赤痢菌侵襲時における生体反応の研究

—— マウスの臓器内鉄及び SH 量の変動 ——

片 岡 保 幸

大阪学芸大学衛生学研究室 (指導 柳原栄一)

[受付: 3 月 6 日・1958 年]

緒 言

さきに、わたくしは赤痢外毒素、内毒素、ワクチン及び菌浮游液を用いて家兎を攻撃した場合における早期の生体防禦反応の一つとして、reduced glutathione(以下 G-SH と略称す) 及び非ヘミン鉄(以下 Fe と略称す) の動態、並びにこれらと抗体産生との間に極めて密接な関連性の存在することについて報告した¹⁾。ことに抗原侵襲における G-SH と Fe の早期の減少は極めて特異的であつて、侵襲毒素は生体内還元系の重要な要素の一つである G-SH の oxidizing agent として作用するよりは、一種の chelating agent (ligand) として反応するものであることを指摘した。

これらの現象からすれば、赤痢菌体成分の生体侵襲に際して起る早期の変動は、生体の受動的防禦の反応で、passive role を中心とした adjustment と考えられる。そこでこの間に変化の著しかった G-SH と Fe の各臓器における相関性を把握することが、侵襲抗原の生体内動態を探究する重要な手掛と考えられる。

今回は、これら現象の特性理解のために、赤痢外毒素及び菌浮游液を用いてマウスを攻撃した後、各臓器内の Fe 及び G-SH 量を測定することにより知見を得たのでここに報告する。

実験方法

- 1) 実験動物には、体重(20±1.0)gの均一系(NA. 2) 雄性マウスを使用した。そして5匹を1単位とし、これを3回くりかえし、その平均値を求めた。
- 2) 供試物質は、前報¹⁾と同じく志賀I型菌より、赤痢外毒素及び菌浮游液を調製して使用した。
- 3) 菌及び毒素投与法は、マウスの尾静脈に、各々 1/2 M. L. D. 量を注射した。その後5分、10分、15分、20分、25分、30分、45分、60分及び120分の各時間毎に断

頭失血死せしめ、直ちに肝、脾、肺及び腎臓を採取して、各5匹を1群として、その3群について臓器内遊離可溶性総グルタチオン量及び臓器内 Fe 量を測定した。

4) 臓器内グルタチオン定量法は²⁾、前報と同じく当研究室の方法を用いた。すなわち各時間毎にマウスを断頭失血死せしめて、取り出した臓器を生理的食塩水にて洗滌し、濾紙にて水分を除き秤量した。これを乳鉢内にてガラス細末を加えて研磨し、均等浮游液とした後、メタ磷酸で除蛋白し、濾液を2%硫酸で酸性となし、2-6-dichlor phenol indophenol にて 1-ascorbic acid を酸化し、エーテルに移行せしめた後、亜鉛アマルガムで還元して、テトラチオン酸の存在下でヨード溶液を加えて、過剰のヨードをチオ硫酸ソーダで滴定した。平均誤差は±2.59 mg/100 g であつた。なおここで述べるグルタチオンとは、前報同様に遊離可溶性総グルタチオンのことであつて、還元型(G-SH) だけでなく、酸化型(G-S-S-G) をも含んだものである。このことは、さきに行つた実験で、グルタチオンの増減は G-SH が支配していて、しかも酸化型の増減は殆んど認められなかつたので、ここには総グルタチオン量(以下 T-SH と略称す) としてそのまゝあらわした。

5) 臓器内非ヘミン鉄定量法は、吉野氏の方法³⁾、木村氏の方法⁴⁾、腰塚氏の方法⁵⁾ 及び島田氏の方法⁶⁾ 等があるが、わたくしは pyrophosphate-3 塩素酢酸法を用い、o-phenanthroline 法で測定する島田氏の方法を選ん

KATAOKA, Yasuyuki: Studies on the adaptive reaction of the living organism through the invasion of *Shigella dysenteriae* (I-type) — Behavior of non-hemin iron and glutathione containing in organs of mice. — The Hygienic Laboratory of the Osaka University of the Liberal Arts and Education. — Jap. J. of Bact., 13(6), 540—545 1958.

