

第 48 回 総 会 シ ン ポ ジ ウ ム

I. 結核免疫におけるリンパ球とマクロファージを
中心とした生体反応

座長 堀 三 津 夫

受付 昭和 48 年 10 月 9 日

The 48th Annual Meeting Symposium

I. CELLULAR RESPONSE OF LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES
IN TUBERCULO-IMMUNITY*

Chairman : Mitsuo HORI

(Received for publication October 9, 1973)

In this symposium the role of lymphocytes and macrophages in tuberculo-immunity was discussed.

The speakers and the subjects of their presentation were as follows:

1) Shigeru MORIKAWA

Response of Lymphocytes and Macrophages in the Establishment of Delayed Hypersensitivity and Granuloma Formation.

2) Kiyoshi SHIMA

Macrophages in Tuberculous Lesions; Their Function and the Kinetics of Macrophage Response.

3) Shizuko MURAOKA

In Vitro Studies on the Role of Immune Lymphocytes in Acquired Resistance to Tuberculous Infection.

4) Kenichi YAMAMOTO

The Mechanism of Enhancing Effect on Tuberculo-Immunity by the Intravenous Challenge of Antigens.

5) Koomi KANAI and Eiko KONDO

Cellular Response in the Mouse Spleen in Relation to Antituberculous Immunity.

6) Kazuhisa SAITO

Activation of Macrophages by Lymphoid Cells from BCG-Infected Mice.

7) Takakazu AOKI

Helper Activity of Tuberculin Reactive Lymphocytes on Secondary Anti-Hapten Antibody Response.

As a result of the interaction between the specific antigen and the T cell, maybe in cooperation with B cell, some macrophage activating factors were produced or released either in vitro or in vivo. And the intracellular growth of tubercle bacilli in

* From the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka 565 Japan.

the activated macrophages was inhibited.

This process might be the main way of antituberculous immunity. [Muraoka, Yamamoto, Kanai, Saito]

Morikawa suggested that thymus cells in cooperation with bone marrow cells played an important role in the development of delayed hypersensitivity and it was found by Shima that the migration of macrophages from bone marrow was predominant and the division of macrophages was limited to only once or twice in tuberculous lesion. This phenomenon closely related to the development of delayed hypersensitivity.

Aoki showed that immune lymphoid cells (T cells) from the animal sensitized with tubercle bacilli had the helper activity cooperating with B cells in vivo in the induction of anti-hapten antibody formation and had the activity to produce MIF in vitro.

近年免疫現象を細胞のレベルで解析していこうとする研究分野が急速に進展しつつある。

結核における免疫は周知のように古くから細胞免疫が主体をなすと考えられてきたが、細胞免疫の本態は明らかでなく、最近の免疫学の進歩はこの本態の研究によりやく手がかりを与えようとしている。また遅延型アレルギーの代表的なものである結核アレルギーについては、その反応の場における細胞反応の様相などが詳細に研究されてきたが、細胞反応が起る要因、細胞反応の意義などに関しては近年までほとんど明らかにされてこなかった。

しかしながら細胞レベルでの免疫学の最近の研究は、一般論的にいつて、以下のように展開し、免疫に関与する細胞とそのからくりが徐々に分明しつつある。

抗原物質が生体に侵入した場合、この抗原物質はまずマクロファージに取り込まれ処理されて処理抗原となり、この処理抗原がリンパ系細胞に作用してここに免疫が芽ばえはじめる。この際に関与するリンパ系細胞は胸腺に由来するリンパ系細胞 (T細胞) と、骨髄に由来するリンパ球 (B細胞) とに区別されている。

T細胞ももともとは骨髄細胞に由来すると考えられており、胸腺内にはいつた骨髄細胞が、胸腺という環境の影響を受けながら分裂して小型リンパ球様の細胞となり、その多くは胸腺内で死滅するが、一部は末梢に放出されてT細胞になるとされている。B細胞は骨髄細胞が胸腺を経ないで末梢に放出されたもので、脾やリンパ節などの組織中に存在する。

T細胞が抗原 (処理抗原) 刺激を受けると分裂、増殖、分化してイムノプラストとなり、更に免疫遂行細胞 (Immunologically committed lymphocyte [Icl]) にまで分化するが、体液性抗体は産生しない。細胞免疫、遅延型アレルギーに大きな役割を演ずるのは実にこの Icl

であるとされている。すなわち Icl はふたたび特異抗原 (最初の抗原と同じ抗原) の刺激を受けて、マクロファージの活性化因子、遊走阻止因子、走化性因子などや、細胞分裂促進因子、皮膚反応惹起因子、細胞障害因子、等々を産生あるいは放出し、その結果、細胞免疫の場合はマクロファージの抗原物質の取り込み、あるいは取り込まれた抗原物質の処理能を高め、また遅延型アレルギーの場合は反応の場へのマクロファージの遊走、集合、定着を容易にし、皮膚反応惹起因子の働きとあいまつて、ツベルクリン反応にみられるような局所の組織反応を起すと理解されている。

一方B細胞は抗原刺激を受けて分裂、増殖し、プラスマプラストの段階を経て、プラズマ細胞に分化し、体液性抗体を産生する。

しかしながら抗原の種類によつては、B細胞単独では抗原の認識ができず、T細胞 (Icl) の協力を得てはじめて抗原を認識し、その刺激を受けたB細胞がプラスマプラスト、プラズマ細胞へと分化し、体液性抗体を産生する反応系の多いことが知られており、このような機能を発揮するT細胞は helper T細胞と呼ばれている。たとえば蛋白をキャリアーとして抗原決定基をもつような抗原、すなわちハプテン・キャリアー系抗原を例にとると、B細胞はハプテン基の、helper T細胞はキャリアー側の抗原特異性をそれぞれ認識するものと考えられている。

このシンポジウムは、上述のような免疫学の進歩をふまえて、結核の免疫あるいはアレルギーをこのような観点から理解し、演者各位の研究発表を通じて、更には討論を通じて、研究を更に前進させたいとの希望で企画されたものである。

しかし司会者の不手際から討論の時間がほとんどなくなつたことをお詫びしたい。

それで討論の代りに司会者から1つだけ演者各位に質問した。それは結核の免疫あるいはアレルギーのすべてを演者各位の研究成績で説明できるか、という質問である。

というのは、実験的に結核免疫はBCG生菌接種によつてはかなり強力なものが成立するが、結核菌(BCGを含めて)の加熱死菌、その他の死菌製剤では、たとえアジュバントを加えても、強力な免疫は得られないし、また結核菌あるいはその製剤を接種した動物の血清には顕著な感染防御能を認めたいこと、などが知られているからである。

この間に対する演者各位の見解をここに列記することはさけるが、はじめに述べたT細胞関与の免疫反応とこれによるマクロファージの活性化が、結核免疫の基本で

あろうことは大方の意見が一致したところであり、司会者も同感である。しかしながら結核免疫あるいはアレルギーに、T細胞関与の免疫反応系がどの程度の役割を演じているのか、B細胞関与の反応系はどんな役をしているのか、など今後に検討すべき多くの問題を残している。

結核症の諸相は複雑をきわめ、その移り変りは千変万化で、菌側の諸因子に生体側の諸因子、特に免疫、アレルギーが常にからみあつている。本シンポジウムの成果が、基礎研究者のみならず、臨床の諸家にとつて、結核症の複雑な様相の理解に役立てば、本シンポジウムを企図された武谷会長にとつても、また司会者にとつても幸いである。

1. 遅延型過敏症と局所肉芽形成におけるリンパ球とマクロファージの関与について

京大胸部研病理部 森 川 茂

結核の免疫およびそれに付随した現象としては、主なものとして次の事象があげられよう。(1)細胞性抗体に関連して遅延型過敏症の成立、(2)液性抗体産生、(3)抗体成分によるアレルギー炎症と特異的肉芽形成であろう。一方近年の免疫学的方法論的発展は免疫現象の解析はもとより、免疫関与細胞の解析の進歩をもたらした。すなわち免疫成立には胸腺由来リンパ球(T-リンパ球)、骨髄由来リンパ球(B-リンパ球)、マクロファージの重要性と3者の共働が強調されている。

今回われわれは結核の免疫現象の1つとして細胞性免疫を取り上げ、遅延型過敏症の成立と肉芽形成に対するリンパ球とマクロファージの関与を形態学的に、また細胞学的に検討した。実験動物としては、T-リンパ球、B-リンパ球、マクロファージの相互関係のモデルの確立されている純系マウスを用い、次のことを検索した。(1) Freund complete adjuvant を付して、種々の蛋白抗原を調べ、マウスにおいて安定して遅延型過敏症としての足蹠反応(foot pad reaction)を成立せしめうる抗原を求めた。(2)メチル化ヒト血清アルブミン(MHSA)が検索した蛋白抗原中、最も顕著にまた安定した足蹠反応を惹起した。このMHSAを中心に幾つかの抗原について、試験管内での胸腺細胞、脾細胞、腹腔内マクロファージに対する作用を観察した。(3)MHSA抗原-足蹠反応系を用いて、種々の細胞移入の実験モデルを組み、マウスでの遅延型過敏症に関与する細胞の解析を行なった。

材料および方法

動物：C₃H マウス、C₅₇ BL マウス、(C₃H×C₅₇ BL)F₁ および (CBA×C₅₇ BL)F₁ を用いた。

抗原：ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清γ-グロブリン(BGG)、ウマ脾臓フェリチン、リゾチーム、PHA-P(Difco)等の純化蛋白抗原を用い、また別にHSA、BGG等はメチル化、蛍光色素標識、熱凝集等、化学的、物理的に修飾を加えたものも用いた。対照として、PPD、Old Tuberculinも検討した。

感作：Freund complete adjuvant H₃₇R_V 死菌 3mg/ml あるいは 0.3 mg/ml) を等量の蛋白溶液(5 mg/ml)を混合し、エマルジョンの 0.05 ml をマウスの左後肢足蹠に1回注射した。

足蹠反応：感作後一定期間して、反対側の右足蹠に 0.02 ml の 1 mg/ml 蛋白溶液を注射し、24~48 時間後の右足の厚さを、実体顕微鏡下で 1/10 mm の目盛のスケールを用いて測定した。惹起注射前の右足の厚さを差しひいて、足蹠反応の大きさ(1/10 mm)として表現した。また同時に感作側左足の厚さも測定して、感作局所の腫脹すなわち肉芽の大きさ(mm)として表現した。両足の皮膚はそれぞれ摘出して、パラフィン切片、hematoxyline-eosin 染色標本を作り、病理組織学的に検索した。試験管内抗原-細胞反応：正常マウスの胸腺、脾臓を取り出し、それぞれ培養液中で細胞浮遊液を作り、これに種々の濃度の抗原を加え、30分間室温で反

