実験的チフス症の研究 (特にマウス対ゲルトネル菌 との組合せにおいて)

VI a. 免疫並びに攻撃時における細網内皮系の活性について

永井正彦 川上正也 山口雄三
今村 晋

群大医学部微生物学教室 (主任 三橋進教授)

小此木 丘 深井孝治 森田丈夫

群大医学部病理学教室 (主任 川合貞郎教授)

〔受付: 6月14日・1958年〕

細菌の感染に対する生体防禦機構に關与する細網内皮系 (以下 R.E.S. と略す) の機能について古く Metchnikoff^{1,2)} Wyssokowitsch³⁾ Pfeiffer, Marx^{4,5)} Wasermann^{6,7)} Jaffé, R.h.⁸⁾ 等の報告がある。Aschoff⁹⁾ は細菌や抗原物質の捕捉は臓器組織中の R.E.S. 細胞によるもので、又抗体産生の場合としての役割についても論じている。

R.E.S. の機能を遮断する物質を与えると抗体産生力が低下する^{8,9,10)}。Good, Thomas¹¹⁾ 等はグラム陰性菌の毒素に対する R.E.S. の機能について報告している。Cluff, Thomas¹²⁾ は内毒素の致死量以下の量を家兎に注射し、24時間後致死量を与えても致死せしめなかつたことは従来の意味での免疫ではなく、R.E.S. が或る種の生体防禦機構の一端を担つておるものと示唆した。生体内の R.E.S. の機能測定については幾多の複雑な問題があるが Biozzi^{13,14)} 等は血中から、投与された炭末の消失を測定し血中から炭末を除去する清浄力 (clearing power) を以て R.E.S. の表現とした。

すでに吾々はゲルトネル菌対マウスの実験チフス症に対する生体の反応を種々の面から検討し、生菌免疫、死菌免疫動物に強毒菌の種々の量を腹腔内及び尾静脈内に攻撃した場合の動物の反応を研究し、その結果の一部は発表した¹⁵⁾。今回は Biozzi 等の方法を用い、マウスにゲルトネル腸炎菌から抽出精製した内毒素を一回並びに数回動物に注射し、これらの動物が流血中から投与された炭末を除去する能力を測定した。又内毒素によって免疫されたマウスに再び大量の内毒素を注射した場合、

及びゲルトネル菌の強毒株 116—54 を攻撃した場合の R.E.S. 機能の変動も併せて測定した。又これらの動物の肝臓の病理組織学的検討については別に報告する。

材料及び実験方法

実験動物は ddF 系マウスを使用し、これが管理は前報^{15a)} に記載の方法に従った。使用菌株は *S. enteritidis* の強毒菌 116—54 株。この性状は既に前報^{15b)} に報告した。

炭末懸濁液: パイロット株式会社製製図用黒色インクを用いた。炭末粒子を一定にするため 8000 r.m.p. 20 分遠心し、その上部を取り、稀苛性ソーダを加えて軽く加熱、蛋白を除き濾過した。乾燥重量は 1 ml 当り 118 mg の炭末を得た。市販の膠を 1% の割合に蒸留水に加え加温溶解し、濾過したものを使用した。マウス体重に換算し 16 mg/100 g の割合に炭末粒子が注射出来る様に炭末懸濁液を作り、アンモニア水で中性にし、少量のマーゾニン (5000 倍) を加え、2°C 内外の冷所に保存した。炭末粒子の大きさは電子顕微鏡で測定すると略 250 Å で実験期間中炭末粒子の大きさは一定に保持出来た。

NAGAI Masahiko, KAWAKAMI Masaya, YAMAGUCHI Yuzo, IMAMURA Susumu OKONOGI Takashi*, FUKAI Koji* and MORITA Takeo*: Studies on the Experimental Typhoid, VI a. Relation between immunity and the activity of reticulo-endothelial system. Department of Microbiology, Department of Pathology*, School of Medicine, Gunma University. —Jap. J. of Bact., 14(1), 1-5, 1959.

