百日咳菌のマウス腹腔内感染の病因について

1. 腹腔内の菌の消長と食菌作用との関係

沢 井 芳 男 下 条 寛 人

東京大学伝染病研究所試験製造室 (主任 沢井芳男助教授)

〔受付: 11 月 11 日・1958 年〕

まえがき

百日咳菌をウサギ, モルモット, あるいはマウスの腹腔内に接種して動物を死に至らしめるには, 他の接種経路, たとえば脳内接種, あるいは終鼻接種よりもはるかに大量の菌を必要としている¹⁾²⁾。したがって腹腔内接種による百日咳菌感染の病因は, 菌がその中で増殖した結果というよりもむしろ菌の毒素による中毒死と見るべきであると考えられてきた。

しかし一方では毒素が菌の感染に重要な役割を演じていることを示唆している報告³⁾もあり, あるいは何故腹腔内接種は他の経路よりも大量の菌を必要とするのかという疑問も残されているので, これ等の問題を分析し, 腹腔内感染の機序を明らかにするために, マウスを用い, 腹腔内に接種された菌の運命を特に食細胞との関連において追求した結果, 2, 3 の新知見を得たのでここに報告して大方の御批判をおおぐ次第である。

実験材料と実験方法

使用菌株は東浜株, 大塚株, 中村株 1 相菌, 及び東浜株, 坂入株 Ⅲ 相菌をボルデー, ジヤング (B・G) 培地に 37°C 48 時間培養したものを用いた。菌浮遊液には生理食塩水を用い, 光電比色計を用いて予め作製した標準曲線と照し合せ乍ら所定の菌濃度に調製した。マウスは伝研で飼育された ddF 系を用いた。

上記の一定量の菌をマウスの腹腔に接種し, 一定時間毎にガラスの毛細管で腹腔液を採取し, 塗抹標本を作り, ギムザ染色を行った後に検鏡し, 白血球の食菌と細胞外の菌の消長を追及した。白血球は 100 個を数え, 多核白血球の食菌していないもの, 1 個～5 個, 6 個～10 個, 10 個以上食菌しているものをわけて記録し, グラフを作り食菌の推移を明らかにした, 一部は単核白血球についても同様な検査を行った。

実験成績

実験 1, 東浜株, 大塚株 1 相菌, 及び坂入株 Ⅲ 相菌の 32bil. (320 億) 及び 8 bil. ずつを 0.5ml の生理食塩水に浮遊し, 生後 4 週 ddF 系マウス 5 匹ずつの腹腔に注射し, 時間を追って腹腔液の検査を行った。その結果は第 1 表にまとめられているが, 腹腔局所の経過は第 1 図に示されたような 3 つの型に大別された。そのひとつは東浜 1 相菌, 32bil. 接種群, マウス No. 1 にみられたもので, 接種後 5 時間の標本では大部分の多核白血球は最大限の食菌を行っており, 細胞外の菌は極度に減少して 1 視野に 10～20 個程度であった。そして更に時間が進み, 24 時間前後のものでは多核白血球の食菌は峠を越し, 食菌を行わない白血球の数が増加するにも拘らず細胞外に少数の菌が動物の死に至るまで食菌されずに残されている。そこで動物の死は, 細胞外にわずかに残存している菌によるというよりも, むしろ I 相菌の毒素の障害作用によると見るべきであると考え, この様な経過をとるものを非敗血症型 (non-sepsis form) と名付けた (写真 2)。すなわち白血球の菌を清掃する力が大であることを意味している。

これに反して上と同様に 32bil. 接種群の No. 2 のマウスは接種された菌がそのままほとんど減少する様子がなく経過し, 白血球数は前者の例にくらべると著しく少く, また最大限に食菌した白血球の周囲には多数の菌の吸着がみつめられ, 多くの場合核が変性し, 崩壊している像も多数認められている。この様にして細胞が崩壊し

SAWAI Yosio and SHIMOJO Hiroto: Studies on the pathogenesis of intraperitoneal infection of *H. pertussis* in mice 1. Relationship between the clearance of bacilli from peritoneal cavity and phagocytosis. Laboratory of Biological Products, Institute for Infectious Diseases, the Univ of Tokyo. —Jap. J. of Bact., 419-424, 1959.

第 1 表

菌 株	接 種 菌 量	マウス生/使用数	敗 血 症 型	非敗血症型	回 復 型
東 浜 I 相	32 bil	0/5	3	2	0
	8 bil	3/5	0	2	3
大 塚 I 相	32 bil	1/5	2	2	1
	8 bil	4/5	0	1	4
坂 入 III 相	32 bil	5/5	0	0	5
	8 bil	5/5	0	0	5

第 1 図 各感染型における食菌像の推移

東浜 I 相 32 bil (マウス No. 1) 非敗血症型

東浜 I 相 32 bil (マウス No. 2) 敗血症型

東浜 I 相 8 bil (マウス No. 6) 回復型

註: グラフのよこ軸 O: 食菌していない白血球, 1~5: 1個から5個食菌している白血球, 以下同じ, たて軸はそれぞれの区分けした白血球数を表す。B: 細胞外の菌数(1視野中), カッコ内は標本番号。Mは視野中の単核白血球

