感染防禦に関する研究

9) P^{32} 標識法による防禦抗原の生体内分布について

村 上 栄・金 政 泰 弘・松 浦 慶 之
岡 好 万・吉 岡 達 治

岡山大学医学部微生物学教室

[受付：5月9日・1960年]

緒 言

Metchnikoff の時代以来免疫成立の機序として細胞説、液体説が両立し、多学者の論争的となつて来た。一方には Ehrlich の液体免疫論に立脚し、抗原抗体反応を理解することが最も妥当と目されて来た。しかし前報¹⁾にも述べた如く、これのみにては理解しがたい点に多く遭遇する。即ち感染防禦力は血清抗体の効力のみにては理解し難く、チフス症、結核ブルセラ症その他においても組織又は細胞性の免疫が重要視され、これ等に関する文献は非常に増加しつつある。²⁾³⁾⁴⁾かくして組織免疫機序の解明は深く追求され、免疫の生化学にまで発展し、小林⁵⁾、安東⁶⁾等は免疫動物の網内系細胞の mitochondria, microsome の作用を暗示している。

1952年末 Haurowitz はこの事実を放射性抗原によって各臓器への Incorporation の追跡を行つて実験的に立証を行っている。⁷⁾⁸⁾⁹⁾

今まで人工免疫の方法としては、生菌免疫及び死菌免疫の両者が行われて研究の対照となつているがこれ等には一長一短の存する事は万人の認める所である。著者等は生菌を用いずに生菌免疫あるいはそれ以上の効果を上げ得る方法を検討し、すりつぶし菌の不溶性顆粒分画が生菌にかわる防禦能賦与抗原としての働きを発揮するのではないかと考え、数年来実験を行い、数種菌において注目すべき成果を上げた。更にこの機序解明の目的で、チフス菌顆粒分画をもつて処理した免疫マウスの肝を磨碎して得た顆粒が、正常マウスに再び高度の感染防禦能を賦与せしめ得る事実を知つたが、この点は組織免疫理論の点からも、更には小林、安東、Haurowitz 等の報告を引用すれば更に興味ある問題となつて来る。菌体顆粒成分が特異的な防禦抗原性を有し、しかもその能力は動物細胞内においても持続される事実を、更に究明するには Haurowitz の如く放射性抗原を用いるのがよいと考え、

とり合えず P^{32} を以つてラベルした顆粒成分を接種し動物体内の動行を追跡し、手掛りを得る目的で次の如き実験を行つた。

実験材料および実験方法

供試細胞：当教室保存の Sal. typhi A-2 strain を供試し、普通寒天平板培地に継代し純化を計つたもので Vi-antigen を有している。

放射性磷 P^{32} ：英国原子力公社より輸入せるもので、 H_3PO_4 の化学的性状を有し、使用にあつては pH 7.2 に修正した。

P^{32} 標識菌及び標識抗原の作製法：普通寒天に P^{32} を 0.4 $\mu\text{C}/\text{cc}$ になる如く混和せしめたるものを用い、平板培地を作製して Sal. typhi A-2 を培養し、18時間37°C 孵卵器中に incubate する。incubate 後集菌して生理的食塩水を用いて2回洗滌を行う。かくして得られた菌を秤量後(湿菌量)石英砂を加えて乳鉢にて低温状態(0°C)で1時間強く磨碎する。磨碎後湿菌量の5倍量の食塩加0.02mol 磷酸緩衝液を加え均等浮游せしめて遠沈分画を行う。(表1)

著者等が本実験にて必要とする分画は4万回にて沈澱する顆粒分画(表にてRと命名せるもの以下文中にてRと略す)であるが、本実験が P^{32} を指標として顆粒の追跡を行う為に、充分磷酸緩衝液にて洗滌を行つて附着せる P^{32} を除去する様つとめた。洗滌後1gの湿菌より得られた顆粒は1ccの割で磷酸緩衝液に浮游し以下の実験

MURAKAMI Sakae, KANEMASA Yasuhiro, MATSUURA Yoshiyuki, OKA Yoshikazu, YOSHIOKA Tatsuji: Studies on prevention of Infection. 9). On the distribution of the protective antigen in vivo by P^{32} -labeling method. Dept. of microbiology. Okayama Univ.—Jap. J. of Bact. 15 (12), 1222-1226, 1960.

