感 染 防 禦 に 関 す る 研 究

(3) 超遠心分劃法により得たチフス菌体の可溶性部, 不溶性顆粒部の酵素学的, 免疫学的研究

村 上 栄 ・ 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: 8月22日・1959年]

緒 言

生体に対する防禦免疫賦与は有毒死菌¹⁻³⁾。無害生菌⁴⁻⁷⁾の二種が考えられる。Salmonella, Shigella 等の如くグラム陰性菌ではS型菌がR型菌より免疫原性が優れているが⁸⁻⁹⁾, これはS型菌のO抗原を全面的に支持するものである。しかし菌体内毒素(O抗原)を接種すると容易に高度の血清抗体が上昇するに拘わらず抵抗性は顕著でないという結果も知られている¹⁰⁾。最近マウス対ゲルトネルの実験チフス症の経験においても毒力死菌の防禦抗原性は弱毒死菌のそれより遙かに劣ることが観察されている¹¹⁾。

著者等は結核免疫で述べた如く¹²⁾, 従来の生菌, 死菌或は化学処理による菌体成分に依らず, 超遠心分劃法により得たチフス生菌の菌体微細構造の防禦抗原性を検討した。本編では之等微細構造の一般化学的性状, 酵素学的活性と実験初段階における血清学的性状と防禦抗原性について述べる。

実験材料及び実験方法

供試菌株……H 901w, O 901w, H 901w-R 型 (以下 S. 57, S. 58, S. 57-R と略す)。A-2, A-63 等の各株であり, 後二者は Vi-抗原を有する。実験には普通寒天 20時間発育のものを使用した。

遠心分劃法……上記発育菌を乳鉢中にて, 石英砂と共に1時間強力に磨砕し, 元の湿菌 1g: 2ml の割合に 0.02mol 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を添加, 充分攪拌後 10000 rpm, 30分間遠心し, その上清を 15000rpm, 30分間遠心し半透明淡黄色の上清を得た。之を更に 40000 rpm, 1時間超遠心し, 上清 (以下 S₁ とす) と沈渣 (以

下 R₂ とす) に分けた。R₂ は元の湿菌 1g に対し前記緩衝液 1ml を添加浮遊せしめたものを, S₁ はそのまゝのものを実験の基準とした。菌磨砕より S₁, R₂ を得るまでの行程は総て 0°~2°C の低温である。

酵素活性の測定……Warburg 検圧法により, 容器内容は 0.1mol 基質。0.3ml, 前記緩衝液。0.7ml, S₁ (或は R₂)。2 ml, 10%KOH。0.5ml であり 37°C, 120分まで測定した。

動物実験法……防禦抗原性の検討には体重15~18g の健康マウスを使用し, 血清学的検討特に凝集抗体価の測定には健康家兎を用いた。動物実験に当り S₁, R₂ に無菌条件を作るため 5分間紫外線照射を行い, 之をチオグリコロート培地で確認した。

実験成績

A. 化学的性状……S₁ は淡黄色透明なもので菌体内の可溶性部分と考えられる。又 R₂ の前記浮遊液は乳白色不透明であり, この部分は不溶性顆粒分劃に該当する。

第1表は S. 57 の S₁ と R₂ の化学的一般性状を示したものである。表の如く S₁ は糖も多量に含有されるが又蛋白含量の大きいことも明かである。これに反し R₂ は糖も微量であるが特に窒素量が S₁ の含量の約 1/10 に

MURAKAMI Sakae, MATSUURA Yoshiyuki, OKA Yoshikazu and YOSHIOKA Tatsuji: Studies on Prevention of Infection (3) The Enzymologic Traits and Protective Ability of Soluble and Particulate Fractions Isolated from Cell-free Extracts of Salmonella Typhi Department of Microbiology, Okayama University, Medical School, Okayama, Japan.—Jap. J. of Bact., 184-188, 1960.

