

緑膿菌自家融解ワクチンの生体の免疫反応に及ぼす影響

佐藤平二・故渋谷明宏・岡本嘉六*

(家畜微生物学教室・*獣医公衆衛生学教室)

平成元年8月10日 受理

Effects, on the Immune Response, of *Pseudomonas aeruginosa* Autolyzed Vaccine

Heiji SATO, Late Akihiro SIBUTANI and Karoku OKAMOTO*

(Laboratory of Veterinary Microbiology and *Laboratory of Veterinary Public Health)

緒 言

緑膿菌感染の問題は獣医学領域においても、ミンクの出血性肺炎、ウシ乳房炎、イヌの耳炎、尿路感染症などの原因として注目されるようになってきた。緑膿菌(以下 Ps. と略)は本来、各種抗生物質に対して耐性を獲得し易いことなどから、緑膿菌感染症(以下 Ps 症と略)の治療は困難を伴うことが多い。Ps. は多くの動物においては正常細菌叢を構成するものであり、Ps 症の発症は生体側の要因によるものとされているが、特に医原病としての Ps. による菌交代症の問題は深刻である。この問題解決の一策としてワクチンによる免疫が考えられており、著者らも Ps. 菌の自家融解ワクチンがマウスの実験感染に効果のあることを報告した²⁵⁾。しかしながら、Ps 菌菌交代症の予防的手段としてのワクチンネーションは、生体の免疫の低下している状態においても感染防御能を持つことが必要である。著者らは先に、副腎皮質ホルモン投与マウス²⁶⁾および放射線照射マウス²⁷⁾に対する Ps. ワクチンの有効性を調べたところ、コバルト60全身照射マウスでは照射後12日から16日までの間はワクチンによる自動免疫、抗血清による受身免疫の何れもあまり奏功せず、獲得した免疫も抑制されているが、照射後20日目までにはもとの免疫状態に戻ることを報告した。かかる免疫能の一過性の抑制現象を解明するには、ワクチンの生体免疫系に対する作用の詳細を知ることが必要である。また、Ps. 自家融解ワクチンは免疫の発現が早く、かつ強力な防御能を与え微量でも有効であるなど^{25, 28)}の点から、通常のワクチンとはやや趣を異に

している事もあり、その免疫機序について興味もたれていたため、それらを明らかにするための基礎的実験として、本報では Ps. 自家融解ワクチンの補体系、マクロファージに対する影響、脾臓の抗体産生細胞、B細胞、T細胞に及ぼす影響等について述べる。

実験方法

1. 実験動物

マウスは日本クレアKKで生産されたJCL-ICR系自然マウス雌5~6週齢、体重22~26gを使用した。ラットは本学科家畜薬理学教室で繁殖されたWister系雄7~8週齢、体重230~300gのものをを使用した。マウス、ラットともすべて水道水、固形飼料(オリエンタル酵母KK製)で飼育した。使用マウス、ラットは予め検疫を行ったが、緑膿菌の検出されたものはなかった。イヌは6ヶ月齢の同腹の雌(雑種)、体重6~8kg、3頭を供した。イヌは生後1ヶ月齢より清浄な環境で飼育した。

2. 使用菌株とMMAF (Minimal Medium Autolyzed Filtrate) ワクチン調整法

ワクチンの調製と攻撃に用いた菌株およびワクチン調整法は前報²⁸⁾同様である。

3. 動物のワクチンネーションと緑膿菌による攻撃

マウスには放射線全身照射あるいは攻撃の4日前にMMAFワクチン0.5mlをipルートより1注射した。ラットに対しては4日間隔で2回1mlずつ腹腔注射した。また、イヌには1mlを皮下注射した。攻撃用緑膿菌の調製法と攻撃法は前報²⁸⁾と同じである。

4. γ線照射

プラスチック製透明円形容器（直径24.5cm、高さ4.5cm）に約15匹のマウスを入れ本学部 RI 実験室の Cs¹³⁷ γ線照射装置（Gammacell 40, Atomic Energy of Canada Ltd. Co. 製）により500 rad の吸収線量を得るように全身照射を行った。

5. 血清および細胞の採取と輸注

(1) 血清の採取と投与

エーテル麻酔したマウスの腋窩動脈を切断し、無菌的に採血した血液をプールしたのち血清を分離した。血清は PBS で2倍に希釈し、recipient マウス1匹あたり0.5mlづつ菌攻撃直前に腹腔注射した。

(2) 腹腔細胞の採取と輸注

グリコーゲン（片山化学 KK）の1%液0.5mlを腹腔に注射し、4日目に放血死させ、氷冷ヘパリンソーダ（5 unit/ml）加ハンクス液（pH 0.7）で腹腔より無菌的に細胞を採取した。細胞は滅菌 PBS で2回洗浄し、10⁵~10⁷/mlの細胞を含むように浮遊させ、攻撃直前に0.5mlづつ腹腔に注射した。

(3) 脾臓細胞の採取と輸注

放血死させたマウスより無菌的に脾臓を取り出し、前記ハンクス液中でよくほぐしながら細胞を単離させ、ステンレスメッシュ（#150）で濾過し滅菌 PBS で2回洗浄後10⁷~10⁸/mlの細胞を含むように浮遊させ、マウス1匹当たり0.5mlを攻撃直前に腹腔注射した。

6. マウス脾臓中の19S 溶血素産生細胞数の測定

MMAF 免疫マウスおよび免疫後γ線照射マウスにつき所定の期日に脾を取り出し、19S 溶血素産生細胞数（IgM-Plaque Forming Cell 数）を調べた測定法は斎藤ら²³⁾が試みた方法にしたがった。

