Lワクチン² = テハ 毒力大ナル ノミナラズ 免疫ガ 阻害セラルルモノナルコト及ビ生抗原ヲ100°C = テ30分間加熱スル時ハコノ阻害作用ハ全然破却セラルルモノナルコトヲ立證セリ(第4報)。

本研究ニ於テハ EL-TOR 菌ヲ「アルカリ」性肉汁中ニ7日間培養シタルモノニ就テソノ催食菌性抗原能働力ヲ吟味セント欲ス。蓋シ「イムペヂン」ノ產生ハ培養基ノ種類及ビ培養時日ノ長短ニヨリテ變化アルベキヲ以テナリ。

實 驗 材 料

1) 生 抗 原 液

大阪帝國大學醫學部今村内科教室ヨリ 分譲セラレタル El-Tor 菌ヲ pH=8 ノ肉汁培養基ニ1週間 37°C ニテ培養シテ得タル EL-TOR 菌肉汁液ヲ 60°C ニ30分間加溫殺菌ス。コノ菌液1.0坵中ノ菌量ハ鳥瀉教授沈澱計ニテ 1.5 度目即チ約 0.001 坵ナリ。コノ菌液ヲ強力遠心シ其ノ上澄ヲ L₃ 陶土濾過管ヲ以テ濾過シ透明ナル濾液ヲ得、コレニ 0.5% ノ割合ニ石炭酸ヲ加フ。

2) 煮 抗 原 液

生抗原液ヲ試験管中ニ分注熔封シ 100°C ニテ沸騰シツツアル重湯煎中ニテ30分間煮沸シタルモノナリ。

3) 喰菌用標準菌液

黃色葡萄狀球菌ヲ普通寒天斜面 24 時間培養ヨリ 0.5% 石炭酸加 0.85 % 食鹽水ニ浮游セシメ、60°C ニ30分間加溫殺菌シ、3 回洗滌シタル後再ビ前記石炭酸加食鹽水ニ浮游セシム。コノ菌液 1.0 坵中ノ菌量ハ鳥瀉教授沈澱計ニテ 3 度目即チ約 0.002 坵ナリ。

4) 試 獸

體重 300 瓦内外ノ健康ナル雄海狸ヲ選ビ 1 群 3 頭宛トナシ實驗結果ノ平均値ヲ求メタリ。

實 驗 方 法

對黃色葡萄狀球菌血行內正常喰菌現象檢査術式ハ第 1 報ニ於ケルト同一ナリ。

實驗第 1 抗原用量 0.25 坵ノ場合

生・煮抗原用量各々 0.25 坵ヲ用ヒタル際ニ於ケル實驗結果ハ第 1 表、第 2 表ニ示サレタリ。マタ「子」及ビ白血球數ノ動搖ハ第 1 圖、第 2 圖ニヨリテ明白ナリ。

第 1 表 EL-TOR 菌生濾液 (NF) 0.25 坵ヲ以テノ喰菌作用 (3 頭平均)

		血液單位容積內白血球絕對數	白血球增減率	白 血 球 200 個 中				
				淋 巴 球		中 性 多 型 核		
				%	• %	噬	菌	子
注 射 前		5850	1.00	67.7	32.3	0	0	0
菌液經過注射時間	30 分	4576	0.78	70.2	29.8	6.5	16.5	23.0
	1 時間	3850	0.66	40.2	59.8	7.5	32.0	39.5
	2 時間	5200	0.89	35.0	65.0	13.0	33.5	46.5
	4 時間	4426	0.76	32.7	67.3	9.5	19.5	29.0
	8 時間	6426	1.10	40.5	59.5	4.0	4.5	8.5
平 均		4896	0.84	43.7	56.3	8.1	21.2	29.3

喰 菌 率 = 5.98

第 2 表 EL-TOR 菌30分煮濾液 (FK30') 0.25 μ ヲ以テノ喰菌作用(3頭平均)

