

S. enteritidis 超遠心分画物質の免疫学的研究

第 1 編

感染防禦実験のための予備的検討

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)
岡山県衛生研究所 (所長: 北村 直次)

吉 岡 達 治

〔昭和 35 年 6 月 17 日受稿〕

緒 言

著者ら¹⁾⁻⁶⁾はさきに磨砕菌の超遠心分画によつて得られる顆粒分画が感染防禦の免疫元として優れた特徴を持っていることを発表した。特にチフス菌についての実験の裏付けとして Sensitivity な宿主と菌の interaction を実験チフス症で確認する必要を感じ S. enteritidis 対マウスの関係を撰んで感染防禦実験を試みた。

その予備試験として顆粒分画及び可溶性上清分画の窒素量、毒性、酵素活性、菌株と使用マウスの関係などを調べる必要がある。又この抗元の血清抗体産生能を調べることも有意であると考え、血中抗体の持つ感染防禦への意義については否定的な意見が多いが最近では吉岡⁷⁾、岩端⁸⁾、竹井⁹⁾¹⁰⁾、三橋¹¹⁾らの研究がある。著者はこの分画や上清部が持つ抗体産生能のみを死菌抗原と比べて見るにとどめた。また感染防禦実験のための予備試験として用いた使用マウス対各菌株の関係は重要で、教室に永く保存した菌株が対マウス攻撃力の甚だしい低下を招くであろうことは論を俟たない。更に著者は研究の主力となる酵素活性である顆粒分画抗原について紫外線照射による影響、薬剤添加によるその失活、加熱による変化などを調べ、これが免疫能獲得と関係あるか否か調べた。この酵素活性を有する抗原については既に Youmans¹²⁾らの実験が結核菌について行なわれている。著者¹⁾⁻⁶⁾らも Mycobact. tuberculosis, S. typhi, sh. Flexneri, Histoplasma などについてその性状を追及しているが、このケースでも同様な試みをなした。

特に今迄行なわれた免疫についての過敏状態の発現は注目すべきことと考える。著者は菌を磨砕遠心した場合の上清部分画がその発現の主力をなしているのではないかとこの想定のもとに毒性試験や窒素量

計測を行なった。

実験材料及び方法

動物 雑系マウス及 CF-1 マウスを使用した。これは感染防禦実験に用いたものと同じ系統のものであつて 13~15 g 体重である。兎は体重 1.5 kg~2.0 kg の白色のものを用了。

酵素活性測定 Warburg 検圧計を用い常法によつて酸素消費量をしらべた。観察は 37°C において 1 時間まで実施した。

菌量の測定 ライツ光電比色計で比濁法によつて菌の濃度を計測した。

窒素量測定 Kjeldahl の測定法に準じた。

紫外線照射 東芝 GL-15 照射ランプにより至近距離で強く振盪し乍ら照射した。

菌株 北里研究所より分与されたもので感染防禦実験と同じものである。即ち強毒株として村島株を弱毒株として高田株を撰んだ。その他 S. enteritidis 1891, Keio 11, 古平株を菌対マウスの関係の検討に用いた。

抗原 18 時間普通寒天培地に培養の湿菌に 2 倍重量の石英砂を加え 30~40 分間 0°C~4°C において磨砕し、菌の 2 倍重量の 1/50M 磷酸緩衝液を加え、よくこれを混ぜ 0°C において 5000 r. p. m. 20 分間遠心沈澱し菌体や砂を捨て上清を更に 12000 r. p. m. 30 分同じく 0°C において遠心、その上清を更に 0°C において 15000 r. p. m. 20 分遠心沈澱して得た無細胞液を 40000 r. p. m. 40 分超遠心沈澱器に懸け上清部分と沈澱物に分けた。上清部を Sf, 沈澱物を Rf とする。Rf は Sf 成分を含まないよう 1/50M 磷酸緩衝液で更に一度洗浄した。この Rf はもとの菌の重さのグラム数と同じ cc の緩衝液に浮遊し 1 倍とし Sf はその儘 2 倍として用いた。40000 r. p. m. で遠心する原液は時に 1 cc 中 10~30 個の生菌を含

Rf は4倍で5匹中2匹死亡したが5倍より薄い濃度ならば先づ死亡することはない。この試験においては死亡するものは大抵接種翌日に死んでいる。死亡するものは妊娠していれば必ず流産を伴うが神経筋肉毒素として働くのであろうと考えられる。

