実験的チフス症の研究 (特にゲルトネル腸炎菌対マウスの組みあわせにおいて)

1. 生菌免疫と死菌免疫の効果の比較

三 橋 進 川 上 正 也 山 口 雄 三 永 井 正 彦

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋進教授)

[受付: 1月6日・1958年]

一度ある伝染病に罹患すると、二度とその病気にかゝり難くなるということは古くから経験的に知られていた事実である。Jenner の種痘の発見にひきつづいて、Pasteur の一連の弱毒生菌免疫の研究から “l'absence de récidive” の概念が導き出された。また、これらの業績にたいして感染によらないでも、死菌体またはその成分、もしくは菌によつて産生された毒素ないしは代謝産物によつても強い免疫があたえられることが明かにされた。これらの研究は実際の応用と結んで、ワクチン、トキシノイドの進歩を促し、毒素学、血清学の著しい発展をみるにいたつた。しかるに感染によつて成立する免疫はワクチン、トキシノイド等によつて作られる免疫とは異つた性質の免疫を含んでおることが、ある程度予想されながら、その解明については充分な発展をみるにいたらなかった。その一因は、生体と菌との “からみ合い” の解析という難しい実験条件に加えて、研究者がその解決の一つの方向を自然抵抗の問題に求めたことにも歸せられよう。1929年、東西殆んど期を同じうして感染後の免疫ないしは弱毒生菌免疫に関する実験的研究が発表された。すなわち、Jensen(1929)¹⁾ はプレスラウ菌の弱毒変異菌を使つて、Li(1929)²⁾ は豚コレラ菌、パラチフスC菌の弱毒変異菌を使用し、小林門下の羽生(1929)³⁾ は鼠チフス菌フェージ抵抗株を使用して、生菌免疫の研究を発表した。その後これらの研究は諸外国ではあまり注目されることなく、主としてわが国において小林およびその一門によつて推しすすめられたといつても過言ではない⁴⁻¹⁰⁾。

これにたいし、細谷^{11,12)}は菌体成分、細菌の液状培養濾液の研究から、感染または弱毒生菌免疫によらないでも、強い感染防禦効果を与えることを示した。安東¹³⁻¹⁵⁾は死菌ワクチンの改良を試み、ゲルトネル菌対マウス、馬流産菌対ハムスターにおいて、クローム明ばんワクチ

ンによつて、ある程度死菌免疫が感染防禦に有効なことを示した。たまたま日本における実験動物のレベルが安東を中心とするグループ^{16,17)}によつて著しく向上した。

われわれはこれらの動物を使用することを得て、古くからとりあげられている “菌対動物のからみあい” (interaction) という問題をふたたびとりあげた。実験動物の事情からマウス対ゲルトネル菌を使用し、本報においては、先づ生菌免疫と死菌免疫を行い、両者を最もすぐれた免疫状態の下において、種々の量の強毒菌を種々のルートから攻撃して、それぞれの感染致死防禦効果を比較した。

実験方法

動物: 東大伝研で生産された ddF 系マウス、生後5週、体重17~20g のものを10匹1群として、各群をそれぞれ一定の飼育箱内で飼育し、東洋酵母株式会社製の飼育用大型固型飼料と水道水をあたえた。

菌株: 強毒菌として予研福見博士より分与された腸炎菌 116-54株を用いた。数回のマウス通過後、この普通寒天18時間培養菌をかきとり、脱脂乳に浮かべて凍結真空乾燥し、真空アンプルに封入して -4°C 以下に保存し、用のにぞんでアンプルを開き、普通寒天に18時間培養し、実験に供した。この菌のマウス LD₅₀は 10^{-8.5}mg であった。

使用した弱毒菌は豊田¹⁸⁾により腸炎菌のブイヨン10日

MITSUHASHI Susumu, KAWAKAMI Masaya, YAMAGUCHI Yuzo and NAGAI Masahiko: Studies on the experimental typhoid 1. A comparative study of live and killed vaccine against the infection of mice with Salmonella enteritidis. Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University. —Jap. J. of Bact., 13 (4), 323-328, 1958.

