



Title	組織培養法によるツベルクリン・アレルギーの研究
Author(s)	沼田, 達夫
Citation	結核の研究, 12, 41-52
Issue Date	1960-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26688
Type	bulletin (article)
File Information	12_P41-52.pdf



[Instructions for use](#)

組織培養法によるツベルクリン・アレルギーの研究

沼田 達夫

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(昭和 34 年 9 月 1 日受付)

結核菌の感作を受けた個体がツベルクリンに対して特有なアレルギー状態を示す事実を解明すべく、組織培養法によつて生体外にとり出した細胞についてツベルクリンに対する反応を調べた実験は、古来甚だ多い。然し注目すべきは、これら学者の得たる結果において、ツベルクリン過敏性を惹起せしめる要因が cellular の factor に存すると考えるべき成績と humoral の factor によるものと見做すべき成績とが相半ばしている事である。

この種の研究のうち、最も初期的な実験の 1 つは、Holst¹⁾ によるものであるが、彼はツベルクリン反応陽性の人間から得た白血球の遊走がツベルクリンによつて阻害される事を報告し、この際同時に白血球の貪喰能も減弱する事を観察した。この data を更に詳細に追究した Rich & Lewis^{2),3)} は、結核動物の脾及び骨髓細胞を組織培養してこれにツベルクリンを添加すれば細胞の形態変化と遊走阻害が起ることを確認したが、この際正常動物の plasma を加えても免疫動物の plasma を加えても成績に相違の起らない事から、ツベルクリン過敏性には humoral の factor が関与しないと述べている。即ち彼らの成績は謂わばツベルクリン過敏性の「細胞説」とでも名付くべきもので、後に Rich はこの成績から進んで、結核におけるアレルギーと免疫の無関係を強く主張するに至つた。

然し同じ実験においてこれとは全く異なつた成績を示した報告もまた数多く存在する。例えば O'Neill & Favour⁴⁾ は、結核患者の白血球を正常血清に浮遊せしめこれにツベルクリンを加えても cytolysis は起らなかつたが、結核血清を加えた場合は健康者の白血球でも明らかに cytolysis を起すことを観察した。この成績は前記 Rich & Lewis の説とは正反対な結論を導くもので、この場合ツベルクリン過敏性に関与する因子は細胞自身ではなく、専ら humoral の factor によつて細胞融解がもたらされるものと解釈し得る。かかる説は Rich & Lewis のそれに対し謂わば「体液説」とでも名付けらるべきものであるが、O'Neill & Favour らは、cytolysis に対し specific な humoral factor のほかに補体もこれ

に関与すると説いている。このような相反する結果が生れた原因については、直ちにはつきりした説明を与える事は困難であるが、恐らく単なる方法的技術的な差のほかに、各 factor の量的な問題やそれぞれの実験条件の違い等、複雑な因子が関係しているものと思われる。試験管内におけるツベルクリン・アレルギー発現の様相を適確に掴むことは単に理論的に興味あるのみならず、アレルギーの本態、ひいては結核免疫とアレルギーとの関係をも明らかにする鍵ともなる問題と考えられるので、著者は正常並びに結核免疫海猿の細胞と正常及び免疫血清との 4 通りの組合せにそれぞれツベルクリンを加えて組織培養し、各組合せにおける細胞の反応を観察した。この際ツベルクリンに対する過敏性を判定するには色々な方法がある。即ち (i) 細胞の形態変化乃至細胞融解を顕微鏡的に観察する方法、(ii) 白血球について遊走速度の変化を観察する法、(iii) Warburg 検圧計により細胞の呼吸を測定する方法、(iv) 細胞の増殖程度を比較する方法、等色々な研究方法がこれまで採られて来たが、著者は比較的正確な結果を与えると思われる細胞浮游液培養法(後述)によつて細胞核数を測定し、もつて細胞傷害(融解)の有無を判定した。その結果は Rich & Lewis^{2),3)} の成績に一致するもので、免疫細胞は、加えられた血清が正常動物から得られたものであると免疫動物より得られたものであると拘らず、ツベルクリンによつて同様に増殖を抑制された。一方正常細胞については、O'Neill & Favour⁴⁾ の成績と異なり、これに免疫血清を加えた場合にもツベルクリンに対し sensitive と考えられるような成績は得られなかつた。以下に著者の得た実験成績について報告し、これに若干の考察を加えてみたいと思う。

実験材料並びに実験方法

(i) 培養組織 培養組織はすべて海猿から得たもので、体重 500 g 内外の健康正常海猿及び結核免疫海猿の脾細胞並びに腹腔内渗出細胞を後述の如き方法で培養した。海猿の免疫には人型毒力菌 仲野株の加熱死菌を用

い、これを per ml 5 mg の割になるよう流動パラフィンに懸濁し、その 1 ml を下腹部皮下に 1 週間間隔で 2 回接種した。尚海猿は何れも免疫 4 週後 100 倍稀釈ツベルクリンをもつて皮膚反応の陽性な事を確かめた。

a) 腹腔内渗出細胞の採取法。滅菌した流動パラフィンを各海猿(正常及び免疫)の腹腔内に約 20~25 ml 宛注射して無菌的な炎症を起さしめ、72 時間後腹腔を開いて peritoneal exudate を集めたが、この為に 1000 倍 heparin 溶液を 5% の割に加えた Tyrode 液で腹腔内をよく洗い、別に用意したガラス管を通じて陰圧の下に洗滌液を吸い上げ、ゴム管で連結した無菌瓶の中へこれを送り込んだ。この操作によつて海猿の腹腔内洗滌液は少しも無駄なく 1 つの瓶中に集め得られる。かくして集めた洗滌液をガーゼで 1 回濾過し 1500 廻転 30 分間遠沈すれば細胞は管底に沈んで厚い層を作り、混在する流動パラフィンは軽いので細胞と別れて上に浮く。上清を静かに捨てて細胞を再び Tyrode 液に suspend し、同じ操作を数回繰り返して良く洗つた後最後の washed cell を trypsin で処理する。即ち 1 ml につき 200 単位の割に trypsin を含む Rinaldini 液を沈渣に加え、37.5°C の恒温槽に浸けて絶えず振盪し、30 分後に遠沈して沈渣を 3 回洗滌後適量の Tyrode 液に浮遊せしめる。この際 Tyrode 液にペニシリンを per ml 50 単位程度に加えておけば更によい。かくして集めた腹腔内渗出細胞の種類は、正常動物から得たものでは淋巴球 22~33%、単球 43~59%、多形核白血球 3~8%、被覆細胞 11~17%、免疫動物から得られたものでは淋巴球 39~43%、単球 36~44%、多形核白血球 1~4%、被覆細胞 14~18% であつた。尚、細胞を trypsin で処置したのは、培養経過中におこる変性を最少限に止める為である。

b) 脾細胞浮游液調製法。上記腹腔内渗出細胞浮游液調製法と大体同じであるが、詳細は (iii) の項に譲る。この浮游液における細胞の種類は大部分が淋巴球であり少数の核小体を持つた淋巴芽球も見られた。多形核白血球は僅かに認められ、その他紡錘形の細胞質をもつた纖維芽細胞と思われる少数の細胞及び形質細胞も認められたが、単球は殆んど見られなかつた。

