細胞感染

1. マウス由来の L 細胞の *Salmonella enteritidis* 感染について

三 橋 進

群大医学部微生物学教室

堀 田 恭 子*

北里研究所・黒川研究室

〔受付: 10 月 3 日・1960 年〕

宿主の体内において“obligatory cytotrophic”なウイルス, リケッチャ等の研究には必然的に生体を増殖の場として使わなくてはならなかったことは申すまでもない。孵化鶏卵, 組織培養の進歩はこれらの研究に非常に大きい進歩をとげしめた。ブルセラ, 野兎病, 結核, チフスの如く“facultative cytotrophic bacteria”による疾患群においては, 菌は宿主の特定細胞内に定着し, 比較的慢性・亜急性の経過をとつて推移する。従つて, これらの疾患における感染, 免疫の研究を *in vitro* における細胞対菌との関係において解析しようとする試みが古くからしばしばなされてきた¹⁻⁷⁾。実験的チフス症においては, 秋山等⁸⁾は Suter⁹⁾の方法によつて腹腔単核嚥細胞を組織培養にかけ, *S. enteritidis* の病原性の差が, 組織培養細胞内における増殖能の差として認められ, 強毒菌の細胞内増殖速度の差が, 動物種による感受性の差を表現することを明らかにした。また佐藤, 田中等^{9, 10)}は, マウス腹腔単核嚥細胞の組織培養の技術的困難さを克服し, 生菌免疫マウス由来の腹腔単核嚥細胞が, 組織培養下において *S. enteritidis* 強毒株の細胞内増殖を阻止することを明らかにした。更に *S. enteritidis* の生菌によつて免疫されたこの細胞は *S. enteritidis* と, その抗原構造を異にする他の腸内細菌(病原大腸菌, *S. choleraesuis*, *S. typhi murium*)の細胞内増殖をも抑制することを明らかにした¹¹⁾。

本報においては, マウスの fibroblast 由来の L 細胞¹²⁾と *S. enteritidis* との組合せによる嚥菌現象について得られた結果の一部を報告する。

実験材料及び方法

使用菌株: *S. enteritidis* 強毒菌 116-54 株。培養には, ANY 培地を用い, 一夜 37°C 静置培養し, 遠心して

菌体を集め, これを生理食塩水で二回洗滌後, 蒸留水に浮遊せしめた。

菌量測定には Coleman 光電比色計を用い 540 m μ における吸収から算定した。生菌数計算は, 普通寒天平板によつた。

L 細胞: Clone B 929-203-6¹³⁾(1955 年 4 月分離)の L 細胞を使用した。培養は 37°C 静置培養を, 母培養は角型の瓶培養を行つた。使用培地は, 0.1% Yeast extract, 0.5% Lactalbumin hydrolysis, 0.45% Glucose を加えた Earle の balanced solution¹²⁾(YLA と略)に非働

第 1 図 基盤に使用したシャーレ

化したヒト血清を 10%に加え, これに抗生剤として, Streptomycin 30 μ g/ml, Penicillin 50 単位/ml Mycostatin 20 単位/ml を加えて使用した。

L 細胞は図 I に示した「すり合せ」の無菌シャーレへ母培養の角瓶から植え継ぎ 37°C, 24 時間培養した。シャーレ内には予め血清でカバーグラスをはりつけ, 8 ml の培養液を加えた。L 細胞は 1 シャーレ約 10⁶ コの割に接

MITSUHASHI Susumu and HOTTA Kyoko: Cellular Infection 1. *In vitro* interaction between “L” cells and *Salmonella enteritidis*. Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University * Kitasato Institute (Director: Dr. M. Kurokawa) — Jap. J. of Bact., 16(4), 317-321, 1961.

種した。

喰菌方法：予めL細胞を培養したシャーレ内の培養液をすて、抗生剤の入らないYLA培地でカバーガラスに附着した細胞を、細胞の剝離しないように注意して洗滌した。喰菌系は1シャーレにYLA培地 8.9 ml, 新鮮モルモット血清 1 ml, 菌浮游液 0.1 ml を混和し、洗ったL細胞に加えた。細胞と菌との割合は1:1から1:500迄種々の割合にし、37°Cにシャーレを静置し喰菌させた。細胞と菌との接触時間は、15, 30, 45, 60, 120分。その都度同一シャーレのカバガラスをとり出し、細胞外の菌を除くため生理食塩水でよく洗い、Wright氏染色を行って、喰菌率を算定した。

喰菌率：Wright氏染色を行つたカバーガラス上の細胞500個を観察し、喰菌率を求めた。喰菌率(%)は(喰菌細胞数/数えた細胞数)×100をもつて現わした。

実験成績

喰菌率の比較：細胞と菌との割合を1:1, 1:10, 1:100, 1:500にし、喰菌時間15—120分の間での喰菌率を第1表に示した。細胞と菌との割合を同数で喰菌させた場合、喰菌率は3%で非常に低い。1:100或いはそれ以上の割合に菌を加えた場合は菌の多くが細胞に附着し細胞外の菌を完全に洗い落す事が出来ず、細胞内の菌と細胞外の菌との鏡検上の区別が困難な場合もあった。細胞と菌との割合が1:10の場合、30—45分の喰菌率は、10—18%で最も高かった。菌と細胞の接触時間をこれ以上長くすると、すべての場合に喰菌率は減少した。