で測定した。

すなわち各臓器片 0.5 g を 15 ml 遠心管にとり、ガラス細末を加え、ガラス棒で磨砕する。これに飽和ピロリン酸ソーダ液 2.0 ml, 10% 3 塩素酢酸 3.0 ml を加え混和する。盲検は、再蒸留水 0.5 ml に上記の試薬を加える。ガラス棒で撹拌しながら検体と盲検を沸騰水中で 7 分間加温する。室温に冷してから 3,000 r.p.m. 10 分間遠沈し、上清 1.0 ml をとる。これを再蒸留水で正確に 5 または 10 倍に稀釈する。稀釈液 2.0 ml に酢酸緩衝液 1.0 ml, 0.1%, o-phenanthroline 液 1.0 ml 及びチオグリコール酸 1 滴を加えて混和後一夜放置する。これを日立分光光度計にて、波長 510 m μ で測定した。再検出率は 97.2% で、定量感度は 0.3% であった。

実験成績

1) 赤痢外毒素で攻撃したマウスの各臓器内非ヘミン鉄の消長

肝臓：毒素で攻撃する前の Fe 量は平均 7.22 mg/100 g で、攻撃 5 分後には 6.08 mg/100 g と減少し、その後 10 分、15 分、20 分及び 25 分の間に著しい動揺を示しながら

30 分後には 4.30 mg/100 g に激減し、45 分後より 60 分後にいたるまで急増を示し、120 分後の値は 60 分後のそれとほぼ同様の値であった。

脾臓：毒素で攻撃する前の Fe 量は平均 8.16 mg/100 g で、攻撃 5 分後には 9.87 mg/100 g と増加し、肝の場合と逆の傾向を示し、その後も肝と対照的な動揺を示しながら増減し、30 分後には 8.27 mg/100 g を示し、45 分後より 60 分後までは減少をたどり、120 分後には 60 分後の値とほぼ同様であった。

肺臓：毒素で攻撃する前の Fe 量は平均 3.00 mg/100 g で、攻撃 10 分後まで僅かに増加し、15 分後にはやや低下の値を示したが、その後 120 分にいたる経過において、殆んど認めるべき動揺を示さなかった。

腎臓：毒素で攻撃する前の Fe 量は平均 2.20 mg/100 g で、25 分後にも同じく 2.20 mg/100 g にて、その間に殆んど動揺を示さず、その後次第に減少をたどり、60 分後には 0.95 mg/100 g と減少したが、120 分後には 1.80 mg/100 g と増加していた。

2) 赤痢菌液で攻撃したマウスの各臓器内非ヘミン鉄の消長

第 1 表 赤痢外毒素の攻撃によるマウスの臓器内非ヘミン鉄の消長 (mg/100g)

	No.	注射前	注 射 後 (分)								
			5	10	15	20	25	30	45	60	120
肝	1	7.40	6.20	6.49	9.06	5.88	7.50	4.46	5.15	7.49	7.65
	2	7.10	5.95	6.23	7.86	5.45	7.45	4.05	4.71	7.11	7.57
	3	7.16	6.09	6.45	8.01	5.68	7.91	4.39	4.78	7.66	7.79
	平均	7.22	6.08	6.39	8.31	5.67	7.62	4.30	4.88	7.42	7.67
脾	1	8.30	10.08	9.89	6.46	6.90	6.90	8.55	6.32	5.54	5.55
	2	8.05	8.55	9.84	5.91	6.46	6.44	8.47	6.11	4.87	4.57
	3	8.13	10.98	11.02	6.83	7.88	6.91	7.79	4.97	4.77	5.36
	平均	8.16	9.87	10.25	6.40	7.08	6.75	8.27	5.80	5.06	5.16
肺	1	3.07	3.28	3.51	2.90	2.91	2.77	3.03	3.53	2.76	2.98
	2	3.15	3.07	3.18	2.42	2.83	2.22	2.36	2.01	2.67	2.76
	3	2.78	3.19	2.91	2.66	2.45	3.21	2.68	2.44	2.22	2.51
	平均	3.00	3.18	3.20	2.66	2.73	2.70	2.69	2.66	2.55	2.75
腎	1	2.42	2.56	2.45	2.66	2.24	2.69	2.25	1.35	0.99	2.04
	2	2.16	2.12	2.42	2.11	2.23	1.89	1.88	0.98	0.76	1.62
	3	2.02	2.07	2.03	2.13	2.01	2.02	2.02	1.33	1.10	1.83
	平均	2.20	2.25	2.30	2.30	2.16	2.20	2.05	1.22	0.95	1.80