食菌が妨げられる為に腹腔内の菌はむしろ増殖の傾向さえみられ、前の感染例とは全く異つた経過をたどるので、この様なマウス群を敗血症型 (Sepsis form) と名づけた (写真1), これらの動物はすべて48時間以内に死亡した。

第3の型は東浜Ⅰ相菌, 8 bil. マウス No. 6, あるいはⅢ相菌感染に見られたように、マウスはすべて生き残る。菌は最初の5時間の標本で殆んど細胞外に見えなくなり、多核白血球による食菌も僅少で既に峠を越していた、24時間後の標本では細胞外の菌は全くなくなり、細胞内の菌も極くわずかに見られる程度であつた。この時期には単核細胞が15%内外に出現して回復の兆候を示し、48時間後では50%あるいはそれ以上にも昇つた。このような経過に対して回復型 (recovery form) と名づけた。

実験2, 菌株は前と同様に東浜株Ⅰ相菌を用い、マウスは ddF 系、生後4週のものを用いた。菌の 32bil, 16 bil, 8 bil, 4 bil. をそれぞれ3匹ずつのマウスの腹腔に注射し、12, 15, 18, 24, 36, 39時間に腹腔液の塗抹標本を作り前と同様の検査を行つた。

第2表

菌 量	マウス生/使用数	敗血症型	非敗血症型
32 bil	0/3	2	1
16 bil	0/3	3	0
8 bil	0/3	1	2
4 bil	0/2	1	1

実験成績は表2に示された通りであるがこれ等の接種マウスの中で敗血症型をたどつたものは前と同様に滲出白血球数が少く、且つ残つた白血球は最大限に食菌していながら崩壊する像が著明で、細胞外の菌は殆んど減少せず、白血球の周囲にも濃厚に密着している為に塗抹標本ではあたかも崩壊した細胞から菌が遊出しているかの様な観を呈するものさえみられた。

これに反して非敗血症型のものでは接種後12時間では細胞外の菌は少数で、食菌作用も漸次減退するが、白血球数は非常に多く、敗血症型のような崩壊像は全く認められなかつた。マウスの死亡直前の標本では単核白血球が10~20%にも出現していた。この様な像も敗血症型には見られなかつた。

実験3 本実験では極く早期における菌の消長をしらべる目的で ddF 系マウス5匹に大塚株Ⅰ相菌10bil. を腹腔に注射し、15分、30分1時間、2時間、3時間、6

第3表

マウス No.	生 死	感 染 型
1	死 (<24)	敗血症型
2	生	回復型
3	死 (<24)	敗血症型
4	死 (<24)	敗血症型
5	死 (<24)	非敗血症型

註: カッコ内<24は24時間以内に死亡したことを示す,
dd 4週, 大塚株Ⅰ相菌,
10 bil. 注射。

時間及び24時間の腹腔液の標本について検査を行つた。実験成績は第3表にまとめているが、5匹中3匹が敗血症型、1匹が非敗血症型、残りの1匹が回復型を示した、また第2図に示されたように、多核白血球の滲出は注射後30分あるいは60分に既に増加の傾向がみられたが、著明な増加は2時間または3時間後であつた。細胞外の菌の消長は注射後15分では1視野に100~200個を数え、敗血症及び非敗血症による差は認められなかつたが、明らかなのは敗血症型の経過をとつたものでは、この時期にも滲出前に局所に遊走している少数の多核白血球にすでに崩壊がみられていた。これに反して回復型の場合には驚くべきことはこの時期に既に細胞外の菌は殆んど全く無菌となつており、わずかに遊走している単核あるいは多核白血球の中にごく少数の菌が食菌されているに過ぎなかつた。

非敗血症型では30分頃から細胞外の菌が減少する傾向がみられたが著明な白血球の増加は3時間後であつた。

考 察

この等の実験成績から、マウスの腹腔内に同じ菌量を接種した場合にも、3つの異つた感染経過をとることがわかつた。この相違は第1に腹腔内の菌の清掃 (clearance) に著しい差がみられることである。第2はとくに多核白血球にみられる阻害作用である。敗血症型と名付けたのは白血球があたかもグラム陽性球菌にみられるロイコジン (leucocidin) 様⁽⁴⁾⁽⁵⁾の作用をうけた結果、菌の清掃が妨げられ、そのために菌の増殖が起るものと考えられたからであつて、局所のみならず全身的にも、この様な増殖がみられるかどうかは別の問題として局所では少くとも菌の増殖を思わせるような像がみられたからである。従つて敗血症型の特徴は白血球の崩壊 (lysis), 従つて白血球数の減少 (leucopenia) が著明で、菌の清