更にこの Rf 及び Sf の10倍を予め接種しておい

て10日後10倍液及び20倍液を同じ腹腔に接種すると、表4のように Rf 20倍の後接種では1匹も死亡しない。Sf ならば10倍再接種で全部死亡した。この実験から過敏症抗原として Sf は Rf と比べて相当強力なものであることを想像せしめると思う。

表 3 Rf, Sf の1回腹腔接種による致死試験

	2×0.5cc	3×0.5cc	4×0.5cc	5×0.5cc	6×0.5cc	7×0.5cc
Rf	●●●●○	●●●●○	●●○○○	●○○○○	○○○○○	
Sf		●●●●●	●●●●●	●●●●○	●●●●○	●●●○○

表 4 Rf, Sf の再腹腔接種 0.5cc 宛

	10倍予備接種 10倍再接種	10倍予備接種 20倍再接種
Rf	●○○○○	○○○○○
Sf	●●●●●	●●●●○

皮内反応を白兔の背を使って行なった結果は表5のようである。Rf 及び Sf を10倍に稀め、その0.1cc を皮内に接種した。そして24時間、48時間、72時間、96時間と観察したが Rf は48時間で既に発赤は消退し硬結感もなくなつたが Sf は発赤後も大きくしかも96時間でも未だ消失せず、その硬結も又96時間でも残っている。これは明らかに Sf が有する毒性の高いことを示している。

表 5 Rf, Sf の皮内接種 10×0.1cc

	24時間		48時間		72時間		96時間	
	発赤 硬結		発赤 硬結		発赤 硬結		発赤 硬結	
Rf	cm	+	cm	—	—	—	—	—
Sf	3.5	+	3	+	3	+	2	+

3) 窒素量測定

毒性と蛋白量とは平行するわけではないが相当な開きが Rf と Sf との間であれば有意なものと云えよう。特に蛋白量の多いことはアレルギーとして問題があろう。若し同じ抗体価が得られるならば蛋白量の多い抗原は抗体産生についても好ましからぬ抗原と云い得るであろう。又表6からわかるように甚だ濃度の高い Sf の蛋白量からして当然表3や表4の結果も納得ができると考える。要するに上清部分は糖や蛋白の含量が沈澱部分と比べれば圧倒的に多いことを示している。

表 6

	N 量	molish, R.	Biuret, R.
Rf	66mg/dl.	+	—
Sf	840mg/dl.	卅	卅

4) Rf, Sf の酵素活性

表7に示す如く T. C. A cycle に関与する有機酸を基質に攪んでそれら基質の酸化能力を調べた。Rf は湿菌 1g に対し 1cc 浮游、Sf は 1g に対し 3cc 浮游つまり 1倍、3倍となつていたので双方の価を比べても意義はない。Rf は Succinate が高い、そして lactate がこれに次ぐが他の基質に対しては活性がない。弱毒株は lactate に対する活性が著しく弱い結果を得た。Sf は endogenous respiration が高いが Succinate, citrate, fumarate, なども酸

表 7 Rf, Sf の各種基質に対する酵素学的活性

分 割	基 質	強 毒 株 (村島)	弱 毒 株 (高田)
Rf	non substrate	1	8
	succinate	114	153
	lactate	36	10
	citrate	3	?
	fumarate	0	7
	malate	3	8
Sf	non substrate	45	60
	succinate	114	104
	lactate	98	59
	pyruvate	62	?
	acetate	48	67
	citrate	101	66
	fumarate	101	?
	malate	74	?

化する。而し弱毒株は citrate, fumarate, に対するその能力が極めて弱い。

5) 紫外線照射, 加熱, 薬剤添加に対する Rf の酵素活性能の影響

著者は Rf 抗元を紫外線照射して用いたがその照射前後の活性能を調べる必要がある。表 8 に示す如く照射によつてその活性能は下落しなかつた。

加熱に対してはその活性能は 56°C 30分 で 3分の 1 以下に低下し 100°C では完全に失活した (表 9)。

薬剤添加に対しては添加直後に振盪してその活性を調べても 3分の 1 ~ 4分の 1 に低下した。

表 8 Rf の酵素活性に及ぼす紫外線照射の影響 (村島株)

	before	after
non substrate	4	5
succinate	125	120
lactate	45	48

表 9 Rf の酵素活性に及ぼす加熱の影響 (村島株)

	非加熱 対 称	56°C 30分	100°C 30分
non substrate	2	1	3
succinate	130	41	4
lactate	42	10	1

表 10 Rf の酵素活性に及ぼす薬剤添加の影響 (村島株)

	非処置 対 称	mersonin 0.01%	Formalin 0.5%
non substrate	3	0	1
succinate	124	40	33
lactate	39	15	9

