

細胞内結核菌発育に及ぼす Cortisone の影響

— 組織培養による研究 —

岩 井 和 郎

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受付 昭和 35 年 10 月 8 日

結 言

副腎皮質ホルモンの 1 つである Cortisone を Henche¹⁾ らが Rheumatoid Arthritis に用いて卓効を認めて以来、このホルモンの諸疾患への使用経験が多数報告されてきた。結核症への投与としては、1950 Spain²⁾ らがモルモットの実験結核症に Cortisone を併用すると局所の変化はピマン性で被包化傾向少なく全身結核は不変であると報告した。しかしその後 Le Meister³⁾, Bacos⁴⁾, Morgan⁵⁾ らの 30 日前後の投与では病変は少ないが組織内菌増殖は盛んであることを報告し、60 日以上以上の投与ないし家兎を用いた Karlson⁶⁾, Cummings⁷⁾, Bloch⁸⁾, 林⁹⁾, 日置¹⁰⁾, 青木¹¹⁾ らの報告ではいずれも病変増悪や菌血症の傾向を認めている。一般感染症についても同様の影響は認められ^{12)~15)}、またある種の動物では Cortisone 投与中の非病原性菌による病巣形成のありうることも報告されている^{16) 17)}。これらの報告から Cortisone 投与時には一方では炎症性反応の減退からくる病巣縮小化の傾向と、一方では組織内菌増殖による悪化拡大の傾向が認められ生体防禦機構のうえから大きな変化が起つているためと考えられる。

著者は今回組織培養を用いて単核細胞に貪食された結核菌の細胞内発育が Cortisone によりいかに影響されるかについてを *in vitro* で検討した。

実 験 方 法

吉武¹⁸⁾ の方法に準じて行い、喰菌の操作を簡便にするために次のように行つた。すなわち健康白雄モルモットの腹腔内に 1 万倍葡萄糖リンゲルを注入し 4 日後に得た腹腔内游离細胞浮游液を用う。これらの細胞の大部分は単核細胞である。これをリング内で 37°C 1 時間放置し細胞が沈下ガラス面に付着するのをまつて塩類溶液で洗う。一方 Sauton 培地継代 H₃₇Rv を 5% Tween 80 中 37°C 3 時間で均等化したのち、3,000 rpm 15 分 2 回遠沈しその上澄を単核菌浮游液として適当に稀釈して用いた。これに 5% に馬血清を加え前記細胞の上に流しこみ、37°C で約 1 時間放置して喰菌せしめた。塩類溶液でよく洗い細胞外の菌をよく除去したのち培養液 0.4

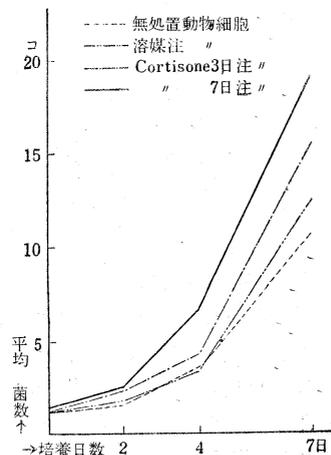
cc を加え、37°C フ卵器に入れて 48 時間ごとに液交換を行つた。培養液は血清 4: 塩類溶液 6 の割合から成り用うる血清は同種無処置動物血清とし、やむをえない場合のみ馬血清を混入した。2, 4, 7 日後に標本を取出し乾燥、メタノール固定、石炭酸フクリン・ヘマトキシリン染色を行い、各群 200~300 コの喰菌単核細胞につき平均菌数を求め各実験群の菌の増殖の比較を行つた。なお全実験はすべて 2~3 回繰返して行つた。

