

原 著

遅延型アレルギーに関与するリンパ球の動態に関する研究

マクロファージ遊走阻止現象と遅延型皮膚反応
の相関関係について

木 野 稔 也

京都大学結核胸部疾患研究所 (主任 辻周介 教授)

受付 昭和 49 年 2 月 6 日

DYNAMIC ASPECTS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS
FOR DELAYED HYPERSENSITIVITY*Relationship between Macrophage Migration Inhibition
Phenomenon and Delayed Skin Reaction

Toshiya KINO (Director : Prof. S. TSUJI)

(Received for publication February 6, 1974)

Many recent investigations support the hypothesis that the macrophage migration inhibitory phenomenon is an *in vitro* model of delayed hypersensitivity. The sensitized lymphocytes liberate the migration inhibitory factor by contact with the specific antigen.

The dynamic aspects of immunocompetent cells for delayed hypersensitivity were studied, comparing the macrophage migration inhibitory phenomenon and the delayed skin reaction.

Guinea pigs were sensitized by 1 mg or 10 mg of heat-killed BCG in the form of Freund's complete adjuvant. According to the difference of the site of sensitization, animals were divided into two groups. The first was sensitized by only one injection of antigen into the back of the neck and the second was injected separately into the hind footpads and the back of the neck.

Regardless of the dose of antigen and the site of sensitization, delayed cutaneous reactions were similarly and intensively induced. However, the macrophage migration inhibition by peritoneal exudate cells was noted only in the animals sensitized by the injection of antigen into the hind footpads and no inhibition by peritoneal exudate cells was observed in the animals injected into the back of the neck (Table 1, Table 2, Fig. 1 and Fig. 2), although the adequate number of lymphocytes were in the peritoneal exudate cells (Table 4 and 5). On the other hand, the migration of the alveolar cells from the animals sensitized into the back of the neck was apparently inhibited and its intensity was correlated to that of delayed cutaneous reaction (Table 7 and Fig. 3).

It was inferred that by sensitization procedure cells localized in the regional lymphnodes are sensitized in delayed type and that these sensitized cells are deposited in two different places, the lung and the peritoneal cavity, depending on the site of sensitization. A skin reaction, however, can be uniformly induced by sensitized cells which come from the depository

* From the Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

to the test skin site regardless of the site of sensitization.

1. 緒 言

遅延型アレルギーの研究は、1890年のKoch¹⁾の記載にまでさかのぼることができよう。結核菌に感染した人およびモルモットの皮下に、ツベルクリンを注射すると、発熱と共に注射局所の硬結と腫脹を認めている。しかし24時間から48時間を頂点とする遅延型皮膚反応を結核感染の診断として確立したのは、Mantoux²⁾である。この遅延型皮膚反応は、個体の感染の程度および免疫状態を検出するのに、現在依然として意義を失っていないが、さらに定量的な方法の確立およびその発現の機構の解明には、*in vitro*での研究がぜひとも必要である。*In vitro*での研究は、Rich and Levis³⁾が遅延型に感作されたモルモットの脾臓を*in vitro*で培養し、特異的抗原によつて脾臓からの単核細胞の遊走が阻止されることを見出して以来、多くの研究^{4)~21)}がこの現象を支持してきた。その後技術的には、George and Vaughan²²⁾の毛細管を用いたマクロファージ遊走阻止現象へと発展し、この方法は、より定量的なまた反応に關与する細胞の解析的な研究方法として、David^{23)~25)}らによつて確立された。もちろん1つの方法が確立されるまでには、幾多の曲折があり、遅延型に感作された動物の骨髓細胞²⁶⁾、皮膚²⁷⁾、肝細胞²⁸⁾、角膜上皮²⁹⁾等を用いると、抗原による組織片からの細胞遊走阻止現象はみられなかつたと主張する報告や、感作動物の腹腔滲出細胞は、抗原によつてむしろ細胞増殖が促進されるという報告³⁰⁾³¹⁾があり、多少の混乱がみられたが、David^{23)~25)}らは、1)結核菌だけでなく、卵蛋白、ジフテリアトキソイド、またはHapten-carrier conjugateによつて、遅延型に感作されたモルモットの腹腔滲出細胞の毛細管からの遊走は、おのおのの抗原によつて、特異的に阻止されること、2)血中抗体のみを産生するように感作されたモルモットの腹腔滲出細胞では、抗原による遊走阻止はみられないこと、3)遅延型に感作されたモルモットの血清とincubateした正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走は、抗原によつて阻止されないことを示し、毛細管からの腹腔滲出細胞遊走阻止現象を遅延型アレルギーの*in vitro*のモデルとして確立した。さらにBloom and Bennett³²⁾³³⁾、David³⁴⁾³⁵⁾およびSvejcar³⁶⁾らは、遅延型に感作された動物のリンパ球と抗原との接触によつて産生される液性物質が、正常モルモットのマクロファージの遊走を阻止することを見出し、この液性物質をMacrophage inhibitory factor (MIF)と名付けた。さらに腹腔滲出細胞遊走阻止現象の主役は感作リンパ球であり、マクロファ

