

ネズミチフス症における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

安井 潔

ANALYSIS OF VACCINE EFFECT TO THE INFECTION OF *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM IN OUTBRED MICE

KIYOSHI YASUI

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received May 31, 1993

Summary : Two outbred mouse strains, ddY and CF 1, were tested for their ability to be protected against infection with *Salmonella typhimurium* by several types of salmonella vaccines. These strains have the same levels of innate susceptibility to *S. typhimurium*, and also have the same capacity to develop delayed-type hypersensitivity (DTH) to salmonella antigens. Both the crude ribosomal fraction (CRF) and live-cell vaccines conferred acquired resistance on both strains, characterized by greater responses of T cells to salmonella antigens. Mice of the ddY strain were also protected by the purified transfer RNA (tRNA) vaccine, which was free of O antigens, but CF 1 mice were not, despite the presence of T-cell reactivity with salmonella antigens. Neither strain was protected by phenol-water-extracted lipopolysaccharide (LPS). The tRNA-immunized CF 1 mice were protected by transfer of antiserum to CRF, but not by transfer of anti-LPS antibody. This antiserum to CRF, however, did not transfer acquired resistance into non-immune mice of either strain.

These observations suggest that CF 1 mice may require an antibody to another non-O antigen existing in CRF to develop acquired resistance, and that stimulation of the defense system by tRNA may be essential to the development of acquired resistance in CF 1 mice.

The active component in CRF of *Salmonella typhimurium*, capable of inducing protective antibody, was partially purified by two series of chromatography (Sephadex G-150 and DEAE-Sephadex CL 6 B) after sodium dodecyl sulphate (SDS)-treated CRF was precipitated with ammonium sulphate. The major active component was eluted by 0.4-0.45 M NaCl from DEAE-Sephadex CL 6 B, and its molecular weight was 43,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Immunization with the fraction containing 43,000 component alone did not always confer protection on CF 1 mice, but its administration together with either the purified tRNA or Freund's complete adjuvant (FCS) was much more effective against infection with *S. typhimurium*. Western blot analysis showed that 43,000 component did not react to antiserum to LPS, but to antiserum to CRF. The antibody elicited by non-O antigenic component and the cell-mediated resistance stimulated by the adjuvant effect of RNA together confer effective protection on CF 1 mice.

Index Terms

crude ribosomal fraction (CRF), transfer RNA, non-O antigen, protective antibody, cell-mediated resistance

緒 言

ネズミチフス症における免疫成立の機序に関しその主役が細胞性成分によるものか液性成分によるものかについて従来よりそれぞれの立場に立った多くの業績が報告されている。例えば Smith ら^{1),2)} 及び Collins³⁾ はネズミチフス症の免疫は細胞性のものであり T 細胞が主役を担っているとしている。しかしながらネズミチフス症の免疫に関する初期の実験では抗菌抗体の関与が重要であり^{4),5)} この抗体は細胞親和性のものでマクロファージの表面に吸着されていてネズミチフス菌のオプソニンとして作用している。この抗体は細胞親和性の 19S マクログロブリンであり免疫マクロファージとしての機能を与えているとしている⁶⁾。更に抗体の重要性に関しては少なくとも感染初期に於いては B 細胞の重要性を示唆している報告がある⁷⁾。

当教室に於いて喜多らはサルモネラの転位 RNA (tRNA) で免疫した T 細胞⁸⁾ 或いはヌクレオチッドワクチン⁹⁾ を接種したマウスの T 細胞が ddY マウスを使用した場合ネズミチフス症の感染抵抗性を移入することが出来ることを明らかにしている。更に種々のワクチンを使用した場合の感染抵抗性の増強の程度はサルモネラ抗原に対する T 細胞の反応性と平行していることを明らかにしている¹⁰⁾。

しかしながら同じマウスでも CF1 を使用した場合サルモネラ抗原に対する T 細胞の反応性には差は無いが感染抵抗性の増強には液性因子の関与が考えられるので、種々のサルモネラワクチンを使用して両マウス間の相異を検索しネズミチフス症に於ける免疫成立の機序について解析した。

実験材料及び実験方法

1. マウス

ddY マウスは日本 SLC 株式会社より購入した 7~8 週令の雌マウスを使用した。CF1 マウスは当教室において自家繁殖維持中の 7~8 週令の雌マウスを使用した。

2. 使用菌種

Salmonella typhimurium LT 2 株を攻撃株として使用し、本菌の弱毒変異株 SL 1004 株は弱毒生菌ワクチン株として使用した。

LT 2 株をマウス腹腔内に接種した時の LD₅₀ (i.p. LD₅₀) は ddY マウスでは 1×10^3 CFU (colony forming unit) であり CF1 の場合は 5×10^2 であった。

3. ワクチン及びその効果判定

1) リボゾーム分画 (crude ribosomal fraction: CRF) は SL 1004 株を使用し Vennemann ら¹¹⁾ に準じて喜多ら¹²⁾ の方法により作製した。この場合 RNA と蛋白質重量比は 3:2 であった¹³⁾。転位 RNA は喜多ら⁸⁾ の方法により SL 1004 の生菌体を phenol 処理をした水層よりエタノール分画及びイソプロピルアルコール分画により作製し、抗 O 抗体を結合せしめた Sepharose 4 B を使用した affinity column により微量に混在している O 抗原を完全に除去したものを使用した。

2) リポ多糖体 (LPS) は Westphal ら¹⁴⁾ (フェノール法)により LT 2 株より抽出精製して使用した。

3) ワクチンの効果判定はそれぞれのワクチンを変量して投与し 14 日後に 1000 LD₅₀ の LT 2 攻撃により飼育のマウスが生存するに要するワクチン量によりその有効量を測定した。

