



Title	馬流産菌の死菌免疫に関する研究 : II. マウスに対する死菌免疫に就て
Author(s)	平戸, 勝七; HIRATO, KATSUSHICHI; 佐藤, 儀平 他
Citation	獣醫學研究, 1(1), 29-39
Issue Date	1953-01
DOI	https://doi.org/10.14943/jjvr.1.1.29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11343
Type	departmental bulletin paper
File Information	KJ00000104914.pdf



馬流産菌の死菌免疫に関する研究

II. マウスに對する死菌免疫に就て

平戸勝七・佐藤儀平・小野悌二・清水龜平次

(北海道大學獸醫學部家畜衛生學教室：主任 平戸教授)

STUDIES ON EQUINE PARATYPHOID VACCINE.

II. ON THE MICE PROTECTION TEST.

KATSUSHICHI HIRATO, GIHEI SATO, TEIJI ONO
and KIHHEI SHIMIZU

From the Laboratory of Veterinary Hygiene and Microbiology,
Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,
Sapporo. Chief: Prof. K. HIRATO

I. 緒 言

從來 *Salmonella* 屬細菌に於ける死菌及び生菌免疫の兩者は本質的に機轉が異なり、死菌は一次及び續發性敗血症防止効果はあるがチフス性疾患の發症を阻止し得ぬに反して生菌免疫は兩者に作用するとする小林教授一門¹⁾の廣汎な實驗研究及び理論が存在する。之に對して死菌及び生菌免疫の差異は質的なものでなく、量的なものであるとする見解と實驗も有力に展開されている(安東²⁾、細谷³⁾、鳥羽⁴⁾)。

馬流産菌死菌のマウス免疫に關する研究としては越智⁶⁾及び添川⁷⁾等の報告があるが、之等は何れも生菌免疫と對比して述べられている。越智によれば本菌の死菌免疫は續發性敗血症死に對しては相當効果はあるが、チフス性疾患を防止することは少ないと言ひ、添川の報告は更に否定的である。之に對し鳥羽⁴⁾は生菌免疫には及ばないが死菌を以てしてもチフス性疾患を防禦すると述べている。以上の相違は生物學的試驗本來の變動性によることも考え得るが、又免疫方法、攻撃感染法、効果判定法等の如何により結論の左右される

ことを重視する必要がある。即ち越智は皮下免疫マウスに腹腔又は經口感染せしめ、添川は靜脈内免疫マウスに靜脈内又は經口感染せしめ、前者はマウスの生死、流血及び体内の菌の消長の面から又後者はマウスの生死、流血中の菌の消長、体内の菌保有度、病理組織學的所見等から効果を判定した。

著者の1人平戸⁸⁾は馬に就いて本菌の生菌免疫を實施し強固な感染防禦力の成立することを立證したが、實際上馬に對する生菌免疫の困難性からその後は死菌ワクチンの研究に着手した。その第一段階として馬流産菌死菌免疫の實體を多角的に検討して効果の本質を考究し且つ二、三の製法によるワクチンに就いて優劣の比較を試みた。茲にその概要を綴り大方の御批判を乞わんとするものである(本研究の一部は昭和25年第29回日本獸醫學會に於て報告した)。

II. 實驗方法

普通に用いた免疫用死菌はpH 7.0の燐酸緩衝食鹽水浮游菌液を60°C 30分加熱殺菌したものである。他種ワクチンに就いてはその都度述べる

こととする。

免疫接種法は各経路共死菌の所要量を緩衝食鹽水の 0.25~0.5 c.c. に含ましめて注射した。供試マウスは感染時過大にならぬよう 10~12g のものを用いた。免疫終了後感染までの期間は 10 日前後である。

感染法及び殺又は斃死マウスの観察法は第 I 報告と同様に行つた。實驗例の大部分に就いて推計學的に検討したが、危険率 5% 以下を以て差を有意とした。危険率はその都度示す。なお生残率や菌陽性個体数等の比較は無相關檢定法⁹⁾によつたものが多い。

免疫効果の判定法に就いては、本菌のマウスに對する致死力が比較的弱く、廣く体内に侵入増殖を營むが、二次敗血症死の数は多くないことから、免疫効果を生死のみで判定することは完全でないので生残率の外に流血の培養による敗血症防止程度、臟器淋巴節体液 (肝, 脾, 肺, 腎, 心血, 頸淋, 腸間膜淋, 鼠蹊淋, 腋窩淋, 生殖器, 腹腔液) 等 11 部位の培養による体内の菌増殖阻止の程度を観察し、又一部のものに就いては病理組織學的に検討した。

III. 免疫回数と免疫効果

死菌免疫に際して免疫注射回数が効果を左右するとなす報告が屢々見られる。TOPLEY¹⁰⁾ は鼠チフス菌を用い 4~6 回免疫注射したマウス群に最も強い免疫効果を認めるが、それ以上回数を

