



Title	志賀赤痢菌毒素に関する研究（第2報）
Author(s)	林, 喬義; 中川, 勇
Citation	低温科学. 生物篇, 11, 123-134
Issue Date	1954-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17567">http://hdl.handle.net/2115/17567</a>
Type	bulletin (article)
File Information	11_p123-134.pdf



[Instructions for use](#)

## 志賀赤痢菌毒素に関する研究 (第2報)

林 喬 義 中 川 勇

(低温科学研究所 醫學部門)

(昭和28年2月受理)

### まえがき

さきに著者は志賀赤痢菌々体から核酸溶液によつて抽出された毒素について報告<sup>1)~3)</sup>したが、その後S型志賀赤痢菌の一菌株からDubos等<sup>4)</sup>の云うO抗原を全く含有しないで強力なExotoxin(志賀赤痢菌の場合菌体内に多く含有されているが毒素の性質上こう呼ぶ)を産生する能力を有する菌株を得ることに成功したので、この菌株と原株との間の毒素産生の比較及び免疫學的な比較を行い、更にこの變異株から精製されたExotoxinは全くEndotoxinを含有していないと云う利點があるので、この毒素を用いて毒素の動物体内に於ける運命に關する若干の實驗を行つたので、それらについて報告する。

### 實驗方法及び結果

#### 實驗1. O抗原を含有しない變異株を得る迄の經過

使用菌株は前報と同じく鹿児島1號株(S型)で、この菌体を普通寒天平板培養によつて集め、三鹽化醋酸を用いて抽出し、等電點沈澱法を繰返して精製したBoivin-fractionを以て家兎を免疫し、沈降素價50萬~100萬の免疫血清を得た。この免疫血清を無菌的に採取して普通ブイオンに1/10量の割合に加え、その血清加ブイオンを滅菌小試験管に1cc宛分注し、これに前記S型菌株を毎日又は隔日に、經代培養して行くと、始めのうちは血清中のO抗原に對する抗体のために菌の發育は悪く菌体は管底に沈澱して増殖し上層部は全く透明であるが、これが早くて6代目おそくて11代目位になると上層の部分が少し溷濁して來て尙2~3代經代して行くと平等溷濁して發育するようになる。この菌を寒天平板に移すと集落はRough型で、普通ブイオンに移すと管底に沈澱して發育し、上層は全く透明でありR型菌の特徴を示している。

對照として原株を健常家兎血清加ブイオン及び普通ブイオンに經代培養しても、吾々の觀察し

\* 北海道低温科学研究所業績 第244號

本論文は昭和27年4月、日本細菌學會總會に於てその概要を報告した。

この研究經費の一部は文部省科學研究助成補助金によるものである。

た期間内においてはこのような変化はおこらなかつた。なお變異株を健常家兔血清加ブイオンに移してみると、沈澱は出来るが上層は平等濁濁の發育状態を示した。經代培養の成績の一例を表示すると第1表の通りである。

第1表 經代培養における菌の發育状態

培 養 基	經 代 數											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
普通ブイオン + 免疫血清	上層 透明	〃	〃	〃	〃	〃	〃	上層 微濁	上層 濁濁	〃	平等 濁濁	〃
	沈澱	〃	〃	〃	〃	〃	〃	沈澱	沈澱	〃	沈澱 僅少	〃
普通ブイオン + 健常血清	平等 濁濁	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
普通ブイオン のみ	平等 濁濁	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃

吾々はかりに原株をS株、これから出来たO抗原を有しない株をR株と呼ぶことにする。菌株はすべて凍結乾燥保存し使用に際してアンプルを切り培養2~3代目のものを用いた。

#### 實驗2. S株及びR株からのExotoxinの精製

精製過程は第2表、第3表に示す通りである。

#### 實驗3. S株及びR株 Boivin-fractionの精製

精製過程は第4表、第5表に示す通りである。

#### 實驗4. 兩菌株のExotoxin, Boivin-fraction及び菌体による家兔の免疫

S株Exotoxin, R株Exotoxin, S株Boivin-fraction, R株Boivin-fraction, S株菌体, R株菌体の6種類の抗原を以て各2頭宛の体重2.5~3kgの家兔を免疫した。免疫注射方法は第6表に示した。

