実験的チフス症の免疫に関する研究

Ⅱ 腹腔単核白血球とゲルトネル菌とのinvitro におけるinteractionについて

頓 宮 三 良

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋 進 教授)

緒 言

感染には種々の型が知られておる。菌が宿主の一定部位に定着し、これだけでは宿主に大きい影響を示さず、菌がそこで産生する毒素によって発症する疾患がある。ジフテリア、破傷風はこれに属する。結核、チフス、ブルセラ症等は菌が宿主体内に侵入すると、生体側の第一次防禦をうけ、これを突破した菌は更に奥深く侵入して親和性臓器内の網内系の細胞に定着する。いわゆる細胞親和性細菌の感染症がこれである。この種に属する疾患では感染後に宿主側に強い免疫乃至はアレルギー状態を残すことが多い。

本教室においてはマウス対腸炎菌との組合せによる実験的チフス症において、感染に耐過した動物の獲得する強固な免疫について研究中で、これまでに多くの業績が発表されてきた¹⁻⁸⁾。

筆者はこれらの関係を細胞対菌との関係においてしらべ、in vitro において細胞の感受性(菌の病原性)、細胞の免疫状態、免疫血清の細胞内菌増殖の抑制に対する影響等を検討する目的でこの実験をはじめた。

実験材料および方法

1. 実験動物：群馬大学医学部中央実験動物舎で飼育されたddN系マウスの生後4週目(体重 $16 \pm 1g$)のものを下記の方法で免疫した。無処置対照(正常)マウスとして生後6乃至7週(体重 $20 \sim 23g$)のものを実験に供した。これらの動物は実験成績の変動を避けるために固形飼料、および水道水を与え、保温、飼育箱

の清掃等一定条件で行なった。

2. 使用菌株：喰菌および免疫の菌株は次のものを使用した。

強毒菌としてS. enteritidis 116-54株(以下強毒菌と略称する)を使用し、18時間普通寒天培養菌をかきとり脱脂乳に浮べて凍結乾燥し、真空アンプルに封入 $-4^{\circ}C$ 以下に保存、使用時アンプルを開き普通寒天上18時間培養し実験に供した。マウスに対するID₅₀は $10^{-8.5}$ である。

弱毒変異菌としてはS. enteritidis SER株(以下弱毒菌と略称する)を使用した。高層寒天に継代培養し、使用に際し普通寒天18時間培養後実験に供した。マウスに対するID₅₀は $10^{-2.4}$ である。

クローム明礬ワクチン：(以下死菌と略称する)は安東等^{9,10)}の方法に従い強毒菌116-54株を用い、普通寒天16時間培養の菌体を集め、0.5%ホルマリンを含む食塩水に100mg/mlの濃さに浮游させ、クローム明礬を0.1%に加え、 $37^{\circ}C$ に5日間放置後遠心沈澱して菌体を集め、生理食塩水で2回洗滌し、菌体を0.5%ホルマリン食塩水に100mg/mlの割合に浮游させた。MLDは腹腔内接種で200mgであった。

3. 免疫方法：死菌免疫としてクローム明礬ワクチン0.1mlを腹腔内に注射した。実験には接種後2乃至3週のものを使用した。

生菌免疫としては協同研究者¹¹⁾の方法に従ってSER株18時間普通寒天培養菌を集め、ブイヨン食塩水(1:4)に浮游させ $10^{-5}mg$ を腹腔内に接種した。更に3週後に強毒菌116-54株 $10^{-7}mg$ を腹腔内に免疫し、この後5乃至7週目のマウスを使用した。この動物の血清凝集価は100乃至200倍を示した。

4. 腹腔内単核白血球の採取：マウスの腹腔内滲出細胞の大部を占める単核細胞¹²⁾が組織球性のものであるか、あるいは網内系の細胞¹²⁾であるかは議論のある¹³⁾所であり、これをGiemsa染色で区別することは難し