応させた。その後 Trypan blue 溶液を加え、細胞の染色性からその生死を判定した。腹腔内細胞はグリコーゲン溶液刺激により集め、10% マウス血清を加えた培養液中で小型シャーレ内で培養し、浮遊細胞を除いた後種々の抗原を加え、底付着性のマクロファージの形態を観察し、その抗原感受性を判定した。

細胞移入実験：Recipient 成熟マウスは、胸腺摘出術を受け、更に 800 rad の全身照射を受けた直後に、同系マウスよりの種々の細胞の移入を受けた。

抗リンパ球抗体：C₃H マウスの胸腺細胞を家兎に免疫して得た、異種抗リンパ球抗体を用いた。

抗 θ 抗体：C₃H マウス胸腺細胞を AKR マウスに免疫して得た、抗 C₃H θ 抗体を用いた。

蛋白抗原によるマウスでの足蹠反応(遅延型過敏症)

検索した蛋白抗原、MHSA, HSA, native BGG, 熱凝集 BGG, FITC 標識 BGG, フェリチン, 熱凝集フェリチン, リゾチーム, PHA-P, PCO genase, PPD および Carrageenan のうち、最も安定して足蹠反応を成立せしめ、また惹起しえたのは MHSA であり 100% にみられ、その大きさも大であった。PPD での惹起では 60~70% で、その大きさも MHSA の 1/3 以下であった。MHSA は Freund incomplete adjuvant を用いても感作を成立せしめた。

感作局所の腫脹はフェリチン, MHSA, Carrageenan に著明にみられた。Carrageenan は足蹠反応を起せしめたが、フェリチンはその効果を有していなかった。

試験管内における抗原と各種細胞の反応性

最も顕著な足蹠反応を来す MHSA は、胸腺細胞、脾細胞に強い障害性を有していた。それ以外の抗原は PHA-P を除き、いずれもそうした障害性を有していなかった。一方腹腔内マクロファージに対する障害性あるいは刺激性はフェリチン, 熱変性 BGG, Carrageenan に強く、MHSA および PHA-P に中等度にみられた。特にフェリチン, Carrageenan の作用はむしろ障害性であった。

MHSA および PHA-P は寒天板内電気泳動法により、正常マウス血清と数本の沈降線を生じることが知られた。

MHSA や PHA-P の胸腺細胞や血清蛋白に対する親和性は、その足蹠反応を成立せしめやすい性質や Blast-transformation を起す性質に関係するようにも考えられる。一方フェリチンや Carrageenan のマクロファージ障害性は感作局所の肉芽形成に関係するようである。

マウスの足蹠反応とその関与細胞

種々の月齢の C₅₇ BL マウスを用い、MHSA を抗原

Fig. 1. Effect of Aging on the Immune Responses of Mouse

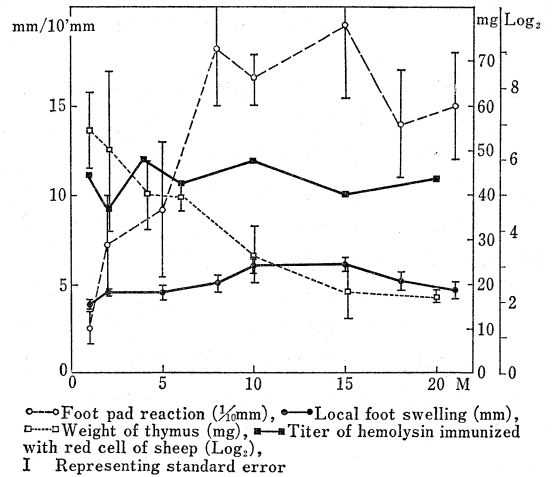


Table. Foot Pad Reaction of Thymectomized and Irradiated C₃H/He Mice Reconstituted with Various Cells from Sensitized Syngeneic Donors

Group	Reconstitution	Positive /tested
I	Anti- θ treated spleen cells	0/5
II	Normal AKR serum treated spleen cells	4/5
III	BM cells + LN cells	3/5

として、感作局所の足腫脹と足蹠反応を検索した。対照として羊赤血球に対する溶血素の産生を同月齢のマウスで調べ、同時にそれぞれの月齢での胸腺重量を測定した (Fig. 1)。胸腺重量が月齢と共に減少してくるのは逆に、足蹠反応は 8~10 カ月以降にピークを示し、なんらかの形の免疫成熟のあることを示唆した。細胞性抗体に比較して液性抗体である溶血素は、明瞭な免疫成熟の現象を示さなかった。

胸腺自体は足蹠反応の成立と関係なく、むしろ逆の相関のような印象を与えるが、マウスの足蹠反応の惹起、成立には胸腺由来細胞の関与が必要であることが明らかにされた。感作されたマウスに ALS を静脈内投与し、惹起注射を行なうと、対照や正常家兎血清を投与されたものに比較して、足蹠反応が抑制された。また感作マウスに胸腺摘出を行ない、その後 450 rad, 600 rad, 800 rad と異なる線量の放射線を照射すると、800 rad ではほぼ完全に足蹠反応は押えられ、600 rad, 450 rad では量に応じた抑制が観察された。あらかじめ感作されたマウスの脾臓を取り出し、細胞浮遊液を 1 群は抗 θ 抗体で、1 群は正常 AKR マウス血清で処置し、それぞれを

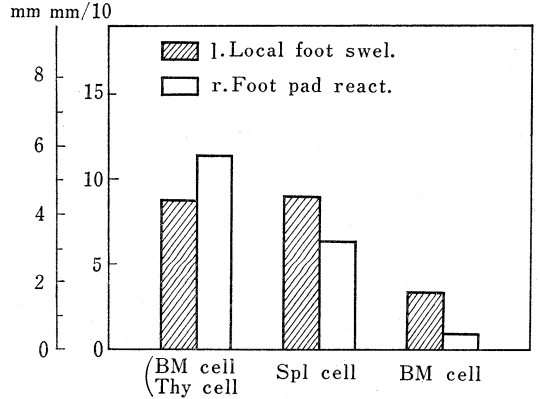
胸腺摘出、被照射マウスに移入した。2日後 Recipient に惹起注射を行い足蹠反応を観察すると、Table のごとく、抗 θ 抗体処置群では足蹠反応は強く抑制されていた。すなわち足蹠反応の出現には、比較的放射線に抵抗性を有する T-cell の関与が示唆されている。

足蹠反応の成立、すなわち感作の成立にも液性抗体で観察されたように、胸腺由来の細胞の必要性が認められた。胸腺摘出、被照射マウスを 2×10^7 コの骨髓細胞のみを補った群、 5×10^7 コの脾細胞のみで補った群、 2×10^7 コの骨髓細胞と 5×10^7 コの胸腺細胞で補った群とに分け、それぞれ感作、足蹠反応を行うと Fig. 2 のように、骨髓細胞のみでは感作局所の肉芽も微弱で、足蹠反応はほとんど成立せず、骨髓細胞に胸腺細胞を補って初めて完全な足蹠反応の成立が観察された。

結 論

- (1) 検索した各種抗原中、MHSA が最も安定してマウスに足蹠反応を惹起しえた。
- (2) 修飾された抗原 MHSA は HSA に比較して抗原性の低下を来し、一方胸腺細胞、血清蛋白との親和性、腹腔内マクロファージの刺激性を示した。
- (3) 感作局所に高度の肉芽を形成する鉄蛋白フェリチンは、Carrageenan と同様に腹腔内マクロファージ

Fig. 2. Requirement of T-cell to Develop Foot Pad Reaction



に対して強い障害性を示した。

- (4) 足蹠反応の成立、出現には血清抗体の産生に比してより免疫成熟が必要である。
- (5) 足蹠反応の出現には放射線に比較的抵抗性を有する T-cell の関与が示唆された。
- (6) 足蹠反応の成立には胸腺由来細胞と骨髓由来細胞の協働が必要であろう。

(共同研究者：馬場満男・原田孝之)

2. 結核病巣における macrophages の機能と kinetics

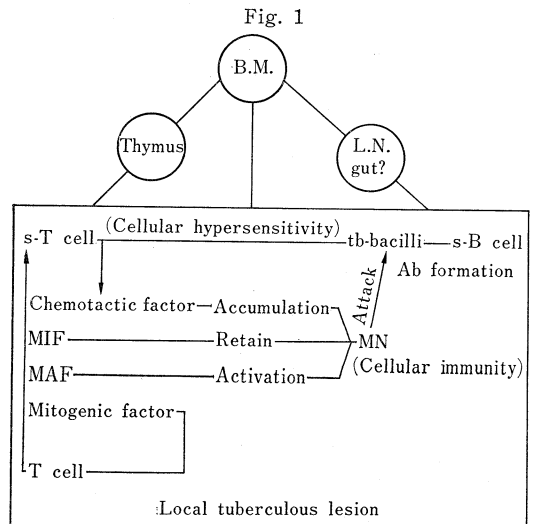
熊本大学医学部徳臣内科 志 摩 清

古くは¹⁾ Metchnikoff により初めて、結核菌に対する獲得免疫が、macrophage によつて mediate されるであろうといわれて以来、数多くの研究がなされ、近來、特にリンパ球との関連において、更に詳細、かつ免疫学的にも興味ある事実がわかつてきた。

Lurie²⁾ は家兎の前眼房を用い、免疫家兎の macrophage が、結核菌の増殖を阻止しうることを証明し、正常 macrophage や免疫血清には、その効果のないことを示し、また、正常家兎に結核菌を感染させた場合、extracellular bacilli を多数認めるのに反し、免疫家兎では、その数が非常に少なくなつてゐることを認めた。すなわち非免疫の状態では、macrophage の活性の程度が低く、貪食の能力、および殺菌能力も低下しているものと考えられる。このように結核菌に対して、effector cell として働く macrophage の kinetics を結核免疫の場で追求するうえで、結核病巣形成の機序を現在までにわかつてゐる事項から想定したシエーマ (図 1) に従い簡単に述べ、この理解のうえで、実験結核症における macrophage の態度を検討していきたい。

