



Title	細胞浮游液培養法によるツベルクリンアレルギーの実験的研究：第1報 培養手技及びツベルクリンによる細胞増殖抑制の際における補体の意義
Author(s)	伊藤, 幹夫; ITO, Mikio
Description	
Citation	結核の研究, 7, 82-85
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26632
Type	departmental bulletin paper
File Information	7_P82-85.pdf



細胞浮游液培養法によるツベルクリンアレルギーの実験的研究

第 1 報

培養手技及びツベルクリンによる細胞増殖抑制の際における補体の意義

伊 藤 幹 夫

(北海道大学結核研究所病理部 指導 森川和雄助教授)

結核免疫動物の体細胞がツベルクリンに感受性を有することは単に皮膚におけるツベルクリン反応のみならず、或いは漿液膜、肺、その他の臓器におけるアレルギー反応として認められて来ている。一方 Rich¹⁾, Aronson²⁾ 一派によつて、同様の事実が試験管内においても認められたわけで、即ち脾、骨髄培養組織にツベルクリンを添加することによつて、組織の増殖、細胞遊出が抑制されることを報じている。更にこの様な事実は通常の蛋白感作動物細胞にその特異抗原の添加では起らず、ツベルクリン型アレルギーに特異なものであることを述べている。この様な成績はその後多数の追試者^{3~6)} によつて確認されているが、Favour⁷⁾ 一派は、結核免疫動物白血球浮游液にツベルクリンを加えて、細胞の融解壊死の起ることを多角的に検討している。

しかしこの様な成績に対して全面的な確認がえられていないわけではない。Lasfargues⁸⁾, Baldridge⁹⁾ その他の反対論者もいるし、又 Waksman¹⁰⁾ は、卵白アルブミン抗原及び抗体系においても、同様の細胞壊死の事実が認められることを報告している。しかも興味あることは、その際に血清補体を必要とする事である。この事実が発表されて以来、ツベルクリン融解は補体を必要としないし、アルブミン融解は補体を必要とする一両者は全く別の機構によつているとの考え方も出ている。しかし Rich, Aronson 時代の組織培養培地にはヘパリン加血漿が使われているわけで、当然補体の参加を否定するわけには行かない。

この様な矛盾を解決する方法として、著者はアレルギー性細胞壊死の際の補体の役割を知るべく、両アレルギー反応系を用いて実験してみたわけである。

尚今迄にこの様な実験に用いられた材料は Favour その他の白血球を除いては、組織片のままであつて、その培養時増殖の程度、遊出の程度は主として増殖帯、遊出帯の面積でもつて判定していたわけである。しかしながらこのような面積の測定からの判定は定量的な実験には不向き

であり、又原組織の面積を一定に保つことにも非常に困難に遇する。即ち同一条件の下で一定の成績を出す迄には相当の熟練を要するものであり、尚且組織片の細切そのものも、場所と切り方による因子の介入をまぬがれ難い。従つて従来の方法にはたしかに不満足の点が多いと感ぜられる。そこで著者は、細胞浮游液培養法を用い、培養細胞の絶対数の増減で細胞増殖或いは抑制過程を判定しようと考えたのである。以下この培養手技の説明と、それによつて得た細胞増殖性抑制の際の補体の役割の成績を述べる。

実験材料及び方法

1. 動物は全て 2 kg 前後の白色雄性家兎を使用した。
2. 卵白アルブミンは本研究室において卵白より Cole の記載法に従つて 3 回精製したものを使用した。
3. 免疫に用いた BCG は本研究所保存株を用いた。
4. 非働化血清は 56° 30 分加温したものを用いた。
5. 家兎に対する卵白アルブミン感作は前記アルブミン 1% 溶液を、3 ml 宛隔日 3 回臀部皮下注射によつて行つた。
6. BCG 免疫は BCG 浮游液 20 mg/ml を 0.5 ml 宛隔週 2 回左右の大腿部皮内に接種して行つた。
7. 浮游液培養法：勝田¹¹⁾ に記載の方法に大体準じた。