4) 脾細胞、腹腔細胞及び血清はワクチン接種 14 日目のものを採取し脾臓 T 細胞は Julius ら¹⁵⁾ の方法に準じて無菌的に採取した脾細胞のうちプラスチックシャーレに非付着の細胞を更にナイロンウールカラムを通過させることにより T 細胞画分を得た¹⁶⁾ 更にこのものを抗 θ 抗体及び補体で処理することにより¹⁶⁾ 95%以上の純度で T 細胞を採ることが出来た。

4. マクロファージ活性の測定

1) マクロファージの採取にはチオグリコレート培地をマウス腹腔内に注射 4 日後のマウス腹腔洗液を Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて数回洗浄後 fetal bovine serum (FBS) を 10% に含有する RPMI 1640 に 5×10^7 /ml となるよう調整した細胞浮遊液を 24 穴平底組織培養ボトルに 200 μ l ずつを分注し 5% CO₂ chamber 中で 37°C 2 時間静置後非付着細胞を除去した後の付着細胞をマクロファージの単層細胞培養として使用した。

2) Superoxide anion (O₂⁻) の産生量は ferricytochrome C の還元による着色を光電比色計により測定した¹⁷⁾ 即ち前述の単層培養したマクロファージを HBSS で 1 回洗浄の後 80 μ M ferricytochrome C (type VI,

Sigma C.C.), 及び 2 mM NaNO₃ を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) の 450 μ l を各 well に加え 37°C に加温後 phorbol myristate acetate を 40 μ l/ml に加えた HBSS 50 μ l を加え 5% CO₂ chamber 内で 90 分間加温した。それぞれの検体は採取後 HBSS で 3 倍希釈しその遠沈上清を使用した。30 μ g/ml の superoxide dismutase (type I, Sigma) を加えたもの或いは無細胞のものをコントロールとして 540 nm の吸光度を比較して O₂ 量を算定した。

3) マクロファージの蛋白質は 1 N NaOH 溶液でマクロファージを溶解後 Lowry 法¹⁸⁾ にて測定した。

4) マクロファージの抗菌活性は腹腔マクロファージの *S. typhimurium* の細胞内殺菌作用を Lissner ら¹⁹⁾ の方法に準じて測定した。即ち *S. typhimurium* LT 2 を凝集価以下の濃度の抗菌家兎抗体で 37°C 20 分間処理によりオプソナイズして後マクロファージの 10 倍の菌 (10⁷ CFU) を RPMI 1640 に浮遊せしめたもの 500 μ l をマクロファージ単層培養に加え 5% CO₂ chamber 中で 30 分静置することにより食菌せしめた。その後上清を除去した後 5 μ g/ml のゲンタマイシンを含有する HBSS で一回洗浄した。ゲンタマイシンの本菌に対する最小殺菌量は 4.8 μ g 以下であるため 5 μ g/ml のゲンタマイシンは未食菌(細胞外)の菌の増殖を阻止するに十分な濃度であり、しかもこの濃度で 37°C 2 時間培養したマクロファージ中の本剤の濃度は 0.5 μ g/10⁶ マクロファージであることから、5 μ g/ml のゲンタマイシンの添加により細胞内増殖の菌数のみを測定することが出来る。

マクロファージに菌を加えた直後にゲンタマイシン未添加の HBSS で 2 回洗浄の後 500 μ l の 0.5% デソキシコール酸ソーダ溶液でマクロファージを溶解せしめ平板培養の結果生じた colony 数を (CFU Time 0) とした。残りの well には 10% 非働化 FBS 及び 5 μ g/ml のゲンタマイシンを加えた RPMI-1640 1 ml を加え 5% CO₂ chamber 内で 37°C 40 分間静置した。その後 HBSS で 2 回洗浄の後 0.5% デソキシコール酸ソーダ溶液 500 μ l でマクロファージを溶解し前述と同じ方法で CFU Time 40 を測定した。*S. typhimurium* の細胞内殺菌率は $\{1 - (\text{CFU Time 40}) / (\text{CFU Time 0})\} \times 100$ で表示した。

5. 抗体価の測定

菌体凝集価 (WCA) は Angerman ら²⁰⁾ の法に従い LT 2 株のホルマリン死菌体を凝集原として使用し、抗 O 抗体価は羊赤血球に LPS を吸着させた受身赤血球凝集反応 (PHA) によって行った。

6. リボゾーム分画 (CRF) の精製

CRF の 1 mg を 2% の sodium dodecyl sulfate (SDS) を含有する 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し 37°C 2 時間放置後、10 mM Tris-HCl 緩衝液に 3 日間透析の後透析内液を 36,000 g 1 時間 (4°C) の高速遠沈を行い SDS を除去した。この上清の硫酸 40% ~ 80% 飽和の画分を 10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し同じ緩衝液で 48 時間透析した。このものを同じ緩衝液で平衡化した Sephadex G 150 のカラム (1.0 x 55 cm) を使用してゲル濾過を行った。この void volume 分画を DEAE-Sepharose CL 6 B カラム (2 x 30 cm) を通過させて後食塩濃度を 0.05 M ~ 0.8 M に直線的に変化させた gradient elution を行った。

7. P-C 免疫マウス腹腔細胞抽出液の作製

P-C 30 μ g/マウスを FCA (Freund's complets adjuvant) と共に 150 匹の CF 1 マウスの背部皮下に接種し 14 日後の腹腔細胞を採取した。Rowley ら⁶⁾ の法に従い細胞浮遊液を数回凍結融解を行い遠沈により HBSS で洗浄の後 2 M 尿素による抽出を 2 回行いこの抽出液を HBSS に対し 4°C で 48 時間の透析を行い限外濾過により原量にまで濃縮した。このものを 10 mM リン酸緩衝液 (PH 7.2) で平衡化した Sephadex G 200 によるゲル濾過を行いその void vol. を集めて限外濾過により濃縮してゲル内沈降反応に使用した。

