Leptospira icterohaemorrhagiae の免疫 原性に関する実験的研究

酒・井 信 平

東京大学伝染病研究所第六細菌研究部 (部長 工藤正四郎教授)

(受付: 9月28日・1959年)

I ま え お き

ワイル病に罹患して幸に恢復した後は、強い免疫性が得られることは早くから知られている。また、動物実験でも、virulence の低い *Leptospira icterohaemorrhagiae* (以後 Lept. と略す) を接種したモルモットは定型的なワイルの症状を呈することなく経過し、一定時日の後 virulence の強い Lept. を再接種しても、もはや罹患しない。なお Lept. を種々の方法で処理したものをワクチンとして接種したときも、程度の差はあるが、いずれも抗体の産生が認められることが明らかにされている。さらに危険にさらされている職業に従事する人において、ワクチンによる予防接種を行うことは *Leptospira* 病を予防し、感染による損失を防ぐためにも、適当な方法の一つと考えられていることは周知のことである。

このような場合、ワクチンとして用いる Lept. の virulence と抗原性との関係 (Griffith¹⁾, Smith²⁾, 小野³⁾ Brunner & Meyer⁴⁾), その抗原性は Lept. の体内にだけあるか、または培養液にも移行するか (北岡, 井上⁵⁾)。さらに、このような抗原性物質の熱その他の物理的作用あるいは、殺菌剤等の化学的作用に対する抵抗等に関する報告も少くないが (井戸等^{6,7)}, 伊藤, 松崎⁸⁾, Uhlenhuth u. Fromme^{9,10)}, Noguchi¹¹⁾, Wani¹²⁾, Esseveld¹³⁾, Smith²⁾, 小野³⁾, 新家¹⁴⁾, Schüffner¹⁵⁾, 添田¹⁶⁾, Borg-Petersen¹⁷⁾, 井上¹⁸⁾), 私は主として、Lept. の抗原性の熱に対する抵抗性を中心とし、さらに virulence と抗原性との関係および、感染防禦力と血清中の抗体との関係等を検討した結果、注目すべき事実を認めたのでここに報告することにする。

II 100°C 加熱ワクチンによる免疫の形成状態

実験動物についての免疫学的血清学的反応として、従来各種の反応があげられているが、本実験では先ず家兎

について、血清による Schüffner-Mochtar 凝集溶解反応を検し、ついでモルモットについて、血清による Schüffner-Mochtar 凝集溶解反応、および感染防禦試験をとりあげることにした。

A. 家兎における実験

実験材料及び実験方法

1. ワクチンの作り方

Lept. (ワイル株) を10%家兎血清加 Korthof 培地に26°C 1週間培養する。これを6,000 r.p.m 50分遠心沈澱し、沈澱を pH 7.0の燐酸緩衝食塩水に浮遊し、その一部を白金耳で一滴載物硝子の上にとりふた硝子で覆い270倍拡大の暗視野顕微鏡で1視野の Lept. が40~50程度になるように稀釈する。これを次のように処置する。

(i) フォルマリン加ワクチン。Lept. 浮遊液にフォルマリンを0.4%の割合に加えたもの。この方法は Lept. の抗原性をよく保持するものとせられている。

(ii) 100°C 2時間加熱したもの。

(a) 浮遊液を100°C 2時間加熱したものそのままでこれを鏡見すると一部は Lept. の形態を示すが大部分は顆粒状を呈する。

(b) 浮遊液を6,000 r.p.m 50分間遠心沈澱した上液を Seitz E.K. で濾過した濾液。

2. 免疫方法

以上のようにして作ったワクチンを体重約2kgの家兎の静脈内に10ml ずつ5日間の間隔をおいて5回注射し、最後の注射から7日後に全採血を行った。

3. 凝集反応のやり方

抗原の作り方

SAKAI Nobuyuki: Experimental studies on the antigenicity of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. The Institute for Infectious Diseases, The University of Tokyo. —Jap. J. of Bact., 15(5), 503-511, 1960.