(ii) 組織培養に用いる諸材料

a) 培養管。直径 15 mm、長さ 90 mm の目盛り付硬質ガラス製のものを用いた。

b) ツベルクリン。青山 B 株の Sauton 培養濾液より型の如く調製した旧ツベルクリンを Tyrode 液で 10 倍に稀釈して用いた。

c) 鶏胎児浸出液。9~10 日目の孵化鶏卵より鶏胚を

無菌的に取り出し、シャーレ内で眼球を除去して Tyrode 液でよく洗滌した後ホモジナイザーにかけて粥状となし、2~3 回凍結融解を繰り返した粥状液を 4000 r.p.m. で 30 分間遠心沈澱する。その上清に等量の Tyrode 液を加えたもの (1:1) を用いた。

d) 液体培地。組織培養の際加えられる液体培地の組成は次の如くである。

血清 1 容、鶏胎児浸出液 (1:1) 1 容、Tyrode 液 1 容、10 倍稀釈ツベルクリン液 1/3 容、又は生理的食塩水 (対照実験) 1/3 容。

(iii) 培養方法 Earle⁹⁾、勝田¹⁰⁾らの細胞浮游液培養法に拠つた。脾細胞培養の場合について述べれば、その大略は第 1 図に示した如くである。

海猿を屠殺して無菌的に脾を取り出し、Ca、Mg を含まない塩類溶液 (Rinaldini 液) の少量を加えた丸底の 50 ml 遠沈管に入れ、長柄の子宮剪刀で袂に抵抗を感じなくなるまで丁寧に細挫する。これを同じ塩類溶液で約 10 回位洗つてから、予め小さなガラス玉を入れて滅菌した 100 ml のコルベンに移し、これに per ml 200 単位の割に trypsin を含んだ Rinaldini 液 50 ml を加え、37.5~38°C の恒温槽に入れその間よく振盪する。これによつて組織粥は更に微細になると共に細胞間の固い結合がとける。これをピペットで遠沈管に移し 2500 廻転で 5 分間遠沈すれば粗い組織塊は管底に沈むからこの部分を避けて沈渣の中間層を別の試験管に取り、適量の Tyrode 液を加えて 1500 r.p.m. 15 分間宛 3 回洗滌後、最後に 15 ml の Tyrode 液に浮遊せしめて 4 枚重ねのガーゼで濾過する。かくして得られた濾液には大きな細胞塊は除かれ、大体均等に浮遊する細胞液が得られる。これを 14 本の試験管に 0.5 ml 宛正確に分注し、一番最初に分注した試験管と中間及び最後の試験管の 3 本を除き、他の 11 本には (ii) の d) に記載した液体培地を各試験管に 1.0 ml 宛加え、ダブル栓を施して 6 日間 37.5~38°C で培養した。細胞浮游液を試験管に分注する時はピペットの先がコルベンの底にまで達していると最初に分注される試験管に特に多数の細胞が入り勝ちであるから、ピペットを吸い上げる間にも絶えず攪拌する事が必要である。尚液体培地の更新は 1 日おきに行つた。

(iv) 細胞核数算定法 細胞核数の算定は培養開始時と 2 日目、4 日目、及び 6 日目にそれぞれ任意の試験管 3 本宛を撰んで行つた。従つて試験管の所要本数は 12 本になるが、上記の如く 14 本の試験管に細胞を培養したのは遠沈時における破損、雑菌混入のおそれ等を考慮して予備を設けた為である。培養開始時における核数計

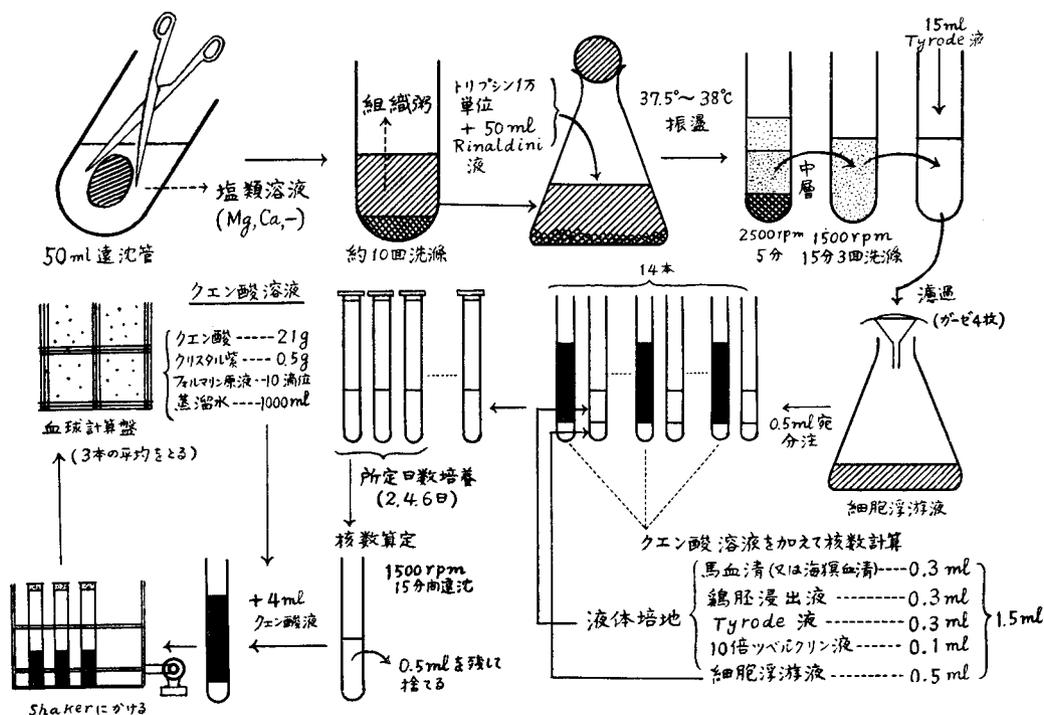


図 1 細胞浮游液培養法の概要

算は、前項に述べた液体培地を加えていない3本の試験管について平均値を求めた。即ち管内にある0.5 mlの細胞浮游液に対しクエン酸溶液4 ml(処方: 蒸溜水1000 ml, 0.1 M クエン酸 21 g, クリスタル紫 500 mg, フォルマリン原液約 10 滴)を加え、37°Cの恒温槽中で30分振盪機にかけた後1500 廻転15分間遠沈、1 mlの目盛りまで正しくピペットで上清を捨て、十分攪拌して均等にした液を血球計算盤に移すと、細胞の核はクリスタル紫できれいに染つているのでその数を算える。培養後の核数を算えるにはまず1500 廻転15分間遠沈後0.5 mlの液を残して上清を捨て、前と同様に4 mlのクエン酸液を加えるが、培養した細胞は管底で鶏胎児浸出液の滓と固い結合を作つているので、加温振盪の時間を2時間乃至2時間半に延ばさなければならない。以下の操作は培養開始時のそれと全く同じである。

実験成績

実験 1. 細胞浮游液の均等性の検討。

本実験を始める前に、各試験管に分注された細胞浮游液中の細胞数にはどれ位の変動があるか、換言すれば培養に当つて各試験管に略々同数の細胞を分注し得るかどうかを検討してみた。第1表はその成績を示すもので、試