第1表 S. 57 (H901w) の S₁, R₂ の化学的性状

反応 分割物質	Biuret	Molish	Kjeldal
S ₁	++	++	N=600mg/dl
R ₂	±	+	N= 60mg/dl

すぎないことは興味深い。

B. 酵素学的性状・ 使用した基質は pyruvate, lactate, acetate, citrate, succinate, malate, glucose の7種である。

第2表 S. typhi の S₁, R₂ による O₂ 消費 (2時間値)

基質	S. 57, R 型		S. 57		S. 58		A-63		A-2	
	S ₁	R ₂	S ₁	R ₂	S ₁	R ₂	S ₁	R ₂	S ₁	R ₂
無基質対照	128	0	120	4	122	1	124	4	116	3
pyruvate	112	0	110	6	*	7	117	6	120	9
lactate	206	63	104	147	232	162	144	107	154	84
acetate	123	5	129	14	*	8	120	7	124	4
citrate	211	6	123	5	121	0	173	3	131	6
succinate	192	44	140	72	152	62	162	69	157	51
malate	144	6	136	3	99	2	137	4	127	5
glucose	167	3	132	5	*	3	134	1	141	3
catalase	*	*	*	*	++	±	++	±	++	±

*...実験していない。

第2表は O₂ 消費の2時間値である。即ち各株チフス菌の S₁ は何れも同様に endogenous respiration が高い。特に S. 57 では endogenous respiration と、各種基質添加時における O₂ 消費との間に著差は観られない。S. 57-R の S₁ は citrate, lactate を各々基質とした場合は1.6倍, succinate で1.5倍, glucose で1.3倍, 無基質対照より O₂ 消費は増加し, 又 S. 58では lactate で約2倍, A-63では citrate で1.4倍, succinate で1.3倍, A-2では lactate, succinate で各々1.3倍, 無基質対照より O₂ 消費は増加した。各株の S₁ とも pyruvate, acetate では O₂ 消費の増加は起らなかった。

次に各株の R₂ による O₂ 消費を観察すると全く S₁ の活性とは性状が異つている。即ち lactate, succinate の二者は特異的に酸化するが, 他の基質は殆んど酸化しない。又 R₂ は S₁ と異り endogenous respiration は殆んど或は全く認められない。

次に S. 58, A-63, A-2 の S₁ 及び R₂ の catalase 作用を検討した結果 S₁ は強力な catalase 作用を示すが, R₂ では殆んど陰性であった。

C. 血清学的, 免疫学的性状。

上記の如き酵素活性を有する S. 57 の S₁ 及び R₂ を個々の家兎皮下に 0.5ml 接種し, 之が血清凝集抗体価の上昇に及ぼす関係を追究した。接種後2週間目の成績を第3表, 第4表に示した。

表に示した如く凝集反応抗原として生菌, 加熱死菌の二者を用いた。即ち S₁ 或は R₂ の微量の接種により, 対応する抗原に対しては(この場合 S. 57) 著しい抗体価の上昇が観られる。生菌を抗原とした場合, Vi-抗原を有する Watson-V, A-2, A-63 で凝集価は同一程度

第3表 S. 57 の R₂ 0.5ml 接種家兎の凝集抗体価

免の 疫血 家清 兎稀 度	抗 原	S. 57 の R ₂ で免疫せる場合							
		生 菌				死 菌			
		S	A	A	Wat	S	A	A	Wat
		57	2	63	V	57	2	63	V
80		++	±	+	++	++	++	++	++
160		++	±	+	++	++	++	++	++
320		++	±	+	++	++	++	++	++
640		++	±	+	++	++	++	++	++
1280		++	±	+	++	++	++	++	+
2560		++	±	+	++	++	++	+	±
5120		++	—	+	—	+	+	±	—
10240		++	—	—	—	±	±	—	—
20480		+	—	—	—	—	—	—	—

