実験的チフス症の研究 (特に腸炎菌と マウスとの関係について)

II b. 本研究に使用した *S. enteritidis* S相, R相株のファージによる比較

川 上 正 也・今 村 晋
原 田 賢 次・三 橋 進

群馬大学医学部微生物学教室 (主任: 三 橋 進教授)

[受付: 5月16日・1960年]

実験的チフス症の研究に種々の弱毒株が使用されているが、我々の一連の研究に使用した菌株については前報¹⁾にその血清学的性状を詳述した。しかし、弱毒生菌免疫にはいかなる菌が最も効果があるかということについては不明な点が多く、またマウスの腸炎菌感染を観察するにあたって、菌力の強弱やS相R相の相異は何に原因するかということは生菌免疫の本態を解明するに当つて是非知つておかねばならない問題である。菌のS相R相とウイルレンスの関係は古くから知られ、一般的にはS相菌のもつ菌体構成物、菌体内毒素が生体に障害作用をもつためにウイルレンスを発揮するという実験事実が、この問題を解決しているかのように見える。しかし実験的チフス症においては、強毒菌にたいする免疫抵抗という面からみると、血中凝集価と免疫抵抗が必ずしも平行しない²⁾こと等から、S相株が必ずしも強いウイルレンスを持つとは限らないと考えられる。また種々のS R中間相が弱毒生菌免疫に有効であるが、このS R中間相の実態はあまり明確にはつかまつていない。これらの問題を解決すべく、S R相の程度を定量的に把握する目的で次の実験を行った。

材料と方法

菌株: *S. enteritidis* の強毒株 116—54, 弱毒株 SER-O, SER-OKADA, SER-18M, SER-19M, SER-20M, SER-21M は前報¹⁾でその血清学的性状を述べた。その他に強毒S相株 116—54の長期培養より由来したR相菌であるR 8, R 9株を用いた。この2株は原株と同じ生物学的性状を示し、0.85%食塩水に自然凝集するが、0.8%食塩水には遅れて凝集した。また原株で作った抗O血清には凝集がみとめられなかつたが、抗gm抗体

を含む血清により強く凝集した。

また食品より分離した *S. enteritidis* TK-3, Nu, その他の株を使用した。この他に *Salmonella* 標準株である *S. paratyphi* A 1015, *S. abortus equi* 202, *S. reading*, *S. typhimurium* 3173, *S. paratyphi* C “East Africa”, *S. choleraesuis* var. Kumzendorf 1350, *S. newport* var. Puerto-rico, *S. berta*, *S. enteritidis* 1891, *S. dublin*, *S. senftenberg* および *Escherichia* 標準株 *E. coli* O-23, *E. coli* O-111 を使用した。菌の保存、培養等は前報¹⁾に従つた。

バクテリオファージ: ニワトリの糞便を材料として、S相腸炎菌 116—54株で増殖させてファージPGK-1を、R相 116—54 R8株で増殖させてPGK-1を分離した。ブイヨン中での増殖液をメンブランフィルターで濾過しそのまま凍結乾燥して真空中に保存した。使用に当つてこれらをそれぞれの対応菌で増殖させ、遠心沈澱とメンブランフィルター濾過によつて菌体を除いた。ファージの力価は種々濃度のファージ稀釈液とあらかじめブイヨンと共に37℃に3時間置いた0.2mg/mlの菌液0.1mlとを混合して寒天平板上に拡げ、6時間培養して生じる溶菌斑の数により測定した。

また各菌株の各ファージに対する感受性を次の方法で表現した。各ファージの 10^{10} 溶菌斑形成ファージ/mlの

KAWAKAMI Masaya, IMAMURA Susumu, HARADA Kenji, MITSUHASHI Susumu (Director: Prof: S. Mitsuhashi): Studies on the experimental typhoid. IIb. Immunogenic activity and phage sensitivity of S and R phase variants of *S. enteritidis*. Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University. —Jap. J. of Bact., 15(11), 1129-1135, 1960.

