

原 著

ツベルクリンアレルギーに関する実験的研究
 —白血球遊走阻止因子(LIF)とマクロファージ遊走阻止
 因子(MIF)の免疫学的意義について—

松 井 祐 佐 公

京都大学結核胸部疾患研究所内科第2部門

受付 昭和54年1月24日

EXPERIMENTAL STUDIES ON TUBERCULIN HYPERSENSITIVITY

—Immunological Significance of Leucocyte Migration
 Inhibitory Factor (LIF) and Macrophage
 Migration Inhibitory Factor (MIF)—

Yusaku MATSUI* (Director : Shunsaku OSHIMA)

(Received for publication January 30, 1979)

Both the macrophage migration inhibitory factor (MIF) and leucocyte migration inhibitory factor (LIF) in guinea pigs vaccinated (V) or vaccinated-challenged (VC) with heat-killed BCG were studied in relation to delayed type hypersensitivity, and the results were compared with that in normal guinea pigs (N).

Macrophage inhibitory capacity was determined by direct and indirect migration inhibition tests by J. R. David. Leucocyte inhibitory capacity was determined by direct and indirect migration inhibition tests by M. Sjöborg.

1) Three kinds of PPD concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used in the culture media of lymphocytes obtained from sensitized animals (Fig. 2). The migration indices of MIF and LIF were determined at 24 hours (Figs 3 and 4). These conditions were established on the results of preliminary experiments.

2) The results of both the direct macrophage migration inhibition test and the direct leucocyte migration inhibition test showed remarkable migration inhibitory capacity not only in the V-group but also in the VC-group (Table 1, and Fig. 5).

3) MIF and LIF production of peripheral blood lymphocytes were tested by using the indirect migration inhibition test. Both productions were remarkable only in the V-group, and MIF productions were weak in the VC-group. LIF productions in the VC-group were not demonstrable, because migration promoting factors accelerated the migration of target cells in the test involved (Table 2, and Fig. 6).

4) MIF and LIF productions were determined in the spleen cells and the inguinal lymph node cells of the V- and VC-groups, and compared with the V- and VC-groups of blood lymphocytes by using the indirect migration inhibition test. The results showed that remarkable MIF productions were seen in the lymph node cells of the V-group as well as in the peripheral

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

blood lymphocytes. On the contrary, the spleen cells of the V-group did not produce MIF at all, although remarkable MIF productions were seen in the spleen cells of the VC-group. On the other hand, MIF productions of VC-lymphnode cells were as weak as the production of the VC-peripheral blood lymphocytes (Fig. 7). LIF production of spleen cells and inguinal lymphnode cells were remarkable in the V-group as well as in the peripheral blood lymphocytes. However, LIF productions of all those cells in the VC-group were not shown, because the leucocyte migration was accelerated by unknown factors as in the results seen in VC-peripheral blood lymphocytes (Fig. 8).

5) Peripheral blood lymphocytes of the V-group incubated with anti-thymocyte serum reduced the productions of MIF and LIF. In addition, peripheral blood lymphocytes of the VC-group incubated with anti-thymocyte serum lost not only MIF producing capacity but also the producing capacity of migration promoting factors (Figs 9, and 10). These results suggest that MIF and LIF are mainly produced by T-lymphocytes and that the migration promoting factors are also produced by T-lymphocytes.

It was demonstrated that LIF plays an important role in delayed type hypersensitivity as does MIF. However, immunological behaviors of both lymphokines were somewhat different. This difference must be investigated in a future study concerning delayed type hypersensitivity.

1. 緒 言

遅延型アレルギーに関する研究は、従来は主として皮膚反応を示標として行なわれてきた。1922年 Holst¹⁾ は、結核感動物の腹腔内にツベルクリンを注射すると、腹腔滲出細胞が急速に凝集することを見出して報告した。また、Rich and Lewis²⁾ はツベルクリン陽性モルモットの脾臓を *in vitro* で培養し、ツベルクリンの存在下で、脾臓からのマクロファージの遊走が阻止されるという新しい事実について報告している。その後、George and Vaughan³⁾ は、現在“capillary method”として知られている毛細ガラス管を用いたマクロファージ遊走阻止試験法を考案し、これを用いて David ら⁴⁾⁻⁶⁾ が詳細な研究を行なった。その結果、マクロファージ遊走阻止現象は抗原特異的であること、またその反応に関与する細胞がリンパ球であることを明らかにし、本現象が遅延型アレルギーに基づいていることを立証した。更に、Bloom and Bennet⁷⁾ は結核感作モルモットのリンパ球を抗原 PPD とともに培養すると、リンパ球から正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走を阻止する活性物質が産生されることを見出し、この活性物質を Macrophage inhibitory factor (M. I. F.) と命名した。このころより、*in vitro* の実験方法による遅延型アレルギーの研究が広く行なわれるようになり、Bendixen and Sjøborg⁸⁾⁻¹⁰⁾ はヒトの末梢血白血球を用いた白血球遊走阻止現象について研究を行なったが、この現象が真の意味で遅延型アレルギーのパラメーターであるか否かについては多くの議論があつた¹¹⁾¹²⁾。その後、Clausen ら¹³⁾¹⁴⁾ による手技の改良が行なわれ、1974年に至つて Rocklin¹⁵⁾ はヒ

トの M. I. F. は、分子量 23,000 ダルトン、標的細胞はモルモット腹腔滲出細胞、ヒト単核細胞であること、一方、白血球遊走阻止因子 (L. I. F.) は分子量 69,000 ダルトン、標的細胞は多核白血球であり、M. I. F. と L. I. F. は異なる物質であることを明らかにした。しかし、現在においてもなお遅延型アレルギーにおける M. I. F. と L. I. F. の役割については不明な点が少なくない。特に、実験動物における L. I. F. の研究報告は現在のところ極めて少数に過ぎない。この点を明らかにするため著者は、モルモットを用いて、ツベルクリンアレルギーにおける M. I. F. と L. I. F. について実験的研究を行ない、遅延型アレルギー反応に関与するこれらの“Lymphokine”の由来と本質についても考察を加えたので報告する。

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 350~450 g のものを選んで感作した。

2) 感作抗原: 感作抗原として、BCG 加熱死菌を Freund 不完全アジュバントに浮遊させた型で用いた。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 加熱死菌を混合した。BCG 加熱死菌の濃度として、1 mg/ml に調整し感作に用いた。

3) 感作方法: モルモットを感作方法の相違によって 3 群に分けた。第 1 群は正常群 (N 群)、第 2 群は 1 mg の BCG 加熱死菌を後肢足蹠に注射して感作し、4 週後の群 (V 群)、第 3 群は V 群に更に、1 mg の BCG 加熱死菌を静脈経路で投与 (“challenge” と呼ぶ) し、1 週後

の群 (VC 群) である。

4) ツベルクリン皮内テスト: $10\mu\text{g}/\text{ml}$ PPD (Park Davis 社製) を、脱毛した各群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。判定にあたっては、硬結の径 $10\times 10\text{ mm}$ 以上のものを陽性、径 $10\times 10\text{ mm}$ 未満、 $5\times 5\text{ mm}$ 以上のものを疑陽性、径 $5\times 5\text{ mm}$ 未満のものを陰性とした。

5) Anti-Thymocyte Serum (ATS) の作製: 10匹のモルモット (200 g) から胸腺を採取し Eagle MEM 中ではさみで細碎し胸腺細胞を得た。Medium で3回洗浄後、packed volume と等量の Eagle MEM で細胞を浮遊し、この浮遊液と等量の 0.01 M , EDTA 溶液 (pH 7.2) を加え、 37°C 3分間 incubate した。Incubate 後、遠心分離 ($3,000\text{ rpm}$, 10分間) し、その上清 (EDTA 抽出液と呼ぶ) を Freund 完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit 社製) と混合し、2羽のウサギの皮下へ注射した。注射2週間後、10匹のモルモット (200 g) から胸腺細胞を得て、これをウサギの耳静脈から静注した。更に、1週間後、初回注射と同量の EDTA 抽出液を Freund 完全アジュバントと混合し、ウサギの背部へ皮下注射した。1週間後に、ウサギの耳静脈から採血して得た血清を、 56°C 30分間で非働化した。この非働化した血清をモルモットの赤血球と骨髄細胞で2度吸取した。この血清 (ATS) は、胸腺細胞の95%以上を死滅させる一方、骨髄細胞の5%以下を死滅させた。この ATS は後述するようにモルモット末梢血リンパ球の培養時に、培養液に混合して使用した。