6) 凝集抗体産生能

兔を用いてその凝集素産生を計測した。Rf 及び Sf, 更に Formalin 死菌を用いた。表 11 にその抗体上昇のカーブを記したが Rf 及び Sf 2 倍液 1.0 cc の皮下接種によつて 3 日から 5 日の間に飛躍的に抗体価が上昇した。併し乍ら死菌皮下注射 2 mg では 8 日目を過ぎてやつと抗体価が上昇し始めた。そして Rf 及び Sf 共に強い OH 凝集が見られた。

マウスに対する Rf 及び死菌の凝集素産生能力を見るに Rf はその 20 倍液 0.5 cc を腹腔接種し、

死菌 0.5 mg 接種でその凝集価上昇は表 12 の如くであつてマウスの場合も Rf が相当優れている。何となれば Rf の 20 倍は余裕ある稀釈度であるが死菌 0.5 mg は最大に近い接種量であると思われるから。

表 11 兔皮下接種による抗体 (凝集価) 上昇曲線 (村島株)

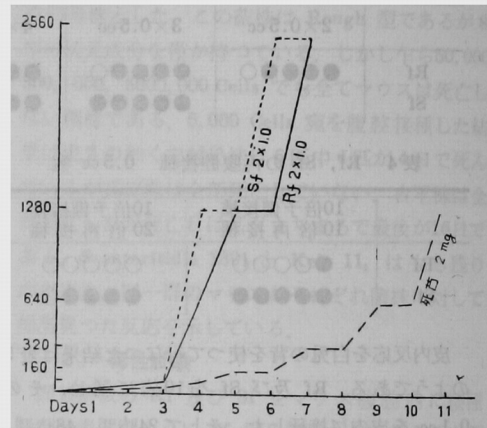
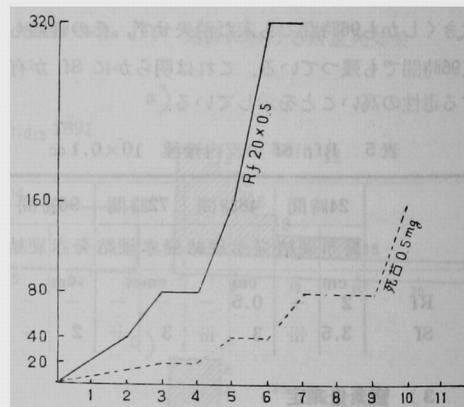


表 12 マウス腹腔接種による抗体 (凝集価) 上昇曲線 (村島株)



総括及び考案

菌株対使用マウスの相関関係は常に気を配っていなければならない重大な点であるので、先づ種々の菌株を使用し CF-1 マウスに対する攻撃性を探った所菌株により相当の差があり、ある菌株例えば高田株は感受性が著しく低く村島株は甚だ強い攻撃力を有していた。そしてその両極端の菌株を感染防禦の抗元及び攻撃用に用いた。この編の試験には主として村島株を撰んだ。

この菌株から分離された Rf 及び Sf についてその毒性試験を行なったが同じ稀釈とした時 Sf は Rf に比べて遙かに高い毒性を持っている。この毒性は腹腔接種による致死能力の点から見ると Rf ならば 5 倍稀釈 0.5 cc, より稀い場合は充分マウスに接種できるが, Sf は 10 倍, 20 倍でも未だ使用に耐え得る濃度でない。これは当然蛋白量や糖の量と関係があるように思う。細菌の内毒素成分の多くは Sf 側に存在すると考えて良くはないだろうか。更に予め抗原を接種して 2 回目接種すれば Sf は強く反応することを考えて見ると, この Sf 分画が過敏症抗原としても Rf に比し遙かに高い抗原性を持っていることを示していると思われる。又その毒性を兔皮内接種で観察したが発赤, 硬結, 腫脹は Sf は Rf と比べ圧倒的に強く, この面からも Sf の毒性の強さはわかる。毒性, 蛋白量, 糖反応の強さなどから推して若しその力価試験が Rf, Sf 共に同じ効果であった場合絶対に Rf 分画が Sf 分画に比して優秀であると言えよう。

