腸チフス菌培養中培養メヂウム (ブイヨン) 中に 遊離する Vi 沈降原について

富 沢 万 之 助

国立予防衛生研究所 (前部長 中村敬三博士, 現部長 福見秀雄博士)

[受付: 6月15日 1954年]

寒天平板及び寒天斜面などにV型腸チフス菌を培養しそのまま孵卵器中に放置すると、金属性の光沢ある厚い不透明なV型集落の特性が次第に失われて、48時間位経るとW型集落との区別が困難になつて来る、又V型集落の充分發育したものを低温度に保存するとV型集落の性状が1週間位保たれる。これらの点から考えると一度發育したV型集落が37°C 中にあるときは、その一部が寒天培地中に移行するためではないかとも思われるが、寒天培地ではその証明が困難なのでブイヨンを用いて実験を行つてみた。即ちブイヨン中に培養して時間的に区切つて濾過して上清を採り、このものについて沈降反応免疫原性を検し、同時に菌体については凝集反応をも行つてみた。

実験方法

10 cc の滅菌生理食塩水中に 1 白金耳の菌量を浮遊させ、これから1白金耳宛を20 cc のブイヨン10本に同時に移植して37°C の孵卵器中に入れ、12時間培養から始めて4時間毎に1本づつ取出し遠心沈澱後ザイツの濾過器で濾した、かくして引続き48時間迄行つた。直ちに遠心沈澱又は濾過出来なかつたものは、2°~5°C の冷蔵庫内に1夜保存して翌朝処理した。沈降反応は重層法によつて行い3時間観察した。凝集反応は遠心沈澱して得た菌を食塩水に再浮遊をして行つた。

V 型腸チフス菌家兎免疫血清に対する沈降反応

Ballerup 菌の免疫血清がなかつたので ViI 菌のブイヨン培養菌で免疫して作つた家兎血清を用いて沈降反応を行つてみた。培養12時間のブイヨン濾液ではすべて陰性の成績を示すが、培養16時間で始めて反応して来る。これらはO血清に反応しない点からみれば培養16

第1表 V型腸チフス菌家兎免疫血清に対する沈降反応

菌株	培養時間	血 清 稀 釈							
		1:1	25	50	100	200	400	800	1600
58	12	—							
	16	±	±	±	—				
	20	++	+	+	++	±	—		
	24	++	+	+	(+)	±	—		
	28	(+++)	++	(++)	(+)	±	±	—	
	32	+++	+++	++	++	+	+	±	—
	36	+++	+++	+++	++	+	+	±	—
	40	+++	+++	+++	+++	++	+	±	—
	44	+++	+++	+++	+++	++	+	±	—
	48	+++	+++	+++	+++	++	+	±	—
Vi I	12	—							
	16	++	++	+	(+)	—			
	20	++	++	(++)	(+)	—			
	24	++	++	++	+	+	(+)	—	
	28	+++	+++	+++	++	(++)	+	(+)	—
	32	+++	+++	+++	++	(++)	+	(+)	—
	36	+++	+++	+++	++	++	(++)	(+)	—
	40	+++	+++	+++	++	++	(++)	+	—
	44	+++	+++	+++	++	++	(++)	+	—
	48	+++	+++	+++	++	++	(++)	+	—
Ty 2	12	—							
	16	++	++	+	(+)	—			
	20	++	++	(++)	(+)	—			
	24	+++	++	++	+	+	(+)	±	—
	28	+++	++	++	(++)	+	+	±	—
	32	+++	(+++)	++	(++)	+	+	±	—
	36	+++	+++	+++	(+++)	++	+	±	—
	40	+++	+++	+++	(+++)	++	+	(+)	—
	44	+++	+++	+++	(+++)	++	+	(+)	—
	48	+++	+++	+++	(+++)	++	+	(+)	—

TOMISAWA Mannosuke: On Vi-precipitinogen freed in Media which were inoculated with Typhoid bacillus, National Institute of Health of Japan, — Jap. J. of Bact., 9(11), 941-944, 1952.

