

BCG 生菌免疫マウス細胞の移入による結核免疫の研究

第1報 結核菌感染に対して感受性を異にする2系統
マウスにおける細胞移入効果を中心として浅葉 義一・永富 鳳一・綿引 定昭・深沢 行夫*
秋 山 武 久・前 田 勝 利**

*国立埼玉療養所 (所長 中沢恒三良)

**慶応義塾大学医学部微生物学教室 (主任 牛場大蔵)

受付 昭和 38 年 10 月 15 日

実験的チフス症におけるR型弱毒生菌免疫の効果は、非抗体性のいわゆる細胞性のものであつて^{1)~3)}、O抗体の産生に伴う殺菌能力の昂進によつてその効果をほぼ説明しうる死菌免疫—adjuvant 加死菌免疫をも含めて—の場合とは、本質的な差異のあることがようやく明らかにされてきたが^{4)~6)}、実験的結核症の場合には、兩種免疫法の効果に同様な本質的な差異があるものかどうか、まだ断定しがたい^{7)~12)}。

われわれは結核症の免疫における生菌ならびに死菌前処置の意義を解明する手掛りを得ることを究極の目的として、すでに実験的チフス症において成功した、被免疫動物の有核細胞を同種動物に移入して免疫性を導入しようとする方法を³⁾⁵⁾、マウスを用いた実験的結核症に適用した。

実験的結核症の免疫にも非抗体性細胞因子の関与する可能性を明らかにすべく、細胞移入法を応用した免疫の研究がすでに少数の学者によつて試みられているが、それらの実験は移入方法のみならず、効果の判定法もまちまちであり、細胞移入により免疫性の導入される可能性についてさえ、統一した見解が得られていない^{13)~17)}。なお先人の実験では生菌免疫された動物の細胞を移入するさいに、細胞に捕食された状態で持込まれる弱毒生菌の意義についてはほとんど考慮が払われていないが、われわれは実験的チフス症に細胞移入法を応用して以来、かかる弱毒生菌の recipient 体内における消長と免疫性の発現との間に不即不離の関係のあることを知つたので、今回の実験的結核症の細胞移入実験にあつても弱毒BCG株の recipient 体内での消長についてはとくに注意をした。

また donor 細胞の効果の持続期間は、recipient がこの細胞に対して同種移植免疫を獲得することにより左右されることが明らかとなつたので¹⁸⁾¹⁹⁾、使用動物の系統差、換言すれば donor, recipient の抗原性に関する genetic disparity についても考慮を払つた。

材料と方法

動物：大部分の実験には市販(金丸商店)の dd マウスの雌のみを使用した。一部の実験には慶応大学医学部微生物学教室で腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) 攻撃に対する均一な感受性を指標として選抜育成した、近交系の DK1 系マウスを雌雄の別なく使用した。DK1 系マウスは結核菌感染に対しても均一な、しかも dd マウスに比べるとはるかに高い感受性を示すことが知られている²⁰⁾。なおいずれのマウスも donor として免疫処置を開始される時期、ならびに recipient として細胞を移入される時期には 5~6 週令であつた。

免疫法：生菌免疫法としては、BCG 株の小川斜面培養より手振り法によつて作製した菌液を、湿菌量にして約 1 mg 宛 (7.6~8.0×10⁶) マウスの尾静脈より接種した。

死菌免疫法としては、人型黒野株の小川斜面培養より作製した菌液を、あらかじめ 70°C、30 分間加熱殺菌したものに、Freund の adjuvant (Aracel A, Drackeol) を混じ、菌量にして約 1 mg 宛をマウスの腹壁皮下に接種した。生・死菌ともに接種回数は 1 回のみで免疫期間は 3 週間とした。

