赤痢菌凝集素と感染防禦能との関係

中 谷 林 太 郎

国立予防衛生研究所細菌部
(部長 福見秀雄)

〔受付: 10月28日1956年〕

赤痢菌に対する免疫の程度を測定する1方法として、マウスの被動感染防禦試験が用いられ、恢復期赤痢患者血清および赤痢菌で免疫された人、動物の血清は同種菌および抗原的に近縁な菌に対する感染防禦能が正常血清にくらべ高度であることが認められている。またこれら免疫血清の凝集素価が正常血清にくらべて上昇していることも周知の事実である。しかるにマウス被動感染防禦能と凝集素価との間の定量的関係についてはまだ明確な結論をのべたものがなく、凝集素が感染防禦の主役を演じているか否かという本質的な問題が残されている。Weil & Farsetta¹⁾ は孵化鶏卵を用い Flexner 菌の感染防禦試験を行い、型特異抗原の重要性を論じ、また Cooper & Keller²⁾ は同型菌による免疫能が異種菌に対するよりもすぐれていることを結論している。

一方、抗体検出法としての敏感度の点からみると、Cooper, Tepper & Keller³⁾ は被動感染防禦試験が凝集反応よりも敏感であるとのべているが、このことは感染防禦試験が好んで免疫度の測定に使用されてきている理由でもある。これと別に、Hayes⁴⁾ は *Shigella sonnei*, *E. coli* 等で、Neter 等⁵⁾ は *E. coli* で、Landy & Webster⁶⁾ は精製 Vi 抗原で赤血球を感作し、これを抗原として凝集反応を行う方法を示したが、これらの成績はこの方法も敏感度の高いことをうかがわせるものである。

こゝには、赤痢菌抗血清の凝集素価を菌体凝集反応および赤血球凝集反応によつて測定し、それらの値と、定量的に測定したマウス被動感染防禦能の値とを比較し、その間の平行性および感度の優劣について考察した結果、ならびに *Shigella flexneri* における型抗原と群抗原の感染防禦における役割にかんする考察をのべる。

材料および方法

菌株: *Shigella flexneri* 2b, P. R. 10307 B, *S. flexneri* 2a, Km-8, *S. flexneri* 3, R-137, *S. sonnei*,

r-10を凝集原、赤血球感作原、および攻撃菌として使用した。これらの菌を5%ムチンに浮游したものを0.5 mlをマウスの腹腔内に注射した場合のLD₅₀は *S. fl.* 2b, P. R. 10307 B は28±24, *S. fl.* 2a, Km-8 は4,000 ± 350, *S. fl.* 3a, R-137 は18 ± 14, *S. sonnei*, r-10は10以下であつた。これらの菌は毒力を測定した時と同一培養の一部を凍結乾燥しておき用に応じて使用した。

抗血清: つぎの10種の抗血清を非動化して使用した。Ew 40-No. 4 (*S. fl.* 2b, P. R. 10307 Bにて免疫した家兎血清), 2b-1, 2b-2, 2b-5, 2b-7 (*S. fl.* 2bに罹患した赤痢患者血清), S-No. 8, S-No. 10 (*S. sonnei*, 渡枝にて免疫した家兎血清), Ew 33 (*S. sonnei*, I, 1196にて免疫した家兎血清), S-1, S-2 (*S. sonnei*に罹患した赤痢患者血清)。

菌体凝集反応: 寒天培地に37°C 18時間培養した菌を0.01%マーゾン加生理食塩液に光電比濁計で測定して10⁹/mlになるよう浮游したものを抗原とした。倍数稀釈した血清列に抗原菌液を加え、50°C 18時間保温後判定し、肉眼で凝集を認めた最終血清稀釈数をもつて凝集素価とした。

赤血球凝集反応: 寒天平板培地に37°C 18時間培養した菌を100mg(湿菌)/mlに生理食塩液に浮游し、100°C 60分間煮沸後、3,000 rpm 30分遠心沈澱した上清と10%の鶏赤血球浮游液とを等量混合し、37°Cに2時間保ち、その間ときどき振りまぜ、さらに4°Cに1夜放置した。吸着されない抗原を除くために感作赤血球浮游液を生理食塩液で4回以上洗滌した。これを生理食塩液で0.25%になるように浮游し感作血球として使用した。この抗原0.5 mlを倍数稀釈血清列(各0.5 ml)に加えて4°Cに2時間放置した。凝集の pattern の判定は Salk⁷⁾

NAKAYA Rintaro: Relationship between agglutinative and mouse-protective antibodies of *Shigella* immune serum. Department of Bacteriology, The National Institute of Japan. —Jap. J. of Bact., 12(1), 35-40, 1957.