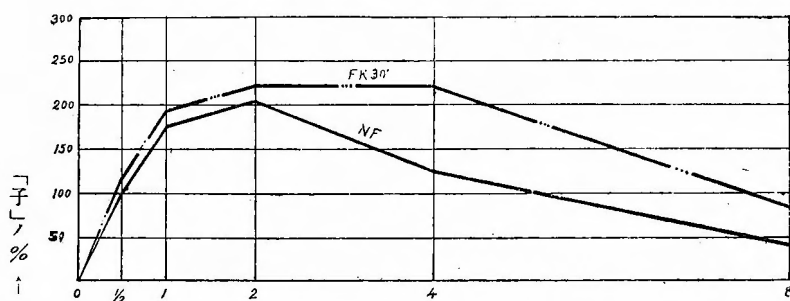
	血液單位容 積内白血球 絶對數	白血球 増減率	白血球 200 個 中				
			淋 巴 球	中 性 多 型 核			
			%	%	喰	菌	子
注 射 前	5426	1.00	54.5	45.5	0	0	0
菌液注射後經過時間							
30 分	4400	0.81	54.5	45.5	9.0	17.5	26.5
1 時間	5776	1.06	29.5	70.5	9.5	35.0	44.5
2 時間	5026	0.93	22.7	77.3	14.0	36.5	50.5
4 時間	4976	0.92	25.0	75.0	14.0	40.5	54.5
8 時間	6326	1.17	31.5	68.5	6.0	13.0	19.0
平 均	5301	0.98	32.6	67.4	10.5	28.5	39.0

喰 菌 率 = 7.36

第 1 圖 抗原用量0.25 μ ニ於ケル L 子 $\uparrow$ ノ百分率ノ推移(第1—2表參照)

NF=生抗原ヲ以テノ L 子 $\uparrow$ ノ%ノ曲線

FK30'=煮抗原ヲ以テノ L 子 $\uparrow$ ノ%ノ曲線

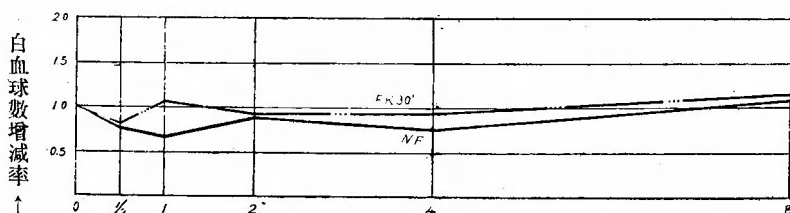


→ 標準菌液注射後經過時間(時)

第 2 圖 抗原用量0.25 μ ニ於ケル血中白血球數増減率ノ推移(第1—2表參照)

NF=生抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線

FK30'=煮抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線



→ 標準菌液注射後經過時間(時)

所 見 概 括

「子」ノ値ノ平均ハ生濾液ニテハ29.3(100%)，煮濾液ニテハ39.0 (133%)ニシテ後者ハ前者ヨリモ33%大トナリタリ。

白血球數ノ動搖ハ兩者トモ略々同様ノ傾向ヲ示シ，平均増減率ハ生濾液0.86，煮濾液0.98ニシテ生濾液ノガガ白血球過少程度(毒力)稍々大ナリ。

實驗第 2 抗原用量0.5㏍ノ場合

抗原用量各々0.5㏍ヲ用ヒタル場合ノ實驗結果ハ第3表，第4表ニ一括セラレ，「子」及ビ白血球數ノ動搖ハ第3圖，第4圖ニ示サレタリ。

第 3 表 EL-TOR菌生濾液 (NF) 0.5㏍ヲ以テノ喰菌作用(3頭平均)

