

ボツリヌスA型中毒の血清療法に 関する実験的研究（第3報）

Experimental Studies on Serum Therapy of Type A Botulism (Part III) Experiments with Rabbits and Monkeys

唐島田 隆 小野 悌二
亀山 邦男
飯田 広夫（北海道大学医学部細菌学教室）

Takashi Karashimada, Teiji Ono and Kunio Kameyama :
Hokkaido Institute of Public Health
Hiroo Iida : Hokkaido University School of Medicine

緒 言

第1報¹⁾および第2報²⁾において、われわれは、ボツリヌスA型中毒の血清療法における、毒素、抗毒素の量的関係、およびA型毒素の消化管からの吸収についての実験結果を報告した。

本報においては、ウサギおよびサルに種々の量のA型毒素を経口投与し、種々の間隔で抗毒素を注射した際の、これらの動物の症状、経過を報告し、併せてA型中毒とE型中毒における血清療法の効果について比較検討した結果を報告する。

実験方法

1. **毒素**：ボツリヌスA型菌秋田38株の毒素（Lot 8）を用いた。毒素の調整の方法、その毒性については、第1報¹⁾に詳しく述べたので省略する。
2. **抗毒素**：Lederle製のボツリヌスAB混合抗毒素血清を用いた。そのA型毒素に対する力価は、500 IU/mlである。
3. **実験動物**：マウスは市販のDDY/S系を用いた。体重は18~20gである。ウサギは市販の白色在来種を、サルは市販のCynomolgus monkey（体重1.65~4.5kg）を使用した。
4. **毒素、抗毒素の投与方法**：毒素の投与方法は、ウサギの場合は、前報²⁾に記載したのと同じである。サルの場合には、一夜絶食させた後、胃内容液のpHが5.0以下のものに限って³⁾、50mlの稀釈毒素液を、ポリエチレン製の小児用カテーテルを用い、直接胃内に注入した。毒素の投与後は、直ちにリンゴを与えた。

抗毒素は、ウサギの場合には耳静脈内に、サルの場合には大腿部の筋肉内に注射した。

5. **血中毒素量の測定**：ウサギについては、毒素投与後6時間目に1回採血して、血中の毒素量を測定した。これは前報²⁾において、ウサギにA型毒素を経口投与した場合の、血中毒素のpeakが、ほぼ6時間後に見られることが明らかにされたからである。サルについては、毒素投与後、2、4、6および8時間目に採血し、また死亡直後にも採血して、血中の毒素量を測定した。血中毒素の測定法については、前報²⁾に記載した。

実験結果

I ウサギを用いた実験

ウサギに種々の量のA型毒素（Lot 1）を経口投与した場合の、症状、経過および流血中に出現する毒素量の経時変化については、既に前報に報告した²⁾。

今回は、Lot 8のA型毒素を用い、その種々の量を6群のウサギに与えて、潜伏期、症状の経過および死亡時間を観察した。その結果は、第1図に示す通りである。

第I群は、8.52ウサギPOLD₅₀の毒素を投与した群で、2頭中1頭（No53）は、約32時間後に左後肢のマヒを呈し、96時間後には食欲不振となり、118時間後には横臥して呼吸困難を示し、145時間後に死亡した。しかし、投与後6時間目に血中からは、毒素が証明されなかった。No54は、28時間後に四肢のマヒを呈し、30時間後には横臥して呼吸困難の症状を呈し、33時間30分後に死亡した。投与後6時間目の血中には、2.8

マウス IPLD₅₀/mlの毒素が検出された。

第II群は、4.26 POLD₅₀の毒素を投与した群であるが、No57は24時間以前に食欲不振となり、72時間後には四肢のマヒと呼吸困難を呈し、75時間20分後に死亡した。No58は経過が速かで、毒素投与後35時間で死亡した。No91の症状は発現はNo57よりも遅かったが、その後の経過は早く、63時間で死亡した。なお毒素投与後6時間目の血中の毒素は、No58にのみ認められ、その量は2.8マウスIPLD₅₀/mlであった。

第III群は、2.13 POLD₅₀の毒素を投与した群であるが、3頭中1頭 (No88) は異常を示すことなく生残った。残る2頭中1頭 (No93) は、80時間後に食欲不振となり、145時間後には後肢のマヒ、続いて前肢のマヒを示し、244時間30分後に死亡した。死の数時間前から呼吸困難を示した。No92は更に経過が早く、146

時間で死亡した。やはり死の数時間前から、四肢のマヒおよび呼吸困難を呈した。しかし、両例とも、血中には毒素が証明されなかった。

第IV群は、1.06 POLD₅₀の毒素を投与した群で、3頭中1頭 (No79) は異常を呈することなく生残った。残る2頭中1頭 (No78) は、症状の進展が極めて緩慢であり、90時間後に食欲不振と軽度のマヒが現われ、これはそのまま35日後に死亡するまで持続した。呼吸困難は確認されなかった。本例のような緩慢な症状の進展は、E型中毒においては認められなかった。No89は、72時間後には食欲不振となり、後肢のマヒを呈し、82時間後に呼吸困難に陥って、96時間後に死亡した。

第V群は、0.53 POLD₅₀の毒素を投与した群で、4頭中1頭のみが7日目に死亡した。残る3頭中2頭 (Nos.61, 62) には、軽い食欲不振あるいは軽度のマヒ

Toxin poLD ₅₀	No.	Death Time (hr)	Course of illness												
			hours				days								
			24	48	72	96	120	6	7	8	9	10	11	35	
0.26	63	Surv.													
	64	Surv.													
	65	Surv.													
	68	Surv. (-)													

Fig. 1-3. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin orally

No.	Death time (hr)	Toxin in blood (MU/ml)	Course of illness											
			hours						days					
			16	24	36	48	60	72	4	5	6	7	8	
97	Surv.	2.8	↓											
98	Surv.	-	↓											
96	Surv.	-	↓											
95	63	2.8	↓											
104	35	4.0	↓											
105	19	5.6	↓											

