

14 ボツリヌス A 型中毒の血清療法に関する

実験的研究 (第 1 報)

北海道立衛生研究所 小 野 悌 二
 北海道大学医学部 細菌学教室 飯 田 広 夫

結 言

ボツリヌス中毒はボツリヌス菌の産生する菌体外毒素によって起る食中毒である。従って、抗毒素血清は本中毒の予防ならびに治療のための有力な手段であり、その投与は第一に試みるべき治療法となっている。

しかしながら、血清療法に対するこれまでの研究者の評価は必ずしも高くはなく、抗毒素血清の投与が現在行ない得る唯一の特異療法であることは認めながらも、その効果に限界のあることが指摘されている。すなわちすでに発病した患者に対してはほとんど効果を期待し得ないとする意見が強く、むしろ同一原因食品を摂取して未だ発病していない者に対して予防的に投与することの意義が強調されてきた¹⁾。これらの抗毒素療法に関する過去の文献については、すでに報告した²⁾ので省略する。

われわれはさきに北海道に発生したボツリヌス E 型中毒の致命率を、抗毒素血清の投与によって、28.9%から 3.5%に低下させることのできたことを報告した³⁾。

その後、実験動物を用いて血清療法の基礎的研究を行ない、抗毒素の治療効果に影響を及ぼす因子として、毒素の摂取量、投与すべき抗毒素量、および毒素の摂取から抗毒素を投与するまでの時間について分析を加えた。その結果ボツリヌス E 型毒素が摂取後消化管から吸収される量は、投与毒素量の増加に伴ない指数函数的に増大し⁴⁾、そのために投与すべき抗毒素量もまた指数函数的に増大することを明らかにし得た^{5,6)}。

従来北海道に発生したボツリヌス中毒の大部分が、1 致死量ないしは僅かにそれを上廻る程度の毒素の摂取によって発生したと推定される²⁾ことを考えるならば、この成績は抗毒素の効果を論ずるうえに、新たな観点からの示唆を与えるものと云い得よう。

われわれは今回さらにボツリヌス A 型中毒についても、E 型中毒と同様の分析方法で実験的に血清療法の検討を行ない、いくつかの知見を得たので、まづ本報においてはマウスを用いた基礎的研究の結果を報告する。

実験材料および方法

1. 毒 素

菌株および培養：秋田県衛生研究所で分離した *Cl. bo-*

tulinum type A の秋田-38株を用いた。

毒素産生用培地の組成はペプトン (毒素産生用, ミクニ) 2%, Yeast Extract (Difco) 0.5% およびブドウ糖 0.5% で、培地は滅菌前に pH を 7.2 に修正した。ブドウ糖は少量の水に溶解して別の容器に入れ、それぞれ 121°C, 20 分滅菌したのち、培地にブドウ糖を加えてから、流水で急速に冷却した。

A 型ボツリヌス菌の培養はあらかじめ 200 ml の毒素産生用培地に秋田-38株を、30°C, 24 時間培養し、この菌液を培地 4 l に接種してから、30°C, 6 日間培養した。

毒素液の濃縮：A 型菌の培養液 20 l に 3N・H₂SO₄ を滴下して pH を 3.4~3.6 に修正したのち、4°C に一夜静置して上清と沈澱に分離させた。上清を傾斜させて捨てたのち、分離した沈澱はさらに 4°C で 3,000 rpm, 10 分間遠心沈澱し、この沈澱物を pH 4.0 の水 1,000 ml で洗浄した。

洗浄した沈澱は 1,000 ml の pH 6.5, 0.2 M 磷酸緩衝液に懸濁して 4°C で一夜抽出したのち、4°C で 5,000 rpm, 40 分遠心沈澱を行ない菌体および芽胞を除去した。

遠心分離した抽出液は固形硫酸を 60% 飽知になるごとく加えて沈澱させ、沈澱は pH 6.5, 0.05 M 磷酸緩衝液に再び溶解させた。この操作を 2 回反復したのち、透折によって硫酸を除去した。そしてさらに 4°C で 10,000 rpm, 60 分遠心沈澱を行なって菌体残渣を除去し、濃縮毒素は最終的に 100 ml の溶液にした。A 型菌の培養液はこの操作によって 1/200 の液量に濃縮され、蛋白窒素量は 1.442 mgN/ml であった (第 1 図)。

この毒素液を Lot 8 とし、-60°C に凍結保存した。

2. 抗毒素

Lederle 製の A, B 型の Bivalent 抗毒素を使用した。A 型毒素に対する力価は 500 IU/ml である。

3. 実験動物

自家繁殖、雑交配 (random breeding) の NIH 系マウスを用いた。マウスの体重は毒素の経口投与実験では、25 ± 2 g, その他の実験では 20 ± 2 g のマウスを用いた。

4. 毒素の投与方法

毒素は 0.2% ゲラチン加 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) で稀釈した。投与する毒素の液量は腹腔内では 0.5 ml, 皮下では 0.1 ml とした。