ージはこの現象の表現型としての役割を果たすことを示した。このように、マクロファージ遊走阻止現象は、遅延型の皮膚反応を示す動物のみならず人^{37)~40)}においても、遅延型アレルギーの*in vitro*のモデルとして、また遅延型アレルギーの皮膚反応に付随する現象として一般に認められているが、はたしてマクロファージ遊走阻止現象と遅延型皮膚反応とは量的にまた経時的に相關関係を有するか否かについての報告は非常に少ない。Ferraresi⁴¹⁾らは、腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止現象と遅延型皮膚反応とを経時的に調べた結果、遅延型皮膚反応はマクロファージ遊走阻止現象より早期にかつ急激に出現し、約6週後に両者の程度は平行すると述べている。マクロファージ遊走阻止現象においては、感作リンパ球がMIFを産生するのであるから^{32)~35)}、用いたリンパ球の所在および感作の程度が当然考慮されなければならない。著者はモルモットをBCG死菌で感作し、遅延型皮膚反応とマクロファージ遊走阻止現象との相關関係を経時的に観察したが、感作する部位によつて、また用いるリンパ球様細胞を採取する臓器の種類によつて、両者が相關する場合とそうでない場合があること、さらに肺も遅延型アレルギーに關与する免疫臓器の1つであることを見出した。さらにPPDに対する血中抗体の推移とも比較した。

2. 実験材料および実験方法

1) 実験動物：本実験にはすべてハートレイ系の雌モルモットを用いた。体重は450~500gのものを選んで感作した。

2) 感作抗原：感作抗原として、BCG死菌をFreund完全アジュバントの型で用いた。すなわち流動パラフィン2容量にラノリン1容量を混合したものに生理的食塩水に浮遊したBCG死菌を混合した。BCG死菌の濃度として、1mg/mlおよび10mg/mlに調製し、感作に用いた。

3) 感作方法：モルモットを感作菌量の相違によつてまず2群に分けた。第1群は1mgのBCG死菌で感作し(1mg感作群)、第2群は10mgのBCG死菌で感作した(10mg感作群)。次に各群を感作部位の相違によつてさらに2群に分けた。すなわち後項部の皮下に1回注射した群(首感作群とよぶ)と、半量の抗原を後項部の皮下に、残りの半量を2本の後足趾に分けて注射した群(後足感作群とよぶ)である。

4) 皮膚テスト：腹腔滲出細胞または肺細胞を採取する2~4日前に、生理的食塩水0.1mlに溶解した0.5

mcg PPD (Park Davis 社製) を、脱毛したモルモットの側腹部の皮内に注射した。皮膚反応は注射後 48 時間後の発赤および硬結の直径を測定した。感作モルモットに大量の抗原を皮下に注射すると Nelson⁴²⁾ らのいう腹腔滲出細胞中のマクロファージ消失現象を引き起こすが、0.5 mcg PPD は腹腔滲出細胞にはなんら影響を与えない安全な量である。

5) 腹腔滲出細胞：腹腔滲出細胞を採取するために、流動パラフィン 20 ml を感作モルモットの腹腔に注射した。4 日後に心臓穿刺によつて採血致死させた後に開腹して、滅菌した Hanks 液⁴³⁾ 約 200 ml を用いて腹腔内を洗浄し、無菌的に腹腔滲出細胞を採取した。腹腔滲出細胞は、分液漏斗で水相部分を分離し、滅菌した Hanks 液を用い、1,000 回転、10 分間の遠沈で3回洗浄し、流動パラフィンをよく除いてから、マクロファージ遊走阻止試験および形態学的細胞分類に供した。なお採血した血液から血清を分離し、これを血中抗体の測定に用いた。

6) 肺細胞：肺細胞を採取するために Myrvic⁴⁴⁾ らのウサギの肺細胞採取法を応用した。感作モルモットを心臓穿刺によつて採血致死させた後に、両肺を肺および気管支を傷つけないように注意しながらきれいに分離し、気管支を通じて滅菌した Hanks 液 10 ml で注入および洗浄を5回繰り返して、肺細胞を採取した。なお1匹からの肺細胞採取量は、腹腔滲出細胞採取量の約 1/3 であったので、3 匹の肺細胞をプールし、滅菌した Hanks 液で腹腔滲出細胞の場合と同様に3回洗浄した後、マクロファージ遊走阻止試験に用いた。なお同時に形態学的分類にも用いた。

7) マクロファージ遊走阻止試験：David²³⁾ らの方法に準じて行つた。滅菌した Hanks 液で洗浄した腹腔滲出細胞または肺細胞を、56°C で 30 分間非動化した正常モルモットの血清を 15% 含む TC-199 medium (pH 7.4) で、10% に浮遊した後、毛細管(径 1.2~1.4 mm, 長さ 75 mm) にほぼ 90% に詰めた。毛細管の一方の先端をパラフィンでふさぎ、閉管部を下にして、1,000 回転、5 分間遠沈して細胞を毛細管閉管部から 5~6 mm のところまで詰めた。次いで細胞と上清の境界面で毛細管を切断し、Mackness-type chamber の底部カバーガラスの上に、少量のシリコングリス(Beckman) を用いて、2本ずつ固定した。パラフィンでカバーガラスを閉じた後、Mackness-type chamber の横穴から、Streptomycin 100 mcg/ml および Penicillin 100 units/ml の割合に加えた TC-199 medium (pH 7.4) に抗原 PPD を特別な場合を除いて 15 mcg/ml の割合に溶解したものまたは PPD を加えないものを満たし、パラフィンで横穴を閉鎖し、37°C で 24 時間培養して毛細管からマクロファージを遊走させた。遊走後、遊走面積を40倍