ブイヨン浮ゆう液を作り、種々の被検株 2×10^{-2} mg を寒天平板に拡げて乾かし、これに上記のファージ液を10倍階段希釈した各希釈液を一定の白金耳で滴下し、乾燥後6時間培養して生じる溶菌像を観察した。それを融合溶菌CLの他に滴下部に生じた溶菌斑の数により卅, 卅, 十の記号をもつて表わした。

各菌株の毒力、免疫効果は前報²⁾に従つて測定した。

実験結果

1. PGK-1の性質と溶菌範囲

S相菌 116—54株に同数の PGK-1 ファージを感染させ1段増殖させると、約20分の潜伏期をおいて増殖し、average burst size は87.5であつた。種々の *Salmonella* 株を寒天平板に拡げ、これに PGK-1 液の10倍階段希釈液をそれぞれ滴下して、前述の方法で溶菌をしらべた。第1表に示す通り *S. enteritidis* の他にB群、D群の一部の株を溶菌させることがわかつた。血清学的に同定された *S. enteritidis* の23株の分離菌について同様に溶菌をしらべた。これらの株がS相集落を形成し、トリパフラビンに凝集しない場合はすべて 10^7 溶菌斑形成ファージ/ml の濃度で融合溶菌を示した。集落の形態または凝集性の点でR相に近い株は溶菌し難いかまたは溶菌しなかつた。

3.8×10^8 個の 116—54株と 1.5×10^9 個の PGK-1 を

混合し直ちに10個の寒天平板に分けて塗抹し、乾燥後培養すると合計42個のファージ耐性株の集落が生じた。このうち8株は3回の継代増殖により感受性株となり、33株は PGK-1 および PGK-11に感受性をもつR相菌であり1株はS相の完全耐性株であつた。

2. PGK-11の性質と溶菌範囲

PGK-11をR 8株で1段増殖させると約15分の潜伏期をおいて増殖し、average burst size は64.2であつた。種々の *Salmonella* と大腸菌をブイヨンに植え7日から20日長期培養し、あるいは更に継代をくり返してR型集落を形成する株を分離した。分離後 Kligler 培地に植え原株と同じ性状を示すものを用いた。これらはすべて0.85%食塩水、0.05%トリパフラビンに凝集した。これらのR相株について、それぞれ PGK-11にたいする感受性をしらべた。第2表に示すように PGK-11は *E. coli* を含むかなり広範囲の菌株にたいし溶菌を示した。しかし *S. abortus equi* からは PGK-11によつて溶かされるR相株を分離することはできなかった。 *S. cholerae suis*, *S. berta*, *S. senftenberg* より生じた多数のR相株のうち、あるものは PGK-11によつて溶菌されたが、ある株は溶菌されなかつた。しかし *S. enteritidis* より生じた36のR相株はすべて PGK-11の 10^{10} 溶菌斑形成ファージ/ml 以下の濃度で溶菌がみられた。これに反して、これらの菌のS相には殆んどまたは全く溶菌をおこ

第1表 PGK-1 にたいする各菌株の感受性

由来	菌株	抗原構造	群	ファージ濃度, log 数/ml									
				10	9	8	7	6	5	4	3	2	
S- 1	<i>S. paratyphi</i> A 1015	1.2.12 : a : -	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-13	<i>S. typhimurium</i> 3173	4.5.12 : - : -	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-19	<i>S. reading</i>	4.12 : e. h : 1.5	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-26	<i>S. abortus equi</i> 202	4.12 : e.n.x. : -	B	CL	CL	CL	CL	+	+	-	-	-	
S-32	<i>S. paratyphi</i> C “East Africa”	6.7.Vi : c : 1.5	C ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-36	<i>S. choleraesuis</i> var. Kunzendorf 1350	6.7 : - : 1.5	C ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-51	<i>S. newport</i> var. Puerto-rico	6.8 : - : 1.2	C ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-64	<i>S. enteritidis</i> 1891	9.2 : 1 g. m : -	D	CL	CL	CL	CL	LC	+	+	-	-	
	<i>S. enteritidis</i> 116-54	(1)9.12 : g. m : -	D	CL	CL	LC	CL	CL	CL	+	+	+	
S-65	<i>S. dublin</i> 215	1.9.12 : g. p : -	D	(CL)	(+)	(+)*	-	-	-	-	-	-	
S-69	<i>S. berta</i>	9.12 : g. f. t : -	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>S. galinarum</i> 5	1.9.12 : - : -	D	CL	CL	CL	+	+	-	-	-	-	
	<i>S. pullorum</i> 7	9.12 : - : -	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S-87	<i>S. senftenberg</i> 3007	1.3.19 : g. s. t : -	E ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>E. coli</i> 0-23			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>E. coli</i> 0-111			-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*溶菌野は不透明

