

今村賞受賞講演

ツベルクリン反応発現の機序

橋本 達一郎

筑波大学基礎医学系
国立予防衛生研究所

受付 昭和49年7月3日

MECHANISM OF TUBERCULIN REACTION

Tatsuichiro HASHIMOTO*

(Received for publication July 3, 1974)

The study on the mechanism of tuberculin reaction is divided into the following three steps.

Cellular transfer of tuberculin hypersensitivity combined with desensitization or with labelling of donor or recipient demonstrated that the circulating sensitized cells (committed lymphocytes) interacted directly with the tuberculin antigen injected intradermally and remained there at the contact site, reaching in several hours the necessary numbers to elicitate the visible skin reaction. To perform these experiments the granulomatous spleen cells were used throughout as the most efficient source of sensitized lymphocytes.

During the specific interaction, the sensitized cells synthesize in several hours a chemical mediator of the skin reaction which is proved to be a macrophage migration inhibitory factor (MIF), also a chemical mediator of the in vitro delayed hypersensitivity. The above skin reactive factor (SRF) obtained from guinea pigs was able to produce the skin reaction similar to the tuberculin reaction in several hours grossly and histologically not only in the guinea pigs but also beyond the animal species. For the massive production of highly efficient SRF again the granulomatous spleen cells were found to be most useful and the isolation technique was established.

The final visible stage of the tuberculin reaction is caused by mononuclear cell infiltration in which macrophages play a main role. The experiments in which whole-body irradiated animals in restored with the normal isogenic bone marrow were examined with various techniques of cell labelling have indicated that the non-specific macrophages come directly to the SRF-mediated skin reaction site from the rapidly proliferating precursors in the bone marrow by way of the blood stream.

Thus the cellular and chemical processes of the tuberculin reaction were analysed in detail.

ツベルクリン反応の発現機序に関する私の一連の細胞免疫学的研究は、1962年以來結核の免疫およびアレルギーの細胞移入実験を出発点として開始された。その詳細

はすでに結核(48:51~59, 1973)誌上に発表したもので、機序の解明に貢献した研究の概略のみを簡単に述べることにする。この研究の出発点から理解されるように私の

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

研究の目的は結核における免疫とアレルギーの関連を解析することであつたが、その前途はまだ遠い。これまでにようやくツベルクリン反応の本態についてその全貌の把握ができるようになったにすぎない。

ツベルクリン反応が結核感染生体においてツベルクリン蛋白の皮内注射によつて肉眼的に発現するためには少なくとも2種の細胞性反応（リンパ球およびマクロファージ）が化学的 mediator の媒介によつて連結されねばならぬことが現在容認されている。この反応連鎖を経てツベルクリン反応は発現の遅延性と反応部位の組織像、すなわち単核性細胞の浸潤を2大特長として発現に至る。私の研究は反応惹起の細胞性および化学的 mediator に相応して次のように3段階に分かつことができる。

1. リンパ球性 mediator

初期の研究としてはツベルクリンアレルギーの細胞による受身伝達、感作細胞の抗原による脱感作、トリチウムサイミジンで標識した感作細胞の追跡などの細胞レベルにおける解析が行われ、遅延型アレルギー受身感作成立の細胞性機構を明らかにすることを目的とした。

研究の焦点はまず細胞移入実験において最も受身感作力の強い細胞材料の発見におかれ、遅延型皮膚反応の観察に最適の実験動物として同種および同系のモルモットが選ばれた。

実験の結果、表1に示すようにツベルクリン感作動物から分離されるリンパ球様細胞を含む材料による受身感作能を定量的にしらべて、感作リンパ球を最も多く含む材料として肉芽腫脾細胞を見出すことができた。

この細胞材料は BCG の静注によつて感作脾にアレルギー性炎症を起こし committed lymphocyte の増加をはかるように創案されたものである。

これによつて活性が強いのみならず、量的にも容易に

大量の細胞材料が得られるようになったので、細胞レベルの実験を行うことが極めて容易になつたのみならず、後述のように化学的 mediator の研究にも大きな利便を与えることになつた。

かくして効率のよい肉芽腫脾細胞材料を主として用い、受身感作ツベルクリン反応の発現には、皮内に注射された PPD などの抗原が直接に全身を循環する感作細胞と作用しあうことを間接的ならびに直接的証拠によつて示すことができた。

間接的な証拠としては細胞による受身感作の成立に潜伏期のないこと、種々の細胞移入経路のうち、静脈経路が最も有効なこと、同種動物間の受身伝達系では同系動物間に比べて受身伝達アレルギーの持続は移植免疫反応のために短期間であること、さらに感作細胞は *in vivo* および *in vitro* で抗原により速やかに可逆的脱感作を受けることである。脱感作実験により、抗体様レセプターは細胞表面に位置することが示唆され、また抗原皮内注射後7時間前後のまだ肉眼的反応のみられない注射部位にすでに感作細胞の必要数が集まつていることが示された。この事実はラベル感作細胞の追跡によつても裏書きされた。