死菌(抗原)……100°C 30分間加熱処理

にえられるが, 凝集の度合は Watson-V が最も強力であり後二者は極めて弱い。然るに加熱死菌を抗原とすると Watson-V との間の凝集状態と差を観なくなる。これは Watson-V が他の二者より Vi-抗原の含量が少いこ

第4表 S. 57 の S₁, 0.5ml 接種家兎の凝集抗体価

免の 疫血 家清 免稀 度	抗原	S. 57 の S ₁ で免疫せる場合							
		生 菌				死 菌			
		S	A	A	Wat	S	A	A	Wat
		57	2	63	V	57	2	63	V
80		++	±	++	++	++	++	++	++
160		++	±	+	++	++	++	++	++
320		++	±	+	++	++	++	++	++
640		++	±	+	++	++	++	++	++
1280		++	±	+	++	++	++	+	++
2560		++	±	+	±	++	++	+	+
5120		++	—	±	—	++	±	—	±
10240		++	—	—	—	—	—	—	—
20480		++	—	—	—	—	—	—	—

死菌 (抗原) ……100°C. 30分間加熱処理

第5表 S. 58 の R₂ を 0.5ml 接種 (皮下) せる家兎血清の凝集抗体価

血清稀釈度 抗原	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
S. 57	++	++	++	+	—	—	—	—	—	—
S. 58	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—
A-2	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A-63	++	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Watson-V	++	±	—	—	—	—	—	—	—	—

血清……免疫処置後2週間目のもの、抗原……生菌を用いた。

第6表 S. 57 の死菌 S₁, R₂ による防禦能力の比較

免疫処置物質 及び処置量	実験マウス群
対 照	● ● ● ● ● ● ● ● ● ○
S. 57. 加熱死菌 (56°C, 1時間) 5mg	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○ ○
S. 57, S ₁ 0.25ml	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
S. 57, R ₂ 0.25ml	● ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○

免疫処置後2週間目に S. 57, 1.5mg を腹腔より攻撃した。

○……耐過マウス ●……死亡マウス

と>関係があるのではないかと考える。又 Paratyphi, B或はAに対する類属凝集価は極めて低い。

第5表はS. 58 の R₂ を 0.5ml. 1回皮下に接種した場合の成績で、前記同様対応抗原に対して著しく高度の

抗体価が得られる。

以上の如く両分割は各々異つた酵素学的性状を有するが、血清学的には殆んど同一の性状を示した。即ち S₁, R₂ を各々接種することにより 同一の凝集抗体を高度に産生せしめた。そこでこのような S₁, R₂ がマウス対チフスの場において如何なる防禦抗原性があるかを検討した。勿論マウス対チフスではチフス症は起らないので第一次敗血症に対する抵抗が判定の基準となる。

第6表はS. 57の加熱死菌。S₁, R₂ の各々で腹腔内免疫をし、それより2週間後に S. 57の 1.5mg を腹腔内より攻撃した場合の成績である。実験は攻撃後1週間て打切つた。

表に示した如く加熱死菌及び S₁ の免疫群も或る程度の防禦能力は認められるが強力なものではない。又 S₁ 群が加熱死菌群よりも稍々防禦力が高いようであるが両

者間に差は認め難い。然るに R₂ 群は極めて強力な防禦能力を発揮し、敗血症を来したものは11匹中1匹にすぎなかつた。

以上の実験から S. 57 の R₂ は S. 57菌の攻撃に対して強く抵抗する事実が判明したので、この R₂ を順次稀釈し、どの程度まで効力が存在するものか、又 S. 57R-

第7表 S型, R型菌の死菌, S₁, R₂ による防禦能力

免疫処置に用いた分割, 死菌及び処置量	分割 (S ₁ , R ₂) の稀釈度 (倍数)				
	1×	2×	4×	8×	16×
S. 57, R ₂ 0.25ml	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
S. 57, 加熱死菌 5 mg		0/5			
S. 57-R型, R ₂ 0.25ml	0/6	1/5	0/5	0/5	
S. 57-R型, S ₁ 0.25ml	0/5	1/5			
S. 57-R型, 加熱死菌 5mg		2/5			
対 照 (無処置)		0/7			