註：各群のマウス (NA 2, 20g $\pm$ 1.0g δ) は 5 匹を 1 群として用いた。

第 1 図 赤痢外毒素の攻撃によるマウスの臓器内非ヘミン鉄の消長 (3 群の平均値)

肝臓： 菌液で攻撃する前の Fe 量は平均7.22 mg/100 g で、攻撃 5 分後には9.85 mg/100 g に増加し、その後は毒素で攻撃した場合と同様に著しい動揺を示したが30分後には8.50 mg/100 g になり、次いで減少の経過をたどり、60分後には5.88 mg/100 g となり、以後漸増の傾向を示した。

脾臓： 菌液で攻撃する前の Fe 量は平均8.16 mg/100 g で、攻撃 5 分後には 3.17 mg/100 g に激減し、しかも肝の場合と全く逆の傾向を示し、肝と対称的な動揺を示しながら増減して、60 分後には5.05 mg/100 g となった。そしてその後は漸減の経過を示した。

肺臓： 菌液で攻撃する前の Fe 量は平均3.00 mg/100 g で、攻撃 5 分後には1.20 mg/100 g に一旦減少したが、その後 120分まで漸増の傾向を示した。

腎臓： 菌液で攻撃する前の Fe 量は平均2.20 mg/100 g で、攻撃 5 分後にはわずかに減少したが、その後20分まで上昇線をたどり、以後 120 分にいたる間漸減を示した。

3) 赤痢外毒素で攻撃したマウスの各臓器内グルタチオンの消長

第 2 表 赤痢菌液の攻撃によるマウスの臓器内非ヘミン鉄の消長 (mg/100g)

	No.	注射前	注 射 後 (分)								
			5	10	15	20	25	30	45	60	120
肝	1	7.40	10.74	10.62	5.77	8.05	7.98	8.99	6.65	6.70	10.28
	2	7.10	9.66	10.23	5.02	8.01	7.22	8.47	5.78	5.51	9.98
	3	7.16	9.15	7.83	4.63	7.55	6.88	8.04	5.81	5.43	7.19
	平均	7.22	9.85	9.56	5.14	7.87	7.36	8.50	6.08	5.88	9.15
脾	1	8.30	2.87	4.11	4.67	3.88	4.02	3.77	3.75	4.79	3.99
	2	8.05	3.33	5.01	5.05	4.33	4.39	3.78	4.25	5.51	4.03
	3	8.13	3.31	4.68	4.83	4.06	4.34	3.78	3.76	4.85	3.74
	平均	8.16	3.17	4.60	4.85	4.09	4.25	3.81	3.92	5.05	3.92
肺	1	3.07	1.01	1.87	1.81	1.55	2.02	2.01	2.54	2.54	2.06
	2	3.15	1.18	1.19	1.56	1.98	1.69	1.66	1.99	1.61	2.09
	3	2.78	1.41	1.47	1.43	1.78	2.08	2.03	2.40	2.39	2.63
	平均	3.00	1.20	1.51	1.60	1.77	1.93	1.90	2.31	2.18	2.26
腎	1	2.42	1.23	1.49	3.98	3.88	4.27	4.12	3.77	3.03	1.01
	2	2.16	2.39	2.55	4.01	4.12	3.48	3.49	3.11	3.44	1.89
	3	2.02	1.84	2.14	2.99	3.55	3.50	3.67	3.98	3.34	1.75
	平均	2.20	1.82	2.06	3.66	3.85	3.75	3.76	3.62	3.27	1.55