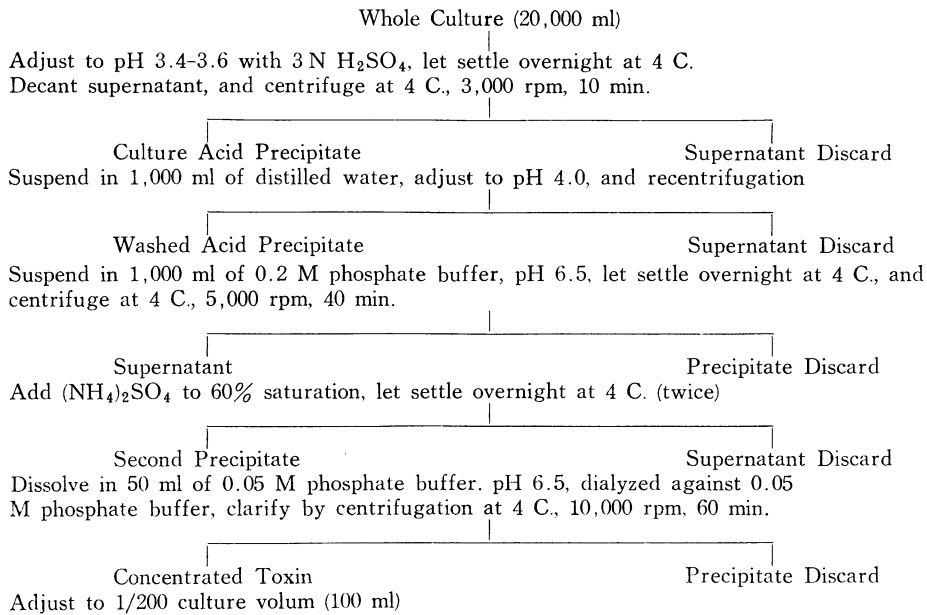


Figure 1. Procedure for concentration of *C. botulinum* type A toxin

経口投与はマウスを4~6時間絶食させたのち、稀釈毒素液をビニールの細管で胃内に0.2または0.5ml注入し、直ちに餌を与えた。

5. 抗毒素の注射

抗毒素血清の稀釈液は *in vitro* で混合してから中和試験を行なう場合は上述の毒素稀釈に用いた液を、抗毒素のみをマウスの皮下に注射する中和試験では pH 7.2 磷酸緩衝生理食塩水を用いた。稀釈した抗毒素はマウスの右側大腿部皮下に 0.1 ml 注射した。

6. LD₅₀ および ED₅₀ の算出

毒素の各稀釈液および毒素、抗毒素の組合せのそれぞれにつき4頭以上のマウスを使用し、7日間観察して生死を判定した。これらのマウスの死亡または生残した数から、Reed and Muench⁷⁾の方法に従い、LD₅₀ および ED₅₀ を算出した。

実験成績

I. 試験毒素のマウスに対する毒性

実験に用いたボツリヌス A 型毒素 Lot 8 をマウスの腹腔内、皮下および経口的に投与した場合の毒性は、第1表

Table 1. Toxicity of type A toxin for mice

(Lot 8)

Experi. No.	IP* toxicity	SC** toxicity	PO*** toxicity
1	0.80 × 10 ⁸ LD ₅₀ /ml	3.17 × 10 ⁷ LD ₅₀ /ml	1.2 × 10 ³ LD ₅₀ /ml
2	0.98 × 10 ⁸	3.40 × 10 ⁷	1.4 × 10 ³
3	0.98 × 10 ⁸	3.56 × 10 ⁷	2.8 × 10 ³
4	1.13 × 10 ⁸	4.00 × 10 ⁷	2.8 × 10 ³
5	1.23 × 10 ⁸	5.04 × 10 ⁷	3.2 × 10 ³
Geometric mean	1.03 × 10 ⁸	3.89 × 10 ⁷	2.4 × 10 ³

* IP: Intraperitoneal, ** SC: Subcutaneous, *** PO: Per os

の通りである。

それぞれルート別の毒性試験を5回反復して行なった成績の幾何平均は、IP: 1.03 × 10⁸ LD₅₀/ml, SC: 3.89 × 10⁷ LD₅₀/ml および PO: 2.4 × 10³ LD₅₀/ml であった。

これらの成績から、IP に対する PO および SC の比は、それぞれ42.900および2.64であることが知られた。

II. 毒素、抗毒素の同時投与における量的関係

1. 毒素、抗毒素を *in vitro* で混合した場合の中和試験

毒素の1:2.5 × 10⁵, 1:5 × 10⁵, 1:1 × 10⁶, 1:2 × 10⁶ および 1:4 × 10⁶ の各稀釈液に、2ⁿ 稀釈の抗毒素を等量に加えて試験管内で混合し、1組4頭のマウスの腹腔内に0.5 ml ずつ注射して中和試験を行なった。

これらの混合液を注射したマウスの生死から算出した抗毒素の各毒素量に対する ED₅₀ の実測値は、第2表のごとくである。毒素および抗毒素量は、稀釈倍数の逆数で示した。この実験でマウスに投与した毒素の最少量は、1:4 × 10⁶稀釈液の0.25 ml で、これは6.44マウス IP LD₅₀ に相