6) 腹腔滲出細胞の採取法: 腹腔滲出細胞を採取するために、滅菌流動パラフィン 20 ml を N 群、V 群および VC 群モルモットの腹腔内に注射した。4日後に心臓穿刺によつて採血致死させた後開腹して、滅菌した Hanks 液約 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、遠心分離 ($1,000\text{ rpm}$, 5分間) 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 (直接法および間接法) に利用した。このようにして得た腹腔滲出細胞に含まれるマクロファージは $83\sim 90\%$ であつた。

7) 末梢血白血球の採取法: 末梢血白血球を採取するために、N 群、V 群および VC 群モルモットをヘパリン加注射器で心臓穿刺することにより採血した血液を、滅菌した6% デキストラン 176 と試験管内で混合し、60分間 37°C のフランキの中に静置した。この操作で赤血球層は下層に沈降するため、上層部 (buffy coat cell) を採取し、P. B. S. を加えて遠心分離 ($1,000\text{ rpm}$, 5分間) した。なお混在する赤血球は蒸留水を加えて溶血さ

せ、10倍量の Eagle MEM を加えて溶血を止めた。buffy coat cell は Eagle MEM を用い、遠心分離 ($1,000\text{ rpm}$, 5分間) で3回洗浄し、白血球遊走阻止試験 (直接法および間接法) に利用した。このようにして得た buffy coat cell に含まれる多核白血球は $45\sim 54\%$ であつた。

8) 末梢血リンパ球の分離と培養: N 群、V 群および VC 群のモルモットをヘパリン加注射器で心臓穿刺によつて採血した血液に、等量の P. B. S. を加えて Ficoll-Isopaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) に重層し、遠心分離 ($1,500\text{ rpm}$, 30分間) を行ないリンパ球層を採取した。混在する赤血球は蒸留水を加えて溶血させ、10倍量の Eagle MEM を加えて溶血を止めた。リンパ球は Eagle MEM を用い、遠心分離 ($1,000\text{ rpm}$, 5分間) で2回洗浄した後、trypan blue dye exclusion method で生細胞数を算定した。リンパ球数は $5\sim 10\times 10^6$ 個/ml に揃え、 20 mM HEPES を含む TC-199 (pH 7.4, SM $100\mu\text{g}/\text{ml}$, PC $100\text{ U}/\text{ml}$ を含む) に非働化した正常馬血清を15%になるように加えた培養液中で、4群に分けて培養した。第1群は抗原 PPD 非添加群、第2群は抗原 PPD 添加群 (PPD 濃度は20, 40, $80\mu\text{g}/\text{ml}$)、第3群はリンパ球浮遊液4容量、ATS (1:10) 5容量、新鮮正常モルモット血清 (補体) 1容量を混合し、 37°C , 45分間 preincubate し、HEPES-TC-199 を用い、遠心分離 ($1,000\text{ rpm}$, 5分間) で2回洗浄した後、抗原 PPD 添加群および非添加群 (第4群) を作製し、 37°C , 48時間 CO_2 incubator で培養した。培養後、遠心分離 ($3,000\text{ rpm}$, 30分間, 4°C) し、その上清をとり、 -20°C でストックし、間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験に供した。以上の操作はすべて無菌的に行なつた。

9) 直接マクロファージ遊走阻止試験: David ら^{4)~6)}の方法に準じて行なつた (Fig. 1)。滅菌した Hanks 液で洗浄した N 群、V 群および VC 群の腹腔滲出細胞を、 56°C , 30分間で非働化した正常馬血清を15%含む HEPES-TC 199 で packed volume の10倍量に浮遊させた後、毛細管 (径 $1.45\sim 1.65\text{ mm}$, 長さ 75 mm) に詰めた。毛細管の一方の先端はあらかじめ加熱して盲管とし、閉管部を下にして遠心沈殿 ($1,200\text{ rpm}$, 7分間) して、細胞を毛細管閉管部から $4\sim 5\text{ mm}$ のところまで詰めた。細胞部分と上清の境界面の約 1 mm 下部の細胞側で毛細管を切断し、Mackerness-Type chamber の底部カバーガラスの上に、少量のシリコングリース (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、Mackerness-Type chamber の横穴から、HEPES-TC 199 に抗原 PPD を20, 40, $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 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た後、パラフィンで横穴を閉鎖し、 37°C , 24時間培養し

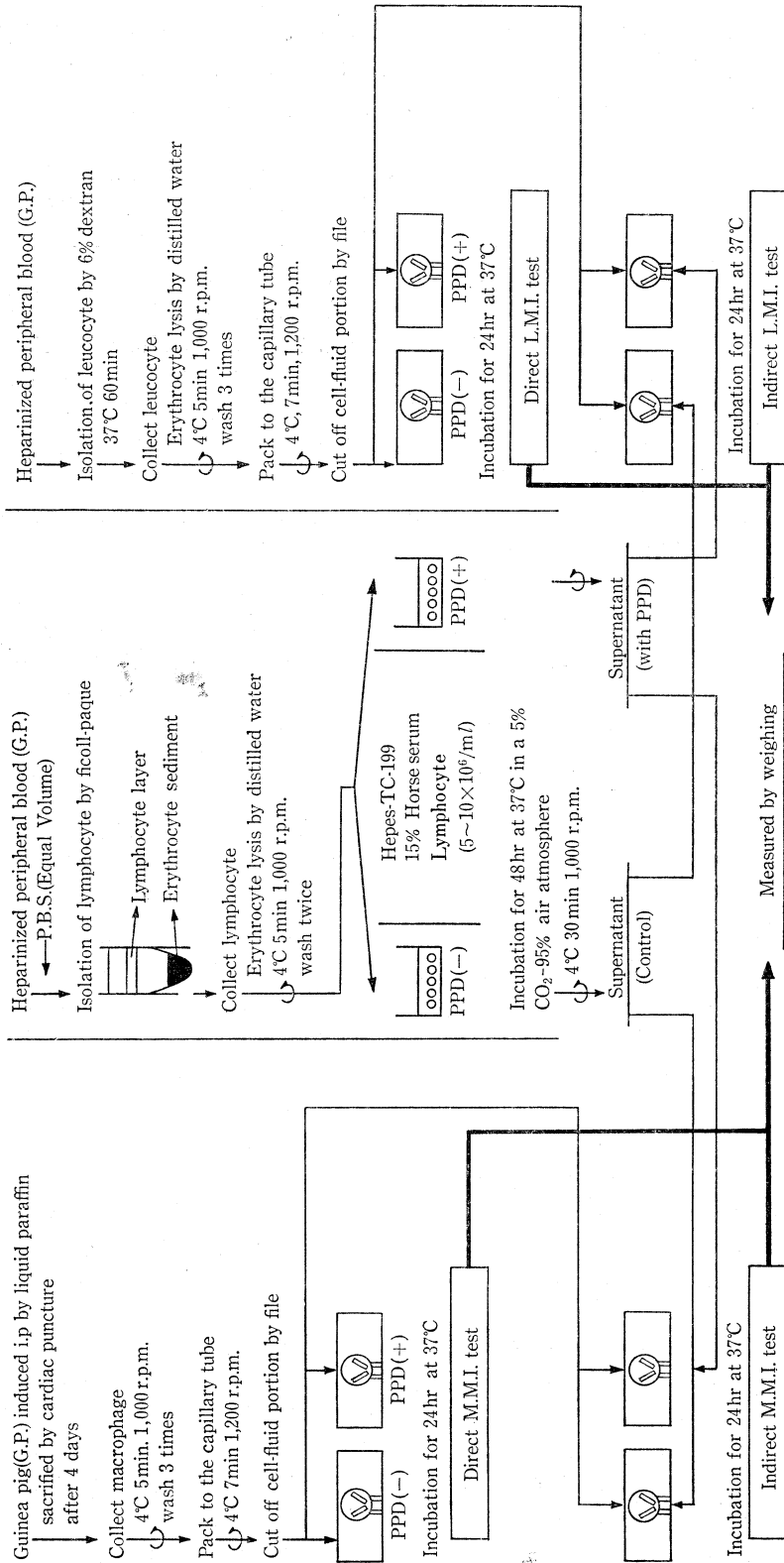


Fig. 1. Method of migration inhibition test.

$$\text{Migration index (M.I.)} = \frac{\text{Mean migration area with PPD}}{\text{Mean migration area without PPD}} \times 100(\%)$$

M.M.I.: Macrophage migration inhibition. L.M.I.: Leucocyte migration inhibition.

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、トレーシングペーパーに写しとつた後、はさみで切り取りその重量を測定した。マクロファージ遊走の程度 (migration index) は次式にあてはめて計算した。

Migration Index (M. I.)

