

BCG 生菌免疫マウス細胞の移入による結核免疫の研究

第2報 種々前処理した免疫細胞の移入効果について

浅葉義一・永富鳳一・綿引定昭・深沢行夫*

秋山武久・前田勝利・牛場大蔵**

*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

PASSIVE TRANSFER OF IMMUNITY TO TUBERCULOSIS BY MEANS OF CELLS FROM BCG VACCINATED MICE

II. Effects of Various Pretreatments of Cells to be Transferred

Giichi ASABA, Hōichi NAGATOMI, Sadaaki WATABIKI and Yukio HUKAZAWA*
Takehisa AKIYAMA, Katsutoshi MAEDA and Daizo USHIBA**

(Received for publication October 15, 1963)

It was reported in the previous report that an antimicrobial activity against a virulent strain of *M. tuberculosis* could be conferred to dd mice, when they were transferred with peritoneal cells derived from the homologous (dd) mice which had been immunized with BCG strain. This effect of passive transfer was already apparent when the recipients were challenged 4 days after the transfer. In the present report the effects of some pretreatments of cells to be transferred and streptomycin (SM) administration to recipient mice after transfer were investigated. The results were judged by counting viable units of tubercle bacilli in the spleen and lung at various intervals after the challenge with a virulent strain resistant to SM, the culture being performed on media with and without SM.

A similar effect of passive transfer as by intact cells was obtained by using the material which had been oscillated (10 kc) for 2.5 minutes, but not by cells heated at 48°C 30 minutes. Viable units in organs of mice transferred with the heated cells showed the numbers similar to those in control animals. The effect of passive transfer with intact cells was also almost nullified when SM was administered during 4 days from immediately after transfer until challenge.

It was assumed from previous experiments that viable cells of BCG contained in transferred cells of immunized mice could withstand the pretreatments of heating or oscillation mentioned above, but they may be vulnerable to SM administered immediately after transfer.

* From Saitama National Sanatorium, Hasuda-machi, Saitama Prefecture.

** From Department of Microbiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo.

前報²⁷⁾では BCG 生菌で免疫したマウスの腹腔渗出細胞や脾細胞を homologous ないし isologous なマウスへ尾静脈より移入し、これらマウスには細胞移入 4 日後に

一斉に強毒結核菌を注射して、その後の主要臓器内での菌増殖の消長を肺、脾の定量培養から求めることにより、はたして donor の免疫性が細胞移入によつて reci-

pient へ導入されたかどうか調べた。

本報では細胞移入によって免疫性が導入される機序を明らかにすることを目的として、含有生菌にはほとんど無害であるが、動物性遊離細胞には致命的に作用するとき種々の前処理を行なつたあとに移入した場合や、逆に動物細胞には無害であるが BCG 株の体内での増殖を阻止する程度のストレプトマイシン (SM) を recipient に連続投与した場合に、recipient に現われる移入効果がいかに変化するかを検討した。

材 料 と 方 法

動物：前報と同じ市販 dd マウスの雌で、donor として免疫を始められる時期ならびに recipient として細胞を移入される時期はともに 5～6 週令であつた。

免疫法：donor マウスの免疫法としては小川斜面に培養した BCG 株より手振り法で作製した菌液の湿菌量約 1 mg (8×10^6) を尾静脈より接種した。

細胞移入法：donor マウスの BCG 生菌免疫期間は 25 日としたので、細胞採取の 5 日前、すなわち BCG 接種後 20 日に 0.04 mg/ml 濃度のグリコーゲン食塩水 1 ml 宛を腹腔に注射しておき、単核球が総滲出細胞の 85%以上になつたときに屠殺した。今回の実験では腹腔滲出細胞のみを移入し、移入効果の弱い脾細胞は使用しなかつた。腹腔滲出細胞は前報²⁷⁾の場合と同様にヘパリン加 Hanks 液で 3 回遠沈洗浄して体液成分を十分除去したものをそのまま移入する群のほかに、移入細胞をあらかじめ音波曝露、加熱処理で不活化してから移入する群、recipient マウスに SM を投与する群と非移入対照群の合計 5 群を区別した。音波曝露は東洋科工機製作所製の 50-5 型、出力 10 KC の音波発生機で 150 秒処理したものであり、加熱は移入細胞を 48°C の恒温槽に 30 分間保つた。音波曝露により細胞の形態は全く破壊されて amorphous となり、加熱により細胞の viability が失われることは中性紅試験によつて確かめられた。なおかかる前処理でも移入材料中に含有される BCG 株生菌がなんら傷害されないことは、処理材料を定量培養して生菌数の減少しないことから明らかとなつた。SM 投与は不活化処理を加えない腹腔滲出細胞を移入された recipient マウスの大腿皮下へ、移入後 4 日間連日 1 回宛 2,000 μ g を注射したもので、音波・加熱処理群とは逆に持込み BCG 株の体内での増殖のみを抑制して、移入細胞の活性はそこなわないことを期待したものであつた。