Lept. (ワイル株) を Korthof の培地に26°C 7—10日培養し、これを3,000 r.p.m 5分遠心沈澱した上液を白金耳で一滴載物硝子の上にとりふた硝子のをせないで270倍拡大の暗視野顕微鏡で1視野約200のLept. が認められる程度にKorthof 培地でうすめる。

反応術式

Schüffner-Mochtar¹⁹⁾の方法に準じた²⁰⁾。37°C 3時間後15×10=150倍拡大の暗視野顕微鏡で検査する。判定方法もSchüffner-Mochtarの方法に準じて行つた。

実験成績

表1に示すように、フォルマリン加ワクチンで免疫

第1表 ワクチン接種家兎血清の凝集溶解価

免疫材料		家兎番号	凝集溶解価
ホルマリン加ワクチン	全液	1	100,000
		2	300,000
100°C 2時間加熱ワクチン	全液	3	100,000
		4	100,000
	濾液	7	<30

した家兎血清は100,000—300,000倍まで凝集溶解価を示した。100°C 2時間加熱ワクチン家兎免疫血清では100,000倍の凝集溶解価を示すが、濾液免疫血清は何等凝集溶解反応を示さない。従つて、Lept. 100°C 2時間加熱のものは依然として抗原性を保有するが、そのSeitz E.K. 濾液には認められる程度の抗原性がないものと考えて差支えない。

B. モルモットにおける実験

以上のような家兎における所見は、Lept. ict. に感受性強いモルモットにおいても認められるか否かを確かめるため次の実験を行つた。

実験材料及び実験方法

上記のようにして作った各免疫材料を体重約300gのモルモットに、0.5—1—1—2—2ml ずつ4—5日の間隔をおいて皮下に注射し、最終注射2週間後心血をとり、血清を分離して凝集溶解価を計り、更に2日後感染実験を行つた。

感染材料は、モルモット通過によつてvirulenceを増強した三河島株感染モルモット肝臓で、先づ生理食塩水で10倍乳剤を作り、3,000 r.p.m 30分遠心した上液から100倍、1,000倍、10,000倍浮遊液を作り、その1ml ずつを試験モルモットの腹腔内に接種した。

実験成績

I 凝集溶解価

表2に示すように、全液免疫モルモット血清は10—

第2表 加熱(100°C 2時間)ワクチン接種モルモット血清の凝集溶解価

免疫材料	検査数	300	100	30	10	10>	平均
全液	8	0	3	2	3	0	49
濾液	11	0	0	0	0	11	0

100倍までの価を示し、その平均は49倍であるが、濾液免疫モルモット血清においては全く凝集溶解価は認められない。

従つて、家兎において認められた事実はモルモットにおいても認められた。

II 感染防禦試験

表3に示すように全液免疫モルモットは感染に耐える

第3表 免疫モルモットにおける感染防禦試験

乳剤稀釈倍数	10	100	1,000	10,000
免疫材料				
全液	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○	
濾液	● ● ● 5 5 6	● ● ● 5 6 6	● ● ○ 9 10	● ● 9 10
対照	● ● 5 8	● ● 5 5	● ● 6 6	● ○ 9

註 ○ } の上部の数字は血清の凝集溶解価を示す

● は定型的ワイル症状の下に仆死したことを示し、下部の数字は仆死までの日数を示す。

○ は生存を示す。

△ はワイル以外の原因で仆れたことを示す。

が、濾液免疫モルモットにおいては対照モルモットとかわりなく何等感染防禦力を認めることが出来なかつた。従つて、100°C 2時間加熱Lept. も感染防禦性抗体をモルモットに生ずる能力を保持するが、濾液はかゝる能力がないことが明らかになつた。

考 按

ワクチンの効力を判定するときは、接種量、接種回数、接種の間隔、接種部位その他を考慮することの必要なことはいうまでもないが、今回は、比較的多い量を、回数を多くし、間隔を大体一定し、家兎では静脈内に、モルモットでは皮下に注射して、出来るだけ強い抗体の産生が認められるようにした。かゝる条件の下でその形

成能を比較することにした。

従来 Lept. の抗原は非耐熱性と考えられ、僅かに、添田¹²⁾は 100°C 30 分加熱したものを以て家兎を免疫し、その抗体価が超音波ワクチン免疫のものより劣るが、上昇することを認め、また Schöffner¹⁴⁾は 100°C 1 時間加熱したものを接種した家兎では高い凝集溶解価を認めたことを報告し、その他 Esseveld¹³⁾が煮沸した Lept. が家兎で生 Lept. と同様抗体を作ることをのべているだけである。Lept. に対する感受性が強いモルモットでのこの点に関する詳細な実験はまだ見当らない。

私は Lept. の凝集溶解反応をおこす抗体を産生する能力は 100°C 2 時間の加熱によつても依然として保持されていることを家兎及びモルモットでの実験で確認し得た。更に、Lept. の感染防禦力をあたえる能力も 100°C 2 時間の加熱によつて失われないことをモルモットにおける実験で証明し得た。