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

平均遊走面積は6本の毛細管から得た値を算術平均した。

10) 直接白血球遊走阻止試験: Bendixen and Sjöborg⁹⁻¹⁰⁾の方法に準じて行なつた (Fig. 1)。N群、V群およびVC群の末梢血白血球を、56°C、30分間非働化した正常馬血清を15%含む HEPES-TC 199 で packed volume の10倍量に浮遊させた後、毛細管に詰め直接マクロファージ遊走阻止試験と同様の方法で行なつた。平均遊走面積は6本の毛細管から得た値を算術平均して migration index を求めた。

11) 間接マクロファージ遊走阻止試験: 標的細胞として滅菌した Hanks 液で洗浄した正常モルモットの腹腔滲出細胞を用い毛細管に詰めた。Mackerness-Type chamber には、N群、V群およびVC群の末梢血リンパ球を抗原 PPD (20, 40, 80 μg/ml) を加えて培養した上清、また PPD を加えないで培養した上清、および末梢血リンパ球を ATS で preincubate した後、抗原 PPD (20, 40, 80 μg/ml) を加えて培養した上清、また抗原 PPD を加えないで培養した上清を満たし、37°C、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。平均遊走面積は6本の毛細管から得た値を算術平均して migration index を求めた。

12) 間接白血球遊走阻止試験: 標的細胞として正常モルモットの末梢血白血球を用い毛細管に詰めた。間接マ

クロファージ遊走阻止試験に用いた同様の培養上清を、Mackerness-Type chamber に満たし、毛細管から白血球を遊走させた。平均遊走面積は6本の毛細管から得た値を算術平均して migration index を求めた。

13) 脾細胞とリンパ節細胞を用いた間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験: N群、V群およびVC群の各脾細胞、リンパ節細胞を採取した。各細胞数を 1×10^7 個/ml に揃え、非働化した正常馬血清 15% を含む HEPES-TC 199 で抗原 PPD (40 μg/ml) 添加群および抗原 PPD 非添加群に分け、37°C 48時間 CO₂ incubator で培養した。その培養上清を用いてマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験を行なつて、脾細胞およびリンパ節細胞の MIF 産生能と LIF 産生能について試験した。

3. 実験成績

1) 腹腔滲出細胞および末梢血白血球に対する PPD の非特異的遊走阻止作用について

20 μg/ml, 40 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml の5種類の PPD 濃度について、標的細胞である正常モルモットの腹腔滲出細胞および末梢血白血球に対する非特異的遊走阻止作用を調べた。その成績は Fig. 2 に示した。標的細胞が腹腔滲出細胞の場合、PPD が高濃度になるに従つて migration index が減少する傾向がみられ、PPD 濃度が 200 μg/ml に達すると、migration index は 78% となり、明らかに PPD による非特異的遊走阻止作用が認められた。一方末梢血白血球については、PPD 濃度が 200 μg/ml に達しても migration index は 101% で、PPD による非特異的遊走阻止作用は認められなかつた。以上の実験成績から、マクロファージ遊走阻止試験における添加抗原として PPD を用いる際、

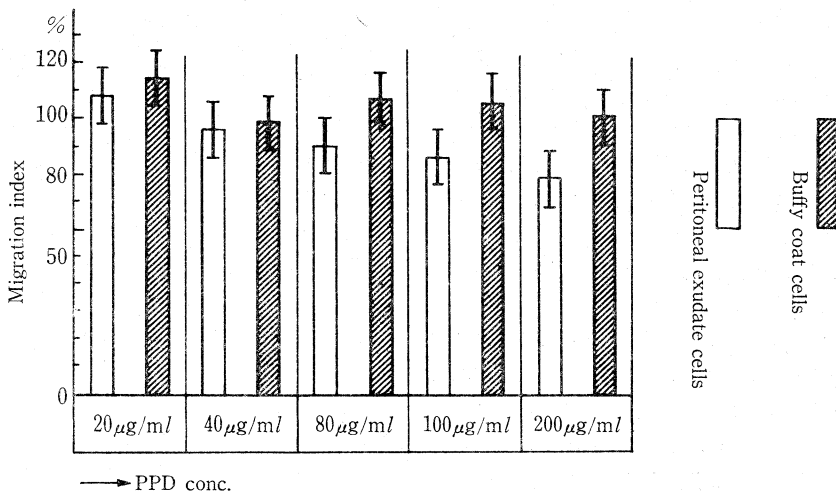


Fig. 2. Effect of PPD to the migration of peritoneal exudate cells and buffy coat cells.

PPD が腹腔滲出細胞に与える非特異的影響を避けるため、最終 PPD 濃度を $80\mu\text{g/ml}$ 以下となるようにした。著者が実際に用いた PPD 濃度は、マクロファージ遊走阻止試験の場合も、白血球遊走阻止試験の場合も、20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の3種類であった。

2) マクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験のための培養時間と migration index との関係

遊走阻止試験の判定に正確を期するため、安定した migration index が得られるに必要な培養時間について検討を行なった。まず、N群およびV群のモルモットから採取した腹腔滲出細胞を毛細管に詰め、PPD $40\mu\text{g/ml}$ を添加した培養液中でそれぞれ2時間、4時間、18時間、24時間培養した直接法によるマクロファージ遊走阻止試験を実施し、各時間について migration index を測定した。その成績は Fig. 3 に示した。すなわち、N群、V群のいずれも2時間、4時間、18時間と培養時間の経過とともに migration index に下降の傾向が認められたが、18時間を過ぎると migration index は安定した値となつた。次にN群およびV群のモルモットから採取した末梢血白血球についても、直接法による白血球遊走阻止試験を実施した。すなわち、末梢血白血球を毛細管に詰め、PPD $40\mu\text{g/ml}$ を添加した培養液中で、それぞれ2時間、4時間、18時間、24時間培養し、各時間について migration index を測定した。その成績は Fig. 4 に示した。N群、V群のいずれについても腹腔滲出細胞の場合と同様、2時間から18時間までは培養時間の経過とともに migration index の下降が認められたが、18時間以後は安定した値となつた。以上の実験成績から著者は、以後のマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験の培養時間を24時間に決定した。

3) 直接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験

V群およびVC群のモルモットから採取した腹腔滲出細胞および末梢血白血球を用いて直接法による遊走阻止試験を行なった。培養液中の PPD 濃度は 20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の3種類、培養時間は24時間である。対照は、N群から得た腹腔滲出細胞および末梢血白血球である。直接法の場合、標的細胞はV群ではV群の腹腔滲出細胞および末梢血白血球(V細胞と呼ぶ)であり、VC群ではVC群の腹腔滲出細胞および末梢血白血球(VC細胞と呼ぶ)であり、N群では正常モルモットの腹腔滲出細胞および末梢血白血球(N細胞と呼ぶ)である。その実験成績は Table 1 および Fig. 5 に示した。直接法によるマクロファージ遊走阻止試験の場合、V群の migration index は PPD 20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の各濃度についてそれぞれ 38%, 36%, 34%で対照群の100%, 91%, 81%と比較して著明な低値が認められた。また VC 群については、

Direct macrophage migration inhibition test

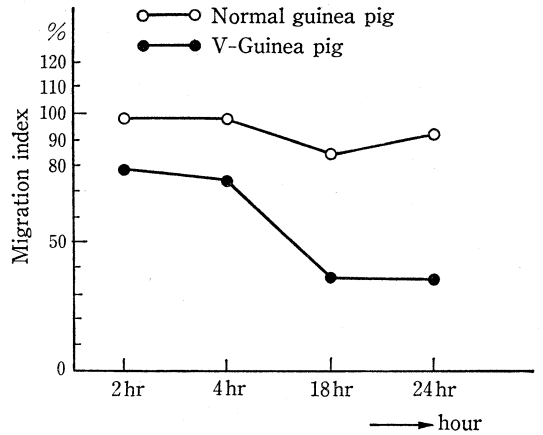


Fig. 3. Migration index of peritoneal exudate cells from N- and V-guinea pig in the presence of $40\mu\text{g/ml}$ of PPD after incubation at 37°C for 2, 4, 18, 24 hr.

