

結核感作動物における腹腔内単核細胞反応について

第1報 グリコーゲン、結核死菌に対するモルモットの腹腔内

単核細胞反応と、単核細胞中の結核菌の消長について

原 沢 道 美・衣 笠 恵 士

前 川 正・吉 田 清 一

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

東京大学冲中内科教室 (教授 冲中重雄)

受 付 昭 和 31 年 12 月 26 日

ま え が き

単核細胞中における結核菌の消長が、結核の感染、免疫に大きな役割を果していることは、すでに一般に認められているところである。そして、近年、単核細胞中の菌の消長を組織培養法を用いて詳細に追求することにより、結核の免疫機序を明らかにしようとする実験が種々試みられている^{1)~3)}。

著者らも、目下この免疫動物の単核細胞について、系統的な免疫学的研究を行いつつあるが、その基礎実験として、2, 3の免疫動物について、グリコーゲンおよび結核死菌に対する腹腔内単核細胞反応を検索してみた。なおそれとともに、蛍光法により細胞内の結核菌を染色し、それと細胞との関係も併せて観察してみた。本報には、まず、モルモットにおける成績を報告する。

実験材料ならびに実験方法

10倍OTによる皮内反応陰性の正常モルモット45匹の第1群、および人型結核菌H₂株の0.1mg (17×10⁵生菌単位)を左腹壁皮下に接種後3週目のモルモット43匹の第2群、計88匹のモルモットを実験に使用した。体重は両群ともほぼ同じで350~450gである。

これら両群のモルモットを3つの実験群に分け、実験(1)では、グリコーゲンを0.01mg/cc含有する生理的食塩水10ccを腹腔内に接種し、翌日より5日間、両群とも毎日3匹ずつを殺し、ヘパリンを含むThyrodé溶液30ccで腹腔内滲出細胞を洗出した。実験(2)では、青山B株の乾燥死菌体を1mg/ccの割にふくむ菌液を生理的食塩水で作り、その10ccを腹腔内に接種し翌日より5日間両群とも毎日2~3匹ずつ殺し、同様な方法で細胞を洗出した。実験(3)では、同じ青山B株の乾燥死菌体を1mg/ccの割にふくむ菌液を、グリコーゲンを0.01mg/ccの割に含有する生理的食塩水にて作り、その10ccを腹腔内に接種し、翌日より5日間両群とも毎日2~3匹ずつ殺し、

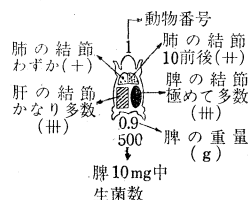
同様な方法で細胞を洗出した。

細胞浮遊液は、直ちに白血球算定用メランジュールを用いて細胞数を算定した後、毎分1,000回転で3分間遠心沈澱し、沈渣の塗抹標本を作り、Giemsa染色により

表 1 結核感染モルモットの剖検所見および脾の定量培養成績

解剖 日別	1	2	3	4	5
グリ コー ゲン 群	1 3 0.9 0.7 500<500< 2	4 6 0.9 0.5 500<300< 5	7 9 0.7 0.9 300<300< 8	10 12 1.7 0.8 500<120 11	13 15 1.2 1.2 300<300< 14
	0.7 114	0.8 122	0.8 500<	1.4 500<	1.2 300<
	16 18 1.0 0.8 500<400< 17	19 1.1 500< 20	21 1.4 500< 22	23 25 1.4 1.0 300<40 24	26 28 1.0 1.4 39 300< 27
結 核 死 菌 群	13 11	1.0 300<	1.6 75	1.5 500<	1.8 20
	29 31 1.0 0.9 300<400< 30	32 34 1.0 1.3 500<300< 33	35 37 1.4 0.8 28 24 36	38 40 1.0 0.9 49 149 39	41 43 1.6 1.2 132 77 42
	1.0 300<	1.0 27	1.6 10	1.6 164	1.4 300<
結 核 死 菌 + グ リ コー ゲン 群	1.0 300<	1.0 27	1.6 10	1.6 164	1.4 300<
	1.0 300<	1.0 27	1.6 10	1.6 164	1.4 300<
	1.0 300<	1.0 27	1.6 10	1.6 164	1.4 300<

注：記号説明



細胞の種類を分別した。

次に、実験(2)で得た一部の塗抹標本に、ロダミン・オーラミン染色⁴⁾(メチレンブラオで後染色)をした後、単核細胞を200個数え、その中で食菌している単核細胞数および細胞内の菌数を蛍光顕微鏡法により観察し、腹腔内に接種した死菌の消長を、単核細胞を中心にして観察した。

なお、結核感染モルモットは全例、100倍OT、0.1cc皮内注射後24時間判定のツベルクリン反応が陽性で、その剖検所見および脾の定量培養の成績は表1の如くである。