増すに従い、却つて減少すると述べ、又井手¹¹⁾ は注射菌量よりも注射回数を増す方が効果を増大すると言ひ伊川¹²⁾ は 3 回以上の注射によつて二次敗血症死阻止力がやや現われ、死期延長は注射回数が多い程有効としている。之等の研究は何れも免疫回数増加と共に死菌量は増加する故、免疫効果の増強が多數回の接種刺戟によるものか或は免疫菌量の増加によるものが明かでない。

本實驗では同一菌量に就いて分割注射回数を異にした場合と、回数及び菌量も異なる場合とについて生残率並びに菌の滯留度を求めた (第 1 表参照)。死菌 0.3 mg を 1, 2, 4 回に分割 7 日間隔で免疫したマウスに 0.1 mg 後感染した場合の生残率は各回数間には差異なく何れも對照に比べ有意の差を示した (危険率 1% 以下)。又 0.3 mg 2 回分割と 0.6 mg 5 回分割との間にも同様生残率の差を認め得ない。一方生残マウス体内菌分布の點からも兩者の間に明かな差異はない。要するに 0.3~0.6 mg の如きマウスに對して相當過量と思われる菌量を注射すれば充分な敗血症防禦力を生じ、従つて分割回数に拘わらず生残率、体内菌分布等の比較では差を生じないものと考えられる。更に死菌量を増して 2 mg 程度の過大量を分割注射したマウスでは菌量及び注射回数共に少ない場合に比べ免疫効果は著しく敗血症防禦並びに体内増殖阻止が殆ど完全となることが後述第 IV 章の實驗で明かにされた。

以上の成績から死菌の免疫効果は注射回数よ

Table 1. Number of Repeated Injections of Heat-killed Vaccine in relation to the Proportion of Survivors.

No. of Repeated Injections (i. p.)	Immunizing Dose (mg)	Per cent surviving on 30th Day No. of Survival / No. tested		Bacterial Distribution in Survivors 65 days after Injection			
				No. of Mice harboring Abortion Bacilli / No. tested		No. of Mice harboring Abortion Bacilli / No. tested	
1	0.3	100.0	11/11				
2	0.15, 0.15	100.0	10/10				
4	0.05, 0.05, 0.1, 0.1	100.0	12/12				
Control	Infection(0.1mg)	8.3	1/12				
2	0.1, 0.2	92.7	12/13	8/10 (80%)		5/10 (50%)	
5	0.05, 0.1, 0.15, 0.15, 0.15	86.7	13/15	9/12 (75%)		5/12 (41.7%)	
Control	Infection(0.2mg)	13.3	2/15				

りも免疫菌量の多寡と平行するものの如く解される。

IV. 免疫菌量と免疫効果

上述の如く, 0.3~0.6 mg 程度の死菌を 1~5 回に分割注射しても敗血症防禦力及び体内菌分布の點では大差がない。0.005~0.5 mg の範圍の死菌量を 1 回注射した免疫マウスはその生残率が不規則ではあるが, ある程度免疫菌量と平行する傾向を示し, しかも各死菌量段階とも對照に比べれば劇然たる差を示している。更に免疫菌量の範圍を擴げ 0.00002~2 mg としても同様の成績を得た(第 2 表参照)。

免疫菌量を異にする感染マウスに就いて流血中の菌の消長を見るに 第 3 表 に示す如く免疫菌量 2 mg のマウスは 0.1 mg の如き大量菌の感染に對しても殆ど完全に敗血症を防止するが免疫菌量の低下とほぼ平行して敗血症防止力も又低下する。

Table 2. The Proportion of Survivors in relation to Immunizing Dose.

Immunizing Dose (mg)	Per Cent surviving on 30th Day No. of survival/No. tested
0.005	66.7 (6/9)
0.01	71.4 (5/7)
0.05	44.4 (4/9)
0.1	70.0 (7/10)
0.2	80.0 (8/10)
0.5	100.0 (5/5)
Control Infection (0.1 mg)	0 (0/12)
0.00002	50.0 (3/6)
0.0002	33.3 (2/6)
0.002	0 (0/6)
0.02	66.7 (4/6)
0.2	80.0 (4/5)
2 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.5)	100.0 (5/5)
Control Infection (0.1 mg)	0 (0/6)

Table 3. Invasion of Bacilli into Blood Stream of Mice immunized with various Doses of Vaccine.

