

原 著

BCG 生菌, cyclophosphamide, 放射線照射の細網内皮系  
および免疫反応に及ぼす影響 (その 1)

原 田 進

九州大学医学部付属胸部疾患研究施設

受付 昭和 52 年 4 月 18 日

THE EFFECTS OF BCG, CYCLOPHOSPHAMIDE AND X-RADIATION ON  
RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM AND IMMUNE RESPONSIVENESS  
IN MICE (PART 1)

Susumu HARADA\*

(Received for publication April 18, 1977)

The effects of BCG and X-radiation of sublethal dose on reticuloendothelial system (RES) were studied in mice. An attempt was also made to evaluate the action of BCG on the recovery of immune responsiveness in irradiated mice.

1) Carbon clearance test and measurement of spread macrophage in peritoneal cells were used to assay the function of RES. The result of carbon clearance was in good accordance with the one of macrophage spreading test.

2) Either intracutaneous or intravenous route of BCG administration increased the activity of RES. The functional levels of RES reached a maximum 3 to 5 weeks after BCG inoculation. When BCG was given intravenously, the highly increased level of phagocytic activity was obtained even one week after BCG injection.

3) Whereas X-radiation of sublethal dose caused a marked reduction of the number of peritoneal cells, the decrease of RES activity was not found. Although X-radiation suppressed markedly the immune response to sheep red blood cells (SRBC), delayed type reactivity recovered quickly to a normal level. The production of plaque forming cells (PFC) in spleen also recovered within 2 weeks after X-radiation and thereafter increased rather, while PFC in the draining lymph node reduced markedly and its recovery was protracted. BCG inoculation in X-radiated mice could not increase the number of peritoneal cells while it increased the activity of RES and the immune responsiveness to SRBC.

4) BCG inoculation made mice extremely susceptible to pseudomonas infection either 2 to 3 weeks after i.v. inoculation or 5 weeks after i.c. inoculation. But a marked resistance than normal controls was found 10 weeks after the i.c. inoculation of BCG. On the other hand, X-radiation caused a serious damage to protective activity against pseudomonas infection and no increase of resistance throughout experimental period.

\* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashiku, Fukuoka 812 Japan.

## 緒 言

細網内皮系 (reticuloendothelial system 以下 RES と略) は、生体の防御機構において、極めて重要な役割を果たすことが知られている。RES に含まれる主たる細胞は、肝臓、脾臓、肺等の組織に存在する組織内 RES 細胞と monocyte 等の血中を自由に遊走し、炎症の際に浸潤するマクロファージの2つに分類<sup>1)</sup>されている。RES は、内因性あるいは外来性の異物が生体内に生じたとき貪食し、消化、あるいは殺菌し排除するとともに、マクロファージは生体内に生じた異物 (= 抗原) を処理し、情報をリンパ球に与え、免疫反応の発現に重要な役割を果たす<sup>2)</sup>とされている。更に Mackness<sup>3,4)</sup>は、結核菌、リステリア菌などの通性細胞内寄生菌の感染免疫において、その獲得抵抗性に細胞性免疫が主役を果たし、その機構は、細菌由来抗原に対する感作Tリンパ球が、抗原と接触したとき、macrophage migration inhibition factor<sup>5,6)</sup> や macrophage arming factor<sup>7)</sup> などの lymphokine<sup>8)</sup> が産生され、それにより活性化されたマクロファージは、その抗原を持つ細菌のみならず、非特異的に他の微生物<sup>4,9)</sup> に対しても攻撃しうると報告している。

一方、細胞性免疫が主役を果たすと考えられる抗腫瘍免疫では、Tリンパ球由来の killer cell が effector cell であると<sup>10,11)</sup> 一般に認められている。しかし、マクロファージの抗腫瘍作用も、しばしば報告されているゆえ<sup>12-14)</sup>、充分考慮に入れるべきものと思われる。BCG 生菌は、結核症に対してほとんど無害なワクチンとして使用されてきた歴史を持ち、近年、その免疫強化作用、RES 活性化作用の検討が進むにつれて、抗腫瘍免疫に対するBCG生菌の応用が、臨床的<sup>15,16)</sup>にも、実験的<sup>17,18)</sup>にも行なわれ、その効果が報告されている。教室の原田<sup>19)</sup>は、主に細胞性免疫を中心として、BCG 生菌の免疫強化作用を報告している。本稿では、BCG については、その RES の活性化作用に重点を置いて検討した。

更に悪性腫瘍の非観血的療法として、一般に、制癌剤や放射線療法や、これらと免疫療法との併用が行なわれるが、副作用として、生体の免疫能や感染防御能を低下させ、近年特にグラム陰性桿菌感染症<sup>20,21)</sup>による死亡が多く報告されている。そこで、放射線照射が RES や免疫能に対してどのような影響を与えるか、また放射線照射による障害の回復を BCG が促進しうるかについて検討した。あわせて、グラム陰性桿菌の1つである緑膿菌の静注感染実験を行ない、BCG 接種、放射線照射の感染防御能に対する影響についても検討した。

## 材料と方法

動物：九大純系動物飼育施設より供給された、生後8

～12週齢の CF<sub>1</sub> 成熟雌マウスを使用した。

BCG 生菌：日本ビーシージー製造株式会社の凍結乾燥標品を生理食塩水に懸濁し、マウス1匹に1mgを右足蹠皮内接種または経尾静脈接種した。

緑膿菌：東大医科研本間遜教授より供与された NC 5 株を、1夜、普通寒天斜面培地 (栄研) に培養したものを生理食塩水に懸濁した。この菌液を分光光度計 (181 日立 UV-VIS 分光光度計) により、波長 660 m $\mu$  にて吸光度を測定し、菌数を調整した後、経尾静脈感染を行なった。感染菌数は、普通寒天平板培地にて1夜培養し、集落計算を行なった。

放射線照射：島津製作所の「信愛号」にて 400 rad の X 線 (200 kVp, 25 mA, フィルター 0.3 mm Cu+1.0 mm Al, 距離 100 cm 22.9 rad/分, 17分27秒, H. V. L. 0.92 mm Cu) を1回全身照射した。