① 浮游液の調製

全採血で死亡した直後、無菌的に脾を取出し、冷却 Rinaldini 液 (Ca, Mg を含まない塩類溶液) で洗い、鋏で細切し、小硝子玉を入れた沈降管に 2% trypsin 溶液 (持田製薬) (pH 7.8 に調製) を入れ 37°C 30 分加温、その間 5 分毎に振盪、2500 rpm 5 分間遠沈、沈渣の中央よりやや上に近い淡黄色の層をペピットでとり、Tyrode 液に入れ、1500 rpm 5 分で数回洗滌、之を 80, 150 メッシュの金網を通し、細胞塊を除く、之に必要とする量迄 Tyrode 液を加える。

② 培養法

液体培地は鶏胚浸出液 3, 血清 (自家血清を用いた) 3, Tyrode 液 4 の割合に混合し, pH を 7.6 に調整した。

前記細胞浮游液を 0.5 ml 宛培養管 (肉厚スピッツグラスで 0.5, 1.0 ml の ring mark の入っているもの) に分注し, 上記液体培地を 1 ml 加えて密栓, 5° の傾斜を持たせ, 37°C で静置培養を行つた。

③ 培養液の交換

培地は隔日に交換した。先づ培養管を 1,000r pm 10 分遠心し, 上清 1 ml を捨て, 新培地 1 ml を加える。

④ 細胞数算定法

培養開始時はそのまま, 培養後は遠心後 0.5 ml を残したものに 8 倍量のクリスタル紫, クエン酸溶液を加え, 37°C 30 分間振盪器で振盪, 1500 rpm で遠心, 1 ml が残る様に上清を捨て, 残りを攪拌し均等な浮游液とし, 血球計算板で, 核数を算え培養管内の総細胞数を算定する。この場合核はクリスタル紫で染まるが, 死んだもの又は死にかけてものは核が崩壊しているので数に加えない。尚 1 回の判定には同条件のもの 3 本の培養管の各々を夫々 3 回宛計算したものを平均して記載した。

8. 抗原添加法

培養細胞に対する抗原の作用を見るために液体培地に抗原を加えた。即ちツベルクリンの場合は Tyrode 液そのものが 100 倍稀釈液になるように旧ツベルクリンを加え, 卵白アルブミンの場合は同様に 0.1% になるように結晶卵白アルブミンを加えて実験した。

成 績

1 予備実験

先づ非働化しない血清を用いて予備実験を行つた。

① 正常家兔脾細胞に対するツベルクリン (T) 及び卵白アルブミン (A) の作用

第 1 表の如く, 同一浮游液にツベルクリン又は卵白アルブミンを加えた場合 2 日目にも, 又一週間目にも殆んど差異を認めなかつた。

第 1 表

	培養開始時	2 日	7 日
正常培地	90,000	180,000	520,000
T 加培地	90,000	170,000	520,000
A 加培地	90,000	180,000	510,000

② 二重感作家兔脾細胞に対するツベルクリン又は卵白アルブミンの作用

ECG 免疫動物を更に卵白アルブミンで感作した例 (ECG 接種後 40 日, 卵白アルブミン感作後 21 日に相当) の脾について調べた。

第 2 表

	培養開始時	2 日	4 日	7 日
正常培地	30,000	50,000	80,000	190,000
T 加培地	30,000	30,000	30,000	50,000
A 加培地	30,000	30,000	30,000	40,000

第 2 表の如く, 非働化しない血清を使うと, ツベルクリンにも又卵白アルブミンにも感受性を有し, 共に増殖が明らかに抑制される事を認めた。

2 非働化実験

液体培地に使用する血清を非働化して, 前実験同様に抗原の作用を調べた。

① BCG 免疫家兔脾に対するツベルクリンの作用

第 3 表

血清処置	添加	前	2 日	4 日	7 日
—	—	201,000	314,000	333,000	369,000
—	T	201,000	286,000	303,000	311,000
非働化	—	201,000	333,000	354,000	378,000
非働化	T	201,000	322,000	345,000	381,000
—	—	60,000	101,000	121,000	139,000
—	T	60,000	86,000	96,000	100,000
非働化	—	60,000	99,000	133,000	144,000
非働化	T	60,000	100,000	131,000	142,000