表 1 菌体顆粒抗原作製法

に供した。

動物接種法及び臓器内 P³² 追跡法：マウスは市販の雑系を使用し、実験の性質上体重16 g前後の可及的一定せるものを使用した。R懸濁液の 0.1cc宛を正確に腹腔又は静脈内（尾静脈内）に注射する。又比較実験としてR液に含有される P³² 量と略同量の P³² 溶液を 0.1cc宛注射した系列も作製した。（実験後R液の P³² 量に換算す）注射後3時間、24時間、9日を選んで各実験例如にマウスの頸動脈切断放血致死せしめ（但し各実験例とも実験誤差特に生物学的誤差を少なくする為に3乃至5匹のマウスを使用した）肺、腎、脾、肝をとり出し、冷生理的食塩水ですばやく洗滌後 Torsion balance にて秤量し P³² Count 数測定操作にもつて行く。但し肝のみは別に一定量（約2 g）をとり、石英砂加磨砕法により遠沈分画を行い、各分画えの P³² の Incorporation 又は残留状態を観察した。分画法は細菌分画法の場合と同様に行い、三分画に分ける（表2）。これ等の分画物は秤量しておく。但し Organ-S は由来せる肝重量とす。

表 2 臓器分画法および命名略号

すべての臓器及び分画物はキエルダールコルペンにとり硫酸法による湿性灰化を行い Mg-mixture による磷モリブデン酸アンモンの沈澱としM—G計数管で P³² 量を測定した。

成績の表し方：測定した計測数（1分値）を各臓器及び分画物の1 g当りに換算し図示した。

実験成績

A) Organ-R₂ の防禦能賦与力に関する実験成績

Organ-R₂ の免疫学的な面の検討は既に報告したが¹¹ 本実験を行うに当つても再確認の為に同一的な実験を行った。但しこの度は P³² の影響（著者の用いた程度では特に無いと考えられる）を考慮して P³² 加平板培地に發育せるA—2より出発した。免疫操作法、攻撃方法は前報と同様で（省略）次の如き成績を得た。（表3）

表 3 免疫マウス肝磨砕分画物の防禦能賦与力
生残数/攻撃数

処置より 分画物 より 攻撃 までの 日数	攻 撃 量			
	1	10	10 ²	10 ³
Organ-R ₂ (元臓器 1 g 対溶媒 1 cc, 0.5 cc 腹腔内接種)	2	4/6	3/6	3/6
	5	5/6	5/6	4/6
	14	6/6	6/6	5/6
Organ-S (元臓器 1 g 対溶媒 1 cc, 0.5 cc 腹腔内接種)	5	3/6	2/6	1/6
	14	4/6	3/6	1/6
対 照	/	0/6		

Organ-R₂, Organ-S の免疫効果は表3に示す如くであった。即ち Organ-R₂ を用いて免疫を行つたものについては、処置後攻撃迄の日数を延期する程攻撃に対する耐過性は上昇し特に14日後のものでは10³ MLD の攻撃に対しても 5/6 の生存率を認めた。これに対して Organ-S 接種のものでは14日経過のものでも10³ MLD に対して 1/6 と有意の差を見出した。なお対照（無処置正常マウス）に比較すれば Organ-S もやや免疫力は認める事が出来る。

更にこれら免疫マウス肝の分画物が抗原性を有するか否かを、正常マウス肝のそれと比較しつつ、免疫家兎血清との間で重層沈降法を行い表4の如き成績を得た。免疫マウス肝の Organ-R₂ のみは家兎免疫血清との間に16倍抗原稀釈まで陽性と現れ、Organ-S 又は正常肝の場合に比し抗原性を有する事が分つた。

表 4 A-2 strain 磨碎 R を以て免疫したマウス肝の磨碎分画物の抗原性

(沈降反応—重層法)

免疫血清	抗 原 稀 釈 度	免疫マウス肝 Organ-R ₂					免疫マウス肝 Organ-S			正常マウス肝 Organ-R ₂			正常マウス肝 Organ-S		
		2	4	8	16	32	2	4	8	2	4	8	2	4	8
A-2免疫家兎血清		卅	卅	卅	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
A-63	〃	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B) P³² 標識抗原のマウス体内分布に就て

