

ネズミチフス症における生菌免疫成立機序に関する研究

奈良県立医科大学細菌学教室

奥 大 介

MECHANISM OF THE ACQUIRED IMMUNITY TO MURINE TYPHOID INDUCED BY THE LIVE-CELL VACCINE

DAISUKE OKU

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received November 26, 1991

Summary: The present study was carried out to elucidate the mechanism by which living cells of *Salmonella typhimurium* confer long-lasting immunity in mice against murine typhoid. Living cells of either virulent or avirulent organisms of *S. typhimurium* induced higher levels of mouse protection of which the duration correlated with the persistence of each bacterium in the liver as a L form. In contrast, *S. schottmülleri*, of which O antigenicity is identical to that of *S. typhimurium*, induced only short-term protection, since L forms of the bacteria existed in the liver only over a short period. The capacity of salmonella L forms to persist in the liver was attributable to the ability of salmonella organisms to produce cytotoxin and they changed into L forms. This cytotoxin was toxic only to macrophages and polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. The persistence of L forms in mice resulted in high production of both the tumor necrosis factor and membrane associated interleukin 1 upon challenge with virulent *S. typhimurium*, which would lead to the initiation of *S. typhimurium*-specific immunity. These results suggest that the persistence of salmonella L forms in mice might be required for longer-lasting immunity against murine typhoid after immunization with live-cell vaccines.

Index Terms

murine typhoid, L forms, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmülleri*, cytotoxin

序 論

murine typhoid は、ヒトにおける細胞内寄生菌感染症の動物モデルとして繁用されている。murine typhoid においては、host のマクロファージ(Mφ)が primary effector であり、獲得抵抗性は T 細胞によって非免疫マウスに伝達し得ると考えられてきた(1)。しかし Hsu(2)一派らの近年の仕事から、murine typhoid の起因菌として用いられる *Salmonella typhimurium* は、host cell 内の殺菌作用に抵抗し増殖能を有するも、細胞外での菌の増殖も著明であるため、獲得抵抗性の成立には抗体と Mφ の存在が必要であり、抵抗性を非免疫マウスへ移入

するには T 細胞より B 細胞の方がより有効であるという報告もみられる(3)。教室の喜多等もマウス系統によっては特異抗体の存在が獲得抵抗性の発現に必要なことを報告している(4)。

murine typhoid においては、生菌ワクチンのみが長期にわたる免疫を附与し得ることがよく知られている(5)。しかも生菌ワクチンとしては強毒株を致死量以下で接種する方法、或いは弱毒株を大量に投与する方法がともに有効である事も認められている。この事は *S. typhimurium* が生体内で抗原性を維持しながら長期間生存している可能性を示唆するものであるが、免疫後 30 日を経たからは、生体内より生菌が回収されないことから、親株

の状態で存在しているとは考えにくい。一つの可能性として、*S. typhimurium* が L 型菌として生体内に存在し続けていることが考えられる。

著者は、murine typhoid の原因菌である *S. typhimurium* と、本菌と血清学的に鞭毛抗原特異相のみを異にし、マウス非病原性である *S. schottmülleri* 及び *S. typhimurium* の R 型変異株を用いて、生菌免疫後のマウス体内における獲得抵抗性の成立過程を L 型菌との関連から解析し、細胞内寄生菌感染症の発症と免疫成立機序について考察を加えた。

方法と材料

1. 動物：ddY 雌マウス(5~6 週令, SLC より購入)及び同週令の C3H/HeJ 雌マウス(日本クレア)を実験に供した。抗体の作製には日本動物社より購入した白色ラビット(雌, 2 kg)を使用した。

2. 菌株：*Salmonella typhimurium* LT 2 株, LT 2 株の *two-heptose mutant* である SL 1004 株, 及び *S. schottmülleri* 8006 株を用いた。LT 2 株の ddY マウスに対する LD_{50} は 10^3 colony-forming unit(CFU)である。8006 株及び 1004 株は両マウスに対して 10^6 CFU 以上でも致死性を示さなかった。

3. L 型菌の誘導：*Brain heart infusion broth*(BHI, Difco)で 4 時間振盪培養した *S. typhimurium* を L 型誘導寒天培地(10% 非働化馬血清, 2% NaCl, 10% sucrose, 1.5% agar 含有 BHI broth)上にコンラッジ棒で塗抹し、その中央に Penicillin G(Pc)10 万単位含有の disc を置き 37°C 48 時間培養した。Pc による阻止円の周辺部に認められる典型的な L 型コロニーを採取し、Pc 10 万単位含有 L 型菌誘導液体培地(L 誘導寒天培地から寒天のみを除去したもの)に接種し、37°C で L 型菌を増殖させた。5 日後、試験管の底に沈殿した L 型菌体の一部を新しい液体培地に接種して更に数代継代して安定な L 型菌(stable L)を得た。

4. cytotoxin の分離：stable L 菌体(湿重量 1 gr)を 10 ml の 0.1% SDS 溶液中にて 37°C 30 分攪拌処理することにより溶菌せしめ、2,200 回転 60 分の遠心により膜成分を除去した後、Sephadex G-25(Pharmacia Fine Chemicals, Tokyo)にて脱塩後、AB 11 A 8 Ion Retardation column(Bio Rad Laboratories, Tokyo)にて SDS を除去し、Hanks' balanced salt solution(HBSS)に十分透析したものを、濾過滅菌した後、その cytotoxin 活性を測定した。尚、活性測定に際しては各 sample の蛋白量を 500 μ g/ml に調整した。蛋白量の測定は Bio Rad 社の Protein-assay kit を用いた。