Direct leucocyte migration inhibition test

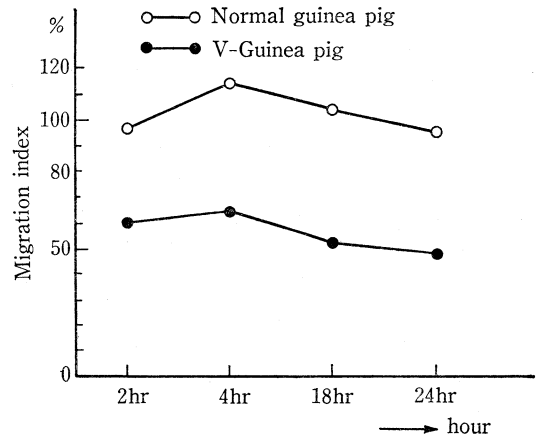


Fig. 4. Migration index of buffy coat cells from N- and V-guinea pig in the presence of $40\mu\text{g/ml}$ of PPD after incubation at 37°C for 2, 4, 18, 24 hr.

PPD 20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の各濃度で migration index はそれぞれ 44%, 43%, 44%と V 群の場合と同様に対照群に比して低値であつた。また末梢血白血球を用いて白血球遊走阻止試験を行なった。その成績は Table 1 および Fig. 5 に示したように、V群では PPD 20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の各濃度について、migration index はそれぞれ 48%, 49%, 59%といずれも対照群の103%, 93%, 95%に比して低値であつた。また VC 群についても PPD 20, 40, $80\mu\text{g/ml}$ の各濃度で migration index はそれぞれ 47%, 36%, 34%でV群の場合と同様、対照群に比して低値であつた。以上の成績は、V群およびVC群の両群とも、直接法を用いたマクロファージ遊走阻止試験

および白血球遊走阻止試験においては、著明な遊走阻止能がみられ、両者の試験が平行することを示したものと考えられる。しかし直接法による遊走阻止試験は、N群、V群およびVC群の各群について標的細胞となるN細胞、V細胞、VC細胞が、それぞれ異なつた免疫状態の細胞であるとともに、リンパ球と標的細胞が毛細管内に共に存在するため、実験動物のリンパ球の lymphokine 産生能のみを直接表現しているものとは言い難い。すなわち直接法では lymphokine 以外に抗体¹⁶⁾あるいは抗

Table 1. Result of Direct M. M. I. Test* and Direct L. M. I. Test** of N-, V- and VC-Guinea Pig

Method	PPD conc. (μg/ml)	Migration index (%)		
		N	V	VC
Direct macrophage migration inhibition test (M. M. I. test)	20	100	38	44
	40	91	36	43
	80	81	34	44
Direct Leucocyte migration inhibition test (L. M. I. test)	20	103	48	47
	40	93	49	36
	80	95	59	34

$$\text{Migration index} = \frac{\text{mean migration area with PPD}}{\text{mean migration area without PPD}} \times 100(\%)$$

* Target cells of direct M.M.I. test are peritoneal exudate cells which are obtained from N-, V- and VC- guinea pig.

** Target cells of direct L.M.I. test are buffy coat cells which are obtained from N-, V- and VC- guinea pig.

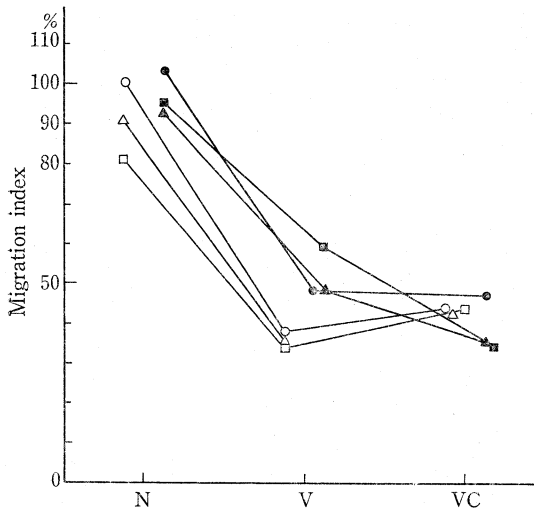


Fig. 5. Result of direct M. M. I. * test and direct L. M. I. ** test of N-, V- and VC-guinea pig.

Mean migration indices (M.I.) of peritoneal exudate cells (○, △, □) and buffy coat cells (●, ▲, ■) in medium containing 20 (○, ●), 40 (△, ▲) and 80 (□, ■) μg of PPD/ml.

* Direct M.M.I. test: Direct macrophage migration inhibition test.

** Direct L.M.I. test: Direct leucocyte migration inhibition test.

原抗体複合物¹⁷⁾¹⁸⁾の関与も否定できない。このような理由から、V群、VC群の lymphokine の産生能を調べる目的で、次に間接法による遊走阻止試験を実施した。

4) 間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験

V群およびVC群のモルモットから採取した末梢血

Table 2. Result of Indirect M. M. I. Test* and Indirect L. M. I. Test** of N-, V- and VC-Guinea Pig

Method	PPD conc. (μg/ml)	Migration index (%)		
		N	V	VC
Indirect macrophage migration inhibition test (M. M. I. test)	20	103	78	88
	40	108	71	96
	80	107	66	76
Indirect leucocyte migration inhibition test (L. M. I. test)	20	107	78	127
	40	110	65	137
	80	95	64	127

$$\text{Migration index} = \frac{\text{mean migration area with PPD}}{\text{mean migration area without PPD}} \times 100(\%)$$

* Target cells of indirect M.M.I. test are peritoneal exudate cells from normal guinea pig.

** Target cells of indirect L.M.I. test are buffy coat cells from normal guinea pig.

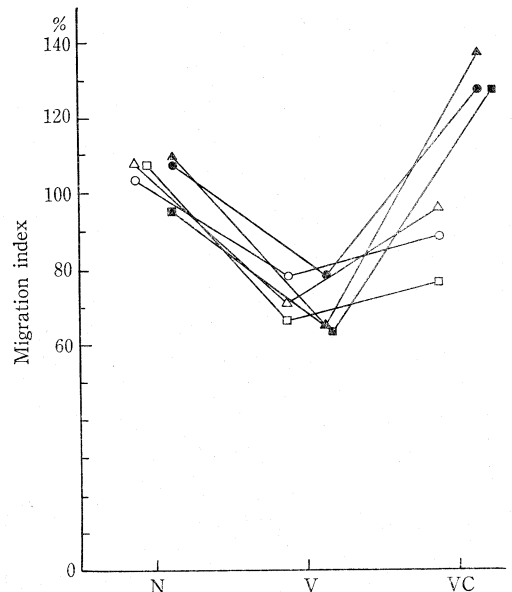


Fig. 6. Result of indirect M. M. I. test* and indirect L. M. I. test** of N-, V- and VC-guinea pig.

Mean migration indices of normal peritoneal exudate cells (○, △, □) and buffy coat cells (●, ▲, ■) in culture supernatant from peripheral lymphocytes of N-, V- and VC- guinea pig incubated with 20 (○, ●), 40 (△, ▲) and 80 (□, ■) μg/ml of PPD.

* Indirect M.M.I. test: Indirect macrophage migration inhibition test.

** Indirect L.M.I. test: Indirect leucocyte migration inhibition test.

リンパ球に PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ添加し, 37 $^{\circ}\text{C}$, 48時間 CO_2 incubator で培養, その培養上清を用いて間接法による遊走阻止試験を実施した。対照としては, N群より得た末梢血リンパ球に抗原 PPD を添加し, 培養した培養上清を用いた。毛細管に詰めた標的細胞としては, 正常モルモットの腹腔滲出細胞, あるいは末梢白血球を用いた。その実験成績は Table 2 および Fig. 6 に示した。間接法によるマクロファージ遊走阻止試験の場合, V群の migration index は, PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度について, それぞれ 78%, 71%, 66%で対照群の 103%, 108%, 107% と比して低値であった。また VC群については, PPD 80 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の時のみ migration index は 76%と対照群の 107% と比して低値を認めた。しかし PPD 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度で migration index はそれぞれ 88%, 96%で対照群の 103%, 108% と比較して極めて微弱な遊走阻止能を認めたにすぎなかつた。一方, 間接法による白血球遊走阻止試験の場合, その成績は Table 2 に示したように, V群では PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度について, migration index はそれぞれ 78%, 65%, 64%といずれも対照群の 107%, 110%, 95% に比して低値であった。