験管 20 本に正常海葵脾細胞浮游液 0.5 ml を正確に分注し、各培養試験管中の細胞核数と標準偏差を計算したものである。同じ実験を時期を異にして2回行つたが、何れの場合にも表の如く試験管毎の変動は極めて少なく、細胞浮游液は容易に均等なものが得られることを知

表 1 培養管 20 本における平均細胞核数

各培養管中の細胞核数	培養管数	各培養管中の細胞核数	培養管数
24×10^3	15	65×10^3	2
25	5	66	0
26	3	67	4
		68	0
		69	0
		70	0
		71	3
		72	1
		73	1
		74	8
		75	1
各培養管中の細胞核数	24.6×10^3	各培養管中の平均細胞核数	70.0×10^3
標準偏差	0.75×10^3	標準偏差	3.32×10^3

つた。

実験 2. 脾細胞によるツベルクリン過敏性惹起因子の検討。

ツベルクリンに対して個体が示す過敏性において、主要な役割を演じているものは細胞であるか又は体液性の因子であるかを検するため、正常脾細胞及び免疫細胞と正常並びに免疫血清との次の如き4つの組合せを作り、それぞれに10倍稀釈ツベルクリンを加えて培養し、細胞の増殖を観察した。

- (i) 正常細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
 - (ii) 正常細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン
 - (iii) 免疫細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
 - (iv) 免疫細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン
- 以上の4つについて接種開始時、培養2日、4日、6

日目と日を追つて細胞核数を算定した成績は第2表の如くである。表中の数字は各3本の培養管について細胞核数の平均値を求めたもので、括弧内の数字は各培養日における細胞核数を培養開始時の細胞核数で割り、これを百分率で示したものである。

(i)の組合せにおいては培養第2、第4日目の細胞核数中、1~2本の試験管に僅かながら減少(1.5~4.1%)の見られたのを除けば、他はすべて核数が増加しており、6日目においては全例に細胞の増加が認められている。(ii)の組合せも同様で、一部に減少を認めたものもあるが全体の傾向としては明らかに細胞数の増加が認められる。これに反し(iii)の組合せにおいては、培養2日にして既に著明な細胞核減少を認め、6日間の培養全経過を通じて細胞増加の傾向は全く認められていない。

表 2 種々の組合せに於ける細胞核数の増減(脾)

	動物 番号	各培養管中に於ける平均細胞核数						
		培養開始時	培 養 後 2 日	4 日	6 日			
(i) 正常細胞+正常血清 +10倍ツベルクリン	1	46.0×10 ³	45.3×10 ³ (98.5%)	50.7×10 ³ (110.2%)	56.0×10 ³ (121.7%)			
	2	69.0	74.3 (107.6)	77.0 (111.6)	81.3 (117.8)			
	3	26.7	26.7 (100.0)	26.7 (100.0)	29.3 (109.7)			
	4	36.3	38.0 (104.7)	38.7 (106.6)	45.3 (124.8)			
	5	42.7	43.0 (100.7)	46.7 (109.4)	47.7 (111.7)			
	6	51.7	54.0 (104.4)	63.7 (123.2)	63.3 (122.4)			
	7	152.0	146.0 (96.1)	145.7 (95.9)	153.0 (100.7)			
	8	30.0	34.7 (115.7)	34.7 (115.7)	41.3 (137.7)			
	9	32.7	34.0 (104.0)	37.0 (113.1)	37.7 (115.3)			
	10	49.3	52.3 (106.1)	55.3 (112.2)	57.3 (116.2)			
(ii) 正常細胞+免疫血清 +10倍ツベルクリン	1		46.7 (101.5)	45.3 (98.5)	49.3 (107.2)			
	2		77.3 (112.0)	78.7 (114.1)	82.0 (118.8)			
	3		25.3 (94.8)	31.3 (117.2)	32.0 (119.9)			
	4		40.7 (112.1)	40.0 (110.2)	42.3 (116.5)			
	5		43.0 (100.7)	43.0 (100.7)	46.0 (107.7)			
	6		56.0 (108.3)	63.7 (123.2)	65.7 (127.1)			
	7		148.0 (97.4)	150.7 (99.1)	152.3 (100.2)			
	8		38.7 (129.0)	38.0 (126.7)	46.0 (153.3)			
	9		33.0 (100.9)	32.0 (97.8)	35.0 (107.0)			
	10		51.7 (104.9)	53.0 (107.5)	55.7 (113.0)			
(iii) 免疫細胞+正常血清 +10倍ツベルクリン	1	42.0×10 ³	26.0 (60.9)	26.3 (62.6)	26.0 (61.9)			
	2		82.7 (67.7)	53.0 (64.1)	50.7 (61.4)			
	3		52.7 (69.6)	32.7 (62.0)	29.0 (55.0)			
	4		34.0 (67.6)	19.3 (56.8)	19.0 (55.9)			
	5		35.3 (71.7)	23.3 (66.0)	21.7 (61.5)			
	6		48.7 (69.2)	30.7 (63.0)	28.3 (58.1)			
	7		96.7 (70.0)	63.0 (65.2)	57.3 (59.3)			
	8		49.3 (73.0)	33.0 (66.9)	28.3 (57.4)			
	9		29.0 (69.0)	18.7 (64.5)	18.0 (62.0)			
	10		33.3 (71.2)	21.7 (65.2)	21.0 (63.1)			
(iv) 免疫細胞+免疫血清 +10倍ツベルクリン	1		27.7 (66.0)	24.7 (57.8)	24.0 (57.1)			
	2		57.3 (69.3)	51.3 (62.0)	51.7 (62.5)			
	3		36.0 (68.3)	32.0 (60.7)	29.6 (58.1)			
	4		24.0 (70.6)	19.7 (57.9)	18.3 (53.8)			
	5		23.3 (66.0)	22.7 (64.3)	22.0 (63.3)			
	6		34.3 (70.4)	29.0 (59.5)	27.7 (56.1)			
	7		73.0 (75.5)	57.3 (59.3)	56.7 (58.6)			
	8		33.0 (66.9)	29.3 (59.4)	26.0 (52.7)			
	9		17.7 (61.0)	19.0 (65.5)	17.6 (60.7)			
	10		23.5 (70.6)	22.6 (67.9)	21.2 (63.7)			

(iv) の組合せも (iii) と同様で、全例に細胞数の減少が認められた。第 2 図はこの関係を図示したもので、第 1

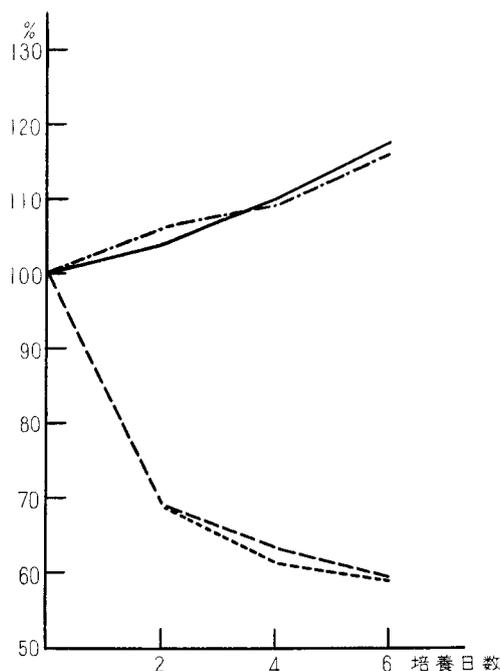


図 2 種々の組合せにおける細胞数増減の推移(脾)

