

## 1 E型ボツリヌス毒素の経口投与条件

北海道立衛生研究所

唐島田 隆	小野 悅二
亀山 邦男	山口 真
神沢 謙三	飯田 広夫

### 緒 言

動物にボツリヌス毒素を経口的に投与した場合、感受性を左右する条件はほかの route から接種した場合におけるよりもさらに複雑多岐にわたることが知られている。例えば MAY ら<sup>1)</sup>はマウスを20~22時間絶食させてA型毒素を経口投与し、直ちに飼料を与えるか、あるいは毒素を飼料とともに投与するとその毒作用はもっとも効果的であると報告している。また LAMANNA ら<sup>2)</sup>は同じくマウスを用いて毒素投与後に給する飼料の種類によっても毒力が増減することを明らかにしている。すなわち、市販の固形飼料、卵白、オリーブ油などは毒力を増強するが、脱脂粉乳は減弱することを観察している。したがってボツリヌス中毒の実験的研究においては厳密な一定の条件下において実験動物を用いて毒素の経口投与を行なわなければ毒力の変動がいちじるしく、得られる成績は再現性に乏しいものと考えられる。

著者らは数年来、E型ボツリヌス中毒の血清療法に関する実験的研究を行なっているが<sup>3,4)</sup>、これと並行して再三、毒素の経口投与条件について検討を加え、若干の知見を得た。

以下に主として、ウサギおよびサルで得た成績を報告する。

### 実験材料および方法

#### 1) E型ボツリヌス毒素

阪口らの方法<sup>3)</sup>にしたがって、ボツリヌスE型菌岩内株の菌体より抽出し、濃縮精製した Prototoxin を用いた。

#### 2) 実験動物

**マウス**：経口投与実験のためには、自家繁殖により10~20代兄妹繁殖を行なった N1H 系マウスを、また腹腔内注射には同上のマウスのほかに市販の Swiss 系マウスを用いた。体重は20±2 gである。

**モルモット**：自家繁殖の English 種 Hartley 系雑交配のもので、体重は400±50 gである。

**ウサギ**：自家繁殖の New Zealand White 種の近交系ウサギで、体重は3,000±500 gである。

**サル**：日本モンキーセンターより供給を受けたカニクイザル *Macaca irus* で、体重は2,000~3,800 gである。

#### 3) 毒素の経口投与および毒力の測定方法

マウスは3~5時間絶食させた後、ポリエチレン細管を装着した1 ml の注射器を用いて毒素液 0.2 ml を胃内に注入し、直ちに固型飼料を給餌した。

モルモット、ウサギおよびサルは、ポリエチレン細管あるいは小児科用ポリエチレン製胃カテーテルを装着した5 ml の注射器を用いて毒素液 5 ml を胃内に注入した。

毒素投与後の実験動物の観察期間は5日間であって、マウスは Reed らの方法<sup>5)</sup>、そのほかの動物は Brownlee らの Up-and-Down 法<sup>6)</sup>によって LD<sub>50</sub>を算出した。

### 成 績

#### 1) 経口投与毒素の毒力におよぼす絶食の影響

ウサギを平常通り給餌（当所では午前8時30分ごろにえんぱく3、ふすま3、ぬか3、大豆粕1からなる濃厚飼料を、午後2時半ごろ、夏季はクローバー、冬季は人参を与える。）したものと、1夜絶食（午後5時ごろに飼育箱内の飼料を一切取除く）させたものの2群に分けた。

このような2群のウサギに8および4経口投与 LD<sub>50</sub> (poLD<sub>50</sub>) のE型ボツリヌス毒素を経口投与し直ちにクローバーないしは人参を与え、毒素投与から斃死に至る死亡時間と毒素投与後4時間目に末梢血中に出現する毒素量をマウスの腹腔内注射によって測定した。

その成績は第1表に示す通りであって、8 poLD<sub>50</sub>の毒素を投与したウサギにおいては1夜絶食させた群のうち、死亡時間のもっとも短いものは360分、もっとも長いものは840分であり、平常通り給餌した群のうち、死亡時間のもっとも短いものは600分、もっとも長いものは1,380分であった。またこれら2群の死亡時間について平均値の差の検定を行なった結果、t<sub>0</sub>=3.4であって有意の差を認めた。