以上の成績より窺い得る事は細菌菌体より得たRはマウスに接種された後に各臓器へ分布し、なんらかの形で長期間滞留するのではないかと云う事である。かかる目的で実験方法に述べた如く P³² 加寒天平板培地にA-2を培養し P³² の大量の Incorporations を受けたR抗原をマウスに腹腔内及び静脈内接種し、その分布状態及び残留状態を P³² を指数として時間的に追跡した。

1) R抗原を腹腔内接種を行つた場合(図1)

Rを接種した場合を対照例と比較する場合注射後3時間においては一般に各臓器への P³² incorporation は低値である。しかし実験例の中で脾肝への P³² incorporation が肺腎に比して高い値を示している。しかもこの傾向は

図 1 の 1 P³² 標識菌の R 分画接種マウスの各臓器における P³² 量 (腹腔内接種)
Counts/m/organ-g

図 1 の 2 P³² 注射マウスの各臓器における P³² 量
(腹腔内注射) counts/m/organ-g

接種後24時間では更に明かとなり、又対照例の脾肝のそれと比較して著明に大である。接種後9日では実験例、対照例共に各臓器における P³² 量は減少するが実験例はやや減少度が少い。

次に肝における分画物中の分布状態を見るに、実験例の Organ-R₂ における P³² 量は接種後24時間で非常に大であり、この傾向は長期間保有されるものであり、9日目の成績においても有意差を以て大である事が判つた。

2) R抗原を静脈内接種を行つた場合(図2)

この場合は接種径路の性格上、R抗原又は P³² のみの何れの場合も3時間で各臓器とも P³² incorporation が大である。実験例対照例を比較する場合、実験例の肝への

P^{32} incorporation が他に比して著明に大であることが認められた。

更に肝分画を行つた成績では Organ-R₂ における P^{32} 量が大であり、前実験と同様長期間この傾向が保たれることを知つた。

図 2 の 1 P^{32} 標識菌の R 分画種接マウスの各臓器における P^{32} 量 (静脈内接種)
Counts/m/organ-g

図 2 の 2 P^{32} 注射マウスの各臓器における P^{32} 量 (静脈内注射)
Counts/m/organ-g

総括および考按

著者等は茲数年来、酵素活性単位としての菌体成分に著目し、これら分画物による免疫方法は理論的に既存の生菌免疫、死菌免疫の両者の長所のみを具備する方法と考え、広範な実験を進めて来た。囊に結核菌、チフス菌を磨砕し、不溶性顆粒分画、可溶性分画を取り出し、両分画共抗原抗体反応には強力に作用関係を持つに拘らず、不溶性顆粒分画のみが毒性少く強力な防禦能賦与力を有する事を報告した。この点より考えて、宿主の防禦能力は血清中の抗体よりも組織細胞中に何か存在するものと推察され、これを究明する目的をもつて免疫マウスの肝の磨砕分画物の免疫学的性状を多角度より追求し興味ある知見を得た。この度は前報の実験の一部を重複して行つた。但し前報の場合と異なる所は、 P^{32} 添加平板培地上に発育した A—2 strain を用いて R を得、マウスへ予備免疫して (前報と同じ) 屠殺し肝を得た。肝の磨砕物中 Organ-R₂、Organ-S による防禦能賦与力及び抗原性の検討を行つた。

結果を要約すると、

- ① 免疫マウス肝の Organ-R₂ は、抗原的に作用し、マウスに強い防禦能力を与えるが、Organ-S の効果は著明でない。
- ② 免疫マウス肝の Organ-R₂ 及び Organ-S の抗原性を A—2 及び A—63 による免疫家兎血清との間の沈降反応によつて検討した結果、Organ-R₂ のみは抗原性を有する事が分つた。

の如くである。考按は前報¹⁾にて論じたのでこの度は省略する。以上の成績より R はマウスに接種後組織細胞内に侵入定着し、この部分において長期に亘り抗原作用を発揮する事が想像される。