また VC群については PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度で, migration index はそれぞれ 127%, 137%, 127% でいずれも対照群の 107%, 110%, 95% に比して高値であった。以上の成績は, V群においては末梢血リンパ球と PPD 添加培養上清中には, 正常モルモットの腹腔滲出細胞および末梢血白血球に対する遊走阻止因子が存在していたことを示している。また VC群においては, ツベルクリン反応が強陽性 (17 \pm 2 mm) を示した (Fig. 7 および Fig. 8) にもかかわらず, 正常腹腔滲出細胞を標的細胞とするマクロファージ遊走阻止因子の産生がV群に比し微弱であった。一方, 正常末梢血白血球を標的細胞とした場合, 遊走阻止作用はみられず, 用いた PPD 濃度 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ のいずれにおいても遊走促進作用が認められた。このように VC群では, 間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走試験で遊走阻止因子の産生は微弱ないし皆無であった。そこで VC群の遊走阻止因子産生細胞の生体内分布を調べる目的で, 脾臓およびリンパ節細胞を用いて, 間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験を実施し, V群およびN群の脾細胞およびリンパ節細胞と比較した。

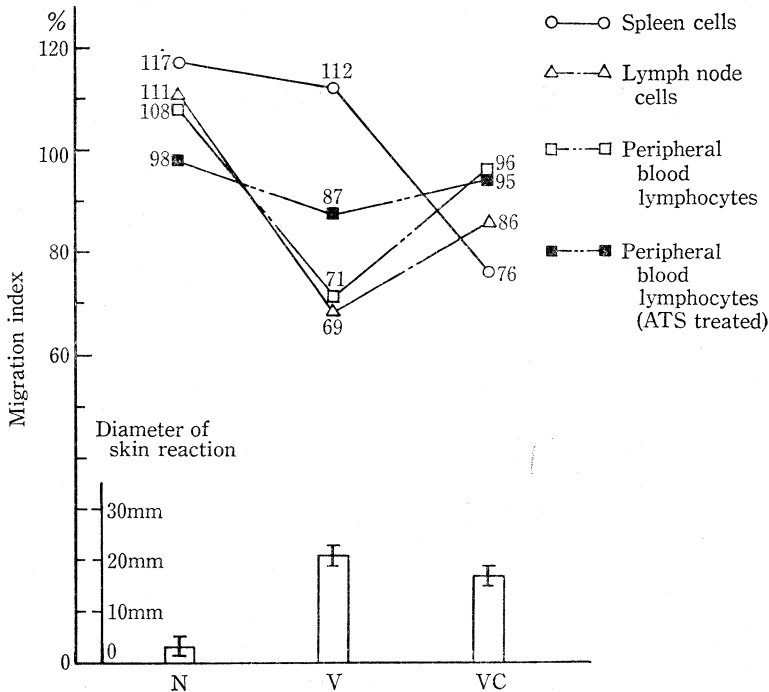


Fig. 7. Macrophage migration inhibitory capacity in the culture supernatant of spleen cells, lymph node cells and peripheral blood lymphocytes which are obtained from N-, V- and VC-guinea pig and result of tuberculin skin reaction (Indirect M. M. I. test*, PPD concentration 40 $\mu\text{g/ml}$).

$$\text{Migration index} = \frac{\text{Mean migration area(sup. with PPD)}}{\text{Mean migration area(sup. without PPD)}} \times 100(\%)$$

* M. M. I. test: Macrophage migration inhibition test.

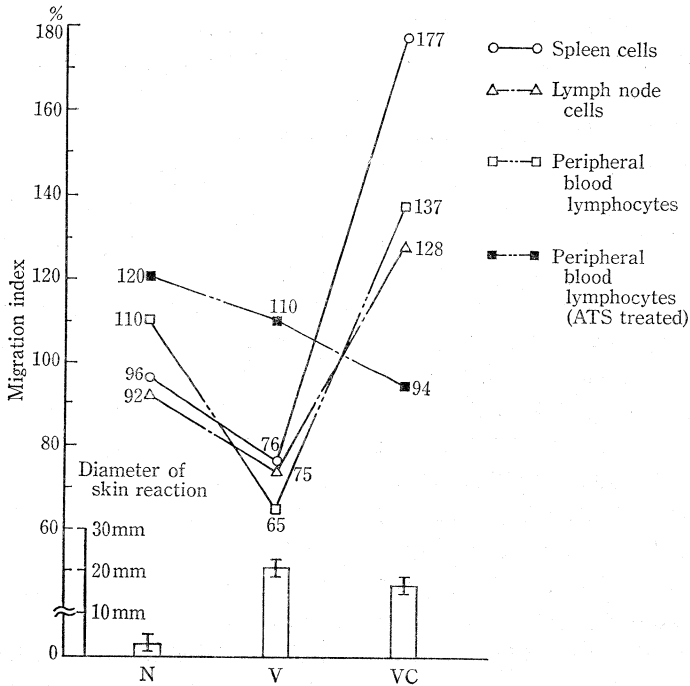


Fig. 8. Leucocyte migration inhibitory capacity in the culture supernatant of spleen cells, lymph node cells and peripheral blood lymphocytes which are obtained from N-, V- and VC-guinea pig. and result of tuberculin skin reaction (Indirect L. M. I. test*, PPD concentration 40µg/ml).

$$\text{Migration index} = \frac{\text{Mean migration area(sup. with PPD)}}{\text{Mean migration area(sup. without PPD)}} \times 100(\%)$$

* L.M.I. test: Leucocyte migration inhibition test.

5) V群および VC 群の脾細胞, 鼠蹊リンパ節細胞 および末梢血リンパ球を用いた間接法によるマクロファージ遊走阻止試験

V群および VC 群のモルモットから採取した脾細胞, 鼠蹊リンパ節細胞および末梢血リンパ球を PPD 40µg/ml 添加し, 37°C, 48時間 CO₂ incubator で培養, その培養上清を用いて正常モルモットの腹腔滲出細胞を標的細胞とした間接法によるマクロファージ遊走阻止試験を実施した。対照として, N群から得た脾細胞, 頸部リンパ節細胞, および末梢血リンパ球を PPD 40µg/ml を添加して培養し, その培養上清を用いた。その実験成績は Fig. 7 に示した。脾細胞の場合, V群の migration index は 112% で対照群の 117% とほぼ同じ値であった。また, VC 群の migration index は 76% と対照群に比して明らかに低値であった。鼠蹊リンパ節細胞の場合, V群の migration index は 69% で対照群の 111% に比して低値であった。また VC 群の migration index は 86% で, 対照群に比して低値であったが, V群と比較するとやや高値であった。末梢血リンパ球の場合, V群の migration index は 71% で, 対照群の 108% と比して明らかに低値であった。また VC群の migration index

は 96% で, 対照群と比して低値であったが, V群と比較すると高値であった。以上の成績から V群の鼠蹊リンパ節細胞においては, 著明な MIF 産生能が認められ, 末梢血リンパ球の場合とはほぼ同程度の正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走阻止能がみられた。一方, V群の脾細胞の場合は, 標的細胞である正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走阻止が認められなかつた事実より, 脾臓内には MIF 産生能を有する細胞が極めて少数であったか, あるいは全く存在しなかつたことが推定された。次に VC 群においては, 鼠蹊リンパ節細胞も末梢血リンパ球もともに V群と比較して, MIF 産生能が低下していたにもかかわらず, 脾細胞については, 逆に V群に比して活発な MIF 産生能が認められたことは興味深い事実である。すなわち V群の鼠蹊リンパ節や末梢血中にあつた MIF 産生能を有するリンパ球が, “challenge” という処置によつて脾臓に集積されたものと推測された。この推測を裏付ける事実としては, “challenge” 後, 急速に脾臓が肥大して V群の脾臓に比して約 3 倍の重量となることが知られている。また, この肥大した脾臓には多数の肉芽腫が認められる。この VC 群の脾細胞は先に大島ら¹⁹⁾が報告したように, 活発なツベルクリンアレルギー