に拡大し薄紙に写しとつた後、プランメーターで面積を測定した。マクロファージ遊走の程度(%migration) は次式に当てはめて計算した。

% migration

$$= \frac{\text{PPDを加えた場合の平均遊走面積}}{\text{PPDを加えない場合の平均遊走面積}} \times 100$$

なお平均遊走面積は、4本の毛細管の結果を平均した。

8) 形態学的細胞分類：マクロファージ遊走阻止試験に用いた腹腔滲出細胞および肺細胞の残りを、1,000 回転、5 分間遠沈した後、正常モルモット血清に浮遊させ、スライドガラスに塗布した。標本を空気乾燥した後、May-Giemsa 複染色を行つた。分類方法は Nelson⁴²⁾ の記載に準じて、マクロファージ、大、中、小リンパ球、多核白血球に分けたが、小リンパ球とは、細胞の直径が赤血球と同じか、それよりやや大きいもの、大リンパ球は直径がマクロファージと同じ位のもの、中リンパ球は直径が両者の中間のものとした。

9) 血中抗体の測定：PPD に対する凝集抗体の推移を Boyden の方法⁴⁵⁾ に準じて測定した。ただし、実験誤差を少なくするため、一度に多数の検体を扱えるマイクロタイターを用いた。検体の希釈液には、1:100 正常ウサギ血清生塩水希釈液は測定値の再現性と凝集最終点(end point) の判定に関して劣るため、0.1% ゲラチンを含む生理的食塩水を用いた。被検血清はすべて 56°C で 30 分間非動化し、等量の羊赤血球で吸収したのち抗体価を測定した。

3. 実験成績

1) 腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止試験

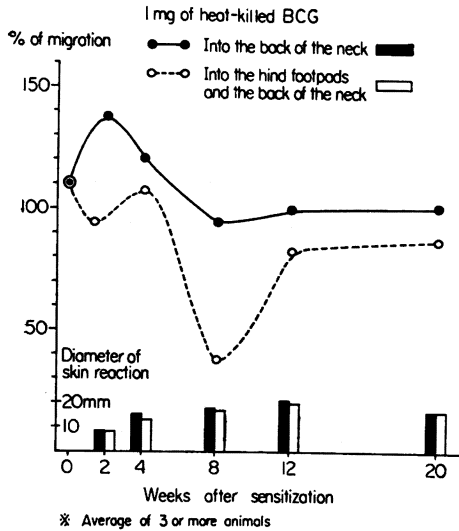
Table 1. Migration of Peritoneal Exudate Cells and Skin Reaction

Weeks after sensitization	1 mg of heat-killed BCG			
	Into the hind footpads and the back of the neck		Into the back of the neck only	
	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)
2W	92	7×7(+)	145	10×10(+)
	107	10×10(+)	124	10×9(+)
	60	8×7(+)	141	7×7(+)
	115	9×9(+)		
4W	113	14×14(+)	120	18×17(+)
	121	17×14(+)	127	15×13(+)
	68	12×11(+)	113	15×14(+)
8W	38	15×15(+)	106	17×17(+)
	14	20×18(+)	105	18×17(+)
	62	18×18(+)	72	20×18(+)
12W	98	22×20(+)	98	21×21(+)
	69	20×20(+)	99	21×21(+)
	82	21×21(+)	103	22×22(+)
20W	86	13×13(+)	103	15×15(+)
	74	22×20(+)	108	20×20(+)
	100	18×18(+)	93	17×17(+)

(+) Erythema only : mm

(H) Erythema+induration : mm

Fig. 1. Migration of Peritoneal Exudate Cells and Skin Reaction



験および遅延型皮膚反応：遅延型皮膚反応およびマクロファージ遊走阻止試験は、それぞれ感作後2, 4, 8, 12および20週目に行なつた。Table 1 および2は個々のモルモットの測定値を、また Fig. 1 および 2 はその平均値を示す。

i) 1 mg BCG 死菌感作群 (Table 1 および Fig. 1) : 0.5 mcg PPD による遅延型皮膚反応は、首感作群および後足感作群共に、感作後2週目には直径10 mm以下の弱い発赤のみを認めすぎなかつたが、4週後からは両群共に時には壊死を伴う強い反応を認め、発赤および硬結の直径は15 mm以上であつた。遅延型皮膚反応の経過は、首感作群および後足感作群共に差は認められず、同程度に誘発することができた。一方興味ある現象が腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止試験においてみられた。首感作群では、遅延型皮膚反応の弱い感作後2週目に、遊走阻止よりもむしろ遊走促進がみられ、平均% migrationは137%であつた。感作4週以後は、遅延型皮膚反応が強く現われるにもかかわらず、平均% migrationは、感作4週目120%、8週目94%、12週目および20週目100%を示し、全く遊走阻止現象はみられなかつた。ところが後足感作群では、感作後2週目、4週目には遊走阻止現象は認められなかつたが、8週目には平均% migrationが38%と強い遊走阻止現象がみられ、12週目、20週目はそれぞれ83%、87%であつた。個々のモルモットにおいても、遅延型皮膚反応の強く出るものが必ずしも強い遊走阻止現象を示すとはかぎらなかつた。