8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

SDS-PAGE は Daemmli²¹⁾ の法に準じ 10% のゲルを使用して行った。検体は 100°C 5 分の加熱と 2-mercaptoethanol で還元して後電気泳動した。Coomassie blus R で 2 時間染色の後 4% 酢酸加 40% メタノールにより脱染した。

9. Western blot assay

Western blot assay は Burnette の法²²⁾ によって行った。電気泳動後直ちにニトロセルローズ膜に転写し、0.5% Tween 80 含有のほう酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有の緩衝液に 100 倍希釈の抗 CRF マウス血清或いは 50 倍希釈の抗 LPS マウス血清を加えた BSA 含有ほう酸緩衝液中で 25°C 1 時間放置後、洗浄し horseradish peroxidase (HRPO) を結合した抗マウス Ig 羊抗体を作用させ基質としての diamino benzidine (DAB) 溶液に浸し、H₂O₂ 溶液を滴下して発色させた。

実験結果

1. ddY マウスと CF 1 マウスの *S. typhimurium* に対する感受性の比較

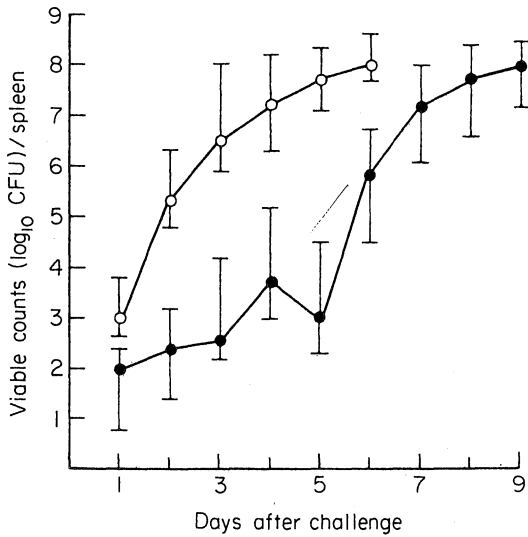


Fig. 1. Log₁₀ viable count (colony-forming units, CFU) of *S. typhimurium* LT2 in spleens from ddY (●—●) and CF1 (○—○) mice. Each point represents the geometric mean count of *S. typhimurium* per spleen as derived from five mice. The bars depict the range of counts. Intraperitoneal challenge dose was 10⁶ CFU for ddY mice and 5 × 10⁵ CFU for CF1 mice.

ddY マウスの *S. typhimurium* LT2 株に対する LD₅₀ は 10³ であり、CF1 マウスのそれは 5 × 10² である。CF1 マウスの場合 1000 LD₅₀ の LT2 株を腹腔内注射をした場合図 1 に示す如くその脾内菌数は逐日的に増加し 3 日乃至 6 日で死に至るが、ddY マウスの場合その脾内菌数は菌接種後 5 日目迄は殆ど増加せず 6 日目より急激に増加して 7~9 日目に最高値に増加して死に至ることが判明した。これら 2 系のマウスの最終的致死量は、LD₅₀ で比較する限り著明な差は見られないが 1000 LD₅₀ の腹腔内接種の場合の脾内菌数の推定に著しい差が見られることは両マウス間における感染初期の反応性に相異のあることを示している。

2. 感染抵抗性を賦与するワクチンの種類

ddY マウスと CF1 マウスに 1000 LD₅₀ の LT2 株攻撃に対し有効な感染抵抗性を賦与するワクチンの種類は表 1 に示す如く、ddY マウスに於いては弱毒生菌ワクチン (SL 1004) の 6 × 10⁶ CFU、CRF (20 μg) 及び tRNA (10 μg) の投与により全マウスが生存するに反し、CF1 マウスの場合には弱毒生菌 6 × 10⁶ 及び CRF 30 μg の投与により完全な感染抵抗性が成立するが tRNA は殆ど無効であり、LPS は両マウス共に全く無効であった。

3. 遅延型足腫反応

Table 1. Protective capacity of salmonella vaccines in both mouse strains

Vaccine type*	% survival against a challenge of 1000 LD ₅₀	
	ddY	CF1
Live cells		
4 × 10 ⁶	95 (27.2)†	75 (22.3)
6 × 10 ⁶	100	100
CRF		
5 μg	80 (24.6)	75 (24.8)
10 μg	85 (25.5)	80 (25.6)
20 μg	100	90 (28.3)
30 μg	100	100
tRNA		
5 μg	80 (25.3)	0 (7.4)
10 μg	100	0 (8.6)
20 μg	100	10 (13.4)
100 μg	100	10 (10.5)
LPS		
1.0 μg	0 (7.5)	0 (5.0)
10 μg	0 (9.5)	0 (5.2)
100 μg	0 (8.4)	0 (4.8)
Saline	0 (7.2)	0 (4.5)

*Each group consisted of 10 mice and was challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of strain LT2 for each mouse strain 14 days after immunization. Survival rate was determined at 30 days post-challenge.

†Numbers in parentheses indicate mean time to death (MTD; days).

Table 2. Delayed footpad responses in ddY and CF1 mice after immunization with salmonella vaccines

Vaccine type*	Delayed footpad swelling (×0.1 mm)	
	ddY	CF1
Live cells	13.8 ± 2.4 (P < 0.01)†	15.6 ± 3.2 (P < 0.01)
CRF	15.2 ± 4.3 (P < 0.01)	16.2 ± 2.8 (P < 0.01)
tRNA	10.4 ± 3.1 (P < 0.01)	12.3 ± 2.6 (P < 0.01)
LPS	3.5 ± 1.2	3.4 ± 1.6
Saline	2.3 ± 0.8	2.7 ± 0.5

*Groups of five mice were immunized with the optimal dose of the designated vaccine and tested for footpad response 14 days later. Footpad swelling was measured 24 hr after footpad injection of salmonella antigen.