註： 各群のマウス (NA 2, 20g±1.0g ♂) は 5 匹を 1 群として用いた。

第2図 赤痢菌液の攻撃によるマウスの臓器内非ヘミン鉄の消長 (3群の平均値)

肝臓：毒素で攻撃する前の T-SH 量は平均 278.3mg/100 g で、攻撃 5 分後には 163.2 mg/100 g に急減し、15 分後には 362.8 mg/100 g に激増を示した。その後動揺を示しながら 30 分後には 224.1 mg/100 g に減少して、以後 120 分にいたるまで増加の経過をたどった。

脾臓：毒素で攻撃する前の T-SH 量は平均 330.5mg

/100 g で、攻撃 5 分後にはわずかに増加を示し、15 分後には 223.4 mg/100 g に激減し、その後次第に上昇をたどり、30 分後には 386.7 mg/100 g に増加して最高値を示し、以後次第に減少するのがみられた。

腎臓：毒素で攻撃する前の T-SH 量は平均 220.8mg/100 g で、攻撃 5 分後には 295.0 mg/100 g に増加し、15 分後には 169.7 mg/100 g まで減少したが、その後再び上昇して 25 分後には 257.2 mg/100 g となり、30 分後及び 45 分後には漸減し、60 分後にはまた増加し、120 分後には 201.9 mg/100 g に低下していた。

4) 赤痢菌液で攻撃したマウスの各臓器内グルタチオンの消長

肝臓：菌液で攻撃する前の T-SH 量は平均 278.3mg/g で、攻撃 5 分後にはわずかに増加し、15 分後には 147.1 mg/100 g に激減して、その後上昇して 25 分後には 235.2 mg/100 g となった。以後次第に減少して 60 分後には 156.3 mg/100 g に低下していたが、120 分後には 162.8 でほぼ同様の値であつた。

脾臓：菌液で攻撃する前の T-SH 量は平均 330.5 mg/100 g で、攻撃 5 分後には 213.2 mg/100 g に激減し、15 分後には 373.5 mg/100 g に急増した。25 分後には減少を示したが、30 分後より 45 分にいたる間は少しく上昇し、その後 120 分迄減少した。

腎臓：菌液で攻撃する前の T-SH 量は平均 220.8

第3表 赤痢毒素の攻撃によるマウスの臓器内総グルタチオンの消長 (mg/100g)

	No.	注射前	注 射 後 (分)								
			5	10	15	20	25	30	45	60	120
肝	1	291.1	173.8	380.8	419.8	270.0	311.2	233.2	333.5	325.5	358.8
	2	272.9	159.2	357.9	401.7	259.5	303.6	229.9	321.1	324.8	344.1
	3	270.9	156.6	349.7	370.1	239.7	302.0	209.2	325.2	301.6	340.2
	平均	278.3	163.2	362.8	397.2	256.4	305.6	224.1	326.6	317.3	347.7
脾	1	337.6	371.1	339.9	228.7	346.2	385.5	394.4	371.1	239.9	201.3
	2	330.2	369.3	320.0	225.0	343.6	370.9	391.4	362.5	244.8	192.2
	3	323.7	354.9	338.8	216.5	329.3	370.4	384.3	358.4	221.8	190.9
	平均	330.5	365.1	332.9	223.4	339.7	375.6	386.7	364.0	235.5	194.8
腎	1	224.9	310.6	306.2	176.7	242.5	268.7	260.9	233.6	259.7	211.4
	2	223.8	289.9	288.3	170.0	240.1	254.3	252.4	230.2	254.8	203.8
	3	213.7	284.5	276.1	162.4	226.3	248.6	240.9	228.6	243.3	190.5
	平均	220.8	295.0	290.2	169.7	236.3	257.2	251.4	230.8	252.6	201.9

註：各群のマウス (NA 2, 20g±1.0g ♂) は 5 匹を 1 群として用いた。
定量方法は羽矢・礪原の方法による。

第3図 赤痢外毒素の攻撃によるマウスの臓器
内総グルタチオンの消長(3群の平均値)

mg/100 g で、攻撃5分後には 181.3 mg/100 g に減少し、15分後には 334.3 mg/100 g に増加して最高値となり、以後45分後まで減少の経過をたどり、その後120分にいたる間漸増を示した。