#### 實驗5. 各免疫家兔血清のS株及びR株Exotoxin中和反應

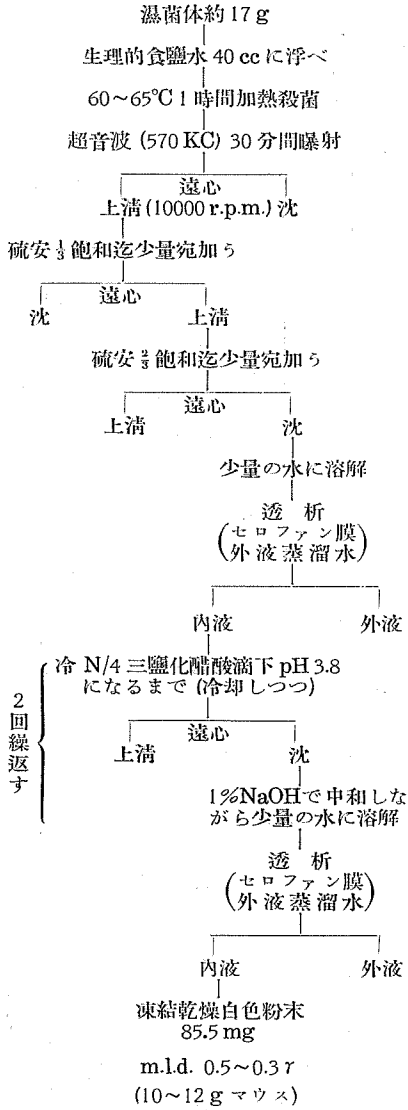
各免疫家兔血清の原液, 5倍, 10倍, 50倍の4種類の稀釋液を作り, これにS株及びR株から精製したExotoxin 20γ/ccの液を夫々各免疫血清稀釋液に等量混じ, 37°C 30分間放置してから各免疫血清毒素混合液0.2cc宛を各2疋の体重10~12gのマウスに靜脈注射し15日間經過を観察した。各マウスに靜脈注射したExotoxinの量は4m.l.d.以上ということになる。成績は第7表, 第8表に示す通りでS株及びR株のExotoxinの免疫血清, 及びS株及びR株の菌体の免疫血清は程度の差はあるが, 何れもS株及びR株のExotoxinのどちらをも中和するが兩株のBoivin-fractionの免疫血清はどちらも兩株のExotoxinを中和出来なかつた。中和關係の間にS株とR株の菌株の特異性を認めることは出来なかつた。

