

単核細胞中の結核菌の消長を指標としての抗結核免疫の観察

—腹腔内感染菌の単核細胞中の消長について—

原 沢 道 美・立 花 暉 夫・衣 笠 恵 士

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 52 年 2 月 16 日

まえがき

結核感作動物は正常動物に比し、腹腔内単核細胞による腹腔内に注入せられた結核死菌の処理が、よりすみやかなることを蛍光顕微鏡法により認め、またこの機能には、単核細胞動員の如何よりも、それが免疫状態にあるか、否かが大きな役割を演じていると思われる所見をえ、これらをすでに前報¹⁾に報告した。

つきに著者らは、上述の所見の免疫学的意義をさらに明らかにするために、モルモットの腹腔内に強毒人型結核菌を接種し、その腹腔内単核細胞反応を検索するとともに、感染菌の運命を、腹腔内滲出細胞を中心にして、定量培養法を用いて 8 週間観察した。

実験材料および実験方法

動物：生後 3 週 (体重 200~300g) の健康モルモット 52 匹を実験に使用した。これらの動物を 2 群に分け、1 群には BCG による免疫操作を加え、他の群はそのまま放置し、非免疫対照群とした。

BCG による免疫：Sauton 培地 8 日培養の BCG を凍結乾燥し、保存してあるものを蒸溜水で再浮遊し、2mg/ml の菌液としてその 0.5ml をモルモットの右下腹部皮下に注射して免疫した。動物 1 匹あたりの接種量は 1mg で、 23×10^6 生菌単位である。

感染法：BCG 免疫処置後 6 週目に、非免疫対照群とともに、0.01mg/ml の割にグリコーゲン含有する生理的食塩水にて作った、人型結核菌 H₂ 株の 0.01mg/ml の菌液、10cc ずつを、すべての動物の腹腔内に接種した。H₂ 株は凍結乾燥して予め菌力、生菌単位数の既知のものを用い、動物 1 匹あたりの接種量は 0.1mg で、 38×10^5 生菌単位であった。

腹腔内滲出細胞の採取法：H₂ 腹腔内感染後、1 時間、24 時間、4 日、1 週、2 週、3 週、4 週、6 週および 8 週目に両群の動物をそれぞれ 2~4 匹ずつ屠殺剖検し、ヘパリンを含有する Tyrode 溶液 30ml を腹腔内に注入し、無菌的にビベットにて腹腔滲出液を採取した。その後、肉眼的にリンパ腺、内臓の結核性病変を観察すると

ともに、腹腔内滲出細胞、肺、肝、脾、後腹膜・門脈リンパ腺の定量培養を行った。

腹腔内滲出細胞中の生菌単位数測定法：上述の方法にて、1 匹の動物より約 25ml の滲出液が採取できる。その 10ml をとり、毎分 1,000 回転にて約 3 分間遠心沈澱し、その沈澱より細胞成分をえた。つきに、細胞中の菌を次の如くして定量培養した。すなわち、その沈澱に 1% 苛性ソーダの 2ml を加え、十分にビベットにて攪拌して細胞を破壊した後、それを基にして各 10 倍稀釈段階液をつくり、各稀釈段階液より 0.1ml ずつを 3 本の小川培地に培養する。培養後 5 週目に 1 本の培地に 100 以下のコロニーを生じた稀釈段階から、その腹腔滲出液 10ml 中の生菌数を算定した。

臓器内生菌単位数測定法：臓器の一部を切除し、素焼乳鉢中で、1% 苛性ソーダを組織重量の 9 倍量に至るまで加えつつ磨砕し、乳剤とする。それより各 10 倍稀釈段階液をつくり、各稀釈段階液より 0.1ml ずつを 3 本の小川培地に培養し、1 本の培地に 100 以下のコロニーを生じた段階から、臓器およびリンパ腺の 10mg 中の生菌単位数を換算した。