の方法にしたがい、赤血球凝集素価を決定した。

マウス被動感染防禦試験：1. 攻撃菌液、毒力測定を行つたときに使用した同一培養の菌を多数のアンプルに分注して凍結乾燥して保存し、実験時に開封、溶解、培養して用いた。アンプルを攻撃予定時より22時間前に開封し少量のペプトン・ブドウ糖培地（組成：ポリペプトン・ブドウ糖培地（組成：ポリペプトン（武田栄養化学）3.0 g, ブドウ糖 0.5 g, 塩化ナトリウム 0.5 g, 蒸留水 100 ml, pH7.60以下 pgb と略す）にとかし、これを10 ml の pgb に加え4時間培養した。その 0.2ml ずつを5本の10 ml 入りの pgb に加え37°C 17時間培養した。攻撃の予定時間より1時間前に5本の培養から5 ml ずつとって混合し、これを原液として各菌の毒力に応じて5%ムチンで希釈してその0.5 ml 中に約1,000 LD₅₀に相当する菌数を含むようにし、一方、30~300/ml の菌数を含むと考えられる1段階の希釈液の1 ml ずつを6枚の平板に分注、寒天培地で混釈培養し生菌数を測定した。これらの平板は37°C48時間培養後生菌数を算定した。各菌の上記原液中の菌数はそれぞれ *S. fl.* 2 b, P. R. 10307 B は40~70×10⁷/ml, 2 a, Km-8 は35~40×10⁷/ml, 3 a, R-137 は70~80×10⁷/ml, *S. sonnei*, r-10 は44~54×10⁷/ml で、この範囲内でつねにくり返し可能で一定値を示した。

2. ムチン液。ムチン（granular Type 1701-W. The Wilson Laboratories, Chicago, Ill., U. S. A.）を5%の割合に蒸留水に浮游し、乳鉢で磨砕しながら十分溶解し、5分間 100°C に加熱後、ガーゼで濾過し、一定量ず

つフラスコに分注し、100°C25分間ずつ3日間毎日1回加熱滅菌してから密栓し5°Cの氷室に保存した。これを使用前に 100°C25分間加熱してから沈澱をよく溶かし、冷却後1 N水酸化ナトリウムでpH 7.3~7.4に修正して使用した。全実験を通じて同時に製造したムチン液を使用し、途中でつくりなおすことはしなかつた。実験の前後でムチンの効力に変化は認められなかつたことは Batson, Brown & Oberstein⁹⁾ および Mishulow⁹⁾ の記載と一致した。

3. マウス・市販のマウス（体重15 g）を水と固型飼料で飼育し、雄と雌をわけて10匹ずつ箱に入れて1群として用いた。1段階の希釈の抗血清で被動免疫するに用いたマウス数は雄10匹、雌10匹の2群20匹であつた。

4. 血清希釈と注射量。抗血清をリン酸緩衝生理食塩液で2倍または4倍希釈し、丁度50%防禦点をはさむように最少2段階の希釈液をつくつて使用した。希釈血清は1.0 ml または2.0 ml のツベルクリン用注射器で0.1 ml ずつマウスの腹腔内に注射した、攻撃菌の毒力対照としては緩衝食塩液 0.1 ml を注射した。