使用した毒素は協同研究者小松¹⁶⁾等の方法によつて精製したものをを使用した。マウスに対するMLDは400 γ である。毒素1回注射には25 γ 、3回注射では初回25 γ 2回目12.5 γ 、3回目12.5 γ 計50 γ を用いた。攻撃には250 γ の毒素を使用した。免疫はすべて腹腔内に行つた。ゲルトネル強毒菌 116—54株 10^{-7} mgを使用し腹腔内攻撃を行つた。

実験方法：マウス尾静脈に炭末懸濁液を注射し炭末粒子が流血中から消失する割合を測定した。すなわち炭末懸濁液をマウス100g体重に換算し16mgの割合で尾静脈に注射した。

0.025 ml に標量した毛細管ピペットを予めヘパリンで洗い、マウスの後眼窩静脈叢から採血し、直ちに0.1%炭酸ソーダ2ml 中に入れ溶血を起させ、Hilger 光电比色計 (Filter No. 70, 最大透過率 710 m μ) で測定した。予めマウス血液中に正確に標量した炭末を階段稀釈で加えたものから標準直線を作製し、これによつて測定値を求めた。正常マウスに炭末懸濁液を注射した場合 R.E.S. に捕捉され方の少い初期 (数分間) は血中の炭末濃度の対数と時間との間には一定の関係は見出し得ないが5分以降は炭末濃度の対数と時間との間には直線関係が見られた。

図1 血中の炭末の消失速度

マウス血中に 16 mg/100 g 体重の割合に炭末を注射した場合の血中から炭末の消失速度

流血中から炭末が除去される速度

炭末の流血中から消失する関係は Biozzi^{13,14)} 等によると次式で現わされる。

$$C = C_0 \cdot 10^{-kt} \dots \dots \dots (1)$$

C_0 : 0 時間における血中炭末濃度の対数
 C : T 時間における血中炭末濃度の対数
 K : Phagocytic Index

(1) 式を追試するため、体重の同じマウス (16 g) 3 匹に 16 mg/100 g マウス体重になるように炭末懸濁液を尾静脈に注射し、直後から 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分後の各時間に採血し、型の如く炭末濃度を測定した。その結果 Biozzi の式とよく一致した。

免疫されたマウスの肝臓脾臓は漸次腫大しその重量は増加する。又 Biozzi¹⁴⁾ によれば Phagocytic index α は体重対肝臓脾臓重量比と Phagocytic index K の立方根との積を以て示されるとし、次式を以て表現した。

$$\alpha = \frac{W}{Wls} \sqrt[3]{K} \dots \dots \dots (2)$$

W: 個体の重量

Wls: その個体の肝臓 (l) 脾臓 (s) の重量

α : 修正された Phagocytic index

標準偏差を求めるためマウス 67 匹を使用し、正常マウスの R.E.S. 機能を測定した。統計学的^{17,18)} に処理した結果次の如き値を得た。

$$0.00722 \geq K \geq 0.00572 \text{ (信頼限界)}$$

$$0.01257 \geq K \geq 0.00039 \text{ (5\%棄却限界)}$$

$$15.5 \geq \frac{W}{Wls} \geq 13.5$$

$$2.83 \geq \alpha \geq 2.66$$

この値は各図表では点線で示した。

炭末懸濁液をマウス尾静脈に注射し10分後第1回の採血を行い、70分後、第2回の採血を行つた。体重を予め測定し、採血後マウスを屠殺、充分に血液を除いた肝臓、脾臓の重量を計つた。K値を(1)式、 α 値を(2)式より求めた。各実験動物の肝臓を Zenker 氏液に48時間固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理組織学的に検討した。1回の測定にマウス5匹を用い、その平均値を取つた。

実験結果

1. 毒素免疫群の R.E.S. 機能

マウス60匹を2群に分け、35匹に毒素25 γ 1回、25匹に初め25 γ 、2日目12.5 γ 、7日目に12.5 γ 、合計50 γ を腹腔内に注射した。初回の R.E.S. 機能測定には毒素注射後、6時間を経て計測した。

毒素1回免疫群の R.E.S. 機能は図2に示した。

K値は1日目は正常の範囲内に止まるが、2日目僅かに昂進し、4日目再び正常に復し、7日目以降上昇する。肝臓、脾臓は次第に腫大し、体重もやや減少するため $\frac{W}{Wls}$ 値は日を追つて減少する。