— — — — — 正常細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
 — — — — — 正常細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン
 — — — — — 免疫細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
 - - - - - 免疫細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン

表記載の細胞核数を各組合せごとに平均し、増加(又は減少)の平均パーセントを日を追つて plot したものである。図から明らかなように、細胞と血清との組合せによる培養成績は 2 つの群に分れ、(i) (ii) においては細胞数増加、(iii) (iv) においては細胞数減少がそれぞれ結果として観察された。即ちツベルクリンに対し過敏性を示すものは免疫細胞に限られ、正常細胞はこれに正常血清を加えても、免疫血清を加えても細胞の減少は認められなかつた。免疫脾細胞における細胞数の減少はツベルクリンによる cytolysis の結果と考えられ、ツベルクリン・アレルギーの本態は細胞自身にあるものと思われる。

実験 3. 馬血清使用による脾細胞の組織培養。

前実験において、細胞に加えられた血清は正常血清でも免疫血清でも得られた成績に差を認めなかつたので、ツベルクリン過敏性の発現に対し humoral factor は dominant な要素でない事を更に確かめる目的から、現在組織培養に最も広く用いられている馬血清を使用して次の 4 通りの培養試験を行い、各細胞における核数の増減を調べた。

- (i) 正常細胞+馬血清+生理的食塩水
- (ii) 正常細胞+馬血清+10倍ツベルクリン
- (iii) 免疫細胞+馬血清+生理的食塩水
- (iv) 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン

得られた成績は第 3 表に示した如く、(iv) の組合せのみにおいて著明な核数の減少が認められ、他の組合せ

表 3 種々の組合せに於ける(馬血清)細胞数の増減(脾)

	動物 番号	各培養管に於ける平均細胞核数			
		培養開始時	培養後 2 日	4 日	6 日
(i) 正常細胞+馬血清+ 生食水	11	73.0×10^3	71.0×10^3 (97.7%)	75.0×10^3 (102.7%)	92.0×10^3 (126.0%)
	12	38.0	37.3 (98.2)	39.0 (102.6)	41.6 (109.5)
	13	36.7	36.0 (98.1)	37.7 (102.7)	46.0 (125.3)
	14	34.2	44.0 (128.7)	48.3 (141.2)	57.1 (167.0)
	15	52.3	50.7 (96.9)	56.3 (107.6)	58.0 (110.9)
(ii) 正常細胞+馬血清+ 10倍ツベルクリン	11		73.7 (101.0)	80.7 (110.5)	82.3 (112.7)
	12		39.0 (102.6)	38.5 (101.3)	41.0 (107.9)
	13		37.0 (100.8)	41.3 (112.5)	41.0 (111.7)
	14		47.7 (139.5)	58.0 (169.5)	58.7 (171.6)
	15		51.3 (98.1)	57.3 (109.6)	59.7 (114.1)
(iii) 免疫細胞+馬血清+ 生食水	11	40.7×10^3	43.3 (106.4)	46.0 (113.0)	49.7 (122.1)
	12	30.3	29.3 (96.7)	30.7 (101.3)	30.3 (100.1)
	13	30.7	31.7 (103.2)	31.7 (103.3)	34.7 (113.0)
	14	30.4	37.3 (122.7)	44.0 (144.7)	47.7 (156.9)
	15	64.0	65.7 (102.7)	67.0 (104.7)	76.3 (119.2)
(iv) 免疫細胞+馬血清+ 10倍ツベルクリン	11		28.7 (70.5)	26.0 (63.9)	26.7 (65.6)
	12		20.3 (67.0)	19.3 (63.7)	19.3 (63.7)
	13		22.0 (71.7)	21.7 (70.7)	19.0 (61.9)
	14		24.0 (78.9)	21.3 (70.1)	21.7 (71.4)
	15		46.0 (117.9)	44.0 (68.8)	43.3 (67.7)

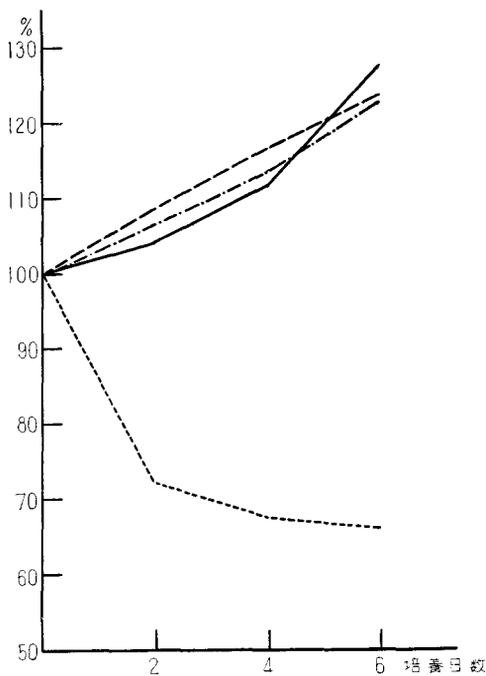


図3 種々の組合せにおける細胞数増減の推移(脾)
 正常細胞+馬血清+生食水
 - - - - 正常細胞+馬血清+10倍ツベルクリン
 - - - - 免疫細胞+馬血清+生食水
 - - - - 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン

においては何れも核数の増加が観察せられた。第3図は第3表記載の核数増減の平均パーセントを図に示したものである。

実験4. 補体の影響について。

ツベルクリンによる cytotoxicity には humoral factor のほかに補体がこれに関与すると云う報告⁴⁾があるので、前実験の再現性を確かめると共に補体の作用を検討する目的で、前実験と同じ組合せに正常海馬からとつた補体(24時間以内氷室保存)をそれぞれ0.2ml宛添加して細胞数の増減を測定した。結果は第4表の如く(iv)の組合せにおいてのみ細胞核数の減少が認められたが、その程度は補体を加えなかつた第3表(iv)の結果と比較して差があるようには思われなかつた。そこで免疫脾細胞だけについて補体の作用をもう一度直接比較してみるために、次の2つの培養から細胞核数の算術平均を求めた。

- (i) 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体
- (ii) 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン
(補体なし)

第5表はその成績をパーセントで比較したものであるが、補体添加の有無が cytotoxicity の程度に影響を与えたとされる結果は得られなかつた。尚第4図及び第5図はそれぞれ第4表及び第5表の成績を図によつて示したものである。

表4 種々の組合せに於ける細胞数の増減(脾)(馬血清, 補体)

	動物		各培養管に於ける平均細胞核数			
	番号	培養開始時	培養後2日	4日	6日	
(i) 正常細胞+馬血清+生食水+補体	16	39.0 × 10 ³	45.7 (117.2%)	50.3 (129.0%)	58.3 (149.5%)	
	17	52.0	51.0 (98.1)	49.7 (95.6)	55.7 (107.1)	
	18	40.0	38.0 (95.0)	40.0 (100.0)	44.0 (110.0)	
(ii) 正常細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体	16		44.0 (112.8)	45.3 (116.1)	55.3 (141.0)	
	17		46.7 (89.8)	57.0 (109.6)	59.7 (114.8)	
	18		36.0 (90.0)	38.0 (95.0)	45.0 (112.5)	
(iii) 免疫細胞+馬血清+生食水+補体	16	35.0 × 10 ³	36.3 (103.7)	37.7 (107.7)	44.7 (127.7)	
	17	55.7	62.3 (118.6)	70.3 (126.2)	70.7 (126.9)	
	18	35.7	32.3 (90.5)	33.0 (92.4)	35.0 (98.0)	
(iv) 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体	16		24.7 (70.6)	24.3 (69.5)	23.0 (65.7)	
	17		35.7 (64.1)	35.3 (63.4)	35.7 (64.5)	
	18		26.0 (72.9)	23.3 (65.3)	22.3 (62.5)	