培養より分離されたS ER株で、LD₅₀は10^{-2.4}mgである。また強毒菌より分離したR型菌R₁は寒天平板上にR型の集落を作り、S抗原をほとんど持たない。S ER株はこの株とS型強毒菌との中間型と考えられる¹⁹⁾。

免疫と攻撃：加熱ワクチンは116-54株の100mg/ml食塩水浮ゆう液を100℃、2.5時間加熱して作った。ホルマリンワクチンは0.5%ホルマリンを含む食塩水浮ゆう液を37℃、1夜放置して作った。またクロームワクチンの作製は安東ら¹⁴⁾の記載に従った。これらのワクチンの種々濃度の食塩水稀釈液0.1mlを静脈または腹腔に注射して免疫した。

生菌免疫としてS ER株18時間寒天培養をかきとり、ブイヨン食塩水(1:4)に浮ゆうさせ、これを種々に稀釈したもの0.1mlを腹腔または静脈内に注射した。

強毒菌116-54株をこれらの免疫動物の攻撃に使用した。毎回新たに保存アンプルを開き、寒天上に18時間培養し、前述のように浮ゆう液を作り、実験に使用した。

これらの菌量は比濁法で測った。浮ゆう液をColeman Junior型比色計により、波長615mμで比色し、あらかじめ作製した乾燥菌量-吸光度曲線と比較して菌濃度を求めた。同時に適当に稀釈した液を寒天に混合して培養し、生じた集落数から生菌数を測定した。

実験結果

攻撃量の決定

まず1群10匹のマウスの各群に種々の量の強毒菌116-54株を腹腔内に感染させたとこ、第1図のような結果になった。3×10³から3×10⁵個の菌を感染させると動物は10日以内に死亡する。次に200匹のマウスにそれぞれ3×10³個(10⁻⁷mg)の116-54株を腹腔内に注射したところ10日以内に93%が死亡し、26日目に最後の1匹が死んだ(第2図)。従って以後の実験にはこの菌量を攻撃量として使用した攻撃試験をするとき、この菌の毒力が変わっていないことを知るため、免疫群の他に毎回必ず10匹ずつの無処置対照群をおき、同時に攻撃してその致死効果をみた。もしこのうち1匹が18日以上生き延びたときは、その実験結果は除外した。

免疫量

S ER株の毒力は第1図に示す通りで、3×10⁶個以下の菌量(10⁻³mg)ならば、免疫に使用しうる。

各群10匹から成るマウスに種々の量の生菌を腹腔内に注射し、21日後に116-54株で攻撃した。また種々の死菌ワクチンの種々量で同様に免疫して、13日または14日

第1図 強毒菌と弱毒菌の毒力

第2図 強毒菌の感染したマウスの生存日数

第1表 免疫量と感染致死防禦効果

免 疫	疫 量			強毒菌 10^{-7} mg 腹腔攻撃後平均生存日数	40日後の生存率 %
	量 mg	部 位	期 間 日		
SER 生 菌	10^{-2}	腹腔	21	9.9	20
	10^{-3}	"	21	14.4	30
	10^{-4}	"	21	8.7	50
	10^{-5}	"	21	11.6	30
	10^{-6}	"	21	9.7	0
SER 生 菌	10^{-7}	"	21	7.0	0
	10^{-4}	"	21	2.0	90
加熱ワクチン	10^{-5}	"	21		100
	0.15	"	14	11.2	0-10
	0.3	"	13	8.7	30
ホルマリソワクチン	0.6	"	13	10.5	0
	0.3	"	14	7.0	0
	0.6	"	14	6.6	0
クロームワクチン	1.4	"	13	13.1	20
	2.8	"	13	15.0	60
	5.6	"	13	6.1	10
非免疫対照*				4.6-4.8	0