5. 被動免疫と攻撃の方法。抗血清または食塩液を注射したマウス群に1時間後1,000 LD₅₀ の5%ムチン浮游菌液を0.5 ml ずつ腹腔内に注射攻撃した。

6. 結果の観察。攻撃後24時間毎に毎日1回72時間まで生死を観察し、72時間後における生残数~総数を記録した。

7. ED₅₀ の求め方。72時間後の各群マウスの生残率をプロビットに変換し、Miller & Tainer¹⁰⁾ の方法で

表 1 菌体凝集反応および赤血球凝集反応成績

血清番号	菌体凝集反応			血赤球凝集反応			差 H-B
	抗原菌	凝集素価 の逆数	B Log (凝集 素価の逆数)	感作菌	凝集素価 の逆数	H Log (凝集 素価の逆数)	
2b-1	<i>Shigella flexneri</i> 2b	40	1.602	<i>Shigella flexneri</i> 2b	160	2.204	0.602
2b-5		80	1.903		640	2.806	0.903
2b-2		160	2.204		640	2.806	0.602
2b-7		320	2.505		1,280	3.107	0.602
Ew 40-No. 4		5,120	3.709		40,960	4.612	0.903
S-3	<i>Shigella sonnei</i>	40	1.602	<i>Shigella sonnei</i>	1,280	3.107	1.505
Ew33		40	1.602		1,280	3.107	1.505
S-1		160	2.204		2,560	3.408	1.204
S-No. 8		320	2.505		5,120	3.709	1.204
S-No. 10		640	2.806		10,240	4.010	1.204
Ew 40-No. 4	<i>S. fl.</i> 2a	5,120	3.709	<i>S. fl.</i> 2a	40,960	4.612	0.903
Ew 40-No. 4	<i>S. fl.</i> 3	160	2.204	<i>S. fl.</i> 3	1,280	3.107	0.903

ED₅₀ を求めその値を血清原液の ml 量であらわした。ただし、生残数が 0 のとき、または全部生残したときはそれぞれ 1/4 匹が生残したこと、または 1/4 匹が死亡したことにしてプロビットに変換した。

成 績

凝集反応: *S. fl.* 2b の抗血清では、菌体凝集素価は *S. fl.* 2b に対し 1:40~1:5,120, *S. fl.* 2a

に対し 1:80~1:5,120, *S. fl.* 3 に対し 1:40~1:320 を示し、赤血球凝集素価は *S. fl.* 2b に対し 1:160~1:40,960, *S. fl.* 2a に対し 1:320~1:40,960, *S. fl.* 3 に対し 1:80~1:1,280 を示した。*S. sonnei* でも同様の傾向で、赤血球凝集素価が菌体凝集素価よりも高い価を示した。これらの成績の一部を表 1 に示した。これらの血清以外の多数の血清についての成績も赤血球凝集素価の方が菌体凝集素価よりもつ

表 2 マウス被動感染防禦試験成績

血清番号	攻撃菌*	抗 血 清 量 [#] ml × 10 ⁻⁵															
		2,500	1,670	1,250	833	625	417	313	156	78.1	39.1	19.5	9.77	4.88	2.44	1.22	6.1
2b-1	<i>Shigella flexneri</i> 2b	17/20 ⁺				1/20											
2b-5								13/20				2/20					
2b-2		20/20				15/20			3/20								
2b-7						11/20			4/20			3/20					
Ew 40-No.4												19/20	18/20	14/20	17/20	13/19	9/20
S-3	<i>Shigella sonnei</i>		7/20		15/20		0/20										
Ew 33				18/20				5/20		1/20							
S-1						19/20		13/20	7/20								
S-No. 8									17/20			10/20	0/20				
S-No.10									18/20			5/20		0/20			
Ew40-No. 4	<i>S. fl.</i> 2a											9/20	7/19	1/20			
Ew40-No. 4	<i>S. fl.</i> 3					13/20		2/20	1/20								