実 験 成 績

〔実験 1〕Cortisone acetate 処置動物細胞内結核菌発育について

Cortisone acetate 10 mg を連日 7 日および 3 日間モルモット大腿筋肉内に注射し対照として無処置動物および Cortisone 溶媒 (Tween 80 5 mg/cc, Carboxymethyl Cellulose 5 mg/cc, Benzylalkohl 0.9% 含有の生食水) 7 日間注射動物をとり、各群 3 匹宛の動物を用う。各群動物から得た細胞に上述のごとく結核菌を貪食せしめて培養し、各群における平均菌数の推移を比較検討した。その結果は図 1 のごとく無処置動物細胞内では培養当日の平均菌数 1.4, 2 日 1.8, 4 日 3.7, 7 日 11.0 を示し、溶媒注射動物細胞では当日 1.4, 2 日 1.9, 4 日 3.3, 7 日 12.4 を示すのに対して、Cor-

図 1 Cortisone acetate 処置動物細胞内菌発育



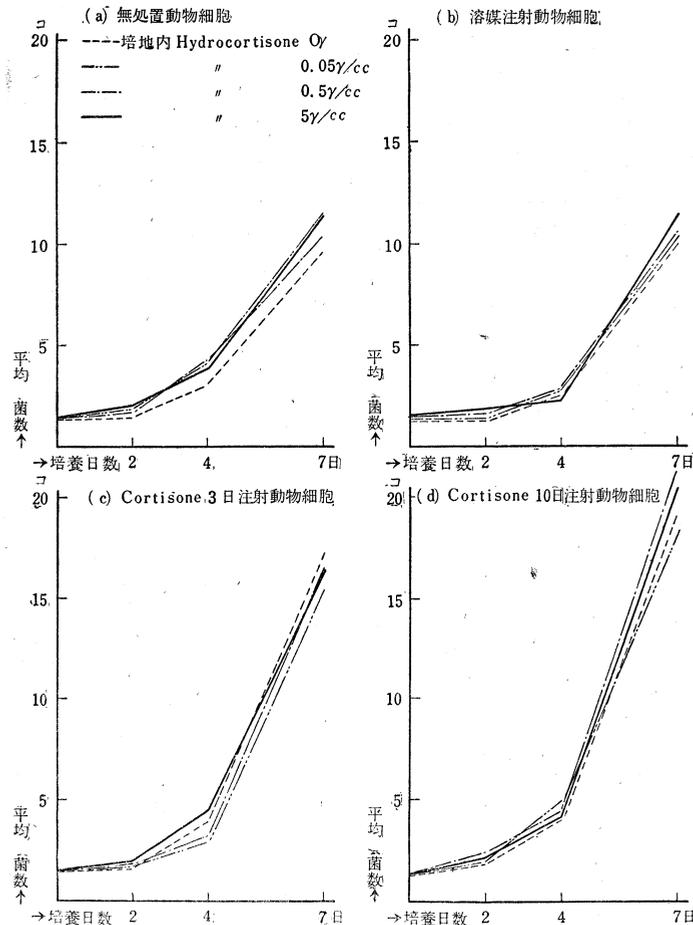
tisone 3日注射動物細胞内では当日 1.5, 2日 2.4, 4日 4.4, 7日 15.3 を示し, Cortisone 7日注射動物では当日 1.6, 2日 2.6, 4日 6.8, 7日 19.0 を示している。すなわち無処置動物および溶媒注射動物細胞内では菌発育に差を認めないが, Cortisone 7日注射動物細胞内での結核菌発育は著明に促進され同3日注射群でもある程度同様の傾向を認めた。

〔実験2〕 Hydrocortisone acetate を培地内に加えた場合の細胞内結核菌発育について

Hydrocortisone acetate 10 mg を連日モルモットに10日間および3日間注射し, 溶媒10日注射動物と無処置動物を対照とした。これらの細胞を培養するにさいして培地内に Hydrocortisone acetate を 0, 0.05,

0.5 および 5 γ /cc の割合に加えてその影響を観察した。その結果は図2に示すごとく無処置動物細胞内の菌数は当日 1.5, 7日目 0 γ /cc 9.5, 0.05 γ /cc 11.4, 0.5 γ /cc 10.4, 5 γ /cc 11.4 を示し, 溶媒注射群では当日 1.5, 7日目 0 γ /cc 10.5, 0.05 γ /cc 10.6, 0.5 γ /cc 10.7, 5 γ /cc 11.4 を, また Cortisone 3日注射群では当日 1.3, 7日目 0 γ /cc 17.3, 0.05 γ /cc 15.7, 0.5 γ /cc 16.6, 5 γ /cc 16.5 を, Cortisone 10日注射群では当日 1.2, 7日目 0 γ /cc 18.8, 0.05 γ /cc 18.5, 0.5 γ /cc 21.2, 5 γ /cc 20.5 を示した。以上の成績から細胞内結核菌の増殖は Hydrocortisone acetate を投与した動物においては〔実験1〕同様に促進されるが, それを培地内に 5 γ /cc までの割合に混入し直接細胞と接触せ