5. cytotoxin 活性の測定：Thioglycollate medium

(TGC)にて誘導したマウス腹腔浸出細胞より、Kumagai 等の方法(6)により分離した $M\phi$ 浮遊液を 10^6 /well の濃度に 96 穴平底マイクロプレート(Falcon)に分注し、37°C 5% CO_2 インキュベーター内で 2 時間プレート底面に接着せしめた後、非附着細胞を除去し、 α -modified MEM(Flow Laboratories, Mclean, VA)にて倍数希釈した sample を各 well に加え、37°C 5% CO_2 インキュベーター内で反応させ、24 時間後に上清を除去し HBSS にて洗浄した後生存細胞をメチルアルコールに溶解したクリスタルバイオレット液で染色した。各ウエルの吸光度を 540 nm の波長で ELISA-Reader を用いて測定した。cytotoxin 活性は、対照ウエル(メディウムのみで $M\phi$ と培養したウエル)の 540 nm における吸光度を 50% に減少せしめる最大希釈倍数の \log_2 で表示した。又マウス腹腔内からの多形核白血球(PMN)の採取は 0.2% casein 2 ml をマウス腹腔内に接種してから 4 時間後に 4 ml の HBSS にて腹腔滲出液を洗い出し、Percoll density gradient にて精製し(7)、 $M\phi$ の時と同様の方法にて cytotoxin assay を行った。リンパ球に対する cytotoxic activity の測定も同様に行なった。尚 T 細胞、B 細胞の分離は喜多等の方法(8)に従い以下の如く行なった。マウス脾細胞浮遊液から plastic adherence 法を 2 回繰り返して、附着細胞を除去した後、Julius 等の方法(9)に従い nylon wool column を用いて T 細胞画分を得た。一方 B 細胞画分は附着細胞を除去したマウス脾細胞浮遊液を抗マウス T 細胞抗体(Cedarlane)と補体(Low-Tox-M, Cedarlane)で処理する事により得た。更に、それぞれの細胞画分を Mage 等の panning method (10)に従って、ラビット抗マウス IgG 抗体(Cedarlane)を poly-L-lysine で結合せしめた plastic dish にて 37°C 60 分反応させ、B 細胞を選択的に結合させた後、非附着細胞を集めて十分に洗浄し精製 T 細胞とした。更に、dish に結合した B 細胞は HBSS で十分に pipetting することにより回収し、よく洗浄した後、精製 B 細胞として用いた。これらの細胞標品は FITC 標識抗体を用いた判定でともに 97% 以上の純度であり、dye exclusion test により 98% 以上の生存率であった。Cytotoxin assay は、96 穴平底マイクロプレートに α -MEM で倍数希釈した sample 100 μ l を加えた後に、リンパ球浮遊液(2×10^7 /ml)の 100 μ l を各ウエルに添加して、 CO_2 インキュベーター内で 24 時間反応後にトリパンブルー染色により細胞の生存率を求めた。各標品の cytotoxic activity は、50% 致死作用を示す sample の最大希釈倍数を \log_2 で表示した。

6. L 型菌による感染防禦効果：L 型菌の菌量は 10

% sucrose 含有 HBSS に懸濁した菌液を吸光度計を用いて $A_{540\text{nm}}=0.1$ に調整した後、同 buffer にて倍数希釈した菌液を $100 \mu\text{l}$ ずつ L 誘導固形培地に塗抹し 37°C で 7 日間培養し、生じた L colony 数より菌量を算定した。一つの colony は一つの L form から形成されるとして、L 型菌量は L-forming units (LFU) で表示した。種々の濃度の L 型菌液 0.1 ml をマウス腹腔に投与した後、15, 30, 40, 及び 60 日目に 1000 LD_{50} の LT 2 腹腔内攻撃を行い感染防禦効果を検討した。この場合各群 10 匹のマウスを用いた。

7. 免疫マウスの血中抗体価、及び遅延型反応の測定：種々のワクチンで免疫を施したマウスの salmonella 抗原に対する遅延型反応は、LT 2 株のホルマリン死菌体 10^7 個を惹起抗原とした delayed footpad response (DFR) (11) の測定により判定した。

血清抗体価は、グルタルアルデヒド法 (12) により羊赤血球に抗原 (L 型菌抽出液) を結合させ、passive hemagglutination 法 (PHA) により測定した。LT 2 菌体に対する whole-cell agglutinin (WCA) も同時に測定した。

8. Tumor necrosis factor (TNF) の測定：TNF は Urushizaki の方法 (13) に順じて行った。96 穴マイクロプレートに L 929 細胞 (マウス繊維芽細胞) を $100 \mu\text{l}$ ($3 \times 10^4/\text{well}$) 接種し、actinomycin D ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で α -MEM にて倍数希釈した sample を $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、48 時間後プレートに附着している L 929 細胞をクリスタルバイオレットで染色し、 540 nm で吸光度を測定したマウスリコンビナント TNF (Genzyme 社) を標準サンプルとして TNF 活性を算出した (14)。

9. L 型菌感染 M ϕ の interleukin 1 (IL-1) 産生能：40 LFU 量の LT 2 及び 8006 株由来 L 型菌を腹腔内投与後 2, 7 及び 14 日目にマウス腹腔内細胞を回収し、 $2 \times 10^6/\text{well}$ の濃度で 24 穴平底マイクロプレート (Falcon) に分注し、2 時間、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内で附着させた後、非附着細胞を除去し、 10^7 個の LT 2 加熱死菌含有 α -MEM を 1 ml 添加し、更に 24 時間培養後の上清を細胞外 IL-1 標品とした。IL-1 の定量は C 3 H/HeJ の thymocyte を用いた co-stimulation assay (15) により測定した。Genzyme 社のヒトリコンビナント IL-1 β を用いて standard curve を作製した。一方膜結合型 IL-1 活性は上清を除去した後、附着細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、十分に洗浄した後、先と同様 comitogen assay 法により測定した。

10. Salmonella 抗原特異的 T 細胞応答：免疫マウス、非免疫マウスの脾由来 T 細胞を RPMI 1640 (10 %

fetal bovine serum, 10 mM HEPES $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-mercapthoethanol 含有) に $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整し、96 穴平底マイクロプレートに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、accessory cell として mitomycin C 処理 ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$, 30 分) TGC-誘導 M ϕ を同メEDIUM に $2 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度に調整した後、各ウエルに $50 \mu\text{l}$ ずつ追加した。抗原としては 10^7 個の LT 2 ホルマリン死菌体を $100 \mu\text{l}$ のメEDIUM に懸濁したものを各ウエルに加えた。 37°C 、5% CO_2 内で 72 時間培養し、培養終了 12 時間前に各ウエルに $1.0 \mu\text{Ci}$ の tritiated thymidine ($[^3\text{H}]\text{TdR}$, 2 Ci/mmol, Amersham, Japan) を加え、DNA への $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取り込みを常法に従って測定した。

11. 抗体の作製：抗 L-toxin 抗体は 1 mg の L 抽出液を等量の Freund's complete adjuvants に混じてラビット皮内に数箇所投与し、14 日間隔で 3 回免疫後、6 日後に全採血し、硫酸分画法にて γ -globulin 分画を得た。

