感染防禦に関する研究

5. チフス菌不溶性顆粒部と可溶性部の免疫学的研究 特に加熱処理の抗原性に及ぼす影響について

松 浦 慶 之 ・ 岡 好 万 ・ 吉 岡 達 治

岡山大学医学部微生物学教室 (指導 村上 栄教授)

[受付: 12月2日・1959年]

緒 言

人におけるチフス症の研究は、実験的にチフス症を誘発出来るマウス対ゲルトネル菌の組合せて進められ¹⁻⁹⁾、マウス対チフス菌の組合せは、主としてチフスワクチン改良の方向 (主として毒性、効力の判定) に利用されてきた¹⁰⁻¹³⁾。著者等の撰んだマウス対チフス菌の場合は、勿論チフス症を誘発出来ない組合せであるから防標能力の判定は、総て第一次敗血症に耐過出来るか否かの検討である。

既にチフス菌体の超遠心分割により得た不溶性顆粒部 (R_2) と可溶性上清部 (S_1) の酵素活性、血清学的、免疫学的の性状の大略と、解析の一部は報告して来た¹⁴⁻¹⁵⁾。之に引続き特に R_2 の血清学的性状と防禦抗原性について、又 S_1 , R_2 の実験動物に対する毒性 (副作用) について得られた知見を述べる。

実験材料及び実験方法

供試菌株: チフス菌としては S 57 (H901 w), S 58 (O 901 w) と Vi 抗原を有する A 2 及び A 63 の各菌である。其の他パラチフス B 菌, 市販ワクチン A-58 も実験に供した。

R_2 , S_1 の作製法: 前報¹⁴⁻¹⁵⁾ と全く同一の方法により調製した。調製された R_2 , S_1 は直に 5 分間の紫外線照射を行い、其の 0.1 ml をチオグリコレート培地に 24 時間培養し無菌であることを確認した。又この照射直後酵素活性を検討したが、この操作による活性の低下は殆んど観られなかった。

実験動物: 白色雑系マウスを用いた。これらマウスは 18—20 g の健康なものを撰んだ。又家兎は白色、体重 2.5 kg 前後の健康なものであり、最初に血清中のチフス抗体価の存在しないことを確めて供試した。

実験成績

家兎皮下に R_2 を 0.5 ml 1 回接種することにより、著しく高度の血中凝集抗体価が得られることを述べたが¹⁰⁾、この抗体価が長期に亘り維持されうるものか否かを検討した。即ち S 58 の R_2 を 0.5 ml, 1 回皮下接種せる家兎と、S 58 生菌, 2.5 mg 1 回皮下接種せる家兎より接種後 30, 45, 60, 75, 90 日目に採血し、基の各々の血清につき S 58 生菌との間の凝集価を比較検討した。30 日以前の力価は前報に記載したので本実験では省略した。結果の概要は第 1 表に示した。

第 1 表 凝集抗体の持続状態

血清稀 釈倍 数	免疫物質 採 血 日 数					S. 58- R_2					S. 58-生菌				
	30	45	60	75	90	30	45	60	75	90	30	45	60	75	90
160	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
320	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
640	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1280	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2560	++	+	±	+	+	++	++	++	+	+	++	++	++	+	+
5120	++	±	—	—	—	±	±	—	—	—	±	±	—	±	—

R_2 接種により 10 日前後で抗体価は最高に達し、1 ヲ月位までは、この力価が動かないことが判る。しかし 45 日頃より極めて徐々にではあるが降下をはじめる。但し

MATSUURA Yoshiyuki, OKA Yoshikazu, YOSHI-OKA Tatsuji: Studies on prevention of infection. V. Immunological properties of particle and soluble fractions isolated from *Sal. typhi*. Influences of heating of the antigen on the immunogenesis. Department of Microbiology. Okayama University Medical School Okayama, Japan (Director: Prof. S. Murakami) —Jap. J. of Bact., 15(7), 680-684, 1960.

90日に至つても2560倍の値を示し, 30日の5120倍値に比すると一段階の下降を觀たに過ぎない。又この R_2 による凝集価を, 生菌免疫処置による凝集価と比較すると両者間には殆んど差が認められない。

以上のことから R_2 により產生された抗体の持続期間は長期に亘り高力価が維持され, 生菌接種の場合に比し何等損色のないことを示した。

2. R_2 の加熱処理が抗体產生並びに防禦能力に及ぼす関係

R_2 が家兎血清抗体產生能の強力なことは確認出來たが, これを加熱処理しても尚強力な抗体產生能を有するか否かは疑問である。そこで S 58 生菌, S 58 よりの R_2 , R_2 を 100°C , 30分加熱せるものの三種の抗原物質を調製し, 前者は 2.5 mg, 後二者は 0.5 ml を家兎皮下に接種し, 48時間後より第1図に示す如く一定の時間に耳静脈より採血し, その血清につき凝集抗体価を測定した。勿論抗原は S 58 生菌である。