7. MMAF ワクチンの細胞毒性と Migration

Inhibition Factor (MIF) 活性

MMFA ワクチンを凍結乾燥により10倍に濃縮し、それを原液として10倍希釈したものを、当教室で継代している Vero 細胞培養液 6 ml に0.5mlずつ加えてその影響をみた。ワクチンの添加はシートのできる前に行い、培養後のシートのできかたにより判定した。

MIF 活性は4日間隔で2回免疫したマウスのさらに4日後にγ線を照射し、照射後4, 8, 12, 16, 20日目マウスについて夏梅²²⁾のアガロース滴を用いるマクロファージ遊走阻止試験間接法により測定した。

8. カラジナーンの MMAF ワクチンの効果に及ぼす影響

(1) 感染防御試験

カラジナン（Type III, Sigma 社製）の4 mg/ml 液（生食水）を調製し、マウスの免疫前、免疫と同時に、免疫後に体重10 g 当たり0.5mlを腹腔に注射して1.33×10⁴ CFU/0.5mlを含む菌ムチン懸濁液で攻撃した。

(2) マウス脾臓中の抗 LPS 抗体産生細胞数の算定

算定法は概ね Möller²¹⁾に準じたが、ヒツジ血球の代わりにヤギの血球を用いた。同種マウスとヤギのそれぞれの血球（packed）1容に LPS（*E. coli* 055: B5, Difco 製）2容（1 mg/ml saline）をよく混合し、37°C 30分間反応させて、生食水で3回洗浄し、最後に Eagle's MEM で洗浄し、40%の割合に Eagle's MEM に浮遊させた。LPS でコートした同種マウス赤血球の10%液、0.5mlをマウスに腹腔注射し、4日後 PFC を調べた。免疫などのスケジュールは Table 4-1 に示した。抗 LPS 抗体産生細胞数の算定は斎藤ら²³⁾の方法に従った。

9. MMAF ワクチンの血清補体価および別経路補体活性への影響

MMAFをマウスには0.5ml、ラットには1ml腹腔注射し、注射後4, 8, 12, 16, 20日目に採血したプール血液から用いた。

(1) 血清補体価（C'H₅₀）の測定

測定の方法は Mayer の方法¹⁸⁾によったが、マウスでは何れも測定不能であったのでラットについて述べる。緩衝液としてはゼラチンペロナル緩衝液（GVB⁺⁺）を用い、感作血球の SRBC は5%，溶血素は GVB⁺⁺ で200倍に希釈したものを、両者等量に混合し37°C 30分振盪しながら感作し、終了後水中に保存した。GVB⁺⁺ と100倍希釈ラット血清による変量希釈列5管に感作血球1mlを加えて総量7.5mlとし、37°C 90分振盪させたのち、上清を取り OD_{541nm} で測定した。コントロール管より求めた血球の機械的溶血、ラット血清の色調などの補正を行った後、第1~5管の溶血率 y（各管の補正值/第6管（完全溶血））を計算する。y/1-y を求めて両対数グラフにプロットし、y/1-y=1 となる血清量（x）を求め、ラット血清希釈100/x=C'H₅₀ とした。

(2) 別経路補体活性（APH₅₀）の測定

MMAF 免疫ラット血清について、天野¹¹⁾らの方法に準じて APH₅₀ を測定した。0.1M EDTA 溶液、0.03M EDTA-GVB⁺⁺ 緩衝液と1.66%ウサギ赤血球（RaRBC）を調製し被検ラット血清は0.03M EDTA-

GVB⁺⁺ で2倍段階希釈したものを使用した。測定はまず、EDTA-GVB⁺⁺ ラット血清を変量させ RaRBC は0.2ml総量0.7mlの段階希釈列を作り感作後 EDTA-GVB 6.3mlを加え上清をOD414nm で測定した。測定値より機械的溶血分と被検血清の色補正值を差し引き、溶血率 y を求め前項同様グラフにより $y/1-y=1$ となる血清量 x を求め $20/x=APH_{50}$ とした。

10. 抗マウス T 細胞血清の作製と免疫への影響の測定

(1) モルモットによる抗マウス T 細胞血清 (MusATS) の作製
4 週齢のマウスより胸腺を取り、PBS (-) 中でほぐし 10^8 cell/ml として37℃に保ち、これに等量の37℃に暖めた10mM EDTA を加え、2 分間静かに振盪後1000rpm 5 分間遠沈し上清を取り4℃に保つ。この約50 μ g のタンパクを含む抽出液を Freund's の complete adjuvant と混合し、モルモット皮下に1 週毎に3回、2 週毎に2 回行って最終免疫後7 日目に採血した。血清を分離して56℃30分間非働化し、Sephrose 4B にマウス血清を結合させた affinity column を通して血清成分に対する抗体を除去した。さらにマウス末梢赤血球ペレットと血清を混合して4℃30分間吸収したものを実験に供した。MusATS による胸腺細胞障害には、マウス腹腔に0.5ml注射した。

(2) 菌攻撃による MusATS の効果判定

MMAF による免疫の前後に、または同時に MusATS 注射し Table 6-1 に示すスケジュールで 3.2×10^4 CFU/0.5ml の菌を含むムチン懸濁液で腹腔攻撃を行った。

(3) マウス脾臓中の19S 溶血素産生細胞数に及ぼす影響

Table 6-2 の如き日程で前項6 と同様の方法で溶血斑数を算出した。

(4) マウス脾臓中の19S 抗 LPS 抗体産生細胞数に及ぼす影響

Table 6-3 の日程で前項8(2)の方法により溶血斑数を算出した。

11. MMAF のイヌ末梢血リンパ球に及ぼす影響

MMAF を接種したイヌよりヘパリン採血し、Ficoll-paque (Pharmac Fine Chemicals) 法によりリンパ球を分離した。分離リンパ球から Miller ら²⁰⁾の方法に準じて E ロゼット形成リンパ球の数を調べた。