掃が極度に阻害される。従つて動物の死因はもちろん毒素が大きな役割を演じているとはいえ、やはり菌増殖という因子もこれに加わっているものと考えられる。崩壊していく白血球は毎常最大限に食菌しているが、核がピクノーゼを起し、細胞膜は破壊されていることが多い、また非敗血症型の場合と異つて白血球の周囲に菌が吸着して密集しているのが特徴であつて、あたかも細胞内の菌があふれ出したのではないかとさえ考えられる。また白血球が菌によつて攻撃されている様な感じさえる。非敗血症の場合には菌数が多く若干菌が吸着している様な像もみられるが、白血球数はあまり減少せず、崩壊像も著しくない、また時期が進めば白血球の増加が著明で、菌の減少も目立つてくる。この場合の特

徴は極め少数ではあるが細胞外に菌が食菌されずに残されることである。この点回復型で早期に菌が消滅するのとは異なる。この場合多核白血球の増加も著明で、食菌をしていないものも多数見られるにも拘らず、少数の細胞外の菌をとり込む事が出来ないのは一見奇異な感じである。

この時期の菌にある種の抵抗性があらわれたのか、あるいは白血球の機能が衰えた為であるかは不明である。この点毒素が菌の侵襲性 (invasiveness) を助けているという考え方が出てくるかも知れない⁹⁾。またこの様に若干の菌が残存する為に、回復型の時の様に早期に多数の単核細胞の滲出がみられず、多核白血球が依然死に至るまで優勢を続けている点にも興味がある。何れにして

第 2

註：図中点線は多核白血球，実線は単核白血球数を示す，

写真 1 百日咳菌 I 相菌 (東浜株) 4 bil を腹腫内注射後 15 時間, 腹腔液ギムザ染色. (敗血症型)

写真 2 同上 8 bil 注射, 12 時間後. (非敗血症型)

図

N:M は多核白血球と単核白血球との比

もこの様な感染様式は対照に用いたⅢ相菌には見られなかった。これに反して回復型、あるいはⅢ相菌感染では菌の清掃能率は素晴らしく、ふつう数時間で細胞内外の菌は局所から消える。ことに実験3にみられた例は15分というわずかな時間内に、同時に注射された他のマウスでは腹腔液は未だ菌の洪水であるのに、見事完全に清掃されているのは注目に価する。これは白血球の滲出が起る以前の出来事であつて、それ以前に少数遊走している局所の白血球だけによつてこの様な完全な清掃が行われたとは考えられないので、この場合はどうしても液性の強い殺菌機構が考えられねばならない⁷⁾。

従来百日咳菌の腹腔内感染はむしろ接種された菌から分泌される毒素による中毒死であるという見方をされてきた。従つて敗血症型の場合にも菌の清掃の障害がどの程度の役割を演じているかは明らかではないが、腹腔内での菌の清掃、あるいは白血球に対する障害に著明な差のあることは、生体反応に著しい差がある為であると見なければならぬ。従つてこれ等の事実は百日咳感染あるいは免疫の機序を分析していく上に多くの示唆を与えるものと考えられる。

総 括

マウスの腹腔内に百日咳菌のⅠ相及びⅢ相菌を注射して腹腔内の菌の清掃と食菌との関係を追及したが、同じ菌量を接種した場合でも3つの異つた経過をとることが明らかにされた。その1つは敗血症型であつて白血球がロイコシチン様の作用を受けて崩壊する像が著明で、菌はむしろ増殖する傾向を示して動物は死ぬ、次は非敗血

症型で、白血球の崩壊は全く起らず、菌の清掃も時間と共に進むが死に至るまで極く少数の菌が食菌されずに細胞外に残されている。第3は回復型であつて菌の清掃力は異常に強く、早期に腹腔から消滅する。この機作は細胞外の殺菌作用を想定させる。この様に菌側の条件を同一にしていわゆる純系マウスを用いても、一見病因を異にするような経過をたどることは百日咳菌の感染の機作を明らかにする上に興味ある事実であると考えられる。

なお本稿の概要は第29回日本細菌学会で演述された、また本研究は文部省科学研究費による総合研究班細菌性小児伝染病予防研究班(班長 野辺地慶三博士の)一環として行われたもので、ここに謝意を表する。

文 献

- 1) Bordet, J. & Gengou, O.: Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche., *Ann. Inst. Pasteur*, 21, 720-726, 1907.
- 2) Standfast, A. F. B.: The phase I of *H. pertussis*, *J. gen. Microbiol.*, 5, 531-545, 1951.
- 3) Ospeck, A. G. & Roberts, M. E.: Pertussis antitoxin, Its relationship to protection in actively and passively immunized mice and rabbit., *J. infect. Dis.*, 74, 22-31, 1944.
- 4) Proom, H.: The immunological aspects of experimental *H. pertussis* infection., *J. path. Bact.*, 59, 165-180, 1947.
- 5) Oram, F.: Pneumococcal leucocidin., *J. Immunology*, 26, 233-246, 1934.
- 6) 沢井芳男, 田中光: マウスの弱毒肺炎球菌感染について, 1. 感染経過と食作用との関係について, *日本細菌学雑誌*, 7, 515-518, 1952.