腹腔マクロファージの spreading：腹腔マクロファージの採取は、非特異的な刺激によるマクロファージの活性化を避けるため、諸家のよく行なうパラフィンオイルやカゼインなどの腹腔内注入による腹腔マクロファージの誘導は行なわなかつた。マウスを頸椎脱臼屠殺後へパリン 5U/ml, 56°C 30 分加熱処理後のウシ胎仔血清 (GIBCO 社製) 5% を含む Hanks 液 2.5 ml を腹腔内に注入した。腹腔をマッサージ後シリコン加工スピッツに 2 ml 採取し、一部は血球計算盤にて細胞数の計測を行ない、また塗抹標本を作り、May-Giemsa 染色を行なった。この採取法により、正常マウス1匹当たり腹腔細胞数は 6~9 $\times 10^6$  であり、その 60~70% はマクロファージであつた。一部は 0.1~0.2 ml を同 Hanks 液 5 ml を入れた鏡面仕上げガラスシャーレに入れ、30 分間 37°C の恒温室に静置後、ニコン倒立位相差顕微鏡 (日本光学工業製) にて、200~300 の細胞を観察した。spread していないマクロファージは、ハローがみえる球形のものであり、リンパ球とは、その大きさによつて区別した。また spread マクロファージの判定は、Fauve<sup>ら</sup><sup>22)</sup> の方法に準じ、1) ガラス面に附着し、2) 細胞質が明瞭に見え、かつ、細胞が 2~3 倍と大きくなり、その辺縁は不規則であること、3) 細胞内に多数の顆粒が認められること、の 3 つの基準を設け、これらの 3 つの基準を満たしたものを spread cell とした。

カーボン・クリアランス：マウスは各群 5 匹とし、実験ごとに正常マウス 5 匹を対照とした。方法は Halpern<sup>ら</sup><sup>23)</sup> の方法によつた。簡略に述べると、ペリカンインク c11/1431a を生理食塩水にて 16 mg/ml に調整し、マウス体重当り、0.01 ml/g を尾静脈より注入した。その後、経時的に後眼窩静脈叢より血液 0.025 ml を採取し、0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 液 3.5 ml に注入混合した後、分光光度計により、おのおののカーボン濃度を波長 600 m $\mu$  にて吸光度として測定した。吸光度の対数を縦軸に経過時間

を横軸にとり、血中からのカーボンの消失直線を描いた。この消失直線の傾き K (clearance index) は RES の食能を示している。

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_1 - t_2}$$

C<sub>1</sub>: t<sub>1</sub> 時の血中カーボン濃度

C<sub>2</sub>: t<sub>2</sub> 時の血中カーボン濃度

同時に、肝臓、肝臓の重量を測定した。

免疫反応の測定: ヒツジ赤血球 (以下 SRBC と略) を右足趾,あるいは経尾静脈内感作し, 4日後, 遅延型反応 (以下 DTH と略) は, 原田<sup>19)</sup>の方法に従い足趾反応 (以下 FPT と略) により測定し, 血中抗体価は, ヒツジ赤血球凝集反応により測定した。また脾臓, 膝窩リンパ節 (SRBC 感作局所リンパ節) の抗体産生細胞は, Jerne のブランク法を一部修飾<sup>24)</sup>してブランク形成

細胞 (以下 PFC と略) を測定した。表に示す PFC 数は, background PFC 数を引かなかつた。

有意差の検定: 各実験によつて得られた差の検定は, Student の t-test により行なつた。

実験結果

1. BCG 生菌接種の RES に及ぼす影響

a) 腹腔マクロファージの spreading

BCG 生菌 1mg の足趾皮内接種群, 経尾静脈内接種群および BCG 未処置の対照群, 各群5匹について, BCG 接種後, 経時的に腹腔細胞数および spread macrophage (以下活性化細胞とする) 数を測定した。その結果, 表1に示すごとく, 皮内接種群では, 腹腔細胞数は5週後より増加し, 10週後まで続いた。活性化細胞数は3週後に対照群の約5倍とピークを示し, 以後漸減した。ま

表 1 BCG 生菌接種の腹腔細胞数および活性化マクロファージ数に対する影響

BCG 接種後の時間 (週)	BCG 右足趾皮内接種群			BCG 経尾静脈内注射群		
	腹腔細胞数 ×10 <sup>6</sup> /マウス	活性化マクロファージ		腹腔細胞数 ×10 <sup>6</sup> /マウス	活性化マクロファージ	
		%	細胞数 ×10 <sup>5</sup> /マウス		%	細胞数 ×10 <sup>5</sup> /マウス
1	8.45 ± 1.85	5.41 ± 3.82	6.52 ± 1.77	7.15 ± 2.03	5.50 ± 2.40	4.36 ± 3.13
2	8.76 ± 3.30	6.20 ± 2.50	5.20 ± 2.86	6.76 ± 1.94	16.90 ± 5.90 <i>p</i> < 0.001	12.20 ± 6.40 <i>p</i> < 0.001
3	8.82 ± 2.73	24.10 ± 4.80 <i>p</i> < 0.001	21.68 ± 9.02 <i>p</i> < 0.001	11.40 ± 2.30 <i>p</i> < 0.001	36.30 ± 7.40 <i>p</i> < 0.001	42.60 ± 7.80 <i>p</i> < 0.001
5	11.56 ± 2.55 <i>p</i> < 0.001	15.81 ± 7.64 <i>p</i> < 0.001	17.85 ± 8.07 <i>p</i> < 0.001	9.78 ± 1.37 <i>p</i> < 0.01	12.58 ± 5.58 <i>p</i> < 0.001	12.35 ± 5.82 <i>p</i> < 0.001
10	12.86 ± 2.96 <i>p</i> < 0.001	9.00 ± 1.85 <i>p</i> < 0.001	11.04 ± 4.31 <i>p</i> < 0.001	11.60 ± 2.30 <i>p</i> < 0.001	15.08 ± 4.19 <i>p</i> < 0.001	17.40 ± 5.30 <i>p</i> < 0.001
対 照 群	7.92 ± 1.05	5.10 ± 0.77	4.04 ± 0.60			

