

39 サルモネラにおける死菌による局所感染抑制現象に関する研究

39 Studies on Local Infection-Inhibiting Effect by Dead Bacilli in Experimental Salmonellosis,

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 熊谷 満

第1章 緒 言

病原体の感染に対する宿主の抵抗性は種々な要因から成立つていて極めて複雑であるが、大別すれば次のようである。

1) 先天的抵抗性；これは動物の種属による各種病原体に対する抵抗性のことをいう。これが如何なる要因に基くものであるかは個々の動物種と病原体との組合せによつて異つており、今日まだ殆んど解明されていない。

2) 獲得免疫；或病原体に感受性を有する宿主動物であつても、感染を耐過したり或は人工的に免疫原たるワクチンなどを接種したりすると生ずるものであつて、その機構は勿論各種病原体によつて異り複雑ではあるが、一般的に言えば組織免疫と体液免疫に分けられている。この獲得免疫の場合には、多くはその血清中に種々な抗体が証明されることは周知の通りである。

3) 非免疫的抵抗；免疫学的に全く関係のない因子によつて感染が抑制乃至阻止されることであつて、これは多くの場合一時的現象である。また免疫学的に関係ある因子であつてもそれによつて免疫が生ずる以前に感染を抑制するような場合もあり得る。この非免疫的抵抗性のうち最もよく知られているのは、ウイルス感染における干渉現象である。即ち2種のウイルスを感染させるとき一方のウイルスが他方のウイルスの感染を阻止する現象である。これはまた同一種ウイルスの不活化ウイルスによつても起り得る。

以上のように感染に対する抵抗性は極めて複雑な機構によるものであるが、これを分析的に究明するには感染と抵抗性を認知する基準を充分に考慮する必要がある。殊に感染の状態が出来るだけ明確に認知し得るような条件が要求される。感染の様相は勿論病原体と宿主動物の種類或は病原体の接種方法などによつて異り、期待通りに明確な場合もあるし、しからざる場合もある。例えば或病原体に感受性の強い動物に接種し、動物が容易に且つ規則正しく斃死するとすれば、このような場合には感染を明確に認知することが出来るが、外観的に識別し得る発症もなく或は斃死が不規則であるような場合には感染の認知は困難である。サルモネラの動物実験は後者の場合であつて屢々感染判定の基準が問題となつて来る。従つて斯かる場合には感染防禦の有無を判定するのに種々な困難が伴うものである。然しこのような場合でも若し適当な方法で感染の有無、程度、

消長などを明確に認知する手段を講ずることが出来れば感染防禦機構の解明に資することになると考えられる。

これについては先に著者等¹⁾は単チフス菌を、安達²⁾はゲルトネル腸炎菌をそれぞれ家兎皮内に接種して共に著明な感染像を示すことを明かにし、更に安達は死菌前処置によつて感染が抑制されることを予想的に述べている。

このサルモネラの家兎皮内接種法は感染像、即ち病變の発生程度、消長を肉眼で逐日的に容易に観察することが出来るので感染防禦乃至は抑制を検するのに好適な手段であると考えられる。依つて著者はゲルトネル腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) の家兎皮内接種による局所感染に及ぼす死菌ワクチンの影響を詳細に検討せんとした。即ち次のような計画によつて実験を行つた。

(1) 局所感染が死菌を予め同一部位に接種しておくことにより如何なる影響を受けるか。またその場合の局所反応の程度及び消長と更に接種された生菌の消長はどうか。

(2) 死菌前処置の時間、菌量及び死菌の処理方法などの局所感染抑制に関与する因子について。

(3) 局所感染抑制現象の特異性。

(4) この抑制現象が抗体性のものかどうか等について実験を行つた。

以下実験方法及び成績について詳述する。

第2章 実験材料及び方法

1) 菌株 伝研より分与された腸炎菌 *Salmonella enteritidis* G₁₄ 株の 18~20 時間培養を使用した。対照として当教室保存菌株を使用した。

2) 動物 市販の体重 2.0kg 以上の白色正常家兎の背部を剪毛し皮フを使用した。使用に当り血中凝集素を調べたがいずれも 0- 凝集価 4 倍前後であつた。

周知のように感染過程を dynamic に観察検討するためには、感染の起つている部位を経過と共に精細に観察し得るような病原体と宿主との組合せを選ぶことが肝要である。著者はこの条件に適した組合せとして、腸炎菌の家兎皮内感染を選んだ。

家兎は小林等³⁾の云うように、腸炎菌に対して感受性が弱く、全身感染の研究対象としては適切でないが、これを家兎皮内に接種すれば日を逐つて病變の進展を詳細に観察することが出来るのみならず、感染局所的的確な別出が容易であり、更に安達²⁾も云う如く、相当多量の菌を皮内

に接種した場合でも、全身症状は侵されず血中からも菌は証明されないが、局所には著明な反応を表わし、しかも菌の増殖が認められるというような利点がある。

3) 死菌の作り方 全て普通寒天 37°C 18~20 時間培養菌で生理的食塩水浮游液を作り、種々な方法で処置して死菌を作った。最初の菌浮游液は、後に述べる理由から常に新鮮なものを用い、殺菌剤を含む菌液は洗滌遠心沈澱を反復し殺菌剤を除去して使用した。

4) 接種方法 生菌及び死菌共に全て家兎の背部皮内に 0.2ml 宛接種したが、この様な実験には、動物の個体差、接種場所、実験手技による誤差、その他の変動を除いて正確な結論を下すことが必要である^{8) 9)}。それで著者はラテン方格法⁹⁾によつて実験を計画し、接種に当つては同一行と同一列に同じ処理が並ばないように工夫し、処理の差の検定に当り場の不均一性に関する変動を取除き得る様にして実験を行った。

5) 結果の判定 局所反応の判定は、反応の極期と考えられる 6~7 日目における発赤の直径を測定し、これをラテン方格法の変量分析表⁹⁾によつて検定し、5%の危険率で結果を判定した。

第3章 実験成績

実験1 死菌前処置の局所感染に及ぼす影響

腸炎菌を家兎皮内に接種すると、一定の経過を辿つて局所性の感染がおこる。そこで予めホルマリン死菌及び 60°C 1 時間加熱死菌を夫々 0.1mg 宛皮内に接種しておき、3 日後にその同一部位に生菌を 0.001mg 及び 0.002mg 宛接種し、6 日目の局所反応を見た。結果は第1表に示す通りで