#### 實驗6. 各種免疫家兔血清とS株及びR株のBoivin-fractionとの沈降反應

免疫血清は原液のまま, 抗原を1000倍~50000倍迄段階的に稀釋し毛細試験管を用い重層

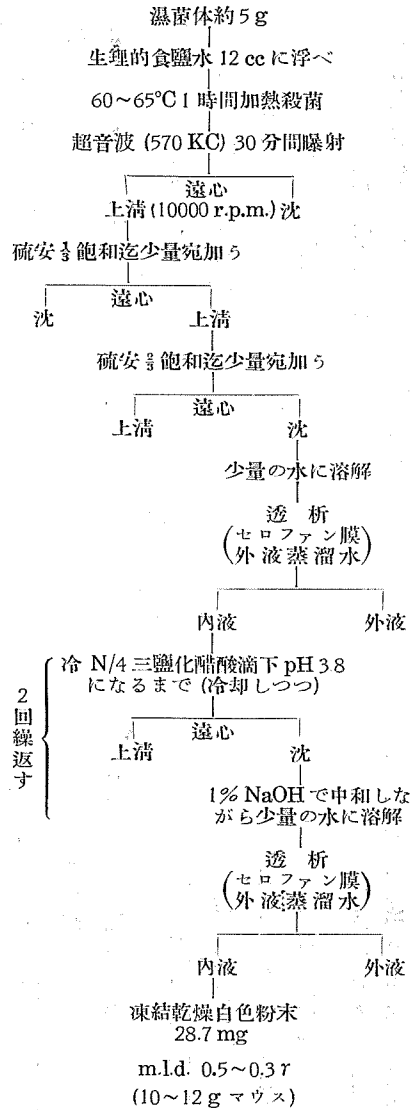
第2表 S株 Exotoxin 精製過程

志賀菌鹿兒島1號S株, ナス型培養瓶120本  
普通寒天24時間培養, 菌体播取り



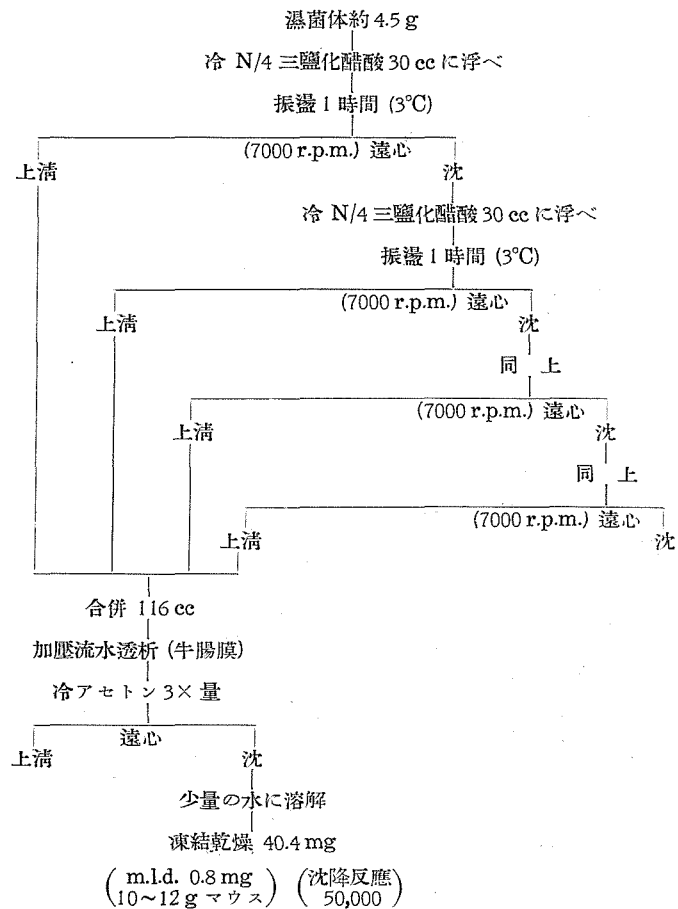
第3表 R株 Exotoxin 精製過程

志賀菌鹿兒島1號R株, ナス型培養瓶40本  
普通寒天24時間培養, 菌体播取り



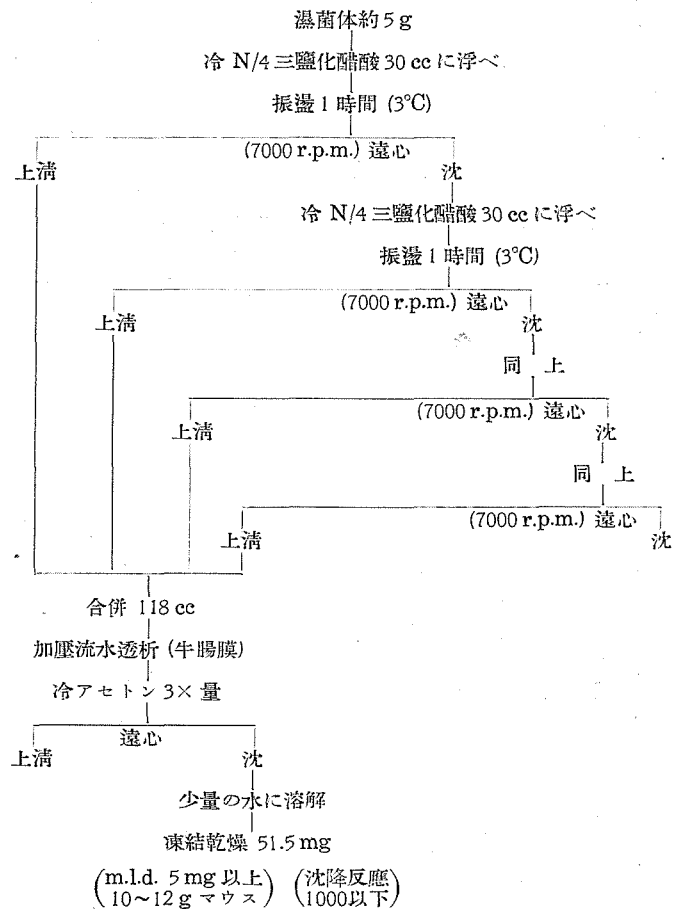
第 4 表 S株 Boivin-fraction 精製過程

志賀菌鹿兒島 1 號 S 株, ナス培養瓶 40 本, 普通寒天  
24 時間培養, 菌体掻取り



第 5 表 R株 Boivin-fraction 精製過程

志賀菌鹿兒島 1 號 R 株, ナス培養瓶 40 本, 普通寒天  
24 時間培養, 菌体掻取り



第 6 表 各種抗原の免疫注射方法

家兎番號	No. 1, No. 7	家兎番號	No. 5, No. 9	家兎番號	No. 2, No. 10	家兎番號	No. 3, No. 11	家兎番號	No. 4, No. 12	家兎番號	No. 6, No. 13
注射抗原	S 株 Exotoxin	注射抗原	R 株 Exotoxin	注射抗原	S 株 Boivin-fraction	注射抗原	R 株 Boivin-fraction	注射抗原	S 株 60°C加熱死菌体	注射抗原	R 株 60°C加熱死菌体
注射 採血日	注射採血量	注射 採血日	注射採血量	注射 採血日	注射採血量	注射 採血日	注射採血量	注射 採血日	注射採血量	注射 採血日	注射採血量
24/10	注射前採血10cc	25/10	注射前採血10cc	24/10	注射前採血10cc	25/10	注射前採血10cc	8/11	注射前採血10cc	8/11	注射前採血10cc
26/10	0.1r (靜注)	26/10	0.1r (靜注)	27/10	0.5 mg (靜注)	27/10	0.5 mg (靜注)	12/11	0.01 mg (皮下)	9/11	0.02 mg (皮下)
30/10	" ( " )	30/10	" ( " )	30/10	" ( " )	30/10	" ( " )	15/11	0.02 mg ( " )	12/11	0.05 mg ( " )
2/11	" ( " )	2/11	" ( " )	2/11	" ( " )	2/11	" ( " )	19/11	0.04 mg ( " )	15/11	0.1 mg ( " )
5/11	0.2r ( " )	5/11	0.2r ( " )	5/11	1.0 mg ( " )	5/11	1.0 mg ( " )	22/11	0.1 mg ( " )	19/11	0.2 mg ( " )
8/11	" ( " )	8/11	" ( " )	8/11	" ( " )	8/11	1.0 mg ( " )	26/11	0.2 mg ( " )	22/11	0.5 mg ( " )