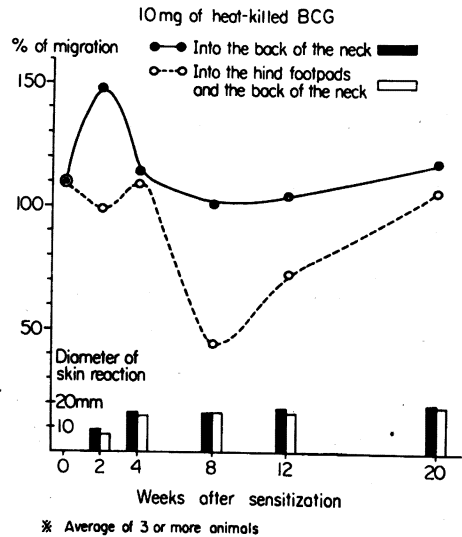
ii) 10 mg BCG 死菌感作群 (Table 2 および Fig. 2) : 1 mg BCG 死菌感作群で示された遅延型皮膚反応とマクロファージ遊走阻止現象の傾向は、10 mg BCG 死

Table 2. Migration of Peritoneal Exudate Cells and Skin Reaction

Weeks after sensitization	10 mg of heat-killed BCG			
	Into the hind footpads and the back of the neck		Into the back of the neck only	
	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)
2W	103	8 × 8 (+)	118	7 × 8 (+)
	93	5 × 5 (+)	114	8 × 8 (+)
	102	4 × 4 (+)	212	10 × 10 (+)
4W	96	15 × 15 (++)	138	17 × 16 (++)
	104	15 × 15 (++)	113	16 × 16 (++)
	150	17 × 15 (++)	106	16 × 16 (++)
	87	14 × 11 (++)	100	18 × 18 (++)
8W	36	18 × 18 (++)	93	11 × 11 (++)
	44	15 × 12 (++)	95	15 × 14 (++)
	51	16 × 15 (++)	114	18 × 17 (++)
12W	99	15 × 15 (++)	83	15 × 15 (++)
	47	19 × 19 (++)	103	21 × 21 (++)
	72	17 × 16 (++)	126	19 × 18 (++)
20W	117	19 × 19 (++)	110	20 × 20 (++)
	100	18 × 17 (++)	123	21 × 21 (++)
	102	19 × 18 (++)	121	20 × 19 (++)

(+) Erythema only : mm
(++) Erythema + induration : mm

Fig. 2. Migration of Peritoneal Exudate Cells and Skin Reaction



菌感作群でも全く同様であつた。遅延型皮膚反応は、抗原の感作部位の違いにかかわらず感作後4週目から同程度の強い陽性を示したが、腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止試験では、首感作群は感作2週目に遊走促進を示し、以後全経過を通じて遊走阻止は認められなかつた。後足感作群では明らかに、感作後8週目、12週目に遊走阻止が認められた。しかし感作後20週目には、もはや遊走阻止現象は認められなかつた。

以上のごとく、BCG 死菌 1 mg 感作群および 10 mg 感作群共に、腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止試験では、首感作群は全く遊走阻止がみられず、後

足感作群においても遅延型皮膚反応が持続している感作後 20 週目には、もはや遊走阻止が認められなかつたことから、次の事柄について吟味する必要がある。a) マクロファージ遊走阻止試験に用いた PPD の濃度が十分であつたかどうか、b) マクロファージ遊走阻止試験に用いた腹腔滲出細胞の組成において、首感作群、後足感作群で差がなかつたかどうか、c) 特に首感作群では、感作リンパ球が腹腔以外の場所、たとえば肺に貯留している可能性、d) 観察したマクロファージ遊走阻止現象の推移は、はたして遅延型アレルギーの一面を現わしているのかどうかを、血中抗体の推移と比較すること、等である。

2) マクロファージ遊走阻止現象に及ぼす PPD の濃度の影響：後足感作群では、感作後 20 週目には、もはやマクロファージ遊走阻止現象は認められなかつた。さらに首感作群では、後足感作群で最も著明に遊走阻止現象がみられた感作後 8 週目においても、遊走率は 100% 前後であつた。そこで上記の 3 つの時期を選んで、培養液に加える PPD の濃度の遊走阻止現象に対する影響を調べた (Table 3)。PPD の濃度を 30 mcg/ml に増量しても遊走阻止率にはたいして影響がなかつた。さらに 5 mcg/ml 程度の濃度では、後足感作群の 8 週目において遊走阻止は著明でなかつた。このことは、PPD 15 mcg/ml は十分にしかつ必要な濃度であり、遊走阻止がみられなかつたのは、PPD の濃度が低かつたため

Table 3. Effect of PPD Concentration on Cell Migration

		5 mcg PPD/ml	15 mcg PPD/ml	30 mcg PPD/ml
8 W after sensitization in the back of the neck	1 mg of BCG	107% 101 —	106% 105 72	102% 99 80
	10 mg of BCG	— 100 102	93 95 114	95 91 110
8 W after sensitization in the hind footpads and the back of the neck	1 mg of BCG	70 — 95	38 14 64	37 20 55
	10 mg of BCG	— 96 80	36 44 51	30 48 50
20 W after sensitization in the hind footpads and the back of the neck	1 mg of BCG	90 — 101	86 74 100	91 80 98
	10 mg of BCG	110 95 —	117 100 102	110 75 115

はなかつた。

3) 腹腔滲出細胞組成の経時的観察：マクロファージ

Table 4. Differentiation of Peritoneal Exudate Cells

Weeks after sensitization	1 mg of heat-killed BCG							
	Into the hind footpads and the back of the neck				Into the back of the neck only			
	Macrophage	Lymphocyte			Macrophage	Lymphocyte		
Large		Medium	Small	Large		Medium	Small	
2W	63.3%	7.0%	9.0%	18.0%	72.0%	2.7%	6.7%	16.3%
4W	67.7	4.0	6.0	19.7	73.3	5.0	5.3	15.3
8W	50.0	4.3	8.3	35.0	52.7	4.7	19.3	21.3
12W	52.0	1.3	8.0	37.3	62.0	3.0	2.3	31.3
20W	55.3	3.0	6.3	33.3	64.7	3.0	7.7	24.0

Average of 3 or more animals.