Table 2. Neutralization of toxin and antitoxin *in vitro*

	Dilution of toxin				
	0.25×10^{-6}	0.50×10^{-6}	1.00×10^{-6}	2.00×10^{-6}	4.00×10^{-6}
Dilution of antitoxin	1.80×10^{-4}	3.15×10^{-4}	3.15×10^{-4}	4.03×10^{-4}	5.12×10^{-4}
		3.61×10^{-4}	3.61×10^{-4}	4.03×10^{-4}	6.45×10^{-4}
			4.03×10^{-4}	5.12×10^{-4}	7.80×10^{-4}
			4.03×10^{-4}	5.12×10^{-4}	7.80×10^{-4}
			5.12×10^{-4}	6.45×10^{-4}	9.03×10^{-4}

Table 3. Neutralization of toxin injected subcutaneously

	Dilution of toxin					
	0.30×10^{-5}	0.90×10^{-5}	1.25×10^{-5}	3.00×10^{-5}	5.00×10^{-5}	20.0×10^{-5}
Dilution of antitoxin	1.02×10^{-3}	5.78×10^{-3}	4.03×10^{-3}	11.3×10^{-3}	10.1×10^{-3}	51.2×10^{-3}
			4.03×10^{-3}		10.1×10^{-3}	59.9×10^{-3}
			4.51×10^{-3}		16.1×10^{-3}	75.8×10^{-3}
			5.70×10^{-3}		16.1×10^{-3}	85.1×10^{-3}
			6.40×10^{-3}		18.1×10^{-3}	102.4×10^{-3}

当する。

またこれらの実測値から、 $y=0.423x-2.046$ の回帰関係の成立することが推定され、その標準誤差は0.085であった。この一次式を、毒素量(x)を横軸に、抗毒素量(y)を縦軸にとれば第2図のごとき直線が得られた。

A型毒素で得られたこの中和直線は、E型毒素について同様の実験方法で得られた中和直線 $y=0.550x-2.317$ に近似した傾斜を示している。このことは、A型毒素の場合にも、毒素、抗毒素をあらかじめ試験管内で混合中和してからマウスに注射すれば、毒素を10倍に増量しても、これを中和するために必要な抗毒素量は僅かに2.67倍で十分であることを示している。

2. 毒素、抗毒素を同時に皮下に注射した場合の中和試験

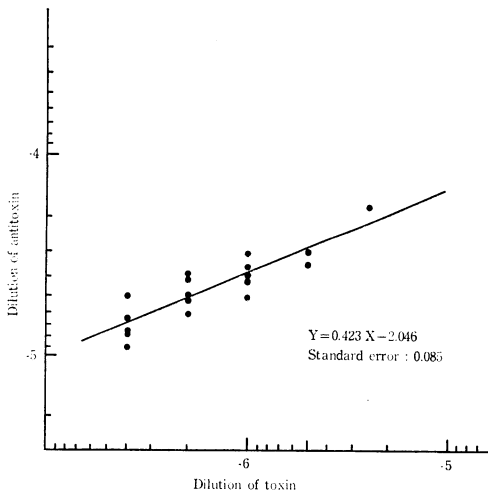


Figure 2. Neutralization of toxin and antitoxin *in vitro*

毒素の $1:3 \times 10^4$, $1:9 \times 10^4$, $1:1.25 \times 10^5$, $1:3 \times 10^5$, $1:5 \times 10^5$ および $1:2 \times 10^6$ 各稀釈液 0.1 ml をマウスの左側大腿部皮下に、また抗毒素の 2^n 稀釈液 0.1 ml を右側大腿部皮下に、それぞれ注射して中和試験を行なった。

その結果、各毒素稀釈液に対する抗毒素の ED_{50} の実測値は第3表のごとくであった。投与毒素量および抗毒素の ED_{50} は、前実験と同様に稀釈倍数の逆数で示した。

マウスに注射した毒素の最少量は、 $1:2 \times 10^6$ 稀釈液 0.1 ml である。これは 1.94 マウス SC LD_{50} に相当する。

またこれらの実測値から、 $y=0.950x+1.149$ の回帰関

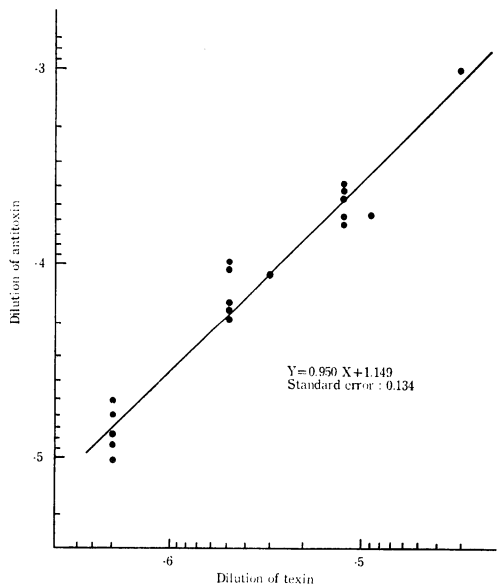


Figure 3. Neutralization of toxin injected subcutaneously

係の成立することが推定され、その標準誤差は0.134であった。この一次式から、第3図のごとき直線が得られた。

このことは、毒素および抗毒素を同時に皮下に注射した場合、注射する毒素量を10倍に増せば、これを中和するのに必要な抗毒素量もほぼ10倍に増量することを示しており、この場合にもE型とほぼ同様の成績が得られた。

