腹腔単核細胞移入による実験的チフス症の免疫の研究

第 1 報

秋 山 武 久

慶応義塾大学医学部細菌学教室 (主任 牛場大蔵)

[受付: 8 月 15 日・1958 年]

われわれの教室がマウス対腸炎菌の組合せを用いておこなってきた実験的チフス症の感染免疫についての研究は、チフス症の免疫に体液性抗体以外の何物か重要な働きをしていることを明らかにした¹⁻⁴⁾。しかしながら、動物体そのものを被感染体とする従来の方法を踏襲する限り、感染免疫現象の分析的解明は極めて困難といわなければならない。そこで、この現象を宿主細胞対菌の関係にまで還元して、新しい視野から分析してみようという考えを持つて、先づ試験管内で培養した宿主の腹腔単核細胞と腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) とのシステムを採上げ、色々と毒力の異なつた菌が細胞内で増殖する様子を記録し⁵⁾、更に、生菌或は死菌を使つて免疫することが細胞の菌に対する反応にどういふふう反映するかが観察された⁶⁾。

ここに報告する実験も同一の趣旨から生れたもので、予め免疫処理をしたマウスの腹腔単核細胞を Chase の方法⁷⁾ にならつて未処置のマウスに移入して、recipients が強毒株の攻撃に対してどう反応するかを観察したものである。

実験材料と実験方法

1. 使用菌株

マウスおよびモルモットに実験的チフス症を起すことの出来る腸炎菌を選び、攻撃菌株、弱毒生菌免疫菌株として各 1 株づつを使つた。

No. 11 株: 教室でおこなつた動物のチフス症の実験に攻撃菌株として使われてきた菌株。

11 Rx 株: 死菌免疫したマウスに No. 11 株を攻撃した際に、その体内から偶々分離されたもので、No. 11 株に由来したと思われる R 型の弱毒変異株。

これらの菌株はすべて凍結乾燥して保存しておき、用に臨んで、先づ肉水寒天斜面に移植し、それを更に 1 代

継代して、その 37°C, 18 時間培養のものを使つた。

2. 使用動物

マウス: 白色、雑系の雌で生後 5—7 週のものを選び、固型飼料と水で飼育した。

モルモット: 全身白色、雑系の雌で、体重が 400—450 g のものを使つた。

3. 前処置としての免疫方法

生菌で免疫する時は 11 Rx 株の湿菌量にして 10^{-5} mg を皮下に接種してから、マウスの場合には 40—70 日 (一部実験では 20—138 日)、モルモットの場合には、53 日経過したものを選び、死菌で免疫する時は、マウスのみを対象としたが、No. 11 株の 56°C, 1 時間加熱死菌を 2—4 日の間隔で 0.05—0.1—0.15—0.2—0.3—0.4—0.5—0.6—0.7 mg と総計 3.0 mg を皮下に接種し、最終接種の後 10 日目のものを使つた。

4. 腹腔単核細胞の採取および移入法

使用器具: ガラス器具は既に報告した単核細胞の培養⁵⁾の際に使つたものと同質のもので、清浄は Weller et al. の方法⁸⁾ になつた。

採取法: 腹腔単核細胞を誘発するには、グリコーゲン食塩水を腹腔内に注射 (マウスでは 0.04 mg/ml のものを 0.5 ml 宛、モルモットでは 0.1 mg/ml のものを 10 ml 宛) してから、5—7 日目に動物を軽くエーテル麻酔したうえで心臓を穿刺して、採血死をおこさせる。次に 20,000 倍稀釈にヘパリンを加えた Hanks 液⁹⁾ を腹腔へ注射 (マウスでは 3.0 ml モルモットでは 15 ml 宛) し、軽く腹を揉んでから開腹し、腹腔内遊走細胞の浮遊

AKIYAMA Takehisa: Passive transfer of immunity in experimental typhoid by cell suspensions of immunized animals, I. Department of Bacteriology, School of Medicine, Keio University. — Jap. J. of Bact., 14 (2), 87—93, 1959.