第1表

A	F	E	D	C	B	5	17	15	0	20	15
B	A	F	E	D	C	15	5	22	15	5	15
C	B	A	F	E	D	15	15	5	22	15	5
D	C	B	A	F	E	10	17	17	5	20	10
E	D	C	B	A	F	17	5	20	17	5	20
F	E	D	C	B	A	20	15	5	20	15	0

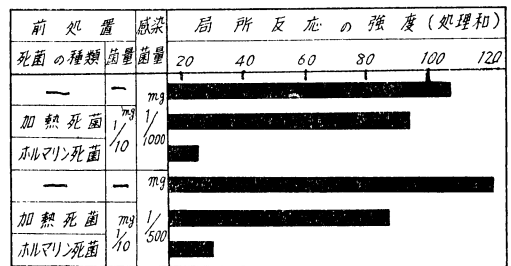
T_A=25 T_B=94 T_C=107 T_D=30
 $\bar{X}_A=4.17$ $\bar{X}_B=15.67$ $\bar{X}_C=17.83$ $\bar{X}_D=5.0$
 T_E=87 T_F=121
 $\bar{X}_E=14.50$ $\bar{X}_F=20.17$

要因	変動	自由度	不偏分散	分散比
列間(C)	39.88	6-1	7.976	7.976/4.895
行間(R)	13.55	6-1	2.71	2.71/4.895
処理間(T)	1356.22	6-1	271.245	271.245/4.895
誤差(E)	97.90	(6-1)(6-2)	4.895	
全体	1507.55	35		

ある。すなわち生菌 0.001mg 接種(C)による発赤の平均は 17.83mm (\bar{X}_C) であるが、ホルマリン死菌で前処置した部位(A)の発赤の直径は 4.17mm (\bar{X}_A)、加熱死菌で前処置した部位(B)では 15.67mm (\bar{X}_B) であつた。

また生菌 0.002mg 接種による発赤の平均は 20.17mm (\bar{X}_F) であるのに対しホルマリン死菌で前処置した(D)部位は 5.0mm (\bar{X}_D)、加熱死菌で前処置した部位(E)では 14.50mm (\bar{X}_E) であつた。処理間の均一性を検定すると $F_0 = V_T/V_E = 55.4$ となり、自由度 $n_1=5, n_2=20$ の時 F 分布表から求めた $F=2.71$ ($\alpha=0.05$) よりはるかに大きい。すなわち処理間に有意の差のあることが認められる。且処理和における有意の差は $IDI \geq (12 \cdot 2 \times 4.35)^{1/2} = 16$ であるから、対照 C に比し A、対照 F に比し D も E も有意である。以上の成績を処理和で図示すると第1図の如くである。

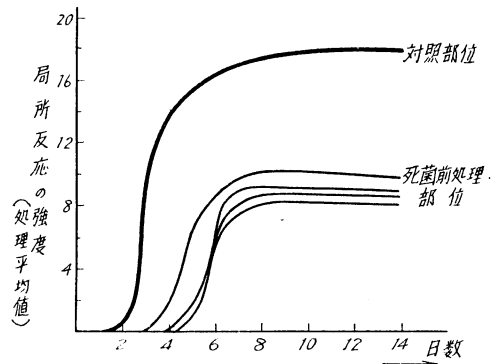
第1図 死菌前処置の局所感染に及ぼす影響



すなわち加熱死菌前処置で生菌 0.001mg を接種した部位は、対照との間に有意の差は認めなかつたが、この例を除けば何れも局所反応は対照部位に比べて弱かつた。すなわち、生菌のみを接種した対照では、家兎皮内では局所性の感染がおこり発赤、腫脹、硬結から壊死或は潰瘍形成等、感染による定型的な局所の反応がみられるのに反し、予め死菌を接種した部位では、局所の変化は軽度であり壊死や潰瘍を形成することはなかつた。換言すれば、死菌前処置によつて局所性感染が明らかに抑制乃至阻止されることが認められる。

またこの場合の局所反応出現の時間及び強度を逐的に観察し、処理平均値で表わすと第2図の如く、生菌のみを接種した対照の部位では2日目頃より軽い発赤が表われ、

第2図 局所反応の経過

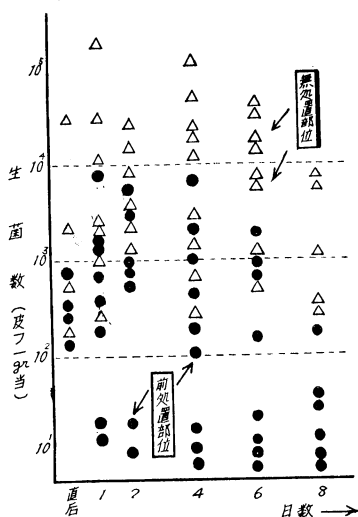


3～4日目には相当な強さとなり、腫脹、硬結を伴い、6～8日目に最高となり時には壊死、潰瘍を形成するものもあるのに対し、死菌前処置部位では、4日目頃に到り漸く発赤が現われはじめ、6～8日目に最高となるが局所反応の程度は弱かつた。すなわち、死菌前処置を施すと局所反応の出現も時間的経過において異つている。

実験2 局所の生菌数の消長

前述の通り、生菌接種前に同一部位に死菌を接種しておくこと局所感染が抑制されるが、これ等の局所組織における生菌の消長を追及した。すなわちホルマリン死菌(0.02mg)で前処置し、4時間後生菌(0.002mg)を接種した後逐日的に局所皮膚を剔出し、その乳剤を作つて型の如く平板注加法により生菌数を測定した。その成績は第3図に示す通りである。

第3図 局所の生菌数の消長



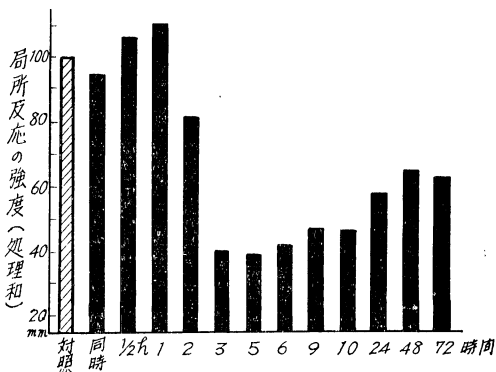
この種の実験では、同一部位における生菌の消長を逐日的に測定し得ないのみならず、個体差及び局所的な差異が当然あるから断定的なことは云えないが、実験を通して推察すると、無処置部位では接種後次第に菌数が増している傾向がみられるのに対し、死菌前処置部位では大体4日目頃迄は増殖せず変動もないようであるが、その後次第に菌数は減少し、1週間以内にすでに生菌を証明し得ない部位もある程である。