毒素3回免疫群における R.E.S. 機能を測定すると K 値は2日目12.5 γ 注射すると急激に昂進し、更に7日目12.5 γ 注射により、毒素1回免疫群に比べ遙かに昂進する。13日目では毒素3回免疫群の K 値は0.0126となる。毒素1回免疫した場合は0.0093であつた。

$\frac{W}{Wls}$ は毒素1回免疫群及び3回免疫群共に減少した。 α 値と K 値では肝臓脾臓の腫大著しく従つてこれらの重

図 2

腸炎菌の菌体内毒素免疫マウスの $\frac{W}{Wls}$, K, α の値

▲——▲ 毒素3回注射群 (矢印は注射日と)
●-----● 毒素1回注射群 (注射量を示す)

表 1

日	毒素1回注射群*			毒素3回注射群**		
	$\frac{W}{Wls}$	K	α	$\frac{W}{Wls}$	K	α
0	19.6	0.0068	3.73			
1	20.0	0.0068	3.70			
2	15.6	0.0073	3.02	13.6	0.0083	2.75
4	14.9	0.0061	2.72	15.3	0.0086	2.65
7	14.0	0.0084	3.14	13.0	0.0112	2.90
10	13.5	0.0087	2.77	13.9	0.0109	2.99
13	12.6	0.0093	2.65	10.8	0.0126	2.72

腸炎菌の菌体内毒素免疫マウスの $\frac{W}{Wls}$, K, α の値* 菌体内毒素1回 (25 γ) 注射群

** 菌体内毒素3回注射群

(1日 25 γ , 2日目 12.5 γ , 7日目 12.5 γ)

量は増加するため、必しも平行関係は見られなかった。

2. 毒素免疫群に毒素攻撃及び強毒菌を攻撃した場合

表 2

日	毒素免疫群に毒素 (250 γ) を攻撃した場合			毒素免疫群に強毒菌を攻撃した場合		
	$\frac{W}{Wls}$	K	α	$\frac{W}{Wls}$	K	α
1/4	13.1	0.0073	2.54	14.3	0.0067	2.74
1	13.1	0.0042	2.11	14.7	0.0053	2.56
2	12.9	0.0060	2.34	11.6	0.0045	1.92
4	12.6	0.0080	2.51	10.4	0.0058	0.86

腸炎菌の菌体内毒素免疫マウスに毒素及び腸炎菌強毒菌を攻撃した場合の $\frac{W}{Wls}$, K, α の値
毒素注射は3回, 注射間隔は表2に同じ

図 3

腸炎菌の菌体内毒素免疫マウスに毒素及び腸炎菌強毒株攻撃後の $\frac{W}{Wls}$, K, α 値の変動

▲——▲ 毒素250 γ 攻撃群
●-----● 腸炎菌強毒株 116-54 攻撃群

の R.E.S. 機能

毒素3回免疫したマウス40匹を2群に分け, 20匹に250 γ の毒素, 他の20匹に腸炎菌強毒株 116-54 の 10^{-7} mg を腹腔内に攻撃した。尚攻撃は免疫後13日目に行った。

毒素免疫群に250 γ の毒素を攻撃した場合の R.E.S. 機能は図3で示した。K値は毒素免疫13日目の値0.0126から0.0073に低下した。攻撃後1日目の R.E.S. 機能は最も低く2日目で正常に復し, 4日目では反って上昇した。 $\frac{W}{Wls}$ 値は攻撃後更に減少した。 α 値は著明な減少を示し, 特に1日目最低を示した。然も測定期間中正常値の範囲に回復しなかった。

毒素免疫群に強毒菌を攻撃した場合の R.E.S. 機能を

測定すると毒素を攻撃した場合より R.E.S. 機能の低下は著しく K 値 0.0067 に低下した。

表 3

	毒素免疫群	毒素攻撃	強毒菌攻撃
	(13日目)		
	0.0118	0.0077	0.0066
	0.0124	0.0078	0.0094
	0.0157	0.0077	0.0081
	0.0127	0.0083	0.0052
	0.0104	0.0050	0.0045
平均 K	0.0126	0.0073	0.0067
平均 α	2.72	2.54	2.74