Toxin: 8.52 poLD₅₀

↓ Antitoxin injected

Antitoxin: 500 U

Fig. 2. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

が見られたが、回復した。1頭 (No.60) は全く異常を示さなかった。これらの動物の血液中には、いずれも毒素は証明されなかった。

第VI群は、0.26 POLD₅₀の毒素を投与した群であるが、4頭とも全く異常を呈することなく生残った。

以上の成績は、A型毒素 Lot 1 を用いて行なわれた前報²⁾のそれとほぼ一致する。すなわち、一般にE型毒素の場合⁴⁾にくらべると、同一のPOLD₅₀の毒素を投与してから、症状の発現する迄の時間、および発症から死亡に到る迄の時間がともに著しく延長し、かつ分散が大きかった。また一般に、中毒症状がE型の場合にくらべて不明瞭であり、毒素の血中への出現も不明確であった。例えば、血中毒素の測定を試みた11頭中、毒素の証明されたのは2頭のみで、その量も2.8マウス IPLD₅₀/mlという僅かな量であった。血中に毒素の証明された2頭はいずれも死亡しているが、毒素の証明されなかった9頭のうち、6頭は死亡した。この点、死亡した例では必ず血中に毒素の証明されているE型の場合と、著しく異なることが知られた。

以上のようなウサギの発症の経過を確認した上で、次には種々の量のA型毒素を投与したウサギに、種々の間隔で一定量(500IU)の抗毒素を静脈内に1回注射し、その救命ないし延命効果の有無を調べた。また全例について、毒素投与後6時間目に、血中の毒素量を測定した。

第2図は、8.52ウサギ POLD₅₀のA型毒素を経口投与したウサギを3群に分け、それぞれ投与後16、18および20時間目に500IUの抗毒素を注射した時の発症の

経過を示している。

毒素投与後16時間目に抗毒素を注射した2頭 (Nos. 97, 98) はともに生残ったが、うち1頭 (No.97) では4日目に軽度のマヒが見られ、約3日間続いて回復した。No.98には全く異常は認められなかった。

毒素投与後18時間目に抗毒素を注射した2頭のうち、1頭 (No.96) は生残ったが、軽い食欲不振および後肢のマヒを呈した後、回復した。他の1頭 (No.95) は、毒素投与後24時間で食欲不振および後肢のマヒを呈し、63時間後に死亡した。

20時間目に抗毒素を注射する予定であった2頭のうち、1頭 (No.105) は、19時間目に死亡したので抗毒素は注射できなかった。残る1頭 (No.104) は、27時間後に食欲不振および後肢のマヒを呈し、ついでマヒは前肢に及び、呼吸困難を示して35時間後に死亡した。

これら3群のウサギのうち、血中毒素の証明されたのは6頭中4頭であり、うち3頭が死亡した。その血中毒素量は、2.8~5.6マウス IPLD₅₀/mlであった。6頭中2頭には血中に毒素が証明されず、これらはいずれも生残った。

第3図には、4.26 POLD₅₀の毒素を投与した後、それぞれ20、22、24、28、30、32および34時間後に、500IUの抗毒素を注射した7群のウサギについての結果が示されている。

毒素投与後20時間目に抗毒素を注射した2頭はともに生残ったが、うち1頭 (No.111) には軽度の食欲不振が認められた。他の1頭 (No.110) には全く異常はなかった。

No.	Death time (hr)	Toxin in blood	Course of illness										
			20	24	36	48	60	3	5	7	11	12	
110	Surv.	-	↓										
111	Surv.	-	↓	—									
118	Surv.	-	↓										
119	Surv.	-	↓										
108	71:30	2.8	↓	—	—	—	—	—	—				
109	52	2.8	↓			—	—	—	—				
120	Surv.	-	↓										

Toxin: 4.26 poLD₅₀
Antitoxin: 500 U

Fig. 3-1. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

22時間目に抗毒素を注射した2頭 (Nos. 118, 119) は、全く異常を示さなかった。

24時間後に抗毒素を注射した3頭のうち、1頭 (No. 120) は、全く異常を示さず生残った。1頭 (No. 108) は、抗毒素注射時に既に発症していたが、3日後に死亡した。他の1頭 (No.109) は、抗毒素の注射時には異常はなかったが、46時間後に発症し、速かな経過をとって、52時間目に死亡した。呼吸困難は死の約1時間半前から認められた。

28時間後に抗毒素を注射した4頭のうち、3頭は生残った。うち1頭 (No.107) には軽度の食欲不振と後肢のマヒが認められたが、後に回復した。他の2頭 (Nos. 123, 124) には全く異常は認められなかった。残る1頭 (No.106) は、抗毒素の注射時既に食欲不振および後肢のマヒを呈していたが、40時間後に死亡した。

毒素投与の30時間後に抗毒素を注射する予定であった4頭のうち、1頭 (No.101) は経過が早く、注射の直前に死亡した。他の3頭はいずれも生残ったが、うち1頭 (No.101) は食欲不振を示し、数日間続いた後回復した。他の2頭 (Nos. 125, 126) には全く異常を認めなかった。

32時間後に抗毒素を注射した2頭のうち、1頭 (No. 90) は、48時間後に食欲不振および後肢のマヒを呈し、12日後まで持続したが回復して生残った。他の1頭 (No.99) は、これとほぼ同じ頃に発症し、6日目に死亡した。

34時間後に抗毒素を注射した2頭のうち、1頭 (No. 102) は全く異常を示さなかった。他の1頭 (No.103) は、3日目から食欲不振および後肢のマヒを呈し、12日目に死亡した。