Immunizing Dose (mg)	No. of Mice	Time, in Days																Spread of Bacilli after 30 days	
		1/8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	a mesenterial lymph node a testicle — — —
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	
	5	0	0	0	0	0	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	
2×10 ⁻²	1	+ D																— —	
	2	(+) + + D																	
	3	++ ++ + + ++ D																	
	4	+	(+)	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0		S
	5	+	0	0	0	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		S
2×10 ⁻⁵	1	∞ D																	
	2	## D																	
	3	+ ## ## ## ## D																	
	4	## ## + 0 + + D																	
	5	## ## (+) 0 ## (+) 0 + D																	
Control	1	## D																spleen and lymph nodes a testicle and a lymph node	
	2	## ## ∞ D																	
	3	## + ## ## ## D																	
	4	##	##	##	+	+	##	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0		S
	5	+	+	+	+	+	(+)	##	+	0	(+)	0	+	+	+	+	+		S

Infection was made by intraperitoneal injection of 0.1 mg.

S = survived. D = died. 0 = none, + = 1~30 colonies, ++ = 31~100 colonies, ## = over 100 colonies, ∞ = numerous.

(+) = positive in enriching culture.

本實驗例に於ける生殘マウスの体内菌分布に就てみると、死菌 2 mg 免疫マウスは一部体内から菌を検出したものもあるが、對照に比べ軽度でよく菌の増殖を阻止している。以上の成績よりすれば多量の死菌を接種したマウスは大量菌感染に對して敗血症並びに菌の体内増殖に抵抗換言すればチフス性疾患の發症を防ぐ抗感染性を獲得したと言ひ得る。

V. 免疫部位、感染部位及び感染菌量の死菌免疫に及ぼす影響

從來馬流産菌死菌の免疫効果に就て國內研究者の間に懸隔の存する點に就ては、作業假説や菌株の相違から離れて免疫部位、感染部位、感染菌量等の要因を仔細に吟味する必要がある。

我々は本菌加熱死菌を腹腔、靜脈及び皮下の經路で免疫し、各免疫群に對して夫々腹腔、皮下及び經口接種によつて大量菌及び少量菌 2 列の感染を行い、生殘率及び菌の体内滯留度等を觀點として免疫効果の變動を觀察した。

死菌 0.3 mg を以上各經路で免疫注射し、腹腔内に 0.3 mg の大量生菌を感染せしめると生殘率は各免疫群とも對照に比べ明かな差を示す（腹腔及び靜脈内免疫群は危險率 1% 以下、皮下免疫群は 5% に近い）。各免疫群の間では腹腔免疫群が特によく生殘し皮下免疫群が最も劣る（危險率 1% 以下）（第 4 表參照）。但し斃死マウスの生存日數では

靜脈群が最長を示した（危險率 5% 弱）。

次に死菌 0.2 mg を用いて各經路で免疫し 2 mg の大量生地を皮下感染すると各群とも對照に比べ明かな差を示さない。又死菌 0.2 mg を用いた各免疫群に對し 1 mg 經口感染せしめた場合斃死するもの殆どなく生殘率の比較は行ひ得なかつた。

次に以上各免疫群に對し感染菌量を少なくして体内菌分布を比較した（第 5 表參照）。

腹腔内に 10^{-3} mg 感染せしめた場合感染後 50 日に於ける菌保有マウスの率は對照に比べ皮下免疫群のみ有意の差が認められた（危險率 5% 以下）。又皮下に 10^{-3} mg 感染せしめた場合には各免疫群とも對照に比べ差がない。又 1 mg 經口感染に對しては各免疫群とも對照と異ならず、 10^{-2} mg 感染に對して各免疫群中皮下免疫群の菌保有マウスの數が少なく（危險率 5% 以下）腹腔及び靜脈免疫群は却つて對照マウスより多い成績であつた。

之を要するに腹腔内感染に對し生殘率は腹腔免疫群が他群に勝り、菌の体内増殖阻止力は皮下免疫群が最も勝れている。又感染經路を皮下又は經口とすれば各免疫群とも殆ど免疫効果を示さない。越智の皮下免疫マウスが腹腔内及び經口感染に對して敗血症防止力はすぐれているが、經口感染では体内増殖を阻止し得ないとする成績、添川の靜脈内免疫マウスは緩和な經口感染に對してすら効果なしとする成績、又鳥羽の皮下免疫マウスに腹腔内感染して菌の増殖阻止を認めた成績等何

Table 4. The Proportion of Survivors and Survival Times in various Groups of Mice subjected to various Routes of Immunization and Infection.

Route and Dose of Infection	Immunizing Dose (mg)	Proportion of Survivors and Survival Times			Control
		Route of Immunization			
		i. p.	i. v.	s. c.	
i. p. 0.3 mg.	0.3	18/20 (90%) 6.5 Days	13/19 (68.4%) 9.8 Days	6/19 (31.6%) 5.5 Days	1/19 (5.3%) 4.6 Days
s. c. 2 mg.	0.2	4/7 (57.1%) 11.6 Days	4/10 (40.0%) 11.5 Days	4/8 (50.0%) 16.5 Days	4/8 (50%) 9.7 Days
Per Os 1 mg.	0.2	1/8 (12.5%)	0/10	0/8	0/8

i. p. = intraperitoneal
i. v. = intravenous
s. c. = subcutaneous

Table. 5. Spread of the Bacilli in Mice subjected to various Routes of Immunization and Infection.