第2表 PGK-11 にたいする各種 R 相菌の感受性

菌株	ファージ濃度, log 数/ml								
	10	9	8	7	6	5	4	3	2
<i>S. abortus equi</i> 202 R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i> 3173 R	CL	CL	CL	CL	CL	卅	卅	+	—
<i>S. reading</i> R	CL	CL	CL	CL	卅	卅	+	—	—
<i>S. choleraesuis</i> Hokkaido R	CL	CL	CL	卅	—	—	—	—	—
<i>S. choleraesuis</i> var. Kunzendorf 1350 R	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. enteritidis</i> 116-54 R _s	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+
<i>S. dublin</i> R	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+
<i>S. berta</i> R _{1-7,9,11,12}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R ₈	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+	—	—
R ₁₀	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	—	—
<i>S. galinarum</i> 5 R	CL	CL	CL	CL	CL	卅	—	—	—
<i>S. pullorum</i> 7 R	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	—	—
<i>S. senftenberg</i> R _{1,3,4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R _{2,5}	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+	—
<i>E. coli</i> 0-23 R	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	卅
<i>E. coli</i> 0-24 R	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+	—
<i>E. coli</i> W R	CL	CL	CL	CL	CL	卅	+	—	—

させなかった。

前項と同様の方法で、 4.2×10^9 個の R 8 に 3.2×10^9 個の PGK-11 を平板上に混合して培養し、28 個の PGK-11 ファージ耐性株を得た。これらはすべて gm 抗原をもち、R 相菌であった。

以上より PGK-1, PGK-11 はそれぞれ *S. enteritidis* の S 相, R 相に強い親和性をもつが、菌相が異ると溶菌しないことが知られ、その例外は非常に少ないことがうかがえる。

3. PGK-1, PGK-11 の吸着

S 相 116-54 株と R 相 116-54 R 8 株の菌体をそれぞれ 0.05M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を加えた 0.85% 食塩水に浮べ、100°C 10 分間加熱後遠心洗滌して、磷酸緩衝食塩水に再浮ゆうさせた。この稀釈液に等容の $7.0-7.7 \times 10^6$ 溶菌斑形成 ファージ/ml のファージ浮ゆう液を加え、37°C に 30 分おいて後遠心して上清のファージ数を算定した。対照として磷酸緩衝食塩水にファージ液を加え、同様に操作した。加えた全ファージ数と、菌体に吸着されたファージ数との割合を第 1 図に示した。50 μ g 以上の S 相, R 相菌体によつてそれぞれ 90% 以上の PGK-1, PGK-11 株ファージが吸着されるが、PGK-1 に R 相菌を加えた場合、PGK-11 に S 相菌を加えた場合は菌体量 500 μ g でも吸着は 10% 以下であった。

このことから S 相または R 相に特異的に感染する PG

第1図 PGK-1, PGK-11 の S 相菌, R 相菌への吸着

I: 116-54+PGK-1 II: 116-54+PGK-11
III: R 8+PGK-1 IV: R 8+PGK-11

K-1 または PGK-11 は、それぞれの菌体への吸着の段階で特異性が決定されると考えられる。

4. S R 中間相菌の溶菌

腸炎菌 SER-18M は平板培養で R 相に近い集落を作り、R 抗原をもつが、同時に S 相の特異 0 抗原の一部をもつていて¹⁾、いわゆる S R 中間相菌と考えられる。PGK-1, PGK-11 を作用させるとそれぞれのファージによりある程度まで溶菌される。この菌は 1 個の菌体に S および R の抗原をもっているのかもしれない。あるいはまた S 相菌と R 相菌を常に一定の割合で生産しながら増殖する菌

第3表 S, SR, R 相菌の PGK-1, PGK-11 による溶菌

菌 株	相	ファージ	ファージ濃度, log 数/ml								
			10	9	8	7	6	5	4	3	2
116-54	S	PGK-1	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	卅	+
		PGK-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R ₈	R	PGK-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		PGK-11	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	—
116-54 + R ₈	S	PGK-1	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(卅)	(卅)	(+)
		PGK-11	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(CL)	(卅)	—
SER-18M	SR	PGK-1	CL	卅	卅	+	—	—	—	—	—
		PGK-11	CL	CL	CL	CL	CL	CL	卅	卅	—

カッコ内は不透明な溶菌

で、その集落はS相菌の混合体であるのかもしれない。この疑問を解くために次の実験を行った。

S相の 116-54株とR相の 116-54 R8株を種々の割合に混合し、全量が約 4×10^{-2} mg になるようにして1枚の寒天平板にまき、乾燥後種々濃度の PGK-1, PGK-11 を滴下して溶菌像を観察した。同時に 4×10^{-2} mg の SER-18M について同じファージの溶菌をみた。第3表、第2図に示すように SER-18M, 116-54, R8の溶菌野は完全に透明であつたが、S相菌とR相菌を混合した場合は溶菌に要するファージ濃度はそれぞれの菌単独の場合と同じであつたが、溶菌野は不透明で、SERの溶菌とは異つていた。PGK-1の滴下部に生じた不透明溶菌野の菌を新しい平板に培養してPGK-11を滴下するとR8株にたいする場合と同じファージ濃度で溶菌した。PGK-11滴下部の菌も同様にPGK-1によつて溶菌された。SER-18Mの6時間培養の溶菌野からはそのような菌を植え継ぐことはできなかった。