液をピペットで吸引する。このようにして数匹——数十匹分の細胞浮遊液をプールしたものに1%のゼラチン食塩水を1/8量の割合に加え、冷凍遠心器を使つて $5 \pm 2^\circ\text{C}$ 1,000 rpm で7分間遠心沈澱し、沈澱を同様ゼラチン・ヘパリン加 Hanks 液に浮遊し、同じ条件でもう1回遠心沈澱する。分離した沈澱を一定量のヘパリン加 Hanks 液に再浮遊したものを使つた。このようにして得られた細胞浮遊液の94%以上は単核細胞で、neutral red 試験¹⁰⁾ では全細胞の95%以上が活性を示した。

移入法：細胞浮遊液は尾静脈、腹腔或は皮下を介して移入（断らない場合には尾静脈から）したが、マウス1匹当りの液量は0.3 ml と決め、この中にマウスでは1.5—2.0 四分（断らない場合には2四分）、モルモットでは2四分の腹腔単核細胞を含ませた。細胞数は recipient 当りマウスで 7.8×10^6 — 14.92×10^6 個、モルモットで 6.6×10^6 個であつた。

5. 攻撃と結果の判定方法

recipients のマウスは各群10匹からなり、細胞を移入してから一定の時間（断らない場合は4日）が経つた時に No. 11 株の 10^{-8} mg (700—1,200 個) を腹腔へ攻撃した。観察期間は21—50日（多くは28日）で、攻撃してからの生存日数を未処置動物の細胞浮遊液を移入した群や攻撃だけ加えた対照群のそれと比較して、どのくらいの感染防禦能が与えられたかを判定した。

実験成績

1. 細胞を移入してから攻撃までの時間を色々に変えた実験

腹腔単核細胞を移入してから攻撃までの時間（以後は interval と呼ぶ）によつて、直後、2日、4日の3群に分け、更に、各群を生菌で免疫されたマウスの細胞を移すか、未処置マウスの細胞を移すかによつて、2亜群を区別した。各亜群は10匹の recipients からなり、これに15四分の細胞を集めたものを10等分して尾静脈から移入した。この他に対照として攻撃だけ加えた群と11 Rx 株を使つて生菌免疫したマウスの血清だけを非働化しないでそのまま0.4 ml 宛皮下に被動的に与えてから24時間後に攻撃した群をおいた。

被働免疫に使つた血清の凝集価は、それぞれ No. 11 株のホルマリン死菌液とアルコール処理菌液¹¹⁾を抗原として、OH 価は32倍で陽性、O 価は2倍で陰性であつた。

結果は図1に示すように、未処置マウスの細胞を移した亜群の成績は何れも対照と変りがないが、免疫マウス

の細胞を移入したものの中では、interval が、2日、4日と長くなるほど強い感染防禦能を示した。攻撃菌に対応するO抗体を欠いた11 Rx 株で生菌免疫したマウスの血清による被働免疫は全く効果が認められなかつた。

この成績を参考にして、その後の実験では何れも interval を4日と決めた。

図 1

図 2

2. 細胞を移入する経路として尾静脈と腹腔を比較した実験

尾静脈から移入しても、腹腔を介しても生菌で免疫されたマウスから集めた細胞は recipients に強い感染防禦能を与えることが出来たが、攻撃菌を接種する場である腹腔に移す時は、たとい細胞が未処置動物のものであつても recipients の抵抗性を僅かながら増強するようであつた (図2)。そのため、その後は専ら尾静脈から移入することにした。なお、図2には攻撃だけの対照群の他に、生菌を使つて能動免疫した群の成績をも示す。

以上第1, 第2の実験で使つた生菌免疫マウスからブールした細胞浮遊液の一部をとつてブイヨンで増菌すると、毎常 11 Rx 株を培養することが出来たが、これは、11 Rx 株の生菌が接種されただけでも、かなりの免疫力を与えるのではないかという疑のもととなるので次の実験をおこなつてこれを解決しようとした。

3.

1) 試験管内で培養した菌を使つて前処置した実験

各群15匹のマウスを使つて、これに試験管内で培養した 11 Rx 株の 20, 200, 2,000個宛を尾静脈より接種し、4日後に、No. 11株で攻撃した。その成績は図3に示す

図 3

ように感染防禦能は与えられなかつた。なお同じ条件で培養した菌を予め未処置マウスの細胞に食菌させておい

てから移入しても同じであつた。

2) in vivo で増殖した菌を使つて前処置してから逐日に攻撃した実験

11 Rx 株の in vivo 菌を採る方法: 先づマウスに X 線の全身照射をするのであるが、これには 15 g 内外のマウスを円形のアクリル樹脂製容器 (直径 25 cm, 高さ 4 cm, 内部を 18 個の放射状の部屋に分け、各部屋に一匹宛のマウスを容れる。自由に動くことが出来ないので、