総 括

Lept. 浮遊液を 100°C 2 時間加熱したものを以て免疫された家兎の血清は高い凝集溶解価を示し、また同様免疫されたモルモットは凝集溶解素の産生と感染防禦抗体の形成を示すことから、Lept. の抗原性は耐熱性であることが明らかである。

III Leptospira の Virulence

と抗原性との関係

Lept. の virulence と抗原性との関係についての報告は少い。その主なものをあげると Smith²⁾は生 non-virulent Lept. は、virulent Lept. をホルマリン、石炭酸、dettol で処置したもの及び加熱したものと同様、モルモットに virulent Lept. に対する感染防禦力を与えるとのべている。小野³⁾は avirulent Lept. の少量を以てしても、死 Lept. 免疫に比べてはるかに確實迅速に感染防禦能をモルモットに賦与することが出来る と報告している。また Brunner & Meyer は avirulent Lept. の凍結乾燥したものをを用いても犬及びハムスターでは良好な成績を得た。これに 反し Borg-Peterson¹⁶⁾によれば non-virulent のものは、ホルマリンで殺しても加熱して殺しても或は生きたまゝのものをを用いても、virulent Lept. にこのような処置を加えたものよりもはるかに免疫能力が劣るという。勿論、これらの実験条件が必ずしも同様でないで、その結果を直ちに比較することが出来ないにしても、このように Lept. の virulence と免疫原性については必ずしも意見の一致がみられていない現状で

ある。然しながら、avirulent Lept. も virulent のものと同程度の抗原性を有するとするならば、培養に耐えた avirulent Lept. の方が動物から分離したばかりの virulent Lept. に比べて、培養が比較的容易であり、その発育も旺盛なものが多くことから、ワクチンを作るために大量を得るに便利であり、同時に危険性の少いという点からも利益がある。かゝる意味からこの問題の解決は有意義であろう。

実験材料と実験方法

使用株

virulent Lept. としては三河島株を用いた。本株はモルモットを通過する事によつて virulence を高めたものである。即ち感染モルモット肝臓乳剤を腹腔内に接種すると、5—7 日以内に定型的なワイルの症状を呈する。

かゝる感染モルモットの心血から Korthof の培地に培養し、同培地通過 5 代以内のものである。

avirulent 株としては Wijnberg 株及び三河島株を用いた。Wijnberg 株は入手以来 Korthof 培地に累代移植することによつて数年間保存されたもので、その大量即ち 10 ml をモルモットの腹腔内に接種しても何等認むべき症状を呈さないまで virulence の低下したものである。avirulent の三河島株というのは Korthof 培地に累代培養することによつてその 5 ml を腹腔内に注射してもモルモットは斃れない程度に virulence を失つたものである。

ワクチンの作り方

Lept. 浮遊液の作り方はⅡにおけると同様。これをもととして次の 3 種の免疫材料を作った。1. 生 Lept. としては、この浮遊液そのまま、2. 56°C 1 時間加熱のもの、及び 3. 100°C 2 時間加熱のもの。

免疫方法及び感染方法

体重約 300—400 g のモルモットに、5 回免疫の際は、0.5—1—1—2—2 ml を、3 回免疫の際は、1—2—3 ml を各間隔 4 日をおいて注射し、最後の注射から 2 週間の後感染実験を行った。

感染実験には、モルモット通過によつて、virulence を高めた感染モルモットの肝臓乳剤を前に記したと同様に稀釈したものを接種した。

実験成績

I 凝集溶解価

Schöffner-Mochtar の方法に準じて価を測定した。

(1) 5 回注射の場合

a) virulent Lept. (三河島株) を用いたとき。

(i) 56°C 1 時間加熱のものを注射されたモルモットの

第 4 表 免疫モルモットにおける凝集溶解価 (5 回免疫)

免 疫 血 清	抗 原 稀 釈 倍 数	検 査 匹 数	三 河 島							Wijnberg								
			3000	1000	300	100	30	10	10>	30,000	10,000	3000	1000	300	100	30	10	10>
Virulent (三河島)	56°C 1時間	11	1	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	7
	100°C 2時間	7	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Avirulent (Wijnberg)	56°C 1時間	9	0	0	0	1	1	1	6	0	0	1	2	4	2	0	0	0
	100°C 2時間	11	0	0	0	0	1	0	10	0	0	0	1	4	0	5	1	0
	生	10	1	0	2	4	1	2	0	3	5	1	1	0	0	0	0	0

血清は同株 (三河島株) に対しては最高3,000 倍, 最低100 倍の凝集溶解価を示すが, 異株 (Wijnberg 株) に対しては最高100倍大多数は10倍以下であった。