抗マウス TNF- α モノクローナル抗体は Genzyme 社製のものを使用した。

12. *S. typhimurium* L 型菌走査電顕：安定な L 型菌を、10% sucrose 含有 HBSS (HBSS-sucrose) にて 3 回洗い、 1 ml の HBSS-sucrose にて、 $A_{540\text{nm}}=0.1$ になるように調節し 1% poly-L-lysine で処理したカバーガラス (直径 15 mm 円形) にサンプルを載せ、15 分間室温に置き、HBSS で洗った後、2% グルタルアルデヒド含有 HBSS にて前固定し HBSS-sucrose に一昼夜 4°C にて浸透させた。その後 1% 酢酸オスミウムを含む HBSS-sucrose にて後固定を 1 時間行った。50%, 70%, 80%, 90%, 95% アルコールを用いて順次脱水し、最後に 100% アルコールを用いて、3 回脱水した。酢酸インアミルにて 2 回置換した後、臨界点乾燥装置 (HITACHI OPTICAL POINT DRYER) にて、乾燥させイオンコーターを用いて、銀イオンをコーティング ($5 \text{ mA}/\text{秒}$) した後、走査型電子顕微鏡 (HITACHI S 800) にて観察した。

結 果

1. 生菌免疫後のマウス肝内 L 型菌増殖：致死量以下 (0.1 LD_{50} 量, 100 CFU) の *S. typhimurium* 腹腔内投与後肝内生菌数の変化と L 型菌量を比較したところ、接種後 15 日目に肝内生菌数は maximum (mean $\log_{10} \text{ CFU} = 3.94$) に達し、その後 10 日間で直線的に生菌数は減少し、接種 30 日目以降では増菌培養によっても肝内より生菌は回収されなかった (Fig. 1)。一方、L 型菌数は 15 日目以降から次第に増加し、接種 60 日後に maximum (mean LFU = 820) に到達し、その後わずかに減少したが 90 日目でも mean LFU は約 740 であった。肝内 L 型菌

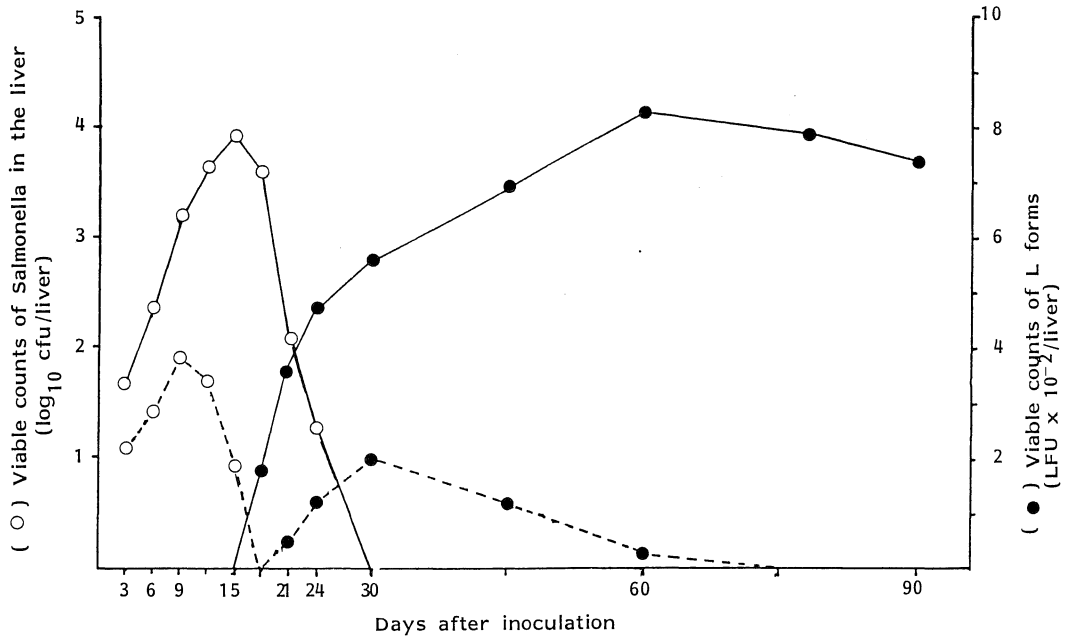


Fig. 1. Relationship between the number of salmonella organisms and that of L forms in the liver of Salmonella-infected mice.

(—) : infected with 100 cfu of *S. typhimurium* LT2
(---) : infected with 10⁸ cfu of *S. schottmulleri* 8006

の定着は、菌接種後3ヶ月目においても mean LFU 440 であることから明らかになった。

LT2のtwo-heptose mutantであるSL1004株10⁸CFUを投与した時にも肝内生菌数とL型菌数の推移は、LT2の生菌100CFUを投与した時とほぼ同様の結果であった。一方*S.schottmulleri* 8006株を10⁸投与した時肝内生菌数は前2株の時に比して有意に少なく、生菌も投与後15日目以降は肝内より回収されなくなった。更にL型菌は12日目頃から検出されるもその菌数は投与30日目に200LFUでmaximumに達し、その後は急速に減少し、60日目以降はL型菌の回収は出来なかった。

2. L型菌の感染防禦効果：生菌投与時に認められる肝内L型菌の存在は免疫の成立と維持に関連があるものと思われる為in vitroで誘導したL型菌を用いて、L型菌の感染防禦効果について検索した。誘導されたL型菌は走査電顕において直径は150nmの粒子状の不定型を呈していた(Fig.2)種々の濃度のL型菌をマウス腹腔内に投与後、7日目に1000LD₅₀のLT2を腹腔内攻撃し30日間生存率を観察した(Fig.3)。マウス当たり20~40LFU量の免疫量では100%の生存率が、100LFU量の免疫量では20%の生存率も、160LFU量以上では全てのマウスが死亡した。しかし、この量ではLT2攻撃後2