(1) E ロゼット形成リンパ球 (ERC) 数の測定
Ficoll paque で分離したリンパ球を Hank's BSS で 8×10^5 /ml に浮遊したもの0.2ml、0.5%モルモット赤血球浮遊液0.2ml、仔ウシ血清 (生後1ヶ月以内) 0.03mlをよく混合して、 $150 \times g$ 5 分間遠沈し、その後37℃に30分間、4℃に1 時間以上静置しトリパンプルーを1 滴加え、パスツールピペットでしずかに再浮遊させて鏡検した。リンパ球当たり3 個以上の赤血球を付着するものを E ロゼット陽性とし、200個のリンパ球中のロゼット陽性細胞数を数えた。

(2) EAC ロゼット形成細胞 (EACRC) 数の測定

0.5% SRBC 懸濁液 2 ml と 1/120 希釈ウサギ抗 SRBC 血清 2 ml を37℃30分間感作し VBSS で2 回洗い、VBSS で7 倍希釈した正常マウス血清 2 ml に浮遊して37℃30分間培養し、終了後2000rpm 100分間遠沈の後沈渣を3 回 VBSS で洗い、VBSS 1.6ml に再浮遊させて感作 SRBC を作る。次いで感作 SRBC 0.2ml とリンパ球浮遊液0.2ml を混ぜ37℃で30分間感作したのち $150 \times g$ で5 分間遠沈し、トリパンプルー1 滴加えてパスツールピペットで静かに再浮遊させ、リンパ球200個当たりの EAC ロゼットを数えた。

実験結果

1. 免疫後全身照射を受けたマウスの細胞および血清による免疫の伝達

Table 1. に見られるように、免疫後 Cs¹³⁷ の照射を受けたマウスの脾細胞、腹腔細胞および血清には、照射後8 日目までは免疫の伝達能を持っていたが、12日目のものには伝達能は乏しかった。16日目では腹腔細胞以外は100%の防御率を示し、20日目には

Table 1. Transfer of immunity to normal mice by transfusion of spleen cells, peritoneal cells or serum from post-irradiated immune mice.

Specimens	Days following irradiation of donor mouse				
	4	8	12	16	20
Spleen cells* ¹	80* ⁴	60	20	100	100
Peritoneal cells* ²	40	80	0	0	100
Serum* ³	80	100	60	100	100
Contol	40	40	40	40	40

*¹: Transfused cell number was $2.1-3.5 \times 10^8$ /0.5ml (ip)

*²: Transfused cell number was $9 \times 10^5-1.1 \times 10^6$ /0.5ml (ip)

*³: 0.5ml of $\times 2$ diluted serum (ip)

*⁴: Survived mice (%) after challenge

Challenge doses were $(2.9-3.2) \times 10^4$ CFU/0.5ml (ip)

Table 2. The effect of γ irradiation and MMAF vaccination on the total number of splenic 19S-hemolysin producing cells in mouse

Mouse groups Days* ¹	Treatment				
	1 V+I	2 I	3 V	4 Control	
-4	V* ²				
0	IR* ³ ·SRBC* ⁴	IR·SRBC	V·SRBC		
5	PFC	PFC	PFC	PFC	Student's t test
	167.3	16.8	2597.4	1477.3	Groups 2 1 4 3
	106.4	11.0	2565.5	1102.9	2 —
	100.3	9.6	2370.6	955.0	1 ** —
	98.7	5.0	2043.2	661.7	4 ** ** —
	57.3	2.7	1585.4	590.3	3 ** ** ** —
	Mean 106.0	9.0	2232.4	957.4	Risk: * 5%, ** 1%
	±SD 39.41	5.50	423.6	358.4	
12	PFC	PFC	PFC	PFC	Student's t test
	129.1	88.4	5813.9	1440.2	Groups 3 4 1 2
	104.1	65.0	5748.1	1388.8	3 —
	69.4	54.3	3271.0	1367.2	4 * —
	47.4	43.3	2272.3	625.0	1 ** ** —
	47.4		1145.6	477.9	2 * ** —
	Mean 79.5	62.8	3650.1	1057.8	
	±SD 36.15	19.26	2085.60	467.73	
24	PFC	PFC	PFC		Student's t test
	527.6	246.2	1563.4		Groups 2 1 3
	516.3	223.8	1307.5		2 —
	477.1	195.0	1214.7		1 ** —
	446.7	184.3	977.6		3 ** ** —
	438.8	158.2	897.8		
	Mean 481.3	201.5	1192.2		
	±SD 39.97	34.31	266.61		

Notes *¹: mice were treated on the day indicated
*³: whole body γ irradiation (500 rad)

*²: MMAF vaccine 0.5ml (ip)
*⁴: sheep RBC $1 \times 10^9/0.5$ ml (ip)

すべての因子が免疫伝達能を回復した。

2. マウス脾臓中の19S 溶血素産生細胞数に及びす γ 線照射および MMAF ワクチンの影響

溶血素産生細胞数は、MMAF 接種マウスでは接種後5日目に IgM-PFC が有意に増加し、免疫後照射したマウスでは免疫せずに照射したマウスよりも多かった。免疫後照射したマウスは12日目には5日目のものより低下しており、照射の影響が12日目に強くあらわれている。しかし、無免疫照射マウスでは、12日目以降は徐々に PFC 数を増加してくるが、免疫後照射したものには及ばなかった。MMAF 接種マウスは接種後12日目までは明らかに19S 溶血素産生細胞を増加するが、20日目頃からは正常のマウスのレベルに戻るようである。(Table 2)