(ii) 100°C 2時間加熱のものを注射されたモルモットの血清は, 同株に対しては最高3,000 倍, 最低300倍, 異株に対しては, 10倍でも凝集溶解を示さなかった。

b) avirulent Lept. (Wijnberg 株) を用いたとき。

(i) 生 Lept. を注射されたモルモットの血清は, 同株に対しては最高30,000 倍, 最低1,000 倍, 異株に対しては, 最高3,000 倍, 最低10倍。

(ii) 56°C 1時間加熱したものを注射されたモルモットの血清は同株に対しては最高3,000 倍, 最低100倍, 異株に対しては, 最高100倍, 最低10倍以下。

(iii) 100°C 2時間加熱したものを注射されたモルモットの血清は同株に対しては最高1,000 倍, 最低10倍, 異株に対しては最高30倍であるが大多数は10倍では凝集溶解を示さなかった。

(2) 3回注射の場合

次に同一株の virulent と avirulent のものを免疫原とした場合について検した。

a) virulent Lept. (三河島株) を用いたとき。

i) 56°C 1時間加熱のものを注射されたモルモットの血清は, 最高100倍であるが, 半数は10倍でも凝集溶解を示さない。

ii) 100°C 2時間加熱のものを注射されたモルモットの血清は, 最高100 倍, 最低10倍以下の凝集溶解を示す。

b) avirulent Lept. (三河島株) を用いたとき。

i) 生 Lept. 注射モルモットの血清は, 最高10,000 倍, 最低100倍の凝集溶解価。

ii) 56°C 1時間加熱したものを注射されたモルモットの血清は, 最高300倍, 最低10倍以下の凝集溶解価を示した。

iii) 100°C 2時間加熱したものを注射されたモルモットの血清は, 最高300倍, 最低10倍以下の凝集溶解価を示した。

II 感染実験

最終免疫注射から15日後に感染実験を行った。

(1) 5回注射免疫

a) virulent Lept. を材料としたとき。

免疫株: 三河島, 感染株: 三河島

表6に示す如く, 56°C 1時間加熱ワクチン免疫モルモ

第 5 表 免疫モルモットにおける凝集溶解価 (3 回免疫)

免 疫 血 清	抗 原 稀 釈 倍 数	検 査 匹 数	三 河 島							
			10,000	3000	1000	300	100	30	10	10>
Virulent (三河島)	56°C 1時間	10	0	0	0	0	1	1	3	5
	100°C 2時間	9	0	0	0	0	4	3	0	2
Avirulent (三河島)	56°C 1時間	14	0	0	0	1	1	5	2	5
	100°C 2時間	14	0	0	0	1	2	5	4	2
	生	9	1	3	2	1	2	0	0	0

第 6 表 免疫モルモットにおける感染防禦試験 (5 回免疫)

免 疫 材 料		感 染 モ ル モ ッ ト 肝 乳 剤										
		100					1,000					10,000
Virulent (三河島)	56℃ 1 時間	1000 ○	1000 ○	1000 ○	1000 ○	300 ○	3000 ○	300 ○	300 ○	300 ○	100 ○	
	100℃ 2 時間	3000 ○	3000 ○	1000 ○	300 ○	○	300 ○	300 ○	300 ○	○	○	
Avirulent (Wijnberg)	56℃ 1 時間	● 5	1000 ● 6	1000 ○	300 ○	100 ○	● 6	300 ● 10	3000 ○	300 ○	100 ○	
	100℃ 2 時間	300 ● 6	300 ● 6	30 ● 6	30 ● 6	30 ● 6	1000 ● 6	10 ● 6	300 ○	300 ○	30 ○	
	生	10000 ●	30000 ○	30000 ○	10000 ○	10000 ○	30000 ○	10000 ○	10000 ○	3000 ○	1000 ○	
対 照	無 処 置	● 5	● 5	● 5	● 5	● 6	● 6	● 6	● 6	● 6	○ ○ ○ ○ ○	

ットも、100°C 2 時間加熱ワクチン免疫モルモットも、感染モルモット肝臓乳剤 100 倍及び 1,000 倍稀釈のものゝ接種による感染を耐過する。対照モルモットは 1,000 倍稀釈のものを接種すると定型的なワイルの症状の下に 6 日以内に死亡した。

b) avirulent Lept. を材料としたとき。

免疫株：Wijnberg, 感染株：三河島。

表 6 に示す如く生 Lept. 免疫モルモットは、感染モルモット肝臓乳剤 1,000 倍稀釈のものの感染に耐え、100 倍稀釈に対しては、4 匹は感染に耐え、1 匹のみは感染斃死した。