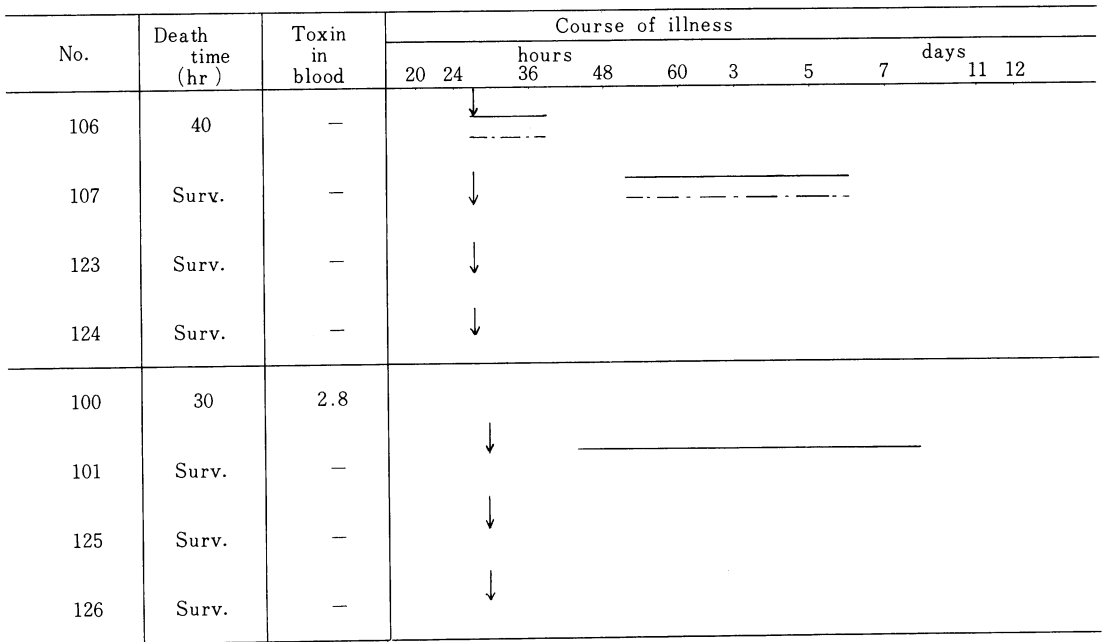


Fig. 3-2. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

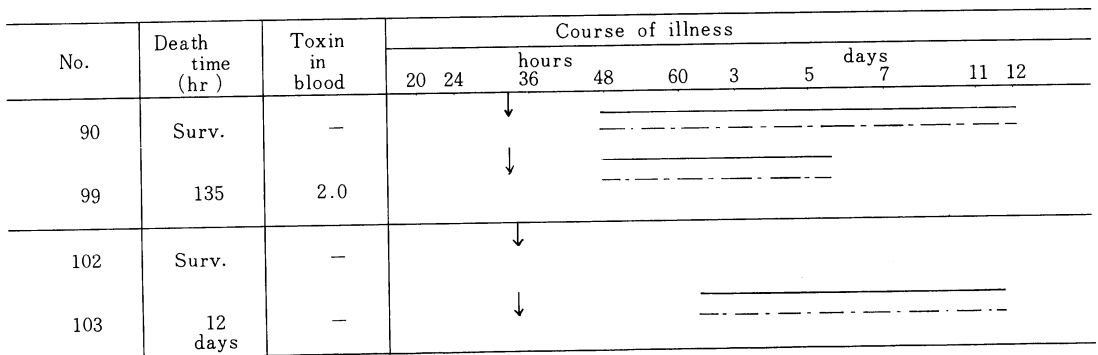


Fig. 3-3. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

これら7群計19頭のウサギについては、毒素投与後6時間目の血中の毒素量を測定した。19頭中15頭には血中に毒素が証明されなかったが、残る4頭には2.0~2.8マウス IPLD₅₀/mlの毒素が証明された。血中に毒素の証明されたウサギで生残ったものではなく、一方血中に毒素が証明されないにもかかわらず死亡したものは、15頭中僅かに2頭のみであった。

既に述べたように、4.26 POLD₅₀の毒素のみを与えて抗毒素を注射しなかった対照群では(第1図)、3頭中2頭に血中毒素は証明されなかったが、これらもすべて死亡している。従って、血中に毒素の証明されない例では、抗毒素の効果が期待できるであろうと推定された。

第4図には、8.52 POLD₅₀の毒素を投与した後、それぞれ12, 18, 21および24時間の間隔で、1,000IUの抗毒素を注射した4群のウサギの結果が示されている。

毒素投与後12時間および18時間目に抗毒素を注射した各2頭のウサギは、いずれも生残ったが、18時間後に抗毒素注射を受けた2頭(Nos. 75, 76)では、軽い食欲不振が認められた。

21時間後に抗毒素を注射した2頭のうち、1頭は生残り、他は5日目に死亡した。生残った1頭(No74)では、26時間後に食欲不振となり、これは8日間以上も継続した。また3日目に後肢のマヒを認めたが、これは数日で回復した。死亡したウサギ(No73)では、最初に後肢のマヒが現われ、食欲不振に陥り、更に呼

吸困難となって、103時間後に死亡した。

24時間後に抗毒素を注射する予定であった2頭のうち、1頭(No55)は抗毒素の注射以前に死亡した。他の1頭(No56)は、抗毒素の注射時既に食欲不振を示していたが、速かに後肢のマヒ、呼吸困難を呈して、30時間後に死亡した。

なおこれら8頭のウサギについて、毒素投与後6時間目の血中毒素を測定したところ、8頭中4頭には毒素は検出されず、残る4頭には2.0~5.6マウス IPLD₅₀/mlの毒素が検出された。毒素の検出されたウサギのうち生残ったのは、1頭のみであったが、毒素の検出されなかった4頭はすべて生残った。

第5図には、4.26 POLD₅₀の毒素を投与して、それぞれ32時間および36時間目に、1,000IUの抗毒素を注射した2群のウサギの結果が示されている。

32時間後に注射を受けたウサギは、2頭とも異常を示すことなく生残った。

36時間後に注射を受けた4頭のうち、1頭(No80)は、何の異常も示さず生残ったが、残る3頭(Nos. 81, 82, 83)は死亡した。これらはいずれも抗毒素の注射時すでに食欲不振と後肢のマヒを呈していて、その後呼吸困難を示し、それぞれ38時間、38時間30分および40時間30分後に死亡した。