実験3 死菌前処置の時間と局所感染抑制との関係

実験1では死菌で前処置してから3日後に生菌を接種した場合明かに局所感染が抑制されることを証明したので、ここでは死菌前処置の時間を種々変えた場合如何なる時間に前処置を施したものが最も抑制効果が大であるかを検討した。すなわちホルマリン死菌(0.02mg)で前処置した後種々なる時間に生菌(0.002mg)を接種して局所反応を観察した。その成績は第4図の如くである。

この図はいくつかの実験を総括したものであるが全て対照に対して有意の差を有する。すなわち3日から3時間前

第4図 死菌前処置の時間と局所感染抑制との関係



に死菌を与えておくこと抑制効果のあることが認められる。しかも3～6時間以前に前処置したものが最も抑制効果が著しかつた。しかし、2時間以内の前処置では抑制は認められなかつた。

実験4 死菌前処置法と生菌接種法との関係

局所感染抑制における死菌前処置量と生菌接種量との関係を見ると、第2表の如く、少なくとも死菌の前処置量が

第2表 局所感染抑制における死菌前処置と生菌接種量との関係

生菌 接種量	死菌前処置量						対 照	
	1/10	1/50	1/250	1/500	1/2500	1/5000		
1/50	+	+	+	+	+	+	+	+=有効
1/500	---	---	---	+	+	+	+	+=稍有効
1/1000	---	---	---	---	+	+	+	+=無効
対照	---	---	---	---	---	---	---	

生菌接種量の倍以上であることが必要と思われる。但し生菌接種量が多くなると、この関係は認められなくなり抑制もおこらない。また死菌の量も0.2mg以上になるとそれ自身で局所に異物反応がおこる。従つて供試菌の毒力にもよるが、著者の場合では、0.02mgの死菌量と0.002mg～0.001mgの生菌量の組合せにおいて最良の成績が得られた。

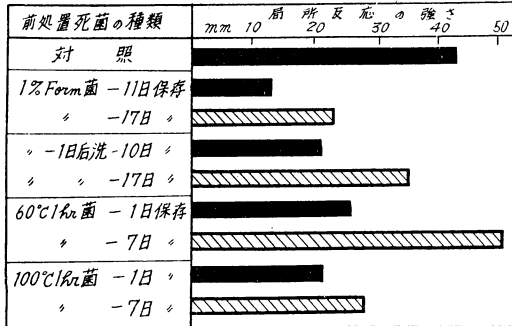
実験5 死菌の処理法と抑制効力

次に死菌の処理法と局所感染抑制効力との関係について検討した。すなわち、前述の如く作つた菌浮遊液に殺菌剤を加えたり、紫外線照射或は加熱処理を行つた。殺菌剤としては、0.5%の割合にホルマリン或は石炭酸を加えるか或はマージンを1万倍の割合に加えて死菌をつくつた。紫外線照射による死菌は紫外線殺菌灯(マツダ殺菌灯)を用いて暗室において10cmの距離で30分間照射することによつて作つた。加熱死菌は100°C及び60°C1時間加熱して作つた。何れも培養試験で生菌のないことを確めた後実験に用いた。特に殺菌剤を含む死菌は、洗滌遠心沈澱の反復により殺菌剤を除去して使用した。

実験の結果は、ホルマリン処理死菌が最も有効で、石炭酸及びマーズン処理死菌では幾分効力が弱い。また紫外線処理死菌も有効であるが、しばしば死菌それ自身で激しい局所反応を呈することがあつた。更に加熱処理死菌も相当有効に作用するようである。

以上は死菌の処理法と抑制効力との関係について述べたが、次に死菌の処理保存法と抑制効力との関係を先ずホルマリン及び加熱死菌についてみると第5図の如くである。

第5図 前処置死菌の処理法と局所感染抑制との関係



即ち、1%ホルマリン処理死菌を作りこれを2等分し、一方はそのまま、他方は翌日洗濯遠心沈澱を反復することによりホルマリンを除去し、最後に滅菌生理的食塩水で原量として夫々室温(10°C前後)に11日及び17日間保存した。これらは接種直前にいずれも洗濯遠心沈澱を反復行つて滅菌生理的食塩水に浮遊せしめて前処置死菌とした。加熱死菌の場合も、菌液を二等分し夫々60°Cと100°Cで1時間加熱し、1日及び7日間室温に保存し前処置死菌とした。

以上の各死菌で前処置した後3時間目に生菌を接種し局所感染抑制作用をみると第5図の如くである。即ちこの場合、1%ホルマリン処理後ホルマリンを除去して17日間保存した死菌及び60°C 1時間加熱死菌を7日間保存したものの場合は、夫々対照との間に有意の差を認め得なかつた。即ち処理法の如何を問わず保存することによつて抑制作用が減ずる。またホルマリン処理死菌についてみると、1%ホルマリンで処理しそのまま保存せるものと、処理翌日ホルマリンを除去し生理的食塩水浮遊液として保存したものでは、後者の方が抑制作用が減ずる傾向がみられ、且つ17日間保存すると対照との間に有意の差を認め難くなつてゐる。また加熱処理では、100°C 1時間加熱処理死菌の方が抑制作用は強く、保存しても作用はあまり低下しないが、60°C 1時間加熱処理死菌では保存すると作用が失われるようである。

このように死菌の処理、保存によつて局所感染抑制作用に差異の生ずる原因を追究するため、ホルマリン処理例について、ホルマリンの濃度、保存温度等を変えて検討した。即ち、処理するホルマリンを1%から0.005%の間の各濃度とし、また1%ホルマリン処理の後翌日洗濯遠心沈澱によつてホルマリンを除去し、これを2分し、一方には再び

1%の割合にホルマリンを加え、他方はホルマリンなしの菌液として夫々37°C及び低温(0~10°C)に3週間保存した。対照として無処置菌液を低温に同様に保存した。

それで先ず夫々の条件下に保存した菌液の反応原性を、生菌ならびにホルマリン死菌同時免疫家兎血清を用いて定量凝集反応を行つて検べたが、その結果は第3表の如くである。

この実験における処理前の菌液は同一のものを使用し、保存にあつては普通試験管に夫々の処理菌液を入れゴム栓をして封臘し、反応原性検査及び皮内接種にあつてはすべて同一条件でホルマリンを除去して使用した。