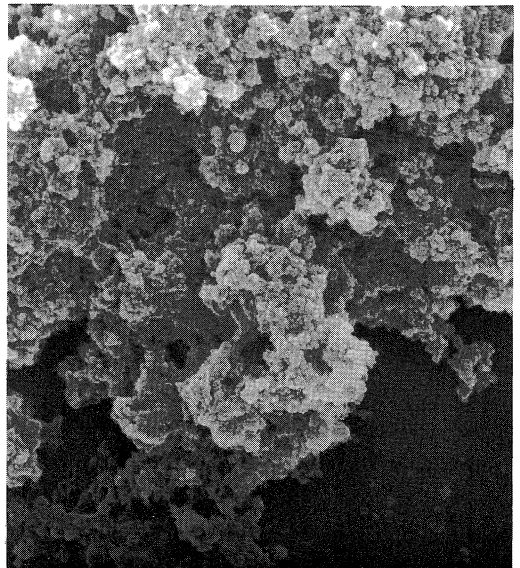


Fig. 2. Scanning electron micrograph of L forms of *S. typhimurium* LT2. Each particle represents approximately 150 nm in diameter. (magnification ×20,000)

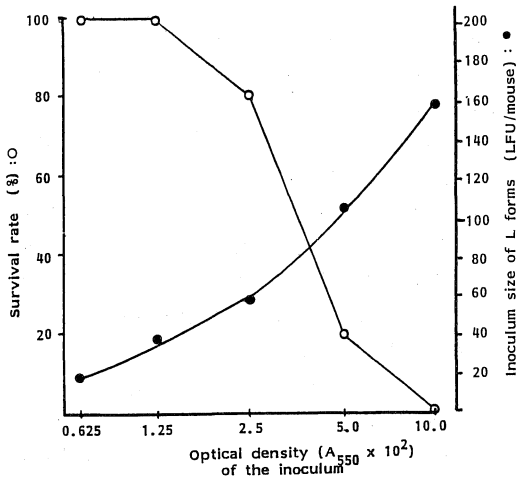


Fig. 3. Relationship between the mouse protection and inoculum size of L forms derived from *S. typhimurium* LT2. Groups of 10 mice were challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of *S. typhimurium* LT2 7 days after an intraperitoneal injection of L forms.

～3日以内に全てのマウスが死亡した。このことから少量のL型菌では感染防禦効果が得られ、大量のL型菌による前処理ではマウスの感受性を亢進させることが認められた。

次に、L型菌前投与によるマウスの *S. typhimurium* LT2 に対する感受性の変化を調べた。LT2, SL1004, 及び8006株により得たL型菌の200 LFU量をマウス腹腔内に投与してから2日後に1000 LD₅₀のLT2で腹腔内攻撃し接種マウスの50%が死亡する日数(ST₅₀)を比較した(Fig.4)。コントロール(10% sucrose 含有 HBSS 0.1 ml 投与)マウス群のST₅₀は7.6日、LT2株L型菌投与マウス群で3.4日、SL1004株L型菌で4.2日、そして8006株のL型菌で14.2日であった。*S. typhimurium* のL型菌を200 LFU前投与することにより親株のS型、R型にかかわらずマウスの *S. typhimurium* に対する感受性は亢進した。一方、8006株のL型菌では逆に抵抗性が亢進した。

3. L-toxin の分離：LT2親株の whole cell lysate にはマウスの *S. typhimurium* に対する感受性を亢進させる様な作用が認められなかった事から *S. typhimurium* のL型菌にのみ何らかの毒性因子が存在するので

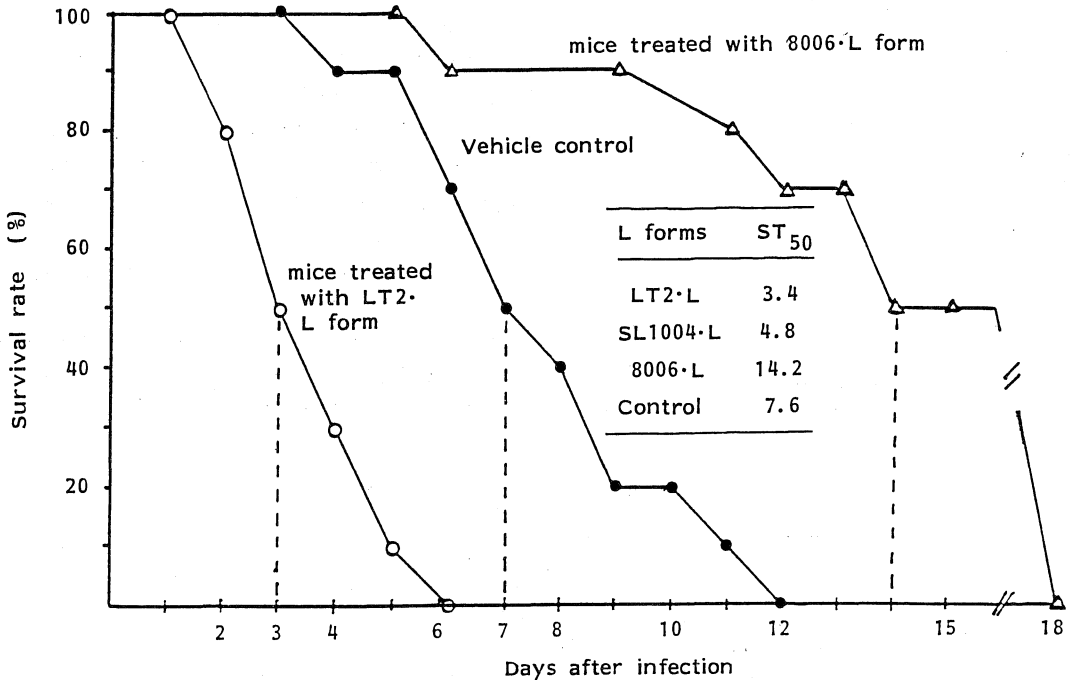


Fig. 4. Enhanced susceptibility to *S. typhimurium* LT2 of mice pretreated with L forms of three strains. Groups of 10 mice were challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of *S. typhimurium* LT2 7 days after an intraperitoneal injection of 200 LFU L forms.