次に供試基質に対する酵素活性は Rf 分画は lactate, succinate にあるが特に succinate に強い。之に比べ Sf は succinate に活性を有するが citrate, fumarate などにもその働きがある。ところが弱毒変異株となると succinate のみに強い活性が残るだけで他の活性は甚だしく低下している。これは動物組織の同じ超遠心による Rf 分画が succinate に高い活性を持つのと比べて興味があり, この間に何か関係があるのではなからうか。ところがこの Rf 分画を抗原として用いる場合の紫外線照射前後を比べてみると差が出て来ない, つまり照射によつてその活性は失われない。更に感染防禦実験において効力の著減を招来する加熱や薬剤処理によつてはその活性は 3 分の 1 乃至 4 分の 1 に低下した。これは当然考えられることであるが免疫元としての能力と比べて興味深い。

Rf 及び Sf 抗原は共に OH 凝集抗体を急速に上昇せしめる能力がある。特に Rf はこの凝集素産生

のための抗原として毒性, 蛋白量などより考えて好適と云うことができよう。これを死菌抗原に比べれば死菌抗原は甚だ凝集素産生は遅く弱いと云えよう。このことはマウスを使つた場合でも云えることであつて致死までの毒性に遙か遠い量で OH 抗体の高い単位が得られる。

以上要するに Sf 及び Rf 抗原を比べて Rf は抗原としての諸性状が遙かに優れている。

結 論

1) 使用マウスに対する各菌株の攻撃力を調べ強毒, 弱毒の両極端の菌株が選ばれた。

2) 毒性試験では兔皮内, マウス腹腔接種及びその再注射の何れに於いても Rf に比し Sf 抗原の毒性が強いことが確認された。

3) 蛋白量や糖量も Sf 方が Rf より遙かに高い。

4) 各基質に対する酸素消費は Rf は succinate, lactate に, Sf は succinate, citrate, fumarate に活性を持つが, 弱毒変異株は succinate にのみ強い活性が残る。

5) 紫外線照射に対しこの活性能は無影響だが 56°C 30 分加熱や薬剤処理で 3 分の 1 ~ 4 分の 1 に低下する。

6) 凝集素産生抗原として Rf は優れている。

7) 以上諸性状から Rf が良好な抗原と云えると思う。

欄筆に当り終始御指導を賜り御校閲をいただいた恩師村上栄教授に深謝します。

文

- 1) Murakami 他: Acta medicine Okayama, 13, 1, 1.
- 2) Murakami 他: Acta medicine Okayama, 13, 1, 15.
- 3) 村上栄他: 日本細菌学誌, 15, 2, 184.
- 4) 村上栄他: 日本細菌学誌, 15, 4, 419.

献

- 5) 村上栄他: 日本細菌学誌, 15, 7, 680.
- 6) 村上栄他: 日本細菌学誌, 15, 投稿中.
- 7) 吉岡守正: 日本細菌学誌, 8, 3, 255.
- 8) 岩端隆之助: 日本細菌学誌, 8, 8, 865.
- 9) 竹井静馬: 日本細菌学誌, 9, 11, 981.
- 10) 竹井静馬: 日本細菌学誌, 9, 12, 1055.

11) 三橋進: 日本細菌学誌, 13, 6, 535.

A. S.: J. Bact, 70, 5, 557.

12) Youmans, G. P., Millman, I. & Youmans,

Immunological Studies on Ultracentrifuged-Fraction from Sal. Enteritidis

Part I. The Preliminary Studies on Immunizing Effect Using Supernatant and Particulated Fractions

By

Tatsuji YOSHIOKA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae MURAKAMI)

Okayama Institute of Health (Director: chief. Naoji Kitamura)

In order to study biochemical and serological properties of supernatant (Sf) and particulated (Rf) fractions of *Sal. enteritidis*, the author prepared two fractions by ultracentrifugation of ground cell suspension of the growing cell of two organisms. The organisms used throughout this study were selected among several strains of *Sal. enteritidis* in the light of virulence to mouse and were MURASHIMA's strain, which showed the highest virulence and TAKATA's strain, showed the lowest virulence. The following results were obtained.

1) Nitrogen and carbohydrate contents were very low in Rf compared to Sf, especially it was markedly low in the case of nitrogen.

2) Rf showed oxidative ability only to succinate and lactate among the substrate related to TCA cycle, but Sf could oxidize many substrates tested in various degree. However, Rf Sf and of TAKATA's strain could oxidize only succinate in high degree.

3) The specific enzyme activity of Rf was not affected by irradiation of ultraviolet ray, but was decreased to $1/3 \sim 1/4$ by exposure to heat, 56°C 30 min., or by action of formalin or mersonin.

4) Antigenic capacities differed only little between Rf and Sf in the light of agglutinin production to rabbit serum.

5) Rf gave less intense cutaneous reaction and was less virulent than Sf in examinations using rabbit, for the cutaneous test, and mouse, for the virulence test.