総括並びに考察

さきに、赤痢菌並びにその有毒成分をもつて家兎を攻撃した直後から、時間を追って血流中総グルタチオン

第4図 赤痢菌液の攻撃によるマウスの臓器
内総グルタチオンの消長(3群の平均値)

(T-SH) と非ヘミン鉄 (Fe 量) を測定するに、両者は全く平行動態を示した。しかも侵襲後48時間目前後に最も減少低下した。そして両者の同時増加への転換期より沈降素抗体の血流中出现が認められたことを報告した。

これらの現象から T-SH, Fe 及び抗体の3者の間に密接な関連性の存在することを想像されたのである。

元来、血清鉄や非ヘミン鉄の動態については、Heil-

第4表 赤痢菌液の攻撃によるマウスの臓器内総グルタチオンの消長 (mg/100g)

	No.	注射前	注 射 後 (分)								
			5	10	15	20	25	30	45	60	120
肝	1	290.1	309.2	196.6	150.5	172.7	246.3	226.1	223.3	169.3	181.7
	2	268.5	279.2	169.4	141.8	147.1	227.4	190.5	178.2	141.1	149.1
	3	276.3	301.1	187.2	149.0	150.9	231.9	207.4	186.2	158.5	157.6
	平均	278.3	296.5	184.4	147.1	156.9	235.2	208.0	195.9	156.3	162.8
脾	1	345.2	221.7	280.1	390.9	337.6	299.1	290.9	341.8	318.8	290.0
	2	330.9	215.5	250.9	368.8	319.3	276.6	287.3	331.6	310.9	283.5
	3	315.4	202.4	227.4	360.8	294.4	276.3	281.3	329.2	299.4	271.9
	平均	330.5	213.2	252.8	373.5	317.1	284.0	286.5	334.2	309.7	281.8
腎	1	233.9	193.4	337.6	341.1	340.0	322.7	281.2	262.4	289.9	292.3
	2	228.9	190.1	324.4	355.7	329.9	309.4	265.5	250.3	281.7	289.7
	3	199.6	160.4	276.7	306.1	305.4	318.9	211.7	213.8	260.0	287.4
	平均	220.8	181.3	312.9	334.3	325.1	317.0	252.8	245.5	277.2	289.8

註：各群のマウス (NA 2, 20g±1.0g δ) は5匹を1群として用いた。
定量方法は羽矢・榊原の方法による。

meyer⁷⁾ 以来詳細な研究がなされ、有毒性抗原殊にジフテリア毒素の侵襲、結核感染等においては、血清鉄の著明な減少と抗毒素の産生や、治療回復への過程において、鉄も漸次増量恢復することが立証されている^{8,9,10)}。又殊に肝障害時の変動役割については、Reissmann¹¹⁾, Shorr¹²⁾, 渋沢¹³⁾, 山下¹⁴⁾ 及び岩田¹⁵⁾ 等の報告があるが、血流中や臓器中の鉄と T-SH の相関について解析された報告に接しない。

わたくしは、前報の結果や榊原・芝¹⁶⁾ の ferrous bis-cysteine chelate compound の実験的根拠にかんがみ、生体防禦反応においては、単に鉄やグルタチオン個々の変動にこだわるよりも、両者を一体とした ferrous bis-glutathione chelate compound^{17,18)} として考える方が実際のであると考へた。

そこで抗原侵襲の結果、単に血流中のみならず臓器内における総グルタチオンと非ヘミン鉄の動態を探究しなければ、真の動態を把握することが困難であると考えた。

上記実験成績に示したごとく、大量のマウスを用いてその肝並びに脾、又腎や肺臓等における両者の関連性と、又臓器の相互間における関係を求めたのである。

そしてこれがため抗原侵襲にさいして、G-SH や l-ascorbic acid の動態の、殊に著しい早期反応における作用について解明の必要性を痛感し、その一助として生体内還元系物質、特に近年ようやく生体反応時に大きな役割を演ずることが解明されつつある臓器内非ヘミン鉄と、臓器内総グルタチオン量を同時に測定観察を試みた。