はないかと推察された。そこでLT2のL型菌を0.1% SDSで溶菌せしめた後、可溶性画分からIon retardationカラム(AG 11 A 8)によりSDSを除去して得たL型菌抽出液を種々の濃度でマウス腹腔内に前投与し、2日目に1000 LD₅₀のLT2株で腹腔内攻撃を行なった。Fig. 5に示す如く50 µg以上の前投与で200 LFUのL型菌を腹腔内前投与した時と同様に、処理マウスの*S. typhimurium*に対する感受性が亢進した。

そこでこの抽出液の細胞毒性について検討を加えた。Table 1に示す如く、抽出液はマウス腹腔Mφ、及びPMNに対してのみ強い毒性を示した。その作用は両細胞に対してcytolyticであった。しかし、*S. schottmülleri* 8006株のL型菌には細胞毒性は認められなかった。また、SL1004株のL型菌抽出液中にもLT2株L型菌の抽出液とほぼ同等の毒性が認められた。いずれの抽出液もT細胞、B細胞に対する毒性は認められず、この作用はMφ及びPMNに対してのみ認められた。

更にLT2のL型菌抽出液のcytotoxic component

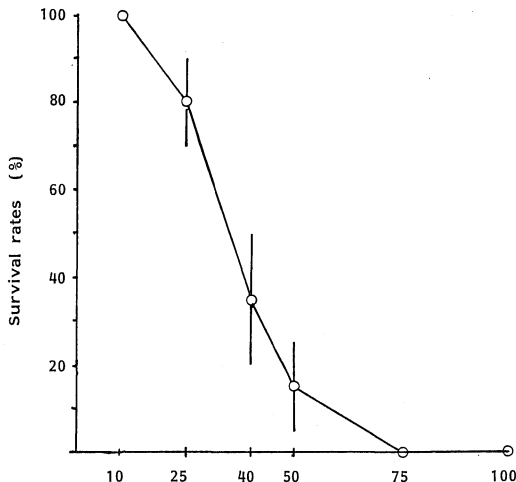


Fig. 5. Effect of L-form extract on the susceptibility of mice to *S. typhimurium*.

を抽出液から分離するために、Bio-GelP 100(Bio Rad)によるゲル濾過を行なったところ、void volumeより少し遅れて抽出される分子量36,000付近の画分に毒性活性が認められた。次にこの活性画分をプールしてロトフォア(Bio Rad)による等電点電気泳動(5%ピオライト pH 3.0-10.0, 12w定電力, 4時間)を行なったところ、活性物質はpH 7.8附近の画分に認められた。この画分を集め濃縮後、α-MEMにて十分に透析し、スライドグラス上に培養したMφのmonolayerに0.5, 5, 10 µg/mlの濃度で添加し、形態学的変化を調べた結果、0.5 µg/mlでは細胞質の膨潤化と多数のtoxic vacuolesが認められ5 µg/ml以上では反応後1時間以内にMφの殆どが細胞融解を呈したので、この画分をL-toxinとして以後の実験に供した。又、SL1004株のL型菌からはLT2のL型菌と同様にL-toxinが分離できたが、*S. schottmülleri* 8006株のL型菌からはL-toxin様の活性物質は認められなかった。

4. L-toxinの感染防禦能：L-toxin 0.5 µgを1回或いは5日間隔3回投与及び5 µgを1回或は10日間隔で3回投与の4つの処置グループをつくり、最終投与後7日目に1000 LD₅₀のLT2を腹腔内攻撃した。0.5 µgで3回前処置したマウス群においては90%の感染防禦効果が得られ、感染抵抗性が附与されている事が認められた(Fig. 6)。一方5 µg投与では何れの投与方法も無効で投与回数が多い程マウスの*S. typhimurium*に対する感受性の亢進が認められた。

5. ワクチン接種後の免疫応答：*S. typhimurium* LT2株、SL1004株及び*S. schottmülleri* 8006株の生菌及びL型菌投与後の感染防禦持続期間及び血中抗体価及びDFRについて調べた(Table 2)。LT2の生菌(100 CFU)及びSL1004の生菌(10⁸ CFU)更にそれぞれのL型菌(40 LFU)感染防禦効果が免疫後60日目でも認められた。しかし8006株の生菌(10⁸ CFU)では免疫後30日目以降感染防禦効果が低下し、40日目では65%、60日目では30%に迄低下した。8006株のL型菌の免疫効果も

Table 1. Cytotoxic activity of L-form extracts from three strains

Extract of L-forms	Cytotoxicity			
	Macrophages	PMN	T cells	B cells
<i>S. typhimurium</i> LT2	12 ± 2	10 ± 1	ND	ND
<i>S. typhimurium</i> SL1004	8 ± 2	9 ± 2	ND	ND
<i>S. schottmülleri</i> 8006	ND	ND	ND	ND

Cytotoxic activity was expressed as the highest log₂ dilution of the sample to achieve a 50% cell death.

ND : not detectable.

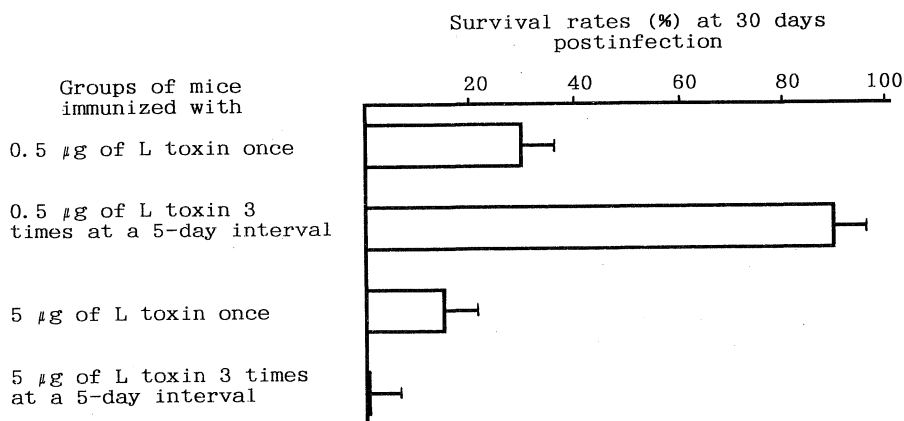


Fig. 6. Mouse protection by L toxin of *S. typhimurium* LT2 against 1000 LD₅₀ of homologous organisms.

Table 2. Duration of the protection induced by various vaccines

Vaccines	Mouse protection at 30 days postinfection (%)			
	Days after immunization			
	15	30	40	60
<i>S. typhimurium</i> LT2				
Live cells (100 cfu)	100	100	100	95
L forms (40 LFU)	100	100	85	75
<i>S. typhimurium</i> SL1004				
Live cells (10 ⁸ cfu)	100	100	80	90
L forms (40 LFU)	100	100	85	70
<i>S. schottmülleri</i> 8006				
Live cells (10 ⁸ cfu)	100	95	65	30
L forms (40 LFU)	65	40	25	30
LT2-L toxin (0.5µg×3)	90	75	20	10

Each group consisted of 10 mice. All mice were infected intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of strain LT2 7 days after the final immunization. All control mice died within 12 days after infection.