また末梢血中の毒素量も1夜絶食した群では最低16マウス ipLD<sub>50</sub>、最高2,048 LD<sub>50</sub>であるのに反し、平常通り給餌した群では最低4 LD<sub>50</sub>、最高64 LD<sub>50</sub>を示したにすぎなかった。

これについても平均値の差の検定の結果は t<sub>0</sub>=3.0 で有意の差を認めた。

同じことは4 poLD<sub>50</sub>の毒素を投与した場合にも認められ、1夜絶食したウサギでは平常通り給餌したウサギに比べ、死亡時間は短くかつ末梢血中に出現する毒素量も多い。

第1表 経口投与毒素の毒力におよぼす絶食の影響  
(ウサギ)

群	Lot	毒 素 投 与 量 (ウサギ poLD <sub>50</sub> )	死 亡 時 間 (分)	4時間後の末梢血中 の毒素量 (マウス ipLD <sub>50</sub> )
一 夜 絶 食	4	8	420	2,048
			360	1,024
			435	1,024
			490	722
			420	512
			600	64
			840	16
食	6	4	390	4,096
			450	4,096
			430	2,662
			450	1,024
			480	512
平常 通 り 給 餌	4	8	600	64
			1,260	32
			825	16
			1,380	4
6	6	4	480	256
			1,080	8
			2,880	2

8 ウサギ poLD<sub>50</sub> 時間 : t<sub>0</sub> = 3.4  
(毒素量 : t<sub>0</sub> = 3.0)

という成績を得た。すなわち 1 夜絶食させることによって毒素は効果的に作用することが明らかになった。

## 2) 経口投与毒素の毒力におよぼす飼料の種類の影響

前項の実験から 1 夜絶食による毒力の増強が明らかになつたので、次に毒素投与後に給する飼料の種類が毒力におよぼす影響を検討した。

ウサギを前述のようにして 1 夜絶食させ、4 ウサギ poLD<sub>50</sub> の毒素を経口投与し、直ちに 1 群のウサギには人参を、ほかの 1 群には濃厚飼料を与え、死亡時間および毒素投与後 4 時間目の末梢血中の毒素量を測定した。

この成績は第 2 表に示す通りであって、人参を与えたウサギの死亡時間は 390 ~ 480 分で、末梢血中の毒素量も 512 ~ 4,096 マウス ipLD<sub>50</sub> であるのに対し、濃厚飼料を与えたウサギの死亡時間は 1,200 ~ 2,760 分で、血中毒素量は 2 ~ 20.8 LD<sub>50</sub> であった。明らかに前者の群は死亡時間は短く、血中に出現する毒素量もはるかに多い。すなわち毒素投与後に与える飼料としては人参の方が濃厚飼料よりも毒性の発揮に効果的であることが明らかである。

## 3) ウサギおよびサルの胃内容液の pH と毒素吸収の

良否および胃洗浄による毒素吸収の促進

前述のようにウサギを 1 夜絶食させて毒素を経口投与し

第2表 経口投与毒素の毒力におよぼす  
飼料の種類の影響

種 類	死 亡 時 間 (分)	4時間後の末梢血中 の毒素量 (マウス ipLD <sub>50</sub> )
人 参	390	4,096
	450	4,096
	430	2,662
	450	1,024
	480	512
濃 厚 飼 料	1,200	20.8
	1,260	20.8
	2,280	16
	2,330	2>
	2,760	2>

毒素 : Lot. 6, 4 ウサギ poLD<sub>50</sub> を投与

直ちに人参を与えると感受性が高まることが明らかになった。また別の実験から、サルにおいては同様に絶食させた後、毒素を経口投与し、直ちに西瓜またはリンゴを与えると十分な感受性を示すことが知られた。

しかし、このような処理をして十分量の毒素を投与してもなお生残する個体をウサギにおいても、またサルにおいても認めた。このような個体では末梢血中にまったく毒素が出現しないか、あるいは出現してもきわめて微量であつて、毒素が十分に吸収されなかつたことが推定された。そこで試みにウサギ 30 羽とサル 20 匹の空腹時の胃内容液の pH を調べてみた。通常空腹時における胃内容液の pH はヒトにおいては中性ないし弱酸性といわれている。しかし著者らがウサギおよびサルについて調べたところヒトとは異なった成績が得られた。すなわちウサギでは大部分が pH 3.0 以下であるのに反し、サルでは 1.4 ~ 7.6 の広い範囲に分布していた。(第 3 表) そしてこれらの胃内容液の pH の値は毒素の吸収と密接な関係のあることが認められた。