免疫処置後2週間目に S. 57, 1.5mg を腹腔より攻撃
表中の分母は攻撃マウス数, 分子は生残りマウス数

の S_1 , R_2 が同様に $S. 57$ の攻撃に対して何程防禦し得るかを, 加熱死菌と比較検討したのが第7表である。

前実験と同様 S_1 , R_2 は 0.25ml (各々前記緩衝液で稀釈せるものを), 加熱死菌は 5 mg を腹腔内に接種し, 2 週後に $S. 57$ の 1.5mg を腹腔より攻撃し防禦能力を判定した。

$S. 57$ の R_2 は表の如く 8 倍稀釈まで完全な防禦抗原性を発揮し, 16 倍稀釈においても高度の抗原性を保有している。しかし $S. 57$ の加熱死菌では敗血死を防ぐことは不可能であつた。又 $S. 57-R$ の S_1 , R_2 は之等の如何なる濃度でマウスを処置しても防禦能力を与えることは出来なかつた。又 $S. 57-R$ の加熱死菌処置群は数字的には或る程度の防禦性を現わしたが真実は今尚疑問である。

以上のことから $S. 57$ の R_2 は相当高稀釈まで $S. 57$ の攻撃に対し防禦抗原性が認められるが, $S. 57$ の変異株である $S. 57-R$ の R_2 は $S. 57$ の攻撃に対し殆んど無抵抗であることが観察された。このことは重要な問題であるから今後種々の感染方法から検討してみたい。

総括及び考按

菌体内毒素を中心とした病原微生物に対する免疫が宿主の液体抗体のみに依るものでなく, 恐らく細胞の組織機構と関係があるらしいことが次第に問題化している²⁾。抗原性物質は速かに宿主網状内皮系臓器の mitochondria に沈着することを Haurowitz¹³⁾ は観察している。この事実は蛋白の生合成に影響するであろうことが充分考えられる。又生菌を磨碎し超遠心分離により得られた不溶性顆粒分離が動物細胞の mitochondria と酵素学的性状が極めて類似しているという記録が多く存在する¹⁴⁻¹⁶⁾。

以上の如き観点から著者等は従来の如き生菌, 死菌, 有機溶媒により抽出された菌体成分或は代謝産物を抗原物質として求めず, 生菌を磨碎し超遠心分離法により可溶性部 (S_1) と不溶性顆粒部 (R_2) を得, 両分離の酵素学的活性を比較検討し, 更に血清学的, 免疫学的関係を追求した。本実験にチフス菌対マウスの条件を撰び, 又攻撃にムチンの如き保護物質を用いなかつたのは, あくまで菌力による第一次敗血症の防禦に中心を置いたものである。

S_1 , R_2 の化学的, 酵素学的性状... S_1 は菌体の可溶性部であり淡黄色透明である。そして Biuret, Molish 反応も強陽性であり, 窒素の含量も極めて多い。又 S_1 の内部呼吸は各菌株とも高い。 S_1 は一般に lactate をよ

く酸化するが特に $S. 57-R$ で之が著明である。又 citrate の酸化は $S. 57-R$, A-63 の S_1 でよく観られる。又 succinate も一般に O_2 消費を増加せしめるが特に $S. 57-R$ で著明である。malate, glucose も一般に O_2 消費を増加するが著明でない。又各株の S_1 は catalase 作用が強力に存在する。