LT 2株のL型菌に比して弱く、免疫後30日目迄が有意の防禦効果を発現し得たにとどまった。更に、LT 2のL-toxin(0.5 µg)3日投与群は、免疫後30日目迄有意の感染防禦を示したが、それ以降経時的に防禦効果は減少し40日目は20%に低下した。血中抗体価及びDFRについては免疫後14日目に調べたが、LT 2株の生菌投与時にはDFRの成立、WCA及び抗L-toxin抗体価の上昇が認められたがSL 1004株の生菌投与時にはDFRの成立と抗L-toxin抗体価の上昇のみであった(Table 3)。8006株の生菌投与時にはDFRの成立とWCAのみ上昇していた。更に、3株のL型菌投与時にはDFRの成立は認められたがWCAの上昇は認められなかった。一方、

L-toxin(0.5 µg)3回免疫群では、抗L-toxin抗体の上昇のみ認められた。これらのワクチンで免疫されたマウス脾臓由来T細胞のLT 2ホルマリン死菌抗原に対する反応性を調べたところ生菌投与時のみならずL型菌投与マウスにおいてもT細胞の反応性が認められた(Table 4)。しかし、L-toxin免疫マウスの脾臓由来T細胞はサルモネラ抗原に反応し得なかった。

6. TNF-assay: 種々のワクチン投与マウスに1000 LD₅₀のLT 2株を腹腔内投与し、2時間後の腹腔滲出液中のTNF活性を測定したところ、LT 2及びSL 1004株のL型菌免疫マウスにおいて生菌免疫マウスの腹腔滲出液に対して2.5倍、非免疫マウスに対して6.4倍の高いTNF活性が検出された。一方8006株の生菌及びL型菌投与マウスではコントロールの約2倍のTNF活性が検出されたにとどまった(Table 5)。

200 LFU量のLT 2由来L型菌前処理マウスにLT 2攻撃前2日間抗TNF-αモノクローナル抗体(20 µg/mouse, Genzyme)或いはラビット抗L-toxin抗体を(100 µg/mouse)投与した後、1000 LD₅₀量のLT 2腹腔内攻撃をしたところ、抗TNF-α抗体投与マウスではマウスの急性死は認められず、75%以上のマウスが生存した(Table 6)。一方抗L-toxin抗体投与マウスでは25%のマウスが生存したにとどまった。

7. IL-1 assay: LT 2株及び8006株の40 LFUのL型菌(40 LFU)投与マウスの腹腔MφのIL-1産生能をFig.7に示した。LT 2由来L型菌投与マウスの腹腔Mφでは、細胞外IL-1産生能のみならず、膜結合型のIL-1産生能が7日目以降から有意に上昇した。しかし、8006株由来L型菌免疫マウスのMφでは細胞外IL-1の産生のみが認められたに留まった。

Table 3. Immune responses after immunization with various vaccines

Vaccines	Immune responses		
	WCA titers	Anti-L toxin Ab	DFR
<i>S. typhimurium</i> LT2			
Live cells (100 cfu)	1 : 256	1 : 128	7.9 ± 0.6
L forms (40 LFU)	< 1 : 2	1 : 256	6.4 ± 0.5
<i>S. typhimurium</i> SL1004			
Live cells (10 ⁸ cfu)	< 1 : 2	1 : 64	6.7 ± 0.3
L forms (40 LFU)	< 1 : 2	1 : 128	6.1 ± 0.3
<i>S. schottmüller</i> 8006			
Live cells (10 ⁸ cfu)	1 : 64	< 1 : 2	6.3 ± 0.4
L forms (40 LFU)	< 1 : 2	< : 2	5.8 ± 0.2
LT2-L toxin (0.5μg×3)	< 1 : 2	< : 512	2.1 ± 0.1
Saline control	—	—	2.2 ± 0.1

Each group consisted of 10 mice. Five mice were killed by extracting blood on day 14 of immunization for measurement of antibody responses. Remaining five mice were used for DFR test, DFR was expressed as $\times 10^{-1}$ nm. Values of DFR in all vaccinated mice except L toxin-immunized mice were all statistically significant ($P < 0.01$) as determined by Student's *t*-test.

Table 4. Salmonella-specific responses of T cells prepared from mice immunized with various vaccines

Vaccines	Salmonella-specific T-cell proliferation (mean cpm ± SD/culture)
<i>S. typhimurium</i> LT2	
Live cells (100 cfu)	21,624 ± 2,433
L forms (40 LFU)	16,128 ± 3,145
<i>S. typhimurium</i> SL1004	
Live cells (10 ⁸ cfu)	17,317 ± 3,106
L forms (40 LFU)	15,214 ± 2,692
<i>S. schottmüller</i> 8006	
Live cells (10 ⁸ cfu)	14,364 ± 1,917
L forms (40 LFU)	13,723 ± 1,584
LT2-L toxin (0.5μg×3)	712 ± 304
Saline control	637 ± 214

Except for responses of T cells from L toxinimmunized mice, values of T cell responses in all immunized mice were statistically significant ($P < 0.01$) as determined by Student's *t*-test.

考 察

「細胞内寄生菌に対して何故生菌ワクチンのみが長期にわたる免疫を附与し得るか」。この問題は従来から多くの研究者が取り組んできたが、未だに明確な答えが得られていない。結核菌においては、生菌免疫時 (BCG ワクチン) にのみ、免疫された個体の T 細胞は stress protein と反応し得る様になる (16) と言われ、*Listeria monocytogenes* では、生菌が産生する hemolysin (cytotoxin) が細胞性免疫の成立に必須とされる膜結合

型の IL-1 産生を誘導できる (17) ことが生菌免疫の有効な理由の一つとして認められている。しかし、これらの研究からは、ほぼ life-long に渡る免疫が持続する理由が明らかでない。

ネズミチフス症においては、生菌ワクチンとして強毒株の sublethal dose, 弱毒生菌, 或いは鞭毛抗原特異相のみ異なる *S. schottmüller* 等が用いられる。本研究においてはこれら 3 種の生菌を用いて感染防禦の成立について解析した。強毒株と言えども、致死量以下で投与すると、投与後 30 日目で増菌培養によっても肝内から生菌

Table 5. TNF production in the peritoneal cavity of immunized mice after infection

Vaccines	TNF activity in peritoneal exudate (u x 10 ⁻² /ml)
<i>S. typhimurium</i> LT2	
Live cells (100 cfu)	5.6 ± 1.9 ^a
L forms (40 LFU)	14.1 ± 2.3 ^b
<i>S. typhimurium</i> SL1004	
Live cells (10 ⁸ cfu)	5.2 ± 0.2 ^a
L forms (40 LFU)	12.4 ± 2.3 ^b
<i>S. schottmüller</i> 8006	
Live cells (10 ⁸ cfu)	4.8 ± 0.7 ^a
L forms (40 LFU)	4.3 ± 1.5 ^b
LT2-L toxin (0.5μg×3)	2.3 ± 0.8
Saline control	2.2 ± 0.3

TNF activity was measured by ELISA. Each assay was done in triplicate.