12/11	0.4r ( " )	12/11	0.4r ( " )	16/11	2.0 mg ( " )	5/11	2.0 mg ( " )	3/12	0.4 mg ( " )	26/11	0.6 mg ( " )
15/11	0.8r ( " )	15/11	0.8r ( " )	19/11	4.0 mg ( " )	19/11	4.0 mg ( " )	15/12	1 mg ( " )	3/12	1.2 mg ( " )
19/11	1.6r ( " )	19/11	1.8r ( " )	22/11	採血 20 cc	22/11	採血 20 cc	21/12	採血 10 cc	6/12	採血 15 cc
22/11	4.0r ( " )	22/11	4.0r ( " )					21/12	1.7 mg ( " )	15/12	2.1 mg ( " )
26/11	8.0r ( " )	26/11	8.0r ( " )								
3/12	20r ( " )	3/12	20r ( " )								
6/12	40r ( " )	6/12	40r ( " )								
15/12	採血 15 cc	15/12	採血 15 cc								
15/12	100r ( " )	15/12	100r ( " )								
18/12	No. 1 死亡	21/12	150r ( " )								

志賀赤痢菌毒薬に関する研究(第二報)

第 7 表 各種免疫血清による S 株 Exotoxin の中和反應

免疫抗原	免疫家免番號	血 清 稀 釋 倍 數							
		1×		5×		10×		50×	
Exotoxin (S株)	No. 1	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 7	⊙	⊙	D	D	D	D	D	D
Exotoxin (R株)	No. 5	⊙	⊙	D	D	D	D	D	D
	No. 9	⊙	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D
菌 体 (S株)	No. 4	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D	D
	No. 12	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D	D
菌 体 (R株)	No. 6	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	D	D	D
	No. 13	⊙	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D
Boivin-fract. (S株)	No. 2	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 10	D	D	D	D	D	D	D	D
Boivin-fr act. (R株)	No. 3	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 11	D	D	D	D	D	D	D	D