なおこれら6頭のウサギについて、毒素投与後6時間目の血中毒素量を測定した。その結果、6頭中4頭には毒素が証明されず、残る2頭にはいずれも2.0マ

No.	Death time (hr)	Toxin in blood	Course of illness																	
			12	18	24	36	48	3	5	7	10	11								
71	Surv.	-	↓																	
72	Surv.	2.8	↓																	
75	Surv.	-	↓					—												
76	Surv.	-	↓					—												
74	Surv.	-	↓					—												
73	103	2.0	↓					—												
55	20	5.6	↓					—												
56	30	2.0	↓					—												

Toxin: 8.52 poLD₅₀
Antitoxin: 1,000 U

Fig. 4. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

ウス IPLD₅₀/ml の毒素が証明された。毒素の証明されなかった4頭中、3頭は生残った。

以上のことから、毒素投与後6時間目に採取した血液中に、毒素の証明された動物では、抗毒素による救命効果が期待できず、また抗毒素の注射時において、既に客観的症狀の認められている動物では、抗毒素の救命効果が見られないことを知った。

抗毒素注射の時期によるウサギの死亡時間の変化は、第6図および第7図に示されている。上段には500IUの抗毒素投与群を、下段には1,000IUの抗毒素投与群を示した。横軸の時間のスケールの上には、抗毒素を

投与しなかった対照群の生死が示されている。縦軸は毒素投与から抗毒素注射までの間隔を示す。また括弧内の数字は、毒素投与後6時間目の血中毒素量を示している。

第6図は、8.52 POLD₅₀の毒素を投与した群で、対照の4頭中2頭は20時間以内に、1頭は33時間目、残る1頭は145時間目に死亡している。これに対して500IUの抗毒素は16時間後まで、1,000IUの抗毒素は18時間後まで救命効果を示したが、その後は血中に毒素の証明されなかった動物にのみ救命効果が見られた。