一の伝達活性を有するという事実から推測して、MIF 産生細胞が脾臓内に集積されている可能性が十分に考えられる。

6) V群および VC 群の脾細胞, 鼠蹊リンパ節細胞, および末梢血リンパ球を用いた間接法による白血球遊走阻止試験

V群および VC 群のモルモットから採取した脾細胞, 鼠蹊リンパ節細胞および末梢血リンパ球を, PPD 40 μ g/ml を添加し, 37 $^{\circ}$ C, 48時間 CO₂ incubator で培養, その培養上清を用いて, 正常モルモットの末梢血白血球を標的細胞とした間接法による白血球遊走阻止試験を実施した。対照はN群から得た脾細胞, 頸部リンパ節細胞および末梢血リンパ球に, PPD 40 μ g/ml を添加して培養した培養上清を用いた。その実験成績は Fig. 8 に示した。脾細胞の場合はV群で migration index は76%で対照群の96%と比して低値であった。また VC 群の migration index は177%で, 対照群に比して明らかに高値であった。すなわち著明な遊走促進作用が認められた。鼠蹊リンパ節細胞の場合, V群で migration index は75%で, 対照群の92%と比して低値であり, また VC 群で migration index は128%で, 対照群と比して明らかに高値であった。すなわち VC 群では脾細胞の場合と同様, 遊走の促進がみられた。末梢血リンパ球の場合, V群で migration index は65%で, 対照群の110%と比して低値であり, 一方, VC 群では migration index は137%で, 対照群と比して高値であった。すなわち VC 群では脾細胞およびリンパ節細胞の場合と同様, 遊走促進作用が認められた。以上の実験成績から, V群の脾細胞およびリンパ節細胞においては, 末梢血リンパ球の場合と同様, 著明な LIF 産生能が認められた。一方, VC 群の脾細胞および鼠蹊リンパ節細胞, また末梢血リンパ球のすべてについて, 標的細胞である正常モルモット末梢血白血球の遊走促進現象が認められた。この原因は VC 群の脾細胞, 鼠蹊リンパ節細胞および末梢血リンパ球と対応抗原である PPD の接触によって, 培養上清中に LIF とは無関係に, 白血球遊走促進因子が存在しているためと考えられる。すなわち LIF 産生細胞はV群の末梢血リンパ球, 脾細胞および鼠蹊リンパ節細胞に認められたが, VC 群では LIF 産生細胞に関する情報は全く得ることができなかつた。

7) ATS 処理後リンパ球の MIF および LIF 産生能について

感作リンパ球と対応抗原との接触で放出される soluble mediator, 特に MIF は T-リンパ球から産生されるという報告がある²⁰⁻²⁴。また LIF および白血球遊走促進因子も T-リンパ球から産生される soluble mediator であるか否かを調べるために, ATS を用いてV群および VC 群の末梢血リンパ球を処理した。

N群, V群および VC 群の末梢血リンパ球浮遊液4容量, ATS(1:10) 5容量, 新鮮正常モルモット血清(補体)1容量を混合し, 37 $^{\circ}$ C, 45分間 preincubate した後, Hepes-TC 199 でよく洗浄した後, PPD 0, 20, 40, 80 μ g/ml を添加し, 37 $^{\circ}$ C, 48時間 CO₂ incubator で培養, その培養上清を用いて正常腹腔滲出細胞および末梢血白血球を標的細胞として, 間接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験を実施した。対照としては, N群, V群および VC 群の末梢血リンパ球を ATS 処理せず, PPD 0, 20, 40, 80 μ g/ml を添加して培養した培養上清を用いた。間接法によるマクロファージ遊走阻止試験の場合, その成績を Fig. 9 に示した。N群の migration index は PPD 20, 40, 80 μ g/ml の各濃度について, それぞれ98%, 98%, 95%で対照(無処置)群の103%, 108%, 107%と比してほぼ同様の値であった。この成績は ATS 自体は標的細胞である正常モルモットの腹腔滲出細胞の遊走に影響を及ぼさなかつたことを示している。V群については, PPD 20, 40 μ g/ml の各濃度で, migration index はそれぞれ86%, 87%であり, 対照群の78%, 71%と比してすべて高値であった。すなわち MIF の産生能は ATS 処理によつて消失したと考えられる。しかし PPD 80 μ g/ml のとき

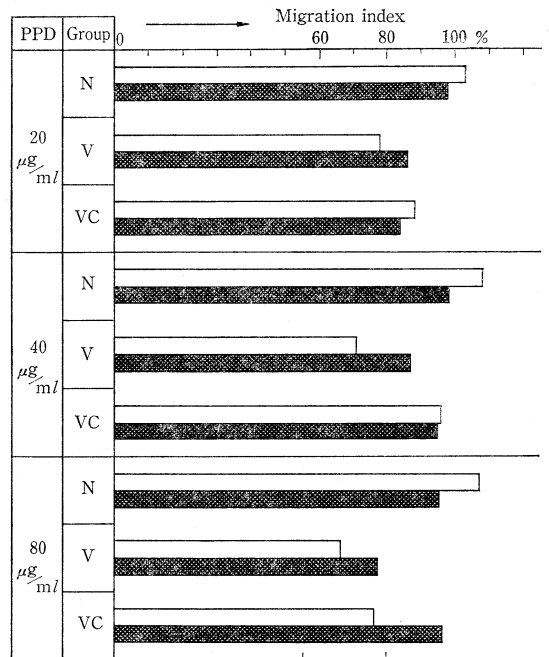


Fig. 9. Influence of anti-thymocyte serum (A. T. S.) on the production of macrophage migration inhibitory factor (M. I. F.) in the N-, V- and VC-guinea pig.

Mean migration indices of normal peritoneal exudate cells in culture supernatant from peripheral lymphocytes of N-, V- and VC- guinea pig incubated with A. T. S. (■) and without A. T. S. (□).

migration index は77%で、対照群の66%と比して高値ではあつたが、この値をN群の値と比較するとやや低値であつた。すなわち MIF 産生能は ATS 処理により減弱したが、なお ATS によつて消失しなかつた活性が残存していたことを示す成績であつた。また VC 群については、PPD 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で migration index はそれぞれ84%, 95%で対照群の88%, 96%とほぼ同様の値であつた。しかし PPD 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は migration index は96%で、対照群の76%と比して明らかに高値であつた。すなわち VC 群についても MIF 産生能は ATS 処理によつて消失した。一方、間接法による白血球遊走阻止試験の場合、その成績を Fig. 10 に示した。N群の migration index は PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度についてそれぞれ99%, 120%, 117%で、対照群の108%, 110%, 95%と比較してほぼ同様の値を示したことは、ATS 自体が腹腔滲出細胞の場合と同様、標的細胞である正常末梢血白血球の遊走に影響を及ぼさなかつたことを示している。V群については、PPD 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度でそれぞれ99%, 110%で対照群の78%, 65%と比較して高値であつた。すなわち LIF 産生能は ATS 処理によつて消失した。しかし PPD 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき migration index は79%で、対照群の64%に比して高値であつたが、この値をN群の値と比較するとやや低値であつた。すなわち LIF 産生能は ATS 処理によつて減弱したが、なお ATS によつて消失しなかつ

た活性が残存していたことを示す成績であつた。また VC 群については PPD 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で、migration index はそれぞれ107%, 94%, 99%で対照群の127%, 137%, 127%と比較して白血球遊走促進作用が消失した。すなわち遊走促進因子の産生能も ATS 処理によつて消失した。以上の成績は、V群および VC 群の末梢血リンパ球を ATS で処理することにより、V群および VC 群の末梢血リンパ球の、抗原 PPD 存在下における MIF, LIF および白血球遊走促進因子の産生能が、著明に減弱ないし消失したことを示すものと考えられる。V群については PPD 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、MIF および LIF の産生能がなお残存していたことより、T-リンパ球以外に MIF および LIF の産生細胞の存在が推測された。著者が実験に利用した ATS は、胸腺細胞の95%以上を死滅させる一方、骨髄細胞の5%以下を死滅させる活性を有するものである。これらの実験成績から、MIF, LIF および白血球遊走促進因子の大部分は、感作 T-リンパ球によつて産生されることが明らかとなつた。しかし一方、PPD 濃度が 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達すると、V群で ATS 処理したリンパ球においては、なお MIF および LIF の産生が微弱ながらみられたことから、MIF, LIF の産生に T-リンパ球以外のリンパ球、例えば B-リンパ球が関与している可能性が考えられた。

4. 考 察

感作リンパ球は、*in vitro* で特異抗原と接触することによつて“lymphokine”を産生する。“lymphokine”はその活性の性質によつて分類され、macrophage inhibitory factor³⁾⁻⁷⁾, leucocyte inhibitory factor⁸⁾⁻¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾, skin reactive factor,²⁵⁾²⁶⁾ chemotactic factor²⁷⁾, lymphotoxin²⁸⁾²⁹⁾, mitogenic factor³⁰⁾⁻³²⁾, macrophage aggregation factor³³⁾, interferon³⁴⁾⁻³⁶⁾ など多くの種類があることが知られている。実験動物における遅延型アレルギー反応は、これらの“lymphokine”に基づく反応が複雑に混り合つた反応と理解される。これらの“lymphokine”のうちで、macrophage inhibitory factor (MIF) については研究の歴史が比較的長く、動物およびヒトの遅延型アレルギーの *in vitro* の指標として利用されてきた。その後、leucocyte inhibitory factor(LIF) による白血球遊走阻止現象も、MIF の場合と同様遅延型アレルギーの指標となりうるということが、Bendixen and Sjöborg⁸⁾ によつて提唱された。しかし MIF と LIF は、Rocklin¹⁵⁾ の指摘したように分子量も異なり、また標的細胞の種類も異なつているので、両者が仮に遅延型アレルギーの発現に関与するとしても、その作用機序が同一であるとは考え難い。事実 LIF は MIF の場合と異なつて、従来の研究が主としてヒトについて行なわれたため、実験動物による研究報告は極めて数が少な