実験5. 腹腔内滲出細胞による過敏性惹起因子の検討

以上の実験は脾細胞を用いて行つたものであるが、次に腹腔内滲出細胞について実験1と全く同じ培養を繰返してみた。細胞と血清との組合せは次の4通りである。

- (i) 正常細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
- (ii) 正常細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン
- (iii) 免疫細胞+正常血清+10倍ツベルクリン
- (iv) 免疫細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン

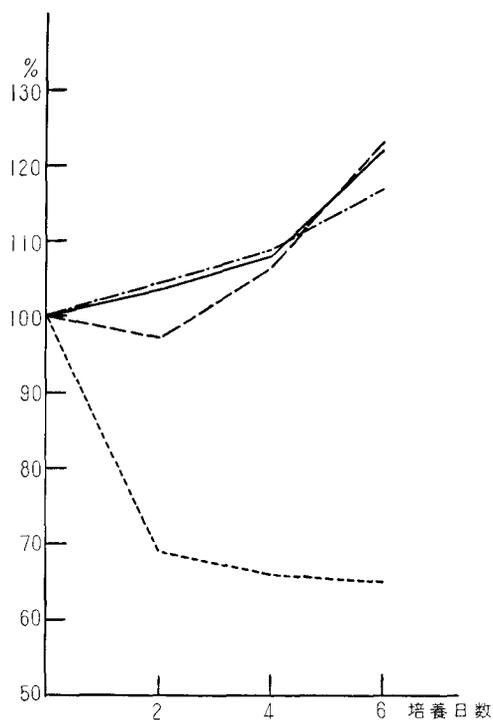


図4 種々の組合せにおける細胞数増減の推移(脾)
(補体)

—— 正常細胞+馬血清+生食水+補体
 - - - - 正常細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体
 ····· 免疫細胞+馬血清+生食水+補体
 - · - · 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体

表5 補体と細胞融解との関係(脾)

	2 日	4 日	6 日
免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体(+)	69.2%	66.1%	64.2%
免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体(-)	72.0	67.4	66.1

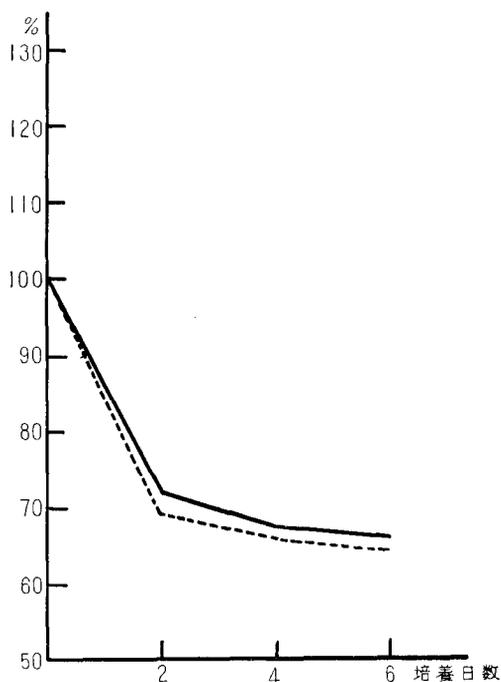


図5 細胞融解と補体との関係

—— 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン
 - - - - 免疫細胞+馬血清+10倍ツベルクリン+補体

表6 種々の組合せに於ける細胞数の増減(腹腔細胞)

動物群	各培養管中に於ける平均細胞核数				
	培養開始時	培養後 2 日	4 日	6 日	
(i) 正常細胞+正常血清+10倍ツベルクリン	1 群	227.3×10 ³	252.0×10 ³ (110.9%)	270.0×10 ³ (118.8%)	285.3×10 ³ (125.5%)
	2 //	115.0	123.7 (107.6)	134.3 (116.8)	141.0 (122.6)
	3 //	75.7	80.3 (106.1)	83.7 (110.6)	87.0 (114.9)
(ii) 正常細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン	1 //		261.7 (115.1)	258.3 (113.6)	265.3 (116.7)
	2 //		128.3 (111.6)	135.0 (117.4)	146.7 (127.6)
	3 //		74.0 (97.8)	76.3 (100.8)	78.3 (103.4)
(iii) 免疫細胞+正常血清+10倍ツベルクリン	1 //	116.3×10 ³	82.0 (70.5)	80.7 (69.4)	73.7 (63.4)
	2 //	95.3	69.7 (73.1)	66.0 (69.3)	60.3 (63.3)
	3 //	120.0	80.7 (67.3)	81.7 (68.1)	75.3 (62.8)
(iv) 免疫細胞+免疫血清+10倍ツベルクリン	1 //		77.7 (66.8)	71.7 (61.7)	68.0 (58.5)
	2 //		65.3 (68.5)	61.7 (64.7)	59.7 (62.6)
	3 //		74.7 (62.3)	76.0 (63.3)	72.0 (60.0)

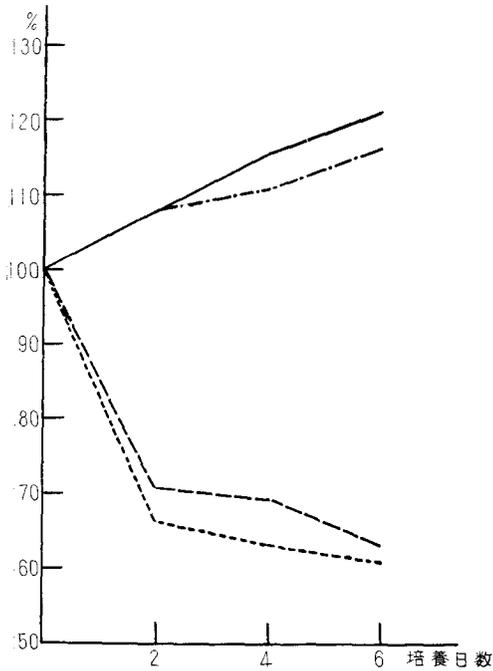


図 6 種々の組合せにおける細胞数増減の推移 (腹腔細胞)

- 正常細胞 + 正常血清 + 10倍ツベルクリン
- · - 正常細胞 + 免疫血清 + 10倍ツベルクリン
- 免疫細胞 + 正常血清 + 10倍ツベルクリン
- 免疫細胞 + 免疫血清 + 10倍ツベルクリン

得られた成績は第 6 表に示した如くで、実験 1 の結果を再現したものであつた。即ち正常細胞にツベルクリンを作用せしめた場合は、これに加えられた血清が正常血清であると免疫血清であるとを問わず細胞核減少は見られなかつたに反し、免疫細胞にツベルクリンを作用せしめた場合には、添加する血清が正常動物のものであつても免疫動物のものであつても、同程度に顕著な細胞核数の減少が見られた。第 6 図は細胞核数の推移を各組合せごとに平均パーセントを以て示したものである。

