感染防禦に関する研究

8. 赤痢菌体顆粒分割のマウスおよび人に対する 防禦抗原性と毒性について

岡山大学医学部微生物学教室

村 上 栄・吉岡 達治・松浦 慶之・岡 好 万

〔受付：3月28日・1960年〕

緒 言

赤痢感染により強力な免疫が獲得できるか否かについては再感染の可能性^{1,2)}、血清中に抗体の出現度の弱いこと等³⁾の問題から可成り疑問がある。更に赤痢の如く腸管局所の疾患においてはその防禦能力が、血清中の抗体あるいは Coproantibody^{4,5)}の如く腸管局所の抗体の何れに主体があるのか多くの疑点が残されている。

しかし赤痢ワクチンの直接の問題としては現在まで試作された幾多の死菌ワクチン⁷⁻¹¹⁾に観られる如く、ワクチンの有効性を損傷することなくして如何にその毒性を低減せしめるかである。

著者等¹²⁾は赤痢磨碎菌を超遠心分割することにより最終段階で顆粒分割（以下 R_1 と略す）と可溶性分割（以下 S_1 と略す）をえ、これ等両分割の化学性状と実験動物に対する毒性（副作用）を中心に検討した結果を述べてきた。即ち R_1 は含窒素量が極めて少なく、副作用も S_1 に比して遙かに弱く、しかも家兎血清中に多量の凝集抗体を出現せしむる能力を有することが判つたので今回は、これに引続き R_1 のマウスに与える防禦抗原性ならびに人体に対する副作用、血清抗体産生能を検討した。

材料および方法

供試株：Sh. flexnerie 2b（岡山県下の流行患者より分離した渋谷株）を5%ムチン溶液に浮遊せしめ8代マウスを通過せしめた。菌力は1MLDが5000生菌数である。

R_1 調製法：上記菌力を有する渋谷株の18~20時間普通寒天発育菌を集め前報¹²⁾と同一の方法により R_1 を得た。 R_1 はこれの分離に使用した元の湿菌量と同量の

0.02mol 磷酸緩衝液 pH 7.0（以下緩衝液と略す）を添加充分撹拌せるものを基準液とした。

動物：体重15~18gの CF_1 系の健康なマウスを選んだ。

免疫および攻撃法： R_1 の種々の稀釈液（緩衝液）を腹腔あるいは静脈より接種免疫し、攻撃は2週間後に5%ムチン浮遊液をもつて実施した。

防禦効果の測定には免疫量を一定とし攻撃量に変化を与える法と、その逆の方法¹³⁾とがあるが著者等はその中間をとり両者に変化を与えた。判定は攻撃後7日間の観察でその生死に主点をおいた。

実験成績

1. 動物実験成績

R_1 は前報¹²⁾でも述べた如く毒性が弱いので高濃度でも使用可能であるから最初は低稀釈度において防禦抗原性があるか否かを検討した。まず R_1 基準液を2倍と10倍の二種に稀釈し、前者はその0.1mlを尾静脈より18匹のマウスに、後者は0.5mlを腹腔内より18匹のマウスに接種免疫した。即ち静脈免疫群も腹腔免疫群も R_1 の免疫実量においては同等である。2週間後に静脈、腹腔両免疫群をそれぞれ3群づつ（1群6匹）に別し、第1表に示した如く1, 10, 100MLDを腹腔内より攻撃した。又無処置対照マウス群に対しては1MLDを攻撃した。

MURAKAMI Sakae, YOSHIOKA Tatsuji, MATSURA Yoshiyuki, OKA Yoshikazu: Studies on Prevention of infection. 8. Protective antigenicity and Toxicity for mice and human body of particulate fraction isolated from Dysenteriae bacilli. —Jap. J. of Bact., 15(11), 1124-1128, 1960.

第1表 R_i 処置マウスの感染防禦能力

R _i 接種量 (ml)	接種 ルート	攻撃量 MLD	耐過マウス数/ 攻撃マウス数
2×. 0.1	静 脈	1	6/6
		10	6/6
		100	5/6
10×. 0.5	腹 腔	1	4/6
		10	6/6
		100	5/6
対 照		1	0/6

表に示した如く無処置対照群は2日以内に全部敗血死を観たが、免疫群マウスにおいては有意の効果が観察された。即ち静脈免疫群においては100MLD攻撃の際1匹、腹腔免疫群においては1MLD攻撃で2匹、100MLD攻撃で1匹死亡を観たのみで他は全部耐過生存した。