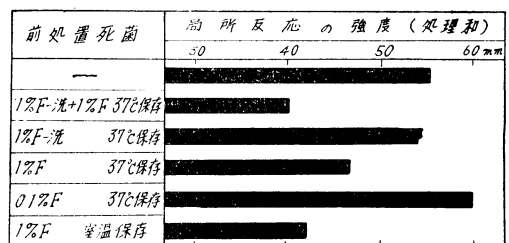
第3表 Formalin 処置の反応原性

抗原	1 (2000)	2	3	4	5	6	7
1%F-洗+1%F	+	+	+	+	+	+	+
1%F-洗	+	+	+	+	+	+	+
1%F-洗+1%F	+	+	+	+	+	+	+
1%F-洗	+	+	+	+	+	+	+
生菌	+	+	+	+	+	+	+
無処置保存	+	+	+	+	+	+	+
1%F	+	+	+	+	+	+	+
0.5%F	+	+	+	+	+	+	+
0.1%F	+	+	+	+	+	+	+
0.05%F	+	+	+	+	+	+	+
0.01%F	+	+	+	+	+	+	+
0.005%F	+	+	+	+	+	+	+
1%F	+	+	+	+	+	+	+
0.5%F	+	+	+	+	+	+	+
0.1%F	+	+	+	+	+	+	+
0.05%F	+	+	+	+	+	+	+
0.01%F	+	+	+	+	+	+	+
0.005%F	+	+	+	+	+	+	+

+ 肉眼で凝集塊の見えるもの
 + 凝集塊の凝集塊のみ見えるもの
 - 凝集塊のみ見えるもの

先ずホルマリン処理死菌の反応原性をみると、ホルマリンの濃度が薄くなるに従つて反応原性は減弱し、1%の割合にホルマリンが存在すると、生菌(37°C 18時間培養の生理的食塩水浮遊液)の反応原性と同じであつた。また保存菌液の反応原性は低温保存よりも37°C保存の方が著しく減弱した。更に低濃度のホルマリン処理菌液では、無処置菌液を低温に保存した場合と同程度に反応原性は減弱していた。なお1%のホルマリンで処理し、翌日ホルマリンを除去した後これを2分し、一方には再び1%にホルマリンを加え、他方は生理的食塩水の菌液として夫々37°C及び低温に保存すると、明かに生理的食塩水菌液の方に反応原性の減弱を認め、この場合も37°C保存の方が減弱の程度が著しかつた。

第6図 種々の Formalin 処置菌による局所感染抑制作用



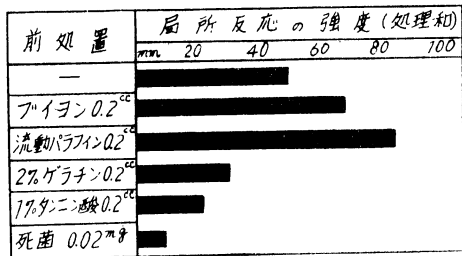
次に、これらの菌液の中から反応原性の減弱しているもの及び正常のものを夫々2~3選り、前処置死菌として使用した場合の局所感染抑制作用を検べてみると第6図の如くである。この場合の処理和間の有意の差は7であるから、反応原性の減弱している菌液には抑制作用のないことが窺われる。

実験6 抑制現象の特異性

以上の腸炎菌による局所感染の死菌による抑制現象は、腸炎菌とO-抗原が全部共通している *Sal. sendai*, *Sal. moscow* 及び *Sal. typhi* のみならず *Sal. typhi murium* 及び *Sal. paratyphi C* 等の死菌を以つてしても可能であるが、抗原的に全く関係のない *Staphylo. aureus* 寺島株, *Esch. coli* 及び *Proteus vulgaris* OX19 等の死菌では腸炎菌の感染を全然抑制し得なかつた。

また細菌以外の非特異的局所刺激物で4時間前に前処置し局所感染に及ぼす影響をみると第7図の如くで、フイヨ

第7図 非特異的局所刺激の局所感染に及ぼす影響



ン及び流動パラフィンではかへつて局所反応が増悪している。なおゼラチン及びタンニン酸が、局所反応を抑制するような傾向を示したが、死菌前処置による抑制と同一機序によるものかどうかは今の所明かでない。要するに腸炎菌並びに共通抗原を有する他の死菌による腸炎菌の局所感染を抑制する作用は、非特異的局所刺激によるものではなく特異的反応であると考えられる。

実験7 局所感染抑制と抗体の関係

以上述べて来た死菌による局所感染の抑制現象と該菌に対する抗体との関係を次の如き実験によつて検索した。抗体の証明には、定量凝集反応及び補体結合反応を行った。

その方法は、凝集反応は等量混合法により、凝集原には生菌、5%ホルマリン死菌及び60°C 1時間加熱死菌の3種類を用いた。これらの凝集原は、OH-免疫血清について検するに、生菌及びホルマリン死菌では血清の2,560倍稀釈迄陽性、加熱死菌の場合は640倍迄陽性を示す反応原性をもっているものである。

補体結合反応は、抗体稀釈法で行い、溶血系には綿羊溶血系を用いた。補体は最少溶血量の2単位を、感作血球は5単位の溶血素で感作した2%の綿羊血球を用い、補体の結合温度は低温長時間法によつた。抗原としては37°C 20時間普通寒天培養菌を10mg/mlの割合に食塩水に浮遊させ、100°C 20分間煮沸し遠心沈澱後の上清を原液とした加

熱抗原と凍結融解を反復し、その遠心沈澱上清を Seitz E. K filter で濾過した凍結融解抗原の2種類である。その抗原価は、加熱抗原が320倍、凍結融解抗原が160倍で、いずれも40倍稀釈で抗補体作用はなかつた。これら2種類の抗原の中主として加熱抗原を使用した。免疫血清との補体結合反応では40倍、80倍及び120倍稀釈加熱抗原で常に免疫血清の320倍と強陽性を示した。