⊙: 生 存 D: 死 亡 觀察は 15 日

第 8 表 各種免疫血清による R 株 Exotoxin の中和反應

免疫抗原	免疫家免番號	血 清 稀 釋 倍 數							
		1×		5×		10×		50×	
Exotoxin (S株)	No. 1	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 7	⊙	D	D	D	D	D	D	D
Exotoxin (R株)	No. 5	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D	D
	No. 9	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D	D
菌 体 (S株)	No. 4	⊙	⊙	D	D	D	D	D	D
	No. 12	⊙	⊙	D	D	D	D	D	D
菌 体 (R株)	No. 6	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D	D
	No. 13	⊙	⊙	⊙	⊙	D	D	D	D
Boivin-fract. (S株)	No. 2	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 10	D	D	D	D	D	D	D	D
Boivin-fract. (R株)	No. 3	D	D	D	D	D	D	D	D
	No. 11	D	D	D	D	D	D	D	D

⊙: 生 存 D: 死 亡 觀察は 15 日

第9表 各種免疫家兎血清とS株及びR株のBoivin-fractionとの沈降反応

免疫抗原	免疫家兎番號	S株 Boivin-fraction の稀釋倍數					
		1000	5000	10000	50000	100000	500000
Exotoxin (S株)	No. 1	±	—	—	—	—	—
	No. 7	+	—	—	—	—	—
Exotoxin (R株)	No. 5	—	—	—	—	—	—
	No. 9	—	—	—	—	—	—
菌体 (S株)	No. 4	##	++	+	—	—	—
	No. 12	##	++	+	±	—	—
菌体 (R株)	No. 6	—	—	—	—	—	—
	No. 13	—	—	—	—	—	—
Boivin-fract. (S株)	No. 2	##	++	++	+	—	—
	No. 10	##	++	+	+	—	—
Boivin-fract. (R株)	No. 3	—	—	—	—	—	—
	No. 11	—	—	—	—	—	—
免疫抗原	免疫家兎番號	R株 Boivin-fraction の稀釋倍數					
		1000	5000	10000	50000	100000	500000
Exotoxin (S株)	No. 1	—	—	—	—	—	—
	No. 7	—	—	—	—	—	—
Exotoxin (R株)	No. 5	—	—	—	—	—	—
	No. 9	—	—	—	—	—	—
菌体 (S株)	No. 4	—	—	—	—	—	—
	No. 12	—	—	—	—	—	—
菌体 (R株)	No. 6	—	—	—	—	—	—
	No. 13	—	—	—	—	—	—
Boivin-fract. (S株)	No. 2	—	—	—	—	—	—
	No. 10	—	—	—	—	—	—
Boivin-fract. (R株)	No. 3	—	—	—	—	—	—
	No. 11	—	—	—	—	—	—

法によつて行つた。成績は第9表の通りでS株のExotoxin免疫血清中にはS株のBoivin-fractionに對する沈降素を僅かながら證明出来る。このことはS株から精製したExotoxin中にはBoivin-fractionが含まれていることを示している。S株の菌体及びBoivin-fraction免疫血清は勿論S株Boivin-fractionと強い沈降反應を示すがR株のBoivin-fractionとは全く反應しない。R株のExotoxin, Boivin-fraction及び菌体の免疫血清は何れもS株のBoivin-



fraction と沈降反應を示さないのみならず R 株自身の Boivin-fraction とも全く反應を示さない。このことから S 株から Boivin-fraction を抽出したと同じ方法で R 株から抽出した物質は免疫原性も反應原性も有していない物質であることを示している。なお R 株から精製した Exotoxin は毒性、免疫原性は S 株からのものと全く變らないが S 株の Boivin-fraction のような沈降原となり得る毒性物質を全く含有していないということがこれらの成績から云えると思う。それ故に以下の Exotoxin の實驗には R 株から精製した Exotoxin を用いた。