又耐過生存マウスを攻撃より7日目に殺処分し血液、肝、脾からの菌検索を培養法により検討したが1匹のマウスからも攻撃菌を証明することはできなかった。

以上の結果から R_i は低稀釈度(高濃度)においてはマウスに強力な防禦能力を賦与しうるものであり、又免疫方法は静脈、腹腔の何れを撰んでも著差のないことが明かとなった。

そこで次の実験は腹腔免疫一本にしぼり、R_i 基準液の稀釈を10倍から500倍まで4段階に、又攻撃も1MLDから1000MLDまで4段階に拡大し、広い場において防禦効果の判定を実施した。その結果は第2表のとうりである。

即ち R_i 基準液の100倍稀釈で免疫した群まで100MLDの攻撃に殆んど耐過している。しかし1000MLDの攻撃には10倍稀釈の免疫群でも多数の死亡例が観られ

第2表 R_i 接種マウスの防禦能力 (2)

R _i 接種量 (ml)	攻 撃 量 (MLD)			
	1	10	100	1000
10×. 0.5		6/6	6/6	2/6
50×. 0.5		6/6	5/6	3/6
100×. 0.5	5/6	6/6	6/6	
500×. 0.5	6/6	6/6	4/6	
対 照	1/6			

攻撃ルート=腹腔

分母……攻撃マウス数, 分子……耐過マウス数

た。又更に500倍稀釈の免疫群においても10MLDには完全に耐過生存した。しかしこの免疫群は100MLDの攻撃に対しては半数以上は耐過するが死亡例が観られるに至った。

これ等の結果から R_i は相当高稀釈しても尚強い防禦能力をマウスに与えることが可能であり、しかも免疫は1回接種するだけで有効であることが観察された。

2. 人体接種実験

動物実験において副作用が少なく、強力な防禦能力を賦与しえたとしても、この結果が人体において直に再現できるか否かは推測が許されないので著者等を含めた7人に接種し、発熱試験、局所反応、血清中の凝集抗体の出現等について検討を加えた。

発熱試験: R_i 基準液を緩衝液で20倍に稀釈し、最初生体反応の程度を検討する目的で第3表に記した如く No. 1の皮内に0.1, No. 2, No. 3の皮下にそれぞれ0.2, 0.4ml 接種した。

0.1, 0.2ml 接種者では殆んど体温に影響は認められず、0.4ml 接種者 (No. 3) で0.6°C 程度の上昇を観たにすぎない。

そこで No. 4~7までに0.4ml 皮下接種を試みた。

第3表 人体接種における発熱試験

接 種 者	接 種 量 (ml)	接種局所	接種前体温	接 種 後 2 時 間 目	接 種 後 5 時 間 目	接 種 後 10 時 間 目	接 種 後 24 時 間 目
No. 1	0.1	皮 内	36.5	36.8	36.8	36.5	36.4
No. 2	0.2	皮 下	36.5	36.5	36.8	36.6	36.5
No. 3	0.4	皮 下	36.4	36.7	37.0	37.0	36.5
No. 4	0.4	皮 下	36.7	36.7	36.8	37.0	36.4
No. 5	0.4	皮 下	36.7	36.7	37.3	37.0	36.5
No. 6	0.4	皮 下	36.7	37.0	38.0	36.5	36.2
No. 7	0.4	皮 下	36.8	37.0	37.6	37.0	36.5

接種液の稀釈度は何れも R_i 基準液の20倍稀釈である。

第4表 人体接種における局所反応

接 種 者	接種量 (ml)	接種局所	腫 脹		圧 痛		運 動 の 支 障	
			24 時 間	48 時 間	24 時 間	48 時 間	24 時 間	48 時 間
No. 1	0.1	皮 内	4.5×3.5cm	±	+	—	—	—
No. 2	0.2	皮 下	4.5×4	±	+	—	—	—
No. 3	0.4	皮 下	4 × 4	±	+	—	—	—
No. 4	0.4	皮 下	6 × 5	—	+	±	—	—
No. 5	0.4	皮 下	6 × 4	—	+	—	—	—
No. 6	0.4	皮 下	5 × 4.5	—	+	—	—	—
No. 7	0.4	皮 下	5 × 4.7	—	+	—	—	—

接種液の稀釈度は何れも R₁ 基準液の 20 倍稀釈である。

その内 No. 6 のみは 38℃ の発熱を観た。しかしそれ以外においては発熱しても 37℃ かそれを僅かに越える程度であつた。しかもこの試験は最も体力を消耗している夏季（7月下旬）に実施したものであるから最悪の条件と思われる。