すなわち直接的証拠としてトリチウムサイミジンでラベルしたツベルクリン感作細胞を DNCB で遅延型に感作したモルモットに移入し、表2に示すように PPD, DNCB 皮膚接種部位におけるラベル細胞の消長を追う実験を行つた。その結果反応が肉眼的に出現しない早期に感作細胞と抗原の特異的な相互作用の起こることがオートラジオグラフィーによつても放射能活性の測定によつても一致して示すことができた。これらの解析は「抗原-感作細胞直接作用説」に強固な支持を与えたとともに、次の感作リンパ球による化学的 mediator の合成、放出を考える基礎になつた。

Table 1. Passive Transfer of Tuberculin Sensitivity from Sensitized to Normal Guinea Pigs

Cells from sensitized animals	No. of cells injected ($\times 10^6$)	Size of passive tuberculin skin reaction in normal animals		
		0	10	20 mm
Peritoneal exudate	4.6	[Bar chart showing reaction size]		
mononuclears	1.3	[Bar chart showing reaction size]		
polymorphonuclears	4.2	[Bar chart showing reaction size]		
Granulomatous spleen cells	4.7	[Bar chart showing reaction size]		
	1.7	[Bar chart showing reaction size]		
Spleen cells	5.4	[Bar chart showing reaction size]		
Thoracic duct lymph cells	1.7	[Bar chart showing reaction size]		
Lymph node cells	5.7	[Bar chart showing reaction size]		
Inflammatory lymph node cells	5.8	[Bar chart showing reaction size]		
Serum	10ml	[Bar chart showing reaction size]		
None	0	[Bar chart showing reaction size]		

Table 2. Radioactivity and Percentage of Labelled Cells at the Site of Passive Tuberculin Skin Reaction, 7 and 24 Hours after Intravenous Injection with Tritiated-thymidine Labelled Cells of Tuberculin Sensitive Donors to DNCB-sensitized Recipient Guinea Pigs

Time after cell transfer	Antigen used for intradermal injection	Changes at the site of skin reaction			
		Radioactivity CPM/40 mg skin	Autoradiographic examination		Gross findings
			Labelled cells per total cells	Percentage of labelling	
7 hours	None	60	3/1,018	0.3%	—
	DNCB	70	6/1,001	0.6%	—
	PPD	1,630	28/1,018	2.8%	—
24 hours	None	70	1/1,019	0.1%	—
	DNCB	120	11/1,032	1.1%	+(Redness)
	PPD	260	14/1,003	1.4%	+(Redness+induration)

Note. DNCB : Dinitrochlorobenzene; PPD : Purified protein derivative (Tuberculin)

2. 化学的 mediator

次に研究の舞台は試験管内に移った。上述の細胞性 mediator が抗原との特異的結合の結果として化学的 mediator を合成, 細胞外に放出する *in vitro* の第2段階である。

In vitro の遅延型アレルギー反応としてはじめ感作モルモットの脾小片を培養して抗原を加え遊走細胞に与える影響をみた。その結果, 遅延型感作のみを受けた動物においてマクロファージだけが遊走阻止を受けることを認めたが, やがて毛細管法に切り替え *in vitro* の遅延型反応を検出する技術の確立がまず行われた。

ついで MIF が *in vivo* では正常動物に皮膚反応を惹起する因子 (SRF) として作用することを認め, ツベルクリン感作動物の肉芽腫脾細胞に抗原 PPD を加えて培養する系から SRF を有効に分離する方法を考案し, SRF がツベルクリン反応の化学的 mediator であるという仮説にたつて SRF 活性の本態を研究対象とした。現在まだ SRF は部分的に精製されているのみであるが, MIF から化学的に分離することはできていないので, MIF 活性は依然として SRF のよい *in vitro* の指標となつている。

われわれが分離している SRF はその dose response curve から活性の高い分画であるとみられ, 通常蛋白量 2 μ g の SRF によつて正常モルモットに径 10 mm 以上の肉眼的, 組織学的にツベルクリン反応と類似の著明な皮膚反応を起こすことができる。さらにモルモットから得た SRF がウサギやラットなど他種の正常動物の皮膚にも全く類似の皮膚反応を起こしうることが確認され (表3), SRF なる化学的 mediator が動物種の壁を乗り越えて作用しうることが立証された。

これらの実験結果は肉芽腫脾細胞中に含まれる感作リンパ球がツベルクリン蛋白と特異的に作用した結果合成

Table 3. Skin Reactions Induced by Guinea Pig SRF^a

Normal recipients	No. of animals	Skin reaction by SRF at 6 hr. ^b	Skin reaction by control at 6 hr. ^b
Guinea pigs	10	17.5 \pm 1.4 mm	5.7 \pm 2.0 mm
Rabbits	6	15.8 \pm 3.8	4.8 \pm 2.8
Rats	10	12.3 \pm 1.4	1.5 \pm 1.9
Mice ^c	42	0	0

- Mean diameter of erythema reported \pm 1 standard deviation.
- The amount of 40 μ g of SRF and control fraction corresponding to SRF was injected intradermally into each flank of the animals.
- Six mice each from an outbred and six inbred strains.