Route and Dose of Infection	i. p., 10 ⁻³ mg			s. c., 10 ⁻⁶ mg			per os, 1 mg			per os, 10 ⁻³ mg		
Immunizing Dose (mg)	0.3			0.2			0.2			0.2		
Route of Immunization	50 Days after Infection			28 Days after Infection			10~14 Days after Infection			10~14 Days after Infection		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
i. p.	6/9 (66.7%)	3/9 (33.3%)	0/9	4/8 (50.0%)	3/8 (37.5%)	1/8 (12.5%)	6/7 (85.7%)	6/7 (85.7%)	1/7 (14.3%)	5/8 (62.5%)	5/8 (62.5%)	2/8 (25.0%)
i. v.	5/5 (100%)	2/5 (40.0%)	0/5	7/10 (70.0%)	7/10 (70.0%)	3/10 (30.0%)	8/9 (88.9%)	8/9 (88.9%)	4/9 (44.4%)	6/9 (66.7%)	5/9 (55.6%)	3/9 (33.3%)
s. c.,	2/7 (28.6%)	2/7 (28.6%)	0/7	5/9 (55.6%)	4/9 (44.4%)	1/9 (11.1%)	7/8 (87.5%)	7/8 (87.5%)	2/8 (25.0%)	2/9 (22.2%)	2/9 (22.2%)	0/9
Control	8/9 (88.9%)	5/9 (55.6%)	1/9 (11.1%)	4/6 (66.7%)	4/6 (66.7%)	0/6	7/8 (87.5%)	7/8 (87.5%)	2/8 (25.0%)	2/8 (25.0%)	2/8 (25.0%)	0/8

a = No. of mice harboring the bacilli/No. tested.

b = No. of mice harboring the bacilli in their spleen and liver/No. tested.

c = No. of septicaemic mice /No. tested.

れも免疫及び感染経路の組合せに由来し、従つて結論も異なるものと思われるのであつて、我々の上述実験の結果からすれば上記研究者等の成績は何れも妥當なものと思われる。

VI. ワクチン用菌株及感染菌株と免疫効果の関係

1. 各菌株死菌の免疫効果

本実験に使用した加熱死菌はすべて新鮮分離菌株から作製した。之等菌株間に免疫原性の差が

あるか否かを生残率によつて比較すると第6表に示す如く、0.05 mgの死菌接種により0.1 mgの腹腔内感染を高率に耐過生残するが、各菌株間には多少の變動が見られる。榮樂株死菌は作製後9カ月以上保存したものであるが、免疫力の低下なく、加熱死菌の効力の安定性を示している。

我々は第I報告に於て新鮮株と保存株の毒力比較を行つた結果、菌株による差異は存するが新舊の別による特定の差は認め得ないことを述べた。ここに致死量の多少異なる新舊菌株から作つた加

Table 6. The Proportion of Survivors in Mice Groups immunized with Heat-killed Vaccine prepared from different Fresh Strains of *S. abortus-equi* (30 Days after Infection)

Name of Fresh Strain used for Vaccine Preparation	Suzuki	Sato	Ito	Eiraku *	Control
Immunizing Dose	0.05 mg	"	"	"	
Infecting Dose (Strain Fuji)	0.1 mg	"	"	"	"
Proportion of Survivors.	7/9 (77.8%)	7/10 (70%)	7/10 (70%)	9/10 (90%)	2/10 (20%)

* Vaccine prepared from Strain Eiraku was stored in ice-box for 9 months.

Table 7. Comparison of Antigenicity of Heat-killed Vaccines prepared from different Fresh and Stock Strains of Abortion Bacilli.

Name of Strains used for Vaccine Preparation	Fresh Strain Hanshun	Stock Strain 19 Ayame	Control	Fresh Strain Asahi	Stock Strain Asatoyo	Control
-log (LD ₅₀) of each Strain	2.57	1.6		2.87	2.75	
Immunizing Dose	0.3mg	"		0.2mg	"	
Infecting Dose and Strain	0.3mg Shōshum	"	"	0.1mg Segawa	"	"
No. of Survivors / No. tested	17/20 (85%)	17/20 (85%)	0/20	8/9 (88.9%)	8/10 (80%)	0/10

熱死菌に就て免疫力を比較するに兩者の生残率には殆ど差がない。即ち各菌株の毒力に多少の差はあつても夫等の免疫原性には差異を證し得ない(第7表参照)。

2. 感染菌株と生残率

免疫効果の判定が感染菌株毒力の強弱により異なる結果を生ずるか否かに就て検討するため範春株加熱死菌を以て腹腔内免疫し、該當株及び他の2株生菌で感染すると第8表に示すように生残率の明かな差は認められない。

之を要するに加熱死菌の敗血症死防止力はワクチン用菌株又は攻撃用菌株によつて影響されることはないと言えよう。

Table 8. Proportion of Survivors in Immunized Mice against different Doses and Strains of Infection.