移入細胞数はいずれの移入群も等しく 1.5×10^7 とし、尾静脈より注入した。

なお移入材料の一部を小川斜面に塗抹培養したが、全群雑菌混入のため持込み生菌数は確認しえなかつた。しかし従来経験よりかなりの BCG 株生菌が細胞と同時

に移入されたものと推定される。

細胞移入効果の判定法も前報²⁷⁾に準じ、細胞移入後 4 日目に、肺結核患者より新鮮分離した SM 100 μ g に完全耐性を示す結核菌中島株の約 0.01 mg (5.4×10^4) を尾静脈より注射し、攻撃 30 分後 (対照群のみ) と 1, 2, 3, 4 週後に各群 3 匹 (ときに 2 匹) 宛を屠殺して、肺・脾内の生菌単位を 1%苛性ソーダを応用した定量培養法により求め、細胞移入群と対照群の値を比較して細胞の移入効果を判定した。

なお攻撃 1, 2 週後の培養材料は薬剤を含有しない小川培地のほかに、SM 50 μ g/ml 加小川培地へも同時に塗抹培養して、発生集落が細胞移入時に持ち込まれた BCB 株に由来したものか、攻撃菌として使用された SM 耐性菌に由来したものかを区別した。

攻撃 3, 4 週後の培養には薬剤含有培地を併用しなかつたが、従来経験によれば、攻撃 3 週以後に肺・脾より分離される菌の大部分は攻撃に使つた強毒菌であつて、細胞移入時に持ち込まれる弱毒 BCG 株に由来する割合はきわめてわずかであることが分かっているためであつた。

成 績

SM 耐性強毒中島株を攻撃後 1～4 週に屠殺したマウスの肺・脾の生菌単位を各臓器 1 mg 当りに換算したものを表 1 に示した。なお括弧内の数字は SM 含有小川斜面上の集落から算定した攻撃菌の生菌単位を示し、括弧外の数字は薬剤を含まない小川斜面上の成績から求めた生菌単位で、攻撃菌のほかに BCG 株をも含めた数値である。

図 1 は攻撃 1～4 週後の生菌単位 (1, 2 週後は SM 含有培地を使つて求めた生菌単位より算定する) のほかに、攻撃 30 分後の生菌単位より各群別に幾何平均値を求めて符号で示し、さらに符号を線で結んで攻撃菌の肺・脾内での消長を表わしたものである。

これら図表から明らかなごとく、加熱前処理細胞移入群と生細胞移入後 SM を投与した群では、攻撃のみの対照群と終始著差のない臓器内菌分布を示したのに対し、生細胞移入群と音波前処理細胞移入群では攻撃初期より実験終了の 4 週後まで臓器内での攻撃菌の増殖を明らかに阻止していることがわかつた。

考 察

前報²⁷⁾においても触れたごとく、われわれの細胞移入法を踏襲するかぎりには、移入細胞中には donor を免疫するために使用した弱毒生菌が含有されているので、これら生菌が細胞移入によつてもたらされる免疫効果の発現にいかなる役割を果たすかは慎重に考慮されなければならない。

Table 1. Viable Units of Tubercle Bacilli after Challenge in the Lung and Spleen of Mice Transferred with BCG-immune Peritoneal Cells
Effects of pretreatments of cells to be transferred and streptomycin administration to recipients