この様に対照の未処置血清例では T の作用が表われているが, 非働化血清を用いると, その作用が認められない。

② 卵白アルブミン感作家兔脾に対する同抗原の作用
卵白アルブミン感作終了後 21 日目の脾について同様に調べた。

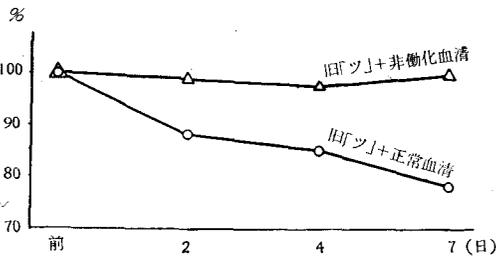
第 4 表

血清処置	添加	培養開始時	2 日	4 日	7 日
—	—	17,000	34,000	59,000	72,000
—	A	17,000	24,000	28,000	29,000
非働化	—	17,000	35,000	58,000	72,000
非働化	A	17,000	33,000	58,000	78,000

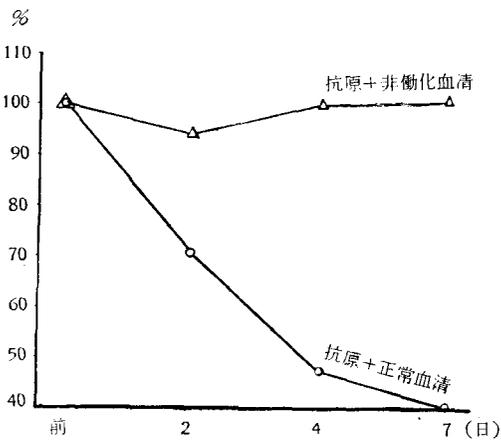
第 4 表の如く卵白アルブミン例においても非働化の有無が増殖抑制に大きく影響していることがわかつた。

以上の成績から培養前の数に対する増殖率を求めて之を抗原添加しない増殖率と比較した比較増殖率を血清非働化の有無について夫々図示すれば第 1, 2 図の如くなる。之からもわかる通り明らかに補体の参与が必要な事実を物語っている。

第1図 BCG 免疫兔脾細胞に対する旧ツベルクリンの作用—血清の非働化と比較増殖率



第2図 卵白アルブミン感作兔脾細胞に対する同抗原の作用—血清の非働化と比較増殖率



考 按

1. 培養方法について

前述の如く、従来の方法とは異り本法は種々の便宜な点が含まれており、優秀な方法と考えられるが、しかしこの方法にも更に検討を要する2, 3の問題が内蔵されている。先ず浮游液の調整の際の *trypsin* 消化であるが、細胞膜自体に対する *trypsin* の作用は否めない。少し時間を長くすると全ての細胞は増殖出来ない状態に立到りし、短時間であると充分に組織が解離せず、殊に脾の如く、多種類の細胞が含まれる臓器の場合、遊離し易い細胞のみが培養の材料になるおそれがある。次に同じ細胞について多数回の遠心操作は一般の細胞は勿論殊に細胞性アレルギー反応を起している場合には尚更障害性に働くことが考えられる。又クリスタル紫による核染色についても、既に崩壊し核の露出してしまったものと、同染色液中のクエン酸によつて裸核となつたものとは必ずしも正確には分別し難い場合がある。その為著者は一般に振盪時間を長く(殊に培養後の細胞数算定の場合)行つて、既に胞体の崩れたものに対する作用を強くして、一応の区別をすることが出来

た。最後に培養管壁に細胞の附着の問題がある。

培養法そのものにはローラーチューブを用いる法と静置培養法とがあるが、著者の基礎実験では静置培養法が増殖にはすぐれていることがわかつた。従つて静置した培養管下面には相当数の細胞が附着する。従つてクリスタル紫加振盪はどうしても長時間行わねばならない。著者は孵卵器中で 1/25 IP モーターに小試験管立を連結し、振幅約 30 mm, 毎分 180 回位の振盪法で行つたもので、大体満足すべき装置と考えている。

以上の様に、この培養法にも夫々の場合に応じた基礎実験を行つて、それに従つた最も良い方法を適切に考える必要があり、著者の方法にもまだまだ改良すべき余地があると考えている。