時間で Vi 抗原がブイオン中に遊離して来たためであると思われる。沈降素量は菌株によつて多少の差異はあるが次第に上昇して培養 24~32 時間で最高値に達するようである。その成績を 1 表に示す。

純 Vi 血清に対する沈降反応

純 Vi 血清稀釈を 50 倍から始めたためか培養後 24~32 時間で始めてブイオン中に遊離 Vi 抗原が認められるようになった。これは V 型血清を用いて行つた沈降反応に於て沈降素量が最高に達したときと一致している。その成績を 2 表に示す。

第 2 表 純 Vi 血清に対する沈降反応

菌株	培養時間	血 清 稀 釈					
		50	100	200	400	800	1600
58	28	—					
	32	(++)	+	+	+	±	—
	36	++	++	(++)	+	±	—
	40	(+++)	++	(++)	+	(+)	—
	44	(+++)	++	++	+	(+)	—
	48	(+++)	++	++	+	(+)	—
Vi I	20	—					
	24	(++)	+	+	(+)	±	—
	28	++	(++)	(++)	(+)	(+)	—
	32	++	(++)	(++)	+	(+)	—
	36	(+++)	++	++	(++)	(+)	—
	40	(+++)	++	++	(++)	(+)	—
	44	(+++)	++	++	(++)	+	—
	48	(+++)	++	++	(++)	+	—
Vi 2	20	—					
	24	+	+	+	+	±	—
	28	++	(++)	(++)	+	(+)	—
	32	++	++	++	+	(+)	—
	38	++	++	++	(++)	(+)	—
	40	++	++	++	(++)	+	—
	44	++	++	++	(++)	+	—
	48	++	++	++	(++)	+	—

以上は沈降原として用いたのはブイオン培養濾液をそのままにし、純 Vi 血清を倍数稀釈して行つた沈降反応の成績である。次に純 Vi 血清も沈降原も共に稀釈して行つてみた。その成績を 3 表に示す。Ty 2 以外は沈降原が不十分なので順を追つて行うことが出来なかつた。菌株によつて培養中ブイオン中に遊離する Vi 抗原の量は異なるが、培養時間の長くなるに従つてブイオン中に遊離する Vi 抗原の量が増すようである。又一般的にみ

第 3 表 沈降原及び純 Vi 血清稀釈法による沈降反応

菌 株	培養時間	抗原稀釈	血 清 稀 釈				
			50	100	200	400	800
Vi I	24	1:1	++	+	+	(+)	—
		1:2	(+)	(+)	(+)	±	—
		1:4	—				
	32	1:1	++	++	(++)	+	
		1:2	+	+	+	±	
		1:4	±	±	—		
		1:8	—				
	24	1:1	+	+	(+)	±	
		1:2	—	—	—	—	
Ty 2	28	1:1	++	+	+	(+)	
		1:2	+	+	(+)	—	
		1:4	—				
	32	1:1	++	++	+	(+)	
		1:2	+	+	+	(+)	
		1:4	—				
	36	1:1	++	++	(++)	+	
		1:2	(++)	+	+	+	
		1:4	(+)	(+)	(+)	—	
		1:8	—				
	40 44 混合 48 合	1:1	++	++	++	+	
		1:2	++	++	(++)	+	
		1:4	+	+	+	(+)	
		1:8	±	±	±	—	

て 3 表に示すように Vi 抗原の発育の良い菌株である Vi 1, Ty 2 などはメヂウム中に遊離する Vi 抗原の量が多いようである。Ty 2 についてみると培養 24 時間では沈降素価は 1, 28~32 時間では 2, 36 時間では 4, 40~48 時間では 4~8 である。

O 血清に対する沈降反応

ブイオンに培養後 20~24 時間で O 血清に反応するようになる。沈降素量の最高値に達するのは培養 28~36 時間後である。O 沈降素量は Vi 沈降素量に比して価が非常に低い。4 表に示す。

凝集反応

培養時間の異なつたブイオンを遠心沈澱して菌体だけを採り、これを食塩水に再浮遊させて純 Vi 血清と O 血清とについて凝集反応を行つた。純 Vi 血清にはすべての菌株が培養時間に関係なく同程度によく凝集し、その凝集価も寒天培地に培養したもの に 比して 高度に 3200