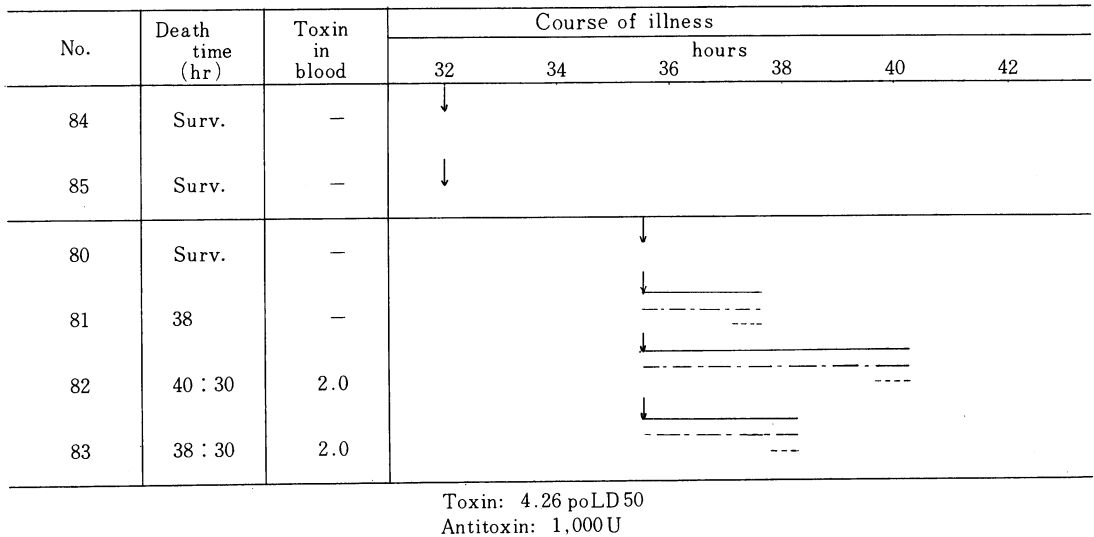


Fig. 5. Onset and duration of signs in rabbits administered toxin and antitoxin

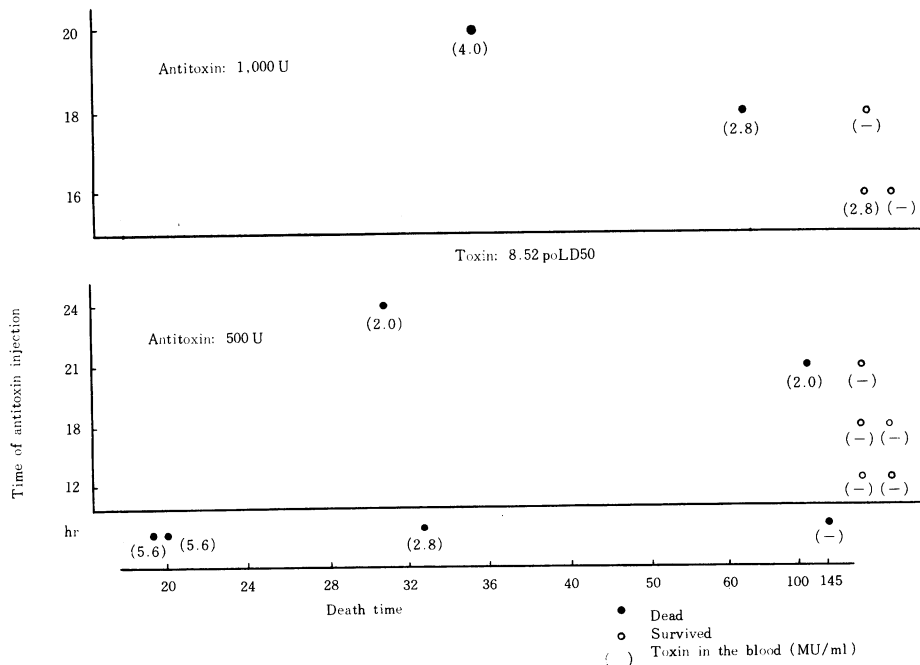


Fig. 6. Time intervals between type A antitoxin injection and death of rabbits

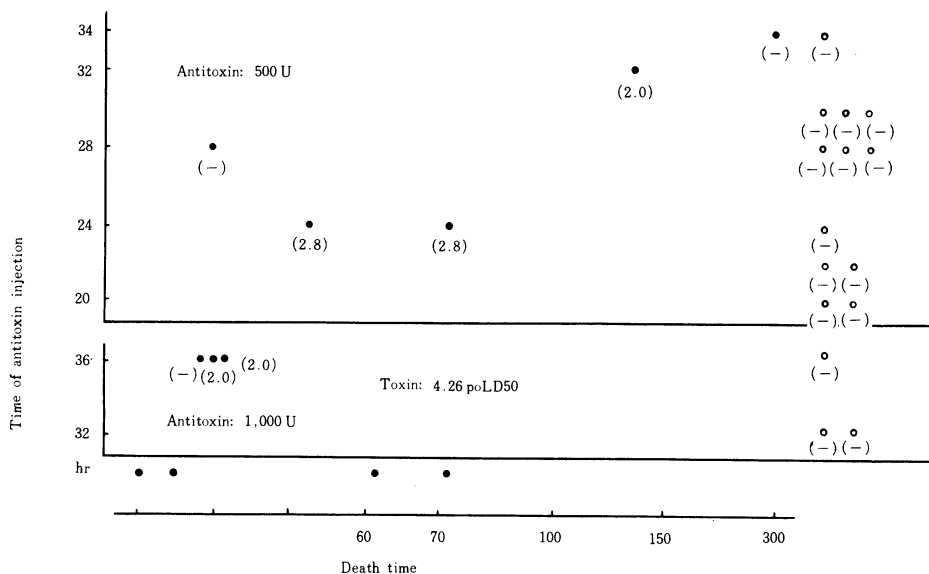


Fig. 7 Time intervals between type A antitoxin injection and death of rabbits

第7図は、4.26 POLD₅₀の毒素を投与した群で、対照の4頭はすべて死亡している。これに反して、20時間および22時間後に500IUの抗毒素の注射を受けた群では、すべてが生残り、24時間後の注射では3頭中2頭が死亡した。その後は再び生残るものが増えて、28時間後には4頭中3頭が、また30時間後には3頭すべてが生残り、32時間および34時間後でも半数が生残った。その理由のひとつとして、生残った群には血中毒素の証明されなかったウサギの多いことも挙げられようが、またこのような paradoxical な現象は、マウスを用いた実験¹⁾においても認められており、おそらくはE型の場合⁵⁾と同様に、アナフィラキシーに基づく現象であろうとも考えられる。

1,000IUの抗毒素を注射した場合には、32時間後では2頭いずれも生残ったが、36時間後に注射した群では、4頭中3頭が死亡した。

以上の実験結果から、毒素投与後ある時間までは抗毒素による救命が可能であり、この抗毒素の有効な期間は、毒素量が増せば短くなり、また抗毒素量を増せばある程度延長し得ることが知られた。しかしその後の抗毒素の救命効果は、経口投与した毒素が血中に出現するか否かによって、著しく影響されることを知った。

II サルを用いた実験

ボツリヌスA型毒素 Lot 8の種々の量を、8頭のサルに与え、up-and-down method⁶⁾によってその経口毒性を測定した。結果は第1表および第8図に示す通りである。

この成績から、Lot 8の毒素のサルに対する経口毒性は、94.34 POLD₅₀/mlと計算され、1サル POLD₅₀は、0.0106mlと算出された。

本毒素のマウスに対する経口毒性は、第1報⁶⁾に述

Table 1. Oral toxicity of type A toxin (Lot 8) for monkeys

No.	Weight kg	Sex	Amount of toxin		Death time	Toxin in the blood (mouse IPLD50/ml)					
			ml	POLD 50		2	4	6	8	24	After death
6	2.0	F	0.06	5.66	79:00	0	2.8	0	0	0	0
5	2.6	M	0.03	2.83	35:00	0	5.6	4.0	4.0	2.0	2.0
8	1.7	M	0.015	1.415	40:00	0	5.6	5.6	5.6	4.0	0
3	2.6	M	0.015	1.415	136:00	0	5.6	0	0	0	0
7	2.3	M	0.0075	0.708	Surv	0	0	0	0	0	
1	3.2	M	0.0075	0.708	Surv	0	2.0	2.0	2.0	0	
4	2.4	F	0.0037	0.354	Surv	0	0	0	0	0	
2	2.6	M	0.0018	0.177	Surv	0	0	0	0	0	

No	Toxin POLD ₅₀	Death time	Course of illness											
			2	4	6	8	hr			days			4	5
6	5.66	79 : 00	(0)(2.8)(0) 0) ----- ----- ---											
5	2.83	35 : 00	(0)(5.6)(4.0)(4.0) ----- ----- ---											
8	1.415	40 : 00	(0)(5.6)(5.6)(5.6) ----- ----- ---											
3	1.415	136 : 00	(0)(5.6)(0)(0) ----- ----- ----- ----- -----											
7	0.708	Surv	(0)(0)(0)(0) ----- ----- -----											
1	0.708	Surv	(0)(0)(0)(0) ----- ----- -----											

----- Slowness in action; cessation of food
 ----- Muscular weakness; paralysis of legs
 ----- Respiratory distress
 ----- Toxin in the blood (mouse IPLD₅₀/ml)