サルでは胃内容液の pH が 4.0 ~ 5.0 のときにもっとも

第3表 空腹時における胃内容液の pH

pH	ウ サ ギ	サ ル
<2.0	14	4
2.2 ~ 3.0	10	5
3.2 ~ 4.0	1	2
4.2 ~ 5.0	4	7
5.2 ~ 6.0	0	1
6.2 ~ 7.0	0	0
>7.2	1	1
計	30	20

毒素の吸収がよく、これより pH が高くてまた低くとも毒素の吸収は不良となり、特に pH が 2.0 以下と 7.0 以上ではまったく末梢血中に毒素が出現しない例も見られた（第 4 表）。これに反してウサギにおいては pH 2.0 以下でかつ胃内容液中に遊離塩酸量の多い場合にもっとも毒素の吸収がよく、これより pH の高いものでは毒素の吸収が不良であった（第 5 表）。

そこで毒素投与前に胃内容液の pH を調べ、サルにおいては pH 4.0～5.0 でないときは生理食塩水 10～40 ml で胃洗浄を行なったところ、容易に 4.0～5.0 に修正され、毒素の吸収も良好となった。ウサギでは胃洗浄による pH の修正は困難であったが、毒素の吸収を促進させることができた。

#### 4) E型毒素に対する動物の感受性

以上述べてきた諸条件を考慮に入れて、E型毒素に対する実験動物の感受性を示せば第 6 表の通りである。

第 4 表 胃内容液の pH と毒素の吸収

(サル)			
胃内容液 pH	投与毒素量 遊離 HCl (poLD <sub>50</sub> )	生死および 死亡時間 (分)	末梢血中の毒素 量 (マウス ipLD <sub>50</sub> )
1.4	16	生	0
1.4	16	2,880	8
4.2	32	750	8,200
4.6	16	540	1,450
5.0	8	480	151
4.6 (2.0)	8	720	722
4.2 (2.6)	8	900	1,024
4.2 (2.2) -50	4	940	256
4.0 (2.0) 65	4	1,000	512
7.6	8	生	0

( ) 内は修正後の pH

第 5 表 胃内容液の pH と毒素の吸収

(ウサギ)			
胃内容液 pH	投与毒素量 遊離 HCl (poLD <sub>50</sub> )	生死および 死亡時間 (分)	末梢血中の毒素 量 (マウス ipLD <sub>50</sub> )
2.0	40	8	425
2.0	29.7	8	390
2.0	40	8	330
2.0	50	8	330
2.0		4	128
2.2		4	256
2.0	52	2	256
4.6 -50		8	2,880
2.0	10	8	0

第 6 表 経口投与毒素に対する実験動物の感受性

	LD <sub>50</sub> /ml	実量 ml	マウス poLD <sub>50</sub> に対する比 1頭当り	kg当り
マウス	3,400	0.000292	1	1
モルモット	166	0.00603	20.5	1.03
ウサギ	22	0.045	154	1.02
サル	27	0.037	126	0.84

本実験に用いた毒素の経口投与による LD<sub>50</sub> 値は 1 ml 当りマウス、モルモット、ウサギおよびサルに対して、それぞれ 3,400, 166, 22 および 27 であって、体重をマウス：20 g, モルモット：400 g, ウサギ：3,000 g, サル：3,000 g として換算すると kg 当りの感受性の比はマウスを 1 とすれば、モルモット、ウサギおよびサルはそれぞれ 1.03, 1.02 および 0.84 であって略々同程度であるといえる。

#### 考 察

ホツリヌス毒素を経口投与した場合、同種の動物間で生ずる感受性の変動は消化管からの吸収の良否によるものと推定される。その原因はまず第一に宿主の側の消化器の生理状態があげられよう。このことは先述のように A型毒素の場合、空腹時に毒素を投与し直ちに飼料を与えるとともに感受性が高まること、さらに与える飼料の種類によつても感受性が左右されるという MAY ら<sup>1)</sup> および LAMA-NNA ら<sup>2)</sup> の成績からも示唆される。

