

緑膿菌自家融解ワクチンの感染防禦効果について

佐藤平二・坂田雅哉*・古賀久視**・望月雅美

(家畜微生物学研究室)

昭和59年8月10日 受理

Studies on *Pseudomonas aeruginosa* Lysed Vaccine; Especially on Induction of Protective Response

Heiji SATO, Masaya SAKATA*, Hisashi KOGA**

and Masami MOCHIZUKI

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

緑膿菌感染症は自発性感染症の好例であるが、特に今日、医原病としての緑膿菌性菌交代症の重要性は広く知られているところである。一般に自発性感染症をコントロールするには免疫による予防よりも、抗生物質などの薬剤による治療の方が有効であることが多い。しかし、緑膿菌が耐性菌になり易いという特徴から、ワクチンまたは抗血清による予防または治療が試みられている。さきにわれわれは、緑膿菌の自家融解ワクチンは著効を有することを発表したが¹⁾、その異常に強い免疫能に興味をもち、免疫発現の諸条件を明らかにするため本実験を行い、二三の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株とワクチン調製

前報²⁾と同様 *Pseudomonas aeruginosa* 1300 株をワクチン調製およびマウス攻撃用として用いた。本菌は人由来で、Lanyi の分類によれば Group 7 に属する。ワクチン調製は Minimal Medium (リン酸 2 カリウム 7 g, リン酸 1 カリウム 3 g, クエン酸ソーダ 0.05 g, 硫酸アンモニウム 1 g を蒸留水 1,000 ml に溶解し, 121°C 15 分間滅菌したこの基礎培地に, 硫酸マグネシウム 2.4 g, ブドウ糖 20 g, 蒸留水 100 ml のブドウ糖液を濾過滅菌して加える) に, 普通寒天斜面 1 夜培養菌を洗滌して推種し, 37°C に静置培養 18 時間後に終末濃度が 10,000 倍になるようにチメロサルを加え, 3 週間冷暗所 (20°C 前後) で自家融解せしめた。このワクチン (MM whole vaccine) を 5,000 rpm 30 分間遠沈後, 0.22 μ m の孔径をもつミリポア

フィルターで濾過し, これを MMAF (Minimal Medium Autolysate Filtrate) と呼んだ。

2. 感染防禦試験

マウスは日本クレア生産の JCL-ICR 系 SPF マウス, 雌 4 週令 (19~22 g) を用い, 水, 固型飼料, ケージ, 敷床は滅菌して飼育した。入荷したマウスは毎回その 10% の個体を抽出して, 口腔, 糞便の緑膿菌 (以下 Ps.) をシュドモナス寒天 (DIFCO) により検索した。検査したマウスから 0.6% に Ps. が分離されたが, 血清学的にはいずれも Lanyi¹⁴⁾ のグループ 3 に属するものであった。能動免疫はワクチン 0.5 ml を腹腔内 (ip) 注射し, 受動免疫は Freund 完全アジュバントに MMAF を等量混和ものを 5 ml ずつ 7 日隔で 2 回, 背部と腰部皮下に分割注射されたウサギの免疫血清を用いた。採血は初回注射後 3 週目で, 血清の保存は, 使用時まで -20°C に凍結して保存した。マウス攻撃は前報¹⁾と同じく, ハートインフュージョンブロス 1 夜培養を希釈し, 5% ムチン (Granular mucin, Wilson & Co. Inc, Trpe 1701W) と 1:9 の割合に混和し, 所定の菌数をその 0.1 ml 中に含むように調製し, マウス腹腔に注射した。1 週間観察し, Behren-Kauber 法により LD₅₀ を算出し防禦指数を計算した。