細胞数は各群5匹の平均値 ± 標準偏差を示す。  
t-test は対照群との間に行なつた。

表 2 BCG 生菌接種による肝臓, 脾臓の経時的重量変化およびカーボン・クリアランスに対する影響

BCG 接種後の時間 (週)	BCG 右足趾皮内接種群			BCG 経尾静脈内注射群			
	臓器重量 (g)		カーボン・クリアランス K/Kc	臓器重量 (g)			カーボン・クリアランス K/Kc
	肝	臓		脾	臓	臓	
1	1.14 ± 0.09	0.10 ± 0.03	1.40 ± 0.25	0.99 ± 0.10	0.10 ± 0.02	5.11 ± 2.16 <i>p</i> < 0.01*	
2	1.28 ± 0.10	0.08 ± 0.02	1.53 ± 0.69	1.65 ± 0.56	0.22 ± 0.14 <i>p</i> < 0.001	4.80 ± 2.60 <i>p</i> < 0.05*	
3	1.25 ± 0.28	0.10 ± 0.03	1.21 ± 0.48	2.54 ± 0.46 <i>p</i> < 0.001	0.44 ± 0.14 <i>p</i> < 0.001	5.77 ± 0.72 <i>p</i> < 0.001*	
5	1.08 ± 0.05	0.12 ± 0.04	2.96 ± 1.73	1.93 ± 0.21 <i>p</i> < 0.001	0.36 ± 0.10 <i>p</i> < 0.001	4.34 ± 1.65	
10	1.28 ± 0.12	0.12 ± 0.02	1.75 ± 0.21	1.66 ± 0.19 <i>p</i> < 0.01	0.19 ± 0.06 <i>p</i> < 0.01	3.42 ± 1.39 <i>p</i> < 0.05*	
対 照 群	1.16 ± 0.34	0.10 ± 0.02					

臓器重量は各群5匹の平均値 ± 標準偏差を示す。

K/Kc =  $\frac{\text{clearance index (K) of experimental group (5 mice)}}{\text{clearance index (Kc) of contemporaneous control group (5 mice)}}$  を示す。

t-test により *p* は対照群との有意差を *p*\* は BCG 皮内接種群と静注群との有意差を示す。

表3 放射線照射マウスにおける BCG 生菌接種の腹腔細胞数および活性化マクロファージ数に対する影響

放射線照射後の時間 (日)	放射線照射単独群			放射線照射後 BCG 右足蹠皮内接種群		
	腹腔細胞数 ×10 <sup>6</sup> /マウス	活性化マクロファージ		腹腔細胞数 ×10 <sup>6</sup> /マウス	活性化マクロファージ	
		%	細胞数 ×10 <sup>5</sup> /マウス		%	細胞数 ×10 <sup>5</sup> /マウス
3	3.10±1.43 <i>p</i> <0.001	8.25±1.34 <i>p</i> <0.001	2.55±1.24	3.79±1.46 <i>p</i> <0.001	5.65±3.21	2.02±0.75
7	3.38±0.63 <i>p</i> <0.001	8.57±4.97 <i>p</i> <0.01	2.00±0.34	3.27±0.91 <i>p</i> <0.001	12.51±5.38 <i>p</i> <0.001	3.64±0.70 <i>p</i> <0.001*
14	3.10±0.94 <i>p</i> <0.001	5.21±1.60 <i>p</i> <0.05	1.71±0.83	3.81±1.96 <i>p</i> <0.001	9.44±2.51 <i>p</i> <0.001	3.20±0.88 <i>p</i> <0.05*
21	3.78±0.77 <i>p</i> <0.001	5.10±2.54 <i>p</i> <0.01	1.75±0.59	4.06±1.71 <i>p</i> <0.001	9.17±4.18 <i>p</i> <0.001	3.27±1.16 <i>p</i> <0.05*
28	5.02±1.31 <i>p</i> <0.001	4.78±2.88	2.35±1.40	6.60±1.43 <i>p</i> <0.01	8.94±3.92 <i>p</i> <0.001	5.59±2.37 <i>p</i> <0.05*
42	7.27±1.85 <i>p</i> <0.05	3.13±1.38	2.67±1.00	7.26±2.16	6.11±0.61 <i>p</i> <0.001	4.47±1.52
対 照 群	9.42±1.64	3.06±1.28	2.83±1.12			

細胞数は各群5匹の平均値±標準偏差を示す。

各群の有意差は *t*-test で行ない、*p* は対照群との有意差を *p*\* は放射線照射単独群と BCG 併用群との有意差を示す。

表4 放射線照射マウスにおける BCG 生菌接種による肝臓、脾臓の経時的重量変化およびカーボン・クリアランスへの影響

放射線照射後の時間 (週)	放射線照射単独群			放射線照射後 BCG 右足蹠皮内接種群		
	臓器重量 (g)		カーボン・クリアランス K/Kc	臓器重量 (g)		カーボン・クリアランス K/Kc
	肝	脾		肝	脾	
1	1.01±0.11	0.04±0.01 <i>p</i> <0.001	1.40±0.25	1.31±0.06	0.06±0.01 <i>p</i> <0.001	1.09±0.20
2	1.20±0.10	0.12±0.03	2.28±0.71	1.12±0.03	0.11±0.03	3.78±2.18
4	1.49±0.31	0.12±0.01	1.31±0.22	1.28±0.10	0.13±0.01	1.91±0.59
6	1.22±0.12	0.09±0.01	1.52±0.56	1.45±0.24	0.13±0.04	2.27±0.90
対 照 群	1.22±0.12	0.11±0.01				

臓器重量は各群5匹の平均値±標準偏差を示す。

$$K/Kc = \frac{\text{clearance index (K) of experimental group (5 mice)}}{\text{clearance index (Kc) of contemporaneous control group (5 mice)}}$$
を示す。

*t*-test は対照群との間に行なつた。

た静脈内接種群では、腹腔細胞数、活性化細胞数ともに皮内接種群に比べ、更に早期より増加がみられ、活性化細胞数は3週後にピークに達した後漸減したが、10週後においても皮内接種群は対照群の約3倍、静脈内接種群では約4倍と、活性化はなお持続していた。