細胞移入法：死菌前処置は能動免疫法としてのみ実施され、移入細胞の donor の免疫には BCG 株の生菌前

処置のみが実施された。移入細胞としては腹腔細胞を主とし、一部では脾細胞も使用した。腹腔細胞は既報の方法³⁾に従って、あらかじめ細胞採取の5~7日前にグリコーゲン食塩水を donor の腹腔に接種し、局処の滲出細胞の85%以上が単核球となった時期を選んで Hanks 氏液を腹腔に注入して洗い出した。脾細胞は摘出脾臓を冷却した Hanks 氏液中で細切したのち、駒込ビペットで吸引圧出をくり返して可及的に細胞を分離したものを、一たん中試験管に分注して数分間静置し、大型組織片の沈下をまつて上清部分より採取した。なおいずれの細胞も Hanks 氏液で2回以上遠沈洗浄して、十分に体液成分を除去したものを適量の冷却 Hanks 氏液に再浮遊し、中性紅試験で²¹⁾細胞の viability を確かめてから使用した。移入細胞数は腹腔細胞の場合は $1 \sim 3 \times 10^7$, 脾細胞の場合は $3 \sim 5 \times 10^7$ とし、いずれも末処置 recipient マウスの尾静脈より注入した。

なおこのさいに、移入細胞材料の一部を小川斜面に培養して、持込み生菌数を確認した。

移入効果の判定には、細胞移入4日後に強毒結核菌の小川斜面培養より作製した菌液を、湿量にして約 0.1 mg 宛, recipient の尾静脈より注射し、その後の体内保菌の消長を、逐次屠殺したマウスの肺, 脾を1%苛性ソーダ法でホモジナイズして定量培養することにより求め、その値を同様に処理した対照群の値と比較した。

攻撃用強毒株としては人型黒野株, あるいはストレプトマイシン (SM) 100 μ g 完全耐性の新鮮分離人型小泉株を使用した。

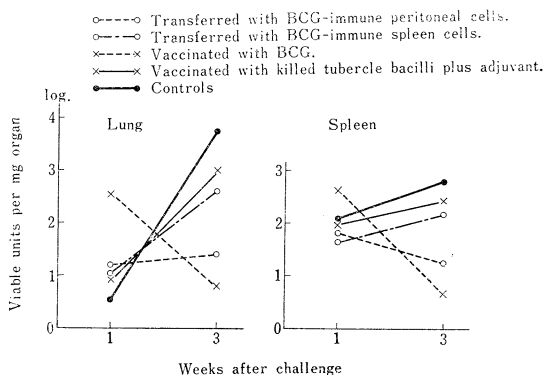
成 績

実験1: donor, recipient とともに dd マウスを用いた。細胞移入群としては BCG 生菌を接種後3週を経過したマウスの腹腔細胞を移入する群 (recipient 当りの持込生菌単位 461 コ) と脾細胞を移入する群 (持込生菌単位約 10,000 コ) を区別し、他に BCG 生菌能動免疫群, adjuvant 加黒野株死菌能動免疫群ならびに無処置対照群をおいた。攻撃には黒野株 (4.7×10^5) を用い、1, 3 週後に各群 5 匹宛を屠殺して肺, 脾を定量培養した。

成績は図1に示すごとく、各臓器 1 mg 当りの生菌単位より幾何平均値を求めるほか1, 3 週の平均値を線で結んだ。

臓器内での生菌単位の消長は肺, 脾ともに相似た傾向が認められた。すなわち、1 週後には BCG 免疫群が体内に残存した免疫菌が攻撃菌に加算されたためと思われるが、もつとも多い生菌単位を示したほかには、とくに対照群と細胞移入群との間に有意差は認められなかつた。しかし3 週判定では各群間の差は明らかとなり、BCG 免疫群では最強の菌増

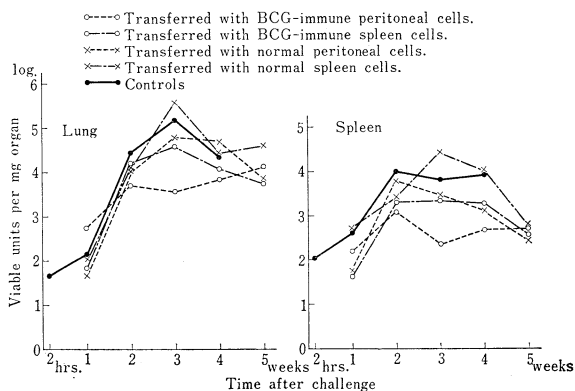
Fig. 1. Effects of Vaccinations and Transfers of Cells from Mice Immunized with BCG on the Challenge with *M. tuberculosis* Strain Kurono (Experiment with dd strain of mice)