Table 5. Differentiation of Pertoneal Exudate Cells

Weeks after sensitization	10 mg of heat-killed BCG							
	Into the hind footpads and the back of the neck				Into the back of the neck only			
	Macrophage	Lymphocyte			Macrophage	Lymphocyte		
Large		Medium	Small	Large		Medium	Small	
2W	68.3%	5.0%	7.3%	16.0%	71.7%	3.3%	6.7%	16.7%
4W	59.8	4.5	11.0	22.3	64.3	8.3	8.5	16.5
8W	45.7	7.7	23.3	21.0	54.0	6.0	12.0	26.0
12W	64.0	2.7	5.7	27.3	62.0	5.3	5.0	25.0
20W	62.7	4.7	6.7	23.7	57.3	6.0	7.7	26.0

Average of 3 or more animals.

Table 6. Differentiation of Alveolar Cells

Weeks after sensitization	Sensitized into the back of the neck							
	1 mg of heat-killed BCG				10 mg of heat-killed BCG			
	Macrophage	Lymphocyte			Macrophage	Lymphocyte		
		Large	Medium	Small		Large	Medium	Small
2W	54.0%	1.5%	9.5%	24.0%	57.0%	4.5%	8.0%	25.0%
4W	53.5	4.5	5.5	28.0	52.5	4.5	8.5	24.5
8W	49.0	3.5	5.5	37.0	58.5	3.0	5.5	30.0
12W	46.5	7.0	4.5	31.5	47.0	7.0	6.6	34.0
20W	38.0	8.0	6.0	31.0	46.0	5.0	3.5	27.5

Average of 6 animals.

とリンパ球に分けた Table 4 および 5 をみると、i) BCG 死菌 1 mg 感作群と 10 mg 感作群とで、細胞組成の推移はだいたい同じといつてよい。ii) 首感作群と後足感作群とを比べると、BCG 死菌 10 mg 感作群の 12 週目および 20 週目を除いて、常に後足感作群のほうのリンパ球の割合が多い。iii) 首感作群および後足感作群共に、感作後 8~12 週目に最もリンパ球の割合が多い。後足感作群でマクロファージ遊走阻止現象が強く現われた感作後 8 週目に最もリンパ球の割合が多かつたことから、著者の観察したマクロファージ遊走阻止現象の程度は、一見リンパ球の占める割合に帰せられるようにもみえるが、この説明は首感作群には当てはまらない。なぜなら、首感作群でも感作後 8~12 週目の腹腔滲出細胞においてリンパ球の割合が一番多くみられるからである。かつ大部分が感作リンパ球であれば、十分遊走阻止を起こしうと思われる量²⁴⁾だからである。したがって後足感作群の 8~12 週目には、リンパ球の量的な増加のみならず、感作リンパ球の質的な増加が腹腔滲出細胞にもたらされ、その結果マクロファージ遊走阻止現象がみられたと考えたい。David²⁴⁾らは、感作細胞が 2.5% 含まれているだけで、正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走阻止を起こしうると述べていることおよび常に首感作群では後足感作群よりもリンパ球の割合が少ないことから、首感作群では、感作リンパ球が腹腔には貯留されず、他の臓器、たとえば肺臓に貯留されているかもしれないことを示唆する。

4) 首感作群における肺胞細胞を用いたマクロファージ遊走阻止現象：首感作群において、肺胞細胞を用いてマクロファージ遊走阻止試験を行つた。Table 6 は用いた肺胞細胞の組成の 6 匹の平均を示したものであるが、腹腔滲出細胞の組成とほとんど同じ割合を示している。Table 7 に示したマクロファージ遊走の遊走度は 3 匹のモルモットの肺胞細胞を集めてテストした値であり、遅延型皮膚反応はおのおの 3 匹の値の平均を示す。Fig. 3 は 2 回の実験の平均値を示したものである。一見して遅延型皮膚反応の程度と、マクロファージ遊走阻止の程度

Table 7. Migration of Alveolar Cells and Skin Reaction

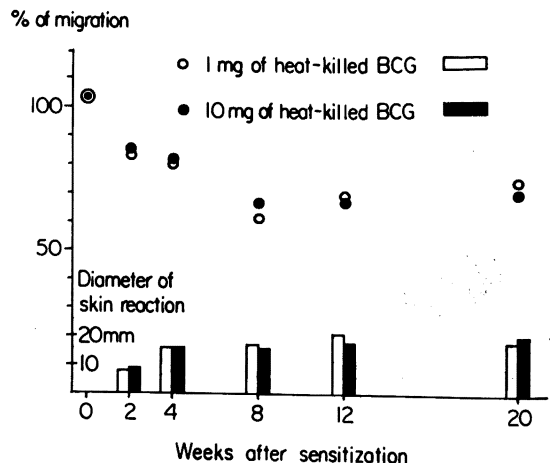
Weeks after sensitization	Sensitized into the back of the neck			
	1 mg of heat-killed BCG		10 mg of heat-killed BCG	
	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)	% of migration (15 mcg PPD/ml)	Skin test (0.5 mcg PPD)
2W	83	9 × 9(+)	79	9 × 9(+)
	85	8 × 8(+)	91	9 × 9(+)
4W	81	16 × 16(++)	87	16 × 16(++)
	80	15 × 15(+)	77	17 × 17(++)
8W	52	18 × 18(++)	70	15 × 15(++)
	70	18 × 18(++)	63	16 × 16(++)
12W	75	21 × 21(++)	68	18 × 18(++)
	63	21 × 21(++)	69	19 × 19(++)
20W	74	17 × 17(++)	85	20 × 20(++)
	74	18 × 18(+)	56	20 × 20(++)