		血液單位容 積内白血球 絶 對 數	白 血 球 増 減 率	白 血 球 200 個 中				
				淋 巴 球	中 性 多 型 核			
				%	%	喰	菌	子
注 射 前		5700	1.00	55.0	45.0	0	0	0
經 過 注 射 時 間	30 分	4450	0.78	39.5	60.5	10.5	32.0	42.5
	1 時間	4750	0.83	35.7	64.3	5.5	16.0	21.5
	2 時間	5300	0.93	40.0	60.0	10.5	24.0	34.5
	4 時間	5276	0.93	28.5	71.5	5.5	24.5	30.0
	8 時間	5076	0.89	49.0	51.0	4.5	6.5	11.0
平 均		4970	0.87	38.5	61.5	7.3	20.6	27.9

喰 菌 率=5.61

第 4 表 EL-TOR 菌30分煮濾液 (FK30') 0.5㏍ヲ以テノ喰菌作用(3頭平均)

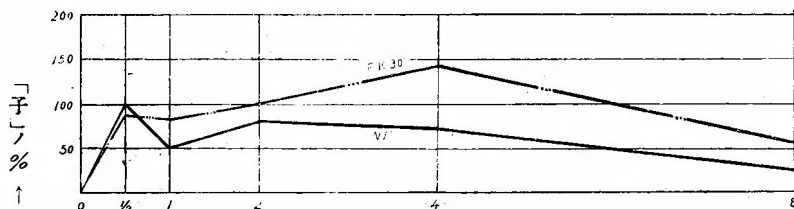
		血液單位容 積内白血球 絶 對 數	白 血 球 増 減 率	白 血 球 200 個 中				
				淋 巴 球	中 性 多 型 核			
				%	%	喰	菌	子
注 射 前		4726	1.00	65.7	34.3	0	0	0
經 過 注 射 時 間	間 分	3550	0.75	58.5	41.5	8.0	29.0	37.0
	1 時間	3726	0.79	42.3	57.7	9.0	26.0	35.0
	2 時間	4076	0.86	43.5	56.5	10.5	32.0	42.5
	4 時間	4076	0.86	33.7	66.3	17.0	44.0	61.0
	8 時間	5200	1.10	22.7	77.3	7.5	16.5	24.0
平 均		4126	0.87	40.1	59.9	10.4	29.5	39.9

喰 菌 率=9.67

第 3 圖 抗原用量0.5 μ ニ於ケル γ 子¹ノ百分率ノ推移(第3—4表参照)

NF=生抗原ヲ以テ γ 子¹ノ%ノ曲線

FK30'=煮抗原ヲ以テ γ 子¹ノ%ノ曲線

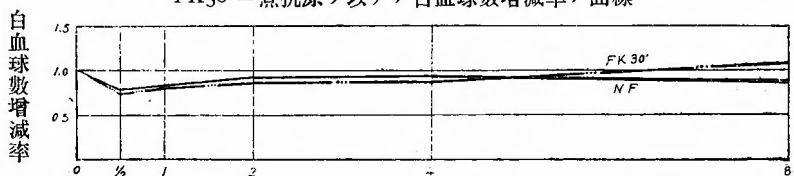


→ 標準菌液注射後經過時間(時)

第 4 圖 抗原用量0.5 μ ニ於ケル血中白血球數増減率ノ推移(第3—4表参照)

NF=生抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線

FK30'=煮抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線



→ 標準菌液注射後經過時間(時)

所 見 概 括

γ 子¹ノ平均ハ生濾液ニテ27.9(100%), 煮濾液ニテハ 39.9 (143%) ニシテ煮濾液ノ效果ハ生濾液ノソレニ比シ43%ダケ大トナリタリ。

白血球數ノ動搖ハ兩者トモ略々同一程度ノ白血球過少ヲ示シ, 平均増減率ハ兩者共ニ 0.87ナリキ。

實驗第 3 抗原用量1.0 μ ノ場合

抗原用量各々1.0 μ ニ於ケル實驗結果ハ第5表, 第6表ニ一括セラレタリ。

γ 子¹ノ推移及ビ白血球數ノ動搖ハ第5圖, 第6圖ニ示サレタリ。

第 5 表 EL-TOR 菌生濾液(NF) 1.0 μ ヲ以テノ喰菌作用(3頭平均)