Immunizing Dose and Strain for Vaccine preparation	Infecting Dose and Strains		
	Shōshum 0.3 mg	Rōrin 0.2 mg	Hanshun 0.1 mg
Hanshun 0.3 mg	17/20 (85%)	11/12 (91.7%)	10/10 (100%)
Control	0/20	2/15 (13.3%)	0/12

VII. 免疫期間と免疫効果

死菌免疫後の経過期間と免疫効果の出現乃至消失との關係に就て検討したものは少ない。免疫終了から感染までの日數は普通數日から10日前後長きは20日以上に及んでいる。我々は免疫力が

有効に達するまでの期間を知るため次のような實驗を行つた。死菌 0.1 mg を以て腹腔内免疫したマウスに對し 1, 3, 6, 10, 14日目に生菌 0.05 mg を腹腔内注射すると、生残率は 1, 3日目にはなお低く 6日目では多少上昇するが、對照に比べまだ有意の差を生じない。

10日以上になると明確な差異が認められる(危険率 5%以下)(第9表参照)。

Table 9. Proportion of Survivors in Mice according to Days elapsed from Immunization.

Time after Immunization (Days)					Control
1	3	6	10	14	
2/5 (40%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	1/5 (20%)

Mice were immunized intraperitoneally with a dose 0.1 mg of heat-killed vaccine, and infected intraperitoneally with a dose of 0.1 mg.

従つて大量菌感染に對する敗血症死防止力は免疫後10日前後より成立し數日前後ではなお不安定であり、おそらく試験毎に不定な結果を示すことと思われる。本實驗に於て免疫後1~3日の早期のものにも對照に比べて多少高い生残率がみられるが、この點は注目する必要がある。OERSKOV u. KAUFFMANN,¹³⁾ PHILIPSON,¹⁴⁾ OERSKOV¹⁵⁾等一連の研究によるいわゆる Promunität は眞性の特異免疫より速かに出現消失し、腹腔内前處置腹腔内感染で最も強く現われ、その本態は腹腔内の細胞反應による非特異的な局所免疫であるとされ

ている。

本実験に於て免疫後1~6日の早期に見られる軽度の敗血症死阻止力が上述諸家の言う Promunität であるか否かは今後更に検討を加え度いと思う。

我々の行つた実験はすべて免疫後大体10日に感染を行つていたので、たとえ Promunität が初期に発生したとしても攻撃時には消失し、従つて非特異的な免疫力の干渉を避け得るものと考えられる。

VIII. 各種處理死菌の免疫効果

第IV章に於て極めて大量の死菌を接種するならば菌の体内増殖をも阻止し得る成績が得られたが、一般に本菌の場合免疫菌量と免疫効果とは平行する傾向がみられる。斯かる観点から大量死菌を注射するためにワクチンの毒性低下を考究する必要がある。我々は既に試みられた2,3の腸チフスその他ワクチンの製法に準じて馬流産菌死菌を作製し、夫等の毒性並びに免疫原性の比較を試みた。先ず安東氏クロムワクチン¹⁶⁾に就ては原法に準じて本菌24時間培養を1000倍マージンで殺菌し、等量に0.4%クロム明礬液を混和し、室温に48時間放置後遠心沈澱して沈澱を生理食鹽水で洗い、然る後所要濃度に稀釋して使用した。又ホルマリン死菌は本菌の磷酸緩衝液浮游液に對し1%の割にホルマリンを加え、又マージン死菌は $1/1000$ にマージンを加え37°Cに一夜納置後使用した。對照として60°C30分加熱死菌も用いた。

Table 10. Toxicity for Mice.

Vaccines	Amounts of Vaccine injected (mg)			
	0.5	5	10	20
Chrome Vaccine	3/3	3/3	3/3	3/3
Formalin Vaccine	2/3	3/3	0/3	0/3
Merzonin Vaccine	3/3	2/3	0/3	0/3
Heat-killed Vaccine	2/3	0/3	0/3	0/3

以上各種處理によるワクチンに就てマウスに對する毒性を観察した結果、第10表の如き成績

を示した。

即ちクロムワクチンは最もすぐれた毒性の低下を示し、20mg接種に對しても皆生殘するが、他の三者は5mg以上の接種に耐え得ず、殊に加熱死菌がやや劣る成績を示した。ワクチンの作製にはクロム明礬の外に一、二の鞣劑に就て添加量を變えて減毒効果を比較した結果、クロム明礬と葡萄糖還元クロム液とはほぼ同様の減毒効果があり、添加法としては安東の菌液及びクロム明礬等量混合法がすぐれ50mg接種に對してもマウスは耐過した(第11表参照)。

Table 11. Reduction of Toxicity of Vaccines by Treatment with Various Tanning Materials.