図2 培地内に Hydrocortisone acetate を加えたときの細胞内菌発育



しめてもほとんど影響をうけないものようである。

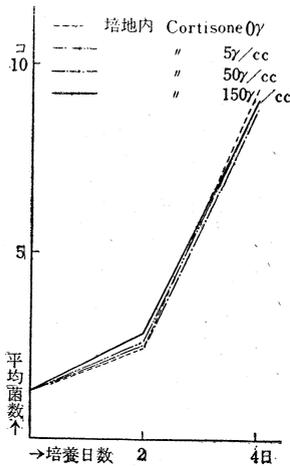
〔実験3〕 free Hydrocortisone を 150 γ /cc まで培地内に加えたときの細胞内結核菌発育について

副腎より分泌される形の free の Hydrocortisone を用いこれを培地内に 5~150 γ /cc の高濃度に加えたときの無処置動物内菌発育について検討を行った。なおこ

の実験では細胞内菌発育が良好のため7日目ですでに細胞変性がつよくあらわれたので観察は4日で打切った。その結果は図3に示すごとく培養当日の細胞内平均菌数は 1.4, 4日目には 0 γ /cc 9.3, 5 γ /cc 9.0, 50 γ /cc 8.9, 150 γ /cc 9.0 を示してその間に全く差を認めなかつた。なお 50 γ /cc 以上の Cortisone を含む培地内

は細胞が Nekrobiose の傾向を示すのが認められた。

図3 培地内に Hydrocortisone (free) を 150 γ /cc まで加えたときの細胞内菌発育



〔実験4〕 Cortisone acetate を結核菌培養培地内に混入したときの培地内菌発育態度について

1% 小川培地に 5 γ /cc の割合に Cortisone acetate を混入し、これに継代 H₃₇Rv 2 週培養の菌を階段稀釈的に接種してその発育を対照培地上のそれと比較した。その結果は表 1 に示すごとくいずれの稀釈倍数においても全く同じ発育菌数を示しており、これより Cortisone は直接結核菌の発育に影響を与えることはないものと考えられ、一般細菌を用いての Glaser⁴²⁾ の成績に一致する。

表 1 1% 小川培地に Cortisone acetate を 5 γ /cc に加えたときの培地上菌発育

	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
Cortisone 5 γ /cc	≡	≡	4
	≡	≡	4
	≡	≡	4
	≡	≡	3
	≡	≡	3
対	≡	≡	4
	≡	≡	2
	≡	≡	6
.....	≡	≡	2
	≡	≡	9

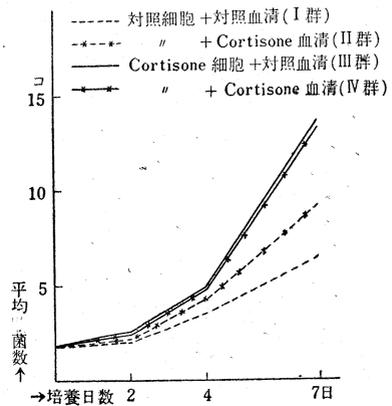
注：1% 小川培地継代 H₃₇Rv (2 週培養) 3 週判定

〔実験5〕 細胞内結核菌発育に及ぼす Cortisone 処置動物血清の影響について

培養にさいし培地に 40% 加える血清として無処置動物血清および Cortisone 処置動物血清を用い、そのおのおのにおける細胞内結核菌増殖を比較した。なお本実験では細胞も無処置動物細胞および Cortisone 処置