(1) 血中抗体との関係 ホルマリン死菌を家兎背部皮内に総量1.0~2.0mg (1個所0.02mg宛)接種し、夫々所定の時間後に採血し、各血清について凝集素及び補体結合性抗体を検べた。先ず局所感染抑制現象が、生菌感染の3~72時間以前に死菌を接種しておくことによつてみられたことから、生菌感染時の血中抗体をみるために死菌接種後3時間及び72時間目の血清について抗体を検べた。然しこれらの抗体の認め得べきような増量はなかつた。即ち凝集素価は4~32倍であり、補体結合性抗体価は0~4倍であつた。更に死菌皮内接種後の血中凝集素を追及してみると、7日目頃に至つて初めてO-凝集素価128倍、H-凝集素価512倍となり通常の抗体産生曲線を描いている。従つて著者の実験の場合には、死菌接種後4時間目に生菌を感染させているのであるから、血中の抗体が増量する時期には、局所感染はすでに一定の時期を経ていることとなり、また同一個体において、血中抗体が或る特定の部分にのみ選択的に濃厚に作用するとは考え難い点からも、血中抗体は抑制には関与していないものと考えられる。

(2) 局所組織中の抗体との関係 家兎の背部の1側の皮内に、ホルマリン死菌(1mg/mlのものを1個所0.2ml宛)を密接して接種した。3日後家兎を放血致死せしめ、該部皮膚を剔出し細切した後滅菌乳鉢にて磨砕し、これに等重量の生理的食塩水を加えて乳剤とし、凍結融解を5回反復後遠心沈澱により上清を得、更に Seitz E. K. filter にて濾過し、その濾液を死菌接種皮膚浸出液として実験に用いた。この際接種した死菌の量は、感染阻止に用いられた菌量よりも1個所当りでははるかに多量である。無処置皮膚としては、同一家兎の非接種側を剔出し同様の処置を行い浸出液を得た。

これら二つの浸出液について、局所組織中の抗体の存在を凝集反応及び補体結合反応によつて検べた。血清反応を行うにあつて、これらの浸出液を56°C 30分間非働化し、この際生ずる沈澱物は遠心沈澱法により除去して透明な上清を用いた。浸出液の抗補体作用は2倍稀釈ですでになかつた。

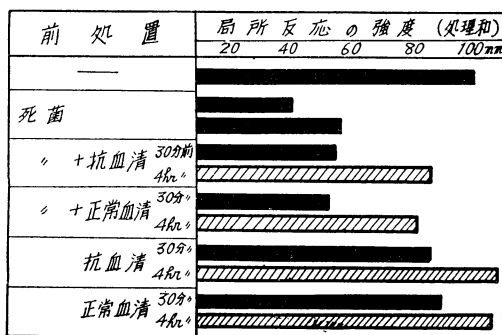
実験成績は次の如くである。即ち、凝集反応ではこれら二つの浸出液は4倍稀釈で陰性であり、補体結合反応においても2倍稀釈で陰性であつた。

以上の成績から、死菌接種皮膚浸出液中からは、血清反応によつては凝集素も補体結合性抗体も証明し得なかつたが、浸出液中に抗体の存在を否定はし得ない。即ち、少なく

とも0.2~1 μ g/0.1ml以上の抗体窒素が存在しなければ、血清反応中では鋭敏な補体結合反応においてさえも陽性に現われないからで¹⁰⁾、皮フ浸出液中には恐らくそれ以上の抗体が含まれていないと云える。

(3) 抗血清による抑制現象 抗血清を受身的に同一部位の皮内に与えた場合における抗体の局所感染に及ぼす影響について調べた。即ち、腸炎菌の生菌及びホルマリン死菌で免疫した家兎の抗血清(凝集素価2,560倍)を活性のまま0.2ml宛生菌接種の30分及び4時間前に受身的に皮内に与えた部位及び生菌接種の4時間前にホルマリン死菌を夫々0.02mg宛接種した部位と、更にこれに生菌接種の30分及び4時間前に抗血清を受身的に0.2ml夫々与えた部位について、局所反応をみると第8図の如くて、抗血清の

第8図 局所感染に及ぼす抗血清の影響



みを与えた部位の局所反応は、正常家兎働性血清を与えた部位及び無処置対照部位と大差がなかつた。また死菌前処置部位に、生菌接種の30分前に抗血清を受身的に与えた場合にもこれを与えない場合と大差がない。更に4時間前に死菌と抗血清を同時に与えた部位では、死菌のみの場合よりも却つて局所反応は強かつた。即ち、抗血清では局所感染を抑制し得ないのみならず抗血清を死菌前処置部位に与えても、死菌の抑制効果を高めるようなことはなかつた。従つてこれからも、局所感染の抑制に抗体が関与するという直接的な証明は得られなかつた。

第4章 総括並びに考按

微生物との接触を機縁として生ずる特異的抵抗性増強には、抗体性のものと非抗体性のものがあることは緒言にも述べた通りであるが、感染と免疫に関与する複雑な多数の因子を分析し、各因子相互間の関連性を求めてゆくことの必要性が生じて来ることは茲に論をまたない。

著者はこの目的で、感染過程をdynamicに観察検討することが出来る皮膚の局所性感染を対象として、感染に死菌がどのような影響を及ぼすかを追究し、興味ある所見を得たので以下これを総括し考察してみたい。

先ず腸炎菌の死菌を、生菌接種の短時間前に接種すると局所感染の抑制乃至阻止、つまり局所的抵抗性増強が認められ、更にその部位では菌の増殖が抑えられていることが

判つた。そこでこの抑制現象に関与するいろいろな因子について考察すると、先ず死菌前処置から生菌接種迄の時間は、同時接種及び2時間以内では抑制現象はみられず、却つて3~6時間の間隔において抑制作用は最も強く現われた。それ以前の処置では時間と共に抑制現象が弱くなつていく傾向にある。この関係はウイルスにみられている干渉現象における時間的關係と類似している点は興味ある所見であると思われる。3日以上の間隔については、特異抗体による免疫現象の発生により複雑な因子が関与して行くと考えられるので、今回の研究では取上げなかつた。なお生菌接種後に死菌を接種するとかへつて局所反応が増悪することは安達⁷⁾によつて報告されている。更に菌量の点については一定の關係があつて、前処置死菌の菌量が生菌よりも多くなければならなかつた。

このように著者の実験における感染抑制現象は、死菌が生菌の前に接種されしかもその時間的關係が3~6時間の間隔という条件で、死菌と生菌の量的關係が満された時に確認されたが、これはウイルスにおける干渉現象が特定の条件の下において認められるのとよく類似している。