第4表 O血清に対する沈降反応

菌 株	培養時間	血 清 稀 釈				
		1:2	25	50	100	200
58	20	—	—	—	—	—
	24	(+)	—	—	—	—
	28	++	(+)	±	—	—
	32	++	(++)	+	(+)	—
	36	++	(++)	+	(+)	—
	40	++	++	+	(+)	—
	44	++	++	+	(+)	—
	48	++	++	+	+	—
Vi I	16	—	—	—	—	—
	20	+	±	±	—	—
	24	++	(+)	(+)	—	—
	28	++	++	+	(+)	—
	32	++	++	+	(+)	—
	36	++	++	+	(+)	—
	40	++	++	+	(+)	—
	44	++	++	+	(+)	—
Ty 2	16	—	—	—	—	—
	20	+	(+)	±	—	—
	24	++	+	+	—	—
	28	++	+	+	±	—
	32	++	+	+	±	—
	36	++	+	+	(+)	—
	40	++	+	+	(+)	—
	44	++	(++)	+	(+)	—
	48	++	(++)	+	(+)	—

倍まで凝集した。ブイオン中に培養すると Vi 抗原の一部がブイオン中に遊離することは沈降反応によつて証明される、このものが Vi 凝集反応を阻止的に働くものと思われる、従つてブイオン培養の沈澱菌が高度に凝集するのは、この遊離の Vi 抗原が除かれるためと思われる。このことについては既に発表した。

O血清について行つた凝集反応

58は培養時間に関係なく最初の12時間培養のものからよくO血清に凝集するのを認めた、然しながら高度の凝集価を示したのは20時間後である。培養40時間で凝集価も凝集度も最高に達した。

Vi Iは培養20時間までは100~200倍まで弱く凝集するに過ぎない。32時間で3200倍まで凝集するが反応度は弱い。36~40時間で凝集度も漸く強く現われ始めた。Ty 2は略々 Vi Iと同様な成績を示す。その成績を5表

に示す。

第5表 O血清に対する凝集反応

菌株	培養時間	血清稀釈								
		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
58	12	+++	+++	++	+	+	(+)	(+)	—	± ± ±
	16	+++	+++	++	+	+	+	(+)	—	
	20	+++	+++	++	+	+	+	(+)	(+)	
	24	+++	+++	++	(++)	+	+	(+)	(+)	
	28	+++	+++	++	(++)	+	+	(+)	(+)	
	32	+++	+++	++	++	+	+	+	(+)	
	36	+++	+++	++	++	+	+	+	(+)	
	40	+++	+++	(+++)	(+++)	++	+	+	(+)	
	44	+++	+++	+++	(+++)	++	+	+	(+)	
	48	+++	+++	+++	+++	++	++	+	(+)	
Vi I	12	(+)	(+)	±	—					—
	16	(+)	(+)	±	—					
	20	+	(+)	(+)	±	—				
	24	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	—		
	28	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	—	
	32	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	—	
	36	(++)	++	(++)	+	(+)	(+)	(+)	—	
	40	(++)	(++)	++	++	+	(+)	(+)	—	
	44	(++)	(++)	++	++	+	(+)	(+)	—	
	48	(++)	(++)	++	++	+	+	(+)	(+)	
Ty2	12	+	+	(+)	—					
	16	++	+	(+)	—					
	20	++	+	(+)	(+)					
	24	++	+	(+)	(+)	(+)	—			
	28	++	++	+	+	(+)	(+)			
	32	++	++	+	(+)	(+)	(+)	—		
	36	++	++	(++)	+	+	(+)	(+)	—	
	40	++	++	++	+	+	(+)	(+)	—	
	44	(++)	(++)	++	++	+	(+)	(+)	—	
	48	(++)	(++)	++	++	+	(+)	(+)	—	

培養時間の短いものは菌体に Vi 抗原が保持されているが培養時間の長いものは一度発育した Vi 抗原が菌体からメヂウム中に遊離するため、O血清に高度に凝集するようになり而も Vi 抗原の発育の悪い菌株は良い菌株より容易に且つ早く菌体からメヂウム中に遊離するため培養時間の早期からO血清に凝集するようになるものと思われる。

力 價 試 験

沈降反応に用いたブイオン培養濾液そのままのもの0.5 cc 宛を体重14~15g 瓦の マウス腹腔内に注射して

14 日目に 63 菌株を 5% のムチン水溶液中に浮遊させて作つた 10,000, 1,000, 100 MLD の菌量で攻撃して 6 表に示すような成績を得た。12 時間の培養濾液の所でマ