第1表 喰菌系における細胞と菌の割合、接触時間を種々に変えた場合の喰菌率

Cell : 菌	1 : 1	1 : 10	1 : 100	1 : 500
喰菌時間				
15 (分)	1	6	1	3
30	3	13	6	5
45	2	14	11	6
60	3	9	8	7
120	3	7	8	6

細胞500個を観察し、この中で喰菌しておる細胞を全体の細胞の百分率で現した。数字は3回の実験の平均値を示した。

細胞と菌の割合を1:10にし、30分喰菌させた時の喰菌している細胞を、細胞内菌数で区分した結果は表2に示した。喰菌している細胞の細胞内菌数は、殆んどが細胞1個あたり1個で、2個以上喰菌しておる例はわずかであつた。

第2表 喰菌しておる細胞の細胞内菌数による区分(%)

	喰菌しておる細胞の細胞内菌数による区分(%)			喰菌率(%)
	菌数1ヶ	菌数2ヶ	菌数3ヶ	
1	92.6	5.0	2.4	14.0
2	83.2	8.3	8.5	12.0
3	80.6	18.1	1.3	14.4
4	81.8	12.1	6.1	13.2

細胞対菌の割合を1:10, 細胞と菌との接触時間30分、喰菌率は細胞500乃至600を観察し、喰菌しておる細胞の全体の細胞数の百分率で現した。

摂取された菌の運命：L細胞内にとりこまれた菌は速やかに縮小化し、球菌状を呈する。時には縮小化した菌体のまわりに halo を認めることがある(写真3, 4, 5)

更に培養が進むにつれ、細胞内菌はますます縮小し培養24時間後には菌と細胞内顆粒との区別はつかなくなる。この間における細胞の形態の変化について述べる。1日組織培養にかけ、カバーガラス上に附着した細胞は、突起をだしさかんな増殖能を示す。このような細胞を、*S. enteritidis* 強毒菌 116—54株の浮游液を加えた喰菌系に入るとL細胞は急速に突起をちぢめて球形化する。(写真1, 2) この細胞を新しく培養液に移すと細胞は再び突起を出し、正常の形にもどる。この詳細については次報¹⁰⁾にゆづる。喰菌後、組織培養にかけられ

第2図 細胞内にとりこまれた菌の生残率

喰菌条件の詳細は text 記載。

喰菌系における菌と細胞との接触時間を30分とし、この時期を喰菌後の時間の開始時間とした。——カバーガラス上の細胞をはぎとり、4回洗滌、Earle 液に浮べ、細胞 10^6 個あたりの菌数を普通寒天平板上で求めた。

1.

2.

3.

4.

5.

- 1) 正常L細胞 (400×) ライト染色
- 2) ゲルトネル菌と30分間接触後のL細胞 (400×) Wright 染色
- 3) ゲルトネル菌感染直後 (1000×) Wright 染色
- 4) ゲルトネル菌感染15分後 (1000×) Wright 染色
- 5) ゲルトネル菌感染30分後 (1000×) Wright 染色

た細胞内で菌が増殖して細胞を崩壊せしめた像は1例もみられなかった。次に細胞内にとりこまれた菌の生死について実験した。図2に示す如く、喰菌30分後には喰菌直後の6%に減少し、喰菌1時間後には、殆んどL細胞内の菌は普通寒天平板上で、コロニーをつくり得なかった。

総括並びに結論

組織培養された細胞の喰菌については、Shepard¹⁵⁻¹⁷⁾がHeLa細胞に結核菌を喰菌せしめた結果を報告している。又 Furness^{18,19)}は猿の腎臓細胞(AMKと略)に*Salmonella typhi murium*を喰菌せしめた結果について述べている。伊藤等²⁰⁾はHeLa細胞と*Salmonella*の系においては喰菌率は2—5%の如く低いことを記載している。マウス対*S. enteritidis*との組合わせにおける実験的チフス症においては、生菌免疫は極めて強い感染死防禦を示し、死菌免疫ではマウスを強毒菌の攻撃から救い得ない²¹⁾。更に橋本等²²⁾によれば弱毒生菌1回、強毒生菌1回の免疫を施されたマウスの感染死防禦は極めて強く、強毒菌の1000MLDの静脈内攻撃にも100%耐過することを明らかにした。生菌免疫の感染死防禦の本態については全く不明であるが、感染経過の解析から、菌の血中からの clearance と細胞内菌の増殖抑制が感染死防禦の主因と考えられる²²⁾。しかも後者は死菌免疫によつては附与せられない。従つて菌と細胞との関係を細胞単位において実験することは免疫解明に極めて重要な問題である。既に報告^{23,24)}せられておるごとく、一端細胞内にとりこまれ、マウスと平衡状態を得た菌は抗生剤に対し、極めて抵抗強く、ストレプトマイシン又はクロランフェニコール或いは両者の共用による5日間の連続治療にも拘わらず、マウス体内から菌を完全に除去することが不可能であつた。しかるに感染18時間以内ではストレプトマイシン1回投与で完全にマウスの全臓器を無菌にすることができた。以上の事実はチフス症における carrier state の問題の解明に大きい示唆を与えるものである。また梁等²⁴⁾によれば、人型結核菌の強毒株は、マウスの肺由来の大喰細胞内では、極めて容易に増殖し、コード形成も著明であるが、同一マウスの菌の脾由来の大喰細胞内での菌の増殖はあまり著明でなくコード形成もみられないと述べている。また鶏胚の脾由来の大喰細胞内では、人型結核菌強毒株は、増殖を抑制され菌は消滅してしまうに拘わらず、モルモットの同一細胞内では菌はさかんに増殖し、コードを形成し細胞についに崩壊する。即ち動物種の差による virulence の差が、細胞内の