実験成績

腹腔内渗出細胞の大部を占める単核細胞が単球⁵⁾であるか、あるいは網内系の細胞⁶⁾であるかについては種々議論のあるところであり、これをGiemsa染色のみで区別することは不可能である。またその染色所見のみからリンパ球と判然と区別することも實際上困難な細胞も少なくない。そこで著者らは、単核の細胞を一括して単核細胞と表現した。

各実験における、両群の細胞数および細胞種類の経過をみると、表2の如くである。

表2 細胞数および種類の経過

実験別	群別		正常モルモット群				結核感染モルモット群			
	日	細胞	細胞数 1mm ³ 中	好中球 %	好酸球 %	単核細胞 %	細胞数 1mm ³ 中	好中球 %	好酸球 %	単核細胞 %
グリコーゲン	1		1500	77.7	3.8	18.5	1100	17.2	3.0	79.7
	2		1950	37.3	3.3	59.5	1800	15.5	1.0	83.5
	3		1730	11.7	3.8	84.5	800	8.7	1.3	90.0
	4		1300	2.8	3.0	94.1	650	3.7	0.8	95.5
	5		1030	1.3	4.0	94.5	1100	2.8	0	97.2
結核死菌	1		730	85.5	0.5	14.0	540	21.7	1.8	76.5
	2		1130	66.0	0.2	33.8	1150	25.8	1.7	72.5
	3		870	29.5	2.2	68.3	850	14.0	0.5	85.5
	4		630	21.8	0.4	77.8	830	3.3	1.2	95.5
	5		1130	10.0	0.3	89.7	400	5.2	1.0	93.8
結核死菌+グリコーゲン	1		1900	89.2	1.0	9.8	1100	23.0	1.3	75.7
	2		2230	73.1	2.1	24.8	2330	20.5	1.2	78.3
	3		1700	35.5	2.5	62.0	1300	17.3	1.7	81.0
	4		1660	17.5	0.5	82.0	830	3.1	0.8	96.1
	5		960	8.8	1.8	89.4	1100	10.2	0.5	89.3

注 各欄とも2-3例の平均を示す

1) グリコーゲンに対する腹腔内単核細胞反応

細胞数は、両群とも2日目に最も多く、以後は少しく減少の傾向を示すが、全期間を通じてその変動は1mm³中1,000個以内で、両群の間に大差は認められない。

それに反し、細胞種類の変動は両群の間に著しい差異が認められる。すなわち、正常モルモット群では、1日目は好中球が77.7%と大部分を占めるが、それが2日目、3日目になるにつれ減少し、4日目には2.8%の低率を示している。それとともに第1日目には18.5%にすぎなかつた単核細胞が増加し、3日目以後には単核細胞がその大部分を占めるようになる。結核感染モルモット群ではそれと異なり、1日目にすでに単核細胞が79.7%と大部分を占め、以後の単核細胞の増加は極めて徐々である。

2) 結核死菌に対する腹腔内単核細胞反応

細胞数の消長は、前者に比すればやや少ないが、両群の間に大差は認められない。しかし前実験成績における

と同様に、細胞種類の変動には、両群の間に大差が認められる。すなわち、正常モルモット群では、接種後1〜2日目においては好中球が多く、単核細胞は漸く3日目ころより多くなるに反し、結核感染モルモット群では1日目においてすでに単核細胞が大部分を占めており、以後の単核細胞の増加は極めて徐々である。

3) 結核死菌+グリコーゲンに対する腹腔内単核細胞反応

細胞数は2日目に最も多く、これは1)、2)の場合と同様である。両群の間に、細胞数には大差は認められないが、グリコーゲン、結核死菌をおのおの単独に使用した場合よりも、両者を併用した場合の方が、両群とも細胞数は多い。次に細胞種類の変動は、1)、2)の所見とほぼ一致した成績が認められた。すなわち、結核感染モルモットでは正常モルモットに比し、単核細胞の動員がより速やかであることが、本実験においても認められた。以上の成績は、図1をみれば明らかである。