* 7回に分けて攻撃試験を行い、各回毎に対照群を置いた。強毒菌 116-54 株 10^{-7} mg 腹腔内攻撃

後に攻撃した。その結果は第1表に示した。生菌の免疫量はこの条件では 10^{-5} から 10^{-4} mg が最も有効であり、死菌免疫ではクロームワクチンが最も毒性が少く、大量の接種が可能で、2.8 mg が最も有効量であった。すなわち生菌免疫はクロームワクチンの $1/10^5$ の免疫量で有効である。

第2表 免疫期間と感染致死防禦効果

免 疫	疫 量			攻撃後平均生存日数	40日後の生存率 %
	量 mg	接種部位	期 間 日		
SER 生 菌	10^{-5}	腹腔	0	2.5	0
	10^{-5}	"	4	5.7	0
	10^{-5}	"	8	8.4	10
	10^{-5}	"	16	15.8	50
	10^{-5}	"	21		100
	10^{-5}	"	48		100
	10^{-4}	"	48	8.0	90
クロームワクチン	2.8	"	7	6.4	0
	2.8	"	13	15.8	60
	2.8	"	21	12.5	50
非免疫対照				4.6-5.1	0

強毒菌 116-54 株 10^{-7} mg 腹腔内攻撃

免疫期間

次に生菌とクロームワクチンの免疫量を一定にし、接種してから攻撃までの時間を変えてその効果をしらべたところ、第2表のようになった。これより、生菌免疫は接種後2週以内ではその効果が低く、3週から7週にかけて強力な感染致死防禦能が成立することがわかる。これに反してクロームワクチンによる免疫は2週目の終りが攻撃に対して最も強い抵抗を示した。

以上の結果はすべて腹腔に免疫し、腹腔に攻撃する方法をとった。Dutton²⁰⁾ はマウスに種々の菌を感染させ、その致死作用を調べ、菌を腹腔内に感染させたときと、静脈内に感染させたときでは、菌の感染致死作用に差があること、またその差は菌株により異なることを指摘している。

そこで生菌と死菌をそれぞれ静脈、腹腔に免疫し、各群を前と同様に攻撃試験を行った。各ワクチンを静脈および腹腔投与したときの毒性を予め測定し、その LD₅₀ の 1/10 を死菌の免疫量とした。結果は第3図に示した。

第3図 強毒菌 116-54 株 10^{-7} mg 腹腔攻撃に

対する腹腔及び静脈免疫の効果

IP: 腹腔 IV: 静脈

死菌免疫の場合、腹腔内に免疫したマウスを静脈から攻撃したときの生存率は低く、腹腔内に免疫し、腹腔内に攻撃するとき、その感染致死防禦能が一番すぐれておつた。死菌ワクチンを静脈を通して免疫した場合、腹腔攻撃、静脈攻撃いずれに対しても感染致死防禦能は腹腔免疫より低い。

この結果から、死菌ワクチンを腹腔内に免疫するとき、腹腔内になにか局处的な防禦体勢がつけられ、腹腔攻撃をうけたとき、先ず、局処での防禦効果が發揮され

第4図 強毒菌 116-54 株 10^{-7} mg 静脈攻撃に
対する腹腔内及び静脈免疫の効果

るものと考えられる。従つて静脈内から攻撃すると、このような局处的防禦効果が發揮されないで、菌は直接内部の臓器（肝，脾，淋巴腺等）に到達するため、感染致死防禦効果が腹腔攻撃の場合より低くなるものと考えられる。

生菌免疫の場合、その免疫ルートを静脈内、腹腔内のいずれをとつても、また攻撃ルートをいずれにしてもその免疫効果に大差がなく、いずれの場合も死菌免疫群にくらべてその感染致死防禦能はすぐれていた。

免疫回数

弱毒生菌を接種すると、菌は長時間動物の臓器内に生存している²¹⁾ので、少量の抗原を長期にわたつて溶出され、これが生体に刺激を与え、免疫を与えているとも考えられる。従つて死菌ワクチンをくり返し長期にわたつ