殖阻止能を示したのに対して、黒野株の死菌免疫群では対照群とほとんど変わらない保菌状態を示し、細胞移入群ではこれらの中間の値を示した。ただし腹腔細胞移入群と脾細胞移入群の保菌状態を比較すれば、前者のほうがはるかに強い菌増殖阻止を示し、脾細胞移入群と対照群の保菌に著差のないのに反して、腹腔細胞移入群は BCG 免疫群にほぼ匹敵する阻止効果を示した。

実験2: 実験1と同様に donor, recipient とともに dd マウスを使用し、BCG 生菌免疫マウスの腹腔細胞 (持込生菌単位 300 コ), 脾細胞 (持込生菌単位 6,000 コ)

Fig. 2. Effects of Transfers of Cells from Normal or BCG Vaccinated Mice on the Course of Challenge Infection with *M. tuberculosis* Strain Kurono (Experiment with dd strain of mice)



を移入した群と無処置対照群のほかに免疫細胞移入群とほぼ同数の未処置マウスの腹腔細胞ならびに脾細胞を移入した計5群を区別した。攻撃には黒野株 (1.53×10^8) を用い、1~5週にわたり毎週各群3匹宛を屠殺して肺、脾を定量培養した。

成績は図2に示すごとく、肺、脾ともに2週後までは各群間に著差を認めえなかつたが、3週後より免疫細胞移入群、とくに免疫マウスの腹腔細胞を移入した群では強力な菌増殖阻止が認められた。ただし4週以後は免疫細胞移入群と他群との差は再び減少したが、これは各群で動物の斃死が始まり、体内保菌値の個体差が大となつたためと思われる。なお未処置マウスの腹腔細胞、あるいは脾細胞を移入した群では、終始対照群と著差のない保菌状態を示した。

実験3: 先にわれわれは腸炎菌を皮下に頻回接種して、動物の血清抗体価が上昇している時期に dd マウスならびに DK1 系マウスを選んで、その腹腔細胞あるいは脾細胞を集め、それぞれ homologous (dd) と isologous (DK1 系) マウスに移入して、recipient 体内で抗体産生が続けられる期間を調べたことがあつた。その結果、homologous な細胞を移入されたマウスでは、細胞移入後10日前後で抗体が検出できなくなるのに対し、isologous な細胞を移入されたマウスでは、細胞移入後110日以上も続いて抗体を検出することができた¹⁸⁾。かかる抗体産生期間の差は donor, recipient 間の抗原性の差に由来するもので、homologous な recipient では移入細胞に対して、早晚同種移植免疫を獲得してその細胞を死滅脱落せしめるのに反し、isologous な recipient では、移植免疫の成立しがたいと考えられる。

さらに別の実験(未発表)では dd マウス相互の間で皮膚移植を行なつた場合には、donor, recipient が同性であつても2週間後で移植片が脱落するのに反し、同性の DK1 系マウスの間で皮膚移植を行なつた場合には、移植片が200日の全観察期間を通じて生着することを確かめた。皮膚のごとき組織片を移植した場合と、腹腔細胞のごとく分離状態の細胞を移植した場合とでは、isologous の動物に移入しても生着期間に長短の生ずる可能性はあるが、実験3では donor, recipient ともに DK1 系のマウスを雌雄の別なく使用して移入細胞が長期生着した場合の効果を調べてみた。移入細胞は BCG 生菌免疫マウスの腹腔細胞とし、生のまま移入する群(持込生菌単位 572 コ)とあらかじめ 48°C 、30分加熱して細胞のみを殺してから移入する群(培養時雑菌混入のため持込生菌単位は不明なるも、上記の加熱条件では結核菌は死滅しないことを確かめてある)を区別し、他に無処置対照群をもうけた。攻撃は黒野株 (8.2×10^8) とし、3、4週後に各3匹宛を屠殺して肺、脾を定量培養した。成績の図表は省略したが、予想を裏切つて生の免疫腹腔細胞