(+) Erythema only : mm

(++) Erythema + induration : mm

Fig. 3. Migration of Alveolar Cells and Skin Reaction

(Sensitized into the back of the neck)



* Average of 6 animals

が平行していることがわかる。さらに 1 mg 感作群と 10 mg 感作群はその程度に差はみられなかつた。このことは首感作群では、感作リンパ球が腹腔よりも、むしろ

Fig. 4. Hemagglutination Antibody Against PPD

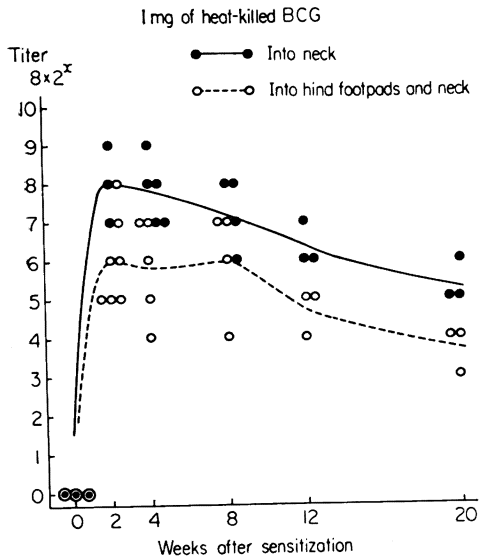
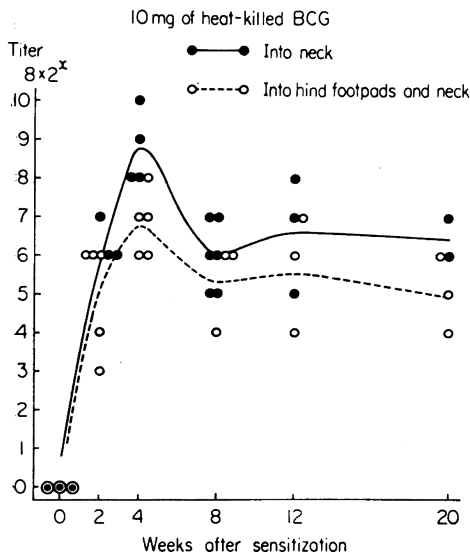


Fig. 5. Hemagglutination Antibody Against PPD



肺に貯留していることを示している。

5) 血中抗体産生の推移：腹腔滲出細胞を用いてのマクロファージ遊走阻止現象の動態は、確かに遅延型アレルギーに関与するリンパ球の動態を現わしているものであろうが、ここで感作部位および感作菌量の違いによる血中抗体の産生の動態と比較してみる必要がある。Boyden 法による PPD に対する血中抗体価は、Fig. 4 および 5 に示すごとく、平均して首感作群のほうが、後足感作群より高い血中抗体価を示したが、抗体価の消長は、ほぼ同じ傾向を示した。しかし BCG 死菌 1 mg 感作群は、血中抗体価のピークが感作後 2 週目にみられたのに対し、10 mg 感作群では、それより遅く 4 週目にピ

ークがみられた。すなわち血中抗体の動態は、感作部位よりも、感作菌量の違いにより影響を受けることを示しており、明らかにマクロファージ遊走阻止現象の動態と異なっている。

4. 考 察

感作リンパ球は、特異抗原との接触によつていろいろな生物活性を有する soluble mediator を培養上清に放出することが知られている。Macrophage migration inhibitory factor については緒言で述べた通りであるが、この他に、Skin reactive factor⁴⁶⁾⁴⁷⁾、Chemotactic factor⁴⁸⁾、Lymphotoxin⁴⁹⁾、Blasotgenic factor^{50)~52)}、および Macrophage aggregation factor⁵³⁾がある。これらの soluble mediator は、単にその生物活性測定の方法に基づいて名前が付けられたもので、その異同が将来さらに検討され整理されることであろうが、*in vivo* における遅延型皮膚反応は、これらの soluble mediator に基づく諸現象の集合したものと考えることができる。これらの soluble mediator の中で、migration inhibitory factor の研究の歴史が一番古く、遅延型アレルギーの *in vitro* のモデルとして、再現性と手技の簡便さから、常に脚光をあびてきた。しかしマクロファージ遊走阻止現象と、遅延型皮膚反応とを経時的に観察した報告は少ない。著者は 2 種類の菌量の BCG 死菌を用いて、感作部位をかえ、また腹腔滲出細胞と肺細胞を用いて、マクロファージ遊走阻止現象と遅延型皮膚反応および血中抗体の推移を比較した。遅延型皮膚反応は、感作菌量および感作部位の差異にかかわらず、感作 4 週目から明らかに同程度の陽性を示し、長期間持続した。一方マクロファージ遊走阻止現象に関しては、首感作群において腹腔滲出細胞を用いると、リンパ球の割合が十分であるにもかかわらず、全経過を通じて全く遊走阻止がみられず、肺細胞を用いて、はじめて遅延型皮膚反応の強さと平行した遊走阻止現象がみられた。このことは遅延型アレルギーに関与する特異的に感作されたリンパ球が、首感作では腹腔に滲出してこず、肺に貯留していることを示している。この意味において、肺の免疫臓器としての意義を強調したい。最近 Richard⁵⁴⁾らは、流動パラフィンで刺激して得た腹腔滲出マクロファージには MIF に対する receptor があるが、Hanks 液で洗浄して得た肺マクロファージには存在しないと述べている。この報告は、必ずしも著者の得た結果と矛盾しない。なぜなら Richard らの用いた腹腔滲出マクロファージは、流動パラフィンで非特異的に刺激されたものであり、肺マクロファージは、前もつてなんら処置を受けていない正常モルモットから得たものである。著者の用いた肺細胞は、Richard らの方法とほぼ同じ方法で採取したものであるが、Freund の完全アジュバントで感作されたモル