結核菌が局所に侵入した際、胸腺由来の感作 T cell

が、その結核菌と出合い、種々の物質を放出する。すなわち chemotactic factor が、macrophage を病巣へ引きつけ、MIF がそれを局所にとどまらせ、macrophage activating factor が、macrophage を活性化し、こ



Local tuberculous lesion

に macrophage の集積が起り, 更に mitogenic factor が感作されていないリンパ球を, 感作分裂させ, 更にこれら反応を増強させ, ここに1つの結核病巣を形成する。これら一連の反応が, いわゆる cellular hypersensitivity であり, 結核菌という抗原に specific な反応といえる。一方活性化した macrophage が結核菌を食食し, その有する lysosomal enzyme により, 菌を分解していく過程が cellular immunity であり, Mackness³⁾ が言うごとく *Listeria*, その他の菌にも働くという non-specific な反応となる。このように結核免疫はリンパ球と macrophage の相互の働きにより cellular hypersensitivity と cellular immunity の2つの反応より成り立っていると考えられる。以上の機序を把握しつつ, 実験結核症における macrophage 活性, 局所での分裂, 病巣への侵入および病巣での死滅の問題について検討していきたい。この全実験に共通する実験方法⁴⁾として, 家兎の背部皮内に接種した BCG lesion について, lysosomal enzyme の1つである β -galactosidase を組織化学的に証明し, enzyme activity を, また tritium でラベルした thymidine を用いて分裂および macrophage の動きを観察し, 更に Ziel Nelsen 重染色を行うことにより同一スライド上にて, H^3T grain, enzyme activity, 結核菌を同時に観察した。

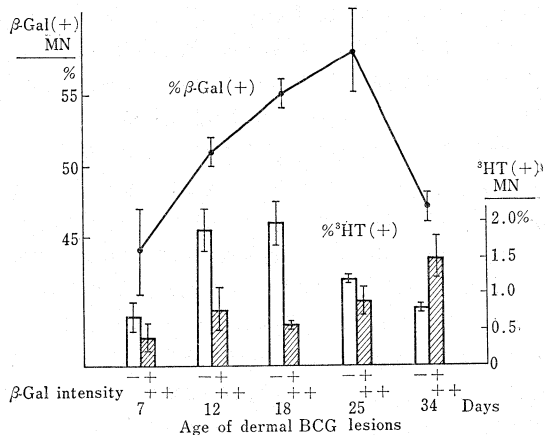
1) macrophage の活性について

家兎の背部皮内の BCG lesion について, その体積を経時的に測定した結果, 2ないし3週で最大となり, その際の BCG lesion 中の macrophage につき lysosomal enzyme である β -galactosidase の activity を組織化学的に染色したところ, その活性化された macrophage の割合が2ないし4週の間で最大となり, この時点で殺菌能力すなわち cellular immunity もまた強くなっていると考えられる。一方 reinfection の場合は primary infection より活性化 macrophage の割合は1週目付近にピークがあり, 3週目以降は逆に低下している。すなわち primary infection に比し早期に高くなり早く減少していくという促進化の状態が認められる。

2) local division

Cellular immunity が効果的になるためには, 局所病巣への macrophage の侵入および活性化が主要な要因であるが, 局所での分裂もまた effector cell の増員という点で重要な factor と考えられる。家兎の背部皮内の BCG lesion を biopsy し, 37°C 1時間, 3気圧の酸素下で incubate し, β -galactosidase 染色および tritiated thymidine に対し7週後に develop し H. E. 染色し, 病巣局所での macrophage の分裂をみたところ, 2週目付近で盛んに行われていることがわかった。一方 Radiation を行つた際の局所の分裂率は control に比し, 低下していた⁵⁾。また, 肺病巣につき, BCG,

Fig. 2.



Ravenel, $H_{37}R_V$ の場合についての分裂は, 皮膚病巣の場合, また菌種間で, さほどの差は認められていない⁴⁾。次に enzyme activity との関係のみたところ, 2週目までは, activity のない未熟型の macrophage の分裂率が多いのに反し, 3週目になると, 未熟型および成熟型の比が同率であった。このことは若い macrophage が DHS が存在した後で, すなわち新しい細胞が病巣に侵入した後で, 漸次 enzyme activity が上昇していき, cellular immunity が進展していくことを示している。と解釈される⁴⁾。(図2)

3) macrophage の病巣への侵入の問題

Macrophage が病巣へ集まることは DHS の存在以外に多核球や組織等の崩壊産物, 体成分等によつても左右されるものと考えられる。BCG lesion に入る macrophage の率をみるため BCG 接種前および接種後 6, 14, 27 日目に tritiated thymidine を静注 flash label し, おのおの5日後に, lesion でのラベルされた macrophage の数をみたところ, labeled macrophage すなわち新しく病巣へやつてきた macrophage の total の数は, 6日で最大となり, 以後 27 日目までその状態が続いている。このことはいつたん DHS が成立すると, 結核菌自体, またその生成物が, 新しい macrophage の侵入を促しているように考えられる⁶⁾。いつたん病巣へ入つた macrophage が, 病巣局所で何回分裂するかの検討を行つたところ, BCG 接種1日前に, H^3T で flash label した場合, 4日目での macrophage 1コ中の H^3T grain の数が, 110 以上までを示しているのに反し, 7日ではほぼ半分までの減少を示した。しかし14日, 21日では, その減少の程度に変化が認められなかつた。ゆえに macrophage が BCG lesion で1回あるいは2回までしか分裂しないことを物語っていると考えられる⁶⁾。Reinfection の場合について検討したところ primary infection では, labeled macrophage が, 4日目の30%

から、7日目の21%に減少するのに反し、reinfectionでは、30%より10%と大きく減少を示していた。すなわち reinfection では primary infection に比し labeled macrophage すなわち新しく病巣へ入った macrophage が早く減少していくことを示しており、早期に病巣の消失化が起ることを表現していると考えられる。

4) cell death について

Tritiated thymidine を flash label した後、10日間、BCG lesion 中に生き残った macrophage の率をみたところ、BCG 接種後、14日目の病巣で盛んに cell death が起つていることがわかった。

以上述べてきた4つの項目である macrophage の活性化、局所での分裂、病巣への侵入および死の問題について検討した結果、次に述べるようなことがいえるものと考えられる。

個体にいつたん DHS が成立すると、それが引き金のような役割を演じ、おそらくリンパ球が放出する種々の mediator の働きによつて、骨髄より BCG lesion への macrophage の侵入が促され、6日目付近で、その侵入の度合いが強くなり、27日ころより消失していくという経過をたどり、2週目付近では病巣局所においても macrophage の分裂が盛んとなり effector cell の動員の一助となり、また、この時期に一致して、macrophage enzyme activity も高まつており、取りも直さず cellular immunity もまた、強く現われてきていることを示している。reinfection の場合はこれらの現象が accelerate された形を取っているものと考えられる。同じく2週目ころには macrophage の局所での死滅もまた、多く認められていることから2週目を境として骨髄より新しく macrophage が局所へ侵入し、侵入しては死んでいくという状態が盛んに行なわれていることを示し、BCG lesion において macrophage が非常に dynamic な動きを行なっていることがわかる。

以上のごとき BCG lesion における macrophage の dynamic な態度は、DHS の存在していることに大きく規制されていると考えられ、結核免疫における cellular immunity との関連で DHS は重要な役割を演じているものと考えられる。そこで DHS を伺う手段として Tub-R があるが、結核免疫において必ずしも immunity とは平行関係になく、Mackness もある時点でのみ parallel であるといつており、人における、特に経過の長い結核症の場合、種々の factor により修飾されているものと考えられる。そこで個体の有する本来の DHS の状態を扱える目的で、人の肺結核症に対し、DN CB test を行い、その経過を胸部X線像の変化で判定し、DN CB test との関係について検討を行なつた(表1)。胸部X線上改善および過去に悪化を示した群に、DN CB 陽性のものが多く、不変の群に陰性が多いという傾向が

Table 1. Relation between DN CB Reaction and Clinical Course

	DN CB reaction				Total
	—	+	++	+++	
Improved	7 16.3%	15	10	11	43
Slightly improved	10 45.5%	3	6	3	22
Unchanged	14 60.9%	3	5	1	23
Aggravated	2 13.3%	1	7	5	15
Total	33	22	28	20	103

Table 2. β -Galactosidase Activity of Cultured Monocytes from Human Peripheral Blood

Type	No. of cases	Neg.	Faintly	1/4	1/2
B	19	57.5%	28.4%	11.3%	2.7%
C	5	62.8%	22.4%	12.2%	2.6%
F	2	55.0%	29.0%	11.5%	3.0%
Cont	5	64.8%	27.0%	7.6%	0.8%

認められた(表1)。この解釈は難しいところと思われるが、結核進展の状態は Rich が述べているごとく、種々の因子に左右され、それらのうちで、獲得免疫の一面のみについて考えると、それは allergen の量および個体の hypersensitivity との関係によつて決まってくると思われる。Allergen の量が、高濃度の場合には、caseous necrosis を起し、個体にとって不利な反応が起つてくると考えられ、これに反し allergen 量が適量の場合には、適度の macrophage の集積、増殖が起り、これら defense cell により治癒に向かうものと考えられる。一方個体が hyperallergic の場合はちょうど allergen の量が高濃度の場合と結果的に同様の反応となり、個体に不利となりうるものと考えられる⁷⁾。すなわち cellular immunity の引き金として働く DHS は、個体にとって、その程度が強すぎると、かえつて不利益をもたらす結果となり、悪化例で DN CB 反応が強く出たということは、ちょうどかかる状態が個体で起つていたのではないかと推測される。

Cellular immunity の parameter として macrophage の活性化の状態を、 β -galactosidase 染色によつて、流血中の monocyte について検討を試みた。末梢血より採取した monocyte を3時間培養し、cover slip に付着したものにつき観察した結果、その活性は、lesion 中の

macrophage より、弱いながらも認められており、人の肺結核症の場合、学研分類 B, C, F 間にその活性の差は認めていないが、正常人対照に比し 1/4, 1/2 プラスがやや多い傾向にあり、家兎の場合も、BCG 接種群で、活性化の高いものが多い傾向にあつた(表2)。この意味づけは更に検討を加えねばならないが、結核患者では Tuberculin like product が流血中に放出され、直接的にまた、cytophilic antibody を介して、あるいは lymphokine 等により活性化されていることが考えられる。更に A 型, E 型, 悪化例についても検討を加え、かつ個体間に monocyte の有する lysosomal enzyme activity の予備能力に差があることも考えられ、phagocytosis 等の処置を加えることにより検討していきたい

と考えている。

文 献

- 1) Metchnikoff, E.: Immunity in infective diseases 1905, Cambridge University Press, Cambridge.
- 2) Lurie, M. B.: J. Exptl. Med., 75: 247, 1942.
- 3) Mackaness, G. B.: J. Inf. Dis., 123: 439, 1971.
- 4) Shima, K. et al.: Amer. J. Pathol., 67: 159, 1972.
- 5) Chandrasekhar, S. et al.: Infec. Immunity, 3: 254, 1971.
- 6) Ando, M. et al.: J. Imm., 109: 8, 1972.
- 7) Dannenberg, Jr., A. M.: Bacteriol. Rev., 32: 85, 1968.