ところで従来宿主における全身免疫と局所免疫との関連についての研究としては、皮膚における例では Meierowitzsch¹¹⁾が1887年に丹毒について報告して以来詳細に研究されている。即ち、実験的丹毒から恢復した家兎の罹患局所は再感染に対して抵抗性顕著であるが、その他の部位は抵抗性を示さないという¹²⁾。殊に生菌の静脈内注射による全身感染に対して何等の抵抗性も示さないと報告されている¹³⁾。ところがこれら丹毒の例における報告は全て生菌の攻撃を受けて治癒した部位における考察である。しかして加熱或はアルコール処理の死菌を皮内に注射しても上記のような免疫は得られていない¹⁴⁾、他方ブイオンの皮内注射によつてもその局所の感染に対する抵抗性の増強が軽度ながらみられるところから、このような局所的抵抗性増加は非特異的炎症反応によつてもおこり得るものと考えられている。

そこでこれら実験的丹毒の場合の観察を総括してみると、連鎖球菌に対する局所免疫は全身免疫なしに存在すると云うことと、局所に注射を反復すると全身免疫が出現するけれども、免疫の程度は、接種部位及び近接部に高いと云うことが明かにされている。結局、局所感染換言すればそれによつて起る炎症反応が、局所免疫成立のために最も有効であると思ふ。

以上丹毒の場合の非特異型の局所免疫について述べたが、この型の非特異的免疫は皮膚のみに限られているわけではない。即ち、Pfeiffer and Issacoff¹⁵⁾は海豚の腹腔へブイオン、ペプトン水或は尿等を注射すると、コレラ菌の腹腔内注射に対して抵抗性を有する非特異的免疫反応をあたえることを報告し、Guy and Morrison¹⁶⁾は肉水のような Macro-pluges の浸潤をおこさせる物質の腹腔内注射は

24 時間後の連鎖球菌の腹腔内注射による感染を防禦することを、また Oerskov and Kauffman¹⁷⁾ and Oerskov¹⁸⁾ は感染菌と抗原的に無関係な細菌の生菌或は死菌により、*Sal. typhi* の Vi-form や *Sh. Shigae* に対する非特異的な腹腔内免疫をマウスにつくらせ得ることを報告している。また Philipson¹⁹⁾ は *Sal. paratyphi B* のワクチンをマウスの腹腔内に接種すると、*Sh. dysent.* に対する非特異的免疫が成立することを認め、しかもワクチンの腹腔内注射後 8 時間から証明され、3~9 日間続くことをみている。更に Cannon et al²⁰⁾ は肺炎菌のホルマリン死菌の滴注により、肺炎菌の経鼻感染に対する肺の免疫が、血中に抗体が証明出来る以前に成立することを報告し、この免疫は特異的であつたと云つている。同じような結果は North and Anderson²¹⁾ によつて百日咳菌の経鼻感染でみられている。しかし彼等は、肺に組織学的反応を惹起させる能力のある大腸菌によつても同じように百日咳菌の経鼻感染を防禦出来たことから、これは非特異的免疫のためであると結論している。

以上のような色々の事実に対し Topley²²⁾ は、炎症に関連した局所免疫においては非特異的な要素があるということは明かであるといつている。しかしその要素の存在は特異的因子がまた働くものであるということの可能性を決して排除するものではないし、特異的抗体産生は局所淋巴節においてのみならず皮膚においてもおこるし、細胞の著明な局所的な増殖は、抗体産生の為に必要な予備行為であることを暗示していると述べている。

それでは著者の実験は前述のどれに相当するであろうか？ 局所的抵抗性増強が死菌接種後短時間にみられる点については Philipson や Cannon et al 等と一致している。しからば著者の抑制現象もこれらと同じく非特異的な要素によるものであろうか。以下この点について考察してみる。

即ち、著者の局所感染抑制現象の機序についてみると、先ず第 1 に局所の炎症反応によるものでないことは、次の事実によつて証明出来る。即ち、ブイヨン及び流動パラフィンのような非特異的刺戟物を用いても、局所感染の抑制はみられずかへつて局所反応は悪化しているし、大腸菌やブドウ球菌の死菌では腸炎菌の感染を抑制し得なかつた。一方腸炎菌と O-抗原が共通である他のサルモネラの死菌によつては明かに腸炎菌の局所感染が抑制される。以上の事実からこの感染抑制機序は、非特異的な炎症反応によるのではなくして特異性を有するようになる。但し収斂作用を有するタンニン酸やゼラチンで抑制がみられるが、これが腸炎菌の死菌による抑制機序と同じであるかどうかは、著者の実験では解明するまでに至っていない。

第 2 にはこの抑制は抗体によるものかどうかと云うことである。一般に抗体が血中に証明されるのは感染数日後であるが、感染組織内では非常に速やかに産生されると云うことは、牛痘ウイルスなどの場合に詳しく検索されてい

る^{23) 24) 25)}。しかし著者の場合感染源は細菌であるので、ウイルス免疫でみられるような中和抗体は証明されないで、抗体産生は凝集素を指標とするほかはない。そこで死菌接種局所組織中における凝集素出現をしらべてみると、1~2 日と云うような短時日には証明することは出来なかつた。然し試験管内で抗体を証明し得ないからと云つて組織中の微量抗体の存在は否定することが出来ない。

それでは感染抑制は局所組織中に速かに抗体が産生されたためかと云うと、次のことから否定出来るし、また産生されていても抑制には余り関与していないものと思われる。即ち、もし感染抑制が抗体産生によるとするならば、(イ) 3~6 時間前の死菌接種部位よりも 10~24 時間前の部位が強く抑制してよい筈であるが、事實は 3~6 時間の前後において感染抑制が最も著しい。(ロ) また抗体が関与するものとするれば、生菌接種前に免疫血清を与えた場合にも抑制がみられてよい筈である。しかし免疫血清は抑制的には有効でなかつた。(ハ) 更に抗体が関与するとすれば、アレルギー反応が起ることも考えられる。斯かる場合は局所反応は却つて逆に強くなることも考えられる。然しかかることも認められなかつた。