Figure 8. Onset and duration of signs in monkeys administered toxin orally

べたように 2,400 LD₅₀/ml であるから、その 1 マウス POLD₅₀は、0.000417ml と計算され、従って、マウスの体重を 25 g、サル の体重を 2 kg とした時の、体重 1 g 当りの 1 POLD₅₀毒素量のマウス対サル の比は、1 : 0.318 となり、サルの方が明らかに高い感受性を示した。

また第 1 表に示されるように、毒素は投与後 4 時間目から血中に出現し、その後の消長には個体差が認められた。死亡した 4 頭 (Nos. 6, 5, 8, 3) には血中に毒素が証明されたが、生残った 4 頭中 1 頭 (No. 1) にも血中に毒素が証明された。

これらの動物中、少量の毒素を投与した 2 頭 (Nos. 4, 2) においては、全く異常を認めなかったが、0.708 POLD₅₀の毒素を投与した 2 頭 (Nos. 7, 1) においては、第 8 図に示されるように、食欲不振および動作緩慢などの症状が現われ、後に消失した。

以上の成績に基いて、投与毒素量を 4.7 サル POLD₅₀ とし、3 群のサルにこれを経口投与した。第 I 群は抗毒素を注射しない対照群、第 II 群は、毒素投与後 36 時間目に 500IU の抗毒素を注射する群、第 III 群は、毒素投与後 48 時間目に、同じく 500IU の抗毒素を注射する群である。その結果は第 9 図に示した通りである。

対照の第 I 群は、3 頭中 2 頭 (Nos. 12, 18) が生残り、1 頭 (No. 19) のみが 29 時間 50 分後に死亡した。生

残った 2 頭 (Nos. 12, 18) では、血中に毒素が証明されず、軽度の発症は認められたが、後に回復した。死亡した 1 頭では、毒素投与後 4 時間目の血中に、4 マウス IPLD₅₀/ml の毒素が証明され、6 時間目には 5.6 とやや上昇したが、8 時間目には 2 マウス IPLD₅₀/ml に低下した。20 時間後から時々横臥し、軽度の後軀マヒを示した。その後呼吸困難が次第に著明となり、毒素投与の 29 時間 50 分後に死亡した。

第 II 群は、4.7 POLD₅₀の毒素を経口投与したのち、36 時間目に 500IU の抗毒素を筋肉内に注射する予定の群であったが、4 頭中 1 頭 (No. 13) は、抗毒素の注射前に死亡した。抗毒素の注射を受けた 3 頭中 2 頭 (Nos. 14, 16) が生残り、1 頭 (No. 15) が死亡した。生残った 2 頭では、血中に毒素が証明されなかったが、食欲不振、軽度のマヒを呈し、後に回復した。抗毒素の注射前に死亡した 1 頭は、毒素投与後 4 時間目の血中に 8 マウス IPLD₅₀/ml の毒素が証明され、6 時間目および 8 時間目にも 5.6 マウス IPLD₅₀/ml の毒素が認められた。動物は 20 時間後には横臥し、間もなく呼吸困難を示した。25 時間 10 分後に死亡した。No. 15 は、毒素投与後 4 時間目の血中には毒素は証明されなかったが、抗毒素の注射前から軽度の後軀マヒを示し、注射後数時間で呼吸困難、瞳孔散大を呈し、毒素投与の 47 時間後に死亡した。

Antitoxin after	No	Death time	Course of illness												
			2	4	6	8	hr		days						
							24	2	3	4	5	6			
-	12	Surv	(0)(0)(0)(0)	_____											
	18	Surv	(0)(0)(0)(0)	_____											
	19	29 : 50	(0)(4)(5.6)(2)	_____											
36hr	13	25 : 10	(0)(8)(5.6)(5.6)	_____											
	14	Surv	(0)	_____											
	15	47 : 00	(0)	_____											
	16	Surv	(0)(0)(0)(0)	_____											
48hr	9	Surv	(0)(0)(0)(0)	_____											
	10	125 : 00	(0)(0)(0)(0)	_____											
	11	35 : 00	(0)(4)(4)(4)	_____											
	17	22 : 00	(22.6)(16)(16)	_____											

Toxin: 4.7 POLD50 Antitoxin: 500 IU : Antitoxin injected
: Toxin in the blood

Figure 9. Onset and duration of signs in monkeys administered toxin and antitoxin

第Ⅲ群は、4.7 POLD₅₀の毒素を経口投与した後、48時間目に500IUの抗毒素を筋肉内に注射する予定の群であったが、4頭中2頭(Nos. 11, 17)は抗毒素の注射以前に死亡し、残る2頭のうち1頭(No.9)は生残ったが、1頭(No.10)は死亡した。注射前に死亡した2頭のうち、1頭(No.17)では、毒素投与後4時間目に22.6マウス IPLD₅₀/ml という高い値の毒素が血中に証明され、6時間目、8時間目にも16マウス IPLD₅₀/mlの毒素が証明された。このサルは速かな経過をとって、22時間後に死亡した。他の1頭(No.11)では、毒素投与後4、6および8時間目の血中に4マウス IPLD₅₀/mlの毒素が証明され、20時前後から食欲不振に陥り、や

がて四肢のマヒ、眼瞼下垂が現われ、30時間後には起立不能となり、35時間で死亡した。

抗毒素の注射を受けた2頭のうち1頭(No.9)は、血中に毒素は証明されなかったが、抗毒素注射の少し前から後軀のマヒを呈した。抗毒素注射後も、食欲不振、瞳孔散大などの症状を呈したが、その後徐々に回復して生残った。No.10も血中に毒素は証明されなかったが、36時間目位から瞳孔散大、眼瞼下垂を呈し、抗毒素注射前から誤嚥などの症状を示した。これらの症状は抗毒素の注射後も回復せず、四肢のマヒなども加わって、118時間後に横臥し、125時間で死亡した。

以上のサルの実験は、E型毒素の場合にくらべて、

A型毒素の不安定性によると思われるバラツキが大きく、毒素対照が3頭中2頭生残り、抗毒素を注射する予定の群に速かに死亡する例が現われて、その治療効果の判定は不可能に終わった。