い。単核喰細胞と淋巴球との鑑別は厳格に行なった。

単核喰細胞の誘発にはchemotactic agent としてグリコーゲンを用いたSuter¹⁴⁾の方法に準じ0.01mg/ml グリコーゲン加生理食塩水 1.0ml をマウス腹腔内に注射し、4乃至5日後に腹腔内滲出液を採取した。採取には20,000倍ヘパリン加Hanks液¹⁵⁾を30ml腹腔内に注射し軽く揉んだ後吸引してThoma-Zeiss計算板で細胞数を算定した。得た腹腔内遊走細胞浮游液を1500rpm 3分遠心沈澱して上清を棄て、更に Hanks 液で2回洗滌遠心沈澱を繰り返した。Hanks液で洗滌後、細胞数500/mm³になるような腹腔内単核細胞Hanks浮游液を作った。

マウスは無処置対照（正常）群、死菌免疫群、生菌免疫群に分ち、動物個体差を考慮してそれぞれ5匹以上から得た材料を合せて用いた。

5. マウス血清：マウスの心臓穿刺を行ない採血し、無菌的に血清を得た。マウスはこの場合も無処置対照群、死菌免疫群、生菌免疫群の3群に分ちそれぞれ5匹以上から得た血清を合せて用いた。

6. 喰菌法：腹腔内単核細胞Hanks 浮游液 5.0mlに菌液0.1ml (0.1mg/ml) および無処置対照マウス血清 0.1ml の混合液を作り、それぞれの組織培養装置に分注して予め用意せられたカバーガラス上に単核細胞と菌とを附着させ、37°C60分間菌と細胞とを接触せしめ喰菌させた。

必ず非感染対照として菌液の代りに同量のHanks液を加えたものを同時にいた。

7. 組織培養法：ガラス器具はすべて良質の硬質ガラスのものを、用い、クローム硫酸浴後充分水洗して、蒸留水に1昼夜以上浸して乾燥使用した。実験前高圧滅菌した。

組織培養法にはいろいろの方法^{14, 16-21)}があるが下記の3方法を行なった。

a. 廻転培養法：Suter¹⁴⁾の方法に従い、培養液 0.6mlを培養管（外径 1.5cm, 長さ15cmの円形廻転管）に分注し、前述6の方法で喰菌させた細胞の附着したカバーガラス(0.9×1.8cm)を1枚ずつとりあげ、formvar液 (0.04% 2 塩化エチレン溶液) で

作った薄膜で全体を被覆し、このものを細胞附着面が培養管壁に面するように向け3枚おいて培養した。培養管はゴム帽で密栓し、10度傾斜で1時間20廻転、37°Cのrotating wheelにおさめた。

b. Porter flask法²¹⁾（静置法）：直径3.5cmのPorter flask 中に予めカバーガラス3枚を重ねないように入れておき混合液1.0ml を注ぎ、前記6の方法で喰菌させ、カバーガラス上に細胞を附着させた。この後に混合液を棄てて新に培養液1.0ml を加え、管口をゴム帽で密栓した。

c. ガラスリング法（梁氏法）²²⁾：内径 0.7cm 高さ 0.6cm のガラスリングの下面をパラフィンでカバーガラスに密着させてculture chamberとし、この中に混合液0.3ml を入れ前記6の方法で喰菌せしめ同時に細胞をカバーガラスに定着させた。

次いで混合液を同量の培養液と交換した。材料は1個ずつ小シャーレ（内径3.0cm）におさめた。

Porter flask法、ガラスリング法は共に水平に保ち37°Cで静置培養した。

何れも培養液の交換は1, 3, 5日目に行なった。

8. 組織培養液：Hanks液にPenicillin 50u/ml, Streptomycin 507/mlを入れ、それぞれのマウス血清を30%になるように加えた。pHは7.2~7.4に調整した。

図1 腹腔内単核喰細胞採取並びに組織培養の順序

培養液中の抗生物質の量は、細胞外菌の生存をおさえ、細胞内菌の増殖を妨げない最少濃度とした。

9. 観察方法：前記6の方法で細胞を附着させたカバーグラス（培養前と略称する）、および培養後1, 3, 5, 7日目のカバーグラスを培養装置よりとり出し、乾燥、メタノール固定（3分）、Giemsa染色（30分）、水洗、乾燥の順に行ない染色標本を作製し、鏡検した。