一般に抗体の体内分布をみると、組織内で産生された後血中に現われて全身に拡がるもので、その濃度は血中に最も多く皮膚は大体その 10% 位であると云われている²⁶⁾。即ち、血清抗体は組織を通じて色々な細胞に分配され一部は固定され、この抗体をもつた細胞は、相当する抗原の存在によつて特異的に反応する筈である。しかし、Cannon によればこのアレルギー反応は肺炎菌の感染を防禦出来なかつたと云つている。更にサルモネラの生菌、死菌免疫家兎血清は感染防禦に無効と考えられている^{27) 28)}。

以上の考察から著者の実験における局所感染抑制現象は、非特異的な炎症反応に基因するものでないこと及び局所抗体の作用でもないことが結論づけられる。この局所感染抑制現象の特異的な点は、Cannon et al²⁰⁾ が肺炎菌で行つた成績と一致する。しかし抗体の点については、彼等の成績では感染の 1~4 日前に死菌投与したのでは完全に防禦しないが、5 日前では完全に防禦することから、抗体が局所的に産生されることによると結論している。これは著者の場合と異なるところである。然らばこの局所的抵抗性増強は如何なる要因によるものであろうか。

生体内に侵入した細菌に対する組織の反応は極めて複雑であつて、種々なる現象が起ることが想像される。即ち、体液の殺菌作用、喰菌現象、局所組織の酵素作用、炎症反応、菌体抗原による感作、抗体産生及びアレルギー性炎症反応等が相前後してしかも互いに影響し合つて起るものと考えられる。しかして著者の抑制現象ではこれらのうちのいずれの反応が主要な役割を演じているかと考えるのに、上述のことから殆んど多くの反応は除外され唯一つ局所組織の酵素作用の問題が浮び上つて来る。以下この点につい

て考察してみる。

一般に微生物が動物体内に侵入した場合感染発症の有無、更に発症した場合その様式は微生物と動物との相互関係によつて多様であるばかりでなく、微生物側並びに動物側の種々な一時的要素もまた支配的要因となるものである。今腸炎菌対家兎についてみると、腸炎菌が家兎の皮膚から侵入した場合、その侵入局所で炎症が起つて、局所淋巴節まで波及しても、それ以上体内への侵入が阻止される。即ち、侵入局所の強力な反応によつてその局所に微生物の抑留されるもので、明かに局所性感染である。しかも細菌の中でも腸炎菌は繁殖性炎を主体とする菌であるから、この菌の感染はウイルス感染の場合のように細胞内侵入を前提とする感染に近いものと思われる。

翻つて、細菌感染の感染機転をみるに、細菌と宿主とは相互に影響を及ぼしながら感染は進展するが、この場合菌の侵入部位では菌は増殖し、それに対して宿主細胞はいろいろな反応を呈するものと思われる。即ち、菌の酵素作用が宿主細胞の酵素作用と相干渉して、菌側の酵素作用がほしいままに展開される場合には感染し、その作用が阻止される場合には感染は進展せず消退するものと思われる。

斯かる観点から考察するとき、著者の死菌前処置による局所性感染抑制現象は、前処置による宿主細胞の代謝機構の変化が関与すると考えられないこともない。殊に抗原を酵素とみなし、抗体を抗酵素とみる者²⁹⁾もあり、更に Abderhalden³⁰⁾ が防禦酵素なるものを提唱して以来、これらの酵素、抗酵素と同じ類型に入るとされる現象が細菌³¹⁾ 及びウイルス感染³⁰⁾ で報告されている。特にこの酵素の産生は抗体の産生よりも著しく早くみられると云われている。

他方著者の感染抑制現象は、ウイルスにおける干渉現象と類似しているように思われる。殊に最近では、*Rickettsia Rickettsii*^{2) 3)} 及び百日咳菌⁴⁾ で、抗体の関与では説明のつかない免疫現象が報告されており、これらもウイルスの場合の干渉現象に類似した機構によるものではないかと云われている。従つてこの問題は叙上の考察とは全く別個な方向から検討されなければならないと思う。

次に以上述べて来た局所的抵抗性は、死菌接種によつて増強せられる。従来感染防禦の免疫をあたえるために生菌が用いられて来たが、その一つの目的は宿主の組織に著明な病変をおこさせることであつた。そしてこのような病変は、その部位へ攻撃菌の接近するのを妨げ或は拒むのかもしれないと考えられる。

このようなことは、細菌感染の例³²⁾ のみならずウイルスの干渉現象の場合にも³³⁾、またリケツチアの場合にも^{2) 3)} みられている。しかしながら死菌は生菌のように著明な局所性変化を起し得ない。それにもかかわらず微妙な影響がこの死菌によつて及ぼされている。これについては著者がすでに抑制機序の所で述べて来た通りである。

更に細菌感染に対する免疫の一つとして死菌体浮遊液が免疫抗原に用いられているが、この死菌をつくるに当り、菌株の選択及び培養条件等種々この方面に努力がはらわれて来ており、今日死菌体中の特定抗原の重要性が明かとなりつつある。しかしながら従来死菌とは、細菌を殺して防腐剤を加えたものと云う単純な考え方が強く、簡単に死菌がつくられている傾向があつたが、最近殺菌並びに防腐剤の抗原物質に及ぼす影響に関して多数の報告がみられるようになった。

著者も本研究で、用いる死菌によつて局所感染抑制効力に差異がみられることからこれを吟味した。即ち、ホルマリンで死菌をつくる場合については、ホルマリンの濃度及び保存方法によつて抑制効力に差がみられ、また加熱死菌の場合も殺菌の温度と保存により差が生じ、しかもこれらの抑制効力の減退と反応性の減弱との間に平行関係が認められている。

周知の如く死菌を保存する場合漸次変化を受けてその免疫原性の減弱するのは、細菌の自家融解酵素の作用によるものであつて、この点に関しては殊に肺炎菌の抗原物質について Day³⁴⁾ や Dubos^{35) 36)} の研究によつて明かにされているし、チフス菌の場合でも、自家融解によつて完全抗原の破壊を招き、抗原性多糖体が非抗原性のハプテンに転化すると云われている。そして Day や Dubos によれば、本酵素はホルマリン、アセトン、アルコール等によつて破壊されることを示しており、鳥瀉³⁷⁾ は 100°C 加熱によつて免疫原性の破壊されないのは、自家融解酵素がこの温度によつて破壊されるので、この処理によつて安定な免疫原が得られるのであると云つている。