モットから得たものであり、明らかに遊走阻止現象がみられた。したがってマクロファージが MIF に対する receptor を持つためには、前もつてなんらかの刺激が加えられている必要があるのかもしれない。感作後2週目で腹腔滲出細胞の遊走が促進された原因は全く不明であるが、非特異的な刺激による遊走促進であるのかもしれない。後足感作群では、感作後8~12週目に腹腔滲出細胞の遊走阻止現象が強くみられたが、20週目には正常レベルに復していた。PPD の濃度を 30 mcg/ml に増量しても結果は同じであつた。このことは、感作リンパ球は、後足感作後8~12週目には腹腔によく集まるが、時を経るにつれて全身に分散してしまうことを示している。この遊走阻止現象の動態は Carpenter⁵³⁾らの観察した腹腔滲出細胞遊走阻止現象の推移とよく似ている。

最後に血中抗体の動態とマクロファージ遊走阻止現象の動態を比較した。Wasserman⁵⁶⁾らは、Thyroglobulin と Freund 完全アジュバントで感作したモルモットにおいて、全血を用いた多核白血球遊走阻止試験は、遅延型皮膚反応の強さの推移と平行せず、Boyden 法による羊赤血球凝集抗体価と平行したと報告している。著者の観察した腹腔滲出細胞を用いてのマクロファージ遊走阻止現象は、必ずしも遅延型皮膚反応とは平行しなかつたが、その動態は、明らかに Boyden 法による羊赤血球凝集抗体価の動態とは異なっており、マクロファージ遊走阻止現象は、用いた細胞集団自身の遅延型アレルギーの *in vitro* のモデルであるといえる。すなわち腹腔滲出細胞を用いてのマクロファージ遊走阻止現象は感作に用いた菌量の違いによつては影響を受けず、感作部位の違いによつて遊走阻止が起こる場合と起こらない場合がある。一方血中抗体の動態は感作部位の違いによる影響は認められなかつたが、感作菌量の違いによつて抗体価のピークの出現時期に差がみられた。このことは、マクロファージ遊走阻止現象と血中抗体価の推移は平行しなかつたという Carpenter⁵⁴⁾らの報告を支持している。

結 論

ハートレイ系モルモットを BCG 死菌 (1mg/ml または 10 mg/ml) を Freund 完全アジュバントの型で、後項部のみ (首感作群とよぶ) または後項に半量および後足蹠に半量 (後足感作群とよぶ) を注射し、遅延型皮膚反応、マクロファージ遊走阻止現象および血中抗体産生の動態を経時的に調べた。

1) 遅延型皮膚反応は、首感作群および後足感作群共に同じ程度に誘発された。

2) 腹腔滲出細胞を用いたマクロファージ遊走阻止現象は、後足感作群においてのみみられ、首感作群では全くみられなかつた。しかし首感作群は、肺胞細胞を用いると、遅延型皮膚反応と平行して、遊走阻止現象がみら

れた。

3) これらのことは、遅延型アレルギーを誘発するに際して感作部位の違いにより、局所リンパ節の感作リンパ球が、2つの異なつた部位に貯留することを示している。1つは従来から考えられている腹腔であり、他の1つは肺臓である。ここに肺の免疫臓器としてまたは免疫反応の場としての意義を見出した。

4) 腹腔滲出細胞によるマクロファージ遊走阻止現象の動態は、血中抗体のそれとは異なつており、著者の観察したマクロファージ遊走阻止現象は、遅延型アレルギーに関与するリンパ球の動態を示すものと考えられる。