†Mean ± SEM. The level of significance for the observed frequencies was determined by the student's *t*-test.

各種のワクチンを使用した場合に見られるサルモネラ抗原に対する遅延型足腫反応は表 2 に示す如く両系のマウスに差は見られず LPS には無反応であった。

4. マクロファージ活性の比較

各種ワクチン接種 14 日後の ddY マウス及び CF1 マウスのマクロファージ活性について O₂ 産生量と *S. typhimurium* LT2 株に対する細胞内殺菌能について比

Table 3. Superoxide anion (O_2^-) release and intracellular killing of *S. typhimurium* by macrophages of ddY and CF 1 mice

Vaccine type	Macrophage activity*			
	O_2^- production		Intracellular killing	
	ddY	CF 1	ddY	CF 1
Live cells	198.7±13.6† (P<0.05)	174.5±20.3 (P<0.05)	65.4±3.5† (P<0.05)	60.5±4.3 (P<0.05)
CRF	224.8±20.5 (P<0.05)	206.2±15.8 (P<0.05)	70.8±4.6 (P<0.05)	72.6±3.2 (P<0.05)
tRNA	154.3±13.4 (P<0.05)	133 ±20.5 (P<0.05)	54.2±3.8 (P<0.1)	48.5±2.5 (P<0.1)
LPS	94.6± 9.4	98.7±10.2	40.4±2.7	39.9±3.2
Saline	70.4±10.3	82.3±14.7	36.5±4.2	35.4±5.6

Data were obtained from three different experiments and expressed as the mean±SEM for triplicate cultures.

* O_2^- production was expressed as n mols/60 min/mg protein. Intracellular killing was expressed as percentage killing during the 40-min incubation.

† Statistical significance was determined by Student's *t*-test.

Table 4. Antibody responses in ddY and CF 1 mice after immunization with salmonella vaccines

Vaccine type*	Antibody responses (\log_2)†			
	WCA titres		Anti-LPS HA titres	
	ddY	CF1	ddY	CF1
Live cells	7	9	5	7
CRF	12	10	8	9
tRNA	ND	ND	ND	ND
LPS	6	6	7	8
Saline	ND	ND	ND	ND

WCA : whole-cell agglutination. Anti-LPS HA : anti-LPS haemagglutination. ND : not detectable.

*Each group consisted of five mice and sera were obtained 14 days after immunization.

† Data were obtained from two different experiments and expressed as the mean of five mice.

較した。表3に示す如く弱毒生菌ワクチン (SL 1004 株), CRF 及び tRNA は何れのマウスにも同程度の活性化を示していたが LPS には殆ど効果は認められなかった。

5. 抗体産生能

免疫 14 日後の両マウスの血清を採取しそれぞれの抗体価を凝集原を LT 2 株のホルマリン死菌体 (WCA) とした場合と LPS を結合せしめた羊赤血球を使用するの受身赤血球凝集反応 (PHA) で比較した。表 4 に示す如く CRF で免疫した場合両系マウス共に WCA に対し最も高い凝集価を示し LPS 免疫では中等度の, tRNA では両系マウス共抗体産生は認められなかった。

6. サルモネラ抗原に対する特異的 T 細胞増殖

Table 5. Salmonella-specific T-cell proliferative responses

Vaccine type*	Proliferative response ($[^3H]$ -TdR uptake c. p. m./ 5×10^6 cells)†	
	ddY	CF1
	Live cells	16,240±1,120 (11.7)‡
CRF	18,540±2,430 (13.4)	17,280±1,960 (12.1)
tRNA	14,330±1,280 (10.3)	12,090±1,243 (8.5)
LPS	1,869± 358	1,630± 196
Saline	1,380± 275	1,420± 215

*The T-cell fractions were prepared from splenocytes of mice immunized with salmonella vaccines.

† T cells cultured with accessory cells (5×10^3) and heatkilled LT2 (10^7) for 4 days. Values were mean c. p. m. ±SEM for triplicate cultures.

‡ Numbers in parentheses indicated the stimulation index. Stimulation index = c. p. m. of test sample/c. p. m. of control sample.

前述の遅延型足蹠反応に加えてそれぞれのワクチンで免疫した両系マウスの脾細胞より採取した T 細胞に *S. typhimurium* LT 2 株の加熱死菌を加えたサルモネラ抗原による免疫マウス T 細胞増殖促進作用を [3H] thymidine の DNA への取り込みを指標に検索した。表 5 に示す如く弱毒生菌 (SL 1004), CRF 及び tRNA で免疫したマウスの T 細胞はサルモネラ抗原の添加により両系マウスとも同程度の増殖促進作用を示したが, LPS 免疫のマウスでは反応は認められなかった。

7. tRNA 免疫 CF 1 マウスに及ぼす抗体の影響

tRNA で免疫した CF 1 マウスに弱毒生菌 (SL 1004) 或いは CRF で免疫した CF 1 マウス血清を腹腔内注射

することにより感染抵抗性に及ぼす抗体の意義を検索した。表6に示す如く弱毒生菌及びCRFによる免疫血清中にはtRNA免疫CF1マウスに感染抵抗性を賦与する能力があるが、抗LPS抗体にはその能力がないことが判明した。

8. CRF中の抗原物質の精製

1) 上記の実験の結果からtRNAで免疫したCF1マウスに強い感染抵抗性を賦与するLPS以外の抗原物質の存在が考えられるのでCRF中よりのこの抗原物質の分離精製を試みた。SDS処理をしたCRFをSephadex G-150カラム(1.0 x 55 cm)によりゲル濾過を行い(図1(a))そのvoid volume(P-I)とP-IIに分画しそれぞ

Table 6. Effect of immune serum transfer on resistance in CF1 mice immunized with tRNA vaccine

Serum donors*	% survival at 30 days post-challenge†
Normal mouse	0 (6.2)
LPS-immunized mouse	10 (15.4)
CRF-immunized mouse	90 (26.5) p<0.01
Live-cell immunized mouse	85 (25.8) P<0.01

*Sera were obtained from 20 mice immunized with indicated vaccines. Groups of 10 CF1 mice that were immunized 14 days previously with 20 µg of tRNA received intraperitoneally 0.4 ml pooled serum of each immune group and were challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of strain LT2 3 hr later.