廻転培養法の場合のカバーグラスは乾燥、メタノール固定後、表面を被覆しているformvar薄膜を二塩化エチレン溶液に1時間浸して除去したものを水洗、乾燥、Giemsa染色を施した。

以上の操作は図1に示した。

実 験 結 果

1 非感染の場合

マウス腹腔内浮游細胞の種類および変動：無処置対照マウスをとりあげchemotactic agentとしてグリコーゲン加生理食塩水 1.0mlを腹腔内に注射した。注射直後、および翌日より10日間毎日5匹ずつ殺し、ヘパリンを含むHanks液 3.0mlで腹腔内浮游細胞を洗い出した。細胞浮游液は直ちに白血球計算用メランジュールを用いて細胞数を算定した後、1500rpm 3分遠心沈澱し、沈澱を塗抹、乾燥、メタノール固定、Giemsa染色を施し細胞の種類を分別した。

表1および図2に示す如く、最初は淋巴球が

主体をなすが日を逐って単核嚥細胞の百分率が增加する。5日目になると80%に達するようになる。6日目には単核細胞内に空胞が認められ、その頃より細胞の崩壊が次第に増加する。

従って単核細胞採取はchemotactic agent注射後4乃至5日目を以って最も適当な日とした。

各種組織培養法における腹腔内単核嚥細胞の生残率の比較

chemotactic agent注射後4乃至5日目に採取した腹腔内単核嚥細胞を廻転培養法、Porter flask法、ガラスリング法の各組織培養装置にかけ、培養による細胞の変化を日を逐って観察した。細胞の附着したカバーグラスは培養1, 3, 5, 7日目にとり出し乾燥、固定、Giemsa染色を施した。

観察は顕微鏡 140倍で5視野中の細胞数を数え、平均1視野中の細胞数をもって培養成績の良否の判定規準とし、培養直後の細胞数に対する百分率をもって比較した。

表2に示す如く腹腔内単核嚥細胞は24時間後に15乃至50%に減少する。廻転培養法、およびPorter flask法はガラスリング法に比して減少の度合いが大きい。

従って以後の実験はガラスリング法を用いた。

表1 マウス腹腔内浮游細胞の百分率：chemotactic agent注射後の時間的変動
(chemotactic agentとしてグリコーゲン加生理食塩水を使用した)

腹水採取 の日 細胞の 種類	0	1	2	3	4	5	6	7	10
単核嚥細胞	10	34	50	53	76	82	95	90	94
淋巴球	80	65	48	46	24	18	5	10	6
好中球	10	1	2	1	0	0	0	0	0
好酸球	0	0	0	0	0	0	0	0	0
							細胞に空胞 が出現 細胞崩壊が 30%認めら れる	空胞出現更 に顕著とな り崩壊細胞 が60~70% となる	崩壊細胞70 %前後とな る

図2 chemotactic agent (グリコーゲン 加生理食塩水) 注射後腹腔内浸出液中の各種細胞の百分率の推移

表2 腹腔内単核喰細胞の各種培養法による生残率の比較
培養直後の細胞数に対する百分率をもって示した

方法	残 存 細 胞 数 (%)			
	培養日数 1	3	5	7
ガラスリング法	85	78	41	38
廻 転 法	53	32	15	10
Porter flask法	50	28	20	20

3 種類の腹腔内単核喰細胞の状態

a. 無処置動物由来の単核細胞

培養前では視野の中90乃至95%が単核細胞である。核は円形で細胞質の比較的豊かなものと僅少のものとあり、後者の細胞はリン巴球との区別が難しい(附図1)