3. 結核感染防御免疫における感作リンパ球の役割について

九州大学細菌学教室 村岡 静子

I. 緒 言

従来から多くの人々が結核感染防御免疫の機作について研究を重ねてきたが、それらは大部分貪食細胞特に macrophage (Mφ) と結核菌との host-parasite relationship を主な研究対象としたものであつた。しかし最近 Mackaness らはマウスの *in vivo* の系において、脾臓リンパ細胞の passive transfer による正常マウスへの獲得免疫の移入の可能性と、またそのような場合、遅延型過敏反応が防御免疫と密接な関係をもつことを示した。また Patterson と Youmans らは *in vitro* の系において感作動物由来の腹腔 Mφ と正常 Mφ では、その中における結核菌の増殖の程度にはほとんど差がないことを示し、感作動物の脾リンパ細胞が Mφ 内結核菌の増殖に対し抑制的効果をもつことを示唆した。そこで著者らは、*in vitro* の系で結核菌感作マウス由来のリンパ球が結核感染防御免疫にどのような役割を果たし、どのような機作で Mφ に関わりを有するのかを検討してみた。

II. 実験材料

① 実験動物: C₅₇ BL/10 雌雄マウス, 6~8 週齢, ② 結核菌: ヒト型菌, H₃₇R_v, ソートン培地で継代, ③ 細胞培養培地: medium 199 に馬血清, 幼若仔牛血清, ペニシリンなどを加え, 5% CO₂ incubator 用に pH を調整したもの。ストレプトマイシンは一切用いなかった。

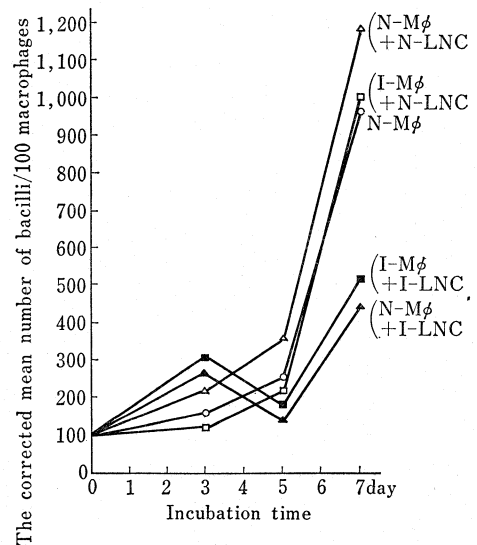
III. 実験方法

① マウスの感作法: 流動パラフィン懸濁加熱死菌 H₃₇R_v 1 mg ずつを四肢に皮下注射後 2 週経つて, 1 mg

生菌 BCG を静注追加免疫した。2~3 週後腹腔滲出細胞, リンパ節細胞を感作マウスより, そして正常マウスからも採取した。

② 細胞培養方法: 約 5×10^6 cells/ml の腹腔滲出細胞液 0.3 ml をプラスチック dish 内のカバースリップ内のにせ 1 時間程度培養後, ハンクス氏液で洗い, 更に 1 晩培養して Mφ monolayer とする。ソートン培地表面培養のヒト型菌をガラス玉で摩擦して単個菌としたものを, monolayer にかけて約 1 時間貪食させた後, ハンクス氏液でよく洗い細胞外菌を除去する。この上に種々のリンパ節細胞 (LNC) 約 1×10^7 コを 48 時間接触させるか, あるいは LNC とその抗原との 24 時間培養上清

Fig. 1.



をかけて培養し、Mφ内の結核菌の増殖への影響を経時的に観察した。

③ Mφ内結核菌増殖度の判定：Mφ monolayerに貪食させた日を0日として、3, 5, 7日とduplicateでカバーリップを固定し、抗酸菌染色、続いてギームザ染色を行い永久プレパラートとする。細胞内に菌を含んだ100コのMφ内の菌数を数え、それを0日の数と比較して、結核菌の細胞内平均増殖度として算出した。

IV. 実験結果

① 感作 Mφ内における結核菌の増殖は、正常 Mφ内における増殖より幾分抑制されたが、両者の増殖カーブはほとんど平行であり、特に感作 Mφのほうが殺菌能力が高いとはいえなかつた。次に感作 LNCを Mφに48時間接触させると、Mφが正常、感作由来にかかわらず感作 LNCを加えないときに比して、細胞内菌の増殖は非常によく抑制された。しかし正常 LNCを加えてもそのような細胞内菌の増殖抑制は起らず、むしろ促進される傾向であつた(図1)。このような実験を6回程度繰返し、Mφ内結核菌の増殖抑制能力という観点からまとめると、感作 Mφは正常 Mφに対し約20%細胞内結核菌の増殖抑制能力が高く、正常 Mφに感作 LNCを接触させると正常 LNCを接触させたときに比して約60%菌増殖抑制能力が上昇しており、感作 Mφに感作 LNCを接触させた場合は、正常 LNCを接触させたときに比して、約44%抑制能力を上昇させた。

② LNCを Mφに48時間接触させるとき、PPDを10~20 μg/ml加えると、感作 LNCは Mφに対して結核菌増殖の抑制効果を増大させた。

③ LNCとPPDとを24時間培養し、その培養上清を新鮮培養液で2倍に希釈後、Mφ monolayerに作用させると、感作 LNCとPPDの培養上清は正常 LNC

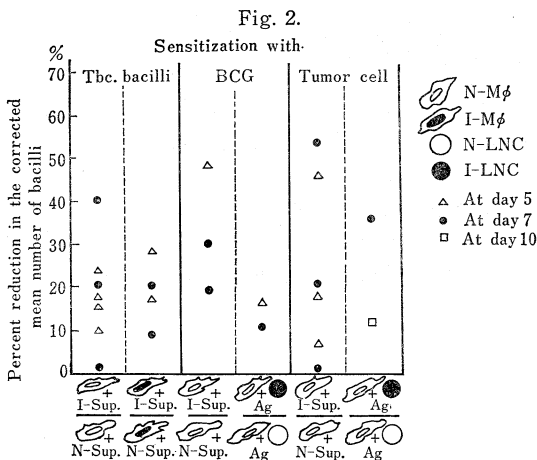
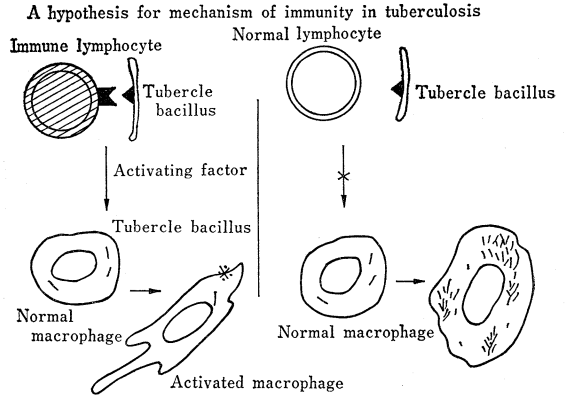


Fig. 3.



と PPD との培養上清に比して、Mφをある程度結核菌増殖抑制の方向に変化させることがわかつた。しかし感作 LNCを直接 Mφ monolayer に接触させた場合に比べると、その効果には、ややバラつきが見られた。(図2, 左端のカラム)

④ 完全 Freund アジュバントに懸濁したウシ-γグロブリン (BGG) 200 μg で感作後 10~14 日のマウスの感作 LNC と BGG の培養上清を、あるいは BGG 感作 LNC と BGG とを直接 Mφ monolayer に 48 時間接触させた場合、正常 LNC と BGG との組合せに比較して、Mφ内結核菌の増殖をある程度抑制することが示された。(図2, 真中のカラム)

⑤ C₃H マウス継代の MH 134 腫瘍細胞で免疫し 7~10 日後の所属 LNC と、5~6 回凍結融解を繰返して作った腫瘍細胞抗原との 24 時間培養上清の 2 倍希釈液を Mφ monolayer に作用させた場合、あるいは腫瘍感作 LNC と抗原とを直接 monolayer に加えた場合も、やはり正常 LNC と抗原との組合せの場合に比して、バラつきはあるものの Mφ内菌の増殖を抑制することが明らかとなつた。(図2, 右端のカラム)

⑥ 蛋白合成阻害剤である cycloheximide や streptovitacin A で、細胞の蛋白合成が 90% 以上阻害される条件下で、LNC を処理後 Mφ monolayer に LNC を接触させると、感作 LNC の Mφ内結核菌増殖抑制効果は大部分失われていた。この場合薬剤処理後の LNC の生残率は、非処理 LNC のそれとほとんど差がないことを確かめている。

⑦ 正常マウス由来の LNC と PHA 1 μl/ml あるいは concanavalin A 2 μg/ml とを、結核菌を取込んだ Mφ monolayer に約 60 時間接触させると、mitogen なしで正常 LNC を加えた場合、あるいは mitogen のみを加えた場合に比して、Mφ内結核菌の増殖は抑制されるが、結核菌感作 LNC を直接接触させた場合に比する