腸炎菌の菌体内毒素免疫マウスの免疫終了後及びこれらのマウスに毒素 (250 γ) 攻撃、強毒菌 (10⁻⁷mg) 攻撃後 6 時間目の K 及び α の値

K 値は 2 日目最も低下し 4 日目ようやく正常の範囲に回復した。

すなわち毒素攻撃後の K 値の減少と比べると強毒菌攻撃直後は僅かであるが減少の途をたどった。毒素攻撃の場合 2 日目で正常値に復したが、強毒菌攻撃の場合回復が遅かった。 α 値は測定期間中減少をつづけた。

3. 毒素免疫群の肝臓の病理組織学的所見。

詳細は別報に述べるが図 4 に示した如く著明な変化はなく軽度のグリソン氏鞘細胞反応と小数のクッペル氏星細胞の限局性集簇を見るに過ぎず、食喰像もそれ程著明ではない。毒素免疫群に強毒菌を攻撃した場合はグリソン氏鞘の細胞反応が比較的著明であつたが他には著しい変化はなく、炭末食喰像も著明でなかつた。この事実は別報に述べる死菌ワクチン免疫群と著しく異なる点である。

考 按

細菌の感染における R.E.S. 機能は侵入菌を処理する場所として長い間研究されてきた¹⁻⁸⁾。実験チフス症において前報¹⁹⁾ の如くマウスは生菌免疫によつて、死菌免疫、毒素免疫では得られない強力な免疫を獲得し、強毒菌攻撃に耐過する。然るに死菌免疫の場合、血中の O 抗体の上昇は著明である。又菌体内毒素による免疫の場合 O 抗体の上昇は著明でマウスは 10 MLD の毒素攻撃にも耐過する。この様なすぐれた免疫条件が完成されて居るにもかゝらず、強毒菌攻撃に対しては生菌免疫の感染死防禦能に比べ著しく劣る。本報では細菌の感染に対する生体防衛機構の解明に R.E.S. 機能の測定を取り上

げ、毒素注射による R.E.S. 機構の変化を測定した。

Biozzi¹⁹⁾等によれば *Salmonella typhi* の死菌及び内毒素の数回に亘る注射でマウスの R.E.S. 機能は昂進することが明かにされた。腹腔内注射以外に静脈内及び皮下に注射したマウスでも同じ結果が得られたと報告している。又抗体産生力を抑制する Cortisone を与えた場合 R.E.S. 機能は低下した¹⁹⁾。吾々の実験結果でもマウスに菌体内毒素を腹腔内に注射すると R.E.S. 機能は昂進し、特に毒素 3 回注射群に著明であつた。1 回の毒素免疫の場合、免疫初期 R.E.S. 機能の低下が見られた。これは毒素による R.E.S. 細胞の障碍によるものと考えられる。その後 R.E.S. にとり込まれた毒素の刺激を受けて反応し R.E.S. 機能は昂進するものと考えられる。

毒素を 3 回免疫した場合、最初の免疫で R.E.S. 細胞が障碍を受けるが次いで与えられる毒素の刺激に反応し R.E.S. 機能は活性化し昂進するものと考えられる。1 回注射による毒素免疫と 3 回注射した毒素免疫群の $\frac{W}{W_{ls}}$ を比較すると毒素を繰返し注射した群では $\frac{W}{W_{ls}}$ は階段状に減少し、前者に比し肝臓脾臓の肥大、重量の増加が著明であつた。

グラム陰性菌の菌体内毒素を予め注射する事によつて別の抗原に対する抗体産生を著しく昂める事が報告されている^{19,20)}。又ツベルクリンを注射する事によつて別に注射された他の抗原に対する抗体産生を昂める事が知られている^{21,22)}。之等の事実は本実験で明らかな如くグラム陰性菌の菌体内毒素注射によつて R.E.S. 機能が昂進し、何らかの機構によつて抗体産生の場が刺激され準備状態にあるものと解される。

測定した K 値の増加が α 値に比し著しい。これは α 値が肝臓、脾臓の重量の増加を考慮に入れて修正されたため、生体の R.E.S. 機能は勿論その臓器の単位体積当りの昂進はもとより、その臓器を腫大せしめる事によつて更に全身の R.E.S. 機能を昂進せしめたものと思われる。