この結果から SER-18MのようなSR中間相はS相とR相の混合集落ではないことが明らかである。上記の溶菌野を不透明にしているものは混合塗抹されたS菌またはR菌が、それぞれR特異的ファージまたはS特異的ファージによつて溶菌されずに残つたものである。

5. S, SR, R 相腸炎菌の S, R 特異的ファージに対する態度

現在感染や免疫に使用している腸炎菌の種々の株にPGK-1とPGK-11を作用させ、溶菌をおこすファージ濃度を測定した。また各株につき普通寒天平板上の集落の形態、のせガラス上の生理的食塩水、トリパフラビンによる凝集およびマウスにたいする毒力をしらべ比較し

た。第3図に示すような結果になつた。S相菌は低濃度のPGK-1に溶けやすく、PGK-11には高濃度でも溶け難い。R相菌はこの反対の傾向を示した。

興味あることには種々の段階のSR中間相がみとめられ、両ファージにそれぞれある程度の感受性をもち、またこれらのファージにたいする感受性が毒力と密接な関係をもつことである。

SER-18Mの平板塗抹培養より任意に分離したSER-18 Ma~k株およびその他の菌につき、ファージ感受性とそれらの株による生菌免疫の効果を比較したところ第4図のようになつた。生菌免疫には各株の 10^{-5} mg ないし 10^{-4} mg を約10匹の ddN 系マウス腹腔に免疫し、3週後に 10^{-7} mg の強毒 116-54株で攻撃し、40日後の生存数をもつて効果を表した。

免疫に使用する菌が SER-21M のようにあまりS相に近い場合は免疫後の生存マウスが少く、免疫菌の感染に耐えたものでも攻撃後死亡する。SER-20M, MF1では生残動物数に変動が大きく、効果は不定である。SER-19MからSER-OKADAに至る各株はある程度良好な成績を示したが、SおよびR特異的ファージによる菌相間の細かな位置づけとは相関関係がみとめられなかつた。R8株にはあまりよい免疫効果がみとめられなかつた。

検 討

S相またはR相腸炎菌に増殖させたウィルレントファージはそれぞれの相の菌に特異的に感染することが確かめられた。この腸炎菌からは 10^{-7} から 10^{-8} の頻度でそれぞれのファージに耐性の菌が出現するが、これ以外の腸

第 2 図 S, SR, R 相菌の溶菌像

a

b

c

d

a: 116-54 株, b: R 8 株, c: SER-18M株, d: 116-54 株と R 8 株の菌を等量に混合して塗抹。いずれの溶菌野も一様に不透明。シャーレの上半は PGK-1, 下半は PGK-11 の階段稀釈液を滴下して 6 時間培養。

炎菌についてはこのファージの S,R 相特異性が広く見られる。しかも SR 中間相の菌は溶菌に要するファージ濃度から S から R までの 1 つの系列上にかなり細かい位置づけができることが判明した。

加熱菌体によるファージの吸着実験から、これらのファージの S, R 菌体への吸着の段階に特異性が示され、このことは S-R 変異は菌体表面の構造物の変化を伴うという考えを裏付けるものである。

S 相と R 相の菌を平板に混合塗抹して両種のファージ

を滴下し培養すると不透明な溶菌野が現れ、この溶菌野の菌はそれぞれ非対応のファージによって溶かされなかった菌であつた。SR 中間相の菌について両種ファージによる溶菌をみると、溶菌野は透明でいずれのファージによつてもある濃度で完全溶菌がおきた。ゆえに SR 中間相菌の集落は S 相, R 相菌の混合体ではないことが確定された。この SR 中間相菌は S 菌, R 菌のもつファージ receptor を共に保存していて、菌体当りの両ファージ receptor の多少が S-R 系列上の位置を決めているもの