56°C 1 時間加熱ワクチン免疫モルモットは、1,000 倍稀釈のものゝ感染に対しては 5 匹中 3 匹、100 倍稀釈に対しては 5 匹中 3 匹感染に耐えた。

100°C 2 時間加熱ワクチン免疫モルモットは、1,000 倍稀釈に対しては 5 匹中 2 匹は感染に耐えたが、100 倍稀釈に対しては 5 匹とも斃死した。

例外はあるが、この時期においては凝集溶解価の高い血清のモルモットは既して感染試験に耐え、低い血清のモルモットほどワイルで感染斃死するものが多いように思われる。

(2) 3 回注射免疫

最終免疫注射から 14 日後感染試験を行った。

a) virulent Lept. (三河島株) を材料としたとき。

(i) 56°C 1 時間加熱ワクチン免疫モルモットは、感染モルモット肝臓乳剤の 100 倍稀釈では 5 匹中 4 匹、10 倍稀釈では 5 匹中 4 匹感染を耐過し、

(ii) 100°C 2 時間加熱ワクチン免疫モルモットは感染

第 7 表 免疫モルモットにおける感染防禦試験 (3 回免疫)

免 疫 材 料		感 染 モ ル モ ッ ト 肝 乳 剤													
		10					100					1,000		10,000	
Virulent (三河島)	56℃ 1 時間	10> ● 8	30 ○	10 ○	10 ○	10> ○	10> ● 9	100 ○	10 ○	10> ○	10> ○				
	100℃ 2 時間	100 ○	100 ○	100 ○	30 ○	○	10> ● 8	100 ○	30 ○	30 ○	10> ○				
Avirulent (三河島)	56℃ 1 時間	10> ● 5	10> ● 10	30 ○	30 ○	30 ○	10> ● 8	100 ○	30 ○	10 ○	10 ○	10> ● 7	10> ● 8	300 ○	30 ○
	100℃ 2 時間	10> ● 7	100 ○	30 ○	30 ○	10 ○	10> ● 7	300 ○	100 ○	10 ○	10 ○	30 ○	30 ○	30 ○	10 ○
	生	10000 ○	3000 ○	3000 ○	1000 ○	100 ○	3000 ○	1000 ○	300 ○	100 ○					
対 照							● 5	● 6	● 7			● 6	● 6	● 7	○ ○ ○

モルモット肝臓乳剤の 100 倍では 5 匹中 4 匹、10 倍に対しては 4 匹全部感染を耐過した。

b) avirulent Lept. (培地通過によって virulence が失われた三河島株) を材料としたとき。

i) 生 Lept. で免疫したモルモットは、感染モルモット肝臓乳剤の 100 倍、10 倍稀釈のものに対し、それぞれ 4 匹、5 匹即ち全部感染を耐過した。

ii) 56°C 1 時間加熱ワクチン免疫モルモットは、感染モルモット肝臓乳剤の 1,000 倍、100 倍、10 倍稀釈のものに対し、それぞれ、4 匹中 2 匹、5 匹中 4 匹、5 匹中 3 匹が感染を耐過し、

iii) 100°C 2 時間加熱ワクチン免疫モルモットは、感染モルモット肝臓乳剤の 1,000 倍、100 倍、10 倍稀釈に対し、夫々、4 匹中 4 匹、5 匹中 4 匹、5 匹中 4 匹が感染を耐過した。

対照モルモットは、感染モルモット肝臓乳剤の 1,000 倍、100 倍稀釈に対し、それぞれ、3 匹中 3 匹、3 匹中 3 匹何れも定型的なワイルの症状を呈して斃死した。

考 按

先ず凝集溶解価についてみると virulent Lept. (三河島株) の加熱ワクチンでモルモットを免疫した場合、血清は同株に対しては 100—3,000 倍の価を示すが、異株 (Wijnberg 株) に対しては 100 以下の価を示し、特に 100°C 2 時間加熱したもので免疫したモルモットの血清は、7 匹とも 10 倍でも反応陰性であった。他方 avirulent Lept. (Wijnberg 株) では、生 Lept. で免疫したモルモットの血清は同種に対しては 1,000—30,000 倍、異株に対しては 10—3,000 の価を示し、56°C 1 時間及び 100°C 2 時間加熱のものでは同株に対しては 10—3,000、異株に対しては 100 倍以下で、10 倍でも反応陰性のものが多い。