* 攻撃菌量: 1,000 LD₅₀ に相当する菌数を 5% ムチン 0.5 ml に浮游させ腹腔内に注射した。

抗血清量: 0.1 ml に所定量の血清原液が含まれるように食塩液で稀釈したものを腹腔内に注射した。

+ 分子は生残数, 分母は総数を示す。

表 3 マウス被動感染防禦力価

血清番号	攻撃菌	ED ₅₀ ± 標準誤差	1/ED ₅₀	Log 1/ED ₅₀
2b-1	<i>Shigella flexneri</i> 2b	0.013 ± 0.004	78	1.892
2b-5		0.0020 ± 0.0003	495	2.695
2b-2		0.0038 ± 0.0008	262	2.418
2b-7		0.0031 ± 0.0005	320	2.505
Ew 40-No. 4		0.000017 ± 0.000001	60,000	4.778
S-3	<i>Shigella sonnei</i>	0.011 ± 0.002	90	1.954
Ew 33		0.0051 ± 0.0009	196	2.292
S-1		0.0022 ± 0.0004	455	2.658
S-No. 8		0.00052 ± 0.00010	1,930	3.286
S-No.10		0.00031 ± 0.00006	3,200	3.505
Ew 40-No. 4	<i>S. fl.</i> 2a <i>S. fl.</i> 3	0.00018 ± 0.00002	5,400	3.732
Ew 40-No. 4		0.0069 ± 0.0014	146	2.164

図 1 菌体凝集素価および赤血球凝集素価と
マウス感染防禦能との関係

ねに高いことを示した。なお、赤血球凝集素価と菌体凝集素価との差の大きさは *S. sonnei* の場合の方が *S. fl. 2a, 2b*, および 3 の場合に比べて明らかに大きく、有意の差があることが認められた。

マウス被動感染防禦試験：各抗血清はそれぞれの攻撃菌に対して表 2 に示すようなマウスの生残率を与えたが、この成績から ED_{50} を算出した。その値は表 3 にまとめられている。この場合の標準誤差は約 $\pm 20\%$ であった。

凝集素価とマウス被動感染防禦力価との相関について：表 1, 3 に示したように菌体凝集素価および赤血球凝集素価の対数と $1/ED_{50}$ の対数とを求めて、前者を X 軸、後者を Y 軸として相関図をえがいたものが図 1 である。まず菌体凝集素価とマウス感染防禦能との関係についてみると、*S. fl. 2b* 抗血清 5 種にかんする値と *S. sonnei* 抗血清 5 種にかんする値は同一の傾向を示したので、これらをあわせて 10 個の点から回帰式を求めた。この回帰式は $Y = 0.02 + 1.23X$ となり、菌体凝集素価に対するマウス感染防禦力価の相関係数は $r = 0.943$ で 1% 以下の危険率で有意性を示した。同様に赤血球凝集素価とマウス感染防禦力価との関係を求めてみたが、この場合は先に凝集反応の成績でえられたように *S. sonnei* の場合の赤血球凝集素価は *S. fl. 2b* のそれと比較して高い値をとることが示されているので、両者の場合の値をわけて回帰式を求めた。*S. fl. 2b* 抗血清の場合は $Y = -0.90 + 1.21X$ で、相関係数は $r = 0.980$ となり、*S. sonnei* 抗血清の場合は $Y = -2.87 + 1.62X$ となり、相関係数は $r = 0.971$ でいずれも有意の相関を示した。なお、これらの回帰式は実験値とよく一致す

る。

異種の菌型間の交叉免疫：表 1, 2 および 3 の下 2 行に示したものは *S. fl. 2b* (抗原 II : 7, 8, 9) で免疫した抗血清 Ew 40—No. 4 が異種の菌 *S. fl. 2a* (II : 4), *S. fl. 3* (III : 6, 7) に対して示す凝集素価とマウス感染防禦力価の成績で、これは 1 例にすぎないが、この場合も凝集素価と感染防禦力価との間に上記の同種菌の場合にみられた平行関係があることを示唆している。

