百日咳菌のマウス腹腔内感染の病因について

3. 腹腔内の菌の消長に対する粗毒素の影響

沢井 芳 男・下 条 寛 人・鴨 志 田 恒 世

伝染病研究所試験製造室 (主任 沢井芳男助教授)

〔受付: 2月23日・1959年〕

われわれは前の報告¹⁾で百日咳菌の同じ菌量をマウスの腹腔へ注射しても、腹腔内の菌の消長はマウスによって著しく異なることを指摘した。そのひとつの感染型である非敗血症型は、敗血症型にくらべると白血球の崩壊像は全く見られず、時間のたつにつれて食菌が進行し細胞外の菌は急速に減少し、全く食菌していない白血球が漸次増加するにも拘らず、死に至るまで完全には清掃されず極く少数ではあるが菌が常に細胞外に残されている。このような現象は回復型あるいはⅢ相菌による感染では全く認められない。

このような感染型にみられる菌の清掃 (clearing) を阻害している因子あるいはその機序を追及することは百日咳菌の感染機序を分析する上に役立つと考えられる。

そこでまず百日咳菌Ⅰ相菌に特徴のある毒素が菌の清掃にどの様に影響するかをしらべた結果、菌の超音波処理による粗毒素分割が菌の清掃を阻害することを知ったのでここにその大要を報告し、2, 3の考察を試みた次第である。

実験材並びに方法

菌株は前の実験と同様にⅠ相菌には東浜株を、またⅢ相菌には坂入株を用い、B・G培地に37°C, 48時間培養したものを用い、粗毒素分割には、Ⅰ相菌の一定量を超音波で20分間処理した後に、20,000 rpm 60分遠心後の上清を用いた。実験には生菌の致死下量と粗毒素の変量とを混合、ddF系、4 W, マウスに注射後、前と同様一定時間に腹腔液の塗抹を行いギムザ染色標本について、食菌と細胞外の菌の消長をしらべた。

実験成績

1. マウスの生死からみた毒素分割の感染増強作用:
生菌はⅠ相菌 4 bil 及び 1 bil. 粗毒素は用いた菌量に換

算して 4 bil, 1 bil, 及び 0.25 bil 相当量をそれぞれ混合して10匹ずつのマウスの腹腔に注射し生死を観察した。実験成績は第1図に示された通りであるが、粗毒素の量

第 1 図

註, 攻撃菌: 東浜株 4 bil.

註, 攻撃菌: 東浜株 1 bil.

SAWAI Yoshio, SHIMOJO Hiroto and KAMO-SHIDA Tsuneo: Studies on the pathogenesis of intraperitoneal infection of *H. pertussis* in mice. 3. Influence of the *H. pertussis* toxin upon the clearance of the bacilli from peritoneal cavity. Laboratory of Biological products, Institute for Infectious Diseases, The Univ. of Tokyo. —Jap. J of Bact, 14 (9) 789-791.

が増すにつれて死亡マウスの数が増加していることがわかる。また生菌攻撃量の大きい方が毒素による増強作用が強い。マウスの死亡時間は12時間から4日の間であった。なお粗毒素のマウスに対する毒性は第1表に示されている。

第 1 表

毒 素 量	死亡数/使用マウス
16 bil 相 当	10/10
4 bil //	5/10
1 bil //	0/10
0.25bil //	0/10

2. 毒素のI相菌による感染型に対する影響：次に15匹ずつのマウスを5群に分け、それぞれに2bilのI相菌と、粗毒素を16bil, 4bil, 1bil, $\frac{1}{4}$ bilを混合して、4群のマウスの腹腔内に注射し、残りの1群は生菌のみの対照とした。マウスは注射後3, 6, 9, 23, 30, 46, 70時間に腹腔液を採取して前と同様に鏡検し、4日, 5日及び6日目にそれぞれの群のマウスを1匹ずつを殺して腹腔液, 心血及び脾臓の塗抹培養を行い菌の有無をしらべた。実験成績は第2表に示された通りである。すなわち16bil相当の毒素を注射された群のみが非敗血症型の感染経過をたどり、他はすべて回復型を示した。また培養成績では非敗血症群のみが、心血, 腹腔, 及び脾臓の培養が陽性であり、回復型では腹腔液の培養はすべて

第 2 表 百日咳菌培養成績

培養時 病 日	マ ウ ス 群 別	心血	腹腔液	脾臓
4 日	非敗血症型 (16 bil)	+	+	+
	回 復 型 (4 bil)	+	—	+
	" (1 bil)	+	—	+
	" (0.25 bil)	+	—	+
	" (0)	—	—	+
5 日	非敗血症型 (16 bil)	+	+	+
	回 復 型 (4 bil)	+	—	+
	" (1 bil)	+	—	+
	" (0.25 bil)	—	—	+
	" (0)	—	—	+
6 日	非敗血症型 (16 bil)	+	+	+
	回 復 型 (4 bil)	—	?	?
	" (1 bil)	—	—	+
	" (0.25 bil)	—	—	+
	" (0)	—	—	+