これらの成績からみても、使用した株の範囲内では、凝集溶解素産生と virulence とは直接の関係なく、一般に同株に対しては高く、異株に対しては低くあらわれるようである。同株を用いたときも avirulent の生 Lept. を以て免疫したときを除き、virulence と凝集溶解素産生能とは直接の関係は認められなかった。

次に感染防禦試験によってワクチンの効力を判断してみよう。5 回免疫の場合でも avirulent の異株で免疫したモルモットでは、生 Lept. を用いたときを除き、加熱ワクチンで免疫したものは、何れも同株で免疫したものに比すれば感染防禦力は弱い。これは avirulent の Wijnberg 株は完全抗原を有すると知られていることから

でも、単なる抗原の完全、不完全によつては説明不可能のことであり、しかも Wijnberg 株の生 Lept. は感染防禦能力をあたえる程度は virulent の加熱 Lept. に劣らないことから、単なる virulence の問題だけではなからう。

この点を解決するためには、virulent Lept. と avirulent Lept. と同一系統のものをを用いる必要がある。3 回免疫による感染実験はこの問題をとくために行われたもので、avirulent の生 Lept. で免疫した場合を除き、56°C 1 時間加熱及び 100°C 2 時間加熱のいずれの場合にも virulent Lept. と avirulent Lept. の別なく同じ程度の感染防禦力をモルモットに賦与していることがわかった。但しこの実験に用いた avirulent の三河島株はたとえモルモットに対する virulence が認められないが、培地通過代数は Wijnberg 株ほど多くないことを考慮することが必要かも知れない。

小野³⁾の成績をみても、1) 弱毒 Lept. そのまゝ、2) これを 50°C 30 分加熱したもの、及び、3) 弱毒 Lept. を石炭酸で殺したもので、夫々 4 頭ずつのモルモットを免疫し、1 週間後強毒 Lept. で感染実験を行つてゐるが、1) は 4 頭全部感染に耐え、2) は 4 頭中 1 頭を除き 3 頭はワイルの症状でたおれ、3) は 4 頭ともワイルの症状で斃死している。また、生 Lept. 免疫の場合には 1 週間後 50—100 倍の凝集溶解価を示している。但しこの実験では、免疫方法はワクチンとして 1 ml 1 回ないし 2 回の注射にとどまつているから、生 Lept. と死 Lept. との間にこのような感染防禦性賦与力の差が出来たことと思われる。

以上の成績から考えて、virulence と免疫能力とは必ずしも直接の関係はあるとは考えられないということになり、Borg-Peterson その他の研究者の結論とは明らかに異なることになった。

総 括

以上の実験成績から明らかなことは次の如くである。

凝集溶解価については、1) avirulent の生 Lept. を以て免疫した動物の血清は、加熱殺菌した同 Lept. 株を以て免疫した動物の血清よりも高い凝集溶解価を示した。2) しかも、免疫株と凝集溶解反応に用いる株とが同じ場合には、異なる場合よりも凝集溶解価が高くあらわれた。

感染防禦試験については、1) 免疫の回数が多いほど得られる免疫が強かつた。2) virulent Lept. を加熱によつて殺したもので免疫した場合は、avirulent Lept. の生又は加熱したもので免疫した場合よりも感染防禦力が強く

つたが、この場合免疫株と感染株とは異なることを考慮すべきであろう。また、培養基通過によつて virulence を低下させた Lept. は通過代数が甚だしく多くないときはたとえ、モルモットに対する virulence がなくなつた場合でも、同株の virulent 株による感染に対しなお強い感染防禦抗体を産生させる能力のあることが明らかである。

IV 免疫の持続期間について

前実験において、virulent Lept. の56°C 1時間加熱ワクチンは、モルモットに極めて強い感染防禦性を与えることが明らかになつたので、この方法を用いて免疫の持続期間をしらべることにした。

実験材料及び実験方法

virulent Lept. 三河島株をもつて前記のような浮遊液を作り、56°C 1時間加熱したもの、0.5—1—1—2—2 ml を4日の間隔をおいて皮下に接種した後、所定の間隔において最終免疫後1カ年にいたるまで感染防禦試

験を行つた。これと併行して、感染実験2日前に心臓穿刺を行つて血液をとり、その各血清について Schüffner-Mochtar 法に準じて凝集溶解価をはかり、なお、混合した血清については、Lept. 滅殺力をはかつた。Lept. 滅殺力をはかるには、1)血清稀釈法と2)Lept. 稀釈法とがあるが、後者によつた。即ち、稀釈しない血清1mlと罹患モルモット肝臓乳剤の10, 100, 1,000 倍の1mlとを混合し、その2mlを約300gのモルモットの腹腔内に注射してワイルに罹患するかどうかを観察した。