と、数段その効力は弱かった。

V. 結論と考察

上に述べたような実験結果から、結核感染防御免疫における感作リンパ球と Mφ との関係は以下のように推察される。

結核菌抗原で感作されたマウスに結核菌が侵入してきた場合、まず Mφ のような貪食細胞内に取込まれ、死菌や生菌の一部は細胞内で消化され外へ排出されるであろう。そのような細胞外へ放出された抗原と、細胞性免疫の方向に十分分化した感作リンパ球が出会うことにより、感作リンパ球が trigger を引かれて、貪食細胞を bactericidal あるいは bacteriostatic な方向に変化させるような液性因子を産生すると考えられる(模式図 3)。しかしこの液性因子の産生量はそれほど大きくはなく、リンパ球から直接的に Mφ に受け渡しが行なわれたほうが効果的な程度の量と考えられる。なぜならば感作 LNC を直接 Mφ に接触させた場合に比べて、感作 LNC と PPD の培養上清を Mφ に接触させた場合は、細胞内菌増殖抑制力は劣るからである。またこのような液性因子を産生するには、蛋白合成やその他の代謝機構が正常に働いている必要があることも、蛋白合成阻害剤を用いた実験より、ある程度示唆される。次に感作リンパ球とその抗原の接触が特異的でありさえすれば、結核菌以外の抗原の感作リンパ球とその抗原であつてもよいか否かという問題である。結核菌と一応無関係と思われる BGG や腫瘍細胞で免疫し、その細胞性免疫が最も高い時期に取り出した LNC とその特異抗原の 24 時間培養上清にも、パラつきはあるけれども Mφ を bactericidal あるいは bacteriostatic に賦活する液性因子が含まれることが実験結果から示唆されるので、リンパ球とその抗

原との接触は免疫学的に特異的である必要があるが、1 度リンパ球が抗原によつて trigger を引かれて液性因子を産生すると、その液性因子はある程度 nonspecific に Mφ を活性化すると思われる。しかし正常リンパ球を PHA や concanavalin A のような nonspecific mitogen で刺激して生じる lymphotoxin のような液性因子は、ある程度は Mφ を結核菌増殖抑制の方向に変化させたが、しかしその程度は結核菌感作リンパ球を直接 Mφ に作用させたときに比して劣るので、このような lymphotoxin と先に述べたような液性因子とは質的に異なるのではないかと考えられる。しかしリンパ球と抗原との接触により放出される他の MIF, SRF, chemotactic factor のような種々の液性因子との異同性については、今までの実験からは明らかではない。

結核感染防御免疫がこのような機作で全部説明しうるかという問題に対して、明らかに言いうるのは、感染防御免疫には、細胞性免疫、特に特異抗原と接触して種々の液性因子を産生しうるまでに十分分化したような感作リンパ球が、Mφ のような貪食細胞を防御の方向に変化させるという仕方に関係しているということである。しかしこの機作以外にも抗体系が防御免疫に補助的役割を果たしていることも十分考えられるし、また個体の感作状態あるいは感作リンパ球といわれるものの中にも質的な差がそのうちに包含されていて、防御免疫に最も有利に働く感作リンパ球集団が、たとえば BCG の生菌免疫により最もよく出現しやすく、死菌免疫では他の質的に異なる免疫状態が出現するというような可能性も考えられる。すなわち感染防御免疫状態の中にも質的な広がりがあるとして、その中の 1 方向として、感作リンパ球が上記のようなメカニズムで防御的方向に働いていると考えられる。

4. マクロファージ・リンパ球相互作用よりみた抗原静注による結核抗菌免疫増強の機序

北海道大学結核研究所 山本健一

BCG cell wall 静注免疫マウスはその肺細胞が Delayed hypersensitivity の in vitro の指標とされている Macrophage migration inhibition (MI) を示し、結核菌の Airborne 感染に強い抵抗性をもつことをすでに確かめた。ところで、この免疫マウスに感染前日に結核抗原を静注すると、肺細胞の MI は減弱ないし消失するにもかかわらず感染防御の増強を示した。この前述の知見と一見相反するこの現象の機序について、細胞性免疫の立場から感作リンパ球と抗原の相互作用の結果放出される因子による Macrophage の Activation が関与するのであろうと想定し、この現象に関与する種々の要因の

検討を行なつた。

方 法

すべて動物は CF₁ マウスを使用した。免疫は BCG cell wall oil-treated ワクチン 150~300 μg を静注あるいは皮下接種した。その後、8~10 週で実験に供した。その他、Listeria monocytogenes cell wall も同様に用いた。静注抗原には BCG protoplasm あるいは Listeria monocytogenes protoplasma を 15~100 μg、その他、非特異的リンパ球刺激剤である Phytohaemagglutinin PHA-P 0.02 unit も実験によつて用いた。

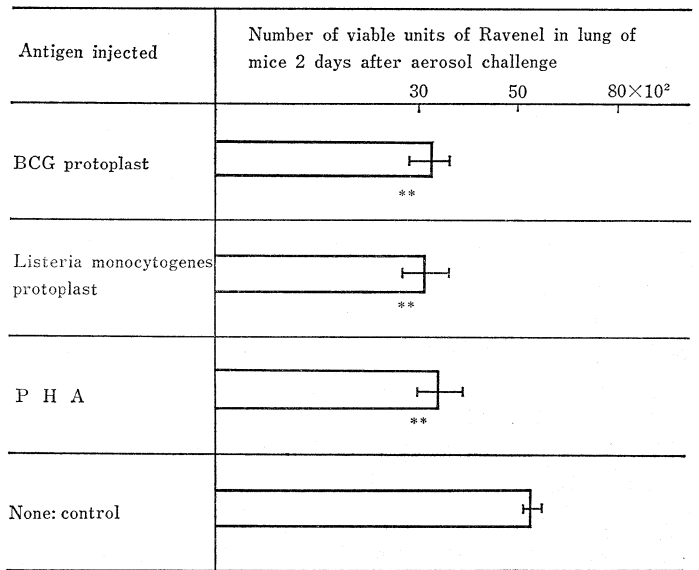
Footpad 反応には PPD あるいは BCG protoplasm 5 μ g を足蹠皮内に注射して、注射部位の腫脹を 24 時間後に測定し、他側足蹠の生食水注射部位の厚みとの差で示した。肺細胞の MI test は被検肺細胞浮遊液と正常マウス腹腔滲出液を等量混合、毛細管につめ、Sykes-Moore 型 chamber で仔ウシ血清 15% 加 Eagle 培地中に置き型のごとく行なつた。脱感作血清は BCG cell wall 免疫マウスに BCG protoplasm 50~100 μ g 静注 24 時間後に採取し、56°C 30 分間加熱非働化して使用した。Airborne challenge は Tri の経気道感染装置を用い M. bovis Ravenel を 10⁶/ml 30 分間一定の条件で吸入させた。抗菌免疫の判定には生存日数および感染後 2~6 日の早期の肺内生菌数を全肺を用い小川培地で定量培養により求めた。in vitro の実験に使用するリンパ球としてリンパ腺細胞浮遊液が供された。この細胞浮遊液と PPD あるいは Listeria monocytogenes protoplasm 30 μ g/ml を 37°C 1 時間試験管内で接触させ、そのまま正常マウスに静注移入した。また、monolayer 細胞実験では肺細胞浮遊液 10⁷ 程度を直径 3 cm のファルコン・プラスチックシャーレで 37°C 1 時間 5% CO₂-incubator 中で単層とし、これに、シャーレ非付着細胞、PPD あるいは脱感作血清を加えた場合の肺細胞の抗菌力を調べた。添加物は 24 時間 37°C 5% CO₂-incubator 中で接触させ、Hanks 氏液で洗浄、Ravenel 0.1 mg/ml 菌浮遊液の 800 回転 2 分間遠沈上清を加え 1 時間食菌させて洗浄、再び仔ウシ血清 15% 加 minimal Eagle's medium で 3~4 日培養、洗浄後、蒸留水 1 ml を加え細胞を溶かし、この lysate について小川培地を用いて定量培養を行ない感染菌の増殖の程度を判定した。

実験成績

実験 A：静注抗原とマウスの感作状態の相互のかわりか感染防御増強にどのように影響しているかの検討。

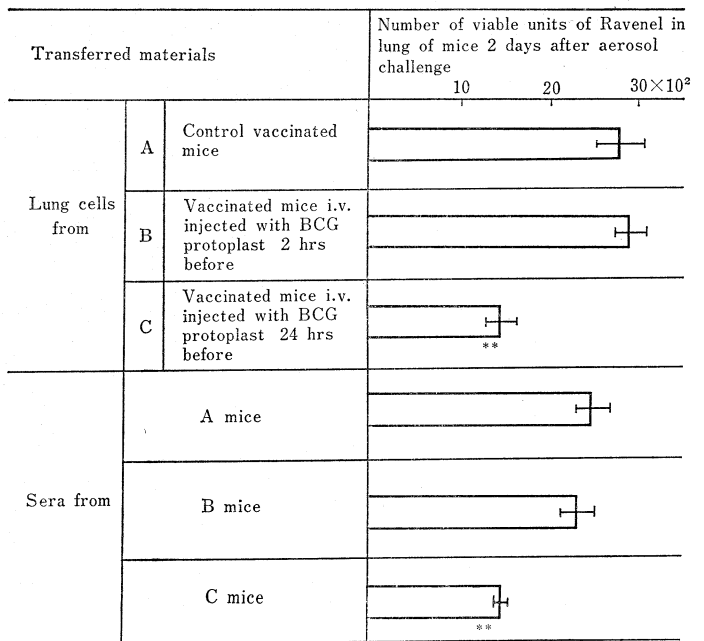
1) あまり強くない感染防御能を与える免疫量 BCG cell wall 60 μ g で免疫したマウスに BCG protoplasm 静注、1 日後に Airborne challenge を行なつた結果、感

Fig. 1. Specific Effect of Antigen Intravenously Injected on Development of Increased Protection against Aerosol Challenge with M. bovis Ravenel in Mice Vaccinated with Mixture of BCG Cell Walls and Listeria Monocytogenes Cell Walls



** p ≤ 0.01

Fig. 2. Anti-tuberculous Immunity Induced by Transfer of Lung Cells or Sera from BCG Cell Wall Vaccinated Mice Previously Injected with Tuberculous Antigen



染後 1 日および 5 日の肺内生菌数、また、平均生存日数のいずれによつても通常強い感染防御能が与えられる BCG cell wall 300 μ g 免疫マウスが示すのとほぼ同じ

程度まで感染防御の増強がみられた。

2) 更に免疫量を少量にして 30 μg とすると, BCG protoplasm 静注によつても, もはや抗菌免疫の増強はなかつた。

3) 抗原静注と Airborne challenge までの時間を5日にすると, 感染時には抗原静注マウスの Footpad 反応と肺細胞の MI は抗原静注以前の状態に復し, 感染後2日目および6日目の肺内生菌数は非処置免疫動物と同様で, 抗原静注による抗菌免疫の増強は特にみられなかつた。