図 4

マウスの照野における位置は大体一定する。なおこの容器にはマウスの発汗を防ぐために、径 0.3 cm 程の多数の孔をあけた)に容れ、総量にして 400 r の X 線を照射した。照射の条件は、計器電圧 168 V 管球最高電圧 180 KVP, 管球電流 4 mA, filters としては Cu 0.5 mm, Al 0.5 mm を併用、距離 50 cm, 入射量 12.05 r/min, 放射時間 33.2 分で、室温、湿度による影響と二次線量は無視した。次いで照射してから 18 時間目に、11 Rx 株の 10^{-2} mg を皮下に接種すると、マウスは 4—7 日の間に全員が敗血症をおこして死亡する。これを斃死直後に開腹して、ヘパリン加 Hanks 液で洗えば、毎常 10^7 前後の菌が採れるので、これを適当に稀釈して、“in vivo の菌”とした。

こうして採つた in vivo 菌と試験管内で培養した菌 (“in vitro 菌”と呼ぶ) の各 12, 11 個宛をマウスの尾静脈から接種し、その後逐日に攻撃した成績を図4に示す。少くとも 4 日の interval では、菌を採つた条件の如何にかかわらず、感染防禦能は与えられなかつた。

4. 色々の期間免疫しておいたマウスの細胞を移入した実験

生菌免疫してから 20, 43, 71, 97, 138 日目のマウス

各々20匹分の細胞をプールして、10匹の recipients の尾静脈から移入し、4日後に攻撃した成績を右側(図5)に、比較のために同一期間免疫したマウスに攻撃した。能働免疫群の成績を左側に示す。なお、移入の際に持込

図 5

まれた 11 Rx 株の菌数を recipient 当りにして、一番右側に示した。細胞浮遊液の中に含まれていた 11 Rx 株の菌数の多少にかかわらず、能働免疫で一番効いた 43—71 日免疫群のマウスの細胞を移入したものが最も強い感染防禦能を示した。そのために、その後の実験では 40—70 日間免疫したマウスを使つた。

5. 細胞浮遊液から 11 Rx 株の生菌を除いた実験

1) これまでの実験では、15匹以上の免疫マウスの細胞をプールしたために、浮遊液中にかなりの数の生菌が混り、それがそのまま recipients に持込まれた。この実験では、免疫マウスの細胞を 5 匹宛宛集めて、これを 3 等分した。その内の 2 部を各々 1 匹のマウスに移入し残った 1 部を寒天平板に流して、11 Rx 株が含まれているかどうかを検べた。こうして無菌の浮遊液を移された 10 匹を生菌を持込まれた (2,400 個入れられた 2 匹を除いては 3—320 個という少量菌) 17 匹から区別することが出来た。

2) 細胞を集める前の 1 週間、連日、朝夕 2 回、毎回 4,000 μ g のジヒドロストレプトマイシン (明治製薬) を皮下に注射すると、20 匹分をプールしても菌を含んでいない浮遊液が得られる。

1), 2) の何れの方法で集めた無菌の細胞浮遊液も reci-

ipients を感染から防禦することは出来なかつた(図 6)。

この際ジヒドロストレプトマイシンで治療したマウスの脾臓、肝臓、腸間膜リンパ腺からは、なお、かなりの数の 11 Rx 株の菌を培養することが出来、このようなマウスに攻撃したところ、10 匹中 9 匹が生残つた。

6. 音波で処理した細胞浮遊液を移入した実験

細胞を破壊するのには、20 K C の音波発生装置を使つ

図 6

たが、処理時間が 15 分以上になるとパイオン増菌しても細胞浮遊液から菌を培養することは出来なかつた。処理時間がより短くなるにつれて生菌が残るようになるが、5 分以上処理してしまうと、浮遊液中に生菌が残つていても recipients に感染防禦能を与えることは出来なかつた。これに反して、2.5 分という短時間処理した細胞は、染色したところでは全く無形状に壊されているにもかかわらず強い感染防禦能を移すことが出来た(図 7)。

7. 細胞浮遊液を音波で処理してから遠心沈澱し、得られた上清を移入した実験

音波で 2.5 分処理した細胞浮遊液は、未だ多少濁つているが、これを 1,000 rpm、7.5 分遠心沈澱すると、細胞の破片は沈んで全く透明な上清が得られる。この上清には、未だかなりの数の生菌が残っているが、これをそのまま移入すれば、intact の細胞浮遊液を移した時と同程度の感染防禦能を与えることが出来た。しかし同じ条件で音波処理した浮遊液でも、3,000 rpm 10 分、遠心沈澱して、生菌が培養によつて証明できない状態として移入したのでは全く効果が無くなつてしまった(図 8)

この実験では、60 匹分の細胞をプールして先づその 1/3 量をそのまま移して intact 細胞群をつくり、残りを一緒に音波処理してから 2 等分し、異なる速度で遠心沈