動物細胞を用いて次のごとき組合せのもとに行つた。すなわち I 群対照細胞・対照血清, II 群対照細胞・Cortisone 血清, III 群 Cortisone 細胞・対照血清, IV 群 Cortisone 細胞・Cortisone 血清の 4 群につき比較したが、その結果は図 4 に示すごとく I 群では当日 1.9, 4 日 3.8, 7 日 6.5 を示し II 群では 4 日 4.4, 7 日 7.2 を示し、II 群における菌増殖は I 群のそれに比して著しい。また III 群では当日 1.8, 4 日 4.9, 7 日 13.7 で、IV 群は 4 日 4.8, 7 日 13.1 を示し両群間に差を認めないが、II 群よりも良好な発育を示す。すなわち Cortisone 処置動物血清は無処置動物細胞内での結核菌発育を促進することが認められるが、Cortisone 処置動物細胞内発育には影響を認めえず、さらに Cortisone 処置動物血清を用いた場合の無処置動物細胞内の菌発育は Cortisone 処置動物細胞内のそれには及ばない。

図 4 Cortisone 処置動物血清の細胞内菌発育に及ぼす影響



〔Cortisone 処置動物各臓器の組織学的変化〕

副腎の重量減少を認め、皮質の菲薄化、分泌顆粒の異常などはある程度まで認められるが著明な所見ではない。脳下垂体には酸性嗜好顆粒がやや増える傾向にあり、甲状腺は多様の像を示して一定の傾向を認めず、睾丸は精細管の萎縮、精子形成不全をみることもあるも一定した所見ではない。脾は重量の減少を認め、組織学的には特に淋巴濾胞の萎縮がありその数大ききとともに減少し胚芽中心の萎縮、淋巴球の減少が認められるが他の部分では著変を認めない。肝もまた強い変化を示し肝細胞索の乱れ、肝細胞の腫大あり、原形質は疎な網状構造を示し多数の空胞状の部分呈するにいたつている。Zudan III 染色では脂肪滴の増加は著明ではなく、PAS 染色(消化酵素試験併用)でグリコーゲン顆粒は肝小葉全体に分布し疎大顆粒状となつて肝細胞内に多量に分布する。

総括および考案

炎症に対する Cortisone の影響は種々の面について

研究されているが、とくに炎症性反応の抑制とともに組織内菌増殖のおこることがよく知られ、結核結節形成は少ないのにもかかわらず臓器定量培養では多量の菌を証明し⁹⁾、組織標本でも細胞内での菌増殖が盛んであることがのべられている^{10) 45)}。この点について抗体産生能力の低下を実験的に追求している研究^{20)~22)}があり、一方 Lurie¹⁹⁾ は細胞動員の抑制よりは喰細胞の菌消化能力の低下によるのではないかと考えている。著者は今回組織培養を用いて、Cortisone 投与時の生体内菌増殖で表現される抵抗力の減退が細胞 1 コを取出して既知の培養条件においた場合どうなるかを検討した。

元來組織培養を用いての細胞内菌増殖速度の研究には、実験方法自体にある程度の問題が含まれている。Hanks²³⁾ は最初の喰菌数のばらつきの多いこと、細胞分裂による菌の分配、細胞変性のため一人喰菌された菌が培地内に放出され、これが別の細胞に喰われることによる菌数の変化などが実験値を大きく狂わせるとし、辻²⁴⁾ も最後の細胞変性による菌再分配の点を指摘している。これらの点に対し著者は次のごとき配慮のもとに実験を行つた。まず最初の平均喰菌数は 1.5 程度とし喰菌数 2 コ以内のものが 90%前後、もつとも多いもので 5~6 コとした。喰菌の程度は菌液の濃度と細胞との接触時間でかなりの程度まで調整しうる。最初の喰菌数が多いと細胞変性が早くくる点よりこの注意は必要である。また喰菌後に細胞外の菌を十分に洗い落してから培地を加える注意も必要である。細胞分裂による菌の分配については標本中に Mitose の像を認めたことはほとんどなく、これによる実験値の変動は問題とならない。つぎに細胞変性の多い標本はすべて廃棄して生存している細胞が大部分の標本についてのみ算定を行つた。また実験はすべて 2~3 回繰返し毎帯同じ傾向のみられる場合のみを取上げた。かかる考慮のもとに行えばこの実験方法は十分用うるに足るものと考えられる。