3. 毒素を経口投与し、抗毒素を同時に皮下に注射した

場合の中和試験

毒素の $1:1.8 \times 10^1$, $1:5.4 \times 10^1$ および $1:1.62 \times 10^2$ の各稀釈液 0.2ml を経口投与した後、抗毒素の 2nd 稀釈液 0.1 ml を右側大腿部皮下に注射して、中和試験を行なった。この実験における抗毒素の ED₅₀ の実測値は、第4表のごとくである。投与した毒素の最少量は2.96マウス PO LD₅₀ に相当する。

Table 4. Neutralization of toxin given *per os*

Dilution of antitoxin	Dilution of toxin		
	1.8×10^{-1}	5.4×10^{-1}	1.62×10^{-2}
	1.13×10^{-3}	5.48×10^{-3}	39.10×10^{-3}
	1.27×10^{-3}	6.40×10^{-3}	45.10×10^{-3}
	1.42×10^{-3}	7.98×10^{-3}	81.80×10^{-3}
	1.60×10^{-3}	9.04×10^{-3}	85.90×10^{-3}
	2.35×10^{-3}	14.50×10^{-3}	102.40×10^{-3}

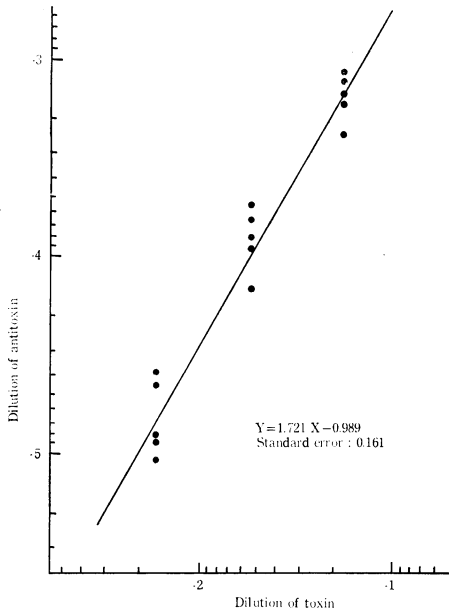


Figure 4. Neutralization of toxin given *per os*

これらの実測値から、第4図に示すように、 $y = 1.721x - 0.989$ (標準誤差0.161) の一次式が得られた。

この中和直線の傾斜 1.721 は、毒素の3種類の投与ルート中最大であるが、E型毒素を経口投与したときの抗毒素の中和直線の傾斜 3.577 にくらべると僅かに $\frac{1}{2}$ に過ぎない。このことは、毒素を10倍増量したときに必要な抗毒素量は、E型では約3,800倍であったのに対し、A型では僅かに50倍に過ぎないことを意味する。

以上の実験成績をもとにして、投与毒素量をそれぞれのルートごとの LD₅₀ 量で、また抗毒素量を IU 量で表現した場合に得られる中和直線をひとつにまとめて描いたのが第5図である。

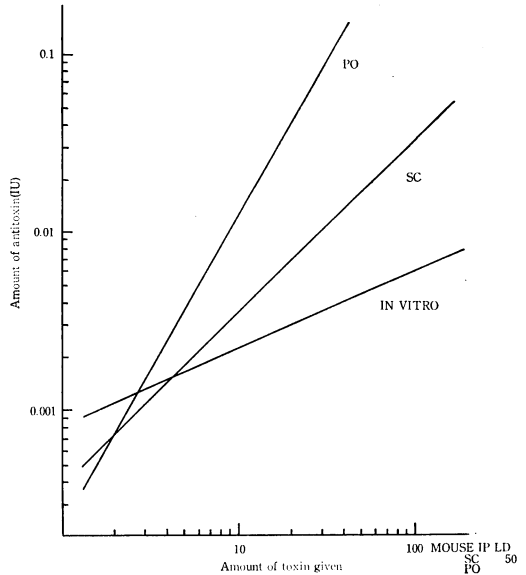


Figure 5. Comparison of the antitoxin and neutralized toxin by various routes

III. 経口投与毒素に対する抗毒素中和能の経時的変化

1. 毒素を経口投与した場合のマウスの死亡時間
抗毒素投与の時期の問題を検討するためには、先ず毒素の投与をうけたマウスが、どれ位の時間生存し得るかを知ることがある。そこで、種々の量の毒素を経口投与したときのマウスの死亡時間を観察した。

A型毒素 Lot 8 の、2nd × 10 稀釈液 0.5 ml を、それぞれ10頭、計90頭のマウスに経口投与して、死亡時間を測定した。毒素を投与してから36時間までは10分毎に、それ以降は1時間毎に観察した死亡時間の実測値は、第5表の通りである。