#### 實驗 7. 志賀 Exotoxin の動物体内における運命

家兎に靜脈から注射された Exotoxin の流血中に存在する時間及び臓器組織への移行の狀態を觀察するために次のような實驗を行つた。

体重 1750 g の健常家兎に R 株 Exotoxin 10 mg (20,000 m.l.d.) を 10 cc の生理的食鹽水に溶解して靜脈注射し、注射後 15 分、30 分、1 時間と以後 1 時間毎に 8 時間目迄時間的に 1.5 cc 宛採血し、直ちに 4% クエン酸ソーダ 0.5 cc を加えて 2 cc とし、その 1.0 cc 宛を体重 1500~2000 g の 2 頭の家兎に靜脈注射して經過を觀察した。成績は第 10 表に示す通り大量 Exotoxin 注射後 1 時間迄の採血血液を注射した家兎は各 2 頭中 2 頭共定型的麻痺を起して 4 日以内に死亡したが 2 時間後及び 3 時間後の採血血液を注射した家兎は何れも 2 頭中 1 頭は 4 日目に定型的症狀で死亡したが 1 頭は一時食慾不振などを示したが生残つた。4 時間目以後の採血血液を注射した家兎は全部一時食慾不振等の症狀はあつたが全部生残つた。初めに大量 Exotoxin を注射した家兎の全血液量を 150~200 cc とすれば 20,000 m.l.d. 靜脈注射した直後の血液中の Exotoxin の濃度は 100~130 m.l.d./1.0 cc となる。この家兎の血液を時間を追つて 1.5 cc 宛採血しその半量の 0.75 cc 宛を直ちに別の家兎に靜脈注射したのであるからその血液の中には大量 Exotoxin 注射後あまり時間がたつていなければ相當大量の Exotoxin が含有されている筈である。しかしながら第 10 表の成績から判斷すると大量 Exotoxin 注射後 1 時間後に採血した血液 0.75 cc 中には完全に 1 m.l.d. 以上の Exotoxin を含有していたが 2 時間、3 時間後に採血した血液 0.75 cc 中には Exotoxin の量はもはや 1 m.l.d. は含有されていなかつたと考えられるので靜脈注射された Exotoxin は比較的速かに流血中から臓器組織に移行するかまたは破壊されてしまうものと想像されるので大量の Exotoxin 注射後 8 時間目にその家兎を瀉血により犠牲死させ肝、脾、腎、腦、脊髓等の臓器を摘出してできるだけ血液を除去し直ちに液体空気で凍結後  $-40^{\circ}\text{C}$  の低温室内で凍結のまま磨碎してから第 11 表に示す割合に吾々が志賀菌体から毒素抽出りに用いたところの 1% R.N.A 溶液を加えて室温 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) で 1 時間振盪抽出後遠心 (8500 r.p.m.) により沈澱を除き上清を表に示す量だけ各群 2 頭の家兎に靜脈注射して經過を觀察した。この結果は第 11 表に示す通り腦、脊髓、肝、の抽出液注射家兎は 2 頭中 2 頭共定型的麻痺症狀を呈して 5 日以内に死亡し、脾の抽出液注射家兎は 2 頭中 1 頭はやはり定型的麻痺で 5 日目に死亡したが 1 頭は麻痺を起さず生残した。腎臓の抽出液注射家兎は 2 頭共生残した。なお臓器抽出液の毒性ということも考え得るので對照として Exotoxin 注射を行わない

第 10 表 静脈注射後流血中に存在する Exotoxin の時間的観察

Exotoxin 注射後採血 迄の時間	家兎番號	体 重 (g)	採血血液注射後の経過日數											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10日		
15分	21	1500	■											
	22	1500	■											
30 "	23	1500	■	■										
	24	1500	■	■										
1 時間	25	1850	■	■	■									
	26	1500	■	■										
2 "	27	1800	■	■	■									
	28	1500	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3 "	29	1400	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	30	1500	■	■	■									
4 "	31	1500	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	32	1500	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5 "	33	1600	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	34	1800	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6 "	35	1900	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	36	2000	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7 "	37	1750	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	38	1900	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8 "	39	1600	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	40	2000	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ 生存期間



健常家兎の肝、及び腦の同じような抽出液を家兎に靜脈注射して見たが何等症狀を示さなかつた。これらの成績から判斷すると靜脈注射された Exotoxin は比較的速かに流血中から消失し量的關係は明らかでないが腦、脊髄、肝、脾等の臟器組織に相當移行しているものと思われる。