培養第1日は単核細胞の原形質は一般に大きくなり一部は楕円形、紡錘状となる。好中球は全く認められなくなる。

培養第3日は殆どの単核細胞が形態を変え、星状あるいは紡錘状で細胞質は豊かになり、周辺に小さな空胞出現し、核を2個以上有する巨大細胞もみられる(附図2)。

培養第5日は細胞質が広がったものが多いを占め、数個の細胞が集合しているものが多いなり、個々のものは紡錘状又は星状を示している(附図3)。

培養第7日以後になると細胞の原形質は縮少

し、一部は10日前後において空胞形成著明となり、一部崩壊し染色性を減ずるものもあるが、一部は整った形で認められた(附図4)。

b. 死菌免疫動物由来の細胞

chemotactic agent注射前は正常マウスの細胞に比し僅かにリン巴球、好中球が多いが、注射後5日では単核細胞は90%前後を示す。この細胞の培養における変化は正常動物由来の細胞と殆ど変わらない。ただ培養第1日における標本でリン巴球がやや多く混在している点が異なっている。

c. 生菌免疫動物由来の細胞

培養前は無処置動物由来の細胞と変わらないが、培養第3日には巨大細胞がかなりの数認められ、次第に培養開始時の状態は認められなくなる(附図5)。

II 感染の場合

実験方法で述べたように、喰菌後の菌の細胞内消化の過程を追求でき、また菌が新しく細胞へ喰菌されることを少なくするために、1乃至2個の菌を摂取している細胞が、喰菌しておる細胞の60%以上を占めるように工夫した(附図6)。この際菌数は細胞1個に対し10個の割合になるように喰菌系を作った。喰菌率は30%前後であった。

a. 正常動物由来の単核細胞と強毒菌との関係

無処置対照マウスの腹腔内単核喰細胞をとり出し、強毒菌と接触せしめ、30%正常マウス血清加Hanks液で組織培養にかけ、細胞内菌の増殖の状態を日を逐って観察した。

顕微鏡 140倍で5視野中にみられる単核細胞全数(a)、この中、菌を摂取しておる細胞数(b)、喰菌しておる細胞全体の中に摂取せられておる菌の総数(c)を観察した。

表3、図3に示す如く、喰菌しておる細胞1個当りの平均菌数は培養と共に増加し(附図7)培養5日目には細胞の崩壊著明となった。

b. 正常動物由来の単核細胞と弱毒菌との関係

前と全く同じ条件でマウス腹腔内単核細胞と弱毒菌とを接触せしめた後、組織培養にかけ

表3 a 顕微鏡視野 (150×) 視野中の細胞総数
 b (a)中菌を摂取している細胞総数
 c (b)中の細胞内菌の総数
 c/b 喰菌している細胞1個当たり摂取している細胞数の平均値

培養日数 喰菌系			0				1				3				5				7			
			a	b	c	c/b	a	b	c	c/b	a	b	c	c/b	a	b	c	c/b	a	b	c	c/b
正常細胞	正常血清マウ	強毒菌	375	146	190	1.3	240	82	336	4.1	55	84	462	5.5	160	43	288	6.7	細胞崩壊			
正常細胞	正常血清マウ	弱毒菌	440	119	78	1.5	240	70	301	4.3	155	48	149	3.1	155	39	172	4.4	80	17	50	3

図3 無処置マウスの腹腔内単核喰細胞に摂取された強毒菌、弱毒菌の細胞内増殖の態度

た。

表3, 図3に示す如く, 喰菌している細胞1個当たりの平均摂取菌数は培養1日でやや増加するが以後細胞内で著明に増加することなく経過した(附図8)。しかも細胞は強毒菌の場合に比較して崩壊するものは殆どみられなかった。

強毒菌の場合と弱毒菌の場合との喰菌条件はほぼ同一で喰菌率には大差はみられなかった。しかし強毒菌は単核細胞内での増殖力の点で弱毒菌にまさり, 病原性は細胞内増殖能を示標としても表現されることを知った。

c. 喰菌せられた菌の増殖に及ぼす各種免疫血清の影響

無処置対照マウスの腹腔内単核喰細胞を採取し invitro において正常血清, 死菌ワクチン免疫血清, 生菌免疫血清の各々を加え, 前記条件で強毒菌を喰菌せしめた後, 細胞の定着したカ