†Data were obtained from two different experiments, and numbers in parentheses indicate MTD.

れの活性を測定した結果、表7上段に示す如く活性物質はP-1に存在することが判明したのでP-1を更にDEAE-Sephadex CL 6Bによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果は表7下段に示す如くその活性はP-Cに存在することが実証された。即ちP-Cによる免疫により60%のマウスが生残し、更に平均死亡日数(MTD)も25.4日と著明に延長した。ホルマリン死菌に対する凝集素価(WCA)も増大したが遅延型足蹠反応は逆に減少が認められた。P-DによるMTDの延長及び足蹠反応の増大はイオン交換体に残留した核酸成分が0.5MのNaClによって溶出されたものと考えられる²⁰⁾。即ちP-Cによる免疫効果は細胞性のものより液性の抗体がその主役であると考えられる。ゲル内沈降反応に於いても(図2c)抗P-Cマウス血清(well B₁)はP-Cに対し一本の沈降線を形成するが抗LPS血清或いは抗B群因子血清に対しP-Cは反応しない。この事はP-C中に存在する感染防禦抗原はO抗原(LPS)以外のものであることを示唆するものである。

2) P-CのSDS-PAGEの所見は図2aに示す如く分子量43,000のタンパク質でありHRPOを結合した抗マウスIg羊抗体を使用したWestern blot法によっても、抗CRFマウス血清はP-I中のタンパク質を多数認識すると共に(図2(b)A)P-Cに関しては一個の蛋白質(43 kDa)のみを認識した(図2(b)B)だけで抗LPS抗体に対しては無反応であった(図2(b)C)。

9. tRNA免疫マウスに対する抗P-Cマウス血清の影響

Table 7. Immunogenicity of fractions of CRF obtained by chromatography on Sephadex G-150 and DEAE-Sephadex CL 6B

Fractions	Survival rate at 30 days post-challenge (%)*	WCA titres (log ₂)†	Delayed footpad response (×0.1 mm)‡
P-I (G-150)	80(27.8)	9	10.2±2.3(P<0.01)
P-II (G-150)	10(10.6)	—	7.5±1.4(P<0.05)
P-A (DEAE-Sephadex)	0(4.9)	1	2.6±0.7
P-B (DEAE-Sephadex)	0(5.0)	1	6.9±1.9(P<0.1)
P-C (DEAE-Sephadex)	60(25.4)	7	3.6±1.5
P-D (DEAE-Sephadex)	0(16.2)	—	8.3±1.8(P<0.05)
Saline control	0(4.6)	—	2.5±0.8

*Groups of 10 mice were immunized intraperitoneally with 20 µg of each sample and were challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of strain LT2 12 days later. Number in parentheses indicated MTD (mean time to death).

†Serum titres of whole-cell agglutinin expressed as mean values of five mice (log₂); (—) not detectable.

‡Groups of five mice were immunized in the same way and the footpad test was performed 12 days later. Data were expressed as the mean values±SEM for five mice. The levels of significance for the observed frequencies were determined by Fisher's test for 2×2 tables or Student's t-test