実験成績

1) 約2週間後

表8に示すように、8匹のモルモットは、それぞれ、感染モルモット肝臓乳剤の10及び100倍稀釈液の接種に対して感染に耐えた。

これらのモルモット血清の凝集溶解価は最高3,000、最低30、平均941であつた。

また、血清には明らかに Lept. 滅殺力が認められた。

2) 約1月後

第 8 表
免 疫 後 約 2 週 間

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000	10,000
免 疫	3000	300	300	30	3000	300	300	300		
	○	○	○	○	○	○	○	○		
対 照					10>		10>		10>	10>
					●		●		●	●
					6		6		6	10

免 疫 後 約 1 カ 月

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000	10,000
免 疫	3000	1000	100	100	3000	1000	1000	100		
	○	○	○	○	○	○	○	○		
対 照					●		●		●	○
					6		6		6	10

免 疫 後 約 2.5 カ 月

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000	10,000
免 疫	300	30			300	100	100	10	100	100
	○	○	○		○	○	○	○	○	○
対 照					●		●		△	○
					6		6		3	

免 疫 後 約 3 カ 月

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000	10,000
免 疫	100	100	30	30	100	100	30	10		
	○	○	○	○	○	○	○	○		
対 照					●		●		●	○
					6		6		6	6

免 疫 後 約 6 カ 月

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000			10,000
免 疫	100 ○	100 ○	100 ○		300 ○	100 ○	100 ○	30 ○	100 ○	10 ○	10 ○	
対 照	● 5		● 6		● 6			● 9	● 8	● 8	● 9	● 10 ○ ○

免 疫 後 約 1 年

乳剤稀釈倍数	10				100				1,000			10,000
免 疫	100 ○	100 ○	100 ○	30 ○	100 ○	100 ○	30 ○	10 ○	100 ○	30 ○	30 ○	
対 照	● 5		● 5		● 7			● 8	● 5		○	

第 9 表 免疫後の血清凝集溶解価の変動

免疫後の経過	検査数	3000	1000	300	100	30	10	10>	平均
約 2 週	8	2	0	5	0	1	0	0	941
約 1 カ月	9	2	3	0	4	0	0	0	1044
約 2.5 カ月	8	0	0	2	4	1	1	0	130
約 3 カ月	10	0	0	0	5	3	2	0	61
約 6 カ月	10	0	0	1	6	1	2	0	95
約 1 年	11	0	0	0	6	4	0	1	63

第 10 表 免疫後の血清の Lept. 滅殺力の変動

乳剤稀釈倍数	10	100	1,000	10,000
免疫血清				
2 週 後	● 10	○	● 12	○ ○
3 カ月 後	○ ○	○ ○	○ ○	
6 カ月 後	○ ○	○ ○	○ ○	
対 照		● 6	● 7	● 7 ○ ○

乳剤稀釈倍数	10	100	1,000	10,000
免疫血清				
1 年 後	△ 2	● 11	△ 4	△ 4
対 照		△ 3	● 6	△ 4 ● 7

9 匹のモルモットは、それぞれ、感染肝臓乳剤の10及び100倍稀釈液接種に対し感染に耐えた。これらのモルモット血清の凝集溶解価は最高3,000，最低100，平均1044。

3) 約2カ月半後

8 匹のモルモットは、それぞれ感染肝乳剤の10及び100倍稀釈液の接種に対し感染に耐えたが、その血清の

凝集溶解価は最高，300,最低10,平均130に低下した。

4) 約3カ月後

10 匹のモルモットは、それぞれ感染肝乳剤の10及び100倍稀釈液接種に対し感染に耐えたが、血清の凝集溶解価は、最高100，最低10,平均61に低下した。しかしながら、その血清には強い Lept. 滅殺力が認められた。

5) 約6カ月後

10匹のモルモットは、それぞれ感染肝乳剤の10, 100, 1,000倍稀釈液接種に対し感染に耐えたが、それらの血清の凝集溶解価は最高300，最低10,平均95であつた。なお血清には明らかに Lept. 滅殺力が認められた。

6) 約1カ年後

11匹のモルモットは、感染肝乳剤の10, 100, 1,000倍稀釈液接種に対し感染に耐えたが、これらの血清の凝集溶解価は最高100，1匹は10倍でも陰性で、その平均価は65であつた。この場合、血清の Lept. 滅殺力は著しく弱まっているが、なお若干残っているようである。