なお、腹腔滲出液の一部標本につき、細胞数および細胞種類の変動を併せて観察した。その方法は、前報¹⁾記載の如くである。

実験成績

(1) 感染菌の消長

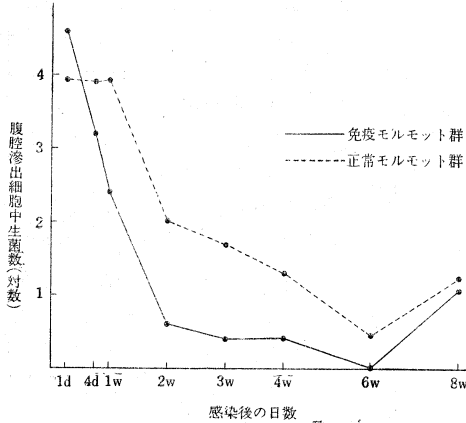
H₂ 菌 0.1mg (38×10^5 生菌単位) 腹腔内注射後の、非免疫および免疫モルモットにおける感染菌の消長は表 1 に示す如くである。まず、正常モルモット群における腹腔滲出液 10ml 中の細胞内菌数は、1 時間および 24 時間後は 10^4 の Order である。そして 4 日目、1 週目とはほぼ同じ Order で経過するが、2 週後に至ると急激に減少して 10^2 の Order になり、以後 3 週、4 週、6 週、8 週と漸減する。これに対し、結核免疫モルモット群では、24 時間後は 10^4 の Order で前者とほぼ同じであるが、その後は前者に比しほぼ 1 Order 少なく経過している。すなわち、4 日後には 10^3 に、1 週後には $10^2 \sim 10^3$ の Order

表1 H₂ 0.1mg (38×10⁵ V.U.) 腹腔内注射後の免疫および非免疫モルモット群における感染菌の消長

| 群別 | 培養臓器 | 感染後の期間 | | | | | | | | |
|-------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|-----|----|
| | | 1時間 | 1日 | 4日 | 1週 | 2週 | 3週 | 4週 | 6週 | 8週 |
| 正常モルモット群 | 腹腔滲出細胞 | 32,000 | 50,000 | 1,180 | 7,200 | 160 | 20 | 6 | 0 | 6 |
| | | 600 | 1,600 | 24,000 | 8,000 | 60 | 60 | 6 | 0 | 60 |
| | | 90,000 | 7,600 | 13,800 | 11,000 | 3,400 | 420 | 160 | 0 | 46 |
| | | 92,000 | | | | 0 | 20 | 46 | 66 | |
| | | 0 | 18 | 57 | 25 | 220 | 87 | 540 | 155 | |
| | 肺 | 1 | 6 | 143 | 27 | 110 | 370 | 250 | 158 | |
| | | 2 | 37 | 11 | 15 | 180 | 160 | 0 | 2 | |
| | | 83 | 20 | | 86 | 330 | 210 | 10 | | |
| | | 1 | 32 | 51 | 75 | 780 | 80 | 170 | 180 | |
| | 肝 | 1 | 15 | 48 | 115 | 450 | 890 | 110 | 92 | |
| | | 13 | 32 | 6 | 22 | 260 | 480 | 0 | 166 | |
| | | 96 | 15 | | 46 | 260 | 940 | 410 | | |
| | 脾 | 2 | 109 | 160 | 1,900 | 4,600 | 3,800 | 290 | 280 | |
| | | 76 | 34 | 170 | 1,900 | 10,600 | 1,300 | 20 | 240 | |
| 32 | | 118 | 55 | 170 | 3,900 | 880 | 60 | 250 | | |
| リンパ腺 | 47 | 58 | | 300 | 4,500 | 600 | 410 | | | |
| | 8 | 34 | 12 | 1,200 | 12,600 | 6,000 | 310 | 190 | | |
| | 66 | 82 | 340 | 3,600 | 15,400 | 4,800 | 150 | 180 | | |
| | 140 | 92 | | 680 | 11,800 | 6,200 | 790 | 160 | | |
| BCG免疫モルモット群 | 腹腔滲出細胞 | 1,180 | 158,000 | 1,600 | 120 | 0 | 0 | 0 | 1.2 | 20 |
| | | 1,420 | 15,600 | 1,040 | 560 | 20 | 6 | 6 | 0 | 12 |
| | 肺 | 3 | 30 | 16 | 0 | 30 | 53 | 1,030 | 3 | |
| | | 4 | 6 | 10 | 9 | 4 | 29 | 0 | 0 | |
| | 肝 | 2 | 49 | 38 | 4 | 49 | 39 | 120 | 18 | |
| | | 1 | 19 | 9 | 6 | 34 | 53 | 12 | 1 | |
| | 脾 | 19 | 40 | 45 | 49 | 510 | 1,180 | 200 | 65 | |
| | | 29 | 69 | 180 | 290 | 290 | 860 | 10 | 9 | |
| | リンパ腺 | 64 | 36 | 72 | 8 | 2,100 | 1,400 | 340 | 180 | |
| | | 0 | 86 | 22 | 160 | 480 | 520 | 11 | 25 | |