3. インターフェロンの検索

インターフェロンの定量には, マウス線維芽細胞由来 L-929 細胞株と水胞性口炎ウイルス (V. S. V.) ニュージャージー株を用いた。細胞株と V. S. V. ニュージャージー株はいずれも東大医科研より分与されたものである。実験の方法は, 35 mm プラスチックシャーレに 4.5 × 10⁵ 個の L-929 細胞を分注し, 24 時間培養後, これに MMAF 0.5 ml の接種をうけたマウス 3 匹ずつより 1 時間毎に採血し血清分離し, 維持液 (MEM + 2% ウシ胎児血清) で階段希釈した血清を

* バイオ製薬 Bio-Pharmaceutical Co.,

** 旭化成 Asahikasei Co.

加えて 8~12 時間の培養のち、希釈血清と培養液を除去し、約 200 PFU/0.2 ml のウイルスを攻撃用として細胞培養に接種し、1 時間吸着させたのち未吸着ウイルスを洗い去り、重層寒天栄養培地 1.5 ml を分注して、37°C 4 日間培養を続けた。ブラックは 0.5% クリスタルヴァイオレット液に 10% にフォルマリンを加えた液で染色固定して数え、攻撃ウイルスのみの細胞プレートに対照として、50% 以上のブラック数の減少を示した血清の最大希釈倍数を求めた。本実験にいうインターフェロンとは、攻撃ウイルス (V. S. V.) の増殖を阻止するインターフェロン様因子というに止まる。

4. 限外濾過

MMAF の遠沈上清を、Amicon 社製限外濾過膜、UM 10 (10,000 ダルトン cut off), UM 2 (1,000 ダルトン cut off), UM 05 (500 ダルトン cut off) で濾過したサンプルを用いて、それぞれの免疫能をしらべた。濾過の条件は、膜を Amicon Model 52 にセットし N₂ ガス 1.5 kg/cm² 陽圧下で濾過を行い、試料の 1/5 容になるまで濃縮し、濾過を繰り返し、4 つの分画を得た。この分画はミリポアにより濾過滅菌したのち、使用まで 4°C に保存した。最終の濾液以外の残液は実験に使用するに先立ち、0.05MPBS (pH 7.0) で 5 倍に希釈して原ワクチンに相当する濃度にもどした。

5. 熱処理

MMAF を 65°C に調節したウォーターバスで 30 分間加熱して急速に放冷した。

6. 酵素処理

蛋白分解酵素としては Trypsin (Merck 製 2,000E/g), 核酸分解酵素としては RNase (生化学工業製), DNase は DNase I (Bölinger Mannheim 社製) を用いて MMAF を処理後免疫実験を行い、その影響を調べた。

i) トリプシン処理: 基質として MMAF 95 ml に 0.2M Tris buffer (pH 7.7) を加え、0.2M Tris aminomethane で pH 7.7 に調製したものを用意した。酵素溶液は trypsin 5 mg/ml を 0.01M Tris buffer (pH 7.7) を用いて調製した。反応は基質 45 ml に対し 5 ml の trypsin 液を加えて行った。

ii) RNase 処理: trypsin 処理同様 pH 7.7 に調製した MMAF 45 ml に 0.01M Tris buffer (pH 7.7) で調製した RNase 溶液 (1 mg/ml) 1.5 ml を混和し反応を行った。

iii) DNase 処理: 基質液としては、最終濃度が 0.02

M になるように硫酸マグネシウムを添加した MMAF (pH 6.8) を用いた。酵素溶液は 0.01MPB (pH 6.8) で DNase I 溶液 (1 mg/ml) を作り、基質 45 ml に 1.5 ml の酵素溶液を加えた。

iv) 反応の実施: 基質液、酵素溶液は共に 37°C に保温しておいたものを混合し、37°C 24 時間反応を行った。反応により生じた沈澱は濾紙で除去し、濾液はミリポア濾過滅菌後 4°C に保存した。