実験 6. 細胞の過敏性とツベルクリン反応の関係。

以上の実験から、免疫細胞はツベルクリンの作用によつて cytolysis を来し、その結果細胞数の減少を来す事が観察された。この際細胞がツベルクリンに対して示す過敏性と細胞を採取した個々の動物のツベルクリンに対する皮膚反応の強さとの間に如何なる関係があるかを調べてみた。第 7 図は細胞核数の減少パーセント (cytolysis を起した細胞のパーセントを表から計算したもの) を皮膚反応の発赤の大きさに対比せしめて plot したものであるが、この図から見た限りにおいては、両者の間に特別な相関関係は見出し得ないようであつた。

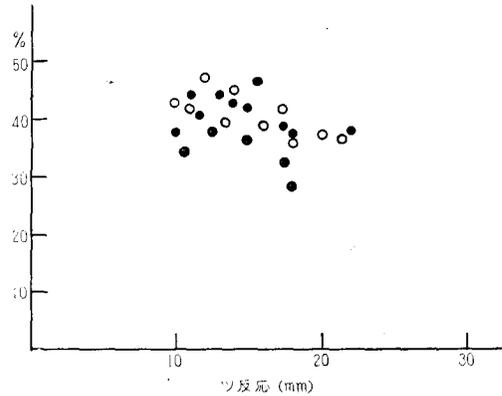


図 7 細胞融解とツベルクリン反応との関係

- 免疫細胞 + 正常血清 + 10倍ツベルクリン
- 免疫細胞 + 免疫血清 + 10倍ツベルクリン
- ◐ 免疫細胞 + 馬血清 + 10倍ツベルクリン

考 察

組織培養法の起源は古く Harrison⁷⁾ に遡り、1907 年彼が蛙の神経繊維を蛙の淋巴内で成長せしめたのがその端緒であるが、続いて Carrel^{8), 11)}, Fischer^{12), 13)} らによつてその基礎が作られ、遂には、1954 年 Robbins, Weller, Enders¹⁵⁾ らが roller tube 法による小児麻痺の研究においてノーベル賞を受けるに至つた程の輝かしい発展を遂げた。この間組織培養法は極めて多数の研究者によつて利用され、その応用範囲は殆んど医学の全分野に及んでいる。従つて結核研究の分野においても亦この方法が活潑に取り上げられた事は当然であり、結核感染に伴う細胞反応の検索、或いは諸組織内における結核菌の細菌学的研究等にも屢々利用されているが、特に顕著な成績を挙げているのは免疫乃至アレルギー現象の解明に関する研究においてである。

然しツベルクリン過敏性に関する組織培養実験の結果は、緒言の項にも述べた如く、一定した成績が得られていない。ある実験においては免疫細胞でも humoral の factor が加わらない限りツベルクリンによる傷害を受けない事が示され、又ある実験においては、これと反対に humoral の factor がツベルクリン過敏性に何ら関与しない事が示されている。

前者に属するものとしては、先に述べた O'Neill & Favour⁴⁾ の他に Fischer¹⁴⁾, Miller et al¹⁶⁾, Baldrige & Kligman¹⁷⁾, Marks & James¹⁸⁾, Jacobi & Marks¹⁹⁾, Cruickshank²⁰⁾ 等の学者があり、後者に属するものとしては Holst¹⁾ 及び Rich & Lewis^{2), 3)} を初め Stewart et al²¹⁾, Aronson²²⁾, Heilman et al²³⁾, Heilman & Seibert²⁴⁾,

Witte²⁵⁾, Fabrizio²⁶⁾, Moen & Swift²⁷⁾ 等が挙げられる。

このように相反する成績が得られた原因については色々な事が考えられるが、O'Neill & Favour は、理由の1つとして、用いられた細胞が自己の plasma factor を全く含まないものであつたか否かを重要視している。即ちある状態の plasma 中にはツベルクリンによつて特異的に細胞傷害を惹き起す物質が存在し、又ある場合には、これと逆に、ツベルクリン中和物質が含まれていると報告²⁵⁾されている如く、plasma factor がツ反応に影響を与える可能性は十分に考えられる。従つて O'Neill らの見解によれば、細胞がこのような plasma factor から完全に free でない限り、ツベルクリン過敏性惹起因子が細胞自身にあると云う考えには軽々に賛意を表し得ないと云う。この意味で彼らが引用している Fischer¹⁴⁾ の実験は興味あるもので、Fischer は鳥型結核菌を感染せしめたニワトリの fibroblast を 12 代 in vitro で継代し、完全に plasma factor を除いた上で鳥型ツベルクリンを作用せしめてみたところ、この細胞はツベルクリンに対し全く感受性を示さなかつたと述べている。然しながら一方において、結核組織のツベルクリンに対する過敏性は数代組織培養を継代したものにも認められる、と云う Moen & Swift²⁷⁾ の報告もあり、著者の実験においてもまた plasma factor をさほど重要視すべき data は得られていない。即ち、若し O'Neill らの考えている如く plasma factor が極く微量混在しても細胞のツベルクリン感受性に影響を与えるものならば、この実験において加えられた免疫血清の量をもつてすれば当然正常細胞にも cytolysis は現われる筈であるが、結果は既に述べた如きものであつた。

次に考えなければならぬのは方法の問題である。緒言の項に述べた如くツベルクリン過敏性を観察するには色々な方法が可能であり、且又用いる細胞の種類によつても成績が異なつて来る可能性は十分ある。Favour 一派^{29)~32)} は前述の如く結核動物の血清中に cytolysis に関与する factor の存在する事を唱えており、この物質は易熱性の γ -globulin で補体と共に cytolysis を起す重要な役割を有するものとしているが、この際 cytolysis を起す細胞は人間・海狸の如く delayed type の皮膚反応を呈するものにあつてはリン巴球、顆粒細胞の両者であり、マウスの如く delayed type の皮膚反応を見ない動物にあつてはリン巴球のみであると述べている。而してかかる相違の原因については、マウスのリン巴球はツベルクリンを吸着するが多核球はこれを吸着せず、人間においては両者ともツベルクリンを吸着すると云う血球吸着能

の差に基くものと説明している。又 Seibert ら³⁴⁾ の成績によれば感受性動物の細胞中ツベルクリンに対して最も傷害を受け難いものはリン巴球であり、最も傷害を受け易いものは多形核白血球であると云う。

かかる細胞による差の他に傷害の程度を判定する組織培養の方法に問題がある。Cytolysis は形態学的に直接観察し得る他に組織培養による細胞数の増減から間接的にこれを知り得るが、従来組織培養法においては組織の成長測定法に1つの難点があつた。即ち従来は多くの場合投影器等を用いて原組織の周囲に生ずる成長帯の面積を測定していたが、勝田⁶⁾も指摘している如く、成長帯中の細胞は分裂による増殖よりもむしろ原組織片より移住して来たものの方が多く、面積の拡大を以て直ちに原組織の成長と見做す事は出来ない。成長帯中に含まれる細胞の密疎を問題とせず、同じ輪廓まで拡つていけば同じ成長を示したものと見做さざるを得なかつた所にこれまでの判定法の根本的な欠陥が宿つていたと云うべきである。故に本研究においては細胞浮游液培養法によつて個々の細胞核数を算定する方法をとつた。核数の測定が直ちに細胞数そのものの増減を表わす事にはならないにしても、細胞数と細胞核数との間にはある程度比例的関係がある事は既に知られており、且実験1から明らかのように全培養管に略々均一な細胞数を分注する事が可能であるから、現在の段階においては先づこの方法をもつて満足すべきものと考えねばなるまい。