バーグラスをとり出し正常血清, 死菌ワクチン免疫血清, 生菌免疫血清をそれぞれ30%に加えたHanks液でガラスリング法を用いて組織培養を行なった。

添加した死菌ワクチン免疫血清, 生菌免疫血清のOH凝集価はそれぞれ800倍, 100倍であった。

単核細胞を100個数え, 喰菌している細胞をとらえ細胞内の菌数を1~2個, 3~5個, 6~10個, 10個以上の4群に分けて細胞内菌の増殖の判定基準とし, 摂取した菌数よりの分布を図4に示した。

組織培養前の喰菌率は3種の血清の間において大差をみないが, 生菌免疫血清, 死菌ワクチン免疫血清添加の群では正常血清添加のものに比し, 多くの菌を摂取している細胞が多くを占めることが観察された。培養につれて, 生菌免疫血清, 正常血清添加群では細胞内にとりこまれた菌は次第に増加し, 細胞内の菌が多い細胞分布に傾く。これに比して死菌免疫血清添加のものではやや細胞内菌の増殖を阻止していることが認められた。

しかしながら感染死防禦効果の最も強い生菌免疫動物の血清が, 菌の細胞内増殖を阻止する力において無処置動物血清と大差がみられないことは注目に値する。

総 括

ゲルトネル菌対マウスの実験的チフス症にお

図4 正常動物由来の腹腔内単核喰細胞に喰菌された強毒菌の細胞内増殖に及ぼす各種免疫血清の影響

いては、感染方法の如何を問わず菌は最終的には淋巴腺、肝、脾などの網内系細胞内に捕捉され細胞内で増殖し²³⁻²⁶⁾、そこでTyphomを形成する²⁷⁻²⁹⁾このように菌が細胞に到達し細胞内増殖を営むものとすれば、宿主が当該菌に対して感受性があるかどうかは宿主細胞内で菌が増殖できるや否やにかかって来る。もし細胞それ自体の中にある感受性因子が感染によって決定的な因子とすれば、感染後に獲得される免疫乃至は弱毒生菌免疫の本体もこの因子の変化にあるものと考えられる。従って、いわゆる細胞親和性細菌と細胞との interaction を考察することは感染、免疫の機構解明に意義がある。感染と免疫を研究する際にはHostとParasiteとの複雑な相互関係をできる限り簡単にして実験を進めなければならないが、ある菌に対する宿主の感受性と宿主の喰細胞中での菌の運命を追求する方法で感染、および免疫機序を明らかにしようとする実験はこれまでにいろいろと試みられておる^{22,30-37)}。しかしながら病原性腸内細菌対喰細胞との関係での研究は牛場³⁴⁾、斎藤^{32,33)}以外には殆ど知られていない。

感染菌対細胞との関係において研究する場合、細胞内の菌増殖の様相を適確に把握するためには、培養開始時の細胞が培養期間中恒常的に維持せられ、喰菌された菌が細胞内で増殖又は分裂力を失って消失してゆくかを観察できることが必要である。このため先ず第一に可及的長期に亘って細胞を生存せしめることが必要と思われ組織培養を利用した。

斎藤³³⁾はSuterの方法を行ない、マウスの単核喰細胞に強毒腸炎菌を接触させた場合、細胞内菌増殖のため培養3日目ですべての細胞は破壊されたと述べている。

筆者はSuterの方法に種々の改良を重ね、現段階においてはガラスリングを用いた方法は上記条件をほぼ満足させてくれるものと思われる成績を得た。

実験結果を要約すると、マウス腹腔単核喰細胞内における腸炎菌強毒株と弱毒株とでは増殖の様相が異なり、前者は細胞内で次第に増殖し、ついには細胞は崩壊する。弱毒菌感染細胞では培養直後多少の菌増殖はみられるが直ちに菌は増殖を停止し、細胞1個当りの摂取菌数は

一定値を保ったまま菌と細胞との平衡関係がつづく。即ち感染における病原性、非病原性が *invitro* における菌対細胞との関係においても観察せられる。

実験的チフス症においては既に小林およびその一門。^{24, 25, 38, 39)} 本教室共同研究者¹⁻⁸⁾等によって多くの業績が発表せられ、生菌免疫動物は著しく強く感染死防禦能を獲得することが明らかにされた¹⁾。しかして生菌免疫・死菌免疫との間に質的の差異のあることが予想せられておる。