実験結果

1. MMAF ワクチンの防禦能

濾過前のワクチン (MM whole) と MMAF の両者を、それぞれ 30 匹づつのマウスに 0.5 ml, 4 日間隔で 2 回, ip 注射し、初回注射から 8 日目に攻撃を行った結果は Table 1 に示されるように、感染防禦指数は両者共 5.6×10^3 以上であった。また、MMAF を 4 倍階段希釈し、その 0.5 ml を 1 群 10 匹づつのマウスに注射して免疫したのち、17LD₅₀ の菌量で攻撃した結果は Table 2 のようなもので、4,096 倍に希釈されたワクチンでもなお感染防禦能をもつことが明らかであった。

Table 1. Protective index (PD₅₀) of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine

Vaccine	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
MM whole* ³	$>1.8 \times 10^6$	$>5.6 \times 10^3$
MMAF* ⁴	$>1.8 \times 10^6$	$>5.6 \times 10^3$
Control	3.2×10^2	

*¹: LD₅₀ was calculated by Behren Karber's method.

*²: PD₅₀ = LD₅₀ of vaccinated mice / LD₅₀ of control.

*³: Whole autolysate in minimal medium.

*⁴: Membrane filtered autolysate.

Table 2. Protection of mice with various dilutions of MMAF vaccine

Vaccine dilution	No. of mice died	No. of mice inoculated
1:1	0	10
1:4	0	10
1:16	0	10
1:64	0	10
1:256	0	10
1:1024	0	10
1:4096	0	10
Control	9	1

Note: 1. Challenge dose 17 LD₅₀

2. Significant protection (P < 0.001)

2. ワクチンの防禦効果発現の時間

MMAF の防禦効果の誘導時間を明らかにするため、各群 30 匹のマウスを MMAF 0.5 ml ip 注射ののち、経時的に菌攻撃を行ってみた結果は Table 3 である。ワクチネーション直後に攻撃した場合は全く防禦効果は見られなかったが、注射後 24 時間たてば効果が見られるようになり、ワクチネーション後 2 日目にはすでに 10^5 以上となり、最大値を示していた。

Table 3. Induction period of protection with MMAF in mice

Interval between vaccination and challenge	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
4 days before challenge	>1.4×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
2 days before challenge	>1.4×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
24 hours before challenge	6.4×10 ³	>4.5×10 ²
0 hour (immediate challenge)	1.4×10 ¹	>1.0×10 ¹
1 hour after challenge	3.3×10 ¹	>2.3×10 ⁰
4 hours after challenge	<1.4×10 ¹	1.0×10 ⁰
Control	<1.4×10 ¹	

*¹, *²: See Table 1

3. インターフェロン様因子の誘導

MMAF 1 回 ip 注射をうけたマウス血清中の V. S. V. ブラック形成阻止因子は、注射後 1 時間から 4 時間目までに限られ、力価は 40 倍程度であり、Ps. の生菌注射ではインターフェロン様因子の誘導は検出出来なかった (Table 4)。

Table 4. Interferon-like substance in the serum of MMAF-injected mice and challenged mice

Hour(s) after vaccination	Potency*
After 1st vaccination	
0 hr.	<20
1	40
2	40
4	40
6	<20
9	<20
15	<20
24	<20
After 2nd vaccination	
12	<20
24	<20
After Pseudomonas challenge	
2	<20
4	<20
8	<20
12	<20
24	<20

* Potency was shown in maximum serum-dilution which reduced plaque less than 50% of control.

4. ワクチン投与方法のちがいによる効果

腹腔投与 (0.5 ml 1 回)、経鼻投与 (4 日間隔で 2 回、ワクチン噴霧後 10 分間被曝)、経口投与 (MMAF を

2 倍に希釈、2 日間隔で 1 日ずつ自由に飲ませる) の三つの方法を試みた。最終投与後 4 日目に攻撃した所では、Table 5 のように、経鼻投与は効果がなかったが、経口的に MMAF を摂取したマウスは 650 倍程度の抵抗性をもつようになった。

Table 5. Protection induced in mice with administration of vaccine from various routes

Routes	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
intra peritoneal	>2.3×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
per oral	1.5×10 ⁴	6.5×10 ²
intra nasal	1.4×10 ²	6.0×10 ⁰
Control	2.3×10 ¹	