Cortisone 処置動物細胞の喰菌能については、Spain²⁶⁾ は腹腔内注入炭粉の追求から、Gamble²⁵⁾ は静注せる India Ink の血中よりの消失時間から、栗木²⁷⁾、勝²⁸⁾ は Congornt 係数の測定から細網内皮系の機能の変動を実験的に観察しているが、その成績はあるいは亢進するといひ^{27) 28)}、あるいは不変であるとし²⁵⁾、あるいは低下するといひ²⁴⁾ 一定した成績を示していない。著者の実験において Cortisone 処置動物細胞と無処置動物細胞とに同一条件で菌液を接触させて喰菌せしめているが、1 時間後の平均喰菌数は各回ともほとんど変わらず全実験を平均した数値も両細胞群間でほぼ等しく、Cortisone 処置細胞の喰菌能が著しく変動しているとは考えられない。

実験の結果はまず Cortisone 注射を行うとその動物の細胞内菌増殖は in vitro でも促進されており、細胞

自体がすでにある変化を受けているものと思われる。組織培養による同様の実験は尾関ら³¹⁾ も行つているが同様の傾向を報告している。しかしこの現象は Hydrocortisone を 150 γ /cc までの濃度で in vitro 細胞と接触させても起らず、50 γ /cc 以上では毒性を有することが認められた。培地内に Cortisone を加えたときの細胞内菌増殖については Wallace²⁹⁾ の研究がある。それによると「脾細胞に細菌を貪食させて培養するとある程度まで菌増殖をみるが、L 細胞内ではおこらない。しかし L 細胞の培養培地内に free Hydrocortisone 200 γ /cc を加えると脾細胞内同様ある程度の増殖をみ、薬液は細胞の代謝を変えるのではないか」とのべている。しかしこの実験は単核細胞と L 細胞、結核菌と細菌との違いがありその実験の意味も異なるところから、生体内単核細胞に対する Cortisone の影響を考えるとときに同列に論ずる訳にはゆかない。さらに Cortisone と細胞とを in vitro で接触させたときには代謝の異常がおこるのではないかという Martin³⁰⁾ の実験がある。すなわち多核白血球の浮遊液に葡萄糖と Hydrocortisone 0.1~10 γ /cc を加えたときに、その葡萄糖消費量、酸素消費量、乳酸産生量の低下することを示したものであるが、これは著者の実験からは細胞内菌増殖に対してよりもむしろ毒性と関係して考えられる。毒性については各種細胞の増殖に対する Cortisone の影響を組織培養を用いて行つた実験がある。Grossfeld³²⁾ は線維芽細胞の増殖は 200 γ /cc 以上の Cortisone で障害されるが上皮細胞は影響をうけないとし、Corman³³⁾ は線維芽細胞には 50~150 γ /cc で毒性ありとし、Holden³⁴⁾ は脾組織および白血球の培養で 10 γ /cc 以上の Cortisone は游走と増殖を阻止すると示している。この Holden 成績は著者の観察を裏付けるものと考えられ、この毒性の点やさらに末梢血中の Hydrocortisone 濃度は 5~20 γ /100 Plasma cc であろうとされている³⁵⁾ 点からして in vitro での細胞と Cortisone の接触に関する実験は打切つた。

以上の成績から次には Cortisone 処置動物血清についての検討が必要となつてくる。【実験 5】の成績は Cortisone 処置動物血清が無処置動物細胞内菌増殖を促進する作用のあることを示した。しかしその増殖は Cortisone 処置動物細胞内菌増殖には及ばず、この差は特殊な生活条件である組織培養液内と生体内での、血清成分と細胞との接触の違いのためとも考えられる。

Cortisone 処置動物血清を作用させたときには細胞内菌増殖は促進されるが、Cortisone を in vitro で細胞と接触させても影響がみられないという現象はいかなることを考えさせるであろうか。まず Hydrocortisone の生体内で分解ないしは合成された形のものか働くのではないかと考えられる。この点に関しては現在不明であ