を移入した群では、対照群より終始多い保菌値を示し、3週後の成績では平均値で脾で約10倍、肺では30倍の差が認められた。ただし加熱腹腔細胞移入群では対照群と著差のない保菌状態を示した。

なお興味深く感ぜられたことは、各群間の保菌状態を反映して、免疫細胞とくに生のままの免疫腹腔細胞を移入された DK1 系マウスは細胞移入の翌日から攻撃数日後まで立毛、不安状態を示したことで、このような症状は前2回の dd マウスを用いた実験では経験しなかつたところであつた。

実験4: 既述の実験とは別に、BCG 生菌免疫 dd マウスの腹腔細胞を DK1 系マウスへ移入したことがあるが、このさいも実験3で経験したとき recipient マウスの立毛、不安状態が認められたので、この現象は必ずしも isologous な免疫細胞を移入したために起こるものでなく、むしろ DK1 系マウスを recipient に選んだがために起こつたのではないかと考えられた。

実験4では DK1 系マウスに移入したさいに起こる立毛、不安状態が菌の体内保菌状態にいかんにか反映するかを確かめることを第1の目的とし、次に生菌免疫マウスの細胞を移入するさいに持込まれる BCG 生菌が recipient 体内でいかに消長するかを確かめることを第2の目的として、donor は BCG 生菌免疫 dd マウスとし、その腹腔細胞(培養時の雑菌混入のため、持込生菌単位の算定は不能)を2分して、dd マウスと DK1 系マウスに移入した。なお持込 BCG 株と攻撃菌の体内消長を区別するために、攻撃菌としては SM 耐性の小泉株 (7.6×10^8) を使用し、屠殺 recipient の臓器培養には、薬剤を含まない小川斜面と SM $50 \mu\text{g/ml}$ 含有小川斜面を併用した。なお上記の目的に合致すべく、攻撃直後、2, 4, 8,

Fig. 3. Effects of Transfers of Cells from Mice Immunized with BCG on the Challenge with Streptomycin Resistant Strain Koizumi of *M. tuberculosis* (Transfer from dd to dd)

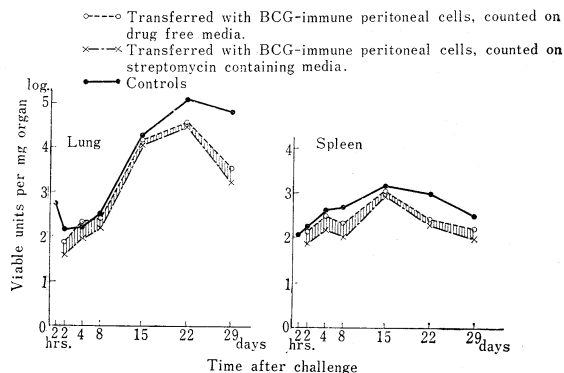
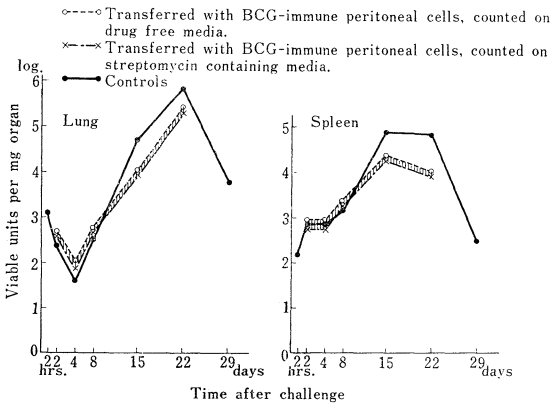


Fig. 4. Effects of Transfers of Cells from Mice Immunized with BCG on the Challenge with Streptomycin Resistant Strain Koizumi of *M. tuberculosis* (Transfer from dd to DK1)