*¹, *²: See Table 1

5. 受身免疫

Freund のアジュバントを用いて作ったウサギの抗血清の凝集価は、ホモの抗原に対しても 16 倍程度の弱いものであった。この抗血清と MMAF を 1/10 容に濃縮したサンプルとの間には、ゲル内沈降反応がおこらなかった。しかし、抗血清を 3 時間前に注射されたマウスは、生菌攻撃に対し、対照のマウスの 10^5 倍という強い免疫が伝達された。しかし、免疫をうけなかったウサギの血清でも 1.4×10^3 倍程度の感染防禦能が認められた。この未免疫ウサギの血清には Lanyi のグループ 4 抗原に対して 4 倍の凝集価があることがわかった (Table 6)。

Table 6. Passive protection with immune sera

Sera	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
Immune rabbit serum	2.3×10 ⁶	1.0×10 ⁵
Not immune rabbit serum	3.2×10 ⁴	1.4×10 ³
Control	2.3×10 ¹	

*¹, *²: See Table 1

6. 限外濾過による各分画の感染防禦能

限外濾過された分画は、F₁ (MW : >10,000), F₂ (MW : 1,000~10,000), F₃ (MW : 500~1,000), F₄ (MW : <500) と名づけたが、その各分画を 4 日隔で 2 回 0.5 ml ip 注射をうけたマウスにおける防禦は、Table 7 に見るように、分子量 1,000 ダルトン以上の分画では 10^5 倍以上の防禦を示し、分子量が 500 ないし 1,000 ダルトンの分画で 3.2×10^4 倍の抵抗性を示し、分子量 500 ダルトン以下の F₄ でも、2,000 倍以上という強い防禦性を示した。

Table 7. Protection with ultrafiltrate of MMAF vaccine

Fractions	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
Fraction 1 (MW: >10,000)	>1.2×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
Fraction 2 (MW: 10,000~1,000)	>1.2×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
Fraction 3 (MW: 1,000~500)	3.8×10 ⁵	>3.1×10 ⁴
Fraction 4 (MW: <500)	2.4×10 ⁴	>2.0×10 ³
Control	<1.2×10 ¹	

*¹, *²: See Tabl 1

7. 熱または酵素処理の影響

加熱 MMAF と原 MMAF との間には Table 8 に見られるように、何らの相違も認められず、酵素処理によっても、MMAF はその感染防禦附与能に影響を受けなかった (Table 9)。

Table 8. Effect of heat treatment on protective effect of MMAF vaccine

Specimens	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
MMAF	>2.2×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
Heated MMAF* ³	>2.2×10 ⁶	>1.0×10 ⁵
Control	<2.2×10 ¹	

*¹, *²: See Tabl 1*³: 65°C, 30 minutes in water-bath.

Table 9. Effect of enzyme treatment on protective effect of MMAF vaccine

Vaccines	LD ₅₀ * ¹	PD ₅₀ * ²
Trypsin treated MMAF	>3.0×10 ⁵	>3.1×10 ³
RNase treated MMAF	>3.0×10 ⁵	>3.1×10 ³
DNase treated MMAF	>3.0×10 ⁵	>3.1×10 ³
Control	9.5×10 ¹	

*¹, *²: See Tabl 1

考 察

緑膿菌ワクチンに関しては、すでに多くの報告があり^{2,5,6,8,13,18-19)}、その有効成分については、全菌体¹³⁾のほか細菌表層 slime layer²⁾、培養濾液^{9,13,23,24)}、リボゾーム分画^{15,22)}、菌体内毒素蛋白部分^{1,7)}、さらには菌体外毒素ともいべきプロテアーゼ、エステラーゼのトキシノイドの併用によるもの^{7,8)}などもある。濾