考 案

Cooper & Keller¹¹⁾ は恢復期赤痢患児の血清中の抗体について、マウス被動感染防禦能および凝集素価を測定して ED_{50} が 0.0004 ml から 0.1 ml で、凝集素価は 1 : 640 から 0 の範囲であつたと報告している。滝田等¹²⁾、滝上、田所¹³⁾、安東等¹⁴⁾および細谷等¹⁵⁾も赤痢ワクチンで免疫した人、または動物の血清および赤痢患者血清を用いて凝集反応、感染防禦試験を行つて、いずれもこれらの血清では菌体凝集素価、感染防禦力価が上昇していることを認めているが、凝集素価と感染防禦力価の間の関連性については余り留意していない。ただ安東等¹⁴⁾が「赤痢クロームワクチン接種後 6 月後には凝集素価は接種前と同程度に下がるが、抗菌抗体価はそれ程下降せず、抗菌抗体価と凝集素価とは必ずしも平行しない。」と結論しており、また、滝上、田所¹³⁾は「患者血清の病初期と恢復期とを比較すると、全例において、多少とも感染防禦能は増加している。また感染防禦能の上昇と、凝集素価の上昇とは、ほぼ平行するようである」とのべているのみである。しかしこれらのいずれの成績も、防禦能測定において使用したマウス数も少く、また実験結果の解析法が不十分であるため、防禦能と凝集素価の間の平行関係について断定的な結論を導くことは妥当でないと考えられる。著者は感染防禦力価測定をかなり定量的に正確に行つて、マウス被動感染防禦力価と菌体凝集素価、赤血球凝集素価の相関性を調べ、両者が密接な相関をなし平行関係にあることを明らかにした。

赤痢菌に対する抗体証明法の敏感度について、Cooper, Tepper & Keller¹⁶⁾は感染防禦試験の方が凝集反応より敏感であるとのべているが、この事実は他の細菌についても認められている。著者はこの問題を検討する意味で赤血球凝集反応をあわせて実施した。Hayes⁴⁾は *S. sonnei* の多糖類抗原で感作した血球で赤血球凝集反応を行つて菌体凝集反応より鋭敏であるとのべているが、著者の成績でも同様な結論に達した。さらに、赤血

球凝集素価の方が感染防禦力価よりむしろ高いことが認められた。菌体凝集反応, マウス被動感染防禦試験, 赤血球凝集反応の三つの抗体測定法の感度はこの順に高くなっている。このことは菌体凝集反応では抗体が証明されないことにもかかわらず感染防禦能をあらわすような血清の抗体を証明するのに赤血球凝集反応が使用できる可能性を示している。また菌体凝集反応が感染防禦試験より感度が低いことは, 凝集抗体が証明されない免疫血清がなお感染防禦能を有していることがあるという安東等¹⁴⁾の成績を説明すると考える。

感染防禦に関与する抗原抗体反応の特異性について, Weil & Farsetta¹⁾および Cooper & Keller²⁾ はある一つの菌の抗血清は同種菌の攻撃に対しては非常に強く防禦するが, 異種菌の攻撃に対しては余り防禦しないという事実から, Flexner 菌では型特異 (主) 抗原がこの反応の主役を演ずるものであろうと想定している。古屋等¹⁷⁾は赤痢患者血清について凝集反応の成績から Flexner 菌の中で 1b と 3a, 2b と 3a との間に相関関係があることを認めている。著者は *S. fl.* 2b 免疫家兎血清を使い, 2b, 2a, 3 に対する感染防禦能を調べたが, 同種菌 2b に対しては高度の防禦能を示すとともに, 異種菌の 2a, 3 に対しても凝集素価とほぼ平行して防禦性をあらわすことを認めた。以上の成績と Flexner 菌の抗原構造上の近縁性を総合してみると, 感染防禦能は同種菌に対しては高度であるが, 抗原的に関係のある異種菌に対しても, 型・群抗原のいかんをとわず共通した抗原に対応する抗体量によって感染防禦能があらわれると推論できる。

以上の諸点から, 赤痢菌に対するマウス感染防禦抗体は菌体凝集素であり, かつこの抗体は赤痢菌菌体抗原によって感作された赤血球の凝集にあずかる抗体でもあると考えることができる。

なお, 以上のべてきた感染防禦抗体はマウスの赤痢菌による敗血症死を防禦するものであつて, この抗体が人の赤痢の感染ないし発症防止に作用するか否かは今後検討さるべき問題と思われる。