放出される SRF を反応の化学的 mediator とみなしうる可能性を強めるものであろう。

3. 炎症性マクロファージ

ツベルクリン反応は化学的 mediator の放出によつてはじめて可視性炎症の発現する第3段階に入るわけであるが, 私の研究はその炎症がどのようにして発現するかという点に向けられた。化学的 mediator : SRF が *in vitro* でマクロファージに対し種々の生物学的活性をもつことはツベルクリン反応の炎症細胞構成成分としてマクロファージが最も大きい役割を演じていること, ひいては結核結節がマクロファージによつて構成されることに大きな生物学的意義をもつと考えられる。SRF によつて惹起されるモルモットの皮膚反応をツベルクリン反応の実験モデルとして, 私はツベルクリン反応の最終段階としてマクロファージが骨髄から動員されて炎症反応の発現にあずかることを示そうとした。

近交系モルモットにガンマ線全身照射, または Cyclophosphamide 投与を行つると, 受身ツベルクリン反応または SRF による皮膚反応は抑制, 消失するが, 正常骨

髄細胞の移植を行うと皮膚反応の回復がみられることを認めた。また全身照射モルモットにトリチウムサイミジンで標識した骨髄細胞を移入し、標識細胞がSRF皮膚反応部位の細胞浸潤に参加することをオートラジオグラフィおよび反応部位の放射能活性測定によつて示すことができた。これらの結果はツベルクリン反応の肉眼的表明に骨髄細胞が非特異的に炎症マクロファージを供給することによつて重要な役割を演じていることを示している。

以上細胞性 mediator, 化学的 mediator および炎症マクロファージの連鎖反応の結果, 十数時間の遅延型時間

経過をとつてツベルクリン皮膚反応が発現せしめられる機序の全貌に関与しその解明に少しでも貢献したと思われる私の実験的研究の概略について述べた。

終わりにこの講演の機会を与えられた砂原茂一会長に謝意を表明するとともに、国立予防衛生研究所結核部室橋豊穂部長のご鞭撻ならびに同結核部 BCG 室の諸氏のご協力に深謝する。なお同研究所江頭靖之病理部長、駒井知好放射能研究室長、中野健司実験動物室長ならびに横浜市立大学医学部皮膚科永井隆吉教授の研究上のご援助に厚く感謝する次第である。

今村賞受賞講演

健康人尿中の結核菌発育抑制因子の研究

大 島 駿 作

京都大学結核胸部疾患研究所

受付 昭和 49 年 6 月 12 日

TUBERCULOSTATIC FACTOR IN HUMAN URINE

Shunsaku OSHIMA*

(Received for publication June 12, 1974)

A polypeptide showing tuberculostatic activity was isolated from healthy human urine in a chemically pure form by repeated column chromatography (activated charcoal, Amberlite CG-400, Dowex 50, Dowex 1). The minimal dose for complete inhibition of the growth of virulent tubercle bacilli was 0.04 mcg/ml. Its yield was only 2.3 mg from 1,000 kg of urine (Table 1). It is composed of several kinds of amino-acids and its molecular weight is assumed to be 1,000. It is referred to as the "Urine Peptide".

It inhibited the growth of SM-, PAS-, INH-resistant tubercle bacilli, and slightly inhibited the growth of non-pathogenic Mycobacteria. On the other hand, it did not inhibit the growth of bacteria and fungi except Mycobacteria at the concentrations of less than 250 mcg/ml (Table 2).

The urine of tuberculin-negative children contained the same amount of tuberculostatic substances as urine from adults. It is likely that the tuberculostatic peptide is involved with native resistance of humans to tuberculosis, and have no apparent relationship to acquired resistance.

It is suggested that the urine peptide plays an important role in native resistance of human body to tuberculosis.