て与えたならば、その免疫効果が更に向上することが予想される。そこで免疫ルートを腹腔内にし、局处的影響を避けるため攻撃経路を静脈内に決めて、弱毒生菌（SER株）、クロームワクセンの免疫回数を増加して、その感染致死防禦効果を比較した。

第8表に示したように、生菌死菌共に、免疫回数を増すことによる感染致死防禦効果の著しい増強はみられなかった。

これに対し、一度弱毒生菌で免疫し、ついで強毒菌 116-54株 10^{-7} mg を接種した動物は非常に強固な免疫を獲得し、 10^{-5} mg の強毒菌攻撃にも完全に耐えうるようになる（第5図）。

第5図 強毒菌 116-54 株 10^{-5} mg 静脈内攻撃に対する生菌および死菌免疫のくりかえしによる効果

クロームワクセン免疫の場合、免疫回数を増しても強毒菌 10^{-7} mg の攻撃に 100%耐え得ない。また、強毒菌 10^{-5} mg の攻撃では、クロームワクセン1回乃至2回免疫では全部死亡する。すなわち生菌免疫は死菌免疫に比

第3表 免疫回数とその効果

免 疫		攻 撃		平均生存		生存率 %
第 1 回	第 2 回	第 3 回	日*	mg	日 数	
mg	mg	mg	日*	mg	日 数	
生 菌 SER	10^{-5}	—	21	116-54	10^{-7}	6.9 40
SER	10^{-5}	—	21	116-54	10^{-7}	15.7 70
SER	10^{-5}	—	55	116-54	10^{-7}	20.0 80
SER	10^{-5}	SER 10^{-5}	35	116-54	10^{-7}	27.0 70
SER	10^{-5}	SER 10^{-5}	55	116-54	10^{-7}	12.0 40
SER	10^{-5}	SER 10^{-5}	56	116-54	10^{-5}	8.1 70
SER	10^{-5}	SER 10^{-5}	56	116-54	10^{-5}	100
SER	10^{-5}	116-54 10^{-7}	48	116-54	10^{-5}	100
死菌 クロームワクセン	2.8	—	13	116-54	10^{-7}	7.9 20
クロームワクセン	2.8	—	13	—	10^{-5}	0
クロームワクセン	2.8	21 クロームワクセン 2.8	55	116-54	10^{-5}	11.1 0

* 第1回免疫からの日数。

免疫はすべて腹腔内に、攻撃は強毒菌 116-54 株を静脈内に行つた。

べて、その効力の点でも非常に強い。しかも使用される免疫量はクロームワクチンに比較して非常に少なくてすみ点注目される。

考 察

マウスの実験的腸炎菌感染とその免疫を扱った研究は非常に多いが、その結果は必ずしも同一でなく、生菌と死菌による免疫の効果についての報告もまちまちである。その原因としては菌の毒力と動物の抵抗力を一定に保つことが困難であること、また免疫効果の判定がむづかしいということにあるようである。第一の困難性を克服するためには、動物の系を限定し、飼育条件を一定にして実験に供する必要がある。また菌の保存法、培養法、定量法、動物への投与法を均一化しなければならない。著者等はこの点に充分留意し、可能な限りこの条件を満足するようにして実験を行った。免疫効果の判定にはMLDの10倍量の菌で攻撃し、40日後の動物の生存数によることを基準とした。これによると、生菌免疫は死菌免疫に比べその効果の点で非常にすぐれておるが、死菌免疫もある程度有効である。この点、両者の異同、生菌免疫の本質を研究する上に注目しなくてはならない。また両者の有効免疫条件を比較すると、両者の間にかかなりの差異が見出される。すなわち弱毒生菌は極めて少量で免疫が成立し、3週から最も有効な免疫が完成する。死菌免疫では毒性の少ないワクチンの可能な限り大量を1回免疫すると、2週目に最も有効な免疫が成立する。死菌ワクチンの場合、腹腔に免疫し、腹腔に攻撃するとき、生存率が一番高い。これに反して、腹腔免疫動物を静脈内から攻撃すると防禦力が低下する。