に減少し、2週以後ではわずかに認められるにすぎない。この両群の差は、図をみれば、さらに明らかである。

図 腹腔滲出細胞中生菌数の消長



次に、正常モルモット群における肺、肝、脾の各臓器およびリンパ腺では、接種24時間後にそれぞれ大体一定数の結核菌が分布し、それは感染後2週目を最高峰として定型的な増殖・死滅曲線を描いている。それに反し、結核免疫モルモット群では、H₂ 腹腔内注射後24時間目では正常モルモット群とほぼ同じ値を示しているが、その後の感染菌の消長は、それに比すればその増殖は強く抑制せられており、それは、正常群において菌増殖の旺盛な感染後2週までが、特に著しい。以上の結果は、さきに著者らが静脈内にH₂菌の0.01mgを接種した、実験

的モルモット結核症で得られた成績²⁾とほぼ一致しており、局所で相当数の菌がとらえられ分布菌の絶対数が少ないことを除外すれば、免疫群および非免疫群の臓器内結核菌の消長に関して、腹腔内感染と静脈内感染の間に著しい差異はないように思われる。

(2) 肉眼的結核性病変の推移

両群における肉眼的結核性病変の推移は表2にみる如くで、正常モルモット群では、感染後1週目までは肉眼的に全く変化なく、2週目から内臓に著しい病変を呈し、以後8週目まで大体同程度の病変が認められる。脾重は2週よりその増大が認められ、4週以後ではさらに著明となっている。免疫モルモット群におけるそれは、正常群に比すればやや病変が少なく、また正常群にみられたような4週以後の脾臓の腫大は認められなかった。

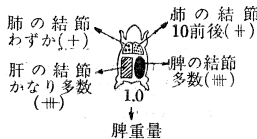
(3) 腹腔内単核細胞反応について

腹腔滲出液中の細胞数および細胞種類の変動をみると、表3に示す如くである。まず細胞数では、感染後2週目よりやや減少する傾向があるが、両群の間に、その消長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日目に好中球が86.5%と大部分を占め、それが減少すると共に単核細胞が増加し、4日目には単核細胞が93.3%を占め、以後単核細胞が大部分を占めている。

結核免疫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91.7%と大部分を占め、以後の単核細胞

表2 H₂ 01mg (38×10⁵ V.U.) 腹腔内注射後の免疫および非免疫モルモット群における結核性病変

| 接種後日数 | 正常モルモット群 | | | | | | | | BCG免疫群 | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1h | 1d | 1w | 2w | 3w | 4w | 6w | 8w | 1h | 1d | 1w | 2w | 3w | 4w | 6w | 8w |
| 正常モルモット群 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0.9 0.8 0.7 2.2 3.0 4.2 5.5 | | | | | | | | 0.8 0.7 1.0 1.5 1.6 1.1 1.0 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0.7 0.8 0.7 1.7 4.4 2.8 2.2 | | | | | | | | 0.8 0.6 1.0 1.0 1.9 0.9 1.0 | | | | | | | |
| BCG免疫群 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0.9 0.9 0.7 2.4 2.0 1.1 3.4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1.1 0.8 0.7 2.9 2.6 1.6 | | | | | | | | | | | | | | | |