3. MMAF の細胞毒性と MIF 活性

ワクチンの細胞毒性の試験結果は Table 3 に示したように、凍結乾燥により10倍に濃縮した原液からのいずれの希釈を加えても細胞シートができたが、特に、原液を加えたものが最も細胞が生き生きと発

Table 3. The effect of MMAF vaccine on the growth of Vero cell

	1* ¹	Vaccine dilutions			
		1:10	1:100	1:1000	1:10000
Sheet formation* ²	+++	++	++	++	+
	+++	++	++	++	+

*¹: 0.5ml of 10 times concentrated MMAF by lyophilization was added into 6ml of culture fluid

*²: Finding of growth. +++ flourishing growth, ++ well sheet formation, + ordinary growth

育した。ワクチン接種マウスで行った MIT では遊走の阻止が見られず、MMA は MIF を産生しないものと考えられた。

4. カラジーンナの MMAF ワクチンの効果に及ぼす影響

菌攻撃による感染防御試験の結果は Table 4-1 のとおりで、免疫前にカラジーンナを投与しておく、マウスの生残率は 0% であるが、ワクチンと同時に投与した場合は 40%、免疫後 5 日目にカラジーンナを投与したものは 80% であり免疫の成立を妨げるものと思われた。ついで Table 4-1 のスケジュールで行った抗リポ多糖類抗体産生細胞数 (LPS-PFC 数) の結果は Table 4-2 に示した。LPS-PFC はコントロールで 131、カラジーンナ投与マウスで 137 であったのに対し、MMAF の接種を受けたマウスでは、679、MMAF を接種された後にカラジーンナを投与されたもので 519 を示し、MMAF 接種後のカラジーンナ投与は LPS-PFC の増加を阻害しないことが明らかであった。これに対し、MMAF 接種前または同時のカラジーンナを投与したものはいずれもコントロールと変わらず、MMAF による PFC 増加効果が阻害された。

5. MMAF ワクチンの血清補体価および別経路補体活性への影響

Table 4-1. The effect of carrageenan (CA) on MMAF vaccination Protection test

Days	CA+V	CA/V	V+CA	V	CA	Cont.	Cont. CA
0	CA	CA·V	V	V	CA		CA
1		○		○	○	○	
2	V						
3	○						
4							
5		●	CA	●	●	●	
6			○				
7	Ps. ●	Ps.	Ps.	Ps.	Ps.	Ps.	
8							
9							
10			●				
Survival of mice (%)	0	40	80	100	0	0	90

Notes CA: Carrageenan (4mg/ml) 0.5/BW10g (ip), V: 0.5ml (ip)
 Ps: Challenge dose 1.33×10^4 CFU/0.5ml (ip)
 ○: 10% LPS-coated mouse RBC 0.5ml (ip)
 ●: LPS-PFC assay performed

Table 4-2. The effect of carrageenan (CA) on MMAF vaccination Population of anti-LPS*1 19S antibody producing cells in spleen

Mouse groups*2	Treatment					
	1 CA+V	2 CA/V	3 V+CA	4 V	5 CA	6 Cont.
No. of	101	106	414	519	126	115,101
PFC/10 ⁶	125	129	427	562	130	130,125
	131	130	527	657	136	132,131
	147		560	766	142	145,147
			667	891	151	160
Mean ±SD	126.0 19.1	121.7 13.6	519.0 103.9	679.0 151.89	137.0 9.9	131.7 17.6

Student' t test

Groups	4	3	5	6	1	2
4	—					
3	—	—				
5	**	**	—			
6	**	**	—	—		
1	**	**	—	—	—	
2	**	**	—	—	—	—

*1: Lipopolysaccharide of *E. coli* 055:B5
 *2: Notes are same as Table 4. 1)

γ線照射後12日目から16日目において感染防御能が抑制されるが、これと補体系との係わりを知るため、先ずマウスを用いて血清補体価および別経路補体活性の測定を行ったが、何れも測定不能であった。そこでまず、MMAF のラットに対する免疫効果を知るため菌攻撃を行ったところ、コントロールの生残 0% に対し、免疫群では生残率は 100% で、十分に免疫されていることが判ったので、C'H₅₀ および APH₅₀ の測定を行った。C'H₅₀ の成績は Table 5-1 に示されているが、コントロールに比べて一応有意差があるように思われるものの、誤差の範囲を大きく越えるものではなく、ワクチンは C'H₅₀ を強く増加するものでは無いと思われた。また、APH₅₀ は Table 5-2 に示すように、コントロールに比べ有意差が無く、MMAF は補体系の活性を高める効果の無いことが明らかにされた。

6. 抗マウス T 細胞血清の MMAF ワクチン効果に及ぼす影響

MMAF ワクチン接種が T, B の何れの細胞に強く依存するかを知るため、ATS を MMAF 接種前、同時に、および接種後に投与したマウスに菌攻撃を行ったところ、Table 6-1 のように何れの群においても 100% の防御が見られた。次いで、脾臓の溶血

素産生細胞数への影響をみたところ、Table 6-2 に見るようにワクチン接種マウスでは著しい増加が認められたが、ATS の注射を受けたマウスはいずれも大きく減少した。これに対して、胸腺非依存性抗原である LPS カップリングさせた赤血球を使用

Table 5-1. The effect of MMAF vaccine on the complement activity of rat Classical pathway

Mouse Groupes Days	Days of post-vaccination					
	1	2	3	4	5	6
	4	8	12	16	20	Cont.
C'H ₅₀	33.1	35.6	33.7	46.3	26.9	27.5
	38.5	38.2	36.7	50.0	35.5	37.7
	39.2	41.5	36.7	53.5	36.6	28.4
	43.8	45.9	42.9	54.6	36.6	46.1
						35.6
Mean	38.6	40.3	37.5	51.1	33.9	35.1
±SD	4.2	4.5	3.9	3.8	4.7	7.6

Ryan's method

Groups	4	2	1	3	6	5
4	—					
2	*	—				
1	*	—	—			
3	*	—	—	—		
6	**	—	—	—	—	
5	**	—	—	—	—	—

Note: 1ml of Vaccine was inoculated two times at 4 days interval.