図1 グリコーゲン、結核死菌に対する腹腔内単核細胞の推移

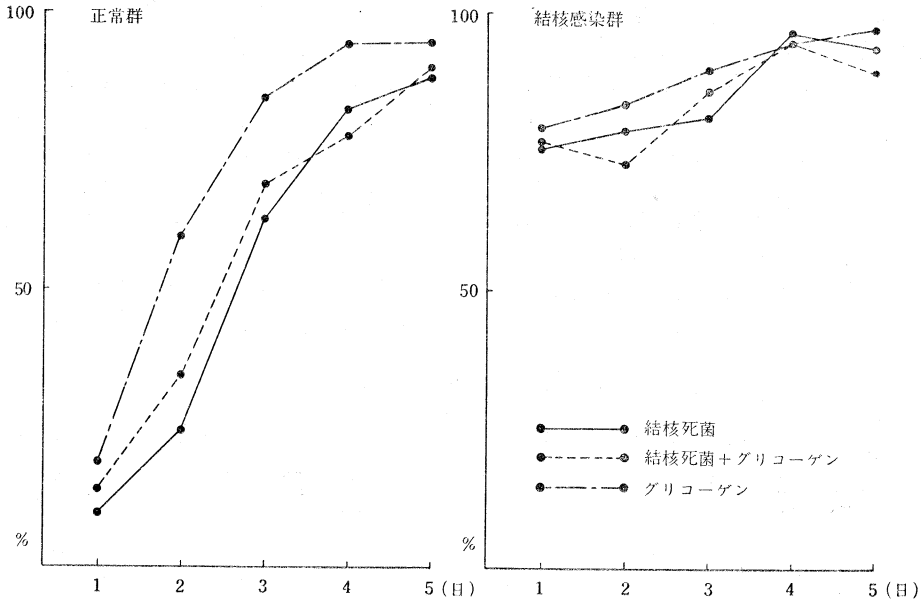
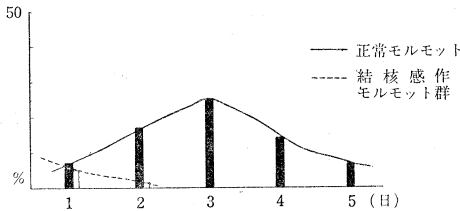


図2 喰菌単核細胞の消長と細胞内菌数



細胞内の菌数

群別	日	1	2	3	4	5
正常モルモット		+~++	++	+++	+++	++
結核感作モルモット		+	0~+	+	0~+	0

次に、実験2の塗抹標本を用いて、腹腔内に接種した菌の消長を単核細胞を中心にして観察してみた。その成績は図2に示すごとくである。正常モルモット群では、食菌単核細胞数は1日目6%であるが、漸次増加し、3日目に最高の25%を示し、以後は減少するが、全期間を通じて菌は認められた。しかるに、結核感作モルモット群では、1日目に5%に認められたが、以後は減少するのみで、3日目、4日目、5日目にはほとんど食菌単核細胞も、また菌も認められなかつた。

すなわち、結核感染モルモットでは正常モルモットに比し、結核死菌に対し、単核細胞の動員が速いとともに、結核死菌の処理もまた速やかであると思われる所見が得られた。

総括ならびに考案

Lurieによれば⁷⁾、結核菌侵入に伴う宿主の反応とし

て、まず好中球が急速に局所に動員される。そして、それが異物としての菌を貪食するが、元来この細胞は結核菌に対して無力なためにかえつて死滅する。次いで単核細胞が出現し、多核白血球の残骸と共に菌を貪食し、やがて、単核細胞系における細胞内感染状態ともいふべき段階が生じる。そしてこの単核細胞中の菌の消長が、結核の感染、免疫に大きな役割を演じていることは、すでに一般に認められているところである^{1)3,8)}。

そしてまた、結核感作動物においては、再感染菌に対し単核細胞の動員が、より速やかに行われることが指摘せられている⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。

以上の関係は、著者らの実験においても明らかに認められた。すなわち、結核死菌の腹腔内接種により、正常動物では、まず生体の反応として好中球が出現する。そして2~3日目あたりから急速に単核細胞の動員が始まり、4日目以後では単核細胞が腹腔内滲出細胞の大部分を占めるようになる。それに反し、結核感作動物では、すでに接種24時間後において単核細胞の動員が認められている。以上は結核死菌についての反応であるが、結核生菌(H₂株)を用いた実験においても同様な成績が認められた¹⁾。その詳細については、引き続き報告する予定である。

次に著者らは、腹腔内に注入せられた結核死菌の消長を、単核細胞を中心にして観察してみた。その結果、図2に示す如く、結核感作モルモットでは正常モルモットに比し、単核細胞による死菌の処理がより速やかなことが認められた。この実験成績は、生体内で起つた現象を、ただ単に、遊出させた単核細胞を通して観察したのみであり、本現象を解明するにはさらに詳細な実験を加える