第1図 抗体形成の時間的カーブ

R_2 を抗原とした場合は 120 時間 (5 日) で既に凝集価は 1280 倍に達し, 216 時間 (9 日) で 5120 倍の値を示したが, 生菌の際は上昇カーブが R_2 に比し幾分遅れる。これは恐らく菌が生体内で溶菌し, 抗原性を發揮するまでに要する時間的なものと考えられる。そして 264 時間 (11 日) で漸く 2560 倍に達した。然るに加熱処理せ

る R_2 では抗体の上昇は極めて微弱であり, 360 時間 (15 日) でやつと 320 倍に達したに過ぎない。

更にこの実験を確かめる目的で S 57 生菌の R_2 を 56°C 30分と 100°C , 30分加熱処理した二種の抗原を作製し前記同様家兎皮下に 0.5 ml 接種し 6, 11, 15 日目に血清中の凝集抗体価を検討した。其の結果は第2表に示した。

第2表 加熱処理せる R_2 (S. 57) による抗体產生

血清稀釈 倍数 採血までの 日数 R_2 の 処理法						
	40	80	160	320	640	1280
56°C 30分	6	++	++	++	+	-
	11	++	++	++	+	+
	15	++	++	++	+	+
100°C 30分	6	++	++	+	±	-
	11	++	++	++	-	-
	15	++	++	++	+	-

即ち 56°C , 30分の加熱せる抗原処理では, 日数の経過とともに抗体は上昇したが, 無処置の R_2 或は生菌による抗体產生には遙かに及ばない。又 100°C , 加熱の R_2 で免疫すれば前記同様 320 倍より価は上昇せず極めて抗体產生力に乏しい。

次に R_2 がマウスに強力な防禦能力を賦与することは前報¹⁴⁻¹⁵⁾ においても記載したが, ここに示す第3表は LD_{50} の攻撃方法により其の効力を示したものである。

第3表 LD_{50} 攻撃方式による防禦能力の成績

免疫処置法	攻撃菌	生存数
A 2- R_2 の 10^3 倍液 を 0.5 ml	A 63	14/20
A 2- R_2 の 10^4 倍液 を 0.5 ml	A 63	12/20
無処置対照	A 63	0/5

分母……攻撃マウス数, 分子……生存マウス数

即ち A 2 (Vi 抗原菌) の R_2 を 10^3 倍稀釈せるものと, 10^4 倍稀釈せる二者を作り, 各々 0.5 ml 宛を 20 匹のマウス腹腔内に接種した。2 週間後 A 63 (Vi 抗原菌) で攻撃した結果は 10^3 倍稀釈免疫群は 14 匹, 10^4 倍稀釈免疫群では 12 匹が耐過した。この成績は両者ともに 50% 以上が生存し, 著明な防禦能力を保有することを示したものである。

又 A 2 より分離した S_1 の防禦抗原性を, 市販ワクチン (A-58 Vi) と比較検討した。

第 4 表 市販ワクチンと A2-S₁ の防禦賦与力

免疫処置法	攻撃量 (MLD)	生存数
市販ワクチン (A-58Vi) 7 倍稀釈液を 0.5 ml	10000	0/6
	1000	3/6
	100	5/6
A2-S ₁ の 35 倍 稀釈液を 0.5 ml	10000	0/6
	1000	1/6
	100	4/6
無処置対照	1	1/6

分母……攻撃マウス数, 分子……生存マウス数

其の結果は第 4 表に示した如く市販ワクチンは 100M LD に対しては高い防禦賦与力を持つているが 1000M LD に対しては中等度であり, S₁ 免疫群の防禦能力は市販ワクチンよりも更に低位の結果を示した。従つて S₁ の防禦抗原性は R₂ に比較すると遙かに低いものである。

現在までの実験で証明された R₂ の高い防禦抗原性が, 加熱処理によつて失われるか否かは特に興味があるので第 5 表に示す如き実験を試みた。

第 5 表 防禦抗原性に及ぼす加熱の影響

免疫処置法	攻撃量 (MLD)	生存数
A2-R ₂ 100°C, 30分 加熱	50倍稀釈液 を 0.5ml	100
		0/5
	150倍稀釈液 を 0.5ml	10
		1/5
A2-R ₂ 56°C, 30分 加熱	50倍稀釈液 を 0.5ml	100
		0/5
	150倍稀釈液 を 0.5ml	100
		1/5
無処置対照	1	0/5