投与した各種稀釈液におけるマウスの生死から求められた

Table 5. Time intervals between toxin administration *per os* and death of mice

Dilution of toxin	1:10,240	1:5,120	1:2,560	1:1,280	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40
Toxin doses per mouse (<i>per os</i> LD ₅₀)	0.222	0.445	0.890	1.78	3.56	7.12	14.25	28.5	57.0
Death time	S	34.83	80.00	40.50	17.50	12.83	6.83	7.16	3.50
	S	S	100.00	68.50	27.16	14.00	10.66	8.50	4.16
	S	S	S	72.50	29.00	16.33	14.33	9.66	6.00
	S	S	S	82.50	34.50	18.16	18.33	13.66	6.33
	S	S	S	95.00	38.50	21.50	18.83	15.16	7.56
	S	S	S	97.00	60.00	28.66	21.50	20.33	13.66
	S	S	S	98.00	68.00	32.50	36.33	21.33	16.16
	S	S	S	100.00	93.00	38.50	68.00	24.33	17.16
	S	S	S	130.00	S	47.00	78.00	25.00	24.50
S	S	S	S	S	68.00	82.00	29.00	27.16	
Median				96.00	49.25	25.08	20.16	17.74	10.58
Geometric mean						34.08	45.02	18.87	14.97

S : survived.

毒素の経口毒性は、2,280 マウス PO LD₅₀/ml であった。従って、マウス1頭当りの推定投与毒素量は、57.0, 28.5, 14.25, 7.12……0.223マウス PO LD₅₀である。また1経口致死量は7.12マウス PO LD₅₀に相当した。

毒素を経口投与したマウスのうち、死亡した60頭の平均死亡時間は50.02時間で、32頭(56.6%)は24時間以上の経過後に死亡した。A型中毒では、E型にくらべて死亡時間が延長し、分散の大きくなる傾向が著しく、57マウス PO LD₅₀という多量の毒素を投与しても、その死亡時間は3.50~27.16時間の間に分布し、10頭中5頭は13.66時間以上

上であった。

この傾向は、投与毒素量が減少するに従いさらに顕著で1致死量に近い7.12マウス PO LD₅₀の投与では、12.83~68.00時間で、10頭中5頭は24時間以上の経過で死亡した。

E型毒素を経口投与したマウスの死亡時間^①と対比させて、第5表の実測値を図に示せば、第6図および第7図のごとくである。

E型毒素の18.7~0.57マウス PO LD₅₀を経口投与したために死亡した67頭のマウスの平均死亡時間は9.24時間であったが、49頭(59.7%)は6時間以内に死亡した。また1致死量より僅かに少ない2.3マウス PO LD₅₀の毒素量でも10頭中9頭は4.50~12.16時間で死亡した。

これらの成績から、マウスにおけるA型中毒とE型中毒の症状ならびに経過は、かなり異なるものであることが知られた。

2. 抗毒素の投与時期と死亡率

A型毒素 Lot 8 の1:240, 0.5ml (約3.4マウス PO LD₅₀)をマウスに経口投与した後、抗毒素 1:5 の0.1 ml (10 IU)を5, 10, 15, 20, 25および30時間後に、各10頭ずつのマウスの右側大腿部皮下に注射した。この抗毒素量は3.4マウス

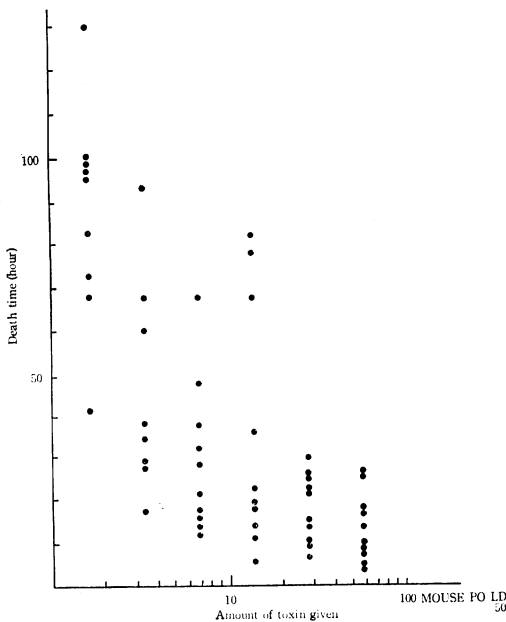


Figure 6. Relationship between the amount of type A toxin given orally and the death time of mice

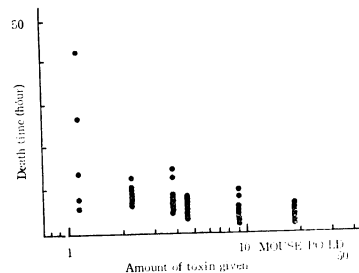


Figure 7. Relationship between the amount of type E toxin given orally and the death time of mice