第 6 表 力価試験

菌 株	攻 撃 菌 量	培 養 時 間		
		12	16	20
58	10,000 MLD	2/5	1/5	0/5
	1,000 MLD	1/5	0/5	0/5
	100 MLD	1/5	0/5	0/5
Vi I	10,000 MLD	2/5	2/5	1/5
	1,000 MLD	0/5	1/5	0/5
	100 MLD	1/5	0/5	0/5
Ty 2	10,000 MLD	3/5	1/5	0/5
	1,000 MLD	2/5	1/5	0/4
	100 MLD	1/5	0/5	0/4

ウス斃死数が多く、次に 16 時間培養濾液の所で多い、それ以上の培養時間では殆んど斃死するものがなく皆同様な成績を示す。このことは沈降反応に於ても判るように培養時間 12~20 時間までは Vi 抗原のブイオン中に遊離する量が少ないためで、それ以上の培養時間になると充分な量の Vi 抗原がブイオン中に遊離するためであろうと思われる。ザイツ濾過器の不完全なため、58 の 12 時間培養濾液中にだけ 1 cc 中約 80 位の割合で生菌が混入していたが力価には殆んど影響が認められない。

次にブイオン培養濾液を食塩水で 10 倍及び 100 倍に稀釈してマウスを免疫し 1,000 MLD で攻撃してみた。すべての菌株の培養濾液が充分になかつたので順を追つて実験出来なかつた。58 の 28 時間培養濾液の 10 倍稀釈では 1,000 MLD の攻撃に耐えるが 100 倍に稀釈すると 6 匹中 4 匹まで倒れる、40~48 時間培養濾液では 100 倍稀釈液でも耐えるようになった。

Vi I 菌では 24 時間培養濾液では 100 倍に稀釈すると 6 匹中 6 匹まで倒れるが、36 時間培養濾液では 6 匹中 1 匹だけ倒れるに過ぎない。Ty 2 では 20 時間培養濾液では 100 倍稀釈液で 6 匹中 5 匹倒れるが、28 時間以上の培養濾液では耐えられるようになった。その成績を 7 表に示す。

総 括

- 1 腸チフス V 型菌をブイオン中に移植して 37°C で

第 7 表 沈降原稀釈による力価試験
攻撃菌量 1,000 MLD

菌 株	免疫注射量	培 養 時 間					
		20	24	28	36	40	48
58	1/10 0.5 cc			0/6		0/6	0/6
	1/100 0.5 cc			4/6		0/6	0/6
Vi I	1/10 0.5 cc		1/6		0/5		0/7
	1/100 0.5 cc		6/6		1/6		1/7
Ty 2	1/10 0.5 cc	0/6		1/6	0/5		0/6
	1/100 0.5 cc	5/6		2/6	1/5		0/6

分母は実験マウス数、分子は斃死数

12~48 時間まで培養し続けてみると、培養 16 時間でブイオン中に遊離の Vi 抗原が証明される。純 Vi 血清 (1:50) についてみると、培養 24~32 時間でブイオン培養濾液中に遊離の Vi 抗原が証明される。この量は沈降原 (ブイオン培養濾液) 稀釈法によつて試験してみると、培養 36~40 時間で最高値に達するようである。

2 遊離の O 沈降原は培養 20~24 時間で認められるようになる。

3 各培養時間の菌を遠心沈澱して得た菌で Vi 凝集反応を行つてみると培養時間には関係なく殆んど一様に同程度まで (1:3200) 凝集する。この凝集価は寒地培地に培養した菌よりは 8 倍位高い。

4 O 凝集反応は 20~24 時間培養菌では凝集価は非常に低い。但し Vi 抗原の發育の悪い菌株では 12 時間培養菌でも相当度に凝集する、培養時間の長くなるに従つて凝集度は一般に弱い次第に高く且つ強く凝集するようになる。

5 12 時間のブイオン培養濾液はマウス体内で充分な免疫原性を有する、培養 24~28 時間まではその 10 倍稀釈で 1,000 MLD の攻撃に耐える、28 時間以上になるとその 100 倍稀釈でも 1,000 MLD の攻撃に耐えるようになる。

本論文の要旨は昭和 26 年予研伝研集談会に発表した。

文 献

- 1) Shimizu, M.: Jap. J. Med. Scie. Biol., 5, 407~419, 1952.
- 2) 寺田清二: 基礎と臨床, 2, 150~156, 1945.