必要があるが、以下少しくこれについて考察を加えてみたい。

Lurie⁷⁾ は結核免疫の第一義を、上述の如き単核細胞の迅速な動員に帰している。しかし、Suter ら¹⁾ は組織培養を用いた実験で、免疫個体の単核細胞が、結核菌の増殖をその細胞内で抑制すること、そしてこれが非免疫個体に移されても、その細胞は増殖抑制の性質の失われないことを認めている。すなわち、免疫個体と非免疫個体の単核細胞とでは、結核菌に対する生物学的作用の異なることを報告し、そしてこの現象をもつて、結核免疫の本態としている。ここで興味があるのは、実験1にみる如く、感作動物の単核細胞の動員の速やかなることは、グリコゲンのみを腹腔内に注入した場合においても認められたことである。グリコゲンは、流動パラフィン等と共に腹腔内単核細胞を遊出させる作用²⁾があるが、結核感作モルモットにとっては非特異的な刺激である。それ故、この場合、本現象の本態を説明するには、単核細胞動員の如何よりは、むしろ、Suter ら¹⁻³⁾ の主張する如き、感作動物と正常動物の単核細胞とでは、その生物学の性状が異なる点に求めた方が、より妥当性があると思われる。なお著者らは、ハツカネズミ、ウサギについて同様な実験⁵⁾を行つたところ、この両動物においては、感作および非感作の両群の間に、その腹腔内単核細胞反応に差が認められなかつた。しかしながら、単核細胞内の菌の消長は両群で異なり、結核感作群は非感作群に比しより死菌の処理が速いことが認められた。

この成績も上述の見解を裏付ける一つの知見と思われる。

しかしこの場合、体液性要因の関与^{4,5)}についても、これを否定することはできず、目下試験管内に移して引き続き本現象を観察中である。

なお Schmidt ら⁶⁾ は、流動パラフィンを用いて48時間後の腹腔内単核細胞反応を観察し、BCG感作モルモット群では単球が、有毒人型菌感染モルモット群ではリンパ球の動員が、それぞれ正常モルモットに比して多いとしているが、本実験で認められた単球細胞のうち、明らかにリンパ球と認められたものは少なかつた。

結 語

正常モルモット45匹、および人型結核菌H₃₇株の0.1mg (17×10⁵ 生菌単位)を左腹腔皮下に接種後3週目のモルモット43匹の、計88匹のモルモットの腹腔内に、グリコゲンおよび結核死菌を注入し、その単核細胞の反応を、また注入せられた死菌の運命を単核細胞を通して5日間観察した。その結果、結核感染モルモットでは正常モルモットに比し、グリコゲンおよび結核死菌に対し、単核細胞の動員がより早く、また死菌の処理もより速やかなことが認められた。

文 献

- 1) Suter, E.: Multiplication of tubercle bacilli within mononuclear phagocytes in tissue cultures derived from normal animals vaccinated with BCG. *J. Exper. Med.*, 97: 235~245, 1953.
- 2) Mackaness, G.B.: The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. *Am. Rev. Tuberc.*, 69: 495~504, 1954.
- 3) Raffel, S.: The mechanism involved in acquired immunity to tuberculosis. *Ciba Symposium on Experimental Tuberculosis*, pp. 261~279, Churchill, London, 1955.
- 4) Yasaki, Y. et al.: Studies on the differentiation of living and dead tubercle bacilli with the fluoromicroscope. *Jikei Med. J.*, 2: 73~84, 1955.
- 5) 天野重安: 血液学の基礎, 丸善, 東京, 1948.
- 6) 赤崎兼義・小島 瑞: 炎症巣における網内系細胞の態度, 血液学討議会報告, 第7輯: 121~152, 昭29.
- 7) Lurie, M.B.: Immunology of tuberculosis. *The Cyclopedia of Medicine, Surgery, Specialities*: F.A.Davis Co., Philad., 1950.
- 8) Lurie, M.B.: Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals. *J. Exper. Med.*, 75: 243~268, 1942.
- 9) Gardner, L.U.: The cellular reactions to primary infection with the tubercle bacillus. *Am. Rev. Tuberc.*, 22: 379~412, 1930.
- 10) Long, E.R. & Vorwald, A.J.: A comparison of tissue reactions to testicular inoculation of acid fast bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 25: 614~633, 1932.
- 11) 原沢道美 他: 腹腔内単核細胞の免疫学的研究, 第7報: 腹腔内に感染した結核菌の単核細胞及び各臓器中の消長について, 医学と生物学, 41: 167~170, 1956.
- 12) Chambers, R. & Grand, C.G.: *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 8: 1, 1936.
- 13) 原沢道美 他: 結核感作動物に於ける腹腔内単核細胞反応について, 第2報: ハツカネズミ, ウサギの単核細胞反応について, 本誌, 次号.
- 14) Lurie, M.B.: Studies on the mechanism of

immunity in tuberculosis. The role of extracellular factors and local immunity in the fixation and inhibition of growth of tubercle bacilli. J. Exper. Med., 69: 555~578, 1939.

- 15) 辻周介 他: 結核に対する生体の防衛力に関する研究: 結核免疫に於ける液性因子の重要性につ

いて, 結核研究の進歩, 8: 215~224, 昭29.

- 16) Schmidt, F. et al.: Beeinflussung unspezifischer Zellreactionen durch die Tuberkulose-Allergie. Beitr. Klin. Tuberk., 109: 131~138, 1953.