液について田淵ら²⁴⁾はその透折外液にも、免疫原性のあることをのべている。

著者ら¹⁹⁾が先に報告した緑膿菌自家融解ワクチンも強い免疫原性を持ち、発熱性などの副作用の少ないすぐれたワクチンであることを示したが、本ワクチンはいくつかの点で従来の死菌ワクチンとはやや趣を異にすることが注目された。すなわち、通常の死菌ワクチンには見られないような強い防禦能をもつこと、極く微量用量でも強い免疫を与えること、および、MMAF で免疫マウスにプレドニゾロン注射や γ -線照射などを行った際の免疫障害の発現の様相が、他菌種のワクチンによる免疫動物と異なること^{20,21)}などが知られたからである。そこで MMAF の免疫の発現の条件を明らかにするため、この実験を行ったが、その結果をみると、免疫能の強さや最小有効量などは前報¹⁹⁾同様であった。緑膿菌免疫においては、免疫の発現が異常に速やかで、かつ、ヘテロの菌株の攻撃に対しても防禦能を示すことが Jones^{10,11)}により報告されている。

今回の実験においても、ワクチン投与後 24 時間目には 4.5×10² PD₅₀ 程度の抵抗性がみられ、2 日目には最高値である 10⁵ の PD₅₀ を示した。しかし、ワクチン注射直後や 4 時間の攻撃では全く抵抗性は認められなかった。かかる早期における抵抗性の発現の理由としては、インターフェロン誘発の可能性が考えられたので¹²⁾、ワクチンのインターフェロン誘導能を調べたところ、MMAF を注射されたマウス血清中には注射後 1 時間から 4 時間に限り×40 程度のインターフェロン様の因子が出現することが知られた。このことは、緑膿菌の感染防禦において、インターフェロンの役割は否定的なものと考えられた。免疫血清による受身免疫は甚だ強く、従来の報告^{3-5,10,15)}を裏付けたが、注目すべきこととして、MMAF 投与方法のうち経鼻(噴霧)によるものは有効ではなかったが、経口的に投与することによってもマウスにかなりの抵抗性を附与することが明らかにされた。

受身免疫の実験においては、免疫されなかったウサギの血清が 1.4×10³ 程度の強い抵抗性を示した事実は、この血清が他の血清型抗原 (Lanyi のグループ 4) に対して 4 倍の凝集価を示したことから、交差反応によるものと考えられた。Jones ら^{10,11)}は緑膿菌免疫血清による免疫は、抗体価が低くてもおこり、かつヘテロの菌に対しても効果があることをのべており、今回の実験でも、ホモ抗原に対する免疫血清の凝集価が×16 と低いにもかかわらず、10⁵ PD₅₀ という高い免疫を伝達したことは注目すべきことであるが、この受

身免疫の内容が抗体によるものだけなのか、他の因子が関与しているのかについても今後検討してみたい。

MMAF の限外濾過による分画中、分子量 500 以下の分画にも 2×10^3 PD₅₀ という高い防禦能を、早期に附与する性状があることは、蛋白質性の抗原、多糖類抗原、リボゾームとは異質の因子があることを示唆している。熱処理、トリプシン、RNase、DNase などの酵素処理によっても、MMAF の効果が影響されなかったこともこの考えを支持するように思われる。

以上のような種々の結果から、緑膿菌の感染防禦反応には、通常の菌体由来抗原物質による免疫のほかに、抗原物質とは異質な生物活性物質、とくにマクロファージ、リンパ球、T細胞、B細胞などに対する非特異性細胞因子による抵抗性の発現も同時におこっていることが想像される。われわれは、目下、MMAF 中の生物活性因子の単離と活性能について研究を継続中である。