次に R_2 は Biuret 反応は殆んど陰性に近く, 又 Molish 反応も強度には現われない。窒素の含量は S_1 の約 $1/10$ 量である。即ち蛋白質量が極めて微量であることが判明した。又 R_2 は S_1 と異り内部呼吸が殆んど認められない。又 R_2 は lactate, succinate を特異的に酸化し, 他の基質の酸化は殆んど観られない。これは不溶性顆粒分離に存する酵素の局在性を示すものと思われる。更に R_2 は S_1 に観られたような catalase 作用は殆んど存在しなかつた。

血清学的性状: S_1 は蛋白量が多く R_2 は之が極めて少ないので, 血清抗体産生力に何程か差が求められるのではないかと考えたが, 予想に反し両者とも著しい抗体上昇を誘起した。即ち S_1 , R_2 の微量を 1 回, 家兎皮下にそれぞれ接種することにより, 両者とも 2 万倍以上の凝集抗体価を産生せしめた。

防禦抗原性: 以上の如く強力な血清抗体産生能を有する S_1 , R_2 の感染防禦賦与力をマウスの第一次敗血死に主点を置いて観察すると, S_1 による防禦能力は加熱死菌と余り差はなく又強力なものでない。然るに R_2 による防禦能力は著しく強力である。そして R_2 を相当高度に稀釈しても防禦抗原性は失われなかつた。しかし同一株の R 型菌より作られた R_2 は, 元の S 型菌の攻撃に対して防禦抗原性に欠けていた。

以上の如く S_1 , R_2 は血清中の凝集抗体産生力には差が観られないが防禦抗原性においては明かに有意の差が認められた。

結 論

著者等はチフス生菌を磨碎し超遠心分離法により可溶性部 (S_1) と不溶性顆粒部 (R_2) を得, 之等の諸種性状を検討し下記の結論を得た。

1. S_1 は窒素含量高く, TCA cycle に関与する多くの基質を酸化するが, R_2 は窒素含量が S_1 の約 $1/10$ 量であり, lactate, succinate を特異的に酸化し, 他の基質は殆んど酸化しない。この性状は動物細胞の mitochondria と類似のものと考えられる。又 S_1 は catalase 作用が強力であるが R_2 は殆んど之を認め難い。

2. S_1 , R_2 ともに家兎血清中に凝集抗体産生力は著し

く強力であるが、マウスに対する防禦賦与能力は R_2 が遙かに強力である。

稿を終るに当り菌株を分与下さいました北里研究所、安齊部長に深謝いたします。尙本論文の要旨は第11回日本細菌学会中国、四国支部総会(山口)において述べた。

文 献

- 1) 三橋・他：日本細菌学雑誌, 13, 323, 1958.
- 2) Ando, K.: Japan. J. Exp. Med., 24, 247, 1954.
- 3) 安藤・田所・下条：医学通信, 7, 307, 34, 1953.
- 4) Li, C.: J. Exp. Med., 50, 767, 1929.
- 5) Gowen, J. W. Stadler, J. et al.: Genetics, 38, 531, 1953.
- 6) 吉岡：日本細菌学雑誌, 5, 31, 1950.

- 7) 豊田：実験医学雑誌, 28, 69, 1944.
- 8) Arkwright, J. A.: J. Path. & Bact., 30, 345, 1927.
- 9) Greenwood, M. et al.: J. Hyg., 31, 257, 1931.
- 10) Dubos, R. J.: Biochemical Determinant of Microbial Diseases., 石田, 日沼, 共訳, 68, 1957.
- 11) 吉岡：日本細菌学雑誌, 5, 31-34, 1950.
- 12) Murakami, S., Oka, Y., Matsuura, Y. and Yoshioka, T.: Acta Med. Okayama, 13, 1, 1959.
- 13) Haurowitz, F.: Biol. Revs., 27, 247, 1952.
- 14) Weibull, C.: J. Bact., 66, 696, 1953.
- 15) 楠瀬：生化学, 30, 2, 126, 131, 136, 1958.
- 16) 谷：生化学：30, 9, 733, 1958.