^a: P<0.01.

^b: P<0.005.

Table 6. Effect of anti-TNF-α antibody on acute death of L form-treated mice following infection with *S. typhimurium* LT2

Antibodies	Dose (μg/mouse)	Mortality rate (%)	P values
Anti-TNF α	20	25	<0.01
Anti-L-toxin	100	75	<0.1
Control (NRG)	100	100	

Each group consisted of 10 mice. Mice were injected intraperitoneally with 200 LFU of LT2-L forms 6 days before infection and received one of antibody preparations intravenously 2 days prior to challenge with 1000 LD₅₀ of strain LT2. Mortality rate was recorded until day 7 of infection.

NRG: normal rabbit globulin.

の存在が証明されなくなる。それにもかかわらず免疫効果が持続する理由として、菌体は何らかの形で生体内に残存している可能性が推察された。そこで肝内よりL型菌の回収を試みたところ、長期にわたる生菌免疫効果を附与し得るLT2及びSL1004株では、肝内の生菌が減少する頃から、L型菌が増加し、投与60日目でも約600LFU量のL型菌が肝内に定着していた。しかし感染防禦効果を附与し得ても、その効果が長期に持続しない。*S. schottmüller*では60日目以降L型菌が減少し、80日目ではL型菌が肝内より消失し、このL型菌の減少に伴って感染抵抗性は減弱した。この事は、生菌免疫効果の持続とL型菌の生存とは密接な関連がある事を裏付けるものと思われた。

*S. typhimurium*のL型菌からはMφ及びPMNに対

するcytotoxinが分離されたが、*S. schottmüller*からは分離されなかった。しかも微量のcytotoxinによる免疫がマウスに感染防禦効果を付与し得たことは、抗cytotoxin抗体の存在によりprimary effectorであるMφが質的・量的に十分に機能し得るため獲得免疫の成立過程において*S. typhimurium*の細胞内増殖を抑制し得るものと思われた。L型菌の産生するcytotoxinと*S. typhimurium*の親株で見い出されているcytotoxin(18)が同一であるかどうかは本研究で明らかにし得なかったが今回用いた3菌株の親株からcytotoxinを分離し得なかったことや、R型*S. typhimurium*のL型菌からもcytotoxinが分離されること、更にこの物質がHeLa細胞やL929 fibroblastに作用し得なかったこと(未発表データ)から、親株で報告されているcytotoxinとは異なる

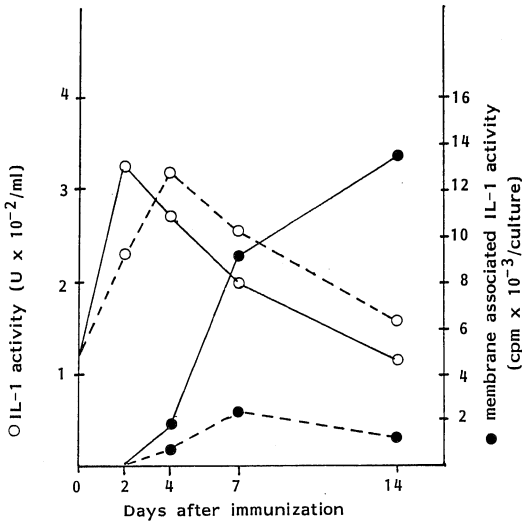


Fig. 7. IL-1 production by macrophage of mice immunized with 40 LFU of L forms.

(—): immunized with L forms of *S. typhimurium* LT2
 (---): immunized with L forms of *S. schottmülleri* 8006

ると考えられる。更に興味あることは、L型菌投与後7日以内に強毒株のLT2で腹腔内攻撃を行うと短時間で大量のTNF- α が産生されることである。L型菌投与マウスにおいて投与後短期間の間に観察された*S. typhimurium* LT2に対する感受性の亢進は、L型菌を食菌したM ϕ がLT2由来のendotoxin刺激により大量のTNF- α を放出、これがcachectinとして作用したことによると思われる。このことは抗cytotoxin抗体よりも抗TNF- α 抗体の前投与でこの急性死が防禦できることから明らかであり、マウスリステリア症においてもTNF- α の適量産生は感染抵抗性の発現に導かれ、過剰産生は急性死を招くというNakane等の報告と(19)合致するものである。一方L型免疫マウスの腹腔M ϕ が膜結合型のIL-1 β を産生し得たことは*S. typhimurium*のL型菌が出すcytotoxinは*L. monocytogenes*の外毒素のひとつで、cytotoxinの一種であると言える。代表的な2種の細胞内寄生菌が出すcytotoxinが同様の作用をしめすことは、immunogenic cytotoxinの存在が細胞内寄生細菌による感染と免疫の成立に密接な関連があるものと思われた。

また、*S. schottmülleri*は免疫後短期間であるが感染防禦効果を附与し得たが、その効果が長期間持続しなかった理由の一つとしてL型菌としてRES系での生存期間が短いことが考えられ、しかもL型菌が長期間持続し得

ない原因の一つにcytotoxinを産生し得ないことが考えられた。

以上の成績から、生菌免疫の有効性とその持続性は免疫に用いた菌がL型菌として長くRES系に定着し得るか、更に、その定着性にはL型菌に変化するに際してimmunogenic cytotoxinを産生し得るかに否かによって決まる可能性が示唆された。しかも*S. typhimurium* LT2の親株からはL型菌から分離されたcytotoxinが検出し得なかったことから、L型菌由来のcytotoxinが一種のstress proteinの役割を担っていると思われる。今後、cytotoxinの細胞内殺菌機構への作用及び、cytotoxin誘導機構の解析と免疫マウスからcytotoxin反応性のT細胞クローンを樹立することが、cytotoxinがstress proteinとして作用しているかを決定する上で重要であると思われる。