註. カッコ内は菌量相当の粗毒素注射を示す

陰性であり、心血は粗毒素量の減少と共にまた剖検日の遅れた程陰性に傾いた。また脾臓はすべて陽性であった。

腹腔内の食菌の経過は第2図に各群1匹ずつのマウス

第 2 図

1. 16bil toxin 2bil 生菌 (マウス No. 3)

2. 4bil toxin, 2bil 生菌 (マウス No. 6)

3. 1bil toxin, 2bil 生菌 (マウス No. 9)

4. $\frac{1}{4}$ bil toxin, 2bil 生菌 (マウス No. 12)

5. 対照 2bil 生菌 (マウス No. 13)

註: 図のたて軸は白血球数, 横軸は1個の白血球にくまれている菌数 Bは細胞外の菌数(1視野中) Nは多核白血球, Mは単核白血球. —~多核白血球.~単核白血球

例について示されているが、非敗血症型をとつたものでは3日後もお多核白血球が単核白血球より優勢で、腹腔での多核白血球による食菌像がみられ、23時間以後のものでは単核細胞の食菌もかなりの程度に認められた。また細胞外の菌もごく少量ではあつたが最後まで認められた。これに反して回復型をとつたものでは細胞外の菌は3~9時間で検出不能となり食菌も23時間以後はほとんど認められなかつた。

3. 毒素のⅢ相菌の清掃に及ぼす影響：前の実験において16bilの菌相当の粗毒素が致死下量のⅠ相菌感染において菌の清掃を不完全にし、非敗血症型の感染経過をとらせることが明らかにされたので、本実験ではⅢ相菌の清掃に対する影響をしらべた。すなわち粗毒素の16 bil, 4 bil, 1 bil, 相当のものをⅢ相菌 8 bil (mld>32 bil) と混合し各群それぞれ3匹ずつのマウスの腹腔に注射し3, 8, 20, 30, 40時間及び3日目の腹腔液を前と同様の方法でしらべた。接種をうけたマウスはそれぞれ16bil相当のものでは8~20時間で死亡、4 bil では20時間以内に、1 bil は30~56時間ですべて死亡し、生菌のみの対照では3匹共生残つた。すなわち毒素を接種された群は毒素量がへるにつれて死期が延長していた。食菌像は8時間で最高となり、細胞外の菌は8時間で死んだ16 bil 相当の毒素接種群の1匹が細胞外に菌をわずかに残して死んだ外は対照例も共に8時間で殆んど検出できなかつた。また単核細胞も20時間でかなりの遊出がみられ回復機転がⅠ相菌感染に比べて迅速であることがうかがわれた。すなわち粗毒素はⅢ相菌の清掃に対してほとんど影響を与えていなかった。

考 察

百日咳菌Ⅰ相菌の毒素が菌の侵襲性にある程度の役割りを演じているのではないかということは以前から考えられていたが²⁾、われわれはⅠ相菌の腹腔内感染で、ある量の粗毒素が菌の清掃を不完全にし非敗血症型の感染経過をとらせることを認めた。この場合の死因は2 bilの生菌の清掃がおくれたためであるか、16bil相当の毒素によるためであるかは不明であるが、16bil, 相当の粗毒素のみを注射された群は24時間以内に死亡しているにも拘らず、この場合には少くとも4日~6日生残した点は注

目に価する。この様にして実験の1及び2からいわゆる粗毒素がⅠ相菌の清掃を阻害することが明らかにされたが、実験3においてはⅢ相菌の清掃にはほとんど粗害を与えていない点から考えて、毒素側にのみの因子を考えることは必ずしも妥当ではない様である。また毒素分割といつてもその中には毒素以外の菌体成分も残されていることも考慮されなければならないので、これ等の結果からは清掃に関与している因子は毒素よりもむしろ他の因子ではないかとも考えられる。しかし生菌側の因子を考えるならばⅠ相菌のみの清掃が阻害されている点も更に考慮される必要がある。しかしいずれにしても超音波処理上清がⅠ相菌の腹腔内の菌の清掃をおくらせているということは注目すべき事実といわなければならない。

総 括

- 1) 百日咳菌東浜株Ⅰ相菌の生菌4 bil,あるいは1 bil,を超音波上清の粗毒素と(4 bil, 1 bil, 及び0.25 bil 相当)混合してマウスに接種すると、毒素量に比例して感染が増強された。
- 2) 2 bil,の生菌と16 bil, 4 bil, 1 bil 及び0.25 bilの菌相当の粗毒素を混合して接種したマウスの腹腔局所の菌の消長をしらべた結果、16 bil 相当の粗毒素接種群のマウスは非敗血症型の経過を示し、菌の清掃は不完全であつた。すなわち粗毒素分割がⅠ相菌の生体からの清掃を妨げることが観察された。
- 3) しかし粗毒素はⅢ相菌の清掃に対しては阻害を示さなかつた。

終りに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の予阪研究班(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) 沢井芳男・下条寛人：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、日本細菌学雑誌。
- 2) Proom, H.: The Immunological aspects of experimental H. pertussis infection., J. path., Bact. 59, 165-180, 1947.