2. アレルギー性細胞崩壊における補体の役割について

前述の如くツベルクリン型に感作された動物の細胞がツベルクリンに *in vitro* で死滅させられ、Arthus 型アレルギーでは見られないとの事実は随分古くから知られている。しかしその際の補体の役割についての知見は比較的新しく、Favour, Waksman 等によつて始めて唱えられたものである。Favour¹²⁾ らはツベルクリン反応陽性者の白血球に補体を除いた患者血漿を加えた場合、ツベルクリンは作用を及ぼさず、之にツベルクリン反応陰性者からとつた補体を加えると細胞融解が起ると述べており、ツベルクリン型においても補体を必要とすることを強調してのわけである。一方 Waksman⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾ は前記の如く Favour の方法を用うれば卵白アルブミン感作の場合も補体の存在さえあれば確実に細胞壊死が起ることを述べ、更に脾、リンパ節の組織培養実験ではツベルクリンの作用には補体を必要としないと述べているのである。

このような3種類の報告を通覧すると、Waksman の述べる如く、恰も Favour の *lympholysis* と Rich らの組織増殖抑制は全く異つた機構に属するとの考えをおしたくなるのである。そこで組織間の連続性をたち、条件的には白血球の場合と同様な浮游液培養法がこの間の説明を与えてくれると考えた次第である。

著者の成績は一言にして言えば、ツベルクリン型でも Arthus 型でも、特異抗原による細胞壊死は共に起りうるものであるし、又その際には共に補体を必要とすると云うことである。Waksman は増殖抑制は大食細胞、線維芽細胞、肝細胞等について見られ、細胞壊死は血球、殊にリンパ球、多核球だけに見られると云つてゐるが、之は著者の成績と一応反している。只著者は、脾培養時に増殖する細胞の種類を、ここに発表出来る程度に迄まとめない。この問題については次報にゆずる。但し、リンパ球、

多核球が脾の培養時に著しく増殖する能力を有しているかと云うことが疑問であるし、又検鏡によつて、之らよりも遙かに大型の細胞が多数認められたことだけ附記しておく。

今回の実験には不十分な点が多し、次報以下においてその不足分を補足して行くつもりである。

結 論

細胞浮游液培養法を用いて感作家兔脾細胞に対する特異抗原の作用を調べ、特にその際の補体の役割について実験的研究を行つた。

1. 正常家兔脾細胞増殖に対し、旧ツベルクリン及び卵白アルブミンは作用を及ぼさない。

2. BCG 免疫家兔脾細胞増殖に対し、旧ツベルクリンは強い抑制効果を及ぼした。その際、液体培地に非働化血清を用いると、この作用が表れなかつた。

3. 卵白アルブミン感作家兔脾細胞増殖に対し、卵白アルブミンは強い抑制効果を示し、その際ツベルクリンの場合同様やはり補体が必要であることがわかつた。

4. 以上の成績について及び培養手技について若干の考察を行つた。

引 用 文 献

- 1) Rich, A. R. & Lewis, M. R. : Eull. Johns Hopkins Hosp., **50**, 115 (1952)
- 2) Aronson, J. D. : J. Immunol., **25**, 1 (1933)
- 3) Moen, J. D. & Swift, H. F. : J. Exper. Med., **64**, 339 (1936)
- 4) Heilman, D. H., Feldman, W. H. & Mann, F. C. : Amer. Rev. Tuberc., **50**, 344 (1944)
- 5) Heilman, D. H. & Seibert., F. B. : Ibid., **53**, 71 (1946)
- 6) Heilman, D. H. & Feldman, W. H. : Ibid., **54**, 312 (1946)
- 7) Favour, C. B. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **56**, 269 (1947)
- 8) Lasfargues, E., Boquet, P. & Delaunay, A. : Ann. Inst. Pasteur, **73**, 169 (1947)
- 9) Baldrige, G. D. & Klingman, A. M. : Amer. Rev. Tuberc., **63**, 674 (1951)
- 10) Waksman, B. H. : J. Immunol., **70**, 331 (1953)
- 11) 勝田 甫 : 組織培養法, 納谷書店, 東京 (1955)
- 12) Miller, J. M., Vaughan, J. H. & Favour, C. B. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **71**, 592 (1949)
- 13) Waksman, B. H. : Amer. Rev. Tuberc., **68**, 746 (1953)
- 14) Waksman, B. H. & Bocking, D. : Am. Rev. Tuberc., **69**, 1002 (1954)