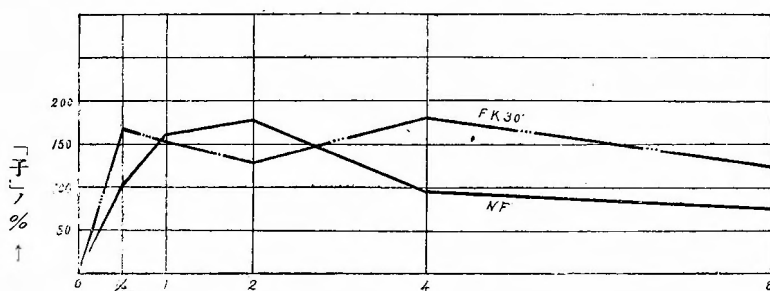
		血液單位容積内白血球絕對數	白血球増減率	白血球 200 個 中				
				淋 巴 球	中 性 球	多 型 核		
				%	%	喰 菌	子	
注 射 前		4300	1.00	72.5	27.5	0	0	0
菌液注射後經過時間	30 分	4450	1.03	61.3	38.7	4.0	14.0	18.0
	1 時間	2126	0.49	63.7	36.3	6.5	22.5	29.0
	2 時間	2626	0.61	49.0	51.0	7.5	24.5	32.0
	4 時間	2600	0.60	39.0	61.0	6.0	11.5	17.5
	8 時間	3700	0.86	37.3	62.7	3.0	11.0	14.0
平 均		3100	0.72	50.1	49.9	5.4	16.7	22.1

喰 菌 率=7.13

第 6 表 EL-TOR 菌30分煮濾液 (FK30') 1.0 兎ヲ以テノ喰菌作用(3頭平均)

	血液單位容 積内白血球 絶對數	白血球 増減率	白 血 球 200 個 中				
			淋 巴 球	中 性 多 型 核			
			%	%	喰	菌	子
注 射 前	6326	1.00	60.3	39.7	0	0	0
菌液注射後 經過時間							
30 分	4026	0.64	59.3	40.7	10.0	20.0	30.0
1 時間	3600	0.57	52.0	48.0	8.5	19.0	27.5
2 時間	3950	0.62	40.7	59.3	8.0	15.0	23.0
4 時間	4500	0.71	30.7	69.3	12.5	20.0	32.5
8 時間	4450	0.70	40.7	59.3	8.0	14.5	22.5
平 均	4105	0.65	44.7	55.3	9.4	17.7	27.1

喰 菌 率 = 6.60

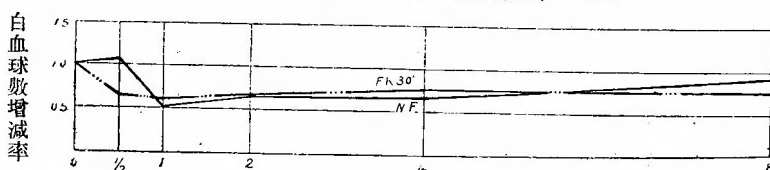
第 5 圖 抗原用量1.0兎ニ於ケル γ 子 $\uparrow$ ノ百分率ノ推移(第5—6表参照)NF=生抗原ヲ以テノ γ 子 $\uparrow$ ノ%ノ曲線FK30'=煮抗原ヲ以テノ γ 子 $\uparrow$ ノ%ノ曲線

→ 標準菌液注射後經過時間(時)

第 6 圖 抗原用量1.0兎ニ於ケル血中白血球數増減率ノ推移(第5—6表参照)

NF=生抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線

FK30'=煮抗原ヲ以テノ白血球數増減率ノ曲線



→ 標準菌液注射後經過時間(時)

所 見 概 括

 γ 子 $\uparrow$ ノ平均ハ生濾液ニテ22.1(100%), 煮濾液ニテハ27.1(122%)ニシテ煮濾液ノ抗原性能働

カハ生濾液ノソレヨリモ22%ダケ大トナリタリ。白血球數ノ動搖ハ菌液注射後30分目ニ於テ生濾液ニアリテハ健常時ト略々同數ナリシモ、煮濾液ニ於テハ著シク白血球過少ヲ來シタル以外兩者ハ近似セル經過ヲ示シタリ。平均増減率ハ生濾液0.72、煮濾液0.65ナリキ。