局所反応：他方同一人について接種局所の反応を観察すると第4表の結果が得られた。

0.1, 0.2ml 接種者よりも 0.4ml 接種者の方が一般的に幾分腫脹の程度が高いようである。又接種者は 24 時間以内においては接種量の多少を問わず圧痛が感じられ

た。しかし腫脹、圧痛ともに 48 時間目の観察では完全に消失していた。即ち R₁ 接種による局所反応は短時間内に消滅することが判つた。又接種局所に基因する運動障害は 1 人も存在しなかつた。

血清中の凝集抗体の測定：血清学的抗体の産生を観ると赤痢の場合は極めて低く、患者血清においても 160～320 倍程度に過ぎず小児の際はせいぜい 50 倍といわれている¹⁷⁾。R₁ 接種による抗体産生の状態は第5表に現わした。

前述の発熱、局所反応の試験者中より No. 1, 2,

第5表 人体接種における凝集抗体の産生状態

接 種 者 No.	接種局所及 接種量	接種前、接種後 の 日 数	凝 集 抗 体 価 （血清稀釈度）					
			40×	80×	160×	320×	640×	1280×
No. 1	皮 内 0.1ml	接種前 1 週間	+	—	—	—	—	—
		接種後 1 週間	卅	卅	卅	+	—	—
		〃 2 週間	卅	卅	+	±	—	—
		〃 6 カ月	卅	卅	卅	+	—	—
No. 2	皮 下 0.2 ml	接種前 1 週間	+	+	—	—	—	—
		接種後 1 週間	卅	卅	卅	+	+	—
		〃 2 週間	卅	卅	卅	+	±	—
		〃 6 カ月	卅	卅	卅	±	—	—
No. 3	皮 下 0.4 ml	接種前 1 週間	—	—	—	—	—	—
		接種後 1 週間	卅	卅	卅	卅	+	—
		〃 2 週間	卅	卅	卅	±	±	—
		〃 6 カ月	卅	卅	卅	卅	—	—
No. 6	皮 下 0.4 ml	接種前 1 週間	+	—	—	—	—	—
		接種後 1 週間	卅	卅	+	±	—	—
		〃 2 週間	卅	卅	卅	卅	+	—
		〃 6 カ月	卅	卅	卅	卅	—	—

接種液の稀釈度は何れも R₁ 基準液の 20 倍稀釈である。

3 と 6 の 4 人を撰び検討した。

R_1 接種前の凝集価は大体 40 倍程度の力価であり凝集は極めて弱く僅かに認められる程度であった。しかし R_1 基準液の 20 倍稀釈 0.1~0.4 ml の接種により 1 週間後には 320~640 倍の抗体価を示した。この力価は感染により生じた抗体価と同等あるいは以上のものと認められる。しかも 6 カ月後の測定においてその力価が殆んど損失することなく維持されていることは興味深い。なおこの表から推測するに接種免疫量は更に微量の範囲で凝集抗体価は充分産生されるものと思われる。

総括考案

抗生物質の登場により赤痢による致命率は著しく減少したが患者数は一向に減少の傾向が認められず、現状において基本的予防の線はワクチンに頼ることが再確認されつつあると考える。しかし赤痢ワクチンは極めて毒性が強いため現在まで試作された死菌ワクチンはこの毒性を物理的、化学的处理により何程低下せしめるかに多大の努力が払われたのであるが未だ実用化の領域に至っていない。他方経口ワクチンも検討されているが¹⁴⁻¹⁶⁾、これによると副作用の点は確かに解決できるが大量の投与を必要とし、しかも効力の点においては余り希望がもてない。

著者等¹²⁾ は前に赤痢菌細胞より得た顆粒分劃 (R_1) の化学的組成、実験動物に対する毒性を中心に検討した結果を述べたがこの報告においては R_1 分劃の防禦抗原性、人体接種実験について論述した。

R_1 は生菌の如く細胞合成能力は勿論存在しない。しかし死菌の如く酵素不活性の物質でもない。即ち succinate を特異的に酸化する点から一連の電子傳達系が完備された単位物質であることは伺える。この R_1 が細胞構造中の何れの部分に基くものかは今後の問題として、少なくとも含窒素量が著しく微量であり、毒性が極めて弱い点からワクチンとして検討の余地が残されていると考えマウスを実験の場として追求した。