攻撃菌……A63, 分母……攻撃マウス数,
分子……生存マウス数

表に示す如く A2 に由来する R₂ を 50 倍と, 150 倍に稀釈し, 其の各々を 100°C, 30 分, 56°C, 30 分の二種加熱処理を施した。之等の各々を 0.5 ml 宛マウス腹腔内に接種し, 2 週間後に A63 (Vi 抗原菌) を攻撃した。加熱処理をした R₂ は何れの免疫群においても対照群と差はなく, 全く防禦能力は認め難い。

以上のことから加熱処理を R₂ に与えることは血清抗

体の産生, 防禦能力に著しく影響を与え, 特に防禦抗原性は皆無に近く欠損する。この現象は R₂ の酵素活性と直接関係があるものか否か現在不明である。しかし検討を要する主要な問題と思う。

3. 各種抗原物質接種による生体反応

チフス生菌より分離した S₁, R₂ はともに血清抗体の産生力において優れているが, 防禦抗原性においては R₂ が遙かに優位である。しかし R₂ が防禦抗原性ととも高い毒性を有するならば之を生体に与えることは危険である。

第 6 表 家兎皮内接種, 局所反応の比較

接種材料	接種後日数		3 日		5 日	
	局 所 反 応	接 種 量	発赤	硬結	発赤	硬結
生菌	0.1 mg	10mm	++	15mm	++	
	0.01 mg	5	++	10	++	
死菌	0.1 mg	5	+	—	±	
	0.01 mg	2	?	—	±	
S ₁	10倍稀釈 0.1ml	4	+	—	±	
	100倍稀釈 0.1ml	2	?	—	±	
R ₂	10倍稀釈 0.1ml	—	—	—	—	
	100倍稀釈 0.1ml	—	—	—	—	

接種材料は総て A2 菌による

第 6 表は A2 に由来する R₂ を家兎皮内に接種せる際の局所反応を A2 生菌, A2 死菌, A2-S₁ と比較検討した結果である。即ち生菌を接種せる場合は, それが 0.01mg の微量であつても 5 日後に尚著明な発赤, 硬結が認められ, 死菌は 3 日後或る程度局所反応が残るが, 5 日目には殆んど認められない。S₁ 10 倍稀釈 0.1ml 接種せる際は死菌 0.1 mg 接種の場合と, 又 S₁ 100 倍稀釈 0.1 ml 接種の際は死菌 0.01 mg の場合と殆んど同程度の局所反応であつた。しかし R₂ 接種家兎においては 3 日目において最早局所反応は全く認められなかつた。

次に A2 から分離した R₂ と S₁ を各々 0.5 ml 宛マウス腹腔内に接種し毒性を検討したのが第 7 表である。

表の如く R₂ は 5 倍稀釈までは或る程度毒性が認められるが, 6 倍稀釈で処理したマウスは全く安全であつた。S₁ は 6 倍稀釈においては安全性に乏しく, 7 倍稀釈で初めて死亡からまぬがれた。

以上から家兎皮内接種による局所反応は R₂ が最も軽く, 又マウスに対する致死量も S₁ より低いことが判つた。しかし致死の検討では両者間に著差があるとはいへ

第 7 表 R_2 , S_1 の安全試験

稀釈 倍数	A 2- R_2				A 2- S_1			
4	●	●	●	●	●	●	●	●
5	●	●	○	○	●	●	●	●
6	○	○	○	○	●	●	○	○
7	○	○	○	○	○	○	○	○

何れも 0.5 ml を腹腔内接種

●死亡マウス, ○生存マウス

ない。このように R_2 は生体に対し余り毒作用を示さないが、之は蛋白含量が S_1 に比し遙かに少いことと関係があるかも知れない。

総括及び考案

細菌性抗原の接種により宿主血清中に産生された液性抗体の防禦能力は古くから詳細に検討されてきたが、最近弱毒生菌免疫の研究から端を発した細胞性免疫においては、免疫の根元を血清抗体よりも寧ろ細胞因子に求めつつある^{12,16)}。これの研究は細胞の構成主要成分である蛋白の生合成に関係してくるものと考えられる。

感染防禦力の検討は宿主の細胞因子の究明とともに、防禦抗原性の問題を細菌細胞の微細構造から追求しなくてはならない。しかし之に関する記録は現在極めて少いようである。

著者等は生菌細胞を破壊し、超遠心分劃法により分離した酵素活性の不溶性顆粒部と可溶性上清部の血清学的、免疫学的検討を継続しているが¹⁴⁻¹⁵⁾、本報においては更に新たな知見を 2—3 述べた。