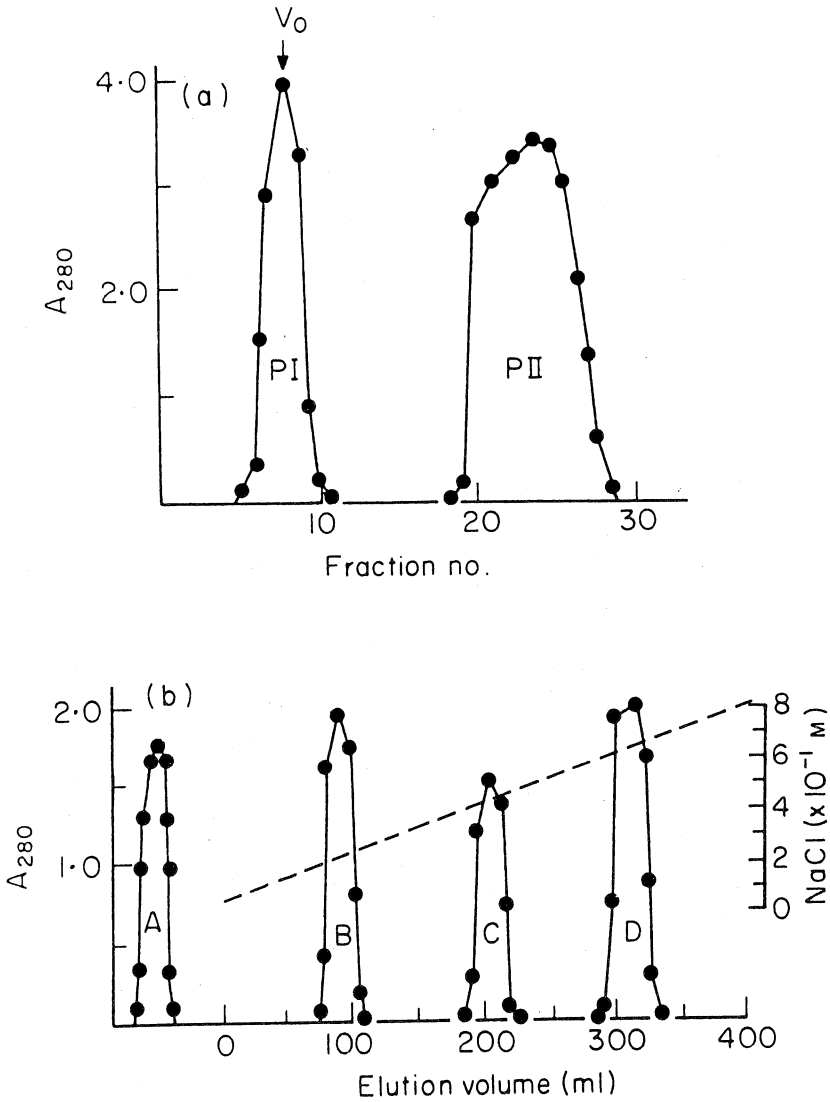


Fig. 2. (a) Chromatographic separation of the SDS-treated CRF on a column (1.0×55 cm) of Sephadex G-150 pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. A 5ml fraction was collected (flow rate 5 ml/hr). V_0 : void volume. (b) DEAE-Sepharose CL 6 B ion exchange chromatography of the void fraction (P-I) obtained by chromatography on Sephadex G-150. The sample was applied to a 2×30 cm DEAE column. After the sample had entered the column, the column was washed with 200 ml of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, followed by a 0.05-0.8 M NaCl gradient (400 ml total volume). Five-millilitre fractions were collected.

表 8 に示す如く P-C に対するみ抗体のみを投与したマウスではある程度の生存日数の延長が認められるのみであるのに対し $30 \mu\text{g}$ の tRNA で免疫 14 日目に抗 P-C 抗体を投与した場合高度の免疫効果(生存率 85%, MTD 28.6)の発現が認められた。一方 tRNA 免疫マウ

スに抗 LPS 抗体(抗 O 抗体)を投与しても殆ど免疫効果(生存率 15%, MTD 11.8)の発現は認められなかった。

10. P-C 免疫マウス腹腔細胞抽出液中の抗体
 P-C で免疫したマウスの腹腔細胞抽出液と P-C との間にはゲル内沈降反応に於いて抗 P-C マウス血清と P-

Table 8. Transfer of anti-Peak C antiserum into mice previously immunized with tRNA

Recipients	Transferred serum*	Survival rate at 30 days post-challenge (%)†	MTD‡ (days)
tRNA-immunized	Anti-P-C antiserum	85 (P<0.01)	28.6
tRNA-immunized	Anti-LPS antiserum	15 NS	11.8
tRNA-immunized	Normal mouse serum	10 NS	12.5
Normal control	Anti-P-C antiserum	0	9.5
Normal control	Anti-LPS antiserum	0	6.2
Normal control	Normal mouse serum	0	4.8

*Antiserum to Peak C or to LPS was given intraperitoneally to mice that had been vaccinated with 30 μg of tRNA 14 days before or to normal mice. Each group consisted of 10 mice and received 0.4 ml of antiserum per mouse.

† Intra-peritoneal challenge with 1000 LD₅₀ of strain LT2 was carried out 3 hr later. NS, statistically not significant by Fisher's test for 2×2 tables.

‡ Mean survival days of dead mice.

Cの間に見られる一本の沈降線と fuse する一本の沈降線が認められた(図 3(c), well B 2)。このことは抗 P-C 抗体は腹腔マクロファージに親和性を持つ細胞吸着性の抗体であることを示唆している。

11. P-C のワクチン効果と tRNA との相乗効果

P-C 或いは tRNA のみでは CF 1 マウスに対して十分な免疫効果を与えることが出来なかったので、この両者を混合して使用した結果表 9 に示す如く CRF 免疫の場合とほぼ同等の免疫効果を維持することが出来た。しかしながら LPS ではこのアジュバント効果は見られず、FCA 使用することによってある程度の免疫効果の発現が認められた。