Tanning Materials	Per cent of Tanning Materials added to Bacterial suspension	Amounts of Vaccine Injected (mg)			
		5	10	20	50
Sugar Liquor*	1.0%	3/3	3/3	3/3	0/3
	0.5"	3/3	3/3	3/3	1/3
	0.2"	3/3	3/3	1/3	1/3
	0.1"	3/3	3/3	3/3	0/3
Alum-chromate Solution	1.0"	3/3	3/3	3/3	0/3
	0.5"	3/3	2/3	3/3	1/3
	0.2"	3/3	3/3	2/3	1/3
	0.1"	3/3	3/3	3/3	1/3
Tan Liquor	1.0"	(2mg) 3/3	1/3		0/3
	0.5"	3/3	2/3		0/3
	0.1"	3/3	0/3		0/3
Ando's Original Method		3/3	3/3	3/3	3/3

* Sugar Liquor: Chrome Liquor reduced with glucose.

以上各種ワクチンに就き死菌量 $5 \times 10^{-1} \sim 5 \times 10^{-4}$ mgを接種した免疫マウスの生菌0.2mg感染に對する生殘率はクロムワクチンが最も高く50%終末點の免疫菌量は他の三者よりも少ない(第12表参照)。

次に各種ワクチンの免疫マウスに於ける菌の体内増殖阻止の程度をみるため 10^{-6} mg感染マウスの3週目の体内菌分布の程度を比較した(第13表参照)。

免疫マウスに於ける菌保有マウスの率は各種ワクチン共對照に比べ低い。又有意差(危険率5%以下)を示す最少免疫量を各種ワクチン毎に求めるとクロム及びホルマリン死菌は 5×10^{-3} mgマ

Table 12. Antigenicity of Various Vaccines in Mice.

Vaccine	Immunizing Dose (mg)				-log (50% Endpoint)
	5×10^{-1}	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	
Chrome Vaccine	5/5	3/5	2/5	0/5	1.8
Formalin Vaccine	4/5	2/5	0/5	0/5	1.0
Merzonine Vaccine	3/5	2/5	2/5	0/5	1.1
Heat-killed Vaccine	2/5	2/5	2/5	0/5	0.9
Control Infection (0.2 mg i. p.)	0/5				

Table 13. Spread of Bacilli in Mice immunized with various vaccines.
(21 Days after Infection)

Immunizing Dose (mg)	Chrome Vaccine			Formalin Vaccine			Merzonin Vaccine			Heat-killed Vaccine		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
5×10^{-1}	3/11	0/11	1/11	1/10	0/10	1/10	5/9	0/9	4/9	5/11	2/11	5/11
5×10^{-2}	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	2/5	1/5	0/5	1/5	2/5	2/5	2/5
5×10^{-3}	2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	4/5	2/5	0/5	2/5
5×10^{-4}	4/5	3/5	4/5	3/5	3/5	3/5	4/5	1/5	4/5	1/5	1/5	1/5
5×10^{-5}	4/5	3/5	4/5	5/5	2/5	4/5	1/5	0/5	1/5	5/5	3/5	5/5
Control Infection (10^{-6} mg i. p.)	10/10	10/10	10/10									

a = No. of mice harboring bacilli/No. tested.

b = No. of septicaemic mice/No. tested.

c = No. of mice harboring bacilli in their spleen and liver/No. tested.

Table 14. Scale of Increase of Bacilli in a definite Volume of Spleen
of Mice immunized with 0.5 mg of various Vaccines.

(21 Days after Infection)

No. of Mice	Scale of Increase				Control Infection 10^{-6} mg i. p.
	Chrome Vaccine	Formaline Vaccine	Merzonine Vaccine	Heat-killed Vaccine	
1	2	1	2	3	4
2	0	0	2	2	4
3	0	0	2	2	4
4	0	0	1	1	2
5	0	0	0	1	2
6	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	2
8	0	0	0	0	2
9	0	0	0	0	2
10	0	0		0	1
11	0			0	
Average	0.1818	0.1000	0.7777	0.8181	2.5000

No. of bacilli were scored as follows;

0 = none, 1 = 1-30 colonies, 2 = 31-100 colonies, 3 = over 100 colonies, 4 = numerous.