これ等の事実を側面的に裏付けする目的で P^{32} で標識された菌体不溶性顆粒抗原を腹腔内及び静脈内接種せるマウス体内における分布状態を観察した。

先づ各臓器別に観察した場合、 P^{32} のみ注射した対照と比較して、R は明かに肝脾に特異的に集積する事を窺う事が出来る。しかもこの傾向は腹腔内接種の場合は注射後 24 時間で明かであり、静脈内接種は 3 時間ですでに明かである。これは接種ルートに関係からも当然の事と考えられる。R が網内系細胞の発達した肝脾を選んで集積する事は興味ある成績であり、しかもこれ等の事は古典免疫学においても網内系が免疫に関与することは推論されており、又小林、安東等が最近報告している網内系の作用に関する報告とも一致するものである。

更に肝における臓器分画を行つた成績であるが、R接種のマウス肝においては Organ-R, Organ-S には P^{32} の Incorporation が少く、減少傾向も強く認められるが、Organ-R₂ においては Incorporation が、他と比して著明に大であり、その残留傾向は経時的観察で明かに認める事が出来る。この Organ-R₂ が果して如何なる細胞成分よりなるかは詳細には追求してないが、mitochondria の破砕物及び microsome 系と考えられる。網内系細胞の mitochondria, microsome が生合成に関係ある以上、抗体産生に關係して免疫機構の重要な役割をなす事は色々報告に接する事が出来、特に Hawrowitz の有名な報告として C^{14} でラベルした Anthranil-Azo-Ovalbumin を家兎の静脈内に接種した場合、抗原は数時間で血中から消失するが、網内系細胞の mitochondria, microsome の部分に沈着し、その部分において長期に亘り抗原作用を發揮する事を述べている⁹⁾。著者等の得た顆粒分画抗原接種で略同様の成績が得られたと考えられる。

但しこの場合の抗原が細胞内に侵入定着して抗体産生能と云う烙印のみを残して消失するものでなく、少くとも抗原はかなりの期間細胞側の生合成能酵素単位と何らかのからみ合いをして残留する事が想像される。この程度の実験で結論する事は危険と考えられ、又 P^{32} を指標としてかかる追跡実験を行う事は隣性の性質上、必ずしも妥当とは考えないが、設備の都合上、今後計画している C^{14} 等による追跡の予備実験として行い傾向を窺うに留めた。今後は更に Radioautograph, 螢光抗体法等によつても更に追究を深めたいと考える。

結 論

Sal. typhi A-2 の不溶性顆粒分画物が、マウスに強い防禦能賦与力を有する事及び沈降反応による抗原性を有する事を前報で報告した。この機序解明の目的で、Sal. typhi A-2 の不溶性顆粒分画物を P^{32} で標識し、これをマウスに接種して各臓器内における分布状態及び残在状態を経時的に追究し次の結果を得た。

1. 腹腔内接種及び静脈内接種何れの場合も肝、脾に多く集積する成績を得た。
2. 肝を磨碎し遠心沈澱法で一萬回沈澱分画、四萬回沈澱分画及びその上清分画に分け検討した結果、 P^{32} は四萬回沈澱分画に特に多く Incorporate しており、接種後 9 日間の観察では P^{32} の残留傾向が明かに認める事が出来た。

文 献

- 1) 村上・松浦・岡・吉岡：日本細菌学雑誌，掲載予定，1960
- 2) Suter, E. ; J. exp. med., 97, 235, 1953
- 3) Suter, E. & White, R. G. ; Am. Rev. Tuberc., 70, 793, 1954
- 4) 齊藤・大野・秋山・中場：日本細菌学雑誌，12, 534, 1957
- 5) Kobayashi, R. & Ushiba, D. ; Keio. J. Med., 1, 35, 1952
- 6) Ando, K., & Takei, S. ; Japan J. Exp. med., 24, 247, 1954
- 7) Haurowitz, F., Crampton, C., and Sowinski, R. ; Fed. Proc., 10, 560, 1951
- 8) Haurowitz, F. and Crampton, C. ; J. Immunol., 68, 73, 1953
- 9) Crampton, C., Reller, H. & Haurowitz, F. ; 70, 793, 1954