4) BCG cell wall 免疫マウスに BCG あるいは Listeria protoplasm を静注すると特異抗原である前者によつてのみ Airborne 感染後の肺内生菌数の減少がみられ感染防御の増強を示した。また, 同様に PHA の静注でも同様な効果を示した。更に Listeria monocytogenes cell wall 免疫マウスに対しては Listeria protoplasm 静注によつてのみ Ravenel airborne 感染後の肺内生菌数の減少を認め, BCG protoplasm にはそのような効果がなかつた。また, BCG cell wall と Listeria cell wall 各 300 μg 混合静注免疫マウスに BCG protoplasm, Listeria protoplasm あるいは PHA を静注すると, 図1に示すごとくいずれの場合にも, 1日後の感染に対して, 感染後早期の肺内生菌数の減少が認められた。

5) 抗マウス脾細胞免疫血清 (A. S. S.) を 0.1 ml ずつ抗原静注1日前および直前に皮下投与された免疫マウスに対しては抗原静注による抗菌免疫増強効果はみられなかつた。

以上の実験結果は静注抗原と感作リンパ球とが特異的に接触して, 約 24 時間で感染防御増強の確立に深くかわり合っていることを示唆しているので, 両者を in vitro で接触せしめて実験を行なつた。

実験 B : 抗原と接触させたリンパ球の移入実験

1) BCG cell wall あるいは Listeria cell wall 感作リンパ節細胞に特異抗原を in vitro で 37°C 1 時間接触後, 正常マウスに移入すると, 24 時間後の感染に対して肺内生菌数の減少がみられた。

2) BCG cell wall 免疫マウスに PHA または PPD 静注 2.5 時間後に得たリンパ節細胞を移入された正常マウスにも Airborne 感染 2 日目の肺内生菌数の減少が示された。

以上の結果から感作リンパ球と抗原の接触が抗菌免疫賦与に関与していることを示しているものと思われる。

次に抗原静注後の脱感作血清中に抗原と感作リンパ球との接触の結果流血中に放出されたと考えられる MI に関与する mediator が含まれていることをわれわれはすでに報告しているので, 脱感作血清の本報告における抗菌免疫確立への関与について調べた。

実験 C : 脱感作血清の抗菌免疫への関与

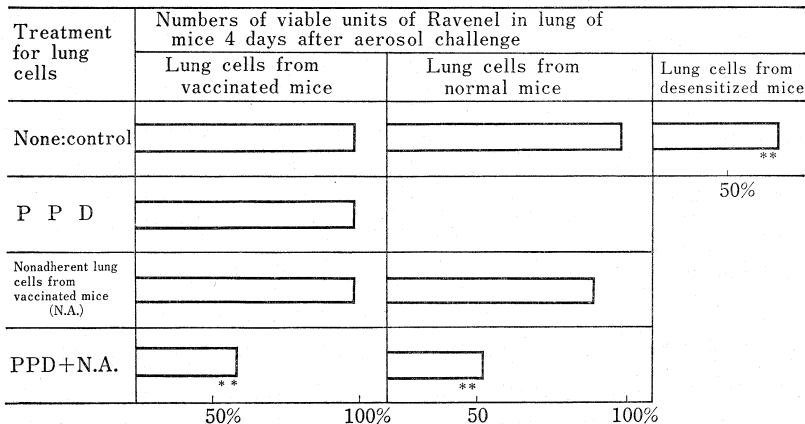
1) BCG cell wall 免疫マウスに BCG protoplasm 静注 24 時間後に得た血清は正常マウス腹腔渗出細胞に MI を示すと共に, これを Airborne 感染1日前に 0.5 ml 正常マウスに静注投与すると, 抗菌免疫を賦与した。同様にして, PHA 静注後に得た血清でも同様の効果があつたが, Listeria protoplasm 静注血清にはそのような効果はみられなかつた。

2) 抗マウス脾細胞免疫血清 (A. S. S.) によつて静注抗原による BCG cell wall 免疫マウスの抗菌免疫増強が阻止されたが, この阻止は抗原静注と同時に脱感作血清 0.5 ml 静注を行なうと妨げられて, 免疫マウスにおける抗原静注による抗菌免疫増強が示された。

3) また脱感作血清をあらかじめ A. S. S. を皮下投与しておいた BCG cell wall 免疫マウスに 0.3 ml 静注と同時に PPD による Footpad 応を試みると, 明らかにこの反応は阻止された。

4) 更に BCG cell wall 免疫マウスに BCG proto-

Fig. 3. Anti-tuberculous Immunity Observed In Vitro of Lung Cells



plasm 静注2時間および1日後の血清と肺細胞浮遊液をそれぞれ正常マウスに静注移入し、1日後に Airborne 感染させ2日後の肺内細菌数を調べた結果を図2に示した。抗原静注24時間後の肺細胞および血清の移入によつて抗菌免疫を与えることが明らかにされた。

以上の結果によつて MIF を含む脱感作血清が抗菌免疫を与える因子をもっていることが想定された。

そこで、このような因子が働きかける相手を Macrophage と考え、モデルとして肺細胞浮遊液でプラスチックシャーレに monolayer を作つて、抗原と感作リンパ球の組合せを添加して、この Macrophage に感染させた菌の増殖阻止を調べた。

実験D: Macrophage monolayer における実験

1) プラスチックシャーレに monolayer にした BCG cell wall 免疫および非免疫マウス肺細胞に PPD と肺細胞浮遊液のシャーレ非附着細胞をそれぞれ単独、あるいは組合せて添加、24時間後に洗浄、次いで Ravenel 菌液を加えて感染させ4日目の増殖の程度を調べた結果は図3に示すごとく PPD と免疫肺細胞のシャーレ非附着細胞とを組合せて添加された免疫および非免疫 Macrophage monolayer において明らかな感染菌の増殖阻止がみられた。また、同じ実験で、BCG protoplasm 静注の脱感作肺細胞 monolayer はそれ自身で同様の感染菌増殖阻止を示した。

2) 同様の実験を BCG cell wall 免疫および非免疫肺細胞 monolayer に脱感作血清を添加させて行なつたが、やはり脱感作血清による Ravenel の肺細胞内増殖阻止

がみられた。

以上の結果は正常肺細胞のシャーレ附着細胞は PPD と BCG cell wall 免疫肺細胞のシャーレ非附着細胞との組合せ、あるいは脱感作血清との接触によつて、感染菌に対する増殖阻止を発揮するよう活性化されることを明らかにした。

む す び

結核菌に対する感染防御も他の通性細胞内寄生性細菌感染症のそれと同じく免疫適格細胞が関与する“細胞性免疫”に基づいて発現するものであることは、すでに Mackaness らの仕事によつて特に注目をひいてきている。われわれが先に報告した BCG cell wall 免疫マウスに抗原を静注した場合、MIF を含む脱感作血清が得られること、また、この抗原静注によつて抗菌免疫の増強がみられること、この2つの事実の根底には免疫適格細胞と抗原の interaction が当然考えられ、そこから Macrophage の抗菌免疫発現へ導く mediator の存在が想定された。そこでこの道すじに関与する諸因子を検討した本実験の結果を総合すると、感作リンパ球と特異抗原の接触後 MIF を含む Mediator が放出され、一方では Macrophage の Activation を惹起し、他方、Footpad 反応と肺細胞の MI の減弱で示される脱感作が一時的に起る。そして前者の過程で肺内感染菌の初期の減少に基づく抗菌免疫の増強という表現が招来されるとの説明が可能であろう。

5. 結核感染マウス脾における細胞反応と防御力

国立公衆衛生院衛生微生物部 金井興美
国立予防衛生研究所結核部 近藤瑩子

緒 言

結核感染におけるリンパ系組織の腫大は、防御力の発生、遅延型感作の成立と密接に関係していることが経験的に認められている。この際、リンパ系組織の腫大に関与する細胞の genesis は、最近 North¹⁾、Dannenberg²⁾ の仕事によつてその大要が明白となつてきた。

私たちがマウス結核感染において脾の腫大が防御力発生と強い因果関係のあることを認め、その細胞生物学的ないくつかの側面について観察を行なつた。

研究材料と方法

動物は市販 dd 系マウスの雄を用い、組織からの感染菌の分離は1%小川培地を用いて型のごとく行なつた。組織または細胞の酸フォスファターゼ活性 (AP 活性と略)

と酸蛋白分解酵素 (カタプシン) 活性の測定は、それぞれパラニトロフェノールフォスフェイト、変性ヘモグロビン、あるいはツベルクリン蛋白 (ツ蛋白) を基質として、これまで報告した方法³⁾ に従つた。脾よりの細胞分離は、100メッシュのステンレスふるいを用いてヘパリン加 PBS 浮遊液とした。更に100メッシュのガラスビーズカラムを用いて37°C 30分で吸着操作を試み、そのあと PBS を流し、流出液からリンパ球を主とする細胞分画を遠沈してあつめた。次にガラスビーズをピーカーに移し、EDTA を含んだ PBS を加え軽く振つて吸着している細胞をふりだし、遠沈してマクロファージを主とする細胞成分をあつめた。マウス腹腔内よりマクロファージをあつめる場合は、流動パラフィン、あるいは加熱結核死菌を1mg/ml に含んだ流動パラフィン2ml を腹腔内注射し、5日後ヘパリン加 PBS で洗い出して、分

液ロートで流動パラフィンを除き、下層の液より遠沈洗浄して細胞成分を集め、ガラスビーズカラムで細胞分画した。

実験成績

(I) マウスを用いた一般感染実験において、静注感染後の脾の腫脹を経時的に追求すると、強毒 *M. bovis* (ラブネル株) 0.5 mg 接種の場合、2週間で脾は2倍ほどの重量に腫大したが、その後は萎縮を続けて死亡時(4週前後)には、はじめの重量に減少した。この間、肺においては感染菌数は上昇を続け、無数の結節形成によつてその重量は1g 近くになった。しかし感染10日目よりINH 1日量0.1 mgの投与で治療を開始すると、脾の腫脹は維持されると同時に、肺の菌数増加は阻止され、また肺の重量増加が停止した。また感染量を単に同一株の0.05 mgに下げるのみでも脾は長期にわたつて腫大を続け、同時に肺の腫大も一定範囲にとどまり、動物は生存を続けた。