考 察

ネズミチフス症に於いてリボゾームワクチンの有効性については著者が使用した非近交系のマウスの場合は肯

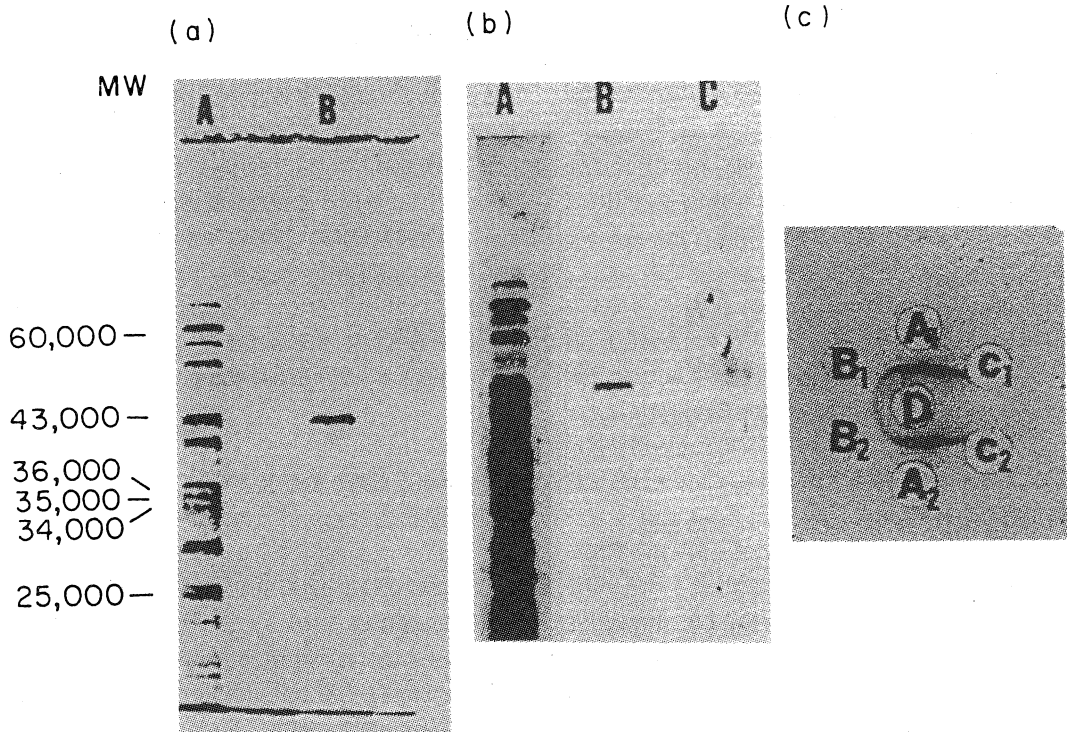


Fig. 3. (a) Ten percent SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (A) fifty micrograms of the Peak I (Sephadex G-150). (B) Twenty micrograms of the Peak C (DEAE-Sephadex CL 6B). Both samples were heated for 5 min at 100°C, and were reduced with 2-mercaptoethanol. Electrophoresis was carried out at a constant current of 20 mA until the tracking dye had run 10 cm into the separating layer. (b) Western blot analysis: (A) Peak I; (B and C) Peak C. The first antibody was anti-CRF mouse serum (A and B) and anti-LPS mouse serum (c). The second antibody was HRPO-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin. (c) Ouchterlony immunodiffusion analysis. A₁: anti-CRF mouse serum; A₂: anti-Peak I mouse serum; B₁: anti-Peak C mouse serum; B₂: immune Mφ extract (void fraction of Sephadex G-200); C₁: anti-LPS mouse serum; C₂: salmonella group B typing serum; D: Peak C.

Table 9. Enhancement of immunogenicity of Peak C by administration with FCA or tRNA

Supplementa- tion*	Survival rate at 30 days post- challenge (%)†	Delayed footpad response (×0.1 mm)‡	T-cell response (³ H)TdR uptake)§
tRNA	85(P<0.01)	11.5±2.2(P<0.05)	10,625±324(P<0.01)
FCA	70(P<0.01)	9.8±2.7(P<0.05)	8,960±245(P<0.1)
LPS	10	3.6±1.5	1,403±276
Saline	0	2.8±0.7	1,370±264

* Twenty micrograms of Peak C were mixed with 20 µg of tRNA, 30 µg of LPS or an equal volume of FCA or saline, respectively.

† Groups of 20 mice were immunized subcutaneously at the base of the tail with each mixed vaccine. Ten mice of each group were challenged intraperitoneally with 1000 LD₅₀ of strain LT2 14 days after immunization. *P* values were determined by Fisher's test for 2×2 tables.

‡ Five mice of each group were subjected to the footpad test, and data were expressed as the mean values±SEM for five mice. *P* values were determined by Student's *t*-test

§ T cells were obtained from the remaining five mice at 14 days post-immunization and stimulated with salmonella antigen. Data were expressed as the mean c.p.m. ±SEM for triplicate cultures

定的な報告が多く成されているが近交系マウスを使用した場合は使用したマウスの系統により異なったパターンを示すことが報告されている²³⁾²⁴⁾.

著者は非近交系の2系のマウス(ddY及びCF1)を用い細胞性免疫応答は同等であるにもかかわらずtRNAワクチンによる感染防禦能の獲得に関して差のあることを示した。

即ちddYマウスに於いてはtRNA投与により完全な感染抵抗性が得られるに反し、CF1マウスの場合DTHによって示される細胞性免疫能は同程度であり、しかもマクロファージのO₂産生能や細胞内殺菌能更にはサルモネラ抗原刺激によるT細胞増殖反応にも著明な差が無いにも拘らずtRNAワクチンのみによっては殆ど感染抵抗性の増加が見られなかった。しかもCRF免疫マウスの血清の添加によりほぼ完全な感染抵抗性の発現が見られるに反し、LPS免疫マウス血清にはその能力がないという事実は、CRFには存在するがLPS中には存在しないO抗原以外の有効な抗原物質の存在を示唆するものである。phenol抽出によったLPSやtRNAには菌体或いはCRF由来タンパク質は殆どphenol層に移行するので、この有効な抗原物質を得るため著者はSDS処理をしたCRFをSephadex G-150によるゲル濾過及びDEAE-Sephadex CL6Bによるイオン交換クロマトグラフィーにより分子量43,000のタンパク質分画(P-C)を得た。このものはWestern blot analysisにより抗CRF抗体と反応する主要なタンパク質抗原であることが示された。更にこの物質単独ではCF1マウスに完全

な感染抵抗性は賦与し得ないがtRNAやFCAを混合することにより高度の感染抵抗性を獲得し得ることが示された。

著者の実験のうちP-Cに対するゲル内沈降反応において抗P-C血清はP-C免疫腹腔細胞抽出液と一本のfuseする沈降線を形成し抗CRF抗体或いは抗P-1抗体による数本の沈降線の一つであることは細胞親和性抗体の重要性について述べている牛場ら²³⁾の意見に同調するものであり抗体の関与を強調しているEisensteinら²⁴⁾の意見とも一致するものである。

結 語

著者は非近交系のddY及びCF1マウスを使用して以下の実験結果を得た。

1. ddYマウスとCF1マウスはLD₅₀で比較する限り大差は無いがLT2株の1000LD₅₀という大量を腹腔内接種した場合CF1マウスに於いてはその脾内菌数は接種直後から逐日的に増加し6日以内で最高値に達してマウスを死に至らしめるが、ddYマウスの場合は脾内菌数は6日目より増加を開始し9日目でCF1のそれと同程度の菌数に達しマウスを死に至らしめる。