著者はかかる方法によつて、ツベルクリン過敏性の発現には humoral の factor が関与していない事を確かめる事が出来た。核数測定による培養成績判定法が従来は面積測定法より正確な結果を与えることは間違いないが、然しかかる方法上の相違や既述の考察だけによつてツベルクリン過敏性に関する実験成績の不一致を説明出来るものとは思われない。最も成績に重大な影響を与えるものは、組織培養実験において用いられた抗原と抗体との量的な関係ではなからうか？ ここで注目しなければならないのは Fischer の行つた実験成績である。彼¹³⁾ は結核家鶏の心嚢を組織培養しこれに鳥型菌より作つたツベルクリンを加えてみたが、非結核の正常組織に対し發育を抑制するような濃度のものを添加しても結核感染組織は盛んに發育するのを認めたと報告している。この成績は、細胞説に対する体液説とは異なつた意味で Rich & Lewis^{2),3)} の報告及び著者の観察した結果とは正反對なものである。即ちこの場合、ツベルクリンに対し過敏性を示すべき結核組織が、むしろ正常組織よりも感受性が鈍いような結果を示している。かかる実験成績から出発して Fischer は結局ツベルクリン過敏性の体液

説を唱えているが、彼の成績は細胞説の立場からも説明出来ない訳ではないと考える。アレルギー及び免疫に関するわが教室の一連の研究^{33)~35)}においてわれわれが繰り返し強調しているように、アレルギー乃至免疫なる2つの生体反応は共に抗原抗体反応に基く現象であり、その限りにおいて両者の現われ方を規定するものは常に抗原と抗体との量的関係である。わが教室の見解に従えば、一定量の抗原に対し反応すべき抗体(体液性の抗体のみならず組織性のものを含めた広義の抗体)が中等量存在する時のみアレルギーが見られ、これより更に抗体量が多くなれば抗原抗体反応の結果は「免疫」として表現される。この意味においてアレルギーは免疫の前段階であると我々は考えている。組織培養において抗体量と云うのは、体液説にあつては文字通り免疫血清の量(乃至濃度)を意味するが、細胞説にあつては培養に用いられた細胞の量そのものではなく、細胞の持つている免疫度の強弱(換言すれば細胞の持つている sessil の抗体量)を意味する。従つて *in vitro* で行うツベルクリン過敏性の実験においても、加えられたツベルクリンに対し細胞の免疫度が中等度の強さのものであればアレルギー性の反応(cytolysis)を示すが、極めて強度に免疫された細胞であれば「免疫」としての表現をとる筈で、従つてこの際正常細胞に傷害を与えるようなツベルクリン濃度に抵抗を示したとしても少しも不合理ではない。Fischer の成績はこのように解釈すれば説明がつくばかりでなく、彼の成績から見てアレルギー乃至免疫なる現象を示す要因は細胞自身にあると解釈する事も可能になつて来る。それは兎も角として、これまで組織培養実験に用いられて来た細胞は、一口に免疫細胞と云つても細胞を採取した動物自体の免疫度には強弱色々あり、その程度は実験者ごとに異なつたものとするのが妥当であろう。云い換えれば細胞の持つ sessil の抗体量が実験者ごとに違つているばかりでなく、用いられたツベルクリン量(濃度)もまた学者によつて一定していない。組織培養においてツベルクリンが結核細胞に対し toxic な効果を示す為には可なり大量のツベルクリンが必要で、Fabrizio²⁶⁾によれば同じ動物にツベルクリン皮膚反応を惹起せしめる量の1000倍にも及ぶ量が必要であり、Rich & Lewis も彼らの実験において可なりのツベルクリン量を必要とした事を認めている。かくの如く抗原及び抗体の量的関係如何が実験結果を左右する事は容易に想像し得るところであり、これまで一致した成績が得られていない大きな原因はかかる量的問題にあるのではないかと著者は考える。この点を明らかにするには免疫度を異なる色々な動物から細胞を採取し、細胞のツベルクリン

に対する過敏性の発現をもつと定量的に観察する必要がある。然しかかる研究はツベルクリン過敏性の主体が細胞にある事を確立した後の問題であり、且本実験において観察した如き細胞と血清との色々な組合せのほかに細胞の免疫度までを加味した組合せを作る事は余りにも実験が複雑になるので、著者はツベルクリン過敏性惹起因子が細胞性のものであるか体液性のものであるかを先づ検討する目的でここに報告した如き実験を行つた。その結果著者は以上述べた如く細胞説をとるに至つたものである。

懸つて考えてみるに、ツ反応は一般に知られている如く血清による被動感作が成立しない。この事は Arthus 型の皮膚過敏性とツベルクリン型のそれとの大きな相違点とされていると共に、ツ反応に関与する抗体が体液性のものではなく細胞鉤着性のもと考えられている所以である。ツ反応抗体が sessil のものである実験的証明として Chase³²⁾は tuberculin-sensitive の動物から得た細胞をもつてツ反応の passive transfer に成功しその後多くの学者^{54)~60)}がこれを追試確認しているが、本論文において著者の観察した事実はツ反応抗体が sessil のものである事を組織培養によつて証明したものであり、Chase らの報告及び教室の荻田⁴⁶⁾の行つた実験を側面から支持するものである。

なお *in vitro* におけるツベルクリン過敏性の現われ方と動物のツベルクリン皮膚アレルギーとの間には理論上平行関係があつて然るべきであるが、本実験においては必ずしも密接な関係があるような結果は得られていない。然しながらツベルクリンに対するアレルギーの発現は、既に述べた如く、抗原たるツベルクリンとこれに対する sessil の抗体との量比によつて強く左右されるものであるから、かかる量的関係の解析を行わない限り正しい結論は得られない。組織培養法におけるかかる解析的研究は今後に残された問題であり、更に進んで量的な factor を考慮に入れた結核組織と結核菌との組合せによる組織培養の研究によつて、結核アレルギーの本態は一層明らかになるものと考えている。

結 論

細胞浮游液培養法によつて正常並びに結核死菌免疫海猿の脾細胞及び腹腔内滲出細胞を試験管内に培養し、これら細胞のツベルクリンに対する過敏性の現われ方を観察した。即ちツベルクリンと共に正常又は結核免疫血清をこれら細胞に加え、それぞれの場合に見られる細胞数の増加又は減少を観察する事によつてツベルクリン過敏性の有無を判定したが、得たる結果は次の如くである。

1) 正常細胞をツベルクリン (10 倍稀釈) と共に組織培養した場合、これに加えられた血清が正常動物から得たものでも免疫動物から得たものであつても、細胞数は増加しツベルクリンによる細胞傷害は認められなかつた。これに反し免疫細胞は、これに加えられた血清が正常血清たると免疫血清たるとを問わず、ツベルクリンによつて同程度の傷害を受け、顕著な細胞数減少を来たした。