すなわち赤痢外毒素並びに菌浮游液を用いて、マウスの尾静脈に一回だけ感作を行い、5分後より120分にわたって臓器内非ヘミン鉄と臓器内総グルタチオンの消長動態を検討した結果、この両者は極めて緊密に、しかも平行関係なる動態を示した。

こゝに脾臓と腎臓の両者の消長は、非ヘミン鉄及び総グルタチオンともに平行して同一傾向を示したのに対し、肝臓においては非ヘミン鉄並びに総グルタチオンともに前2者の消長と全く逆となつた態度を示した。とりわけ、動揺増減の著しい肝と脾においては、その動態は前者の増加にさいして、後者は減少するごとく明かに対称的であり、極めて興味ある現象と思われた。このことは、とりもなおさず臓器間の相互性を示すものと理解でき、このように肝脾に相互性の存在することは、これら臓器は抗原侵襲にさいして、生体防禦の調整的役割を果す臓器として重要な意義を有するものであらうと考えられる。

このような変動期を過ぎて、漸次本質的に G-SH と非

ヘミン鉄は減少してゆくもので、両者の間には不離一体の関連性の存在することがうかぎえた。

結 語

赤痢菌 (I 型) 浮游液及び赤痢外毒素を用いてマウスを攻撃して、各臓器 (肝, 脾, 腎及び肺) の非ヘミン鉄量と総グルタチオン量を測定観察して次の結果を得た。

1) 非ヘミン鉄と総グルタチオンは、いずれも著明な消長動態を示し、かつ両者は極めて緊密に平行関係を示した。

2) 肝に対する脾及び腎における両物質の消長動態は、著明な相関性を有し、対称的動揺経過をたどつた。殊にその関係は肝と脾において著明であつた。

3) 肺臓の鉄量については、概してみるべき変動を示さなかつた。

4) 抗原性物質の血中侵襲にさいして、血流・肝及び脾等の還元物質 (reduced glutathione, ferrous ion, l-ascorbic acid 等) は中和剤として働くが、その反応型式は結合運搬の方向であつて、単なる還元又は結合無毒化ではない。肝、脾はこれらの物質補給臓器として重要であり、早期には還元系物質の補給調製の役割を有し、抗原に対する受動反応と考えられる。

5) 以上のことから抗原侵襲にさいして、生体内還元系物質の動態と、その生体防禦機構にあづかる相関性をうかぎ知ることができた。

拙筆するに当り、恩師榊原栄一先生の御懇切なる御指導、御鞭撻と御校閲を厚く深謝する。

主 要 文 献

- 1) 片岡：日本細菌学雑誌, 13, 112—122, 1958,
- 2) 羽矢・榊原：生化学, 28 (3), 178—181, 1956.
- 3) 吉野：日本医大雑誌, 19 (3), 395, 1952.
- 4) 木村：薬学雑誌, 72 (10), 1240, 1952.
- 5) 腰塚：総合医学, 10 (4), 23, 1953.
- 6) 島田：日本医事新報, No. 1652, 102, 1955.
- 7) Heilmeyer: Acta haemat, 12, 154—159, 1954.
- 8) 上林：日本細菌学雑誌, 12 (11), 873—878, 1957.
- 9) 上林：日本細菌学雑誌, 12 (11), 879—883, 1957.
- 10) 久成：鉄鋼労働衛生, 6 (1), 1—7, 1957.
- 11) Reissmann: J. Lab. and Clin. Med., 43, 572, 1954.
- 12) Shorr: Science, 102: 489, 1945.
- 13) 渋沢：ショックの臨床, 医学書院, 1955.
- 14) 山下：日本医大雑誌, 20 (12), 1059, 1953.
- 15) 岩田：日本小児科学雑誌, 61 (9), 1068—1078, 1957.
- 16) 芝：日本細菌学雑誌, 11 (1), 59—62, 1956.
- 17) Li, et al.: J. Am. Chem Soc., 76, 225, 1954.
- 18) 榊原：山口医学, 6 (3), 175, 1957.