の増加は極めて徐々である。すなわち、結核免疫モルモット群では正常モルモット群に比し、結核菌感染に対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。

総括ならびに考案

近時、結核免疫の本態が、単核細胞の菌処理態度の変化によるものとする実験成績が、Lurie³⁾, Suter⁴⁾らにより報告せられ、また Mackaness⁵⁾は単核細胞免疫説を認めえなかつたが、菌の毒力が単核細胞内の増殖力によつて表現される事実を認め、感染過程と単核細胞の密接な相互関係を証明している。

モルモットの腹腔を用いた著者らの実験においても、ほぼこれらの成績を裏付ける所見が得られた。すなわち、著者らは、正常およびBCG免疫モルモットの腹腔内に、人型結核菌H₂株の0.1mg (V.U. 38×10⁵) を接種し、接種直後より8週間、腹腔滲出細胞中の生菌数の消長を経過を追つて観察した。その結果、結核免疫モルモットでは、正常モルモットに比し、腹腔滲出細胞中の結核菌の消長が、明らかに少ないことが認められた。

表3 細胞数および細胞種類の変動

| 群別 | 細胞 | 正常モルモット群 | | | | BCG免疫モルモット群 | | | |
|--------|-----|--------------------------|---------|---------|----------|--------------------------|---------|---------|----------|
| | | 細胞数 (1mm ² 中) | 好中球 (%) | 好酸球 (%) | 単核細胞 (%) | 細胞数 (1mm ² 中) | 好中球 (%) | 好酸球 (%) | 単核細胞 (%) |
| 感染後の日数 | 1 日 | 2,500 | 86.5 | 1.5 | 12.0 | 2,200 | 7.0 | 1.3 | 91.7 |
| | 4 " | 1,800 | 6.0 | 0.7 | 93.3 | 2,000 | 1.0 | 0.3 | 98.7 |
| | 1 週 | 1,400 | 0.9 | 2.6 | 96.5 | 2,250 | 0.7 | 0.5 | 98.8 |
| | 2 " | 1,200 | 0.1 | 0 | 99.9 | 1,500 | 0.3 | 0.7 | 99.0 |
| | 3 " | 1,200 | 0.5 | 0.1 | 99.6 | 1,650 | 0.3 | 3.7 | 96.0 |
| | 4 " | 1,600 | 0 | 0.1 | 99.9 | 1,050 | 0.3 | 0.5 | 99.2 |
| | 6 " | 1,500 | 0 | 0 | 100.0 | 1,050 | 0 | 12.0 | 88.0 |
| | 8 " | 1,400 | 0 | 0.2 | 99.8 | 1,150 | 0 | 0.7 | 99.3 |

この場合、表3にみる如く、その腹腔滲出液中の細胞数の消長には、両群の間に大差は認められず、上述の成績を細胞数そのものの差に帰することはできない。また、表1にみる如く、接種1時間および24時間後の各臓器およびリンパ腺中の生菌数にも、両群の間に差は認められず、上述の成績を、腹腔内に接種せられた結核菌の接種局所から各臓器およびリンパ腺への散布状態の差異に求むることもできないと思われる。

それ故、この場合、免疫動物の腹腔内単核細胞の中に、結核菌の発育を阻止するものがあると考えるのが、最も妥当であると思われる所見が得られた。

さて、Lurieによれば⁶⁾、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、すでに上述した如くである。そしてまた、結核感作動物においては、再感染菌に対して単核細胞の動員が、より速やかに行われることが指摘⁶⁾⁻⁸⁾せられている。