以上は実験ごとの恒常的な結果であり、脾の腫大は免疫に関与する細胞の増加を示唆する現象と考えられ、過大感染による脾の縮小は抗原過剰によるそうした細胞(おそらくリンパ球)の広範な崩壊であり、その結果としての感染死であると理解したい。

(II) マウスをBSA 330 μ gで感作する際、腹腔内に Freund の不完全アジュバントを用いた場合と、完全アジュバントを用いた場合について、感作の実態を比較した。つまり感作注射後3週にBSAの20 μ gあるいは5 μ gを静注してその反応を観察すると、前群のマウ

スにおいては全例アナフィラキシー症状を呈し、実験ごとに変動はあるが1/4~1/3の動物が死亡した。他方、完全アジュバントによる感作群はこの際症状は軽微で、死亡は例外的であつた。ところが感作による脾の腫脹は、逆に完全アジュバント群においてのみみられ、またBSA再注射と同時に有毒結核菌(*H₃₇R_v* KM-R株)0.05 mgを静注感染し、その菌数消長を週ごとに追求して感染防御力の存在を調べてみると、完全アジュバント群において、早期に一時的な防御力の発現が検出できた。

結核菌を含んだ完全アジュバントを用いてBSAで免疫すると、BSAに対する骨髓前駆細胞の分化と増殖が、主として細胞免疫(遅延型)に関与する感作リンパ球に方向づけられ、抗体産生型のリンパ球への転化が抑制された結果、上述のごとき観察が得られたと説明できよう。BSAの再注射による感作リンパ球の刺激は、一時的なマクロファージの活性化につながり、防御力の表現となつたものであろう。いずれにせよ、この群においてのみ脾が腫脹していたことは、脾腫が感作リンパ球の集積によるものとみて、大きな誤りはないであろう。

(III) 結核感染防御の本態が、特異的に刺激を受けたリンパ球と、非特異的に活性化されているマクロファージの協力によるものであり、これら活性化の指標の一つがライソゾーム由来の水解酵素活性の上昇であるとされる。そこで感染後における肺と脾のホモジネイトについて、AP活性とカテプシン活性の変化を週を追つて検査した。肺においては、3週後感染菌数は10,000倍にふえ、この間、カテプシン活性は組織重量当りで4倍に、臓器当りでは10倍にもなつた。AP活性は組織重量当りで2倍に、臓器当りでは5倍ほどであつた。脾においては両活性とも、臓器当りで5倍ほどの上昇であるが、重量当りでは2倍にならなかつた。

以上の結果は、細胞当りの酵素活性の上昇はあるにしても、より重要なのは活性細胞の集積による数の増加であり、ことに肺ではそれらが肺胞空間に充満するために、組織重量当りの活性が顕著に増し、脾ではもともとそうした細胞の集まつた実質臓器であるため、臓器全体の腫大があつても、重量当りの活性上昇が肺のように表現されないであろう。

また興味あることは、6-MP注射によつてリンパ球の増殖を抑制すると、感染動物の脾は萎縮し、また単位重量当りの水解酵素活性をみると、カテプシンの場合は多少減少するが、AP活性は逆に著明に上昇し2倍になることもある。このことは、リンパ球の崩壊の結果として脾におけるマクロファージの数が相対的に増加すること、そしてAP活性がマクロファージで強く、リンパ球で弱いと考えれば説明がつくが、次にこの点を検討した。

Fig. Time-Course Enumeration of Spleen Viable Units in the Mice Challenged with Virulent Tubercle Bacilli at the Time of "Recall" with BSA 3 Weeks after Sensitization with the Same Antigen Incorporated into Freund Complete or Incomplete Adjuvant

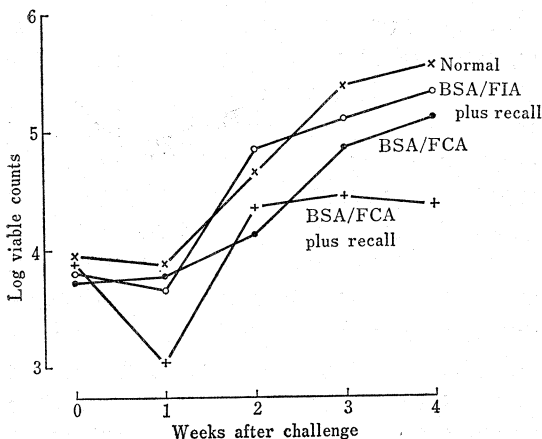


Table 1. Change of Viable Counts in the Tissue Homogenate or Macrophage Suspension Prepared from the Mouse Spleen Challenged with a Kanamycin-Resistant Strain of Tubercle Bacilli ($H_{37}RaKM-R$)

BCG (0.5mg) vaccination	Challenge with $H_{37}RaKM-R$ (0.2mg) 3 weeks after vaccination	Inoculum	No. of viable units isolated selectively on kanamycin-containing Ogawa medium (Enumeration of the challenge strain)		
			3 hr	1 w.	2 w.
No	Yes	Macrophage 10^6	82	48	13
		Homogenate 10 mg	4,100	1,800	1,100
Yes	Yes	Macrophage 10^6	53	0.5	0.15
		Homogenate 10 mg	2,100	7	0

Table 2. Degradation of Tuberculoproteins by Incubation with Mouse Peritoneal Macrophages

No. of macrophages employed	Addition of pepstatin (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Folin reaction (OD 700 $m\mu$) of degradation products from the below-indicated substrates		
		Denatured hemoglobin (4,000 μg)	Tuberculoproteins from	
			$H_{37}Ra$ protoplasm (525 μg)	BCG culture filtrate (330 μg)
2×10^6	-	0.482	0.074	0.070
	+	0.030	0.005	0.010

(IV) 正常マウスの脾、あるいは BCG を3週間隔で2回静注して得た腫大した脾より、硝子吸着性の細胞(GAC)と非吸着性(GNAC)の細胞を分離し、 10^7 細胞数による水解酵素活性を検査すると、両活性ともGACが強く、またカテプシン/AP活性比をみると、常にGACが低い。この傾向は腹腔内渗出細胞についても全く同様であり、結論として、ライソゾーム由来の水解酵素活性は一般にマクロファージがリンパ球より強く、ことにAP活性は前者が圧倒的である。また抗原処理という観点からすれば、マクロファージのカテプシン活性の意味は理解しやすいが、リンパ球のカテプシン活性の免疫学的意味は今後の興味ある課題であろう。

(V) 2群のマウスを用意し、一方をBCG 0.5mgの静注で免疫し、3週後 $H_{37}Ra$ KM-R 株 0.2mg の静注によつて両群とも感染した。感染後3時間、1週、2週目に、各群より10匹のマウスをサンプリングして脾を摘出し、うち3匹分はホモジネイトとして、また7匹分の脾からはGACを分離して、それぞれKM 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の小川培地に接種して感染菌の選択的分離を行なつた。その結果、ホモジネイトについても、GACについても、免疫群における菌数減少は極めて顕著で、免疫処置が、マクロファージの抗菌力を活性化している事実が示された。

(VI) 腹腔内マクロファージ 2×10^6 を使い、基質として変性ヘモグロビン 4,000 μg 、 $H_{37}Ra$ 株の菌体細胞

質(100,000g上清)より分離した蛋白 525 μg あるいは BCG ソートン培養液より精製した蛋白 330 μg をそれぞれ混合インキュベイトし、 40°C 、90分、pH 3.19における蛋白分解の程度を検討した。この際、それぞれ2系列とし、一方にはカテプシンDに対する特異的阻害剤ペプスタチンを加えた。その結果は、ツベルクリン蛋白がマクロファージのカテプシンDによつて分解されることが明白に示された。また、更に大量の基質を用い、分解物をSephadex G-75を用いたゲル濾過で分離し、そのツベルクリン活性を感作モルモットを用いて検討したところ、明らかに力価の減少が認められたが、数千の分子量をもつかぎり、反応そのものは定型的な発赤と硬結を示した。

結 論

結核感染においてマウスの脾は腫脹するが、これはその個体の免疫力(防御力)ならびに遅延型アレルギーの発生と密接な関係をもつ。そのような脾の構成細胞であるリンパ球、マクロファージが活性化されていることは、水解酵素活性、抗菌力の上昇によつて証明された。しかし、同時に、あるいはそれ以上に重要なのは、この種の白血球性細胞の数の増加(動員)であると考えられる。

文 献

- 1) North, R. J. and Mackaness, G. B. : 日米医学協
力計画結核部会第5回合同会議, 1970.
- 2) Dannenberg, A. M., Jr., Ando, M. and Shima,
K. : J. Immunol., 109 : 1109, 1972.
- 3) 金井興美・近藤瑩子 : 結核, 44 : 217, 1969.

6. 特別発言：結核免疫におけるマクロファージ代謝活性ならびに それと免疫リンパ球との関連

慶応義塾大学医学部微生物学教室 斎藤和久

結核やチフス症など通性細胞内寄生性細菌感染症に対する防御免疫は、免疫の成立している動物のマクロファージ (MP) 内における感染菌の増殖抑制として発現されることが明らかにされ、“細胞性免疫”の範疇に入れられるに至ったことは周知の通りである。ところで、このような細菌感染症に対する“細胞性免疫”が免疫適格細胞とは考えられない MP に即して発現される事実をいかに説明するかは大きな問題となった。そして、まずこの機序を免疫動物 MP に付着していると思われる cytophilic antibody ないし cell-bound antibody に求めようとする考えを一部の人に生ぜしめたが、異なつた通性細胞内寄生性細菌感染症の間 (たとえば結核とチフス症、リステリア症、ブルセラ症の間) に、免疫学的特異性をこえて交差的に感染防御免疫が成立し、それが MP 内における攻撃菌の増殖抑制に基づくことが示されたため、感染症に対する細胞性免疫に直接抗体が関与するという考えは否定された。

Mackaness は、遅延型アレルギーにおいて感作リンパ球に *in vitro* で対応する抗原を作用させると、正常動物の MP の遊走を阻止する物質 (MIF) や chemotactic factor などいろいろな活性物質が産生されるということにアナロジーを求め、感染防御免疫においても感作リンパ球に対応抗原が作用して、MP の活性を上昇させるような物質を生じ、これにより活性の上昇した MP に即して免疫学的特異性をこえて感染防御免疫が発現するのであろうという考えを、*in vivo* の細胞移入の実験結果から提唱した¹⁾。Mackaness のこの考えは、免疫適格細胞と MP を結びつける機構を示すものとして注目をひき、これに向かつて多くのアプローチがなされているが²⁾⁻⁹⁾、この問題を MP の代謝活性の面から検討した研究はわずかに Nathan ら¹⁰⁾の MP の hexosemonophosphate 回転促進についての研究があるのにすぎない。