従つてホルムアルデヒドは正しい条件で用いなければならないと云うことになり、また加熱についても、活性な形で残しておきたい特異性抗原の特定の性質によつて決めなければならないが、殺菌に充分な最低温度というものも必ずしも自家融解酵素の不活化を来さないと云われている。これらの事実は著者の実験でも実証されている。またホルムアルデヒドと細菌細胞との結合は、細菌浮遊液をよく洗つて防腐剤を除くか、それを弱く酸性にすることによつて解離させることが出来る。そうすると自家融解に関与する酵素系の或る成分がその活性を恢復するようになると云われているが^{35) 36)}、著者の実験においても、ホルマリンで殺菌し、洗滌によつてホルマリンを除去することにより抑制現象に関与する抗原物質の破壊がみられている。

以上殺菌及び防腐剤について考慮しなければならない点を述べたが、感染防禦性の免疫を成立せしめるのは、細菌細胞の中に存在する特殊の構造物によるものであつて、これまで余り適切な方法で研究されていないが、抗体産生という仕事のほかに、細菌産生物の毒作用に自ら適応したり或は寄生体の増殖を抑制したり、更に適応によつて或る種の酵素の産生を促したりするものと思われ、その構造の分

析的研究は更に免疫の解明に或る光明を見出すかも知れない。

著者はここに細菌感染に対する局所の防禦機構について研究し、死菌によつて早期に免疫的抵抗性増強のみられること、この機構がウイルスの干渉現象に類似せるものであること及び抗体性免疫に至る段階としてこのような非抗体性抵抗による防禦の一面も存在するのではないかということ述べたが、これは細菌の種類により異なると考えられるから、更に多くの例について研究され究明されなければならぬものと思う。

第5章 結 論

腸炎菌死菌を短時間前に接種すると、同菌の生菌による局所感染に影響を与えるが、これを中心として局所感染における防禦機構を追究し次の如き所見を得た。

1) 腸炎菌の生菌接種に先立ち予め死菌を同一部位に接種しておくと同菌の局所感染は種々な程度に抑制される。

2) 死菌前処置を施せば、生菌感染の局所反応出現は遅延し、しかも反応は軽度であり、また局所における菌の増殖も抑制されている。

3) 局所感染抑制の最も顕著なのは、死菌前処置から生菌接種までの時間間隔が3～6時間の場合である。

4) 局所感染抑制を招来する生菌と死菌の菌量の関係は、少なくとも死菌の量が2倍以上であることが必要である。

5) 局所感染抑制のためには、死菌としてはホルマリン処理菌が最もよいが、加熱死菌でもかなり有効であつた。しかしてホルマリンの濃度及び加熱の温度と抑制効力には密接な関係があつて、ホルマリンは1%以上の濃度での処理が最もよく、加熱は100°C 1時間が最もよかつた。

6) 腸炎菌の局所感染を抑制するには、O-抗原を共通している他のサルモネラの死菌によつてもよい。即ち、この現象は免疫学的には特異性を示している。

7) この抑制現象は、特異的抗体とは無関係であつて、抗体に基く免疫機序では説明することが出来ない。

8) この抑制現象の機構について考察した。

稿を終るに当り、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師北大医学部山田守英教授並びに御校閲を賜つた中村豊彦長、飯田広夫疫学科長に満腔の謝意を表します。

本研究の要は昭和30年2月日本細菌学会北海道支部大会並びに昭和30年4月日本細菌学会総会及び同年5月北海道医学会春季大会において発表した。

文 献

- 1) 熊谷満：北海道立衛生研究所報，第10集，206，昭33
- 2) W. H. Price：Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 2, 1953
- 3) W. H. Price, J. W. Johnson, H. Emerson, C. E. Preston：Science, 120, 3116, 1954

- 4) D. G. Evans and F. T. Perkins：Brit. J. Exper. path., 35, 6, 1954
- 5) 小林，牛場：Keio J. Med., 1, 35, 1952
- 6) 八田義貞：日本細菌学会誌，10, 3, 1955
- 7) 安達信一：未刊行
- 8) 大原達：北海道医学会誌，25, 5, 1950
- 9) 増山元三郎：少数例の纏め方と実験計量の立て方，河出書房，昭24
- 10) E. H. Lennette：Ann. Rev. Microbiol., 5, 277, 1951
- 11) Meierowitsch：Zbl. Bakt., Ref., 3, 406, 1888
- 12) L. Cobbett and W. S. Melsome：J. Path. Bact., 3, 39, 1895
- 13) D. Gromakowsky：Ann. Inst. Pasteur, 9, 620, 1895
- 14) F. P. Gay and B. Rhodes：J. infect. Dis., 31, 101, 1922
- 15) R. Pfeiffer and Issaef：Z. Hyg. Infektkr., 17, 355, 1894
- 16) F. P. Gay and L. F. Morrison：J. infect. Dis., 33, 338, 1923
- 17) J. Oerskov and F. Kauffmann：Z. Hyg. Infektkr., 119, 65, 1936
- 18) J. Oerskov：Z. Immun. Forsch., 98, 359, 1940
- 19) J. Philipson：Acta. Path. Microbiol. Scand. Suppl. 32, 1937
- 20) P. R. Cannon and T. E. Walsh：J. Immunol., 32, 49, 1937
- 21) E. A. North and G. Anderson：Med. J. Aust., ii, 228, 1942
- 22) Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity
- 23) J. Oerskov & E. K. Anderson：Z. Immun., 92, 487, 1938
- 24) P. D. McMaster and J. G. Kidd：J. Exp. Mxd., 66, 73, 1936
- 25) 高瀬一：ウイルス，3, 2, 1953
- 26) J. Freund：J. Exp. Med., 51, 889, 1930
- 27) 大野順之助，西原円治：細菌誌，449, 770, 昭8
- 28) 安東清：細菌誌，456, 132, 昭9
- 29) M. G. Sevag：Immuno-catalysis. Charles Thomas, Spring field, Illinois, 1945
- 30) 安東洪次：感染と免疫，丸善，昭28
- 31) 加藤定吉：和歌山医学，2, 145, 1951
- 32) 羽里彦左衛門他：日本細菌学雑誌，1, 52, 1944
- 33) L. W. Jungglut and M. Sanders：J. Exp. Med., 76, 127, 1942
- 34) H. B. Day：J. Hyg., 43, 473, 1944
- 35) R. J. Dubos：J. Exp. Med., 65, 873, 1937
- 36) R. J. Dubos：J. Exp. Med., 66, 113, 1937
- 37) 鳥瀉：30)より引用