菌の増殖によつて認められると共に、同一個体内での大喰細胞内においても菌の増殖能に差異のあることは興味深い。以上の見地から、マウスに対し病原性の高い*S. enteritidis*とマウス由来のL細胞との組合わせでの喰菌系を用い実験を行い次の結果をえた。

結 果

- 1) マウスに病原性の高い、*S. enteritidis*とマウス繊維芽細胞由来のL細胞の組合わせでは、L細胞に対し、*S. enteritidis*は殆んど病原性を示さなかった。
- 2) L細胞は上記の条件では10—18%の割合に喰菌し、喰菌された菌は速やかに縮少し、球菌状を呈し、時には菌体のまわりに halo を認めることがある。
- 3) L細胞に*S. enteritidis*強毒菌116—54株を加えると突起を出した正常の形から急速に球形となる。これらの細胞は新しい培地に移すと容易にもとの形に復帰する。
- 4) 細胞内にとりこまれた菌は30分後に普通寒天平板上にコロニーを形成しにくくなり、ついには細胞内で死滅し消失する。

文 献

- 1) Beveridge, W. I. B. and Burnet, F. M.: Spec. Rep. Series Med. Res. Council, London, No. 256. 1946.
- 2) Wood, W. B. Jr., Smith, M. R. and Watson, B.: J. Exp. Med., 84, 387, 1946.
- 3) Wood, W. B. Jr. and Smith, M. R.: J. Exp. Med., 90, 85, 1949.
- 4) Suter, E.: J. Exp. Med., 96, 137, 1952., 97, 235, 1953. Bact. Rev., 20, 94, 1956.
- 5) Mackaness, G. B., Smith, N. and Wells, A. Q.: Amer. Rev. Tuberc., 69, 479, 1954.
- 6) Mackaness, G. B. and Smith, N.: Amer. Rev. Tuberc., 67, 322, 1953.
- 7) Frocksen, E. and Schellenberg, H.: Z. Hyg., 142, 554, 1956.
- 8) 秋山武久: 日本細菌学雑誌. 14, 87, 1959.
- 9) 佐藤一英, 田中徳満, 他: 日本細菌学雑誌. 13, 630, 1958.
- 10) 田中徳満, 佐藤一英, 他: 日本細菌学雑誌. 15, 437, 1960.
- 11) 佐藤, 田中, 三橋: 日本細菌学雑誌. 1960年7月. 札幌.
- 12) Earle, W. R.: J. Nat. Cancer Inst., 4, 165, 1943.
- 13) Sanford, K. K., Earle, W. R. and Likely, G. D.: J. Nat. Cancer Inst., 9, 229, 1948.
- 14) 堀田, 黒川, 三橋: 日本細菌学雑誌. 投稿予定.

- 15) Shepard, C. C. : J. Bact. **73**, 494, 1957.
- 16) Shepard, C. C. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **90**, 392, 1955.
- 17) Shepard, C. C. : Federation Proc. **15**, 613, 1955.
- 18) Furness, G. : J. Infect. Dis., **103**, 272, 1958.
- 19) Furness, G. : Federation Proc. **17**, 511, 1958.
- 20) 伊藤周治, 橋本一男, 佐々木正五 : 日本細菌学会雑誌. **15**, 349, 1960.
- 21) 三橋, 川上, 他 : 日本細菌学雑誌. **13**, 323, 1958.
- 22) 橋本一, 川上正也, 他 : 日本細菌学会雑誌. **15**, 771, 1960.
- 23) 三橋, 川上, 五島. 他 : 日本細菌学雑誌. **13**, 704, 1958.
- 24) Smadel, J. E. : J. Immunol., **84**, 1, 1960.
- 25) Lyang, K. W. : Amer. Rev. Resp. Disease **81**, 201, 1960. **81**, 206, 1960.