このことから腹腔内になにか局所的防禦体勢が成立しているものと予想される。腹腔内に侵入した菌は、先ず腹腔内の種々の防禦作用を受け、これを突破しえた菌のみが血流またはリンパ管を経て、肝、脾、リンパ腺等の終局の寄生部位に侵入するものと考えられる。

生菌免疫の場合、免疫ルート、攻撃ルートのいずれの組み合わせをとつても、その感染致死防禦効果は死菌免疫に比して著しくすぐれており、しかも上記のような、いわゆる“局所的効果”と考えられる現象はみられず、チフス性疾患の場合の終局の戦場である肝、脾、リンパ腺等の臓器内でその本質的な防禦効果が発揮されるのではないかと想像される。

生菌免疫と死菌免疫の比較実験において、ワクチンの投与部位におこる“局所的な防禦”と、チフス性疾患の終局の戦場である肝、脾内の防禦とを区別して考えない

と、誤った結論を導き出す危険がある。

また死菌免疫の場合、くり返し免疫しても効果はあまり増強されない。この点死菌免疫を8回以上反復してもその効果が増さないという伊川²²⁾の報告に同意出来る。弱毒生菌の反復免疫も効果を増さなかつたのに、弱毒生菌で免疫した動物に、強毒菌の少量 10^{-7} mgを接種すると非常に強力な免疫が成立することを知った。

生菌免疫に使用する菌量は 10^{-5} mgで、これが動物の体内で多少増えるとしても、死菌の有効な免疫量に比べると非常に少い(約 $1/10^5$)。

以上の結果から、あまり多くのことを判断することは出来ないが、有効免疫条件の比較実験から、また免疫ルート、攻撃ルートの適当な組合せと、攻撃菌量の適当な増減によつて、生菌免疫と死菌免疫の成立機転の上になにか質的に別のものが働いているものと予想される。

マウスの腸炎菌感染症の実験において、死菌免疫がかなり有効な場合がある。たとえばクロームワクチンを腹腔に2.8mg免疫し、強毒菌の 10^{-7} mgを腹腔内に攻撃すると50%前後の動物は感染に耐える。攻撃菌量を 10^{-5} mgに増加し、尾静脈より攻撃すると、クロームワクチン免疫では、免疫回数1乃至2回の場合全部のマウスが死亡する。ところが免疫法、攻撃法の組み合わせや、攻撃菌量を減ずると(10^{-7} mg)死菌免疫が、感染致死防禦に、ある程度有効な場合がある。この点、マウス対腸炎菌の研究にあたつて注意すべき事実である。すなわち、死菌ワクチンの研究や、菌体成分、培養液から感染致死防禦物質をとり出す研究に際して、攻撃菌量や、その毒力、免疫、攻撃ルートが異るとその結果がまちまちになつて、その効果が誇大に結論される結果となる。この点がまた生菌免疫との比較実験において、多くの論争をひき起した原因ともなっているのであろう。

生菌免疫の場合、免疫菌、攻撃菌は、長期にわたつて動物体内に生存している²³⁾。この残存している菌と、生体細胞との間の関係を知ることが、今後に残された問題といえよう。

生菌免疫を、死菌免疫との差違を解明するにあたり、上に述べた点を考慮しながら、以上の実験から得られた両者の最有効免疫条件で免疫された動物に、強毒菌を攻撃し、生体の示す防禦反応を種々の面から検討すれば、生菌免疫の成立機序をある程度うかがいうるものと思う。

要 約

マウス対腸炎菌の実験的チフス症について、生菌免疫

と死菌免疫の異同をしらべた。

1) いろいろの死菌ワクチンを比較検討し、クロームワクチンが最もすぐれていることを知った。

2) クロームワクチンは 2.8 mg 腹腔免疫し、免疫終了後 2 週間の終りが強毒腸炎菌の攻撃にたいし最も防禦効果が高い。免疫回数を増しても効力はあまり増強されなかった。