ゾン死菌は不規則ではあるが、 5×10^{-5} mg, 加熱死菌は 5×10^{-4} mg である。

次に 0.5 mg 免疫マウスに 10^{-6} mg 感染せしめ 21 日後各個体に就いて脾臓の一定量を培養し、WERNER & KNIGHT¹⁷⁾ の記載の如く、その集落数から菌の増殖程度を數字で表わし、各ワクチン毎に比較した (第 14 表)。

各ワクチン群マウスの脾臓に於ける菌数の平均値は対照より明かに少なく (危険率 5% 以下) よう菌の増殖を抑制する成績を示した。各種ワクチン間では加熱及びマーズン死菌がやや劣るが有意の差ではない。

以上 第 13, 14 表の成績から各ワクチンとも 10^{-6} mg の如き微量菌感染に対しては相當度の体内増殖阻止力を示すことが知られる。鳥羽は加熱死菌又は菌体含糖物質 0.12 mg を皮下に分割注射し 10^{-4} mg を感染せしめて若干のものがチフス性疾患を阻止したと述べ、我々は第 V 章に於て各経路免疫菌量 0.2 mg, 腹腔内感染菌量 10^{-3} mg で實驗した場合皮下免疫群のみに明かな体内増殖阻止力を認めたと述べたが、本實驗では更に少ない菌量で腹腔内免疫をしても感染菌量が 10^{-6} mg の如く微量であれば明かに菌の体内増殖を阻止することを認めた。

以上の實驗からクロムワクチンの毒性低下は著しいが、その免疫原性に於て菌の体内増殖阻止力の點からみれば、特に他種のものよりすぐれたものとは言い難い。

IX. 總括及び考按

馬流産菌死菌免疫の効果を明かにするためマウスを用いて種々な角度から之を檢討した。即ち免疫注射と攻撃接種の経路及び菌量を種々に組合せ又ワクチン用菌株攻撃用菌株の差による免疫効果の異同を分析的に觀察し、又 4 種ワクチンの毒性及び免疫原性を比較検討した。本實驗に於ける成績を總括すれば次の如くなる。

1. 馬流産菌加熱死菌 0.3~0.6mg を 1~數回に分割し腹腔内接種すれば 0.1mg の如き致死量の感染に對し高率に生殘し免疫注射回數の多寡に影響されない (第 1 表)。

2. 生殘率はある程度免疫量と平行し、免疫菌量を 2 mg 程度に増せば大量菌の感染に對してもチフス性疾患の發症を阻止する (第 2 表)。

3. 免疫経路を腹腔、皮下、靜脈に分け、感染経路を腹腔、皮下、経口に分けて組合せると、腹腔感染に對し生殘率は腹腔免疫群がすぐれ、又菌の体内増殖阻止力は皮下免疫群のみに明かに認められた。感染経路を皮下又は経口とすれば各免疫群とも殆ど免疫効果を示さない (第 3, 4 表)。

4. 加熱死菌の敗血症死防止力はワクチン用菌株の差、又は攻撃用菌株によつて影響されない (第 5~8 表)。

5. 腹腔内に免疫接種し腹腔内に感染せしめた場合、免疫注射後早期にある程度生殘率の上昇がみられ、Promunität に類する現象が觀察された。免疫後 10 日に至れば完全な免疫を生ずる (第 9 表)。

6. 安東氏法に準じて作製したクロム明礬處理死菌 (クロムワクチン) の毒性低下は著しい。クロム、ホルマリン、マーズン及び加熱ワクチン 4 種に就いて免疫原性を比較するに生殘率ではクロムワクチンやや三者に勝るが体内の菌増殖阻止力は何れも大同小異である (第 10~14 表)。

以上我々は馬流産菌死菌のマウスに對する免疫効果を檢討するため主として生殘率及び菌の体内増殖阻止を觀點として實驗を遂行した。結局免疫菌量を増大すれば大量菌の感染に對してもよく敗血症を阻止し、体内に於ける菌の増殖を充分抑壓し得る抗感染性を獲得することを知つた。なお免疫菌量が少量であつても感染菌量が微量であれば同様にチフス性疾患の發症をある程度防止する。之等の成績は龔に鳥羽が本菌の死菌又は含糖物質を以てマウスを免疫しても、ある程度チフス性疾患を防禦し得たとする報告と一致する。なお免疫及び感染経路の組合せ如何により死菌免疫の効果がかなり異なつた成績を生ずることは、ワクチンの効力檢定手技を論ずるに當つて多くの考慮を必要ならしめるものと思う。

我々の實驗成績に於ける如く免疫及び感染経路を共に腹腔内とする場合に認められた高度の免疫力が FELIX¹⁸⁾ の指摘するように OERSKOV u. KAUFFMANN, PHILIPSON 及び OERSKOV 等によ