Table 5-2. The effect of MMAF vaccine on the complement activity of rat Alternative pathway

Mouse Groupes Days	Days of post-vaccination					
	1	2	3	4	5	6
	4	8	12	16	20	Cont.
APH ₅₀	4.31	5.16	5.33	4.72	4.92	4.77
	5.26	5.54	5.53	5.21	5.12	4.96
	5.72	6.22	5.69	5.40	5.47	5.11
	6.31	8.26	6.23	6.33	6.21	5.23
						5.31
Mean	5.40	6.30	5.69	5.42	5.43	5.07
±SD	0.8	1.4	0.4	0.78	0.6	0.2

Not significant (Ryan's method)

Note: 1ml of Vaccine was inoculated two times at 4 days interval.

Table 6-1. The effect of guinea pig anti-mouse thymus cell serum on the MMAF vaccination Protection test

Days	Treatment			Cont.
	ATS+V	V/ATS	V+ATS	
0	ATS	ATS·V	V	
1				
2				
3				
4	V		ATS	
5				
6	Ps.	Ps.	Ps.	Ps.
Survival of mice (%)	100	100	100	0

Notes ATS: Guinea pig anti-mouse thymus cell serum, 0.5ml (ip)
V: 0.5ml (ip)
Ps.: Challenge dose 3.2×10^4 CFU/0.5ml (ip)

Table 6-2. The effect of guinea pig anti-mouse thymus cell serum on the MMAF vaccination Population of 19S-haemolysin producing cells in mouse spleen

Mouse Groupes Days	Treatment			
	1	2	3	4
	V	ATS+V	ATS	Control
0		ATS	ATS	
1				
2	V	V		
3				
4	○	○	○	○
5				
9	●	●	●	●
No. of PFC/10 ⁶	970	1	0	377
	1145	1	1	421
	1177	2	1	560
	1265	3	2	577
	1320	5	2	623
Mean	1175.4	2.4	1.2	511.6
±SD	134.2	1.7	0.8	106.5

Student' t test

Groups	3	2	4	1
3	—			
2	—	—		
4	**	**	—	
1	**	**	**	—

Notes ATS: Anti-mouse thymus cell guinea pig serum 0.5ml (ip)

V: Vaccine 0.5ml (ip)

○: Sheep GBC 1×10^9 /0.5ml (ip)

●: 19S-PFC assay performed

した LPS-PFC 試験の結果は Table 6-3 に示すように、ワクチネーションによる細胞の増加は ATS により影響を受けない事があきらかであった。

7. MMAF ワクチンのイヌ末梢リンパ球に及ぼす影響

イヌ末梢血リンパ球すなわち、T細胞、B細胞の数に与える MMAF 接種の影響について調べた結果は Table 7-1, 7-2 の通りで、EAC ロゼット形成細胞数は、コントロールで $55.3 \pm 5.5/100\text{WBC}$ に対し、MMAF 接種イヌでは $71.8 \pm 7.8/100\text{WBC}$ であった。また E ロゼット形成リンパ球はコントロールの $29.2 \pm 0.5/100\text{WBC}$ に対して、 23.6 ± 1.2 とやや減少している。

考 察

先に著者ら^{26,27)}は免疫低下時において、正常な免疫動物からの免疫細胞の輸注による受動免疫を試みたが成功しなかった。そこで免疫の低下を細胞レベルで明らかにするため、免疫後 γ 線を照射したマウスから脾臓細胞、腹腔細胞および血清を経時的採取し、正常マウスに輸注し免疫の伝達を試みた。実験の結果から、諸因子はいずれも γ 線の影響を受けており、免疫の伝達は不成功であった。 γ 線照射の免疫に及ぼす影響については、マクロファージのみについても諸説あって^{9,11,13,30)}、その実態は必ずしも明らかではないが、免疫血清にも十分な防御能が期待できない事は、照射されたマウスには逆に感染促進因子があるのではないかとさえ思わせる。

Table 6-3. The effect of guinea pig anti-mouse thymus cell serum on the MMAF vaccination Population of anti-LPS 19S-antibody producing cells in mouse spleen

Mouse Groups Days	Treatment			
	1 V	2 ATS+V	3 ATS	4 Control
0		ATS	ATS	
1				
2	V	V		
3				
4	△	△	△	△
5				
9	▲	▲	▲	▲
No. of PFC/10 ⁶	870	866	216	415
	971	923	318	433
	1172	951	422	456
	1182	1167	423	512
	1254	1219	510	516
Mean	1089.8	1025.2	377.8	466.4
±SD	161.7	157.3	113.2	45.8

Duncan's multiple range test

Groups	3	4	2	1
3	—			
4	—	—		
2	**	**	—	
1	**	**	—	—

Notes ATS : Anti-mouse thymus cell guinea pig serum 0.5ml (ip)
 V : Vaccine 0.5ml (ip)
 △ : LPS-coated mouse RBC (10% suspension) 0.5ml (ip)
 ▲ : LPS 19S-PFC assay performed

Table 7-1. Effect of MMAF vaccination on canine peripheral lymphocytes EAC (Erythrocyte-antibody-complement) rosette formation assay (No. of EAC/100WBC)

Group 1 1	Vaccinated dogs		Group 2 1	Control dogs		Student's t test		
	2	3		2	3	Groups	2	1
72	58	80	53	47	60			
75	65	81	56	51	65	2	—	
(73.5)	(61.5)	(80.5)	(54.5)	(49)	(62.5)	1	**	—
71.8 ± 8.9			55.3 ± 6.5					