以上の関係も、著者らの実験において明らかに認められた。すなわち、H₂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。そしてその後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。

Lurie⁶⁾はこの免疫動物の単核細胞動員の速やかなことをもつて、上述した単核細胞の菌処理現象と共に、結核免疫の第一義としているが、さきに著者⁹⁾らは、モルモット、ハツカネズミおよびウサギについて、結核死菌に対する腹腔内単核細胞反応を観察したところ、これらの動物ではその単核細胞動員様式がそれぞれ異なるにも

かかわらず、単核細胞を通してみた死菌の処理態度には同じような傾向が認められ、また、ツベルクリン脱感作操作¹⁰⁾および Triton 処置¹¹⁾により、免疫動物の単核細胞動員様式がそれぞれ変化するにもかかわらず、単核細胞による菌処理にはなんらの影響も認められないことを観察しえた。それ故、本現象を直接結核の免疫現象と結びつけることには疑問をもち、その意味づけについては目下引き続き観察を続けている。

次に、感染菌の各臓器およびリンパ腺内の動態をみると、各臓器とも、接種24時間後にはそれぞれ一定数の結核菌が分布している。非免疫対照群では、感染後2週を最高峰とする定型的増殖・死滅曲線を描いている。それに反し免疫群では、非免疫群で旺盛な菌数の増加のみられる感染後2週までにおいて、すでに、増殖が著明に阻止されている。この結果は、静脈内にH₂菌を接種した結果とよく一致し、局所で菌がとらえられ分布菌の絶対数が少ないことを除外すれば、これらの臓器内生菌数の消長に関して、腹腔内感染と静脈内感染との間に著しい差異はない¹²⁾ように思われる。

結 語

正常およびBCG免疫モルモットの腹腔内に、人型結核菌H₂株の0.1mg (V.U. 38×10⁵)を接種し、接種直後より8週間、腹腔内滲出細胞、肺、肝、脾、および後腹膜・門脈リンパ腺中の生菌数の消長を、経過を追って観察した。

1) 結核免疫モルモットでは正常モルモットに比し、腹腔内滲出細胞中の生菌数の消長は明らかに少なく、またこの成績の意味づけとしては、免疫動物の腹腔内滲出細胞の中には、結核菌の発育を阻止するものがあると考えるのが、最も妥当と思われる所見がえられた。

2) 免疫モルモットでは、正常モルモットに比し、結核菌に対する単核細胞の動員がより速やかである。

3) なお、感染菌の各臓器およびリンパ腺中の動態をみると、接種24時間後にはそれぞれ一定数の結核菌が分布し、以後の増殖の程度は、静脈内感染の場合とよく一致する成績が得られた。

(柳沢部長、冲中教授の御指導、御校閲を深謝いたします)

文 献

- 1) 原沢道美他：結核，32：360～365，昭32.
- 2) 原沢道美他：結核，31：540～543，昭31.
- 3) Lurie, M.B.: J. Exper. Med., 75: 247～268, 1942.
- 4) Suter, F.: J. Exper. Med., 97: 235～247, 1953.
- 5) Mackaness, G.B.: Am. Rev. Tuberc., 69: 495～504, 1954.
- 6) Lurie, M.B.: The Cyclopedia of Medicine, Surgery, Specialities: F.A. Davis. Co., Philad., 1950.
- 7) Gardner, L.U.: Am. Rev. Tuberc., 22: 379～412, 1930.
- 8) Long, E.R. & Vorwald, A.J.: Am. Rev. Tuberc., 25: 614～633, 1932.
- 9) 原沢道美他：腹腔内単核細胞の免疫学的研究，第1報～第6報：医学と生物学，39：118，202，40：76，150，231，41：67，昭31.
- 10) 原沢道美他：医学と生物学，42：4～7，昭32.
- 11) 原沢道美他：医学と生物学，43：1～5，昭32.
- 12) 加藤充彦：医学と生物学，32：314～319，昭29.