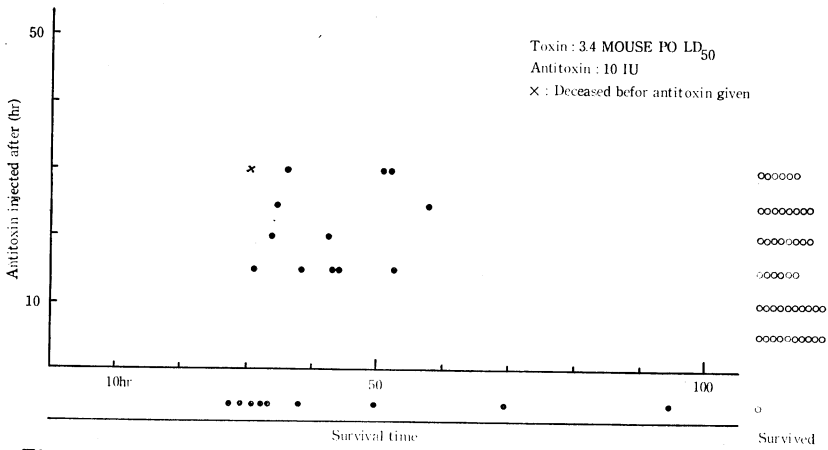


Figure 8. Relationship of intervals between type A toxin and antitoxin administration to survival time of mice (1)

PO LD₅₀ の毒素と同時投与した抗毒素の中和当量の約5,000倍に相当する。これらの成績を一括して図に示したのが第8図である。

対照として毒素のみを投与した10頭のマウスのうち、9頭は27:30~94:30の間に死亡したが、1頭だけは発症することなく生残した。

抗毒素を注射した群のうち、5および10時間後に注射した群では、それぞれ10頭のマウス全部を救命することができた。

抗毒素を注射しても救命し得なかったマウスの数は、抗毒素を15時間後に注射した群は5頭で最も多かったが、20および25時間後に注射した群ではむしろ少なく、死亡したマウスはそれぞれ2頭に過ぎなかった。

30時間後に抗毒素を注射する予定のマウス10頭のうち、1頭は抗毒素の注射前に29:00で死亡した。そのため残りの9頭のマウスに抗毒素を注射したところ、3頭が死亡し6頭が生残した。

毒素を経口投与してから20時間以降に抗毒素を注射した群の中で、死亡したマウスは、抗毒素の注射時すでに呼吸

困難、軽度の麻痺などの症状が認められていたが、生残したマウスはとくに発症を確認することができなかった。ただこれらのマウスのほとんどが、抗毒素注射の30分ないし1時間後に、呼吸困難の症状を呈し、この症状は20~30時間以上観察された。

対照群のマウスの死亡時間から、抗毒素を投与した群のマウスの過半数は、27~40時間で死亡すると推定された。従って、毒素を投与してから抗毒素を20~25時間後に注射した群は、推定生存時間の2/3以上を経過した時期に抗毒素の注射を受けたことになり、他の動物実験の成績⁸⁾から推測しても、少なくとも経過の後期に抗毒素の投与を受けたものと考えられた。

毒素投与後15時間で抗毒素注射を受けた群のうち死亡したマウスは、抗毒素の注射時には全く発症していなかったにもかかわらず死亡した。

抗毒素を注射してから死亡したマウスの死亡時間は、最も短いもので31:00、最も長いもので58:00であった。これらのマウスの死亡時間は対照マウスのそれとほとんど同じで、E型中毒で認められたような死亡時間の延長また

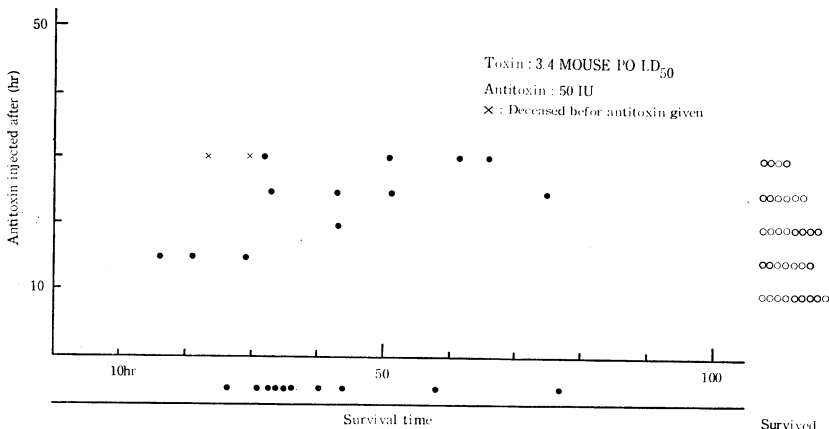


Figure 9. Relationship of intervals between type A toxin and antitoxin administration to survival time of mice (2)

は短縮のような、特異な変化は認められなかった。

抗毒素量が、毒素と同時投与の中和当量の5,000倍ではなお不足とも考えられたので、さらに抗毒素量を中和当量の20,000倍(50 IU)に増量して実験を試みた。この結果は第9表に示すとおりである。

成績は期待したほどの死亡率の減少は認められず、むしろ毒素投与後15時間目に抗毒素を注射した群のうち3頭は抗毒素の注射によって死亡時間が短縮された。

考 察

われわれはさきにボツリヌスE型中毒の血清療法に関する実験的研究を試みてきたが、その結果、治療効果を現わすために必要な抗毒素量は、摂取した毒素量と抗毒素の投与時期によって著しく影響されることを知った。すなわち経口的に摂取された毒素は速かに吸収されて血中に出現したが、この血中の毒素量は投与毒素量に対して指数函数的に増大し、従ってこれを中和するために必要な抗毒素量もまた指数函数的に増大することを知った^{4,5,6)}。