Table 7-2. Effect of MMAF vaccination on canine peripheral lymphocytes E (Erythrocyte) rosette formation assay (No. of E/100 WBC)

Group 1 1	Vaccinated dogs		Group 2 1	Control dogs		Student's t test		
	2	3		2	3	Groups	1	2
22	21	21	28	28	24			
27	23	28	29	31	35	1	—	
(24.5)	(22)	(24.5)	(28.5)	(29.5)	(29.5)	2	**	—
23.6 ± 1.2			29.2 ± 0.5					

マウス脾臓中の 19S 溶血素産生細胞数に及ぼす γ 線照射および MMAF ワクチンの影響についての実験によれば、MMAF は溶血素産細胞 (IgM-PFC) を有意に増加させ、しかも注射後 5 日目においてもすでに増加していることが示され、MMAF 免疫の早期発現²⁸⁾と矛盾しなかった。*Escherichia coli* の LPS は B 細胞に対して mitogenic であると言う報告^{5,6,10,19)}や *Pseudomonas aeruginosa* の外膜タンパクは B 細胞 mitogen と言う報告³¹⁾等からも MMAF 同様な効果のあることは十分考えられ、溶血素産生細胞の増加に関係しているものと思われた。 γ 線照射との関連では、無免疫照射マウスは溶血素産生細胞が著しく減少し、また、ワクチネーション後に照射したマウスも 12 日目までは少数ながら、また 24 日目にはかなりの回復がみられた。すなわち、ワクチネーションは障害の回復に効果があるようにみられた。

MMAF ワクチンの毒性を知るため、Vero 細胞培養を用いた実験結果から、MMAF ワクチンには細胞毒性がないばかりか、原液添加のものが最も細胞活性が強いように見られた事から、MMAF には Vero 細胞に mitogenic な作用があると思われた。

マクロファージ遊走阻止試験 (MIF) の結果はすべて陰性であり、MMAF ワクチンは阻止因子を産生させないことが明らかであった。

マクロファージはカラジーンにより機能が阻害されると言われるが、マクロファージの機能低下と MMAF 生物学的活性との関係を知るために行った実験では、カラジーンは明らかに免疫誘導に干渉する様で、ワクチン接種前または同時にカラジーンを注射すると免疫を阻害することが判った。しかしながら、ワクチン接種後のカラジーン投与は免疫抑制が弱く、このときマクロファージが障害を受けているとすれば、Ps. の感染防御に係わっている因子としては、Bjornson ら^{7,8,17)}が述べているような好中球によるオプソニン食作用と、免疫グロブリンと補体による細胞内殺菌作用が主体ではないかと思わせる。次いで、抗 LPS 19S 抗体産生細胞 (LPS-PFC) 数の算定を試みたところ、コントロール (無処置マウス脾臓細胞) に比べて V+CA, V では 4~5 倍という増数に対し、CA+V, CA/V 群では LPS-PFC の増加が見られないことから、MMAF には抗 LPS 抗体産生を強める効果があり、この効果には健全なマクロファージの関与が必要であることが明らかであった。カラジーンは胸腺依存抗原に対する抗体 (抗 SRBC 抗体等) 産生には抑制的

であるが、この際マクロファージの malfunction とは無関係であり、この現象にはマクロファージ以外の細胞の影響を示唆している報告があり^{2,12,24)}、興味深い。LPS-PFC の実験結果では、LPS が胸腺非依存抗原であることから、カラジーンによる抑制は無かったが、MMAF による抗体産生増強効果はマクロファージ依存性である。

感染防御に補体が関係することは当然であるが、Bjornson ら^{7,8,17)}によると、緑膿菌のヒト多形核白血球によるオプソニン食作用と細胞内殺菌には免疫グロブリンと classical, alternative 両補体経路が必要であると言われる。そこで、MMAF ワクチンへの影響を知るため、マウス、ラットを用い補体活性の測定を行ったところ、マウスでは測定値が低く過ぎて測定不能であったが、MMAF 免疫ラットでは血清補体価 (C' H₅₀) でコントロールとの間に有意差が認められた。しかし大きな増加とは認められなかった。APH₅₀ は殆ど増加は認められず、これらの成績より MMAF はラットに感染防御能を付与するが、この免疫に補体活性の増強は余り関係しないように思われた。

抗マウス胸腺細胞血清 (ATS) は T 細胞に障害を与え、SRBC 溶血素産生を抑制すると言われる^{3,4)}が、ATS の MMAF ワクチン免疫に及ぼす影響を調べた実験から、ATS 投与はマウスの感染防御誘導に影響が無い事が示された。一方マウス脾臓細胞による SRBC, LPS-MRBC に対する IgM-PFC 実験成績では、ATS 感作は胸腺依存性抗原である SRBC に対し溶血素産生に障害を与えるが、胸腺非依存性抗原である LPS-MRBC には影響が無いなどの事からみて、MMAF ワクチンは胸腺非依存性であることが明らかであった。

これまでの実験結果から、MMAF ワクチンは体液性免疫であるように思われたので、ワクチン接種動物の末梢血中における T 細胞、B 細胞の変動をビーグル犬を用いて調べた。ビーグル犬では E ロゼット数、EAC ロゼット数の正常値が $26.9 \pm 9.5/100\text{WBC}$, $55.4 \pm 5.5/100\text{WBC}$ ¹⁴⁾ なのに対し、本実験では $29.2 \pm 0.5/100\text{WBC}$, $55.3 \pm 5.5/100\text{WBC}$ で、ほぼ同様の値を示したが、ワクチン群では E ロゼット形成細胞が正常値をやや下回ったのに対し、EAC ロゼット形成細胞は $71.8 \pm 7.8/100\text{WBC}$ で、かなりの増加がみられた。しかしながら、Krakowda^{14,15)}によれば conventional ビーグル犬の血液を Ficoll-Hypaque により白血球