澱して得た上清を各々10匹のマウスに移した。

8. *intact* の細胞浮遊液を皮下に、或は凍結融解したものを尾静脈に移入した実験

ドライアイスとアセトンを組合せた寒剤を使つて凍結融解を2回繰返すと、液の中の細胞は大部分壊れてしま

図 7

うが、生菌は残っている。これを移入しても感染防禦能を与えることは出来なかつた。

また、尾静脈から移せば強い抵抗を与える *intact* の細胞浮遊液でも、皮下を介して移入したのでは全く無効に終つてしまった (図略)

9. 異種動物の細胞を移入した実験

11 Rx 株の生菌で免疫したモルモットの腹腔単核細胞を roller tube 内で培養しながら、これに No. 11 株を感染すると、未処置モルモットの細胞に同株を感染した場合に比べて感染菌の増殖が著しくおさえられることは既に報告したが⁹⁾、同じ条件で免疫したモルモットの腹腔単核浮遊液には 11 Rx 株の生菌が残っていたにもかかわらず、これを尾静脈から移入してもマウスに何らの感染防禦能を与えなかつた (図略)

10 死菌で免疫したマウスの細胞を移入した実験

実験方法の項で述べた要領で免疫したマウスの血清を分離して、No. 11 株に対する凝集価を測つてみると、ホルマリン加死菌液を抗原として OHI 価が 5, 120 ×, アルコール処理抗原を使つて O 価が 160 × 陽性であつた。この血清を非働化しないでそのまま、0.4 ml 宛を被動的に皮下に与えると、死菌で能動免疫されたマウスと同程度に、僅かではあるが攻撃後の死期が延びた。これに反して、同じマウスの腹腔単核細胞を移入したのでは、防禦効果は極めて弱く、未処理マウスと殆んど変わらない死にかたを示した (図 9)

図 8

図 9

総括と考按

攻撃菌の加熱死菌で免疫したマウスの血清は、同菌に対して高い凝集価を示すにもかかわらず、そのマウスの腹腔単核細胞を集めて未処置マウスに移入しても殆ん

どの効果もなかった。これに反してR型弱毒の生菌で免疫した場合にはマウスの流血中には、攻撃菌に対する凝集素が殆んど欠けているにもかかわらず、その腹腔単核細胞は recipients に強い感染防禦能を移すことが出来た。この成績はこの場合に、体液性抗体とは違った因子が働いていることを示唆しているが、生菌処理の場合でも特に免疫してから43—71日といった能働免疫群が最も強い感染防禦能を示す時期のマウスから採った細胞が、最も効果的であるということは、生菌免疫、ひいてはチフス症の免疫の主役を演ずる因子の内の少くとも一部が、この細胞浮遊液の中に含まれていることを暗示しているとはいえないだろう。

それでは、生菌で免疫したマウスから採った細胞浮遊液のはたしてどの部分に有効因子がひそんでいるのだろうか。細胞か、或は偶々持込まれた弱毒の生菌に由来するのか。またはこの両者の存在が必要なのか。こういう点に問題をしばつて成績を整理してみる。

先づ菌だけによつて感染防禦能が与えられるのでないらしいということは、次の成績から肯けよう。

1. 移入の際に持込まれた弱毒生菌の数と与えられた感染防禦能の強さとの間に、何の相関関係もなかった。

2. *in vivo*, *in vitro* の何れの条件で採った菌を使つても、4日間の前処置では認むべき程の感染防禦能を与えることは出来なかった。これは菌を予め未処置マウスの腹腔単核細胞に食菌させてから前処置に使つても同様であつた。この実験のように攻撃後のマウスの斃死状態を成績判定の規準として、しかも相当の免疫を与えるためには、弱毒の生菌を接種してから、少くとも1週間以上は待たなければならないことは従来教室でおこなつた実験¹²⁾によつても明らかである。

3. 5分以上音波で処理してしまつたものは、その中に生菌が残つていても無効であつた。

4. 同様に生菌が残つていても異種動物の細胞であつたり、静脈や腹腔に移入すれば有効な細胞でも、これを皮下に接種したのでは recipients の感染防禦能をたかめることは出来なかった。

また細胞だけでも感染防禦能の移入が達せられないらしいということは、不充分ではあるが、次の成績から窺われる。

1. 2.5分音波で処置した細胞浮遊液を軽く遠心沈澱して、細胞の破片をすつかり除いてしまつても、生菌が残っているかぎり、感染防禦能を与えることが出来るが、更に強く遠心沈澱して生菌を除いてしまつたものでは効果がなかった。