本報においては正常マウス由来の腹腔内単核嚥細胞に死菌ワクチン免疫血清、生菌免疫血清、正常マウス血清の細胞内菌増殖に及ぼす影響を検討したが、3種の血清添加群間においては嚥菌率に大きい差はみられなかったが、生菌免疫血清、ワクチン免疫血清を添加した場合は、無処置のマウス血清を添加した場合に比し、細胞内に菌を摂取する能力がやや高まって、細胞内に数個の菌を摂取しておる細胞群の多いことが特長的である。これを組織培養にかけて観察すると、死菌免疫血清はやや細胞内の菌の増殖を阻止する傾向がある。これに反し感染死防禦効果の著しく強い生菌免疫動物由来の血清には、なんら細胞内菌増殖抑制効果なく正常マウス血清と大差のない成績を得たことは興味深い。

結 論

腸炎菌116-54株より作製したクローム明礬ワクチンで免疫した死菌免疫群、弱毒変異菌、116-54株で免疫した生菌免疫群、および無処置対照群のマウスの腹腔内単核嚥細胞の組織培養を行なった。また無処置対照群の腹腔内単核嚥細胞にゲルトネル菌を嚥菌させ嚥菌時、ならびに組織培養を行なって長期間の細胞内感染像を観察し、次の如き結果を得た。

1 無処置対照マウスの腹腔内単核嚥菌細胞の組織培養を行ない、1週間にわたって生存せしめ得ることに成功した。

2 腸炎菌強毒株、および弱毒株を感染させ細胞内菌増殖を観察した。

強毒菌は次第に細胞内で増殖し、ついには細胞を崩壊せしめる。弱毒菌は細胞内での増殖はある程度抑制され、菌と細胞との平衡関係を保持細胞内に残生する。

3 無処置対照マウス血清、死菌ワクチン免疫血清、生菌免疫血清の細胞内菌増殖の抑制効果を比較したが、3種の血清の嚥菌率に及ぼす影響には大差はみられなかった。但し死菌ワクチン免疫血清、生菌免疫血清添加群では1個当りの細胞にとりこまれる菌数がやや多い傾向にある。細胞内増殖は死菌ワクチン免疫血清添加群である程度抑制されるが、生菌免疫が強い感染死防禦能を示すに拘らず、その血清は無処置対照マウス血清と同様、なんら菌の細胞内増殖抑制を示さなかった。

本論文の要旨は昭和33年4月6日第31回日本細菌学会総会において発表した。

終りにのぞみ御指導御校閲をいただいた三橋進教授に衷心より謝意を表し、群馬大学医学部微生物学教室各位、第1病理学教室小此木助教授、深井学士に厚く感謝の意を表する。又援助頂いた国立療養所大日向荘西野荘長はじめ医局員各位に感謝する。

文 献

- 1) 三橋進, 川上正也, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 323, 1958.
- 2) 三橋進, 原田賢次, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 366, 1958.
- 3) 三橋進, 川上正也, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 535, 1958.
- 4) 三橋進, 五島彦智子, 川上正也, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 704, 1958.
- 5) 三橋進, 川上正也, 山口雄三, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 794, 1958.
- 6) 川橋進, 川上正也, 山口雄三, 永井正彦, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 1037, 1958.
- 7) 三橋進, 川上正也, 山口雄三, 永井正彦, 他: 日本細菌学雑誌, 13: 1081, 1958.
- 8) 永井正彦, 川上正也, 山口雄三, 他: 日本細菌学雑誌, 14: 1, 1959.
- 9) 安東洪次, 田所一郎, 下条寛人: 医学通信, 7: 3, 1946.
- 10) 竹井静真: 日本細菌学雑誌, 9: 237, 1954.