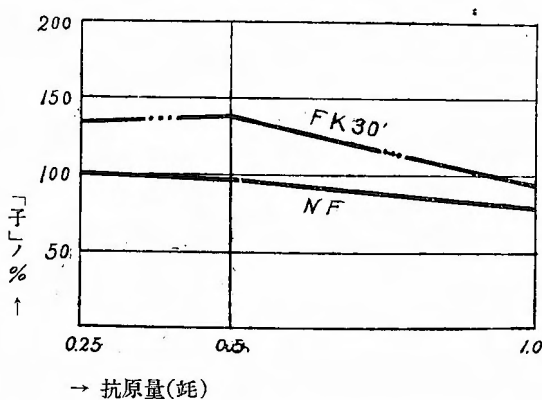
所見總括

實驗第1, 第2, 第3ノ所見ヲ總括シ第7表及ビ第7圖ヲ得タリ。

第7表 抗原遞加用量ニ於ケル喰菌作用ノ總括

抗原量 (mg)	抗原別	白血球 絶對數	白血球 増減率	L 喰 I	L 菌 I	L 子 I	L 子 I ノ 百分比	最大 L 子 I ノ 百分比
0.25	生抗原	4896	0.84	8.1	21.2	29.3	100	100
"	煮抗原	5301	0.98	10.5	28.5	39.0	133	133
0.5	生抗原	4970	0.87	7.3	20.6	27.9	100	95
"	煮抗原	4126	0.87	10.4	29.5	39.9	143	136
1.0	生抗原	3100	0.72	5.4	16.7	22.1	100	75
"	煮抗原	4105	0.65	9.4	17.7	27.1	122	92

第7圖 生・煮兩抗原ニヨル最大催喰菌作用
(L 子 I)ノ比較(第7表参照)



NF=生抗原ヲ以テノ平均 L 子 I
百分率曲線
FK30'=煮抗原ヲ以テノ平均 L 子 I
百分率曲線

L 子 I ノ平均ハ生濾液ニ於テハ抗原用量ガ0.25 mg ヨリモ0.5 mg ニ増加シタルニ連レ僅微ノ減少ヲ示シ、1.0 mg ニ於テハ更ニ著シク減少セリ(下行位相)。

煮濾液ニ於テハ用量0.25 mg ニ於ケルヨリモ0.5 mg トナルニ及ビ L 子 I ハ明白ニ0.9ダケ増大セリ(上行位相)。而シテ用量ガ1.0 mg トナルニ及ビテ2.8ダケ減少セリ(下行位相)。

即チ生抗原ニテハ0.25 mg ニテ既ニ下行位相、煮抗原ニテハコノ使用量ニテハ僅微ノ上行位相ヲ取りタリ。即チ生濾液ノ方ガ煮濾液ヨリモ作用域(Wirkungsbreite)小ナリ、換言スレバ同一使用量ニテアリナガラ生濾液ノ方ガ煮濾液ヨリモ早期ニ下行位相ヲ發現ス。

而シテ煮濾液ニ於テハ生濾液ニ於ケルヨリモ常ニ大ナル L 子 I ヲ示シ抗原用量0.25 mg ノ際ニハ

33%, 0.5 兎ノ際ニハ43%, 1.0 兎ノ際ニハ22%ノ増大ヲ認メタリ。

生濾液ヲ以テ舉ゲ得タル最大催喰菌作用ハ $\text{L}_{\text{子}}^{\text{T}}$ ノ値トシテ 29.3ニシテコノ際ノ用量ハ 0.25 兎ナリキ。コレニ對シ煮濾液ニテ舉ゲ得タル最大催喰菌作用ハ $\text{L}_{\text{子}}^{\text{T}}$ ノ値ニテハ 39.9ニシテコノ際ノ用量ハ 0.5 兎ナリキ。兩者ノ百分比ハ生：煮＝100：136ナリ。即チ生濾液ニテハ用量ヲ増大スレバ却ツテ抗原能働力ハ減弱シ、阻止的ニ作用シ、下行位相ヲ來シ、十分ナル抗原能働力ヲ發揮セシメ得ザルモノタルコトガ明白ニ立證セラレタリ。