り, Johns³⁵⁾も「循環ホルモンがfreeのHydrocortisoneであるか体蛋白との結合体であるかは不明である」としている。つぎにCortisone注射により二次的に他のホルモンの分泌異常がおこり, その流血中含量の多寡が直接細胞に影響することが考えられる。副腎皮質ホルモンは生体内で他の諸ホルモンの分泌と密接な関係があり, 互いに拮抗または協力作を示すことは周知の事実であるが, 上述の点の解明は今後の研究にまたねばならない。第3にCortisone投与により全身の代謝系に異常がおこりその結果として細胞自体の代謝も変るのではないかという考えがある。Cortisone投与により過血糖, 肝グリコーゲン増量, 血中ヒョロステロール・Lipoprotein増加, N排泄量の上昇など各代謝への影響があることは多数の報告にみられ, また著者の実験動物の肝所見も何かある代謝異常のあることを想定せしめるが, これらが細胞自体の代謝系になんらかの影響を及ぼしていると考えるのは困難ではない。これに関して辻ら³⁶⁾の研究は興味深い。すなわちCortisone処置動物の体液ないし血清中では結核菌の発育は促進され, 血清中の発育促進物質の増量と抑制物質の減量あり, 前者は高分子分劃に後者は低分子分劃にあるとしている点である。血清の各分劃の変化が生活体である細胞にいかに関与するかの問題はあるとしても, この研究は注目すべきであろう。ただCortisone処置動物血清は結核菌の発育を促進しないという報告³⁷⁾もあり, 実験方法の検討と相まつて追試を必要とするところであろう。最後に注目すべきはCortisone投与時の淋巴組織の態度で, 流血中の淋巴球の減少, 淋巴結節および脾淋巴組織の萎縮のあることは多くの文献上で一致した記載である。脾は感染症においてことに淋巴組織の増生があり, 抗体産生や喰菌などの面から炎症に重要な役割を演ずるといわれ, これは主として細網内皮系に負うものと考えられてきた。しかし著者の実験動物では淋巴組織の萎縮が著明でありむしろ淋巴球の減少の方が大きな意味を有するごとくみえる。淋巴球はその機能をほとんど知られていないとしても, 一般感染症の回復期に淋巴球増多症がおこりまた抗体産生に淋巴球が関与するといわれていることからその減少の意味は無視できない。Rich³⁸⁾は「淋巴球がある任組で結核症や他の感染症に対する抵抗性に関係する」ことを強調しており, かかる淋巴球減少がいかなる機序によるかは別としても細胞内菌発育と関係あるのではないかという考には十分の考慮を払う必要がある。この点に関しては青木¹¹⁾がすでに同様の見解をのべている。

古くから糖尿病患者の感染症は増悪しやすく, 甲状腺機能亢進者には結核は少ないといわれており, 感染抵抗性とホルモンとの関係は深いものと思われるが, その機作を知るにはあまりにも知識に乏しいのが現状であろう。Cortisoneと結核との関係も, 今後多くの研究によ

りはじめて明らかにされるものと思われる。

結 論

組織培養を用いて単核細胞内結核菌発育に及ぼすCortisoneの影響を検討しつぎの成績を得た。

- (1) Cortisone注射動物細胞内では結核菌の発育は促進されている。
- (2) Cortisone注射動物血清は無処置動物細胞内菌発育をin vitroである程度まで促進する。
- (3) Cortisoneをin vitroで細胞と接触させてもかかる影響はみられなかつた。
- (4) 5 γ /ccのCortisoneを含む1%小川培地上の菌発育は対照培地上の発育と変わらず直接結核菌に働いてその発育を促進することはない。