#### b) カーボン・クリアランスへの影響

前記 a) の実験と同様に3群に分け、各群5匹について、肝臓、脾臓の重量およびカーボン・クリアランスを測定した。カーボン・クリアランスの変化は、各週ごとに行なつた対照群の clearance index の平均値 Kc との比 K/Kc により検討した。表2のごとく皮内接種群では、肝臓、脾臓の重量変化はほとんど起こらないが、カーボン・クリアランスは1週後より軽度の亢進が認められ、5週後には対照群の約3倍とピークに達し、以後漸減した。

一方、静脈内接種群では肝臓、脾臓の重量は2週後より増加し、3週後をピークとし、以後漸減した。カーボン・クリアランスは1週後、すでに約5倍と亢進し、臓器重量増加のピークと一致して、3週後にピークとなり、以後漸減した。

#### 2. X線照射およびX線照射と BCG 皮内接種併用の RES および免疫反応に及ぼす影響

##### a) 腹腔マクロファージの spreading

CF<sub>1</sub> 10~12 週齢の成熟雌マウス (体重 25g) に対し、通常の臨床的照射量を考慮して、X線照射量は sublethal dose である 400 rad を選び、1回全身照射を行なつた。また BCG 接種経路も臨床的応用を考慮して、X線照射1日後に BCG 1mg を足蹠皮内接種した。マウスは各群

5匹で、対照群は正常マウス15匹である。

X線照射群、および BCG 皮内接種併用群について、経時的に腹腔細胞数および活性化細胞数を測定した。その結果、表3に示すごとく、両群ともに腹腔細胞数は照射後3日より21日まで正常マウスの33~40%に減少し、28日後より漸増し、42日後には約80%まで回復した。X線照射単独群において、活性化細胞の腹腔細胞総数に対する割合は、照射直後の方が高率であるが、活性化細胞の絶対数は、14日後に最も減少し、以後漸増して42日後で、ほぼ対照群と同程度まで回復した。一方、X線照射1日後に BCG 皮内接種をした群においては、更に活性化細胞の腹腔細胞総数に対する割合は高くなり、7日後をピークとして以後漸減したが、42日後においても対照群に比べて約2倍であった。また活性化細胞数もX線照射単独群より約1.5~2倍多く、28日後をピークとして増加することが認められた。以上の結果から、腹腔細胞の活性化は強くかつ長期間持続していることが認められた。

#### b) カーボン・クリアランスへの影響

上記 a) の実験と同様に処置し、経時的に両群の肝臓、および脾臓の重量の変化とカーボン・クリアランスの変化を測定した。マウスは各群5匹とし、実験ごとに正常マウス5匹を対照群とした。表4のごとく、臓器重量の変化を観察すると、両群ともに肝臓は正常マウスとほとんど変わらず脾臓は照射1週後、対照群の約1/2~1/3に減少したが、2週以後は正常マウスとほとんど同じであった。カーボン・クリアランスは、X線照射単独群において、照射1週後すでに対照群に比し、約1.4倍の亢進を示し、2週後に約2.3倍のピークとなり、以後減少したが、6週後においても、なお対照群の約1.5倍と軽度の亢進を持続していた。一方、BCG 皮内接種併用群は、X線照射単独群より一層亢進を示し、2週後をピークとして、X線照射単独群と同様の経過を示した。以上の2つの実験から、X線照射により、RES の機能は2週後をピークとして亢進を示し、BCG 皮内接種はX線照射による腹腔細胞数の減少の回復を促進することはなかつたが、X線照射によつて起こつた RES の機能亢進を更に増幅するとともに、BCG 単独皮内接種において観察された(表2)接種後5週における RES の強い亢進も認められた。

### 3. X線照射およびX線照射・BCG 併用の免疫反応に及ぼす影響

X線 400 rad 照射群と照射1日後 BCG 1mg を足趾皮内接種した群2群に対し、上記実験と同様に経時的に SRBC  $10^7$  を右足趾 (BCG 接種局所) に皮内感作し、その4日後、5匹は FPT を、他の5匹は右膝窩リンパ節 (SRBC 感作局所リンパ節) と脾臓の細胞数および PFC を測定した。対照群は無処置マウスとし、プラー

表5 放射線照射マウスにおける BCG 接種の SRBC に対する遅延型反応(足趾反応)への影響

放射線照射とSRBC感作との間隔(週)	足 趾 反 応 (0.1 mm)	
	放射線照射単独群	放射線照射後 BCG 右足趾皮内接種群
1	1.2±0.2 $p < 0.001$	3.1±1.8
2	5.9±0.9	7.6±4.1
4	4.0±1.1	11.4±4.3 $p < 0.05$ $p < 0.02^*$
6	7.6±2.1	11.4±1.3 $p < 0.001$ $p < 0.02^*$
対 照 群	5.4±1.5	

足趾反応は各群5匹の平均値±標準偏差を示す。

各群の有意差は *t*-test で行ない、*p* は対照群との有意差を *p*\* は放射線照射単独群と BCG 併用群との有意差を示す。

ク法は各実験ごとに対照群5匹を置き、PFC の経時的変化は対照群の PFC との比で観察した。

DTH に対する影響は、表5に示すごとく、両群ともに照射7日後は対照群に比べ減弱したが、2週後にはすでに対照群と同程度に回復した。また BCG 皮内接種併用群では、4週以後 DTH の著しい増強効果が認められた。

膝窩リンパ節と脾臓の細胞数および PFC に対する影響は、表6のごとくX線照射単独群において、膝窩リンパ節細胞数の著明な減少が認められ、4週後において対照群の約30%、6週後においても約50%の回復しか示さなかつた。膝窩リンパ節の PFC は更に回復が遅く、6週後に対照群のわずかに23%であつた。脾臓における細胞数の変化では、2週後で50%の低下を示し、4週以後回復の傾向を示した。一方、PFC は1週後減弱を示したにもかかわらず、2週後は約4倍となり、以後6週まで PFC 産生の増強が認められた。一方、BCG 皮内接種併用群においては、膝窩リンパ節細胞数は、1週後対照群の約16%に減少していたが、2週以後細胞数は増加し、6週後には対照群の約2倍、X線照射群の約4倍に達した。しかし膝窩リンパ節の PFC の増加は、全くX線照射単独群と同じで、BCG の影響は認められず、6週後においても対照群の14%であつた。脾臓の PFC に対する影響は、X線照射単独群と同様の傾向を示し、2週後から6週後に至るまで、PFC の増加が認められ、特に6週後には、対照群の36.5倍と著しい増加が認められた。