考 按

virulent Lept. の加熱ワクチンでモルモットを免疫した後、一定の間隔をおいて感染防禦試験を行い、同時にその血清について凝集溶解価をしらべ、またその Lept. 滅殺力を検した成績について考えてみた。凝集溶解価は最終免疫後1カ月が最も高く、それ以後は順次低下して、行くものと思われる。また血清の Lept. 滅殺力は免疫後比較的早期にあらわれ、3—6カ月後においては著しいが、1年後になると著名に減弱することが明らかである。しかるに、感染防禦力は最終免疫後1カ年を経過しても、なお依然として認められた。したがって、感染防禦力は、血清の凝集溶解価の高さ、または、血清の Lept. 滅殺力の程度と完全に平行するものとは考えられない。

これは、免疫後1カ年を経過して、血清の凝集溶解価が低下し、また、その Lept. 滅殺力も著しく弱まった時期においても、モルモットは依然として感染防禦力を示すことから容易に推定されます。

Brunner and Meyer のハムスター及び犬での実験では、ワクチン接種後の凝集価は感染防禦力の程度を知る有効な方法として役立つとのべている。

然しながら前の実験及び本実験の成績から推して、血清の凝集溶解価と個体の感染防禦力の程度とは常に平行するものとは考え難い。

総 括

最終免疫後1カ年経過したモルモットも依然として強い感染防禦力を示すことから免疫性が長期にわたり持続することが明らかにされたが、その血清の凝集溶解価及び Lept. 滅殺力は著しく低下していることは注目すべきことである。

従って免疫モルモットにおいては、血中抗体は感染防禦の際重要なことはいふまでもないが、所謂組織免疫性も亦重大な役割を演じていることが、実験的にも証明出来たと考えても差支えあるまい。

結 論

1) Lept. の免疫原性は 100°C 2 時間の加熱によつても保持されることは、免疫モルモットにおける感染防禦実験ならびに免疫家兎及びモルモットの血清の凝集溶解反応によつて明らかにされた。

2) モルモットでの実験では、Lept. の virulence と免疫原性とは必ずしも直接の関係があるとは考えられない。

3) 免疫されたモルモットは1年後においてもなお強い感染防禦性を有するが、血清の Lept. 滅殺力は著しく弱まっていることから、両者は必ずしも併行しない場合があることがわかった。

参 考 文 献

- 1) Griffith, A. S.: J. Hyg., 18, 59-68, 1919.
- 2) Smith, J.: J. Hyg., 37, 261-270, 1937.
- 3) 小野蘇牧: 福岡医科大学雑誌, 31, 1470-1529, 昭 13.
- 4) Brunner, K. T. and Meyer, K. F.: J. Immunol., 64, 365-372, 1950.
- 5) 北岡正見, 井上祐正: 日本細菌学雑誌, 8, 43-47 昭 28.
- 6) 井戸泰, 法貴六郎, 伊藤照, 和通秀恒: 医事新聞, 940, 1657-1666, 大 4.
- 7) 井戸泰, 法貴六郎, 伊藤照, 和通秀恒: 東京医事新誌, 1964, 633-640, 大 5.
- 8) 伊東徹太, 杉崎春一郎: 千葉医学専門学校雑誌, 83, 389-404, 大 5.
- 9) Uhlenhuth and Fromme: J. Immunitätsf., 25, 317-483, 1916.
- 10) Uhlenhuth and Fromme: J. Immunitätsf., 28, 1-118, 1919.
- 11) Noguchi, H.: J. Exp. Med., 28, 561-570, 1918.
- 12) Wani, H.: J. Immunitätsf., 76, 1-26, 1933.
- 13) Esseveld, H.: Cit. from Leptospirosis in man and animals, Alston, G. M. and Broom J. C., E. & S. Livingstone Ltd. Edinburg and London, 1958.
- 14) 新家偕三: 実験医学雑誌, 23, 312-323, 434-450 昭 14.
- 15) Schüffner, W.: Z. Immunitätsf., 99, 323-332, 1941.
- 16) 添田百枝: 日本伝染病学会雑誌, 17, 413-423, 807-822, 昭 18.
- 17) Borg-Petersen, C.: Symposium on the leptospiroses. United States Government printing Office, Washington, 1953.
- 18) 井上祐正: 日本細菌学雑誌, 8, 631-634, 717-720, 昭 28.
- 19) Schüffner, W. und Mochtar, A.: Zbl. Bakt., I Abt. Orig., 101, 405-413, 1927.
- 20) 臨床細菌学提要, 274-277, 昭 27. 伝染病研究所学友会編.