結核感染に対する生体の防衛機構に関する研究において、健康動物の体液低分子分画が毒力結核菌の発育を抑制する作用を有することが辻・伊藤の“チェンバー法”により実験的に証明された。この体液低分子分画中の抗菌因子の本体を明らかにすることによって、結核感染に対する生体の自然抵抗力の本態を解明しようとした。

初期の実験においては実験材料として健康動物の血清透析外液、各種臓器透析外液および健康人尿を使用した。これらの実験材料はすべて陽イオン交換樹脂および陰イオン交換樹脂を用いて系統的に分画した。すなわち 1) 両性分画、2) 塩基性分画、3) 酸性分画、4) 中性分

画の4分画に分画した(文献1参照)。H₃₇R_v 菌に対する *in vitro* の抗菌試験の結果、血清透析外液、筋肉、肝、腎、肺、脳の透析外液および健康人尿のすべての材料について両性分画および酸性分画の2分画に著明な抗菌作用を認めた。更にこれらの抗菌因子について追求した結果、酸性分画については低分子の脂肪酸(またはそれらの塩)に比較的弱い抗菌作用があるが、これらが比較的少量に存在するため全体としては抗菌作用が著明であることが判明した。一方両性分画からは高度の抗菌活性を示す主因子が分離された。この主因子は微量物質と思われたのでその本体を究明するため大規模の実験を

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

Table 1. Yield and Activity of Tuberculostatic Fraction

	Yield	Activity
Human Urine	Dry weight mg/l 31,300	M. I. D. (Tubercle bacilli) mcg/ml 20,000
↓ Charcoal column chromatography		
↓ Fraction eluted by 20% acetic acid		
↓ Methanol extraction		
↓ Soluble part	94	4,000
↓ Amberlite CG 400 column chromatography		
↓ Fraction a	13.5	250
↓ Dowex 50 column chromatography		
↓ Fraction aE	0.17	16
↓ Dowex 1 column chromatography		
↓ Fraction aE3	0.0023	<0.1

Table 2. Bacteriostatic Test of Purified Fr. aE against Culture of Microorganisms

	Microorganism	Culture medium	Culture method	M. I. D. mcg/ml
Mycobacterium	H ₃₇ Rv (Hominis)	Kirchner	Slide culture method	0.2
	SM-resist.	"	"	0.2
	PAS-resist.	"	"	0.2
	INH-resist.	"	"	0.2
	RM (Bovis)	"	"	0.2
	BCG	"	"	0.2
	Chokyo (Avium)	"	"	125~250
	M. phlei	"	"	250
	E. coli	Broth	Suspension	Resistant*
	Sal. typhosa	"	"	"
	B. subtilis	"	"	"
	Sh. dysenteriae	"	"	"
	St. albus	"	"	"
	St. aureus	"	"	"
	Sar. lutea	"	"	"
	Cand. albicans	Glucose-Broth	"	"
	Asp. fumigatus	"	"	"
	Noc. asteroides	"	"	"
	Spor. schenckii	"	"	"

* Resistant: The growth of organisms is not inhibited at the concentration of 250 mcg/ml.

行つた。

抗菌因子の分離方法としては、実験材料として容易に多量の材料が得られる健康人尿を用い、分離精製は以下の順序で行つた(文献3)。

- 1) 活性炭カラムクロマト
- 2) 陰イオン交換樹脂 (Amberlite CG 400) によるカラムクロマト
- 3) 陽イオン交換樹脂 (Dowex 50) によるカラムク

ロマト

4) 陰イオン交換樹脂 (Dowex 1) による蟻酸濃度勾配を用いたカラムクロマト

以上のカラムクロマトを逐次行い、各クロマトによつて分離した分画の抗菌活性をテストして活性物質を分離精製した(表1)。その結果著明な抗菌活性を有する塩基性ペプチド (Urine Peptide と呼ぶ) を含む活性分画を得た。この分子量は約 1,000, N:16%, Ninhydrin

反応陽性で6N HClで約2時間水解すると活性を消失する。その人型および牛型結核菌に対する最低発育阻止濃度は0.04 mcg/mlであり、SM耐性菌、PAS耐性菌およびINH耐性菌に対してもin vitroで同様の活性を示した。しかし鳥型結核菌および非病原性ミコバクテリウムに対する発育阻止作用は比較的微弱であり、ミコバクテリウム以外の微生物（細菌および真菌）に対する抗菌作用は250 mcg/mlという高濃度でも全く認められなかつた(表2)。またマウスに対する毒性は認められていない。

本抗菌因子はツベルクリン反応陽性者の尿においても陰性者の尿においても同様に認められることにより結核に対する獲得性抵抗力とは無関係と考えられる(文献2参照)。

以上の実験成績より本物質は健康人尿中の結核菌発育抑制因子のうちの主因子と考えられ、結核感染に対して先天的に生体が具備している抗菌性物質であることが明らかとなつた。したがつて本因子を精製し、その化学構造を決定することは、結核のPathogenesisに関しても、また臨床応用の面からも資するところがあろうと考える。

文 献

- 1) Oshima, S. et al.: Am. Rev. Tuberc., 78: 884, 1958.
- 2) Oshima, S. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 91: 832, 1965.
- 3) 大島駿作他: 京大胸部研紀要, 4: 54, 1971.