以上の結果より、X線照射マウスにおいても、BCG 皮内接種を行なうことにより、4週以後 RES および免疫反応が増強することが認められた。

### 4. BCG およびX線照射のマウスの緑膿菌感染防御に及ぼす影響

表 6 放射線照射マウスにおける BCG 接種の SRBC に対する抗体産生への影響

放射線照射 とSRBC感 作との間隔 (週)	放射線照射単独群				放射線照射後 BCG 右足趾皮内接種群			
	膝窩リンパ節		脾臓		膝窩リンパ節		脾臓	
	細胞数 ×10 <sup>6</sup>	対照群に PFC 対す PFC 比 る群の 率	細胞数 ×10 <sup>8</sup>	対照群に PFC 対す PFC 比 る群の 率	細胞数 ×10 <sup>6</sup>	対照群に PFC 対す PFC 比 る群の 率	細胞数 ×10 <sup>8</sup>	対照群に PFC 対す PFC 比 る群の 率
1	1.57±0.55 <i>p</i> <0.001	0.031	n. d	0.55	1.96±1.26 <i>p</i> <0.001	0.052	1.39±0.69	0.48
2	1.60±0.38 <i>p</i> <0.001	0	1.00±0.46	3.89	6.18±3.28 <i>p</i> <0.01 <i>p</i> <0.05**	0.058	1.24±0.33	3.67
4	3.44±1.39 <i>p</i> <0.001	0.098	1.88±0.27	1.00	20.76±8.60 <i>p</i> <0.02 <i>p</i> <0.01**	0.090	2.28±0.95	1.80
6	5.96±2.60 <i>p</i> <0.02	0.230	1.09±0.37	3.30	25.00±9.70 <i>p</i> <0.01 <i>p</i> <0.001**	0.140	1.97±0.36 <i>p</i> <0.01	36.50
対 照 群	12.42±4.80	254*	2.18±0.84	67.5*				

膝窩リンパ節, 脾臓の細胞数は各群5匹のマウスの平均値±標準偏差を示す。

対照群 PFC の実験群 PFC に対する比率は,  $\frac{\text{total PFC number of experimental group}}{\text{total PFC number of contemporaneous control group}}$  とした。

各群の有意差は *t*-test で行ない, *p* は対照群との有意差を *p*\*\* は放射線照射単独群と BCG 作用群との有意差を示す。

254\* 67.5\* はそれぞれ正常マウス20匹の膝窩リンパ節脾臓の平均 PFC 数を示す。

表 7 BCG 静注および足趾皮内接種後, 経時的に緑膿菌感染を行なったときのマウスの死亡率

i) BCG 静注接 種後の時間 (週)	緑膿菌感染後の日数						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1/10*	4/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10
2	8/10	10/10					
3	8/10	10/10					
5	4/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11
対 照 群	1/10	6/10	6/10	6/10	7/10	7/10	7/10
緑膿菌感染菌数 1.87×10 <sup>7</sup>							
ii) BCG 足趾接 種後の時間 (週)	緑膿菌感染後の日数						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1/10	3/10	4/10	4/10	4/10	4/10	4/10
3	2/10	5/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10
5	2/10	6/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10
対 照 群	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10
緑膿菌感染菌数 7.30×10 <sup>8</sup>							
iii) BCG 足趾接 種後の時間 (週)	緑膿菌感染後の日数						
	1	2	3	4	5	6	7
5	2/11	5/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11
10	0/11	1/11	1/11	1/11	1/11	1/11	1/11
対 照 群	2/10	3/10	4/10	4/10	4/10	4/10	4/10
緑膿菌感染菌数 1.00×10 <sup>7</sup>							

緑膿菌 NC5 株を静注感染し \* は10匹中1匹のマウス死亡数を示す。

表8 放射線照射後、経時的に緑膿菌感染を行なったときのマウスの死亡率

放射線照射後 の時間 (日)	緑膿菌感染後の日数								
	5時間	17時間	1	2	3	4	5	6	7
6	0/10*	8/10	10/10						
16	1/10	7/10	8/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10
23	1/10	4/10	5/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10
30	1/10	3/10	4/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10
対 照 群	0/10	3/10	5/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10

緑膿菌 NC5 株  $6 \times 10^6$  を静注感染した。

\* は 10 匹中のマウスの死亡匹数を示す。

a) i) BCG 1mg を 1~5 週前に経尾静脈内接種し、緑膿菌 NC 5 株  $1.87 \times 10^7$  の静注感染を行ない、その後 7 日間死亡率を観察した。表 7 の i) に示すごとく、BCG を 2 週および 3 週前に静注されたマウスは、著しく死亡率が高まった。死亡するマウスは、静注感染後、数時間で動かなくなり、毛が逆立ち、振戦し、2 日以内にほとんどが死亡した。死亡したマウスの臓器には病変が認められず、肝臓、脾臓の重量減少が認められた。

ii) 次に BCG 1mg を足趾皮下接種し、その後、1 週、3 週、5 週に NC 5 株  $1.73 \times 10^6$  を静注感染すると、表 7 ii) に示すごとく、5 週後に高い死亡率を示し、また表 7 iii) に示すごとく、BCG 1mg 皮下接種後 5 週と 10 週に NC 5 株  $1.0 \times 10^7$  を静注感染し比較すると、10 週後には死亡率は低下した。

b) X線 400 rad 1 回全身照射を表 8 に示すごとく、6 日、16 日、23 日、30 日前に前処置し、NC 5 株  $6 \times 10^6$  を静注感染させた。対照群は無処置正常マウスである。その結果、X線照射により死亡率は高まり、照射後、日数が経過するに従って抵抗力は回復し、30 日後において死亡率は対照群と同じになった。