15, 22, 29 日後と、とくに攻撃早期に頻りに屠殺して肺、脾を定量培養した。屠殺マウス数は毎回各群 3 匹とし、成績は図 3, 4 に示した。

dd マウスを recipient とした場合の成績を実験 1, 2 のそれに比較すると、今回の免疫細胞移入群の菌増殖阻止効果はやや弱い、臓器内の保菌消長の傾向は同一で、移入群と対照群との肺、脾内総生菌単位は 2 週後まで著差がなく、3 週以後明らかな差が認められた。さらに 2 週以前でも図の斜線部で示した BCG 株の占める数を減じて、SM 含有培地上に培養された攻撃菌のみについて比較すれば、免疫細胞移入群では肺、脾ともに対照群の生菌単位を終始下回る値を示すことが分かった。DK1 系マウスを recipient とした場合には、やはり移入早期に立毛、不安状態が認められ、dd マウスを recipient とした場合とは始めから違っていたが、発症の有無は体内保菌数にも反映して、攻撃 2, 4 日後の培養成績は脾臓では移入群と対照群間に差を認めえず、肺臓では移入群の保菌値が対照群のそれを明らかに凌駕していることが分かった。ただし 15 日以後には肺、脾ともに移入群の保菌値が対照群のそれを下回っており、実験 3 で isologous な免疫マウスの腹腔細胞を DK1 系マウスに移入した場合の成績とは、明らかに異なっていた。

考 察

BCG 生菌免疫マウスの細胞を移入された homologous,あるいは isologous なマウスの攻撃菌処理能力が変化しているのに反して、未処置マウスの細胞を移入されたマウスではかかる攻撃菌処理能力に変化が認められなかつたことは、免疫細胞の移入によつて donor 動物の免疫性が recipient に導入されたという可能性を示唆し

ている。この免疫性が抗体の移入によつて導入されたと仮定すれば、細胞移入時に既成抗体が細胞と同時に持込まれるが、生きてまま移入された免疫細胞が recipient の体内でも抗体の産生を続けることを証明しなければならない。ところがわれわれは免疫細胞を移入する場合にはあらかじめ十分洗浄して体液成分を除去したもののみを使用しているため、既成抗体の持込みは考えられず、続報²²⁾で述べるとく、特殊な前処置で殺した細胞にも強い免疫性を導入する効果が残っていることが確かめられて、recipient 体内での抗体産生も否定されたので、免疫細胞の移入によつてもたらされる recipient の反応性の変化は、先に秋山が腸炎菌感染マウスを対象として実施した細胞移入実験⁹⁾や、異種移植免疫を免疫動物の腹腔細胞や脾細胞を移入することにより新しい動物に導入しえた場合¹⁹⁾²³⁾と同様に、donor の細胞性の免疫性が recipient へなんらかの形で導入されたものと考えたい。異種移植免疫を導入する移入細胞の有効因子は現在かなり解明され、核酸や脂質を含まない蛋白を主とする物質であることが明らかとなり、マウス当りの最少有効量も数十 μg まで精製されてきたが、同様の化学物質が細菌感染症の免疫、とくに細胞性免疫の本態に関係するかどうかは今後の検討に待たなければならず、これらと Lawrence のツベルクリンアレルギーの“transfer factor”²⁴⁾との異同についても明らかにされていない。

免疫細胞と同時に recipient に持込まれる弱毒生菌の意義については、実験的チフス症を対象として細胞移入実験を行なつた場合にも注目されたところであるが、本報では強毒菌攻撃後 2 週以前では recipient 体内の総生菌数のかなりの部分が持込み BCG 株に由来することと、生菌免疫細胞を移入することにより recipient の免疫学的反応性に变化をもたらした場合には必ず細胞移入時に免疫用に使つた BCG 株のいくらかが持込まれていたことを述べるにとどめて、持込弱毒生菌の細胞移入効果の発現に及ぼす意義については続報²²⁾で論及したい。