また毒素が摂取されてから抗毒素を投与するまでの時期は、できるだけ早期であることが望ましく、抗毒素量は毒素投与後の時間の経過とともに著しく多量を必要とすることが知られた。例えば、3.8マウス PO LD₅₀ のE型毒素を経口投与したマウスの平均死亡時間は約8時間であったが4時間後に抗毒素を投与したのでは、同時投与における中和当量の20,000倍以上の抗毒素を必要とした。

従ってボツリヌスE型中毒の血清療法は、摂取毒素量が1致死量ないしは僅かにそれを上廻る程度の量の場合に、できるだけ早期に多量の抗毒素を投与すれば効果を期待し得るものと推定された。

今回われわれは、ボツリヌスA型中毒について、これら種々の条件下における毒素、抗毒素の量的関係を、E型中毒の場合と対比しつつ、マウスを用いて検討してみた。

先ず毒素、抗毒素の同時投与のときの両者の量的関係を明らかにするために、(1)あらかじめ毒素、抗毒素を試験管内で混合中和する方法、(2)毒素、抗毒素の同時皮下注射、および(3)毒素を経口投与し、同時に抗毒素を皮下注射するという3種の組合せについて中和試験を行なった。その結果、(1)および(2)の場合には、ほとんどE型中毒の場合と同様の成績を得た。

これに対して、毒素を経口投与してから直ちに抗毒素を皮下に注射するという(3)の場合には、E型毒素の場合、中和直線の傾斜が3.577であったのに対し、A型毒素では1.721に過ぎなかった。このことは、E型毒素では投与毒素量を10倍に増したとき、これを中和するための抗毒素量は3,000倍以上を必要とするのに対し、A型毒素では50~60倍で十分であったことを意味する。

経口投与したA型毒素に対する抗毒素の中和直線の傾斜が、E型毒素の中和直線の傾斜にくらべて緩やかであろう

ということは、実験の当初においてすでに予想されていた。A型菌は強い蛋白分解性を有するために、毒素は培養の極めて早期にほとんどが活性化された状態で培養液中に存在する。これに反してE型菌は強い蛋白分解性を欠除しているために、毒素の大部分は培養の後期に到るまで所謂前駆体として菌体内もしくは菌体表面に存在している^{9,10)}。このような両型における毒素産生過程の差異は、当然消化管内における毒素の安定性に影響を及ぼすと考えられる。E型毒素の前駆体はトリプシンによって活性化され、その毒性が増強されることが知られており¹¹⁾、消化管内のE型毒素は、むしろ消化酵素によって活性化を受け、毒性が100~200倍増強され、従ってまた吸収される毒素量も増大することが推定された。

経口投与毒素を中和するための抗毒素が、毒素の増量に伴って著しく大量を必要とする理由は、E型の場合には上述のような毒素の消化管内における活性化によって一応理解される。しかし、A型中毒においてもなお中和直線の傾斜が1以上の値を示すのは、いかなる理由によるのであろうか。

中和直線の傾斜を変化させる因子としては、毒素、抗毒素の吸収速度、血中量、さらに投与毒素量の増加に伴う吸収率の変化などを挙げることができよう。

A型毒素の消化管からの吸収については、第2報¹²⁾に詳述するが、A型毒素を経口投与したウサギの末梢血中に出現した毒素量の回帰直線の傾斜もまた1.560であったことから、E型の場合と同様にA型中毒の場合にも、投与毒素量の増量に伴って、毒素の吸収率は上昇するものと考えられる。

A型毒素における消化管からの吸収率の上昇は、ウサギのE型中毒で観察された吸収率の上昇に比べれば僅かにその1/16~1/20に過ぎない。これは毒素の活性化が起らないことを考えれば当然のことであろう。しかし、中和に必要な抗毒素量に対する吸収毒素量と抗毒素投与時期の相乗的影響を考えるならば、この吸収率の上昇は、中和に必要な抗毒素量を考えるうえに大きな意味を持つであろう。

つぎに抗毒素の投与時期とその効果との関係を観察するための予備実験として、毒素を経口投与したマウスの死亡時間を測定した。

その結果、A型毒素を経口投与したマウスの死亡時間もまた、E型の場合とは著しく趣きを異にした。すなわち、A型中毒においては、かなり大量の毒素を投与してもE型の場合にくらべて死亡時間の変動が著しく、投与毒素量が減少するにつれて、さらにこの傾向は一層顕著になった。

この原因は、すでに述べたように、A型毒素がE型にくらべて不安定であるために、消化管から吸収される毒素量が変動しやすいことにもよるのであろう。しかしまた、ウサギを用いた実験において、経口的に投与されたA型毒素が末梢血中に出現する時期は、E型の場合とほとんど差がな

いにかかわらず、A型中毒ではE型中毒にくらべて潜伏期が著しく長く、症状の経過もまた延引するという事実が観察されており、これは両型における発症の pathogenesis の相違に基因するものと考えられた。