即ち不溶性顆粒部を家兎皮下に 1 回微量接種することにより血清凝集価は速やかに、しかも高度に上昇するが、この抗体価の持続期間は如何であるか検討した結果、90 日間の観察において、生菌を接種せる場合の抗体持続期間と何等差を觀ない成績を得た。

前報¹⁴⁾において述べた如く不溶性顆粒部は lactic acid と TCA cycle に関与する有機酸中 succinic acid のみを特異的に酸化し、他の基質では酸素の消費は起らない。このような顆粒部の特異的酵素活性を熱処理により不活化した際、尚抗原性が存在するか否かは将来酵素化学と血清学或は免疫学の関係を検討する上に重要なことと思われる。

S 58 生菌より得た顆粒部を 100°C, 30 分熱処理し、之を抗原として家兎皮下に接種した結果は、「生」の顆粒部を抗原とした場合と全く異り、血清抗体の上昇は著しく低下した。又 S 57 生菌より得た顆粒部を 100°C, 30 分

と 56°C, 30 分の二種熱処理を実施し、之等による抗体産生能を比較した結果は後者処理法が前者より幾分抗体上昇率がよい。

更に顆粒部の熱処理と防禦抗原性の関係を A 2 顆粒部につき検討した。即ち 56°C, 30 分或は 100°C, 30 分の何れの熱処理法においても、「生」の顆粒部に存在せる如き強力な防禦抗原性は全く認められなかつた、

即ち顆粒部を加熱不活化することは血清抗体の産生を著しく低下せしめるし、更に一段と防禦抗原性を消失せしめる。酵素不活化が直接之等の現象と関係あるか否かは、これのみの実験では断言出来ないが可能性は考え得ると思う。

次に可溶性部の防禦抗原性を検討するため A 2 生菌より得た可溶性部を 35 倍稀釈し、その 0.5 ml でマウスを免疫した。其の結果は市販ワクチン 7 倍液 0.5 ml で免疫したものと同程度或はそれ以下の防禦力であつた。この成績は顆粒部の防禦抗原性には遙かに及ばない。

以上の如く「生」の顆粒部は高い抗体産生能と強い防禦抗原性を有するが、これを接種することにより生体に害作用を与えるか否かを、先ず接種局所の反応から検討したが、顆粒部による局所反応は最も弱く速かに消失した。局所反応の最も強いのはやはり生菌であつた。更に顆粒部と可溶性部の高濃度の場合、マウスに対する致死毒性をみると顆粒部は可溶性部より毒性も低い。

以上の如く一般に顆粒部が有害作用が少い原因は恐らく蛋白含量が可溶性部に比して遙かに少いことに基くものと思われる。

結 論

チフス菌各株の肉汁寒天発育菌を磨砕し、超遠心分劃法により、酵素活性の不溶性顆粒部と可溶性部を得た。之等の血清学的、免疫学的性状を検討し下記の結論を得た。

1. 顆粒部接種により産生された血清中の凝集抗体価は長期に亘り力価の低下が起らない。
2. 顆粒部を加熱処理すると抗原性は著しく低下する。特に防禦抗原性において之が著しい。
3. 顆粒部、可溶性部、生菌、死菌の接種による毒性の比較において、顆粒部が最も毒性弱く、生菌が最も強い。

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導御校閲を戴いた村上教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 小林：日本医学及健康保険，3240，3260，1941.
- 2) 牛場：日本細菌誌，3，9，1948.
- 3) 臣永：日本細菌誌，3，18，1948.
- 4) 牛場，佐々木，他：日本細菌誌，9，1069，1954.
- 5) 三橋，川上，山口，永井：日本細菌誌，13，323，1958.
- 6) 三橋，川上，山口：日本細菌誌，13，535，1958.
- 7) 三橋，川上，五島，他：日本細菌誌，13，704，1958.
- 8) 三橋，川上，山口，他：日本細菌誌，13，794，1958.
- 9) 三橋，川上，山口，他：日本細菌誌，13，1037，1958.
- 10) 吉岡，岩端，牛場：日本細菌誌，4，369，1953.
- 11) 竹井：日本細菌誌，9，237，1954.
- 12) Ando, K., Takei, S.: Japan. J. Exp. Med., 24, 247, 1954.
- 13) 吉岡，岩端，牛場：日本細菌誌，8，585，1953.
- 14) 村上，松浦，岡，吉岡：日本細菌誌.
- 15) 村上，岡，松浦，吉岡：日本細菌誌.
- 16) Haurowitz, F.: Biol. Revs., 27, 247, 1952.