第 1 表で述べた如く R_1 は濃度の高いものでも毒性弱く充分免疫に利用されう。 R_1 基準液の $1/20$ 実量をもつて免疫すれば 2 週間後の攻撃に対し強力な防禦能力を獲得するに至った。又免疫処置が静脈、腹腔の何れであつても著差はなく一樣に 100MLD に対し殆んど完全に耐過することができ、これ等耐過マウスは一週間後の臓器培養において全く攻撃菌を証明することはできなかった。

以上の結果から高度に稀釈しても防禦抗原性があるの

ではないかと考え、 R_1 基準液の $1/20 \sim 1/1000$ 実量に至るまで検討した結果、 $1/1000$ 実量の接種においても 10MLD には完全に耐過し、100MLD に対しても強力な防禦能力を示した (第 2 表)。

R_1 の毒性は弱くして強い抗原性を有することが諸種の実験で明かとなつた。しかし人体に対する毒性、防禦抗原性の問題が終局の焦点である。そこで人体接種少数例につき発熱試験、局所反応を最初に観察したが、 R_1 基準液の 20 倍稀釈 0.2ml の皮下接種では発熱は起らないが、0.4ml 接種の場合は僅かの発熱 (37°C 程度) が一般に観られる。しかし迅かに正常に復帰した。又接種者は総てその局所に軽度の腫脹は認められ、その部は軽い圧痛が存在するが、それ等の生体反応も 48 時間目の観察では総て消失し、又運動支障は終始認められなかつた。以上の程度の生体反応は抗原物質を接種するのであるから当然まぬがれることのできないものと考ええる。

次に R_1 基準液の 20 倍稀釈 0.1ml 皮内接種した者も、0.4ml 皮下接種した者も凝集抗体価に著差はなく一樣に 1 週間後には 320~640 倍の力価がえられる。しかも 6 カ月後に測定した結果殆んど凝集価の低下が認められない。

諸種検討の結果から R_1 はマウスに対し強い防禦抗原性を与えることができるとともに、人体に対しても毒性は弱く、しかも可成り長期に亘り血清抗体を維持せしむることが可能である。

結 論

Sh. flexnerie 2b の生菌細胞より超遠心分劃法により分離した不溶性顆粒分劃のマウスに対する防禦抗原性、人体に対する副作用並びに血清抗体産生について検討をした。

1. 一定量の接種によりマウスに対し強力な防禦能力を賦与しうる。
2. 人体接種において発熱、局所反応は極めて軽度であり、しかも迅かに消失する。
3. 微量の接種により迅かに血清抗体の産生を誘起し、しかも長期に亘り抗体価を維持せしむることができ

文 献

- 1) 阿部 実, 齊藤 誠, 関 盛久, 黒木達郎: 日本医事新報, 1532, 3458, 昭26.
- 2) 鶴見 等, 石村隆蔵, 河野 譲, 星 英教: 文部省科学研究費による腸内細菌研究班報告, 昭和

- 28.
- 3) H. B. Gillespie, M. H. Waugh and Y. V. Serett: J. Bact., 52, 257, 1946.
- 4) A. Burrows, I. Havens: J. Inf. Dis., 82, 231, 1948.
- 5) A. Burrows: J. Inf. Dis., 92, 152, 1953.
- 6) 合田 朗: 北里実験医学, 24, 113, 1952.
- 7) 杉本敬二郎: 衛生学伝染病学雑誌, 22, 246, 大正15.
- 8) 村江通之: 実験医学, 24, 36, 昭和15.
- 9) S. E. Branham, K. Habel: J. Imm., 54, 305, 1946.
- 10) 田所一郎: 日本細菌学雑誌, 12, 203, 1957.
- 11) 安齊 博: 北里メデイカルニュース, 11, 1, 1955.
- 12) 村上 栄, 岡 好万, 吉岡達治, 松浦慶之: 日本細菌学雑誌投稿中.
- 13) 中谷林太郎: 日本細菌学雑誌, 11, 965, 1956.
- 14) M. L. Cooper, H. M. Keller and A. M. Hart: J. Imm., 64, 456, 1949.
- 15) M. L. Cooper, H. M. Keller: J. Imm., 60, 177, 1948.
- 16) M. L. Cooper, H. M. Keller: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 64, 422, 1947.
- 17) H. B. Gillespie, M. H. Waugh and Y. V. Serett: J. Bact., 52, 257, 1946.