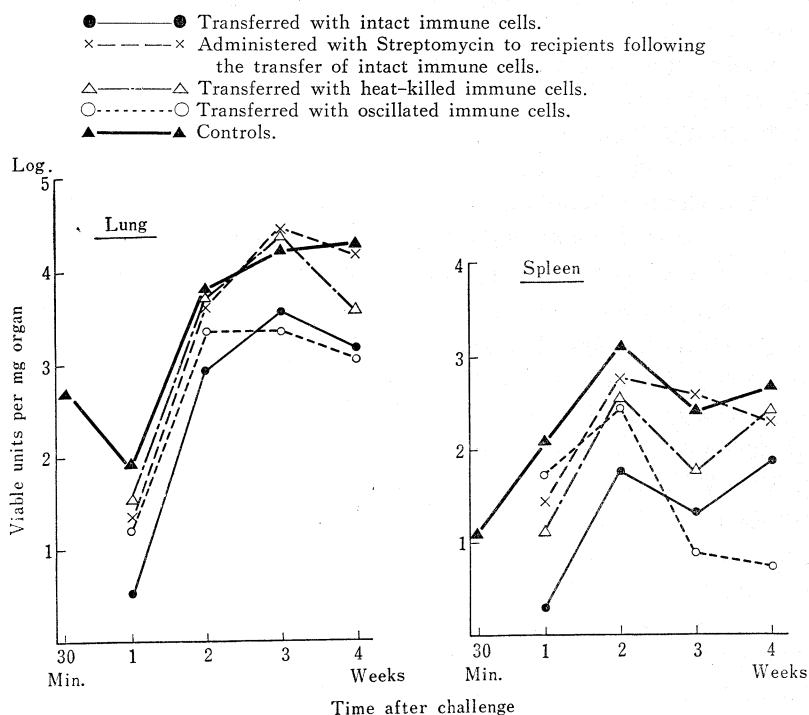
Pretreatment of cells	Streptomycin administration to recipients	Weeks after challenge								
		1		2		3		4		
		Lung	Spleen	Lung	Spleen	Lung	Spleen	Lung	Spleen	
None	No	{	30* (3)**	12 (1)	1,090 (250)	38 (23)	3,400	10	1,000	50
			13 (4)	20 (4)	3,800 (2,800)	440 (160)	4,000	15	2,000	100
None	Yes	{	50 (10)	29 (20)	5,750 (4,750)	1,765 (1,050)	12,650	85	171,000	485
			92 (35)	23 (21)	6,800 (5,100)	480 (450)	21,500	335	1,210	100
			84 (28)	64 (60)	2,400 (3,100)	485 (430)	65,000	2,150		
Heating at 48°C for 30 min.	No	{	55 (27)	c	6,900 (3,800)	870 (650)	65,500	435	3,950	1,500
			55 (34)	40 (30)	8,050 (6,050)	400 (210)	15,600	855	3,450	50
			46 (27)	98 (70)			13,100	600		
Oscillation for 2.5 min.	No	{	25 (13)	47 (16)	4,100 (3,100)	2,000 (650)	11,150	95	1,500	25
			32 (9)	147 (90)	2,000 (1,750)	137 (161)	1,350	5	850	0
			66 (33)	200 (120)			740	0		
No transfer (control)	{	(130)	(50)	(3,900)	(1,070)	6,400	65	20,000	700	
		(69)	(305)	(10,800)	(1,850)	14,400	300	14,200	300	
				(3,810)	(1,055)	42,000	815			

* Number of cultured bacilli per mg of organs.

** Parentheses show the number of bacilli cultured on streptomycin (50 µg/ml) media.

c: contaminated.

Fig. 1. Effects of Transfers of Cells from Mice Immunized with BCG on the Challenge with Streptomycin Resistant Strain Nakajima of *M. tuberculosis*



細胞移入の効果が、これら弱毒生菌によつて recipient に賦与される能動免疫のみで説明しえないことは、
1) われわれの実験では終始、細胞移入後4日目に強毒菌を攻撃しており、かかる短時間では、攻撃菌のその

後の増殖を阻止するほどの能動免疫が賦与されるとは考えられないこと、2) 移入細胞の前処理法として、われわれが採用した音波曝露および加熱の条件では結核菌の viability は傷害されないことはすでに知られているが、

加熱前処理細胞移入群における攻撃菌増殖阻止効果のみが生細胞移入群や音波前処理細胞移入群のそれに比べて劣ること、および前報²⁷⁾に示したごとく、3) 移入に用いた腹腔渗出細胞と脾細胞にはともに同程度の弱毒生菌が含有されていたにもかかわらず、移入後の攻撃菌増殖阻止効果は腹腔細胞移入群においてのみ明らかに認めえたことなどによつて理解されよう。

ただし、細胞移入時に弱毒生菌が持ち込まれ、しかもこの生菌が recipient 内で増殖しうる環境が与えられることが移入効果の発現に必須の条件であるように考えられる。生細胞移入直後より SM を連続投与した場合に攻撃菌増殖阻止効果の認めえなかつたことは、かかる条件が満たされなかつたためではなからうか。

他方、免疫された donor のある種の有核細胞の移入も免疫効果の発現に必須の条件であることは、前報²⁷⁾に示したごとく、donor と recipient 間での系統差により移入効果に著差のあることや、未免疫マウスの腹腔渗出細胞に BCG 株の生菌を添加して移入しても免疫効果の認められなかつたことから理解することができる。