分離を行うと、その分画にはリンパ球のほかに好中球、単球も含まれ、さらに、イヌの好中球、単球は共にEロゼット、EACロゼットを形成するというから、本実験のEACロゼット形成細胞の増加を直ちにB細胞の増加とは言えない。しかし、分離白血球の百分比は、正常犬で好中球：リンパ球：単球＝6：3：1であったのに対し、免疫犬では5：4：1となったことから、リンパ球の増加はBリンパ球である可能性が高い。

以上の諸成績から、MMAFワクチンによる速やかに、かつ強力に発現する免疫には特異的免疫のほかに、インターフェロン産生以外²⁸⁾の免疫賦活能があることが示された。その実体としてはendotoxin由来物質²⁹⁾の作用等が疑われている。Aschheimら²⁾は、カラジナンによる免疫抑制実験の成績から、マクロファージ以外の細胞の係わりを示唆しているが、MMAFの免疫にも未だ明らかでない免疫賦活作用や、知られているImmunocompetent Cell以外の細胞系の関与なども考えてみる必要があるように思われる。

結 論

緑膿菌自家融解ワクチンの生体に対する細胞のレベルの免疫学的試験を行い、以下のような結果を得た。

1. MMAFワクチンによる免疫後 γ 線を照射したマウスから経時的に脾臓細胞、腹腔細胞、血清をとり、正常マウスに輸注した免疫伝達試験によれば、照射後12日目のマウスは何れの因子にも十分な伝達能を欠いていた。

2. MMAFワクチンは19S溶血素産生細胞の速やかな増加を促し、細胞の増加は、MMAF接種後5日目にはすでに高い増加を示し、12日目に最高となり徐々に減少する。 γ 線照射を受けたマウスは12日目まで溶血素産生細胞は著しく減少するが、SRBC免疫前のMMAF接種は細胞の減少は防止しえないものの、その程度は弱く、回復も速い。

3. MMAFワクチンはVero細胞の増殖を促進する。

4. MMAFワクチンはマクロファージ遊走阻止因子を産生させない。

5. カラジナンをMMAFワクチン接種の前または同時に投与すると、ワクチンの免疫産生を阻害するが、免疫後のカラジナン投与は、防御能を余り低下させない。また、MMAFワクチンには抗LPS抗体産生細胞を増加させる効果があるが、こ

の効果はマクロファージ依存性である。

6. ラットにおいてはMMAFワクチンの接種により、血清補体価(Classical pathway)が僅かに上昇するが、別経路補体活性には影響が見られなかった。

7. マウスにおいては、モルモット抗マウス胸腺細胞血清の投与は、MMAF接種の前後を問わず、感染防御能の誘導に影響を与えなかった。また、マウスではMMAF接種により高まるSRBC溶血素産生細胞の増加は、ATSにより阻害されるが、抗LPS抗体産生細胞の増加はATSによる影響を受けなかった。

8. MMAFワクチンはイヌにおいてはEACロゼット形成リンパ球数を増加させる事が明らかにされた。

文 献

- 1) 天野哲基・吉野内猛夫・宮島哲人・三橋康彦・大藤 真：SLEのAlternative pathway. 臨床免疫, **8**, 289-297 (1976)
- 2) Aschheim, A., and Raffel, S.: The immunodepressand effect of carrageenin. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **11**, 253-262 (1972)
- 3) Barth, R.F., Southworth, J., and Burger, G.H.: Studies on heterologous anti-lymphocyte and anti-thymocyte sera. I. Serologic specificity and immunosuppressive response. *J. Immunol.*, **101**, 282-291 (1969)
- 4) Barth, R.F., and Southworth, J.: Studies on heterologous anti-lymphocyte and anti-thymocyte sera. II. Effects on cellular antibody production during the early primary and secondary immune response of mice to sheep erythrocytes. *J. Immunol.*, **101**, 1283-1290 (1968)
- 5) Bessler, W., Resch, K., Hanock, E., and Hantke, K.: Induction of lymphocyte proliferation and membrane change by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Z. Immunitätsforsch. Immunobiol.*, **153**, 11-22 (1977)
- 6) Bessler, W., and Henning, U.: Protein I and II from the outer membrane of *Escherichia coli* are mouse B-lymphocyte mitogens. *Z. Immunitätsforsch. Immunobiol.*, **155**, 387-398 (1979)
- 7) Bjornson, A.B., and Michael, J.G.: Factors in normal human serum that promote bacterial phagocytosis. *J. Infect. Dis.*, **128**, S182-S186 (1973)
- 8) Bjornson, A.B., and Michael, J.G.: Factor in human serum promoting phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Interaction of opsonins with the bacterium. *J. Infect. Dis.*, **130**, S119-S126 (1974)
- 9) Gillette, R.W., and Lance, E.M.: Kinetic studies of macrophages. IV. Effect of irradiation. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **14**, 18-25 (1973)
- 10) Glode, L.M., Scher, I., Osborne, B., and Rosenstreich, D.L.: Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.*, **116**, 454-461 (1976)
- 11) Hahn, F.F., Goldstein, F.E., and Dungworth, D.L.: Effect of