以上ノ事實ハ生濾液中ニ含有セラルル $\text{L}_{\text{イムペデン}}^{\text{T}}$ ニヨリテソノ催喰菌性抗原能働力が阻止セラレタルニ基因スルモノニシテ、煮濾液ニ於テハ $\text{L}_{\text{イムペデン}}^{\text{T}}$ ガ破却セラレタルヲ以テ喰菌作用ガ何等ノ阻止ヲモ蒙ルコトナク促進セラレタルニ歸スルモノナリ。

24時間寒天斜面培養ヲ出發材料トナセル場合ノ生・煮兩抗原ノ比較ニ於テ最大喰菌子ハ69%ノ増大ナリキ(第1報)。7日間肉汁培養ヲ出發材料ト爲セル本研究ノ結果ニテハ検査範圍ニ於ケル最大喰菌子ハ43%ノ増大ナリ。即チ $\text{L}_{\text{イムペデン}}^{\text{T}}$ ハ24時間固形培養ニ於ケルト、7日間肉汁培養ニ於ケルトニヨリ、其ノ產生量ニ差アルモノナルコトヲ知ル。從ツテ $\text{L}_{\text{イムペデン}}^{\text{T}}$ ヲ破却スル爲メノ煮沸時間ハ個々ノ培養ニヨリテ其ノ都度豫備實驗ニヨリテ確定セラルベキモノナリ。

血中白血球數ノ動搖ニ於テハ各實驗何レモ略々同一程度ノ白血球過少ヲ來シ兩者ノ間ニハ著シキ差違ヲ認メズ。即チ毒力ハ兩者略々同一程度ナリキ。

以上ノ所見ニヨリテ煮濾液ハソノ毒力ニ於テハ生濾液ト略々同一ナリシモ、喰菌作用促進能働力ニ於テハ明ニ生濾液ヲ凌駕セルコトヲ認メ得ベシ。即チ El-Tor 菌肉汁培養ニ於テモ固形培養ニ於ケルト均シク $\text{L}_{\text{イムペデン}}^{\text{T}}$ ノ存在ガ立證セラレタリ。

結 論

El-Tor 菌ヲ $\text{L}_{\text{アルカリ}}^{\text{T}}$ 性肉汁中ニ7日間培養シタルモノヲ 60°C 30分間加熱ニヨリ殺菌シ其ノ濾液ヲ生抗原ト爲シ、生抗原ヲ100°C 30分間煮沸スルコトニヨリテ煮抗原ヲ得、爾他同一條件ノ下ニ抗黃色葡萄狀球菌血行内正常喰菌性抗原能働力ヲ檢シタルニ下ノ結果ヲ得タリ。

1) 生抗原ハ煮抗原ヨリモ催喰菌作用ニ於テ早期ニ下行位相ヲ發現セリ、換言スレバ生抗原ハ煮抗原ヨリモ反應域 (Wirkungsbreite) 小ナリ。

2) 生抗原ハ用量 0.25 兎ニテ最大喰菌子ヲ舉ゲソノ値 29.3ナリキ。コレニ對シ煮抗原ハ用量 0.5 兎ニテ最大喰菌子ヲ舉ゲソノ値 39.9ナリキ。兩者ノ百分比ハ生：煮＝100：136ナリ。

3) 生・煮兩抗原何レニテモ血中白血球數ノ動搖ハ略々同一程度ナリキ(第7表)。コレ此ノ際兩者ノ毒力ガ略々同一ナリシコトヲ意味スルモノナリ。