本報で述べた成績のうちで、われわれの全く予期しなかつたことは recipient の系統差によつて、免疫細胞を移入した後に認められる免疫学的反応性に著差のあつたことである。その原因は明らかでないが、BCG 生菌免疫マウスの細胞を移入することにより、免疫性ととも遅延性アレルギーも導入される可能性は、われわれの細胞移入法が Chase²⁵⁾がツベルクリンアレルギーを導入しようとして考案した方法になつたところからも、当然考えなければならない。したがつて、細胞移入に基づく遅延性アレルギーの発現性が、DK1 系マウスにおいてとくに強いと仮定すれば、同系マウスを recipient とした場合に、とくに移入早期に立毛、不安状態や臓器内保菌の増加が認められたことが説明できる。Allison らは

結核に感染したウサギの免疫性が一過性に、とくに遅延性アレルギーの成立が強力であると考えられる時期に一致して低下することを認め、免疫性の低下が特殊の基質に対する動物細胞の代謝機能の低下と関連していることを示唆した報告のうちで、結核菌に対して強い感受性を示す系統のウサギの細胞は、より抵抗性のウサギの細胞よりも同上基質に対する代謝能が低下していることを述べているが²⁶⁾、彼らの成績に徴すれば、結核菌に対してとくに感受性の強い DK1 系マウスを recipient にした場合に、強い遅延性アレルギーが導入され、一見免疫に反する現象が認められたと仮定しても、あながち牽強付会とはいわれないのではなかろうか。

結 論

BCG 株の生菌を接種して3週後のマウスの腹腔滲出細胞あるいは脾細胞を未処置の isologous, ないし homologous なマウスの尾静脈より移入し、4日後に強毒結核菌を同じく尾静脈より攻撃してその後の体内菌消長を、逐次屠殺マウスの肺、脾の定量培養により求めた。

1. 近交系でない dd マウス間で免疫細胞の移入が行なわれた場合には、攻撃早期より recipient 体内での菌

増殖阻止効果が認められたが、阻止効果は脾細胞移入群よりも腹腔細胞移入群のほうが強力であつた。なお未処置マウスの細胞を移入しても菌増殖阻止効果の発現はなかつた。

2. BCG 免疫 dd マウスの腹腔細胞を近交系の DK1 系マウスへ移入した場合には、攻撃菌の増殖を阻止する効果は攻撃後2週以上経過した個体のみ認められ、攻撃後1週以前のマウスでは対照群マウスに比べて、逆に菌増殖の促進が認められた。

3. donor, recipient とともに DK1 系マウスを用いた場合には、免疫マウスの腹腔細胞の recipient は細胞移入早期の立毛、不安状態の発現とともに、攻撃3, 4週後まで引続き菌増殖の促進が認められた。

なお donor, recipient の系統差に基づく細胞移入効果の相違を、recipient マウスの結核菌感染に対する感受性の差を中心にして考察した。

本論文の要旨は第16, 17回国立病院療養所総合医学会(昭和36・37年)において講演した。

御指導をいただいた中沢所長、牛場教授に深謝する。

引用文献は第2報に記載する。

Passive Transfer of Immunity to Tuberculosis by Means of Cells from BCG vaccinated Mice. I. Comparison of Results obtained in Experiments with Two Mouse Strains different in the Susceptibility to Tuberculosis.

Effects of transfers of peritoneal exudative or spleen cells from donor mice immunized with BCG upon the challenge infection of recipients with virulent strains of *M. tuberculosis* were examined by means of quantitative cultivations of bacilli in the lungs and spleens.

In dd strain mice transferred with immune peritoneal cells from homologous dd mice, marked inhibi-

tory activity against bacterial multiplication was observed in the cultivated organs.

However, the recipients of immune spleen cells did not show so marked anti-microbial activity as observed in the recipients of immune peritoneal cells, although it was more obvious as compared with that of the controls.

When inbred DK1 strain mice which are more susceptible to infections with tubercle bacilli were transferred with peritoneal cells from immune isologous or homologous donors, enhanced multiplication of bacilli in organs of sacrificed mice, especially in an early phase of infections, was noticed.