私は BCG 免疫マウスの MP の lysosomal enzymes が増量していることを見出しているので、MP 内の菌処理に重要と考えられるこの lysosomal enzymes の一つである acid phosphatase (a. p.) 活性を指標として上記

の問題の追究を試みた。

BCG 感染 25 日のマウスの脾細胞を *in vitro* にそのまま、あるいは PPD 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、1 日培養した培養液を Millipore 濾過したもの (CS) を等量の新しい培養液に加え、正常マウスの腹腔から集めた MP の cell sheet の培地として用い、3 日間培養した MP の a. p. 活性を定量すると、その活性は正常マウス脾細胞の CS を加えて培養した MP のそれに比し明らかに上昇していることが見出された。そして、この際に CS が PPD を添加したものであると、BCG 感染マウス脾の CS の場合にはかえつて MP a. p. 活性上昇が少なく、また正常マウス脾の CS の場合にはかえつて MP a. p. 活性を上昇させた。

BCG 感染後、日をおつてマウス脾の CS の正常 MP a. p. 活性に及ぼす影響を検討する目的で、正常 MP cell sheet を Millipore filter でへだてて、BCG 感染後日数を異にするマウスの脾細胞と cocultivate 後、MP a. p. 活性を定量した。その結果、BCG 感染 10 日後の脾細胞では正常 MP a. p. に影響を及ぼさないが、26 日後、36 日後の脾細胞では明らかに正常 MP の a. p. 活性を上昇させた。また PPD による BCG 感染マウス脾細胞の正常 MP a. p. 活性上昇の抑制は、脾細胞と PPD を短時間作用させた後洗った脾細胞を用いて、正常 MP と cocultivate してもみられた。

BCG 感染マウス脾細胞を glass bead column 通過により純化したリンパ球系細胞を用い CS を作製しても、その CS は正常 MP の a. p. 活性を上昇させた。また、このようにして得られた CS を透析しても、正常 MP の a. p. 活性上昇作用は失われなかつた。

以上の結果は BCG 感染マウス脾細胞集団中のリンパ球系細胞が、MP の a. p. 活性を上昇させるような、非透析性の物質を産生していることを示唆する。PPD の添加がかえつてこの物質の作用あるいは産生を抑制する結果を得ているが、BCG 生菌感染により生体内で適当に感作されているリンパ球に対する PPD の影響と考えることもできよう。また、このような物質が MIF など

と同一の物質か否か、この物質産生に関与するリンパ球が胸腺由来(T)リンパ球であるか否かなど、今後の問題として追究中である。

文 献

- 1) Mackaness, G. B. : J. Exp. Med., 129 : 973, 1969.
- 2) Dodd, Z. Y. : Infect. Immun., 1 : 551, 1970.
- 3) Patterson, R. J. and Youmans, G. P. : Infect. Immun., 1 : 600, 1970.
- 4) Howard, D. H., Otto, V. and Gupta, R. K. : Infect. Immun., 4 : 605, 1971
- 5) Krahenbuhl, J. L. and Remington, J. S. : Infect.

- Immun., 4 : 337, 1971.
- 6) Godal, T., Rees, R. J. W. and Lamvik, J. O. : Clin. Exp. Immunol., 8 : 625, 1971.
- 7) Simon, H. B. and Sheagren, J. N. : J. Exp. Med., 133 : 1377, 1971.
- 8) Simon, H. B. and Sheagren, J. N. : Cell. Immunol., 4 : 163, 1972.
- 9) Simon, H. B. and Sheagren, J. N. : Infect. Immun., 6 : 101, 1972.
- 10) Nathan, C. F., Karnovsky, M. L. and David, J. R. : J. Exp. Med., 133 : 1356, 1971.
- 11) Saito, K. and Suter, E. : J. Exp. Med., 121 : 728, 1965.

7. 特別発言：ツベルクリン反応性細胞の抗ハプテン抗体産生における Helper 効果について

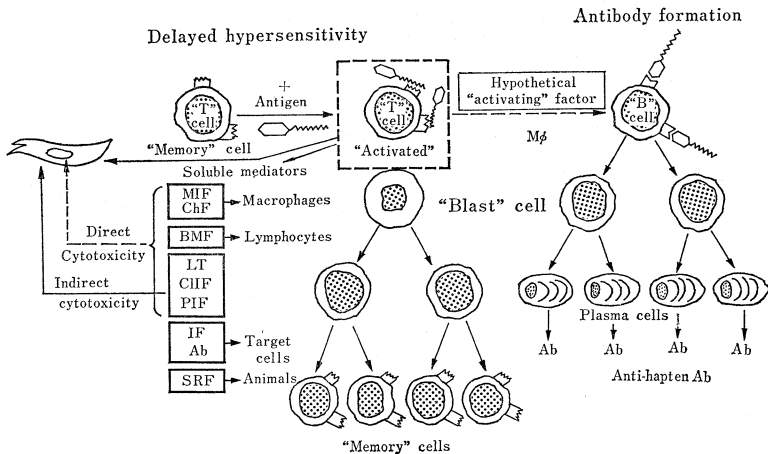
大阪大学保健管理センター・医学部第3内科 青木隆一

研究目標

結核菌感動物のリンパ球, T-cellのもつ免疫生物学的特性として,細胞性免疫諸現象を誘起する lymphocyte mediators を産生することが次第に明らかになつて来ている。また結核菌感動物の“activated angry macrophages”の示す特異な感染防御作用も細胞性免疫の一つとして注目されている。一方,結核菌感動物のT-cellは,体液性抗体産生を促進する helper 効果, adjuvant 効果を示すことが広く認められている。抗 haptene 抗体産生には,抗 haptene 抗体産生前駆細胞 (AFCP : B-cell) と抗 carrier helper cell (T-cell) およびマクロファージの3者の協同作用が必要とされているが,これら

細胞間の co-operation 機構についてはほとんど判明していない。このため,1つのアプローチとして最も代表的な細胞性免疫現象の1つとされているツベルクリン過敏症を例にとり,また精製した PPDs は体液性抗体を作らないという利点を利用して本研究を行なつた。すなわち抗 haptene AFCP (B-cell) を haptene-PPDs で刺激して, PPDs 反応性リンパ球 (T-cell) とともに予めX線照射した recipient 中で生体内培養し, [PPDs 反応性細胞が haptene-primed B-cell の産生する抗 haptene 抗体産生にどのような効果を示すか, ツベルクリン反応性細胞の免疫生物学の性状, 更に T-cell-B-cell co-operation に関与する T-cell 由来の1種の chemical mediator (Bloom の hypothetical activated factor)

Fig. Relation between Cellular Immunity and Antibody Formation



MIF : Migration inhibitory factor, ChF : Chemotactic factor, LT : Lymphotoxin, IF : Interferon, SRF : Skin reactive factor, BMF : Blastogenic, mitogenic factor, CHIF : Cloning inhibitory factor, PIF : Proliferation inhibitory factor, Ab : Antibody

の有無, 性状を追求したので追加発言する。

研究方法および成績

動物は ddo マウス, C₃H 系マウスを使用した。PPDs は糖反応のなくなるまで精製して用いた。ハプテン基として 2,4-dinitrophenyl (DNP) 基を用い, Eisen の法で DNP-PPDs, DNP-KLH など調整し, hapten-carrier conjugate として使用した。人型結核菌加熱死菌(青山B株)で感作した動物より tuberculin-reactive cell (helper cell) を, また DNP-KLH で免疫した動物より抗 hapten-primed cell をとり, 両者を混合して DNP-PPDs とともにあらかじめ X 線照射された recipient 内で生体内培養した。産生される血中の抗 DNP 抗体量は DNP-BSA-¹³¹I を用いる共沈法で定量し, また脾細胞中の抗 DNP 溶血斑形成細胞の測定は Cunningham 法で行なつた。一方 migration inhibitory factor (MIF) の産生および部分精製は Bloom らの方法で行ない, 型のごとく間接法で MI テストを行なつた。

(1) 結核菌感作マウス・リンパ球のツベルクリン反応性

ツベルクリン反応性を有するか否かを macrophage disappearance test および MIF 産生能 (MI テスト) で検討した結果, 結核菌感作マウスのリンパ腺リンパ球中には PPDs 反応性細胞が存在することを確認した。

(2) PPDs 反応性細胞の helper activity

前述の研究方法で検討した結果, 結核菌死菌感作マウスのリンパ球は carrier protein (PPDs) を介して抗 DNP-AFCP と co-operation して著明な抗 DNP 抗体を産生し, 明らかに helper cell activity を示した。抗 hapten-primed cell としては DNP-bacterial α amylase

か DNP-Taka amylase で免疫しても同様の結果を得た。BCG (1.2×10⁷) 接種後4週目の BCG-sensitized cell も明らかに helper activity を有している。この helper activity は結核菌感作後3日より出現し, その活性は4週以上も持続して認められるが, ¹³¹I-PPDs を用いた radio-immunoelectrophoresis で検討した結果, 抗 PPDs 抗体は検出できなかつた。

(3) 本 helper activity 発現に影響する因子

抗 θ 抗体 (AKR anti- θ (C₃H/He) isoantisserum) を用い, 型のごとく前処置した PPDs 反応性リンパ球は, helper activity を消失し, また 1,000r の X 線照射, 酢酸コーチゾンを腹腔内注射後に死菌感作した場合などにもその helper activity は 1/2~1/4 に低下する。これらの結果, helper activity を有する感作リンパ球は T-cell と考えられる。

(4) 感作 T-cell 由来の抗ハプテン抗体産生促進因子について

Helper cell と hapten-primed cell とを混合せずに別々の route で recipient に投与しても抗ハプテン抗体が明らかに産生されることから, 本 cellular cooperation における T-cell 由来の mediator の存在を想定した。感作マウスのリンパ腺リンパ球を PPDs とともに培養し, その培養液の遠心上清より本 mediator の分画を試みた。Sephadex G-200 でゲル過した結果, MIF 活性は post-albumin 位 (Fr. IV) に見出されるが, 本促進因子活性は void volume に続く画分に見出され, MIF とは明らかに異なる高分子物質である。

以上, 結核菌感作動物のリンパ球がもつ抗ハプテン抗体産生における helper activity について追加した。