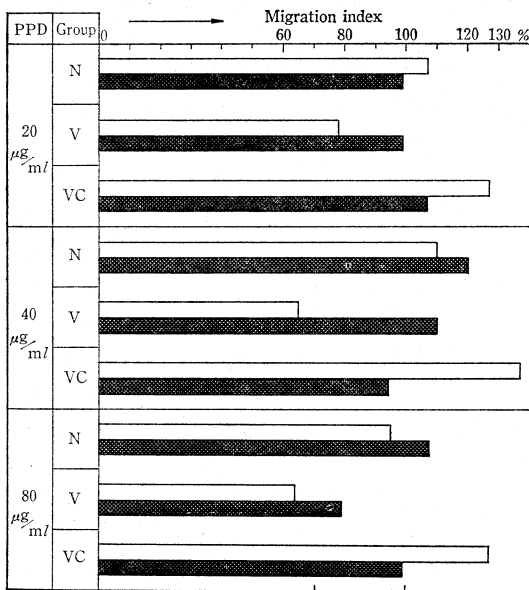


Fig. 10. Influence of anti-thymocyte serum (A. T. S.) on the production of leucocyte migration inhibitory factor (L. I. F.) in the N-, V- and VC-guinea pig.

Mear migration indices of normal buffy coat cells in culture supernatant from peripheral lymphocytes of N-, V- and VC-guinea pig incubated with A.T.S. (■) and without A.T.S. (□).

く、したがってその作用機序についても不明な点が少なくない。著者は、モルモットを用いてツベルクリンアレルギーと LIF との関係について研究し、MIF の成績と比較検討した。まず最初、結核死菌を用いて感作した V 群について、直接法によるマクロファージ遊走阻止試験と白血球遊走阻止試験の成績を比較したところ、両者にはほぼ同様の阻止作用を認めた。次いで、結核感動物に更に結核死菌を静脈経路に投与した VC 群を用いて、上記と同様の方法で遊走阻止作用について比較したが、この成績についても両者にはほぼ同様の阻止作用が認められた。これらの実験に用いた V 群および VC 群はいずれもツベルクリン皮内反応は強陽性であつて、このような実験条件下では直接法による遊走阻止試験は、その標的細胞が腹腔滲出細胞であつても、末梢血白血球であつてもいずれも、よくツベルクリンアレルギーを反映しているように思われる成績であつた。しかし直接法の場合、結果的に細胞の遊走が阻止されたとしても、N 群、V 群および VC 群の各群について、標的細胞となる N 細胞、V 細胞、VC 細胞がそれぞれ異なつた免疫状態の細胞であるとともに、リンパ球と標的細胞が毛細管内に存在するため、その実験成績が実験動物のリンパ球の有する“lymphokine”産生能を直接表現しているとは言い難い。すなわち、直接法による遊走阻止試験では、“lymphokine”以外に抗体¹⁶⁾あるいは抗原抗体複合物¹⁷⁾¹⁸⁾が、影響を与えることが考慮される。このような理由から、著者は V 群および VC 群の末梢血リンパ球の“lymphokine”産生機能について、直接調べる目的で間接法による遊走阻止試験を MIF と LIF の両者について行なつた。その実験成績は V 群でマクロファージの遊走も白血球の遊走もともに阻止されたことは、直接法の成績とほぼ同様の成績であつた。一方、VC 群については、マクロファージ遊走阻止作用が V 群に比して減弱していた。更に白血球遊走阻止試験においては、VC 群では全く遊走阻止作用が認められなかつたばかりでなく、むしろ遊走の促進が認められた。すなわち間接法を用いた場合、VC 群についての遊走阻止実験によつて直接法の成績とは全く異なる成績を得た。VC 群にみられるこのような変化の原因を調べる目的で、N 群、V 群および VC 群について、それぞれ脾細胞およびリンパ節細胞について MIF 産生能と LIF 産生能に関する検討を行なつた。すなわち PPD とともに培養し、それぞれの培養上清を用いてマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験を行なつた。その成績は、マクロファージ遊走阻止試験では、リンパ節細胞培養上清については先に行なつた末梢血リンパ球の場合と同様、V 群では強く、VC 群では微弱な遊走阻止作用が認められたが、脾細胞培養上清では全く異なり、V 群で全く遊走阻止作用がなく、VC 群では著明な遊走阻止作用が認められた。この事実

は、末梢血リンパ球にみられたような MIF 産生細胞が脾臓とリンパ節に均等に分布しているものではなく、V 群においては感作部位の所属リンパ節に、VC 群においては脾細胞に集積されていることを示唆するものと考えられる。一方、白血球遊走阻止試験の成績は、V 群においてはリンパ節細胞培養上清、脾細胞培養上清の両者について、末梢血リンパ球の場合と同様、著明な白血球遊走阻止作用が認められた。また VC 群においてはこれら 3 種類の培養上清についてすべて白血球遊走促進作用が認められた。すなわち LIF 産生細胞は、MIF 産生細胞と異なつて、V 群においては感作部位所属リンパ節内のみならず、脾臓内にもほぼ均等に分布していることが明らかになつた。

次に MIF, LIF および白血球遊走促進因子の産生細胞を調べる目的で、anti-thymocyte serum (ATS) で末梢血リンパ球を処理した。ATS 処理後、末梢血リンパ球における MIF 産生能、LIF 産生能および白血球遊走促進因子産生能が消失したという著者の実験成績は、MIF 産生細胞、LIF 産生細胞、白血球遊走促進因子産生細胞は T-リンパ球であることを強く示唆するものである。従来 LIF 産生細胞に関する実験は、ほとんどすべてヒトの末梢血白血球を用いて行なわれたため、その生体内分布に関しては不明な点が少なくない。また MIF 産生細胞と LIF 産生細胞の異同に関しても必ずしも明らかであつたとは言い難い。著者はヒトでは実施困難である LIF 産生細胞の生体内の分布に関する研究を、モルモットを用いて行なつたのであるが、その結果 LIF 産生細胞も MIF 産生細胞と同様 T-リンパ球ではあるが、MIF 産生細胞とは異なつた動態を有する細胞集団に属することを証明した。VC 群についての白血球遊走阻止試験の結果、末梢血リンパ球培養上清、リンパ節培養上清、脾細胞培養上清のすべてについて遊走促進現象が認められた。このような遊走促進現象に関する研究報告としては、Bendixen and Sjöborg³⁷⁾の報告がある。すなわちヒトの白血球遊走阻止試験において、微弱な感作状態にある細胞に少量の抗原を加えると遊走が促進されるという現象について記述している。また、Fox³⁸⁾は胎牛血清中には遊走阻止因子と遊走促進因子の作用の相反する 2 因子が含まれていると述べ、更に Weisbart³⁹⁾は agarose system を用いたヒトの白血球遊走阻止試験で、遊走阻止因子はアルブミン分画に、遊走促進因子は β -グロブリン分画にあることを、polyacrylamide gel electrophoresis を使つて証明したと報告している。著者の実験成績に認められた白血球遊走促進因子の本体は、現在のところ不明であるが、著者の行なつた ATS 処理によつて、リンパ球培養上清中の促進作用が消失することにより、本促進因子も他の多くの“lymphokine”と同様、T-リンパ球によつて産生されるものと思われる。また

結核感作モルモットに結核死菌を静脈注射する“challenge”という処置は、動物体内に激しい免疫学的変化を惹起するものと考えられる。例えば感作後“challenge”することによつて、脾臓が著明に肥大し、そこに多量のtransfer 活性細胞が集積されることが、佐藤⁴⁰⁾あるいは大島¹⁹⁾らによつてすでに報告された。このような動物体内における免疫担当細胞の動態を知るためには、単にリンパ球のMIF産生能について調べるのみでなく、同時にLIF産生能についても調べることが、極めて重要な意義を有することが、本研究によつて明らかにされたものと考えられる。

5. 結 論

結核死菌によつて感作したモルモット(V群)、および感作後“challenge”を行なつたモルモット(VC群)について、末梢血リンパ球を用いてmacrophage inhibitory factor(MIF)の産生およびleucocyte inhibitory factor(LIF)の産生について実験的研究を行ない、遅延型アレルギー反応に関与するこれら“lymphokine”産生細胞の免疫学的動態について考察を加えた。