つて立證された非特異的な局所抵抗性の増強に大きく影響されているか否かが問題となる。之等の點に就ては更に慎重な検討を必要とするであらう。

本菌のクロムワクチンは毒性低下が著しくその効果も他のワクチンに比べ劣らないことから、今後その實用化に向つて更に検討を加える必要があらう。

本研究は文部省科學研究費によつて行われた。記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) 小林：日本醫學及び健康保健，3266號，5(昭和17年)。
- 2) 牛場：日本醫學，3421號，97(昭和23年)。
- 3) 安東：血清學免疫學雜誌，5，1(昭和19年)。
- 4) 細谷：臨牀，2，355(昭和24年)。
- 5) 鳥羽：最近の獸醫學，東京大學獸醫學教室編(1951)。
- 6) 越智：細菌學雜誌，455號，36(昭和9年)。
- 7) 添川：日本獸醫學雜誌，6，19(昭和19年)。
- 8) 葛西，平戸：同上誌，2，1(昭和15年)。
- 9) 佐藤：少數例適用無相關檢定法，中文館(昭和24年)。
- 10) TOPLLEY, W. W. C.: *Brit. J. Exp. Path.*, **14**, 403 (1933)。
- 11) 井手：細菌學雜誌，431號，147(昭和11年)。
- 12) 伊川：同上誌，513號，740(昭和13年)。
- 13) OERSKOV, J. und F. KAUFFMANN: *Zeitschr. f. Hyg.*, **119**, 65(1936)。
- 14) PHILIPSON, J.: *Acta path. scand. Suppl.*, **32**, 1 (1937) [*Zbl. Bakt., I. Ref.*, **129**, 262(1938)]。
- 15) OERSKOV, J.: *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, **98**, 359 (1940)。
- 16) ANDO, K. & Y. NAKAMURA: *Jap. J. Exp. Med.*, **21**, 149(1951)。
- 17) WERNER, C. A. & V. KNIGHT: *J. Immunol.*, **65**, 509(1950)。
- 18) FELIX, A.: *J. Hyg., Camb.*, **49**, 268(1951)。

Résumé

In this paper, there are described the mouse-protection tests carried out with a heat-killed vaccine of *Salm. abortus-equi*; observations on the protective value of it from various points of view are likewise described.

Analytical observations were made in order to detect the factors influencing the immunizing potency such as the route of administration of the immunizing injections and of the challenge dose, the vaccine strains and test cultures. Also the toxicity and immunogenicity of 4 kinds of vaccines were compared.

Results are summarized as follows:

1. One or repeated intraperitoneal injections of a heat-killed bacilli with a dose of 0.3~0.6 mg induced in mice a high percentage of survivors to intraperitoneal challenge with a mice-killing dose of 0.1 mg. The degree of protection is not enhanced by repeated injections (Table 1).

2. The percentage of survivors runs parallel with immunizing dose to a certain degree. If the dose reaches 2 mg, the protective power becomes able to suppress the spread and multiplication of the bacilli in mice, even if the challenge dose is as large as 0.3 mg (Table 2).

3. The immunizing effect shown under the various combinations of the routes of administration of the immunizing and challenge doses were observed.

In case of injecting both the immunizing and the challenge doses by the intraperitoneal route, the proportion of survivors shows the highest rate, however, the suppression of the multiplication of bacilli in mice was marked in case of subcutaneous immunization and intraperitoneal injection (Tables 3, 4).

4. There is no marked difference in immunogenic properties with different vaccine strains even of a slightly different mouse virulence and also the protective value of a heat-killed vaccine is not affected by the difference of test cultures (Tables 5~8).

5. The intraperitoneal injection of vaccine seems to induce non-specific resistance against the challenge

injection by the intraperitoneal route. This resistance was proved after 1~6 days following immunizing injection (Table 9).

6. The killed bacilli treated with alum-chromate solution following ANDO's method (Chrome vaccine) showed markedly reduced toxicity. The immunogenic properties of chrome vaccine is the most favorable from the view point of the percentage of survivors, however, it does not show superior suppression of the spread of bacilli in mice as compared with the other vaccines such as formalin, merzonine or heat-killed baccilli (Tables 10~14).

The observations recorded in this paper traverse the points necessary to be understood regarding the mice protection test. The protecting effect of the killed abortion bacilli is mainly observed from the view point of the proportion of survivors and of the power to inhibit or suppress the spread of bacilli in mice. Consequently, the increase of the immunizing dose up to 2 mg would make it possible to avoid septicaemia and to inhibit the spread and multiplication of bacilli in mice almost completely. The same protective value is induced even of smaller immunizing dose if the challenge dose is of minute quantity.

According to the different combinations of the routes of immunizing and challenge injections, the results of the immunizing effects become somewhat different. In case of injecting both the immunizing and the challenge doses by the intraperitoneal route, the proportion of survivors become higher compared with the other combination, however, the intraperitoneal immunizing injection seems to induce non-specific intraperitoneal resistance as FELIX (1951) pointed out in describing the errors concerning potency test of typhoid vaccine. Additional experiments with more clear results are needed for the clarification of this point.