2) 免疫マウスを予めストレプトマイシンで治療するとか、細胞を少数のマウスから集めながら、その一部を培養して生菌の有無を検べるとかして選り出した無菌の細胞浮遊液を移入したのでは全然感染防禦能は与えられなかった。

結局、上記の成績からしては、生菌で免疫されたマウスの細胞成分と、免疫に使つた株の生菌とが同時に移入されることが必要と思われるが、これについての結論およびその機序については将来の追究にまたなければならぬ。

次にこれらの問題とは別に、細胞浮遊液を皮下に移入したり、予め凍結融解処理した細胞や¹³⁾ intact でも異種動物の細胞を移した場合には効果がなく¹⁴⁾、逆に短時間の音波処理で壊した細胞には効果が保たれている¹⁵⁾ことは、ツベルクリン反応陽性動物の細胞を移入して、未処置動物にツベルクリンアレルギーを移す場合の条件と似ているが、結核とチフス症の発症病理や免疫の機序に色々と相似する点の少くないことを思いあわせると、まことに興味深く感じられる。

結 論

腸炎菌 (*S. enteritidis*) のR型弱毒株の生菌で予め免疫したマウスの腹腔単核細胞を集めて未処置マウスに尾静脈か腹腔を介して移入すると、recipients に4日後の強毒株の攻撃に対抗する強い感染防禦能を与えることが出来た。

上記細胞浮遊液を2回凍結融解してから移入しても感染防禦能を与えることが出来なかったが、軽く音波処置して壊した細胞は強い防禦能を移すことが出来た。

生菌による能働免疫が一番有効な時期(接種後40—70日)に採った細胞が、移入実験によつても最も強い感染防禦能を与えることが出来た。

感染防禦能の移入が有効な場合には何れも移入した細胞浮遊液から生菌免疫に使つたR型弱毒菌を培養によつて証明することが出来たが、そこに含まれる生菌のみによつては有効であるという証明は得られず、また他方、種々の方法で得られた生菌を含まない細胞浮遊液のみによつても感染防禦能を与えることは出来なかった。これらの点についての解決は将来に残された。

強毒株の加熱死菌で免疫したマウスの細胞を移入しては殆んど効果がなかった。また弱毒生菌免疫マウスの細胞でもこれを皮下に移入した場合、あるいは同菌で免疫したモルモットの細胞をマウス静脈内に移入した場合にも、上記のような感染防禦能を与えることはできなかった。

た。

(本論文の要旨は昭和32年(第30回), 33年(第31回)の日本細菌学会総会で発表した)

ご指導とご校閲をいただいた恩師牛場教授, 齊藤講師, ならびに, 協力をおしまれなかつた大井田(旧姓大野), 杉山両学士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kobayashi, R. & Ushiba, D.: Keio J. Med., 1, 35-47, 1952.
- 2) Ushiba, D., Yoshioka, M., Iwahata, R. & Yamagata, S.: Keio J. Med., 2, 75-90, 1953.
- 3) Ushiba, D., Iwahata, R., Saito, K., Akiyama, T. & Yoshioka, M.: Keio J. Med., 3, 73-78, 1954.
- 4) 牛場大蔵, 齊藤和久, 秋山武久, 大野シヅ子: 第28回日本細菌学会記録(昭30), 日本細菌学雑誌, 10, 626, 1955.
- 5) 齊藤和久, 大野シヅ子, 秋山武久: 日本細菌学雑誌 12, 937-947, 1957.
- 6) 齊藤和久, 大野シヅ子, 秋山武久, 牛場大蔵: 第30回日本細菌学会記録(昭32), 日本細菌学雑誌, 12, 534, 1957.
- 7) Chase, M. W.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 59, 134-135, 1945.
- 8) Weller, T. H., Enders, J. F., Robbins, F. C. & Stoddard, M. B.: J. Immunol., 69, 645-671, 1952.
- 9) Hanks, J. H. & Wallace, R. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 71, 196-200, 1949.
- 10) 大根田玄寿: 日本医事新報, 1437, 3167-3168, 1951.
- 11) White, P. B.: J. Path. & Bact., 32, 85-94, 1929.
- 12) 羽生秀吉, 窪田幸記: 慶応医学, 10: 1277-1288, 1930.
- 13) Chase, M. W.: J. Allerg., 26, 242-248, 1955.
- 14) Cummings, M. M., Patnode, R. A. & Hudgins, P. C.: Am. Rev. Tuberc. 73, 246-250, 1956.