結 語

*S. typhimurium*の強毒株LT2、弱毒株SL1004及び*S. typhimurium*と鞭毛抗原特異相のみ異なる*S. schottmülleri* 8006株を用いて、murine typhoidにおける生菌ワクチンによる免疫成立機構について解析した。

1. 強毒株LT2及び弱毒株SL1004で免疫後30日目以降は肝内より生菌が回収されなくなるが、両菌のL型菌が持続して回収され感染抵抗性も維持された。

2. *S. schottmülleri* 8006投与後も肝内にL型菌の定着が認められ、一過性に*S. typhimurium*に対する感染防禦効果が成立したが、肝内よりL型菌が消失するにつれて抵抗性が減弱した。

3. 生菌ワクチンによる感染抵抗性の成立とワクチンに用いた菌株の肝内でのL型菌定着能に相関性が認められた。

4. 用いたワクチン株が肝内へL型菌として定着するためには親株からL型菌に変化するに際してcytotoxinを産生する能力が必要であると認められた。

5. このcytotoxinはM ϕ 及びPMNに対して高濃度では細胞融解作用を示したが、低濃度をマウスに反復投与することにより一過性には細胞性免疫の関与を認めなかった。

6. *in vitro*で誘導した*S. typhimurium* LT2株及びSL1004のL型菌によってマウスに感染抵抗性を附与し得るこれら2株のL型菌免疫マウス体内における、TNF- α および膜結合型IL-1の産生能が著しく亢進することも認められた。

本論文の要旨は、第64回日本細菌学会総会(平成2年4月)、第44回日本細菌学会関西支部総会(平成3年10

月)に於いて発表した。

稿を終えるに当たり、御指導を賜った椋葉周三教授に深謝します。また細部に渡って種々の助言を賜った喜多英二講師、並びに御協力下さった谷川いゆ子嬢に謝意を表します。

文 献

- 1) Collins, F. M., Mackaness, G. B. and Blande, R. V. : Infection-immunity in experimental salmonellosis. *J. Exp. Med.* **124** : 601, 1966.
- 2) Hsu, H. S. : Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.* **53** : 390, 1989.
- 3) Hochadel, J. F. and Keller, K. F. : Protective effects of passively transferred immune T- or B-lymphocytes in mice infected in *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* **135** : 813, 1977.
- 4) Kita, E., Nishi, K., Emoto, M., Katsui, N., Yasui, K. and Kashiba, S. : Analysis of immunity to infection with *Salmonella typhimurium* in outbred mice. I. Requirement of the antibody to non-O antigen for protection in mice that are not protected by the RNA-rich vaccine. *Immunology* **61** : 535, 1987.
- 5) Angreman, C. R. and Eisenstein, T. K. : Correlation of the duration and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various with antibody titres. *Infect. Immun.* **27** : 435, 1980.
- 6) Kumagai, K., Itoh, K., Hinuma, S. and Tada, M. : Pretreatment of plastic petridishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J. Immunol. Methods* **29** : 17, 1979.
- 7) Kita, E., Takahashi, S., Yasui, K. and Kashiba, S. : Effect of estrogen(17 β -estradiol) on the susceptibility of mice to disseminated gonococcal infection. *Infect. Immun.* **49** : 238, 1985.
- 8) Kita, E., Emoto, M., Oku, D., Hamuro, A., Nishikawa, F., Tanikawa, I., Yasui, K., Katsui, N. and Kashiba, S. : Nonspecific stimulation of host defense by *Corynebacterium kutscheri*. II. Isolation of the active moiety. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **9** : 387, 1990.
- 9) Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A. : A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3** : 645, 1973.
- 10) Mage, M. G., McHugh, L. L. and Rothsteni, T. L. : Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin : Preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. *J. Immunol. Methods* **15** : 49, 1977.
- 11) Kita, E., Emoto, M., Yasui, K., Yasui, K., Katsui, K., Nishi, K. and Kashiba, S. : Cellular aspects of the longer-lasting immunity against mouse typhoid infection afforded by the live-cell and ribosomal vaccines. *Immunology* **57** : 431, 1986.
- 12) Kita, E. and Kashiba, S. : Immunogenicity of the ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium* : analysis of humoral immunity. *Infect. Immun.* **27** : 197, 1980.
- 13) Urushigaki, I. : Definition of tumor necrosis factor and its production mechanism. *Jpn. J. Cancer Chemotr.* **11** : 1356, 1984.
- 14) Kita, E., Emoto, M., Oku, D., Nishikawa, F., Hamuro, A., Kamikaidou, N. and Kashiba, S. : Contribution of interferon γ and membrane-associated interleukin-1 to the resistance to murine typhoid of Ity^r mice. *J. Leuko. Biol.* (in press).
- 15) Mizel, S. B., Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. L. : Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P 388 D. I. Enhancement of LAF production by activated T Lymphocytes. *J. Immunol.* **120** : 1487, 1978.
- 16) Thole, J. E. R., Van Schooten, W. C. A., Keulen, W. J., Hermans, P. W. M., Janson, A. A. M., de Vries, R. R. P., Kolk, A. H. J. and Van Embden, J. D. A. : Use of recombinant antigens expressed in *Escherichia coli* K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of *Mycobacterium bovin* BCG. *Infect. Immun.* **56** : 1633, 1988.
- 17) Mitsuyama, M., Igarashi, K., Kawamura, I., Ohmori, T. and Nomoto, K. : Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cell of *Listeria*

- monocytogenes*. Infect. Immun. **58** : 1254, 1990.
- 18) **Koo, F. C., Peterson, J. W., Houston, C. W. and Molina, N. C.** : Pathogenesis of experimental Salmonellosis : inhibition of protein synthesis by cytotoxin. Infect. Immun. **43** : 93, 1984.
- 19) **Nakane, A., Minagawa, T. and Kato, K.** : Endogenous tumor necrosis factor(Cachectin)is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. Infect. Immun. **50** : 2563, 1988.
- 20) **Sokolovic, Z., Fuchs, A. and Goebel, W.** : Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **58** : 3582, 1990.