MIFの測定はDavid⁴⁾⁻⁶⁾らの方法に準じて毛細管を用いた直接法および間接法によつて行なつた。LIFの測定はBendixen and Sjøborg⁸⁾⁻¹⁰⁾の方法に準じて毛細管を用いた直接法および間接法によつて行なつた。

1) 実験条件を設定するに当たつて、遊走阻止試験に用いるPPD濃度の標的細胞に対する非特異的影響について試験した。腹腔滲出細胞の場合、PPD濃度が200 $\mu\text{g/ml}$ になると非特異的遊走阻止作用がみられた。一方、末梢血白血球の場合、PPD濃度が200 $\mu\text{g/ml}$ に達しても非特異的遊走阻止作用は認めなかつた。また遊走阻止試験の判定時間としては、18時間以上の培養時間を必要とすることが分かつた。したがつて本実験では、培養液中のPPD濃度は80 $\mu\text{g/ml}$ 以下とし、判定時間を24時間とした。

2) 直接法によるマクロファージ遊走阻止試験および白血球遊走阻止試験の成績は、V群およびVC群の両群とも、N群に比し著明な遊走阻止作用が認められた。

3) 末梢血リンパ球を用いた間接法によるマクロファージ遊走阻止能および白血球遊走阻止能の成績は、V群ではMIFおよびLIFの産生が認められた。一方、VC群ではマクロファージ遊走阻止試験でMIFの産生能の減弱がみられた。また白血球遊走阻止試験で、LIFの産生能は認められず、むしろ白血球遊走促進作用が認められた。

4) 間接法を用いてV群およびVC群の両群について、脾細胞および鼠蹊リンパ節細胞のMIF産生能およびLIF産生能について、末梢血リンパ球のそれらと比較した。MIF産生能は、V群の鼠蹊リンパ節細胞、末

梢血リンパ球およびVC群の脾細胞に認められた。VC群の鼠蹊リンパ節細胞および末梢血リンパ球では、MIF産生能は減弱し、V群の脾細胞には、MIF産生能は全く認められなかつた。このようにモルモットの感作条件の相違で、MIF産生細胞の生体内分布が不均等になることが証明された。一方、LIF産生能はV群の脾細胞、リンパ節細胞および末梢血リンパ球には認められたが、VC群ではすべて遊走促進作用がみられ、LIF産生細胞については明らかにしえなかつた。

5) V群およびVC群の末梢血リンパ球を、anti-thymocyte serum(ATS)で処理した後、抗原PPDとともに培養、その培養上清を用いて間接法による遊走阻止試験を実施し、MIF産生能およびLIF産生能を調べた。V群でみられたMIFおよびLIF産生能は、末梢血リンパ球をATSで処理した後、それらの産生能は著しく低下した。しかしPPD濃度が80 $\mu\text{g/ml}$ のとき、MIFおよびLIFの産生能が一部残存していた。この事実は、MIFおよびLIF産生細胞の大部分は、主としてT-リンパ球によつて産生されるが、一部はT-リンパ球以外の細胞によつて産生されることを示唆したものと思われる。またVC群については、ATS処理後、MIF産生能は全く認められなかつた。一方、白血球遊走促進作用もATS処理後、ほとんど消失したことより、白血球遊走促進因子の本体は不明であるが、本因子もまたT-リンパ球によつて産生されたものと思われる。

以上の実験成績より、結核感作動物においてはLIFもMIFと同様、主としてT-リンパ球によつて産生される“lymphokine”で、遅延型アレルギー反応機構に重要な役割を演じていることが明らかとなつた。感作動物における両者の免疫学的動態が異なることより、反応発現における両者の役割が異なることが推測された。したがつて、将来ヒトにおける遅延型アレルギー反応機構を論ずるに当たつては、LIFはMIFと異なる免疫学的意義を有する“lymphokine”として考慮されなければならないと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました大島駿作教授に厚くお礼申し上げます。また研究面で、終始、御指導をいただいた木野稔也博士ならびに御協力をいただいた大山口渥先生、本田和徳先生に深く感謝いたします。実験遂行のうへで御協力をいただいた今井保代氏、谷岡文字子氏、壺井愛子氏、吉田修子氏、阪口三重子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Holst, P. M.: Tubercle, 3: 337, 1922.
- 2) Rich, A. R. and Lewis, M. R.: Bull. Johns. Hopk. Hosp., 50: 115, 1932.

- 3) George, M. and Vaughan, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111 : 514, 1962.
- 4) David, J. R., Al-Askari, S., Laurence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol., 93 : 264, 1964.
- 5) David, J. R., Laurence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol., 93 : 274, 1964.
- 6) David, J. R., Laurence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol., 93 : 279, 1964.
- 7) Bloom, B. R. and Bennett, B.: Science, 153 : 80, 1966.
- 8) Sjøborg, M. and Bendixen, G.: Acta Med. Scand., 181 : 247, 1967.
- 9) Sjøborg, M.: Acta Med. Scand., 184 : 135, 1968.
- 10) Bendixen, G. and Sjøborg, M.: J. Immunol., 104 : 1551, 1970.
- 11) Lockshin, M. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 132 : 928, 1969.
- 12) Kaltreider, H. B., Soghor, D., Taylor, J. B. and Decker, J. L.: J. Immunol., 103 : 179, 1969.
- 13) Clausen, J. E.: Acta Allergologica, 26 : 56, 1971.
- 14) Clausen, J. E.: Acta Allergologica, 28 : 351, 1973.
- 15) Rocklin, E. R.: J. Immunol., 112 : 1461, 1974.
- 16) Amos, H. E., Gurner, B. W., Old, L. J. and Coombs, R. R. A.: Int. Arch. Allergy, 32 : 496, 1967.
- 17) Spittler, L. E., Huber, H. and Fudenberg, H. H.: J. Immunol., 102 : 404, 1969.
- 18) Kotkes, P. and Pick, E.: Clin. Exp. Immunol., 19 : 105, 1975.
- 19) Oshima, S., Kino, T., Sato, A., Oyamaguchi, A. and Matsui, Y.: Japanese J. Tuberculosis and Chest Disease, 21 : 5, 1978.
- 20) Sonozaki, H. and Cohen, S.: Cellular Immunol., 2 : 341, 1971.
- 21) Yoshida, T., Sonozaki, H. and Cohen, S.: J. Exp. Med., 138 : 784, 1973.
- 22) Clinton, B. A., Magoc, T. J. and Aspinall, R. L.: J. Immunol., 112 : 1741, 1973.
- 23) Rocklin, R., Mac Dermott, R. P., Chess, L., Schlossman, S. and David, J. R.: J. Exp. Med. 140 : 1303, 1974.
- 24) Bloom, B. R. and Shevach, E.: J. Exp. Med., 142 : 1302, 1975.
- 25) Pick, E., Krejci, J., Cech, K. and Turk, J. L.: Immunol., 17 : 741, 1969.
- 26) Bennett, B. and Bloom, B. R.: Proc. Nat. Acad. Sci., 59 : 756, 1968.
- 27) Ward, P. A., Remold, H. G. and David, J. R.: Science, 163 : 1079, 1969.
- 28) Ruddle, N. H. and Waksman, B. H.: J. Exp. Med., 128 : 1267, 1968.
- 29) Granger, G. A. and Williams, T. W.: Nature, 218 : 1253, 1968.
- 30) Kasakura, S. and Lowenstein, L.: Nature, 208 : 794, 1965.
- 31) Kasakura, S. and Lowenstein, L.: Transplant., 5 : 459, 1967.
- 32) Valentine, F. T. and Lawrence, H. S.: Science, 165 : 1014, 1969.
- 33) Lolekha, S., Dray, S. and Gotoff, S. P.: J. Immunol., 104 : 296, 1970.
- 34) Glasgow, L. A.: J. Bact., 91 : 2185, 1970.
- 35) Green, J. A., Cooperland, S. R. and Kibrick, S.: Science, 164 : 1415, 1969.
- 36) Milstone, L. M. and Waksman, B. H.: J. Immunol., 105 : 1068, 1970.
- 37) Bendixen, G. and Sjøborg, M.: Dan. Med. Bull., 16 : 1, 1969.
- 38) Fox, R. A., Gregory, D. S. and Feldman, J. D.: J. Immunol., 112 : 1861, 1974.
- 39) Weisbart, R. H., Bluestone, R., Goldenberg, L. S. and Pearson, C. M.: Proc. Nat. Acad. Sci., 71 : 875, 1974.
- 40) 佐藤篤彦: 京大結研紀要, 7 : 135, 1974.