ただこの実験の結果から、サルにおいても、ウサギの場合と同じく、E型の場合にくらべてA型では経口投与した毒素の血中に出現する頻度は低く、またその血中毒素量も著しく少ないことが知られた。更にサルの死亡時間も、E型では3.24~4.00 POLD₅₀の毒素を投与した4頭が、いずれも15~20時間で死亡しているのに対し、A型では4.7 POLD₅₀の毒素を投与した3頭のうち、2頭は生残った。いずれも毒素の毒性は、予めup-and-down method によって計算されたものであり、E型毒素の安定した毒性にくらべて、A型毒素の著しく不安定なことが知られた。

考 察

以上、ウサギおよびサルを用いて、A型ボツリヌス中毒における血清療法の効果に関する実験を試みたが、得られた結果は、既に報告した⁷⁾ E型中毒におけるそれと、かなりの相違を示した。

ウサギを用いた実験においては、A型毒素の消化管からの吸収を扱った前報²⁾にも述べたように、毒素投与から死亡までの時間に著しい変動が見られ、また毒素の流血中への出現が極めて不安定であった。例えばE型では、7.2ウサギ POLD₅₀の投与によって、4頭すべてのウサギの6時間目の血中には512マウス IPLD₅₀/ml以上の毒素が証明され、かつ4頭とも6~7時間以内に死亡したのに反し、A型では、8.52ウサギ POLD₅₀の毒素の投与によって、2頭中1頭の血中のみ毒素が証明され、その毒素量も僅かに2.8マウス IPLD₅₀/mlに過ぎなかった。またその死亡時間は、148時間および33.5時間と、E型に比べて著しい延長を示した。

更にE型の場合には、7.2 POLD₅₀の毒素を投与されたすべてのウサギが、毒素投与後2時間以内に発症を示しているのに対し、A型では、8.52 POLD₅₀の毒素投与で、20~30時間後にはじめて症状を現わしている。

このような相違の現われる理由については、既に前報²⁾で考察したが、A型中毒に際して、血中の毒素量が著しく少なく、また発症、死亡までの時間が長いことは、E型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予想された。しかしながらこの予想は、必ずしも当を得たものではないことが、実験の結果明らかになった。

A型中毒とE型中毒における抗毒素の効果を比較するに当たって最も困難な点は、上述のような両者の中毒における動物の死亡時間の差異である。例えばE型に

おいては、3.6 POLD₅₀の毒素を与えたウサギは、7~8時間で死亡しており、同量の毒素を投与した後、1時間目に抗毒素(840IU)を注射した群は生残っているが、2時間以後に抗毒素を注射した群はすべて死亡している。

これに対してA型中毒では、4.26 POLD₅₀の毒素を与えた場合、3頭のウサギの死亡時間は35~75時間と変動が大きく、500IUの抗毒素の注射は、毒素投与後22時間までは動物を救い得たが、その後は必ずしも効果を期待し得ず、抗毒素を1,000IUまで増した場合、毒素投与後32時間目までは動物を救い得た。

このことは、一見A型においては、E型よりもかなり後期に到るまで抗毒素の効果が認められること示すかのように思われるが、動物の血中毒素の有無を考慮に入れるならば、A型中毒においては、抗毒素注射の時期よりもむしろ血中への毒素の出現の有無が、抗毒素の効果と密接な関連を示すことが知られるであろう。

血中毒素のレベルと抗毒素の効果との関係は、E型においても明らかに認められており、動物が発症する以前であっても、多量の毒素(100マウス IPLD₅₀/ml以上)が既に血中に出現していれば、抗毒素の効果は認められなかった。A型の場合においても、血中毒素の有無が抗毒素の効果と関連をもつことは明らかである。すなわち、8.52 POLD₅₀の毒素を投与した群では、14頭中6頭には血中に毒素が証明されなかった。この6頭は、抗毒素注射の時期と関係なく、すべて生残った。これに反して、残る8頭には血中に毒素が証明されており、このうち抗毒素注射によって生残ったのは僅かに2頭のみであった。

4.26 POLD₅₀の毒素を投与した群では、25頭中19頭には、血中に毒素は証明されず、この19頭のうち16頭は、抗毒素の量あるいは注射の時期と関係なく生残っている。これに反して、血中に毒素の証明された6頭中、生残ったものは全くない。従ってA型の場合には、一旦血中に毒素が出現すれば、抗毒素の効果は極めて期待し難いもののように思われる。

一方、8.52および4.26 POLD₅₀の毒素を投与した後、抗毒素を注射しなかった対照群では、血中に毒素の証明されない動物もすべて死亡しているから、毒素投与後に血中毒素の証明されなかった例では、抗毒素の効果があったものと考えてよいであろう。

サルを用いた実験においては、A型毒素を投与した場合の動物の死亡時間の変動が更に著しく、例えば予めup-and-down method で測定した POLD₅₀の値に従って試みた治療実験の毒素対照が、必ずしも予定通りには死亡しなかった。また治療群においても、予想された死亡時間より遙かに短時間で死亡するものがあ

て、血清の治療効果に関しては、必ずしも一定した結論を下し得なかった。

今回のサルの実験においても、A型毒素の血中への出現は極めて不安定で、4.7POLD₅₀の毒素を経口投与した11頭のうち、7頭までは血中に毒素の出現が証明されなかった。この7頭中5頭は、抗毒素注射の有無にかかわらず生残っており、一方血中に毒素の証明された4頭は、抗毒素注射の有無にかかわらず速かに(22~35時間)死亡している。このことは、既に述べたウサギの場合と軌を一にするもので、A型中毒においては、血中への毒素の出現が、動物の予後ならびに抗毒素の効果と極めて重大な関係をもつであろうことを物語っている。

以上のように、E型中毒においては、少量の血中毒素の存在は抗毒素の治療効果にほとんど影響を与えないのに反して、A型の場合には、血中に僅かでも毒素が証明されれば、ほとんど抗毒素の効果を期待できないという事実が知られた。この理由はどこにあるのであろうか。