## 考 察

### I. BCG, X線照射の RES に及ぼす影響

RES の活性を計測する方法として、次の 2 つの方法を用いた。1 つは腹腔細胞が、ガラス面に吸着し、胞体が拡がって、大型化した spread macrophage の数を計測する形態観察法である。この spread macrophage はミトコンドリアやリソゾームが増加し<sup>25)</sup>、また殺菌作用に関与すると考えられる hexose monophosphate shunt<sup>6)</sup> が高まつていて、貪食能、運動能、殺菌能においても、活性化されたマクロファージと報告されている。この方法は、free macrophage の活性を観察する方法である。他の 1 つは、RES の貪食能を検討する方法で、一般によく用いられる Halpern のカーボン・クリアランスを行なった。静注されたカーボンの 90% は、肝臓、脾臓の RES 細胞によって貪食され、肝臓、脾臓の重量が、カーボンの血中消失速度 (clearance index) に大きな影響を持つ

ことを Benacerraf<sup>26)</sup> は報告している。この方法は、臓器に固定した fixed macrophage の機能を観察したものである。この 2 方法を用いて RES の活性化を検討した。この 2 つの方法によつて得られた結果は、比較的よく一致し、RES の活性化を測定するよい方法と考えられた。

### 1. RES に対する BCG 生菌の影響

BCG 生菌は、接種経路にかかわらず RES を活性化し、そのピークは 3~5 週に起こり、その時期は、BCG に対する DTH であるツベルクリン反応が成立、増強する時期<sup>19)</sup> とほぼ一致している。また North<sup>27)</sup> も BCG のマクロファージ活性化に T cell が必要であると報告していることから、BCG による RES の活性化は、BCG に対する cell mediated immunity の成立の結果によるものが充分考えられた。山田<sup>17)</sup> は methylcholanthrene による腫瘍発生や移植腫瘍の生着、発育が BCG の DTH 増強期に抑制されると報告し、また Hibbs<sup>14)</sup> は BCG によつて活性化されたマクロファージが in vitro において腫瘍細胞の増殖を阻止することを報告している。これらの報告や、BCG 接種による DTH 増強期と RES 亢進期が一致することから、BCG の抗腫瘍作用は、一般に報告されている T cell を活性化するばかりでなく、RES 機能を活性化する作用も関与している可能性は否定できない。また BCG 静注 1 週後より、肝臓、脾臓の重量の増加と平行して、カーボン・クリアランスが著しく亢進し、腹腔マクロファージの活性化と時期的に一致しなかつた。BCG 接種によるカーボン・クリアランスの亢進<sup>28)</sup> は、BCG に対する DTH の成立に無関係な、非特異的な影響によるものと考えられる。このようなカーボン・クリアランスの上昇は、endotoxin<sup>29)</sup> や zymosan<sup>30)</sup> 等の他の菌体由来成分によつても起こされる。

### 2. X線照射の RES に及ぼす影響と X線障害の回復に及ぼす BCG の影響

X線照射により、腹腔細胞数も活性化細胞数も、照射 1~2 週後著しく減少し、以後漸増したが、6 週後においても、なお対照群の約 80~90% の回復しか示さなかつた。一方、活性化細胞数の腹腔細胞数に対する割合が、

対照群に比較して増加したことは、腹腔細胞数中の残存した成熟マクロファージの割合が増加したためと考えられ、X線照射により、RESが活性化されたとは思われなかつた。一方、カーボン・クリアランスに対する影響は、X線照射により障害されることはなく、2週後にかえつてクリアランスの増強が認められた。一般に、骨髄に存在するマクロファージの前駆細胞は、放射線に対して感受性が高いが、血中、組織中に出現した成熟したマクロファージ、特に活性化マクロファージは、抵抗性が強い<sup>31)</sup>と報告されている。またマクロファージの食食能も、放射線照射による障害を受けないと報告<sup>32)33)</sup>され、上記の実験結果とよく一致している。

またX線照射マウスにBCGを皮内接種すると、腹腔細胞数は、常に対照群より少ないが、活性化細胞数は4週をピークとして増加した。またクリアランスの増強もX線照射単独群より強く認められ、6週後まで増強が持続していた。このことから、BCG接種単独でみられた(表1)のような、骨髄より腹腔への細胞の動員は、X線照射による骨髄抑制のために認められなかつたものと思われる。しかしBCGに対するDTHの成立を介して、X線抵抗性のマクロファージの活性化は認められると考えられた。X線照射により、2週後、RESの食食能(カーボン・クリアランス)の増強が認められたことに対する理由は不明であるが、Millerら<sup>34)</sup>は450radのX線照射マウスの血液培養より、照射2週後、正常腸内細菌を65%のマウスに認めており、腸内細菌、またはそのendotoxinの関与する機序も想定される。以上の実験から、BCG生菌接種により、X線照射によつて起こつた骨髄抑制の回復を促進することはなかつたが、RESの活性化を増強する効果は認められた。

## II. X線照射の免疫能に及ぼす影響とX線障害の回復に及ぼすBCGの影響

X線照射1週後、DTHは減弱するが、2週後の比較的早期に回復し、BCG皮内接種によるDTHの増強効果も十分に認められた。X線400radの1回全身照射は、DTHに対する障害は少なかつたが、しかし、増強することも認められなかつた。一方、抗体産生系に対する影響については、表6に示すごとく、X線照射単独群において、膝窩リンパ節細胞の減少にもまして、抗体産生細胞を示すPFCの減少が著しく、6週後においても対照群の23%しか回復は認められなかつた。この傾向は、BCG接種群においても認められ、4週以後膝窩リンパ節細胞数が増加したにもかかわらず、6週後においてもPFCは対照群の14%であつた。すなわちリンパ節の抗体産生細胞(B cell)に対するX線照射の影響は強く、原田が報告<sup>19)</sup>している、BCG接種によつて起こされた、SRBC感作局所リンパ節のPFCの増加も認められな