毒素免疫群に大量の毒素及び強毒菌を攻撃した二つの場合共に攻撃後急激に R.E.S. 機能が低下する。これらの回復を見ると強毒菌攻撃の方が毒素攻撃に比し劣る。然し何れの場合も攻撃後 4 日迄は K 値は一度減少した後回復を示す。菌体内毒素免疫マウスに強毒菌を攻撃した場合必ずマウスは斃死し感染死防禦能は成立しておらない。それにも拘らず強毒菌攻撃後、K 値は一時回復を示す事は K 値が必しも感染死防禦能を知る示標にならない事を示している。これに反し α 値は強毒菌攻撃後減少し回復を示さない点は興味深い。

総 括

菌体内毒素注射による生体の R.E.S. 機能を測定し次の結果を得た。

1. 毒素免疫群では1回の免疫に比べ、数回毒素を与える事により R.E.S. 機能は更に昂進する。
2. 毒素免疫群では無処置の対照群に比し、肝臓脾臓の腫大が著明であり、体重対肝臓脾臓比は著しく減少する。
3. 毒素免疫群におけるK値と α 値とは必しも平行関係はない。
4. 毒素免疫群に大量の毒素を攻撃した場合注射直後著しく R.E.S. 機能は低下するが短期間で正常に恢復し、ついで昂進する。
5. 毒素免疫群に強毒菌を攻撃した場合K値は一旦低下するが毒素攻撃の場合に比し遅れて僅かに恢復する。然しながら α 値は恢復を見る事なく減少の一途をたどる。

文 献

- 1) Metchnikoff, E.: L'Immunité dans les maladies infectieuses, Paris, 1901.
- 2) Metchnikoff, E.: Ann. de l'inst. Pasteur. 1: 321, 1887.
- 3) Wyssokowitsch, W.: Ztschr. f. Hyg. 1: 3, 1886.
- 4) Pfeiffer, R. and Marx, D.: Ztschr. f. Hyg. 27: 272, 1898.
- 5) Pfeiffer, R. and Marx, D.: Deutsch. med. Wschr. 24: 47, 1898.
- 6) Wassermann, A.: Berlin. Klin. Wschr. 35, 209, 1899.
- 7) Wassermann, M.: Deutsch. med. Wschr. 25: 141, 1899.
- 8) Jaffé, R. H.: Physiol. Rev. 11: 277, 1931.
- 9) Aschoff, L.: Erg. d. inn. med. Kinderheilk. 26: 1, 1924.
- 10) Jungenblut, C. W.: Ergebn. d. Hyg. 11: 1, 1930.
- 11) Good, R. A. and Thomas, L.: J. exp. Med. 96: 625, 1952. Ibid. 97: 871, 1953.
- 12) Cluff, L. E.: J. of Exper. med. 100: 391, 1954.
- 13) Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N.: Brit. J. exp. Path. 36: 226, 1955.
- 14) Halpern, B. N., Benacerraf, B. and Biozzi, G.: Brit. J. exp. Path. 36: 426, 1955. Ibidem and Stiffel, C.: Rev. Hemat. 1955. Benacerraf, B., Halpern, B. N., Biozzi, G. and Benos, S. A.: Brit. J. of exp. Path. 35: 97, 1954.
- 15^a) 三橋進他(第1報): 日本細菌学雑誌, 13, 323, 1958.
- 15^b) 三橋進他(第2報): 日本細菌学雑誌. 13, 366, 1958.
- 16) 小松信彦他: 日本細菌学雑誌. 13, 717, 1958.
- 17) 鳥居, 高橋, 土肥, 共著: 「医学, 生物学のための推計学」東大出版会: 1954年版.
- 18) 南保賀, 「整数の乗除: 計算表とその応用」東京: 理工図書: 1950年版.
- 19) Johnson, A. G. et al.: Fed. Proc. 13: 499, 1954.
- 20) Condie, R. M. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 90: 355, 1955.
- 21) Chandler, A., Stetson, Jr.: J. exp. Med. 101: 421, 1955.
- 22) Good, R. A., Condie, R. M., Thompson, G. and Tensen, D. R.: Fed. Proc. 16: 415, 1957.