要 約

緑膿菌感染に対する緑膿菌自家融解ワクチン (MMAF) の防禦能について、抵抗性の発現時間、インターフェロン誘導能、ワクチンの投与方法による影響、有効分画、熱処理、酵素処理の影響などについて詳細な実験を行い、以下のような結果を得た。すなわち、MMAF はマウスによる感染防禦試験により、極めて強い防禦能をもち、しかも微量で有効であることが確認された。MMAF はマウス投与後 4 日目に最大の抵抗性を附与し、2 日目においてもかなりの抵抗性を誘導する。この早期の防禦能の発現に関しては、インターフェロンの役割は否定的であった。また、MMAF は経口投与によってもマウスに抵抗性を与えることが明らかにされた。MMAF の限外濾過による各分画を用いた感染防禦試験では、分子量 500 ダルトン以下の分画にも抵抗性附与能があることが示された。MMAF は熱処理 (65°C 30 分)、トリプシン、RDase、DNase などの酵素処理によっても何ら影響されないことが明らかにされた。以上の多くの結果から、MMAF の強い抵抗性附与能には、細菌体由来の抗原や毒素などのほかに、非特異性細胞因子などによる抵抗性の増強も関与していることが強く示唆された。

謝辞 本実験を行うに当たり、L-929 細胞株および水疱性口炎ウイルスニュージャージー株を分与下さった、東京大学医科学研究所藤原公策教授に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Abe, C., Shionoya, H., Hirano, Y., Okada, K. and Homma, J. Y.: Common protective antigen (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jap. J. Exp. Med.*, **45**, 355-359 (1975)
- 2) Almo, T.H. and Bass, J.A.: Immunization against *Pseudomonas aeruginosa* 1. Induction of protection by an alcohol-precipitated fraction from the slime layer. *J. Infect. Dis.*, **117**, 249-256 (1967)
- 3) Bass, J.A. and McCoy, T.C.: Passive immunization against experimental *Pseudomonas* infection: Correlation of protection to Verder and Evans "O" sero-type. *Infect. & Immun.*, **3**, 51-58 (1971)
- 4) Bjornson, A.B. and Michael, J.G.: Biological activities of rabbit IgM and IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. & Immun.*, **2**, 453-461 (1970)
- 5) Feller, J. and Pearson, C.: *Pseudomonas* vaccine and hyperimmune plasma for burned patients. *Arch. Surg.*, **97**, 225-229 (1968)
- 6) Harvath, L. and Anderson, B. R.: Evaluation of type specific *Pseudomonas* vaccine for treatment of *Pseudomonas* sepsis during granulocytopenia. *Infect. & Immun.*, **13**, 1139-1143 (1976)
- 7) Hirao, Y. and Homma, J. Y.: Therapeutic effect of immunization with OEP, protease toxoid and elastase toxoid on corneal ulcers in mice due to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Jap. J. Exp. Med.*, **48**, 41-51 (1978)
- 8) Homma, J. Y., Abe, C., Tanamoto, K., Hirao, Y., Morihara, K., Tsuzuki, H., Yanagawa, R., Honda, E., Aoi, Y., Fujimoto, Y., Goryo, M., Imazeki, N., Noda, H., Goda, A., Takeuchi, S. and Ishihara, T.: Effectiveness of immunization with single and multi-component vaccines prepared from a common antigen (OEP), protease and elastase toxoids of *Pseudomonas aeruginosa* on protection against hemorrhagic pneumonia in mink due to *P. aeruginosa*. *Jap. J. Exp. Med.*, **48**, 111-133 (1978)
- 9) Jones, R. J.: Protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection by immunisation with fractions of culture filtrates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brit. J. Exp. Path.*, **49**, 411-420 (1968)
- 10) Jones, R. J., Lilly, H. A. and Lowbury, E. J. L.: Passive protection of mice against *Pseudomonas aeruginosa* by serum from recently vaccinated mice. *Brit. J. Exp. Path.*, **52**, 264-270 (1971)
- 11) Jones, B. J.: Specificity of early protective