本稿を終るにあたり御校閲戴いた隈部所長, 岩崎研究部長, ならびに御指導戴いた吉武博士に謝意を表す。

本研究の要旨は第33回日本結核病学会において発表した。

文 献

- 1) P.S. Hench : Proc. Staf. Meet Mayo Clin., 24 : 181, 277, 1948.
- 2) D.M. Spain, & N. Molomut : Am. Rev. Tub., 62 : 337, 1950.
- 3) C. LcMeister, R. Tompssett : Am. Rev. Tub., 64 : 295, 1951.
- 4) J.M. Bacos, & D.T. Smith : Am. Rev. Tub., 67 : 201, 1953.
- 5) J.E. Morgan, & S.H. Wanzer : J. Bact., 67 : 257, 264, 1954.
- 6) A.G. Karlson, et al. : Proc. Staf. Meet. Mayo Clin., 27 : 465, 1952.
- 7) M.M. Cummings, P. Roch, et al. : Am. Rev. Tub., 65 : 596, 603, 1952.
- 8) R.G. Bloch, K. Vennessland, et al. : J. Lab. Clin. Med., 38 : 133, 1951.
- 9) 林久子・金井興美 : 結核, 30 : 631, 昭30.
- 10) 日置辰一朗 : 京大結研紀要, 6 : 77, 昭32.
- 11) 青木正和 : 第33回日本結核病学会総会.
- 12) W. Mogabgab, et al. : J. Lab. Clin. Med., 36 : 968, 1950.
- 13) E.H. Kass, et al. : J. Exp. Med., 99 : 89, 1954.
- 14) J.H. Jacobs, & F.C. Rose : Tubercle, 36 : 113, 1955.
- 15) 望月栄助 : 東京医科大学雑誌, 15 : 57, 昭32.
- 16) C. Le Meister, & R. Tompssett : J. Exp. Med., 95 : 393, 1952.

- 17) B.S. Berlin, C. Johnson : J. Lab. Clin. Med., 40 : 82, 1952.
- 18) 吉武洋海 : 綜合医学, 13 : 287, 昭31.
- 19) M.B. Lurie, et al. : Ciba Foundation of Exp. Tub. 246, Churchill Ltd. Co. 1956.
- 20) M. Bjørnebae, & E.E. Fischel. : J. Exp. Med., 93 : 37, 1951.
- 21) E.E. Fischel, et al. : Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 81 : 345, 1952.
- 22) F.G. Germuth : J. Exp. Med., 94 : 139, 1951.
98 : 1, 1953.
- 23) J.H. Hanks : Am. Rev. Tub., 77 : 789, 1958.
- 24) 辻周介 : 第 33 回日本結核病学会討論.
- 25) J.E. Gamble, & R.A. Hetting : J. Lab. Clin. Med., 40 : 801, 1952.
- 26) D.M. Spain, & N. Molmut : Science, 112 : 335, 1950.
- 27) 栗木栄子 : 関西医科大学雑誌, 10 : 28, 昭33.
- 28) 勝正孝 : 第 6 回日本化学療法学会, 昭33.
- 29) J.H. Wallace : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97 : 101, 1958.
- 30) S.P. Martin, et al. : J. Clin. Invest., 33 : 358, 1954.
- 31) 尾関一郎 他 : 第 33 回日本結核病学会総会.
- 32) H. Grossfeld, & C. Ragen : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86 : 63, 1954.
- 33) I. Corman : Science, 113 : 37, 1951.
- 34) M. Holden, & B.C. Seagal : J. Exp. Med., 98 : 551, 1953.
- 35) J.C. Johns : The Adrenal Cortex, Cambridge Univ. Press., 1957.
- 36) 辻周介 : Am. Rev. Tub., 76 : 90, 1957.
77 : 529, 1958.
- 37) 小沢庄太郎 : 京大結研紀要, 4 : 305, 昭31.
- 38) A.R. Rich 隈部英雄訳 : 結核病理発生論, 岩波書店, 昭31.
- 39) R.L. Magoffin, W.W. Spink : J. Lab. Clin. Med., 37 ; 924, 1951.
- 40) G.B. Mackerness, et al. : Am. Rev. Tub., 67 : 322, 1953.
- 41) E. Suter : Am. Rev. Tub., 65 ; 775, 1952.
- 42) R.J. Glaser : J. Lab. Clin. Med., 38 : 363, 1951.
- 43) L. Wallner, J.R. Thompson : Am. Rev. Tub., 66 : 161, 1952.