抗毒素の効果と云う点から見れば、A型における僅かな量の血中毒素は、E型における高いレベルの血中毒素に比較し得ると考えられよう。このことは、A型中毒の場合、毒素が血中に証明されるような例においては、毒素とその侵襲部位の組織との結合が、早期において既に不可逆的に起っていることを意味し、一方E型においては、かなり高いレベルの毒素が血中に証明されるような例において、はじめて早期に不可逆的な結合が起っていることを意味するのではないであろうか。A型に比べて、E型中毒ではその潜伏期が著しく短いことは、毒素とtarget cellとの不可逆的な結合の起る以前に、かなりの量の毒素が侵襲点に到達していることを意味するのかも知れない。いずれにしても、このような両者のpathogenesisの差が、毒素分子のどのような差異に起因するものかは不明である。

既に前報²⁾において、A型毒素とE型毒素の腸管からの吸収の問題を論じた際に、われわれは、この両者の毒素生成の過程の差が、吸収率の差に関連するであろうという推定を述べた。すなわち、proteolytic groupに属するA型においては、毒素の大部分は既に活性化された毒素として存在するのに反し、non-proteolytic groupに属するE型においては、大部分の毒素が不活性のprecursorとして存在している⁸⁾。前者は消化管内の酵素による不活化に対して不安定であり、後者はむしろ消化管内で活性化されて毒性を増し^{4, 9)}その後吸収されるものと推定された。従って、A型における毒素の吸収率は、E型に比べて著しく低いのであろうと考えられた。

このようなA型菌とE型菌における毒素産生のprocessの差は、血中から侵襲部位への毒素の抗散速度、あるいは侵襲部位におけるtarget cellとの結合力と何らかの関連性をもつであろうか。もし何らかの関連性があるものとすれば、それは両者の毒素分子におけるどのような性状の差によるものであろうか。これらが今後に残された最も重要な課題となるであろう。

結 論

ウサギおよびサルに種々の量のボツリヌスA型毒素を経口投与し、その症状の発現を観察した。また毒素の投与後、種々の間隔で一定量の抗毒素血清を注射し、その効果を観察した。これらの知見を、既に得られたE型中毒における成績と比較して、次のような結論を得た。

1. A型中毒においては、ウサギ、サルともに、経口投与された毒素の流血中への出現が著しく不安定であった。ウサギでは、4.26~8.52POLD₅₀のA型毒素を投与した後、血中に毒素の証明されたのは、39頭中14頭にすぎなかった。サルでは、4.7POLD₅₀の毒素を投与した後、血中に毒素の証明されたのは、11頭中4頭にすぎなかった。

2. 抗毒素の効果は、その量および注射の時期とは無関係に、血中に毒素の証明された動物ではほとんど無効であった。これに反して、血中に毒素の証明されない動物では、ある程度その効果を認めることができた。

3. E型中毒においては、経口投与された毒素はconstantに流血中に証明され、その量の少ない場合には、動物の発症後でも抗毒素の効果が認められた。これに反してA型中毒においては、僅かな量でも血中に毒素が証明された場合には、抗毒素の効果を認め難かった。

(この研究にはCenter for Disease Control, Atlanta, U. S. A. の科学研究費CC 00173の交附を受けた。)

文 献

- 1) 小野悌二, 飯田広夫: 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報, **21**, 113-121, 1971
- 2) 小野悌二, 亀山邦男, 唐島田隆, 山口勲, 飯田広夫: ボツリヌスA型中毒の血清療法に関する実験的研究(第2報), 北海道立衛生研究所報, **21**, 122-128, 1971
- 3) 唐島田隆, 小野悌二, 亀山邦男, 山口勲, 神沢謙

- 三, 飯田広夫: 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報, **19**, 1-5, 1969
- (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). 北海道立衛生研究所報, **19**, 9-16, 1969
- (5) 小野悌二, 亀山邦男, 山口勲, 唐島田隆, 神沢謙三, 飯田広夫: ボツリヌス毒素および抗毒素に起因するアナフィラキシーについて. 北海道立衛生研究所報, **20**, 1-11, 1970
- (6) Brownlee, K. A., Hodges, J. L. and Rosenblatt, M.: The up-and-down method with small samples. J. Amer. Statist. Ass., **48**, 262-277, 1953
- (7) 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). 北海道立衛生研究所報, **19**, 17-25, 1969
- (8) 飯田広夫: Cl. botulinum の毒素産生に関する実験的研究. 北海道立衛生研究所報, **15**, 1-9, 1965
- (9) Dolman, C. E., Darby, G. E. and Lane, R. F.: Type E botulism due to salmon eggs. Canad. J. Publ. Health, **46**, 135-141, 1955

Experimental Studies on Serum Therapy
in Type A Botulism (Part III)

Takashi Karashimada, Teiji Ono and
Kunio Kameyama
(Hokkaido Institute of Public Health)
Hiroo Iida

(Hokkaido University School of Medicine)

Various doses of *Clostridium botulinum* type A toxin were administered orally to rabbits and monkeys, and the clinical course of these animals was observed. Also a definite amount of type A antitoxin was injected after various intervals of toxin administration, and the survival of the animals was observed. The results obtained were compared with those obtained with type E toxin and antitoxin.

1) The appearance of type A toxin in the blood was very unstable both in rabbits and monkeys as compared with type E.

2) Independently of the quantity and time of administration, the therapeutic effect of antitoxin was not observed in animals which showed type A toxin in the blood. On the other hand, the effect of antitoxin was observed to some degree in animals which showed no toxin in the blood.

3) In type E intoxication, toxin was constantly demonstrated in the blood both in rabbits and monkeys. The effect of antitoxin was observed in animals of low toxin titer in the blood even if it was administered after the onset of the disease. On the contrary, no effect of antitoxin was observed in animals of high toxin titer in the blood even if it was given before the appearance of the symptoms.