かつた。この事実と、SRBC足蹠感作では、DTHのeffector cellの生成は主として局所リンパ節であることから考えると、X線照射後、速やかにDTHが回復することも、X線に対して、B cellは感受性が強く、T cellは抵抗性であるという報告<sup>35)</sup>とよく一致した結果であつた。また正常のマウスでは、膝窩リンパ節(抗原感作局所リンパ節)のPFCが脾臓よりも多く観察されるのに対して、X線照射群においては、脾臓のPFCが多く観察され、2週から6週までに正常群の数倍の増加を示した。BCG接種は、この傾向を更に増幅し、6週後には36倍と脾臓のPFCの極端な増加を示した。X線照射による2週後のPFCの増加は、X線照射により破壊された細胞の核酸のアジュバント効果、あるいはB cellのmitogenとして知られるendotoxinなどの影響<sup>36)</sup>も考えられるが、2週以後、長期にわたる脾臓のPFCの増加は、X線により、より強く障害を受けたB cellの過剰な代償性過増生によると考えられる。B cell増殖状態でのBCGは、抗体産生を異常に増強する山田の報告<sup>17)</sup>とも矛盾しない。

## III. BCG, X線照射の緑膿菌感染に対する影響

RESが細菌感染に対して、重要な防御機構であることは、多くの人びとによつて報告されており、RESの機能が亢進した動物は、非特異的に、一般細菌感染に対しても、抵抗力は増強していると報告<sup>37)</sup>されている。また緑膿菌感染の防御免疫においては、緑膿菌の静注大量感染による敗血症に対して、抗体が有効であり、細胞性免疫はほとんど無効である(未報告)。抗体は好中球やマクロファージの食食殺菌を助けるオプソニン効果を示すと報告<sup>38)39)</sup>されている。そこでBCG, X線照射が、マウスの免疫反応やRES機能等の総和として表現される感染防御能に与える影響を検討する目的で、緑膿菌静注感染実験を行なつた。

正常マウスに緑膿菌の大量静注感染を行なうと、24時間以内の早期に死亡する場合と、24時間以後の晩期に死亡する場合とがみられる。早期に死亡する場合は、1)死亡したマウスの臓器に病変が認められず、肝、脾は虚血状態で、重量の減少が認められること、2)BCGを処置したマウスは、endotoxin<sup>40)41)</sup>や大量の緑膿菌死菌を静注することによつても、同じ様相で早期に死亡すること、3)緑膿菌静注感染後、肝、脾の臓器培養を行ない、菌の増減を観察すると、静注後3~6時間に菌は減少を示すが、その時期においてもマウスの死亡が認められること、以上の3つの理由より、早期死の原因は、エンドトキシン・ショックによるものを考えた。一方、晩期死の原因は、臓器培養により静注後10時間以後に、肝、脾での菌の増殖が認められることより、感染死であると思われた。緑膿菌静注感染による死因は、この両者が包括されてい



と思われるが、臨床的にも、重症の緑膿菌感染症の死因として、この両者が認められ、かつ、この両者を区別することは、極めて困難であるので、この両者の死因を含めて緑膿菌感染防御能に対する影響を検討した。

### 1. 緑膿菌感染に及ぼす BCG の影響

BCG 静脈内接種後2～3週、皮内接種後5週の RES の機能亢進の状態が緑膿菌を静注感染させると、マウスは高い死亡率を示した。しかし、一方 BCG 皮内接種後10週の抗体産生増強期にマウスの抵抗力が増強することもみられた。BCG 静注後2～3週、足趾皮内接種3～5週にマウスの死亡率が高まるのは、緑膿菌のもつ endotoxin に対する感受性が増強したためと思われる。データを示していないが、salmonella abortus equi の endotoxin や緑膿菌死菌を、BCG によつて RES の機能が亢進した時期に投与することによつても高い死亡率が認められた。一般に endotoxin は RES で処理されると報告されているが、BCG 死菌<sup>40,41</sup>、zymosan<sup>30</sup> を静注し、RES が亢進した時期に、endotoxin に対する死亡率が高まること、無菌マウス<sup>42</sup>では、この現象が認められないこと、cortison<sup>30</sup> で前処置することによつて、予防ができることより、BCG 接種によりマウスが endotoxin に対して、過敏状態になつているものと思われる。

### 2. 緑膿菌感染に及ぼす X線照射の影響

X線照射後、抵抗力は著しく減弱し、照射後、日数を経るに従い、30日後には正常マウスと同程度まで回復した。X線照射後2週に RES の食食能の増強が認められたが、Nelson ら<sup>43</sup> は放射線照射マウスの腹腔マクロファージは、緑膿菌を食食するが、殺菌することができないことを報告している。また細菌感染に対する抵抗力は、生体の全機能を上げて成立するものと考えられ、骨髄由来細胞の増殖動員を必要とするであろう。したがつて X線照射による感染抵抗力の減弱は、骨髄障害による好中球の減少に主な原因を求めるのが妥当であろう。

## 結 論

CF<sub>1</sub> および C<sub>3</sub>H/He マウスを用いて、BCG 生菌皮内接種および静注接種、400 rad の X線照射の処置を行ない、細網内皮系および免疫能に対する影響を検討した。結果は以下のとおりであつた。

① RES の機能を、腹腔マクロファージの spreading およびカーボン・クリアランスの2つの方法を用いて検討した。この両者は、ほぼ一致する結果を示し、RES の機能の良い指標となると思われる。

② BCG 生菌皮内接種後、RES は3～5週後をピークとする機能亢進を示した。BCG 静注接種の場合も、同様の傾向を示したが、カーボン・クリアランスのみは、1週後すでに著しい増強を示し、その後も亢進状態を続した。

③ X線照射の RES に対する影響をみると、腹腔細胞数は減少し、6週後に正常に回復した。しかし腹腔の活性化マクロファージも、カーボン・クリアランスも比較的正常に保たれ、むしろ照射2週後には、一時的な増強さえ認められた。免疫反応に対する影響をみると、遅延型反応は早期に回復した。抗体産生に関しては、膝窩リンパ節においては PFC の回復は極めて遅く、6週後においても著しい低下を認めた。しかし脾臓においては、2週後から PFC の著しい増加が認められ、6週後まで持続した。更に X線照射後の BCG 接種は、RES の機能も免疫反応も共に増強した。