2. 感染抵抗性を賦与するワクチンの種類としてはddYマウスとCF1マウスの差は前者の場合tRNAが有効であるに反しCF1マウスでは無効であるという点である。しかしtRNA免疫マウスに於ける遅延型足蹠反応性、マクロファージの活性化の指標として用いたO₂産生能と細胞内殺菌能及び免疫マウスのT細胞のサル

モネラ抗原に対する反応性等に関しては両マウス間に差は見られず細胞性免疫能に関する限り両系マウスに差の無いことが明らかにされた。

3. CRF 免疫の結果両系マウス共 WCA に対し高い凝集価を示したが, tRNA によって抗体価の上昇は認められなかった。

4. tRNA 免疫 CF 1 マウスに対し感染防禦的に有効なワクチン(弱毒生菌及び CRF)で免疫した CF 1 マウスの血清を加えることにより高度の感染抵抗性を賦与する事が出来た。

5. CRF より分離精製した P-C 分画は O 抗原以外のタンパク質(43 kDa)であり, CF 1 に於ける感染抵抗性の主役は液性因子(細胞親和性抗体)であることが示唆された。

6. CF 1 に感染抵抗性を賦与するワクチンの主体は O 抗原以外のタンパク成分であり tRNA や FCA は adjuvant として作用していることが考えられる。

本論文の要旨は第 60 回日本細菌学会総会(昭和 62 年, 東京)において発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました樗葉周三教授に深謝いたします。更に種々の御指導, 御援助を戴きました喜多英二助教授及び細菌学教室の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) **Smith, R. A. and Bigley, N.** : Ribonucleic acid-protein fractions of virulent *salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect. Immun.* **6** : 377-383, 1972 a.
- 2) **Smith, R. A. and Bigley, N.** : Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid-protein fraction of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **6** : 384-389, 1972 b.
- 3) **Collins, F. M.** : Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol. Rev.* **38** : 371-402, 1974.
- 4) **Jenkin, C. R. and Rowley, D.** : Basis for immunity to typhoid in mice and the question of 'cellular immunity'. *Bacteriol. Rev.* **27** : 391-404, 1963.
- 5) **Collins F. M.** : Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* on nonvaccinated mice challenged by various routes. *J. Bacteriol.* **97** : 667-683, 1969.
- 6) **Rowley, D., Turner, K. and Jenkin, C. R.** : The basis for immunity to mouse typhoid. III. Cell bound antibody. *Aust. J. Exp. Biol.* **42** : 237-248, 1964.
- 7) **Hochadel, J. F. and Keller, K. F.** : Protective effects of passively transferred immune T- and B-lymphocytes in mice infected with *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* **135** : 813-823, 1977.
- 8) **Kita, E. and Kashiba, S.** : Immunogenicity of transfer RSA isolated from a two-heptose rough mutant of *Salmonella typhimurium* LT 2 in mouse typhoid infection. *Immunology* **50** : 369-376, 1983.
- 9) **Kita, E., Matsuura, H., Masuda, S., Tomihata, S. and Kashiba, S.** : Immunogenic dialyzable factor derived from a ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. I. preparation of the protective dialyzable factor from the ribosomal fraction by the freeze-thaw procedure. *Microbiol. Immunol.* **27** : 7-24, 1983.
- 10) **Kita, E., Yasui, K., Katsui, N., Nishi, K. and Kashiba, S.** : Cellular aspects of the longer-lasting immunity against mouse typhoid infection afforded by the live-cell ribosomal vaccines. *Immunology* **57** : 431-435, 1986.
- 11) **Venneman, M. R., Bigley, M. J. and Berry, L. J.** : Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **1** : 574-582, 1970.
- 12) **Kita, E. and Kashiba, S.** : Immunogenicity of the ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium* : analysis of humoral immunity. *Infect. Immun.* **27** : 197-203, 1980.
- 13) **Kita, E., Matsuda, Y., Matsuda, K. and Kashiba, S.** : Separate transfer of mouse protection and delayed-type hypersensitivity with *Salmonella typhimurium* transfer factor. *Cell. Immunol.* **87** : 528-537, 1984.
- 14) **Wesphal, O., Luderitz, O. and Bister, F.** : Über die extraktion von Bakterien mit phenol-wasser. *J. Naturforsch.* **7B** : 148-155, 1952.
- 15) **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** : 645-649, 1973.

- 16) **Golub, E. S.** : Brain-associated θ antigen : reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells. *Cell. Immunol.* **2** : 353-358, 1971.
- 17) **Johnston, R. B., Godzik, C. A. and Cohn, Z. A.** : Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* **148** : 1515-1556, 1978.
- 18) **Lowry, O. H., Rosenbough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
- 19) **Lissner, C. R., Swanson, R. N. and O'Brien, A. D.** : Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium* : expression of the Ity gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in Vitro*. *J. Immunol.* **131** : 3006-3013, 1983.
- 20) **Angerman, C. R. and Eisenstein, T. K.** : Correlation of the duration and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various vaccines with antibody titers. *Infect. Immun.* **27** : 435-443, 1980.
- 21) **Lamli, U. K.** : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227** : 680-685, 1970.
- 22) **Burnette, W. N.** : Western Blotting : electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analyt. Biochem.* **112** : 195-203, 1981.
- 23) **Ushiba, D., Nakae, T., Akiyama, T. and Kishimoto, T.** : Characterization of 'clearance' factor and 'cell-bound' antibody in experimental typhoid. *J. Bacteriol.* **9** : 1705-1712, 1966.
- 24) **Eisenstein, T. K., Killar, L. M. and Sultzer, B. M.** : Immunity to infection with *Salmonella typhimurium* : mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J. Infect. Dis.* **150** : 425-435, 1984.