E型毒素についてわれわれが行なった実験でも、ウサギおよびサルの場合は空腹時に毒素を投与した方がより安定な成績がえられ、感受性もまた増大した。しかしマウスの場合はやや趣きを異にし、1夜の絶食より 3～5 時間程度の絶食の方が、より感受性が良好であり、給餌後では感受性、分散とともに不良であった（未発表）。したがってわれわれは毒素の経口投与実験では、マウスは 3～5 時間の絶食後 0.2 ml の毒素液を、またウサギおよびサルの実験では 1 夜絶食後 5.0 ml の毒素液を投与し、5～10 分後にマウスでは固型飼料を、ウサギ、サルでは多汁質の飼料（クローバー、人参、リンゴ、西瓜など）を与える方法を採用した。

この動物種による空腹状態と毒素に対する感受性一換言すれば空腹状態と毒素の吸収との関係は、あるいは胃の内容積と投与毒素液の量とに関係するのかも知れない。なぜならマウスの場合は胃容積は拡張時 3.0 ml、収縮時 0.6 ml に対し毒素液 0.2 ml の投与は胃容積に対してかなり大量（1/15～1/3）であるが、ウサギおよびサルの場合は胃容積は拡張時 300 ml、収縮時 60 ml で、胃内容積に対する投与毒素の液量（1/60～1/12）が少ないので十分に毒素が吸収されるためには胃の中が完全に空虚であることが必要なのであろう。

そしてまたマウスの場合に3～5時間程度絶食させたときに毒素の吸収がよいのは、胃容積に対する投与毒素の液量が多いために毒素が胃の中に残っている飼料に吸着されたり破壊されたりする影響よりも、1夜の絶食による消化管の活動力の低下の影響の方が大きいためであろう。次に空腹時に毒素を与えても、なおかつ毒素の吸収が悪い個体が認められたが、ウサギおよびサルの場合は空腹時の胃内容液の水素イオン濃度が関係することが知られた。一般に動物の空腹時における胃内容液のpHは弱酸性ないし中性といわれているが、われわれが検査した成績は、ウサギではpH 3.0以下の動物が大部分を占めたが、サルではpH 1.4から6.0まで広く分布し、まれにはpH 7.6の動物も存在した。そしてこれらの胃内容液のpHと毒素の吸収との関係はウサギとサルとではまったく逆の関係を示した。すなわち、サルでは胃内容液のpHが4.0～5.0のときに毒素の吸収がもっとも良好であり、pH 2.0以下および7.0以上では毒素の吸収はまったく起らないか、あるいはきわめて微弱であった。

これに反してウサギではpH 2.0以下で遊離HCl量が多いときに毒素の吸収がもっとも良好であった。そしてまたサルでは生理食塩水による胃洗浄によって容易に胃内容液のpH 2.0以下からpH 4.0～5.0に修正することができたが、ウサギの胃内容液のpHを2.0以下からpH 4.0以上に修正することは困難であった。

胃内容液のpH変動の原因のうち、pH 2.0以下となるのは胃液の分泌によって、またpH 7.0以上になるのは十二指腸液の逆流によって起ると考えられるが、ウサギで胃内容液のpHが2.0以下で遊離HCl量が多いときに毒素の吸収が良好になるのは、消化管の活動が盛んになりつつある状態のときと理解することができる。

また一方サルの場合に、胃内容液のpHが2.0以下でも洗浄によって容易にpHが上昇することは、以前に分泌された胃液が貯留したもので、これは現在胃が活動的状態にあって胃液が分泌されたのではないことを示すと考えられる。

サルでは胃の活動に先立って唾液の分泌が旺盛となり、これが嚥下されるために胃内容液のpHが4.0～5.0となると考えられ、このような状態のときに毒素を与えれば、速かに消化管の吸収作用が盛んになり、毒素の吸収が良好となると推定された。したがって胃内容液の水素イオン濃度は直接毒素の吸収と関係があるとは考えがたく、消化管の活動開始の状態を知るうえの指標として価値があると考えられる。また粗毒素はin vitroでは胃液の影響はほとんど認められないにもかかわらず、サルでは胃内容液のpHが2.0以下のときに毒素の吸収が不良となった原因は不明であるが、これは恐らく生体内ではin vitroとは異なった複雑な影響をうけるためであろう。

われわれは動物の経口投与実験の成績の変動を防ぐため

に、ウサギは胃内容液のpHを検査してpH 2.0以下の動物だけを用い、サルはpH 4.0～5.0の個体を用いるか、胃洗浄によってpH 4.0～5.0に修正して用いた。