④ BCG 接種、および X線照射の緑膿菌感染に及ぼす影響を検討した。

BCG 静注接種後2～3週、皮内接種後5週においては、著明な死亡率の増加が認められ、また皮内接種後10週においては、抵抗力の増強が認められた。X線照射は、著しく抵抗力を障害し、照射30日後に正常に回復した。

(稿を終わるにあたり、ご指導とご校閲を賜つた恩師、杉山浩太郎教授、石橋凡雄講師、高本正祇講師に衷心より感謝の意を表します。なお本研究の要旨は、第50回日本感染症学会総会、第51回、第52回日本結核病学会総会において発表しました。)

## 文 献

- 1) Taliaferro, W. H.: Ann. Rev. Microbiol., 3: 159, 1949.
- 2) 森沢成司・石坂重昭: 臨床免疫, 8: 491, 1976.
- 3) Mackaness, G. B. and Blanden, R. V.: Progr. Allergy, 11: 89, 1967.
- 4) Mackaness, G. B.: J. Exp. Med., 129: 973, 1969.
- 5) David, J. R.: Proc. Nat. Acad. Sci., 56: 72, 1966.
- 6) Nathan, C. F., Karnovsky, M. L. and David, J. R.: J. Exp. Med., 133: 1356, 1971.
- 7) Evans, R. and Alexander, P.: Immunology, 23: 615, 1972.
- 8) Parish, W. E., Wardle, G. R. and Cowan, S. I.: Scand. J. Resp. Dis. Suppl., 89: 15, 1974.
- 9) Blanden, R. V., Lefford, M. J. and Mackaness, G. B.: J. Exp. Med., 129: 1079, 1969.
- 10) Hawrylko, E.: J. Natl. Cancer Inst., 55: 413, 1975.
- 11) Plata, F., Gomard, E., Leclerc, J. C. and Levy, J. P.: J. Immunol., 111: 667, 1973.
- 12) Currie, G. A. and Basham, C.: J. Exp. Med., 142: 1600, 1975.
- 13) Old, L. J., Clarke, D. A., Benacerraf, B. and Goldsmith, M.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 88: 264, 1960.
- 14) Hibbs, J. B., Jr.: Science, 180: 868, 1973.
- 15) Mathè, G., Schwarzenberg, L., Amiel, J. L., Schneider, M., Cattani, A. and Schlumberger, J. R.: Cancer Res., 27: 2542, 1967.

- 16) Morton, D. L., Eilber, F. R., Holmes, E. C., Hunt, J. S., Ketcham, A. S., Silverstein, M. J. and Sparks, F. C.: *Ann. Surg.*, 180: 635, 1974.
- 17) 山田穂積: *結核*, 52: 11, 1977.
- 18) Bast, R. C., Jr., Zbar, B., Borsos, T. and Rapp, H. J.: *New Engl. J. Med.*, 290: 1413, 1974.
- 19) 原田泰子: *結核* 52: 515, 1977.
- 20) Fishman, L. S. and Armstrong, D.: *Cancer*, 30: 764, 1972.
- 21) Young, L. S., Meyer, R. D. and Armstrong, D.: *Ann. Int. Med.*, 79: 518, 1973.
- 22) Fauve, R. M. and Dekaris, D.: *Science*, 160: 795, 1968.
- 23) Stuart, A. E.: *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell, Oxford, p.1045, 1967.
- 24) Tanaka, A., Ishibashi, T., Kohashi, O., Koga, T. and Sugiyama, K.: *Japan J. Exp. Med.*, 45: 139, 1975.
- 25) Mackaness, G. B.: *Infectious Agents and Host Reactions*, W. B. Saunders, Philadelphia, p.61, 1970.
- 26) Benacerraf, B., Biozzi, G., Halpern, B. N. and Stifel, C.: *Physiopathology of the RES*, Blackwell, Oxford, p.52, 1957.
- 27) North, R. J.: *Infect. and Immunity*, 10: 66, 1974.
- 28) Biozzi, G., Binacerraf, B., Grubach, F., Halpern, B. N., Levaditi, J. and Rist, N.: *Ann. Inst. Pasteur*, 87: 291, 1955.
- 29) Benacerraf, B. and Sebestyen, M. M.: *Fed. Proc.*, 16: 860, 1957.
- 30) Benacerraf, B., Thorbecke, G. J. and Jacoby, D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100: 796, 1959.
- 31) Volkman, A. and Gowans, J. L.: *Brit. J. Exp. Path.*, 46: 62, 1965.
- 32) Smith, M. R., Fleming, D. O. and Wood, W. B., Jr.: *J. Immunol.*, 90: 914, 1963.
- 33) Di Luzio, N. R.: *Amer. J. Physiol.*, 181: 595, 1955.
- 34) Miller, C. P., Hammond, C. W. and Tompkins, M.: *J. Lab. Clin. Med.*, 38: 331, 1951.
- 35) Kataoka, Y. and Sado, T.: *Immunology*, 29: 121, 1975.
- 36) Andersson, J., Sjöberg, O. and Möller, G.: *Transplant. Rev.*, 11: 131, 1972.
- 37) Howard, J. G., Rowley, D. and Wardlaw, A. C.: *Immunology*, 1: 181, 1958.
- 38) Young, L. S.: *J. Infect. Dis.*, 126: 277, 1972.
- 39) Reynolds, H. Y., Kazmierowski, J. A. and Newball, H. H.: *J. Clin. Invest.*, 56: 376, 1975.
- 40) Howard, J. G., Biozzi, G., Halpern, B. N., Stifel, C. and Mouton, D.: *Brit. J. Exp. Path.*, 40: 281, 1959.
- 41) Suter, E., Ullman, G. E. and Hoffman, R. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 99: 167, 1958.
- 42) Schaedler, R. W. and Dubos, R. J.: *J. Exp. Med.*, 113: 559, 1961.
- 43) Nelson, E. L. and Becker, J. R.: *J. Infect. Dis.*, 104: 13, 1959.