- 11) 赤崎兼義：血液学討議会報告，7輯：121，1954.
- 12) 天野重安：血液学の基礎，1：丸善，1948.
- 13) 村田純一郎：日本血液学会雑誌，18：38，1955.
- 14) Suter, E., : J. Exp. Med., 95 : 137, 1952.
- 15) Hanks, J.H. & Wallace, R.E., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71 : 196, 1949.
- 16) 勝田甫：組織培養法，1，納谷書店，1955.
- 17) 木村廉：組織培養，1，共立出版，1955.
- 18) Parker, R.G., : Method of tissue culture., Paul B. Hoeber, Inc., New York, 1950.
- 19) 甲野礼作：臨床病理，2：356，1954.
- 20) Murray, M. & Kopech, G., : A bibliography of the reserch in tissue culture., 1Ⅱ：1741, 1953.
- 21) Porter, K.R., Claud, A., Fullam, E.F., : J. Exp. Med., 81 : 233, 1945.
- 22) 水之江久英，梁慶雲，居合亮：日本細菌学雑誌，13：655，1958.
- 23) Goodpasture, E.W., : Am. J. Path., 13 : 175, 1937.
- 24) 小林六造：日本医学及健康保険，3240：1745，1941.
- 25) 小林六造：日本医学及健康保険，3260：2853，1941.
- 26) 安東洪次：血清学免疫学雑誌，5：1，1941.
- 27) 安東洪次：血清学雑誌，5：1，1944.
- 28) 藤巻茂夫，長谷川健次郎：日本病理学雑誌，37：133，1948.
- 29) 深井孝次：北関東医学，8：54，1958.
- 30) Fount, Jacob, Schneider, Patricia. & Elberg, S., : J. Exp. Med., 104 : 455, 1956.
- 31) Fount, Jacob, Schneider, Patricia. & Elberg, S., : J. Exp. Med., 105 : 25, 1957.
- 32) 斎藤和久，大野シヅ子：日本細菌学雑誌，12：534，1957.
- 33) 斎藤和久，大野シヅ子：日本細菌学雑誌，12：937，1957.
- 34) 牛場大蔵，斎藤和久，秋山武久：日本細菌学雑誌，13：633，1958.
- 35) Schaffer, J.J., Kucera, L.J. & Spink, W.W., : J. Exp. Med., 97 : 772, 1953.
- 36) Mackerness, G.B., : J. Path. Bact., 64 : 429, 1952.
- 37) Mackerness, G.B., : AM. Rev. Tuberc., 69 : 479, 1954.
- 38) 小林六造：日本医事新報，544：171，1933.
- 39) 小林六造：日本医事新報，544：240，1933.

(特別掲載)

ON THE *IN VITRO* INTERACTION BETWEEN *S. ENTERITIDIS* AND MOUSE MONOCYTE.

Saburo Tongu

(Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University)

Director : Prof. S. Mitsuhashi

The present investigation is an attempt to elucidate the relation between *S. enteritidis* and the abdominal monocytes of mice in tissue culture. Monocytes were obtained from the peritoneal cavity of mice which had been given an injection of 1 ml of glycogen solution four to five days prior to the collection. The monocytes were obtained by washing with Hanks solution. The cells were placed in a Porter flask or culture-chamber and incubated at 37° C for 1 hour. The results were as follow :

- 1) The monocytes of normal mice were maintained as long as one week in tissue culture.
- 2) The monocytes were infected with virulent or attenuated strains of *S. enteritidis* and placed in tissue culture tube. The virulent strain of *S. enteritidis* ingested in monocytes proliferated in the cells. The cells were disrupted. But the monocytes inhibited the proliferation of attenuated strain of *S. enteritidis* ingested into the cells. There was a parallel correlation between monocyte and bacteria ingested into the cells. The bacteria in the cells did not proliferate, persisted in the cells for a long time and were able to form colonies on agar.
- 3) Serum obtained from the mice immunized with killed vaccine slightly inhibited the intracellular multiplication of bacteria, but no effect was observed from the serum of mice immunized with living vaccine.

図1 培養前 (正常)

図2 培養3日目 (正常細胞)

図3 培養5日目 (正常細胞)

図4 培養7日目 (正常細胞)

图5 生菌免疫細胞3日目巨大大細胞

图6 培養前喰菌狀態

图7 正常細胞内強毒菌増殖像
(培養3日目)

图8 正常細胞内弱毒菌増殖像
(培養3日目)