ただし移入効果の発現するために、必ずしも viable な有核細胞の移入されることが必要でないことは、音波曝露によつて形態学上全く破壊された細胞を移入した場合にも、生細胞移入時と同程度の攻撃菌増殖阻止効果の認めえたことから明らかである。

以上の成績は、recipient 体内で増殖しうる条件が満たされた弱毒生菌と、免疫された donor のある種の有核細胞に含まれる有効因子の協力作用によつてのみ細胞移入効果がもたらされることを示唆している。なお、この細胞性有効因子は細胞の viability とは無関係であるが化学的には不安定であり、加熱により容易に失活することは、48°C で 30 分加熱した細胞を移入しても免疫効果の認めえなかつた成績が示している。

細胞移入によつて recipient に免疫性が賦与されるための上記諸条件は、腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) の弱毒生菌で免疫したマウスの細胞を同種マウスに移入した場合に感染死防御能力が賦与される場合の条件³⁾に全く一致しており、両種感染症の免疫——とくに細胞性免疫——の成立機序が類似していることを示唆している。

さらに、音波曝露と加熱処理とが細胞の移入効果を傷害する度に著差のあることは、音波曝露した細胞にはツベルクリン・アレルギーを移入する効果が残されているが、加熱前処理細胞にはかかる効果の全く認めえないという報告³⁹⁾⁴⁰⁾からもうかがわれる。

細胞移入によつて recipient に導入された免疫性が donor の免疫性、とくに細胞性の免疫性を復元したものであろうことは前報²⁷⁾の考察で論及したところであり、donor の免疫に rough 型菌の生菌を使用する腸炎菌の実験の場合ではとくに容易に理解されたが、免疫菌と攻

撃菌の体表抗原構造に差が認めえない結核菌を使つた今回の実験でも、recipient 内で抗体を産生しえない音波前処理細胞移入群が生細胞移入群に劣らない強い菌増殖阻止効果を示したことは、細胞移入効果の発現に抗体がほとんど作用していないであろうことを示唆している。

最後に、細胞移入効果の特異性について考察を加えたい。細胞移入効果が免疫 donor の細胞を特殊の条件のもとで移入した場合にかぎつて認められ、未処置動物を donor とした場合に認めえないことは、一応本効果が donor 細胞の免疫性の導入に基づくことを示唆しているが、結核症とブルセラ²⁸⁾²⁹⁾、百日咳³⁰⁾、ヒストプラスモージス³¹⁾、ブドウ球菌症³²⁾、サルモネラ症³³⁾³⁴⁾などとの交叉免疫の存在が確かめられてきたごとく、細胞性免疫自体の特異性の存在さえ議論されている現段階ではわれわれが検知した細胞移入効果がはたして donor の特異的な細胞免疫性の導入のみに基づいたものかどうか断言することはできない。

ただし結核菌で能動的に免疫した動物の細胞は未処置の同種動物の細胞に比べて、食菌能³⁵⁾、血清抗体産生能³⁶⁾、酸素消費能⁸⁾、ある種の代謝機能²⁸⁾³⁷⁾³⁸⁾などが昂進することが認められているので、かかる性状を donor, recipient の細胞間に比較するとともに、細胞移入を契機として一過性に昂進する非特異的な細網内皮系組織の活性と細胞移入効果の相関についても検討をすすめて、細胞移入効果の導入される機序を明らかにしていきたいと考えている。

結 論

BCG 株生菌を接種して 25 日目の dd マウスの腹腔渗出細胞を同種マウスへ尾静脈を介して移入し、4 日後に強毒結核菌を同じく尾静脈より接種したのちの肺・脾内生菌単位は対照群に比べて明らかに減少することを認めた。

かかる主要臓器内での菌増殖阻止効果は、移入材料をあらかじめ 10KC 音波で 150 秒前処理してから移入した場合には認められたが、48°C で 30 分間加熱してから移入した場合には認められなかつた。

生細胞を移入した場合でも、強毒菌を接種するまでの 4 日間、連日 1 回宛ジヒドロストレプトマイシン 2,000 μ g を recipient の皮下に投与すると、ストレプトマイシン耐性の攻撃菌は対照群マウスにおけると同様に増殖し細胞移入効果が認められなくなつた。

本報告の要旨は第 38 回日本結核病学会総会（昭和 38 年）において口演された。なお本研究は Public Health Service Research Grant E-4738 (U.S.A.) および文部省科学研究費（総合研究「細胞免疫の本態」班長牛場）