第3図 各菌株の毒力とSおよびR特異的
ファージに対する感受性

■ PGK-1 による溶菌, ▨ PGK-11 による溶菌, 4段階の幅はそれぞれ溶菌の程度 CL, n 卅, n 卅, n+を示す。

と考えられる。

PGK-1は *S. enteritidis* の他に数種の *Salmonella* に感染するが、菌体抗原との関聯性は見出せなかった。R相菌に増殖させたファージは種々の株のR相菌に感染する⁴⁾⁵⁾ことが報告されているが、PGK-11はR相であれば *Salmonella*, *Escherichia* にわたる広範囲の菌に感染する。これらの持つR抗原は血清学的にも共通な普遍性のあるもの⁶⁾として知られているが、このR特異ファージは血清学的手段によるよりも、もつと明確にR物質の普遍性を示している。集落の形態、自然凝集性等から明らかにR相とみなされうるものでも株によつてはPGK-11に感受性のないものがあり、これらはR抗原を失つたいわゆるφ相と関係があるのかもしれない。しかし *S. enteritidis* の長期培養、抗O血清を加えたブイヨン培養で多数のR相菌を得たが、未だにPGK-11に非感受性のR相菌は見出されていない。

従来実験的チフス症の生菌免疫にはSR中間相菌が良い成績を挙げている。さらにS相の強毒株で追加感染させると、強い抵抗が出来る²⁾。前述のように初回免疫にはあまりR相に近く、毒力の弱い菌では効果がなく、

第4図 各菌株のSおよびR特異的ファージ
に対する感受性と抗感染死免疫の効果

■ ▨ は前図に同じ。

* 免疫効果：各株の生菌 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ mg をマウスに感染させ、3週後に116-54株 10^{-7} mg で攻撃したときの生残率。

またS相に近い毒力の強過ぎる菌でもかえつてaggressiveに働きよい免疫が得られない³⁾。免疫に有効な中間のSR相を2種のファージで検定したが、ファージによつて示されるような微妙なSRの差と免疫効果の間に関聯性を見出すことはできなかった。これは動物体内での免疫成立経過が再現性に乏しいためとも考えられるし、また動物体内のSR相菌が、増殖中にわずかながらS相に近い菌を出し、このような菌が免疫に良い効果をもたらすとも考えられる。最近腸炎菌より菌体内毒素と異なる易熱性の強力な毒性をもつ毒素が証明され、抗感染死免疫に関与することがわかっている⁷⁾ので、このような抗感染死防禦物質を適量をもっている菌が最も生菌免疫に有効なのかもしれない。

ま と め

腸炎菌のS相菌に強い感染性を持ち、R相菌に感染しないファージPGK-1と、R相菌に感染性があり、S相菌にないPGK-11を用いて、種々の相の腸炎菌または他の腸内細菌に対する溶菌を観察し、次のことを見出した。

1) 腸炎菌のS R中間相は PGK-1, PGK-11の両方によつて種々の程度に溶菌し, 両ファージに対する感受性は互に反比例的な関係にあり, S からRにいたる種々の程度がある。

2) S R中間相の集落はS相, R相菌の混合体ではなく, 1個の菌体はSおよびRの receptor をもっている。

3) 両ファージに対する感受性は菌の毒力, 集落の形態, 凝集性と関係がある。

4) このファージ感受性によつて決められるS-R系列はS Rの程度をかなり詳細に表現しうるが, 菌の生菌免疫効果とは必ずしも関係がなかった。

文 献

- 1) 三橋 進, 原田賢治, 川上正也, 山口雄三, 永井正彦, 小笹 茂, 今村 晋, 岡田和夫: 実験的チフス症の研究 II. 本研究に使用してゐる *S. enteritidis* の強毒株及び弱毒変異株の抗原分析と Virulence について, 日本細菌学雑誌, 13, 366—371, 昭33, (1958).
- 2) 三橋 進, 川上正也, 山口雄三, 永井正彦: 実験的チフス症の研究 I. 生菌免疫と死菌免疫との異同, 日本細菌学雑誌, 13, 323—328, 昭33(1958).
- 3) 三橋 進, 川上正也, 山口雄三, 永井正彦, 林 義次: 実験的チフス症の研究 III. 死菌免疫, 生菌免疫におけるS型, R型菌の効果比較, 日本細菌学雑誌, 13, 535—539, 昭33, (1958).
- 4) Burnet, F. M.: Smooth-rough variation in bacteria in its relation to bacteriophage. J. Path. Bact., 32, 15—42 (1929).
- 5) Burnet, F. M.: Bacteriophage activity and the antigenic structure of bacteria. J. Path. Bact., 33, 647—664 (1930).
- 6) White, P. B.: Notes on intestinal bacilli with special reference to smooth and rough races. J. Path. Bact., 32, 85—94 (1929).
- 7) 川上正也, 前野弘夫, 三橋 進: 第6回細菌毒素シンポジウム, 箱根, 昭34 (1959).