3) 死菌免疫の場合は、免疫ルート、攻撃ルートの組合せのちがひによつてその防禦効果が著しく変動し、“局処の免疫効果”を考慮に入れなくてはならない。

4) 生菌免疫では、このような免疫ルート、攻撃ルートの組合せが異つても感染致死防禦効果に差がなく、いずれの場合も死菌免疫に比べてすぐれた感染致死防禦効果を示した。

5) 弱毒菌 (S E R 株) 10^{-5} mg で免疫し、つづいて、強毒菌 10^{-7} mg を接種した動物は、極めて強い免疫を獲得し、従来の攻撃量の 100 倍の強毒菌 (10^{-5} mg) を攻撃しても完全に耐過する。

6) クロームワクチンを、1 乃至 2 回腹腔内に免疫したマウスに 10^{-5} mg の強毒菌を、静脈から感染させると全部死亡する。従つて生菌免疫はその防禦効果の上でも、死菌免疫に比し、明らかにすぐれている。

7) 生菌免疫に必要な量と、クロームワクチン免疫に必要な菌体量を比べると、免疫菌の生体内での残存性の問題を別にして、生菌の場合、死菌の約 $1/10^5$ で足りる。

8) 生菌免疫と死菌免疫との間には、多少 overlap した部分があるかもしれないが、その感染防禦機序の大部分は異質のものによつて成立しているものと予想され

る。

文 献

- 1) Jensen, K. A.: Immunitätsfösch., 63, 298-326, 1929.
- 2) Li, C. P.: J. Exp. Med., 50, 767-775, 1929.
- 3) 羽生: 慶応医学, 9, 1, 昭 4 (1929).
- 4) 小林六造: 日本医学及び健康保険, 第 3240-3243 号, 昭 16 (1941), 第 3260-3261 号, 昭 16 (1941).
- 5) 大野順之助: 細菌学雑誌, 443, 54-65, 昭 8 (1933).
- 6) 窪田幸記: 細菌学雑誌, 444, 113, 昭 8 (1933).
- 7) 野口嘉幸: 細菌学雑誌, 454, 198, 昭 8 (1933).
- 8) 首藤三八: 細菌学雑誌, 458, 303, 昭 9 (1934).
- 9) 安東清: 細菌学雑誌, 456, 128, 昭 9 (1938).
- 10) Topley, W. W. C.: Brit. J. exp. Path., 14, 408, 1933.
- 11) 細谷省吾, 牧野正顕, 多田庄三: 日本細菌学雑誌, 7, 263, 昭 27 (1952).
- 12) 細谷省吾: 基礎と臨床, 2, 33-40, 昭 23 (1948).
- 13) 安東洪次, 野村達次, 下条寛人: 医学通信, 7 (307) 3, 昭 21 (1946).
- 14) Ando, K.: J. Exp. Med., 24, 247, 1954.
- 15) 野村達次: 日本細菌学雑誌, 11, 699, 昭 31 (1956).
- 16) 安東洪次: 日本臨床, 11, 1, 昭 28 (1953).
- 17) 安東洪次: 日本細菌学雑誌, 8, 713, 昭 28 (1953).
- 18) 豊田哲夫: 実験医学雑誌, 28, 69, 昭 19 (1944).
- 19) 三橋他: 腸炎菌弱毒株の抗原構造, 日本細菌学雑誌, 未発表.
- 20) Dutton, A. A. C.: Brit. J. exp. Path., 36, 128, 1955.
- 21) 川上, 永井, 小笹, 山口, 小金沢, 三橋, 五島, 桑原: 第 12 回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 昭 32 (1957).
- 22) 伊川喜久蔵, 戸田修: 細菌学雑誌, 514, 801, 昭 31 (1938).