- whole body x-irradiation on pulmonary bacterial function. *Rad. Research.*, **47**, 461-471 (1971)
- 12) Ishizaka, S., Otani, S., and Morisawa, S.: Effect of carrageenan on immune response. I. Suidise on the macrophage dependency of various antigens after treatment with carrageenan. *J. Immunol.*, **118**/1213-1218 (1977)
 - 13) Kornfeld, L., and Greenman, V.: Effects of total-body x-ray irradiation on peritoneal cells of mice. *Rad. Research.*, **29**, 433-444 (1966)
 - 14) Krakowka, S., and Guyot, D.J.: Rosette formation assays in dogs: Lack of specificity of E rosettes for T lymphocytes. *Infect. Immun.*, **17**, 73-77 (1977)
 - 15) Krakowka, S.: Mechanism of E-rosette formation by mitogen-stimulated canine lymphocytes. *Immunol.*, **36**, 255-261 (1980)
 - 16) Lake, W.W., Bice, D., Schwartz, H.J., Salvaggio, J.: Suppression of in vitro antigen-induced lymphocyte transformation by carrageenan, a macrophage-toxic agent. *J. Immunol.*, **107**, 1745-1751 (1971)
 - 17) Leist-Wels, P., and Bjornson, A.B.: Requirement for immunoglobulins and the classical and alternative pathway for phagocytosis and intracellular killing of multiple strains of gram negative aerobic bacilli. *Infect. Immun.*, **29**, 99-109 (1979)
 - 18) Mayer, M.M., Kabat, E.A.: Experimental Immunochimistry. 2nd ed., pp. 135-153, Charles C. Thomas, Springfield (1961)
 - 19) Melchers, F., Braun, V., and Galanos, C.: The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*, a B-lymphocytemitogen. *J. Exp. Med.*, **142**, 473-487 (1975)
 - 20) Miller, C.H., Carbonell, A.R., Peng, R., Mackenzie, M.R., and Shifrine, M.: Cell surface markers on canine lymphocytes. *AM. J. Vet. Res.*, **39**, 1191-1194 (1978)
 - 21) Möller, G.: 19S antibody production against soluble lipopolysaccharide by individual lymphoid cells invitro. *Nature*, **207**, 1166-1168 (1965)
 - 22) 夏梅俊之助：アガロース滴を用いるマクロファージ遊走阻止試験間接法。免疫実験操作法，A：528-533，日本免疫学会，金沢（1973）
 - 23) 斎藤和久・多田隈卓史：Cunningham and Szenberg のプラーク法。免疫実験法，A：485-490，日本免疫学会，金沢（1971）
 - 24) Sakemi, T., Kurioka, A., and Nemoto, K.: Effect of carrageenan on induction of cell-mediated cytotoxic response in vitro. *Immunology*, **41**, 297-302 (1980)
 - 25) Sato, H., Diena, B.B.: A polyvalent pseudomonas vaccine. *Rev. Can. Biol.*, **33**, 93-97 (1974)
 - 26) 佐藤平二・上田智之：ブレドニゾロン投与マウスに対する緑膿菌ワクチンの影響について。鹿大農学術報告，No. 30，131-137（1980）
 - 27) 佐藤平二・上田智之：ガンマ線照射マウスに対する緑膿菌ワクチンの影響について。鹿大農学術報告，No. 30，139-145（1980）
 - 28) 佐藤平二・坂田雅哉・古賀久視・望月雅美：緑膿菌自家融解ワクチンの感染防御効果について。鹿大農学術報告，No. 35，133-139（1985）
 - 29) 佐藤平二・藤田景清：緑膿菌自家融解ワクチンの有効成分に関する研究。鹿大農学術報告，No. 39，139-146（1989）
 - 30) Stewart, M.R., Pribnow, J.F., and Silverman, M.S.: The effect of chronic gamma radiation on airborne infection of mice with *Listeria monocytogenes*. *Rad. Research*, **24**, 96-107 (1965)
 - 31) Yu-Hua Una Chan, Hanock, R.E.W., and Mishell, R.I.: Mitogenic effect of purified outer membrane protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **28**, 178-184 (1980)

Summary

Features of protective effect induced by autolysed *Pseudomonas aeruginosa* vaccine (MMAF) have been pursued in our laboratory. This report deals with the effects of MMAF vaccine on the several particularly interesting reactions of immunocytes in the immuno-suppressed animals. The items tested and results obtained are as follows:

1) Attempting possible transfer of immunity, transfusion of spleen cells, peritoneal cells and serum prepared from the MMAF vaccinated mice which irradiated after vaccination into normal mice was carried out. Apparent diminution in passive protection was seen after total body irradiation with spleen cell, peritoneal cell and even serum of mice. On the 12th day after irradiation, protection was minimal in each of the three factors. However, protection become recovered in all groups by the 20th day.

2) MMAF vaccine elicits rapid increase of 19S haemolysin-producing cell, reaching its maximal on 12th day. This increase was due to irradiation. While the vaccinated mice showed more PFC and better recovery from depress than the non-vaccinated irradiated mice.

3) When MMAF vaccine was incorporated into medium, Vero cell culture gave better growth, compared to control.

4) MMAF vaccination did not stimulate migration inhibition factor in mice macrophage.

5) Carrageenan treatment executed prior to MMAF vaccination inhibited the elicited protection, while carrageenan administration made at post vaccination did not interfere with the established prote-

ction. Carrageenan also interfere the increase of anti-LPS antibody producing cells. However, carrageenan treatment after MMAF vaccination inducing significant increase of LPS-PFC represented little interference.

6) In MMAF vaccinated rats no significant increase of complemental activity was proved either in classical or alternative pathway.

7) The use of anti-mouse thymus cell antibody did not inhibit the protection induced by MMAF vaccine. The increase of antibody producing cell stimulated by MMAF was inhibited by ATS in anti-SRBC antibody formation, but not in anti-LPS antibody formation.

8) It was demonstrated that MMAF vaccination increased somewhat the EAC rosette forming cell in dog.