の援助を受けた。

文 献

- 1) Ushiba, D., Saito, K., Akiyama, T. and Sugiyama, T.: Mechanisms of Infection and Immunity of Cytopathogenic Bacteria, Symposium of the 11th Kanto Branch Meeting of the Japan Bact. Association. 1959.
- 2) Ushiba, D., Saito, K., Akiyama, T., Nakano, M., Sugiyama, T. and Shirono, S.: Japan J. Microbiol. 3 : 231, 1959.
- 3) 秋山武久 : 日本細菌学雑誌, 14 : 87, 1959.
- 4) 城野智 : 日本細菌学雑誌, 16 : 330, 1961.
- 5) 牛場大蔵・秋山武久・城野智 : 日本細菌学雑誌, 17 : 65, 1962.
- 6) 秋山武久・前田勝利・牛場大蔵 : 日本細菌学雑誌, 17 : 829, 1962.
- 7) Zitrin, C.M. and Wasz-Höckert, O.: Amer. Rev. Tuberc., 76 : 256, 1957.
- 8) Raffel, S.: Ciba Symposium on Experimental Tuberculosis, edited by G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron, J.A. Churchill Ltd., London, p. 261, 1955.
- 9) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 75 : 247, 1942.
- 10) Elberg, S.S.: Bact. Rev., 24 : 67, 1960.
- 11) Suter, E.: J. Exp. Med., 97 : 235, 1953.
- 12) Mackaness, G.B.: Amer. Rev. Tuberc., 69 : 495, 1954.
- 13) Sever, J.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103 : 326, 1960.
- 14) Suter, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 535, 1961.
- 15) Millman, I.: Amer. Rev. Res. Dis., 85 : 30, 1962.
- 16) Fong, J., Chin, D. and Elberg, S.S.: J. Exp. Med., 115 : 475, 1962.
- 17) 橋本達一郎 : 日本細菌学会関京支部例会, 1962.
- 18) 秋山武久・城野智・斎藤和久・牛場大蔵 : 日本細菌学雑誌, 17 : 115, 1962.
- 19) 秋山武久・前田勝利 : 癌の臨床, 8 : 628, 1962.
- 20) 牛場大蔵・斎藤和久・中野昌康・氏家淳雄 : 医学と生物学, 64 : 13, 1962.
- 21) 大根田玄寿 : 日本医事新報, 1437, 3167, 1951.
- 22) 浅葉義一・永富鳳一・綿引定昭・深沢行夫・秋山武久・前田勝利・牛場大蔵 : 結核, 39 : 95, 1964.
- 23) 秋山武久 : 日本小児科学会総会特別講演, 1963 ; 日本小児科学会雑誌, 37 : 219, 1963.
- 24) Lawrence, H.C.: Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive states, A. Hoeber Harper Book, New York, p. 279, 1961.
- 25) Chase, M.W.: J. Allerg., 26 : 242, 1955.
- 26) Allison, M.J., Zappasodi, P. and Lurie, M.B.: Amer. Rev. Resp. Dis., 85 : 364, 1962.
- 27) 浅葉義一・永富鳳一・綿引定昭・深沢行夫・秋山武久・前田勝利 : 結核, 39 : 55, 1964.
- 28) Nyka, W.: Amer. Rev. Tuberc., 73 : 251, 1956.
- 29) Elberg, S.S., Schneider, P. and Fong, J.: J. Exp. Med., 106 : 545, 1957.
- 30) Dubos, R.J. and Schaedler, R.W.: J. Exp. Med., 104 : 53, 1956.
- 31) Hedgecock, L.W.: Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 125, 1961.
- 32) Dubos, R.J. and Schaedler, R.W.: J. Exp. Med., 106 : 703, 1957.
- 33) Howard, J.G., Biozzi, G., Halpern, B.N., Stiffel, C. and Mouton, D.: Brit. J. Exp. Pathol., 40 : 281, 1959.
- 34) 牛場大蔵・斎藤和久・氏家淳雄・秋山武久・中野昌康 : 結核, 37 : 67, 1962.
- 35) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 69 : 579, 1939.
- 36) Lewis, P.A. and Loomis, D.: J. Exp. Med., 40 : 503, 1924.
- 37) Suter, E. and Hulliger, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 88 : 1237, 1960.
- 38) Mauer, H.: Beitr. Klin. Tuberk., 106 : 421, 1952.
- 39) Cummings, M.M., Patnode, R.A. and Hudgings, P.C.: Amer. Rev. Tuberc., 73 : 246, 1956.
- 40) Opreescu, C.C.: Nature., 193 : 492, 1962.