このように、A型中毒の場合に潜伏期間および経過が遅れるという現象は、吸収された毒素がその侵襲点に到達するまでに時間がかかるためか、あるいは侵襲点に到達してもその作用を現わすまでに時間がかかるのかのいずれであろう。抗毒素が治療効果を発揮するためには、1致死量以上の毒素がその侵襲点に到達して、非可逆的な障害を起す以前にこれを中和することが必要である。この点から考えれば、A型中毒の場合には、E型のそれよりもむしろ抗毒素の効果を期待できるのではないかと考えられた。

しかしながら、今回の実験成績から見る限りでは、とくにA型の場合にE型よりも優れた血清療法の効果が得られるという結論は得られなかった。

ただ、2~4マウス PO LD₅₀ の毒素をマウスに経口投与した場合、マウスの過半数は20~50時間で死亡した。A型中毒では死亡時間の変動が大きいので、毒素を投与してから20~30時間を経過して抗毒素を注射したマウスに、抗毒素の注射時明瞭な発症は認められなかったにせよ、この時期は他の動物ではかなり明瞭に中毒の症状が現われる時期である。この時期に抗毒素血清の注射をうけたマウスの一部に救命効果の見られたことは、興味のある事実と云えよう。

結 論

マウスを用いて、ボツリヌスA型毒素に対する抗毒素の中和効果を検討した結果、つぎのような成績を得た。

(1) 毒素、抗毒素を試験管内で中和したときの中和直線は $y=0.423x-2.046$ であった。

(2) 毒素、抗毒素を異なった部位の皮下に同時に注射したときの中和直線は $y=0.950x+1.149$ であった。

(3) 毒素を経口的に投与してから、直ちに抗毒素を皮下に注射した場合の中和直線は、 $y=1.721x-0.989$ であった。

(4) A型毒素を経口投与したマウスの死亡時間は、E型の場合にくらべて、著しく延長し且つ変動が大きかった。

(5) 摂取毒素量が1致死量に近い量るときには、多量の抗毒素をできるだけ早期に投与することによって、血清療法の効果を期待することができる。

(本研究には Center for Diseases Control, Atlanta, U.S.A. の科学研究費 CC 00173 の交付を受けた。)

参 考 文 献

1) Dack, G. M.: Current status of therapy in microbial food poisoning. J. Amer. Med. Assoc., **172**, 929-932, 1960.

2) 飯田広夫, 神沢謙三, 中村豊, 唐島田隆, 小野悌二, 斎藤富保: 昭和37年北海道に発生したボツリヌス中毒について、特にその血清療法の効果について、北海道立衛生研究所報告, **14**, 6-18, 1964.

3) Dolman, C. E. & Iida, H.: Type E botulism: Its epidemiology, prevention and specific treatment. Canad. J. Publ. Health, **54**, 293-308, 1963.

4) 小野悌二, 唐島田隆, 亀山邦男, 山口勲, 神沢謙三, 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(第3報)特に毒素の消化管からの吸収について、北海道立衛生研究所報告, **19**, 9-16, 1969.

5) 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(第1報)マウス、北海道立衛生研究所報告, **15**, 24-32, 1965.

6) 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(第2報)モルモット、北海道立衛生研究所報告, **18**, 1-7, 1968.

7) Reed, L. J. & Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg., **27**, 493-497, 1938.

8) 小野悌二, 唐島田隆, 亀山邦男, 山口勲, 神沢謙三, 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(第4報)ウサギおよびサル、北海道立衛生研究所報告, **19**, 17-25, 1969.

9) 飯田広夫: *Clostridium botulinum* の毒素産生に関する実験的研究(第1報)、日本細菌誌, **19**, 458-461, 1964.

10) 飯田広夫: 同上(第2報)同誌, **19**, 463-468, 1964.

11) Duff, J. T., Wright, G. G. & Yarinsky, A.: Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J. Bact., **72**, 455-460, 1956.

12) 小野悌二, 亀山邦男, 山口勲, 唐島田隆, 飯田広夫: A型ボツリヌス中毒の血清療法に関する実験的研究(第2報)消化管からの毒素の吸収について、北海道立衛生研究所報告, **21**, 携載予定, 1971.

14. Experimental Studies on Serum Therapy of Type A Botulism (Part I)

Teiji Ono (Hokkaido Institute of Public Health)

Hiroo Iida (Hokkaido University School of Medicine)

Neutralization tests were carried out with *Cl. botulinum* type A toxin and its specific antitoxin in mice. The results may be summarized as follows.

(1) Toxin and antitoxin were mixed *in vitro* and

then injected intraperitoneally into mice. The general equation for the neutralization was $Y=0.423 X-2.046$.

(2) When toxin and antitoxin were simultaneously injected subcutaneously, the equation was $Y=0.950 X+1.149$.

(3) If toxin be given orally and antitoxin subcutaneously, the equation was $Y=1.721 X-0.989$.

(4) The death time of mice received various

amounts of oral type A toxin was longer and more variable as compared with type E toxin.

(5) It was concluded that, as in the case of type E botulism, the effectiveness of antitoxic therapy in type A botulism will depend upon a sufficient amount of antitoxin being administered at the earliest possible opportunity.