結 論

1) 赤痢菌抗血清の同種菌に対する菌体凝集素価, 赤血球凝集素価はマウス被動感染防禦力価と相関を示し, 平行関係にある。

2) 赤痢菌に対する抗体測定法の感度は, 赤血球凝集反応が最も高く, ついでマウス被動感染防禦試験, 菌体凝集反応の順に低くなる。

3) 菌体凝集素価とマウス被動感染防禦力価の関係は, *S. flexneri* 2b と *S. sonnei* とで全く差がないが, 赤血球凝集素価とマウス被動感染防禦力価の関係はそれぞれの場合でやや異つた量的関係を示す。

4) Flexner 菌では型抗原, 群抗原に対する抗体はともに感染防禦に関与すると考えられる。

5) 凝集抗体そのものが感染防禦抗体であると考えられる。

本実験に使用した赤痢患者血清は東京都立駒込病院小張一峯博士の好意により寄与された。原稿の校閲を賜つた福見部長に謝意を表す。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつてなされたことを記し謝意を表す。

文 献

- 1) Weil, A. J. & Farsetta, K.: The type-specificity of immune Protection against *Shigella paradysenteriae* (Flexner), J. Immunol., 51, 301, 1945.
- 2) Cooper, M. L. & Keller, H. M.: Studies in dysentery vaccination, III. Immunity in mice injected with vaccines of Shigella, J. Immunol., 58, 361-368, 1948.
- 3) Cooper, M. L., Tepper, J. & Keller, H. M.: Studies in dysentery vaccination, IV. Primary vaccination of children with monovalent vaccines of Shigella, J. Immunol., 60, 189-203, 1948.
- 4) Hayes, L.: Specific serum agglutination of sheep erythrocytes sensitized with bacterial polysaccharides, Australian J. Exper. Biol. & M. Sc., 29, 51-62, 1951.
- 5) Neter, E., Bertram, L. F., Zak, D. A., Murdock, M. R. & Arbesman, C. E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera, J. Exper. Med., 96, 1-15, 1952.
- 6) Landy, M. & Webster, M. B.: Studies on Vi antigen, III. Immunological properties of purified Vi antigen derived from *Escherichia coli* 5396/38 J. Immunol., 99, 143-154, 1952.
- 7) Satk, J. E.: A simplified procedure for titrating hemagglutination capacity of influenza virus and the corresponding antibody, J. Immunol., 49, 87-98, 1944.
- 8) Batson, H. C., Brown, M. & Oberstein, M.: Mouse-protection potency assay of typhoid vaccine, Pub. Health Rep., 66, 789-805, 1951.
- 9) Mishulow, L.: Mucin solution for enhancing the virulence of *S. typhi*, J. Lab. & Clin. Med., 39, 503-504, 1952.

- 10) Miller, L. C. & Tainer, M. L.: Estimation of the ED_{50} and its error by means of logarithmic-probit graph paper, *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 57, 261-269, 1944.
- 11) Cooper, M. L. & Keller, H. M.: Studies in dysentery vaccination, II. Humoral antibody content of sera from children convalescent from dysentery, *J. Immunol.*, 58, 357-360, 1948.
- 12) 滝田順吾, 他14名: シンポジウム「赤痢ワクチン」に関して (プリント), 北里研究所, 1953.
- 13) 滝上正, 田所一郎: 病初期及び恢復期における細菌性赤痢患者血清の凝集反応及びマウス防禦試験, *日本伝染病学会雑誌*, 27, 64-67, 1955.
- 14) 安東洪次, 田所一郎, 山下章, 難波諄士, 田中和義, 石丸寅之助: 赤痢クロームワクチンの研究, I. 動物実験成績及び人体接種の場合の抗体産生, *日本伝染病学会雑誌*, 27, 127-128, 1953.
- 15) 細谷省吾, 多田庄三, 馬場齡: 赤痢新ワクチンの基礎的研究, *日本伝染病学会雑誌*, 27, 129-130, 1953.
- 16) Cooper, M. L., Tepper, J. & Keller, H. M.: Studies in dysentery vaccination, VI. Primary vaccination of children with polyvalent vaccines of *Shigella*, *J. Immunol.*, 61, 209-219, 1949.
- 17) 古屋暁一, 小酒井望, 石川哲也: 細菌性赤痢の血清凝集反応知見補遺, *日本伝染病学会雑誌*, 27, 132-133, 1953.