- responses induced by *Pseudomonas* vaccines. *J. Hyg. Camb.*, **70**, 343-351 (1972)
- 12) Kojima, Y., Homma, J. Y. and Abe, C.: Property to induce interferon of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin and its component. *Jap. J. Exp. Med.*, **41**, 493-496 (1971)
- 13) Laborde, H.F. and Fajardo, C. L.: *Pseudomonas* vaccine. I. Preparation and assay. *J. Bact.*, **90**, 290-291 (1965)
- 14) Lanyi, B.: Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Group-specific somatic antigens, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **13**, 295-316 (1967)
- 15) Lieberman, M. M., Wright, G. L., Wolcott, K.M. and McKissock-Desoto, D. C.: Polyvalent antisera to *Pseudomonas* ribosomal vaccines: Protection of mice against clinically isolated strains. *Infect. & Immun.*, **29**, 489-493 (1980)
- 16) Markley, K. and Smallman, E.: Protection by vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* infection after thermal injury. *J. Bact.*, **96**, 867-874 (1968)
- 17) Mates, A. and Zand, P.: Specificity of the protective response induced by the slime layer of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hyg.*, **73**, 75-84 (1974)
- 18) Sasaki, M., Ito, M. and Homma, J. Y.: Immunological studies on the Original Endotoxin Protein (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa* — Adjuvant effect of OEP in vivo. *Jap. J. Exp. Med.*, **45**, 335-343 (1975)
- 19) Sato, H. and Diena, B. B.: A polyvalent *Pseudomonas* vaccine. *Rec. Can. Biol.*, **33**, 93-97 (1974)
- 20) Sato, H. and Ueda, T.: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine on Predonisolon treated mice. *Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, **No. 30**, 131-137 (1980) (in Japanese)
- 21) Sato, H. and Ueda, T.: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine on irradiated mice. *Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, **No. 30**, 139-145 (1980) (in Japanese)
- 22) Smith, P. L., Wysocki, J. A., Bruun, J. N., DeCorcy, S. J. Jr., Blackmore, W. S. and Mudd, S.: Efficacy of Ribosomal preparation from *Pseudomonas aeruginosa* to protect against intravenous challenge in mice. *J. Reticuloendthel. Soc.*, **15**, 22-30 (1973)
- 23) Tabuchi, K. and Diena, B. B.: The protective effect of *Pseudomonas* culture filtrates against experimental infection in mice. *J. Biol. Stand.*, **2**, 215-222 (1974)
- 24) Tabuchi, K., Sato, H. and Diena, B. B.: Pathogenic and immunological properties of culture filtrates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1417-1422 (1974)

Summary

Some features of protective responses induced by autolysed *Pseudomonas aeruginosa* vaccine (MMAF) were pursued in respects of several analytical points of view. A fixed number of tests were carried out on the following items: effective fractions, interferon induction, effects of administration route, early protection response and effects of enzyme treatment of MMAF vaccine. The results obtained are as follows:

1. A strong protection was induced in mice by MMAF, and strong protection was transferred to mice by immune rabbit serum.
2. Very a small amount of vaccine such as 1:4096 was capable of inducing effective protection in mice.
3. A single inoculation of MMAF protected mice 24 hours after vaccination against 4.5×10^2 LD₅₀ challenge by homologous *Pseudomonas aeruginosa*. Interferon-like factor was detectable in mouse sera for 1-4 hours after injection. Titres measured by means of plaque-reducing-method were $\times 40$. This result does not seem to be in support of the role of interferon in protection against the *Pseudomonas* infection.
4. MMAF vaccine also protected mice against 6.5×10^2 LD₅₀ challenge by *Pseudomonas* even in case of per oral administration.
5. Small molecular weight fractions such as 500 dalton prepared by ultrafiltration of MMAF still induced a high protection, such as 2×10^3 of PD₅₀.
6. Protectivity of MMAF vaccine was not effected by treatment with heat (65°C 30 min) and enzymes (Trypsin, RNase and DNase).

From the results mentioned above, it was suggested that MMAF vaccine contains particularly effective fraction (s) which might be distinguished from the ordinary antigens or endotoxin substances derived from the bacteria.