### 總括並びに考按

志賀赤痢菌 (鹿兒島 1 號株) S 型菌をその菌の精製 Boivin-fraction 免疫家兎血清加ブイオンに經代培養し O 抗原を全く含有しない強い Exotoxin 産生株を作り得た。これは培養の際に培地中の血清に含有される O 抗体によつて S 型菌が凝集し發育を阻止され菌株の中に僅かに混入していた O 抗原を有しない菌のみが發育して來て代を重ねるにしたがつてますます選擇されて來たものかあるいは眞の意味の變異であるか不明であるが得られた菌株は數代普通ブイオンに移植しても原株の菌即ち O 抗原を有する菌が現れて來ることほなかつた。Dubos 等<sup>4)</sup>は彼等の得た R 型變異菌を毒素産生用の培地に移植する場合 S 型菌の混入を防ぐために移植の際に菌体を滅菌蒸溜水に浮べ自然沈澱を 3 回繰返して沈澱した菌を用いているが吾々の場合はその操作の必要はなかつた。

吾々の得た R 菌株の Exotoxin も原株から精製したものと毒性及び免疫及び免疫原性に於て全く變りなく原株から出發したものでは常に少量含まれている O 抗原が全く含有されていないと云ふ點で Exotoxin そのものの實驗に用うるには有利であると思う。

三鹽化醋酸で原株から Boivin-fraction を抽出する操作と全く同様の操作でこの R 菌株を處理すると毒性、免疫原性及び反應原性も全く有さない物質が得られるがこのものの化學的性狀については次の報告にゆする。

吾々の得た R 菌株から精製した Exotoxin を用いて靜脈注射後におけるその毒素の分布の概略を観察する實驗を行つたが流血中からは比較的早く即ち注射後 2~3 時間で殆んど消失し、肝、脾、腦、脊髄などの諸臟器に移行し、ある期間破壊されずに固定されているものと思われる成績を得た。Exotoxin が臟器組織に移行してからその毒作用によつて變化がおこる迄の經過はまだ不明であるがこの毒素の Neurotoxin としての特有の症狀である麻痺症狀のおこるのが注射後比較的小さいのが常であることや、吾々がさきに行つた毒素注射後麻痺症狀を起してしまつた家兎に抗毒素血清を大量注射して死を免れしめかつ麻痺症狀も完全に治癒せしめ得た實驗<sup>5)</sup>及びこの毒性注射動物の病理組織學的所見<sup>5)</sup>などを考えあわせるとき未だ興味ある問題が多く残されているように思う。

### 結 び

志賀赤痢菌の S 型の一菌株から O 抗原を全く含有しない強い Exotoxin 産出株を作り得たのでその菌株と原株との間の毒素産出の比較及び免疫學的な比較を行つた。

この R 菌株から精製した Exotoxin を用いてこの毒素の動物体内における運命を観察した。

本實驗について種々御教示を頂いた根井教授及び傳染病研究所細谷教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 林 喬義 1950 志賀赤痢菌毒素に關する研究 (第1報). 昭和醫學會雜誌, 10, 57.
- 2) 林 喬義 1950 志賀赤痢菌毒素に關する研究 (續報). 日本細菌學雜誌, 5, 86. (第23回日本細菌學會總會記錄).
- 3) 林 喬義 1950 志賀赤痢菌毒素に關する研究 (續報). 日本細菌學會關東支部總會演說抄録.
- 4) Dubos, R. J. & Geiger, J. W. 1946. Preparation and properties of Shiga toxin and toxoid. J. Exp. Med. 84, 143.
- 5) 林喬義・中川勇 1953 志賀赤痢菌毒素に關する研究. 日本細菌學雜誌 8, 568. (第26回日本細菌學會總會記錄).

#### Résumé

From Kagoshima No. 1 S strain of *Shigella shiga* its R variant was obtained by means of successive culture in the broth containing anti-Boivin-fraction serum.

The neurotoxin extracted from the R variant showed the same toxicogenicity and immunogenicity as that from original S strain, but it did not contain O-antigen.

The substance extracted with trichloroacetic acid solution from the R variant cells had neither toxicogenicity nor immunogenicity, and did not show any precipitation reaction against the serum immunized even with the R variant cells themselves.

Shiga neurotoxin from the R variant, intravenously injected in a rabbit, was traced. The quantity of the toxin in circulating blood was found to decrease to 1/200 in 2—3 hours, considerable amount of the toxin being fixed in the tissues of various organs, especially of liver, spleen, brain and spinal cord.