付 記

稿を終るにあたり、本研究の指導および論文の校閲を賜つた辻周介教授に深謝します。なお実験遂行にあたりご助力いただいた大島駿作助教授、小原幸信講師、泉孝英博士に深く感謝いたします。またご協力いただいた今村祐子氏、今井保代氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Koch, R.: Dtsch. med. Wschr., 16: 1029, 1890.
- 2) Mantoux, C.: Presse Méd., 18: 10, 1910.
- 3) Rich, A.R. and Levis, M.R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 50: 115, 1932.
- 4) Aronson, J.D.: J. Exp. Med., 54: 387, 1931.
- 5) Moen, J.K. and Swift, M.F.: J. Exp. Med., 64: 339, 1936.
- 6) Heilman, D.N., Feldman, W.N. and Mann, F.C.: Amer. Rev. Tuberc., 50: 344, 1944.
- 7) Kirchheimer, W.F. and Weiser, R.S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68: 407, 1948.
- 8) Raffel, S.: J. Infect. Dis., 82: 267, 1948.
- 9) Buckley, J.J., Buckley, S.M. and Keeve, M.L.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 89: 303, 1951.
- 10) Leahy, R.N. and Morgan, H.R.: J. Exp. Med., 96: 549, 1952.
- 11) Seibert, F.B. and Fabrizio, A.M.: Amer. Rev. Tuberc., 66: 314, 1952.
- 12) Holden, M., Seegal, B.C. and Adams, R.B.: J. Exp. Med., 98: 551, 1953.
- 13) Waksman, B.H.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 746, 1953.
- 14) Gangarosa, E.J., Inglefield, J.T., Thoman, G.A. and Morgan, H.R.: J. Exp. Med., 102: 425, 1955.
- 15) O'Neill, E.F. and Favour, C.B.: Amer. Rev. Tuberc., 72: 577, 1955.
- 16) Hall, N.E. and Sherago, M.: Amer. Rev. Tuberc., 76: 888, 1957.
- 17) Shea, J.D. and Morgan, H.R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94: 436, 1957.
- 18) Marks, J.: J. Path. Bact., 75: 39, 1958.
- 19) Wasserman, J. and Packalen, Th.: Amer. Rev. Resp. Dis., 80: 19, 1959.
- 20) Svejar, J. and Johanovsky, J.: Z. Immunitae-

- tsforsch, 122 : 398, 1961.
- 21) Carpenter, R.R.: Fed. Proc., 22 : 617, 1963.
 - 22) George, M. and Vaughan, J.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111 : 514, 1962.
 - 23) David, J.R., Al-Askari, S., Laurence, H.S. and Thomas, L.: J. Immun., 93 : 264, 1964.
 - 24) David, J.R., Laurence, H.S. and Thomas, L.: J. Immun., 93 : 274, 1964.
 - 25) David, J.R., Laurence, H.S. and Thomas, L.: J. Immun., 93 : 279, 1964.
 - 26) Baldrige, G.D. and Kligman, A.M.: Amer. Rev. Tuberc., 63 : 674, 1951.
 - 27) Cruickshank, C.N.D.: Nature (Lond.), 168 : 206, 1951.
 - 28) Jacoby, F. and Marks, J.: J. Hyg. (Lond.), 51 : 541, 1953.
 - 29) May, K.J. and Weiser, R.S.: J. Immun., 77 : 34, 1956.
 - 30) Waksman, B.H. and Matoltsy, M.: J. Immun., 81 : 220, 1958.
 - 31) Svejcar, J. and Johanovsky, J.: Z. Immunitätsforsch, 122 : 437, 1961.
 - 32) Bloom, B.R. and Bennett, B.: Science, 153 : 80, 1966.
 - 33) Bloom, B.R. and Bennett, B.: Fed. Proc., 27 : 13, 1968.
 - 34) David, J.R.: Proc. Nat. Acad. Sci., 52 : 72, 1966.
 - 35) David, J.R.: Fed. Proc., 27 : 6, 1968.
 - 36) Svejcar, J., Pekarek and Johanovsky : Immunology, 15 : 1, 1968.
 - 37) Thor, D.E., Jureziz, R.E., Veach, S.R., Miller, E. and Dray, S.: Nature, 219 : 755, 1968.
 - 38) Bendixen, G. and Sjøborg, M.: Danish Medical Bulletin, 16 : 1, 1969.
 - 39) Rocklin, R.E., Meyers, O.L. and David, J.R.: J. Immun., 104 : 95, 1970.
 - 40) Marsman, A.J.W., Mia van der Hart, Walig, C. and Eijssvoogel, V.P.: Eur. J. Immunol., 2 : 546, 1972.
 - 41) Ferraresi, R.W., Dedrick, C.T., Raffel, S. and Coihman-Yahr: J. Immun., 102 : 852, 1969.
 - 42) Nelson, D.S. and Boyden, S.V.: Immunology, 6 : 264, 1963.
 - 43) 勝田甫編: 組織培養法, 納谷書店(東京), p. 31, 1955.
 - 44) Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Fariss, B.: J. Immun., 86 : 128, 1961.
 - 45) Boyden, S.V.: J. Exp. Med., 93 : 107, 1951.
 - 46) Bennett, B. and Bloom, B.R.: Proc. Nat. Acad. Sci., 59 : 756, 1968.
 - 47) Krejci, J., Pekarek, J., Johanovsky, J. and Svejcar, J.: Immunology, 16 : 677, 1969.
 - 48) Ward, P.A., Remold, H.G. and David, J.R.: Science, 163 : 1079, 1969.
 - 49) Granger, G.A., Shacks, S.J., Williams, T.W. and Kolb, W.P.: Nature, 221 : 1155, 1969.
 - 50) Bloom, B.R. and Bennett, B.: Fed. Proc., 27 : 13, 1968.
 - 51) Kasakura, S. and Lowenstein, L.: Nature, 215 : 80, 1967.
 - 52) Valentine, F.T. and Lawrence, H.S.: Science, 165 : 1014, 1969.
 - 53) Lolekha, S., Dray, S. and Gotoff, S.P.: J. Immun., 104 : 296, 1970.
 - 54) Richard, W.L., Eddleston, A.L.W.F., Hadden, J.W. and Good, R.A.: J. Exp. Med., 136 : 589, 1972.
 - 55) Carpenter, R.R. and Brandriss, M.W.: J. Exp. Med., 120 : 1231, 1964.
 - 56) Wasserman, J. and Packalen, Th.: Immunology, 9 : 1, 1965.