2) 正常細胞又は免疫細胞を馬血清及び 10 倍ツベルクリンと共に培養した場合は、後者においてのみ顕著な細胞数減少が認められた。

3) ツベルクリンによる細胞傷害に対し、補体の添加は何ら影響を与えなかつた。

4) 以上の成績から見てツベルクリン過敏性惹起因子は体液性のものでなくて細胞性のもと考えられる。

稿を終るに当り、終始御指導、御校閲を頂いた恩師大原教授に深甚なる感謝を捧げる。又組織培養法について御教示を頂いた本研究部病理部森川教授、種々御助言を頂いた予防部山本講師、病理部奥山博士の御教示を感謝する。尚論文の要旨は昭和 34 年 4 月、第 31 回日本細菌学会総会 (岡山) において述べた。

引用文献

- 1) Holst, P.M.: *Tubercle*, 3, 249, 289, 337, 1922.
- 2) Rich, A.R. & Lewis, M.R.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 25, 596, 1928.
- 3) Rich, A.R. & Lewis, M.R.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 50, 115, 1932.
- 4) O'Neill, E. F. & Favour, C. B.: *Am. Rev. Tuberc.*, 72(5), 577, 1955.
- 5) Earle, W.R.: 文献 6) より引用
- 6) 勝田 市: 組織培養法 (納谷書店) p. 95~115, 1955.
- 7) Harrison, R.G.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 4, 140, 1907.
- 8) Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, 15, 516, 1912.
- 9) Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, 17, 14, 1913.
- 10) Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, 38, 407, 1923
- 11) Carrel, A.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 102, 742, 1929.
- 12) Fischer, A.: "Tissue culture". *Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro.* Levin & Munksgaard, Copenhagen, 1925.
- 13) Fischer, A.: "Gewebezüchtung". *Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro.* pp. 653, Müller & Steinicke, München, 1930.
- 14) Fischer, A.: *Ztschr. f. Immun-forsch. u. exp. Therap.*, 56, 24, 1928.
- 15) Robbins, F.C., Weller, T.H. & Enders, J. F.: *J. immunol.*, 69, 673, 1952.
- 16) Miller, J.M., Favour, C.B., Wilsons, B.A., & Umbarger, M.A.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 70, 738, 1949.
- 17) Baldrige, G.D. & Kligman, A.M.: *Am. Rev. Tuberc.*, 63, 674, 1951.
- 18) Marks, J. & James, D.M.: *J. Hyg.*, 51, 340, 1953.
- 19) Jacobi, F. & Marks, J.: *J. Hyg.*, 51, 541, 1953.
- 20) Cruickshank, C.N.D.: *Nature*, 168, 206, 1951.
- 21) Stewart, F.W., Long, H. & Bradley, J.I.: *Am. J. Path.*, 2, 47, 1926.
- 22) Aronson, J.D.: *J. Exp. Med.*, 54, 387, 1931.
- 23) Heilman, D.H., Feldman, W. H. & Mann, F. C.: *Am. Rev. Tuberc.*, 50, 344, 1944.
- 24) Heilman, D. H. & Seibert, F. B.: *Am. Rev. Tuberc.*, 53, 71, 1946.
- 25) Witte, S.: *Beitr. Klin. Tbk.*, 104, 252, 1950.
- 26) Fabrizio, A. M.: *Am. Rev. Tuberc.*, 65, 250, 1952.
- 27) Moen, J.K. & Swift, H.F.: *J. Exp. Med.*, 64, 339, 1936.
- 28) Wells, A.Q. & Wylie, J.A.H.: *Lancet*, 1, 439, 1949.
- 29) Favour, C.B.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 60, 369, 1946.
- 30) Fremont-Smith, P. & Favour, C.B.: *Ibid*, 67, 502, 1948.
- 31) Miller, J.M.: *Ibid.*, 71, 287, 1949.
- 32) Favour, C.B., Fremont-Smith, P. & Miller, J. M.: *Am. Rev. Tuberc.*, 60, 212, 1949.
- 33) 大原 達・中川駿一郎: 東京医事新誌, 68 (12), 5, 昭 26.
- 34) 大原 達・中川駿一郎: 結核, 26, 502, 1951. (抄録)
- 35) 大原 達・中川駿一郎: 日本細菌学雑誌, 6 (3), 176, 1951. (抄録)
- 36) 大原 達・中川駿一郎・池端 隆: アレルギー, 1(1), 29, 昭 27.
- 37) 大原 達・中川駿一郎: 結核, 27, 104, 1952. (抄録)
- 38) 大原 達・高瀬 一・池端 隆・荻田友雄・谷野政次・中川駿一郎: 結核の研究, 1, 39, 昭 28.
- 39) 大原 達・池端 隆・谷野政次・荻田友雄: 日本細菌学雑誌, 9 (8), 664, 1954. (抄録)
- 40) 大原 達・高瀬 一・池端 隆・荻田友雄: アレルギー, 2(5), 268, 1954. (抄録)
- 41) 大原 達: アレルギー, 4 (1), 1, 1955.
- 42) 大原 達・荻田友雄・板倉益夫: アレルギー, 4 (2), 177, 1955. (抄録)
- 43) 大原 達・池端 隆・荻田友雄: 結核の研究, 3, 70, 1955.
- 44) 大原 達: 結核の臨牀, 3 (9), 528, 1955.
- 45) 大原 達: 臨牀の日本, 2 (4), 279, 1956.
- 46) 荻田友雄: アレルギー, 5 (1), 30, 1956.

- 47) 大原 達: 最新医学, 11 (7), 1518, 1956.
48) 大原 達: アレルギー, 5 (1), 30, 1956.
49) 大原 達・平野五郎・沼田達夫: アレルギー, 6 (5), 374, 1958. (抄録)
50) Ohara, T. & Nakagawa, S.: Jap. J. Tuberc., 1 (1), 32, 1953.
51) Ohara, T., Nakagawa, S. & Ikehata, T.: Jap. J. Tuberc., 2 (1), 116, 1954.
52) Ohara, T., Ikehata, T. & Ogita, T.: Jap. J. Tuberc., 3, 101, 1955.
53) Chase, M.W.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 59, 134, 1945.
54) Cummings, M. M., Hoyt, M. & Gottshall, R. Y.: Publ. Health Rep., 62, 994, 1947.
55) Kirchheimer, W.F. & Weiser, R.S.: Proc. Exp. Biol. Med., 66, 166, 1947.
56) Kirchheimer, W.F. & Weiser, R.S.: Ibid., 68, 407, 1948.
57) Kirchheimer, W.F. & Weiser, R.S.: Ibid., 70, 99, 1949.
58) Lawrence, H.S.: Ibid., 71, 516, 1949.
59) Metaxas, M.N. & Metaxas-Buehler, M.: Ibid., 69, 163, 1948.
60) Metaxas, M. N. & Metaxas-Buehler, M.: J. immunol., 75, 333, 1955.
61) Schmid, F.: Beitr. Klin. Tbk., 105, 397, 1951.
62) Schmid, F. et al: Ibid., 108, 237, 1953.
63) Stavitsky, A.B.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 67, 225, 1948.
64) Walzer, M. & Glazer, I.: Ibid., 74, 772, 1950.
65) Kourilsky, R., Decroix, G. & Ganter, P.: Rev. immunol., 16, 333, 1952.
66) Wesslen, T.: Acta tuberc. Scandinav., 26, 38, 1952.