同一種の実験動物のボツリヌス毒素に対する感受性の変動は、これらのほかに系統による変動が認められた。C<sub>3</sub>HおよびDDM系のマウスは NIHおよびDDY系のマウスに比し、腹腔内、経口ともに1管ないし2管程度（2～4倍）多い毒素量を必要とした。とくに経口投与実験は市販マウスでは変動が激しく、われわれは NIHまたはDDMの近交系のマウスを用いた。マウスの系統による感受性の差については、別に報告する予定である。

## 結論

ウサギおよびサルにおけるE型ボツリヌス毒素の経口投与条件を検討し、以下のような所見を得た。

1. ウサギおよびサルは1夜絶食させて毒素を投与し、直ちに水分に富む飼料を与えると、死亡時間も短縮し、かつ末梢血中の毒素量も増加する。すなわち毒素の吸収が良好であった。

2. しかし上記のようにして十分量の毒素を与えると、なお生残する個体を認めた。このような動物では末梢血中に毒素が出現しないか、またきわめて少なく、吸収の不良であることが推定された。

3. 毒素吸収の良否は、毒素投与前の動物の胃内容液のpHと密接な関連のあることが推定された。すなわちウサギではpH 2.0以下で遊離塩酸量の多い場合に、サルでは4.0～5.0のときにもっとも吸収が良好であった。これ以外のpHの場合は生理食塩水で胃の内容を洗浄し、毒素の吸収を良くすることができた。

4. 以上のことを考慮してE型毒素を経口投与した場合、マウスの体重1kg当たりの感受性を1とすればモルモット、ウサギおよびサルの感受性はそれぞれ1.03、1.02および0.84である。

(本研究にはアメリカ NCDC 科学研究費 CC 00173 の補助を受けた)

## 文献

- 1) MAY, A. J. & WHALER, B. G.: The absorption of *Clostridium botulinum* type A toxin from the alimentary canal. Brit. J. Expt. Path., 39, 307-316, 1958.
- 2) LAMANNA, C. & MEYERS, C. H.: Influence of ingested foods on the oral toxicity in mice of crystalline botulinic type A toxin. J. Bact., 79, 406-410, 1960.
- 3) 小野悌二、唐島田隆、飯田広夫：E型ボツリヌス中毒

の血清療法に関する実験的研究、北海道立衛生研究所報  
15, 24-32, 1965.

- 4) 小野悌二, 唐島田隆, 亀山邦男, 飯田広夫 : E型ボツリヌス中毒の血清療法に関する実験的研究(II), 北海道立衛生研究所報, 18, 1-7, 1968.
  - 5) SAKAGUCHI, G. & SAKAGUCHI, S. : A simple method for purification of type E botulinal toxin from the precursor extract of the bacterial cells. Jap. J. Med. Sci. Biol., 14, 243-248, 1961.
  - 6) REED, L. J. & MUENCH, H. : A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27, 493-497, 1938.
  - 7) BROWNLEE, K. A., HODGES, J. L. & ROSENBLATT, M. : The Up-and-Down method with small samples. J. Am. Statist. Ass., 48, 262-277, 1953.
- 1 Factors affecting the oral toxicity of *Clostridium botulinum* type E toxin

Takashi Karashimada, Teiji Ono, Kunio Kameyama, Isao Yamaguchi, Kenzo Kanzawa and Hiroo Iida

(Hokkaido Institute of Public Health)

Factors affecting the oral toxicity of *Cl. botulinum* type E toxin were investigated with rabbits and monkeys and the following results were obtained.

(1) Both in rabbits and in monkeys, oral toxicity of type E botulinum toxin was most conspicuous when the animals were deprived of feed for one night, then given toxin and fed with juicy feeds. Under these conditions, the death time of the animals was reduced and a sufficient amount of toxin was absorbed from the alimentary tract into the blood stream.

(2) In some animals, however, the absorption of toxin was not sufficient under these conditions. It was found out that the pH of the stomach contents of the animals plays an important role in the absorption of toxin, thus in rabbits toxin was much more absorbed when the pH of the stomach contents was 2.0 or below, and in monkeys, at the pH of between 4.0 and 5.0.

(3) Under these conditions, the comparative values of the sensitivity of mice, guinea-pigs, rabbits and monkeys per kg of body weight were 1.00, 1.03, 1.02 and 0.84, respectively.